



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO TECNOCAT

KAUANA NUNES DE ALMEIDA

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE LEPIDILINA COMO POTENCIAIS AGENTES
CITOTÓXICOS**

Porto Alegre

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO TECNOCAT

KAUANA NUNES DE ALMEIDA

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE LEPIDILINA COMO POTENCIAIS AGENTES
CITOTÓXICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

Orientador

Dr. Vinícius Demétrio da Silva

Co-orientador

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Almeida, Kauana Nunes de
SÍNTESE DE DERIVADOS DE LEPIDILINA COMO POTENCIAIS
AGENTES CITOTÓXICOS / Kauana Nunes de Almeida. --
2022.
45 f.
Orientador: Henri Stephan Schrekker.

Coorientador: Vinícius Demétrio da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Química, Bacharelado em Química, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Sal imidazólico. 2. Câncer. 3. Agente
citotóxico. 4. Derivados Lepidilina. 5.
Quimioterápico. I. Schrekker, Henri Stephan, orient.
II. Silva, Vinícius Demétrio da, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

KAUANA NUNES DE ALMEIDA

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE LEPIDILINA COMO POTENCIAIS AGENTES
CITOTÓXICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso

Aprovado pela banca examinadora em 05 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker
Orientador

Prof.^a Dr.^a Cristiane Pontes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Me. Fernando Mendonça Diz
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que estiveram comigo nesta jornada muito doida que finalmente está chegando ao fim. Em especial para minha mãe que sempre me apoiou e me incentivou a terminar a faculdade, com certeza sem ela seria difícil. Ao meu namorado que me aturou nos surtos e também sempre me apoiou e esteve ao meu lado. Ao meu filho de quatro patas Zeca que sempre me animava e me distraía. Aos amigos que entendiam quando não podia ir para os “rolês” e aos que me ajudaram nem que fosse com alguma palavra de apoio.

Aos colegas do laboratório TECNOCAT que ajudaram nas análises, que desligaram as reações e me ajudaram nas interpretações, em especial ao Igor e a Laura. Ao meu orientador pela paciência e dedicação em me ajudar a resolver os problemas. Ao meu co-orientador que mesmo distante fisicamente sempre respondeu aos meus questionamentos o mais rápido possível. A empresa Pró-Análise, onde faço estágio, pelo suporte e apoio.

Ao parceiro Fernando Diz do laboratório LAFAP da PUC/RS, pelas análises complementares ao meu trabalho, sem elas não seria possível verificar o potencial antitumoral do TCC.

RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais mata atualmente, prevê-se que nos próximos anos haja um aumento de 70 % de câncer no mundo. A busca por novos tratamentos é de extrema importância, por isso, as pesquisas na área se tornam essenciais. Pensando nisso, foi verificado que as raízes da Lepidilina (*Lepidium meyenii*), demonstram um potencial anticancerígeno contra um painel de linhas celulares humanas. Com isso, o presente trabalho descreve a síntese de sais imidazólicos (SI) cloreto de 1-benzil-3-decilimidazolio (**C₁₀BnlmCl**) e cloreto de 1-benzil-3-hexadecilimidazolio (**C₁₆BnlmCl**), que foram planejados como derivados da Lepidilina, através de uma metodologia simples. A obtenção dos SI realizou-se em duas etapas, onde primeiramente faz-se a alquilação do produto neutro. Para isto, realizou-se a adição de hidreto de sódio em atmosfera inerte em uma solução de tetraidrofurano com 1-imidazol, cuidadosamente e após adicionou-se o cloroalcano com a cadeia alquilar desejada, 1- clorodecano e 1- clorohexadecano, assim obtém-se os produtos neutros, alquilimidazóis. Após faz-se a segunda etapa da alquilação dos alquilimidazóis com cloreto de benzila em tolueno sob atmosfera inerte, para a formação dos SI. Os SI foram caracterizados pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (RMN), ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência. Através das caracterizações foi verificada a formação e a pureza dos SI **C₁₀BnlmCl** e **C₁₆BnlmCl**. A avaliação citotóxica foi realizada no laboratório LAFAP, foram usadas células U87MG, U251MG, M059J e Vero, e a viabilidade celular foi medida através das técnicas de redução do MTT. Os SI exibiram citotoxicidade para as células tumorais, porém apresentaram baixa citocompatibilidade para a célula Vero. O SI **C₁₀BnlmCl** na concentração de 2 µg/mL para a célula U251 foi o que obteve melhor relação entre a citotoxicidade e a citocompatibilidade da célula Vero. Pelos resultados podemos verificar que há um potencial dos SI formados para uma possível aplicação como agentes antitumorais, porém mais testes na área são necessários.

Palavras chaves: Sal imidazólico; Câncer; Agente citotóxico; Derivados Lepidilina; Quimioterápico.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that kills the most today, it is predicted that in the coming years there will be a 70% increase in cancer worldwide. The search for new treatments is extremely important, therefore, research in the area becomes essential. With this in mind, it was found that the roots of Lepidillin (*Lepidium meyenii*) demonstrate an anticancer potential against a panel of human cell lines. Thus, the present work describes the synthesis of imidazole salts (SI) of 1-benzyl-3-decylimidazolium chloride (**C₁₀BnImCl**) and 1-benzyl-3-hexadecylimidazolium chloride (**C₁₆BnImCl**), which were planned as derivatives of Lepidillin, through of a simple methodology. Obtaining the SI was carried out in two stages, where first the alkylation of the neutral product is carried out. For this, the addition of sodium hydride was carried out under an inert atmosphere in a solution of tetrahydrofuran with 1-imidazole, carefully and then the chloroalkane with the desired alkyl chain, 1-chlorodecane and 1-chlorohexadecane, was added, thus obtaining if neutral products, alkylimidazoles. After that, the second stage of alkylation of the alkylimidazoles with benzyl chloride in toluene is carried out under an inert atmosphere, for the formation of the SI. The SI were characterized by ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques, melting point, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) and fluorescence spectroscopy. Through the characterizations, the formation and purity of the SI **C₁₀BnImCl** and **C₁₆BnImCl** were verified. Cytotoxic evaluation was performed at the LAFAP laboratory, using U87MG, U251MG, M059J and Vero cells, and cell viability was measured using MTT reduction techniques The SI exhibited cytotoxicity for tumor cells, but showed low cytocompatibility for the Vero cell. The SI **C₁₀BnImCl** at a concentration of 2 µg/mL for the U251 cell showed the best relationship between cytotoxicity and the cytocompatibility of the Vero cell. From the results we can verify that there is a potential of the SI formed for a possible application as antitumor agents, but more tests in the area are necessary.

Keywords: Imidazole salt; Cancer; cytotoxic agent; Lepidillin Derivatives; chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sais imidazólicos isolados das raízes *Lepidium meyenii*. 13
- Figura 2** - Classificação dos LI de acordo com as propriedades físicas, químicas e físico-química. 17
- Figura 3** - Espectro de ^1H RMN do produto C_{10}Im feito em CDCl_3 , obtido no programa MestReNova, com deslocamento químico RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.93 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.77 (p, J = 7.1 Hz, 2H), 1.28 (d, J = 15.3 Hz, 14H), 0.92 – 0.83 (m, 3H). 31
- Figura 4** - Espectro de RMN ^1H do produto C_{16}Im feito em CDCl_3 , obtido no programa MestReNova, com deslocamento químico RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 3.94 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.80 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.32 – 1.26 (m, 26H), 0.92 – 0.88 (m, 3H). 32
- Figura 5** - a) espectro de RMN ^1H do SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ feito em DMSO-d_6 , obtido pelo programa MestReNova. b) espectro de RMN ^{13}C do SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ feito em DMSO-d_6 , obtido pelo programa MestReNova 33
- Figura 6** - a) espectro de RMN ^1H do SI $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ feito em DMSO-d_6 , obtido pelo programa MestReNova. b) espectro de RMN ^{13}C do SI $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ feito em DMSO-d_6 , obtido pelo programa MestReNova 35
- Figura 7** - Espectro de ATR do produto $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$. 36
- Figura 8** - Espectro de ATR-FTIR do produto $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$. 36
- Figura 9** - Ponto de fusão do $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$. 37
- Figura 10** - Espectro de Uv-Vis do sal imidazólico $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$. 38
- Figura 11** - Espectro de Uv-Vis do sal imidazólico $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$. 39
- Figura 12** - Espectro de fluorescência do sal imidazólico $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$. 40
- Figura 13** - Espectro de fluorescência do sal imidazólico $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$. 40
- Figura 14** - Viabilidade de células U251, U87, M059 e Vero, tratadas com os SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$, $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ nas concentrações de 0.2, 2.0 e 20 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas de tratamento (Teste t $p < 0,05$, em relação ao controle). 42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação de alquilação entre imidazol e o 1-clorodecano.	25
Esquema 2 - Reação de alquilação entre imidazol e o 1-clorohexadecano.	25
Esquema 3 - Reação entre o 1-decilimidazol e cloreto de benzila.	25
Esquema 4 - Reação entre o 1-hexadecilimidazol e cloreto de benzila.	26
Esquema 5 - Representação do princípio do ensaio de MTT.	28
Esquema 6 - Reação entre <i>H</i> -imidazol com hidreto de sódio.	30
Esquema 7 - Reação entre Na-imidazol e 1-clorodecano ou 1-hexaclorodecano.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

SI – Sais Imidazólicos

LI – Líquidos Iônicos

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

TMS – Tetrametilsilano

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

DMF – Dimetilformamida

THF – Tetraidrofurano

IFAs – Ingredientes Farmacêuticos Ativos

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	SAIS IMIDAZÓLICOS E LIQUIDOS IÔNICOS	14
2.2	LÍQUIDOS IÔNICOS COMO INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS	16
2.3	LÍQUIDOS IÔNICOS COMO POTENCIAIS AGENTES ANTITUMORAIS	17
2.5	CARACTERIZAÇÕES	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	MATERIAIS	22
4.2	MÉTODOS	22
4.2.1	<i>Síntese do 1-decilimidazólio (C₁₀Im)</i>	22
4.2.2	<i>Síntese do 1-Hexadecilimidazólio (C₁₆Im)</i>	23
4.2.3	<i>Síntese do Cloreto de 1-benzil-3-decilimidazólio</i>	23
4.2.4	<i>Síntese do Cloreto de 1-benzil-3-hexadecilimidazólio</i>	24
4.2.5	<i>Caracterização dos imidazóis e sais imidazólicos</i>	24
4.2.5.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	24
4.2.5.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	24
4.2.5.3	Ponto de fusão	24
4.2.5.4	Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis)	25
4.2.5.5	Espectroscopia de Fluorescência	25
4.2.6	<i>Avaliação da atividade citotóxica dos SI</i>	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO C ₁₀ IM E C ₁₆ IM	27
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO C ₁₀ BNIMCL E C ₁₆ BNIMCL	30
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS SI	39
6	CONCLUSÃO	41

1 INTRODUÇÃO

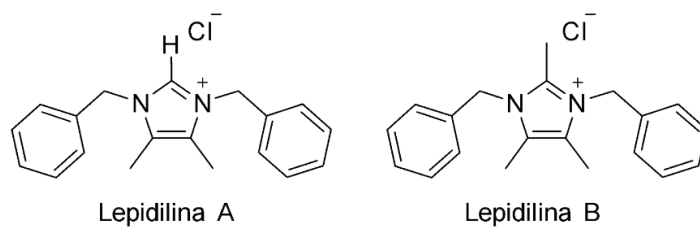
Segundo a OMS, o câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. Câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos, onde se dividem rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis.

A OMS indica que a incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e no aumento dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico. As terapias atuais resultam em vários efeitos colaterais, porque não são citocompatíveis para as células tumorais. Entretanto, o equilíbrio entre o efeito antitumoral e os efeitos secundários pode ser melhorado por modificações estruturais nas classes de substâncias com atividade antitumoral conhecida.

Os sais imidazólicos (SI) vêm sendo estudados em aplicações biológicas devido às suas excelentes propriedades, como a alta estabilidade térmica e química, baixa inflamabilidade, baixa volatilidade e em diversos casos, alta solubilidade em meio aquoso. Estudos apontam que assim como os surfactantes e biocidas, os SI podem causar danos a integridade da membrana plasmática. Em outras pesquisas são relacionadas a tensão superficial e atividade biológica dos sais. Existem evidências que demonstram que o comprimento de cadeia ligada ao nitrogênio do anel imidazólico exerce influência diretamente proporcional à eficiência antimicrobiana dos SI.

Alguns destes SI podem ser encontrados em produtos naturais, como a Lepidilina A e Lepidilina B (**Figura 1**), que podem ser isoladas das raízes de *Lepidium meyenii*. Segundo Zeng Yugen foram testadas a citotoxicidade da Lepidilina A e B contra um painel de linhas celulares de câncer humano, Lepidilina A mostrou-se fracamente ativo apenas contra a linhagem celular de carcinoma de ovário humano, em comparação, Lepidilina B mostrou atividade citotóxica significativa contra o carcinoma de bexiga humana, carcinoma pancreático humano e carcinoma de mama humano.

Figura 1 - Sais imidazólicos isolados das raízes *Lepidium meyenii*.



Fonte: (RIDUAN *et al.*, 2013)

Diante disto é proposto a síntese de SI com as características evidenciadas anteriormente, com um anel imidazólico e com uma cadeia alquílica longa. O presente trabalho divide-se em revisão bibliográfica, metodologia, discussão de resultados e conclusões

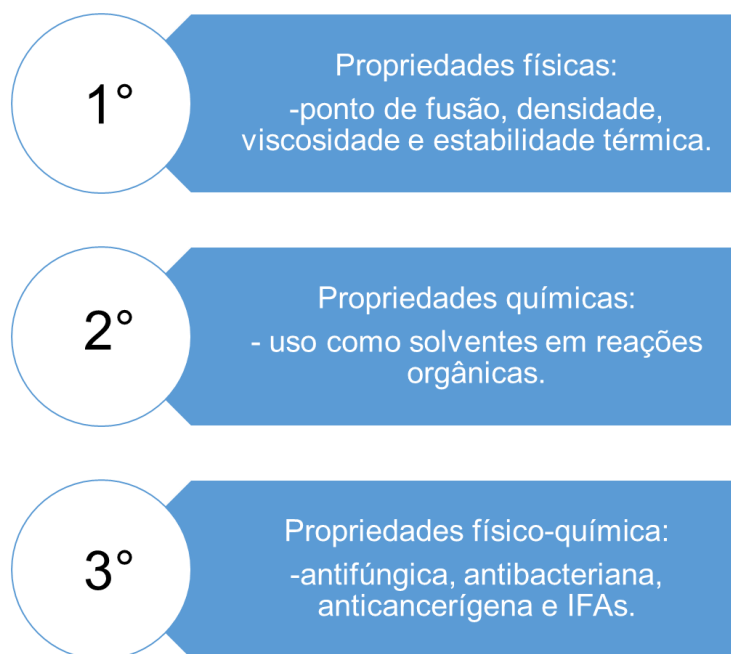
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SAIS IMIDAZÓLICOS E LIQUIDOS IÔNICOS

Os Sais Imidazólicos (SI) são sais orgânicos em que o cátion é derivado do anel imidazol, onde são sintetizados através da protonação ou alquilação dos nitrogênios do anel (COUTO, 2018). Diversos SI também são conhecidos como Líquidos Iônicos (LI), sendo que o anel imidazol é um dos principais cátions orgânicos utilizados na constituição dos LI assim como piridínio, amônio, fosfônio e guanidínio. Já os ânions podem ser de natureza orgânica ou inorgânica como halogenetos, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, *bis*(trifluorometilsulfonyl)imida e acetato. Os LI possuem ponto de fusão de 100 °C ou menor, podendo ser usados como solventes verdes devido à sua baixa pressão de vapor, além de alta estabilidade térmica e química, baixa inflamabilidade, baixa volatilidade e alta solubilidade em meio aquoso (RIDUAN *et al.*, 2013).

Desde o século 21 os LI têm sido estudados e podem ser divididos em três classificações, de acordo com as suas propriedades e aplicações conforme **Figura 2**. Na primeira classificação podemos agrupar os LI tendo em consideração as suas propriedades físicas, como o ponto de fusão, densidade, viscosidade e estabilidade térmica. Já na segunda classificação são englobadas as propriedades químicas, como solventes em síntese orgânicas. A terceira classificação é mais recente, demonstra o uso na síntese de LI modificando as suas estruturas físico-químicas para aplicação em atividades biológicas, antifúngica, antibacteriana, antitumoral e em Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) (COUTEIRO, 2017).

Figura 2 - Classificação dos LI de acordo com as propriedades físicas, químicas e físico-química.



Fonte: Adaptado de (COUTEIRO, 2017).

Na década de 1970, esses compostos foram utilizados como catalisadores em reações orgânicas e também como solventes. Já em 1980 o grupo de Wilkes sintetizou o 1,3-dialquilimidazólio para ser utilizado como eletrólito de baterias. No início da década de 1990, Wilkes e Zaworotko, descreveram a síntese de sais líquidos à temperatura ambiente e estáveis na presença de água. Após alguns anos Souza, Dupont e colaboradores descreveram a síntese de LI a base de 1-butil-3-metilimidazólio, estes novos LI possibilitaram a aplicação em processos de catálise bifásica (SILVA, 2004).

Desde então várias aplicações e atividades biológicas dos SI tem sido demonstradas, como antimicrobiana (RIDUAN *et al.*, 2013), antifúngica (LIU *et al.*, 2013), antitumoral (RIDUAN *et al.*, 2013), antioxidante (RIDUAN *et al.*, 2013), antifibrosa (RIDUAN *et al.*, 2013), bioengenharia (liberação droga/gene ou biosensores) (RIDUAN *et al.*, 2013), anti-inflamatória (FANG *et al.*, 2010), entre outras (SCHREKKER, 2016).

Como observamos, os SI podem ser utilizados em várias aplicações químicas e farmacêuticas, devido as suas propriedades físicas, químicas e físico-químicas que permitem modificações estruturais, tanto no cátion como no ânion ou pela

incorporação de um grupo funcional específico nos íons constituintes (SCHREKKER, 2016).

2.2 LÍQUIDOS IÔNICOS COMO INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

Por definição, os insumos farmacêuticos ativos (IFAs), do inglês “*active pharmaceutical ingredients (APIs)*”, são moléculas ou produtos químicos orgânicos ou inorgânicos, que de acordo com sua função e estrutura química, possuem atividade de ação farmacológica. Também são denominados como fármacos e/ou farmoquímicos, sendo o princípio ativo do medicamento (ANVISA 2018).

De acordo com a etimologia, os medicamentos por definição são classificados como produtos farmacêuticos, tecnicamente produzidos através de composição formulada, elaborados com finalidade medicamentosa, utilizada para diagnóstico, alívio ou tratamento, em benefício da pessoa na qual se administra. Todo e qualquer medicamento, na sua composição formulada, deve conter principalmente seu componente fundamental, identificado como IFA, inserido numa composição farmacêutica associada com demais insumos adjuvantes não ativos, que definem propriamente o medicamento na sua apresentação final como um produto acabado para uso humano e/ ou veterinário (COUTEIRO, 2017).

O IFA pode ser obtido através de processos por extração animal, mineral e/ou vegetal, ou por meio de síntese química através de processos por reações químicas de fonte biológica de transformação ou mesmo reações químicas de transformações moleculares por processos químicos e biotecnológicos (MENDES, 2013).

Estudos recentes têm revelado que muitos IFAs conhecidos podem ser facilmente convertidos em LI, melhorando dessa forma algumas características, tais como solubilidade e taxa de dissolução, o que pode ter um impacto direto na farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos. Estes, uma vez que são farmacologicamente ativos e termodinamicamente estáveis, evitam os problemas relativos com o polimorfismo e "transformação polimórfica" que está associada à forma sólida dos IFAs, assim evitando a possibilidade de uma substância existir no estado sólido com no mínimo duas estruturas cristalinas diferentes.

O estudo de IFAs na forma de LI é uma das opções viáveis para a indústria farmacêutica, pois além de permitir eliminar alguns inconvenientes como o caso do polimorfismo, ainda apresenta diversas vantagens potenciais, nomeadamente ao nível das propriedades farmacológicas dos compostos, tais como atividade antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória (COUTEIRO, 2017).

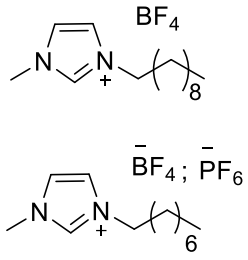
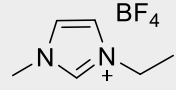
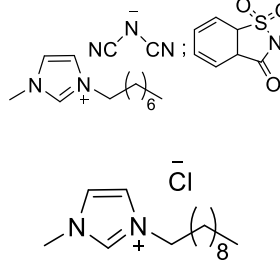
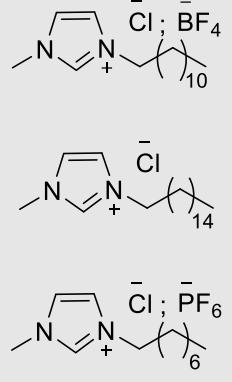
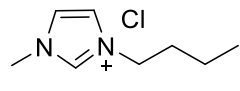
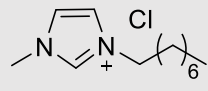
2.3 LÍQUIDOS IÔNICOS COMO POTENCIAIS AGENTES ANTITUMORAIS

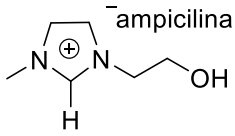
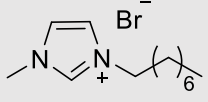
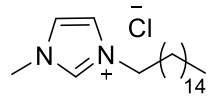
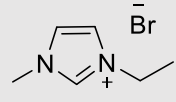
Sabe-se que o câncer tem um impacto significativo na saúde e qualidade de vida dos pacientes, e que requer terapias inovadoras de forma a minimizar ou eliminar os efeitos colaterais associados às terapias convencionais. Atualmente, temos uma taxa de sucesso muito baixa para as drogas avaliadas em ensaios clínicos que são lançadas no mercado, cerca de 10%. Portanto, há urgência em encontrar novos avanços científicos para gerar drogas e terapias eficazes, uma vez que o câncer é uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O desenvolvimento de novos agentes antitumorais com menor toxicidade e que podem evadir os mecanismos de resistência tumoral é um dos principais objetivos no campo da pesquisa farmacêutica na área da oncologia (COUTEIRO, 2017).

Assim, os SI podem ser vistos como possíveis compostos utilizáveis no desenvolvimento de novos agentes antitumorais, pois apresentam a capacidade de se ajustar e afinar a sua toxicidade ao adaptar-se às suas propriedades físico-químicas e farmacológicas para a aplicação terapêutica desejada. O surgimento dos LI de terceira classificação veio eliminar os problemas relacionados com os polimorfismos referentes às formas sólidas e trazer novas alternativas aos tratamentos utilizados atualmente (COUTEIRO, 2017).

Estudos foram efetuados no sentido de demonstrar a potencial atividade antitumoral dos LI, onde foi analisada a sua toxicidade em relação a linhas celulares humanas com câncer e comparando com linhas celulares humanas saudáveis. A Tabela 1 a seguir, mostra alguns dos estudos efetuados indicando o potencial dos LI como agentes antitumorais e a sua ação nas diferentes linhas celulares (COUTEIRO, 2017).

Tabela 1 – Estudos das potenciais atividades antitumorais efetuados com diferentes linhas celulares humanas e diferentes LI.

Tipo de câncer	Linha celular	Ensaio experimental	Líquido iônico	1º autor / ano publicação
Intestino	Ht-29 CaCo-2	MTT ^[a]		FRADE (2007)
Cervical	HeLa	MTT		WANG (2007)
Intestino	CaCo-2	MTT		FRADE (2009)
Leucemia	NC160 ^[b]	MTT		MALHOTRA (2010)
Cérebro	T98G	MTT		KAUSHIK (2012)
Fígado	QGY-7701	WST-1 ^[c]		JING (2013)

Mama, próstata, intestino, ósseo	T47D PC3 RKO MG63	MTT		FERRAZ (2015)
Fígado	HepG2	WST-1 ^[d]		LI (2015)
Oral	CAL27	Proliferação (2D), morte celular (2D) e ensaio de esferoides (3D)		CAMPOS (2020)
Mama	MCF-7	MTT		SAJADIYEH (2021)

[a] brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio. [b] US National Cancer Institute 60-tumor-célula-linha painel. [c] 2- (4-Iodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) -2H-tetrazólio. [d] 2- (2-Metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4 - dissulfofenil) -2H-tetrazólio.

Fonte: adaptado de (COUTEIRO, 2017)

2.5 CARACTERIZAÇÕES

- Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O RMN é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para determinar a estrutura molecular e a composição química de uma amostra. Ela analisa a interação dos núcleos em rotação em um forte campo magnético. Na espectroscopia por RMN, um campo magnético externo estacionário faz com que determinados núcleos em uma molécula absorvam radiofrequências seletivas. A energia que é absorvida induz uma transição nos spins nucleares, que então é observado em um espectro de RMN (MERCK, 2022).

- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR demonstra evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura química de substâncias, podendo ser usada para identificar um composto ou investigar sua composição química. Para realizar as medidas, a radiação no infravermelho passa através da amostra e é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrofotômetro registra o resultado na forma de bandas

de absorção. A região do espectro eletromagnético de maior interesse para essa técnica se encontra na faixa de número de onda entre 4000 a 400 cm^{-1} (DEQUI, 2022).

- Ponto de fusão

O ponto de fusão é quando a temperatura na qual uma substância passa do estado sólido ao estado líquido a uma dada pressão atmosférica.

- Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A espectroscopia de UV-Vis é a absorção da radiação eletrônica da região do ultravioleta (100-400 nm) e visível (400-800 nm) por parte de moléculas, átomos ou íons, está normalmente associada a transições eletrônicas. Essas transições ocorrem quando, por interação da radiação eletromagnética com o meio absorvente, um elétron é promovido de um estado eletrônico de baixa energia para outro de energia mais elevada (MARTINHO, 1994).

- Espectroscopia de fluorescência

Fluorescência é a emissão de fótons após excitação por fótons de energia superior. Os espectrômetros de fluorescência oferecem alta sensibilidade (picomolar), pois estão detectando um sinal contra um fundo escuro, ao contrário dos espectrofotômetros.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar novos sais imidazólicos derivados da Lepidilina como base para desenvolver agentes citotóxicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os produtos C₁₀Im e C₁₆Im através de RMN ¹H;
- Caracterizar os produtos **C₁₀BnlmCl** e **C₁₆BnlmCl** através de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C, ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia de Ultravioleta-Visível e espectroscopia de fluorescência;
- Avaliar a atividade citotóxica dos SI **C₁₀BnlmCl** e **C₁₆BnlmCl**.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

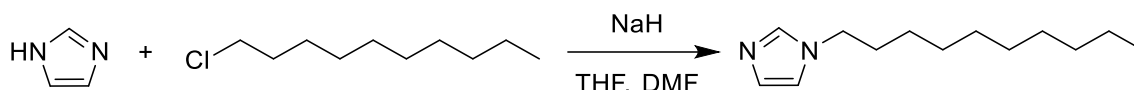
Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos a seguir.

- Imidazol (Sigma Aldrich; 99,5%) puriss;
- 1-Clorohexadecano (Sigma Aldrich; 95%);
- 1-Clorodecano (Sigma Aldrich; 98%);
- Cloreto de benzila (Sigma Aldrich; 99%);
- Hidreto de sódio (Sigma Aldrich) dispersão de 60% em óleo mineral;
- Tetraidrofurano (Química moderna; 99,0%);
- Dimetilformamida (Dinâmica; 99,8);
- *n*-Hexano (Synth; 100%);
- Tolueno (Synth; 100%);
- Acetato de etila (Neon; 99,5%);
- Acetona (Neon; 99,5%);
- Sulfato de magnésio (Dinâmica; 98%);
- Bicarbonato de sódio (Synth; 100%);
- Água destilada (departamento de química analítica).

4.2 MÉTODOS

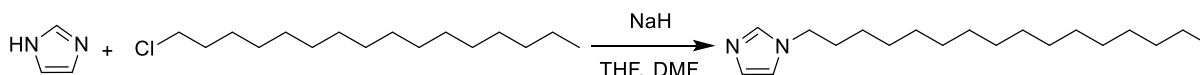
4.2.1 Síntese do 1-decilimidazólio (C₁₀Im)

Sob atmosfera inerte de argônio, uma solução de imidazol (2,00 g; 29,4 mmol; 1,00 equiv.) em 20 mL de THF foi adicionada vagarosamente a uma suspensão de hidreto de sódio 60% em óleo mineral (1,3 g; 32,5 mmol; 1,11 equiv.) em 20 mL de DMF. A mistura foi deixada em temperatura ambiente por 2 h. Após foi adicionado vagarosamente o 1-clorodecano (5,75 mL; 28,2 mmol; 0,96 equiv.) (Esquema 1). A mistura foi deixada sob agitação por 18 h a 50 °C. Após a mistura foi resfriada e foi adicionado 10 mL de água deionizada. O solvente foi retirado sob pressão reduzida. Então o produto foi dissolvido em 40 mL de acetato de etila, lavado (5 x 20 mL) com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio, seco com MgSO₄ e filtrado. O filtrado foi concentrado no rota evaporador e colocado sob vácuo por 4 h, produzindo um líquido amarelo.

Esquema 1 - Reação de alquilação entre imidazol e o 1-clorodecano.

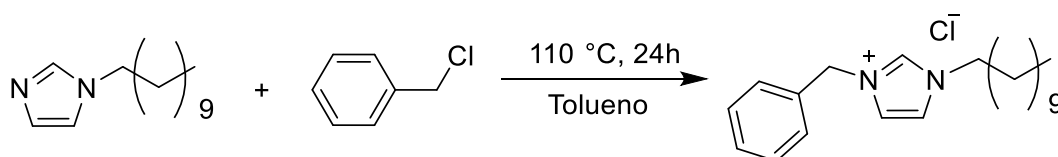
4.2.2 Síntese do 1-Hexadecilimidazólio (C₁₆Im)

Sob atmosfera inerte de argônio, uma solução de imidazol (2 g; 29,4 mmol; 1,00 equiv.) em 20 mL de THF foi adicionada vagarosamente a uma suspensão de hidreto de sódio 60% in óleo mineral (1,3 g; 32,5 mmol; 1,11 equiv.) em 20 mL de DMF. A mistura foi deixada em temperatura ambiente por 2 h. Após foi adicionado vagarosamente o 1-clorohexadecano (8,5 mL; 28,1 mmol; 0,96 equiv.) (Esquema 2). A mistura foi deixada sob agitação por 18 h a 50 °C. Após a mistura foi resfriada e foi adicionado 10 mL de água deionizada. O solvente foi retirado sob pressão reduzida. Então o produto foi dissolvido em 40 mL de acetato de etila, lavado 3 x 20 mL com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio e seco com MgSO₄ e filtrado. O filtrado foi concentrado no rota evaporador e colocado sob vácuo por 4 h, após o líquido foi recristalizado com n-hexano gelado, produzindo um sólido branco.

Esquema 2 - Reação de alquilação entre imidazol e o 1-clorohexadecano.

4.2.3 Síntese do Cloreto de 1-benzil-3-decilimidazólio

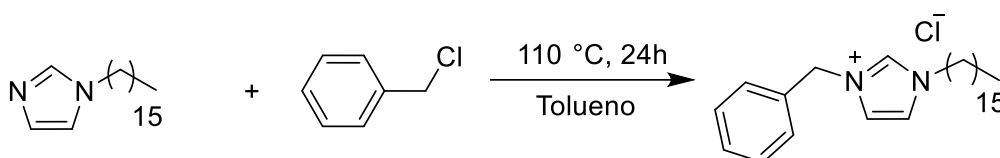
Em um balão foi adicionado o C₁₀Im (356,2 mg; 1,71 mmol 1,00 equiv.), preparado anteriormente, junto com cloreto de benzila (238,1 µL; 1,71 mmol; 1,00 equiv.) e dissolvidos em 10 mL de tolueno (Esquema 3), e esta solução foi deixada refluxando por 24 h a 110 °C sob atmosfera inerte de argônio. O produto foi lavado com acetona e seco até 60 °C sob pressão de vácuo por 24 h (THOMAS *et al.*, 2017).

Esquema 3 - Reação entre o 1-decilimidazol e cloreto de benzila.

4.2.4 Síntese do Cloreto de 1-benzil-3-hexadecilimidazólio

Em um balão foi adicionado o C₁₆Im (500.2 mg; 1,71 mmol; 1,00 equiv.), preparado anteriormente, junto com cloreto de benzila (238,1 µL; 1,71 mmol; 1,00 equiv.) e dissolvidos em 10 mL de tolueno (Esquema 4) e esta solução foi deixada sob refluxo por 24 h a 110 °C sob atmosfera inerte de argônio. O produto foi recristalizado com acetona, filtrado com o funil de Büchner e então o sólido branco seco a 50 °C sob vácuo por 24 h (THOMAS *et al.*, 2017).

Esquema 4 - Reação entre o 1-hexadecilimidazol e cloreto de benzila.



4.2.5 Caracterização dos imidazóis e sais imidazólicos

4.2.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados em um espectrofotômetro: BRUKER Avance 400 MHz III HD (Departamento de Química – Central Analítica), que opera a 400,13 MHz para ¹H e 100,62 MHz para ¹³C.

Os dados de ¹H e ¹³C, foram obtidos em tubo de 5 mm na temperatura de 300 K, onde foram utilizados clorofórmio deuterado (CDCl₃) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) para dissolver as amostras para posterior análise no equipamento e utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna do descolamento em ppm.

4.2.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise foi feita no equipamento BRUKER - modelo alpha, localizado no LAMOCA, a análise foi feita primeiramente limpando-se o equipamento com uma solução de álcool com o auxílio de um papel higiênico macio e então adicionando-se diretamente o produto no equipamento com o auxílio de uma espátula e então a análise foi realizada.

4.2.5.3 Ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado num equipamento B U C H I no Instituto de Química. Primeiramente preparou-se um capilar com a amostra (C₁₆BnImCl) a ser

analisada, após no próprio equipamento foi escolhido o método com temperatura de 60 a 120 °C e uma rampa de aquecimento a 1 °C/min.

4.2.5.4 Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis)

As análises da espectroscopia de UV-Vis foram realizadas no Instituto de Química, no equipamento de espectrômetro UV-Vis Cary 50, para isto preparou-se uma solução de 200 mg/L em água deionizada, onde obteve-se o espectro de UV-Vis.

4.2.5.5 Espectroscopia de Fluorescência

A análise da espectroscopia de fluorescência foi realizada no Instituto de Química, no equipamento de espectrômetro Fluorescência Cary Eclipse, para isto preparou-se uma solução de 200 mg/L em água deionizada, obtendo-se o espectro.

4.2.6 Avaliação da atividade citotóxica dos SI

Estas análises foram realizadas no laboratório LAFAP, localizado na Universidade da PUC/RS. A seguir serão descritas as metodologias utilizadas para a avaliação das propriedades biológicas dos SI **C₁₀BnlmCl**, **C₁₆BnlmCl** e **C₁₆MlmCl**:

● Materiais utilizados

Os reagentes e materiais utilizados estão na Tabela 2 a seguir e foram obtidos de fontes comerciais.

Tabela 2 - Relação dos reagentes utilizados para a avaliação dos potenciais biológicos dos SI **C₁₀BnlmCl**, **C₁₆BnlmCl** e **C₁₆MlmCl**.

Materiais e Reagente	Marca	Observação
DMEM	Life Technologies	—
Tripsina com EDTA 0,5%	Life Technologies	—
Fungizona	Life Technologies	—
Penicilina-Estreptomicina	Life Technologies	—
Soro Fetal Bovino	Life Technologies	—
DMSO	Sigma-Aldrich	—
Linhagem celular - U87MG	ATCC	Linhagem de glioblastoma multiforme humano
Linhagem celular - U251MG	ATCC	Linhagem de glioblastoma multiforme humano

Linhagem celular- M059J	ATCC	Linhagem de glioblastoma multiforme humano
Linhagem celular- VERO	ATCC	Linhagem de células de rim de macaco verde africano

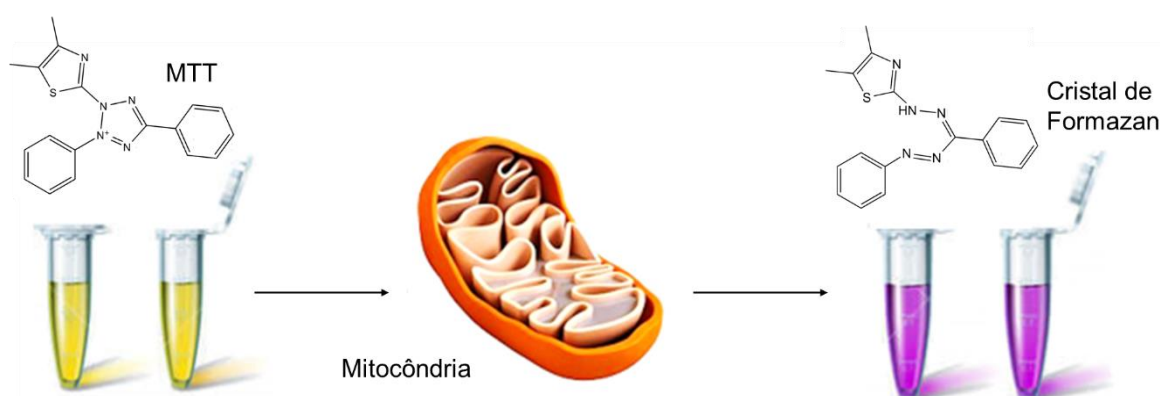
Fonte: (LAFAP, 2022)

● Avaliação das propriedades biológicas

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram obtidas da ATCC (U87MG, U251MG, M059J, Vero) foram cultivadas em meio DMEM, ambos os meios contendo 0,5 U/mL dos antibióticos penicilina/estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantida em temperatura de 37 °C, com umidade relativa do ar de 95% e atmosfera de 5% CO₂. Para a realização dos experimentos as células foi tripsinizadas e plaqueadas conforme a necessidade.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. O princípio deste método descrito por Mosman (1983) consiste em medir a viabilidade celular pela atividade metabólica mitocondrial das células vivas, no qual é quantificada pela redução do MTT (coloração amarela) em cristais de Formazan (coloração roxa). Desta forma, a redução do MTT é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (Esquema 5).

Esquema 5- Representação do princípio do ensaio de MTT.



Fonte: (LAFAP,2022)

Para avaliação da viabilidade celular, as linhagens U87MG, U251MG, M059J e Vero foram plaqueadas numa densidade de 5×10^3 células por poço em placas de 96 poços. Após a confluência foram tratadas com diferentes concentrações dos sais imidazólicos (0,2, 2,0 e 20 $\mu\text{g/mL}$) incubadas por 24 horas. Após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 100 μL de solução

de MTT 0,5% por poço. Após 3 horas de incubação, o meio foi removido e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 24 horas, para secagem. Na sequência, os cristais de Formazan foram eluídos em 100 µL de DMSO. A densidade óptica de coloração foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax Plus) a 570 nm. Os resultados foram determinados em percentual da absorbância dos tratados em relação ao grupo que não recebeu tratamento (controle). A atividade antitumoral dos sais imidazólicos foi calculada pela taxa de sobrevivência celular (TSC) por meio do teste de MTT. A TSC foi calculada através da seguinte equação:

$$TSC = \frac{d_2 - d_1}{d_2} \times 100\% \quad (\text{eq 1})$$

Onde;

TSC = taxa de inibição das células cancerígenas;

d1 = valor da densidade óptica das células expostas ao tratamento;

d2 = valor da densidade óptica das células cultivadas sem tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

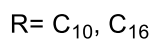
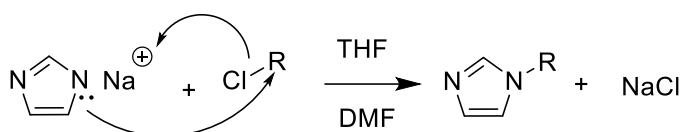
Os Sais Imidazólicos utilizados nessa pesquisa foram todos sintetizados no laboratório TECNOCAT, e a avaliação citotóxica no laboratório LAFAP. Os resultados foram divididos em síntese e caracterização dos produtos C₁₀Im e C₁₆Im (5.1), síntese e caracterização dos SI **C₁₀BnImCl** e **C₁₆BnImCl** (5.2) e avaliação da citotoxicidade dos SI, em linhagens U87MG, U251MG, M059J e Vero (5.3).

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO C₁₀Im E C₁₆Im

Tanto para o C₁₀Im e o C₁₆Im seguem o mesmo método, apenas com a mudança do agente alquilante, as sínteses foram realizadas de acordo com o método adaptado da literatura (BARA, 2011; SUKLABAIDYA *et al.*, 2021), primeiramente o imidazol foi dissolvido em THF e com a adição do NaH em DMF, ocorrendo a desprotonação entre o N⁻ do anel imidazol e o Na⁺ do hidreto de sódio, formando o produto conforme Esquema 6 a seguir:

Esquema 6 - Reação entre H-imidazol com hidreto de sódio.

Após adicionou-se 1-clorodecano ou 1-hexaclorodecano, onde obteve-se os produtos C₁₀Im e C₁₆Im, conforme Esquema 7 a seguir:

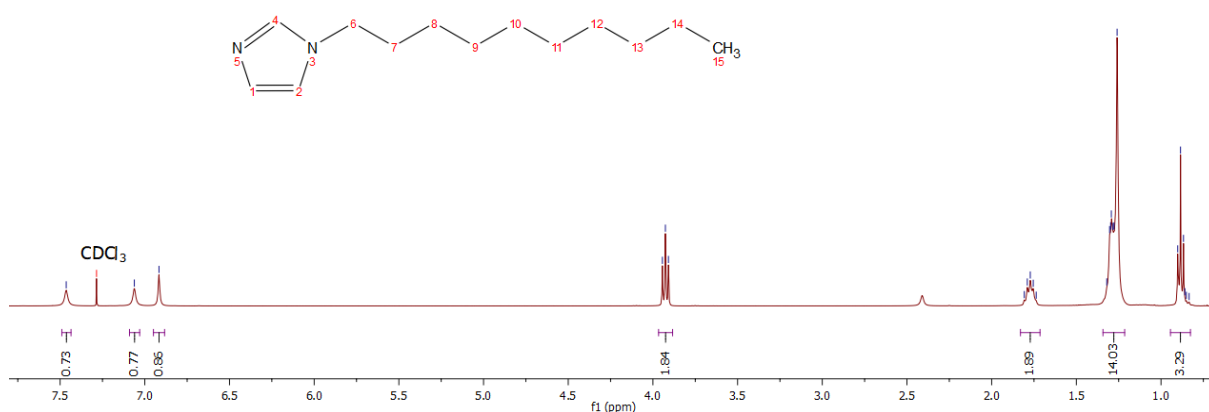
Esquema 7 - Reação entre Na-imidazol e 1-clorodecano ou 1-hexaclorodecano.

Para a síntese representada anteriormente no Esquema 7, obteve-se um rendimento de 52,2% e 41,2% para os produtos C₁₀Im e C₁₆Im, respectivamente.

Para avaliar a formação dos produtos sintetizados realizou-se um espectro de RMN ¹H **figuras 3 e 4** a seguir com os seus respectivos deslocamentos químicos obtidos no programa MestReNova.

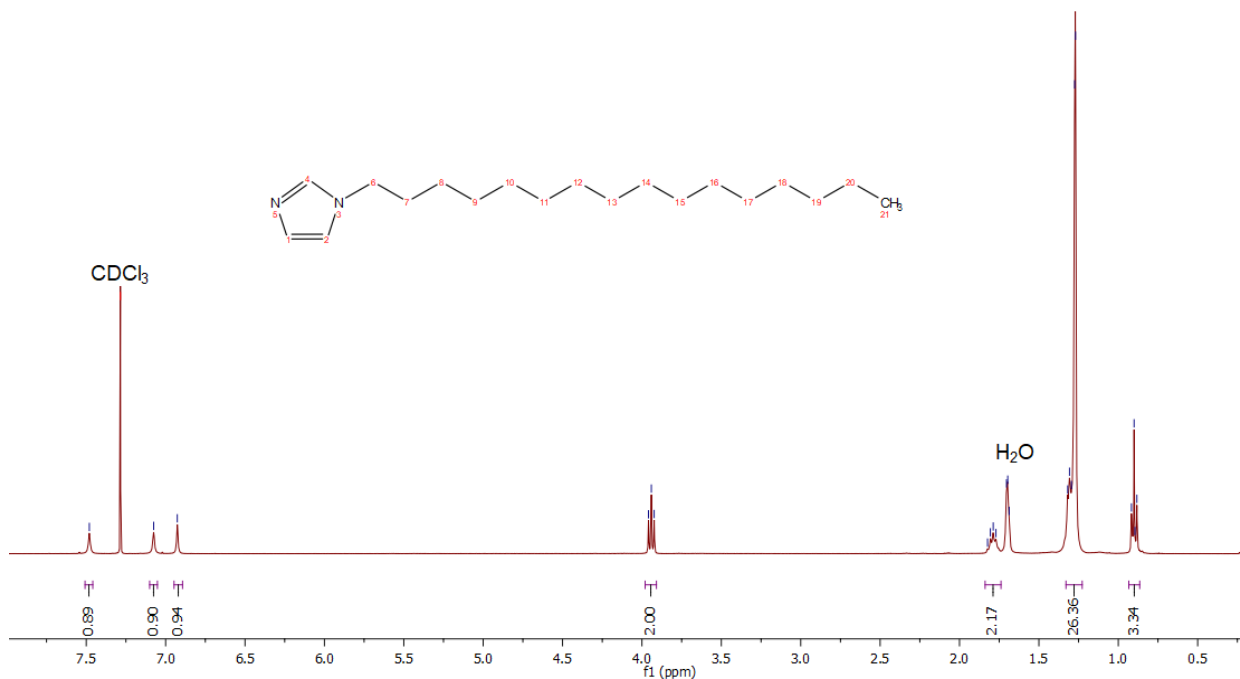
No espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ do C₁₀Im temos os seguintes deslocamento químico de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.46 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.93 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.77 (p, J = 7.1 Hz, 2H), 1.28 (d, J = 15.3 Hz, 14H), 0.92 – 0.83 (m, 3H). Pela referência temos o deslocamento químico de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (s, 1H), 6.92 (dd, J = 39.0, 37.9 Hz, 2H), 4.09 – 3.71 (m, 2H), 1.83 – 1.64 (m, 2H), 1.46 – 1.04 (m, 14H), 0.86 (td, J = 6.9, 1.3 Hz, 3H) (BARA, 2011). Pela **Figura 3** e através do deslocamento químico, podemos verificar a formação do produto quando comparados ao da referência.

Figura 3 - Espectro de ^1H RMN do produto C_{10}Im feito em CDCl_3 , obtido no programa MestReNova, com deslocamento químico RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.77 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.28 (d, $J = 15.3$ Hz, 14H), 0.92 – 0.83 (m, 3H).



No espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 do C_{16}Im temos os seguintes deslocamento químico de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 3.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.80 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.32 – 1.26 (m, 26H), 0.92 – 0.88 (m, 3H). Observou-se a presença de água como impureza em 1,56 ppm. Pela referência temos o deslocamento químico de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.49 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 3.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.27 (bs, 26H), and 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H) (SUKLABAIDYA *et al.*, 2021). Pela **Figura 4** e através do deslocamento químico, podemos verificar a formação do produto quando comparados ao da referência.

Figura 4 - Espectro de RMN ^1H do produto C_{16}Im feito em CDCl_3 , obtido no programa MestReNova, com deslocamento químico RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 3.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.80 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.32 – 1.26 (m, 26H), 0.92 – 0.88 (m, 3H).



5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ E $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$

Para a síntese dos SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ foi realizado uma alquilação do alquil imizadol com o cloreto de benzila, uma metodologia utilizada na síntese da maioria dos LI encontrados na literatura (CRNCEVIC *et al.*, 2021), onde adiciona-se os dois reagentes juntos a um solvente e deixa-se agitando por no mínimo 24 h.

Para estas reações obteve-se um rendimento de 60% para o $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ e 22% para o $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$, acredita-se que o baixo rendimento para o SI $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ possa estar relacionado ao processo de cristalização com a acetona, talvez este parâmetro melhore ao se escolher um outro solvente que seja menos solúvel em temperatura ambiente.

Para melhor organização, as caracterizações destes SI foram separadas em tópicos, conforme as análises descritas a seguir:

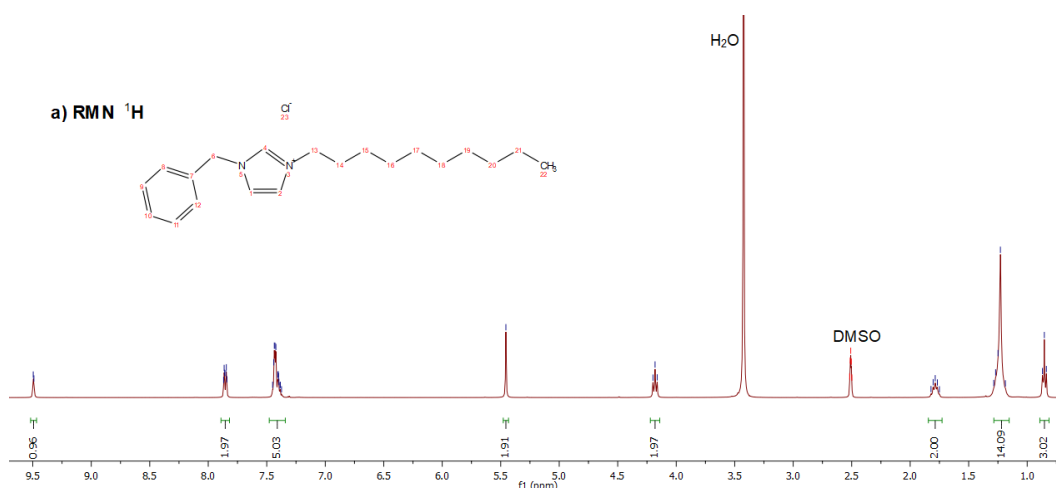
- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

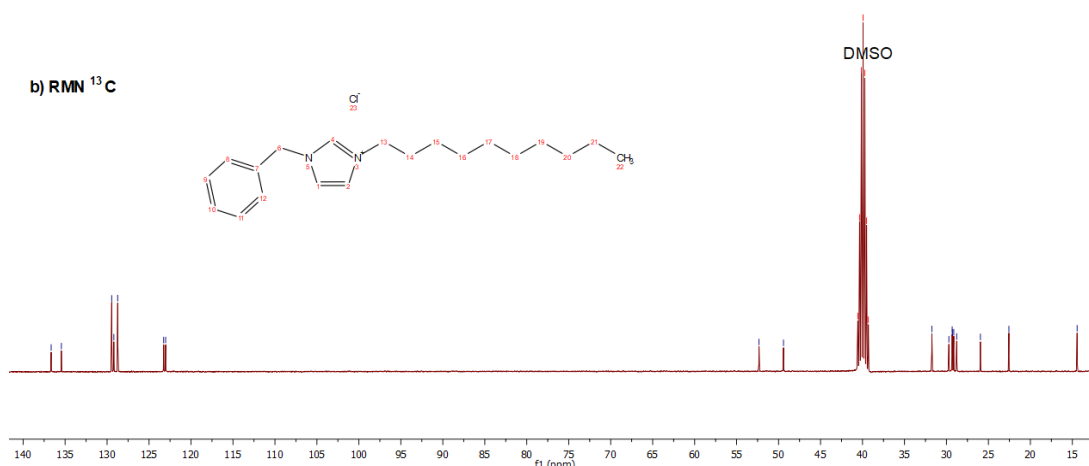
Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos pelo programa MestReNova e podem ser vistos nas **figuras 5 a) b) e 6 a) b)** a seguir:

No espectro de RMN de ^1H **Figura 5 a)** em $\text{DMSO-}d_6$ do **C₁₀BnlmCl** temos os seguintes deslocamento químico de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.41 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.84 (dt, $J = 5.0, 1.9$ Hz, 2H), 7.44 – 7.39 (m, 5H), 5.44 (s, 2H), 4.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.79 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.27 – 1.20 (m, 14H), 0.85 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H). Pela referência temos o deslocamento químico de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.40 (1 H, s, H2 Im) 7.85 (2 H, quin, $J=1.83$ Hz, H4 Im, H5 Im) 7.39 - 7.45 (5 H, m, Ar) 5.45 (2 H, s, CH_2Bn) 4.18 (2 H, t, $J=7.21$ Hz, H1') 1.79 (2 H, t, $J=7.09$ Hz, H2') 1.18 - 1.31 (14 H, m, H3'- H9') 0.82 - 0.89 (3 H, m, H10') (CRNCEVIC *et al.*, 2021).

Já pelo espectro de RMN de ^{13}C **Figura 5 b)** em $\text{DMSO-}d_6$ do **C₁₀BnlmCl** temos os seguintes deslocamento químico de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 136.63, 135.40, 129.47, 129.21, 128.70, 123.27, 123.05, 52.37, 49.42, 31.74, 29.69, 29.32, 29.29, 29.12, 28.77, 25.95, 22.56, 14.44. Pela referência temos o deslocamento químico de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 136.62 (C2) 135.41 (C1Ar) 129.46 (C2Ar, C6Ar) 129.21 (C4Ar) 128.72 (C3Ar, C5Ar) 123.29 (C4) 123.06 (C5) 52.38 (CH_2Bn) 49.44 (C1') 31.75 (C2') 29.71 (C8') 29.33 (C7') 29.29 (C6') 29.13 (C5') 28.79 (C4') 25.96 (C3') 22.57 (C9') 14.44 (C10') (CRNCEVIC *et al.*, 2021).

Figura 5 - a) espectro de RMN ^1H do SI **C₁₀BnlmCl** feito em $\text{DMSO-}d_6$, obtido pelo programa MestReNova. b) espectro de RMN ^{13}C do SI **C₁₀BnlmCl** feito em $\text{DMSO-}d_6$, obtido pelo programa MestReNova



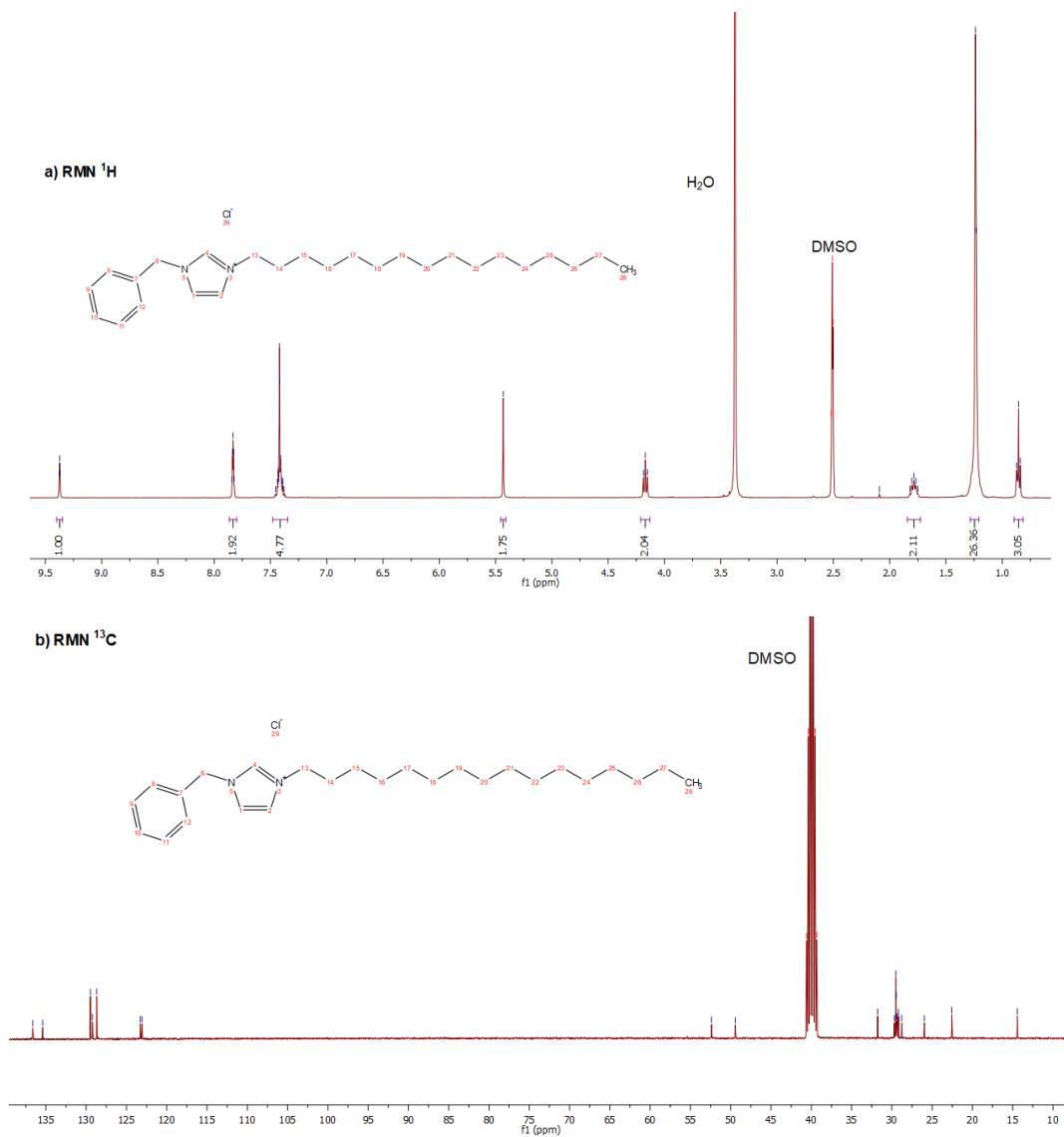


Para o SI $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ não foi encontrada referência na literatura tanto do RMN de ^1H quanto para o de ^{13}C , logo a solução foi fazer a comparação com a referência do SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$, já que a diferença entre estes dois SI é o tamanho da cadeia alquílica, podemos pegar os picos característicos como da Ar e do anel imidazólico para verificação.

Para o espectro de RMN de ^1H **Figura 6 a)** em DMSO- d_6 do $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ temos o seguinte deslocamento químico de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.34 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.84 – 7.81 (m, 2H), 7.45 – 7.38 (m, 5H), 5.43 (s, 2H), 4.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.78 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.24 (s, 26H), 0.88 – 0.83 (m, 3H). Pela referência do SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ descrita anteriormente teremos os mesmos picos dos hidrogênios (-CH) anel imidazólico em 9.34 e 7.84 – 7.81 ppm, o mesmo multipletto dos hidrogênios (-CH) da Ar em 7.45 – 7.38 ppm, assim como os demais picos, onde podemos verificar a diferença entre os mesmos que será nos hidrogênios da cadeia alquílica (- CH_2) onde teremos um singleto em 1.24 ppm referente a 26 H, enquanto que no SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ ocorre um multipletto em 1.18 – 1.31 ppm referente a 14 H.

No espectro de RMN de ^{13}C **Figura 6 b)** em DMSO- d_6 do $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ temos o seguinte deslocamento químico de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 136.62, 135.39, 129.47, 129.21, 128.68, 123.28, 123.06, 52.39, 49.42, 31.76, 29.69, 29.51, 29.48, 29.37, 29.29, 29.17, 28.78, 25.96, 22.57, 14.44. Comparando com a referência do SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ verificamos a existência dos mesmos picos referentes a Ar em 136.62, 135.39, 129.47, 129.21, 128.68 ppm, o pico referente ao carbono do CH_2Bn em 52.39 ppm. A diferença maior ocorre nos carbonos da cadeia alquílica que possuem deslocamentos químicos diferentes do SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$.

Figura 6 - a) espectro de RMN ^1H do SI $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ feito em $\text{DMSO-}d_6$, obtido pelo programa MestReNova. b) espectro de RMN ^{13}C do SI $\text{C}_{16}\text{BnImCl}$ feito em $\text{DMSO-}d_6$, obtido pelo programa MestReNova



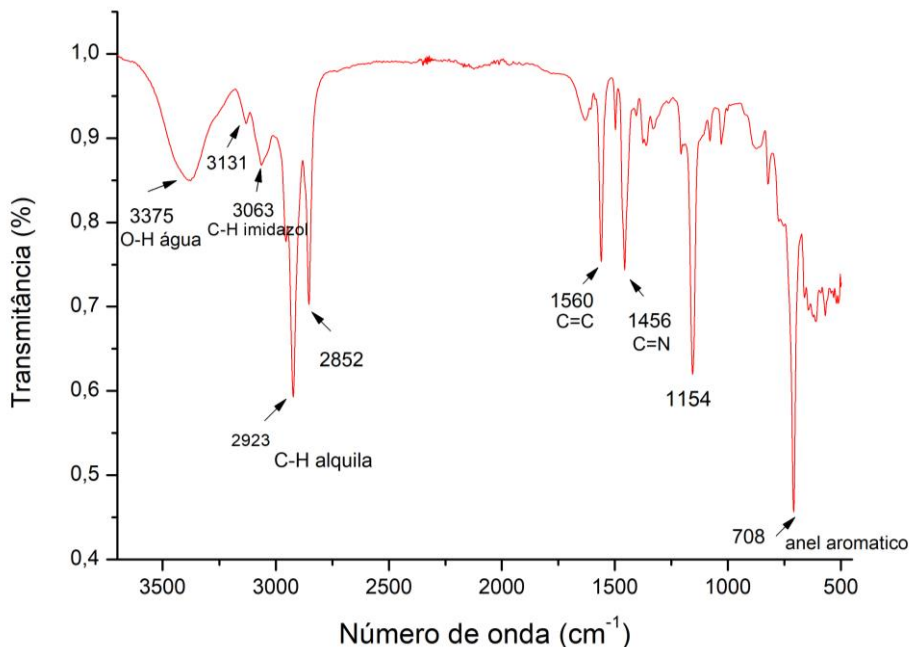
- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Através do espectro de ATR-FTIR podemos verificar as bandas características dos produtos formados, conforme referências os picos característicos do anel imidazólico C=N, C=C, C-H, anel aromático, água O-H e o C-H das alquilas estão marcados nas respectivas **figuras 10 e 11** a seguir:

Pelo ATR-FTIR do SI $\text{C}_{10}\text{BnImCl}$ (**Figura 7**) teremos as seguintes bandas 3375 cm^{-1} (O-H água), 3131 cm^{-1} , 3063 cm^{-1} (C-H imidazólico), 2923 cm^{-1} (C-H cadeia

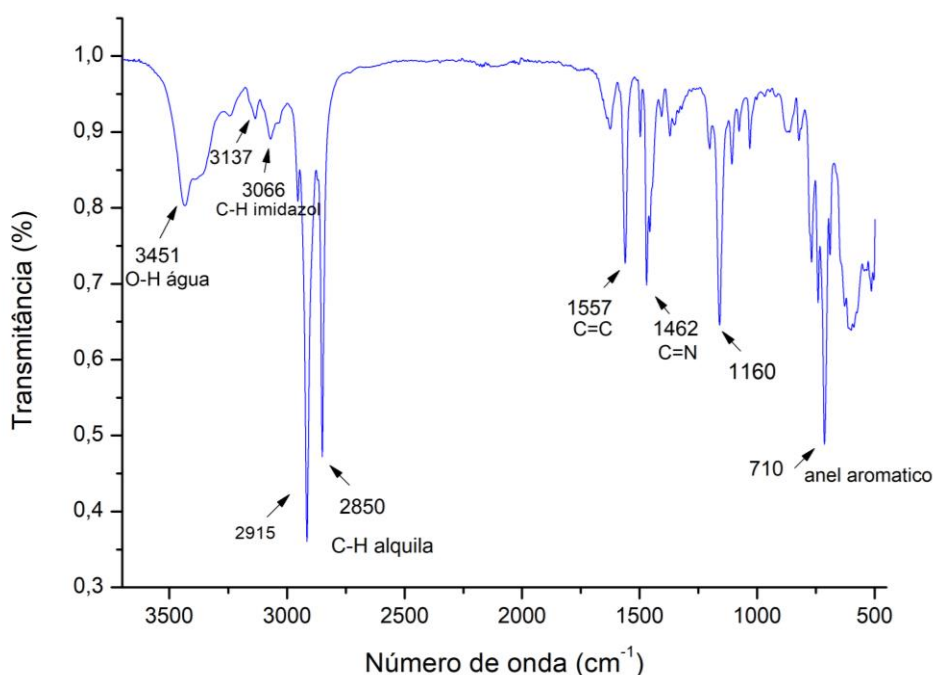
alquílica), 2852 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} (C=C imidazólico), 1456 cm^{-1} (C=N imidazólico), 1154 cm^{-1} e 708 cm^{-1} (Arla)

Figura 7- Espectro de ATR do produto **C₁₀BnlmCl**.



Já para o ATR-FTIR do SI **C₁₆BnlmCl** **Figura 8**, teremos as seguintes bandas 3451 cm^{-1} (O-H água), 3137 cm^{-1} , 3066 cm^{-1} (C-H imidazólico), 2915 cm^{-1} (C-H cadeia alquílica), 2850 cm^{-1} , 1557 cm^{-1} (C=C imidazólico), 1462 cm^{-1} (C=N imidazólico), 1160 cm^{-1} e 710 cm^{-1} (Arla).

Figura 8 - Espectro de ATR-FTIR do produto **C₁₆BnlmCl**.



Comparando os dois SI, podemos verificar que o SI **C₁₆BnImCl** possui uma cadeia alquílica maior, logo seu pico de C-H da alquila será mais intenso do que o pico C-H da alquila do SI **C₁₀BnImCl**.

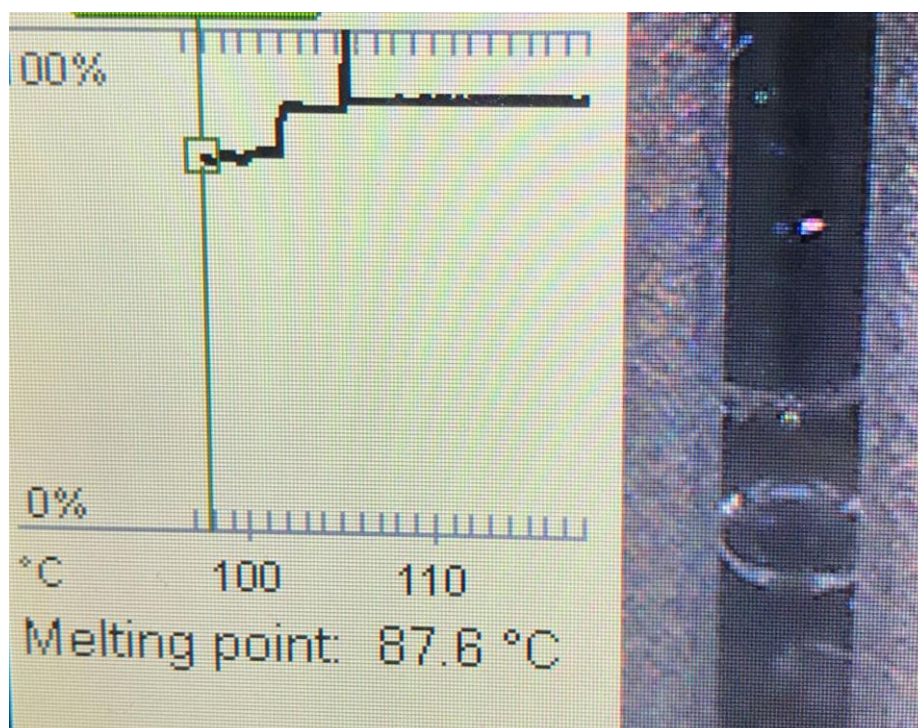
- Ponto de fusão

Os SI tendem a apresentar um ponto de fusão decrescente quanto maior for o tamanho e a assimetria do cátion, resultando em uma melhor distribuição da carga, diminuindo a atração entre os íons e diminuindo a interação intermolecular do cristal (SILVA, 2004). Este conceito se aplica aos SI principalmente por causa da Arila, pois ela aumenta sua assimetria.

O ponto de fusão foi somente realizado no produto sólido (**C₁₆BnImCl**), uma vez que o ponto de fusão é a passagem do estado sólido para o estado líquido. Como podemos verificar na **Figura 9** a seguir, o ponto de fusão encontrado foi de 87,6 °C. Sendo assim pela classificação o SI **C₁₆BnImCl** é considerado um LI.

Como o SI **C₁₀BnImCl** possui o aspecto de um líquido viscoso a temperatura ambiente também pode ser considerado um LI.

Figura 9 - Ponto de fusão do **C₁₆BnImCl**.



- Espectroscopia de UV-Vis

Como podemos observar nas **figuras 10 e 11** a seguir dos espectros de UV-visível, os SI (**C₁₆BnlmCl** e **C₁₀BnlmCl**) absorvem na região do ultravioleta aproximadamente em 257 nm, estando de acordo a teoria de que os compostos orgânicos que possuem dupla ligação absorvem fortemente no ultravioleta. Através do espectro também podemos observar que os SI absorvem na mesma região, esperava-se isso já que a única diferença entre os SI são as cadeias laterais, que não interferem no espectro de UV-Vis.

Figura 10 - Espectro de Uv-Vis do sal imidazólico **C₁₀BnlmCl**.

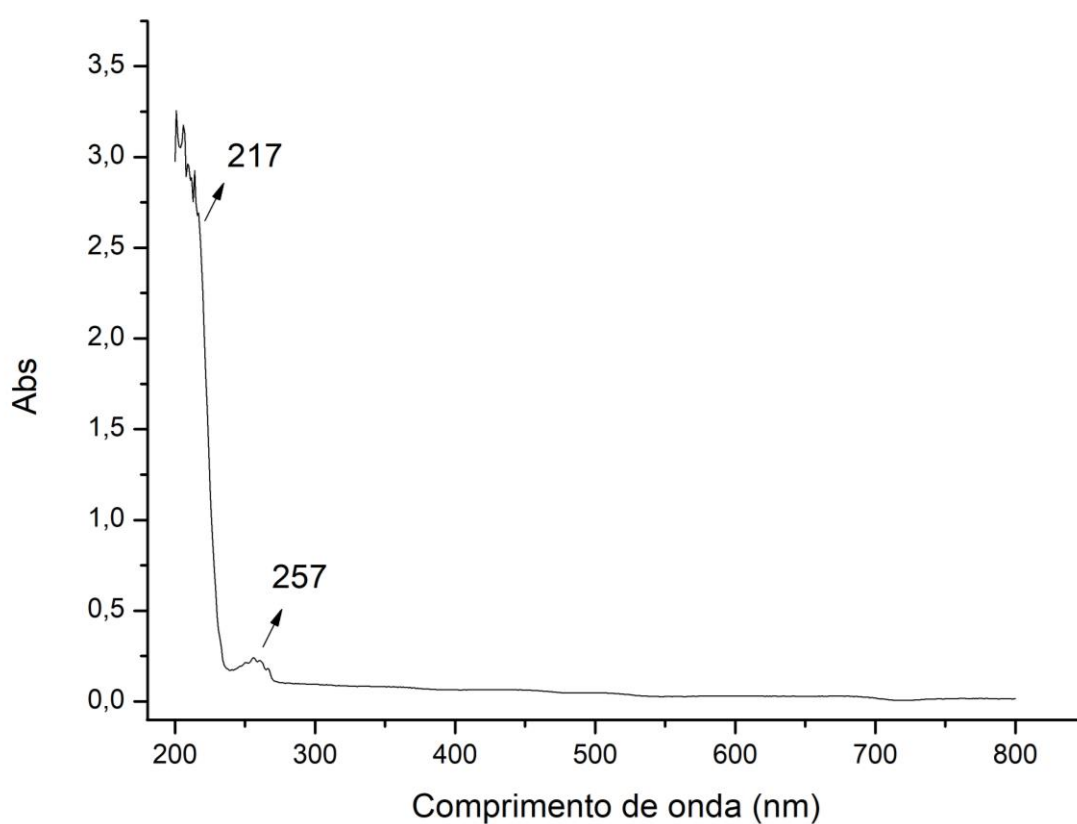
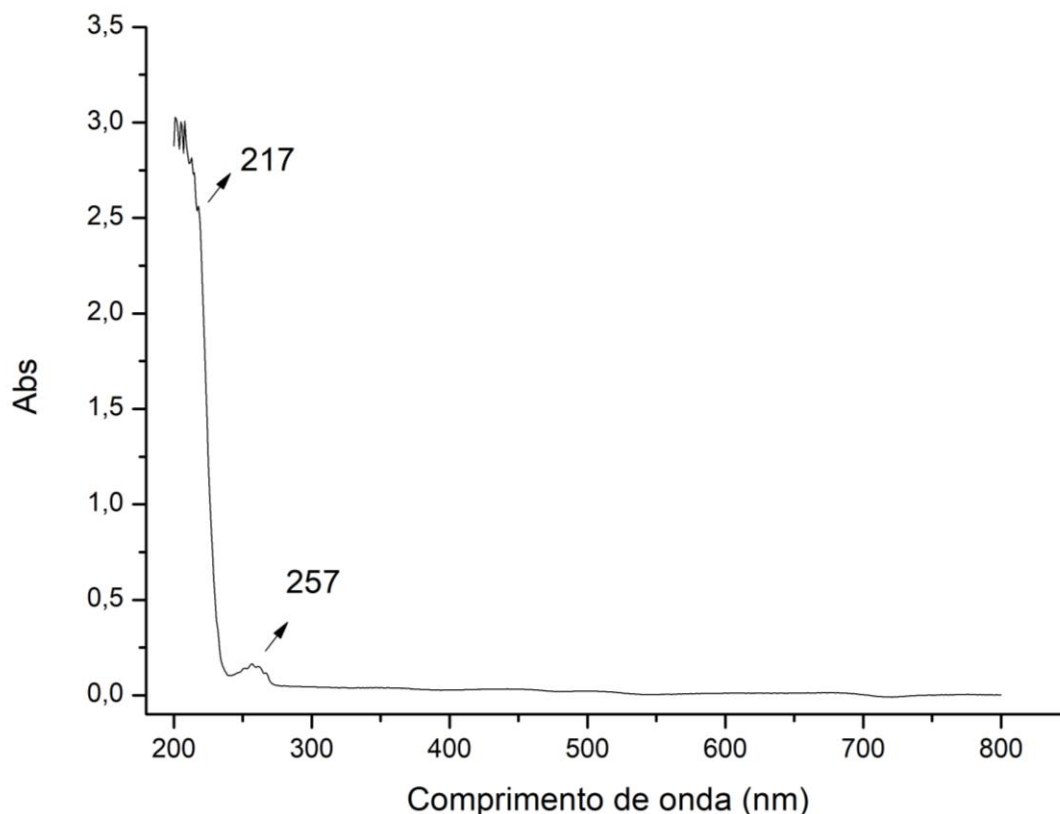


Figura 11 - Espectro de UV-Vis do sal imidazólico $C_{16}BnImCl$.



- Espectroscopia de Fluorescência

Na técnica de espectroscopia de UV-Vis (absorção) percebe-se reduções de intensidade de luz incidente, já a técnica de espectroscopia de fluorescência detecta a intensidade de luz emitida, sendo assim uma técnica de alta sensibilidade. Pela espectroscopia de fluorescência podemos verificar marcações fluorescentes específicas nos produtos formados, podemos também verificar a quantificação de analitos. Nos SI $C_{10}BnImCl$ (Figura 12) e $C_{16}BnImCl$ (Figura 13), quando excitados em $\lambda_{ex} < 230$ nm, exibiram um espectro de emissão com um pico maior em aproximadamente 280 nm para os dois SI, obtendo-se o máximo de fluorescência. Em estudos encontrados na literatura (CHEN *et al.*, 2011) os SI que apresentam fluorescência podem ser utilizados como marcadores em macromoléculas.

Figura 12 - Espectro de fluorescência do sal imidazólico **C₁₀BnImCl**.

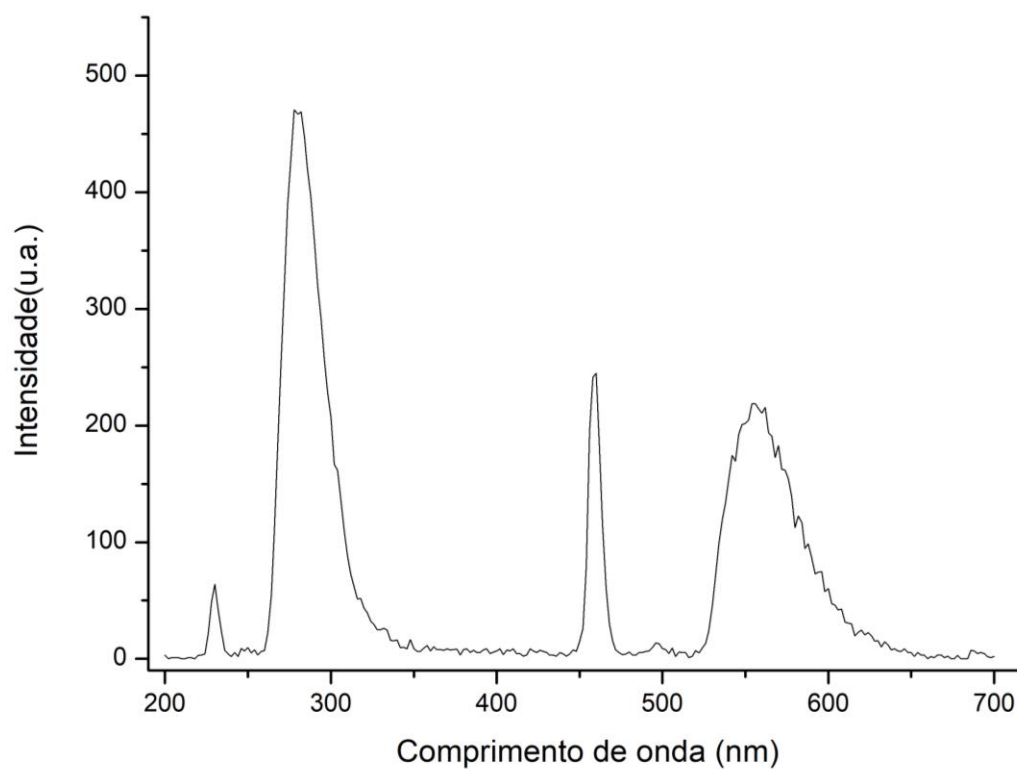
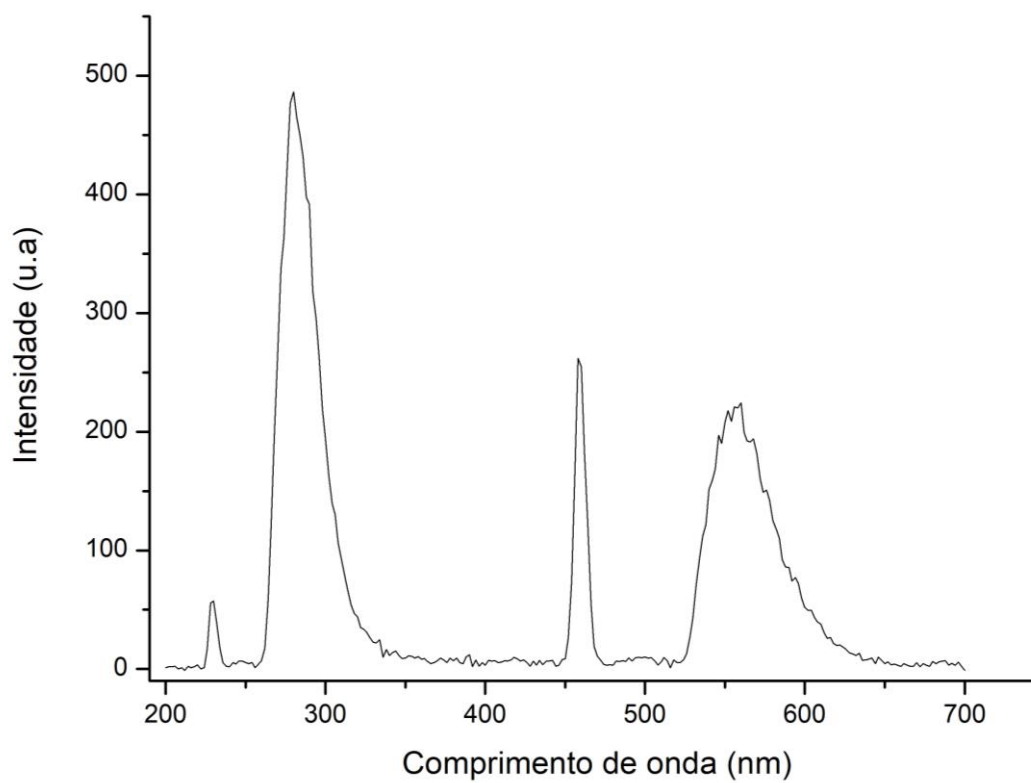


Figura 13 - Espectro de fluorescência do sal imidazólico **C₁₆BnImCl**.



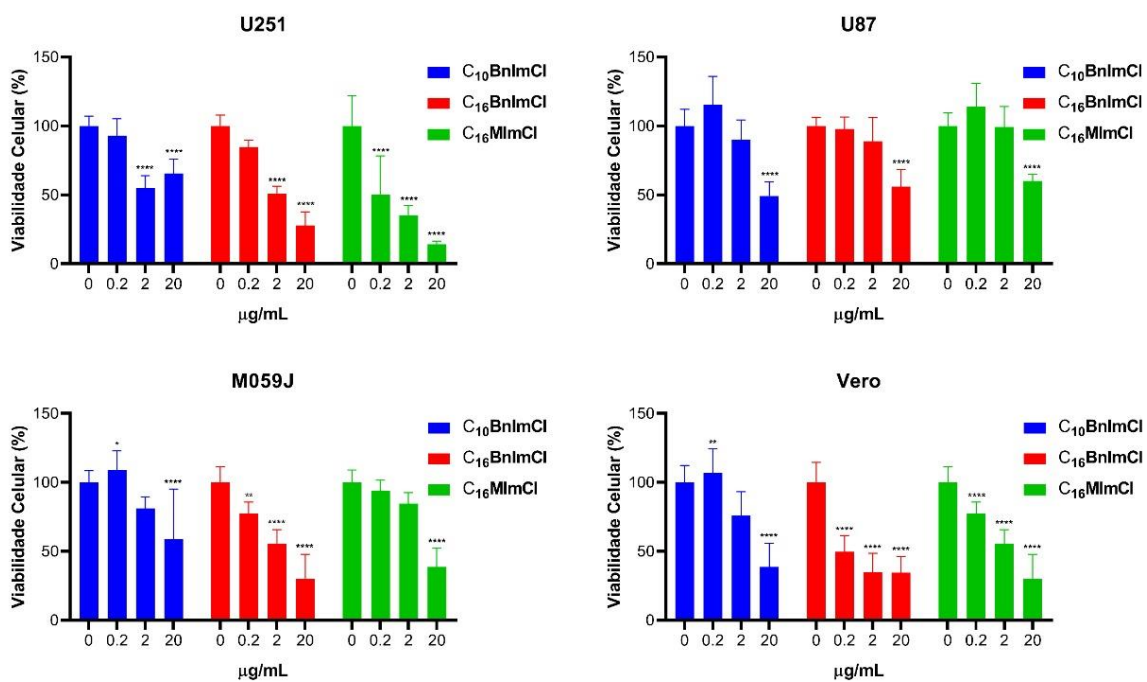
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS SI

No intuito de avaliar se os SI **C₁₀BnlmCl** e **C₁₆BnlmCl** apresentam potencial aplicação anticâncer, primeiramente são necessários ensaios de citotoxicidade para confirmar a viabilidade dos compostos. Os mesmos foram testados em diferentes concentrações de 0.2, 2.0 e 20 µg/mL incubadas por 24 horas utilizando o teste de viabilidade por MTT. A viabilidade celular obtida após tratamento com os extratos por 24 horas está ilustrada nos gráficos a seguir (**Figura 14**).

Como podemos ver na **Figura 14** a seguir, utilizou-se as seguintes linhagens U87, U251, M059J e Vero, sendo as três primeiras células tumorais e a última célula não tumoral. O LI **C₁₆MlmCl** foi usado como parâmetro, pois há dados em literatura onde o LI apresenta potencial atividade antitumoral (MALHOTRA (2010); CAMPOS (2020)).

Para a linhagem U251 podemos verificar que o SI **C₁₆BnlmCl** apresenta maior citotoxicidade nas concentrações 2 e 20 µg/mL em comparação ao SI **C₁₀BnlmCl** nas mesmas concentrações. Na linhagem U87 o SI **C₁₀BnlmCl** apresentou um ligeiro aumento de citotoxicidade na concentração de 20 µg/mL em relação ao SI **C₁₆BnlmCl**. Já na linhagem M059J novamente o SI **C₁₆BnlmCl** teve maior citotoxicidade na concentração de 20 µg/mL em relação ao SI **C₁₀BnlmCl** na mesma concentração. Para avaliar a citocompatibilidade dos SI, utiliza-se a célula Vero, onde o que obteve menor citotoxicidade foi o SI **C₁₀BnlmCl** nas concentrações de 0,2 e 2 µg/mL em relação ao SI **C₁₆BnlmCl**. Pensando na citocompatibilidade como um fator determinante o SI **C₁₀BnlmCl** foi o que obteve melhor relação entre a citotoxicidade e citocompatibilidade. Ao se comparar o SI **C₁₀BnlmCl** com o LI **C₁₆MlmCl** percebe-se que o LI tem uma maior citotoxicidade na linhagem U251 em relação ao SI, porém para a célula Vero o SI tem mais citocompatibilidade que o LI.

Figura 14 - Viabilidade de células U251, U87, M059 e Vero, tratadas com os SI **C₁₀BnlmCl**, **C₁₆BnlmCl** e **C₁₆MlmCl** nas concentrações de 0,2, 2,0 e 20 µg/mL após 24 horas de tratamento (Teste t $p < 0,05$, em relação ao controle).



Fonte: (LAFAP, 2022).

6 CONCLUSÃO

As metodologias propostas para síntese dos SI **C₁₀BnImCl** e **C₁₆BnImCl** mostraram-se eficientes, uma vez que as caracterizações destes SI demonstraram a formação dos produtos propostos. Pelos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C podemos verificar os deslocamentos químicos característicos de cada SI, os espectros de ATR demonstram os grupos característicos dos SI, o ponto de fusão do SI **C₁₆BnImCl** foi de 87,6 °C, já o **C₁₀BnImCl** possui aspecto de um líquido viscoso a temperatura ambiente, os dois com ponto de fusão menor de 100 °C, indicando que são LI, através das análises de UV-Vis e fluorescência podemos verificar que estes SI podem ser utilizados como marcadores de macromoléculas para posterior identificação. As análises citotóxicas demonstram que há potencial anticancerígeno, o SI que obteve menor citotoxicidade nos ensaios com as células Vero foi o **C₁₀BnImCl** em relação ao SI **C₁₆BnImCl** e LI C₁₆MImCl. Pensando na citocompatibilidade como um fator determinante o SI **C₁₀BnImCl** na linhagem U251 foi o que obteve melhor potencial antitumoral.

Em comparação ao LI C₁₆MImCl em que já há estudos sobre o seu potencial anticancerígeno, a mudança de uma metila para uma benzila mostrou uma leve melhora no potencial antitumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANALÍTICA, Central. **ESPECTROMETRIA DE MASSA**. Disponível em: <http://www.iq.ufrgs.br/ca/index.php/servicos/espectrometria-de-massa>. Acesso em: 4 ago. 2022.
- ANVISA. **Insumos Farmacêuticos Ativos**. 2. ed. Brasília: Gmed, 2018. 22 p
- BARA, Jason E.. A Versatile and Scalable Method for Producing N-functionalized Imidazoles. **Ileec Research**, Alabama,, v. 1, n. 50, p. 13614-13619, ago. 2011.
- CAMPOS, Paloma Santos de. **MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL: INFLUÊNCIA DE FATORES QUÍMICOS E FÍSICOS**. 2020. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós- Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020
- CHEN, Xu-Wei *et al.* A Highly Fluorescent Hydrophilic Ionic Liquid as a Potential Probe for the Sensing of Biomacromolecules. **The Journal Of Physical Chemistry B**, China, v. 115, n. 6, p. 1524-1530, 26 jan. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp109121h>.
- COUTEIRO, Maria de Fátima Martins. **Estudo da Atividade Antitumoral de Líquidos Iônicos com base em antibióticos Beta-lactâmicos e em Fluoroquinolonas**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Escola Superior de Saúde do Porto, Porto, 2017.
- COUTO, Júlia Lacerda. **Obtenção de uma nova classe de sais imidazólicos com potencial atividade antifúngica via metátese cruzada de derivados naturais**. 2018. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.
- CRNCEVIC, Doris *et al.* The mode of antibacterial action of quaternary N-benzylimidazole salts against emerging opportunistic pathogens. **Bioorganic Chemistry**, Croacia, v. 112, n. 1, p. 1-8, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104938>.
- DEQUI. **Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/dequi-labs/central-analitica/espectrofotometro-de-absorcao-molecular-na-regiao-do-infravermelho-proximo-e-medio/>. Acesso em: 3 ago. 2022
- FANG B, Zhou CH, Rao XC. 2010. Synthesis and biological activities of novel aminederived bis-azoles as potencial antibacterial and antifungal agentes. **Eur J Med Chem**. 45: 4388-4398.
- FERRAZ, Ricardo; COSTA-RODRIGUES, João; FERNANDES, Maria H.; SANTOS, Miguel M.; MARRUCHO, Isabel M.; REBELO, Luís Paulo N.; PRUDÊNCIO, Cristina; NORONHA, João Paulo; PETROVSKI, Željko; BRANCO, Luís C.. Antitumor Activity of Ionic Liquids Based on Ampicillin. **Chemmedchem**, Portugal, v. 10, n. 9, p. 1480-1483, 16 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201500142>.

FERRAZ, Ricardo; BRANCO, Luís C.; PRUDÊNCIO, Cristina; NORONHA, João Paulo; PETROVSKI, Željko. Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. **Chemmedchem**, Portugal, v. 6, n. 6, p. 975-985, 9 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201100082>.

FRADE, R. F. M., Matias, A., Branco, L. C., Afonso, C. A. M., & Duarte, C. M. M. (2007). Effect of ionic liquids on human colon carcinoma HT-29 and CaCo-2 cell lines. *Green Chemistry*, 9(8), 873-877. doi:10.1039/b617526k

FRADE, R. F.M. *et al.* Toxicological evaluation on human colon carcinoma cell line (CaCo-2) of ionic liquids based on imidazolium, guanidinium, ammonium, phosphonium, pyridinium and pyrrolidinium cations. **Green Chemistry**, Portugal, v. 11, n. 10, p. 1660-1665, ago. 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b914284n>

FERREIRA, Joana Alexandra Gomes. **Estudo da atividade biológica de líquidos iônicos baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**. 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto., Porto, 2015.

INCA, Instituto Nacional de Câncer -. **Como surge o câncer?** Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>. Acesso em: 25 jun. 2022.

JING, Changqin; LI, Xiaoyu; ZHANG, Jihong; WANG, Jianji. Responses of the Antioxidant System in QGY-7701 Cells to the Cytotoxicity and Apoptosis Induced by 1-Octyl-3-methylimidazolium Chloride. **Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology**, China, v. 27, n. 6, p. 330-336, 20 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.21495>.

KAUSHIK, Nagendra; ATTRI, Pankaj; KAUSHIK, Neha; CHOI, Eun. Synthesis and Antiproliferative Activity of Ammonium and Imidazolium Ionic Liquids against T98G Brain Cancer Cells. **Molecules**, Coreia, v. 17, n. 12, p. 13727-13739, 22 nov. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules171213727>.

LI, Xiaoyu; MA, Junguo; WANG, Jianji. Cytotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in HepG2 cells induced by ionic liquid 1-methyl-3-octylimidazolium bromide. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, China, v. 120, p. 342-348, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.018>.

LIU L, Wu H, Riduan SN, Ying JY, Zhang Y. 2013. Short imidazolium chains effectively clear fungal biofilm in keratitis treatment. *Biomaterials*. 34: 1018-1023.

MALHOTRA, Sanjay V.; KUMAR, Vineet. A profile of the in vitro anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Frederick, v. 20, n. 2, p. 581-585, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.085>.

MARTINHO, J. M. G., 1994 - Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível, **QUÍMICA**, 52, 44.

MENDES, Marcela Bocks. **Avaliação da dependência econômica relativa à importação de insumos farmacêuticos ativos para a produção de medicamentos antirretrovirais pelos**

laboratórios farmacêuticos oficiais do Brasil. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2013.

MERCK. **Ressonância magnética nuclear (RMN)**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/analytical-chemistry/nuclear-magnetic-resonance>. Acesso em: 4 ago. 2022.

MOSMANN, T. (1983) **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

PITA, João Carlos Lima Rodrigues. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE DO TRACHYLOBANO-360 DE *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE)**. 2010. 155 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

RIDUAN, Siti Nurhanna *et al.* Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. **Chemical Society Reviews**, Japão, v. 42, n. 23, p. 9055-9071, 27 ago. 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60169b>.

SAJADIYEH, Elham *et al.* The Study of Cytotoxicity of an Imidazolium Based Ionic Liquid on MCF-7 Cell Line. **Journal Of Chemical Health Risks**, Irã, v. 11, n. 1, p. 329-333, mar. 2021. Islamic Azad University, Damghan Branch, Islamic Republic of Iran. <http://dx.doi.org/10.22034/jchr.2020.1886005.1079>.

SCHREKKER, Clarissa Martins Leal. **POLÍMEROS COM SAIS IMIDAZÓLICOS: MATERIAIS INOVADORES COM PROPRIEDADES ANTIBIOFILME FRENTE A ISOLADOS DE CANDIDA**. 2016. 219 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

SILVA, Thiago Barcellos da. **LÍQUIDOS IÔNICOS - ALGUNS ASPECTOS SOBRE AS PROPRIEDADES, PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES**. 2004. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Curso de Bacharelado e Licenciatura em Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

SUKLABAIDYA, Sudip *et al.* Polydiacetylene-N-1-Hexadecyl Imidazole Mixed Film and Its Application toward the Sensing of Volatile Organic Compounds, Gasoline, and Pollution Level in Car Exhaust. **The Journal Of Physical Chemistry C**, Índia, v. 125, n. 29, p. 15976-15986, 16 jul. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c04338>.

THOMÉ, Chairini Cássia. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LÍQUIDOS IÔNICOS IMIDAZÓLICOS EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA HUMANO E GLIOMA DE RATO**. 2015. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

THOMAS, Eapen; THOMAS, Deepthi; BHUVANESWARI, S.; VIJAYALAKSHMI, K.P.; GEORGE, Benny K.. 1-Hexadecyl-3-methylimidazolium chloride: structure, thermal stability and decomposition mechanism. **Journal Of Molecular Liquids**, Índia, v. 249, n. 1, p. 404-411, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.029>.

WANG, Xuefeng; OHLIN, C. André; LU, Qinghua; FEI, Zhaofu; HU, Jun; DYSON, Paul J.. Cytotoxicity of ionic liquids and precursor compounds towards human cell line HeLa. **Green Chemistry**, Xangai, v. 9, n. 11, p. 1191, ago. 2007. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b704503d>.