



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS VIA CONDENSAÇÃO DE
KNOEVENAGEL E REAÇÕES SEQUENCIAIS UTILIZANDO QUITOSANA COMO
ORGANOCATALISADOR RECICLÁVEL**

PALOMA GOMES DE ABRANTES

**JOÃO PESSOA – PB
2025**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS VIA CONDENSAÇÃO DE
KNOEVENAGEL E REAÇÕES SEQUENCIAIS UTILIZANDO QUITOSANA COMO
ORGANOCATALISADOR RECICLÁVEL**

PALOMA GOMES DE ABRANTES

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal da Paraíba
como requisito para a obtenção do título
de Doutora em Ciências, área de
concentração em Química Orgânica.**

1º ORIENTADORA: Dra. JULIANA ALVES VALE

2º ORIENTADOR: Dr. ERCULES EPAMINONDAS DE SOUSA TEOTONIO

**JOÃO PESSOA – PB
2025**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A161s Abrantes, Paloma Gomes de.

Síntese de compostos bioativos via condensação de Knoevenagel e reações sequenciais utilizando quitosana como organocatalisador reciclável / Paloma Gomes de Abrantes. - João Pessoa, 2025.

198 f.

Orientação: Juliana Alves Vale.

Coorientação: Ercules Epaminondas de S. Teotônio.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Quitosana. 2. Condensação de Knoevenagel. 3. Reações sequenciais. 4. Catálise. 5. Atividade biológica. I. Vale, Juliana Alves. II. Teotônio, Ercules Epaminondas de Sousa. III. Título.

UFPB/BC

CDU 54(043.2)

SÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS VIA CONDENSAÇÃO DE KNOEVENAGEL E REAÇÕES SEQUENCIAIS UTILIZANDO QUITOSANA COMO ORGANOCATALISADOR RECICLÁVEL

Trabalho de Tese de Doutorado apresentado pela discente Paloma Gomes de Abrantes e aprovada pela banca examinadora abaixo em 22 de outubro de 2025.

Documento assinado digitalmente



JULIANA ALVES VALE
Data: 29/10/2025 13:27:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Juliana Alves Vale
DQ/UFPB
Orientadora – Presidente

Documento assinado digitalmente



ERCULES EPAMINONDAS DE SOUSA TEOTONIO
Data: 29/10/2025 14:59:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ercules Epaminondas de Sousa Teotônio
DQ/UFPB
2º Orientador

Documento assinado digitalmente



RODOLFO HIDEKI VICENTE NISHIMURA
Data: 31/10/2025 19:31:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodolfo Hideki Vicente Nishimura
DQF/UFPE
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente



FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA
Data: 13/11/2025 20:21:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra
DCF/UFPB
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente



DAYSE DAS NEVES MOREIRA
Data: 30/10/2025 11:37:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Dayse das Neves Moreira
DQ/UFPB
Examinadora Interna

Documento assinado digitalmente



CLAUDIO GABRIEL LIMA JUNIOR
Data: 29/10/2025 17:28:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Júnior
DQ/UFPB
Examinador Interno

Dedico este trabalho
a todos que caminharam comigo,
mesmo quando os passos foram incertos e o caminho desafiador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada novo dia de vida, pelas maravilhas que me foram concedidas e pelo amparo constante nos caminhos que trilhei, os quais me renderam tantos frutos.

Agradeço à minha família, sempre presente, oferecendo apoio, conselhos e, acima de tudo, esperança e motivação para jamais desistir dos meus sonhos.

Agradeço aos meus orientadores, Dra. Juliana Alves Vale e Dr. Ercules Epaminondas de Sousa Teotonio, pela orientação dedicada e pela oportunidade de realizar este trabalho. Sou imensamente grata pela paciência, confiança e incentivo.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha trajetória. Em especial, agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pela excelência e compromisso com o ensino.

Agradeço com carinho e gratidão aos colegas e amigos do Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LaSOB) e do Laboratório de Compostos de Coordenação e Química de Superfície (LCCQS). Estendo esse agradecimento aos integrantes dos demais laboratórios do PPGQ, que sempre se mostraram solícitos e dispostos a ajudar.

Agradeço aos profissionais do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB (IPeFarM-UFPB) pelo suporte nas análises de RMN e pelos momentos de conversa e encorajamento.

Sou também grata a todos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (LAPAVET), do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABIDIC), do Laboratório de Quimioinformática da UFPB e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela parceria e pelas análises biológicas realizadas *in silico* e *in vitro*.

Agradeço, com amor e admiração, ao meu noivo, Edson Carlos Monteiro Pordeus, que, mesmo ciente dos desafios dessa caminhada, nunca deixou de me apoiar, incentivar e acreditar em mim.

Agradeço à Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-Graduação em Química e à Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Química pelo suporte institucional ao longo desse percurso.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro por meio da concessão da bolsa.

Quero que todos saibam o quanto foram essenciais para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Minha gratidão é imensa e permanente.

RESUMO

A reação de condensação de Knoevenagel constitui uma variante amplamente explorada das reações aldólicas, utilizada para incrementar a funcionalidade de cadeias carbônicas na prospecção de novas moléculas bioativas. Por se tratar de um processo dependente de catalisadores, tem-se intensificado a busca por metodologias catalíticas inovadoras capazes de promover reações mais rápidas, seletivas e eficientes. Nesse contexto, quitosanas de peso molecular baixo (QPB) comercial e modificada com EDTA por 72 h (QPB-EDTA-72h) foram aplicadas na síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos, adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos ou isatina, além de derivados de xanteno e tetracetona. Os compostos obtidos foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C , ponto de fusão e avaliados quanto às atividades antileishmania, antimicrobiana e antitumoral *in vitro* e larvicide frente a *Aedes aegypti*. A QPB-EDTA-72h atuou como organocatalisador bifuncional heterogeneizado à temperatura ambiente em reações entre aldeídos ou isatinas e malononitrila em etanol:água (3:7, v/v), produzindo os adutos desejados (**1a-l** e **2a-h**) em 0,5–120 min, com rendimentos de 83–96%. O catalisador manteve a atividade por seis ciclos de recuperação e reutilização. Nos ensaios larvicidas, os adutos de Knoevenagel **1c** (R = 4-NO₂) e **1g** (R = 3-OCH₃) apresentaram CL₅₀ de 3,39 e 5,13 ppm, respectivamente, alterando a hemolinfa das larvas sem aumento significativo de óxido nítrico (NO). Como antimicrobianos, **1a** (R = H), **1f** (R = 3-NO₂) e **1h** (R = 2-NO₂) inibiram todas as cepas avaliadas (CIM = 512–1024 µg/mL). Contra *Leishmania infantum*, os adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2b** (R = 5-Cl; R' = H), **2c** (R = 5-Br; R' = H) e **2g** (R = 5-CH₃; R' = N-benzil) apresentaram CI₅₀ de 15,05, 18,38 e 12,7 µM (promastigota) e CE₅₀ de 5,74, 4,64 e 3,8 µM (amastigota axênica), sem citotoxicidade em hemácias humanas. Em PBMCs, exibiram CC₅₀ entre 25,2–34,41 µM, com IS de 4,39–7,42. Nenhum aduto de Knoevenagel derivado de isatina mostrou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas (2–1024 µg/mL). Na síntese sequencial do ácido cumarino-3-carboxílico **3a** (R = H), a QPB comercial foi o catalisador mais eficiente em água ou etanol:água (3:7, v/v) a 75 °C, fornecendo o produto em curto tempo e bom rendimento. Com salicilaldeídos substituídos, foram obtidos novos derivados cumarínicos (**3b-i**) em 10–45 min, com rendimentos de 77–88% e até quatro ciclos de reutilização do catalisador. Os ácidos **3c-e**, **3h** e **3i** inibiram o crescimento microbiano a partir de 1024 µg/mL, sendo o composto **3d** (R = 5-Br) considerado bactericida e fungicida. Derivados de xanteno (**4a-g**) e tetracetona (**5a-g**) foram obtidos em reações sequenciais de aldeídos aromáticos e dimedona (1:2 equivalentes) em água a 75 °C com QPB comercial. Os processos se mostraram simples, sustentáveis e eficientes. Os derivados de xanteno foram obtidos em 10–60 min (73–93%) e os de tetracetona em 10–20 min (82–94%), mantendo estrutura e atividade catalítica após seis ciclos de reciclagem. Nos ensaios biológicos, os derivados de xanteno apresentaram maior citotoxicidade que as tetracetonas. O composto **4f** (R = 4-OH) foi o mais ativo (inibição >94%) contra linhagens de leucemia mieloide crônica (K-562), câncer de cólon humano (HCT-116) e carcinoma pulmonar (A-549), com CI₅₀ de 12,08, 6,61 e 5,54 µM, respectivamente, mas apresentou alta citotoxicidade em células não tumorais (MRC-5, 96,07%), resultando em baixo IS. Ainda assim, destaca-se como composto líder para futuras modificações visando maior seletividade.

PALAVRAS-CHAVE: Quitosana; Condensação de Knoevenagel; Reações Sequenciais; Catálise; Atividade biológica.

ABSTRACT

The Knoevenagel condensation reaction is a widely explored variant of aldol reactions, used to enhance the functionality of carbon chains in the search for new bioactive molecules. As it is a catalyst dependent process, the pursuit of innovative catalytic methodologies capable of promoting faster, more selective, and more efficient reactions has intensified. In this context, low molecular weight commercial chitosan (LWC) and EDTA-modified chitosan (LWC-EDTA-72h) were applied in the synthesis of 3-coumarin-carboxylic acids, Knoevenagel adducts derived from aromatic aldehydes or isatin, as well as xanthene and tetraketone derivatives. The obtained compounds were characterized by ^1H and ^{13}C NMR, melting point analysis, and evaluated for antileishmanial, antimicrobial, antitumor *in vitro*, and larvicidal activity against *Aedes aegypti*. LWC-EDTA-72h acted as a bifunctional heterogeneous organocatalyst at room temperature in reactions between aldehydes or isatins and malononitrile in ethanol:water (3:7, v/v), producing the desired adducts (**1a–l** and **2a–h**) in 0.5–120 min with yields of 83–96%. The catalyst maintained its activity over six recovery and reuse cycles. In larvicidal assays, the Knoevenagel adducts **1c** (R = 4-NO₂) and **1g** (R = 3-OCH₃) exhibited LC₅₀ values of 3.39 and 5.13 ppm, respectively, altering larval hemolymph without significant increases in nitric oxide (NO). As antimicrobials, **1a** (R = H), **1f** (R = 3-NO₂), and **1h** (R = 2-NO₂) inhibited all evaluated strains (MIC = 512–1024 $\mu\text{g/mL}$). Against *Leishmania infantum*, the isatin-derived Knoevenagel adducts **2b** (R = 5-Cl; R' = H), **2c** (R = 5-Br; R' = H), and **2g** (R = 5-CH₃; R' = N-benzyl) showed IC₅₀ values of 15.05, 18.38, and 12.7 μM (promastigote) and EC₅₀ values of 5.74, 4.64, and 3.8 μM (axenic amastigote), with no cytotoxicity toward human erythrocytes. In PBMCs, they exhibited CC₅₀ values of 25.2–34.41 μM , with SI values of 4.39–7.42. No isatin-derived Knoevenagel adduct showed antimicrobial activity at the tested concentrations (2–1024 $\mu\text{g/mL}$). In the sequential synthesis of 3-coumarinocarboxylic acid **3a** (R = H), commercial LWC was the most efficient catalyst in water or ethanol:water (3:7, v/v) at 75 °C, providing the product in short reaction times and good yields. With substituted salicylaldehydes, new coumarin derivatives (**3b–i**) were obtained in 10–45 min with yields of 77–88%, and up to four catalyst reuse cycles. Acids **3c–e**, **3h**, and **3i** inhibited microbial growth from 1024 $\mu\text{g/mL}$, with compound **3d** (R = 5-Br) being considered bactericidal and fungicidal. Xanthene (**4a–g**) and tetraketone (**5a–g**) derivatives were obtained through sequential reactions of aromatic aldehydes and dimedone (1:2 equivalents) in water at 75 °C using commercial LWC. The processes proved simple, sustainable, and efficient. Xanthene derivatives were obtained in 10–60 min (73–93%) and tetraketone in 10–20 min (82–94%), maintaining their structure and catalytic activity after six recycling cycles. In the biological assays, xanthene derivatives showed greater cytotoxicity than tetraketone. Compound **4f** (R = 4-OH) was the most active (>94% inhibition) against chronic myeloid leukemia (K-562), human colon cancer (HCT-116), and lung carcinoma (A-549) cell lines, with IC₅₀ values of 12.08, 6.61, and 5.54 μM , respectively, but exhibited high cytotoxicity toward non-tumor cells (MRC-5, 96.07%), resulting in a low SI. Nevertheless, it stands out as a lead compound for future modifications aiming at improved selectivity.

KEYWORDS: Chitosan; Knoevenagel Condensation; Sequential Reactions; Catalysis; Biological Activity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A-549	Células de Carcinoma Pulmonar
AChE	Acetilcolinesterase
AmB	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
BHI	Ágar <i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC₅₀	Concentração Citotóxica Semimáxima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CD₃CO₂D	Ácido acético deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CE₅₀	Concentração Efetiva Semimáxima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CH₅₀	Concentração Hemolítica Média
CI₅₀	Concentração Inibitória Semimáxima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL₅₀	Concentração Letal Semimáxima
D₂O	Água deuterada
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DEM	Mistura Eutética Profunda
DHPMs	Dihidropirimidonas
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DOX	Doxorrubicina
DP	Desvio Padrão da Média
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DTPA	Ácido Dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGB	Base Eletrogerada
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GD	Grau de Desacetilação
GlcN	2-amino-2-desoxi- <i>D</i> -glicopirranose
GlcNAc	2-acetamida-2-desoxi- <i>D</i> -glicopirranose

HCT-116	Células de Câncer de Cólon Humano
IC	Intervalo de Confiança
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de Seletividade
K-562	Células de Leucemia Mieloide Crônica
LAPaVet	Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores
LaSOB	Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise
LASOM	Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal
LGEO	Óleo Essencial de <i>Lippia gracilis</i>
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
mGO	Óxido de Grafeno magnético
MOFs	Estruturas Metal-Orgânicas
MPLC	Cromatografia Líquida de Média Pressão
MRC-5	Fibroblastos Pulmonares
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio
NO	Óxido Nítrico
OG	Óxido de Grafeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PEG	Polietilenoglicol
P.F.	Ponto de Fusão
PHQs	Polihidroquinolinas
QPB	Quitosana de Peso Molecular Baixo
RB	Rodamina B
R_f	Fator de Retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMSD	Desvio Quadrático Médio da Raiz
UNICAL	Unidade de Central Analítica
β-CD	β-ciclodextrina
δ	Deslocamento Químico

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Aplicação de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{quitosana}$ como organocatalisador heterogêneo para a obtenção de PHQs na reação assimétrica de Hantzsch	32
Esquema 2. Aplicação de quitosana-OG como organocatalisador heterogêneo para a síntese de DHPMs	33
Esquema 3. Aplicação de $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{quitosana}$ como catalisador heterogêneo para a síntese de 2-amino-4 <i>H</i> -cromenos	33
Esquema 4. Aplicação de quitosana/Ce como catalisador heterogêneo para a síntese de piperidinas espiro-substituídas	34
Esquema 5. Aplicação de quitosana em solução aquosa de ácido acético (2%) como catalisador homogêneo para a síntese de curcumina 3,4-dihidropirimidinonas	35
Esquema 6. Aplicação de <i>O</i> -carboximetil-quitosana como catalisador para a síntese de Bis-benzoquinonilmetanos	36
Esquema 7. Representação para a reação de condensação de Knoevenagel	37
Esquema 8. Representação simplificada para a reação de síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos via condensação de Knoevenagel	43
Esquema 9. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos promovida por micelas do extrato aquoso de vagens de <i>Acacia concinna</i> como catalisador	43
Esquema 10. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos promovida pela formação do complexo de inclusão β -CD-salicilaldeído	44
Esquema 11. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos promovida por sucos de frutas e vegetais comestíveis como catalisadores e licores e águas residuais como solventes	45
Esquema 12. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos utilizando complexo polimérico à base de amida primária cristalina como catalisador heterogêneo bifuncional	46
Esquema 13. Obtenção de derivados de xanteno e tetracetona a partir de aldeído aromático e 1,3-dicetona cíclica (proporção 1:2) via reação sequencial de Knoevenagel-Michael e ciclização intramolecular	46
Esquema 14. Síntese de derivados de xanteno utilizando ácido <i>p</i> -toluenossulfônico monohidratado ($\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$) como catalisador homogêneo em moagem mecanoquímica	48
Esquema 15. Síntese de derivados de xanteno utilizando catalisador híbrido mesoporoso de $\text{PTA}@\text{Ta}_2\text{O}_5$	49
Esquema 16. Síntese de derivados de xanteno utilizando nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Ag}/\text{CeO}_2$ como um catalisador heterogêneo	50

Esquema 17. Síntese de derivados de xanteno e tetracetonas utilizando OG e rOG@Fe ₃ O ₄ @Ni como catalisador heterogêneo	50
Esquema 18. Síntese de derivados de tetracetona utilizando 2-aminopirazina como catalisador básico de Lewis	51
Esquema 19. Síntese de derivados de tetracetona utilizando DEM de <i>L</i> -prolina:ácido oxálico como catalisador ácido de Bronsted	51
Esquema 20. Síntese de derivados de tetracetona utilizando CNF@DBU[Cl] como catalisador heterogêneo	52
Esquema 21. Obtenção de tetracetona 5 a partir de benzaldeído e dimedona (1:2 equivalentes) sob condições otimizadas após 1 h de acompanhamento reacional	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação estrutural dos meros GlcNAc e GlcN da quitina (A) e quitosana (B), respectivamente	27
Figura 2.	Campos de aplicação e usos potenciais da quitosana e seus derivados	29
Figura 3.	Estrutura da isatina	39
Figura 4.	Atividades biológicas observadas para os compostos heterocíclicos obtidos a partir de adutos de Knoevenagel derivados de isatina com malononitrila ou cianoésteres	40
Figura 5.	Medidas instrumentais usadas na caracterização dos catalisadores e dos compostos bioativos	58
Figura 6.	Mecanismo proposto para reação de síntese do aduto de isatina 2a catalisada por QPB-EDTA-72h	87
Figura 7.	Desempenho de reciclagem da QPB-EDTA-72h na síntese do produto 2a	88
Figura 8.	Espectros de FT-IR de QPB-EDTA-72h (b), QPB-EDTA-72h reutilizada (seis ciclos) (c) e produto 2a (d)	88
Figura 9.	Atividade larvicida de diferentes adutos de Knoevenagel (1a-l) na concentração de 500 ppm contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 h. C = Controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)	89
Figura 10.	Atividade larvicida de diferentes adutos de Knoevenagel nas concentrações de 100 e 80 ppm em larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 h. C = Controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)	90
Figura 11.	Atividade larvicida de diferentes adutos de Knoevenagel nas concentrações de 40, 20, 10 e 1,5 ppm em larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 h. C = Controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey	91
Figura 12.	Interações 2D entre o aduto Knoevenagel 1g (A), o aduto Knoevenagel 1c (B) e o ligante PDB (C) com o alvo FKBP12 do <i>Aedes aegypti</i> (PDB: 3UQI)	93
Figura 13.	Metade da concentração letal máxima dos adutos 1c e 1g de Knoevenagel contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> em estágio quatro após 24 h. IC = Intervalo de confiança	93
Figura 14.	Hemócitos presentes na hemolinfa larval de <i>Aedes aegypti</i> exposta aos adutos 1c , 1g e controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey	94
Figura 15.	Hemócitos totais presentes na hemolinfa larval de <i>Aedes aegypti</i> exposta aos adutos 1c , 1g e controle negativo após 24 h. (*) estatisticamente significativo em relação ao	

controle negativo. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey	96
Figura 16. Produção de NO na hemolinfa larval de <i>Aedes aegypti</i> exposta aos adutos 1c , 1g e controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey	97
Figura 17. Curva de viabilidade celular de formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> na presença de 2b , 2c , 2g e AmB . Valor de p: $p < 0,05$ (*)	99
Figura 18. Mapas de interação 2D dos compostos 2g (A), 2b (B), 2c (C), AmB (D) e do ligante co-cristalizado PDB (E) com <i>Tripanotona reductase</i> de <i>Leishmania infantum</i> (PDB: 5EBK)	101
Figura 19. Curva de viabilidade celular da forma amastigota axênica de <i>Leishmania infantum</i> na presença de 2b , 2c , 2g e AmB . Valor de p: $p < 0,05$ (*)	102
Figura 20. Curva de viabilidade de PBMCs na presença dos compostos testados 2b , 2c , 2g e substância controle (AmB). Valor de p: $p < 0,05$ (*)	104
Figura 21. Mecanismo proposto para reação de síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos catalisados por quitosana	109
Figura 22. Desempenho de reciclagem da QPB comercial na síntese do produto 3a	113
Figura 23. Espectros de FT-IR de QPB comercial (a), QPB reutilizada (quatro ciclos) (b) e produto 3a (c)	114
Figura 24. Espectros de RMN de ^1H da QPB comercial (a) e QPB reutilizada (quatro ciclos) (b) em mistura binária $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{COOD}$ (1:1, v/v) a 40°C	114
Figura 25. Mecanismo proposto para a síntese do derivado de xanteno 4a usando quitosana comercial como organocatalisador	122
Figura 26. Desempenho de reciclagem de QPB comercial na síntese do produto 4a	128
Figura 27. Espectros de FT-IR de QPB comercial (a), reutilizada (seis ciclos) (b), produto 4a (c)	129
Figura 28. Procedimento para a síntese dos derivados de 3,4-dihidrocumarinas (6a-i)	138
Figura S1. Espectro de RMN ^{13}H (300 MHz, CDCl_3) do Composto 1g	161
Figura S2. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Composto 1g	161
Figura S3. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Composto 1i	162
Figura S4. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Composto 1i	162
Figura S5. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Composto 1j	163
Figura S6. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Composto 1j	163
Figura S7. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto 2a	164
Figura S8. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto 2a	165

Figura S9.	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2b	165
Figura S10.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2b	165
Figura S11.	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2c	166
Figura S12.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2c	166
Figura S13.	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2d	167
Figura S14.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2d	167
Figura S15.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2e	168
Figura S16.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2e	168
Figura S17.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2f	169
Figura S18.	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2f	169
Figura S19.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2g	170
Figura S20.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) do Composto 2g	170
Figura S21.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do Composto 2h	171
Figura S22.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do Composto 2h	171
Figura S23.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) do Composto 3a	172
Figura S24.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do Composto 3a	172
Figura S25.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto 3b	173
Figura S26.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto 3b	173
Figura S27.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto 3c	174
Figura S28.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto 3c	174
Figura S29.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto 3d	175
Figura S30.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto 3d	175
Figura S31.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto 3e	176
Figura S32.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto 3e	176
Figura S33.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto 3f	177
Figura S34.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto 3f	177
Figura S35.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto 3g	178
Figura S36.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do composto 3g	178
Figura S37.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto 3h	179
Figura S38.	Deconvolução do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto 3h	179
Figura S39.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) ampliado após deconvolução do composto 3h	180
Figura S40.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do composto 3h	180

Figura S41.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto 3i	181
Figura S42.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do composto 3i	181
Figura S43.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 4a	182
Figura S44.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 4a	182
Figura S45.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 4b	183
Figura S46.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 4b	183
Figura S47.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 4c	184
Figura S48.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto 4c	184
Figura S49.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 4d	185
Figura S50.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto 4d	185
Figura S51.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 4e	186
Figura S52.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto 4e	186
Figura S53.	Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) do composto 4f	187
Figura S54.	Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do composto 4f	187
Figura S55.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 4g	188
Figura S56.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto 4g	188
Figura S57.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 5a	189
Figura S58.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 5a	189
Figura S59.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 5b	190
Figura S60.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 5b	190
Figura S61.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 5c	191
Figura S62.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 5c	191
Figura S63.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 5d	192
Figura S64.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto 5d	192
Figura S65.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 5e	193
Figura S66.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 5e	193
Figura S67.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 5f	194
Figura S68.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto 5f	194
Figura S69.	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto 5g	195
Figura S70.	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto 5g	195

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Vantagens e desvantagens dos catalisadores homogêneos e heterogêneos	26
Tabela 2.	Exemplos de adutos de Knoevenagel utilizados na síntese de compostos com atividade biológica	38
Tabela 3.	Reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais e suas procedências (continua)	56
Tabela 4.	Aplicação de variados aldeídos aromáticos para obtenção de adutos de Knoevenagel utilizando QPB-EDTA-72h como catalisador nas condições otimizadas (continua)	82
Tabela 5.	Aplicação de variadas isatinas para obtenção de adutos utilizando QPB-EDTA-72h como catalisador nas condições otimizadas (continua)	84
Tabela 6.	Concentração inibitória semimáxima (CI ₅₀) do crescimento de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratados com adutos de Knoevenagel derivados de isatina e AmB como controle positivo	98
Tabela 7.	Concentração efetiva semimáxima (CE ₅₀) do crescimento amastigota axênico de <i>Leishmania infantum</i> tratado com adutos de Knoevenagel derivados de isatina, AmB como controle positivo, citotoxicidade em hemácias humanas (CH ₅₀) e índice de seletividade (IS)	103
Tabela 8.	Concentração efetiva semimáxima (CE ₅₀) de amastigotas axênicas tratadas com adutos de Knoevenagel derivados de isatina 2b , 2c , 2g e AmB como controle positivo, citotoxicidade em PBMC (CC ₅₀) e índice de seletividade (IS)	104
Tabela 9.	Aplicação dos materiais de quitosana como organocatalisador sob diferentes condições para obtenção do ácido cumarino-3-carboxílico 3a	105
Tabela 10.	Otimização das condições reacionais para obtenção do ácido cumarino-3-carboxílico 3a	107
Tabela 11.	Aplicação de saliciladeídos substituídos para obtenção de variados ácidos cumarino-3-carboxílicos nas condições otimizadas (continua)	110
Tabela 12.	Aplicação de variadas misturas binárias etanol:água como solvente para obtenção de variados ácidos cumarino-3-carboxílicos	112
Tabela 13.	Resultados da avaliação da CIM/CBM/CFM (1024 a 2 µg/mL) de 12 moléculas/adutos de Knoevenagel em espécies de bactérias e fungos - Técnica de microdiluição (continua)	115

Tabela 14. Resultados da avaliação da CIM/CBM/CFM (1024 a 2 $\mu\text{g/mL}$) de 8 moléculas/adutos de Knoevenagel derivados de isatina em espécies de bactérias e fungos - Técnica de microdiluição	117
Tabela 15. Resultados da avaliação da CIM/CBM/CFM (1024 a 2 $\mu\text{g/mL}$) de 9 moléculas/ácidos cumarino-3-carboxílicos em espécies de bactérias e fungos - Técnica de microdiluição	118
Tabela 16. Testes de atividade catalítica dos materiais de quitosana como organocatalisadores na síntese do derivado xanteno 4a	120
Tabela 17. Aplicação de salicilaldeídos substituídos para obter vários derivados de xanteno (continua)	123
Tabela 18. Aplicação de benzaldeídos substituídos para obtenção de diversas tetracetonas (continua)	126
Tabela 19. Porcentagem de inibição do crescimento celular (%) e desvio padrão da média (DP) dos compostos em linhagens de células tumorais	129
Tabela 20. Citotoxicidade em μM dos compostos em K-562, A-549 e HCT-116	131
Tabela 21. Porcentagem de inibição do crescimento celular (%) e desvio padrão da média (DP) dos compostos em linhagens celulares não tumorais	132
Tabela 22. Valores de CI_{50} (μM) e intervalo de confiança (IC 95%) dos compostos 4f e DOX em células MRC-5 e respectivos IS contra as linhagens tumorais K-562, A-549 e HCT-116.	132

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	A CATÁLISE	25
2.1.1	Definição, tipos de catálise e catalisadores	25
2.2	A QUITOSANA	27
2.2.1	Estrutura, propriedades e aplicações	27
2.2.2	Quitosana e derivados como organocatalisadores recicláveis em reações orgânicas ...	31
2.3	A REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO DE KNOEVENAGEL	36
2.3.1	Importância sintética	36
2.3.2	Os ácidos cumarino-3-carboxílicos: métodos de obtenção e aplicações	41
2.3.3	Os derivados de xanteno e tetracetona: métodos de obtenção e aplicações	46
3	OBJETIVOS	53
3.1	OBJETIVO GERAL	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	SOLVENTES E REAGENTES	56
4.2	MEDIDAS INSTRUMENTAIS	58
4.2.1	Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier	58
4.2.2	Cromatografia em Camada Delgada	58
4.2.3	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13	59
4.2.4	Determinação dos Pontos de Fusão	59
4.3	SÍNTESE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	59
4.3.1	Obtenção da mistura binária EtOH:H ₂ O (3:7, v/v)	59
4.3.2	Procedimento geral para a síntese dos adutos de Knoevenagel	59
4.3.3	Procedimento geral para síntese dos ácidos cumarino-3-carboxílicos	60
4.3.4	Procedimento geral para a síntese dos derivados de xanteno e tetracetona	60
4.4	ANÁLISE <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	61
4.4.1	Análise da atividade larvívora dos adutos de Knoevenagel contra <i>Aedes aegypti</i>	61
4.4.1.1	Perfil celular	62
4.4.1.2	Medição de óxido nítrico	62
4.4.1.3	Ensaio de citotoxicidade frente <i>Artemia salina</i>	62
4.4.2	Análise da atividade antileishmaniana dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina	63

4.4.2.1 Cultura e manutenção de parasitas <i>in vitro</i>	63
4.4.2.2 Atividade antileishmania dos adutos de Knoevenagel derivados de isatinas sobre formas promastigotas e amastigota de <i>Leishmania infantum</i>	63
4.4.2.3 Citotoxicidade dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina frente a glóbulos vermelhos humanos	64
4.4.2.4 Citotoxicidade dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina em Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)	65
4.4.2.5 Análise de dados e estatísticas	65
4.4.3 Análise da atividade antimicrobiana dos adutos de Knoevenagel e ácidos cumarino-3-carboxílicos	66
4.4.3.1 Micro-organismos	66
4.4.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)	67
4.4.4 Análise da atividade antitumoral dos derivados de xanteno e tetracetona	68
4.5 Dados de deslocamentos dos Espectros de RMN ^1H e ^{13}C	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 SÍNTESE DOS ADUTOS DE KNOEVENAGEL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	82
5.1.1 Síntese dos adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos ou isatina utilizando QPB-EDTA-72h como organocatalisador heterogeneizado bifuncional	82
5.1.2 Estudo de reciclabilidade da QPB-EDTA-72h na reação de síntese do aduto de Knoevenagel derivado de isatina 2a	87
5.1.3 Atividade larvicida frente <i>Aedes aegypti</i> com com adutos de Knoevenagel derivados dos aldeídos aromáticos	89
5.1.4 Atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina	98
5.2 ATIVIDADE CATALÍTICA DOS MATERIAIS DE QPB NA SÍNTESE DE ÁCIDOS CUMARINO-3-CARBOXÍLICOS E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	105
5.2.1 Avaliação da atividade catalítica dos materiais de QPB na síntese dos ácidos cumarino-3-carboxílicos	105
5.2.2 Estudo de reciclabilidade da QPB comercial na síntese do ácido cumarino-3-carboxílico 3a	112
5.2.3 Atividade antimicrobiana dos adutos de Knoevenagel e ácidos cumarino-3-carboxílicos	115
5.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DOS MATERIAIS DE QPB NA SÍNTESE DE DERIVADOS DE XANTENO E TETRACETONA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	120

5.3.1	Avaliação da atividade catalítica dos materiais de QPB na síntese dos derivados de xanteno e tetracetona	120
5.3.2	Estudo de reciclabilidade da QPB comercial na síntese do derivado de xanteno 4a ..	128
5.3.3	Atividade antitumoral dos derivados de xanteno e tetracetona	129
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
7	PERSPECTIVAS	137
	REFERÊNCIAS	139
	MATERIAL SUPLEMENTAR	161
	Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C	161
	Artigo S1. Synthesis and <i>in vitro</i> antimicrobial activity evaluation of coumarin-3-carboxylic acids obtained via cascade reaction using chitosan as a recyclable catalyst	196
	Artigo S2. Larvicidal potential of Knoevenagel adducts against <i>Aedes aegypti</i> : theoretical study and <i>in vitro</i> validation	197
	Artigo S3. Synthesis, antileishmanial activity and <i>in silico</i> study of isatin-derived Knoevenagel adducts	198
	Artigo S4. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity in tumor cells of xanthene and tetraketone derivatives obtained via cascade reaction using chitosan as an organocatalyst ..	199

CAPÍTULO 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A síntese orgânica vem sendo idealizada objetivando não apenas a obtenção do produto final com rendimento elevado e alta pureza. Os fatores ambientais e econômicos têm sido considerados no planejamento de uma reação, uma vez que a procura por processos químicos mais sustentáveis e com maior eficiência aumentou consideravelmente. Como exemplo, a aplicação de catalisadores recicláveis tem se destacado para os químicos sintéticos por diminuir o número de etapas, bem como reduzir a geração de resíduos para os processos químicos. Além disso, a utilização de catalisadores possibilita maior eficiência na síntese de moléculas complexas e de alto valor agregado.

A catálise é empregada como estratégia de síntese para muitas reações orgânicas, permitindo que reações lentas se processem mais rapidamente através da redução da intensidade energética do processo químico [1]. No caso das reações de condensação de Knoevenagel, o uso de catalisadores proporciona benefícios para o progresso reacional, permitindo a obtenção de compostos bioativos versáteis de forma simples, rápida e sustentável. Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas que envolvem o emprego de catalisadores representa um dos setores mais promissores da indústria, contribuindo, especialmente, para a ampliação de estudos na elaboração de novos fármacos ou biocidas usados no tratamento ou controle de diversas doenças de grande impacto social [9-17].

A reação de condensação de Knoevenagel é de fundamental importância sintética por ser uma das rotas possíveis para a obtenção de olefinas substituídas de grande interesse industrial. Também é considerada como etapa intermediária de diversas reações sequenciais, como da síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos, derivados de xanteno e tetracetona, entre outras [2-8]. Esses compostos se destacam em estudos de diversas áreas, principalmente na indústria farmacêutica, pois exibem atividades antioxidante [3, 9], antiviral [10], antimalária [11], antibacteriano [12, 13], antifúngico [14, 15], anticâncer [16, 17], etc. Como consequência, são considerados promissores para o trabalho inovador na indústria e na pesquisa [3, 6].

Os métodos usuais para a síntese de adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos ou isatinas, ácidos cumarino-3-carboxílicos ou derivados de xanteno e tetracetona incluem a utilização de um composto carbonilado e um composto de metileno ativo em sistemas envolvendo promotores reacionais [7], misturas de solventes [18, 19] e catalisadores homogêneos ou heterogêneos [20-23]. Dentre esses sistemas, materiais de quitosana já foram investigados para obtenção dos adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos ou isatinas de forma eficiente [24, 25]. No entanto, a aplicação desse biopolímero como

organocatalisador reciclável ainda não foi explorada para as sínteses dos ácidos cumarino-3-carboxílicos e derivados de xanteno e tetracetona via reações sequenciais oriundas da condensação de Knoevenagel.

A quitosana é conhecida como um dos biopolímeros mais abundantes na natureza e apresenta propriedades notáveis, como baixo custo, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, solubilidade apenas em soluções ácidas diluídas e possibilidade de modificação para atuação como suporte catalítico [26, 27]. Dessa forma, se destaca por atender características buscadas no desenvolvimento de metodologias sustentáveis, atuando principalmente na catálise heterogênea de reações orgânicas [28], inclusive na condensação de Knoevenagel [29, 30]. Como catalisador heterogêneo, a quitosana pode ser empregada sem modificação. Porém, a sua funcionalização permite a heterogeneização de vários catalisadores homogêneos.

Embora a atuação da quitosana na catálise homogênea tenha sido pouco explorada, é possível unir a eficiência desse tipo de catálise com a recuperação e reciclabilidade, que são vantagens explícitas da catálise heterogênea. Essa união viabiliza benefícios ao sistema reacional sem haver comprometimento da estrutura do biopolímero, além de proporcionar resultados de tempo e rendimento satisfatórios mesmo após ciclos de recuperação e reutilização [31, 32]. Assim, dando continuidade aos esforços para o desenvolvimento de novas metodologias catalíticas eficientes e sustentáveis para a síntese de compostos bioativos, este trabalho propõe a obtenção de variados adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos ou isatinas utilizando quitosana funcionalizada com EDTA como organocatalisador heterogeneizado bifuncional [24], objetivando investigar as atividades antileishmania, antimicrobiana e larvicida frente *Aedes aegypti* desses compostos. Para mais, também propõe a aplicação da quitosana comercial como organocatalisador reciclável entre vários aldeídos aromáticos e 1,3-dicetonas cíclicas via reações sequenciais, bem como a avaliação das atividades antimicrobiana e antitumoral dos produtos obtidos.



CAPÍTULO 2

Referencial teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CATÁLISE

2.1.1 Definição, tipos de catálise e catalisadores

A catálise é uma tecnologia essencial que impulsiona a inovação, a eficiência e a sustentabilidade em diversas indústrias, desempenhando um papel vital no avanço da sociedade em direção a práticas mais responsáveis do ponto de vista ambiental. Muitas reações químicas ocorrem em condições mais brandas, com temperaturas e pressões mais baixas devido aos avanços da catálise. Isso não apenas economiza energia, como também melhora a eficiência geral dos processos industriais, levando a um menor desperdício de materiais e à produção de menos subprodutos indesejados. A pesquisa contínua na área da catálise visa descobrir novos catalisadores (substâncias que promovem a catálise) e otimizar processos para atender aos requisitos cada vez mais rigorosos de sustentabilidade [33-35].

A catálise é definida como um processo químico no qual a velocidade de uma reação é influenciada pela presença de um catalisador, que facilita a reação, mas não é consumido no processo. O catalisador atua diminuindo a barreira energética (ou energia de ativação) necessária para que a reação ocorra, permitindo que ela se processe mais rapidamente e, geralmente, em condições mais suaves do que ocorreria sem o catalisador. Em outras palavras, o catalisador fornece um caminho alternativo para que uma reação química ocorra, com uma energia de ativação menor do que o caminho convencional. Isso resulta em uma aceleração da reação sem que o catalisador seja consumido ou alterado permanentemente [35, 36].

Dependendo da fase em que ocorre a catálise, ela pode receber classificação diferente. Na catálise homogênea, o catalisador presente no meio reacional está na mesma fase que os reagentes e são chamados de catalisadores homogêneos. Como exemplo, os íons metálicos em solução ou ácidos e bases em reações aquosas podem ser citados [37, 38]. Quando o catalisador está em uma fase diferente, a catálise é classificada como heterogênea e os catalisadores também são chamados dessa forma. As sílicas mesoporosas são exemplos típicos de catalisadores heterogêneos [39-41]. Além desses, ainda existem os catalisadores homogêneos ligados a sólidos insolúveis, também conhecidos como catalisadores suportados ou heterogeneizados [42-44]. As enzimas em sistemas biológicos também desempenham um papel catalítico crucial. A catálise enzimática ou biocatálise é fundamental para muitos processos bioquímicos e tem sido bastante aplicada na síntese orgânica [45, 46].

Embora os catalisadores homogêneos apresentem como principal desvantagem a dificuldade de separação do meio reacional, sua principal vantagem é a maior dispersão, permitindo uma maior atividade e a necessidade de uma concentração mais baixa de catalisador. Nos catalisadores homogêneos, teoricamente, cada átomo individual pode ser cataliticamente ativo, enquanto nos catalisadores heterogêneos apenas os átomos da superfície participam da catálise. Entretanto, os catalisadores heterogêneos se destacam por serem facilmente removidos de uma mistura de reação, muitas vezes utilizando apenas filtração simples ou centrifugação [1, 46]. A **Tabela 1** resume outras vantagens e desvantagens dos dois tipos de catalisadores.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos catalisadores homogêneos e heterogêneos.

	Catalisador Homogêneo	Catalisador Heterogêneo
Centros ativos	Todos os átomos	Apenas os átomos da superfície
Concentração	Baixa	Alta
Seletividade	Alta	Baixa
Problemas de difusão	Praticamente ausente	Presente
Condições reacionais	Leve (50-200 °C)	Severa (>250 °C)
Aplicabilidade	Limitada	Larga
Perda de atividade	Reação irreversível com o produto	Envenenamento
Estrutura/Estoquiometria	Definida	Indefinida
Possibilidade de modificações	Alto	Baixo
Estabilidade térmica	Baixa	Alta
Separação do catalisador	Às vezes difícil	Fácil
Reciclagem do catalisador	Possível	Fácil
Custos das perdas do catalisador	Alto	Baixo

Fonte: Adaptado de [Hagen, 2006 \[1\]](#).

A escolha entre catalisadores homogêneos, heterogêneos ou heterogeneizados dependerá das características específicas da reação e das condições do processo. Cada tipo de catalisador tem suas vantagens e desvantagens, e a decisão deve levar em consideração fatores como a facilidade de recuperação, seletividade desejada, custos e requisitos ambientais.

Para a síntese orgânica, a catálise desempenha um papel significativo. Muitas reações orgânicas aplicam catalisadores para a obtenção de compostos, incluindo fármacos, produtos

químicos industriais, polímeros e materiais avançados. Para as reações de hidrogenação e desidrogenação, catalisadores metálicos, como manganês e níquel, são bastantes utilizados [47]. Em reações de acoplamento cruzado de Suzuki e Heck, os catalisadores de paládio são responsáveis pela ligação de dois fragmentos orgânicos, formando uma nova ligação carbono-carbono [48, 49]. Para a esterificação, os biocatalisadores são frequentemente utilizados de forma seletiva e eficiente [50, 51]. De modo geral, a catálise em síntese orgânica permite o controle seletivo das reações, a economia de reagentes, a redução de subprodutos indesejados e a eficiência geral dos processos. Essas características são cruciais para a produção de moléculas complexas de forma sustentável e econômica, tornando a catálise uma ferramenta essencial na química orgânica moderna.

2.2 A QUITOSANA

2.2.1 Estrutura, propriedades e aplicações

A quitosana é um biopolímero de baixo custo e alta disponibilidade natural, mas que geralmente é obtido pela indústria e grupos de pesquisa por meio da *N*-desacetilação da quitina. Este último é o biopolímero mais abundante na natureza depois da celulose e pode ser encontrado em crustáceos, insetos e moluscos, bem como na parede celular de alguns fungos. Embora sejam representados como homopolímeros, como mostrado na **Figura 1**, esses materiais são classificados como copolímeros formados por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) unidos por ligações glicosídicas β -(1,4), em que a proporção dessas unidades varia de acordo com o polímero. No caso da quitina, a estrutura polimérica apresenta predominância das unidades GlcNAc, enquanto na quitosana as unidades que se repetem, majoritariamente, são as GlcN [26, 27].

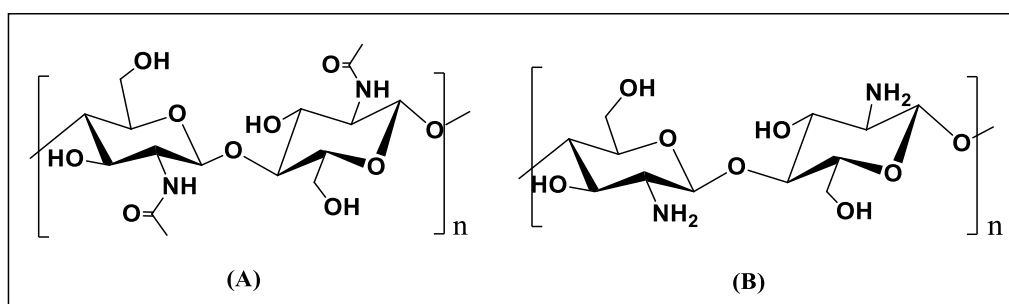


Figura 1. Representação estrutural dos meros GlcNAc e GlcN da quitina (A) e quitosana (B), respectivamente. **Fonte:** Adaptado de [Elsoud e Kady \(2019\) \[52\]](#).

Tanto a quitina quanto a quitosana são insolúveis em quase todos os solventes orgânicos e em água. No entanto, a quitosana se diferencia por ser solúvel em soluções ácidas cujo $\text{pH} < 6,0$, sendo essa uma das propriedades levadas em consideração para a obtenção desse biopolímero e determinação do grau de desacetilação (GD), além da maior utilização da quitosana frente a seu precursor. Sua solubilização ocorre em meio aquoso ácido devido à protonação dos grupos amino ($-\text{NH}_2$) localizados no carbono 2 da unidade repetitiva de *D*-glicosamina. Esse processo converte a quitosana em um polieletrólito, tornando-a solúvel em soluções aquosas [52, 53].

Além do GD, outros parâmetros influenciam a solubilidade da quitosana, como peso molecular, concentração do ácido ou do biopolímero e força iônica do meio. É importante otimizar esses parâmetros para obter quitosanas com propriedades específicas desejadas para diferentes aplicações. No entanto, a obtenção de quitosana com alto GD e alto peso molecular pode ser desafiadora devido ao risco de degradação do biopolímero com o aumento da massa molecular [54, 55].

A quitosana comercialmente disponível pode ser obtida a partir da *N*-desacetilação da quitina, que acontece por meio da hidrólise de seus grupos acetamidas em meio fortemente alcalino e elevada temperatura. Esse processo origina os grupos aminos predominantes na quitosana e responsáveis pela sua solubilidade em soluções aquosas ácidas. Para isso, o GD da quitina deve ser igual ou superior a 50% para que se solubilize em soluções ácidas e passe a ser considerada quitosana [52]. Os recentes avanços tecnológicos têm permitido explorar fontes alternativas para a obtenção de quitosana, e o cultivo de fungos selecionados é uma abordagem promissora nesse sentido. O uso de fungos para a produção de quitosana pode ter vantagens ambientais em comparação com métodos tradicionais que envolvem crustáceos. Além disso, essa abordagem pode ajudar a reduzir a dependência de fontes marinhas para a obtenção de quitosana [56, 57].

Dentre inúmeros polímeros, a quitosana se destaca por apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade, biorreabsorvidade e atoxicidade, podendo atuar como antibacteriano, anti-inflamatório, regenerador tecidual e ósseo, bem como um ótimo hemostático [58]. Os derivados de quitosana, como a quitosana *N*-alquilada, são capazes de converter os materiais usados na fabricação de curativos em hemostáticos, apresentando excelente capacidade de tamponamento para superfícies de feridas hemorrágicas. Assim, a quitosana *N*-alquilada pode transformar o sangue líquido total em um gel rapidamente, fazendo o sangramento de ferimentos leves ou graves cessar [26]. Vale lembrar que o processo de alquilação da quitosana, assim como a tosilação, carboxilação, acilação, sulfonação, amidação, acetilação, sililação, sulfonação, etc, é

possível devido a existências dos grupos funcionais amino e hidroxila livres em sua cadeia polimérica, que permitem que a quitosana seja modificada quimicamente, originando materiais com novas propriedades ou aprimorando as já existentes. Dessa forma, uma série de derivados com propriedades melhoradas ou distintas podem ser aplicados em vários campos da indústria (Figura 2) [59, 60].

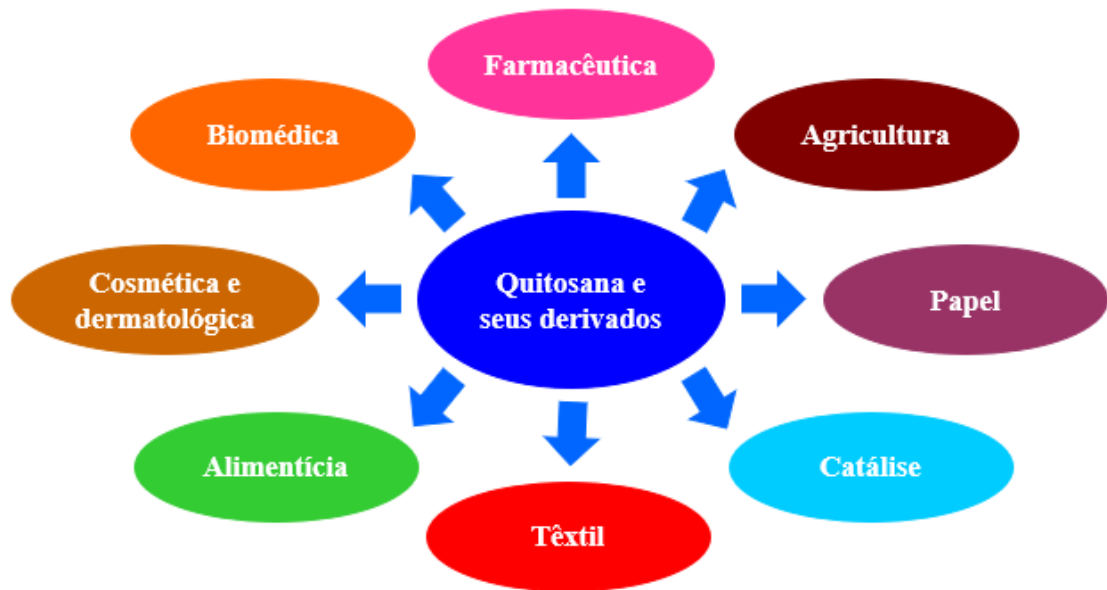


Figura 2. Campos de aplicação e usos potenciais da quitosana e seus derivados. **Fonte:** Adaptado de Hamed, Özogul e Regenstein (2016) [56].

Como um recurso natural renovável abundante e, principalmente, insolúvel em água, a quitosana e seus derivados têm sido utilizados em pesquisas de tratamento de efluentes, apresentando alta eficiência na remoção de corantes, íons de metais pesados, íons terras raras de águas residuais e industriais. O uso desses materiais para tratamento de água é importante porque os poluentes de metais pesados no meio ambiente, especialmente íons de metais pesados na água, representam uma séria ameaça aos ecossistemas e à saúde pública, tendo em vista que esses íons são tóxicos e não biodegradáveis. Além do mais, as principais tecnologias utilizadas para remover íons de metais pesados de efluentes também apresentam algumas limitações, como alto investimento de capital e custos operacionais. Dessa forma, a tecnologia de adsorção é uma metodologia alternativa para o tratamento de efluentes devido à sua facilidade de operação, baixo custo, alta eficiência e disponibilidade de diferentes tipos de adsorventes [61, 62].

No trabalho de Wu e colaboradores (2018) [63], os pesquisadores propuseram um compósito de quitosana com β -ciclodextrina (β -CD) modificado com ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) que demonstrou excelente desempenho para remoção de chumbo [Pb (II)] e o corante vermelho de ácido aniônico 73 (AR) em amostras de água. [Marnani e colaboradores \(2019\) \[64\]](#) também realizaram a produção de um adsorvente a partir da quitosana modificada com EDTA, porém com alterações interessantes. Os pesquisadores fizeram a combinação de dois grupos funcionais ambientalmente amigáveis (quitosana e EDTA) com nanofolhas de óxido de grafeno magnético (mGO) e o aplicaram como removedor eficiente do corante catiônico Rodamina B (RB) em soluções aquosas. Em ambos os casos, os adsorventes puderam ser recuperados, tratados e reutilizados em novos ciclos de tratamento de água. Porém, a magnetização de adsorventes permite que o mesmo seja mais facilmente recuperado da água tratada sem perdas e poluições secundárias, além de reduzir o tempo e o custo do processo.

Na separação de íons terras raras por cromatografia, a quitosana modificada pode ser utilizada como fase estacionária. Por exemplo, no trabalho de [Roosen e colaboradores \(2014\) \[65\]](#), a quitosana funcionalizada com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) foi misturada com sílica gel (quitosana-DTPA/sílica) e utilizada como fase estacionária na cromatografia líquida de média pressão (MPLC) enquanto uma solução diluída de ácido nítrico foi usada como eluente para a separação das seguintes misturas de íons terras raras: $\text{Nd}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$, $\text{Pr}^{3+}/\text{Nd}^{3+}$ e $\text{Pr}^{3+}/\text{Nd}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$. Os experimentos mostram que a separação dos íons terras-raras é viável com quitosana-DTPA/sílica, sem a necessidade do uso de soluções de agentes quelantes como eluentes.

Na catálise, a quitosana é empregada como catalisador heterogêneo ou suporte para a heterogeneização de catalisadores homogêneos, garantindo vantagens às reações químicas por meio da redução de resíduos, fácil recuperação do meio reacional através de métodos simples e seguros, bem como a possibilidade de reutilização em novas reações [\[66\]](#). Por exemplo, [Esfandiari et al. \(2020\) \[67\]](#) propuseram o uso da quitosana funcionalizada por triácido imida como um catalisador heterogêneo eficaz para a síntese multicomponente de benzodiazepinas à temperatura ambiente. Como resultados, observaram que a quitosana funcionalizada por triácido imida permite a produção dos compostos desejados em altos rendimentos, com excelente recuperação e método de processamento simples. Além disso, a quitosana funcionalizada por triácido imida possui uma boa reciclabilidade, podendo ser reutilizada por seis vezes sem perdas significativas de sua atividade catalítica.

Para a reação de condensação de Knoevenagel, a quitosana modificada com EDTA (QPB-EDTA-72h) atuou como organocatalisador heterogeneizado bifuncional, ou seja, capaz de ativar a carbonila do aldeído/cetona, utilizando os sítios ácidos do EDTA, e o composto de

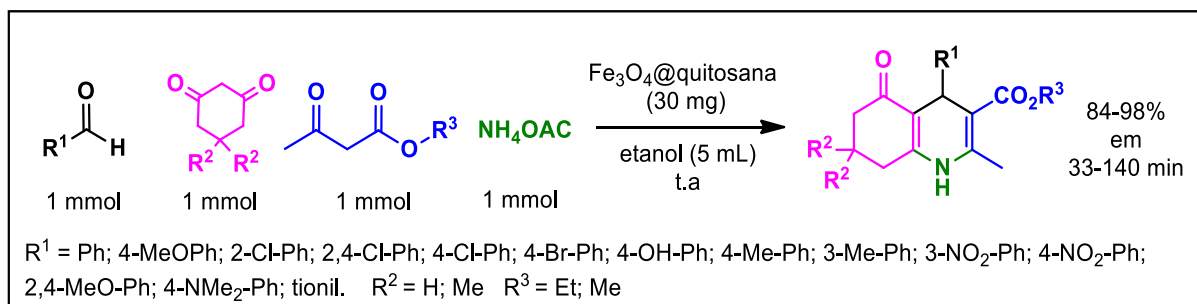
metileno ativo através dos grupos aminos residuais da quitosana que são ótimos sítios básicos para essa reação. Além disso, proporcionou ótimos resultados entre variados aldeídos e malononitrila em mistura binária etanol:água (3:7, v/v) como solvente à temperatura ambiente e se mostrou recuperável e reutilizável por seis vezes [24]. Estes resultados comprovam a eficácia dos catalisadores à base de quitosana e a possibilidade de inserção deles na síntese de outros compostos, como na síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos, derivados de xanteno e tetracetona, que utilizam a condensação de Knoevenagel como etapa intermediária.

2.2.2 Quitosana e derivados como organocatalisadores recicláveis em reações orgânicas

É impossível ignorar a importância da catálise para a química sintética, sendo considerada um dos pilares da química verde e ferramenta essencial para alcançar metodologias mais sustentáveis tanto nos laboratórios químicos quanto nos mais diversos setores da indústria. Nesta perspectiva, além de considerar as características desejadas para um catalisador, como baixo custo de aquisição, atoxicidade, excelente atividade, alta seletividade e estabilidade, facilidade de recuperação, reciclabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, a comunidade científica tem buscado incansavelmente por sistemas catalíticos que atendam essas características, se adequando a química verde [68].

A quitosana é um excelente material para o desenvolvimento de novos sistemas catalíticos verdes devido às suas propriedades interessantes e inatas. Além disso, a presença de diversos grupos funcionais na estrutura desse biopolímero torna a quitosana um composto excepcional, que pode desempenhar muitos papéis na ciência da catálise. A este respeito, a quitosana pode ser usada como um organocatalisador modificado ou não, sendo aplicada com sucesso em sistemas catalíticos para a síntese de diversos compostos orgânicos.

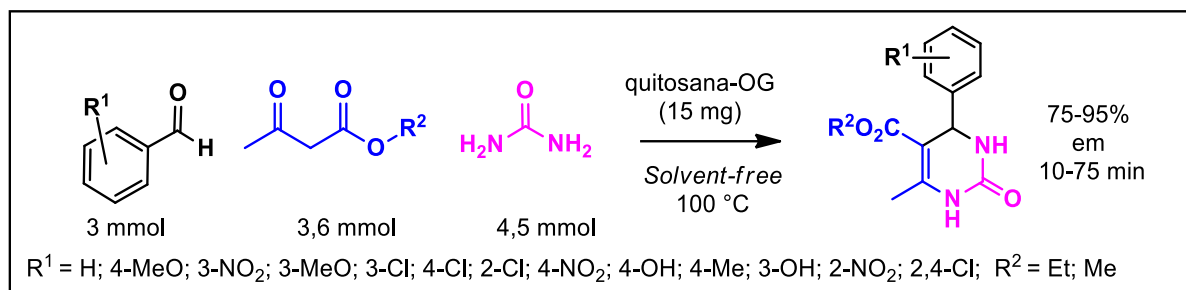
Via catálise heterogênea, inúmeros são os trabalhos que aplicam a quitosana como organocatalisador no sistema reacional [69-71]. Por exemplo, Maleki e colaboradores (2014) [72] propõem a aplicação do nanocompósito de magnetita revestida com quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{quitosana}$) como organocatalisador heterogêneo para a síntese de polihidroquinolinas (PHQs) a partir da reação assimétrica de Hantzsch. Na metodologia de modo geral, vários aldeídos, acetoacetato de etila ou metila, dimedona ou 1,3-ciclohexandiona e acetato de amônio reagiram à temperatura ambiente utilizando etanol como solvente e o nanocompósito de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{quitosana}$ (30 mg), proporcionando a obtenção das PHQs com altos rendimentos (84-98%) e tempos curtos (33-140 min) (**Esquema 1**).



Esquema 1. Aplicação de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@quitosana}$ como organocatalisador heterogêneo para a obtenção de PHQs na reação assimétrica de Hantzsch. **Fonte:** Adaptado de [Maleki e colaboradores \(2014\) \[72\]](#).

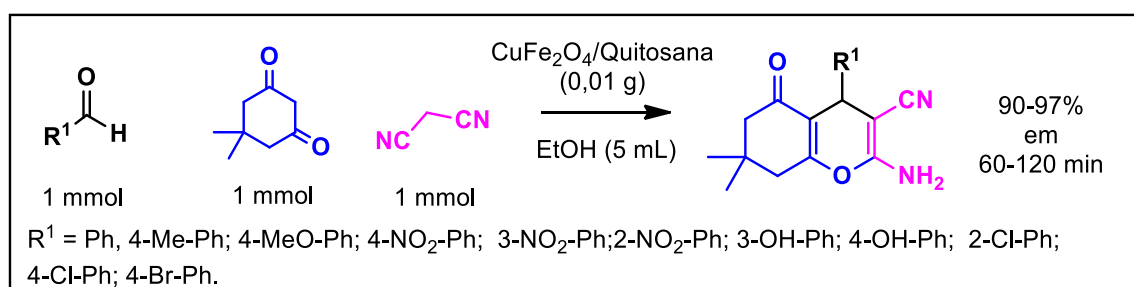
Nos ensaios iniciais, foi possível observar as vantagens de utilizar a quitosana comercial para revestir nanopartículas de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@quitosana}$), uma vez que permitiu obter PHQs de forma mais rápida (70 min) e com rendimento significativamente maior (90%) quando comparada com o resultado obtido com a quitosana comercial (traços de produto-120 min). Esse resultado pode ser atribuído ao fato de o nanocompósito de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@quitosana}$ se dispersar no meio reacional muito mais que a quitosana comercial, aumentando a superfície de contato entre os substratos e o catalisador, e, conseqüentemente, proporcionar reações mais rápidas. Além disso, a magnetização permite que o catalisador seja mais facilmente recuperado da mistura reacional utilizando apenas uma barra magnética externa, permitindo a reutilização por cinco vezes sem perda significativa da atividade catalítica ([Maleki e colaboradores, 2014\) \[72\]](#).

No que diz respeito a reação de Biginelli, o trabalho proposto por [Maleki e Paydar \(2016\) \[73\]](#) faz a síntese e aplicação de um nanocompósito de quitosana modificada com óxido de grafeno (quitosana-OG) como organocatalisador heterogêneo na reação de síntese de dihidropirimidonas (DHPMs) entre aldeídos, acetoacetato de etila ou metila e ureia em condições livres de solvente a 110 °C. Com a metodologia proposta, os produtos foram obtidos com tempos curtos (10-75 min) e bons rendimentos isolados (75-95%) (**Esquema 2**). No entanto, é importante destacar que a reação realizada nas mesmas condições, mas utilizando apenas quitosana como organocatalisador proporcionou um rendimento de 85%, ou seja, apenas 10% inferior ao obtido com a quitosana-OG no mesmo tempo reacional (10 min-95%). Dessa forma, é questionável se a modificação da quitosana realmente é vantajosa, considerando que o aumento no número de etapas no processo de síntese não é recomendado pela química verde.



Esquema 2. Aplicação de quitosana-OG como organocatalisador heterogêneo para a síntese de DHPMs. **Fonte:** Adaptado de Maleki e Paydar (2016) [73].

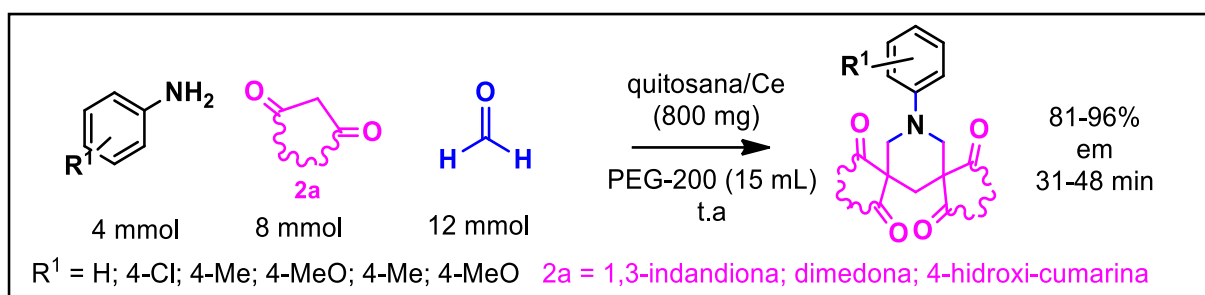
A reação de Knoevenagel-Michael para a síntese de 2-amino-4H-cromenos também envolveu o uso de materiais a base de quitosana via catálise heterogênea. A ferrita de cobre foi imobilizada à quitosana e aplicada como nanocompósito magnético (CuFe₂O₄/quitosana) para a síntese de 2-amino-4H-cromenos em etanol à temperatura ambiente. Na proposta, os pesquisadores Maleki *et al.* (2018) [74] aplicaram a CuFe₂O₄/quitosana na reação entre aldeídos aromáticos, malononitrila e dimedona, originando 2-amino-4H-cromenos com rendimentos elevados (90-97%) em 1-2 horas (**Esquema 3**). O organocatalisador pôde ser recuperado da mistura reacional por um processo simples, além de ser reutilizado pelo menos sete vezes sem perda significativa na atividade catalítica. Notavelmente, o uso do catalisador verde e não tóxico, a fácil separação do catalisador usando um ímã externo, a capacidade de reciclagem do material em diversas execuções de reação, além do procedimento de processamento simples, rendimentos altos a excelentes e condições de reação suaves são vantagens explícitas do protocolo desenvolvido pelos autores.



Esquema 3. Aplicação de CuFe₂O₄/quitosana como catalisador heterogêneo para a síntese de 2-amino-4H-cromenos. **Fonte:** Adaptado de Maleki *et al.* (2018) [74].

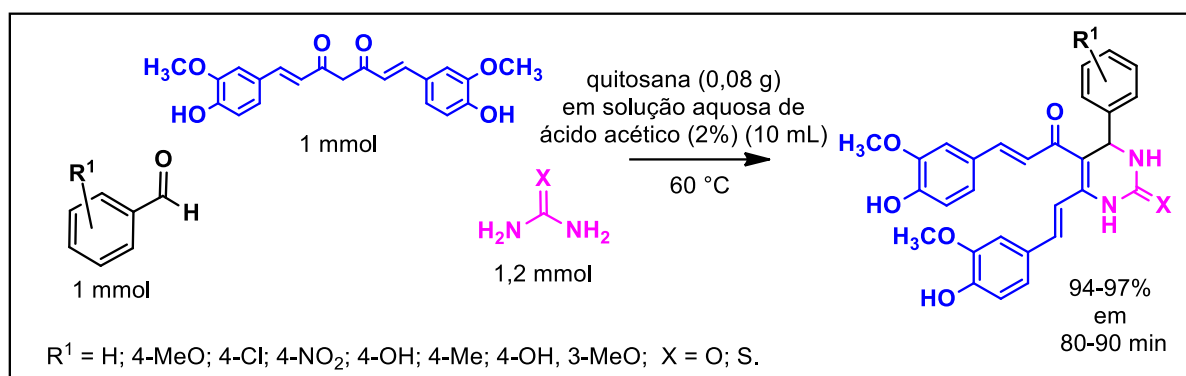
Na síntese de piperidinas espiro-substituídas através da reação entre anilinas substituídas, formaldeído e diferentes compostos de metileno ativos cíclicos, a quitosana foi empregada como suporte catalítico do cério (quitosana/Ce), preparado e utilizado como catalisador heterogêneo à temperatura ambiente em polietilenoglicol 200 (PEG-200). O

catalisador quitosana/Ce permitiu obter produtos com tempos de reação curtos (32-48 min) e alto rendimento (81-96%), além de poder ser reutilizado por cinco ciclos consecutivos sem perda apreciável da atividade catalítica (**Esquema 4**). O protocolo, desenvolvido por [Ahmed e Siddiqui \(2015\) \[75\]](#), apresenta vantagens como originar novos produtos, possuir sustentabilidade energética, viabilidade econômica e reciclabilidade do catalisador. Além disso, vale ressaltar que o PEG é um composto barato, não tóxico, não volátil e termicamente estável como meio adequado para transformações orgânicas ambientalmente sustentáveis. Sua solubilidade em água facilita a separação e recuperação do produto do meio reacional, contribuindo para altos rendimentos.



Esquema 4. Aplicação de quitosana/Ce como catalisador heterogêneo para a síntese de piperidinas espiro-substituídas. **Fonte:** Adaptado de [Ahmed e Siddiqui \(2015\) \[75\]](#).

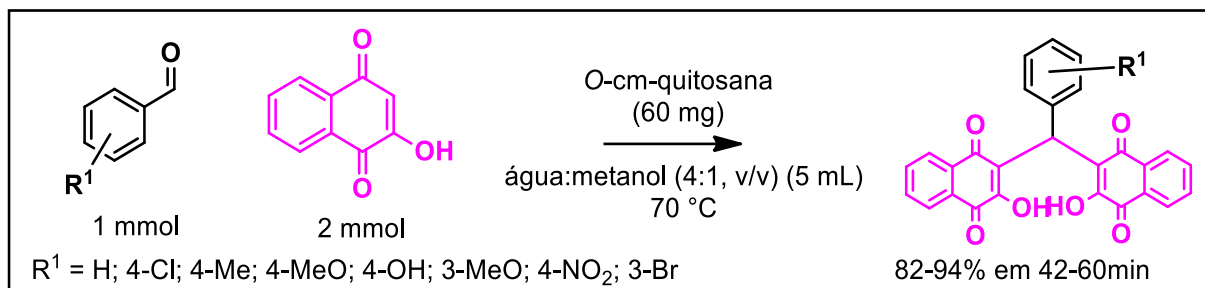
Via catálise homogênea, apenas dois trabalhos que utilizam a quitosana como organocatalisador reciclável são reportados na literatura. [Lal e colaboradores \(2012\) \[32\]](#) relacionaram a aplicação do biopolímero comercial em solução aquosa de ácido acético (2%) como catalisador homogêneo para a síntese de curcumina 3,4-dihidropirimidinonas através da condensação em um único recipiente de curcumina, aldeídos aromáticos e ureia/tioureia a 60°C. Os produtos foram obtidos na solução ácida de quitosana em 80-90 min com rendimentos isolados entre 94 e 97% (**Esquema 5**). O efeito de vários solventes, como metanol, etanol, propanol, acetonitrila, tolueno, DMF, DMSO e mistura de outros solventes, foi investigado, mas os pesquisadores alegaram que o rendimento do produto desejado foi muito baixo nos solventes orgânicos estudados em 10 h (dados não reportados). Eles atribuem esse resultado à insolubilidade da quitosana nos solventes orgânicos, indicando que a aplicação da quitosana via catálise homogênea, neste caso, é mais eficiente em comparação ao mesmo material aplicado via catálise heterogênea [32].



Esquema 5. Aplicação de quitosana em solução aquosa de ácido acético (2%) como catalisador homogêneo para a síntese de curcumina 3,4-dihidropirimidinonas. **Fonte:** Adaptado de Lal e colaboradores (2012) [32].

Como forma de comprovar se o ácido acético era o principal catalisador responsável pelo progresso reacional, a reação foi testada em solução aquosa de ácido acético (2%) na ausência de quitosana. Assim, nenhum produto foi formado nas mesmas condições e em períodos de tempo comparáveis ao testado com quitosana. Dessa forma, os autores puderam mostrar que o ácido acético na concentração de 2% em água, independentemente de servir como co-solvente para a dissolução da quitosana, não tem efeito por si só no progresso da reação. Além disso, embora a quitosana se solubilize no sistema proposto, ela pode ser recuperada e reutilizada por cinco vezes sem perda significativa da atividade catalítica e sem comprometer sua estrutura, comprovando a eficiência do método para a síntese de curcumina 3,4-dihidropirimidinonas [32].

No trabalho de Asghari-Haji e colaboradores (2012) [31], a quitosana foi empregada como organocatalisador para a síntese de bis-benzoquinonilmetanos entre benzaldeído e 2-hidroxi-naftoquinona. Os testes iniciais da reação em água na presença de quitosana suspensa forneceram um bom rendimento do produto desejado (50 min-84%). Porém, a reação realizada com quitosana e adição de ácido acético (1%) ao meio reacional levou à dissolução da quitosana e um aumento no rendimento do produto (45 min-88%). Mais uma vez, a questão se o ácido acético é o principal catalisador responsável pelo aumento do rendimento foi levada em consideração, e uma reação foi testada em ácido acético (1%) na ausência de quitosana. Com isso, pouquíssimo produto foi formado (24h-19%), mostrando que o ácido acético na concentração de 1% em água serve apenas como co-solvente para a dissolução da quitosana.



Esquema 6. Aplicação de *O*-carboximetil-quitosana como catalisador para a síntese de Bisbenzoquinonilmetanos. **Fonte:** Adaptado de [Asghari-Haji e colaboradores \(2012\) \[31\]](#).

Com a intenção de utilizar derivados de quitosana solúveis em água e evitar a adição de ácido acético como co-solvente, os autores realizaram a reação com a *O*-carboximetil-quitosana (*O*-cm-quitosana). Por possuir tanto os grupos aminos primários quanto os substituintes carboximetil hidrofílicos, a *O*-cm-quitosana catalisou homogeneamente a reação, se assemelhando à quitosana em solução de ácido acético (1%), além de proporcionar resultados eficientes (45 min-89%). Assim, as reações posteriores se processaram com a quitosana modificada em água:metanol (4:1, v/v) a 70 °C, gerando os produtos desejados em até uma hora, com rendimentos de 82-94% (**Esquema 6**). A *O*-cm-quitosana foi recuperada facilmente e reutilizada por seis ciclos sem apresentar diferença significativa de atividade catalítica e estrutura [31].

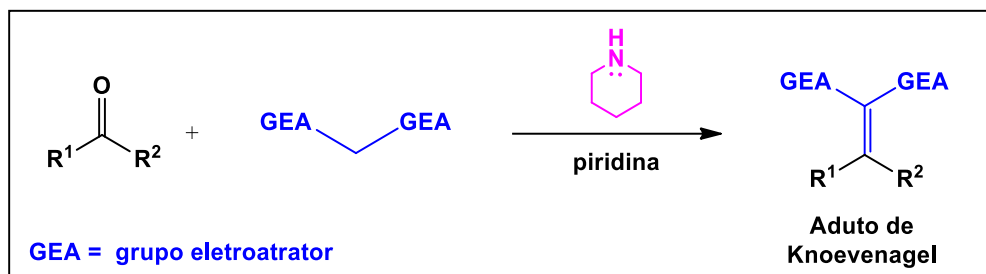
Vários outros exemplos de estudos de reações orgânicas envolvendo quitosana e derivados como catalisadores heterogêneos podem ser citados [71, 76, 77], enquanto a aplicação desses materiais como catalisadores homogêneos ainda é pouco abordada na literatura. Porém, é possível notar a versatilidade que esse biopolímero proporciona para a área da catálise, gerando inúmeros catalisadores recicláveis e eficientes. Esses benefícios justificam a sua importância e contribuem para que eles conquistem mais espaço, permitindo cada vez mais o progresso da síntese orgânica.

2.3 A REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO DE KNOEVENAGEL

2.3.1 Importância sintética

No final do século XIX e início do século XX, Emil Knoevenagel, um químico alemão, contribuiu significativamente para a química orgânica. Ele explorou e estabeleceu a reação que hoje é conhecida como a condensação de Knoevenagel. A reação de condensação de Knoevenagel é uma reação de síntese orgânica do tipo aldólica que ocorre entre um composto

carbonilado (aldeído ou cetona) e um composto de metileno ativo. Originalmente, era catalisada por uma base fraca, como a piperidina, utilizando a piridina como solvente em um sistema homogêneo (**Esquema 7**) [78, 79].

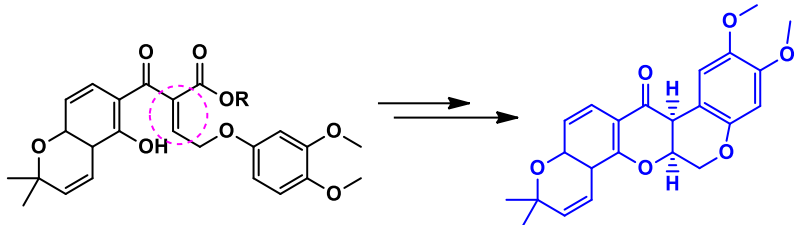
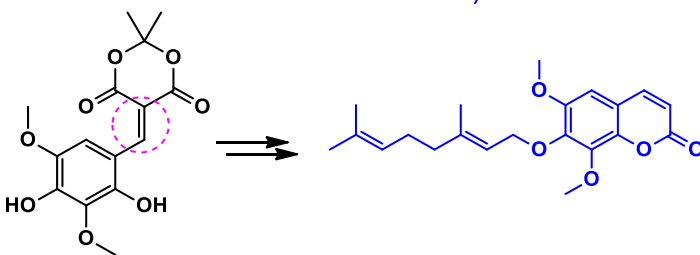
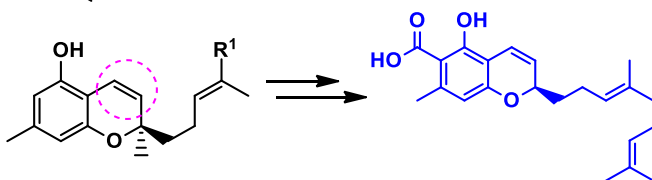
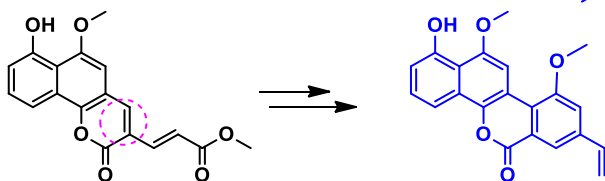
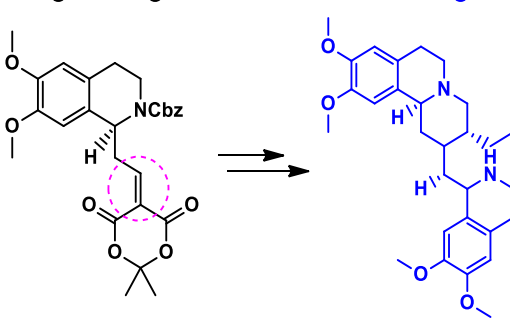


Esquema 7. Representação para a reação de condensação de Knoevenagel. **Fonte:** Adaptado de Knoevenagel (1896) [78].

Atualmente, diversas metodologias sintéticas têm sido desenvolvidas a fim de se obter maior controle da reação de condensação de Knoevenagel, não só com relação ao rendimento e tempo de reação, como também na intenção de proporcionar condições mais amenas para obtenção dos produtos desejados [79]. Esse objetivo tem sido alcançado principalmente através do uso de catalisadores recicláveis. Assim, vários tipos têm sido utilizados nas mais diversas composições, sendo materiais a base de óxidos metálicos [80], estruturas metal-orgânicas (*Metal-Organic Frameworks* (MOFs)) [81], sílicas mesoporosas [82], nanopartículas magnéticas [83] ou polímeros naturais, como a quitosana, por exemplo [84].

O produto da condensação de Knoevenagel, ou aduto de Knoevenagel, é geralmente uma α,β -insaturação, onde a ligação dupla é formada entre os carbonos α e β em relação ao grupo carbonila original. Esta ligação dupla conjugada é uma característica importante de muitos compostos orgânicos, sendo importante observar que a sua formação envolve a eliminação de uma molécula de água. A reação de condensação de Knoevenagel tem aplicações amplas e é uma ferramenta valiosa na química orgânica sintética [85, 86]. Os produtos obtidos nessa reação são frequentemente usados como intermediários em sínteses orgânicas para a obtenção de compostos mais complexos, como agentes terapêuticos, aditivos químicos, polímeros com diferentes grupos funcionais, inseticidas e pesticidas. A versatilidade dessa reação a torna imprescindível na construção de esqueletos carbonílicos e na funcionalização de moléculas orgânicas com propriedades biológicas atraentes para a indústria farmacêutica (**Tabela 2**) [87].

Tabela 2. Exemplos de adutos de Knoevenagel utilizados na síntese de compostos com atividade biológica.

Adutos de Knoevenagel como intermediários de compostos com propriedades biológica	Aplicação
	Quimiopreventivo e Quimioterápico
	Ativação de sirtuínas (SIRT1)
	Anti-HIV
	Antibacteriano e Antitumoral
	Antiprotozoico

Fonte: Adaptado de [Heravi, 2020 \[87\]](#).

Alguns compostos sintetizados por reações derivadas da condensação de Knoevenagel também têm sido avaliados como larvicidas contra *Aedes aegypti*, apresentando resultados promissores no controle deste vetor [88-90]. Porém, o uso de adutos de Knoevenagel como larvicidas ainda é pouco explorado, evidenciando a necessidade de mais estudos na área. O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de doenças virais de grande relevância epidemiológica, como dengue, febre amarela, chikungunya e Zika. Essas enfermidades apresentam alta taxa de morbidade e mortalidade em nível global, além de sobrecarregar os sistemas de saúde pública, especialmente em regiões tropicais e subtropicais [91]. A epidemia

de Zika, por exemplo, revelou consequências devastadoras, como a associação entre o vírus e condições graves, incluindo microcefalia em recém-nascidos e a síndrome de Guillain-Barré em adultos [92, 93].

Outros adutos de Knoevenagel, como os obtidos a partir de isatinas e derivados, têm sido amplamente explorados na síntese de diversos compostos heterocíclicos que exibem atividades biológicas interessantes. A isatina é um composto heterocíclico contendo um grupo indol-2,3-diona com possibilidade de variação de substituintes em sua estrutura básica [94, 95] a partir da inserção de substituintes nas posições 5 e 7 de seu anel aromático [96], reações de *N*-acilação e *N*-alquilação [11], redução de carbonila [97], etc (**Figura 3**). Ela reage com compostos de metileno ativo por meio da condensação de Knoevenagel para formar adutos, sendo a presença da isatina nesses compostos o que proporciona uma rica química explorada para modular as propriedades biológicas dos compostos resultantes [95].

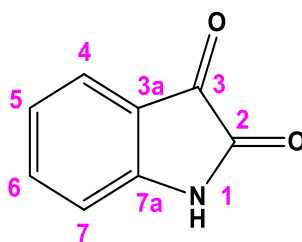


Figura 3. Estrutura da isatina. **Fonte:** Adaptado de Silva, 2013 [95].

Muitos compostos heterocíclicos obtidos a partir de adutos de Knoevenagel derivados de isatina são encontrados em produtos naturais e compostos sintéticos biologicamente ativos. Por exemplo, os alcaloides indólicos estriptofolina, espirotriprostatina A e B possuem propriedades antimitóticas e tem sido estudada pelo seu potencial anticâncer. A rincofilina atua como um antagonista não competitivo de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e bloqueador dos canais de cálcio, sendo considerada para potenciais aplicações em pesquisa neurofarmacológica. No alívio da dor, a horsfilina apresenta efeitos analgésicos, enquanto o composto sintético MI-219 é um inibidor potente, altamente seletivo e oralmente ativo da interação MDM2-p53, que foi estudado como um novo agente para o tratamento do câncer. Esses exemplos destacam a diversidade de atividades biológicas associadas aos adutos derivados de isatina [98-100].

Os adutos de Knoevenagel derivados de isatina, especialmente aqueles obtidos da condensação com malononitrila ou cianoésteres, têm demonstrado atividade anticâncer e antimicrobiana, destacando seu potencial em várias áreas terapêuticas. A síntese de espiro-

derivados a partir dos adutos entre isatina e cianoésteres é mencionada como uma rota significativa. A atividade desses compostos pode variar dependendo dos grupos substituintes na isatina, oferecendo uma gama diversificada de atividades biológicas. Na literatura, a atividade antineoplásica é destacada como uma das áreas mais pesquisadas para os adutos de Knoevenagel derivados isatina. Isso sugere um interesse significativo na busca por compostos que possam ter potencial no tratamento de câncer. Os adutos de Knoevenagel derivados de isatina também desempenham um papel importante como integrantes de uma nova classe de antagonistas. Esses antagonistas são potentes e seletivos para o receptor CRTH2 (também conhecido como DP2), e têm aplicação no tratamento de doenças inflamatórias alérgicas [101]. Na **Figura 4** são mostradas algumas das atividades biológicas observadas para os compostos heterocíclicos obtidos a partir de adutos de Knoevenagel derivados de isatina com malononitrila ou cianoésteres.

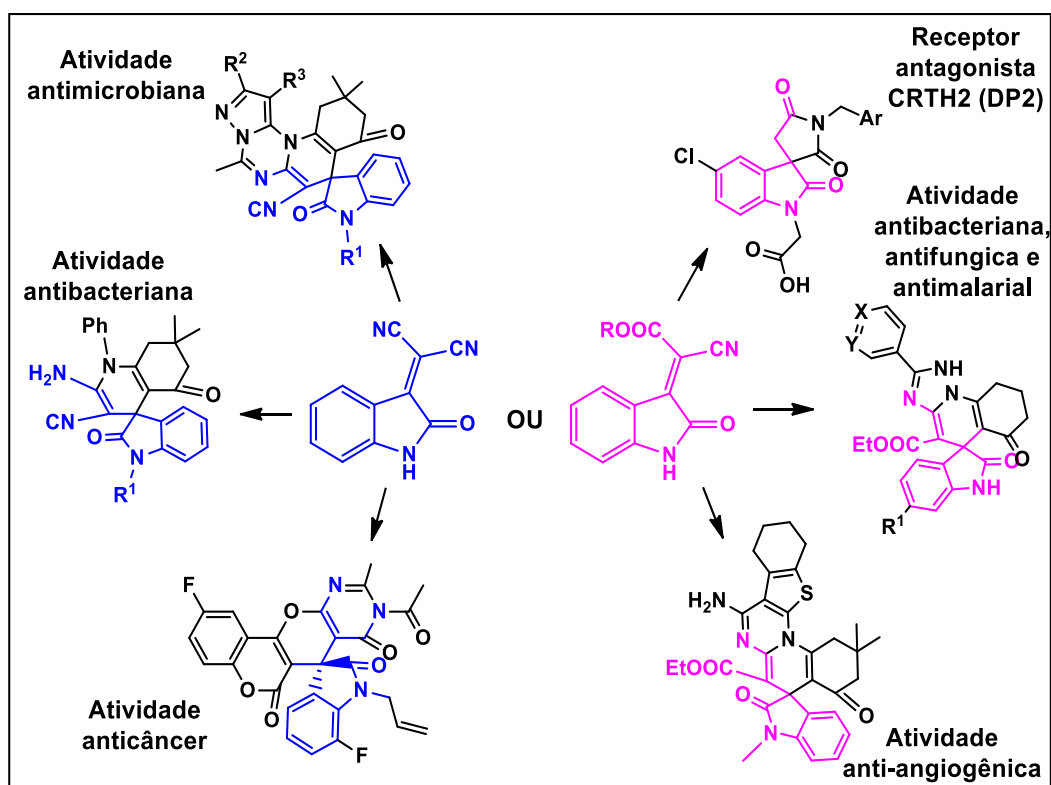


Figura 4. Atividades biológicas observadas para os compostos heterocíclicos obtidos a partir de adutos entre isatina e malononitrila ou cianoésteres. **Fonte:** Adaptado de Ferreira e colaboradores (2021) [101].

Compostos derivados da isatina já foram apontados como agentes antileishmania [102, 103]. No entanto, os adutos de Knoevenagel derivados de isatina ainda não foram explorados para o tratamento da leishmaniose. Essa doença infecciosa, causada por parasitas do gênero

Leishmania, é transmitida principalmente pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados. Esses insetos adquirem o parasita ao se alimentar de animais ou pessoas previamente infectados [104, 105]. Apesar dos avanços em seu controle, a leishmaniose ainda é considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) pela Organização Mundial da Saúde (OMS), afetando entre 700.000 e 1 milhão de pessoas em todo o mundo anualmente [106]. O tratamento da leishmaniose varia dependendo da forma da doença e da gravidade dos sintomas. No entanto, o seu abandono por pacientes representa uma ameaça, pois aumenta a chance de resistência parasitária [107].

Vários fatores são apontados com justificativa para o abandono do tratamento da leishmaniose, como o alto custo, a eficácia limitada de alguns medicamentos, a complexidade do tratamento e os efeitos adversos significativos. Além disso, a falta de acesso a centros de saúde especializados e a falta de conhecimento sobre a importância de concluir o tratamento também desempenham um papel importante neste cenário [108, 109]. Apesar dos avanços, o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes, acessíveis e seguros para o tratamento da leishmaniose continua sendo um desafio crítico para a comunidade científica global. Assim, ao explorar as propriedades dos adutos e seus derivados, os pesquisadores podem obter ideias valiosas sobre a interação dessas substâncias com sistemas biológicos. Além disso, é importante ressaltar que a pesquisa nesse campo também contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a várias condições médicas, permitindo aos cientistas identificar alvos terapêuticos potenciais e desenvolver estratégias mais inovadoras para o tratamento de doenças.

2.3.2 Os ácidos cumarino-3-carboxílicos: métodos de obtenção e aplicações

As cumarinas são lactonas de origem natural ou sintética caracterizadas pelo anel benzo- α -pirano rico em elétrons π altamente conjugados [3]. Muitas aplicações úteis podem ser enfatizadas e incluem atividade antibacteriana, antifúngica, analgésica, antimutagênica, anticancerígena, anti-HIV, anti-inflamatória, anticoagulante e antitumoral como as principais atividades biológicas observadas. Além disso, as cumarinas podem ser usadas como sensores de fluorescência, agentes inseticidas, atraindo considerável atenção dos químicos. A possibilidade de utilização em fragrâncias e perfumes, como aditivos em alimentos e cosméticos, branqueadores ópticos, corantes laser, agroquímicos e cosméticos, sensores fluorescentes de dobramento de transtirretina e dispositivos fotônicos moleculares justificam o interesse da indústria química em relação a esses compostos [2, 110, 111].

Os ácidos cumarino-3-carboxílicos são uma subclasse específica de cumarinas e possui uma estrutura de anel benzênico ligado a um anel α -pirano além de possuir um grupo carboxila ligado ao carbono C3 do anel pirano. Esses compostos se destacam em estudos de diversas áreas, pois o grupo carboxila permite a introdução de unidades que contribuem para o aumento da atividade química, como por exemplo:

(i) a formação de híbridos de cumarina-piperazina origina compostos com atividade anti-acetilcolinesterase (AChE), sendo considerados potencialmente no tratamento da doença de Alzheimer [112];

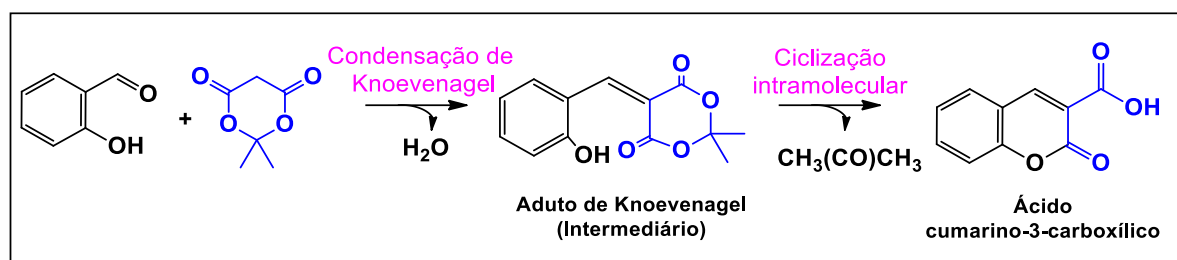
(ii) a complexação de cobre em ácidos cumarino-3-carboxílicos origina sensores fluorescentes eficientes para detecção rápida de água em solventes orgânicos [113];

(iii) a produção de filmes flexíveis e mutáveis de ácidos cumarino-3-carboxílicos/ $\text{GdF}_3\text{:Sm}^{3+}$ permite a detecção luminescente de pesticidas em água mesmo em microconcentrações [114];

(iv) a formação de complexos de prata (I) com ácidos cumarino-3-carboxílicos exibem maior atividade antibacteriana contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como atividade antifúngica contra um isolado clínico de *Candida albicans* em comparação a seus ligantes isolados [115]. Como consequência, esses compostos são considerados promissores para o trabalho inovador na indústria e na pesquisa.

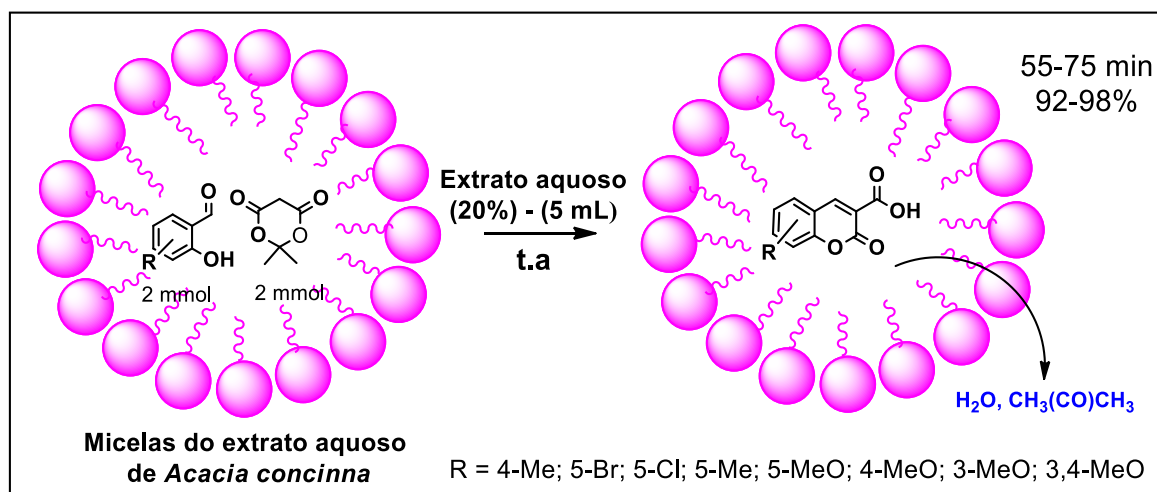
O desenvolvimento de novos antimicrobianos é de extrema importância devido ao aumento da resistência microbiana, que compromete a eficácia dos tratamentos convencionais e representa uma ameaça crescente à saúde pública [116, 117]. Bactérias, fungos e outros microrganismos patogênicos têm demonstrado uma capacidade notável de adaptação, tornando-se resistentes a antibióticos e antifúngicos amplamente utilizados. Esse fenômeno reduz as opções terapêuticas disponíveis e pode levar a infecções difíceis de tratar, aumentando a morbidade e a mortalidade associadas a doenças infecciosas. Além disso, a resistência microbiana impacta diretamente setores como a medicina, a veterinária e a agropecuária, tornando essencial a busca por novos antimicrobianos [118, 119].

Numerosos métodos desenvolvidos para a síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos incluem a condensação de Knoevenagel seguido de ciclização intramolecular como principal via de obtenção. A partir do salicilaldeído e ácido de Meldrum como composto 1,3-dicarbonílico cíclico há a formação do aduto de Knoevenagel, que cicliza-se logo em seguida liberando acetona e dando origem ao ácido cumarino-3-carboxílico como produto final [7]. O **Esquema 8** representa simplificada a reação de síntese do ácido cumarino-3-carboxílico via condensação de Knoevenagel.



Esquema 8. Representação simplificada para a reação de síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos via condensação de Knoevenagel. **Fonte:** Autoria própria, 2024.

Na literatura, os métodos de síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos entre salicilaldeído e ácido de Meldrum envolvem o uso de uma variedade de catalisadores homogêneos ou heterogêneos, como acetato de amônio [120], carbonato de potássio, azida de sódio [7], argilas [121], derivados de ácido sulfônico [122], cloreto de óxido de zircônio ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) [4] e $\text{Yb}(\text{OTf})_3/\text{MW}$ [123]. No protocolo desenvolvido por Chavan e Bandgar (2013) [20], a síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos foi realizada usando extrato aquoso de vagens de *Acacia concinna* como um catalisador ácido do tipo surfactante de ocorrência natural. Os produtos desejados foram produzidos a partir da condensação do ácido de Meldrum com salicilaldeídos com excelentes rendimentos (55-75min/92-98%) sob condições amenas (**Esquema 9**).



Esquema 9. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos promovida por micelas do extrato aquoso de vagens de *Acacia concinna* como catalisador. **Fonte:** Adaptado de Chavan e Bandgar (2013) [20].

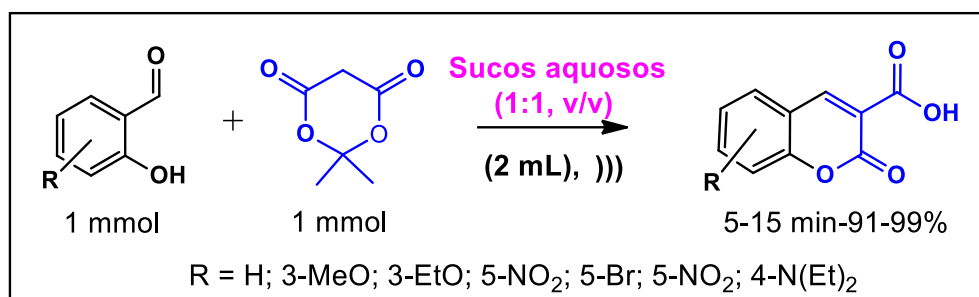
Com base nos pesquisadores [20], a eficiência do extrato aquoso de vagens de *Acacia concinna* foi atribuída à sua propriedade surfactante e ao pH ácido. As saponinas, que são altamente ácidas foram capazes de solubilizar fortemente os reagentes através de ligações de

Complexo de inclusão β -CD-saliciladeídos

R = H; 3-MeO; 3-EtO; 5-Cl; 5-Br; 5-NO₂; 3,5-Cl

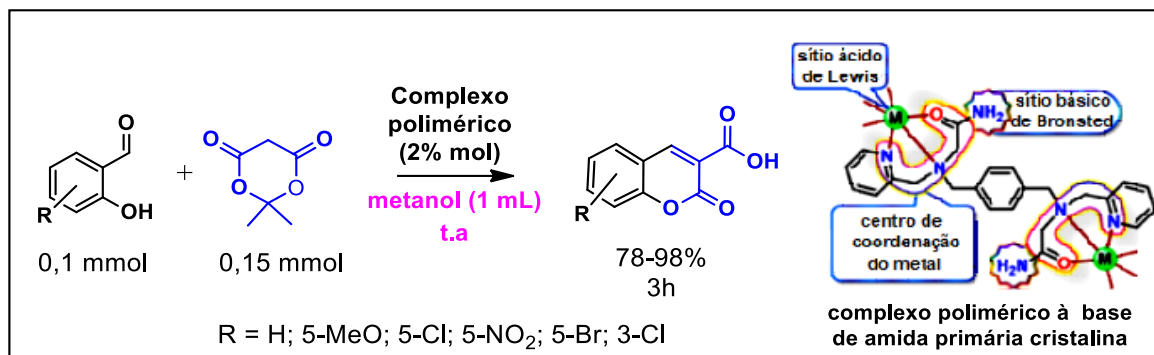
Uma nova metodologia para a produção de ácidos cumarino-3-carboxílicos via condensação de Knoevenagel usando sucos de frutas e vegetais comestíveis (limão, toranja, cenoura, romã, kiwi, vinagre, tomate), licores (limoncello) e águas residuais (soro de leite coalhado e resíduos do processamento da azeitona) como solventes foi empregada por Fiorito e colaboradores (2016) [5]. Os ácidos cumarino-3-carboxílicos foram sintetizados com excelentes rendimentos (5-15 min-91-99%) por irradiação ultrassônica a partir de salicilaldeídos substituídos e ácido de Meldrum como substratos iniciais (**Esquema 11**). Como

justificativa para os resultados alcançados, os pesquisadores consideraram a hipótese de que a presença de ácidos orgânicos (cítrico, tartárico, málico, oxálico, succínico, láctico, pirúvico e vários outros com $\text{pH} = 4,2-5,1$) em todos os meios aquosos usados são os responsáveis por promoverem a condensação de Knoevenagel. Tais ácidos podem atuar como catalisadores eficazes para as reações de acoplamento, sendo capazes de protonar o átomo de oxigênio da carbonila dos salicilaldeídos, aumentando sua reatividade ao ataque nucleofílico do ácido de Meldrum.



Esquema 11. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos promovida por sucos de frutas e vegetais comestíveis como catalisadores e licores e águas residuais como solventes. **Fonte:** Adaptado de Fiorito e colaboradores (2016) [5].

No sistema proposto por Markad e colaboradores (2020) [21], um complexo polimérico à base de amida primária cristalina, $(\{[\text{Cd}_2(2\text{-BPXG})(\text{Fum})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}\})_n$, onde, 2-BPXG = 2,2'-((1,4-fenilenobis(metileno))bis((piridin-2-ilmetil)azanediil))diacetamida e Fum = fumarato), foi utilizado como catalisador heterogêneo bifuncional para a síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos em temperatura ambiente através da reação de Knoevenagel. Segundo os pesquisadores, os ligantes funcionalizados com amida primária são bons candidatos para fazer complexos poliméricos bifuncionais, em que o centro metálico atua como ácido de Lewis e seu envolvimento exclusivo é responsável pela catálise doadora de ligações de hidrogênio, ou seja, atuação como base de Bronsted. A partir das condições otimizadas, observou-se a eficiência do catalisador heterogêneo bifuncional, proporcionando a síntese dos produtos desejados para esta reação (3h/78-98%) (Esquema 12). Também foi demonstrado sua reciclabilidade em até cinco ciclos sem perda significativa de atividade e integridade estrutural.

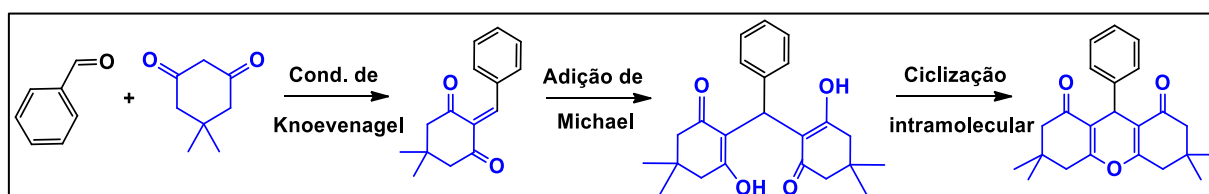


Esquema 12. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos utilizando complexo polimérico à base de amida primária cristalina como catalisador heterogêneo bifuncional. **Fonte:** Adaptado de Markad e colaboradores (2020) [21].

Embora os protocolos relatados encontrem méritos próprios, a busca por rotas mais simples, limpas e eficientes para a síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos farmacologicamente potentes continua sendo um exercício válido em química orgânica e medicinal, representando em um campo de pesquisas de interesse atual e crescente. Nesse contexto, abordagens que reduzam o número de etapas reacionais, minimizem o uso de solventes orgânicos e promovam maiores rendimentos têm recebido atenção especial.

2.3.3 Os derivados de xanteno e tetracetona: métodos de obtenção e aplicações

Derivados de xanteno representam uma classe importante de compostos tricíclicos que incorporam oxigênio em sua estrutura. As tetracetonas, por sua vez, desempenham um papel crucial como intermediários estruturais na síntese desses compostos, contribuindo para a formação de suas estruturas químicas complexas [125, 126]. Normalmente, as tetracetonas são obtidas por meio de uma reação sequencial de Knoevenagel-Michael entre um composto carbonílico e uma 1,3-dicetona cíclica na proporção molar de 1:2 equivalentes [8]. No caso dos xantenos, uma etapa adicional é observada, envolvendo uma reação de ciclização intramolecular que forma a estrutura tricíclica (**Esquema 13**) [127].



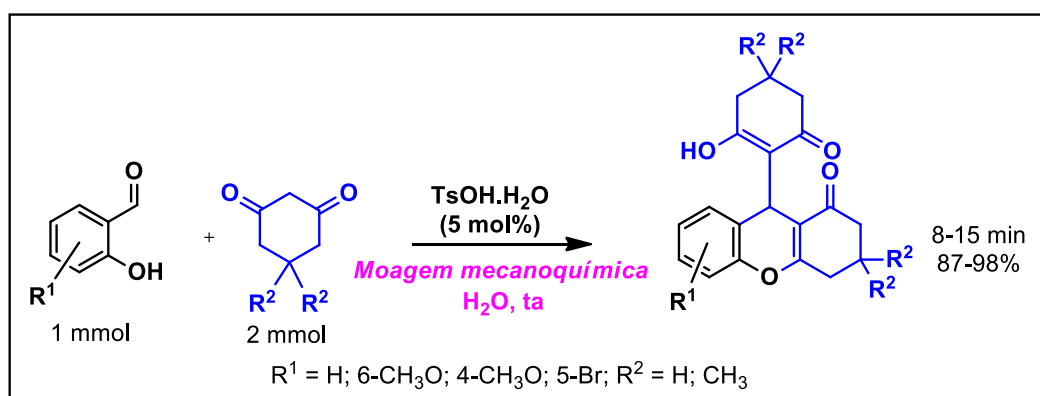
Esquema 13. Obtenção de derivados de xanteno e tetracetona a partir de aldeído aromático e 1,3-dicetona cíclica (proporção 1:2) via reação sequencial de Knoevenagel-Michael e ciclização intramolecular. **Fonte:** Adaptado de Morbale e colaboradores (2015) [127].

Nos últimos anos, a construção de derivados de xanteno e esqueletos de tetracetona tem atraído atenção significativa de químicos orgânicos devido à sua relevância. A produção de corantes fluorescentes usados em bioimagem, sensores ópticos e marcações fluorescentes em biologia [128], a produção de pigmentos e resinas utilizadas na formulação de tintas e vernizes [129] e a criação de células solares e materiais ópticos são algumas das possibilidades já exploradas pela indústria para esses compostos. Além disso, aplicações na fabricação de polímeros e moléculas com propriedades ópticas avançadas [130] e a elaboração de fotossensibilizadores utilizados em terapia fotodinâmica no tratamento de câncer [131] também são exemplos plausíveis de destaque. Esses compostos exibem propriedades farmacológicas notáveis, incluindo atividades como antioxidante [9], antiviral [10], antibacteriana [12], antifúngica [14] e, em especial, anticâncer [16]. O avanço na descoberta de novos fármacos é fundamental para o tratamento de diversas doenças oncológicas, especialmente aquelas com altas taxas de mortalidade e desafios terapêuticos, como o carcinoma de pulmão, o câncer de cólon e a leucemia mieloide crônica (LMC).

O carcinoma de pulmão é uma das formas mais letais de câncer, frequentemente diagnosticado em estágios avançados [132]. O câncer de cólon, por sua vez, é um dos tumores mais comuns no mundo, sendo associado a fatores como dieta inadequada, sedentarismo e predisposição genética. Apesar dos avanços em estratégias preventivas e no rastreamento precoce, quando diagnosticado tardiamente, pode apresentar metástases, reduzindo drasticamente as chances de cura [133]. Já a LMC é uma neoplasia hematológica caracterizada pela presença do gene BCR-ABL1, resultante de uma translocação cromossômica, que estimula a proliferação descontrolada de células imaturas na medula óssea. O tratamento revolucionado pelo uso de inibidores de tirosina quinase aumentou a sobrevida dos pacientes. No entanto, a resistência ao tratamento pode se desenvolver, tornando necessária a busca por novas alternativas terapêuticas [134, 135].

Os métodos usados para a síntese de derivados de xanteno e tetracetona envolvem vários catalisadores, como ácido bórico [136], β -CD [124], nanopartículas de cobalto magnético (CoFe_2O_4) revestidas com resíduos de pão [137], ácido perclórico ou ácido polifosfórico adsorvido em sílica gel [138], complexos [139], aminoácidos [140], entre outros. Por exemplo, no sistema proposto por Borah e colaboradores (2023) [141], os derivados de xanteno foram preparados usando ácido *p*-toluenossulfônico monohidratado ($\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$) como catalisador homogêneo ácido de Brønsted sob condições de moagem mecanoquímica assistida por água à temperatura ambiente.

A reação sequencial entre salicilaldeídos substituídos e dimedona ou ciclo-1,3-hexadiona proporcionou a obtenção de uma série de derivados de xanteno em curtos tempos reacionais e altos rendimentos isolados (8-15 min/87-98%) (**Esquema 14**). Todos os compostos sintetizados foram isolados puros apenas pela filtragem do precipitado juntamente com lavagem contínua com água seguida por recristalização em etanol. Para validar ainda mais a potencialidade do presente método, os pesquisadores aumentaram a escala da reação em 10 vezes. A partir disso, foi observado resultados consistentes com a primeira escala testada, confirmando a eficiência da metodologia proposta em escala de gramas. Porém, embora os resultados sejam satisfatórios, os pesquisadores não relatam sobre estudos de recuperação e reciclagem do catalisador em pequena ou larga escala [141].

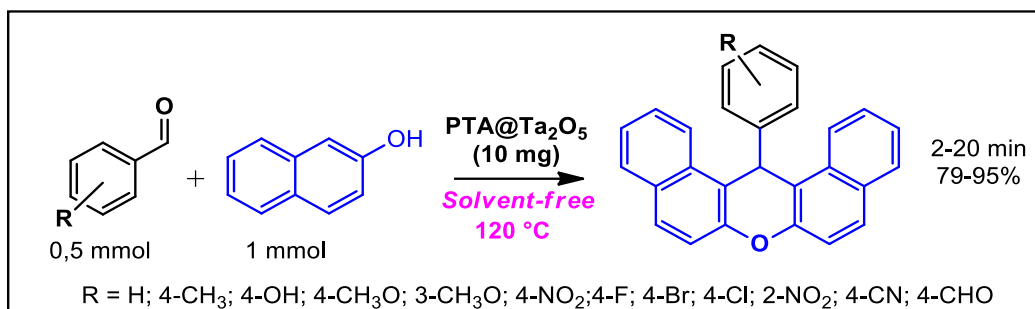


Esquema 14. Síntese de derivados de xanteno utilizando ácido *p*-toluenossulfônico monohidratado (TsOH·H₂O) como catalisador homogêneo em moagem mecanoquímica.

Fonte: Adaptado de Borah e colaboradores (2023) [141].

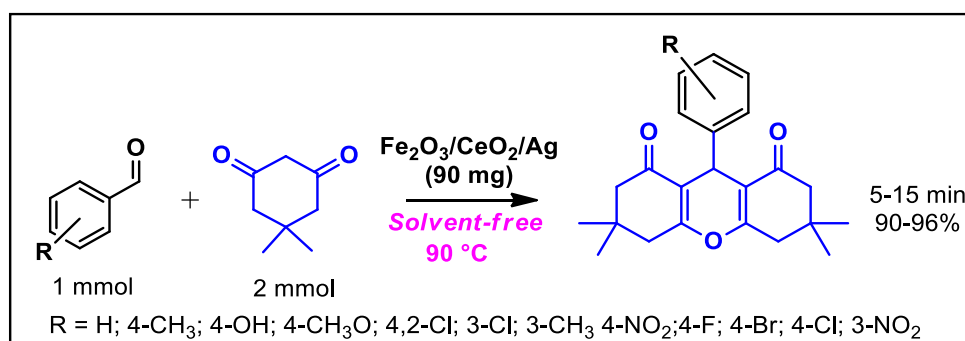
Outra proposta para a síntese de derivados de xanteno pode ser encontrada no trabalho de Mahapatra e colaboradores (2025) [142], usando catalisador híbrido mesoporoso de ácido 12-fosfotúngstico de Keggin (PTA) suportado por óxido de tântalo (V) (PTA@Ta₂O₅). O uso de PTA@Ta₂O₅ proporcionou a obtenção dos compostos através da condensação *one-pot* de β-naftol com vários aldeídos aromáticos em condições livres de solvente (**Esquema 15**). A atividade catalítica aprimorada atribuída ao efeito sinérgico da combinação de PTA com a matriz Ta₂O₅ resultou em curtos tempos reacionais e bons ou elevados rendimentos isolados (2-20 min/79-95%). Segundo os pesquisadores, os sítios ácidos duplos no sistema PTA@Ta₂O₅, com PTA atuando como sítio de Brønsted e Ta₂O₅ como sítio de Lewis, trabalharam sinergicamente e melhoraram o processo catalítico. Além disso, no compósito híbrido, a unidade Keggin de PTA exibiu fortes interações com a matriz mesoporosa de Ta₂O₅, influenciando significativamente o desempenho catalítico do compósito mesohíbrido.

Juntamente com os benefícios adicionais de reciclabilidade e aplicabilidade por sete ciclos reacionais sem perda significativa na atividade catalítica, a estratégia forneceu uma abordagem sustentável, mais verde e mais eficiente para sintetizar derivados de xanteno.



Esquema 15. Síntese de derivados de xanteno utilizando catalisador híbrido mesoporoso de PTA@Ta₂O₅. **Fonte:** Adaptado de Mahapatra e colaboradores (2025) [142].

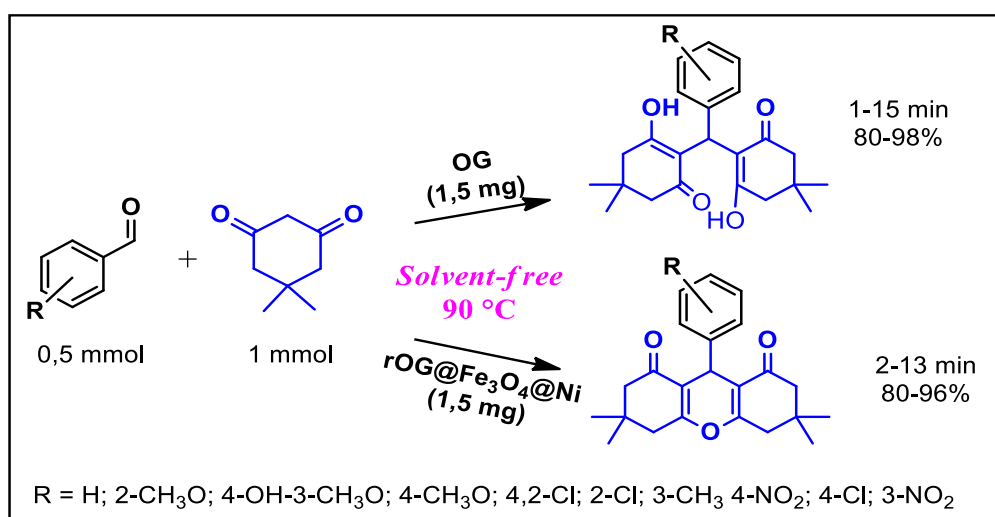
Mohammadi e colaboradores (2025) [143] obtiveram derivados de xanteno utilizando nanocompósito de prata e óxido de cério suportados em hematita (Fe₂O₃/CeO₂/Ag) como catalisador heterogêneo em condições livres de solventes a 90 °C (**Esquema 16**). Os compostos foram alcançados por meio da reação envolvendo dimedona e aldeídos aromáticos em tempos curtos e elevados rendimentos isolados (5-15 min/90-96%). Conforme os pesquisadores, esses parâmetros de reação auxiliaram no avanço de práticas sustentáveis em síntese orgânica e na simplificação de reações com um catalisador heterogêneo recuperado e reutilizado por cinco vezes sem perda significativa na atividade catalítica. Porém, essas mesmos reagentes aplicados em condições reacionais e catalisadores diversos podem levar a produtos diferentes, como apontado por Esmati e Zeynizadeh (2021) [144] e Kour e Gupta (2019) [145].



Esquema 16. Síntese de derivados de xanteno utilizando nanocompósito de Fe₂O₃/CeO₂/Ag como catalisador heterogêneo. **Fonte:** Adaptado de Mohammadi e colaboradores (2025) [143].

Os pesquisadores Esmati e Zeynizadeh (2021) [144] obtiveram derivados de tetracetona, além de derivados de xanteno, ao utilizarem aldeídos aromáticos e dimedona com óxido de

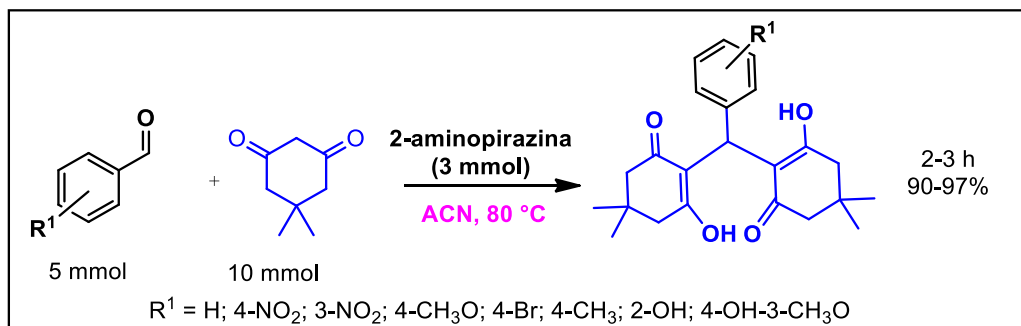
grafeno sem modificação (OG) ou ele reduzido e suportado em nanocompósito de magnetita e níquel ($\text{rOG@Fe}_3\text{O}_4\text{@Ni}$) como catalisador em condições livres de solvente a 90 °C. No trabalho, os resultados mostraram que OG e $\text{rOG@Fe}_3\text{O}_4\text{@Ni}$ em condições otimizadas aceleraram as reações quimiosseletivamente de tal forma que OG direcionou as reações para a produção de derivados de tetracetonas, enquanto o $\text{rOG@Fe}_3\text{O}_4\text{@Ni}$ levou as reações um passo adiante e forneceu os derivados de xanteno como produtos de ciclização (**Esquema 17**). Todas as reações foram realizadas em 1–15 min, proporcionando os produtos derivados de xanteno e tetracetona correspondentes em rendimentos altos a excelentes (80-98%). Embora o mecanismo exato das reações na presença dos catalisados de OG e $\text{rOG@Fe}_3\text{O}_4\text{@Ni}$ não seja claro, as vias mecanísticas plausíveis descritas no trabalho podem desempenhar um papel para fornecer produtos derivados de xanteno e tetracetona. A reutilização de OG e $\text{rOG@Fe}_3\text{O}_4\text{@Ni}$ também foi examinada por quatro ciclos consecutivos sem perda significativa de atividade catalítica.



Esquema 17. Síntese de derivados de xanteno e tetracetonas utilizando OG e $\text{rOG@Fe}_3\text{O}_4\text{@Ni}$ como catalisador heterogêneo. **Fonte:** Adaptado de [Esmati e Zeynizadeh \(2021\) \[144\]](#).

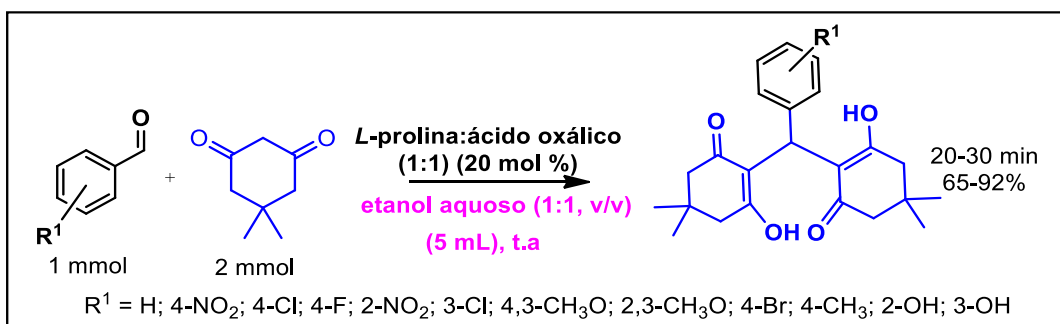
A síntese de derivados de tetracetona também foi alcançada por [Thakur e colaboradores \(2024\) \[146\]](#) ao utilizarem 2-aminopirazina como catalisador básico de Lewis na reação sequencial de Knoevenagel-Michael entre dimedona e aldeídos aromáticos em acetonitrila como solvente a 80 °C. Os rendimentos dos produtos variaram de 90 a 97% em 2-3 h de reação, dependendo das substituições no aldeído (**Esquema 18**). Além disso, os pesquisadores observaram através de dados de difração de raio-X e espectrometria de massa de ionização por eletrospray que, em meio de solvente, a estrutura final da tetracetona existe na forma dimérica, enquanto que, na forma cristalina, a molécula monomérica existe com ligação de hidrogênio

intramolecular, respectivamente. Neste trabalho, também não foi relatado sobre estudos de recuperação e reciclagem do catalisador.



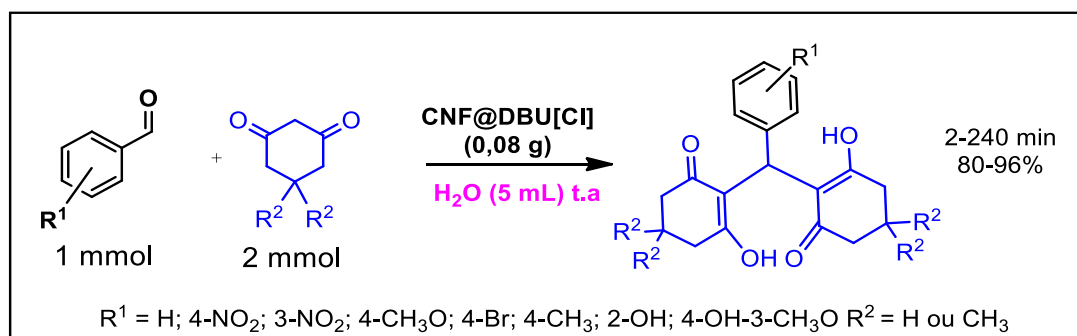
Esquema 18. Síntese de derivados de tetracetona utilizando 2-aminopirazina como catalisador básico de Lewis. **Fonte:** Adaptado de [Thakur e colaboradores \(2024\)](#) [146].

Outro protocolo foi elaborado por [Chaudhary e colaboradores \(2024\)](#) [147] para a síntese de derivados de tetracetona. Os pesquisadores utilizaram uma mistura eutética profunda (do inglês *deep eutectic mixture* - DEM) de ácido oxálico e *L*-prolina como catalisador ácido de Bronsted para a síntese de derivados de tetracetona sob condições de reação à temperatura ambiente e etanol aquoso (1:1, v/v) como solvente. Os produtos desejados foram obtidos com bons rendimentos (65–92%) em um curto espaço de tempo (20–30 min) (**Esquema 19**). O uso de etanol aquoso como meio de reação torna essa abordagem mais viável e ecologicamente correta, pois o produto alvo se solidifica após a conclusão da reação, a etapa de purificação se torna mais simples e obtida sob condições de reação muito suaves com bons rendimentos. Embora o uso de DEMs tenha ganhado crescente interesse entre os químicos sintéticos devido à sua sustentabilidade, custo-benefício e facilidade de reuso, a abordagem desenvolvida pelos pesquisadores ainda carece de relatos sobre estratégias eficazes para a recuperação e reciclagem desse material.



Esquema 19. Síntese de derivados de tetracetona utilizando DEMs de *L*-prolina:ácido oxálico como catalisador ácido de Bronsted. **Fonte:** Adaptado de [Chaudhary e colaboradores \(2024\)](#) [147].

Nanofibras de celulose funcionalizadas com DBU (CNF@DBU[Cl]) também foram avaliadas por [Lasemi e colaboradores \(2020\) \[148\]](#) na síntese de derivados de tetracetona na reação entre aldeídos aromáticos ou alifáticos e compostos 1,3-dicarbonílicos usando água à temperatura ambiente (**Esquema 20**). Na presença de CNF@DBU[Cl], as tetracetonas foram obtidas em rendimentos de 80–96% sob condições de reação suaves e tempos relativamente curtos (2-240 min). No sistema, o catalisador foi recuperado e reutilizado quatro execuções sucessivas sem perda significativa de atividade catalítica. De acordo com os pesquisadores, o método apresentou diversas vantagens significativas, como a utilização de múltiplos substratos, um processamento simplificado, a dispensa de etapas de extração ou purificação cromatográfica, condições ambientalmente sustentáveis e a ausência de solventes prejudiciais. Contudo, é importante destacar que o estudo não especifica se a metodologia proposta resulta na obtenção de derivados de xanteno após tempos de reação mais prolongados.



Esquema 20. Síntese de derivados de tetracetona utilizando CNF@DBU[Cl] como catalisador heterogêneo. **Fonte:** Adaptado de [Lasemi e colaboradores \(2020\) \[148\]](#).

Embora a literatura tenha explorado uma ampla gama de abordagens [\[18, 149\]](#) ainda não há relatos de métodos que utilizem quitosana comercial como organocatalisador para a síntese de derivados de xanteno e tetracetona. Considerando a quitosana como um material versátil e promissor, sua aplicação na obtenção desses compostos pode abrir novas possibilidades tanto para pesquisadores em laboratórios acadêmicos quanto para a indústria química, incentivando o desenvolvimento de processos mais sustentáveis, simples e eficientes.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a eficiência catalítica de materiais de quitosana de peso molecular baixo (QPB) comercial e funcionalizada com EDTA (QPB-EDTA-72h) como organocatalisadores recicláveis para obtenção de compostos bioativos via condensação de Knoevenagel e reações sequenciais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar os adutos de Knoevenagel à base de aldeídos aromáticos e derivados de isatina utilizando QPB-EDTA-72h como organocatalisador;
- Testar a atividade catalítica dos materiais de quitosana para a síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos a partir de salicilaldeído e ácido de Meldrum sob condições diversas;
- Ampliar a série de ácidos cumarino-3-carboxílicos utilizando salicilaldeídos substituídos e ácido de Meldrum nas condições otimizadas;
- Testar a atividade catalítica dos materiais de quitosana para a síntese de derivados de xanteno com saliciladeído e dimedona;
- Ampliar a série de derivados de xanteno utilizando saliciladeídos ou benzaldeídos substituídos e dimedona nas condições otimizadas;
- Verificar a reciclabilidade dos materiais utilizados como organocatalisador para a obtenção dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina, ácidos cumarino-3-carboxílicos, derivados de xanteno e tetracetona;
- Avaliar através de testes *in vitro* a atividade antimicrobiana dos adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos ou isatina e dos ácidos cumarino-3-carboxílicos;
- Avaliar através de testes *in vitro* a atividade antileishmania e larvicida frente *Aedes aegypti* dos adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos e isatina, respectivamente;
- Avaliar através de testes *in vitro* a atividade antitumoral dos derivados de xanteno e tetracetona.

CAPÍTULO 4

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SOLVENTES E REAGENTES

Todos os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento experimental deste trabalho estão listados na **Tabela 3**, bem como a procedência dos respectivos.

Tabela 3. Reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais e suas procedências (continua).

REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO DE KNOEVENAGEL E SEQUENCIAIS	
Reagentes/Solventes	Procedência
Tolueno 99,5%	Tedia [®]
Tetra-hidrofurano 99%	Sigma-Aldrich [®]
Etanol absoluto, 200 proof 99,5%	Tedia [®]
Metanol 99,8%	Dinâmica [®]
Água deionizada	LCCQS
Hexano 98,5 %	Química moderna [®]
Acetato de etila 99,8%	Tedia [®]
Malononitrila $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich [®]
Ácido de Meldrum 98%	Sigma-Aldrich [®]
Dimedona 95%	Merck [®]
Benzaldeído $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich [®]
3-Nitrobenzaldeído 99%	Merck [®]
4-Nitrobenzaldeído 99%	Merck [®]
4-Clorobenzaldeído 97%	Sigma-Aldrich [®]
4-Metoxibenzaldeído 98%	Sigma-Aldrich [®]
3-Metoxibenzaldeído 98%	Sigma-Aldrich [®]
2-Nitrobenzaldeído 99%	Merck [®]
2-Metoxibenzaldeído 98%	Sigma-Aldrich [®]
3-Hidroxibenzaldeído 99%	Sigma-Aldrich [®]
4- <i>N,N</i> -(Dimetilamino)benzaldeído 99%	Sigma-Aldrich [®]
4-Bromobenzaldeído 99%	Sigma-Aldrich [®]
1-Naftaldeído 95%	Sigma-Aldrich [®]
2,4-Dimetoxibenzaldeído 99%	Sigma-Aldrich [®]

Tabela 3. (Continuação) Reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais e suas procedências.

3-Piridinacarboxialdeído 98%	Sigma-Aldrich®
Isatina 97%	Sigma-Aldrich®
5-Fluoroisatina 98%	Sigma-Aldrich®
5-Metilisatina 95%	Sigma-Aldrich®
5-Cloroisatina (sintetizado)	LASOM
5-Bromoisatina (sintetizado)	LASOM
5-Metil, <i>N</i> -metilisatina (sintetizado)	LASOM
5-Metil, <i>N</i> -benzilisatina (sintetizado)	LASOM
<i>N</i> -Metilisatina (sintetizado)	LASOM
Salicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich®
5-Nitrosalicilaldeído	Sigma-Aldrich®
5-Clorosalicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich®
5-Bromosalicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich®
5-Metoxisalicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich®
4-(Dietilamino)salicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich®
4,6-Dimetoxisalicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich®
Orto-vanilina 99%	Sigma-Aldrich®
Quitosana de Peso Molecular Baixo (QPB), GD = 75-85%	Sigma-Aldrich®
Quitosana de Peso Molecular Baixo funcionalizada com EDTA (QPB-EDTA-72h) (sintetizado)	LCCQS
MEDIDAS INSTRUMENTAIS	
Reagentes/Solventes	Procedência
Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d ₆) 99,9% + 0,05% v/v TMS	Cambridge Isotope Laboratories®
Clorofórmio deuterado (CDCl ₃) estabilizado com prata, 99,8%	Cambridge Isotope Laboratories®
Água deuterada (D ₂ O), filtrada e 99,8% de átomos de Deutério	Sigma-Aldrich®
Ácido acético deuterado (CD ₃ CO ₂ D) ≥ 99,9% de átomos de Deutério	Sigma-Aldrich®
Brometo de potássio (KBr) grau FT-IR, ≥99%	Sigma-Aldrich®

4.2 MEDIDAS INSTRUMENTAIS

As medidas instrumentais utilizadas para caracterizar os catalisadores e os produtos da reação de condensação de Knoevenagel e reações sequenciais estão descritas na **Figura 5**.

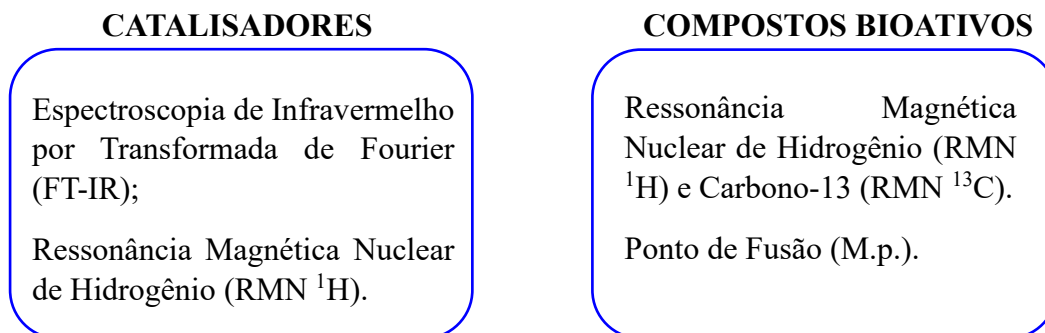


Figura 5. Medidas instrumentais usadas na caracterização dos catalisadores e dos compostos bioativos.

4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Os espectros de absorção na região do infravermelho (FT-IR) das quitosanas de peso molecular baixo (QPB) comercial e funcionalizada com EDTA (QPB-EDTA-72h) foram registrados na faixa espectral de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ em um espectrofotômetro FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer), modelo IRPrestige-21 da Shimadzu®, localizado no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LASOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Para isso, foram utilizadas pastilhas de KBr como suporte para as análises das amostras e o registro dos espectros foi programado via software IRSolution®. Os dados obtidos foram tratados no *software* OriginPro® 8.5.

4.2.4 Cromatografia em Camada Delgada

O progresso das reações de condensação de Knoevenagel e reações sequenciais foi acompanhado através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando mini placas de alumínio revestidas com sílica gel (com marcador de fluorescência), e os reagentes de partidas e produtos já disponíveis como referência. A câmara ultravioleta com lâmpada UV de comprimento de onda igual a 254 nm foi utilizada como revelador. As substâncias mais polares, como os produtos de Knoevenagel, apresentavam um menor fator de retenção (R_f), ficando

mais próximas da linha base da placa cromatográfica. Dessa forma, os produtos foram facilmente diferenciados dos substratos carbonilados nas placas de CCD.

4.2.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono-13 foram realizados utilizando DMSO-d₆ ou CDCl₃ como solvente e registrados em um espectrômetro VARIAN® Mercury Spectra AC 20 (100 e 500 MHz), pertencente à Unidade de Central Analítica (UNICAL) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB, IPeFarM-UFPB. Os dados obtidos nas análises foram tratados no software MestReNova®, versão 6.1.0-6224.

4.2.6 Determinação dos Pontos de Fusão

As medidas dos pontos de fusão (P.F.) foram realizadas em equipamento de fusão a seco da marca Fisatom, modelo 431, localizado no Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LaSOB) da UFPB. As amostras foram colocadas em capilares e submetidos a aquecimento. Através da lente de aumento, presente no equipamento, foi realizada a leitura do ponto de fusão com auxílio de um termômetro. As medidas foram realizadas em duplicatas.

4.3 SÍNTESE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

4.3.1 Obtenção da mistura binária etanol:água (3:7 v/v)

A mistura binária etanol:água (3:7 v/v) foi preparada utilizando 3 mL de etanol 99,5% e 7 mL de água deionizada. A solução foi agitada manualmente até atingir temperatura ambiente e armazenada sob refrigeração em recipiente âmbar.

4.3.2 Procedimento geral para a síntese dos adutos de Knoevenagel

A síntese dos adutos de Knoevenagel utilizando aldeídos aromáticos ou isatinas foi realizada seguindo metodologia de [Abrantes e colaboradores \(2022\) \[24\]](#). Porém, houve alteração do método de isolamento dos produtos, a fim de minimizar o número de etapas do processo e aumentar o potencial de reciclagem do organocatalisador. De modo geral, em um

balão de reação, foram adicionados 0,4 mL de mistura binária etanol:água (3:7 v/v), 1 mmol do composto carbonílico, 3 mg do catalisador de QPB-EDTA-72h e 1 mmol de malononitrila. O sistema foi fechado com septo de borracha e permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD até o desaparecimento do composto carbonílico utilizando mistura de hexano:acetato de etila (4:1 v/v) como eluente. Após o término da reação, foram adicionados 2,5 mL de água gelada e, em seguida, o sistema foi filtrado sob pressão reduzida. A mistura de produto e catalisador foi solubilizada em acetato de etila e filtrada sob pressão reduzida para separar do catalisador. Posteriormente, o produto solubilizado foi rotaevaporado para quantificação e caracterização por RMN de ^1H , ^{13}C e P.F. O catalisador foi lavado com água destilada e etanol, posteriormente, seco a pressão reduzida por 12 horas para posterior reutilização. Todos os ensaios foram realizados no LaSOB, coordenado pela professora Dra. Juliana Alves Vale.

4.3.3 Procedimento geral para síntese dos ácidos cumantino-3-carboxílicos

Em um balão de reação, foram adicionados 2,5 mL de água deionizada, 0,5 mmol de salicilaldeído, 10 mg do catalisador de QPB e 0,5 mmol de ácido de Meldrum. Posteriormente, o sistema foi fechado com septo de borracha e submetido a agitação magnética a 75 °C. A reação foi monitorada por CCD utilizando solução de hexano:acetato de etila (7:3, v/v) como eluente até o completo consumo do salicilaldeído. Confirmado a inexistência de salicilaldeído, o septo de borracha foi removido para evaporação do solvente e 5 mL de acetato de etila ou metanol foram adicionados ao sistema ainda em aquecimento para solubilização do produto, permitindo a separação do catalisador por filtração à pressão reduzida. O produto solubilizado foi seco em Na_2SO_4 anidro e recristalizado no solvente utilizado anteriormente. Por fim, a quitosana foi lavada três vezes com solução de NaOH (0,4 mol/L) para garantir total precipitação e remoção dos resíduos do produto impregnados em sua superfície, água deionizada e etanol, posteriormente filtrada e seca sob pressão reduzida por 4 horas para posterior utilização. O produto foi caracterizado por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Todos os ensaios foram realizados no LaSOB, coordenado pela professora Dra. Juliana Alves Vale.

4.3.4 Procedimento geral para a síntese dos derivados de xanteno e tetracetona

De modo geral, em um balão de reação, foram adicionados 2,5 mL de água deionizada, 0,6 mmol do aldeído, 10 mg de catalisador QPB comercial e 1 mmol de dimedona. O sistema

foi fechado e mantido sob agitação magnética a 75 °C. A reação foi monitorada por CCD até o desaparecimento da dimedona utilizando mistura de hexano:acetato de etila (6:4 ou 7:3, v/v, para xantenos e tetracetonas, respectivamente) como eluente. Após o término da reação, foram adicionados 2,5 mL de água gelada e, em seguida, o sistema foi filtrado sob pressão reduzida. A mistura sólida de produto e catalisador foi solubilizada em acetato de etila ou metanol, filtrada para separação do catalisador e recristalização do produto nesse mesmo solvente. Após filtração, secagem e quantificação, os produtos foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C e P.F. O catalisador foi lavado com solução de NaOH (0,4 mol/L), água destilada, etanol e seco a pressão reduzida por 4 horas para posterior reutilização. Todos os ensaios foram realizados no LaSOB, coordenado pela professora Dra. Juliana Alves Vale.

4.4 ANÁLISE *in vitro* DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.4.1 Análise da atividade larvicida dos adutos de Knoevenagel contra *Aedes aegypti*

A atividade larvicida dos adutos de Knoevenagel (**1a-l**) foi avaliada seguindo as recomendações da OMS [106]. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (Lapavet) do Centro de Biotecnologia da UFPB, coordenado pela professora Dra. Fabíola da Cruz Nunes. Foram usadas larvas de quarto estágio (L4) de *Aedes aegypti* (cepa RecLab-Lapavet), considerada fase final do desenvolvimento larval antes da metamorfose para pupa. Nessa etapa, as larvas apresentam maior tamanho corporal e uma coloração mais escura em comparação aos estágios anteriores. Essas características são de grande importância em estudos de controle biológico e ensaios larvicidas, pois representa o momento em que as larvas estão mais resistentes e metabolicamente ativas.

Os adutos de Knoevenagel foram diluídos em várias concentrações (0,5 a 0,001 mg/mL) usando 10 mL de solução Tween 80 (2%) em água destilada. 25 larvas de estágio L4 foram transferidas para tubos Falcon contendo as soluções de adutos de Knoevenagel. Um grupo controle foi preparado usando apenas a solução Tween 80 (2%) em água destilada. Os tubos foram incubados por 24 horas a 28 °C, com 12 horas de luz natural e 12 horas de escuridão. A mortalidade larval foi avaliada após 24 horas de incubação. Todos os testes foram realizados em triplicata. Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) foram aplicados para determinar diferenças significativas entre os grupos.

4.4.1.1 Perfil celular

O bioensaio de perfil celular foi realizado com hemolinfa coletada de 20 larvas (L4) expostas à concentração letal semimáxima (CL_{50}) das frações de adutos de Knoevenagel **1c** e **1g** por 24 h. As larvas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (do inglês, *phosphate-buffered saline* - PBS) e imobilizadas sob refrigeração (1–2 min). Em seguida, foram colocadas em uma placa de Petri e decapitadas com o auxílio de uma lupa e lâmina de bisturi. A hemolinfa foi coletada com uma micropipeta e transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 100 μ L de PBS. A porção de hemolinfa foi centrifugada a 6500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e 20 μ L da porção celular foram transferidos para outro Eppendorf com 160 μ L de PBS. Uma alíquota de 10 μ L foi colocada em uma câmara de Neubauer para análise da integridade e viabilidade celular com um microscópio, usando uma lente objetiva de 20x.

4.4.1.2 Medição de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida usando o reagente de Griess em uma porção de hemolinfa coletada de 20 larvas (L4) após exposição à CL_{50} dos adutos de Knoevenagel **1c** e **1g** por 20 minutos, resultando no volume final de 20 μ L em PBS [150]. Os grupos de controle foram expostos apenas à água destilada e Tween 80 (2%) pelo mesmo intervalo de tempo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para determinar as concentrações de NO_2^- , uma alíquota de cada amostra foi analisada por espectrofotometria. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas com um filtro de 562 nm, e a quantificação de NO foi realizada usando uma curva padrão de $NaNO_2$ como referência. As análises estatísticas foram conduzidas com o *software* GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey, quando apropriado ($p < 0,05$).

4.4.1.3. Ensaio de citotoxicidade frente a *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade foi realizado utilizando náuplios de *Artemia salina*. Uma solução salina foi preparada com sal marinho na concentração de 30 g/L e o pH foi ajustado para a faixa de 8,0–9,0 utilizando solução de NaOH 0,1 mol/L. Essa solução foi utilizada tanto para a eclosão dos ovos de *Artemia salina* quanto para o preparo das diluições de teste. Os ovos foram

incubados na solução salina por 48 horas a 25 °C sob aeração constante para permitir a eclosão. Após esse período, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos de ensaio contendo as substâncias-teste (**1c** e **1g**) nas concentrações de 20 e 40 ppm. Para o controle negativo, 10 larvas por grupo foram mantidas na mesma solução salina na qual os náuplios haviam eclodido. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e, após 24 horas, registrou-se o número de organismos vivos e mortos.

4.4.2 Análise da atividade antileishmania dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina

A avaliação da atividade antileishmania dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina (**2a–h**) foi conduzida no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC), vinculado ao Centro de Biotecnologia da UFPB, sob a coordenação da professora Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente. A espécie *Leishmania infantum* foi selecionada para os ensaios por ser o agente parasitológico responsável pela forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral. As análises envolvendo amostras de fluídos humanos foi autorizada pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB (Nº.: 404.854 e 7.884.565).

4.4.2.1 Cultura e manutenção de parasitas *in vitro*

As formas promastigotas de *Leishmania infantum* [IOC/L0579(MHOM/BR/1974/PP75)] foram cultivadas em meio de Schneider, pH 7,0, suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado pelo calor, 2% de urina humana masculina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina, e os parasitas foram mantidos a 26 °C. O procedimento para obtenção da forma amastigota axênica extracelular de *Leishmania infantum* foi baseado em métodos descritos anteriormente [151], modificados usando um meio de Schneider reajustado para pH 5,5 a 37 °C. A cultura das formas promastigotas na fase estacionária foi centrifugada, e o meio dessas células foi substituído e diferenciado em amastigotas axênicas por mudanças de temperatura e pH do meio. Os parasitas foram mantidos em cultura por no máximo 20 passagens.

4.4.2.2 Atividade antileishmania sobre formas promastigotas e amastigota axênica

A atividade antileishmania dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina foi avaliada utilizando o teste do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio). Em placa

de 96 poços, foram adicionados 50 µL de meio Schneider suplementado e, posteriormente, adicionados os dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina (**2a–h**) em triplicata, previamente diluídos em meio Schneider suplementado para um volume final de 100 µL para cada poço nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL. Por fim, cerca de 1×10^6 M de promastigotas por poço foram adicionadas, sendo essa concentração alcançada via reajuste da cultura controle após contagem em câmara de Neubauer com adição de meio Schneider suplementado para o alcance da concentração de células necessária.

As amostras foram incubadas por 72 h em estufa de DBO a temperatura de 26°C. Ao final da incubação, foram adicionados 10 µL de MTT diluído em tampão fosfato-salino a uma concentração final de 5 mg/mL. Posteriormente, foram incubados por mais 4h em estufa de DBO a 26°C, e em seguida adicionado 50 µL de dodecil sulfato de sódio a 10%. A placa ficou em *overnight* para dissolução do formazano e por último, foi realizada a leitura a 540 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800). O branco foi mantido na ausência de substâncias, contendo assim apenas meio Schneider suplementado.

O controle positivo foi realizado na presença de anfotericina B (**AmB**) como fármaco de referência comumente usado no tratamento da leishmaniose visceral. Já o controle negativo foi realizado apenas com promastigotas em meio Schneider suplementado na ausência dos compostos. A porcentagem de inibição de crescimento das substâncias avaliadas foi calculada em relação à cultura controle. O mesmo procedimento foi seguido para avaliar a inibição da forma amastigota axênica usando os mesmos compostos com as seguintes modificações: o tempo de tratamento foi encurtado para 24 h, e a temperatura do teste foi elevada para 37 °C a um pH de 5,5. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.4.2.3 Citotoxicidade dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina frente a glóbulos vermelhos humanos

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada a partir de glóbulos vermelhos humanos com tipo sanguíneo O⁺, coletado de voluntários saudáveis com anticoagulante EDTA. Após a coleta, os glóbulos vermelhos humanos foram diluídos em 80 µL de PBS e ajustado a uma concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida, os adutos de Knoevenagel derivados de isatina (**2b**, **2c** e **2g**) foram adicionados em concentrações seriadas de 400 a 3,12 µg/mL e de 50 a 3,12 µg/mL para a **AmB**. Posteriormente, as amostras incubadas durante 1 h a 37°C e a reação foram interrompidas pela adição de 200 µL de tampão fosfato-salino novamente. Após o tempo de exposição, as suspensões passaram por processo de centrifugação

(112 x g durante 10 minutos) à temperatura ambiente e cada sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços. A hemoglobina liberada foi monitorizada através da medição da absorbância a 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) puderam ser determinadas a partir da substituição da solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril (hemólise por choque hipotônico), respectivamente. O experimento se sucedeu em duplicata, em três experimentos independentes e os resultados foram expressos em concentração hemolítica semimáxima (CH_{50}), considerando o controle positivo como 100% de hemólise.

4.4.2.4 Citotoxicidade dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina em Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada usando Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMCs) coletadas de três voluntários saudáveis (2 homens, idade média de 33 anos; e 1 mulher, idade de 28 anos). As PBMCs foram separadas por gradiente de densidade usando Ficoll Paque PLUS, peletizadas por centrifugação (400 μ g por 40 min) e ressuspensas em meio RPMI 1640, então suplementadas com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução antibiótica (penicilina 5000 Unidades/mL + estreptomicina 5000 μ g/mL). Após 24 h de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico modificado com base no corante tetrazólio MTT.

O ensaio MTT foi usado para citotoxicidade *in vitro* conforme descrito anteriormente com as seguintes modificações: as células foram expostas a concentrações diluídas em série de adutos de Knoevenagel derivados de isatina (100 a 7,8 μ M) e **AmB** (100 a 0,78 μ M). As placas foram mantidas a 37 °C por 24 h. MTT (5 mg/mL) foi adicionado e incubado por 4 h a 37 °C, após o que as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e DMSO foi adicionado, deixando as placas sob agitação para solubilizar os sais de formazano. A absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de placas. A porcentagem média de células viáveis foi calculada em relação ao controle não tratado.

4.4.2.5 Análise de dados e estatísticas

Os valores de concentração inibitória semimáxima (CI_{50}), concentração efetiva semimáxima (CE_{50}), concentração citotóxica semimáxima (CC_{50}) e concentração hemolítica semimáxima (CH_{50}) foram calculados usando o programa GraphPadPrism® (versão 6.0; San

Diego, CA, EUA). A análise estatística foi realizada usando regressão não linear (ajuste de curva). A menos que indicado de outra forma, os ensaios foram realizados em triplicatas e três experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) com o teste post hoc de Tukey em um nível de significância de 0,05.

4.4.3 Análise da atividade antimicrobiana dos adutos de Knoevenagel e ácidos cumarino-3-carboxílicos

Os adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos (**1a-l**) ou isatina (**2a-h**) e ácidos cumarino-3-carboxílicos (**3a-i**) foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas de 4 bactérias, 4 fungos leveduriformes e 4 fungos filamentosos. Os antifúngico e antibacteriano usados como controles foram fluconazol e gentamicina, respectivamente (Sigma-Aldrich/Merck KGaA). Os produtos foram pesados e devidamente solubilizados em 150 µL (3 %) de DMSO e adicionados 100 µL de Tween 80 (2%), completando-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 5 mL. Dessa forma, foi obtida a concentração inicial dos produtos de 1024 µg/mL e diluído em série até 2 µg/mL [152, 153].

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade biológica foram Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) - adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France, para manutenção, respectivamente, das cepas de bactérias e fungos. Para os ensaios de atividade biológica, meio RPMI 1640 com *L*-glutamina e sem bicarbonato foram usados (Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

4.4.3.1 Micro-organismos

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos, foram utilizadas as seguintes cepas microbianas: *Staphylococcus aureus* ATCC-13150, *Staphylococcus epidermidis* ATCC-12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *Escherichia coli* ATCC-18739, *Candida albicans* ATCC-76485, *Candida albicans* LM-70, *Candida tropicalis* ATCC-13803, *Candida tropicalis* LM-77, *Aspergillus flavus* LM-26, *Aspergillus flavus* LM-55, *Aspergillus niger* LM-23, *Penicillium citrinum* ATCC-40011. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia,

Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, coordenado pela professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

Foram utilizados para os testes repiques recentes em ASD inclinado e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para bactérias ou fungos leveduriformes e à temperatura ambiente ($t.a. = 28-30^\circ\text{C}$) para fungos filamentosos. Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas de bactérias em meio BHI e fungos em meio ASD, foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFC/mL para os fungos e 10^8 UFC/mL para as bactérias [152, 154-156].

4.4.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM), Fungicida Mínima (CFM) e Bactericida Mínima (CBM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland e Squires (1991) [152] e Eloff (1998) [157]. A determinação da CIM das amostras sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em caldo, com placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 μL de caldo RPMI-1640 duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μL das moléculas solubilizados foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 até 2 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, foi adicionado 10 μL das suspensões das espécies fúngicas/bacterianas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (RPMI + fungos ou bactéria), para comprovação da viabilidade das cepas, meio de cultura (RPMI), para comprovação da esterilidade e controle com gentamicina/bactérias e fluconazol/fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias ou leveduras e a $t.a.$ ($28-30^\circ\text{C}$)/5-7 dias para fungos filamentosos.

O produto foi considerado ativo quando inibiu, pelo menos, 50% dos micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade biológica [152, 158-161]. Após leitura da Cocentração inibitória mínima (CIM), foi realizado o ensaio para determinação da CBM/CFM. Aliquotas de 10 μL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico ou bacteriano (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram adicionadas a 100 μL de caldo RPMI contidos em novas placas de microdiluição (96 poços) e incubadas por 24-48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para bactérias ou fungos leveduriformes e por 5-7 dias a $t.a.$ ($28-30^\circ\text{C}$) para fungos

filamentosos. A CBM e CFM foram consideradas como sendo a menor concentração do produto teste capaz de inibir o crescimento bacteriano ou fúngico, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das concentrações obtidas nos três ensaios [162, 163]. Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade (caldo RPMI 1640) e de viabilidade das espécies fúngicas e bacterianas (RPMI 1640 mais inóculo de cada micro-organismo).

4.4.4 Análise da atividade antitumoral dos derivados de xanteno e tetracetona

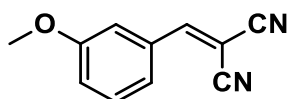
A análise de citotoxicidade foi realizada utilizando o método do MTT no Laboratório de Proliferação Celular e Câncer do Departamento de Fisiologia e Farmacologia na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob coordenação da professora Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão. As linhagens celulares tumorais utilizadas foram leucemia mieloide crônica (K-562), câncer de cólon humano (HCT-116) e carcinoma pulmonar (A-549), juntamente com a linhagem não tumoral derivada de tecido pulmonar normal (fibroblastos pulmonares – MRC-5). Essas linhagens celulares foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. As células foram semeadas em uma concentração de 1×10^5 células/mL. Para determinar a resposta em concentração única, as amostras foram testadas na concentração de 25 µg/mL. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: as amostras foram classificadas como inativas (0% de inibição), fracamente ativas (1–50%), moderadamente ativas (51–75%) ou altamente ativas (76–100%).

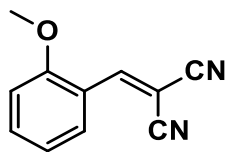
Os experimentos foram analisados com base nos valores médios e respectivos desvios padrão, utilizando o *software* LibreOffice Calc (versão 6.4.7.2). Cada amostra foi testada em duplicata, em dois experimentos independentes. O valor de CI₅₀ foi calculado por meio de análise de regressão não linear utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.0A. A linhagem celular K-562 foi semeada na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, enquanto as linhagens HCT-116, H-1299 e MRC-5 foram semeadas em 1×10^5 células/mL. As substâncias, previamente dissolvidas em DMSO, foram diluídas em meio RPMI para se obter a concentração final desejada e adicionadas em placas de 96 poços (200 µL por poço). As placas foram incubadas por 72 horas em incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C.

Após 69 horas de tratamento, foram adicionados 20 μL da solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço, e as placas foram incubadas pelas 3 h restantes. Ao final da incubação, o produto formazano do MTT foi dissolvido em 100 μL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm em um espectrofotômetro de placas (Varioskan Flash; Thermo Scientific, Finlândia).

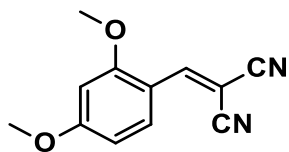
4.5 Dados de deslocamentos dos Espectros de RMN ^1H e ^{13}C



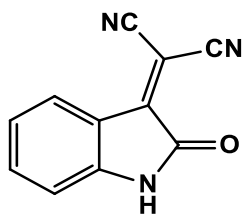
2-(3-metoxibenzilideno)malononitrila (1g): Sólido amarelado. P.F. obtido/literatura: 98-102 $^{\circ}\text{C}$ /102 $^{\circ}\text{C}$. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3,87 (s, 3H); 7,17 (dt, J = 7,3, 2,5 Hz, 1H), 7,46 – 7,42 (m, 2H), 7,51 – 7,48 (m, 1H), 7,75 (s, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 55,53, 82,98, 112,59, 113,64, 114,07, 121,35, 123,90, 130,57, 132,04, 159,86, 160,14. Dados de deslocamentos e P.F. condizentes com os obtidos por [Ferreira e colaboradores \(2017\)](#) [19].



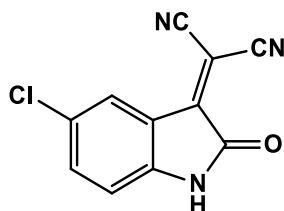
2-(2-metoxibenzilideno)malononitrila (1i): Sólido amarelado. P.F. obtido/literatura: 68-70 $^{\circ}\text{C}$ / 70-73 $^{\circ}\text{C}$. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3,93 (s, 3H), 7,11 – 6,96 (m, 2H), 7,59 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 8,18 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 8,30 (s, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 55,92, 81,43, 111,46, 112,95, 114,29, 120,18, 121,18, 128,85, 136,45, 154,43, 158,91. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Ferreira e colaboradores \(2017\)](#) [19].



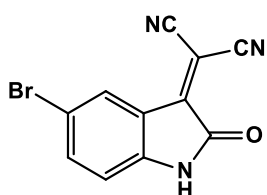
2-(2,4-dimetoxibenzilideno)malononitrila (1j): Sólido esverdeado. P.F. obtido/literatura: 130-134 $^{\circ}\text{C}$ /134-136 $^{\circ}\text{C}$. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3,90 (s, 3H); 3,91 (s, 3H), 6,45 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 6,61 (dd, J = 9,0, 2,4 Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,26 (d, J = 9,0 Hz, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 55,85, 55,96, 76,64, 98,03, 106,72, 113,86, 113,95, 115,14, 130,74, 152,94, 161,20, 166,87. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Ferreira e colaboradores \(2017\)](#) [19].



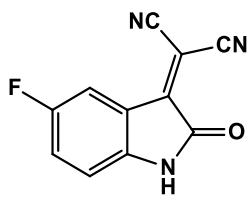
2-(2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2a): Sólido vermelho. P.F. obtido/literatura: 143-145 °C/143-145 °C. ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,13 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,56 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,87 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz), 11,19 (s, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 80,59, 111,63, 113,04, 118,62, 122,91, 125,86, 137,83, 146,47, 150,59, 163,72. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Tan e colaboradores \(2019\)](#) [164].



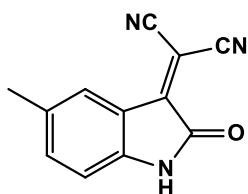
2-(5-Cloro-2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2b): Sólido roxo. P.F. obtido/literatura: 218-220 °C/219-220 °C. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 6,97 (dd, 1H, $J = 8,5, 0,4$ Hz), 7,63 (dd, 1H, $J = 8,5, 2,1$ Hz), 7,76 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz), 11,36 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 82,35, 111,21, 112,76, 113,34, 120,02, 124,80, 126,55, 136,98, 145,23, 149,67, 163,52. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Tan e colaboradores \(2019\)](#) [164].



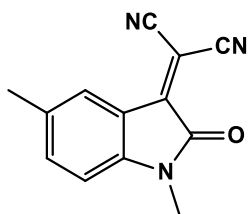
2-(5-bromo-2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2c): Sólido roxo. P.F. obtido/literatura: 220-222 °C/220-222 °C. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 6,92 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,73 (d, 1H, $J = 10,4$ Hz), 7,86 (s, 1H), 11,36 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 82,67, 111,58, 113,14, 114,12, 114,44, 121,86, 128,04, 140,14, 145,95, 149,86, 163,77. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Tan e colaboradores \(2019\)](#) [164].



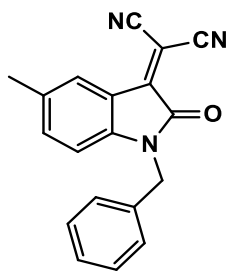
2-(5-Fluoro-2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2d): Sólido roxo. P.F. obtido/literatura: 242-245 °C/243-245 °C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 6,96 (dd, 1H, ArH, $J = 8,7, 4,3$ Hz), 7,47 (td, 1H, $J = 9,0, 2,7$ Hz), 7,55 (dd, 1H, $J = 8,3, 2,6$ Hz), 11,24 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 82,41, 111,32, 111,95, 112,20, 112,76, 113,02, 113,10, 119,24, 119,34, 124,44, 124,68, 143,06, 150,28, 150,31, 156,48, 158,80, 163,81. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Tan e colaboradores \(2019\)](#) [164].



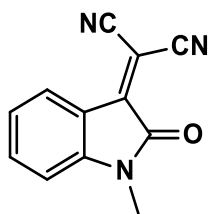
2-(5-metil-2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2e): Sólido roxo escuro. P.F. obtido/literatura: 175-180 °C/179-183 °C. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,27 (s, 3H), 6,83 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,39 (dd, 1H, $J = 8,1, 0,9$ Hz), 7,64 (s, 1H), 11,09 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 20,47, 80,29, 111,54, 111,60, 113,08, 118,67, 125,74, 131,97, 138,57, 144,46, 150,58, 163,81. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Tan e colaboradores \(2019\)](#) [164].



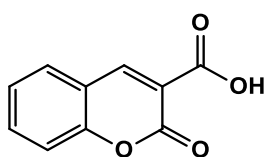
2-(1,5-Dimetil-2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2f): Sólido marrom. P.F. obtido/literatura: 235-240 °C/241-243 °C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2,30 (s, 3H), 3,12 (s, 3H), 7,05 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 7,49 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 7,69 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 20,47, 26,30, 80,96, 110,45, 111,51, 113,01, 118,06, 125,57, 132,60, 138,32, 145,24, 149,89, 162,47. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Tan e colaboradores \(2019\)](#) [164].



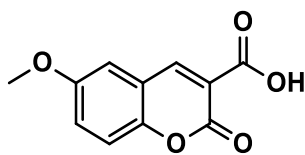
2-(1-benzil-5-metil-2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2g): Sólido preto. P.F. obtido/literatura: 160-163 °C/161-163 °C. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 2,28 (s, 3H), 4,90 (s, 2H), 6,94 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz), 7,41-7,30 (m, 6H), 7,73 (s, 1H); ^{13}C RMN (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 20,48, 43,07, 81,49, 110,94, 111,63, 113,07, 118,33, 125,81, 127,43, 127,79, 128,80, 132,87, 135,32, 138,20, 144,18, 149,67, 162,73. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Deng, Wei e Shi \(2011\) \[165\]](#).



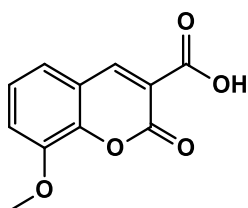
2-(1-Metil-2-oxoindolin-3-ilideno)malononitrila (2h): Sólido roxo. P.F. obtido/literatura: 210-215 °C/215-217 °C. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): 3,25 (3H, s), 6,86 (d, 1H, ArH, $J = 7,9$ Hz), 7,15 (td, 1H, $J = 7,8, 1,1$ Hz), 7,58 (td, 1H, $J = 7,8, 1,1$ Hz), 8,11 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 26,56, 82,77, 109,77, 110,68, 112,41, 118,31, 124,03, 126,91, 137,86, 147,16, 149,51, 162,58. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Deng, Wei e Shi \(2011\) \[165\]](#).



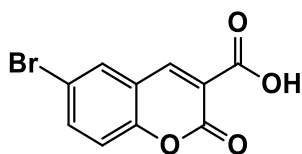
Ácido 2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3a): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 188-190 °C/189-191 °C. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,46 – 7,37 (m, 2H), 7,72 (ddd, 1H, $J = 8,8, 7,3, 1,7$ Hz), 7,90 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 8,73 (s, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 116,16, 118,01, 118,39, 124,87, 130,22, 134,33, 148,39, 154,50, 156,76, 164,02. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Brahmachari \(2015\) \[7\]](#).



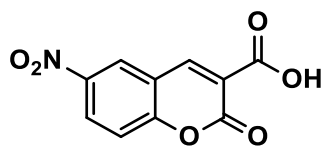
Ácido 6-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3b): Sólido amarelado. P.F. obtido/literatura: 198-201 °C/198-200 °C. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3,80 (s, 3H), 7,31 (dd, 1H, $J = 9,1, 3,0$ Hz), 7,37 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 7,44 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz), 8,67 (s, 1H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 55,89, 111,90, 117,35, 118,46, 118,64, 122,16, 148,20, 148,99, 155,81, 157,11, 164,12. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Brahmachari \(2015\) \[7\]](#).



Ácido 8-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3c): Sólido amarelado. P.F. obtido/literatura: 214-215 °C/216-217 °C. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3,91 (s, 3H), 7,32 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,41 (ddd, 2H, $J = 15,4, 7,9, 1,4$ Hz), 8,69 (s, 1H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 56,22, 116,28, 118,53, 121,14, 124,80, 143,85, 146,28, 148,63, 156,48, 164,02. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Chavan e Bandgar \(2013\) \[20\]](#).

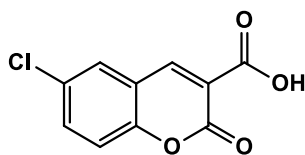


Ácido 6-bromo-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3d): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 189-192 °C/193-195 °C. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,39 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,85 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,4$ Hz), 8,14 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 8,66 (s, 1H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 116,31, 118,50, 119,62, 119,92, 132,04, 136,46, 146,98, 153,57, 156,19, 163,82. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Brahmachari \(2015\) \[7\]](#).



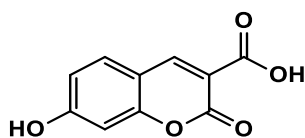
Ácido 6-nitro-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3e): Sólido amarelado. P.F. obtido/literatura: 227-229 °C/232-234 °C. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,63 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 8,48 (dd, 1H, $J = 9,1, 2,8$ Hz), 8,87 (s, 1H), 8,88 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz).

^{13}C RMN (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 117,76, 118,40, 120,39, 125,98, 128,38, 143,69, 147,17, 155,51, 158,09, 163,56. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Brahmachari \(2015\) \[7\]](#).



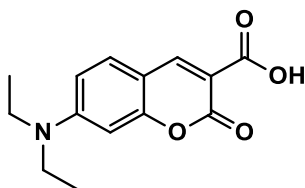
Ácido 6-cloro-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3f): Sólido branco.

P.F. obtido/literatura: 123-122 °C/122-123 °C. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,47 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz), 7,75 (ddd, 1H, $J = 8,8, 2,6, 0,7$ Hz), 8,03 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz), 8,69 (s, 1H). ^{13}C RMN (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 118,17, 119,37, 119,60, 128,42, 128,98, 133,61, 146,97, 153,11, 156,12, 163,75. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Brahmachari \(2015\) \[7\]](#).



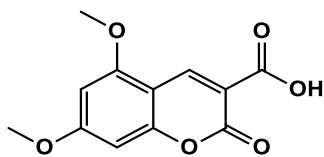
Ácido 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3g): Sólido amarelado.

P.F. obtido/literatura: 264-265 °C/260-262 °C. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6,73 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 6,84 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,3$ Hz), 7,74 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 8,68 (s, 1H). ^{13}C RMN (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 101,81, 110,64, 112,53, 114,03, 132,06, 149,42, 157,01, 157,56, 163,94, 164,24. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Brahmachari \(2015\) \[7\]](#).

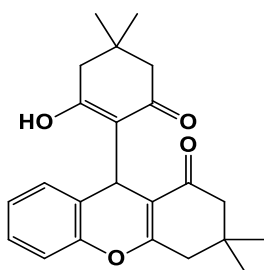


Ácido 7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3h):

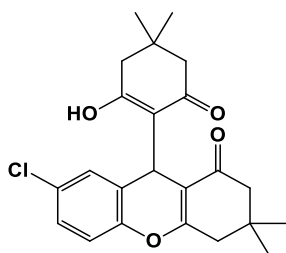
Sólido laranja. P.F. obtido/literatura: 224-226 °C/224-225 °C. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1,13 (t, 6H, $J = 7,0$ Hz), 3,47 (q, 4H, $J = 7,1$ Hz), 6,54 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 6,77 (dd, 1H, $J = 9,0, 2,4$ Hz), 7,62 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 8,56 (s, 1H). ^{13}C RMN (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,39, 44,51, 95,98, 107,16, 107,46, 110,17, 131,95, 149,54, 153,02, 157,97, 159,72, 164,62. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Bardajee e colaboradores \(2010\) \[4\]](#).



Ácido 5,7-dimetoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (3i): Sólido amarelado. P.F. obtido/literatura: 232-234 °C/234-236 °C. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3,89 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 6,54 (s, 1H), 6,63 (s, 1H), 8,63 (s, 1H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 56,40, 56,63, 93,05, 95,29, 102,75, 111,35, 143,51, 157,14, 157,65, 158,12, 164,06, 166,28. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Chavan e Bandgar \(2013\)](#) [20].

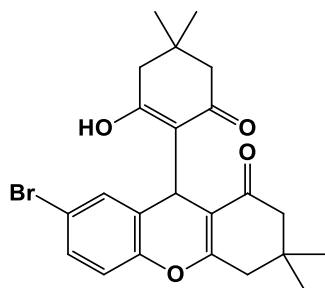


9-(2-Hidroxi-4,4-dimetil-6-oxo-ciclohex-1-enil)-3,3-Dimetil-2,3,4,9-tetra-hidroxanten-1-ona (4a): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 207-210 °C/210-212 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10,45 (s, 1H), 7,18 – 7,12 (m, 1H), 7,05 – 6,97 (m, 3H), 4,66 (s, 1H), 2,63 – 2,43 (m, 2H), 2,40 – 2,35 (m, 2H), 2,35 – 2,30 (m, 2H), 2,04 – 1,90 (m, 2H), 1,12 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 0,99 (d, $J = 2,4$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 201,08, 196,74, 170,89, 169,32, 151,18, 128,12, 127,67, 124,72, 124,44, 118,46, 115,89, 111,19, 50,75, 50,06, 43,33, 41,69, 32,44, 31,09, 29,99, 29,30, 27,92, 27,34, 26,59. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Mali e colaboradores \(2018\)](#) [166].

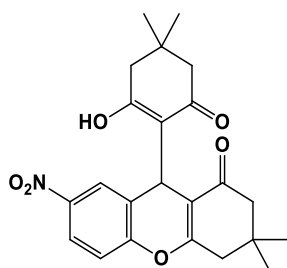


7-cloro-9-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxociclohex-1-en-1-il)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-xanten-1-ona (4b): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 226-228 °C/232-234 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10,39 (s, 1H), 7,14 – 7,07 (m, 1H), 7,00 – 6,92 (m, 2H), 4,61 (s, 1H), 2,58 (d, $J = 17,7$ Hz, 1H), 2,52 – 2,38 (m, 2H), 2,38 – 2,30 (m, 3H), 2,09 – 1,95 (m, 2H), 1,12 (s, 3H), 1,00 (d, $J = 9,8$ Hz, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 200,95, 196,82, 171,36, 168,96, 149,81, 129,59, 127,85, 127,68, 126,31, 118,00, 117,15,

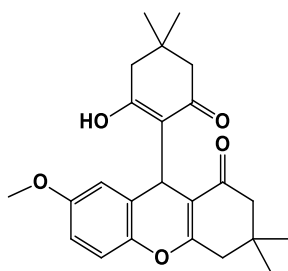
110,84, 50,80, 50,04, 43,35, 41,58, 32,42, 31,23, 29,84, 29,34, 28,02, 27,21, 26,77. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Mali e colaboradores \(2018\)](#) [166].



7-Bromo-9-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxo-ciclohex-1-enil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-xanten-1-ona (4c): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 245-248 °C/252-254 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10,38 (s, 1H), 7,26 – 7,22 (m, 1H), 7,12 (dd, J = 2,3, 0,8 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 4,60 (s, 1H), 2,61 – 2,43 (m, 2H), 2,38 (d, J = 12,8 Hz, 2H), 2,34 – 2,31 (m, 2H), 1,98 (s, 2H), 1,12 (s, 3H), 1,04 – 0,97 (m, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 200,96, 196,84, 171,37, 168,92, 150,32, 130,82, 130,60, 126,74, 118,02, 117,56, 117,07, 110,91, 50,78, 50,02, 43,33, 41,56, 32,43, 31,24, 29,86, 29,33, 27,92, 27,22, 26,75. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Mali e colaboradores \(2018\)](#) [166].

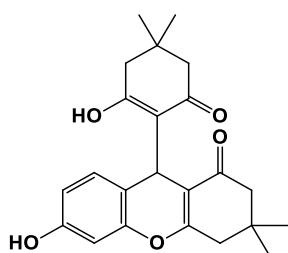


9-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxociclohex-1-en-1-il)-3,3-dimetil-7-nitro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-xanten-1-ona (4d): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 205-207 °C/204-205 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10,31 (s, 1H), 8,05 (dd, J = 8,9, 2,7 Hz, 1H), 7,93 (dd, J = 2,7, 0,8 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,68 (s, 1H), 2,65 – 2,49 (m, 2H), 2,49 – 2,30 (m, 4H), 2,03 – 1,91 (m, 2H), 1,14 (s, 3H), 1,05 – 0,97 (m, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 201,33, 197,26, 172,41, 168,35, 155,89, 144,78, 126,39, 124,20, 124,05, 118,12, 116,88, 111,42, 51,05, 50,36, 43,66, 41,68, 32,80, 31,62, 30,09, 29,64, 28,39, 27,50, 27,12. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Mali e colaboradores \(2018\)](#) [166].



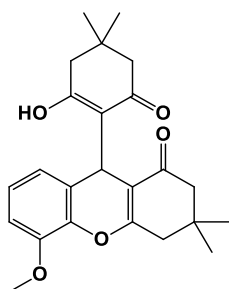
9-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxociclohex-1-en-1-il)-7-metoxi-3,3-

dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-xanten-1-ona (4e): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 173-176 °C/177-181 °C. °C ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10,57 (s, 1H), 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,70 (dd, $J = 2,9, 0,5$ Hz, 1H), 6,50 (dd, $J = 3,0, 0,7$ Hz, 1H), 4,64 (s, 1H), 3,70 (s, 3H), 2,62 – 2,41 (m, 2H), 2,40 – 2,36 (m, 2H), 2,34 – 2,29 (m, 2H), 2,01 – 1,94 (m, 2H), 1,11 (s, 3H), 1,00 (d, $J = 9,1$ Hz, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 201,02, 196,75, 171,00, 169,56, 156,56, 145,36, 125,36, 118,36, 116,61, 113,39, 112,47, 110,46, 55,69, 50,76, 50,06, 43,35, 41,74, 32,41, 31,07, 30,06, 29,32, 28,40, 27,30, 26,61. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Kupwade e colaboradores \(2016\) \[167\]](#).



6-hidroxi-9-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxociclohex-1-en-1-il)-3,3-

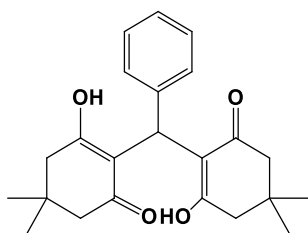
dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-xanten-1-ona (4f): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 226-228 °C/232 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,39 (s, 1H), 6,73 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 6,41 (dd, $J = 8,3, 2,5$ Hz, 1H), 6,31 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 4,91 (s, 1H), 2,50 (d, $J = 18,0$ Hz, 2H), 2,29 (d, $J = 17,3$ Hz, 1H), 2,21 (d, $J = 15,9$ Hz, 2H), 2,01 (dd, $J = 16,4, 1,6$ Hz, 2H), 1,03 (s, 3H), 0,96 (s, 3H), 0,88 (s, 7H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 195,95, 156,13, 150,08, 128,83, 115,96, 111,82, 111,22, 101,90, 50,50, 40,74, 31,63, 29,23, 27,74, 26,29. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Pore e colaboradores \(2010\) \[168\]](#).



3-metoxi-9-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxo-ciclohex-1-enil)-3,3-dimetil-

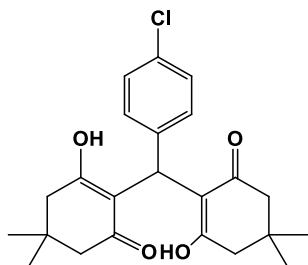
2,3,4,9-tetrahidro-xanten-1-ona (4g): Sólido amarelo claro. P.F. obtido/literatura: 223-225

°C/228-230 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10,42 (s, 1H), 6,94 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,75 (dd, $J = 8,2, 1,4$ Hz, 1H), 6,58 (dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz, 1H), 4,66 (s, 1H), 3,88 (s, 3H), 2,76 – 2,50 (m, 2H), 2,38 – 2,30 (m, 4H), 2,04 – 1,89 (m, 2H), 1,12 (s, 3H), 1,04 – 0,96 (m, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 201,15, 196,72, 170,75, 169,00, 147,23, 140,81, 125,34, 124,38, 119,91, 118,31, 111,04, 110,52, 56,21, 50,77, 50,08, 43,32, 41,68, 32,46, 31,04, 30,03, 29,25, 27,92, 27,32, 26,56. Os dados de deslocamentos e P.F. correspondem aos obtidos por [Mali e colaboradores \(2018\)](#) [166].



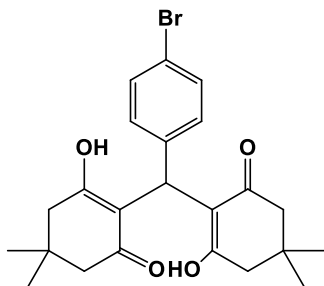
2,2'-(fenilmetileno)bis(3-hidroxi-5,5-dimetilciclohex-2-enona) (5a):

Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 186-188°C/183-184 °C ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11,90 (s, 1H), 7,26 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,20 – 7,13 (m, 1H), 7,12 – 7,07 (m, 2H), 5,54 (s, 1H), 2,45 – 2,31 (m, 8H), 1,23 (s, 6H), 1,10 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 190,61, 189,54, 138,20, 128,35, 126,91, 125,98, 115,73, 47,20, 46,58, 32,88, 31,57, 31,55, 29,78, 27,54. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Kalla e colaboradores \(2019\)](#) [18].



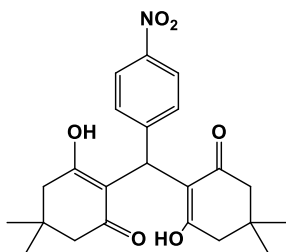
2,2'-((4-clorofenil)metileno)bis(3-hidroxi-5,5-dimetilciclohex-2-enona) (5b):

Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 137-139 °C/136-138 °C ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11,86 (s, 1H), 7,25 – 7,20 (m, 2H), 7,04 – 6,98 (m, 2H), 5,47 (s, 1H), 2,48 – 2,29 (m, 8H), 1,21 (s, 6H), 1,10 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 191,04, 189,83, 137,10, 131,99, 128,75, 128,59, 115,74, 47,45, 46,83, 32,81, 31,82, 29,99, 27,81. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Kalla e colaboradores \(2019\)](#) [18].



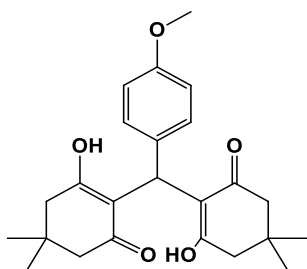
2,2'-((4-bromofenil)metileno)bis(3-hidroxi-5,5-dimetilciclohex-2-

enona) (5c): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 163-166 °C/158-160 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11,86 (s, 1H), 7,38 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,00 – 6,89 (m, 2H), 5,45 (s, 1H), 2,52 – 2,24 (m, 8H), 1,21 (s, 6H), 1,10 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 190,81, 189,57, 137,42, 131,43, 128,74, 119,79, 115,41, 47,18, 46,56, 32,61, 31,56, 29,74, 27,55. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Kalla e colaboradores \(2019\)](#) [18].



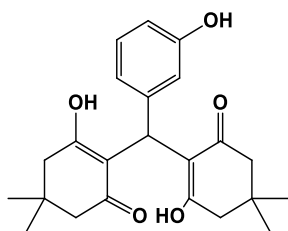
2,2'-((4-nitrofenil)metileno)bis(3-hidroxi-5,5-dimetilciclohex-2-

enona) (5d): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 186-187 °C/191-192 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 11,79 (s, 1H), 8,17 – 8,09 (m, 2H), 7,24 (dd, $J = 8,9, 1,3$ Hz, 2H), 5,54 (s, 1H), 2,49 – 2,32 (m, 8H), 1,23 (s, 6H), 1,11 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 191,08, 189,73, 146,66, 146,27, 127,77, 123,66, 115,05, 47,13, 46,54, 33,39, 31,61, 29,66, 27,59. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Kalla e colaboradores \(2019\)](#) [18].



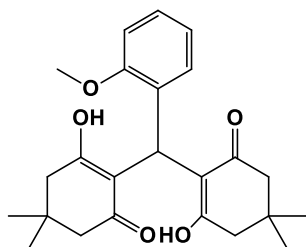
2,2'-((4-metoxifenil)metileno)bis(3-hidroxi-5,5-dimetilciclohex-2-

enona) (5e): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 139-140 °C/140-142 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11,91 (s, 1H), 7,02 – 6,97 (m, 2H), 6,83 – 6,78 (m, 2H), 5,48 (s, 1H), 3,77 (s, 3H), 2,45 – 2,31 (m, 8H), 1,22 (s, 6H), 1,09 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 190,55, 189,52, 157,72, 129,96, 127,93, 115,93, 113,79, 55,35, 47,21, 46,58, 32,16, 31,52, 29,81, 27,50. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Kalla e colaboradores \(2019\)](#) [18].



2,2'-((3-hidroxifenil)metileno)bis(3-hidroxi-5,5-dimetilciclohex-2-

enona) (5f): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 245-249 °C/245-246 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11,93 (s, 1H), 7,11 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,68 – 6,55 (m, 3H), 5,49 (s, 1H), 2,47 – 2,28 (m, 8H), 1,21 (s, 6H), 1,08 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 190,68, 189,68, 155,79, 140,31, 129,43, 119,35, 115,66, 114,31, 113,08, 47,19, 46,55, 32,79, 31,61, 29,63, 27,65. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Safaei-Ghomi e colaboradores \(2017\)](#) [169].



2,2'-((2-metoxifenil)metileno)bis(3-hidroxi-5,5-dimetilciclohex-2-

enona) (5g): Sólido branco. P.F. obtido/literatura: 182-183 °C/181-183 °C. ^1H NMR ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,24 – 7,15 (m, 2H), 6,89 (td, $J = 7,6, 1,2$ Hz, 1H), 6,79 (dd, $J = 8,0, 1,2$ Hz, 1H), 5,58 (s, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,34 (s, 8H), 1,10 (s, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 189,33, 157,29, 128,65, 127,61, 127,00, 120,14, 116,62, 110,29, 55,42, 46,89, 31,37, 29,39. Dados de deslocamentos e P.F. correspondentes aos obtidos por [Shirini e colaboradores \(2016\)](#) [170].

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DOS ADUTOS DE KNOEVENAGEL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

5.1.1 Síntese dos adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos ou isatina utilizando QPB-EDTA-72h como organocatalisador heterogeneizado bifuncional

A partir da metodologia otimizada por [Abrantes e colaboradores \(2022\) \[24\]](#), as reações de Knoevenagel foram realizadas utilizando QPB-EDTA-72h como organocatalisador heterogeneizado bifuncional em mistura binária etanol:água (3:7, v/v) como solvente à temperatura ambiente. Uma classe de aldeídos aromáticos e derivados de isatina foram empregados para sintetizar o conjunto de adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos ou isatina com a intenção de avaliar a atividade antileishmania, antimicrobiana e larvicida frente *Aedes aegypti* desses compostos. Os tempos e rendimentos de cada composto obtido estão apontados na [Tabela 4 e 5](#).

Tabela 4. Aplicação de variados aldeídos aromáticos para obtenção de adutos de Knoevenagel utilizando QPB-EDTA-72h como catalisador nas condições otimizadas (continua).^a

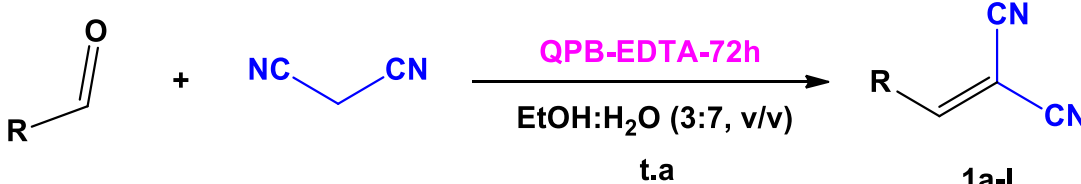
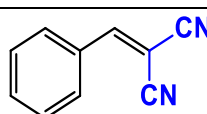
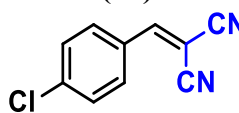
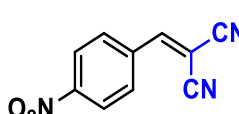
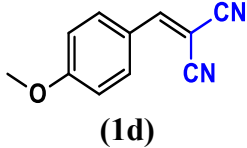
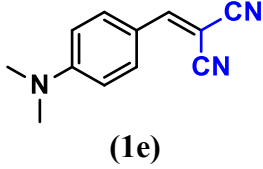
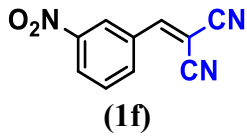
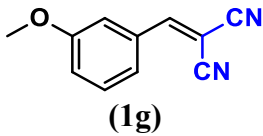
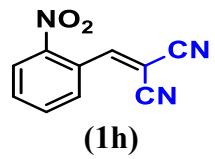
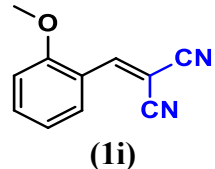
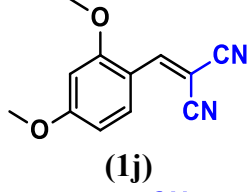
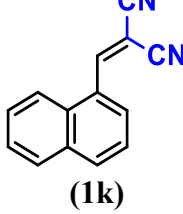
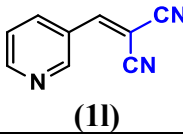
				
Entrada	R	Produto	Tempo (min) ^b	Rendimento isolado (%)
1	Ph	 (1a)	15	90
2	4-Cl-Ph	 (1b)	50	85
3	4-NO ₂ -Ph	 (1c)	15	96

Tabela 5. (Continuação) Aplicação de variados aldeídos aromáticos para obtenção de adutos de Knoevenagel utilizando QPB-EDTA-72h como catalisador nas condições otimizadas.^a

4	4-CH ₃ O-Ph		40	90
5	4-N-(CH ₃) ₂ -Ph		120	95
6	3-NO ₂ -Ph		60	90
7	3-CH ₃ O-Ph		20	83
8	2-NO ₂ -Ph		80	90
9	2-CH ₃ O-Ph		20	90
10	2,4-CH ₃ O-Ph		40	89
11	1-Naftil		20	91
12	3-piridil		5	90

^aCondições reacionais: aldeído (1,0 mmol), malononitrila (1,0 mmol), 0,4 mL de EtOH:H₂O (3:7), 3 mg de QPB-EDTA-72h; ^bAs reações foram monitoradas por CCD até o desaparecimento do aldeído.

Como apontado por Abrantes e colaboradores (2022) [24], as reações utilizando variados aldeídos aromáticos monossustituídos por grupos doadores ou retiradores de elétrons e malononitrila na presença de QPB-EDTA-72h como organocatalisador heterogeneizado bifuncional apresentou tempos curtos ou moderados e ótimos rendimentos isolados (entradas 1-6, 8, 11-12, **Tabela 4**). A mesma tendência foi observada quando os novos aldeídos foram aplicados (entradas 7, 9 e 10, **Tabela 4**). Os produtos **1g** e **1i** foram obtidos em 20 minutos, independentemente da posição do grupo substituinte (entradas 7 e 9, **Tabela 4**). Infere-se, neste caso, que o efeito doador de elétrons desses grupos não interfere no progresso da reação. Entretanto, quando o 2,4-dimetoxibenzaldeído (entrada 10, **Tabela 4**) foi empregado na condensação de Knoevenagel, o produto **1j** foi formado em 40 minutos, indicando que a dissustituição retarda o progresso reacional, mas não influencia significativamente no rendimento.

Após as reações utilizando aldeídos como compostos carbonilados, foram realizadas algumas reações utilizando derivados de isatina e a malononitrila na presença do material QPB-EDTA-72h como organocatalisador heterogeneizado bifuncional também nas condições estabelecidas por Abrantes e colaboradores (2022) [24] (entradas 1-8, **Tabela 5**).

Tabela 5. Aplicação de variadas isatinas para obtenção de adutos de Knoevenagel derivados de isatina utilizando QPB-EDTA-72h como catalisador nas condições otimizadas (continua).^a

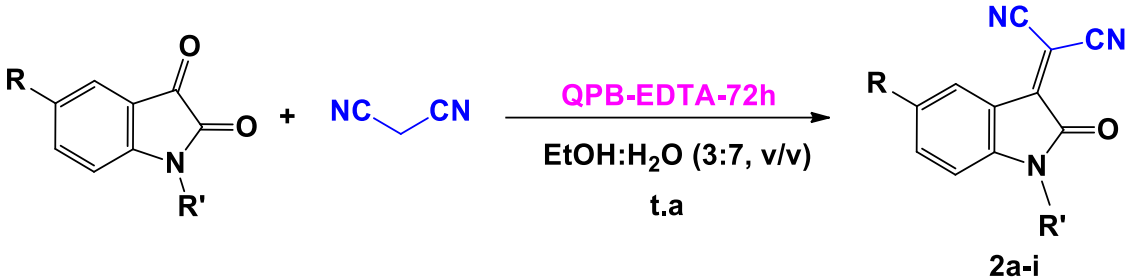
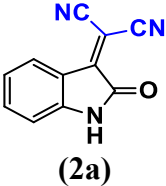
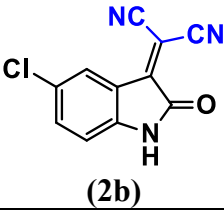
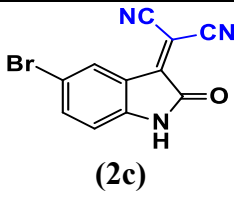
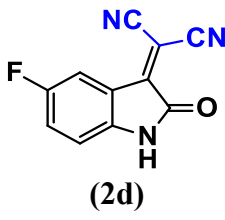
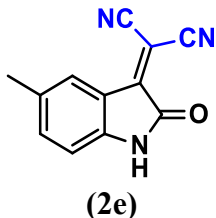
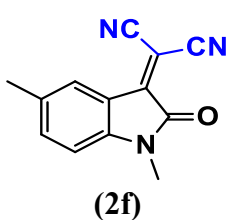
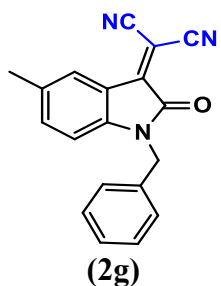
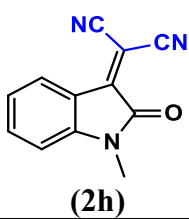
				
Entrada	R; R'	Produto	Tempo (min) ^b	Rendimento Isolado (%)
1	H; H	 (2a)	1	92
2	5-Cl; H	 (2b)	0,5	92

Tabela 5. (Continuação) Aplicação de variadas isatinas para obtenção de adutos de Knoevenagel derivados de isatina utilizando QPB-EDTA-72h como catalisador nas condições otimizadas.^a

3	5-Br; H		1	90
4	5-F; H		0,5	92
5	5-CH ₃ ; H		1	94
6	5-CH ₃ ; N-CH ₃		0,5	94
7	5-CH ₃ ; N-Benzil		1	88
8	H; N-CH ₃		0,5	94

^aCondições reacionais: isatina (1,0 mmol), malononitrila (1,0 mmol), 0,4 mL de EtOH:H₂O (3:7), 3 mg de QPB-EDTA-72h; ^bAs reações foram monitoradas por CCD até o desaparecimento da isatina.

De modo geral, as reações envolvendo isatina e seus derivados foram significativamente mais rápidas do que aquelas que utilizaram os aldeídos, além de apresentarem ótimos ou

excelentes rendimentos isolados (**Tabela 5**). As reações envolvendo isatinas substituídas por grupos retiradores de elétrons, como 5-Cloro e 5-Fluoro (entradas 2 e 4, **Tabela 5**) foram concluídas em um tempo mais curto que a reação da isatina sem substituinte (entrada 1, **Tabela 5**). Esses resultados podem ser justificados pela presença desses grupos de atração de elétrons que ativam a carbonila cetônica, favorecendo a formação dos produtos **2b** e **2d**. Em contrapartida, a reação envolvendo a isatina substituída pelo 5-Bromo (entrada 3, **Tabela 5**) apresentou tempo equivalente à reação sem substituinte (entrada 1, **Tabela 5**) ou substituída por grupo metila, doador de elétrons (entrada 5, **Tabela 5**), apontando uma possível diminuição da ativação da carbonila cetônica em decorrência da presença desses grupos. Em consequência, a formação dos produtos **2c** e **2e** foi sutilmente retardada.

Na presença de substituintes do anel aromático da isatina, bem como do nitrogênio da amida desse mesmo reagente, o comportamento não se distanciou do observado para as demais reações (entrada 6-8, **Tabela 5**). A reação envolvendo a 5-Metilisatina *N*-Metilada (entrada 6, **Tabela 5**) se mostrou mais rápida que a reação com a 5-Metilisatina (entrada 5, **Tabela 5**) e ocorreu no mesmo tempo que a reação com a isatina *N*-Metilada (entrada 8, **Tabela 5**). Esse comportamento indica que a substituição do nitrogênio não interfere na cinética da reação, bem como no rendimento isolado dos produtos **2e**, **2f** e **2h**. Entretanto, quando além de metilada no anel aromático a isatina foi *N*-Benzilada, houve um aumento do tempo e redução do rendimento, sendo o produto **2g** obtido em 1 minuto com 88% de rendimento (entrada 7, **Tabela 5**). Neste caso, a baixa solubilidade do substrato influencia não só no tempo da reação, como também no rendimento do produto.

Acredita-se que o organocatalisador heterogeneizado QPB-EDTA-72h funcione como um sistema bifuncional, combinando grupos básicos e ácidos em sua estrutura [24]. Os grupos amino residuais da estrutura polimérica atuam como sítios básicos, enquanto os grupos carboxílicos do EDTA funcionalizado atuam como sítios ácidos. Catalisadores bifuncionais têm sido amplamente estudados na literatura, mostrando-se eficazes e impulsionando avanços significativos em sínteses orgânicas [171-173]. Considerando esses aspectos, uma proposta mecanística foi elaborada e representada na **Figura 6**. De modo geral, na primeira etapa (I), um dos átomos de hidrogênio ácido da malononitrila é abstraído pelo grupo amino residual da estrutura do organocatalisador QPB-EDTA-72h para produzir um carbânion. Posteriormente, o átomo de hidrogênio polarizado do grupo carboxílico do EDTA ativa a carbonila da isatina para intensificar o caráter eletrofílico do carbono carbonílico, onde ocorre o ataque nucleofílico (II), gerando um intermediário tetraédrico. Na terceira etapa (III), este intermediário é protonado

pelo hidrogênio do grupo amino residual do organocatalisador. Em seguida, a desidratação do intermediário é novamente acelerada pelo organocatalisador heterogeneizado bifuncional (IV), onde ocorre a abstração do próton do carbono tetraédrico, gerando a ligação dupla C-C e causando a saída de água para obter o aduto de isatina desejado **2a**.

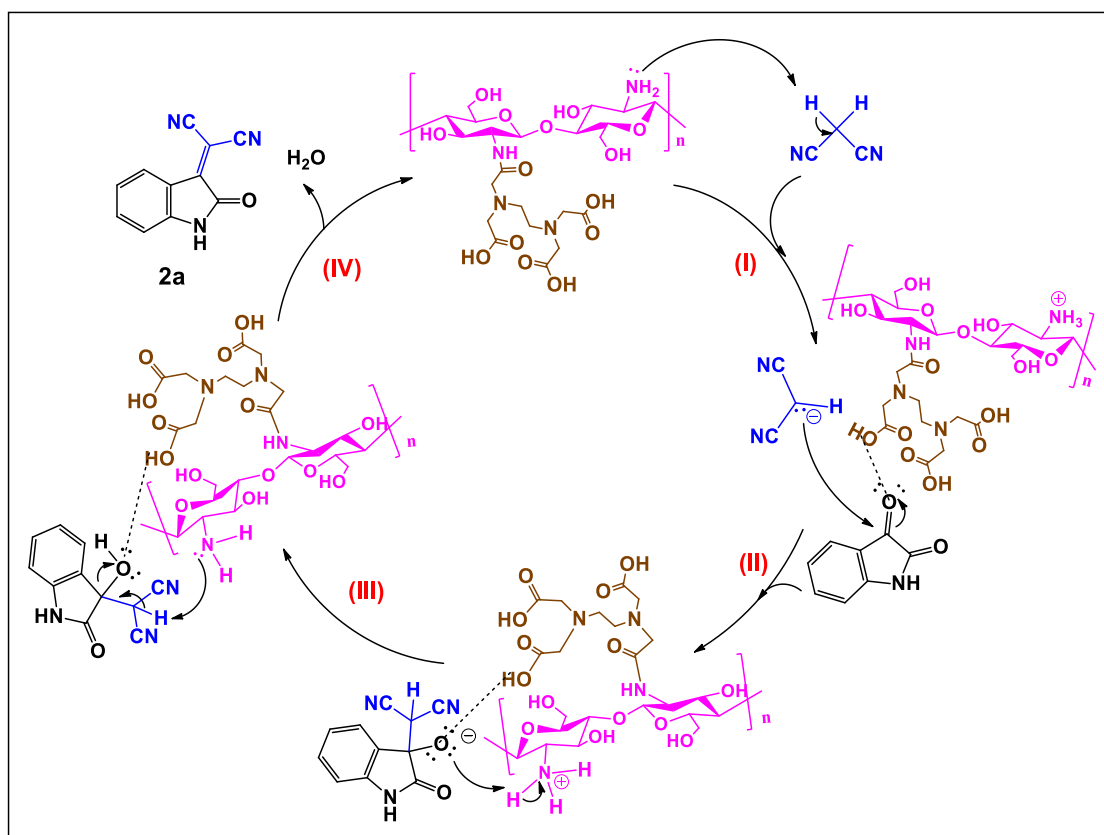


Figura 6. Mecanismo proposto para reação de síntese do aduto de isatina **2a** catalisada por QPB-EDTA-72h.

5.1.2 Estudo de reciclabilidade da QPB-EDTA-72h na reação de síntese do aduto de isatina **2a**

As características mais relevantes de um catalisador heterogêneo são a fácil separação do meio reacional e reutilização em novos ciclos. Assim, o organocatalisador QPB-EDTA-72h foi submetido a testes de reutilização na reação de síntese do aduto de isatina **2a**. Após o primeiro ciclo, o catalisador foi recuperado, tratado e seco para reutilização por até seis vezes. Durante os ciclos não houve perda significativa do rendimento isolado do composto **2a**, como mostrado na **Figura 7**. Os espectros de FT-IR do catalisador antes (**b**) e depois (**c**) do teste de reciclagem (seis vezes) não registrou alterações consideráveis das bandas (**Figura 8**). Além disso, não foram observadas bandas de vibração relacionadas ao produto **2a** (**d**) no espectro do catalisador após a recuperação por seis vezes (**c**). Esses resultados indicam que o catalisador

não sofre alterações químicas significativas ao longo das reações, mantendo sua função catalítica ativa e permitindo sua reciclagem nas reações de Knoevenagel.

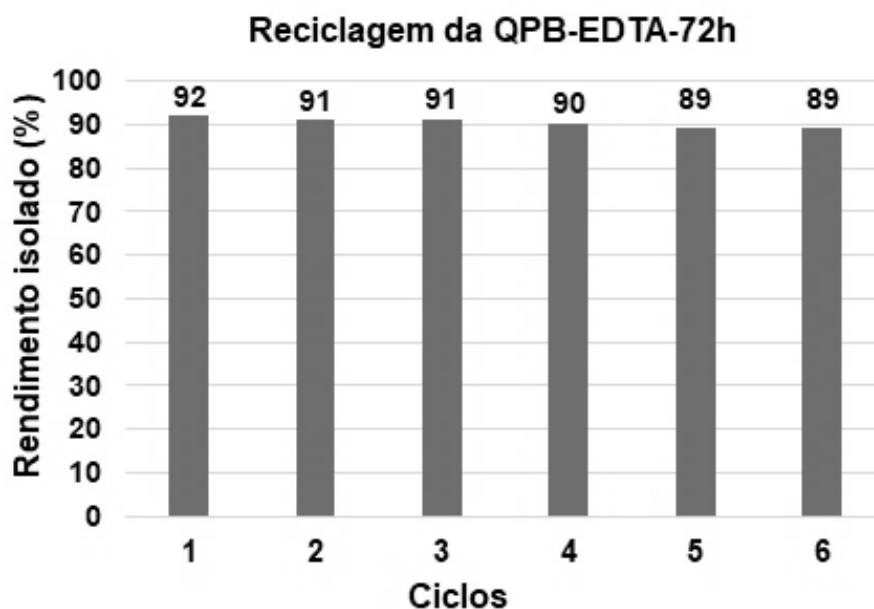


Figura 7. Desempenho de reciclagem da QPB-EDTA-72h na síntese do produto **2a**.

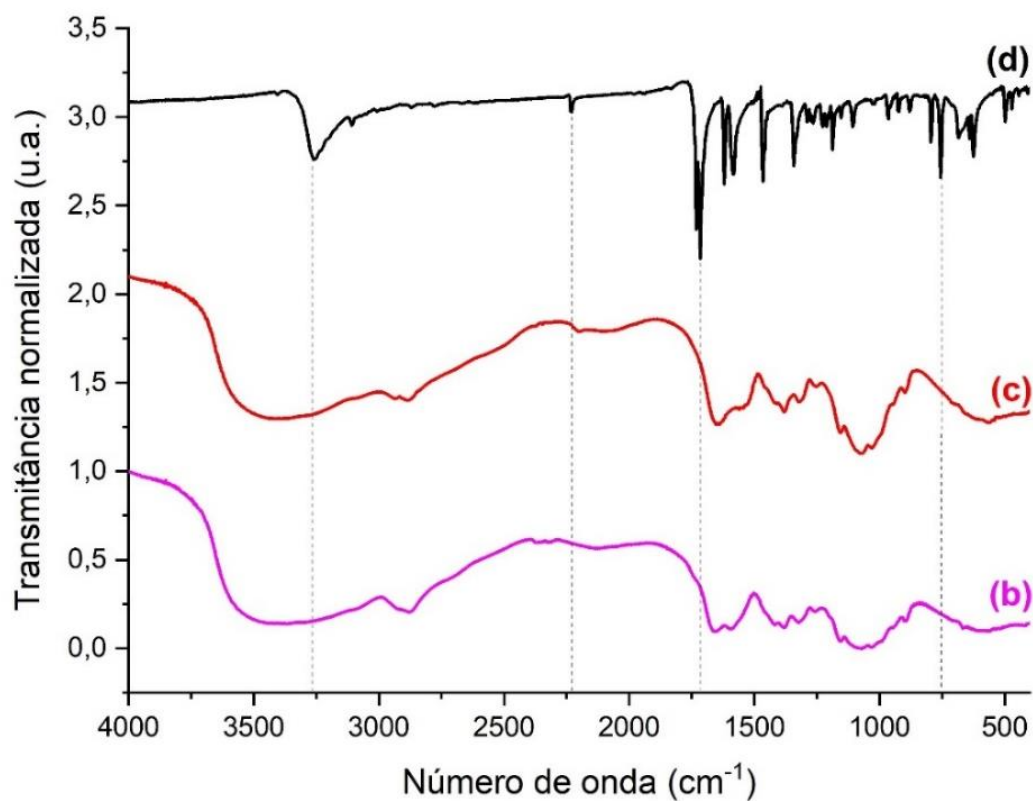


Figura 8. Espectros de FT-IR de QPB-EDTA-72h (b), QPB-EDTA-72h reutilizada (seis ciclos) (c) e produto **2a** (d).

5.1.3 Atividade larvícida frente *Aedes aegypti* com adutos de Knoevenagel derivados dos aldeídos aromáticos

Os testes *in vitro* com adutos de Knoevenagel derivados dos aldeídos aromáticos (**1a-l**) foram realizados através de experimentos de análise da atividade larvícida frente *Aedes aegypti* em 24 h. A triagem inicial se procedeu com concentração dos compostos em 500 ppm (**Figura 9**).

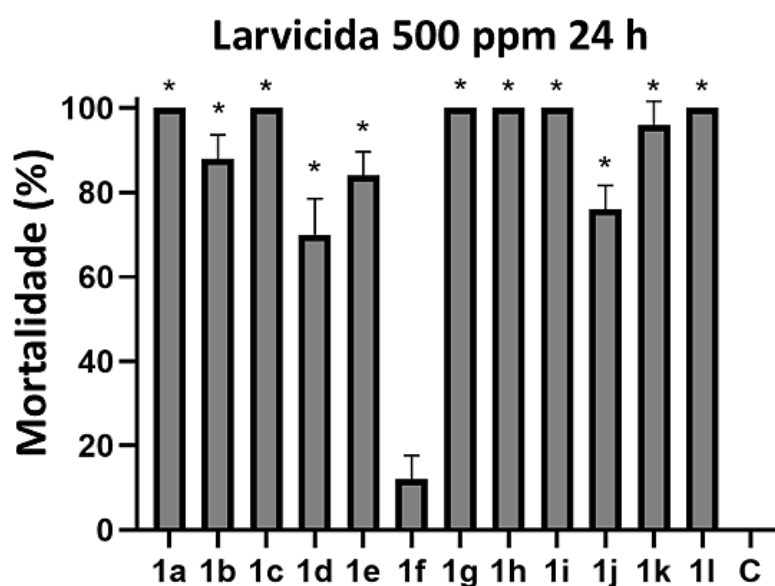


Figura 9. Atividade larvícida de diferentes adutos de Knoevenagel (**1a-l**) na concentração de 500 ppm contra larvas de *Aedes aegypti* após 24 h. C = Controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Considerando a concentração inicialmente testada (500 ppm), os adutos de Knoevenagel **1a**, **1c**, **1g-i** e **1l** apresentaram propriedades larvicidas promissoras, com porcentagem de mortalidade de 100% após 24 h de incubação (**Figura 9**). Dos compostos avaliados, o **1f** exibiu baixo perfil de atividade larvícida, com mortalidade de apenas 12%. Com porcentagens de 88, 70, 84, 76 e 98%, os compostos **1b**, **1d**, **1e**, **1j** e **1k**, respectivamente, se mostraram com boa atividade, porém, não foram considerados para os testes seguintes.

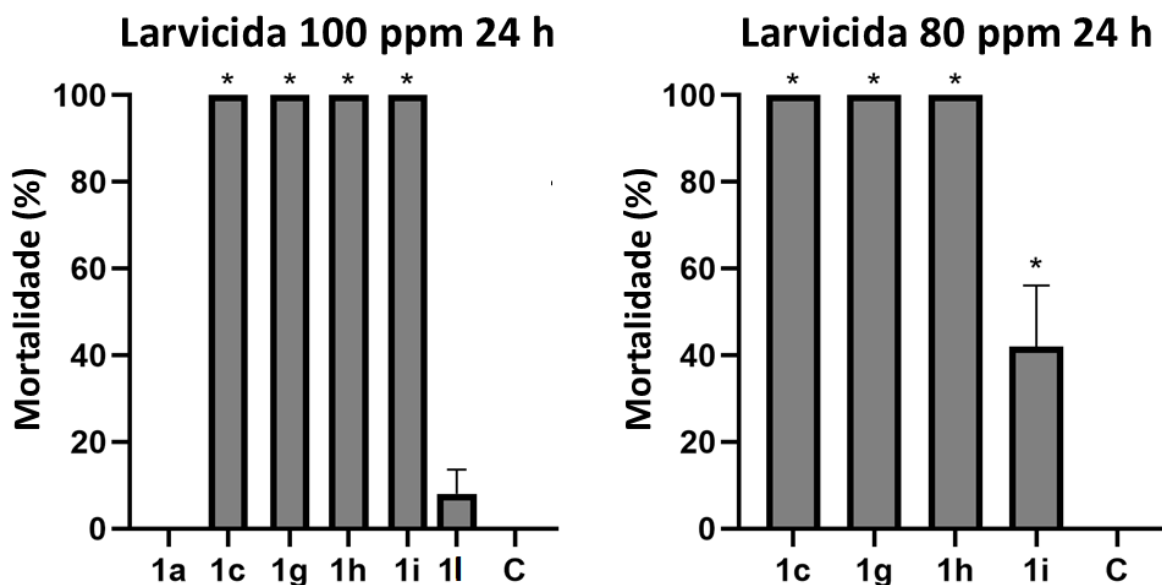


Figura 10. Atividade larvicida de diferentes adutos de Knoevenagel nas concentrações de 100 e 80 ppm em larvas de *Aedes aegypti* após 24 h. C = Controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após a redução em 5 vezes da concentração das soluções testadas (100 ppm), o aduto de Knoevenagel **1a** não apresentou atividade larvicida, enquanto o composto **1l** proporcionou a morte de apenas 8% das larvas de *Aedes aegypti*. Já os compostos **1c**, **1g-i** permitiram a mortalidade de 100% das larvas (**Figura 10**). A uma concentração de 80 ppm, o composto **1i** causou mortalidade em menos da metade das larvas após 24 h de incubação (42%), indicando que a redução da concentração de 100 para 80 ppm impacta significativamente o potencial larvicida desse composto. Em contrapartida, os adutos **1c**, **1g e 1h** apresentaram porcentagem larvicida elevada, atingindo 100% de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (**Figura 10**). Outras concentrações também foram avaliadas antes da determinação da concentração letal semimáxima (CL_{50}) dos adutos de Knoevenagel com maior potencial larvicida (**Figura 11**).

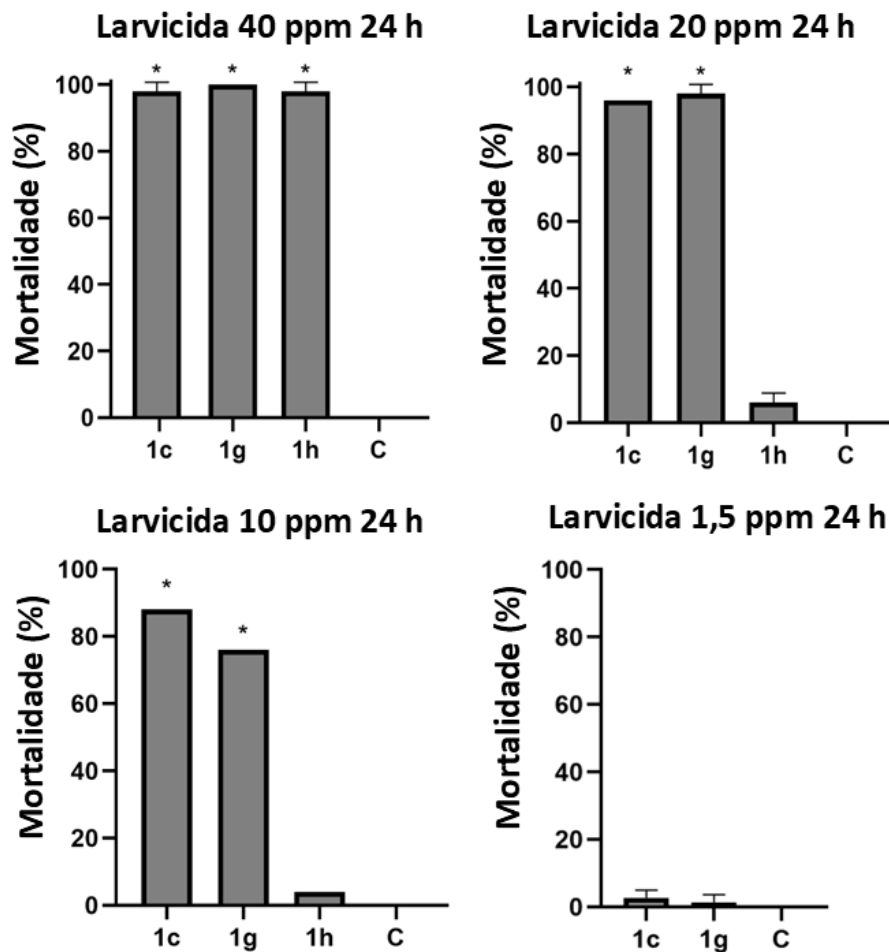


Figura 11. Atividade larvicida de diferentes adutos de Knoevenagel nas concentrações de 40, 20, 10 e 1,5 ppm em larvas de *Aedes aegypti* após 24 h. C = Controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A **Figura 11** mostra a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* após exposição aos adutos **1c**, **1g** e **1h** nas concentrações de 40, 20, 10 e 1,5 ppm, além do controle negativo. Na concentração de 40 ppm, observa-se uma mortalidade elevada em todos os tratamentos, alcançando 100% de mortes das larvas quando expostas ao aduto **1g** e 98% para **1c** e **1h**. Entretanto, ao reduzir a concentração para 20 ppm, a porcentagem de mortalidade cai significativamente para o composto **1h** (6%), enquanto os tratamentos com **1c** e **1g** continuam com mortalidade elevada (96% e 98%, respectivamente). Com a redução da concentração para 10 ppm, os adutos **1c** (88%) e **1g** (76%) ainda apresentam uma mortalidade alta, embora ligeiramente menor do que nas concentrações anteriores. No entanto, assim como observado no teste anterior, o tratamento com o aduto **1h** exibiu uma redução expressiva na mortalidade das larvas, sugerindo que, nas concentrações de 20 e 10 ppm, esse composto não é eficaz contra as larvas de *Aedes aegypti*. Na menor concentração testada (1,5 ppm), os compostos **1c** (2,6%) e **1g** (1,3%) apresentam mortalidade muito baixa, próxima à observada no controle negativo.

Considerando as semelhanças estruturais, a elevada atividade larvicida dos compostos **1c** (R = 4-NO₂) e **1g** (R = 3-OCH₃) pode ser explicada a partir de seus substituintes. Grupos fortemente retiradores de elétrons, como o –NO₂ em posição *para* (4-NO₂) no composto **1c**, frequentemente aumentam a potência biológica. Eles ampliam a polaridade molecular e favorecem interações eletrostáticas ou de ligação de hidrogênio com sítios de ligação de proteínas, além de sua posição *para* permitir maior deslocalização eletrônica pelo anel aromático e um arranjo espacial mais favorável para o encaixe no sítio ativo do alvo biológico [173, 174]. Por outro lado, o composto **1g**, substituído pelo grupo doador de elétrons em posição *meta* (3-OCH₃), aumenta a densidade eletrônica do anel, reforçando interações hidrofóbicas, embora a posição *meta* limite parcialmente os efeitos de ressonância em comparação a substituições em *orto* ou *para* [175, 176].

Resultados em consonância a estes foram observados nas análises de *docking* molecular e dinâmica molecular realizadas em parceria com o professor Dr. Marcus Tullius Scotti do Laboratório de Quimioinformática da UFPB com a enzima FKBP12 de *Aedes aegypti* (PDB: 3UQI) e detalhados em um dos nossos trabalhos (Material Suplementar – Artigo S2). Os dados obtidos evidenciaram a afinidade significativa de ambos os compostos pelo sítio ativo. O aduto **1g** apresentou o maior valor de probabilidade de atividade e afinidade superior até mesmo ao ligante co-cristalizado, estabelecendo interações π – π empilhado e π –alquil com resíduos chave como Ile57 (Isoleucina), Trp60 (Tryptofano), Phe47 (Fenilalanina), Val56 (Valina) e Phe100 (Fenilalanina), responsáveis pela estabilidade do sítio ativo. Já o aduto **1c** mostrou perfil de interação semelhante, também envolvendo o anel aromático, mas com contribuição adicional do grupo nitro, que modulou as interações eletrostáticas (Figura 12).

As simulações de dinâmica molecular mostraram que o composto **1c** manteve interações mais estáveis com FKBP12 ao longo de 100 ns, apresentando valores de Desvio Quadrático Médio da Raiz (do inglês *Root Mean Square Deviation* – RMSD) (0,35 nm) comparáveis ao ligante de referência e superiores ao aduto **1g**, que exibiu maior instabilidade conformacional. A análise energética revelou predomínio das contribuições de van der Waals (Lennard-Jones) para ambos os adutos, reforçando o papel das interações hidrofóbicas e π -sistema no reconhecimento molecular. Em conjunto, esses resultados evidenciam que tanto a natureza eletrônica (retirador ou doador de elétrons) quanto a posição dos substituintes modulam a distribuição eletrônica e o perfil de interação dos adutos de Knoevenagel, explicando o desempenho larvicida superior desses compostos contra *Aedes aegypti*. A partir desses dados, a CL₅₀ dos adutos de Knoevenagel **1c** e **1g** foram determinadas (Figura 13).

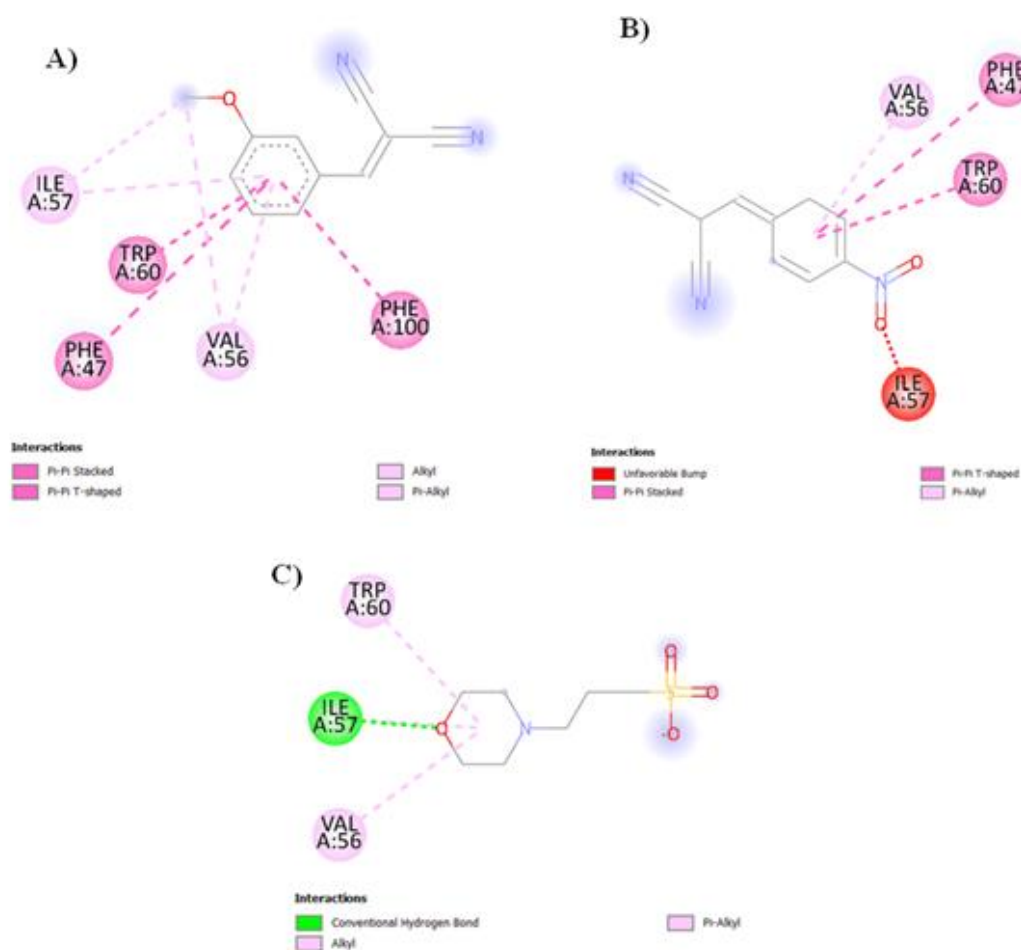


Figura 12. Interações 2D entre o aduto Knoevenagel **1g** (A), o aduto Knoevenagel **1c** (B) e o ligante PDB (C) com o alvo FKBP12 do *Aedes aegypti* (PDB: 3UQI).

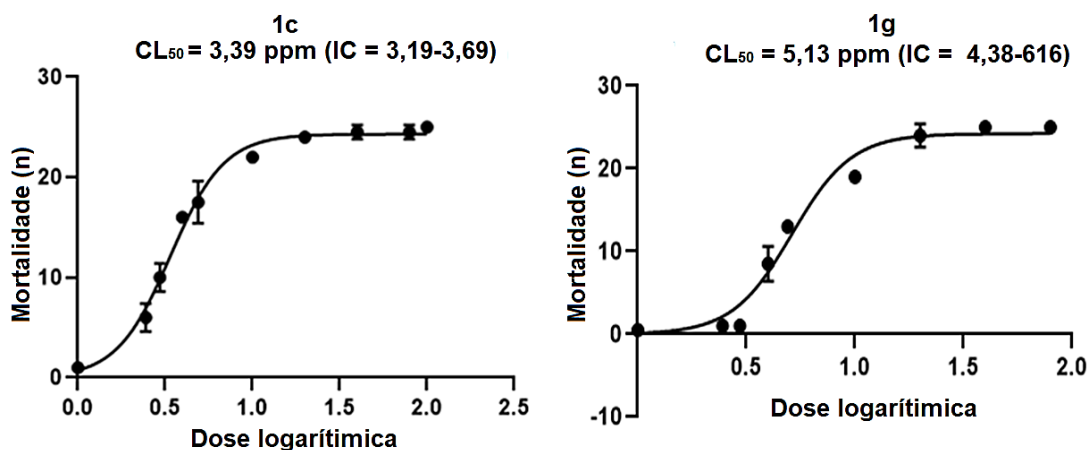


Figura 13. Concentração letal semimáxima dos adutos de Knoevenagel **1c** e **1g** contra larvas de *Aedes aegypti* em estágio quatro após 24 h de exposição. IC = Intervalo de confiança.

O ajuste dos dados à curva sigmoideal, representando a curva dose-resposta em escala logarítmica, permitiu a determinação da CL_{50} para os adutos de Knoevenagel (**Figura 13**). O composto **1c** apresentou uma CL_{50} de 3,39 ppm, enquanto o composto **1g** exibiu uma CL_{50} de

5,13 ppm. Esses valores refletem a elevada capacidade larvicida dos adutos em baixas concentrações, evidenciando seu potencial como agentes de controle de larvas de *Aedes aegypti*. A eficácia em doses reduzidas sugere que esses compostos podem contribuir para o desenvolvimento de novos larvicidas, promovendo eficiência com impacto ambiental minimizado. No trabalho de Vilvest e colaboradores (2024) [177], os autores demonstraram que o andrographolide extraído de *Andrographis paniculata* possui ação larvicida eficaz contra estágios imaturos de *Aedes aegypti*, com uma CL_{50} de 2,02 ppm em 24 h.

Em outra pesquisa, nanopartículas de prata sintetizadas com *Aspergillus fumigatus* também exibiram elevada atividade larvicida, com uma CL_{50} de 2,624 ppm. Esses resultados indicam que *Aspergillus fumigatus* pode facilitar a produção sustentável de nanopartículas larvicidas, oferecendo uma abordagem inovadora para o controle de vetores sem danos aos organismos não-alvo do mesmo ecossistema [178]. Outro exemplo interessante de potencial larvicida é o complexo de β -CD com óleo essencial de *Lippia gracilis* (LGEO). Galvão e colaboradores (2018) [179] observaram que esse complexo apresentou uma CL_{50} de 33 ppm, comparada a 39 ppm do LGEO puro, indicando que a complexação com β -CD aumentou sua eficácia larvicida.

Os hemócitos encontrados na hemolinfa de *Aedes aegypti* foram quantificados e a prevalência de cada tipo em contato com os adutos de Knoevenagel testados foi mostrado na Figura 14.

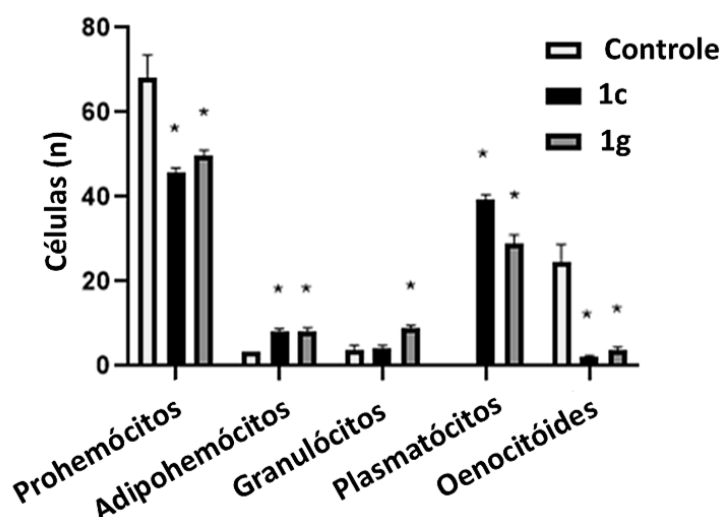


Figura 14. Hemócitos presentes na hemolinfa larval de *Aedes aegypti* após exposição aos adutos 1c, 1g e controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Cinco tipos diferentes de hemócitos foram identificados, sendo classificados em prohemócitos e plasmatócitos em maior quantidade, enquanto os adipohemócitos, glanulócitos e oenocitóides se apresentaram em quantidade menos expressiva (**Figura 14**). A partir dos resultados, observou-se que os adutos **1c** e **1g** exercem um efeito notável sobre o sistema imunológico, alterando a composição celular dos hemócitos e sugerindo um impacto direto na resposta imune e metabólica das larvas [180, 181].

Os prohemócitos, que no controle negativo representam a maior parte das células (68,2%), sofreram uma redução considerável após a exposição aos adutos **1c** e **1g**, com os níveis caindo para 45,9 e 49,7%, respectivamente. Como essas células são imaturas e dão origem a outros tipos de hemócitos, a diminuição observada pode indicar que as substâncias testadas interferem na diferenciação celular ou causam estresse que compromete tanto a produção quanto a sobrevivência dos prohemócitos. Esse efeito sugere que as larvas podem ter dificuldades em manter uma população equilibrada de células imunes maduras em resposta a exposição aos adutos de **1c** e **1g**, o que prejudica sua capacidade de resposta imunológica [182, 183].

Outro efeito observado foi um significativo aumento dos adipohemócitos em ambas as exposições (8,3 e 8,7% para **1c** e **1g**, respectivamente) quando comparado ao controle negativo (3,4%). Os adipohemócitos estão envolvidos no armazenamento de nutrientes e na regulação do metabolismo e o aumento na sua proporção pode refletir uma mobilização de reservas energéticas em resposta ao estresse provocado pela exposição a **1c** e **1g**. Esse comportamento é possivelmente uma adaptação das larvas para sustentar a maior demanda energética causada por uma resposta imunológica intensa ou para compensar os danos celulares [184].

As substâncias também parecem induzir um leve aumento dos granulócitos, atingindo 4,26% e 8,2% para **1c** e **1g**, respectivamente, mas correspondendo a 3,6% dos hemócitos no controle negativo. Além disso, observou-se uma diminuição significativa dos oenocitóides, que no controle representam 24,4% dos hemócitos, mas caíram para 2,2% e 3,9% após a exposição a **1c** e **1g**, respectivamente. A ausência de plasmatócitos no grupo controle e seu aumento significativo após a exposição aos adutos **1c** (39,2%) e **1g** (29,1%) indicam uma ativação imunológica importante. Como esses hemócitos são fagocíticos e participam da defesa contra patógenos, o aumento expressivo sugere que as larvas acionam uma resposta imune em resposta à toxicidade ou ao estresse das substâncias, como uma forma de defesa. Esse aumento dos plasmatócitos reforça a ideia de que o sistema imunológico das larvas está sendo ativado em resposta aos adutos avaliados. [Fernandes e colaboradores \(2020\) \[185\]](#) também observaram

esse comportamento quando a hemolinfa larval foi exposta a *Helicteres velutina* em diclorometano e seu composto isolado bruto, 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona, exibindo plasmatócitos em 7,4 e 13,1%, respectivamente, na hemolinfa após em 24 h. Os autores relacionaram esses resultados à atividade necrosante que *Helicteres velutina* exerce sobre hemócitos. A concentração de hemócitos totais presentes na hemolinfa larval de *Aedes aegypti* exposta aos adutos **1c**, **1g** e controle negativo também foram avaliados (**Figura 15**).

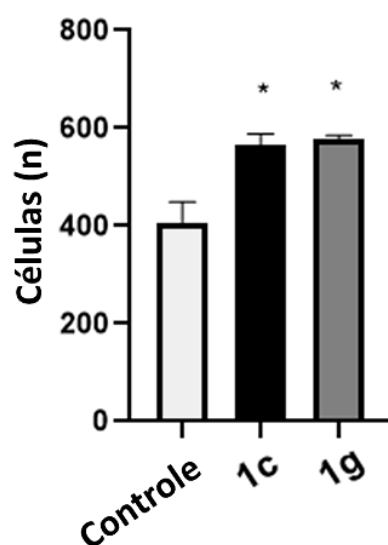


Figura 15. Hemócitos totais presentes na hemolinfa larval de *Aedes aegypti* após exposição aos adutos **1c**, **1g** e controle negativo após 24 h. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados obtidos da análise de hemócitos totais sugerem que tanto o aduto **1c** quanto o **1g** induzem um aumento significativo na proliferação celular nos hemócitos das larvas de *Aedes aegypti* comparado ao controle negativo (**Figura 15**). O aumento de 39,8% na concentração total de hemócitos para a exposição ao aduto **1c** e de 42,6% para **1g** indicam uma resposta ativa das larvas para lidar com o estresse imposto por essas substâncias. Embora o aumento de hemócitos tenha sido ligeiramente maior quando a hemolinfa foi exposta ao composto o **1g**, é possível sugerir que esse aduto pode desencadear uma resposta imune mais intensa contra as larvas de *Aedes aegypti* em comparação ao aduto **1c**.

Cerri e colaboradores (2023) [186] também observaram um aumento na concentração total de hemócitos nas primeiras 24 h após a injeção de saliva bruta de carrapatos fêmeas (*Amblyomma cajennense*) no mosquito de *Aedes aegypti*. Os autores justificaram esses resultados indicando que a saliva do carrapato induz um efeito excitatório precoce na atividade dos hemócitos do mosquito transmissor de várias arboviroses. Em contrapartida, Bitencourt e

colaboradores (2023) [182] identificaram uma redução das concentrações totais de hemócitos quando as larvas de *Aedes aegypti* foram expostas por imersão a blastosporos ou conídios de *Beauveria bassiana* CG 206 após 24 h. Essa interação do fungo infectante com as larvas do mosquito ocorreu principalmente pelo intestino médio, sendo a presença de propágulos fúngicos os responsáveis pelo estímulo a resposta celular.

A análise da produção de óxido nítrico (NO) também foi avaliada a fim de identificar o possível mecanismo de ação dos adutos na morte das larvas *Aedes aegypti* e os resultados obtidos foram expressos na **Figura 16**.

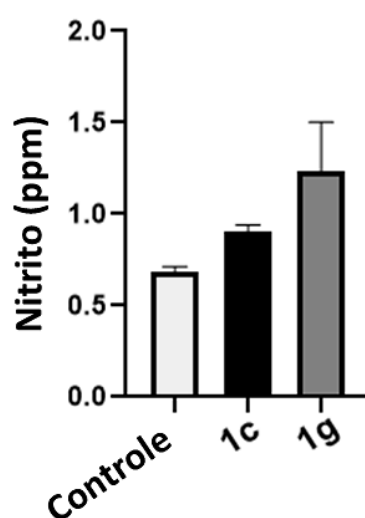


Figura 16. Produção de NO na hemolinfa larval de *Aedes aegypti* exposta aos adutos **1c**, **1g** e controle negativo. (*) estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. Barras com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A partir da análise da produção de NO, notou-se que a exposição das larvas de *Aedes aegypti* ao **1c** e **1g** não alterou significativamente os níveis de NO na hemolinfa (**Figura 16**). Esse resultado sugere que essas substâncias não influenciam na produção de NO, apesar das mudanças na composição e no número total de hemócitos. O NO é uma molécula sinalizadora frequentemente envolvida em respostas imunes e em processos de defesa contra patógenos. Em muitos organismos, um aumento no NO pode indicar uma resposta ao estresse oxidativo ou uma tentativa de neutralizar patógenos [187, 188]. Contudo, a ausência de alteração nos níveis de NO após a exposição aos adutos **1c** e **1g** sugere que esses compostos não desencadeiam uma resposta de NO na defesa imunológica das larvas.

Nunes e colaboradores (2015) [189] observaram uma diminuição na produção de NO pelas larvas de *Aedes aegypti* quando expostas ao extrato bruto de *Agave sisalana* após 24 h. Os autores justificaram esse resultado, sugerindo que a *Agave sisalana* era capaz de provocar

um efeito inibitório na via do óxido nítrico, possivelmente inibindo a enzima NO sintase. Em outro estudo, a concentração de NO na hemolinfa também foi significativamente maior para a fração analisadas na presença de *Helicteres velutina* em diclorometano e seu composto isolado bruto, 7,4'-di-*O*-metil-8-*O*-sulfato flavona após 24 h de exposição [185].

O ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina* forneceu informações preliminares sobre os possíveis efeitos dos compostos testados (**1c** e **1g**) em organismos não alvos. Após 24 horas de exposição, foi observada mortalidade de 100% em ambas as concentrações (20 e 40 ppm), enquanto nenhum óbito ocorreu nos grupos controle. Embora isso sugira algum nível de toxicidade, esses achados não necessariamente impedem o uso seguro dos compostos, pois estratégias adequadas de aplicação podem minimizar os riscos potenciais. Estudos ecotoxicológicos adicionais são necessários para compreender melhor seu impacto ambiental e explorar formulações ou métodos de aplicação mais seguros, que reduzam os efeitos sobre espécies não alvo, mantendo a eficácia contra larvas de *Aedes aegypti*.

5.1.4 Atividade antileishmania *in vitro* dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina

Testes *in vitro* com adutos de Knoevenagel derivados de isatina (**2a-h**) foram realizados por meio de experimentos analisando inicialmente a atividade antipromastigota de *Leishmania infantum*. Na triagem molecular, conduzida em dois experimentos em duplicata com os adutos de Knoevenagel derivados de isatina, a concentração inicial foi de 400 μM , seguida de uma diluição serial até 3,125 μM . A partir disso, foi calculado a CI_{50} primária, que foi usado como parâmetro para selecionar quais compostos seriam usados em testes subsequentes, sendo o ponto de corte da CI_{50} estabelecido em 20 μM (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração inibitória semimáxima (CI_{50}) do crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum* tratados com adutos de Knoevenagel derivados de isatina e **AmB** como controle positivo.

Aduto de isatina	CI_{50} (μM) (IC)	Aduto de isatina	CI_{50} (μM) (IC)
2a	65,4 (53,73 – 80,38)	2e	32,05 (15,31 – 66,19)
2b	15,5 (10,17 – 23,36)	2f	76,65 (58,12 – 102,9)
2c	18,38 (9,82 – 31,92)	2g	12,7 (7,5 – 20,49)
2d	27,38 (12,46 – 53,04)	2h	59,17 (41,19 – 87,43)
AmB	0,87 (0,56 a 1,41)	AmB	0,87 (0,56 a 1,41)

Os dados representam a média de dois experimentos independentes em duplicata de promastigotas de *Leishmania infantum* (CI_{50}). IC indica o intervalo de confiança dos valores de CI_{50} calculados.

Na **Tabela 6**, os adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2a**, **2d-f** e **2h** mostraram citotoxicidade em formas promastigotas com altos valores de CI_{50} primária. Apenas os adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2b**, **2c** e **2g** mostraram uma CI_{50} primária abaixo de 20 μ M (**Tabela 6**). Portanto, os testes subsequentes aumentaram o número de experimentos de atividade antipromastigota para três, cada um realizado em triplicata, começando em uma concentração de 100 μ M e diluído em série para 0,78 μ M. Essa abordagem permitiu uma determinação mais precisa dos valores de CI_{50} para os compostos **2b**, **2c** e **2g** (**Figura 17**).

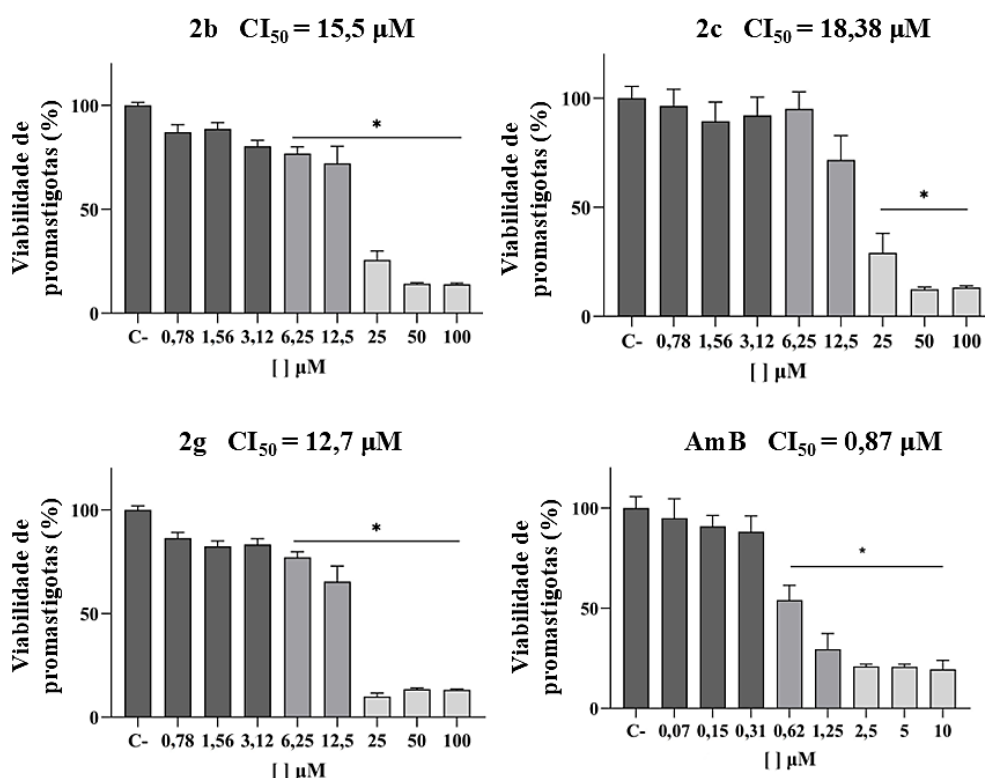


Figura 17. Curva de viabilidade celular de formas promastigotas de *Leishmania infantum* na presença de **2b**, **2c**, **2g** e **AmB**. Valor de p: $p < 0,05$ (*).

Na **Figura 17**, pode-se observar que os compostos **2b** ($R = 5\text{-Cl}$; $R' = \text{H}$), **2c** ($R = 5\text{-Br}$; $R' = \text{H}$) e **2g** ($R = 5\text{-CH}_3$; $R' = N\text{-benzil}$) apresentaram inibição de mais de 50% da forma promastigota nas concentrações de 25, 50 e 100 μ M, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Os dados de CI_{50} dos compostos **2b** e **2c** sugerem que os substituintes $-\text{Cl}$ e $-\text{Br}$ podem contribuir para a atividade antiparasitária em comparação ao composto não substituído **2a** (**Tabela 6**). Estudos anteriores mostraram que halogênios (como $-\text{Cl}$ e $-\text{Br}$) ajudam a aumentar a atividade antipromastigota. O grupo $N\text{-benzil}$ no composto **2g** favoreceu a atividade de citotoxicidade com um efeito lipofílico positivo [190, 191], resultando em uma CI_{50} menor em comparação com seu análogo não $N\text{-benzilado}$ **2e**

(**Tabela 6**). A redução da concentração desses compostos de 12,5 para 0,78 μM diminuiu sua eficácia contra os parasitas. **AmB** (fármaco de referência) exibiu considerável atividade antileishmania, atingindo aproximadamente 75% de inibição da forma promastigota em concentrações de 2,5, 5 e 10 μM . Mesmo quando a concentração foi reduzida para 1,25 μM , o fármaco de referência manteve a inibição de mais de 50% (**Figura 17**). O aduto de Knoevenagel derivados de isatina **2g** foi o composto que mais reduziu a viabilidade celular de células promastigotas no ensaio. Estudos anteriores sobre a atividade antileishmania de derivados de isatina (derivados de amina aromática *N*-alquil-isatina-3-imino) produziram resultados promissores na forma promastigota de *Leishmania major* em concentração micromolar [192].

Simulações de *docking* molecular e dinâmica molecular com a enzima *Tripanotona reductase* de *Leishmania infantum* (PDB: 5EBK) foram realizadas em parceria com o professor Dr. Marcus Tullius Scotti do Laboratório de Quimioinformática da UFPB e detalhadas em um dos nossos trabalhos (**Material Suplementar – Artigo S3**). Com bases nos dados obtidos, os adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2b**, **2c** e **2g** apresentaram valores de energia de ligação negativos, indicando interação favorável com o alvo. O composto **2g** destacou-se com afinidade superior ($-77,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), estabelecendo ligação de hidrogênio com o resíduo Ser470 (2,28 Å) e interações hidrofóbicas com resíduos catalíticos como His461 e Cys52, sugerindo maior potencial inibitório. Já os compostos **2b** e **2c** exibiram energias de $-50,9$ e $-50,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente, ambos interagindo com o resíduo His461 e reforçando o papel dos substituintes halogênicos em favorecer contatos hidrofóbicos no sítio ativo.

A **Figura 18** destaca as principais interações moleculares, incluindo ligações de hidrogênio convencionais (verde-escuro), ligações carbono-hidrogênio (verde-claro), interações hidrofóbicas, como alquila e π -alquila (rosa-claro), interações em forma de T π - π (rosa-escuro), contatos π -enxofre (amarelo) e interações π -ânion (laranja). Os principais resíduos que interagem incluem Ser (Serina), Pro (Prolina), Leu (Leucina), His (Histidina), Cys (Cisteína), Val (Valina), Glu (Ácido glutâmico), Thr (Treonina) e Asn (Asparagina).

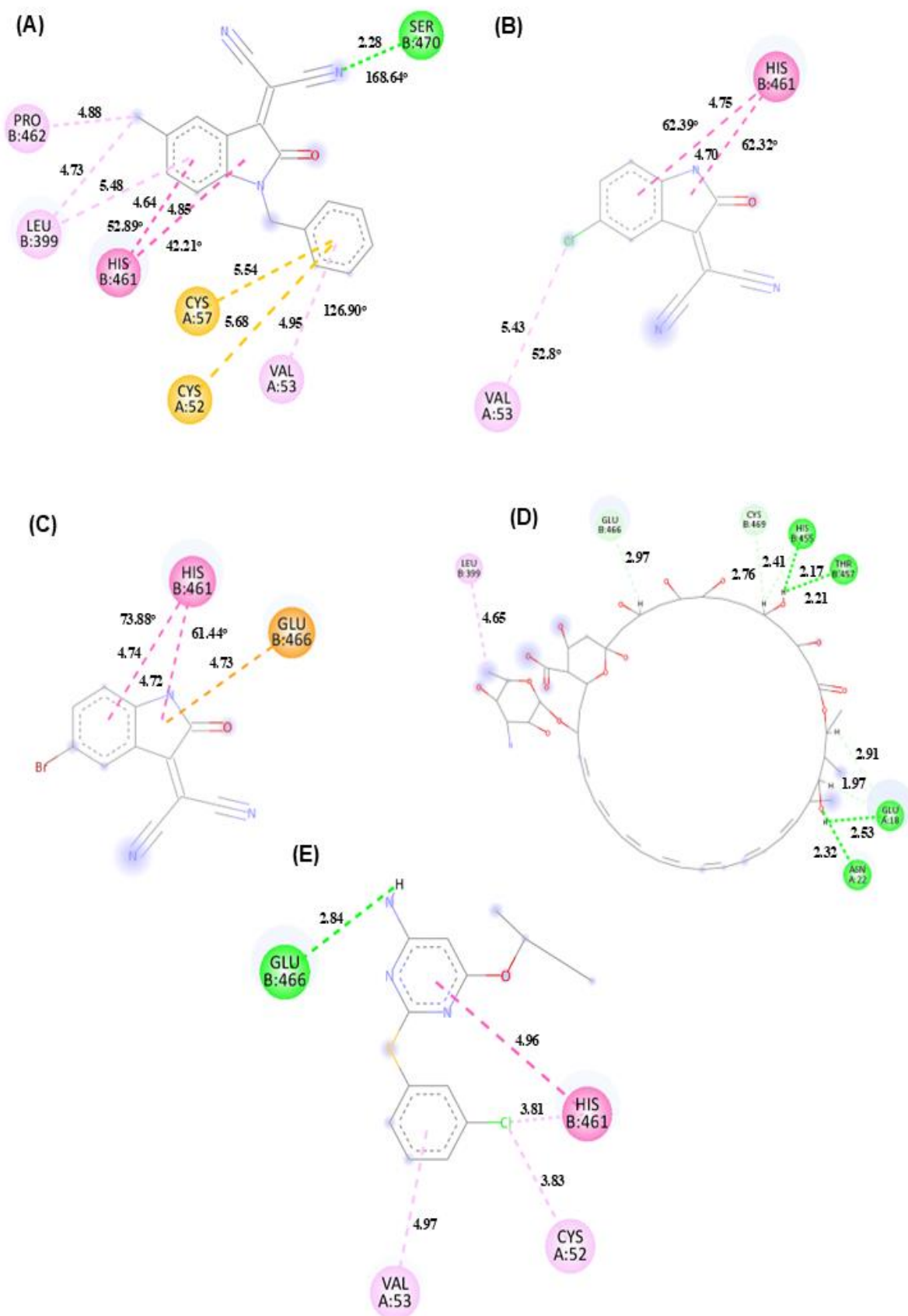


Figura 18. Mapas de interação 2D dos compostos **2g** (A), **2b** (B), **2c** (C), **AmB** (D) e do ligante co-cristalizado PDB (E) com *Tripanotonia reductase* de *Leishmania infantum* (PDB: 5EBK).

As simulações de dinâmica molecular confirmaram que os complexos formados por **2b** e **2g** permaneceram estáveis ao longo de 100 ns, com valores de RMSD entre 1,5–2,0 Å, enquanto o composto **2c** apresentou maiores flutuações locais, sugerindo menor estabilidade conformacional. A análise de energia livre (MM/PBSA) reforçou esse padrão. O aduto de isatina **2b** exibiu o valor mais favorável ($-150,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), seguido por **2g** ($-119,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), enquanto **2c** apresentou estabilização menos pronunciada ($-20,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Esses resultados demonstram que a presença de halogênios em **2b** e **2c**, assim como o grupo *N*-benzil em **2g**, não apenas modulam a atividade biológica observada *in vitro*, mas também conferem interações moleculares mais estáveis e energeticamente favoráveis com a *Tripanotiona redutase*, validando o papel estrutural desses substituintes na atividade antipromastigota.

Os adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2b**, **2c**, **2g** e **AmB** também foram testados na forma amastigota axênica de *Leishmania infantum* para determinar a CE_{50} (Figura 19 e Tabela 7).

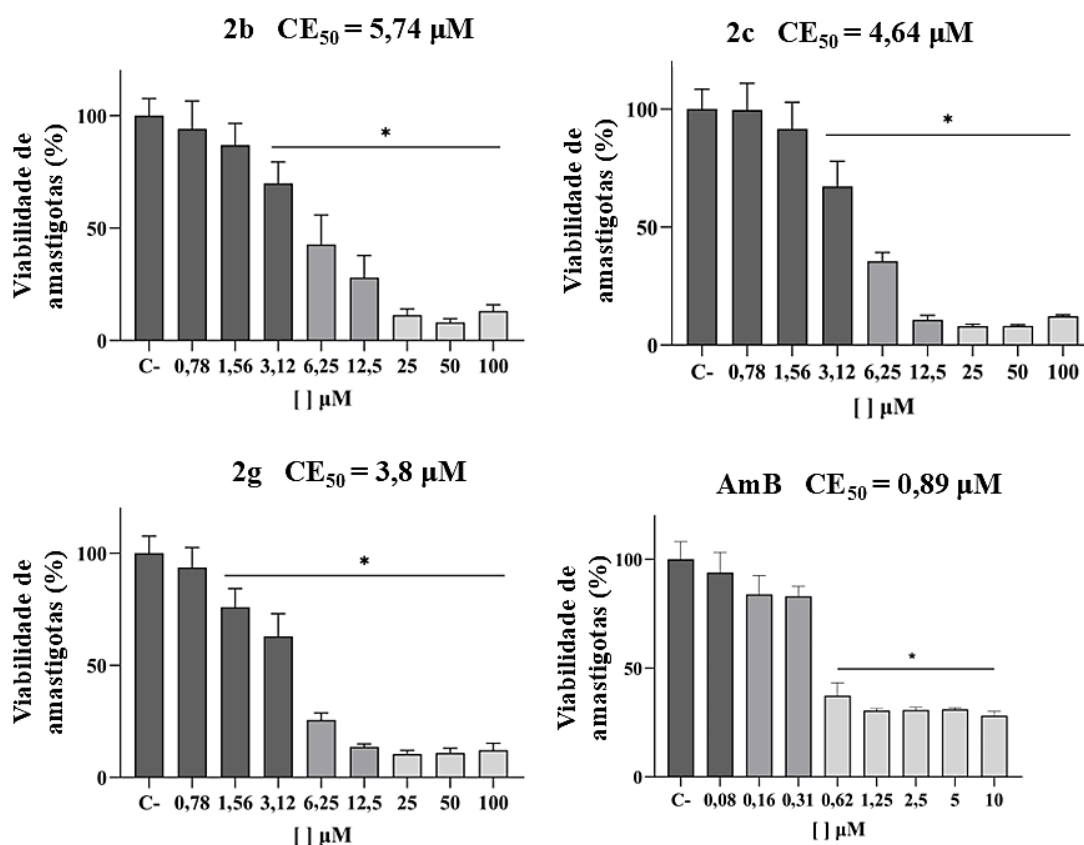


Figura 19. Curva de viabilidade celular da forma amastigota axênica de *Leishmania infantum* na presença de **2b**, **2c**, **2g** e **AmB**. Valor de $p < 0,05$ (*).

Tabela 7. Concentração efetiva semimáxima (CE₅₀) do crescimento amastigota axênico de *Leishmania infantum* tratado com adutos de Knoevenagel derivados de isatina, **AmB** como controle positivo, citotoxicidade em hemácias humanas (CH₅₀) e índice de seletividade (IS).

Aduto de isatina	CE ₅₀ (μM) (IC)	CH ₅₀ (μM)	IS
2b	5,74 (4,7 – 7,03)	>100	>17,42
2c	4,64 (3,8 – 5,68)	>100	>21,55
2g	3,8 (2,9 – 5,01)	>100	>26,31
AmB	0,89 (0,43 – 2,11)	193,4 (156,6 – 244,6)	217,3

Os dados representam a média de três experimentos independentes conduzidos em triplicata com amastigotas de *Leishmania infantum* tratados com adutos de Knoevenagel derivados de isatina e anfotericina B como controle positivo, bem como índice de citotoxicidade de hemácias (CH₅₀) e seletividade (IS = CH₅₀/CE₅₀).

Os adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2b**, **2c** e **2g** apresentaram citotoxicidade na forma amastigota axênica acima de 50% nas concentrações de 6,25 a 100 μM com diferença estatística em relação ao controle negativo (**Figura 19** e **Tabela 7**). A partir dos resultados nas duas formas de *Leishmania infantum*, nota-se que os adutos de Knoevenagel derivados de isatina apresentam maior inibição da forma amastigota axênica em comparação à forma promastigota. Em contraste, [Khatoon e colaboradores \(2021\) \[193\]](#) observaram menor inibição para a forma amastigota axênica ao estudar compostos híbridos de cumarina-isatina contra *Leishmania tropica*. A **AmB** apresentou valor de CE₅₀ de 0,89 μM, com porcentagem de inibição maior que 50% nas concentrações iguais ou maiores que 0,62 μM (**Figura 19** e **Tabela 7**).

A citotoxicidade dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2b**, **2c** e **2g** foi avaliada em eritrócitos de humanos saudáveis. No teste (**Tabela 7**), que avalia a capacidade hemolítica (CH₅₀) desses compostos nas concentrações utilizadas anteriormente contra hemácias humanas, os compostos **2b**, **2c** e **2g** apresentam CH₅₀ semelhante ao do controle negativo. Ou seja, na maior concentração testada (100 μM), nenhum dos compostos foi tóxico para hemácias humanas. Consequentemente, o IS para os compostos é superior a 17,42, 21,55 e 26,31 para **2b**, **2c** e **2g**, respectivamente. Entretanto, **AmB**, que tem citotoxicidade conhecida (CH₅₀ equivalente de 193,4 μM), apresentou um IS equivalente a 217,3. Porém, a descoberta de novos agentes terapêuticos potenciais para o tratamento da leishmaniose ainda é necessária, considerando os efeitos adversos oriundos do uso desse medicamento.

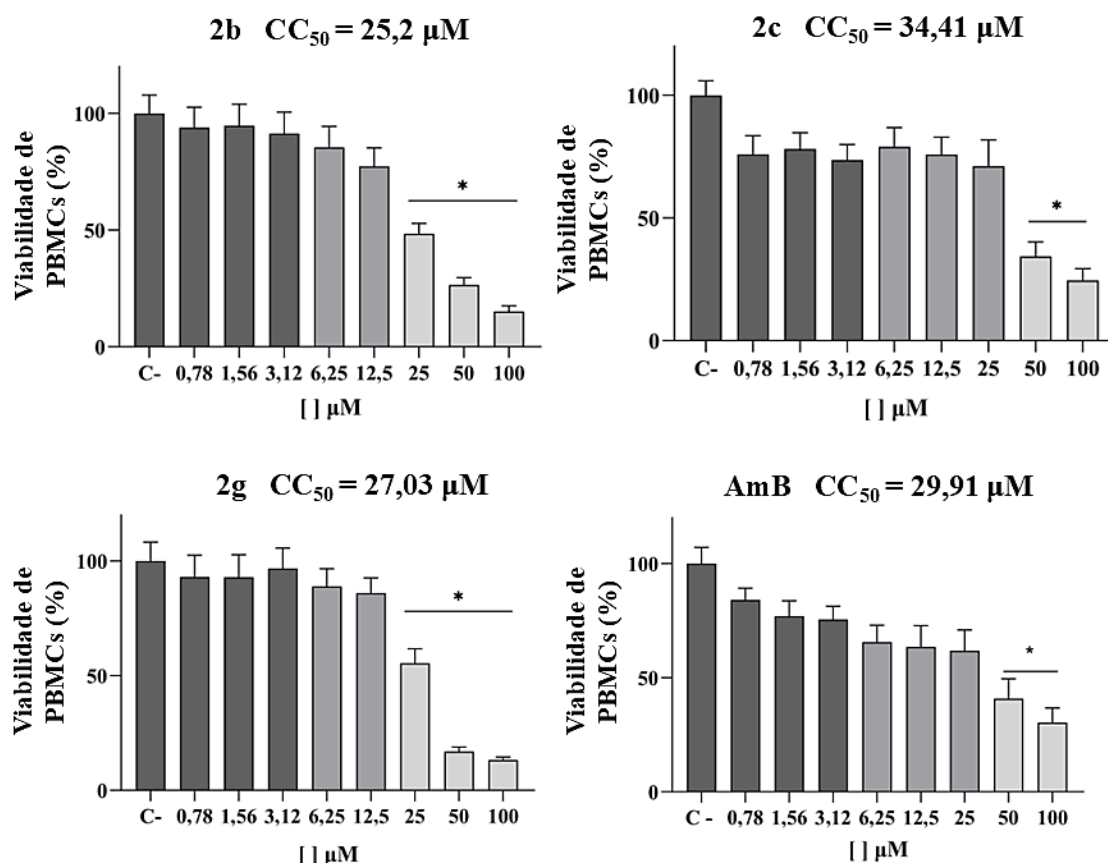


Figura 20. Curva de viabilidade de PBMCs na presença dos compostos testados **2b**, **2c**, **2g** e substância controle (**AmB**). Valor de $p < 0,05$ (*).

Tabela 8. Concentração efetiva semimáxima (CE_{50}) de amastigotas axênicas tratadas com adutos de Knoevenagel derivados de isatina **2b**, **2c**, **2g** e **AmB** como controle positivo, citotoxicidade em PBMC (CC_{50}) e índice de seletividade (IS).

Aduto de isatina	CE_{50} (μM) (IC)	CC_{50} (μM) (IC)	IS
2b	5,74 (4,7 - 7,03)	25,2 (21,8 - 29,16)	4,39
2c	4,64 (3,8 - 5,68)	34,41 (14,89 - 63,5)	7,42
2g	3,8 (2,9 - 5,01)	27,03 (22,3 - 32,75)	7,11
AmB	0,89 (0,43 - 2,11)	29,91 (19,1 - 53,4)	33,6

IS = CC_{50}/CE_{50} .

Ensaio de PBMCs com o composto **2g** mostraram inibição maior que 50% em concentrações de 50 e 100 μM , com CC_{50} de 27,03 μM e um IS de 7,11 (**Figura 20** e **Tabela 8**). Um resultado semelhante foi observado para o composto **2b**, que exibiu baixa citotoxicidade para PBMCs humanos, mas com menor IS (IS = 4,39 e CC_{50} = 25,2 μM). O composto **2c** mostrou o maior CC_{50} (34,41 μM), resultando em um IS de 7,42. Por outro lado, a **AmB** demonstrou citotoxicidade comparável aos adutos de Knoevenagel derivados de isatina, com

inibição maior que 50% em concentrações de 50 e 100 μM e CC_{50} de 29,91 μM (**Figura 20**). Entretanto, seu IS foi maior devido ao seu baixo valor de CE_{50} (0,89 μM) (**Tabela 8**).

5.2 ATIVIDADE CATALÍTICA DOS MATERIAIS DE QPB NA SÍNTESE DE ÁCIDOS CUMARINO-3-CARBOXÍLICOS E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

5.2.1 Avaliação da atividade catalítica dos materiais de QPB na síntese dos ácidos cumarino-3-carboxílicos

Para avaliar a performance catalítica da QPB comercial e QPB-EDTA-72h na síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos, uma série de reações foram realizadas utilizando salicilaldeído e ácido de Meldrum sob variadas condições e os resultados destacados na **Tabela 9**. A escolha do solvente para iniciar os testes catalíticos, bem como a quantidade de material utilizado como organocatalisador foi baseada em trabalhos previamente reportados na literatura [109, 124].

Tabela 9. Aplicação dos materiais de quitosana como organocatalisador sob diferentes condições para obtenção do ácido cumarino-3-carboxílico **3a**.^a

3a

Entrada	Catalisador	Volume do solvente (mL)	Tempo (min) ^b	Rendimento Isolado (%)
1	-	-	1320	89
2	-	0,1	120	84
3	QPB-EDTA-72h	0,1	60	83
4	QPB comercial	0,1	20	81
5	QPB comercial	-	300	83
6	QPB comercial	0,3	20	84
7	QPB comercial	0,5	20	80
8	QPB comercial	1	20	81
9	QPB comercial	2,5	10	82
10	QPB comercial	2,5	50 ^c	82

^aCondições reacionais: salicilaldeído (0,5 mmol), ácido de Meldrum (0,5 mmol), catalisador (10 mg); ^bAs reações foram monitoradas por CCD até o desaparecimento do salicilaldeído; ^cReação realizada à temperatura ambiente.

Inicialmente, a reação foi realizada na ausência de solvente e catalisador. Neste caso, a formação do produto aconteceu lentamente, sendo ele obtido com 89% de rendimento após

1320 minutos (entrada 1, [Tabela 9](#)). Ao comparar esse resultado com o da reação em água ainda sem catalisador, nota-se que a introdução do solvente ao sistema reacional proporciona uma redução do tempo em mais de 10 vezes, permitindo a obtenção do produto **3a** com rendimento de 84% (entrada 2, [Tabela 9](#)). Assim, destaca-se o uso do solvente como imprescindível para o progresso da reação, melhorando a homogeneização dos reagentes para a obtenção do produto mais rapidamente.

O potencial catalítico da QPB-EDTA-72h empregada como organocatalisador bifuncional foi observado quando a conversão total dos reagentes em produto **3a** aconteceu em 60 minutos (entrada 3, [Tabela 9](#)), metade do tempo gasto na reação sem catalisador, mas garantido rendimento semelhante. Enquanto isso, na reação com QPB comercial como organocatalisador, o material não funcionalizado promoveu uma redução de tempo ainda maior, uma vez que a geração do produto **3a** ocorreu em 20 minutos com rendimento isolado ligeiramente inferior (entrada 4, [Tabela 9](#)). Dessa forma, destaca-se os grupos aminos livres ($-NH_2$) da QPB comercial como sítios básicos importantes para a catálise da reação frente a eles modificados por EDTA.

Na síntese do produto **3a**, os grupos aminos livres da QPB comercial são protonados ao ativarem o ácido de Meldrum, que possui baixo pK_a (H_2O) = 4.97 [194]. Em consequência, o biopolímero solubiliza-se na água, promovendo catálise homogênea. Essa por sua vez, possui a eficiência catalítica como uma das suas principais características, o que justifica o melhor resultado para a reação utilizando QPB comercial (entrada 4, [Tabela 9](#)) em comparação ao mesmo material modificado (entrada 3, [Tabela 9](#)). Embora a QPB-EDTA-72h possua grupos aminos livres residuais, a quantidade disponível é insuficiente para propiciar a solubilização desse material em água após a ativação do ácido de Meldrum, o que faz com que a catálise heterogênea seja a atuante neste caso.

Para verificar a atuação isolada da QPB comercial na síntese do ácido cumarino-3-carboxílico **3a**, ela foi empregada na ausência de solvente. Consequentemente, a reação se procedeu mais lentamente devido à dificuldade de homogeneização do sistema que era formado quase totalmente de sólidos, porém o produto **3a** foi obtido com bom rendimento após 300 minutos (entrada 5, [Tabela 9](#)). A partir desses resultados e além de considerar que sistemas diluídos favorecem reações de ciclização [195], outras reações foram realizadas aumentando gradativamente a quantidade de solvente no sistema (entradas 6-9, [Tabela 9](#)). Assim, quando utilizado 2,5 mL de água como solvente, o tempo reacional caiu para 10 minutos sem grande influência no rendimento (entrada 9, [Tabela 9](#)), comprovando a ideia inicial deste teste. Quando

a reação foi realizada à temperatura ambiente (entrada 10, **Tabela 9**), a conversão de todo material de partida em produto foi alcançada em 50 minutos, mostrando que o sistema proposto é promissor mesmo sem aquecimento. Porém, neste caso, o aquecimento é importante para a rápida obtenção do produto **3a**.

Após a escolha do melhor material para catálise, a reação de síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos entre salicilaldeído e ácido de Meldrum foi usada como modelo para a otimização das condições reacionais, como determinação do melhor solvente e quantidade do catalisador e os resultados foram descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Otimização das condições reacionais para obtenção do ácido cumarino-3-carboxílico **3a**.^a

Entrada	Solvente	Massa de catalisador (mg)	Tempo (min) ^b	Rendimento Isolado (%)
1	H ₂ O	5	20	84
2	H ₂ O	10	10	82
3	H ₂ O	20	10	82
4	H ₂ O	30	10	81
5	EtOH:H ₂ O (3:7)	10	20	80
6	EtOH	10	240	83
7	THF ^c	10	1440	85
8	Tolueno	10	1440	- ^d

^aCondições reacionais: salicilaldeído (0,5 mmol), ácido de Meldrum (0,5 mmol), solvente (2,5 mL); ^bAs reações foram monitoradas por CCD até o desaparecimento do salicilaldeído; ^cReação realizada sob refluxo; ^dApenas traços de produto **3a**.

Nas reações envolvendo diferentes quantidades de QPB comercial como organocatalisador (**Tabela 10**), a redução para 5 mg provocou o aumento do tempo reacional para 20 minutos com ligeiro aumento no rendimento (entrada 1, **Tabela 10**). Entretanto, o uso de 10, 20 ou 30 mg de organocatalisador não alterou a eficiência catalítica no que diz respeito ao tempo e rendimento (entradas 2-4, **Tabela 10**). Dessa forma, 10 mg foi considerada a quantidade ideal de organocatalisador para as demais reações, representando a quantidade de sítios ativos suficiente para promover a catálise da reação.

Utilizando solventes polares próticos, apróticos e apolares, como água, etanol:água (3:7 v/v), etanol, THF e tolueno, notou-se que a reação de formação do produto **3a** não é favorecida

por solventes polares apróticos ou apolares. De modo geral, em THF (entrada 7, [Tabela 10](#)), um longo tempo reacional foi necessário para converter todo material de partida em produto, enquanto, em tolueno (entrada 8, [Tabela 10](#)), apenas traços foram observados após 1440 minutos. Esse resultado, por sua vez, pode estar relacionado à aglomeração do organocatalisador no solvente apolar.

Os melhores resultados de tempo foram observados utilizando solventes polares próticos, (entradas 2 e 5-6, [Tabela 10](#)), sendo a água identificada como o melhor solvente em relação ao menor tempo e processamento mais sustentável (entrada 2, [Tabela 10](#)). A utilização da água como solvente em reações orgânicas se destaca como uma prática promissora, além de estar alinhada com os princípios da Química Verde. Vários benefícios podem ser destacados:

[1] Economia: a água é um solvente de baixo custo, amplamente disponível e não inflamável. Isso torna a sua utilização economicamente vantajosa em comparação com solventes orgânicos, na maioria das vezes caros e potencialmente perigosos [\[196, 197\]](#);

[2] Amigável ao meio ambiente: além da sua vantagem econômica, a água é um solvente ecologicamente correto, pois não gera resíduos poluentes ou emissões tóxicas. Ela não contribui para a poluição do meio ambiente e pode ser tratada após o uso [\[196, 187\]](#);

[3] Propriedades únicas: a água possui propriedades físicas e químicas únicas que a tornam adequada para vários processos químicos. Sua alta tensão superficial, constante dielétrica, calor específico e densidade de energia coesiva podem influenciar positivamente o curso de reações orgânicas [\[196, 197\]](#);

[4] Natureza anfotérica: podendo atuar tanto como ácido quanto como base em reações químicas, a água facilita diversas transformações químicas [\[196, 197\]](#);

[5] Interações hidrofóbicas: as interações hidrofóbicas da água com compostos orgânicos podem ser úteis em certos processos orgânicos. Isso pode levar à formação de estruturas supramoleculares que desempenham um papel importante em reações e na estabilização de intermediários [\[196, 197\]](#).

Portanto, o desenvolvimento de protocolos que aproveitam as propriedades da água como solvente em reações orgânicas é priorizado, contribuindo para a redução do impacto ambiental, promover a eficiência energética, além de tornar os processos químicos mais sustentáveis.

Uma proposta mecanística para produção dos ácidos cumarino-3-carboxílicos utilizando QPB comercial como organocatalisador em água é demonstrado na [Figura 21](#) e foi baseada em outros mecanismos relatados na literatura [\[109\]](#). Resumidamente, a reação se processa por uma

condensação de Knoevenagel em água entre salicilaldeído e ácido de Meldrum seguidos por ciclização intramolecular. Acredita-se que os grupos aminos da quitosana ativam o ácido de Meldrum por meio da desprotonação do carbono alfa desse composto de metileno ativo, tornando-o mais nucleofílico (I). Posteriormente, ocorra a formação do aduto de Knoevenagel por meio de ataque nucleofílico ao salicilaldeído (II) seguido de desidratação (III). Através do ataque nucleofílico da hidroxila do salicilaldeído a carbonila do ácido de Meldrum, uma ciclização intramolecular (IV) acontece, eliminando acetona e gerando o produto **3a** com a restituição do organocatalisador como etapa final (V). Vale destacar que a QPB comercial protonada se solubiliza no meio reacional aquoso, promovendo uma catálise homogênea eficiente e após sua restituição, precipita no meio permitindo a recuperação e reutilização em novas reações.

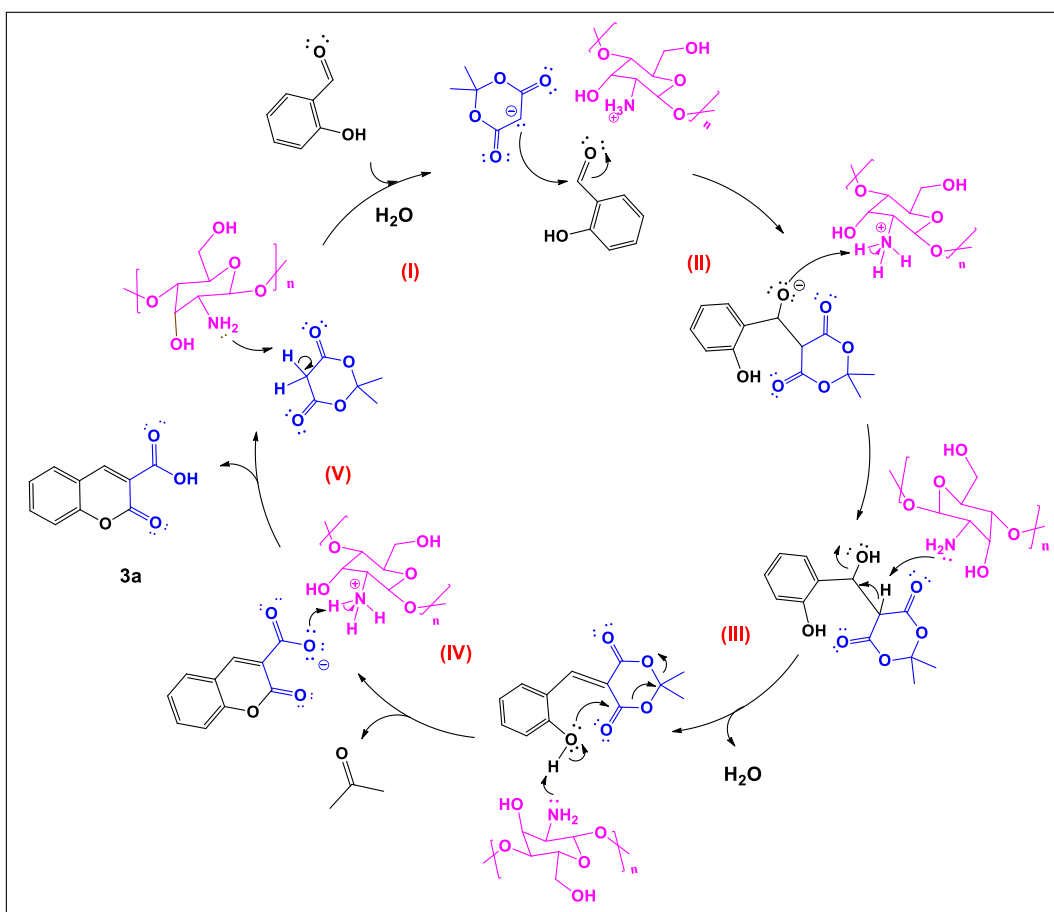


Figura 21. Mecanismo proposto para reação de síntese do ácido cumarino-3-carboxílico **3a** catalisado por QPB comercial.

Após a otimização das condições reacionais, o mesmo protocolo foi aplicado com uma variedade de salicilaldeídos a fim de explorar o efeito de diferentes substituintes no progresso da reação, sendo os resultados destacados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Aplicação de salicilaldeídos substituídos para obtenção de variados ácidos cumarino-3-carboxílicos nas condições otimizadas (continua).^a

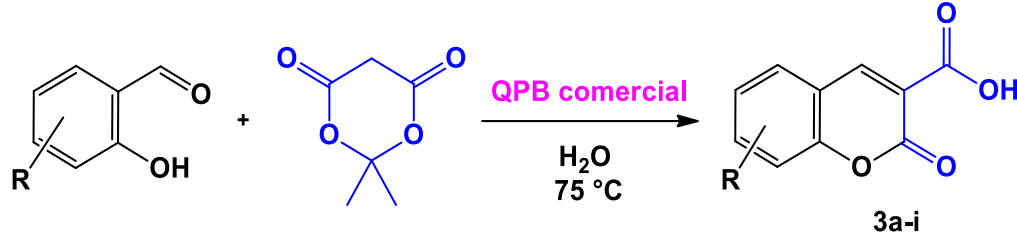
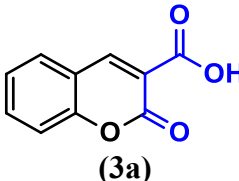
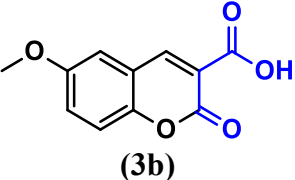
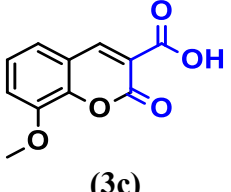
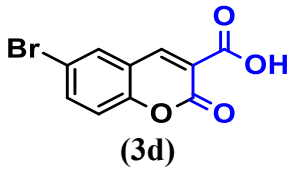
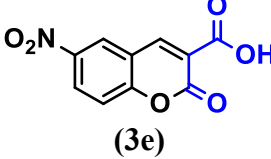
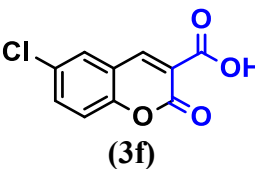
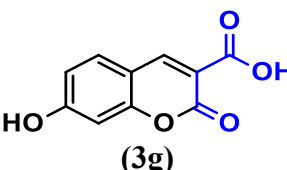
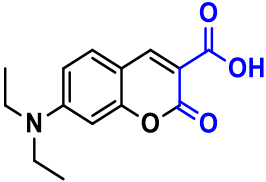
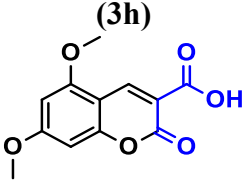
				
Entrada	R	Produto	Tempo (min) ^b	Rendimento Isolado (%)
1	H	 (3a)	10	82
2	5-OCH ₃	 (3b)	10	88
3	3-OCH ₃	 (3c)	15	82
4	5-Br	 (3d)	30	81
5	5-NO ₂	 (3e)	20	82
6	5-Cl	 (3f)	15	81
7	4-OH	 (3g)	15	88

Tabela 11. (Continuação) Aplicação de salicilaldeídos substituídos para obtenção de variados ácidos cumarino-3-carboxílicos nas condições otimizadas.^a

8	4- <i>N</i> - (CH ₂ CH ₃) ₂		120 ^c	74
10	4,6-OCH ₃		120 ^c	33

^aCondições reacionais: salicilaldeído (0,5 mmol), ácido de Meldrum (0,5 mmol), H₂O (2,5 mL), catalisador (10 mg); ^bAs reações foram monitoradas por CCD até o desaparecimento do salicilaldeído; ^cReações interrompidas.

De modo geral, os ensaios com os salicilaldeídos monossustituídos por grupos doadores (entrada 2-3 e 7, [Tabela 11](#)) ou retirados de elétrons (entradas 4-6, [Tabela 11](#)) reagiram eficientemente para a geração dos ácidos cumarino-3-carboxílicos desejados (**3a-g**). Apesar da presença de grupos retiradores de elétrons na posição 5 dos salicilaldeídos (entradas 4-6, [Tabela 11](#)) implicar diretamente na etapa de ciclização intramolecular para formação do anel pirano do produto final, as reações se procederam em tempos inferiores ou iguais a 30 minutos e com rendimentos dentro da média obtida para as reações com os demais grupos substituintes.

Na presença de grupos doadores de elétrons nas posições 4 ou 5 dos salicilaldeídos (entradas 2 e 7, [Tabela 11](#)), os tempos reacionais foram ainda mais curtos, comprovando, dessa forma, os benefícios do efeito doador de elétrons dos substituintes para o progresso da reação. Esse comportamento também pode ser observado quando o substituinte do salicilaldeído se localizava na posição 3 e que, embora pudesse gerar um impedimento estérico indesejado para a etapa de ciclização intramolecular, não interferiu no resultado final da reação e permitiu que a síntese do produto desejado ocorresse em apenas 15 minutos com bom rendimento isolado (entrada 3, [Tabela 11](#)).

Os derivados de salicilaldeído monossustituídos por grupos volumosos (entrada 8, [Tabela 11](#)) ou dissustituído (entrada 9, [Tabela 11](#)) reagiram lentamente e proporcionaram baixos rendimentos, uma vez que os materiais de partida não foram totalmente convertidos em produtos. Esse resultado pode ser atribuído à baixa solubilidade desses salicilaldeídos no solvente proposto e ao grande volume deles em comparação aos outros substratos testados. Comportamento semelhante foi observada por [Kamat e colaboradores \(2021\) \[124\]](#), que

sintetizaram ácidos cumarino-3-carboxílicos entre variados salicilaldeídos e ácido de Meldrum em água como solvente e β -CD como catalisador homogêneo a 70 °C.

Como forma de melhorar os resultados das entradas 8 e 9 (**Tabela 11**), novos ensaios foram realizados utilizando a mistura binária etanol:água como o segundo melhor solvente testado anteriormente (entrada 5, **Tabela 11**) e os resultados foram registrados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Aplicação de variadas misturas binárias etanol:água como solvente para obtenção de variados ácidos cumarino-3-carboxílicos.^a

		 (3h)		 (3i)	
Entrada	Solvente (v/v)	Tempo (min) ^b / Rendimento (%)		Tempo (min) ^b / Rendimento (%)	
1	EtOH:H ₂ O (3:7)	45/80		45/77	
2	EtOH:H ₂ O (1:1)	60 ^c /68		60 ^c /66	

^aCondições reacionais: aldeído (0,5 mmol), ácido de Meldrum (0,5 mmol), H₂O (2,5 mL), QPB comercial (10 mg);

^bAs reações foram monitoradas por CCD até o desaparecimento do salicilaldeído; ^cReações interrompidas.

Aplicando a proporção 3:7 (v/v) da mistura binária etanol:água nas duas reações, foi observado a total conversão dos reagentes em produtos em 45 minutos (entrada 1, **Tabela 12**), além de alcançar rendimentos superiores aos obtidos nas condições anteriores (entradas 8 e 9, **Tabela 11**). A presença de etanol no solvente permitiu uma melhor homogeneização dos sistemas, contribuindo para a melhor performance das reações. No entanto, ao aumentar a quantidade de etanol na mistura binária, ou seja, utilizando etanol:água na proporção 1:1 (v/v), ainda foi observado reagentes em ambas as reações após 60 minutos (entrada 2, **Tabela 12**), consequentemente, os rendimentos isolados foram mais baixos que os alcançados com a mistura binária etanol:água (3:7, v/v), o que reforça que essas reações são mais favorecidas em água. Esses resultados juntos aos ensaios de reciclagem e atividade antimicrobiana deram origem ao **Artigo S1** do **Material Suplementar**.

5.2.2 Estudo de reciclabilidade da QPB comercial na síntese do ácido cumarino-3-carboxílico 3a

A QPB comercial foi submetida a testes de reutilização a fim de verificar a integridade da atividade catalítica do biopolímero após cada ciclo de síntese de ácidos cumarino-3-

carboxílicos entre o salicilaldeído e ácido de Meldrum nas condições otimizadas. Durante os ciclos, não houveram perdas significativas do rendimento isolado do composto, conforme mostrado na **Figura 22**. Além disso, a similaridade entre os espectros de FT-IR do organocatalisador inicial **(a)** e recuperado **(b)** após os quatro ciclos apoiam a manutenção da estrutura do biopolímero após recuperação e reutilização (**Figura 23**). Também não foram observadas bandas adicionais no espectro do organocatalisador após a recuperação, principalmente provenientes do produto **3a** **(c)**, atestando a eficiência das lavagens para total remoção de qualquer substância residual impregnada no organocatalisador. Comparando os espectros de RMN ^1H da quitosana solubilizada na mistura binária $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{COOD}$ (1:1, v/v) antes **(a)** e após o reuso **(b)** (**Figura 24**), também não foram observados o aparecimento de novos sinais ou o desaparecimento de sinais iniciais após a reciclagem, indicando mais uma vez a retenção da estrutura polimérica e a eficiência do tratamento após recuperação.

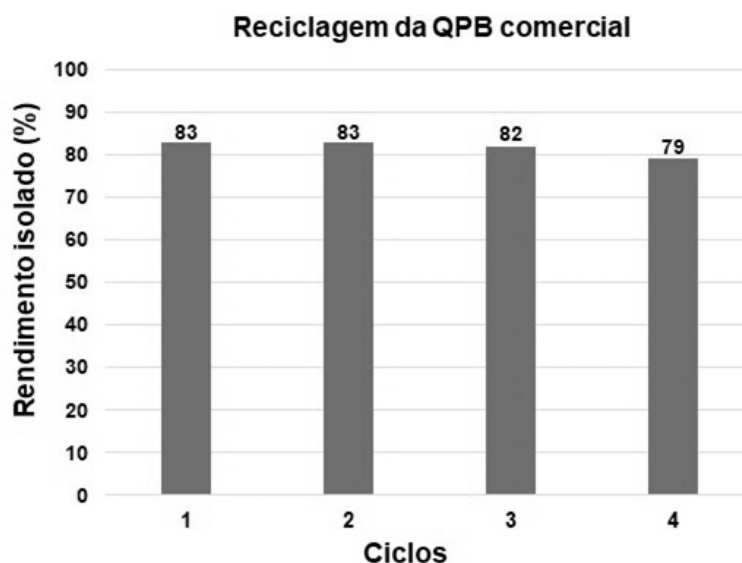


Figura 22. Desempenho de reciclagem da QPB comercial na síntese do produto **3a**.

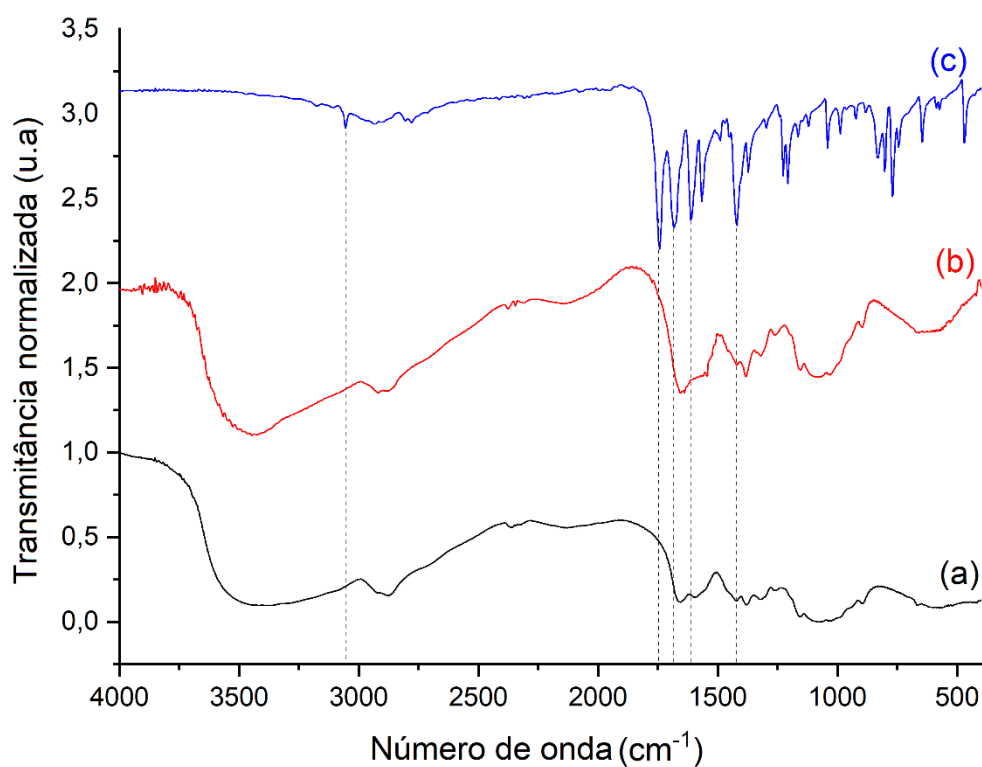


Figura 23. Espectros de FT-IR de QPB comercial (a), QPB reutilizada (quatro ciclos) (b) e produto **3a** (c).

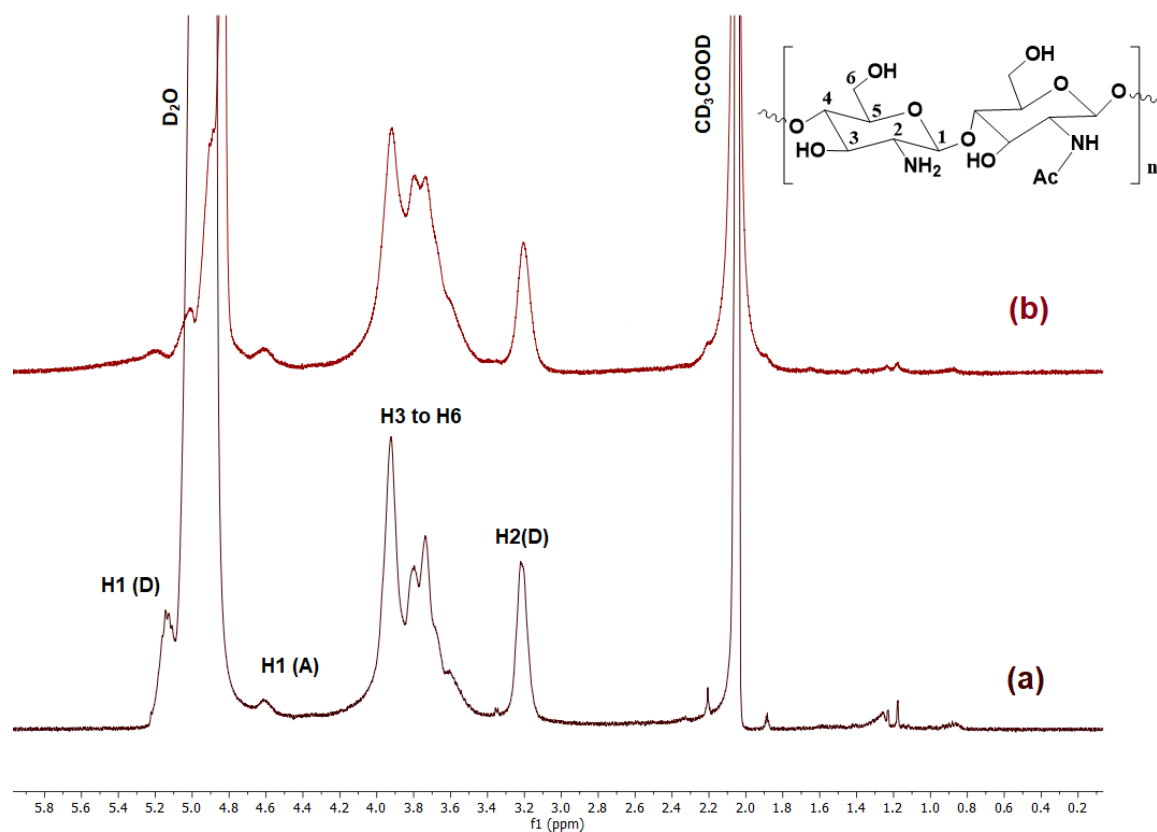


Figura 24. Espectros de RMN de ¹H da QPB comercial (a) e QPB reutilizada (quatro ciclos) (b) em mistura binária D₂O:CD₃COOD (1:1, v/v) a 40°C.

5.2.3 Atividade antimicrobiana dos adutos de Knoevenagel e ácidos cumarino-3-carboxílicos

Tabela 13. (Continuação) Resultados da avaliação da CIM (1024 a 2 µg/mL) de 12 adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos em espécies de bactérias e fungos - Técnica de microdiluição.

Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gentamicina	128	128	256	256	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fluconazol	NA	NA	NA	NA	128	256	256	256	256	256	256	256

(+) Crescimento microbiano; (-) Ausência de crescimento microbiano; (NA) Não aplicado.

No trabalho de [Güller e colaboradores \(2021\) \[139\]](#), os adutos de Knoevenagel **1a-d** foram testados contra *E. coli* e *S. aureus* em concentrações que variaram de 500 a 3000 µg/mL. Os efeitos dos adutos de Knoevenagel nas bactérias foram analisados com base no método de difusão em disco e a zona de inibição com o diâmetro em milímetros. Um diâmetro da zona de inibição ≥ 10 mm indicou que o composto testado é ativo contra as culturas indicadoras [140]. Como resultado, os pesquisadores verificaram que nenhum dos adutos de Knoevenagel testados foi eficaz contra *E. coli* mesmo em concentração elevada. Curiosamente, neste trabalho (**Tabela 13**), o composto **1a** foi eficaz contra a bactéria em questão com concentração de 512 µg/mL.

Ainda conforme os autores (2021), a molécula **1d** ($R = 4\text{-OCH}_3$) também não foi eficaz contra a cepa de *S. aureus*, já os adutos **1a-b** (2500 µg/mL) e **1c** (500 µg/mL) apresentaram atividade. Mais uma vez, uma incompatibilidade de resultados pode ser observada já que, neste trabalho (**Tabela 13**), os compostos **1b** ($R = 4\text{-Cl}$) e **1c** ($R = 4\text{-NO}_2$) não se mostraram eficazes contra a mesma espécie mencionada na concentração de 1024 µg/mL. Além disso, o aduto de Knoevenagel **1a** apresentou concentração inibitória inferior ao do trabalho de [Güller e colaboradores \(2021\) \[198, 199\]](#). Essas divergências de resultados podem ser justificadas pelas diferenças nos métodos utilizados para realizar os testes biológicos e aos critérios de análise utilizados para interpretar os resultados.

A avaliação antimicrobiana para os adutos de Knoevenagel derivados de isatina (**2a-h**) revelou que nenhum dos compostos possui atividade contra as cepas bacterianas e fúngicas avaliadas nas concentrações de 2 a 1024 µg/mL testadas (**Tabela 14**). Na literatura, os compostos **2a** ($R = H$), **2c** ($R = 5\text{-Br}$; $R' = H$) e **2h** ($R = H$; $R' = N\text{-CH}_3$) foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana contra as espécies *S. aureus* e *E. coli* pelo método de difusão em disco com concentrações entre 2000-20000 µg/mL [100]. Segundo o estudo, o composto **2a** foi altamente ativo contra *S. aureus* (CIM 10000 µg/mL), enquanto mostrou leve atividade contra *E. coli* na mesma CIM. O composto **2h** não apresentou atividade contra *S. aureus* ou *E. coli*.

Além disso, verificou-se que o composto **2c** exibiu forte atividade contra *S. aureus* (CIM 6000 µg/mL), pouca atividade contra *E. coli*, porém, foi mais ativo que o composto **2a** (CIM 10000 µg/mL) para a mesma cepa.

Conforme [Azad e colaboradores \(2021\) \[100\]](#), o estudo possibilitou verificar que os adutos de Knoevenagel derivados de isatina exibiram boa atividade biológica devido à presença de um anel extra em sua estrutura. Essa característica pode ter desempenhado um papel no aumento do espectro de atividade biológica dos compostos. Porém, as divergências de resultados em comparação com a [Tabela 14](#) podem ser justificadas pelas diferenças nos métodos utilizados para realizar os testes biológicos e aos critérios de análise utilizados para interpretar os resultados.

Tabela 14. Resultados da avaliação da CIM (1024 a 2 µg/mL) de 8 adutos de Knoevenagel derivados de isatina em espécies de bactérias e fungos - Técnica de microdiluição.

Micro-organismos/CIM (µg/mL)												
Produto (µg/mL)	<i>S. aureus</i> ATCC-13150	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>C. albicans</i> ATCC-76485	<i>C. albicans</i> LM-70	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. tropicalis</i> LM-77	<i>A. flavus</i> LM-26	<i>A. flavus</i> LM-55	<i>A. niger</i> LM-23	<i>P. citrinum</i> ATCC-40011
2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2e	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gentamicina	128	128	256	256	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fluconazol	NA	NA	NA	NA	128	256	256	256	256	256	256	256

(+) Crescimento microbiano; (-) Ausência de crescimento microbiano; (NA) Não aplicado.

Para os ácidos cumarino-3-carboxílicos, os valores da CIM mostraram que os produtos **3a**, **3b**, **3f** e **3g** foram ineficazes ou não apresentam atividade contra todas as cepas avaliadas.

Entretanto, os produtos **3c-e**, **3h** e **3i** testados a partir da concentração de 1024 µg/mL apresentaram efeito inibitório promissor sobre o crescimento dos micro-organismos (**Tabela 15**).

Tabela 15. Resultados da avaliação da CIM/CBM/CFM (1024 a 2 µg/mL) de 9 moléculas/ácidos cumarino-3-carboxílicos em espécies de bactérias e fungos - Técnica de microdiluição.

Produtos (µg/mL)	Micro-organismos/CIM (µg/mL)											
	<i>S. aureus</i> ATCC-13150	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>C. albicans</i> ATCC-76485	<i>C. albicans</i> LM-70	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. tropicalis</i> LM-77	<i>A. flavus</i> LM-26	<i>A. flavus</i> LM-55	<i>A. niger</i> LM-23	<i>P. citrinum</i> ATCC-40011
3a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3c	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	+	+
3d	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	+	+
3e	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
3f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3h	1024	512	512	512	512	512	512	512	512	512	+	+
3i	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
Meio de Cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gentamicina	128	128	256	256	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fluconazol	NA	NA	NA	NA	128	256	256	256	256	256	256	256

(+) Crescimento Microbiano; (-) Ausência de Crescimento Microbiano; (NA) Não Aplicado.

Para as cepas das espécies *A. niger* e *P. citrinum*, apenas os produtos **3e** (R = 5- NO₂) e **3i** (R = 4,6-OCH₃) foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos com a maior CIM utilizada (1024 µg/mL). O produto **3d** (R = 5-Br) apresentou a CIM mais baixa em relação aos demais, e, em comparação com a gentamicina, apresentou a mesma CIM para as cepas *P. aeruginosa* e *E. coli*. Em relação ao fluconazol, o produto **3d** mostrou atividade semelhante para as cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* (ATCC-13803 e LM-77) e *A. flavus* (LM-26 e LM-55). Em contrapartida, as espécies *A. niger* e *P. citrinum* apresentaram resistência ao referido

produto. No mais, a CBM e CFM ficou determinada na concentração de 256 µg/mL, sugerindo que produto **3d** é de natureza bactericida e fungicida.

Entre os ácidos cumarino-3-carboxílicos avaliados, a diferença estrutural mais evidente do produto **3d** em relação aos demais é a presença do átomo de bromo. Esse resultado pode ser atribuído a um efeito multifatorial. O bromo aumenta a lipofilicidade da molécula, favorecendo sua difusão através da membrana celular e, conseqüentemente, melhorando a disponibilidade intracelular [202]. Além disso, sua elevada polarizabilidade possibilita interações adicionais de halogênio com grupos doadores de elétrons presentes em biomoléculas microbianas, como carbonilas e resíduos sulfurados de enzimas [203, 204].

Do ponto de vista eletrônico, o bromo exerce simultaneamente efeito indutivo (-I) e mesomérico (+M), modulando a densidade eletrônica do núcleo cumarínico e tornando-o mais favorável a interações não covalentes. Somado a isso, o tamanho volumoso do átomo contribui para a complementaridade estérica da molécula em microambientes hidrofóbicos [205, 206]. Assim, a presença do bromo em **3d** confere um conjunto sinérgico de propriedades que explica seu desempenho antimicrobiano superior em comparação aos demais ácidos cumarino-3-carboxílicos analisados.

Nos híbridos quinoxalínicos estudados por Ammar e colaboradores (2020) [207], também foi observada forte atividade antimicrobiana para compostos com substituições halogenadas, em especial bromadas, sugerindo novamente o efeito combinado de maior lipofilicidade, aumento da complementaridade estereoeletrônica e favorecimento de interações halogênio-aceptoras no sítio da DNA girase. O mesmo padrão foi observado no trabalho de Liu e colaboradores (2020) [208], que descreveu derivados cumarina-tiazolil éster como inibidores de DNA girase. O composto com substituinte bromo no núcleo cumarínico, exibiu forte atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* (CIM = 0,05 µg/mL), além de CI₅₀ = 0,13 µM para DNA girase. A análise de SAR revelou que o bromo favoreceu significativamente a atividade, provavelmente devido a interações adicionais com resíduos hidrofóbicos no sítio ativo da enzima, além de aumentar a permeabilidade celular em bactérias Gram-positivas.

5.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DOS MATERIAIS DE QPB NA SÍNTESE DE DERIVADOS DE XANTENO E TETRACETONA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

5.3.1 Avaliação da atividade catalítica dos materiais de QPB na síntese dos derivados de xanteno e tetracetona

As condições otimizadas para a síntese dos ácidos cumarino-3-carboxílicos foram aplicadas como uma alternativa simples, ecológica e eficiente para a síntese de derivados de xanteno e tetracetona. Nesta abordagem, a condensação entre salicilaldeído e dimedona (1:2 equivalentes) ocorreu na presença de QPB comercial como organocatalisador, utilizando água como solvente e a 75 °C, resultando no derivado de xanteno **4a** como único produto da reação (entrada 3, [Tabela 16](#)). Para confirmar a eficiência catalítica da quitosana, alguns experimentos adicionais foram realizados, conforme detalhado na [Tabela 16](#).

Tabela 16. Testes de atividade catalítica dos materiais de quitosana como organocatalisadores na síntese do derivado xanteno **4a**.^a

4a

Entrada	Catalisador	Tempo (min) ^b	Rendimento isolado (%)
1	-	240	90
2	QPB-EDTA-72h	30	90
3	QPB comercial	20	93
4	QPB comercial	120 ^c	92
5	QPB comercial	60 ^d	77

^a Condições reacionais: salicilaldeído (0,6 mmol), dimedona (1 mmol), QPB comercial (10 mg), H₂O (2,5 mL); ^b As reações foram monitoradas até o completo desaparecimento da dimedona; ^c Reação à temperatura ambiente; ^d Reação sem solvente.

Inicialmente, a reação entre salicilaldeído e dimedona, conduzida na ausência de catalisador, resultou no consumo total dos reagentes em 240 min, com rendimento isolado de 90% (entrada 1, [Tabela 16](#)). A introdução do catalisador QPB-EDTA-72h (entrada 2, [Tabela](#)

16) promoveu uma redução expressiva do tempo reacional para apenas 30 min, mantendo o mesmo rendimento de 90%, o que demonstra a eficiência da modificação da quitosana com EDTA em acelerar a reação. Contudo, o melhor desempenho foi obtido com o QPB comercial (entrada 3, **Tabela 16**), que levou à formação do produto em apenas 20 min, com rendimento de 93%, resultado que supera todas as demais condições avaliadas.

A redução significativa no tempo de reação foi atribuída à ação dos grupos amino livres da quitosana, que funcionam como sítios básicos, aumentando a nucleofilicidade da dimedona como um composto metileno ativo (entrada 3, **Tabela 16**). A eficiência catalítica da QPB comercial também foi observada mesmo em condições de temperatura ambiente (entrada 4, **Tabela 16**), onde o produto desejado foi obtido com rendimento de 92%, na metade do tempo de reação realizada sem catalisador. Além disso, merece destaque a contribuição da água como solvente, pois, na sua ausência, a homogeneização do sistema reacional ficou comprometida, prejudicando o andamento da reação, bem como o rendimento do produto **4a** (entrada 5, **Tabela 16**).

Uma proposta mecanística para a produção do derivado de xanteno **4a** usando QPB comercial como organocatalisador com base no mecanismo relatado por [Kupwade e colaboradores \(2016\) \[167\]](#) é demonstrada na **Figura 25**. Resumidamente, a reação prossegue por meio de uma condensação de Knoevenagel entre salicilaldeído e 1 equivalente de dimedona, seguida pela adição de Michael do outro equivalente de dimedona e uma ciclização intramolecular para formar o derivado de xanteno final. Acredita-se que os grupos amino da quitosana ativam a dimedona pela desprotonação do carbono alfa deste composto de metileno ativo, tornando-o mais nucleofílico (I). Posteriormente, a formação do aduto de Knoevenagel ocorre por ataque nucleofílico ao salicilaldeído (II) seguido pela desidratação (III). Na próxima etapa, o segundo equivalente de dimedona ativada promove a adição de Michael ao aduto de Knoevenagel. Por meio do ataque nucleofílico da hidroxila do salicilaldeído sobre a carbonila da dimedona, ocorre uma ciclização intramolecular (IV), eliminando água e gerando o derivado xanteno **4a** com o retorno do catalisador como etapa final (V).

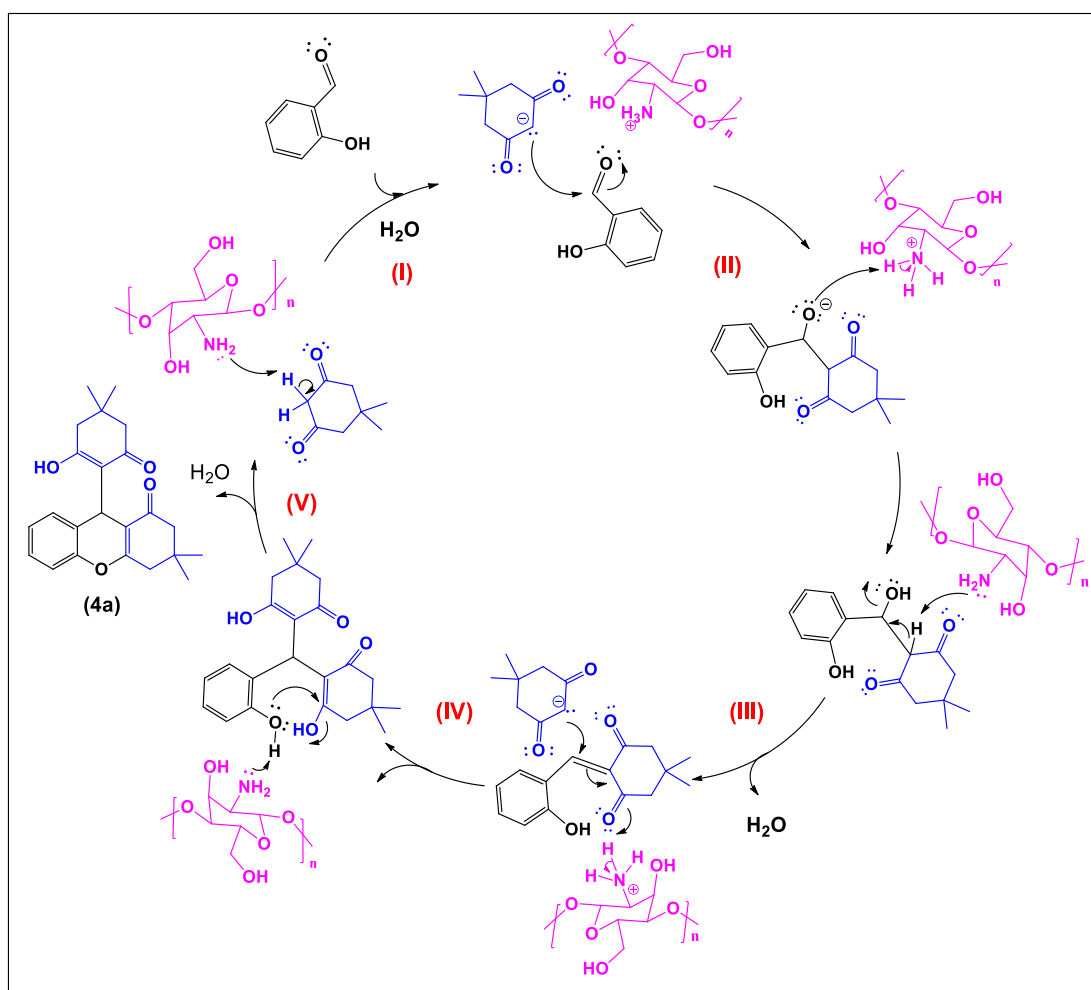


Figura 25. Mecanismo proposto para a síntese do derivado de xanteno **4a** usando quitosana comercial como organocatalisador.

Com base nos resultados anteriores, as mesmas condições foram aplicadas usando salicilaldeídos substituídos por grupos retiradores ou doadores de elétrons ou halogenados. Em todos os casos, os derivados de xanteno foram produzidos com tempos de reação curtos e altos rendimentos isolados (**Tabela 17**).

Tabela 17. Aplicação de salicilaldeídos substituídos para obter vários derivados de xanteno (continua).^a

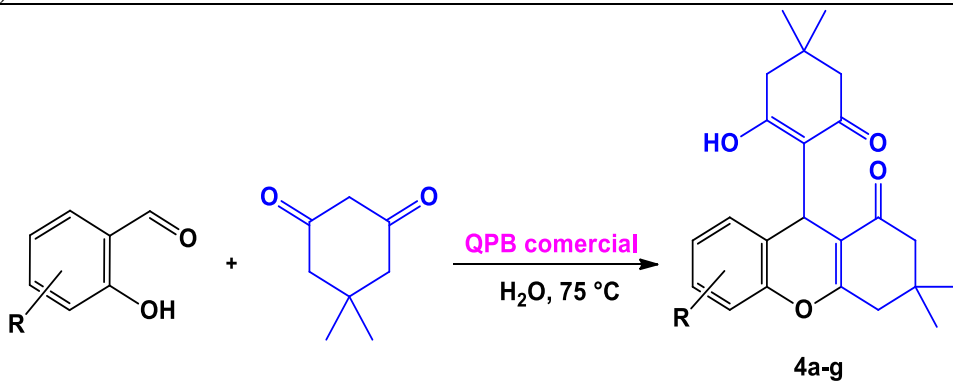
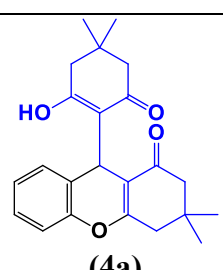
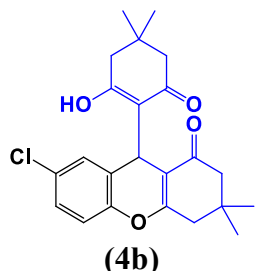
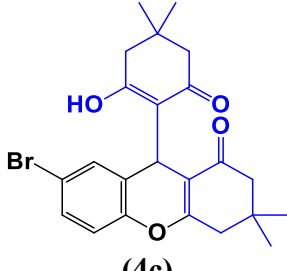
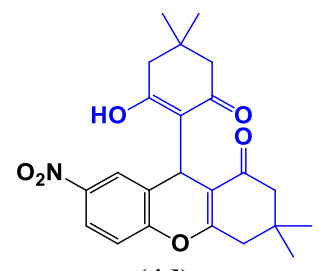
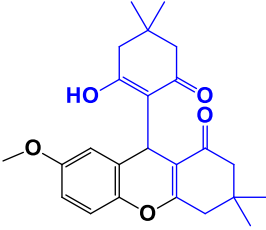
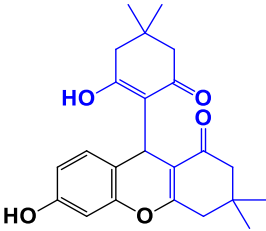
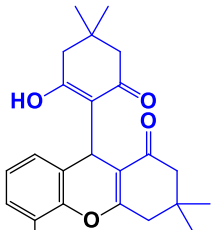
 R 4a-g				
Entrada	R	Produto	Tempo (min) ^b	Rendimento isolado (%)
1	H	 (4a)	20	93
2	5-Cl	 (4b)	20	92
3	5-Br	 (4c)	20	90
4	5-NO ₂	 (4d)	60	73 ^c

Tabela 17. (Continuação) Aplicação de salicilaldeídos substituídos para obter vários derivados de xanteno.^a

5	5-OCH ₃	 (4e)	20	91
6	4-OH	 (4f)	30	92
7	3-OCH ₃	 (4g)	20	93

^a Condições reacionais: salicilaldeído substituído (0,6 mmol), dimedona (1 mmol), QPB (10 mg), H₂O (2,5 mL); ^b As reações foram monitoradas até o completo desaparecimento da dimedona; ^c Reação em EtOH:H₂O (3:7, v/v).

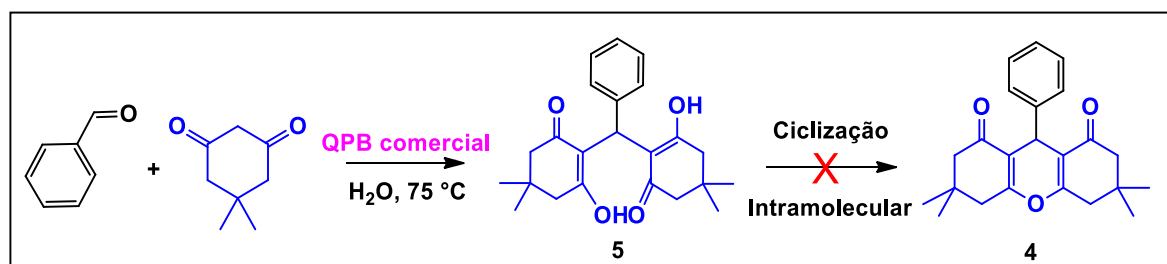
Em geral, os salicilaldeídos substituídos reagiram eficientemente, produzindo os produtos correspondentes (**4b–c** e **4e–g**) em 20–30 min com rendimentos superiores a 90% (entradas 2, 3 e 5–7, **Tabela 17**). Em comparação com trabalhos anteriores, o presente método destaca-se pela sua sustentabilidade. [Prasad e colaboradores \(2013\) \[140\]](#) obtiveram altos rendimentos (85–99%) utilizando *L*-prolina como organocatalisador em etanol a 60 °C. No entanto, a reação exigiu tempos mais longos (0,5–5 h) e o catalisador não foi recuperado. Da mesma forma, [Kamat e colaboradores \(2021\) \[124\]](#) relataram um sistema catalisado por β-ciclodextrina (β-CD) em água a 70 °C que proporcionou excelentes rendimentos (84–95%) em 15–60 min, mas também não incluiu informações sobre a reciclabilidade do catalisador.

A reação envolvendo o 5-Nitro-salicilaldeído como reagente carbonilado exibiu taxa de reação mais lenta (entrada 4, **Tabela 17**), produzindo o derivado de xanteno **4d** em rendimento relativamente baixo, mesmo quando uma mistura binária etanol:água (3:7, v/v) foi usada como solvente alternativo para melhorar os problemas de solubilidade do reagente [\[209\]](#). No estudo

de [Pore e colaboradores \(2010\) \[168\]](#), também foi observado que os testes envolvendo o grupo $-\text{NO}_2$ como substituinte salicilaldeído atrasaram a conclusão da reação para obter o derivado de xanteno desejado. Em geral, o sistema dos pesquisadores consistiu em usar água em refluxo sem catalisador para sintetizar os derivados de xanteno em 3,5-5 horas com rendimentos entre 84-93%.

O benzaldeído também foi testado com dimedona (1:2 equivalentes) usando QPB comercial e água a 75 °C para gerar o derivado de xanteno **4** ([Esquema 21](#)). Curiosamente, o produto resultante não sofreu ciclização intramolecular após 1 h de acompanhamento reacional e apenas o produto não ciclizado foi observado, caracterizado como derivado de tetracetona **5**. [Kali e Maiti \(2024\) \[210\]](#) também obtiveram o composto **5** em seu método usando o líquido iônico [BCMIM][Cl] em etanol aquoso à temperatura ambiente. O mesmo composto foi preparado por [Borah e colaboradores \(2023\) \[141\]](#) por meio de uma reação de condensação catalisada por $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ sob condições de moagem à temperatura ambiente. Em contraste, [Peiman e Maleki \(2024\) \[211\]](#) conseguiram obter o derivado de xanteno **4** por meio de síntese *one pot* usando nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NTMPThio-Cu}$ como catalisador heterogêneo ácido de Lewis sob condições livres de solvente. [Kazemi-Rad e colaboradores \(2015\) \[212\]](#) também sintetizaram o derivado de xanteno **4**, mas por meio de uma rota de duas etapas. A primeira consistiu em usar base eletrogerada (EGB) como catalisador na presença de brometo de sódio como eletrólito para formar o derivado de tetracetona **5**. Na segunda etapa, ácido sulfúrico (H_2SO_4) foi usado como reagente desidratante para o processo de ciclização e formação do derivado de xanteno **4**.

A partir dos dados mencionados e de outros reportados na literatura [\[213-220\]](#), é possível traçar uma correlação direta entre a acidez do catalisador e a eficiência da ciclização intramolecular do derivado de tetracetona **5** na formação do derivado de xanteno **4** quando usado benzaldeído e dimedona (1:2 equivalentes) como reagentes. Essa característica justifica o resultado observado na presença da QPB comercial como organocatalisador, uma vez que seus grupos aminos atuam seletivamente para a síntese de derivados de tetracetona **5** via catálise básica.



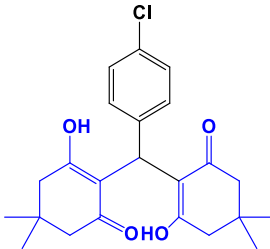
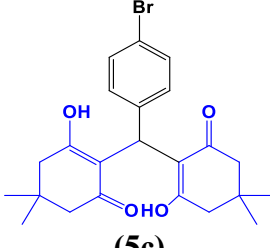
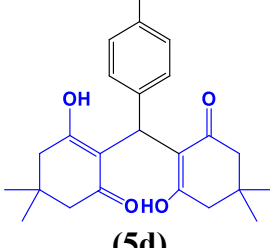
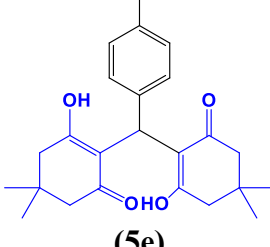
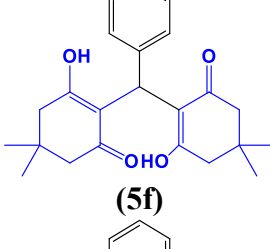
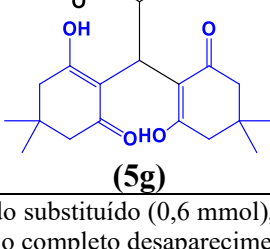
Esquema 21. Obtenção de tetracetona **5** a partir de benzaldeído e dimedona (1:2 equivalentes) sob condições otimizadas após 1 h de acompanhamento reacional.

A partir dos resultados mencionados, uma série de benzaldeídos contendo substituintes doadores ou retirantes de elétrons foram reagidos com dimedona sob as mesmas condições para obter os compostos **5a-g** (**Tabela 18**). O ensaio envolvendo benzaldeído não substituído demonstrou alto rendimento, com conversão completa dos reagentes no produto **5a** dentro de 10 min de reação (entrada 1, **Tabela 18**). Resultados semelhantes de tempo e rendimento isolado foram observados para outras reações (entradas 2–7, **Tabela 18**), indicando que essas condições foram altamente eficientes para substratos, independentemente da posição ou natureza dos substituintes. Em resumo, as tetracetonas foram obtidas sem a formação de quaisquer produtos secundários. Esses resultados juntos aos ensaios de reciclagem e atividade antitumoral deram origem ao [Artigo S4](#) do [Material Suplementar](#).

Tabela 18. Aplicação de benzaldeídos substituídos para obtenção de diversas tetracetonas (continua).^a

Entrada	R	Produto	Tempo (min) ^b	Rendimento isolado (%)
1	H	 (5a)	10	94

Tabela 18. (Continuação) Aplicação de benzaldeídos substituídos para obtenção de diversas tetracetonas.^a

2	4-Cl	 (5b)	20	82
3	4-Br	 (5c)	10	88
4	4-NO ₂	 (5d)	15	83
5	4-OCH ₃	 (5e)	20	90
6	3-OH	 (5f)	10	85
7	2-OCH ₃	 (5g)	10	88

^a Condições reacionais: benzaldeído substituído (0,6 mmol), dimedona (1 mmol), QPB (10 mg), H₂O (2,5 mL); ^b As reações foram monitoradas até o completo desaparecimento da dimedona.

5.3.2 Estudo de reciclabilidade da QPB comercial na síntese do derivado de xanteno **4a**

A QPB comercial foi submetida a testes de reutilização para verificar a integridade da estrutura do biopolímero após cada ciclo de síntese do derivado de xanteno **4a**, formado entre salicilaldeído e dimedona sob condições otimizadas. Ao longo dos seis ciclos, nenhuma redução significativa no rendimento isolado do composto foi observada, conforme mostrado na **Figura 6**. Além disso, a similaridade entre os espectros de FT-IR dos catalisadores inicial (**a**) e recuperado (**b**) após seis ciclos suporta a preservação da estrutura do biopolímero após recuperação e reutilização (**Figura 27**). Além disso, nenhuma banda adicional foi observada no espectro do catalisador recuperado, particularmente aquelas do produto **4a** (**c**), confirmando a eficácia do processo de lavagem na remoção completa de quaisquer substâncias residuais impregnadas no catalisador.

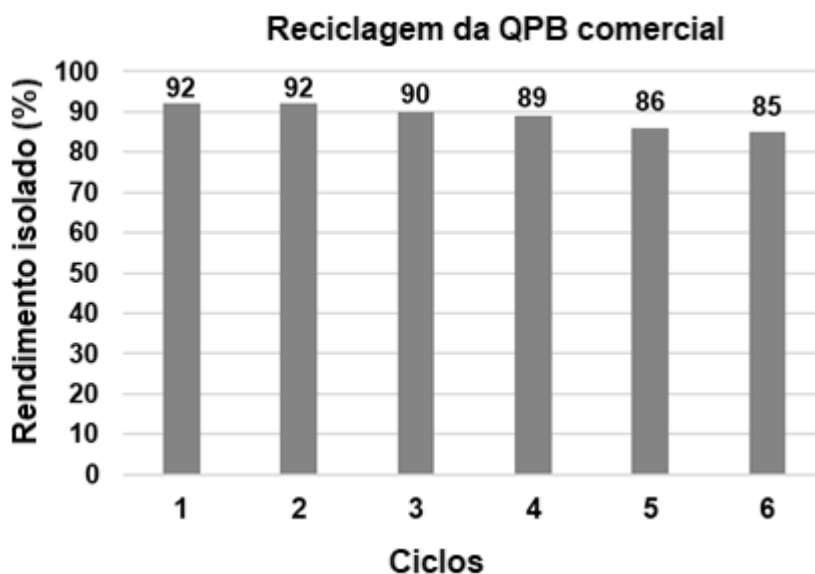


Figura 26. Desempenho de reciclagem de QPB comercial na síntese do produto **4a** em seis ciclos de reação.

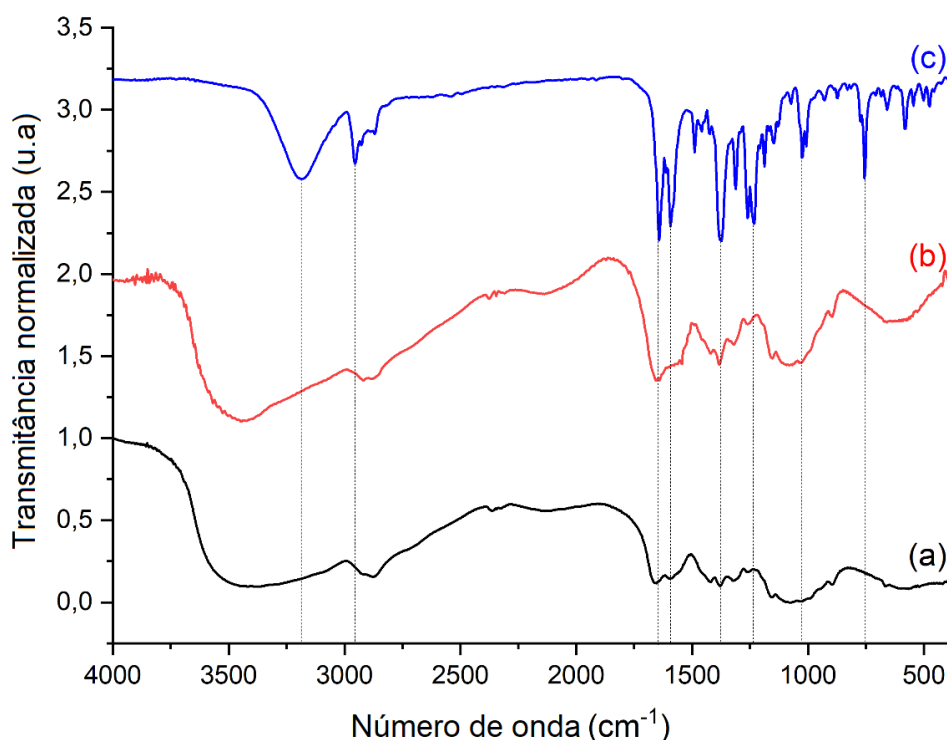


Figura 27. Espectros de FT-IR de QPB comercial (a), reutilizada (seis ciclos) (b), produto 4a (c).

5.3.3 Atividade antitumoral dos derivados de xanteno e tetracetona

Neste estudo, foi avaliada a atividade antitumoral dos derivados de xanteno e tetracetonas (**4a-g** e **5a-g**) em três linhagens celulares tumorais: leucemia mieloide crônica (K-562), carcinoma de pulmão (A-549) e câncer cólon humano (HCT-116). A **Tabela 19** apresenta a porcentagem de inibição do crescimento celular para cada composto, juntamente com o desvio padrão da média (DP). A Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo, permitindo a comparação da eficácia dos compostos testados com um agente quimioterápico amplamente utilizado.

Tabela 19. Porcentagem de inibição do crescimento celular (%) e desvio padrão da média (DP) dos compostos em linhagens de células tumorais (continua).

Produto	K-562		A-549		HCT-116	
	Inibição (%)	DP	Inibição (%)	DP	Inibição (%)	DP
4a	89,06	6,3	79,22	9,8	82,01	9,8
4b	91,17	4,7	93,22	3,6	90,09	5,4
4c	81,14	8,8	89,22	5,5	81,33	8,7
4d	64,79	13,6	69,86	12,2	60,53	13,8
4e	52,04	14,6	66,46	13,5	56,57	14,3
4f	95,19	2,7	95,33	2,6	94,71	2,9

Tabela 19. (Continuação) Porcentagem de inibição do crescimento celular (%) e desvio padrão da média (DP) dos compostos em linhagens de células tumorais.

4g	39,78	14,4	45,18	14,3	47,81	15,4
5a	24,18	10,9	26,70	11,2	18,87	9,0
5b	44,43	14,2	12,87	6,5	22,04	10,0
5c	22,98	12,2	41,16	14,0	26,39	11,4
5d	46,61	14,7	59,79	14,2	29,44	12,1
5e	30,49	12,3	22,10	9,9	18,31	8,7
5f	24,22	10,5	44,97	14,2	19,72	9,1
5g	43,72	14,3	14,54	7,2	22,29	10,0
DOX	84,76	7,6	85,41	7,2	86,60	6,6

Em geral, os derivados de xanteno (**4a-g**) foram mais citotóxicos para as células tumorais do que os tetracetonas (**5a-g**). Dentre eles, destaca-se o composto **4f** ($R = 4\text{-OH}$), que apresentou as maiores taxas de inibição em todas as linhagens celulares (95,19% em K-562, 95,33% em A-549 e 94,71% em HCT-116), com baixa variação padrão, indicando alta reprodutibilidade dos resultados. O composto **4b** ($R = 5\text{-Cl}$) também demonstrou forte atividade, com inibição superior a 90% para as linhagens A-549 e HCT-116, sendo superior à DOX nesses casos. Em contraste, os compostos **4d** ($R = 5\text{-NO}_2$), **4e** ($R = 5\text{-OCH}_3$) e **4g** ($R = 3\text{-OCH}_3$) apresentaram atividade de baixa a moderada, especialmente contra a linhagem HCT-116.

Os derivados de tetracetona (**5a-g**) mostraram menor atividade, com a maioria apresentando inibição inferior a 50%, sendo os compostos **5f** ($R = 3\text{-OH}$) e **5g** ($R = 3\text{-OCH}_3$) os menos ativos. A baixa atividade observada para os tetracetonas pode estar relacionada à ausência de ciclização da molécula para formação do composto heterocíclico tricíclico. Por exemplo, [Mohammadi e Kakesh \(2025\) \[143\]](#) relataram bons resultados com a molécula derivada da ciclização de **5e** ($R = 4\text{-OCH}_3$). O estudo foi realizado com as linhagens HeLa, SKOV-3 e LS-180, cujos valores de CI_{50} foram de 38,4 ($\pm 13,3$), 44,0 ($\pm 23,3$) e superiores a 25 μM , respectivamente. Embora não sejam as mesmas linhagens celulares utilizadas neste trabalho, os resultados representam um forte indício da importância da ciclização para a atividade biológica.

A DOX, utilizada como controle positivo, apresentou alta inibição em todas as linhagens celulares (variando de 84,76% a 86,60%), mas alguns compostos, como **4a-c** e **4f**, apresentaram resultados comparáveis ou até superiores. Isso sugere que esses compostos podem ser fortes candidatos para estudos adicionais no desenvolvimento de terapias antitumorais. A [Tabela 20](#)

apresenta os valores de CI_{50} e o intervalo de confiança (IC) dos compostos testados nas três linhagens celulares.

Tabela 20. Citotoxicidade em μM dos compostos em K-562, A-594 e HCT-116.

Produto	K-562 CI_{50} (IC)	A-549 CI_{50} (IC)	HCT-116 CI_{50} (IC)
4a	>68,22	55,34 (52,31 – 58,56)	>68,22
4b	21,37 (14,89 – 30,75)	42,55 (39,56 – 45,74)	34,59 (21,02 – 56,89)
4c	11,24 (9,16 – 13,78)	30,69 (26,81 – 35,09)	22,29 (16,07 – 30,87)
4f	12,08 (8,00 – 18,22)	6,61 (5,83 - 7,50)	5,54 (4,83 - 6,35)
DOX	0,47 (0,25 – 0,86)	1,30 (0,77 – 2,15)	1,87 (1,39 – 2,50)

Com base na **Tabela 20**, o derivado de xanteno **4a** ($R = H$) apresentou baixa atividade contra as linhagens K-562 e HCT-116 ($CI_{50} > 68,22 \mu M$), mas teve um CI_{50} de $55,34 \mu M$ para A-549. O composto **4b** apresentou citotoxicidade intermediária, com valores de CI_{50} de 21,37 (K-562), 42,55 (A-549) e $34,59 \mu M$ (HCT-116), sugerindo um efeito inibitório maior do que o de **4a**. O composto **4c** ($R = 5-Br$) exibiu citotoxicidade mais pronunciada, com CI_{50} de 11,24 (K-562), 30,69 (A-549) e $22,29 \mu M$ (HCT-116), indicando maior atividade contra leucemia e câncer colorretal.

O composto **4f** ($R = 4-OH$) destacou-se como o mais promissor, apresentando os menores valores de IC_{50} para todas as linhagens celulares avaliadas (12,08, 6,61 e $5,54 \mu M$ para K-562, A-549 e HCT-116, respectivamente), o que evidencia sua considerável citotoxicidade. A presença do grupo hidroxila ligado ao anel aromático desse derivado pode estar diretamente associada à atividade antitumoral observada. Esse grupo funcional é reconhecido por sua capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio com biomacromoléculas, contribuindo para interações estáveis e favorecendo o reconhecimento molecular [221, 222]. Além disso, o grupo hidroxila modula a polaridade e a solubilidade da molécula, fatores que podem facilitar a difusão em ambientes intracelulares e ampliar a eficácia citotóxica [223]. Miladiyah e colaboradores. (2018) [224] ressaltaram o papel determinante da introdução de grupos hidroxila na intensificação da atividade antitumoral de derivados de xantenos e xantonas. De forma consistente, Su e colaboradores (2011) [225] também relataram que derivados benzoxantênicos hidroxilados exibiram maior atividade antitumoral. Esses achados demonstram que, embora diferentes classes de derivados compartilhem o núcleo xantênico/xantônico, a inserção de grupos hidroxila constitui um fator recorrente de incremento da potência citotóxica. Ademais,

os mesmos autores avançaram na elucidação mecanística, evidenciando que a citotoxicidade de seus derivados hidroxilados envolve indução de apoptose mitocondrial, ativação de caspases-3 e -9, danos ao DNA e inibição da topoisomerase II. Assim, a comparação entre os estudos reforça a relevância do grupo hidroxila como funcionalidade central na modulação da atividade biológica.

A **Tabela 21** avaliou a inibição do crescimento celular em células não tumorais de fibroblastos de pulmão (MRC-5), o que é essencial para determinar a seletividade dos compostos. Um fármaco ideal deve ter alta citotoxicidade contra células tumorais e baixa citotoxicidade contra células normais, fator crucial para sua viabilidade terapêutica.

Tabela 21. Porcentagem de inibição do crescimento celular (%) e desvio padrão da média (DP) dos compostos em linhagens celulares não tumorais.

Produto	MRC-5 Inibição (%)	DP
4a	45,16	3,1
4b	56,56	2,5
4c	44,10	3,2
4f	96,07	2,2
DOX	66,3	1,9

Os compostos **4a** e **4c**, quando testados a 25 µg/mL, apresentaram baixos efeitos citotóxicos (inibição do crescimento celular abaixo de 50%), enquanto o composto **4b** apresentou efeito citotóxico moderado (56,5% de inibição a 25 µg/mL). O composto **4c** foi citotóxico para três linhagens celulares tumorais (CI_{50} variou de 5,0 a 13,6), sem efeito citotóxico em MRC-5, indicando seletividade para células cancerígenas. Dentre os compostos testados, apenas o composto **4f** foi considerado citotóxico a 25 µg/mL e seu CI_{50} em MRC-5 foi avaliado (**Tabela 21**). A **Tabela 22** apresenta os valores de CI_{50} dos compostos **4f** e DOX, bem como seus respectivos IS em células MRC-5.

Tabela 22. Valores de CI_{50} (µM) e intervalo de confiança (IC 95%) dos compostos **4f** e DOX em células MRC-5 e respectivos IS contra as linhagens tumorais K-562, A-549 e HCT-116.

Produto	MRC-5 CI_{50} (IC)	K-562 IS	A-549 IS	HCT-116 IS
4f	2,90 (2,09 - 4,05)	0,24	0,43	0,54
DOX	2,59 (1,12 - 5,99)	5,42	1,99	1,38

IS = CI_{50} (MRC-5)/ CI_{50} (célula tumoral)

O composto **4f** apresentou um valor de CI_{50} mais alto (2,90 μM) na linhagem celular MRC-5, em comparação com a DOX (2,59 μM), indicando ser menos tóxico para essa linhagem de célula não tumoral em comparação ao fármaco de referência. No entanto, ao analisar o IS, o composto **4f** apresentou valores significativamente menores para K-562, A-549 e HCT-116 do que a DOX. Esses resultados sugerem que, embora o composto **4f** apresente citotoxicidade contra células tumorais, sua seletividade global é limitada. Vale destacar que o composto **4f** demonstrou maior citotoxicidade contra a linhagem HCT-116, sugerindo um perfil relativamente mais seletivo para esse modelo de câncer de cólon. Esse achado é particularmente promissor, caso modificações estruturais possam ser introduzidas para reduzir a citotoxicidade em células não tumorais, ao mesmo tempo em que se potencializa a atividade contra outros tipos tumorais.

CAPÍTULO 6

Considerações finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da QPB-EDTA-72h como organocatalisador heterogeneizado bifuncional nas condições otimizadas para a síntese de adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos ou isatina possibilitou a geração eficiente (0,5-120 min/83-96%) dos compostos avaliados biologicamente como larvicida frente *Aedes aegypti*, antileishmania e antimicrobiano. No estudo de reciclagem do organocatalisador, foi observado que a QPB-EDTA-72h pode ser recuperada e reutilizada por seis ciclos de reciclagem sem perdas significativas da atividade catalítica (rendimento médio de ~90%) e alteração da estrutura biopolimérica.

Nos testes *in vitro* para avaliação da capacidade larvicida dos adutos de Knoevenagel derivados de aldeídos aromáticos, foi observado que os compostos **1c** (R = 4-NO₂) e **1g** (R = 3-OCH₃) demonstraram elevado potencial larvicida contra *Aedes aegypti* (CL₅₀ de 3,39 e 5,13 ppm, respectivamente). A análise de citotoxicidade na hemolinfa das larvas expostas revelou uma alteração significativa na quantidade e tipos de hemócitos, com uma redução expressiva de prohemócitos e aumento de plasmatócitos e adipohemócitos, sugerindo uma resposta de estresse imunológico e metabólico. Em contraste, a produção de NO não apresentou aumento significativo, indicando que o mecanismo larvicida dos adutos **1c** e **1g** não depende do estresse oxidativo mediado por NO. A partir dos testes como antimicrobianos, foi observado que os adutos de Knoevenagel **1a** (R = H), **1f** (R = 3-NO₂) e **1h** (R = 2-NO₂) apresentaram atividade contra todas as cepas de bactérias e fungos testadas, com CIM entre 512-1024 µg/mL.

Os adutos de Knoevenagel derivados de isatina, testados inicialmente contra a forma promastigota *Leishmania infantum*, exibiram valores de CI₅₀ de 15,05, 18,38 e 12,7 µM para **2b** (R = 5-Cl; R' = H), **2c** (R = 5-Br; R' = H) e **2g** (R = 5-CH₃; R' = *N*-benzil), respectivamente. Importaneamente, nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade contra hemácias humanas em testes de atividade hemolítica. Contra a forma amastigota axênica, os mesmos compostos apresentaram valores de CE₅₀ mais baixos (3,8-5,74µM). Nos ensaios com PBMCs, os compostos **2b**, **2c** e **2g** apresentaram valores de CC₅₀ de 27,03, 34,41 e 25,2 µM, respectivamente, resultando em baixos valores de IS (4,39-7,42). Enquanto isso, a avaliação antimicrobiana revelou que nenhum dos adutos de Knoevenagel derivados de isatina possuem atividade contra as cepas bacterianas e fúngicas avaliadas (CIM = 2-1024 µg/mL).

Dentre as condições aplicadas para a síntese sequencial do ácido cumarino-3-carboxílico **3a** (R = H), a QPB comercial se mostrou o melhor organocatalisador reciclável com água ou etanol:água (3:7, v/v) como solvente a 75 °C, promovendo catálise homogênea para a geração

do produto em tempo curto e bom rendimento isolado. Utilizando salicilaldeídos substituídos nas condições otimizadas, foi possível obter novos ácidos cumarino-3-carboxílicos (**3b-i**) com tempos curtos e bons rendimentos isolados (10-45 min/77-88%). No estudo de reciclagem da QPB comercial, foi observado que o organocatalisador pode ser recuperado e reutilizado por quatro ciclos sem (rendimento médio de ~82%) comprometimento da estrutura biopolimérica. Aplicados como antimicrobianos, os ácidos cumarino-3-carboxílicos **3c-e**, **3h** e **3i** testados a partir de 1024 µg/mL apresentaram efeito inibitório promissor sobre o crescimento dos micro-organismos. No mais, a CIM, CBM e CFM para o composto mais ativo (**3d**) ficou determinada em 256 µg/mL, sugerindo considerado de natureza bactericida e fungicida.

Para a síntese de derivados de xanteno (**4a-g**) e tetracetona (**5a-g**) por meio de reações sequenciais entre salicilaldeídos ou benzaldeídos substituídos e dimedona (razão 1:2 equivalentes) em água a 75 °C, o uso de QPB comercial como organocatalisador reciclável provou ser uma alternativa simples, ecologicamente correta e eficiente. A eficiência catalítica da QPB comercial foi confirmada pela redução significativa no tempo de reação tanto para os derivados de xanteno (10-60 min/73-93%) quanto para os derivados de tetracetona (10-20 min/82-94%). Além disso, a reutilização do organocatalisador sem perda significativa de atividade, juntamente com a preservação de sua estrutura após seis ciclos (rendimento médio de ~89%), ressalta seu potencial como uma solução sustentável em síntese orgânica.

Na avaliação biológica, os derivados de xanteno apresentaram maior citotoxicidade contra as linhagens celulares tumorais testadas em comparação com os tetracetonas. O composto **4f** (R = 4-OH) demonstrou maior potência na inibição celular, com valores de 95,19% em K-562, 95,33% em A-549 e 94,71% em HCT-116. Também apresentou baixos valores de CI_{50} com valores de 12,08, 6,61 e 5,54 µM, respectivamente. No entanto, sua citotoxicidade em células não tumorais (96,07% de inibição em MRC-5), aliada ao baixo índice de seletividade (IS = 0,24 para K-562 e IS = 0,43 para A-549), revela um risco significativo de efeitos colaterais. Apesar dessas limitações, os resultados destacam a atividade promissora do composto **4f**, que pode servir como composto líder para otimizações estruturais.

Por fim, conclui-se que os materiais à base de quitosana apresentam excelente atividade catalítica na síntese de compostos orgânicos bioativos por meio da reação de condensação de Knoevenagel e reações sequenciais. Além disso, nota-se que as condições otimizadas possibilitam a obtenção desses compostos de forma simples e eficiente, dispensando o uso de catalisadores complexos, reagentes caros ou temperaturas elevadas, destacando-se como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate ou controle de doenças de grande impacto social.

CAPÍTULO 7

Perspectivas

PERSPECTIVAS

- Ampliar a série de adutos de Knoevenagel derivados de isatina através da introdução de grupos lipofílicos no nitrogênio da amida da isatina, juntamente com variações de substituintes doadores e retiradores de elétrons no anel aromático e aplicá-los contra formas promastigota e amastigota de *Leishmania infantum*;
- Investigar o potencial inseticida de adutos de Knoevenagel em outras fases do ciclo de vida do *Aedes aegypti* e avaliar alterações morfofisiológicas em larvas de gerações subsequentes expostas a doses subletais desses compostos;
- Modificar os ácidos cumarino-3-carboxílicos (**3a-i**) para a obtenção de derivados de 3,4-dihidrocumarinas (**6a-i**) e investigar o seu efeito antimicrobiano contra bactérias e fungos leveduriformes e filamentosos por meio de ensaios *in vitro*.

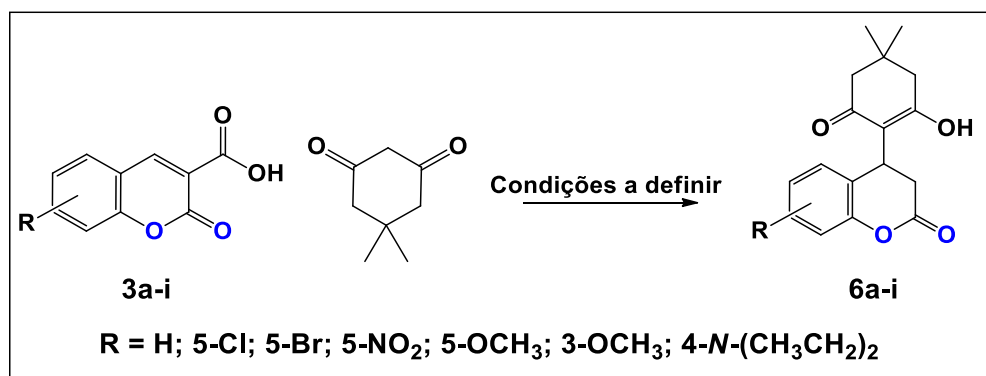


Figura 28. Procedimento geral para a síntese dos derivados de 3,4-dihidrocumarinas (**6a-i**).
Fonte: Autoria própria, 2025.

REFERÊNCIAS

- [1] HAGEN, J. **Industrial Catalysis a Practical Approach**, 2. ed. Germany: Wiley - VCH, 2006.
- [2] VEKARIYA, R. H.; PATEL, H. D. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: a review. **Synthetic Communications**, v. 44, n. 19, p. 2756-2788, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00397911.2014.926374>.
- [3] MEDINA, F. G.; MARRERO, J. G.; MACÍAS-ALONSO, M.; GONZÁLEZ, M. C.; CORDOVA-GUERRERO, I.; GARCÍA, A. G. T.; OSEGUEDA-ROBLES, S. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 10, p. 1472-1507, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c4np00162a>.
- [4] BARDAJEE, G.; JAFARPOUR, F.; AFSARI, H. $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$: an efficient catalyst for rapid one-pot synthesis of 3-carboxycoumarins under ultrasound irradiation in water. **Open Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 370-374. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/s11532-009-0141-9>.
- [5] FIORITO, S.; TADDEO, V. A.; GENOVESE, S.; EPIFANO, F. A green chemical synthesis of coumarin-3-carboxylic and cinnamic acids using crop-derived products and waste waters as solvents. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 43, p. 4795-4798, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.09.023>.
- [6] KOUR, J.; GUPTA, M.; CHOWHAN, B.; GUPTA, V. K. Carbon-based nanocatalyst: an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for one-pot synthesis of gem-bisamides, hexahydroacridine-1,8-diones and 1,8-dioxo-octahydroxanthenes. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 16, n. 12, p. 2587-2612, 18 jul. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13738-019-01723-1>.
- [7] BRAHMACHARI, G. Room Temperature One-Pot Green Synthesis of Coumarin-3-carboxylic Acids in Water: a practical method for the large-scale synthesis. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 9, p. 2350-2358, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00826>.
- [8] FALLAH, A.; TAJBAKHS, M.; VAHEDI, H.; BEKHRADNIA, A. Natural phosphate as an efficient and green catalyst for synthesis of tetraketone and xanthene derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, n. 1, p. 29-43, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-016-2603-y>.
- [9] MAHARVI, G. M.; ALI, S.; RIAZ, N.; AFZA, N.; MALIK, A.; ASHRAF, M.; IQBAL, L.; LATEEF, M. Mild and efficient synthesis of new tetraketones as lipoxxygenase inhibitors and antioxidants. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 62-69, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14756360701408754>.
- [10] FERNANDES, L. S.; SILVA, M. L.; DIAS, R. S.; LUCINDO, M. S. S.; SILVA, Í. E. P.; SILVA, C. C.; TEIXEIRA, R. R.; PAULA, S. O. Evaluation of Antiviral Activity of Cyclic Ketones against Mayaro Virus. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2123, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v13112123>.

- [11] THAKUR, R. K.; JOSHI, P.; UPADHYAYA, K.; SINGH, K.; SHARMA, G.; SHUKLA, S. K.; TRIPATHI, R.; TRIPATHI, R. P. Synthesis of isatin based N1-alkylated 3- β -C-glycoconjugated-oxopropylidene oxindoles as potent antiplasmodial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 162, p. 448-454, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.008>.
- [12] GHORBANI, F.; POURMOUSAVI, S. A.; KIYANI, H.. Novel Biomass Derived from Grape Pomace Waste as an Efficient Nanocatalyst for the Synthesis of Dibenzoxanthene, Tetraketone, bis(indolyl)alkane and Chromene Derivatives and their Antimicrobial Evaluation. **Current Organic Synthesis**, v. 17, n. 6, p. 440-456, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1570179417666200409144600>.
- [13] POGOSYAN, S. A.; POGOSYAN, M. V.; ALEKSANYAN, L. R.; SAFARYAN, A. S.; ARAKELYAN, A. G. Synthesis and Biological Activity of Substituted Spiro[chromene-4,3'-indoles] and Spiro[indole-3,4'-quinolines]. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 1860-1863, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1134/s1070428018120254>.
- [14] PATEL, M. S.; PAREKH, J. N.; CHUDASAMA, D. D.; PATEL, H. C.; DALWADI, P.; KUNJADIYA, A.; BHATT, V.; RAM, K. R. Meglumine-Promoted Eco-Compatible Pseudo-Three-Component Reaction for the Synthesis of 1,1-Dihomoarylmethane Scaffolds and Their Green Credentials. **Acs Omega**, v. 7, n. 34, p. 30420-30439, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.2c03787>.
- [15] SALEEM, M.; AHMAD, M.; MEHMOOD, R. F.; SHAHEEN, A.; QAISER, S.; NIAZ, S. I.; ALI, M.; IRSHAD, M.; MEHMOOD, S.; ABUBSHAIT, S. A. Synthesis of Isatin Derivatives Exhibiting Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities. **Current Organic Synthesis**, v. 19, n. 6, p. 748-756, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1570179419666220128091313>.
- [16] AL-OMRAN, F.; MOHAREB, R. M.; EL-KHAIR, A. A. New route for synthesis, spectroscopy, and X-ray studies of 2-[aryl-(6'-hydroxy-4',4'-dimethyl-2'-oxocyclohex-6'-enyl)methyl]-3-hydroxy-5,5-dimethylcyclohex-2-enone and 1,8-dioxo-octahydroxanthenes and antitumor evaluation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 4, p. 1623-1633, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-013-0712-3>.
- [17] JIANG, X.; SUN, Y.; YAO, J.; CAO, Y.; KAI, M.; HE, N.; ZHANG, X.; WANG, Yiqing; WANG, R. Core Scaffold-Inspired Concise Synthesis of Chiral Spirooxindole-Pyranopyrimidines with Broad-Spectrum Anticancer Potency. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 354, n. 5, p. 917-925, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201100792>.
- [18] KALLA, R. M. N.; KARUNAKARAN, R. S.; BALAJI, M.; KIM, Il. Catalyst-Free Synthesis of Xanthene and Pyrimidine-Fused Heterocyclic Derivatives at Water-Ethanol Medium and Their Antioxidant Properties. **Chemistryselect**, v. 4, n. 2, p. 644-649, 14 jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201803449>.
- [19] FERREIRA, J.; RESENDE FILHO, J.; BATISTA, P.; TEOTONIO, E.; VALE, J. Rapid and Efficient Uncatalyzed Knoevenagel Condensations from Binary Mixture of Ethanol and Water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 7, p. 1382-1387, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170240>.

- [20] CHAVAN, H. V.; BANDGAR, B. P. Aqueous Extract of *Acacia concinna* Pods: an efficient surfactant type catalyst for synthesis of 3-carboxycoumarins and cinnamic acids via knoevenagel condensation. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 8, p. 929-936, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/sc4000237>.
- [21] MARKAD, D.; KHULLAR, S.; MANDAL, S. K. A Primary Amide-Functionalized Heterogeneous Catalyst for the Synthesis of Coumarin-3-carboxylic Acids via a Tandem Reaction. **Inorganic Chemistry**, v. 59, n. 16, p. 11407-11416, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01178>.
- [22] CHAKRABORTY, S.; PAUL, B.; NATARAJAN, R.; HOSSAIN, J.; MAJUMDAR, S. Ecofriendly Approach for the Large-Scale Synthesis of 4-Unsubstituted Coumarin-3-carboxylic Acids from o-Hydroxy-araldehydes with Meldrum's Acid in the Water-SDS Micellar System. **Chemistryselect**, v. 8, n. 3, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202204128>.
- [23] PINTO, L. S.; SOUZA, M. Sonochemistry as a General Procedure for the Synthesis of Coumarins, Including Multigram Synthesis. **Synthesis**, v. 49, n. 12, p. 2677-2682, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1590201>.
- [24] ABRANTES, P. G.; COSTA, I. F.; FALCÃO, N. K. S. M.; FERREIRA, J. M. G. O.; LIMA JUNIOR, C. G.; TEOTONIO, E. E. S.; VALE, J. A. The Efficient Knoevenagel Condensation Promoted by Bifunctional Heterogenized Catalyst Based Chitosan-EDTA at Room Temperature. **Catalysis Letters**, v. 153, n. 4, p. 945-955, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10562-022-04034-y>.
- [25] HUANG, G.; LIU, Y.; CAI, J. L.; CHEN, X. F.; ZHAO, S. K.; GUO, Y. A.; WEI, S. J.; LI, X. Heterogeneous biomimetic catalysis using iron porphyrin for cyclohexane oxidation promoted by chitosan. **Applied Surface Science**, v. 402, p. 436-443, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.01.082>.
- [26] KUMARI, S.; KISHOR, R. Chitin and chitosan: origin, properties, and applications. **Handbook of Chitin and Chitosan**, p. 1-33, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817970-3.00001-8>.
- [27] MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; LACABA, K. de. Chitosan as a bioactive polymer: processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358-1368, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>.
- [28] ZHALEH, S.; HAZERI, N.; FAGHIHI, M. R.; MAGHSOODLOU, M. T. Chitosan: a sustainable, reusable and biodegradable organocatalyst for green synthesis of 1,4-dihydropyridine derivatives under solvent-free condition. **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 12, p. 8069-8081, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-016-2579-7>.
- [29] SAKTHIVEL, B.; DHAKSHINAMOORTHY, A. Chitosan as a reusable solid base catalyst for Knoevenagel condensation reaction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 485, p. 75-80, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.020>.

- [30] RANI, D.; SINGLA, P.; AGARWAL, J. 'Chitosan in water' as an eco-friendly and efficient catalytic system for Knoevenagel condensation reaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 355-364, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.008>.
- [31] ASGHARI-HAJI, F.; RAD-MOGHADAM, K.; MAHMOODI, N. O. An efficient approach to bis-benzoquinonylmethanes on water under catalysis of the bio-derived O-carboxymethyl chitosan. **RSC Advances**, v. 6, n. 33, p. 27388-27394, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c5ra26580k>.
- [32] LAL, J.; GUPTA, S. K.; AGARWAL, D. D. Chitosan: an efficient biodegradable and recyclable green catalyst for one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidinones of curcumin in aqueous media. **Catalysis Communications**, v. 27, p. 38-43, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2012.06.017>.
- [33] PATRA, G. K. **Fundamentals and Prospects of Catalysis. Catalysis: current and future developments**. 2. ed.: Bentham Science Publishers, 2020. 267 p.
- [34] VÉDRINE, J. C. Fundamentals of heterogeneous catalysis. **Metal Oxides in Heterogeneous Catalysis**, p. 1-41, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811631-9.00001-6>.
- [35] BYSTRZANOWSKA, M.; PETKOV, P.; TOBISZEWSKI, M. Ranking of Heterogeneous Catalysts Metals by Their Greenness. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 22, p. 18434-18443, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b04230>.
- [36] ROSS, J. R. H. **Contemporary Catalysis: Fundamentals and Current Applications**. 5. ed.: Elsevier, 2018. 402 p.
- [37] MICHON, C.; AGBOSSOU-NIEDERCORN, F. Bifunctional Homogeneous Catalysts Based on Ruthenium, Rhodium and Iridium in Asymmetric Hydrogenation. **Series On Chemistry, Energy and the Environment**, p. 281-367, 22 jun. 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.1142/9789811248436_0009.
- [38] GARCÍA-ÁLVAREZ, J. Special Issue: advances in homogeneous catalysis. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1493, 25 mar. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25071493>.
- [39] FRIEND, C. M.; XU, B. Heterogeneous Catalysis: a central science for a sustainable future. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 3, p. 517-521, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00510>.
- [40] ROSS, J. R.H. Heterogeneous Catalysis – Chemistry in Two Dimensions. **Heterogeneous Catalysis**, p. 1-15, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-53363-0.10001-5>.
- [41] YU, X.; WILLIAMS, C. T. Recent advances in the applications of mesoporous silica in heterogeneous catalysis. **Catalysis Science & Technology**, v. 12, n. 19, p. 5765-5794, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/d2cy00001f>.

- [42] RAJAPAKSHA, R.; SAMANTA, P.; QUADRELLI, E. A.; CANIVET, J. Heterogenization of molecular catalysts within porous solids: the case of Ni-catalyzed ethylene oligomerization from zeolites to metal organic frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 52, n. 22, p. 8059-8076, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/d3cs00188a>.
- [43] BATOOL, S.; LANGER, M.; MYAKALA, S. N.; HEILAND, M.; EDER, D.; STREB, C.; CHEREVAN, A. Thiomolybdate Clusters: from homogeneous catalysis to heterogenization and active sites. **Advanced Material**, p. 1-22, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/adma.202305730>.
- [44] CHEN, T.; PENG, Y.; QIU, M.; YI, C.; XU, Z. Heterogenization of homogeneous catalysts in polymer nanoparticles: from easier recovery and reuse to more efficient catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 489, p. 215195, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215195>.
- [45] BOMMARIUS, A. S. Biocatalysis: a status report. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 6, n. 1, p. 319-345, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061114-123415>.
- [46] DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. An Overview of the Different Types of Catalysts in Organic Synthesis. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 840-871, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120060>.
- [47] SINGH, T.; ATREYA, V.; JALWAL, S.; ANAND, A.; CHAKRABORTY, S. Advances in Group VI Metal-Catalyzed Homogeneous Hydrogenation and Dehydrogenation Reactions. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 18, n. 23, p. 1, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/asia.202300758>.
- [48] ROSSI, R.; BELLINA, F.; CARPITA, A. Palladium Catalysts for the Suzuki Cross-Coupling Reaction: an overview of recent advances. **Synthesis**, v. 2004, n. 15, p. 2419-2440, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-831223>.
- [49] TENG, S.; TESSENSOHN, M. E.; WEBSTER, R. D.; ZHOU, J. S. Palladium-Catalyzed Intermolecular Heck-Type Reaction of Epoxides. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 8, p. 7439-7444, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acscatal.8b02029>.
- [50] SENA, B.; ACEÑA, J. L.; ROBISCO, J. L. N.; MARTÍNEZ, B. M.; MONTANER, L. M.; FERNÁNDEZ-BACHILLER, M. I. Effectiveness of different immobilized *Candida antarctica* lipase B (CaLB) in the production of biobased oligoester derivatives from poly(butylene succinate) (PBS) and poly(butylene adipate) (PBA). **European Polymer Journal**, v. 201, p. 112575, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112575>.
- [51] ZIENIUK, B.; STĘPNIEWSKI, T. M.; FABISZEWSKA, A. Do they make a good match? Molecular dynamics studies on CALB-catalyzed esterification of 3-phenylpropionic and cinnamic acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 750, p. 109807, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2023.109807>.
- [52] ELSOUD, M. M. A.; KADY, E. M. E. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1-12, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s42269-019-0105-y>.

- [53] AZUMA, K.; IZUMI, R.; OSAKI, T.; IFUKU, S.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y. Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: old and new materials. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 1, p. 104-142, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jfb6010104>.
- [54] JAIN, A.; GULBAKE, A.; SHILPI, S.; JAIN, A.; HURKAT, P.; JAIN, S. K. A New Horizon in Modifications of Chitosan: syntheses and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 2, p. 181, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013005678>.
- [55] MINH, N. C.; VAN HOA, N.; TRUNG, T. S. Preparation, properties, and application of low-molecular-weight chitosan. **Handbook of Chitin and Chitosan**, p. 453-471, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817970-3.00015-8>.
- [56] HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 40-50, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>.
- [57] MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 6, p. 1013-1051, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.03.002>.
- [58] VUNAIN, E.; MISHRA, A. K.; MAMBA, B. B. Fundamentals of chitosan for biomedical applications. **Chitosan Based Biomaterials**, v. 1, p. 3-30, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100230-8.00001-7>.
- [59] CHOPIN, N.; GUILLORY, X.; WEISS, P.; BIDEAU, J.; COLLIEC-JOUAULT, S. Design Polysaccharides of Marine Origin: chemical modifications to reach advanced versatile compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 867-895, 2014. DOI: [10.2174/138527281807140515152334](http://dx.doi.org/10.2174/138527281807140515152334).
- [60] RAJASREE, R. An Overview on Various Modifications of Chitosan and It's Applications. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 11, p. 4175-4193, 2013. DOI: [http://dx.doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.4\(11\).4175-93](http://dx.doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.4(11).4175-93).
- [61] REN, Y.; ABBOOD, H. A.; HE, F.; PENG, H.; HUANG, K. Magnetic EDTA-modified chitosan/SiO₂/Fe₃O₄ adsorbent: preparation, characterization, and application in heavy metal adsorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 300-311, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.059>.
- [62] KHAWAR, A.; ASLAM, Z.; JAVED, S.; ABBAS, A. Pb (II) biosorption using DAP/EDTA-modified biopolymer (Chitosan). **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 11, p. 1555-1567, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00986445.2018.1460598>.
- [63] WU, D.; HU, L.; WANG, Y.; WEI, Q.; YAN, L.; YAN, T.; LI, Y.; DU, B. EDTA modified β -cyclodextrin/chitosan for rapid removal of Pb (II) and acid red from aqueous solution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 523, p. 56-64, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2018.03.080>.

- [64] MARNANI, N. N.; SHAHBAZI, A. A novel environmental-friendly nanobiocomposite synthesis by EDTA and chitosan functionalized magnetic graphene oxide for high removal of Rhodamine B: adsorption mechanism and separation property. **Chemosphere**, v. 218, p. 715-725, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.109>.
- [65] ROOSEN, J.; BINNEMANS, K. Adsorption and chromatographic separation of rare earths with EDTA- and DTPA-functionalized chitosan biopolymers. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 5, p. 1530-1540, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c3ta14622g>.
- [66] BONARDD, S.; SALDÍAS, C.; RAMÍREZ, O.; RADÍĆ, D.; RECIO, F. J.; URZĀ, M.; LEIVA, A. A novel environmentally friendly method in solid phase for in situ synthesis of chitosan-gold bionanocomposites with catalytic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 533-541, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.009>.
- [67] ESFANDIARI, M.; ABBAS, A. K.; VAKILI, M. R.; SHAHBAZI-ALAVI, H.; SAFAEI-GHOMI, J. Synthesis of benzodiazepines catalyzed by chitosan functionalized by triacid imide as a superior catalyst. **Research on Chemical Intermediates**, v. 47, n. 2, p. 483-496, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-020-04281-x>.
- [68] GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. **Progress in Polymer Science**, v. 30, n. 1, p. 71-109, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.12.001>.
- [69] MOLNAR, Á. The use of chitosan-based metal catalysts in organic transformations. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 388, p. 126-171, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.018>.
- [70] SIDDIQUI, Z. N. Chitosan catalyzed an efficient, one pot synthesis of pyridine derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 14, p. 1919-1924, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.02.111>.
- [71] LEE, M.; CHEN, B.-Y.; DEN, W. Chitosan as a Natural Polymer for Heterogeneous Catalysts Support: a short review on its applications. **Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1272-1283, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/app5041272>.
- [72] MALEKI, A.; KAMALZARE, M.; AGHAEI, M. Efficient one-pot four-component synthesis of 1,4-dihydropyridines promoted by magnetite/chitosan as a magnetically recyclable heterogeneous nanocatalyst. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 95-105, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40097-014-0140-z>.
- [73] MALEKI, A.; PAYDAR, R. Bionanostructure-catalyzed one-pot three-component synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives under solvent-free conditions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 109, p. 120-124, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.10.013>.
- [74] MALEKI, A.; GHASSEMI, M.; FIROUZI-HAJI, R. Green multicomponent synthesis of four different classes of six-membered N-containing and O-containing heterocycles catalyzed by an efficient chitosan-based magnetic bionanocomposite. **Pure and Applied Chemistry**, v. 90, n. 2, p. 387-394, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/pac-2017-0702>.

- [75] AHMED, N.; SIDDIQUI, Z. N. Cerium Supported Chitosan as an Efficient and Recyclable Heterogeneous Catalyst for Sustainable Synthesis of Spiropiperidine Derivatives. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 8, p. 1701-1707, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00223>.
- [76] ANTONY, R.; ARUN, T.; MANICKAM, S. Theodore David. A review on applications of chitosan-based Schiff bases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 615-633, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.047>.
- [77] KUHBECK, D.; SAIDULU, G.; REDDY, K. R.; DÍAZ, D. D. Critical assessment of the efficiency of chitosan biohydrogel beads as recyclable and heterogeneous organocatalyst for C–C bond formation. **Green Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 378-392, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c1gc15925a>.
- [78] KNOEVENAGEL, E. Ueber eine Darstellungsweise der Glutarsaure. 1894.
- [79] VAN BEURDEN, K.; KONING, S.; MOLENDIJK, D.; VAN SCHIJNDEL, J. The Knoevenagel reaction: a review of the unfinished treasure map to forming carbon-carbon bonds. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 13, n. 4, p. 349-364, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1851398>.
- [80] SAHANI, A. J.; BURANGE, A. S.; JAYARAM, R. V. An efficient Knoevenagel condensation of aldehydes with active methylene compounds over novel, robust CeZrO_{4-δ} catalyst. **Research on Chemical Intermediates**, v. 44, n. 12, p. 7805-7814, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-018-3587-6>.
- [81] ALMASI, M.; ZELENÁK, V.; OPANASENKO, M. V.; ČEJKA, J. Efficient and Reusable Pb (II) Metal–Organic Framework for Knoevenagel Condensation. **Catalysis Letters**, v. 148, n. 8, p. 2263-2273, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10562-018-2471-8>.
- [82] HIERRO, I.; PÉREZ, Y.; FAJARDO, M. Supported choline hydroxide (ionic liquid) on mesoporous silica as heterogeneous catalyst for Knoevenagel condensation reactions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 263, p. 173-180, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.12.024>.
- [83] RESENDE FILHO, J. B. M.; PIRES, G. P.; FERREIRA, J. M. G. O.; TEOTONIO, E. E. S.; VALE, Juliana A. Knoevenagel Condensation of Aldehydes and Ketones with Malononitrile Catalyzed by Amine Compounds-Tethered Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles. **Catalysis Letters**, v. 147, n. 1, p. 167-180, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10562-016-1916-1>.
- [84] YOUSEFIAN, M.; RAFIEE, Z. Cu-metal-organic framework supported on chitosan for efficient condensation of aromatic aldehydes and malononitrile. **Carbohydrate Polymers**, v. 228, p. 115393, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115393>.
- [85] DHAKSHINAMOORTHY, A.; HEIDENREICH, N.; LENZEN, D.; STOCK, N. Knoevenagel condensation reaction catalysed by Al-MOFs with CAU-1 and CAU-10-type structures. **Crystengcomm**, v. 19, n. 29, p. 4187-4193, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c6ce02664h>.

- [86] SEN, B.; AKDERE, E. H.; ŞAVK, A.; GÜLTEKIN, E.; PARALĐ, Ö.; GÖKSU, H.; ŞEN, F. A novel thiocarbamide functionalized graphene oxide supported bimetallic monodisperse Rh-Pt nanoparticles (RhPt/TC@GO NPs) for Knoevenagel condensation of aryl aldehydes together with malononitrile. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 225, p. 148-153, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.11.067>.
- [87] HERAVI, M. M.; JANATI, F.; ZADSIRJAN, V. Applications of Knoevenagel condensation reaction in the total synthesis of natural products. **Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly**, v. 151, n. 4, p. 439-482, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02586-6>.
- [88] ZANIN, L.; JIMENEZ, D.; BAIA, G.; MARINHO, V.; ARAUJO, I.; RAMOS, R.; SOTO, R.; FERREIRA, I.; SANTIAGO, P.; ELLENA, J. Versatile Applications of Cyanoacetic Acid in Organic Chemistry: active methylene compound for the Knoevenagel condensation and organocatalyst for the Biginelli reaction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1-16, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20240003>.
- [89] SAMPAIO, A. B. S.; MORI, M. S. S.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S.; SALVADOR, C. E. M.; ANDRADE, C. Kleber Z. Continuous Flow Photochemical Synthesis of 3-Methyl-4-arylmethylene Isoxazole-5(4H)-ones through Organic Photoredox Catalysis and Investigation of Their Larvicidal Activity. **Catalysts**, v. 13, n. 3, p. 518, 2023. <http://dx.doi.org/10.3390/catal13030518>.
- [90] SILVA, J. B. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; SILVA, A. G.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; MOREIRA, D. R.; RAMOS, M. N.; ESPÍNDOLA, J. W. P.; OLIVEIRA, A. D. T.; BRONDANI, D. J. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 162-175, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.061>.
- [91] CARDOSO-JAIME, V.; TIKHE, C. V.; DONG, S. DIMOPOULOS, G. The Role of Mosquito Hemocytes in Viral Infections. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2088, 20 set. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v14102088>.
- [92] SANTOS, T.; RODRIGUEZ, A.; ALMIRON, M.; SANHUEZA, A.; RAMON, P.; OLIVEIRA, W. K.; COELHO, G. E.; BADARÓ, R.; CORTEZ, J.; OSPINA, M. Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 16, p. 1598-1601, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc1609015>.
- [93] CHRISTOFF, R. R.; QUINTANILHA, J. H.; FERREIRA, R. O.; FERREIRA, J. C. C. G.; GUIMARÃES, Da. M.; VALÉRIO-GOMES, B.; HIGA, L. M.; ROSSI, Á. D.; BELLIO, M.; TANURI, A. Congenital Zika Virus Infection Impairs Corpus Callosum Development. **Viruses**, v. 15, n. 12, p. 2336, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/v15122336>.
- [94] BORAD, M. A.; BHOI, M. N.; PRAJAPATI, N. P.; PATEL, H. D. Review of Synthesis of Spiro Heterocyclic Compounds from Isatin. **Synthetic Communications**, v. 44, n. 7, p. 897-922, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00397911.2013.843196>.
- [95] SILVA, B. V. Isatin, a Versatile Molecule: studies in brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 707-720, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130089>.

- [96] SILVA, B. V; ESTEVES, P. M; PINTO, A. C. Chlorination of isatins with trichloroisocyanuric acid. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 2, p. 257-263, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532011000200010>.
- [97] WU, S.-Y.; CHEN, W.-L.; MA, X.-P.; LIANG, C.; SU, G.-F.; MO, D.-L. Copper-Catalyzed [3+2] Cycloaddition and Interrupted Fischer Indolization to Prepare Polycyclic Furo[2,3-b]indolines from N-Aryl Isatin Nitrones and Methylenecyclopropanes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 361, n. 5, p. 965-970, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201801327>.
- [98] ADIB, M.; YASAEI, Z.; MIRZAEI, P. A One-Pot, Multicomponent Synthesis of 5'-Amino-2,2'-dioxospiro[indoline-3,3'-pyrrole]-4'-carbonitriles. **Synlett**, v. 27, n. 03, p. 383-386, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1560963>.
- [99] GUPTA, N.; ROY, T.; GHOSH, D.; ABDI, S. H. R.; KURESHY, R. I.; KHAN, N.-U. H.; BAJAJ, H. C. Ordered short channel mesoporous silica modified with 1,3,5-triazine-piperazine as a versatile recyclable basic catalyst for cross-aldol, Knoevenagel and conjugate addition reactions with isatins. **RSC Advances**, v. 5, n. 23, p. 17843-17850, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c5ra00406c>.
- [100] AZAD, I.; KHAN, T.; AHMAD, R.; KAMAL, A.; KHAN, A. R.; NASIBULLAH, M. A Simplistic Approach for Preparation of Alkylidenemalononitrile Derivatives: characterization, in silico studies, quantum chemical evaluation, molecular docking, and in vitro biological activity evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1228, p. 129451, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129451>.
- [101] FERREIRA, J. M. G. O.; SILVA, G. A.; COELHO, M. C.; LIMA JUNIOR, C. G.; VALE, J. A. Quick synthesis of isatin-derived Knoevenagel adducts using only eco-friendly solvent. **Results in Chemistry**, v. 3, p. 100135, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100135>.
- [102] PERVEZ, H.; MANZOOR, N.; YAQUB, M.; KHAN, K. M. 5-Nitroisatin-derived thiosemicarbazones: potential antileishmanial agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 628-632, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2013.836641>.
- [103] SABT, A.; ELDEHNA, W. M.; IBRAHIM, T. M.; BEKHIT, A. A.; BATRAN, R. Z. New antileishmanial quinoline linked isatin derivatives targeting DHFR-TS and PTR1: design, synthesis, and molecular modeling studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 246, p. 114959, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114959>.
- [104] SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU, I. V.; DEY, R.; KISSINGER, R.; VALENZUELA, J. G.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends In Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.003>.
- [105] BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31204-2).

- [106] WHO. Leishmaniasis. In: World Health Organization. 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acessado em: 13 Nov. 2024.
- [107] HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-23, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/571242>.
- [108] GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25-40, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s146521>.
- [109] BAMOROVAT, M.; SHARIFI, I.; AFSHARI, S. A. K.; KARAMOOZIAN, A.; TAHMOURESI, A.; HESHMATKHAH, A.; SALARKIA, E.; KHOSRAVI, A.; PARIZI, M. H.; BARGHI, M. Poor adherence is a major barrier to the proper treatment of cutaneous leishmaniasis: a case-control field assessment in Iran. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 21, p. 21-27, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2022.11.006>.
- [110] LIN, P.-Y.; YEH, K.-S.; SU, C.-L.; SHEU, S.-Y.; CHEN, T.; OU, K.-L.; LIN, M.-H.; LEE, L.-W. Synthesis and Antibacterial Activities of Novel 4-Hydroxy-7-hydroxy- and 3-Carboxycoumarin Derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10846-10863, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules170910846>.
- [111] KAWASE, M.; VARU, B.; SHAH, A.; MOTOHASHI, N.; TANI, S.; SAITO, S.; DEBNATH, S.; MAHAPATRA, S.; DASTIDAR, S.; CHAKRABARTY, A. Antimicrobial Activity of New Coumarin Derivatives. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 01, p. 67-71, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1300004>.
- [112] ZHANG, J.; JIANG, C.-S. Synthesis and evaluation of coumarin/piperazine hybrids as acetylcholinesterase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 6, p. 1717-1727, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-018-2185-x>.
- [113] CHENG, W.; XIE, Y.; YANG, Z.; SUN, Y.; ZHANG, M.-Z.; DING, Y.; ZHANG, W. General Strategy for in Situ Generation of a Coumarin-Cu²⁺ Complex for Fluorescent Water Sensing. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 9, p. 5817-5823, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00132>.
- [114] CHEN, Z.; ZHAO, Z.; YANG, J.; GAO, X.; SANG, X.; KHAN, A.; XU, R.; FENG, M.; LIU, L.; LIU, Q. Luminescent detection of pesticides by color changeable flexible coumarin-3-carboxylic acid/GdF₃:Sm³⁺ composite film. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 261, p. 120002, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2021.120002>.
- [115] CREAVER, B. S.; EGAN, D. A.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; NOBLE, A.; THATI, B.; WALSH, M. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarin-3-carboxylatosilver (I) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, n. 12, p. 3976-3984, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2006.04.006>.
- [116] BERTAGNOLIO, S.; DOBREVA, Z.; CENTNER, C. M.; OLARU, I. D.; DONÀ, D.; BURZO, S.; HUTTNER, B. D.; CHAILLON, A.; GEBRESELASSIE, N.; WI, T. WHO global

research priorities for antimicrobial resistance in human health. **The Lancet Microbe**, v. 5, n. 11, p. 100902, 2024. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s2666-5247\(24\)00134-4](http://dx.doi.org/10.1016/s2666-5247(24)00134-4).

[117] SOLANKI, S.; DAS, H. K. Antimicrobial resistance: molecular drivers and underlying mechanisms. **Journal of Medicine, Surgery, and Public Health**, v. 3, p. 100122, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100122>.

[118] FISHER, M. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BERMAN, J.; BICANIC, T.; BIGNELL, E. M.; BOWYER, P.; BROMLEY, M.; BRÜGGEMANN, R.; GARBER, G.; CORNELLY, O. A. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>.

[119] MURRAY, C. J. L.; IKUTA, K. S.; SHARARA, F.; SWETSCHINSKI, L.; AGUILAR, G. Ro.; GRAY, A.; HAN, C.; BISIGNANO, C.; RAO, P.; WOOL, E. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).

[120] ALVIM JUNIOR, J.; DIAS, R. L. A.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; CORREA, A. G. Preparation and evaluation of a coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 763-773, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532005000500014>.

[121] BANDGAR, B. P.; UPPALLA, L. S.; KURULE, D. S. Solvent-free one-pot rapid synthesis of 3-carboxycoumarins. **Green Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 243-245, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/a905811g>.

[122] ZOLFIGOL, M. A.; AYAZI-NASRABADI, R.; BAGHERY, S. Synthesis and characterization of two novel biological-based nano organo solid acids with urea moiety and their catalytic applications in the synthesis of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ol), coumarin-3-carboxylic acid and cinnamic acid derivatives under mild and green conditions. **Rsc Advances**, v. 5, n. 88, p. 71942-71954, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c5ra14001c>.

[123] FIORITO, S.; GENOVESE, S.; TADDEO, V. A.; EPIFANO, F. Microwave-assisted synthesis of coumarin-3-carboxylic acids under ytterbium triflate catalysis. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 19, p. 2434-2436, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.03.079>.

[124] KAMAT, S. R.; MANE, A. H.; PATIL, A. D.; LOHAR, T. R.; SALUNKHE, R. S. Synthesis of xanthene and coumarin derivatives in water by using β -Cyclodextrin. **Research on Chemical Intermediates**, v. 47, n. 3, p. 911-924, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-020-04308-3>.

[125] MAIA, M.; RESENDE, D. I. S. P.; DURÃES, F.; PINTO, M. M. M.; SOUSA, E. Xanthenes in Medicinal Chemistry – Synthetic strategies and biological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, p. 113085, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113085>.

[126] KHANDELWAL, S.; TAILOR, Y. K.; RUSHELL, E.; KUMAR, M. Use of sustainable organic transformations in the construction of heterocyclic scaffolds. **Green Approaches in**

Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design, p. 245-352, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817592-7.00009-5>.

[127] MORBALE, S. T.; JADHAV, S. D.; DESHMUKH, M. B.; PATIL, S. S. Bronsted acid-type biosurfactant for heterocyclization: a green protocol for benzopyran synthesis. **RSC Advances**, v. 5, n. 103, p. 84610-84620, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c5ra13652k>.

[128] VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. 2. ed. Weinheim-Germany: Wiley, 2012. 592 p.

[129] WYPYCH, G. **Handbook of Material Weathering**. 7. ed. Ontario, Canada: Elsevier, 2025.

[130] HADJICHRISTIDIS, N.; PITSIKALIS, M.; PISPAS, S.; IATROU, H. Polymers with Complex Architecture by Living Anionic Polymerization. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 12, p. 3747-3792, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/cr9901337>.

[131] CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00007-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00007-4).

[132] WANG, Z.; CAI, G.; ZHU, J.; WANG, J.; ZHANG, Y. Treatment of advanced-stage non-small cell lung cancer: current progress and a glimpse into the future (review). **Molecular and Clinical Oncology**, v. 22, n. 5, p. 1-12, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/mco.2025.2837>.

[133] MORGADO-DIAZ, Jose Andres. **Gastrointestinal Cancers**. 5. ed. Brisbane, Australia: Exon Publications, 2022, 144 p.

[134] ALVES, R.; GONÇALVES, A. C.; RUTELLA, S.; ALMEIDA, A. M.; RIVAS, J. L.; TROUGAKOS, I. P.; RIBEIRO, A. B. S. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia—From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 4820, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13194820>.

[135] JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. **American Journal of Hematology**, v. 99, n. 11, p. 2191-2212, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.27443>.

[136] SHASHI, R.; BEGUM, N. S.; PANDAY, A. K. Green synthesis of tetraketones: crystal structure, DFT studies and hirshfeld surface analysis of 2,2-((3,4-dimethoxyphenyl) methylene) bis(3-hydroxy-5,5-dimethylcyclohex2-enone). **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 709, n. 1, p. 81-97, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15421406.2020.1829308>.

[137] MOGHADDAM, F. M.; AGHILI, S.; DANESHFAR, M.; MOGHIMI, H.; DANESHFAR, Z. Bread waste in the form of CoFe₂O₄@TBW catalyst was used as a green biocatalyst to synthesize pyranopyrazole and tetraketone derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, v. 49, n. 4, p. 1507-1543, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-022-04934-z>.

- [138] KANTEVARI, S.; BANTU, R.; NAGARAPU, L. $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ and PPA-SiO_2 catalyzed efficient one-pot Knoevenagel condensation, Michael addition and cyclo-dehydration of dimedone and aldehydes in acetonitrile, aqueous and solvent free conditions: scope and limitations. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 269, n. 1-2, p. 53-57, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2006.12.039>.
- [139] MAURYA, M. R.; MAURYA, S. K.; KUMAR, N.; AVECILLA, F. Nonoxidovanadium (IV) Complex-Catalyzed Synthesis of 2-Amino-3-cyano-4H-pyrans/4H-chromenes, Biscoumarins, and Xanthenes under Green Conditions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 89, n. 17, p. 12143-12158, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.4c01029>.
- [140] PRASAD, D.; PREETAM, A.; NATH, M. *L*-Proline-accelerated, eco-friendly synthesis of 9-substituted-2,3,4,9-tetrahydro-1H-xanthen-1-ones under mild conditions. **Comptes Rendus Chimie**, v. 16, n. 12, p. 1153-1157, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2013.05.011>.
- [141] BORAH, B.; SWAIN, S.; PATAT, M.; KUMAR, B.; PRAJAPAT, K. K.; BISWAS, R.; VASANTHA, R.; CHOWHAN, L. R. Brønsted acid catalyzed mechanochemical domino multicomponent reactions by employing liquid assisted grindstone chemistry. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-27948-y>.
- [142] MAHAPATRA, J.; DASTIDAR, S. G.; JAGANKAR, D.; ROY, N.; SHARMA, J.; MUKHERJEE, A.; MAITY, C.; PANDA, T. K.; MAL, S. S. Catalytic Synthesis of Xanthene and Unprecedented Evolution of Naphthopyrans Using Heteropoly Acid-Tantalum(V) Oxide Hybrid Composite as Promoter. **Chemistryselect**, v. 10, n. 3, p. 1-14, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202406059>.
- [143] MOHAMMADI, M. K.; KAKESH, N. Nano $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Ag}/\text{CeO}_2$ catalyzed solvent free synthesis of 1,8-dioxooctahydroxanthene derivatives as potential anti-cancer agents. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 102, n. 2, p. 101600, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jics.2025.101600>.
- [144] ESMATI, M.; ZEYNIZADEH, B. Synthesis of GO and $\text{rGO}@ \text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Ni}$ as remarkable nanocatalyst systems for solvent-free and chemoselective coupling reactions of dimedone with aromatic aldehydes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 1-18, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.6321>.
- [145] KOUR, J.; GUPTA, M.; CHOWHAN, B.; GUPTA, V. K. Carbon-based nanocatalyst: an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for one-pot synthesis of gem-bisamides, hexahydroacridine-1,8-diones and 1,8-dioxo-octahydroxanthenes. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 16, n. 12, p. 2587-2612, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13738-019-01723-1>.
- [146] THAKUR, D.; KAUR, M.; MALHI, D. S.; GARG, S.; SHARMA, A.; SOHAL, H. S. 2,2'-(Arylmethylene)bis(3-hydroxy-5,5-dimethylcyclohex-2-enone) crystals formation via atom economy reaction and their antioxidant activity. **Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly**, v. 152, n. 5, p. 537-543, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00706-021-02767-x>.
- [147] CHAUDHARY, H. R.; PATEL, P. J.; GUPTA, V. K.; PATEL, D. M. *L*-proline-Brønsted acid deep eutectic mixture (DEM) triggered consecutive Claisen-Schmidt and Michael addition

reactions. **Research on Chemical Intermediates**, v. 50, n. 3, p. 1273-1286, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-023-05215-z>.

[148] LASEMI, Z.; TAJBAKSH, M.; ALINEZHAD, H.; MEHRPARVAR, F. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene functionalized cellulose nanofibers as an efficient and reusable nanocatalyst for the synthesis of tetraketones in aqueous medium. **Research on Chemical Intermediates**, v. 46, n. 7, p. 3667-3682, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-020-04167-y>.

[149] FU, Y.; FAN, B.; CHEN, H.; HUANG, H.; HU, Y. Promiscuous enzyme-catalyzed cascade reaction: synthesis of xanthone derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 555-559, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.06.034>.

[150] GREEN, L. C.; LUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.78.12.7764>.

[151] DEBRABANT, A.; JOSHI, M. B.; PIMENTA, P. F. P.; DWYER, D. M. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 205-217, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.011>.

[152] CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

[153] NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. L. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2007000100020>.

[154] PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.913299>.

[155] HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n.3 p. 137-147, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I).

[156] FREIRE, I. C. M.; PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; MARIZ, B. A. L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16 n. 2, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_053.

- [157] ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the Minimal Inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957563>.
- [158] HAFIDH, R. R., ABDULAMIR, A. S., VERN, L. S., BAKAR, F. A., ABAS, F., JAHANSHIRI, F. AND SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801105010096>.
- [159] HOLETZ, F. B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.
- [160] SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>.
- [161] HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p.3 91-400, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032>.
- [162] BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, abr. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [163] NCUBE, N.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/ajb07.613>.
- [164] TAN, Z.-Y.; WU, K.-X.; HUANG, L.-S.; WU, R.-S.; DU, Z.-Y.; XU, D.-Z. Iron-catalyzed cross-dehydrogenative coupling of indolin-2-ones with active methylenes for direct carbon-carbon double bond formation. **Green Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 332-335, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c9gc03639c>.
- [165] DENG, H.-P.; WEI, Y.; SHI, M. Highly Regio- and Diastereoselective Construction of Spirocyclopenteneoxindoles through Phosphine-Catalyzed [3 + 2] Annulation of Morita-Baylis-Hillman Carbonates with Isatylidene Malononitriles. **Organic Letters**, v. 13, n. 13, p. 3348-3351, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ol201094f>.
- [166] MALI, S.; SHINDE, S.; DAMTE, S.; PATIL, S. Synergistic effect of natural chickpea leaf exudates acids in heterocyclization: a greener protocol for benzopyran synthesis. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 2, p. 170333, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.170333>.
- [167] KUPWADE, R. V.; PANDIT, K. S.; DESAI, U. V.; KULKARNI, M. A.; WADGAONKAR, P. P. Diethylamine-catalyzed environmentally benign synthesis of 1-oxo-hexahydroxanthenes and bis-coumarins at ambient temperature. **Research on Chemical**

Intermediates, v. 42, n. 7, p. 6313-6325, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-016-2464-4>.

[168] PORE, D. M.; SHAIKH, T. S.; UNDALE, K. A.; GAIKWAD, D. S. A green protocol for catalyst-free synthesis of 1-oxo-hexahydroxanthenes in aqueous medium. **Comptes Rendus Chimie**, v. 13, n. 12, p. 1429-1432, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2010.06.015>.

[169] SAFAEI-GHOMI, J.; ASADIAN, S.; NAZEMZADEH, S. H.; SHAHBAZI-ALAVI, H. Synthesis of Tetraketones Using ZnS Nanoparticles as an Efficient Catalyst. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 65, n. 4, p. 430-434, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jccs.201700250>.

[170] SHIRINI, F.; DANESHVAR, N. Introduction of taurine (2-aminoethanesulfonic acid) as a green bio-organic catalyst for the promotion of organic reactions under green conditions. **RSC Advances**, v. 6, n. 111, p. 110190-110205, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra15432h>.

[171] ALIREZVANI, Z.; DEKAMIN, M. G.; DAVOODI, F.; VALIEY, E. Melamine-Functionalized Chitosan: a new biobased reusable bifunctional organocatalyst for the synthesis of cyanocinnamionitrile intermediates and densely functionalized nicotinonitrile derivatives. **Chemistryselect**, v. 3, n. 37, p. 10450-10463, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201802010>.

[172] HU, X.-J.; LI, Z.-X.; XUE, H.; HUANG, X.; CAO, R.; LIU, T.-F. Designing a Bifunctional Brønsted Acid–Base Heterogeneous Catalyst Through Precise Installation of Ligands on Metal–Organic Frameworks. **CCS Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 616-622, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.31635/ccschem.019.201900040>.

[173] SINGH, A. S.; KACHGUNDE, H. G.; RAVI, K.; NAIKWADI, D. R.; BIRADAR, A. V. Bifunctional heterogeneous catalyst: a sustainable route for cyclic acetals synthesis through tandem hydroformylation-acetalization reaction. **Molecular Catalysis**, v. 555, p. 113859, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcat.2024.113859>.

[173] SZATYLOWICZ, H.; JEZUITA, A.; EJSMONT, K.; KRYGOWSKI, T. M. Substituent Effect on the σ - and π -Electron Structure of the Nitro Group and the Ring in Meta- and Para-Substituted Nitrobenzenes. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 121, n. 27, p. 5196-5203, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpca.7b03418>.

[174] OLENDER, D.; WAWIAK, J.; ZAPRUTKO, L. Multidirectional Efficacy of Biologically Active Nitro Compounds Included in Medicines. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 2, p. 54, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph11020054>.

[175] MONTE, Z.; NAVARRO, D.; AGUIAR, J.; NASCIMENTO, J.; SCOTTI, M.; SCOTTI, L.; BARROS, R.; SANTOS, A.; PEREIRA, V.; FALCÃO, E. Pyrimidine Derivatives: QSAR studies of larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 7, p. 1531, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200039>.

[176] SANTOS, S. R. L.; SILVA, V. B.; MELO, M. A.; BARBOSA, J. D. F.; SANTOS, R. L. C.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. H. Toxic Effects on and Structure-Toxicity

Relationships of Phenylpropanoids, Terpenes, and Related Compounds in *Aedes aegypti* Larvae. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1049-1054, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0158>.

[177] VILVEST, J.; MILTON, M. C. J.; YAGOO, A. B.; GANESAN, R.; SHANMUGASUNDARAM, T.; KRISHNAN, M. Structural elucidation of andrographolide from *Andrographis paniculata* and its ovicidal, larvicidal and pupicidal activities against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 267, p. 108858, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2024.108858>.

[178] KUDESIA, N.; BANU, A. N. Larvicidal efficacy of green synthesized silver nanoparticles on *Aedes aegypti* and its impact on non-target *Daphnia magna*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 64, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01327-1>.

[179] GALVÃO, J. G.; CERPE, P.; SANTOS, D. A.; NASCIMENTO, A. R.; ALMEIDA, R. R.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, A. F.; ANDRADE, L. N.; ALVES, P. B. *Lippia gracilis* essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 452-459, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.5138>.

[180] ELEFThERIANOS, I.; HERYANTO, C.; BASSAL, T.; ZHANG, W.; BASSAL, M.; ZHANG, X.; REICHLER, S.; WANG, Y. Haemocyte-mediated immunity in insects: cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. **Immunology**, v. 164, n. 3, p. 401-432, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.13390>.

[181] CASTILLO, J. C.; ROBERTSON, A. E.; STRAND, M. R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 12, p. 891-903, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.08.010>.

[182] BITENCOURT, R. O. B.; CORRÊA, T. A.; SANTOS-MALLET, J.; SANTOS, D. A.; ALVES, R. J.; BARBOSA, J. D.; FERREIRA, F. M. Beauveria bassiana interacts with gut and hemocytes to manipulate *Aedes aegypti* immunity. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05655-x>.

[183] CHENG, L.; LIU, W.; SU, M. P.; WANG, H.; ZHAO, Y.; LI, Y. Prohemocytes are the main cells infected by dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05276-w>.

[184] ARAÚJO, H. C. R.; CAVALCANTI, M. G. S.; SANTOS, S. S.; MENEZES, C. R.; SILVA, R. A.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron**, v. 39, n. 2, p. 184-189, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.01.003>.

[185] FERNANDES, D. A.; OLIVEIRA, L. H. G.; RIQUE, H. L.; BATISTA, R. L.; SOUZA, J. P.; CAVALCANTI, S. C. H. Insights on the larvicidal mechanism of action of fractions and compounds from aerial parts of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 3015, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25133015>.

- [186] CERRI, F.; ARAUJO, M. S.; AGUIRRE, A. A. R.; SANTOS, C. P.; LIMA, R. R.; CASTRO, T. P.; AMARAL, I. M. *Crude saliva of Amblyomma cajennense sensu stricto* (Acari: Ixodidae) reduces locomotor activity and increases the hemocyte number in the females of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 251, p. 108570, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108570>.
- [187] HILLYER, J. F.; ESTEVEZ-LAO, T. Y. Nitric oxide is an essential component of the hemocyte-mediated mosquito immune response against bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 2, p. 141-149, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.08.014>.
- [188] HALL, C. N.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? **Nitric Oxide**, v. 21, n. 2, p. 92-103, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.07.002>.
- [189] NUNES, F. C.; LEITE, J. A.; OLIVEIRA, L. H. G.; BARBOSA, J. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MELO, M. A.; SANTOS, R. L. C. The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. **Parasitology Research**, v. 114, n. 2, p. 543-549, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4216-y>.
- [190] ALMEIDA, F. S.; MOREIRA, V. P.; SILVA, E. S.; CARDOSO, L. L.; PALMEIRA, P. H. S.; CAVALCANTE, S. L. H. A.; ARAUJO, D. A. M.; AMARAL, I. P. G.; GONZÁLEZ, E. R. P.; KEESEN, T. S. L. Leishmanicidal Activity of Guanidine Derivatives Against *Leishmania infantum*. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 3, p. 141, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed8030141>.
- [191] CRAIG, P. N. Interdependence Between Physical Parameters and Selection of Substituent Groups for Correlation Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 680-684, 1971. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm00290a004>.
- [192] HASSANZADEH, F.; HEJAZI, S. H.; JAFARI, E.; FARD, A. M.; SADEGHI, A. H. Molecular Docking and Synthesis of N-Alkyl-Isatin-3-Imino Aromatic Amine Derivatives and Their Antileishmanial and Cytotoxic Activities. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 238-250, 2024. DOI: http://dx.doi.org/10.4103/rps.rps_244_22.
- [193] KHATOON, S.; AROOSH, A.; ISLAM, A.; KALSOOM, S.; AHMAD, F.; HAMEED, S.; ABBASI, S. W.; YASINZAI, M.; NASEER, M. M. Novel Coumarin-Isatin Hybrids as Potent Antileishmanial Agents: Synthesis, *in Silico* and *in Vitro* Evaluations. **Bioorganic Chemistry**, v. 110, p. 104816, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104816>.
- [194] HELLER, S. T.; SILVERSTEIN, T. P. PKa values in the undergraduate curriculum: introducing pKa values measured in DMSO to illustrate solvent effects. **Chemtexts**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40828-020-00112-z>.
- [195] KNIPE, A. C. **Organic Reaction Mechanisms 2014**: an annual survey covering the literature dated january to december 2014. Uk: Wiley, 2018. 1024 p.

- [196] ZHOU, F.; HEARNE, Z.; LI, C.-J. Water—the greenest solvent overall. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 18, p. 118-123, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.05.004>.
- [197] SIKDAR, S. K. Sustainability Perspective and Chemistry-Based Technologies. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 14, p. 4727-4733, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ie0700056>.
- [198] GÜLLER, P.; DAĞALAN, Z.; GÜLLER, U.; ÇALĐĐR, U.; NİĐANCĐ, B. Enzymes inhibition profiles and antibacterial activities of benzyliidenemalononitrile derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1239, p. 130498, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130498>.
- [199] YORDANOVA, S.; VASILEVA-TONKOVA, E.; STANEVA, D.; STOYANOV, S.; GRABCHEV, I. Synthesis and characterization of new water soluble 9,10-anthraquinone and evaluation of its antimicrobial activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1168, p. 22-27, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.007>.
- [200] SLAWSON, R. M.; VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. **Plasmid**, v. 27, n. 1, p. 72-79, 1992. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0147-619x\(92\)90008-x](http://dx.doi.org/10.1016/0147-619x(92)90008-x).
- [201] ZHAO, G.; STEVENS JÚNIOR, S. E. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. **Biometals**, v. 11, n. 1, p. 27-32, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1009253223055>.
- [202] KARATAS, H.; TURKMENOGLU, B.; KOKBUDAK, Z.; AKKOC, S. Synthesis, Molecular Docking, and Antiproliferative Activity Studies of Bromine Bearing Schiff Bases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 761, p. 151739, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.151739>.
- [203] WILCKEN, R.; ZIMMERMANN, M. O.; LANGE, A.; ZAHN, S.; BOECKLER, F. M. Using Halogen Bonds to Address the Protein Backbone: A Systematic Evaluation. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 8, p. 935-945, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-012-9592-8>.
- [204] CAVALLO, G.; METRANGOLO, P.; MILANI, R.; PILATI, T.; PRIIMAGI, A.; RESNATI, G.; TERRANEO, G. The Halogen Bond. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2478-2601, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00484>.
- [205] HERBERS, S.; BUSCHMANN, P.; WANG, J.; LENGSELD, K. G.; NAIR, K. P. R.; GRABOW, J. U. Reactivity and Rotational Spectra: The Old Concept of Substitution Effects. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 20, p. 11490-11497, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/d0cp01145b>.
- [206] CARTIER, J. P.; SANDORFY, C. Inductive and Mesomeric Effects in Substituted Fulvene and Pyridine Derivatives. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 2759-2766, 1963. DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/v63-406>.

- [207] AMMAR, Y. A.; FARAG, A. A.; ALI, A. M.; HESSEIN, S. A.; ASKAR, A. A.; FAYED, E. A.; ELSISI, D. M.; RAGAB, A. Antimicrobial Evaluation of Thiadiazino and Thiazolo Quinoxaline Hybrids as Potential DNA Gyrase Inhibitors: Design, Synthesis, Characterization and Morphological Studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 99, p. 103841, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103841>.
- [208] LIU, H.; XIA, D. G.; CHU, Z. W.; HU, R.; CHENG, X.; LV, X. H. Novel Coumarin-Thiazolyl Ester Derivatives as Potential DNA Gyrase Inhibitors: Design, Synthesis, and Antibacterial Activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, p. 103907, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103907>.
- [209] ABRANTES, P. G.; COSTA, I. F.; ABRANTES, P. G.; MAGALHÃES, R. R.; TEIXEIRA, B. A.; GALVÃO, J. L. F. M.; LIMA, E. O.; TEOTONIO, E. E. S.; VALE, Juliana A. Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity evaluation of coumarin-3-carboxylic acids obtained via cascade reaction using chitosan as a recyclable catalyst. **New Journal of Chemistry**, v. 48, n. 29, p. 12967-12975, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/d4nj02261k>.
- [210] KALI, V.; MAITI, B. The Expediency of [BCMIM][Cl] Ionic Salt in the Synthesis of Tetraketones: Insights into Their Photophysical Properties and Theoretical Calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1299, p. 137053, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.137053>.
- [211] PEIMAN, S.; MALEKI, B. Fe₃O₄@SiO₂@NTMPThio-Cu: A Sustainable and Eco-Friendly Approach for the Synthesis of Heterocycle Derivatives Using a Novel Dendrimer Template Nanocatalyst. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 1, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-68316-8>.
- [212] KAZEMI-RAD, R.; AZIZIAN, J.; KEFAYATI, H. Improved Synthesis of 2,2-Arylmethylene Bis(3-hydroxy-5,5-dimethyl-2-cyclohexene-1-one) and 1,8-Dioxooctahydroxanthene Derivatives Catalyzed by Electrogenenerated Base and Sulfuric Acid. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 62, n. 4, p. 311-315, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jccs.201400307>.
- [213] KARIMIAN, A.; GARGARI, M. J. Green synthesis of xanthenes using a GLYMO/melamine-functionalized Fe₃O₄-based zinc nanocatalyst. **Research On Chemical Intermediates**, v. 51, n. 9, p. 4877-4905, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-025-05684-4>.
- [214] SAYAD, R.; BOUZINA, A.; BOUONE, Y. O.; BELDJEZZIA, D.; DJEMEL, A.; IBRAHIM-OUALI, M.; AOUF, N.-E.; AOUF, Z. Zinc acetate-catalyzed, green and efficient synthesis of xanthene derivatives under ultrasound irradiation: x-ray crystallographic analysis and *in silico* study. **RSC Advances**, v. 14, n. 34, p. 24585-24603, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/d4ra04135f>.
- [215] ZANG, H.; ZHANG, Y.; CHENG, B.; ZHANG, W.; XU, X.; REN, Y. An Efficient and Green One-pot Synthesis of 12-Aryl-8,9,10,12-tetrahydrobenzo[a]xanthen-11-one Derivatives Promoted by Sulfamic Acid in [BMIM]BF₄ Ionic Liquid. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 362-366, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cjoc.201180488>.

- [216] AL-FARRAJ, Eida S.; YOUNIS, Adel M.. Co/Amprone-MOF as a Green Nanocatalyst for One-Pot Synthesis of Xanthene Derivatives. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1-16, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.70169>.
- [217] M, J.; DEVASIA, J.; CHINNAM, S.; NIZAM, A.; PERIYASAMY, G.; WADHWA, P.; KRISHNA, S. B. N. 10-camphor sulfonic acid: a simple and efficient organocatalyst to access anti-sars-cov-2 benzoxanthene derivatives. **Molecular Catalysis**, v. 572, p. 114691, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcat.2024.114691>.
- [218] MERROUN, Y.; CHEHAB, S.; HALLAOUI, A. E.; GUEDIRA, T.; BOUKHRIS, S.; GHAILANE, R.; SOUIZI, A. Synthesis, Characterization, and Catalytic Application of SnP₂O₇ for the Highly Efficient Synthesis of Xanthene Derivatives. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 44, n. 7, p. 4349-4363, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10406638.2023.2247128>.
- [219] SAPKAL, B. M.; LABHANE, P. K. Graphene Oxide Sheets Decorated by Zinc Oxide Nanoparticles: an efficient and heterogeneous reusable catalyst for the synthesis of 9-aryl-1, 8-dioxooctahydroxanthenes and 9-aryl -1, 8-dioxodecahydroacridines in aqueous media. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 33, n. 02, p. 143, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.59467/ijhc.2023.33.143>.
- [220] SWAMI, M. B.; NAGARGOJE, G. R.; MATHAPATI, S. R.; BONDGE, A. S.; JADHAV, A. H.; PANCHGALLE, S. P.; MORE, V. A Magnetically Recoverable and Highly Effectual Fe₃O₄ Encapsulated MWCNTs Nano-Composite for Synthesis of 18-Dioxo-octahydroxanthene Derivatives. **Journal of Applied Organometallic Chemistry**, p. 184-198, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.22034/jaoc.2023.404091.1085>.
- [221] ZHANG, X.; LI, X.; YE, S.; ZHANG, Y.; TAO, L.; GAO, Y.; GONG, D.; XI, M.; MENG, H.; ZHANG, M. Synthesis, SAR and Biological Evaluation of Natural and Non-Natural Hydroxylated and Prenylated Xanthenes as Antitumor Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 1012-1025, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1573406411208061012>.
- [222] FATMASARI, N.; KURNIAWAN, Y. S.; JUMINA, J.; ANWAR, C.; PRIASTOMO, Y.; PRANOWO, H. D.; ZULKARNAIN, A. K.; SHOLIKHAH, E. N. Synthesis and *In Vitro* Assay of Hydroxyxanthenes as Antioxidant and Anticancer Agents. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-05573-5>.
- [223] KHAN, F. F.; ALAM, S. QSAR and Docking Studies on Xanthone Derivatives for Anticancer Activity Targeting DNA Topoisomerase II α . **Drug Design, Development and Therapy**, p. 183, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s51577>.
- [224] MILADIYAH, I.; JUMINA, J.; HARYANA, S. M.; MUSTOFA, M. Biological Activity, Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis, and Molecular Docking of Xanthone Derivatives as Anticancer Drugs. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 149-158, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s149973>.
- [225] SU, Q.-G.; LIU, Y.; CAI, Y.-C.; SUN, Y.-L.; WANG, B.; XIAN, L.-J. Anti-tumour effects of xanthone derivatives and the possible mechanisms of action. **Investigational New Drugs**, v. 29, n. 6, p. 1230-1240, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-010-9468-5>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

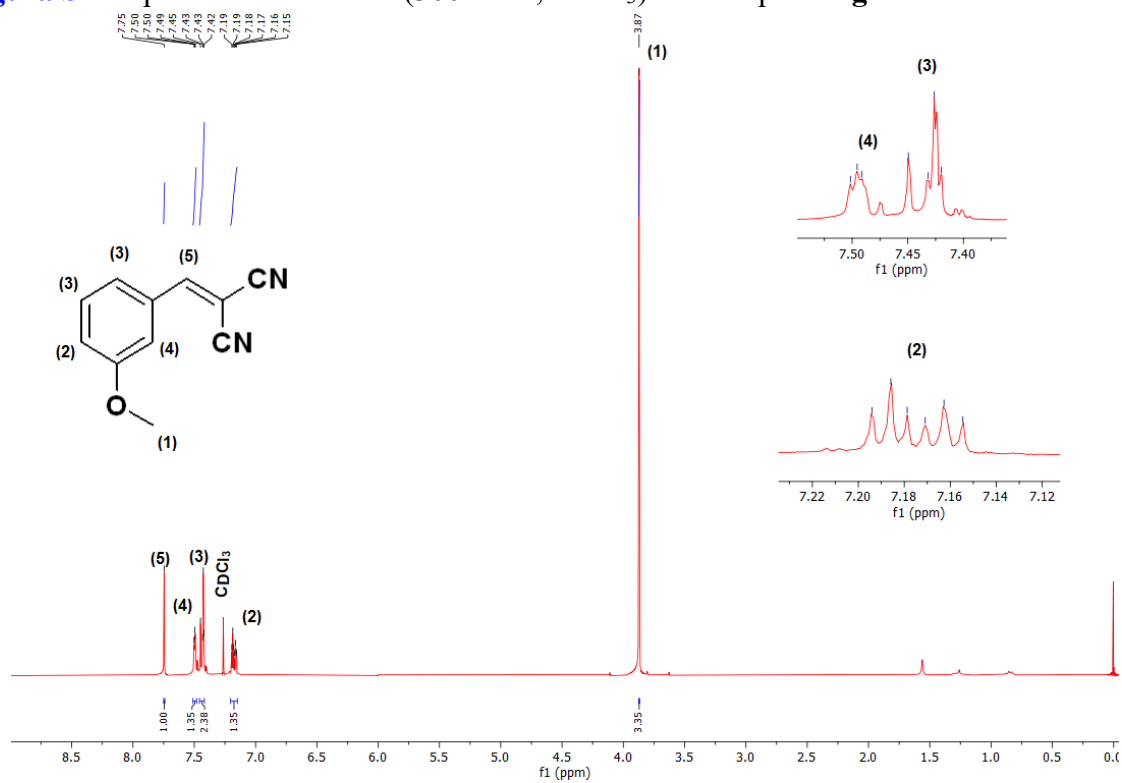
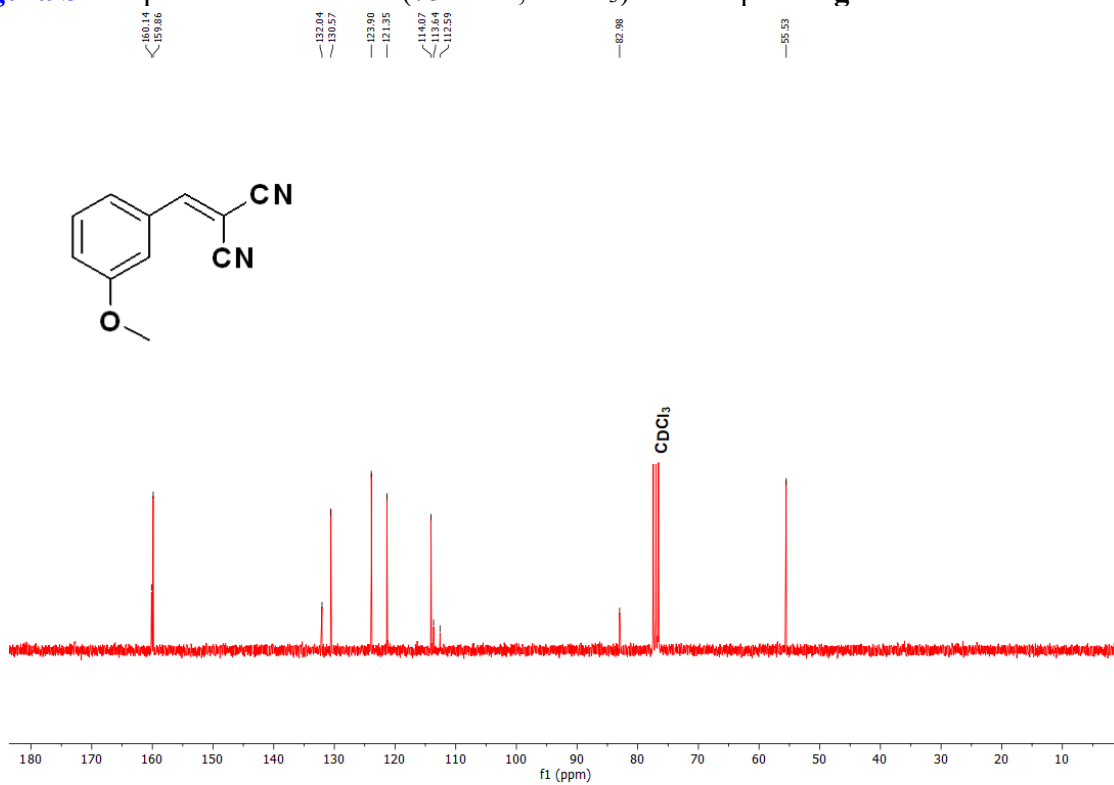
Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C **Figura S1.** Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Composto **1g**.**Figura S2.** Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Composto **1g**.

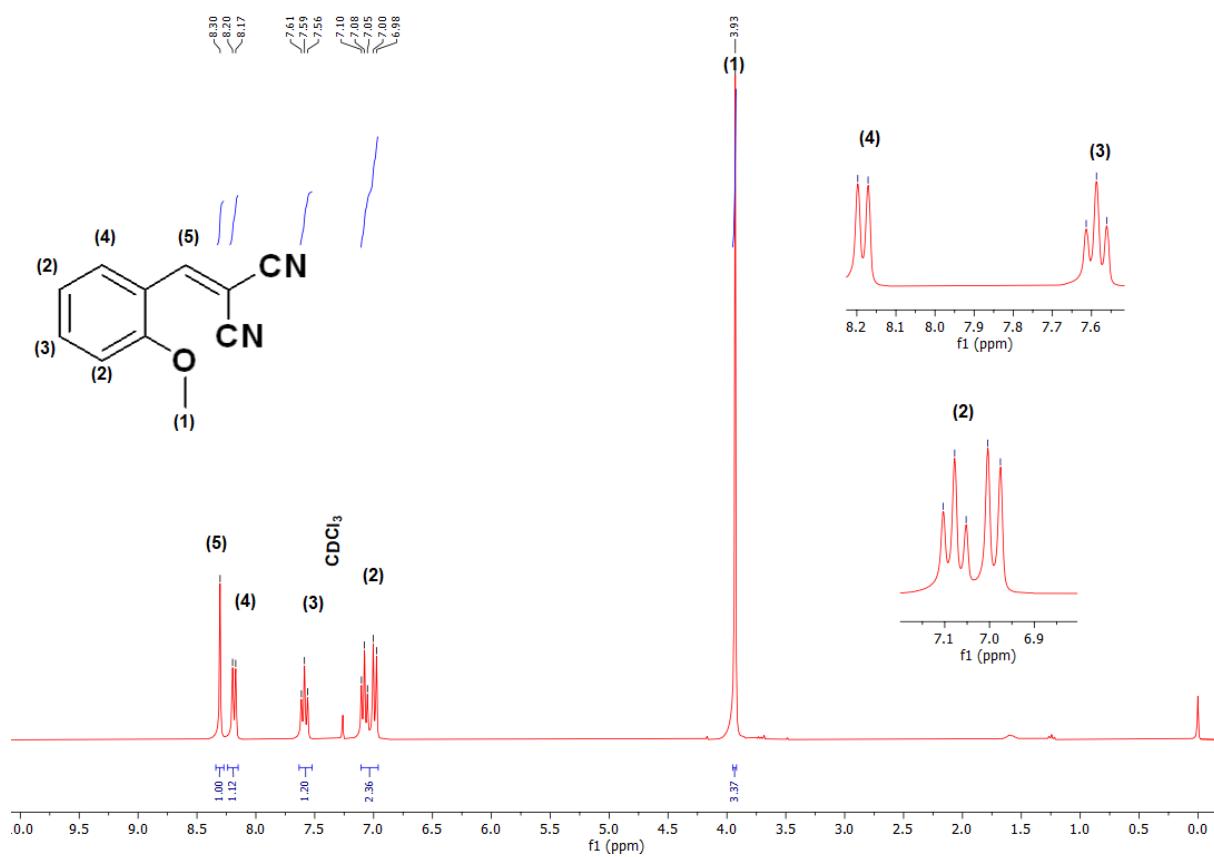
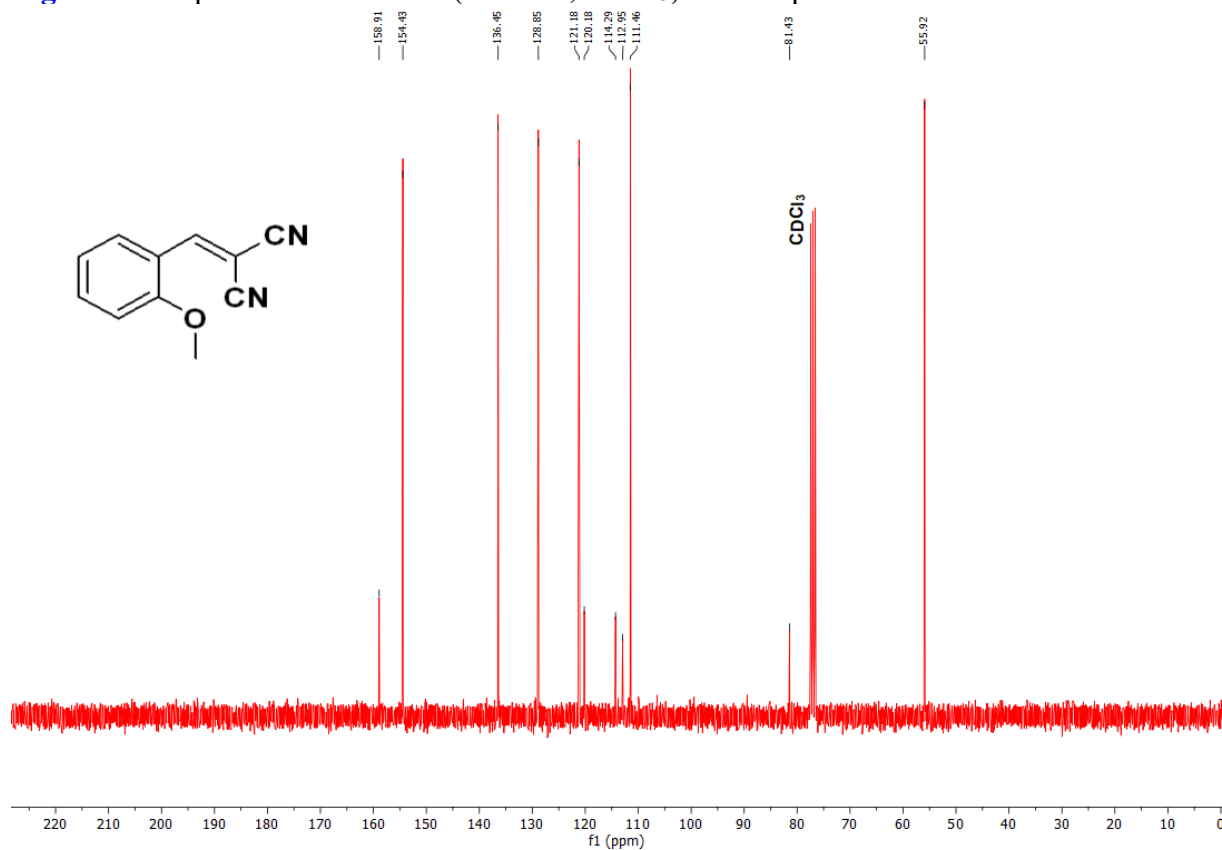
Figura S3. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Composto **1i**.**Figura S4.** Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Composto **1i**.

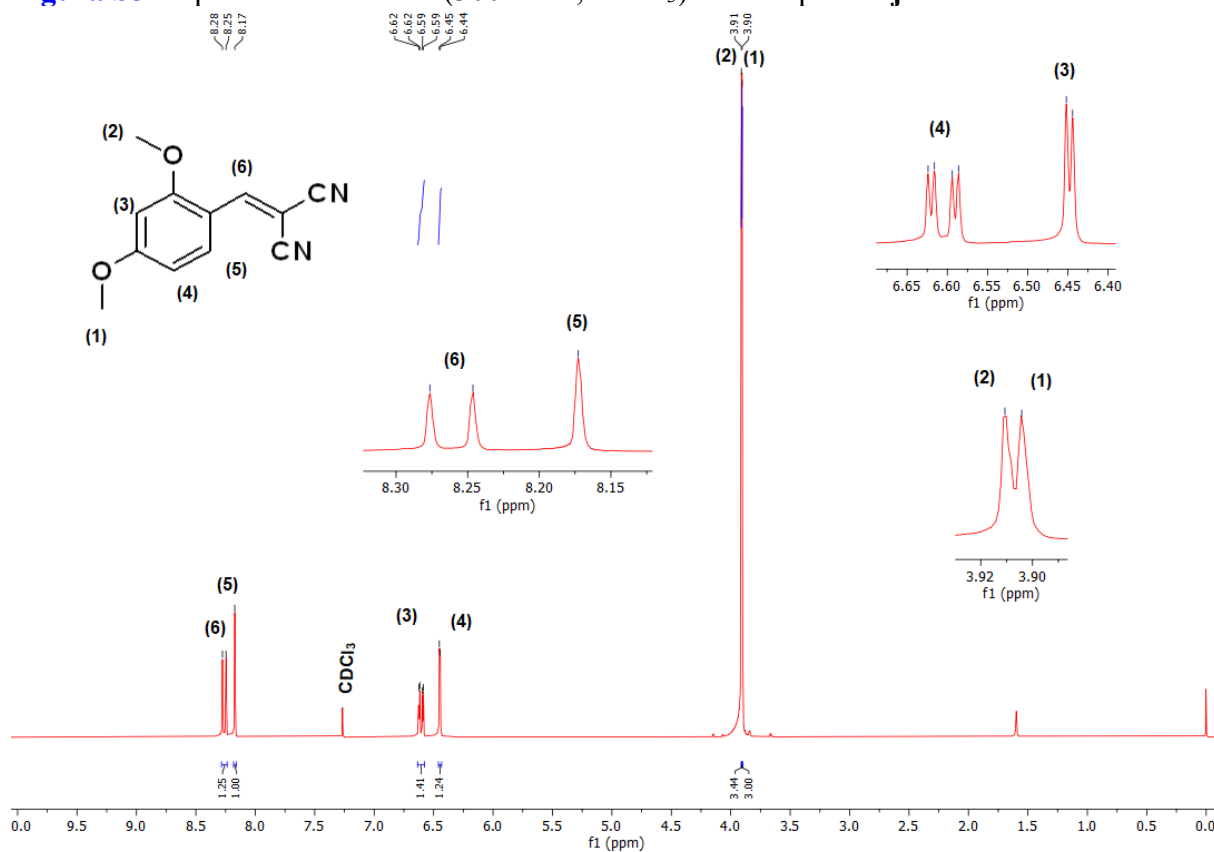
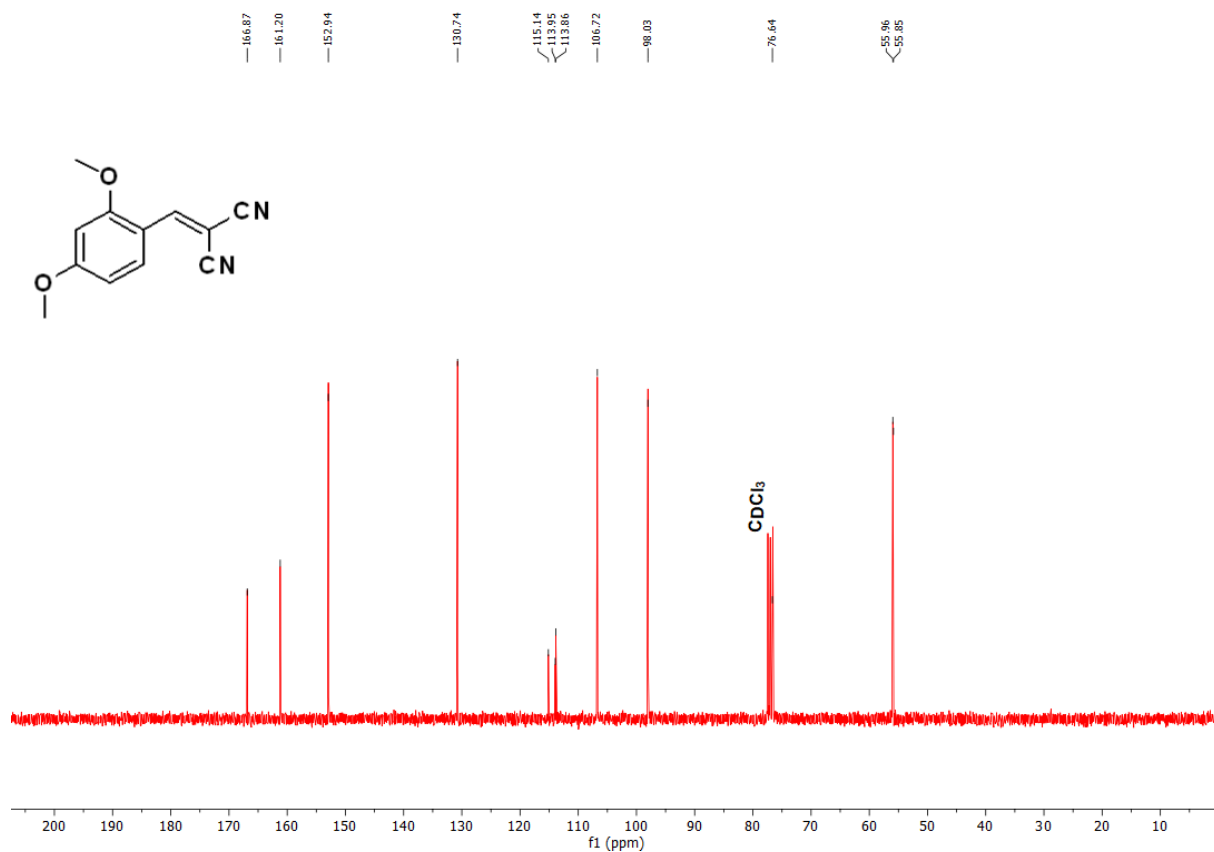
Figura S5. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Composto **1j**.**Figura S6.** Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Composto **1j**.

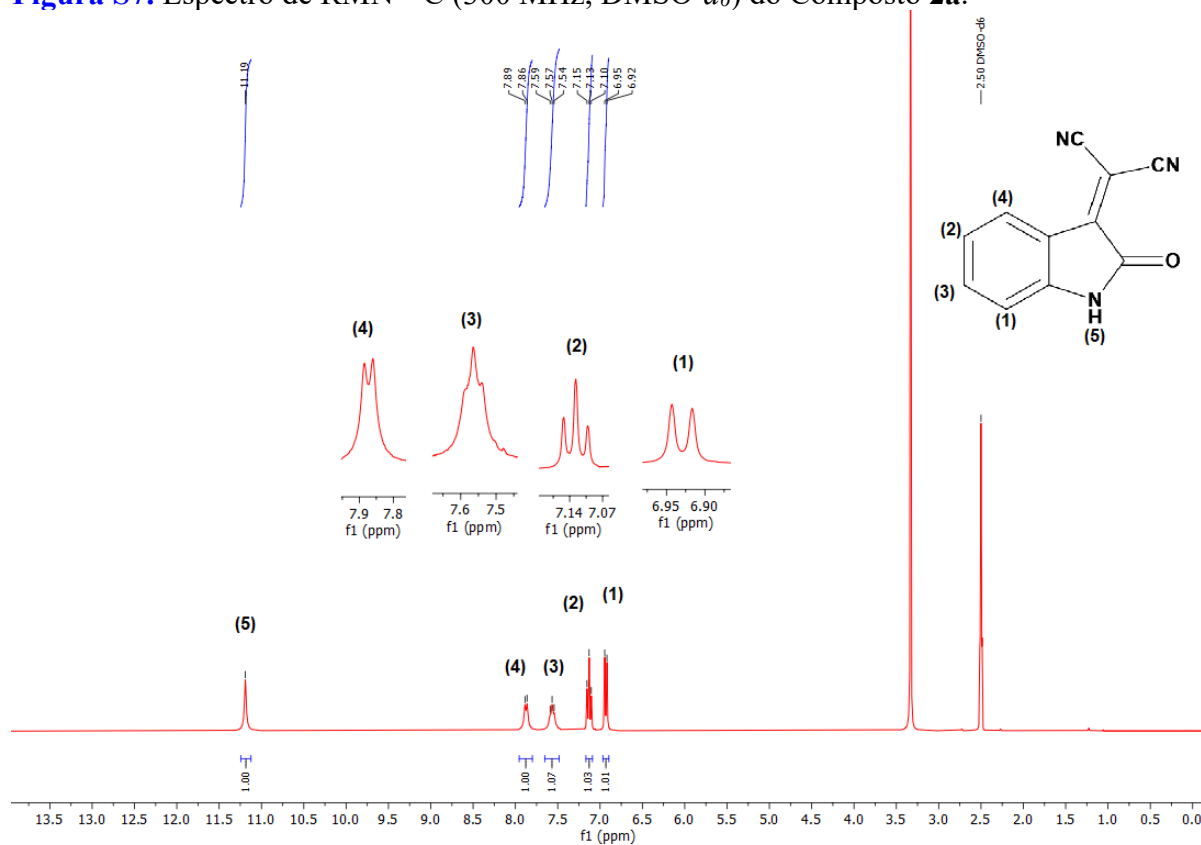
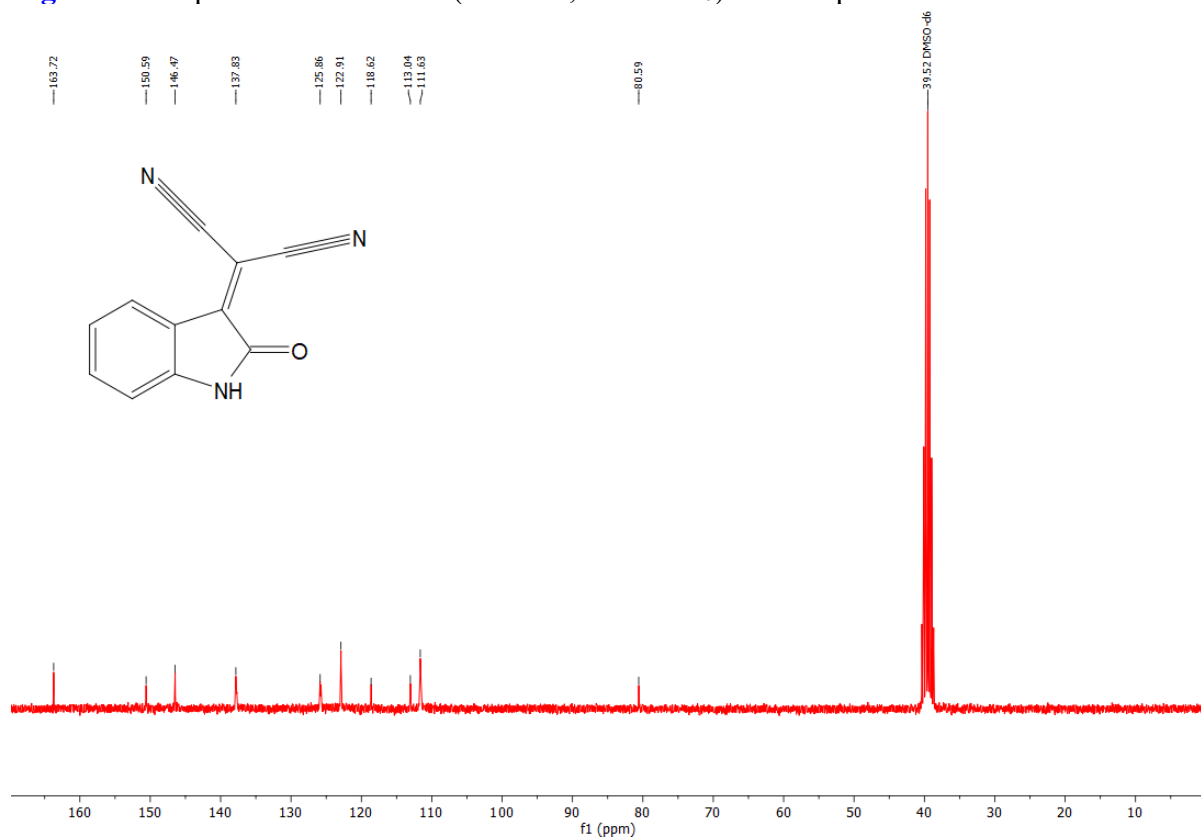
Figura S7. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2a**.**Figura S8.** Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2a**.

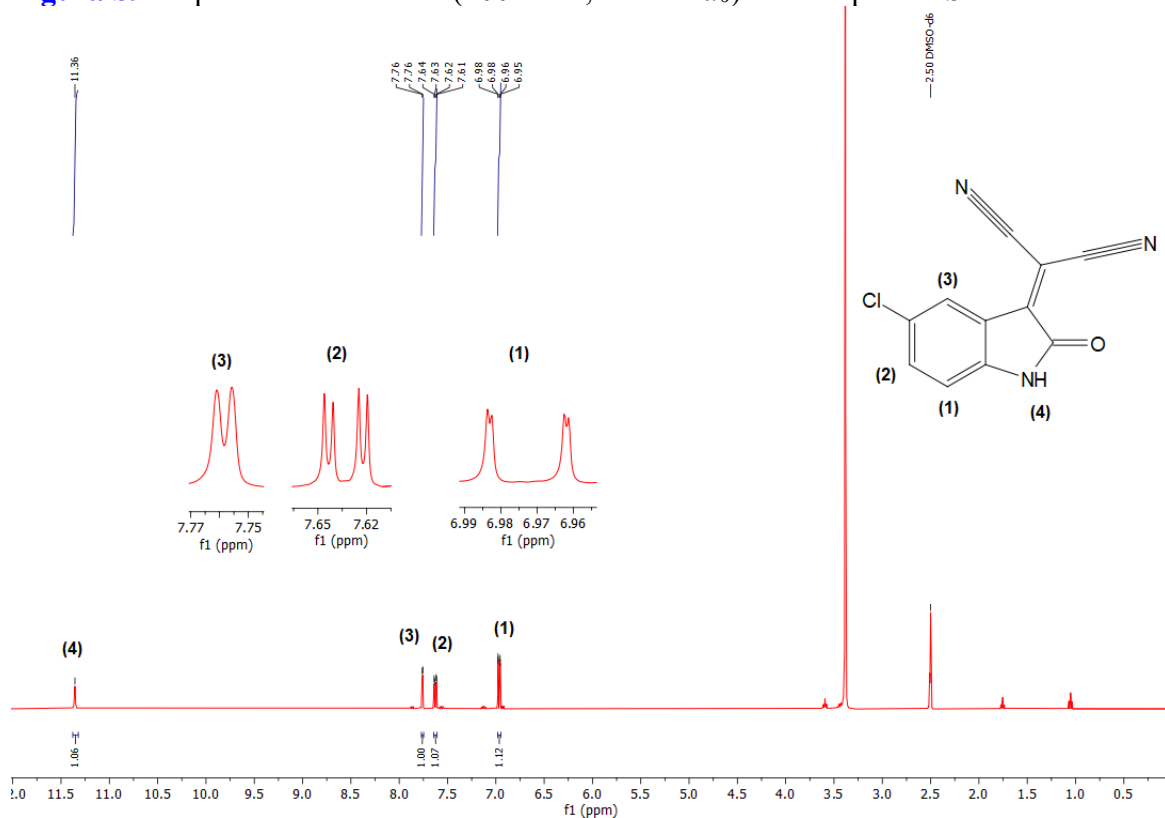
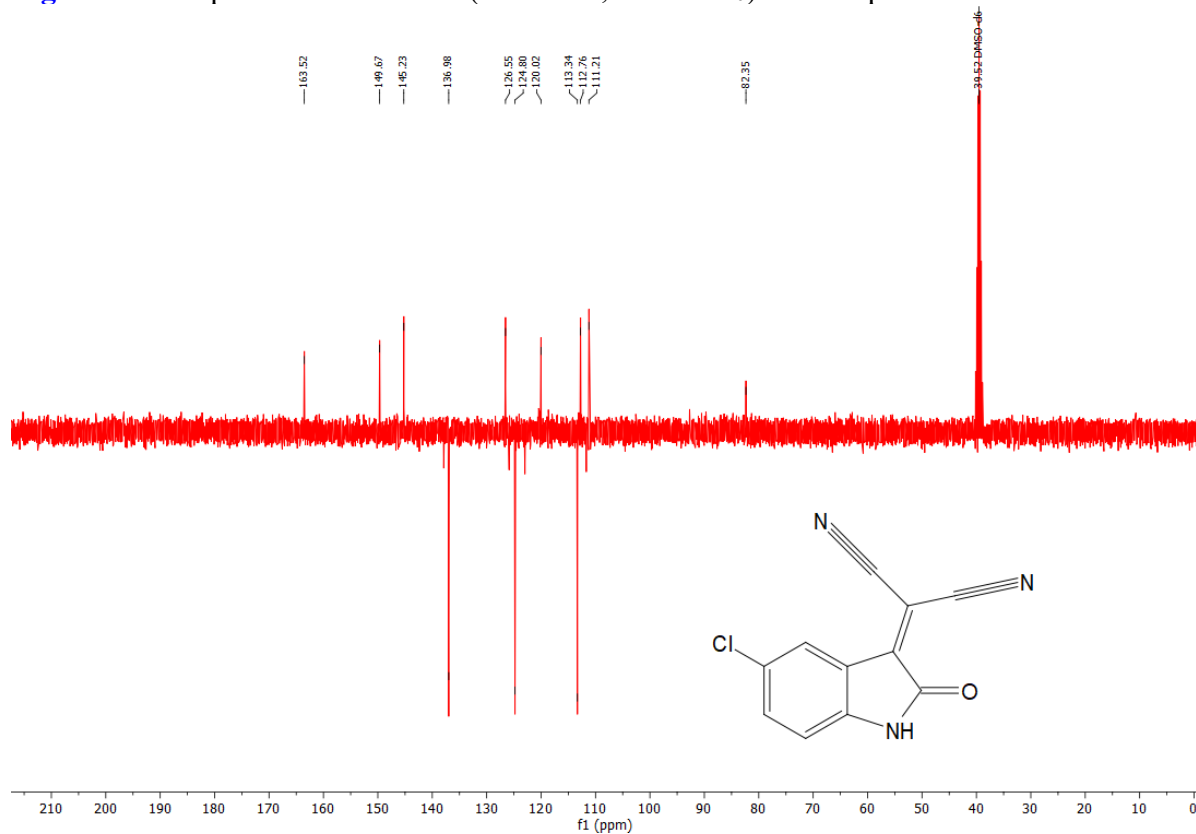
Figura S9. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto **2b**.**Figura S10.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto **2b**.

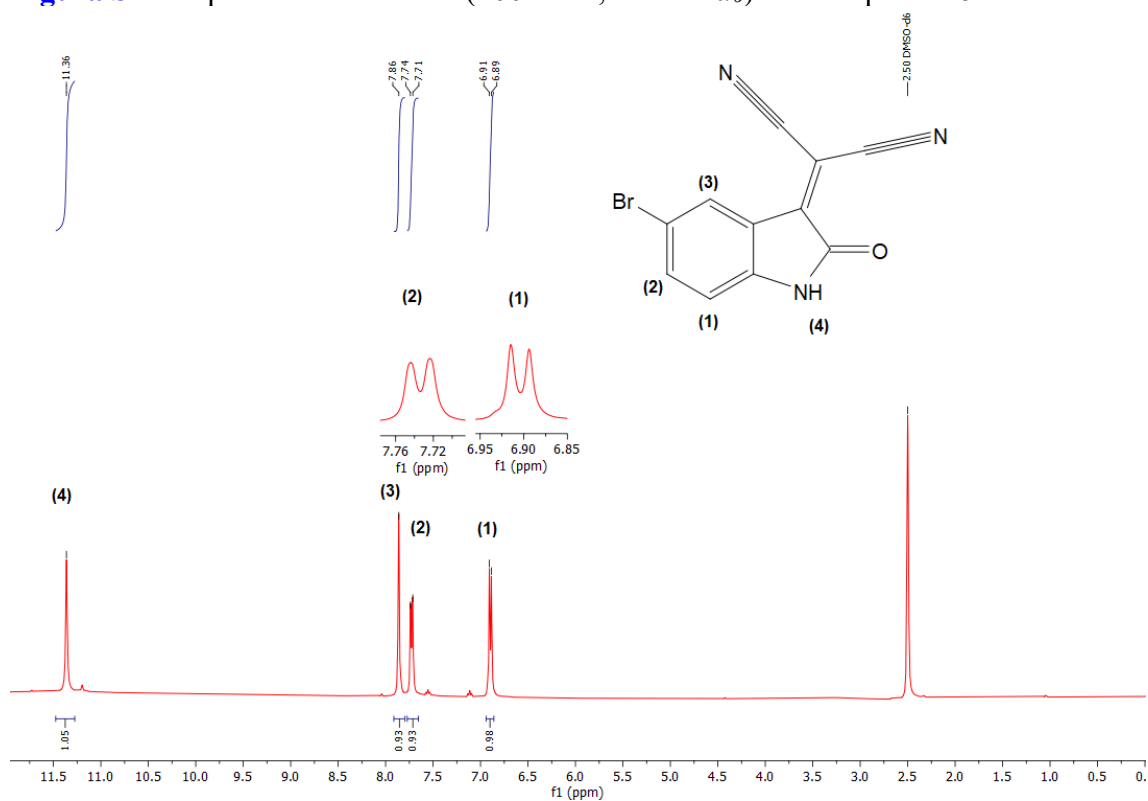
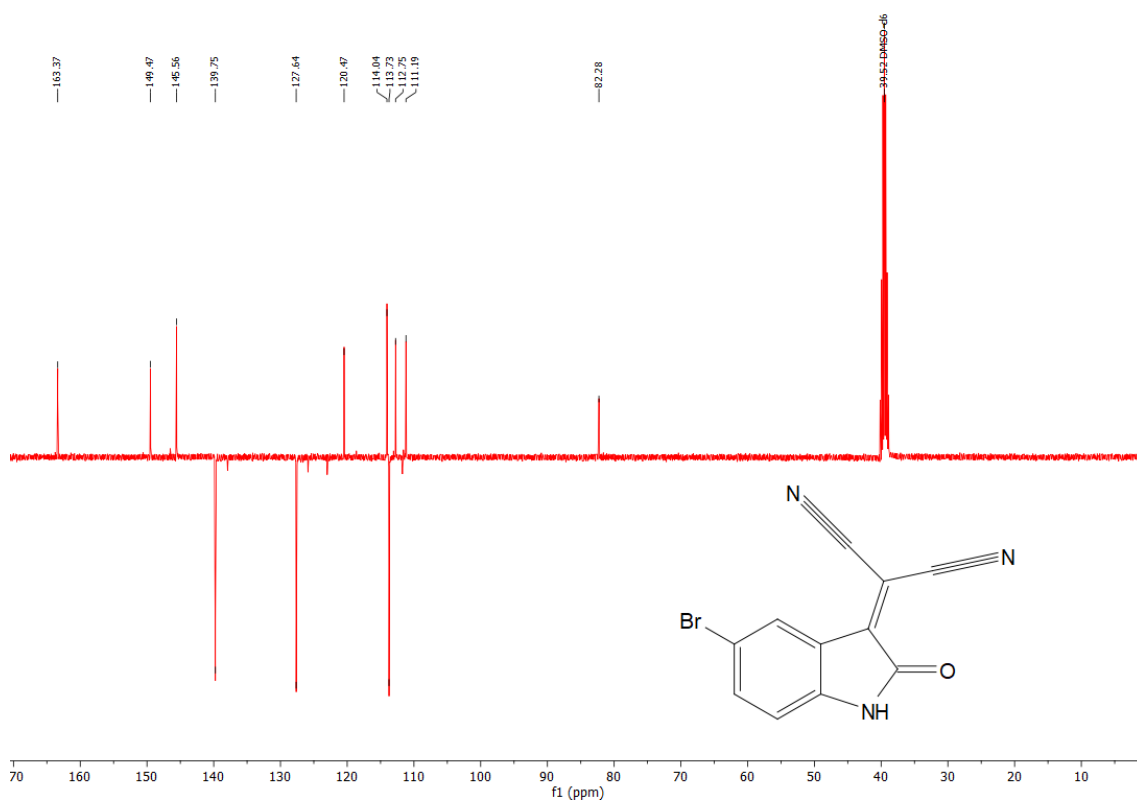
Figura S11. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2c**.**Figura S12.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2c**.

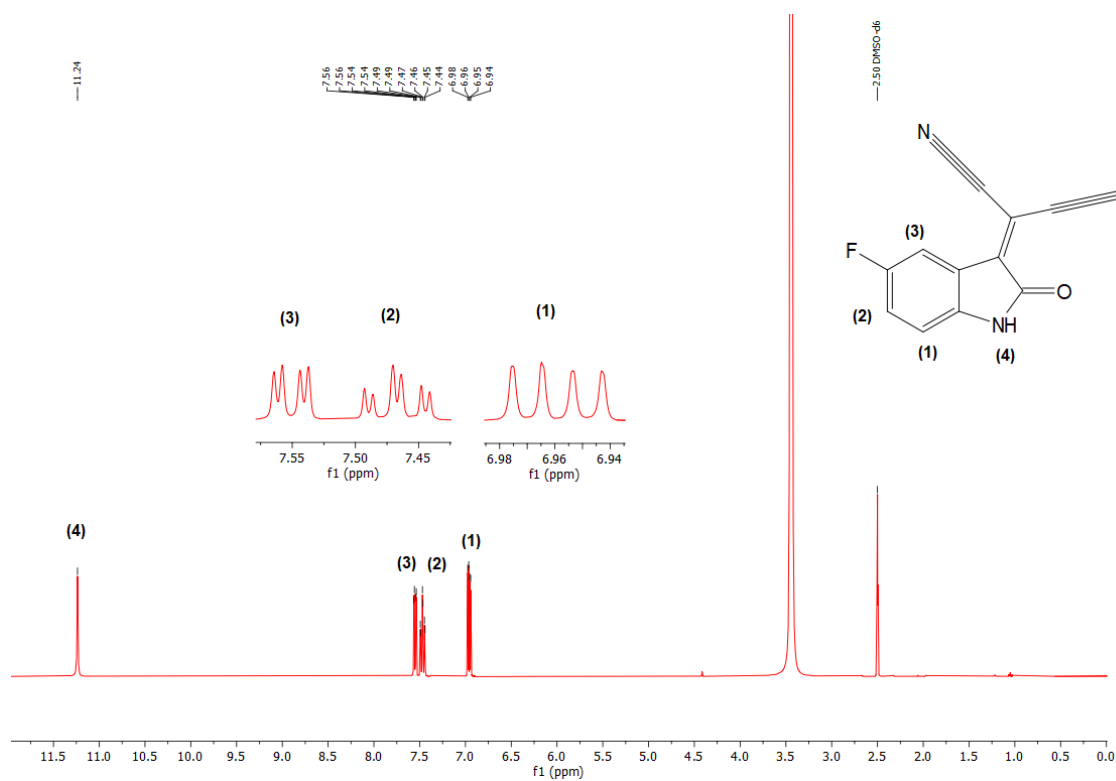
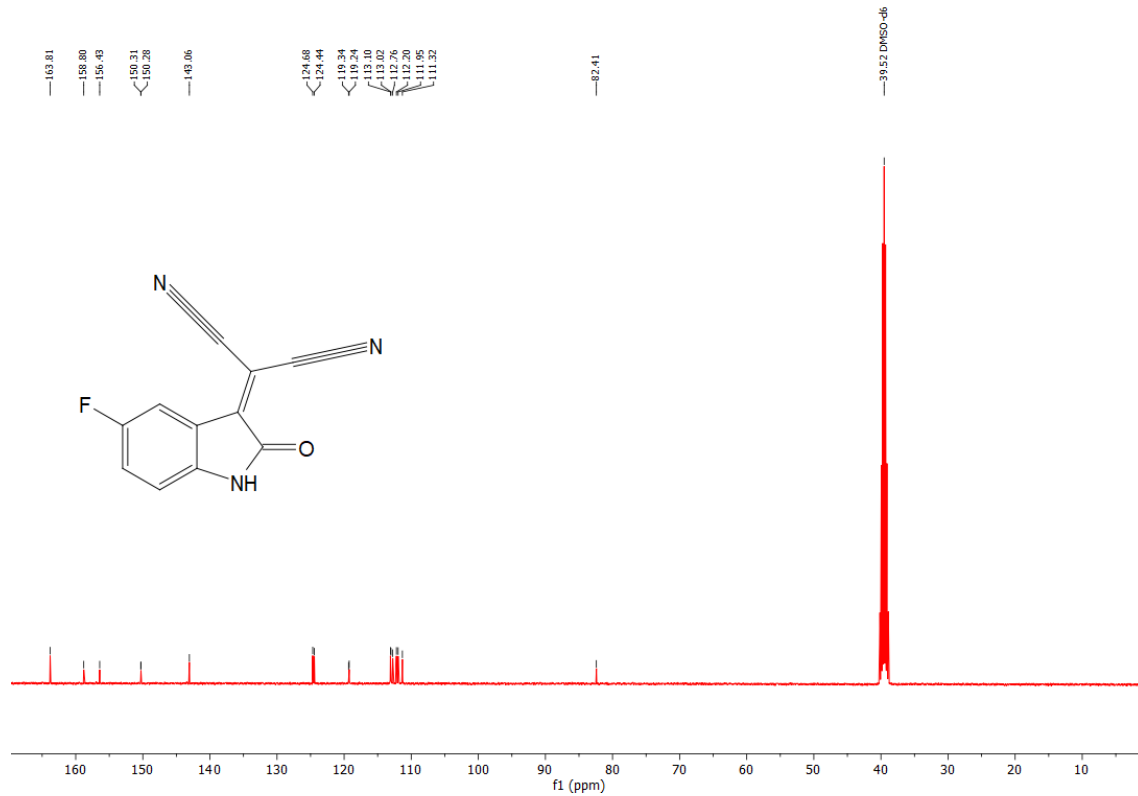
Figura S13. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto **2d**.**Figura S14.** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto **2d**.

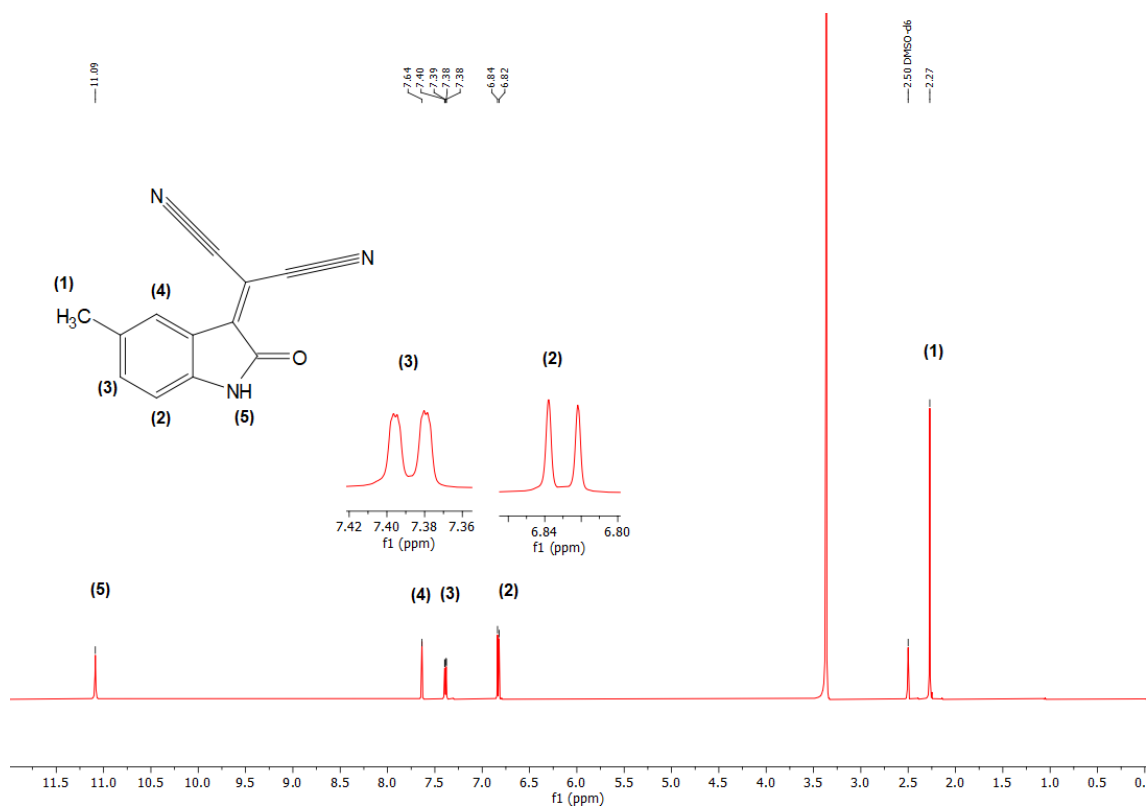
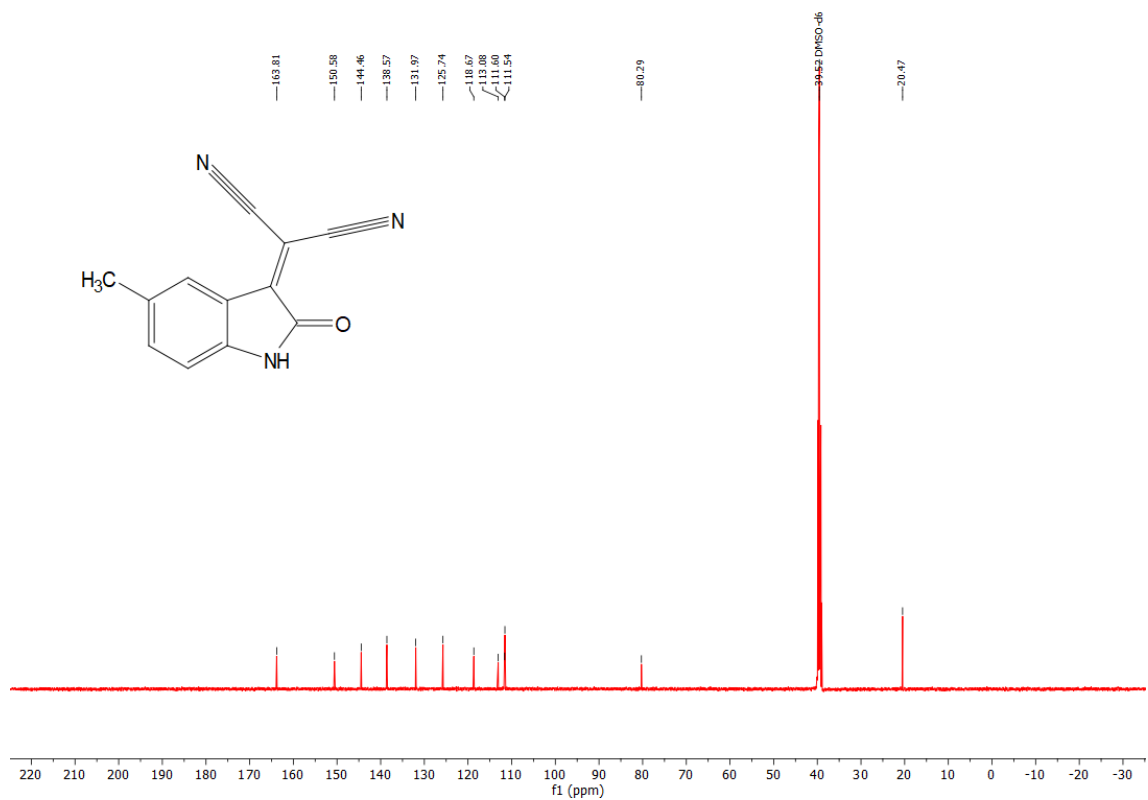
Figura S15. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto **2e**.**Figura S16.** Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do Composto **2e**.

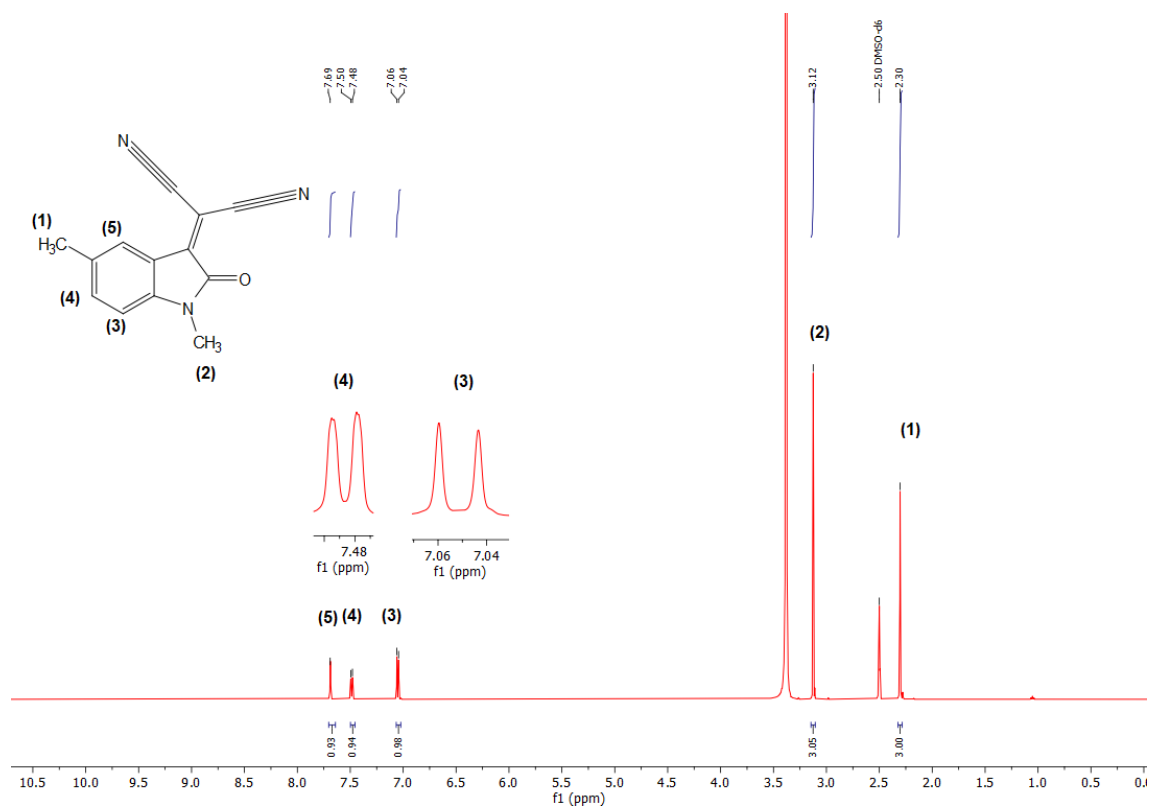
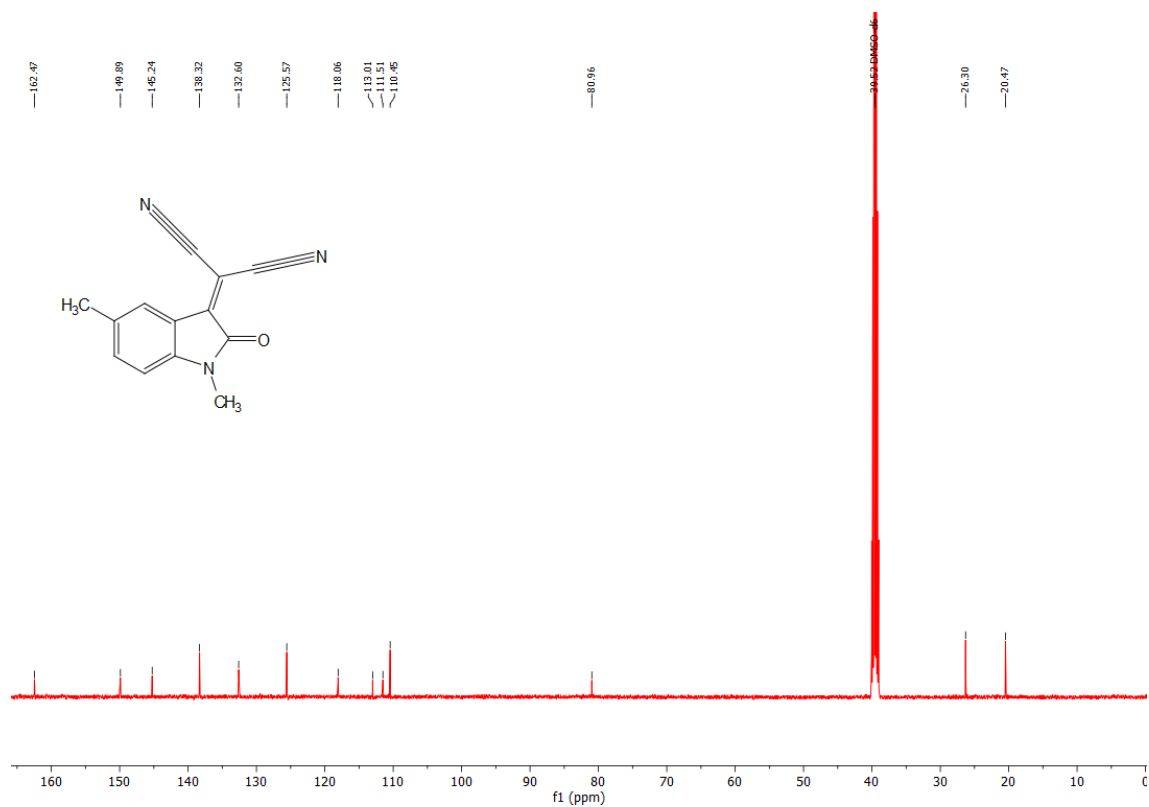
Figura S17. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2f**.**Figura S18.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2f**.

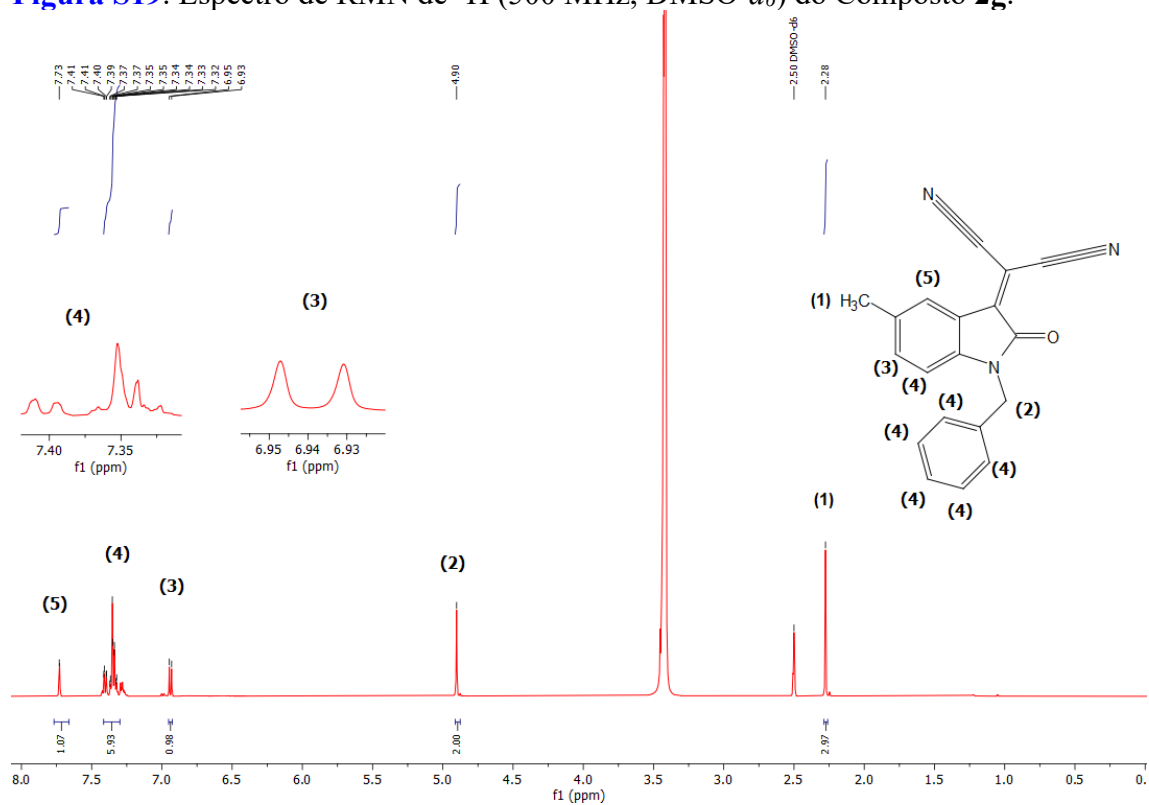
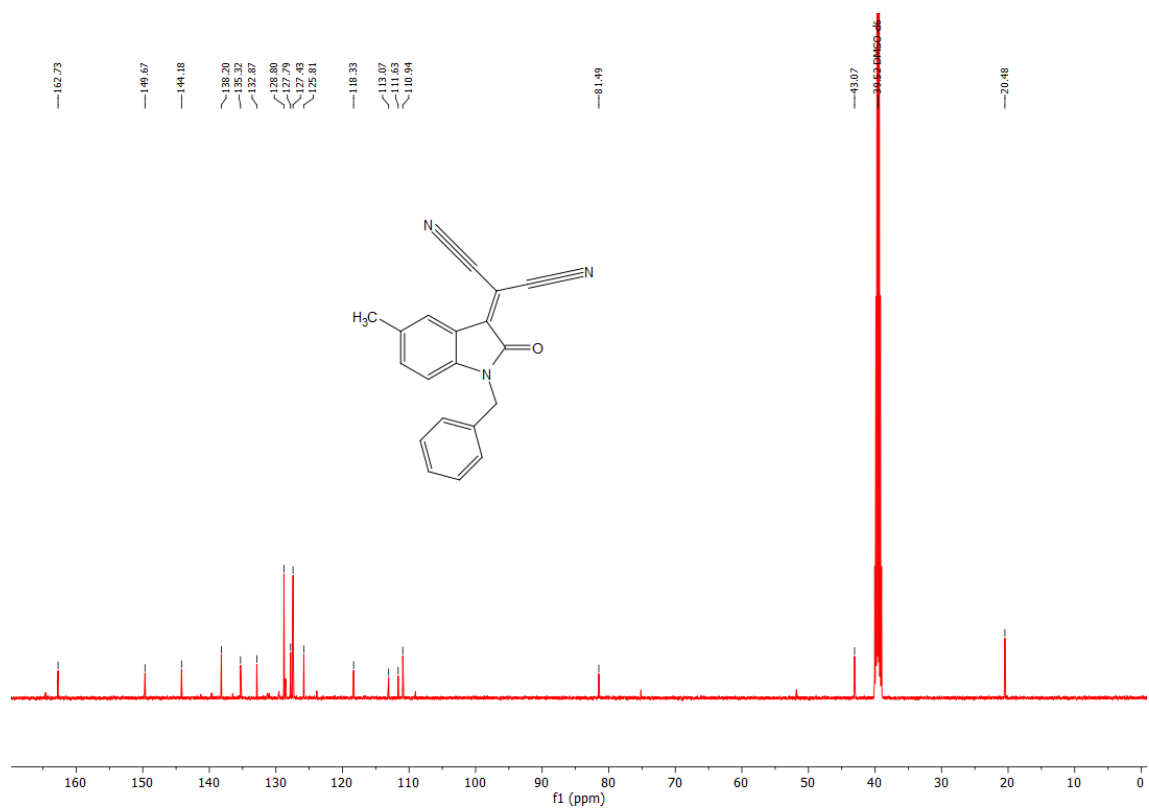
Figura S19. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2g**.**Figura S20.** Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do Composto **2g**.

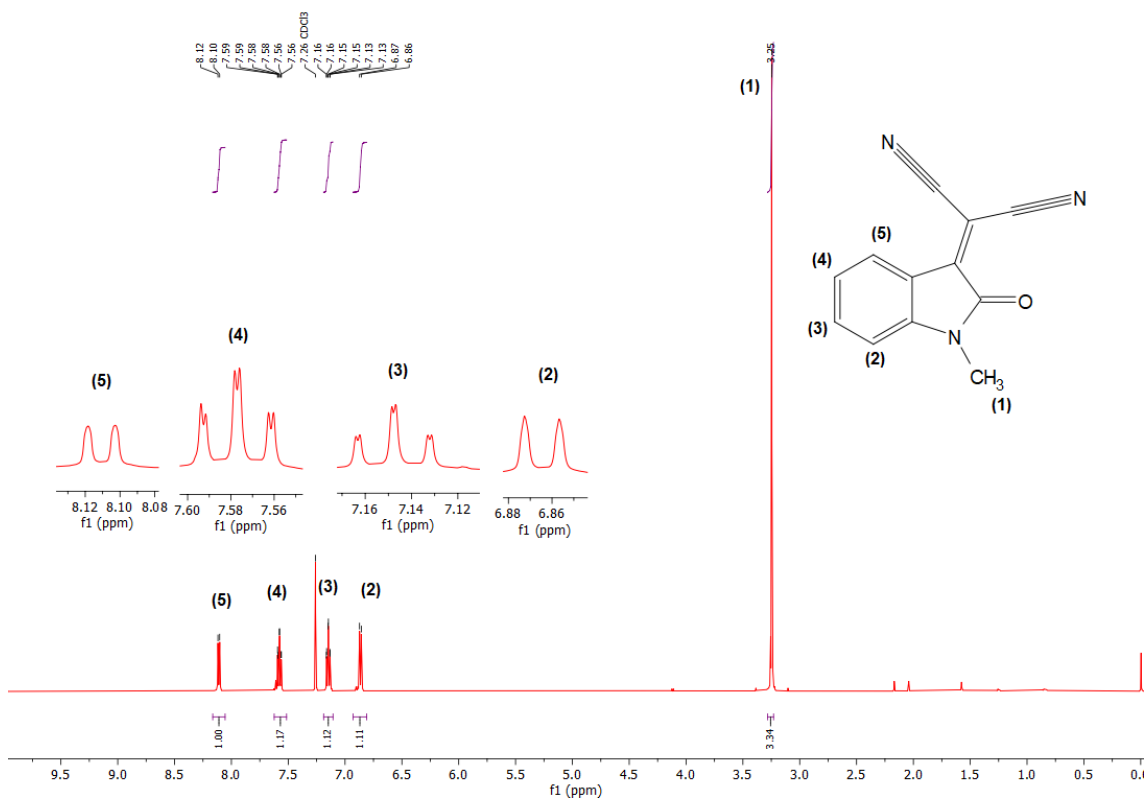
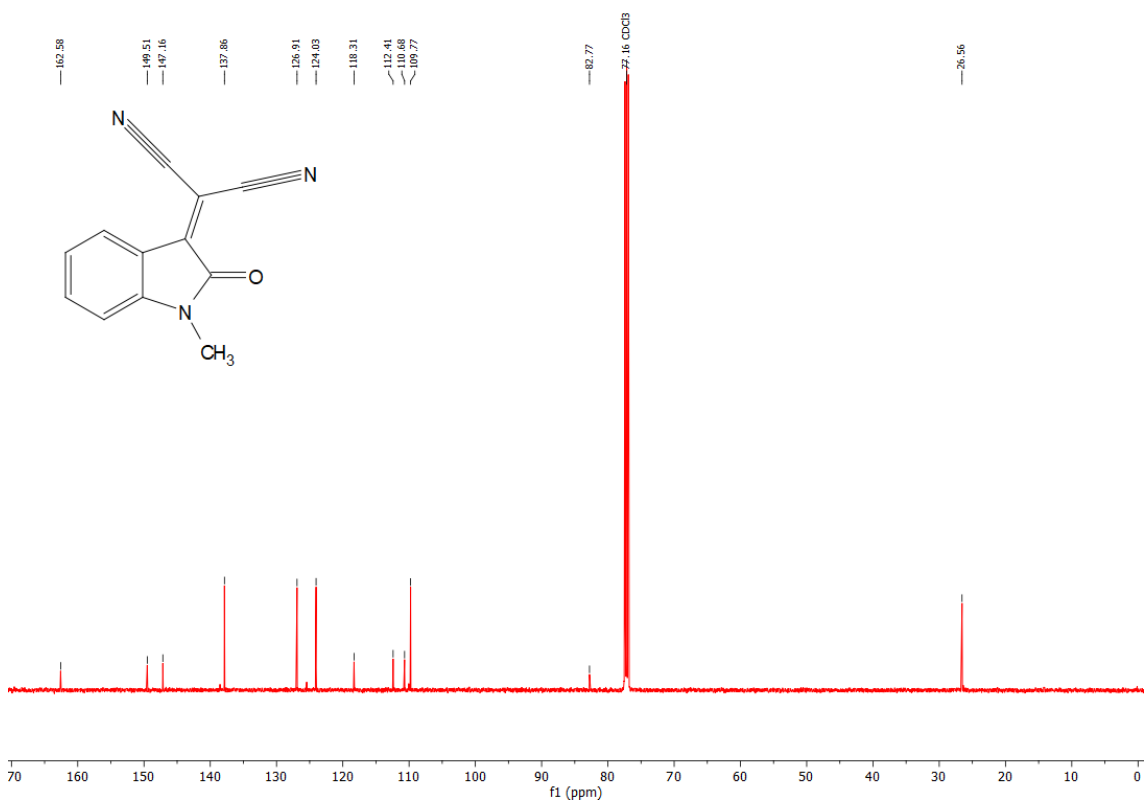
Figura S21. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do Composto **2h**.**Figura S22.** Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do Composto **2h**.

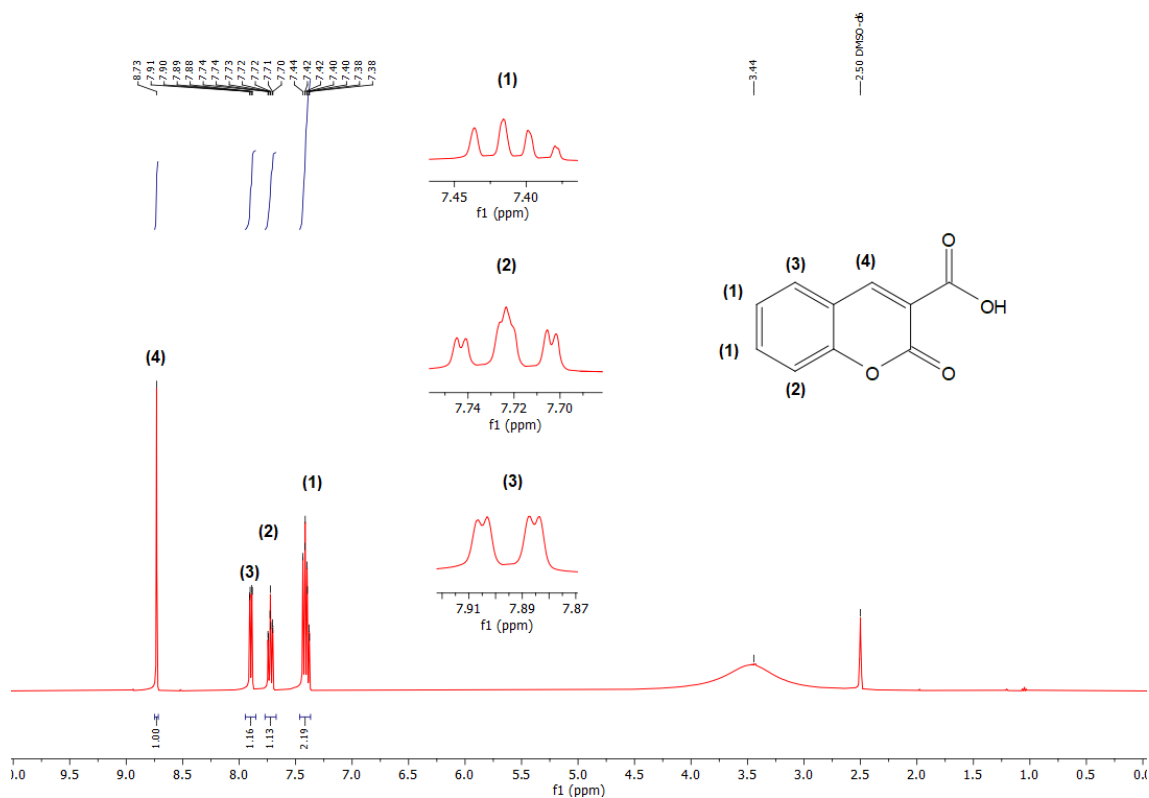
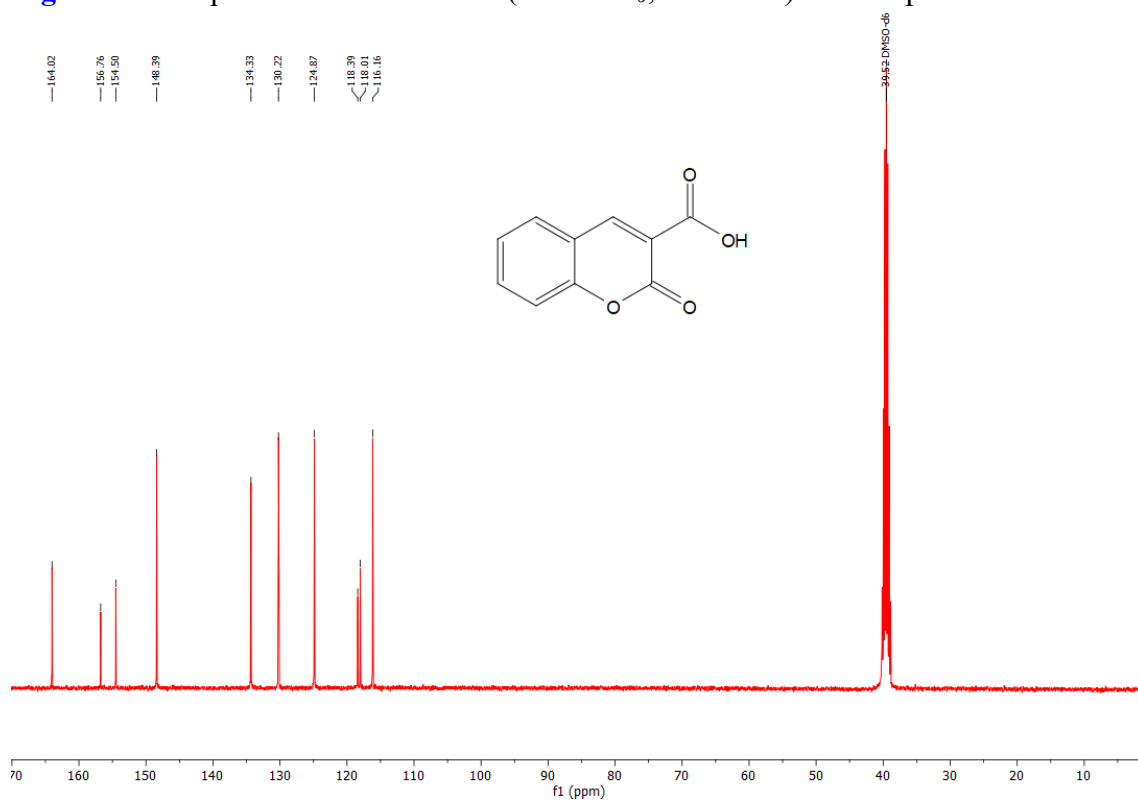
Figura S23. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) do Composto **3a**.**Figura S24.** Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) do Composto **3a**.

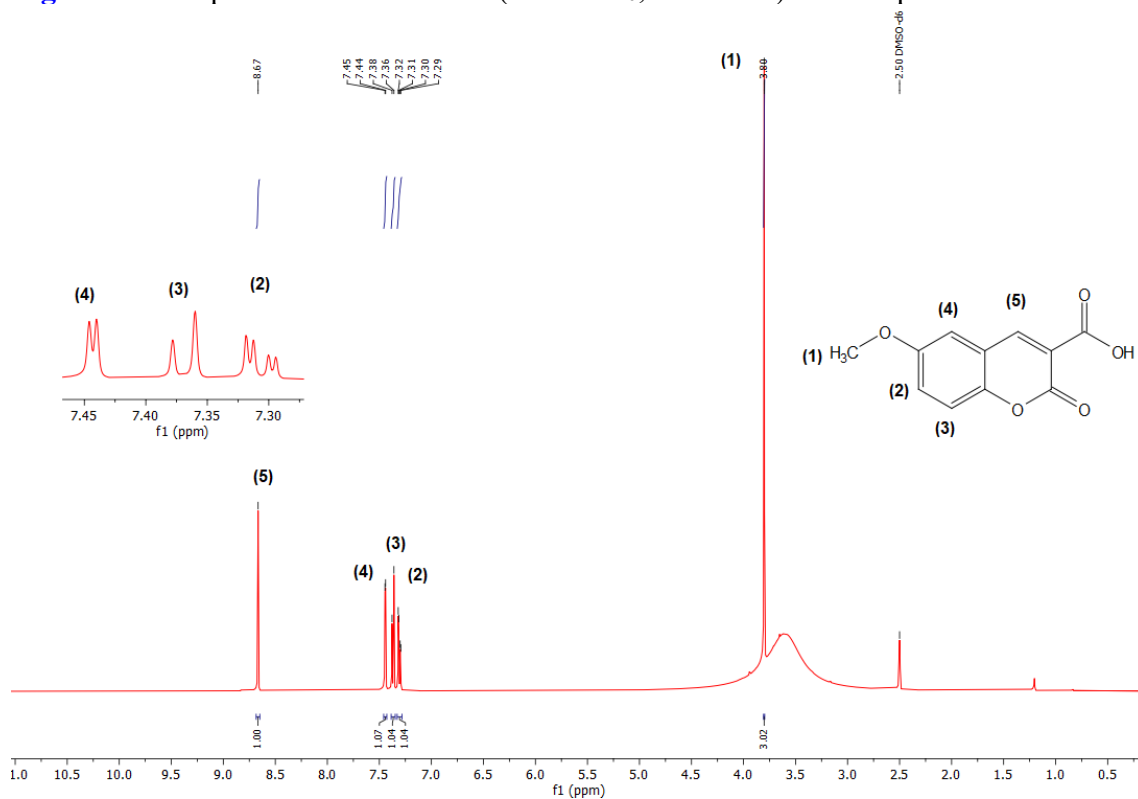
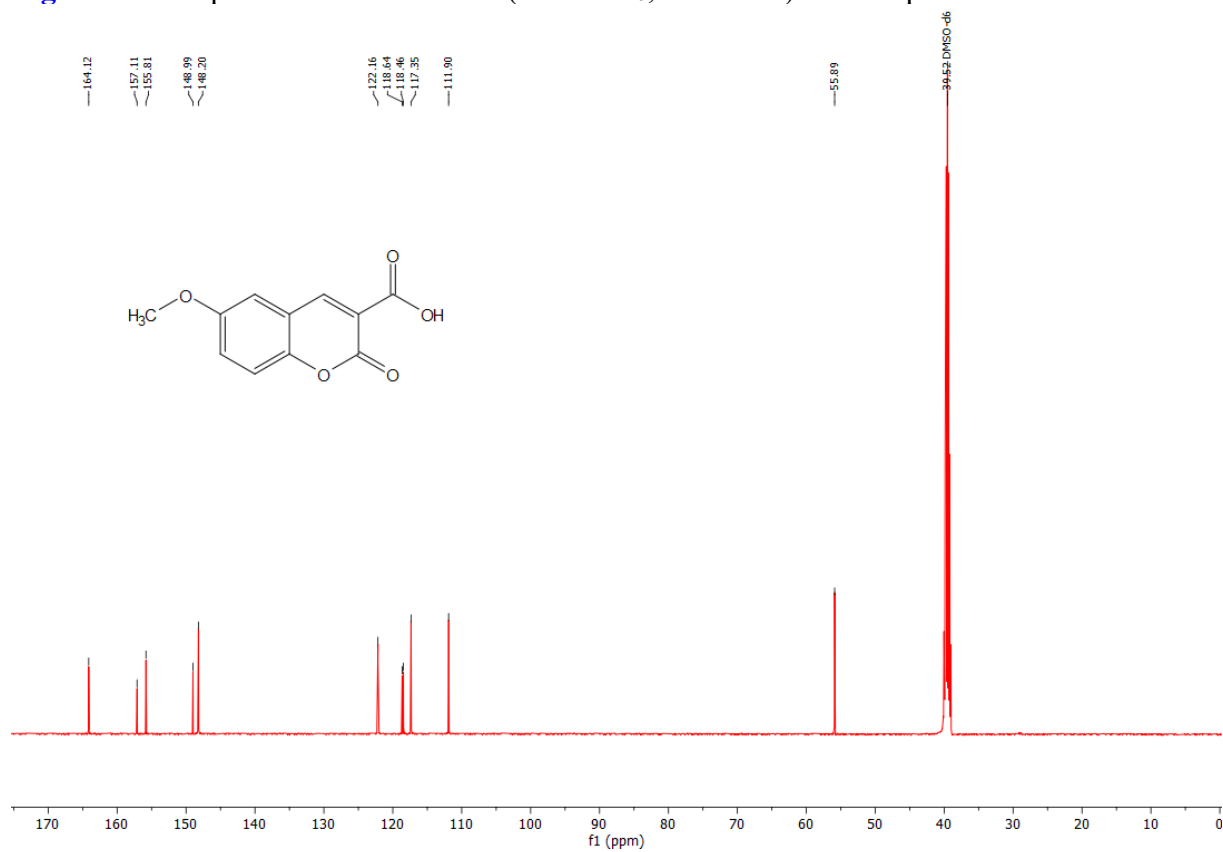
Figura S25. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) do Composto **3b**.**Figura S26.** Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) do Composto **3b**.

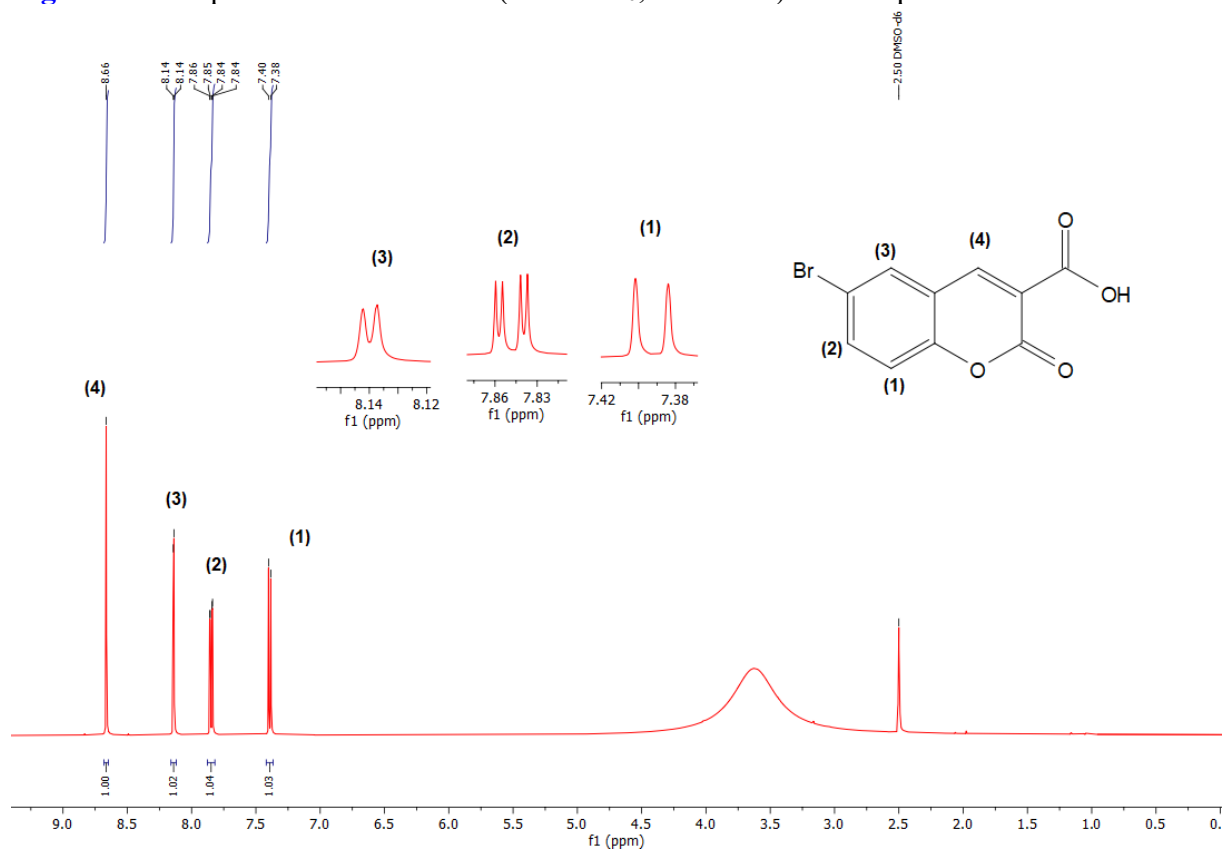
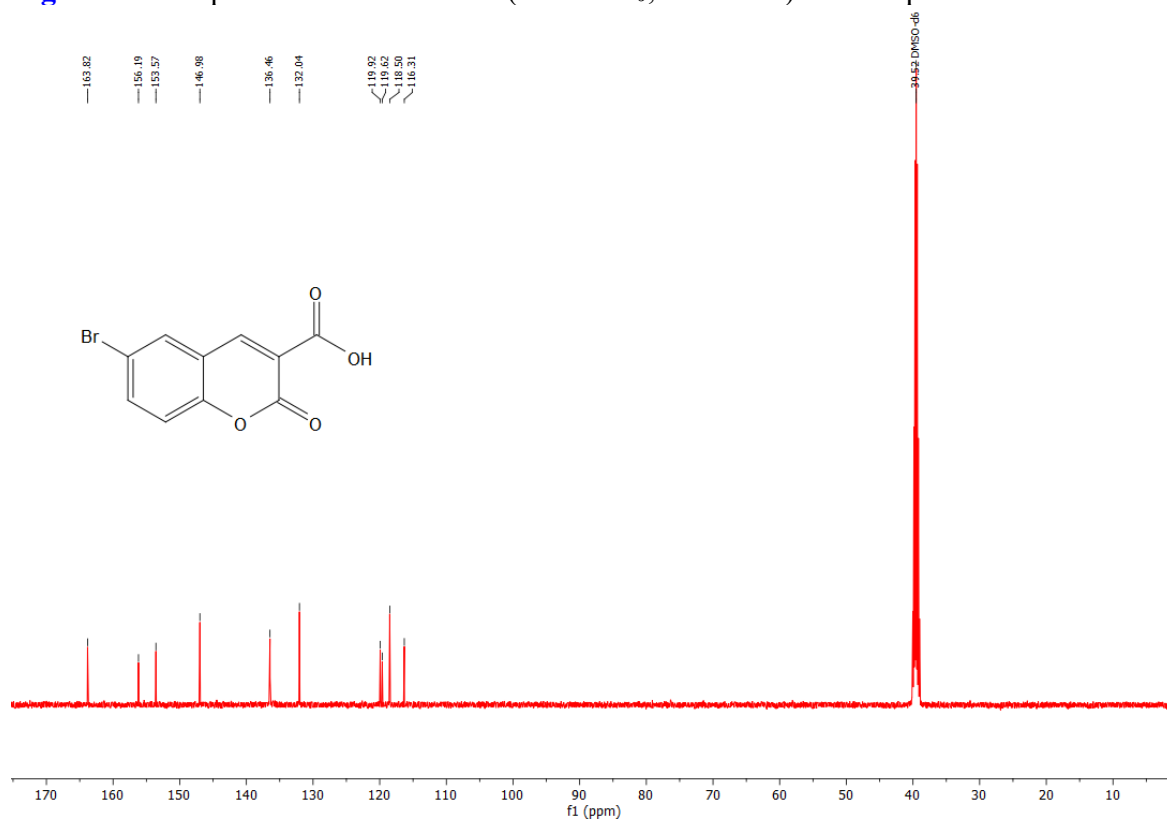
Figura S27. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto **3c**.**Figura S28.** Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto **3c**.

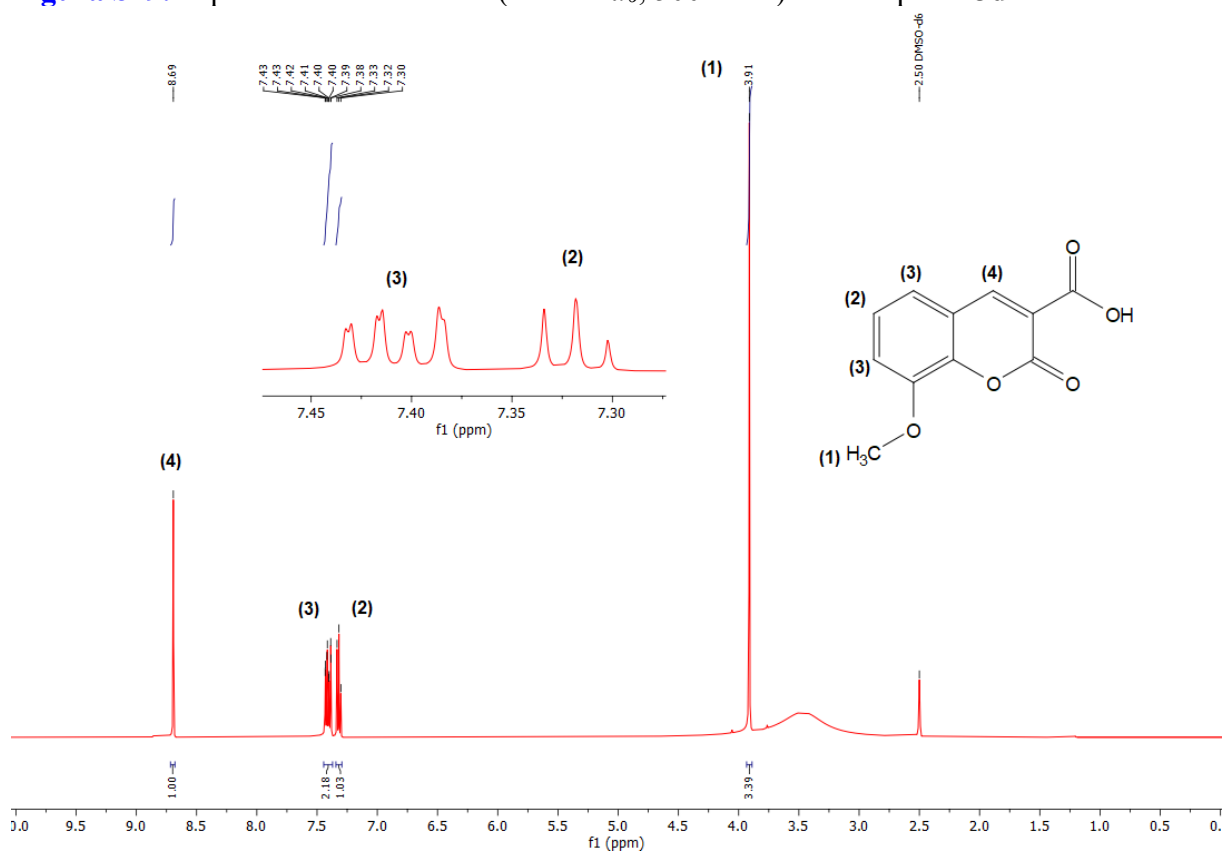
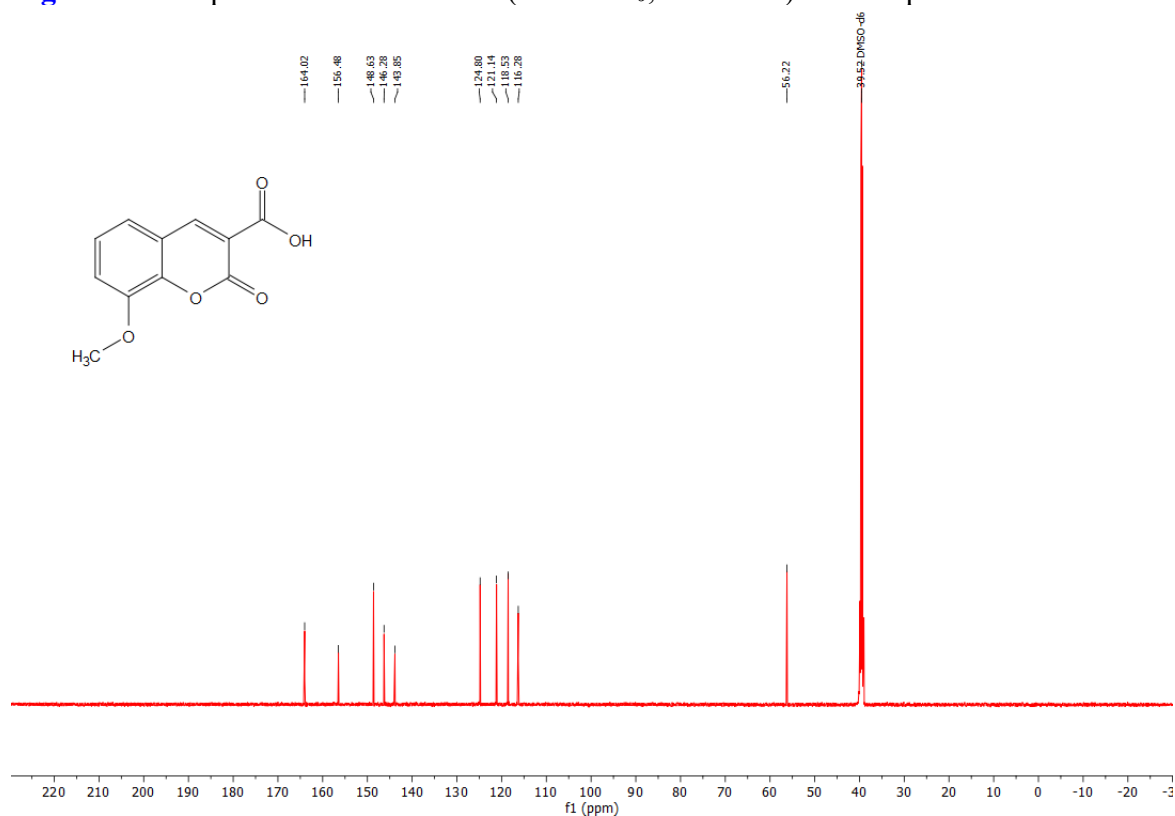
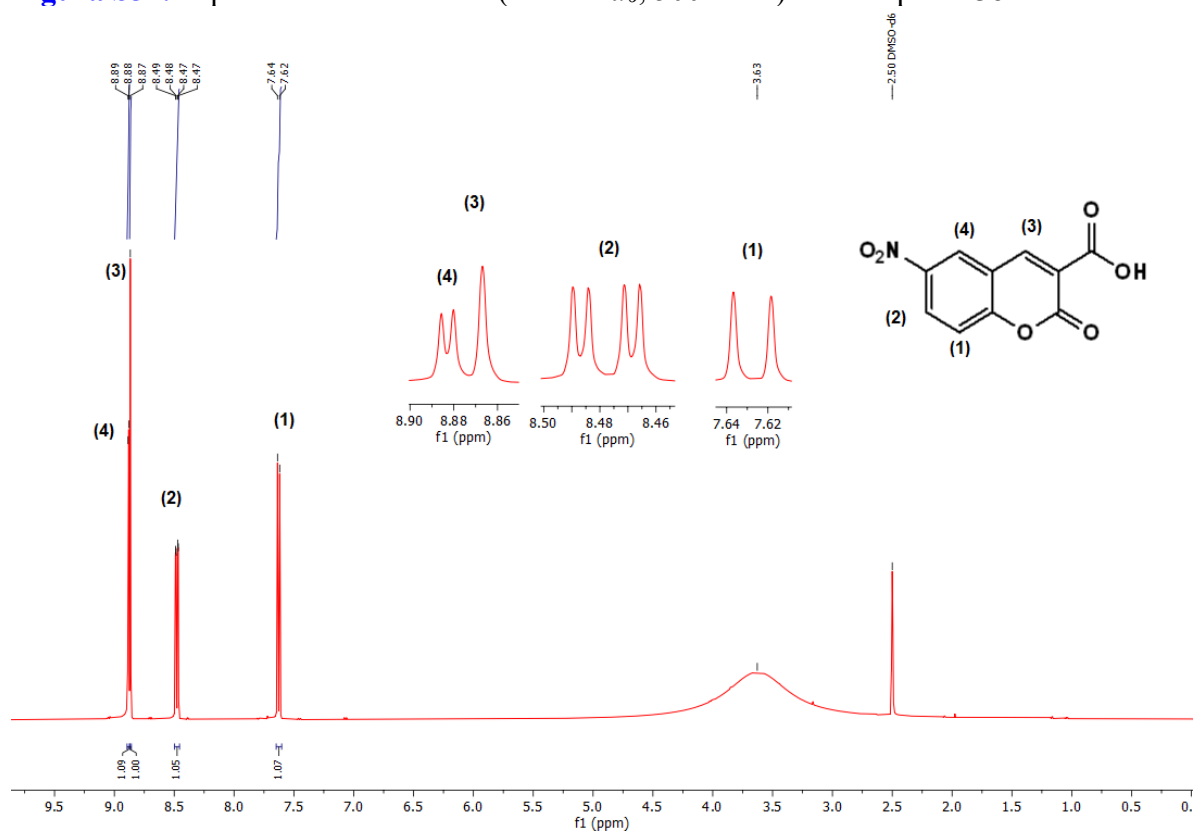
Figura S29. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto **3d**.**Figura S30.** Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto **3d**.

Figura S31. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Composto **3e**.**Figura S32.** Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Composto **3e**.

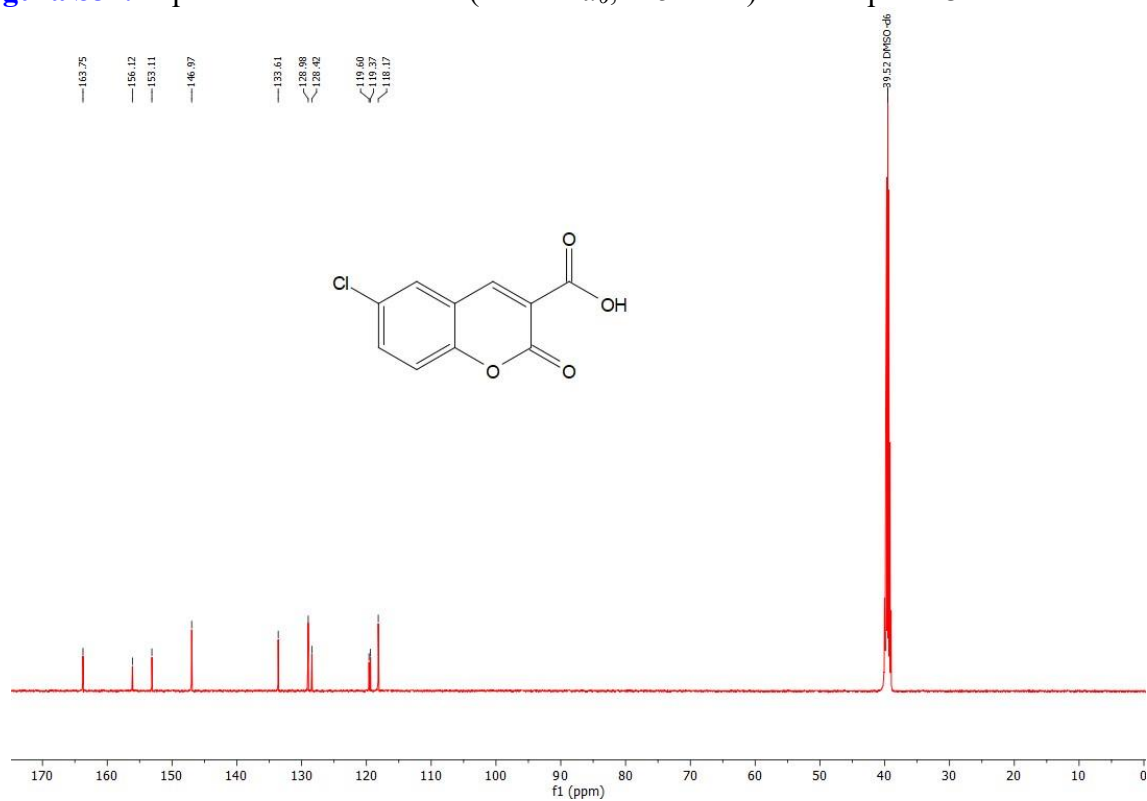


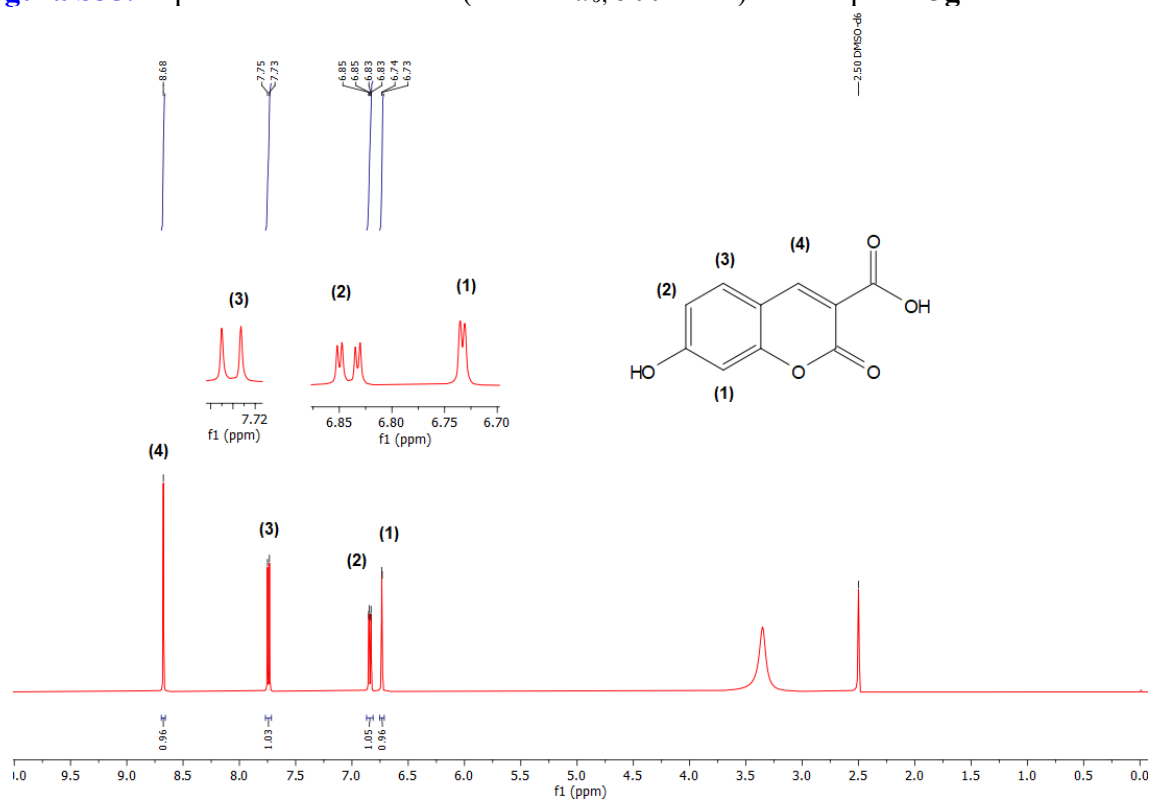
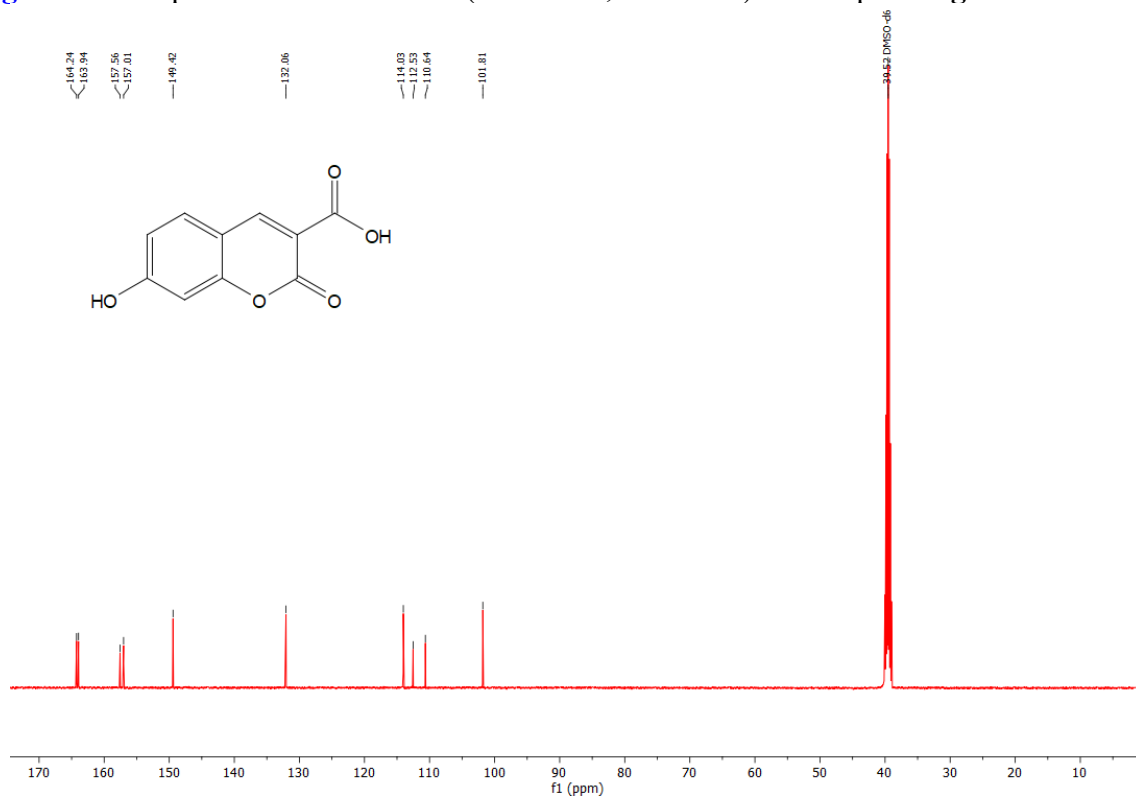
Figura S35. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto **3g**.**Figura S36.** Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do composto **3g**.

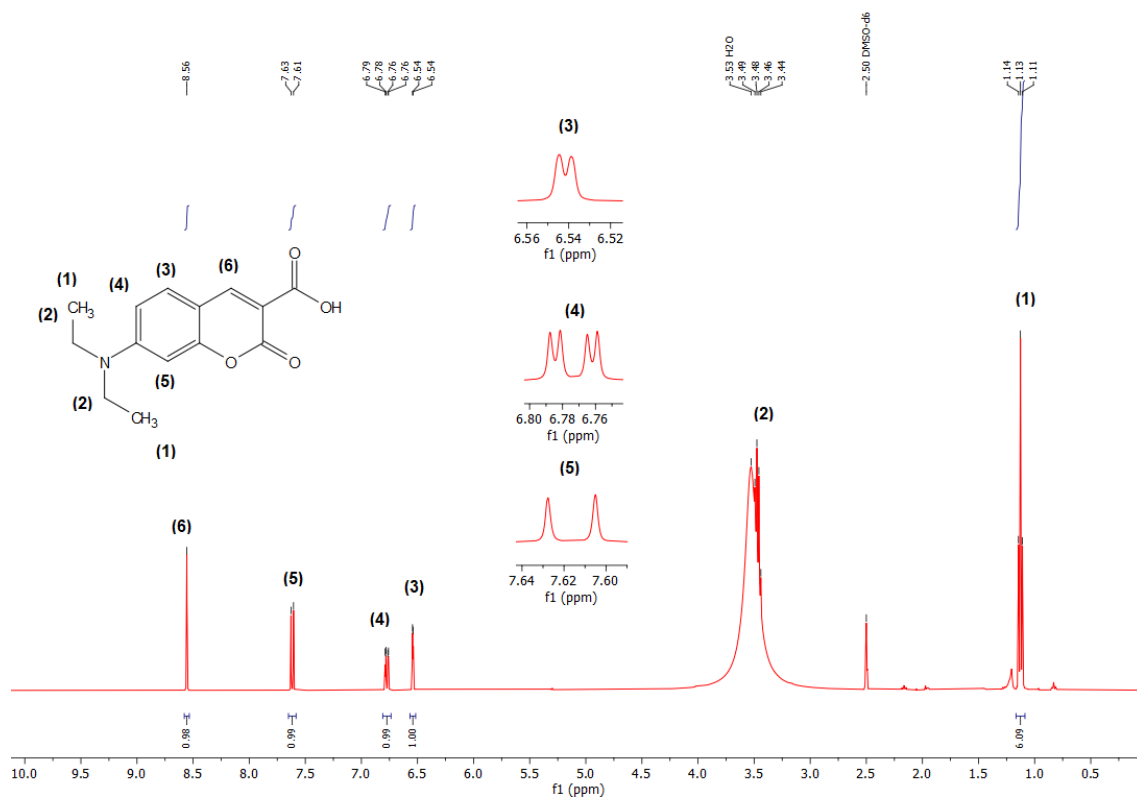
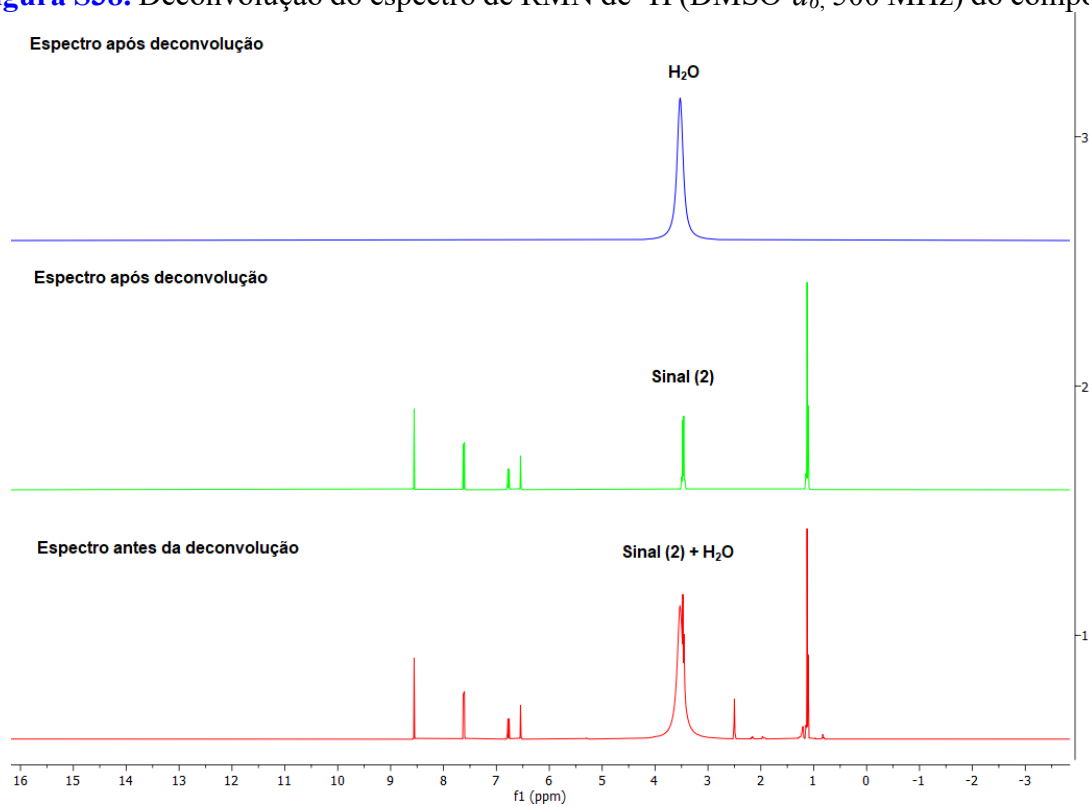
Figura S37. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto **3h**.**Figura S38.** Deconvolução do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto **3h**.

Figura S39. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) ampliado após deconvolução do composto **3h**.

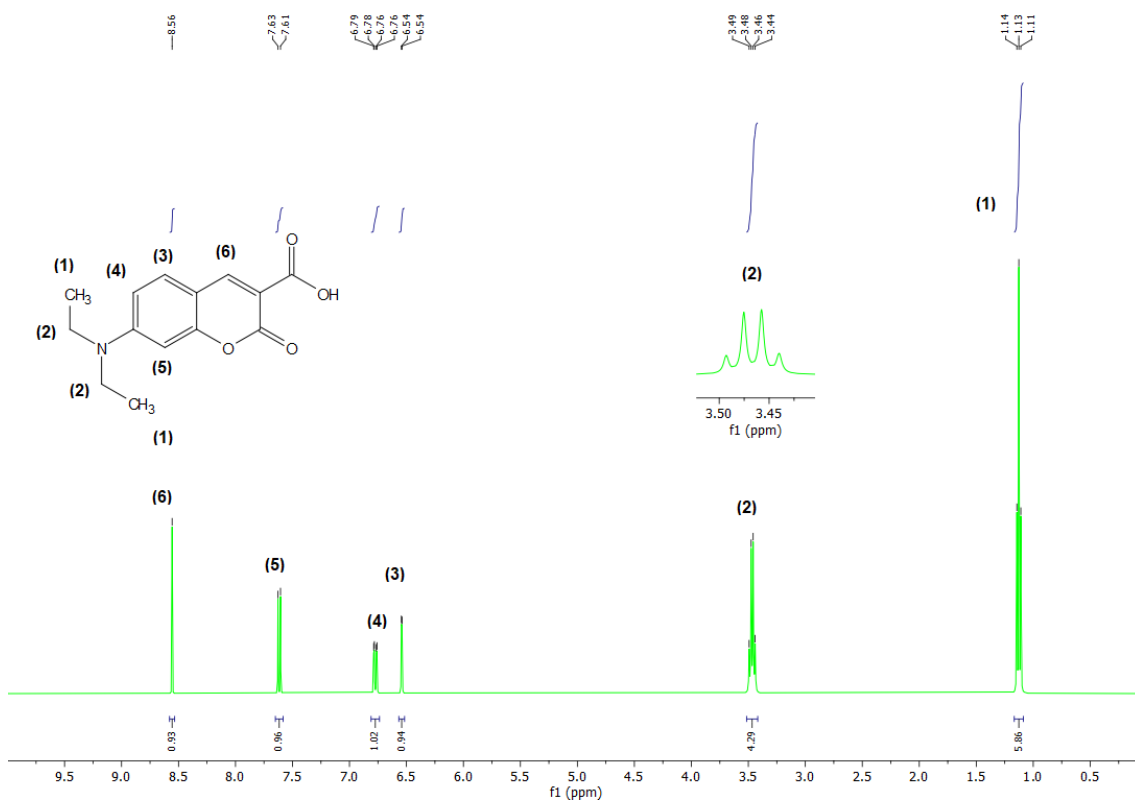


Figura S40. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do composto **3h**.

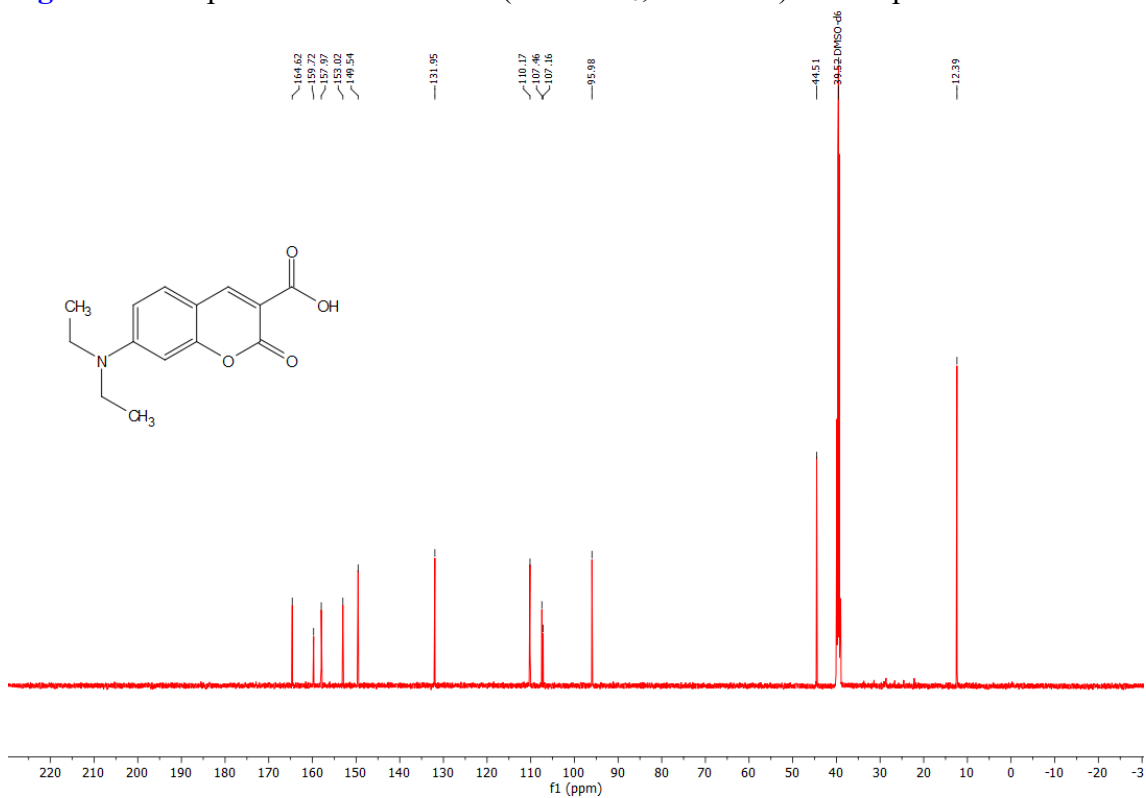


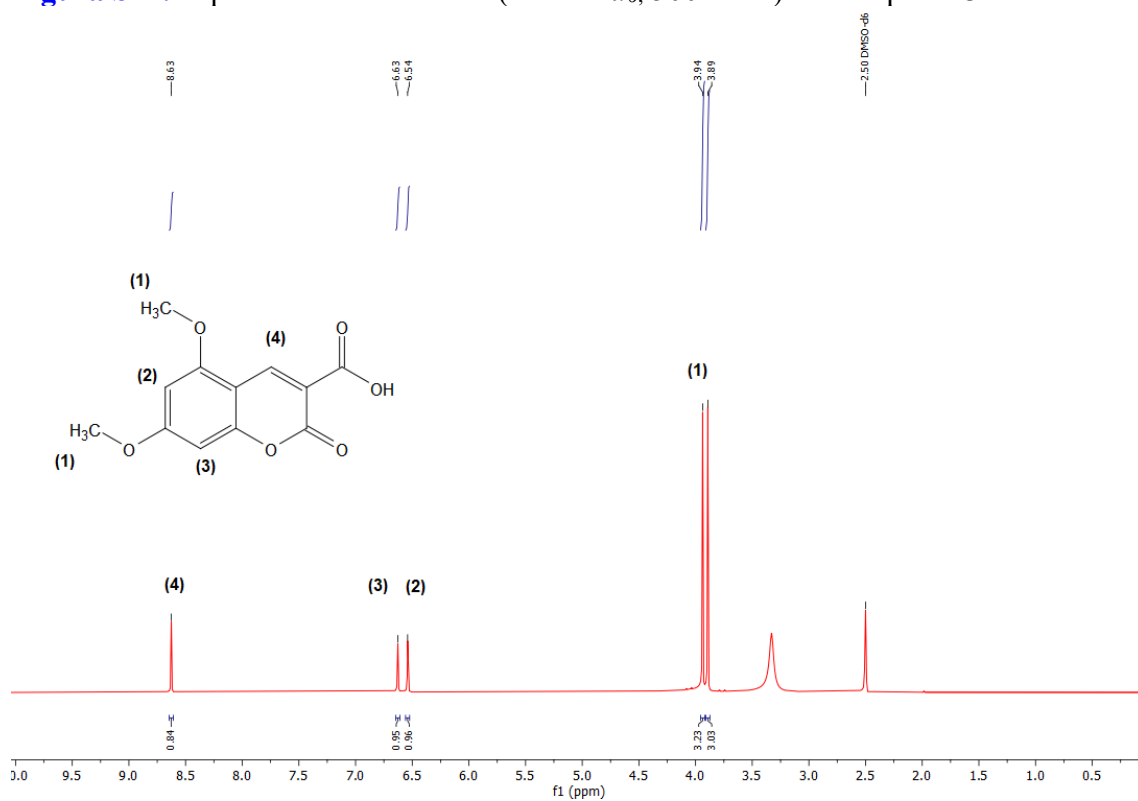
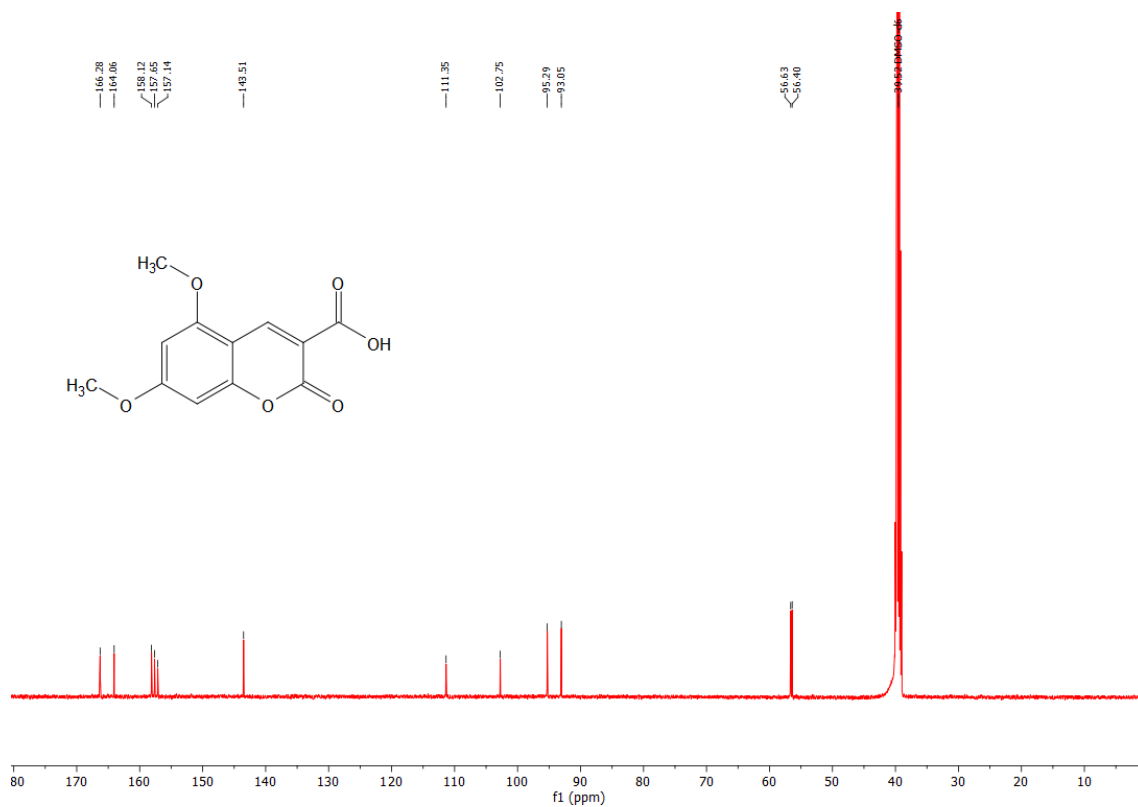
Figura S41. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do composto **3i**.**Figura S42.** Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do composto **3i**.

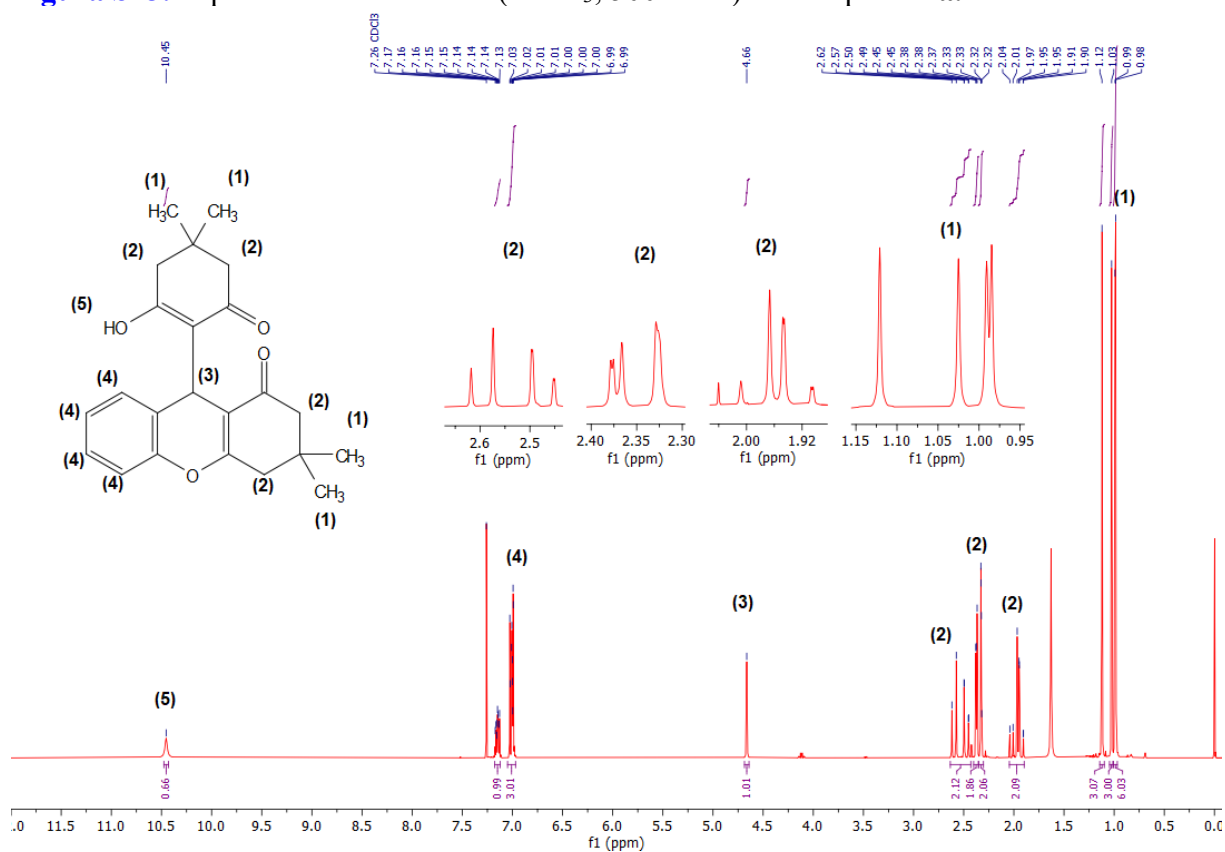
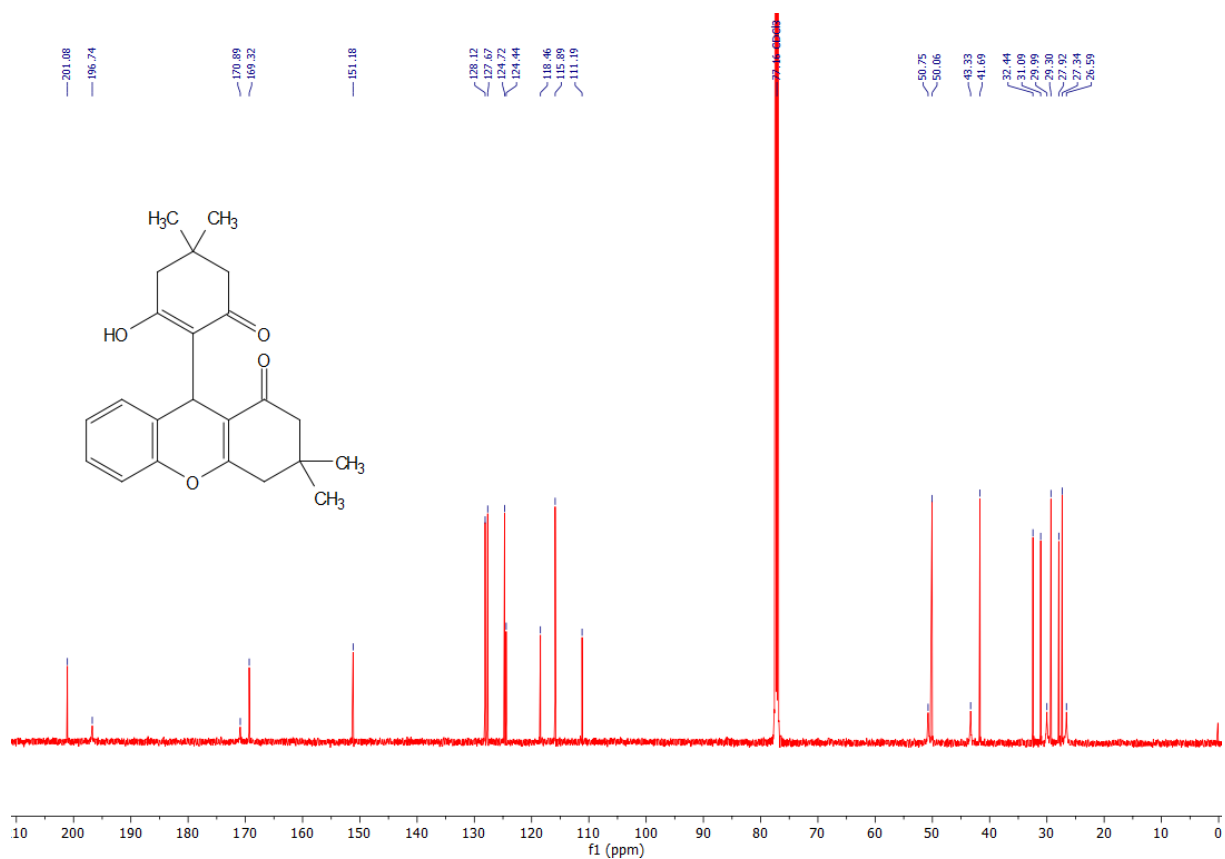
Figura S43. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto **4a**.**Figura S44.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto **4a**.

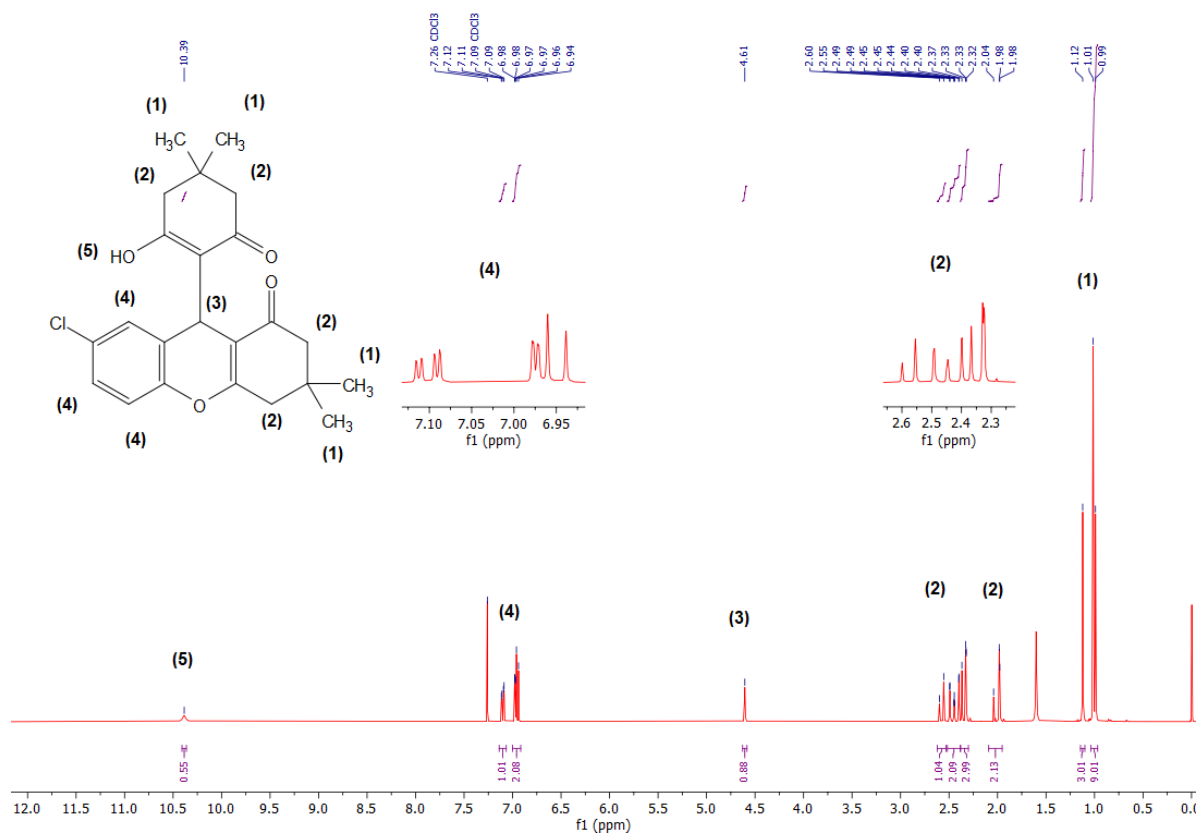
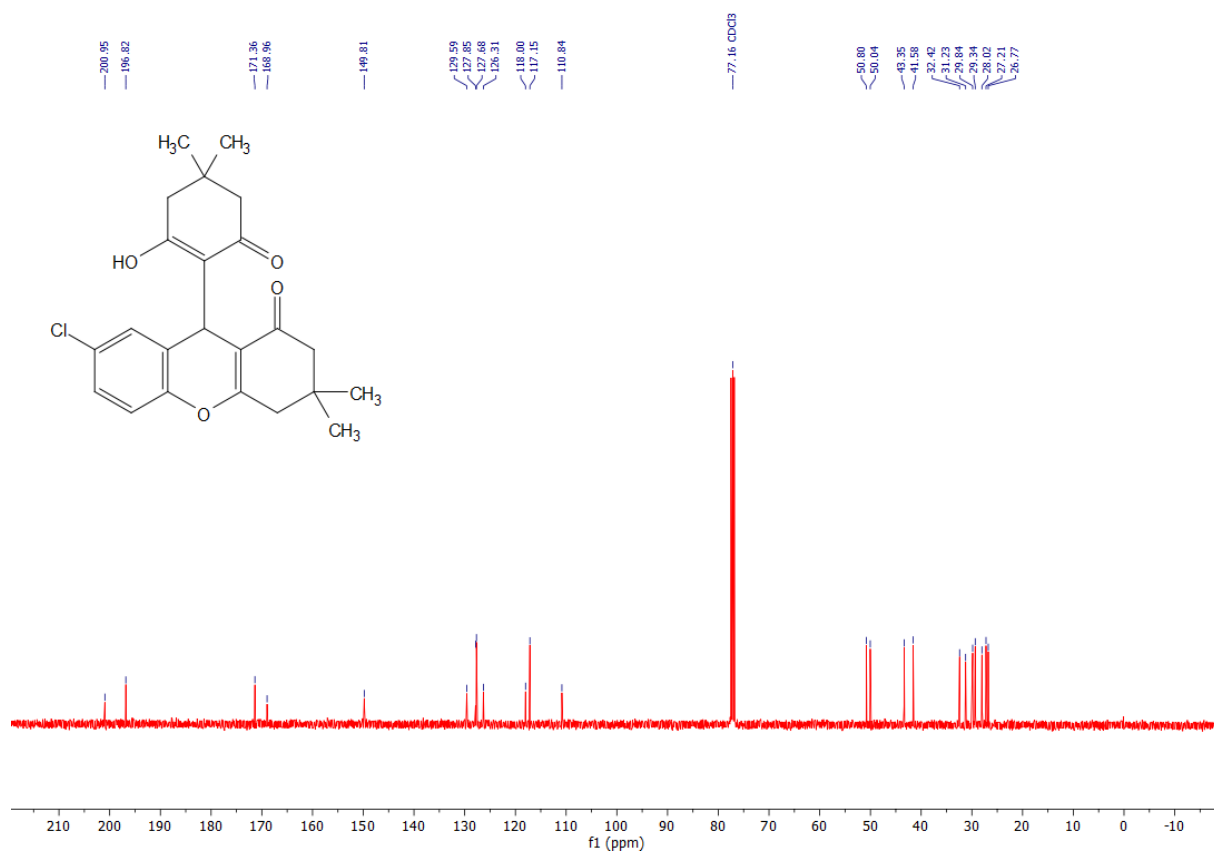
Figura S45. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **4b**.**Figura S46.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto **4b**.

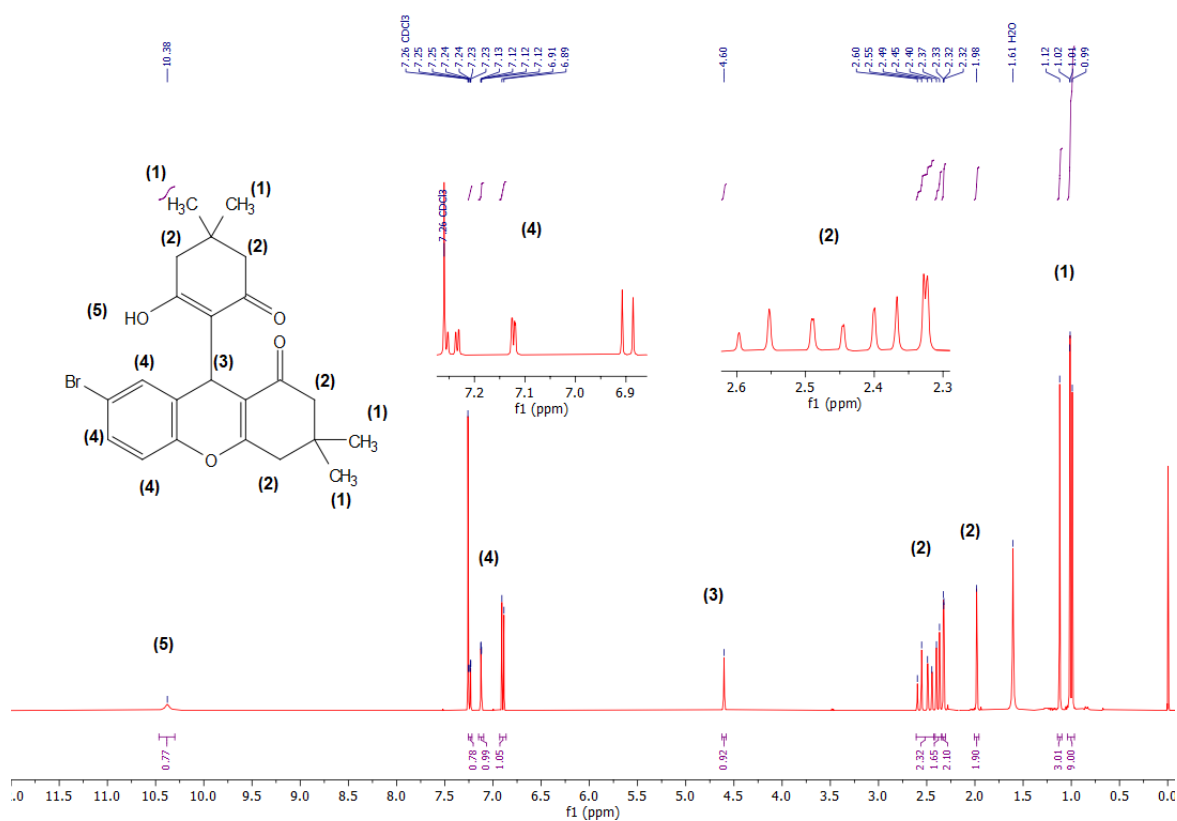
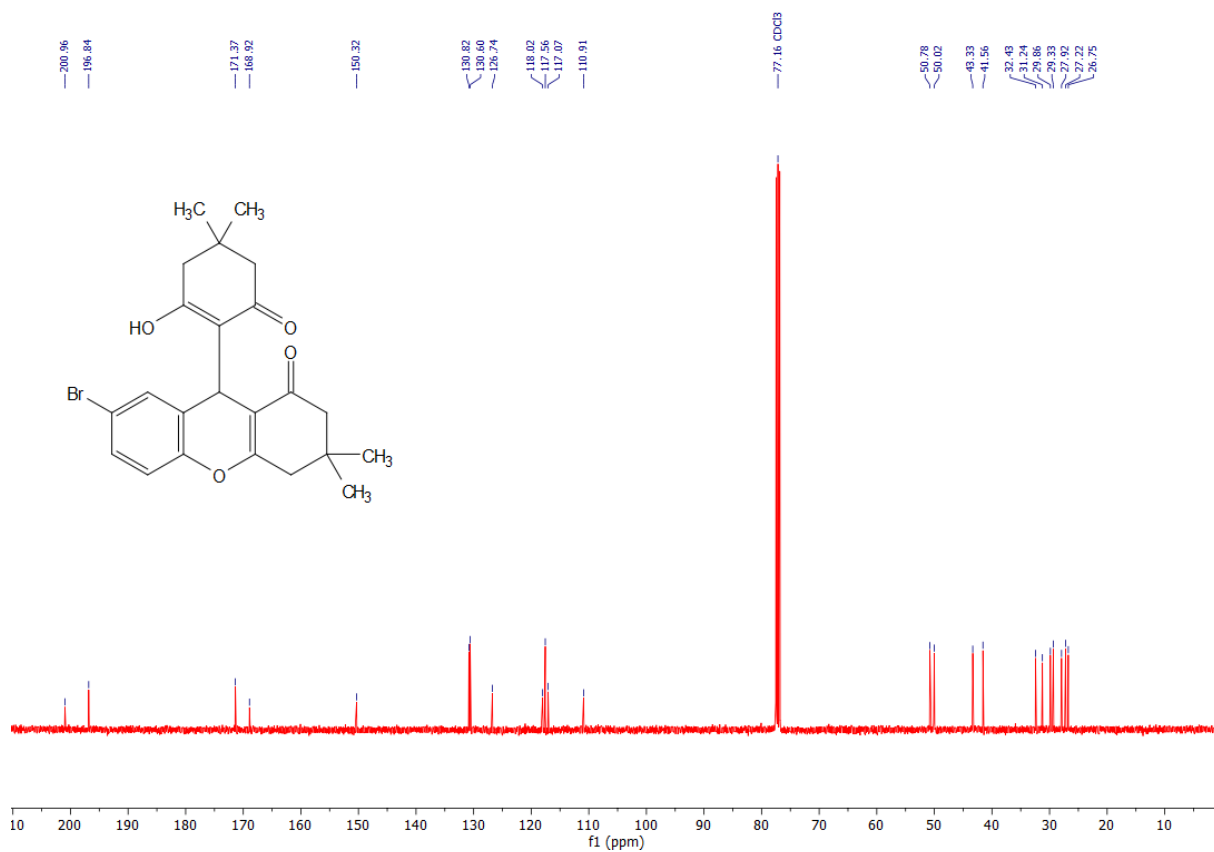
Figura S47. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **4c**.**Figura S48.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **4c**.

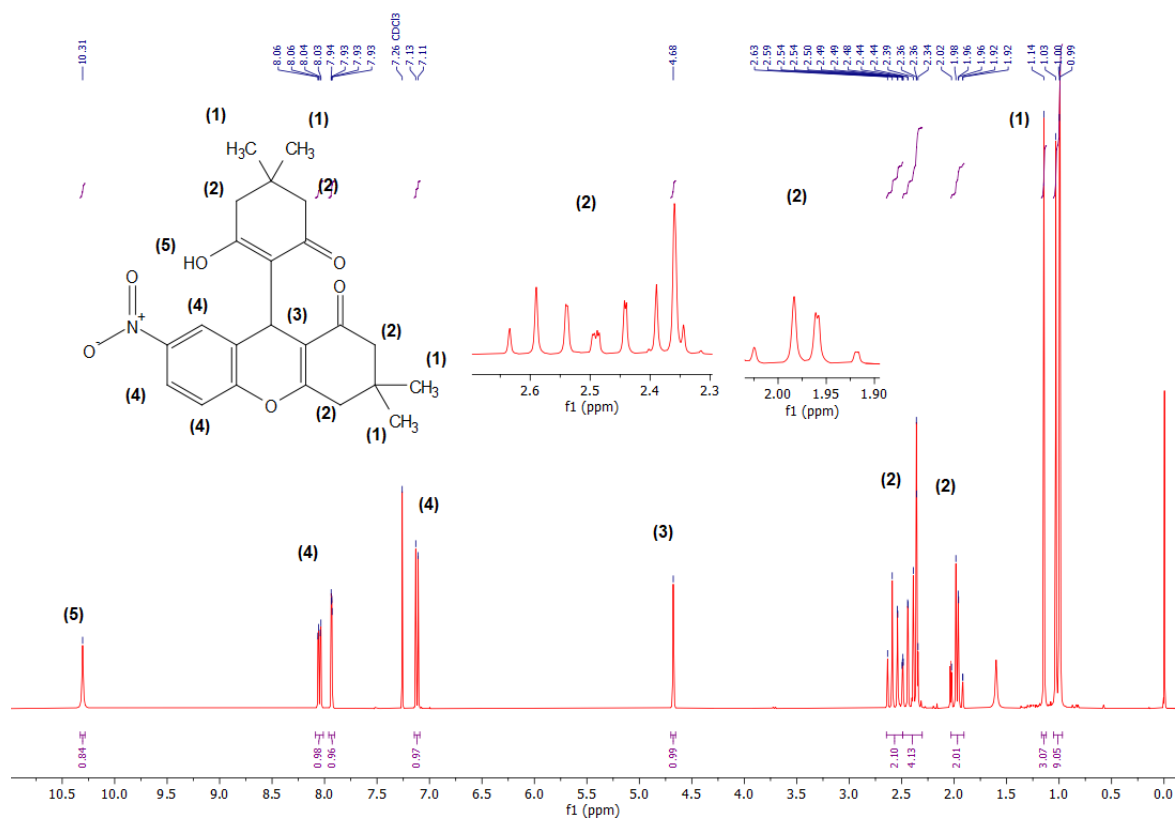
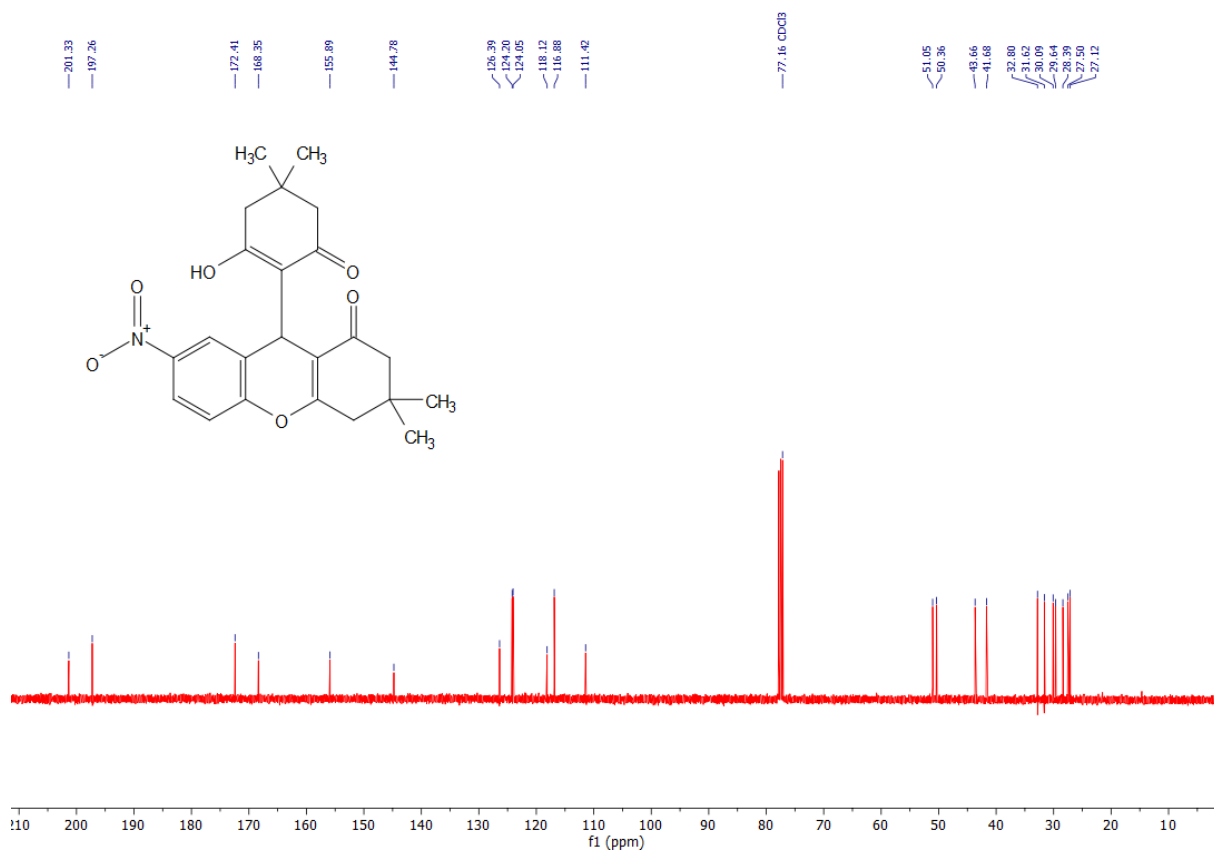
Figura S49. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **4d**.**Figura S50.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **4d**.

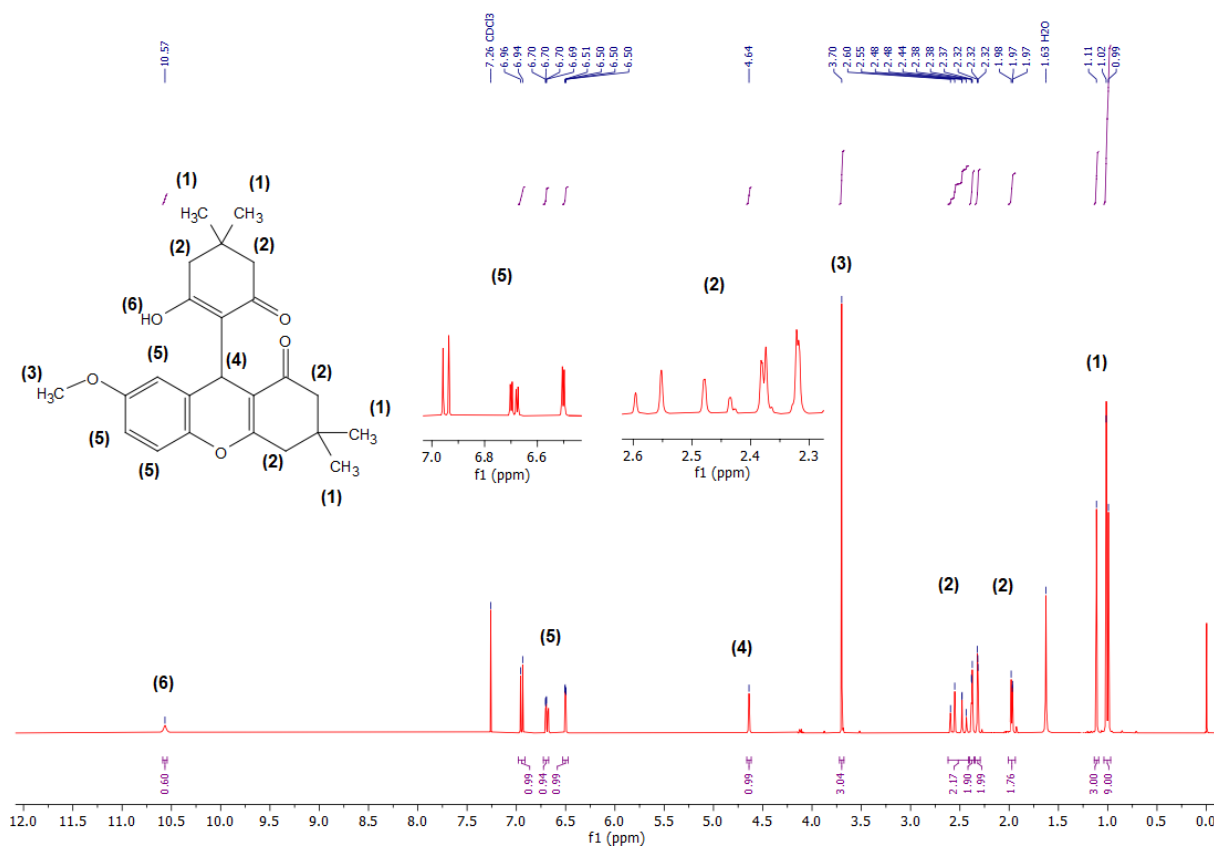
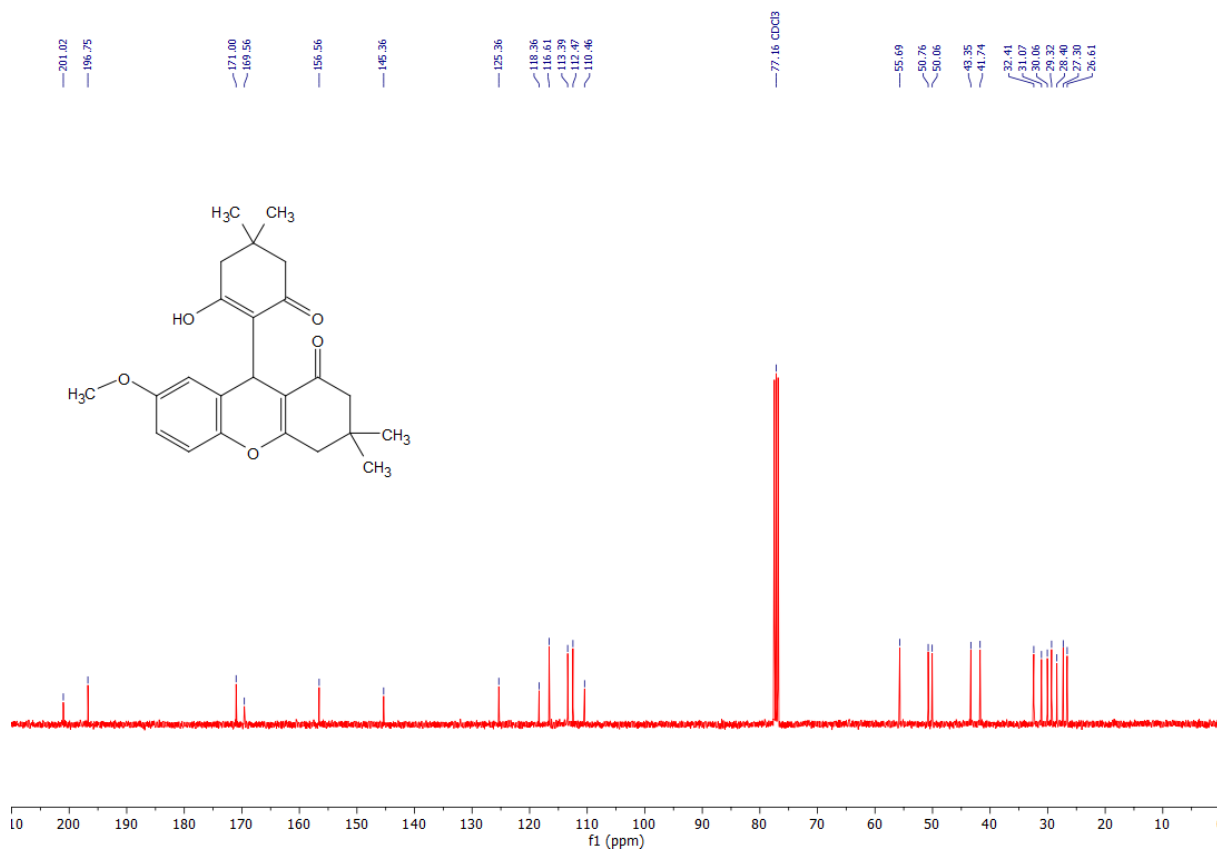
Figura S51. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **4e**.**Figura S52.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **4e**.

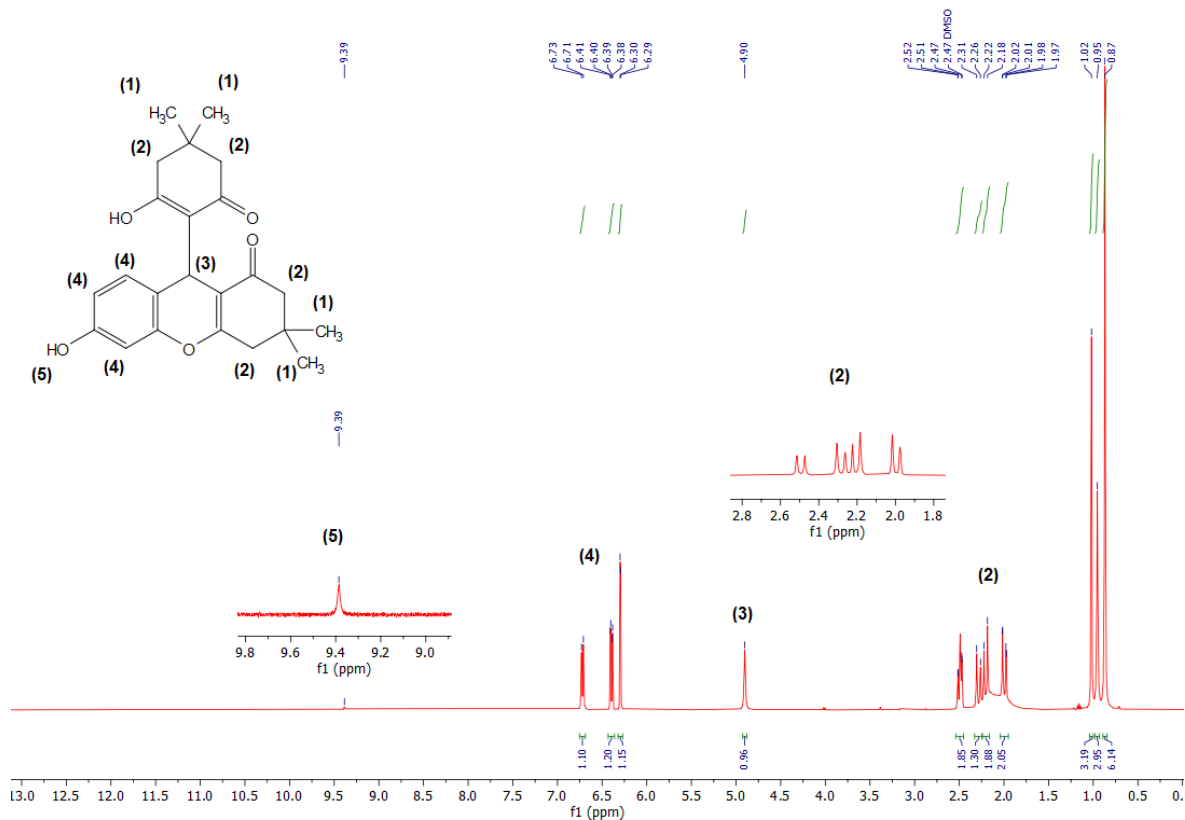
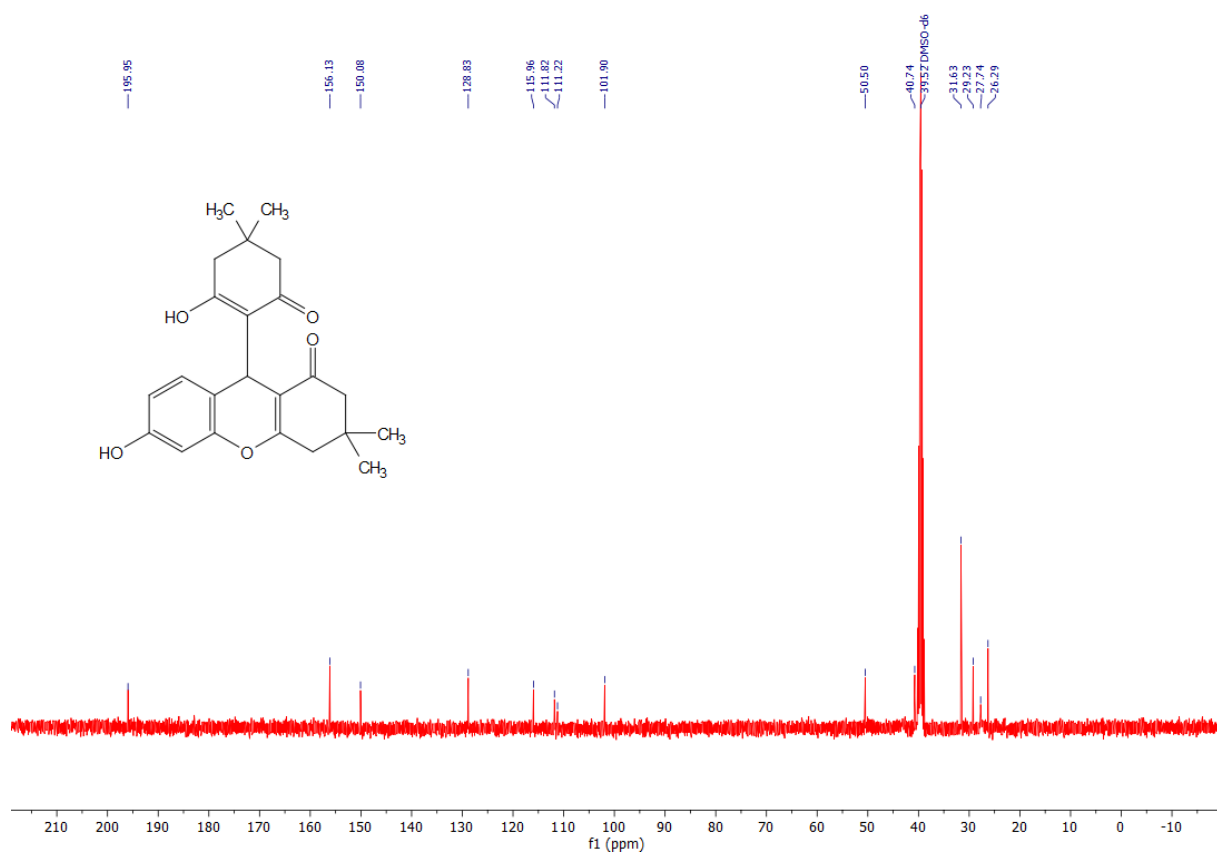
Figura S53. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) do composto **4f**.**Figura S54.** Espectro de RMN de ^{13}C ((DMSO- d_6 , 100 MHz) do composto **4f**.

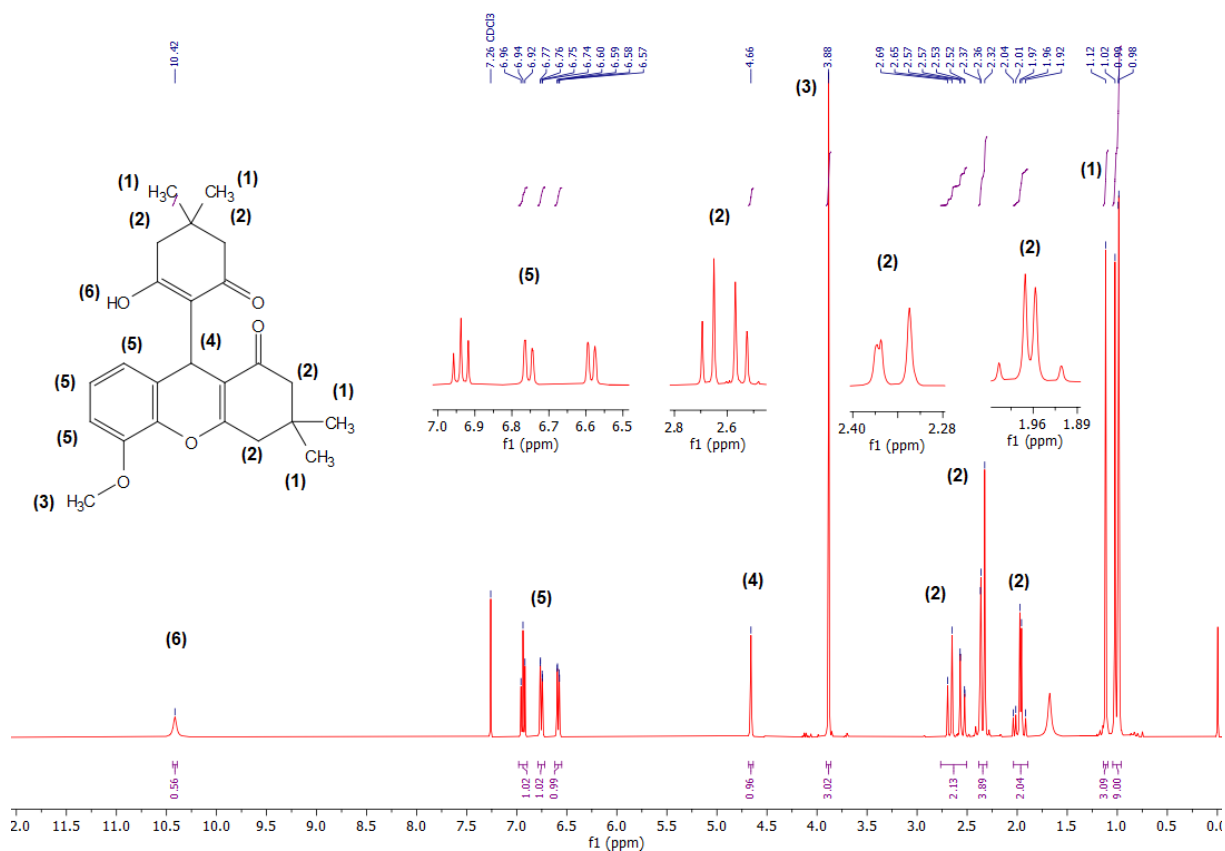
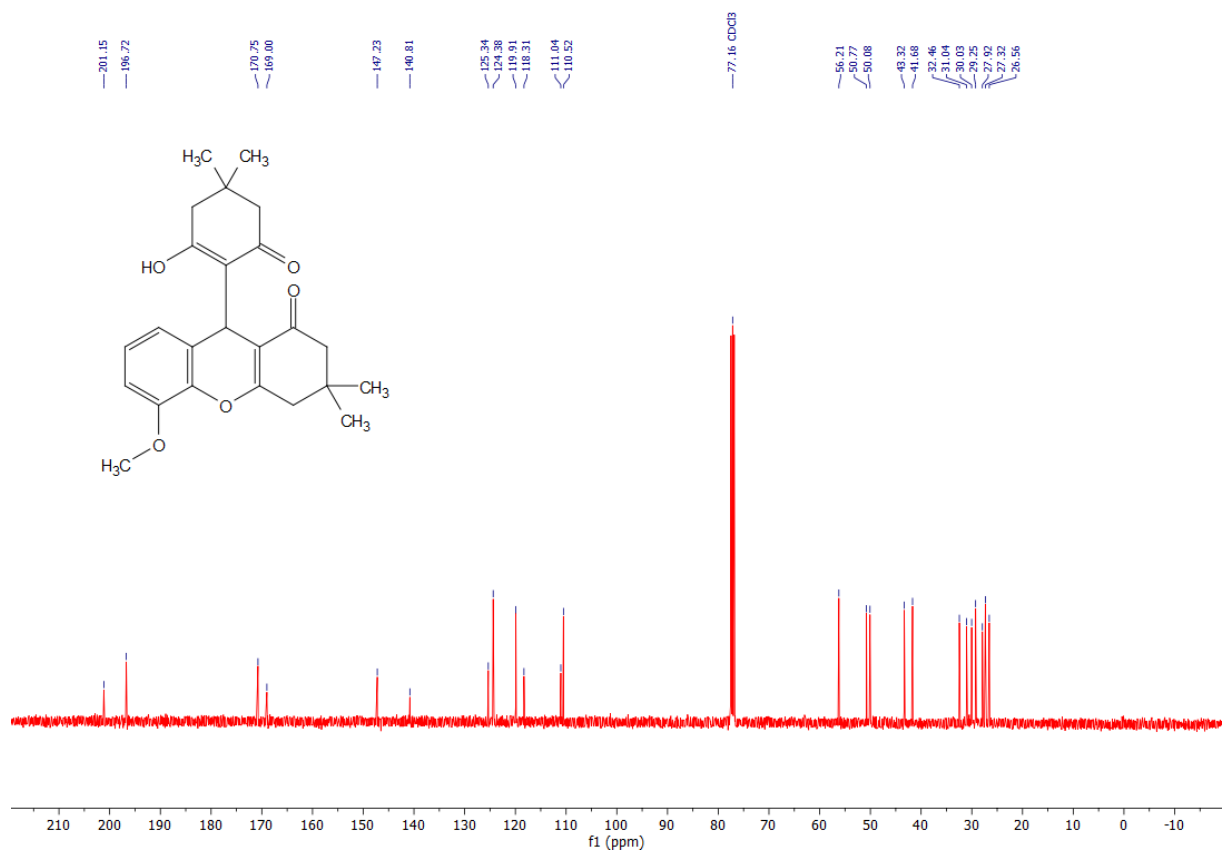
Figura S55. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **4g**.**Figura S56.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **4g**.

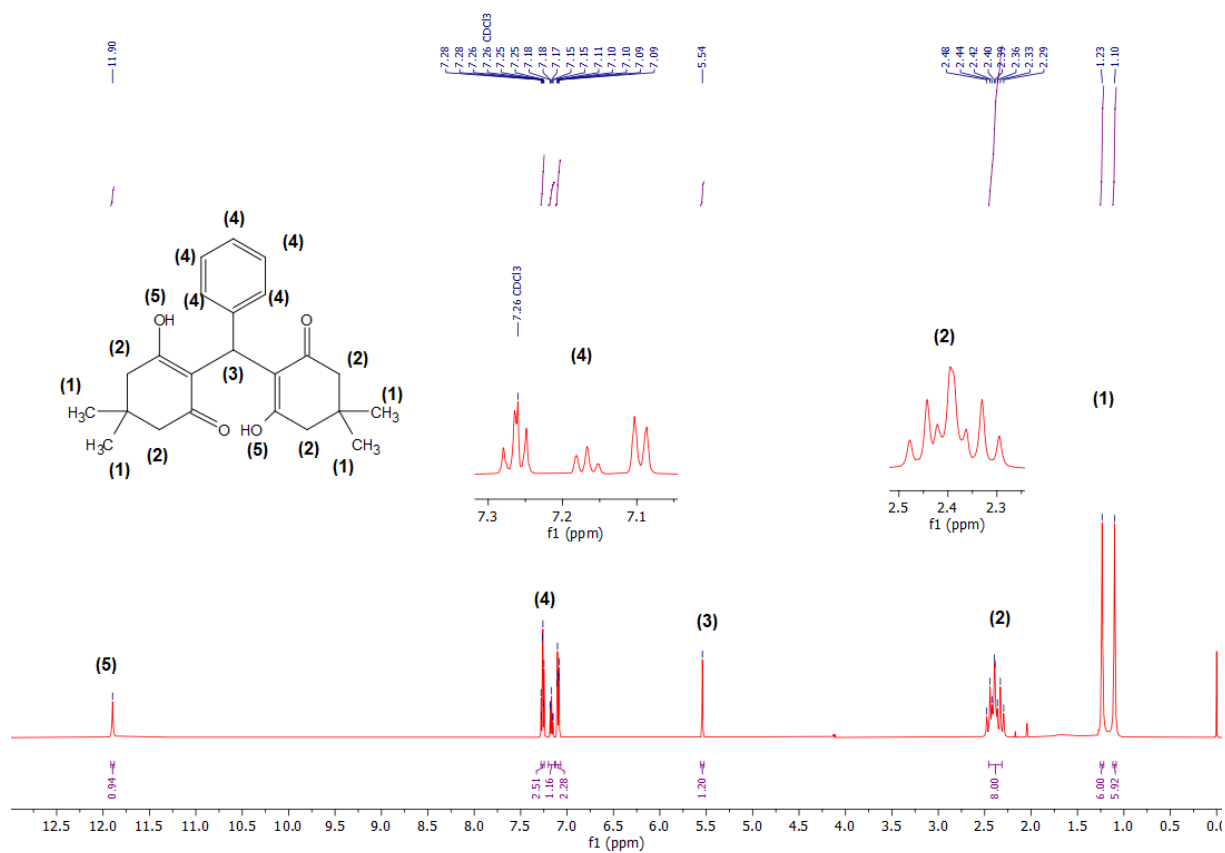
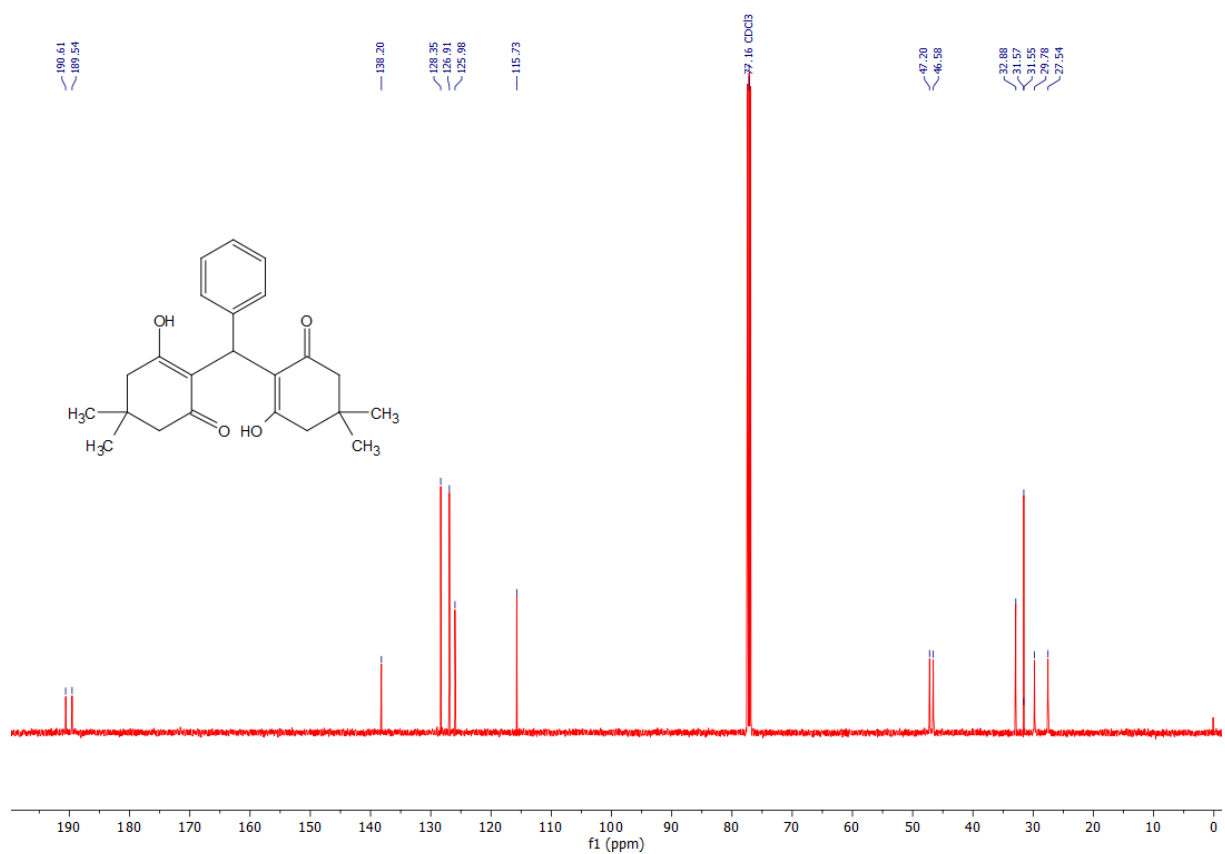
Figura S57. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto **5a**.**Figura S58.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto **5a**.

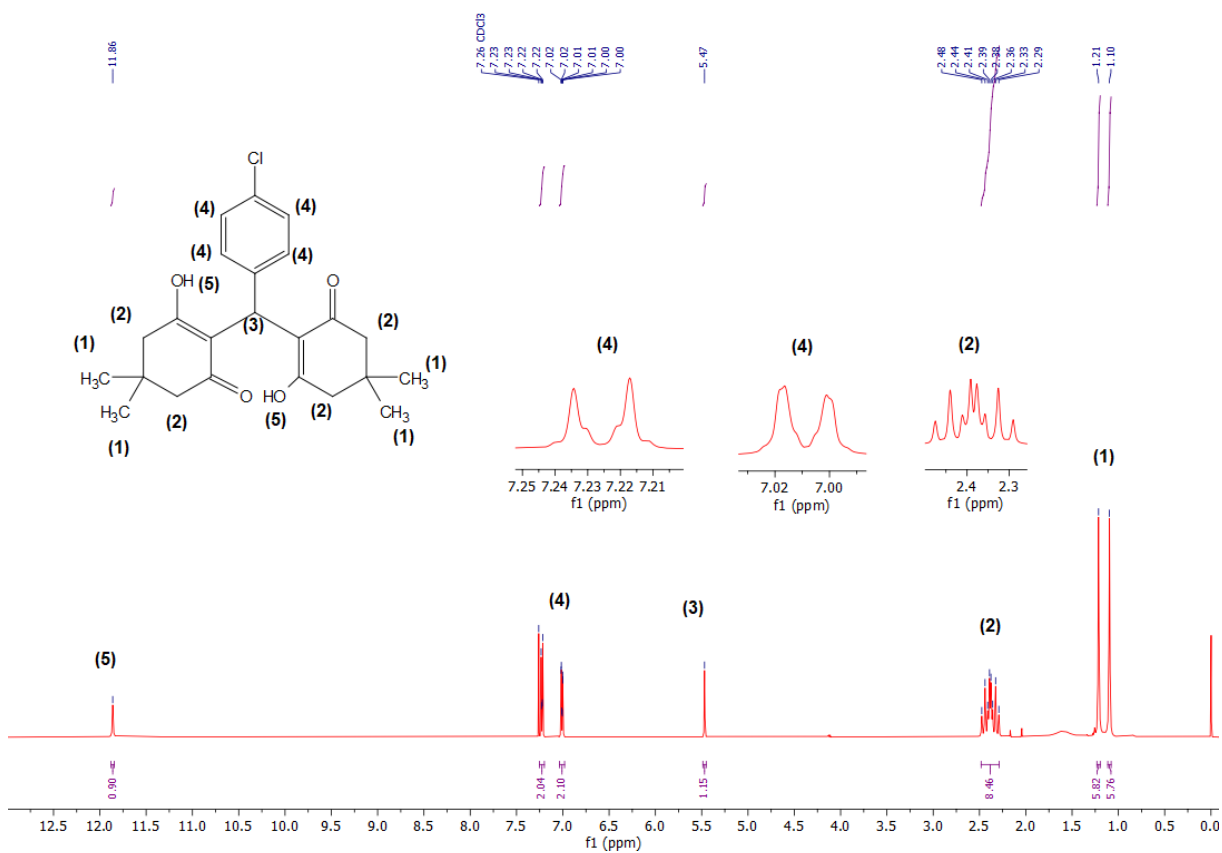
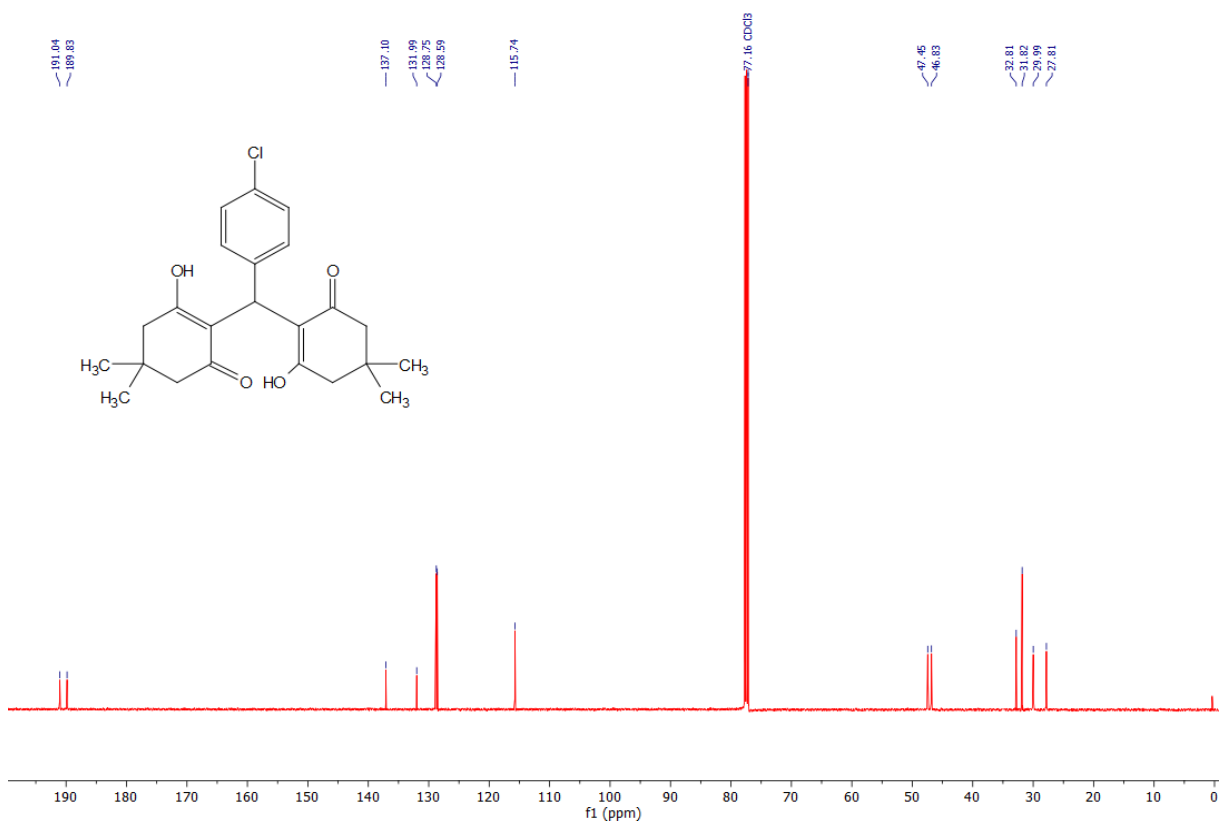
Figura S59. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto **5b**.**Figura S60.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto **5b**.

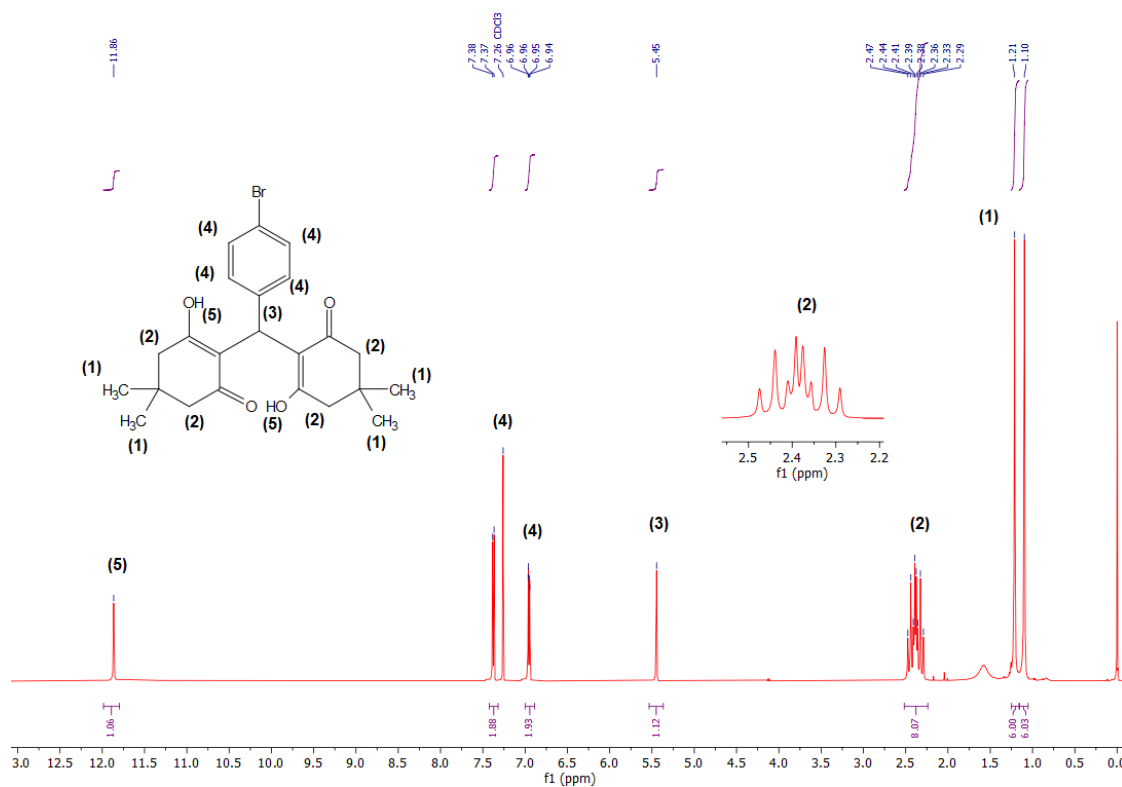
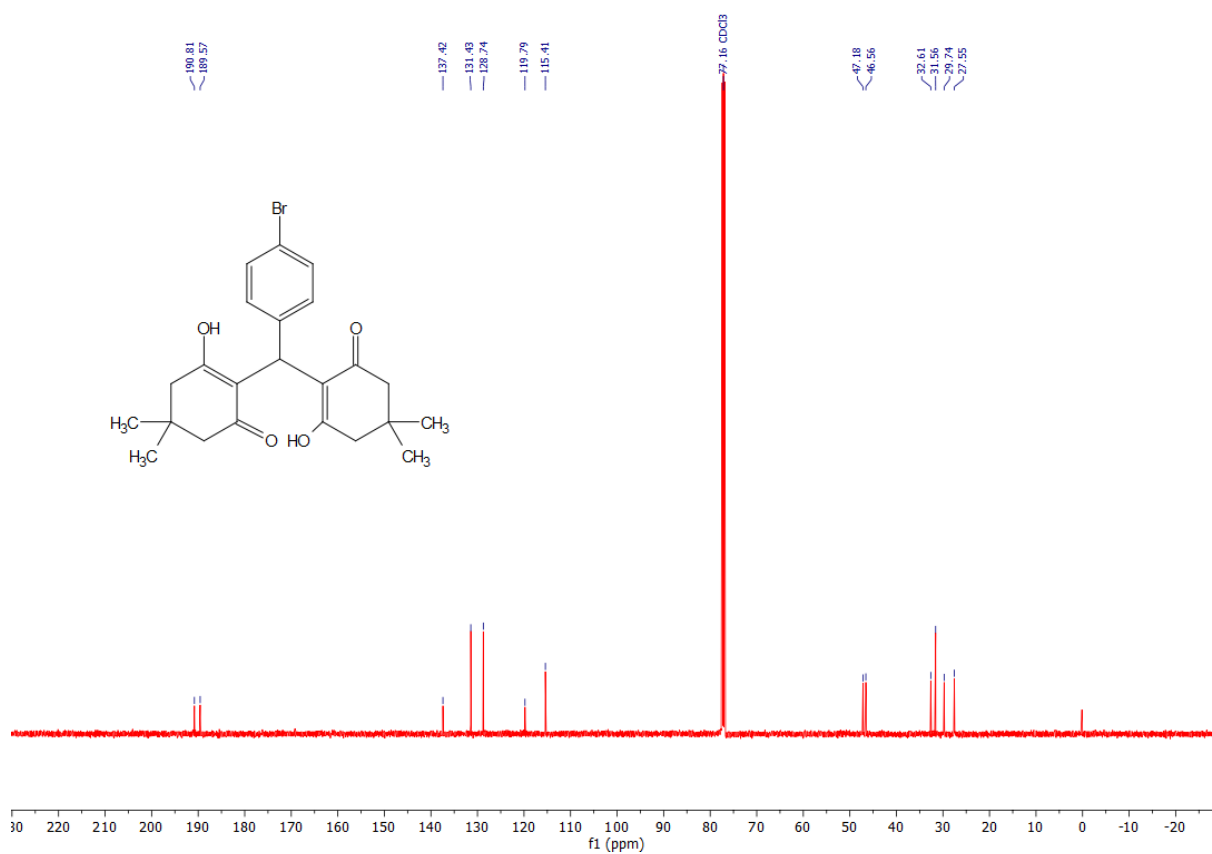
Figura S61. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto **5c**.**Figura S62.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto **5c**.

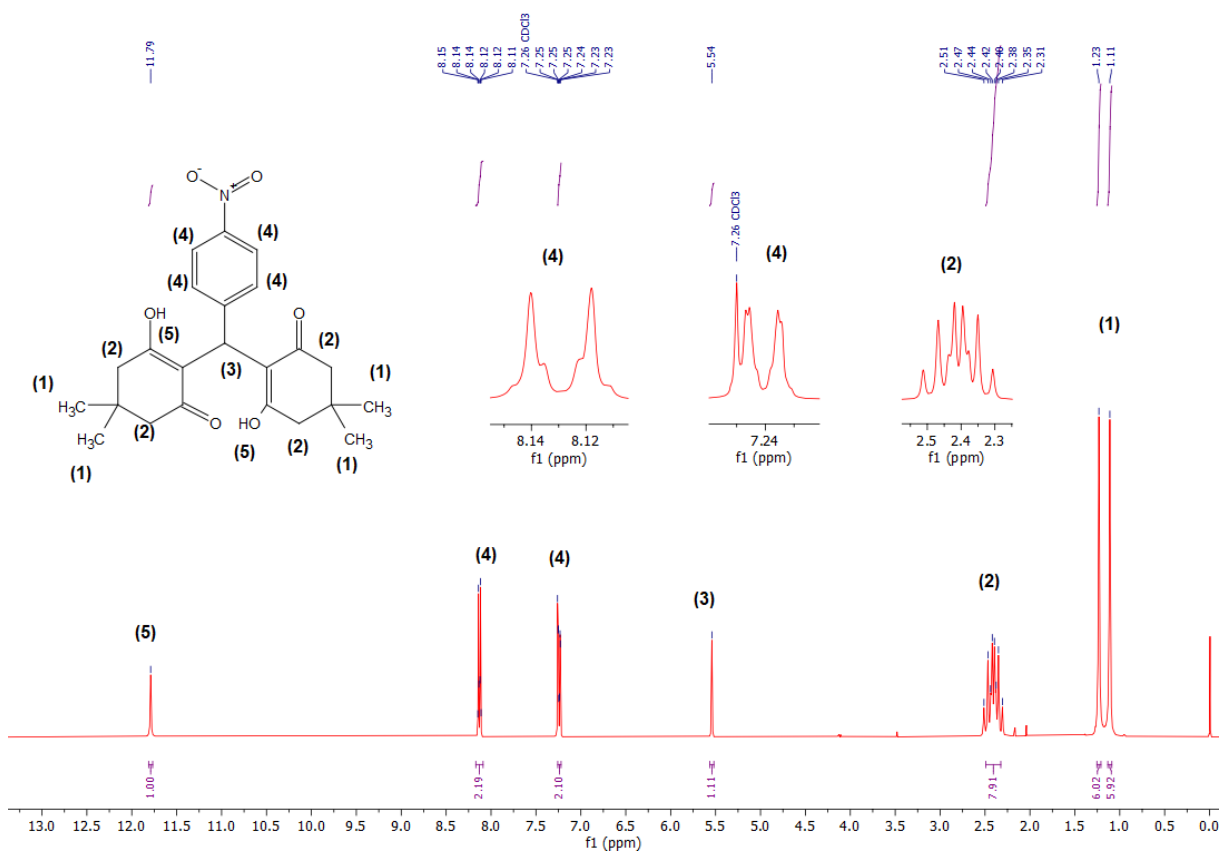
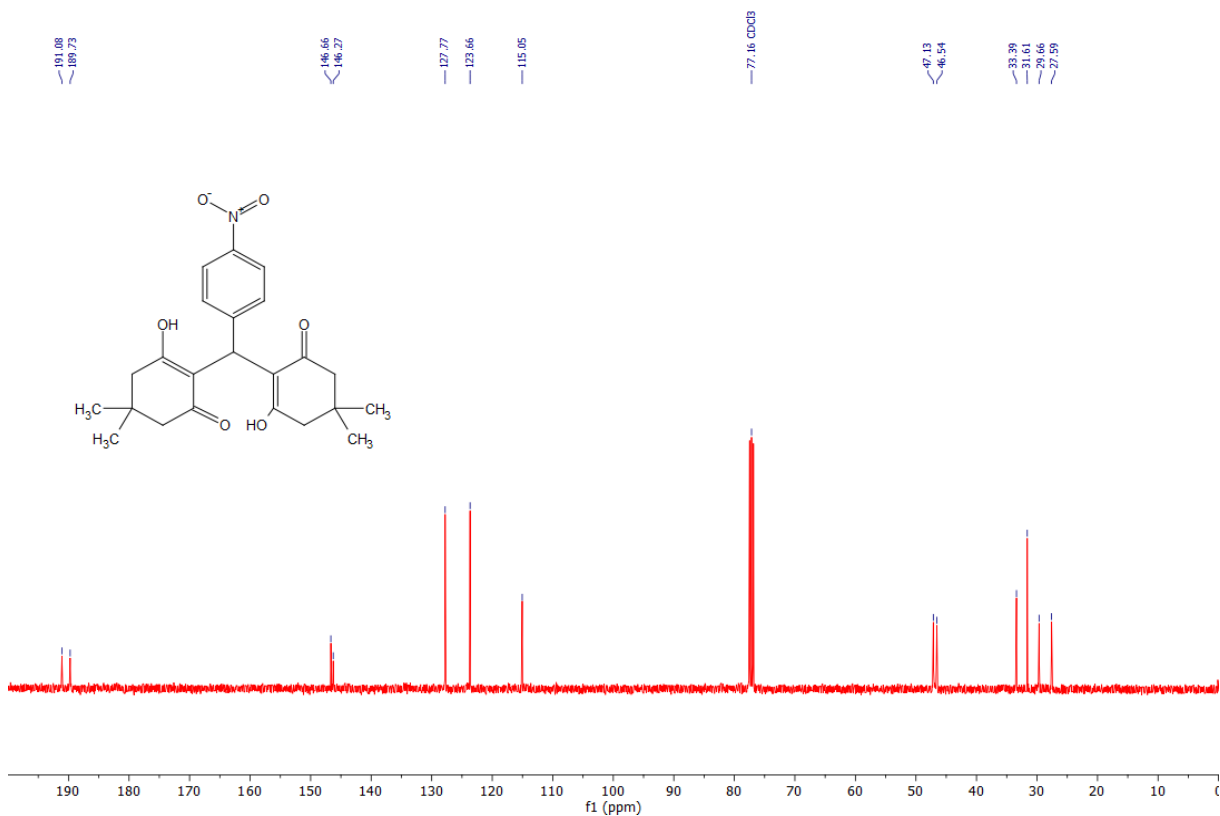
Figura S63. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **5d**.**Figura S64.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **5d**.

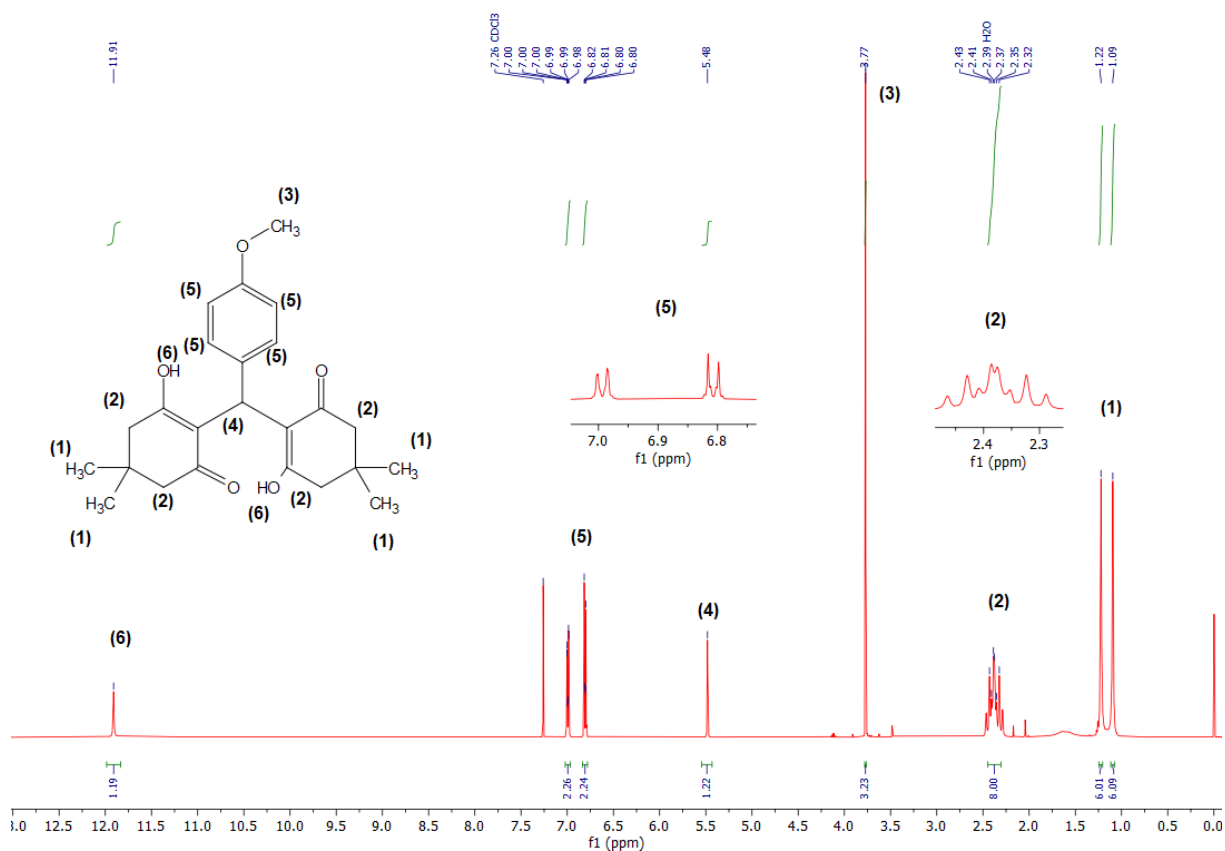
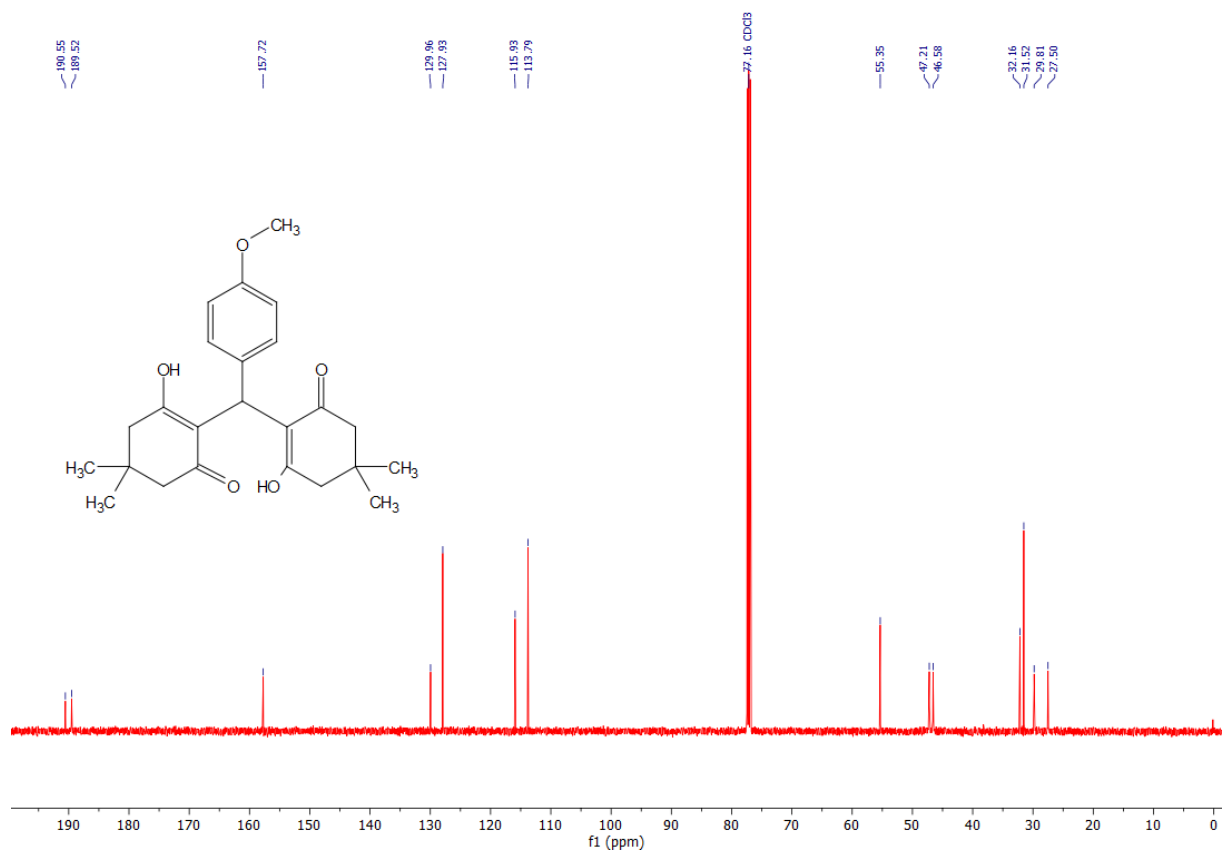
Figura S65. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto **5e**.**Figura S66.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto **5e**.

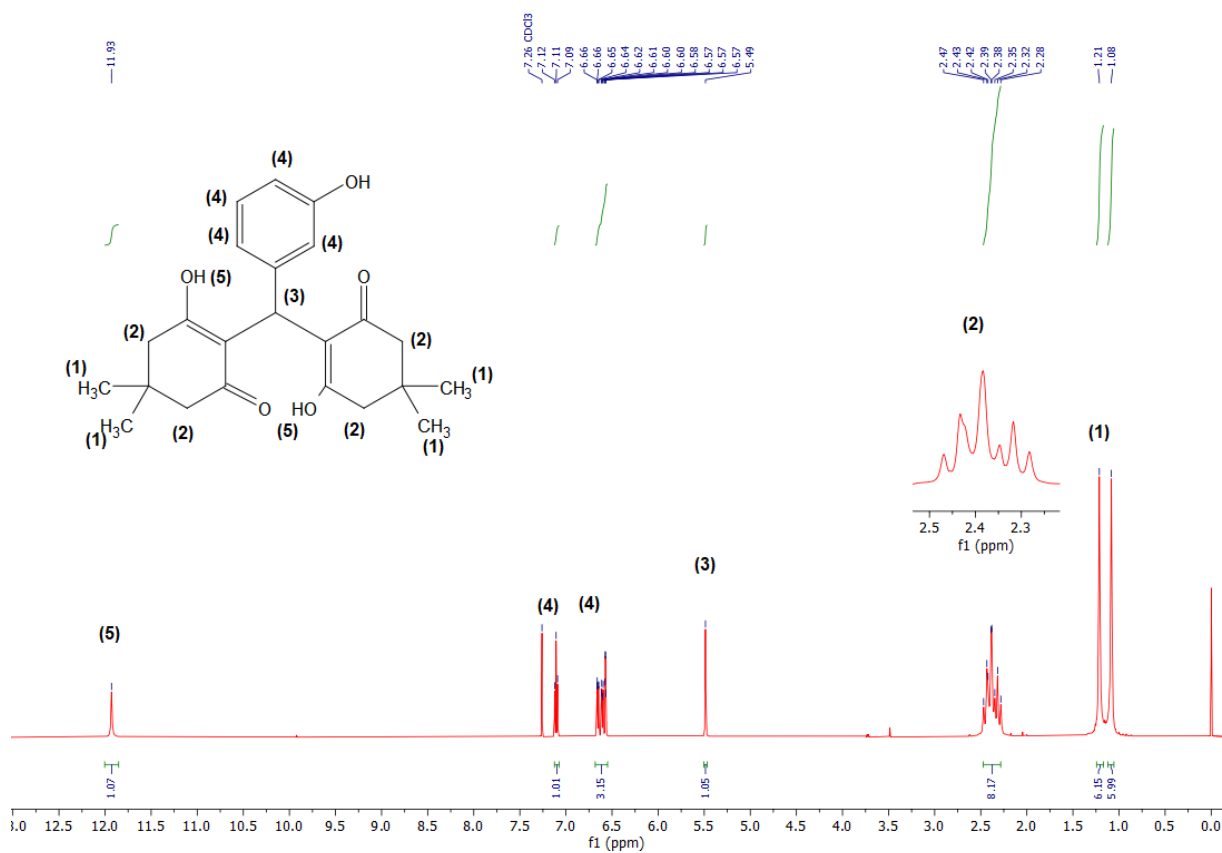
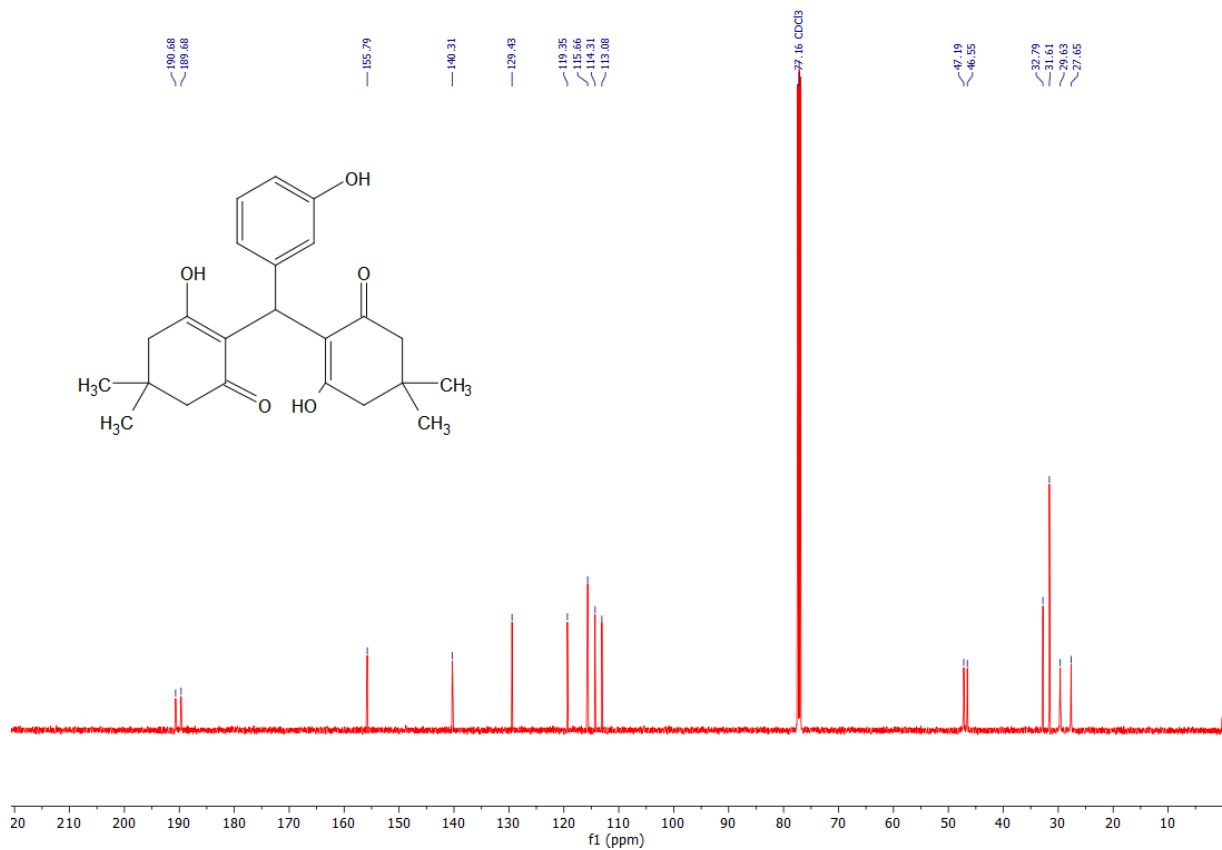
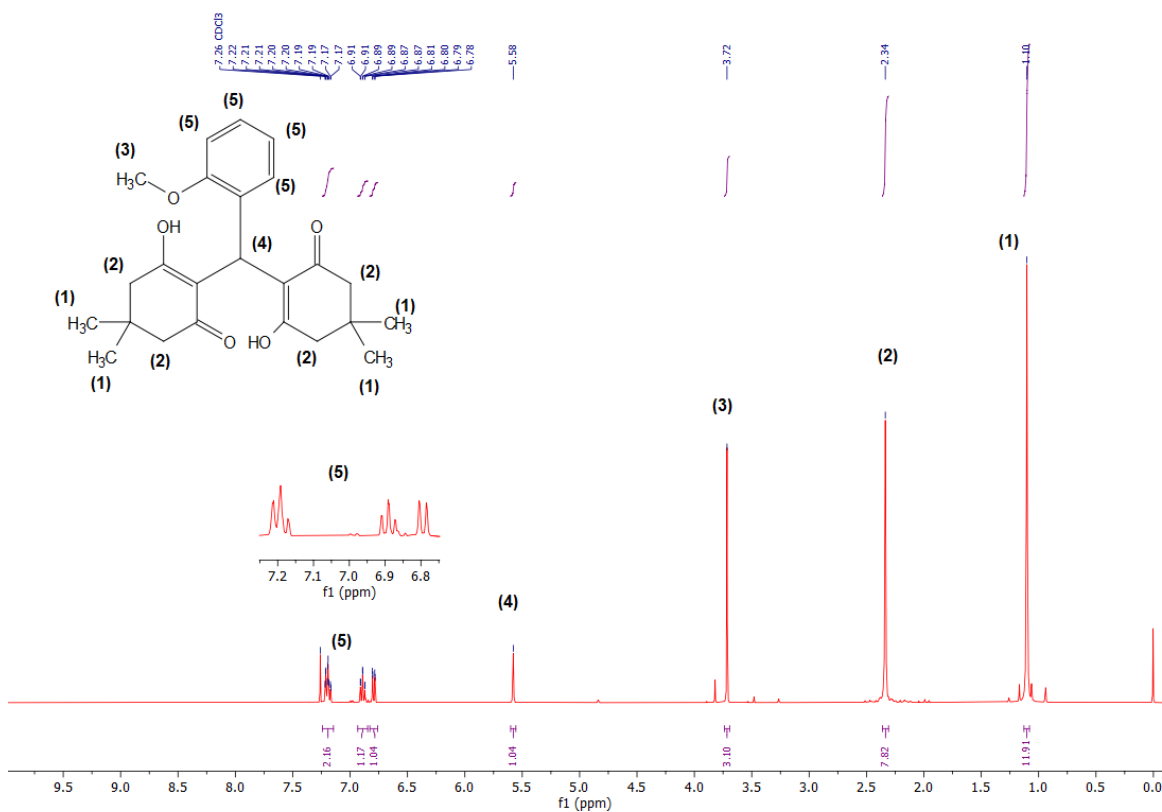
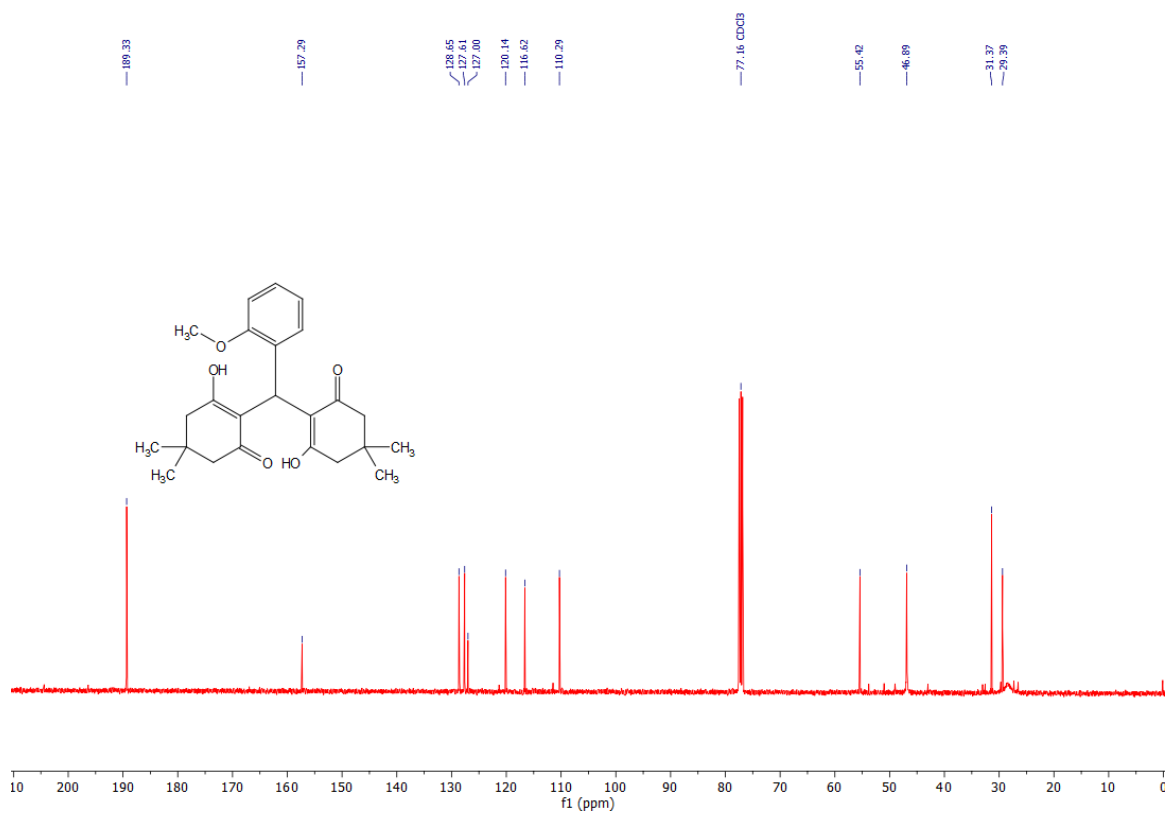
Figura S67. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto **5f**.**Figura S68.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do composto **5f**.

Figura S69. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **5g**.**Figura S70.** Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **5g**.

Artigo S1. Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity evaluation of coumarin-3-carboxylic acids obtained via cascade reaction using chitosan as a recyclable catalyst

NJC



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)

 Cite this: *New J. Chem.*, 2024,
 48, 12967

Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity evaluation of coumarin-3-carboxylic acids obtained via cascade reaction using chitosan as a recyclable catalyst†

 Paloma G. Abrantes,^a Israel F. Costa,^b Poliana G. Abrantes,^a
 Renata R. Magalhães,^a Bráulio A. Teixeira,^c José Lucas F. M. Galvão,^c
 Edeltrudes O. Lima,^c Ercules E. S. Teotonio^a and Juliana A. Vale *

In this work, commercial chitosan was used as a recyclable and biodegradable catalyst for efficient one-pot synthesis of coumarin-3-carboxylic acids in water or ethanol/water (5:7, v/v) at 75 °C via Knoevenagel-intramolecular cyclization cascade reaction. Coumarin-3-carboxylic acids (**3a–f**) were obtained from different substituted salicylaldehydes and Meldrum's acid under mild conditions in short times (10–45 min) and good isolated yields (77–88%) without requiring laborious purifications. The proposed method combined the advantages of homogeneous catalysis with recovery and recyclability of four times catalyst without compromising its catalytic activity and structural integrity. In the evaluation of *in vitro* antimicrobial activity against 4 bacterial and 8 fungal strains, the tested coumarin-3-carboxylic acids **3c–e**, **3h**, and **3i** showed an inhibitory effect on the growth of the microorganisms (0.024–256 µg mL^{−1}). Product **3d** showed the lowest MIC against fungal and bacterial strains (256 µg mL^{−1}), suggesting a bactericidal and fungicidal nature.

 Received 14th May 2024,
 Accepted 30th June 2024

DOI: 10.1039/d4nj02261k

ncl/jnc

1 Introduction

Coumarins are lactones of natural or synthetic sources, characterized by the presence of a benzo-*o*-pyran ring rich in highly conjugated π electrons.¹ Various medicinal effects are reported for its derivatives, such as use as drug carriers,² antitumor,³ anti-HIV,⁴ anti-inflammatory,⁵ antioxidants,⁶ and anticoagulants.⁷ Among them, coumarin-3-carboxylic acid and its derivatives constitute a subclass of compounds differentiated by the presence of the carboxyl group linked to carbon C3 of the pyran component of coumarin ring. These compounds stand out in studies from different areas since the carboxyl group allows the introduction of units that contribute to the increased chemical activity, for example, (i) the formation of coumarin-piperazine hybrids gives rise to compounds with potential anti-Alzheimer activity,⁸ (ii) the production of flexible and changeable films of coumarin-3-carboxylic acids/GdF₃:Sm³⁺ allows the luminescent detection of

pesticides in water even at micro concentrations,⁹ and (iii) the complexation of copper in coumarin-3-carboxylic acids originates efficient luminescent sensors for rapid detection of water in common organic solvents.¹⁰ Consequently, these compounds are considered promising for innovative work in industry and research.

The usual methods for the synthesis of coumarin-3-carboxylic acids include Knoevenagel-intramolecular cyclization cascade reaction as one of the main routes and uses salicylaldehyde and Meldrum's acid as reagents.^{11,12} In recent years, it has been possible to highlight the application of potassium carbonate or sodium azide as a reaction promoter in water at room temperature,¹³ the use of amino acids in ethanol or water under reflux,¹⁴ or still, the using of a bifunctional heterogeneous catalyst based on primary amide in methanol.¹⁵ Several other conditions for the synthesis of coumarin-3-carboxylic acids can also be found in the literature.^{16–20} However, to the best of our knowledge, the application of natural polymers has not still been reported.

Chitosan is one of the most abundant polymers in nature and shows remarkable properties, such as low cost, biodegradability, biocompatibility, non-toxicity, and solubility only in dilute acid solutions.^{19,20} It is still distinguished for having wanted characteristics in sustainable methodologies, acting mainly in the heterogeneous catalysis of various organic reactions,²¹ including Knoevenagel condensation.^{22,23} However, when used in synthesis coumarin-3-carboxylic acids, chitosan promotes homogeneous catalysis due to the low pK_a (H_2O) = 4.97 of Meldrum's

*Departamento de Química - Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Jardim Cidade Universitária, João Pessoa, PB, CEP: 58051-900, Brazil.

E-mail: juliana.ady@ufpb.br; Tel: +558332167941

^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Líbero Prestes, 748, São Paulo, SP, CEP: 05508-900, Brazil

^cDepartamento de Ciências Farmacológicas - Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Jardim Cidade Universitária, João Pessoa, PB, CEP: 58051-900, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d4nj02261k>

Artigo S2. Larvicidal potential of Knoevenagel adducts against *Aedes aegypti*: theoretical study and *in vitro* validation



Future Medicinal Chemistry



ISSN: 1756-8919 (Print) 1756-8927 (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/lfmc20

Larvicidal potential of Knoevenagel adducts against *Aedes aegypti*: theoretical study and *in vitro* validation

Paloma G. Abrantes, Poliana G. Abrantes, Renata R. Magalhães, Gildilayne M. Silva, Natália F. Sousa, Marcus T. Scotti, Renan T. Leite, Jheison M. C. Francelino, Fabíola C. Nunes & Juliana A. Vale

To cite this article: Paloma G. Abrantes, Poliana G. Abrantes, Renata R. Magalhães, Gildilayne M. Silva, Natália F. Sousa, Marcus T. Scotti, Renan T. Leite, Jheison M. C. Francelino, Fabíola C. Nunes & Juliana A. Vale (2025) Larvicidal potential of Knoevenagel adducts against *Aedes aegypti*: theoretical study and *in vitro* validation, Future Medicinal Chemistry, 17:9, 999-1011, DOI: [10.1080/17568919.2025.2498877](https://doi.org/10.1080/17568919.2025.2498877)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/17568919.2025.2498877>

 View supplementary material 

 Published online: 05 May 2025.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 44

 View related articles 

 View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lfmc20>

Artigo S3. Synthesis, antileishmanial activity and *in silico* study of isatin-derived Knoevenagel adducts

Journal of Molecular Structure 1353 (2026) 144641



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstr

Synthesis, antileishmanial activity and *in silico* study of isatin-derived Knoevenagel adducts

Paloma G. Abrantes^a, Gildilayne M. Silva^a, Israel F. Costa^b, Claudio G. Lima-Junior^{a,c},
Emelly S.F.R. Santos^a, Natália F. Sousa^c, Marcus T. Scotti^c, Ana L.M. Fernandes^d,
Delva T.F. Lamec^d, Tatjana S.L. Keesen^d, Ercules E.S. Teotônio^{a,c}, Juliana A. Vale^{a,*}

^a Departamento de Química - Universidade Federal do Paraíba - UFPB, Jardim Cidade Universitária CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil^b Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lima Poente, 748 CEP: 05308-000, São Paulo, SP, Brazil^c Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos/Biotecnologia, Universidade Federal do Paraíba - UFPB, Jardim Cidade Universitária CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil^d Departamento de Biologia Molecular e Celular - Universidade Federal do Paraíba - UFPB, Jardim Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Antileishmanial activity

Molecular docking

Isatin-derived Knoevenagel adducts

Chitosan

Heterogeneous catalysis

ABSTRACT

In this work, several isatin-derived Knoevenagel adducts (3a–h) were efficiently synthesized in short times (0.5–1 min) and isolated in high yields (88–94 %) using EDTA-functionalized chitosan (LWC-EDTA-72) as a bifunctional heterogeneous catalyst at room temperature. The catalyst was easily recovered and reused for six reaction cycles without significant loss of catalytic activity. Compounds 3b (R = 5-Cl; R' = H), 3c (R = 5-Br; R' = H), and 3g (R = CH₃; R' = N-benzyl) showed half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 15.05, 18.38, and 12.7 μM, respectively, against *Leishmania infantum* promastigotes. No cytotoxicity was observed against human red blood cells, resulting in a selectivity index (SI) >17.42 for 3b, >21.55 for 3c, and >26.31 for 3g. Against axenic amastigotes, compounds 3b, 3c, and 3g also showed activity with half-maximal effective concentration (EC₅₀) of 5.74, 4.64, and 3.8 μM, respectively. Furthermore, they exhibited moderate cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) assays, with CC₅₀ values of 27.03, 34.41, and 25.2 μM, respectively. AmB showed similar cytotoxicity but had a higher SI (33.6) than the studied compounds. *In silico* studies showed that compound 3g had the highest affinity for Trypanothione reductase from *Leishmania infantum* (PDB: 5HBK), forming a hydrogen bond with residue Ser470 (2.28 Å), while AmB was identified as the most stable ligand in terms of binding energy. The analysis of ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) indicated that isatin-derived Knoevenagel adducts have good oral bioavailability and high gastrointestinal absorption.

1. Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease caused by parasites of the *Leishmania* genus and is primarily transmitted through the bite of infected female phlebotomine sandflies. These insects acquire the parasite by feeding on previously infected animals or people [1,2]. The disease manifests in three main forms, classified as cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis, with the latter being the most severe and potentially fatal [3]. Despite advancements in its control, leishmaniasis is still considered a Neglected Tropical Disease (NTD) by the World Health Organization, affecting between 700,000 and 1 million people worldwide annually [4].

The treatment of leishmaniasis varies depending on the form of the

disease and the severity of symptoms. Antimonial drugs are frequently used for cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, while amphotericin B (AmB) is often the treatment of choice for visceral leishmaniasis, particularly in severe cases. Early initiation of treatment is crucial to prevent serious complications and potential fatalities, especially in visceral and mucocutaneous forms [5,6]. However, patients abandoning treatment represents a threat, as it increases the chance of parasite resistance [7].

The high cost, limited efficacy of some medications, treatment complexity, and significant adverse effects are key factors contributing to the abandonment of leishmaniasis treatment. Furthermore, lack of access to specialized health centers and knowledge about the importance of completing treatment also play an important role in this

* Corresponding author.

E-mail address: julianadq@yahoo.com.br (J.A. Vale).<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.144641>

Received 23 January 2025; Received in revised form 27 October 2025; Accepted 3 November 2025

Available online 4 November 2025

0022-2860/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Artigo S4. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity in tumor cells of xanthene and tetraketone derivatives obtained via cascade reaction using chitosan as an organocatalyst

Research on Chemical Intermediates
<https://doi.org/10.1007/s11164-025-05818-8>



Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity in tumor cells of xanthene and tetraketone derivatives obtained via cascade reaction using chitosan as an organocatalyst

Paloma G. Abrantes¹ · Poliana G. Abrantes¹ · Renata R. Magalhães¹ · Felipe S. C. Colaço¹ · Yuri V. Santos² · Gardenia C. G. Militão² · Ercules E. S. Teotônio¹ · Juliana A. Vale¹

Received: 14 August 2025 / Accepted: 9 November 2025
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2025

Abstract

This study investigated the use of commercial chitosan as a simple, eco-friendly, and efficient organocatalyst for the synthesis of xanthene and tetraketone derivatives via a cascade reaction. The reaction between various salicylaldehydes and dimedone (1:2 molar ratio), conducted in water at 75 °C, and catalyzed by chitosan, produced xanthene derivatives (**3a–g**) in good to excellent isolated yields (73–93%) within short reaction times (10–60 min). When benzaldehyde was employed as the aldehyde component, tetraketone derivatives (**5a–g**) were formed instead of xanthene derivatives. A series of substituted benzaldehydes were also investigated, efficiently affording the corresponding Tetraketone derivatives in high yields (82–94%) and short reaction times (10–20 min). The reusability of chitosan was confirmed, with no significant decrease in catalytic activity or structural integrity after six consecutive cycles. The synthesized compounds were evaluated for their cytotoxic activity against K-562, A-549, and HCT-116 tumor cell lines, as well as the non-tumor cells MRC-5. Xanthene derivatives demonstrated superior activity, particularly compound **3f**, which exhibited low IC₅₀ value for HCT-116 (5.54 μM) and SI of 0.54 (SI = IC₅₀ (MRC-5)/IC₅₀ (HCT-116)). These findings indicate the potential of these molecules as anticancer agents, while also highlighting the need for further structural optimization to enhance selectivity, especially against colon cancer cells.

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 19 November 2025

Springer