

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Nathália Cavalcanti Colaço Cordeiro

**NOVOS AGENTES ANTICÂNCER TIAZACRIDÍNICOS SUBSTITUÍDOS:
SÍNTESE, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE *IN VITRO*.**

Recife

2012

Nathália Cavalcanti Colaço Cordeiro

**NOVOS AGENTES ANTICÂNCER TIAZACRIDÍNICOS SUBSTITUÍDOS:
SÍNTESE, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE *IN VITRO*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Inovação Terapêutica, na área de concentração: Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

Recife

2012

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso
CRB 1728

Cordeiro, Nathália Cavalcanti Colaço

Novos agentes anticâncer tiazacridínicos substituídos: síntese, características físico-químicas e avaliação da citotoxicidade *in vitro*/ Nathália Cavalcanti Colaço Cordeiro– Recife: O Autor, 2012.

74 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador: Maira Galdino da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia

1. Tiazoles 2. Acridina 3. Câncer 4. Toxicidade- testes I. Maria do Carmo Alves de Lima (orientadora) II. Pitta, Maira Galdino da Rocha (coorientadora) III. Título

547.594

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-266

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas dourado

Vice-Reitor

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Dr. Francisco de Sousa ramos

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Nathália Cavalcanti Colaço Cordeiro

**NOVOS AGENTES ANTICÂNCER TIAZACRIDÍNICOS SUBSTITUÍDOS:
SÍNTESE, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE *IN VITRO*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Inovação Terapêutica, na área de Concentração Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos. Defesa realizada em 29/10/2012.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a.: Maria do Carmo Alves de Lima
Departamento de Antibióticos - UFPE

Assinatura: -----

Dr.: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Núcleo de Pesquisas para Inovação Terapêutica - NUPIT/UFPE

Assinatura: -----

Prof^a Dr^a Ana Cristina Lima Leite
Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE

Assinatura: -----

Dedicatória

A Deus, por me permitir viver essa etapa importante e ter me abençoado em todos os momentos.

A minha tia Dilcia e primas Ana Valéria e Manuela, pelo amor e cuidados me dados e por me ensinarem o caminho para chegar até aqui.

Ao meu pai Nehemias e irmão George, por serem fundamentais na minha vida.

Ao meu marido Alberto, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão de sempre.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima pela qual tenho grande admiração e respeito. Agradeço a oportunidade e a forma como foi recebida desde a graduação até o momento. Pelos ensinamentos, pelo incentivo e apoio em todos os momentos, pela orientação em todas as etapas do trabalho, pela amizade e momentos vividos que vão perdurar ao longo da vida.

A Prof^a. Dr^a. Maíra Galdino da Rocha Pitta pela co-orientação do trabalho, pelo apoio e ensinamentos, e por possibilitar a realização dos testes de citotóxicidade *in vitro*.

A Paulo Germano Moreira de Brito, secretário do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, pela colaboração demonstrada durante todo o curso.

Aos meus amigos da pós-graduação e do LPSF/UFPE Anekécia Lauro, Andreza Tavares, Antônio Sérgio, Aracely França, Beatriz Souza, Elizabeth Almeida, Leidiane Lira, Luíz Carlos, Marina Pitta, Michele France, Sandra Sarinho, Sanderssonilo Albuquerque, Sinara Mônica, Sybelle Pedrosa, Tiago Bento, Vinícius Barros e Willams Leal, e a todos companheiros de laboratório que me ajudaram direta ou indiretamente e que foram fundamentais pelo meu crescimento científico, através das trocas constantes feitas no dia-a-dia. Pela amizade e momentos especiais vividos que ficarão para sempre na memória.

A minha família que é a parte fundamental da minha vida, pelo amor, afeto, apoio, incentivo, compreensão e orações dedicadas a mim.

Ao CNPq pelo apoio financeiro muito importante durante esse período, sem o qual seria difícil a realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Intercalantes do DNA	25
Figura 2 - Estrutura química do anél acridínico	27
Figura 3 - Diferença da molécula da Amsacrina em relação aos compostos sintetizados por Pitta et.al.	28
Figura 4 – 2-amino-acridina	30
Figura 5 - 4-(amino-metil)-3-dimetil-amino-acridina	30
Figura 6 - Derivados acridínicos obtidos por Rocha Pitta (2010)	34
Figura 7 - Estruturas teóricas dos diastereoisômeros <i>Z</i> e <i>E</i> para as tiazolidonas substituídas	48
Figura 8 – Viabilidade celular (%) da linhagem T47D em função das doses testadas.	58
Figura 9- Viabilidade celular (%) da linhagem HEPG2 em função das doses testadas.	58
Figura 10- Viabilidade celular (%) da linhagem NG97 em função das doses testadas.	59
Figura 11- Viabilidade celular (%) da linhagem Jurkat em função das doses testadas.	59
Figura 12- Viabilidade celular (%) da linhagem Raji em função das doses testadas.	60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Síntese do anel acridínico realizada por Radchenko et.al. (2011)	28
Esquema 2 - Síntese do anel acridínico realizada por Goodell et.al. (2006)	29
Esquema 3 - Síntese da 2-metóxi-6-cloro-9-(2'-metóxi-4'-metanosulfonamida analina)-acridina realizada por Ferlin et al. (2000)	31
Esquema 4 - Obtenção do intermediário acridínico reativo por Silva (2001)	31
Esquema 5 – Síntese dos derivados tiazacridínicos realizada por Silva (2003)	32
Esquema 6 – Síntese de derivados 4-tioxo-imidazacridínicos e 4-tioxo-tiazacridínicos realizada por Magalhães (2003)	32
Esquema 7 - Diagrama de síntese dos derivados tiazacridínicos	37
Esquema 8 – Mecanismo de reação de ciclização da tiazolidina-2,4-diona	43
Esquema 9. Mecanismo reacional de <i>N</i> -alquilação da tiazolidina-2,4-diona	44
Esquema 10. Reação de condensação de Knoevenagel	46
Esquema 11. Suposto mecanismo da reação de adição de Michael em derivados tiazolidínicos	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da inibição do crescimento da massa tumoral dos compostos LPSF/AC-28 e LPSF/AC-119 com doses baseadas na DL ₅₀ em camundongos Swiss com Sarcoma 180 induzido	33
Tabela 2 – Estrutura química dos compostos sintetizados com as respectivas quantidades dos LPSF/IPs utilizadas para cada síntese.	40
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ calculados para os compostos testados frente as linhagens T47D, HEPG97 e NG97.	60
Tabela 4 - Valores de IC ₅₀ calculados para os compostos testados frente as linhagens Raji e Jurkat.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD - Cromatografia de camada delgada

DL₅₀ - Dose Letal mediana (50%)

DMSO - Dimetilsulfóxido

GB - Gas-phase basicities

GPIT - Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica

HCT-8 - Linhagem celular de carcinoma de cólon

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

HEPG2 - Linhagem celular de carcinoma hepático

IR/ IV - Infravermelho

Jurkat - Linhagem celular derivada de Linfócitos T de leucemia

KHCO₃ - Bicarbonato de potássio

LINAT - Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

LPSF - Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos

m-AMSA - Amsacrina

MDA-MB435 - Linhagem celular de melanoma

MK - Merz-Singh-Kollman

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

NG97 - Linhagem celular de glioma humano

PCC - Clorocromato de piridínio

P.F - Ponto de fusão

ppm - Partes por milhão

Raji - Linhagem celular derivada de linfoma humano

Rf - Razão de frente

RMN¹H - Ressonância Magnética Nuclear do isótopo de massa um

RMN¹³C - Ressonância Magnética Nuclear do isótopo de massa treze

RPMI - Meio de cultura de tecido animal

SF-295 - Linhagem celular do sistema nervoso central

T47D - Linhagem celular de câncer de mama

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e alberga intensos e crescentes investimentos em pesquisa oriundos dos setores público e privado. Considerando os alarmantes indicadores epidemiológicos registrados e a visível carência de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para esta patologia, o Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos vem, desde o final da década de 1980, desenvolvendo moléculas com potenciais propriedades anticâncer. A meta é minimizar o impacto dessa doença no Brasil e no mundo. Para tanto, conhecendo-se as propriedades anticâncer de derivados da acridina, este trabalho teve como objetivo preparar, determinar as características físico-químicas, caracterizar estruturalmente e avaliar a atividade anticâncer de oito moléculas originais derivadas da acridina. Nos ensaios *in vitro* foram utilizadas linhagens celulares T47D, NG97, HEPG2, Jurkat e Raji. Para a realização das sínteses, foram realizadas reações de *N*-alquilação, condensação, ciclização e adição de Michael. As moléculas obtidas foram comprovadas através de métodos espectroscópicos no infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectrometria de massas. Os resultados revelam que o composto 3-(acridin-9-ilmetil)-5-(5-bromo-1*H*-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-29) se destacou por apresentar menores valores de viabilidade celular para as linhagens T47D, HEPG2 e NG97 de células testadas, chamando atenção para a dose de 50 μ M que foi a melhor. Também foi possível observar que o substituinte triazol presente no composto LPSF/AA-48 possibilitou uma maior toxicidade frente as linhagens Raji e Jurkat, principalmente na dose de 100 μ M.

Palavras-chave: Tiazacridinas, MTT, Atividade anticâncer.

ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death in the world and is home to intense and increasing investments in research coming from the public and private sectors. Whereas the alarming epidemiological indicators recorded and visible lack of more effective and less toxic drugs for this condition, the Laboratory Planning and Synthesis of Pharmaceuticals has, since the late 1980s, developing molecules with potential anticancer properties. The goal is to minimize the impact of this disease in Brazil and worldwide. To do so, knowing the anticancer properties of acridines derivatives, this study aimed to prepare, determine the physico-chemical characteristics, structurally characterize and evaluate the anticancer activity of eight original molecules derived from acridines. *In vitro* cell lines T47D, NG97, HEPG2, Jurkat and Raji were used. To perform the synthesis, reactions of N-alkylation, condensation, Michael addition and cyclization were performed. The molecules obtained were confirmed by spectroscopic methods in the infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. The results show that compound 3 - (acridin-9-ylmethyl)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/AA-29) stood out with lower values for T47D cell viability, and HEPG2 NG97 tested cell lines, calling attention to the dose of 50 mM which was the best. Was also observed that the triazole substituent present in the compound LPSF/AA-48 allowed greater toxicity across the Raji and Jurkat cell lines, especially at a dose of 100 mM.

Keywords: Acridines, MTT, anticancer activity.

SUMÁRIO

Agradecimentos

Lista de Figuras

Lista de Esquemas

Lista de Tabelas

Resumo

1. Introdução	16
2. Objetivos	19
2.1. Gerais	20
2.2. Específicos	20
3. Revisão da literatura	21
3.1. Prevalência do câncer no Brasil e no mundo	22
3.2. Tratamento do câncer	23
3.2.1. Agentes intercalantes do DNA	24
3.3. Acridina e seus derivados	25
3.4. A química das acridinas	27
4. Parte química	35
4.1. Planejamento e síntese de fármacos	36
4.2. A importância da modificação molecular	36
4.3. Materiais e métodos	37
4.4. Descrição da metodologia e dos compostos obtidos	37
4.4.1. Obtenção da tiazolidina-2,4-diona	39
4.4.2. Obtenção da 9-metil-acridina (LPSF/AC-1)	39
4.4.3. Obtenção da 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160)-	39
4.4.4. Obtenção da 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-1A)	40
4.4.5. Obtenção de ésteres de Cope (LPSF/IPs)	40
4.4.6. Obtenção da 3-(acridin-9-ilmetil)-5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AAs)	41
4.5. Resultados e Discussão	43
4.5.1. Mecanismo reacional	43
4.5.2. Determinação da Configuração da Dupla Exocíclica	46

4.5.3. Características físico-químicas e resultados espectroscópicos	47
4.5.3.1. Tiazolodina-2,4-diona	47
4.5.3.2. Derivados tiazacridínicos	48
5. Parte biológica	53
5.1. Materiais e métodos	55
5.2. Resultados e Discussão	56
6. Conclusão	61
7. Perspectivas	63
8. Referências bibliográficas	65

/

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença decorrente da divisão celular descontrolada e resulta no desenvolvimento de tumores sólidos ou de partes moles. Acomete milhares de pessoas por ano e é uma das maiores causas de morte no mundo. Devido a esses números alarmantes, essa doença é um importante problema de saúde pública que se destaca em países desenvolvidos e em desenvolvimento (INCA, 2011).

O tratamento do câncer envolve intervenção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia de forma conjugada ou isolada, adequada para cada tipo da doença (Shewach, 2009). Várias terapias já estabelecidas e experimentais têm como alvo os mecanismos moleculares de morte celular. (Galluzzi, 2009).

A quimioterapia é realizada com o objetivo de destruir e eliminar as células do tumor ou impedir que elas se multipliquem e se alastrem pelo organismo. Porém, devido à alta toxicidade que as drogas apresentam, esta intervenção causa muitos efeitos colaterais indesejados como supressão da medula óssea, lesões do trato gastrointestinal, perda de cabelo e náusea, pois os medicamentos agem não somente nas células danificadas, mas também nas normais (Thurston, 2007).

O tratamento quimioterápico pode ser realizado com diversas classes de drogas como os antimetabólicos, agentes alquilantes, inibidores mitóticos e os intercalantes de DNA os quais podem inibir as enzimas topoisomerases.

Desde o início do século XX as acridinas vêm sendo cada vez mais utilizados pelas suas propriedades farmacológicas. A sua estrutura molecular é formada por um complexo tricíclico planar, chamado anel acridínico, que tem a habilidade de interferir em vários processos metabólicos de células de eucariontes e procariontes (Denny, 2002). Elas apresentam um amplo espectro de atividade biológica também sendo utilizadas como antibacteriano e antiprotozoário, além de antineoplásico (Denny, 2003; Lorente, 2004).

Derivados da 9-anilinoacridina, como a amsacrina, desempenham um papel importante na medicina como candidatos aprovados para o tratamento do câncer. Eles são poderosos intercalantes de DNA que inibem sua replicação devido à formação de complexos da topoisomerase II com DNA, impedindo a divisão celular e levando a célula à morte celular por apoptose (Doh-ura, 2000; Gurova, 2009; Raza, 2011).

Com relação à busca por novas drogas, a modificação molecular de protótipos preexistentes tem sido há muitos anos uma das principais estratégias adotadas. A modificação molecular consiste na realização de pequenas modificações químicas em um composto protótipo matriz, possuidor de estrutura química e atividades biológicas bem conhecidas (mantendo constante seu grupo farmacofórico) obtendo-se novos compostos análogos, sem perda das principais propriedades do composto matriz (Montanari, 1995).

Baseado nisso, e em outras perspectivas, grupos de pesquisas de todo mundo vem buscando o desenvolvimento de novas drogas capazes de superar o processo de resistência, disponibilizando assim novas opções de quimioterápicos. Dentre esses, os derivados 9-anilínico-acridínicos, vem apresentando excelentes resultados, e alguns deles já se encontram em uso clínico, como o 4-(9-Acridinilamino)-N-(metanesulfonil)-*m*-anisidina – Amsacrina (*m*-AMSA), principalmente para o tratamento de leucemias agudas (BACHERIKOV et al., 2005).

O Grupo de Pesquisa e Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco – GPIT/UFPE, pioneiro na síntese e avaliação da atividade antitumoral de derivados Tiazacridínicos e Imidazacridínicos, no Brasil, vem enfatizando seus projetos na busca de novos derivados, assim como no aperfeiçoamento e obtenção desses, através de parcerias com grandes centros de pesquisas no mundo.

Diante do esforço para descobrir medicamentos mais eficazes, mais baratos e menos tóxicos, associado ao grande potencial antitumoral de diversas acridinas, visualizamos a possibilidade de desenvolver novas moléculas sintéticas, terapeuticamente úteis, análogas a Amsacrina, que possam servir como novos agentes anticâncer.

Para isso, houve desenvolvimento de rota sintética visando à obtenção de novos compostos quimicamente relacionados à Amsacrina. Seguida da análise das características físico-químicas e estruturais dos novos derivados. Por fim, a realização de teste de citotoxicidade com células tumorais de cinco diferentes linhagens, utilizando o ensaio de MTT.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer através da síntese de novas moléculas tiazacridinas.

2.2. Específicos

- Sintetizar os derivados tiazacridínicos substituídos (LPSF/AAs);
- Determinar as características físico-químicas dos derivados tiazacridínicos LPSF/AA-29, LPSF/AA-35, LPSF/AA-36, LPSF/AA-38, LPSF/AA-39, LPSF/AA-40, LPSF/AA-41 e LPSF/ AA-48;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos novos derivados sintetizados pelo método do MTT, utilizando as linhagens de células tumorais T47D, HEPG2, NG97, Jurkat e Raji.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

Em organismos multicelulares, a programação para ocorrer à morte celular é essencial para vários processos fisiológicos, como a embriogênese, desenvolvimento pós-embrionário e a manutenção da homeostase do tecido adulto. Entretanto, quando esse mecanismo de morte celular está desregulado, pode caracterizar a etiologia determinante de patologias agudas e crônicas, como as doenças autoimunes e o câncer, o qual decorre de condições de proliferação celular excessiva, entre outras causas (Galluzzi, 2009).

Sabe-se que fatores genéticos e ambientais, alguns tipos de vírus e de agentes físicos, e várias substâncias químicas são responsáveis pelo surgimento de vários tumores humanos e animais (Brasileiro Filho et al., 1994).

O surgimento do câncer pode ser relacionado com a idade do indivíduo que é em média aos 65 anos de idade. Isto se dá por uma série de fatores que vão se acumulando com o passar do tempo, os quais são chamados de “hits”. Estes são resultados da susceptibilidade genética e de fatores ambientais como agentes químicos, radiação, vírus, bactérias, infecções parasitárias e até mesmo radicais livres, estes últimos produzidos endogenamente (Ruddon, 2007).

3.1. Prevalência do câncer no Brasil e no mundo

O processo de industrialização que o mundo sofreu, desencadeado no século passado, possibilitou a integração das economias e sociedades de vários países e possibilitou a redefinição de vários aspectos de estilo de vida como condições de trabalho, modelos de nutrição e consumo (Waters, 2001).

Nesse período houve uma mudança na demografia mundial causada pela redução nas taxas de mortalidade e natalidade, o aumento da expectativa de vida e consequentemente o envelhecimento da população. Essas transformações globais desencadearam significativas modificações nos padrões de saúde-doença no mundo, como uma transição epidemiológica caracterizada pela diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas, em especial as doenças cardiovasculares e o câncer (Abala e Yanes, 1997).

O câncer é uma doença decorrente da divisão celular descontrolada e resulta no desenvolvimento de tumores sólidos ou de partes moles. Acomete milhares de

peessoas por ano e é uma das maiores causas de morte do mundo. Foram estimadas para o ano de 2008, 7.6 milhões de mortes no mundo (em torno de 13% de todas as mortes) e a projeção é que o número de mortes continue crescendo para mais de 11 milhões no ano de 2030. No Brasil, em 2008, foram registradas taxas de mortalidade por câncer no Brasil de 93,2 mortes por 100.000 para os homens, quando a taxa padrão brasileira para este ano seria 87,22; e 77,1 por 100.000, para mulheres, diferente da taxa padrão estimada de 62,1 (INCA, 2011).

No mundo, os principais tipos de câncer com maior índice de mortalidade são o de pulmão (1.4 milhões de mortes), estômago (740.000 mortes), fígado (700.000 mortes), colo-retal (610.000 mortes) e mama (460.000 mortes). No Brasil, estimou-se para o ano de 2011 a ocorrência de 489.270 novos casos da doença. Devido a esses números alarmantes, essa doença é um importante problema de saúde pública que se destaca em países desenvolvidos e nos que estão em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2008).

3.2. Tratamento do câncer

Atualmente, existem algumas opções para o tratamento do câncer, como, radioterapia, quimioterapia e intervenção cirúrgica. Essas podem ser utilizadas de forma separada ou associada, para um melhor resultado, ou quando a doença já se encontra em estado avançado. Dentre elas, a quimioterapia ainda é a opção mais apontada, para o tratamento, pois permite minimizar uma das piores consequências da doença, a metástase (Shewach, 2009).

Entretanto, um dos problemas relacionados à quimioterapia consiste exatamente no processo de resistência a droga, que as células cancerosas apresentam como um mecanismo de defesa, e que muitas vezes influencia drasticamente no tratamento. Devido à alta toxicidade que as drogas apresentam, esta intervenção causa muitos efeitos colaterais indesejados como supressão da medula óssea, lesões do trato gastrointestinal, perda de cabelo e náusea, pois os medicamentos agem não somente nas células danificadas, mas também nas normais (Thurston, 2007).

São várias as classes de fármacos úteis para inibir ou atuar na síntese de macromoléculas como o DNA e RNA. Aquelas capazes de inibir a síntese podem agir como antimetabólitos ou como inibidores enzimáticos. Os que agem

diretamente sobre os ácidos nucléicos já existentes podem ser agentes intercaladores, agentes alquilantes e agentes que clivam as cadeias (Thomas, 2003).

3.2.1. Agentes intercalantes do DNA

A terapia anticâncer também é realizada pelo uso drogas intercalantes do DNA. Elas apresentam uma estrutura química adequada que se inserem entre os pares de bases criando um espaçamento entre elas, formando um ângulo de aproximadamente 90° do eixo do DNA. Esse processo causa uma alteração estrutural do DNA, criando espaço de 3,4A para cerca de 7A entre os pares de bases CG (Poot, 1995). Essas drogas atuam nas topoisomerases, que são responsáveis pelo estado topológico do DNA.

Os inibidores da topoisomerase I são representados pelo irinotecano e o topotecano, derivados mais solúveis da camptotecina, um alcalóide pentacíclico com baixa solubilidade em água. Além da doxorrubicina, uma antraciclina que apresenta na sua estrutura molecular o núcleo planar antraquinona, bastante usada para o tratamento de leucemia aguda, linfomas e vários tipos de tumores sólidos. E os inibidores da topoisomerase II são o etoposide, um composto semi-sintético do epipodofilotoxina que é um alcalóide; e a amsacrina que tem na sua estrutura, a acridina, utilizada para o tratamento de carcinomas ovarianos, leucemia mielóide e linfomas (Figura 1) (Thurston, 2007).

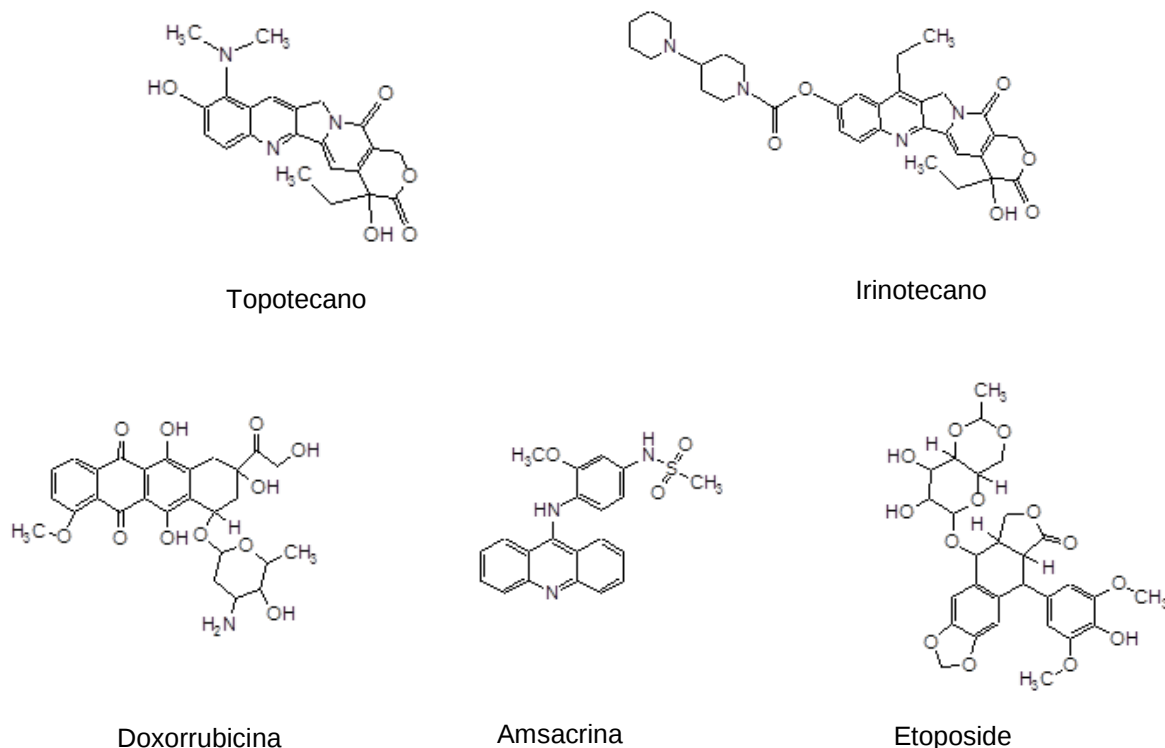


Figura 1 - Intercalantes do DNA

3.3. Acridina e seus derivados

As acridinas têm um amplo espectro de atividade biológica e são usadas como antibacteriano, antiprotozoário e como antineoplásico (Denny, 2004; Lorente, 2004).

Por apresentarem alta intensidade de fluorescência e se inserirem entre os pares de bases nitrogenadas, as acridinas também são usadas como biomarcadores, sendo eficazes para testes investigativos com membrana, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos das células (Yarmoluk, 2001; Ogul'chansky, 2001).

Desde o início do século XX os derivados acridínicos vêm sendo cada vez mais utilizados pelas suas propriedades farmacológicas (Denny, 2002). Na década de 1920, corantes que apresentaram anéis heteroaromáticos na estrutura foram descobertos por terem propriedades antibacterianas, por exemplo, o antiséptico acriflavina (Wainwright, 2001; Belmont, 2007). No meio da década de 60 houve o estímulo a síntese de novos derivados acridínicos como candidatos a terapia do câncer, devido à descoberta da sua ação contra o crescimento de células tumorais (Bongui, 2005). Neste momento foram desenvolvidos e utilizados na clínica

compostos acridínicos carboxiamida como o DACA, 9-anilinoacridinas como a amsacrina e nitroacridinas e a ledacrina (Seguin, 2005; Burres, 1989; Gniazdowski, 1995). No decorrer dos anos, vem sendo necessária a síntese de novos derivados acridínicos que sejam mais específicos e eficazes e também estudos farmacológicos que avaliem suas propriedades.

Em relação ao desenho de novas moléculas anticâncer, sabe-se que elas devem interagir com o DNA por intercalação, interação eletrostática ou, principalmente, intercalação. Muitos quimioterápicos e antibióticos agem como intercalantes de DNA e vários estudos relatam os compostos acridínicos interagindo com o DNA desta forma (Qiang Liu, 2010).

A amsacrina é um exemplo de intercalante poliaromático planar e seus derivados desempenham um papel importante na medicina como candidatos aprovados para o tratamento do câncer. Eles são poderosos intercalantes de DNA que inibem a replicação deste devido à formação de complexos da topoisomerase II com DNA que causa a quebra deste e consequentemente leva a célula à morte por apoptose (Rene, 1997).

Apoptose é um mecanismo de controle da morte celular que assegura a homeostase de células e órgãos e previne a tumorigênese. Uma vez iniciado seu processo, acontecem algumas modificações na célula como a permeabilização da membrana mitocondrial, ativação de caspases e, finalmente, morte celular. Este mecanismo ocorre de forma rápida, eficiente e irreversível (Mathew, 2007; Adam, 2007).

O desenvolvimento de tumores está intimamente ligado à supressão da apoptose por diversos mecanismos. Isto resulta na proliferação e no tempo de sobrevivência celular, como também desencadeia vários eventos adversos que são o estresse metabólico, ativação da oncogênese, depleção de nutrientes e de fator de crescimento, falta de irrigação sanguínea e hipóxia e, que levam à necessidade de intervenção terapêutica (Mathew, 2007; Adam, 2007).

Outras evidências mostram que os derivados acridínicos são capazes de atingir o DNA, porém sem causar dano ou quebra do DNA e não provocam mutações nos genes. Isto reduz os efeitos adversos e os riscos de desenvolvimento de cânceres secundários. Isso apóia o uso de moléculas não genotóxicas que se ligam ao DNA na terapia do câncer (Doh-ura, 2000; Gurova, 2009; Raza, 2011).

3.4. A química das acridinas

A acridina tem sua estrutura molecular formada por um complexo tricíclico planar, chamado anel acridínico (Figura 6), que tem a habilidade de interferir em vários processos metabólicos de células de eucariontes e procariontes. Porém o principal mecanismo pelo qual ela desempenha seu papel farmacológico é sua capacidade de se ligar reversivelmente ao DNA, interagir com as enzimas regulatórias topoisomerases e assim impedir que as funções do DNA se realizem (Ferguson and Denny, 2007; Denny and Baguley, 2003).

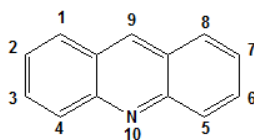
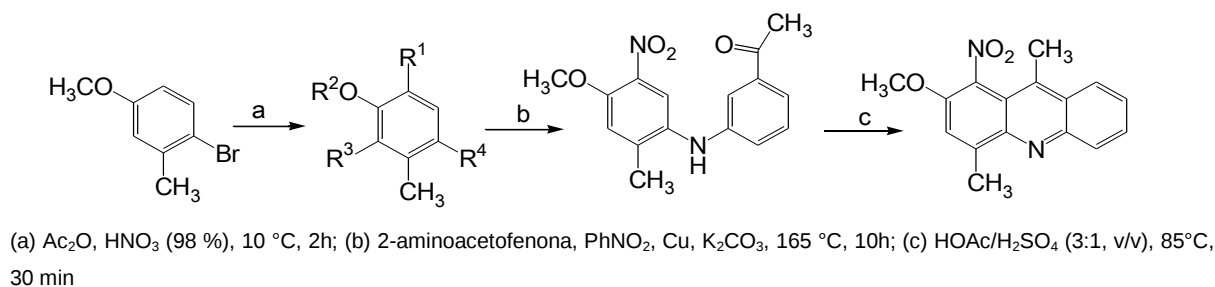


Figura 2 - Estrutura química do anel acridínico

O anel aromático policíclico planar da acridina e seus derivados são responsáveis pela inserção de forma perpendicular no DNA, sem que haja ligações covalentes (Brana, 2001; Martinez, 2004). Porém, a estabilidade da ligação, a cinética e a geometria do complexo formado com o DNA dependem, além do anel acridínico, dos grupos de átomos ligados a este que compõem a estrutura da molécula (Hecht, 1996). Por exemplo, o trabalho realizado por Sabolova (2006), que avaliou uma série de derivados acridínicos quanto ao poder de ligação ao DNA verificou que as moléculas com substituintes mais volumosos e hidrofóbicos apresentaram melhores resultados (Sabolova, 2006).

Radchenko et.al., descreve a reação de acoplamento catalisada por cobre (copper-catalyzed coupling) que ocorre entre um brometo e a 2-aminoacetofenona e também a ciclização eletrofílica da amina para a formação do anel tricíclico da acridina (Esquema 1) (Radchenko, 2011).



Esquema 1 - Síntese do anel acridínico realizada por Radchenko et.al. (2011).

Um importante derivado acridínico publicado por Pitta et.al., foi o 5-acridin-9-ilmetileno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AC-4) (Figura 7) que apresentou 85 % de atividade contra tumor sarcoma 180 em camundongos, agindo após 8 dias de tratamento intraperitoneal com 100 mg/kg/dia. Isso faz desta molécula um potente candidato anticâncer e isso resultou numa patente depositada no exterior (WO/2007/109871) (Pitta, 2007).

A diferença existente entre a molécula da amsacrina e os derivados acridínicos relatados neste trabalho, semelhante ao composto LPSF/AC-4, é a presença de um radical metileno na posição 9 do anel acridínico dos derivados ao invés da amina presente na amsacrina, resultando numa rigidez nessa porção da molécula.

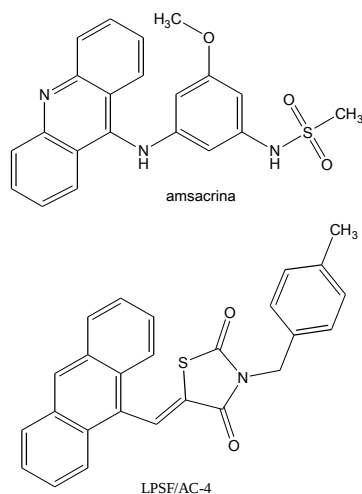


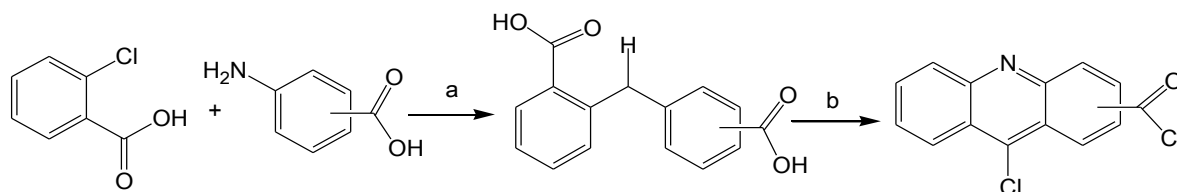
Figura 3 - Diferença da molécula da Amsacrina em relação aos compostos sintetizados por Pitta et.al.

Com o objetivo de verificar a reatividade da acridina, Pigatto et.al. realizaram mudanças moleculares no composto 5-acridin-9-ilmetileno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AC-4) por meio de cálculos computacionais no nível B3LYP/6-31pG (d,p). De acordo com a análise de Merz-Singh-Kollman (MK), foi

sugerido que os sítios de protonação da acridina sejam nos átomos de oxigênio ou nitrogênio por serem os átomos mais negativos da molécula. Foram calculadas também as afinidades dos prótons e foi verificado que os íons mais estáveis são os que a protonação se deu no N-quinolina. Valores da afinidade de prótons e gas-phase basicities (GB) foram calculados pelo B3LYP/6-31pG (d,p) e mostraram que espécies N-quinolina protonadas são aproximadamente 30 kcal mol⁻¹ e 50 kcal⁻¹ mais estáveis que as protonadas no oxigênio e no nitrogênio, quinto membro do anel, respectivamente (Pigatto, 2011).

Para a obtenção do anel acridínico, põem-se a reagir o ácido 2-clorobenzoico e o ácido aminobenzoico apropriado para a substituição desejada. Levando em consideração que, para a substituição na posição 3, não é possível usar o ácido 3-aminobenzoico porque na reação haveria a formação de uma mistura de produtos substituídos nas posições 1 e 3 que não são facilmente separáveis.

O produto antranílico intermediário formado é ciclizado em POCl₃, obtendo-se por fim o anel acridínico, 9-cloroacridina (Esquema 2) (Goodell, 2006).



(a) Cu, CuI, piridina, K₂CO₃, H₂O, refluxo; (b) POCl₃, refluxo.

Esquema 2 - Síntese do anel acridínico realizada por Goodell et.al. (2006).

Existem muitas tentativas de associação de duas ou mais funcionalidades intercalantes em uma única molécula para aumentar sua afinidade e especificidade com o DNA (Ihmels, 2005).

Com isso, vários derivados acridínicos foram idealizados e sintetizados variando as posições das substituições, principalmente nas posições 1, 2, 3, 4 e 9. Como exemplo temos a 2-amino-acridona (Figura 8) que foi estudado inicialmente por Tabarrini et al (1999).

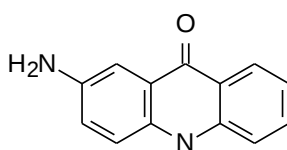


Figura 4 – 2-amino-acridina

Como também, Duflos et al. (1996), que sintetizaram derivados acridínicos como 4-(amino-metil)-3-dimetil-amino-acridina (Figura 9). Este apresentando resultados promissores no combate a diversos cânceres.

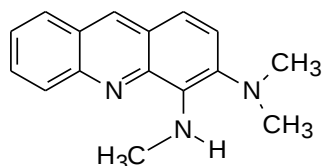
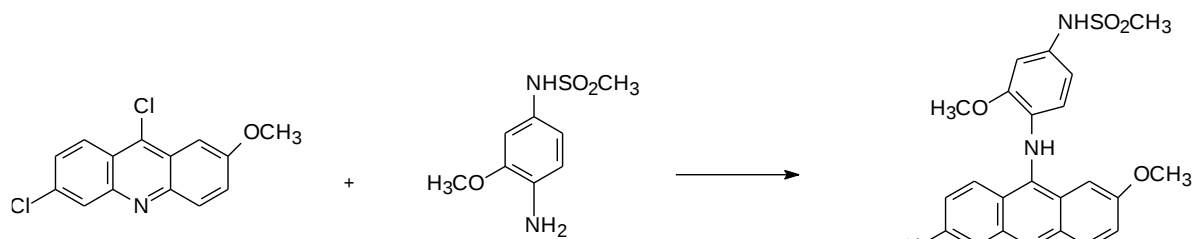


Figura 5 - 4-(amino-metil)-3-dimetil-amino-acridina

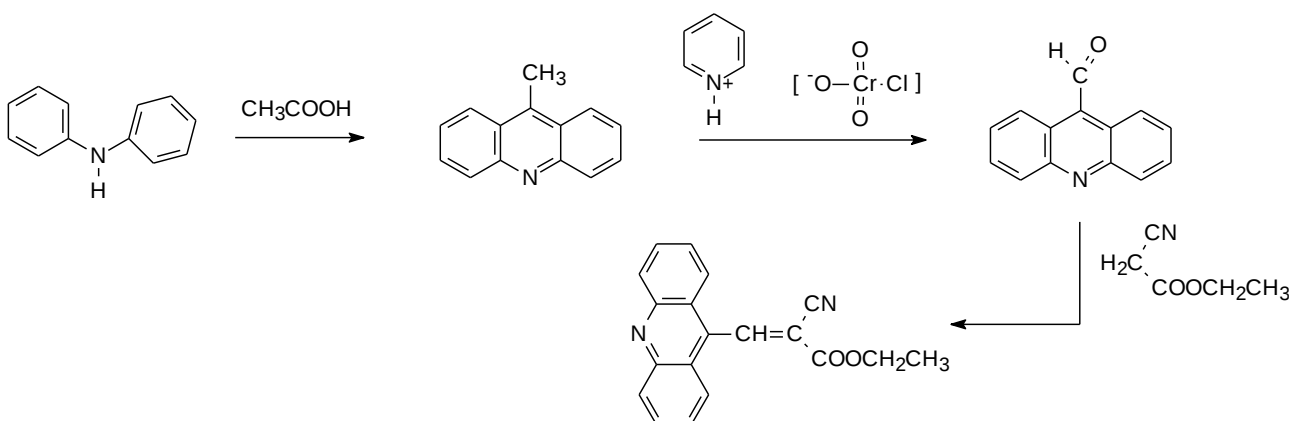
Segundo Acheson (1956), as 9-alkil-acridinas são de particular interesse por causa da boa reatividade do hidrogênio α do grupo alquil, devido às propriedades eletronegativas do átomo de nitrogênio do anel heterociclo. Elas podem ser comparadas com o 2 e 4-etil-piridinas e quinolinas onde o grupo metil é similarmente ativado.

Baseando-se nestas e em outras informações que pesquisadores como Ferlin et al. (2000), sintetizaram uma série de derivados acridínicos substituídos em posição 9. A obtenção dos compostos ocorreu a partir de uma acridina comercial, a 2-metóxi-6,9-dicloro-acridina, que permitiu reações de substituição nucleofílica na posição 9, que é favorecida pela saída do átomo de cloro do anel acridínico e entrada dos derivados anilínicos (Esquema 3) apresentando bons resultados. Entre eles o 2-metóxi-6-cloro-9-(2'-metóxi-4'-metanosulfonamida-anilina)-acridina apresentou melhor rendimento.



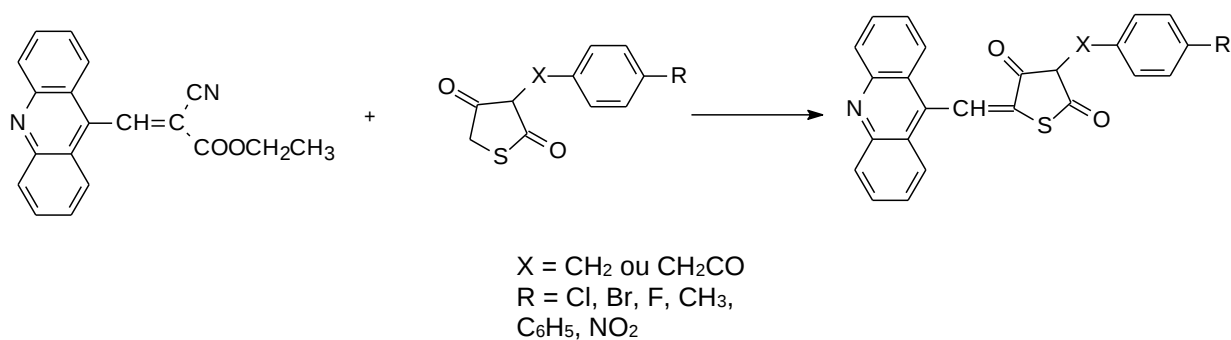
Esquema 3 - Síntese da 2-metóxi-6-cloro-9-(2'-metóxi-4'-metanosulfonamida analina)-acridina realizada por Ferlin et al. (2000).

Silva (2001), sintetizou o 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila (LPSF/IP-29). A obtenção do núcleo acridínico partiu da difenilamina que em presença do ácido acético e cloreto de zinco conduziu a 9-metil-acridina. Subseqüentes reações de oxidação com clorocromato de piridínio (PCC) na presença de sulfato de magnésio e de condensação do tipo Knoevenagel utilizando o cianoacetato de etila levou à formação deste intermediário reativo (Esquema 4).



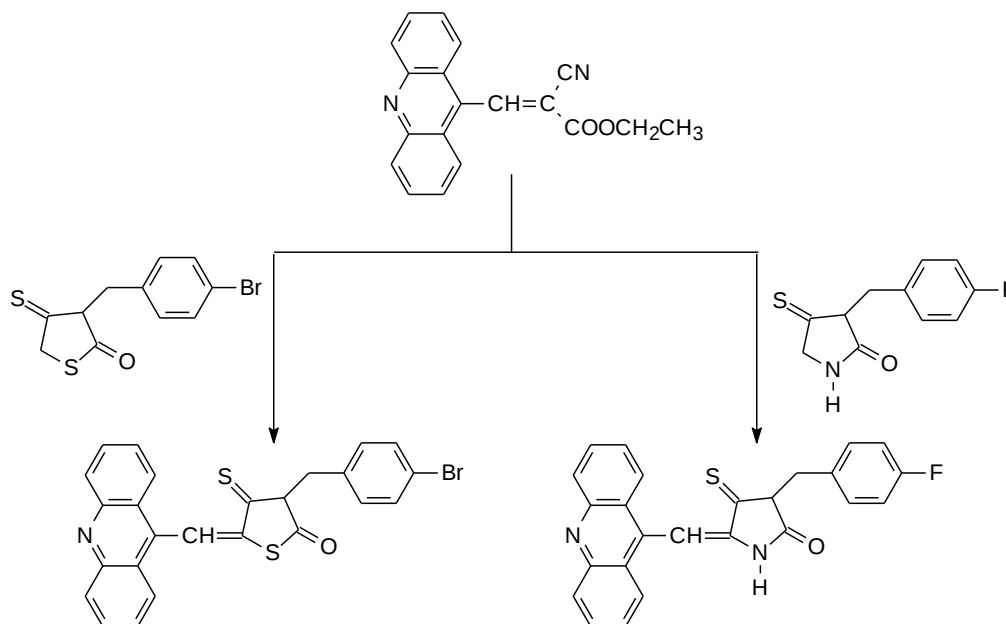
Esquema 4 - Obtenção do intermediário acridínico reativo por Silva (2001).

Silva (2003), utilizando o 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila (LPSF/IP-29) sintetizou sete novos derivados tiazacridínicos N-alquilados na posição 3 do núcleo tiazolidinônico por grupamentos benzila ou fenila substituídos em posição *para* por Cl, Br, F, CH₃, C₆H₅, NO₂ (Esquema 5).



Esquema 5 – Síntese dos derivados tiazacridínicos realizada por Silva (2003).

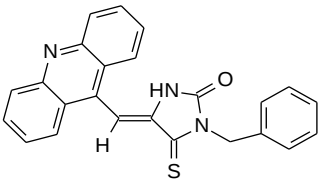
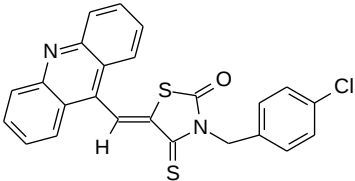
Derivados 4-tioxo-imidazacridínicos e 4-tioxo-tiazacridínicos foram obtidos por Magalhães (2003), a 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-bromo-benzil)-4-tioxo-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-18) e a 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/AC-124), utilizando o 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila também como intermediário (Esquema 6).



Esquema 6 – Síntese de derivados 4-tioxo-imidazacridínicos e 4-tioxo-tiazacridínicos realizada por Magalhães (2003).

Moura (2005) sintetizou seis novos derivados tiazacridínicos, onde observou que dois derivados se destacaram. Obteve uma resposta de inibição de crescimento da massa tumoral até a dose de 46,09 mg/kg/dia para o 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-cloro-benzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona (LPSF/AC-119) e 45,93 mg/Kg/dia e para o 5-(acridin-9-il-metileno)-3-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/AC-28) (Tabela 1), onde a resposta máxima observada foi de 83,60 e 83,89 %, respectivamente.

Tabela 1 – Avaliação da inibição do crescimento da massa tumoral dos compostos LPSF/AC-28 e LPSF/AC-119 com doses baseadas na DL₅₀ em camundongos Swiss com Sarcoma 180 induzido

Compostos	DL ₅₀ (%)	Dose (mg/Kg/dia)	Inibição (%)
 LPSF/AC-28	5	91,87	67,75
	2,5	45,93	83,89
	1,25	23,97	71,69
	0,63	11,57	58,95
	0,31	5,7	41,44
 LPSF/AC-119	5	92,18	80,11
	2,5	46,09	83,60
	1,25	23,04	66,69
	0,63	11,61	31,58
	0,31	5,72	

Camundongos com sarcoma 180 induzidos tratados com LPSF/AC-28 e LPSF/AC-119 via i.p. durante 8 dias nas doses mencionadas. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação: $TWI = (C - T) \times 100/C$

Rocha Pitta (2010) realizou ensaios *in vitro* em linhagens celulares SF-295 (Sistema Nervoso Central), MDA-MB435 (melanoma) e HCT-8 (carcinoma de cólon). Os resultados revelam que os compostos 3-acridin-9-il-metil-5-acridin-9-il-metileno-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-2), 3-acridin-9-il-metil-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-3) e 3-acridin-9-il-metil-5-(4-bromo-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-6) destacaram-se entre os mais ativos da série, pois apresentaram, respectivamente, 92,4 %, 86,7 % e 96,6% de inibição da proliferação celular contra a linhagem de carcinoma de cólon; enquanto que a doxorrubicina, fármaco de referência, apresentou 95,2 % de inibição contra a

mesma linhagem de células (Figura 10). Estes resultados revelam a importância de derivados tiazacridínicos no combate do câncer.

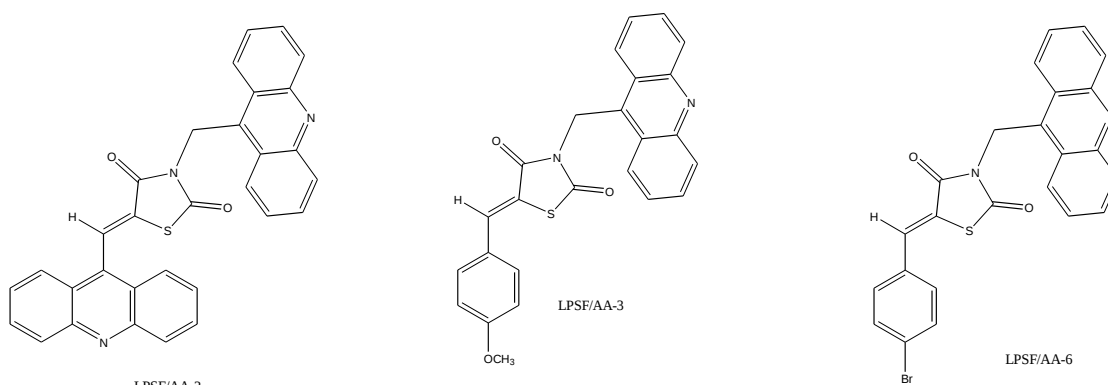


Figura 6 - Derivados acridínicos obtidos por Rocha Pitta (2010)

Os resultados obtidos com os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF/GPIT/UFPE nos estimulou a propor e desenvolver a síntese de novos derivados acridínicos substituídos, visualizando a obtenção de compostos que possam melhorar o arsenal terapêutico na tentativa de contribuir para o tratamento de doenças degenerativas como câncer.

Parte Química

4. Parte Química

4.1. PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE FÁRMACOS

Uma das principais ferramentas para introdução na clínica médica de novos agentes terapêuticos, potencialmente ativos e menos tóxicos, é através de um processo atualmente usado nos laboratórios de síntese orgânica, o planejamento racional. Para isso utilizamos a Química Farmacêutica ou Química Medicinal que nos possibilita o conhecimento dos mecanismos que regem as reações químicas, a interação com catalisadores e métodos específicos de purificação e identificação de moléculas.

Segundo Thomas (2003), as rotas usadas nas sínteses de fármacos potenciais podem ser classificadas como vias sintéticas parciais ou plenas, onde as parciais são resultantes da combinação da síntese orgânica e de outros métodos, como por exemplo, computacionais; e as vias plenas utilizam apenas métodos de síntese orgânica. Estas vias, ainda podem ser lineares, quando utilizam etapas subsequentes até a obtenção da molécula-alvo, ou convergentes, quando duas ou mais seções da molécula-alvo são sintetizadas separadamente antes de serem combinadas. Contudo, todos os planos para obtenção de um composto-protótipo devem apresentar detalhes que permitam possíveis modificações moleculares objetivando a produção de uma ampla faixa de análogos.

4.2. A Importância da Modificação Molecular

A idealização de um composto-protótipo e a possibilidade de possíveis modificações moleculares constitui um dos métodos mais utilizados pelos químicos medicinais. As possíveis variações estruturais conferem novas propriedades físicas e alteram a reatividade da molécula que, por sua vez, causam mudanças na distribuição nas células e nos tecidos (BURGER, 1970 *apud* DANIELLI, 1970).

Burger afirma ainda em seus estudos, a importância das unidades estruturais específicas com o propósito de enfatizar a correlação existente entre a atividade biológica com a constituição química do composto-protótipo. Assim sendo, relatou a importância dos sistemas anelares em algumas atividades farmacológicas, como, o indol e sistemas condensados que foram utilizados como compostos-protótipos da ergotamina e serotonina que apresenta uma atividade biológica simpatolítica e pressora, respectivamente (BURGER, 1970).

Tanto Sexton (1963 *apud* KOROLKOVAS, 1974), quanto Patrick (2001), afirmaram que os grupos presentes ou introduzidos em um fármaco são importantes por dois motivos: 1) eles podem ser essenciais para a manifestação de determinada ação biológica, em razão da sua reatividade química ou da disposição espacial; e 2) eles podem modificar a intensidade de determinada ação biológica, em consequência dos efeitos característicos que exercem.

Patrick (2001) demonstra que na síntese de compostos de forma randômica, as estratégias envolvidas na preparação de novas moléculas são: 1) variação de substituintes; 2) extensão da estrutura; 3) contração/extensão da cadeia; 4) contração/extensão do anel; 5) variação do anel; 6) isósteros; 7) bioisósteros; 8) simplificação da estrutura e 9) rigidificação da estrutura.

4.3. Materiais e Métodos

Os produtos secos e puros foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, infravermelho e espectrometria de massas, para confirmação das estruturas moleculares.

Espectrometria de infravermelho foi realizada em espectrofotômetro FTIR Bruker modelo IFS 566, em pastilhas de KBr. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi efetuada em espectrofotômetro Varian modelo Plus 300 MHz. Espectrometria de massas foi registrada sobre impacto eletrônico a 70 eV em espectrômetro HP 5987. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Quimis modelo 340.27.

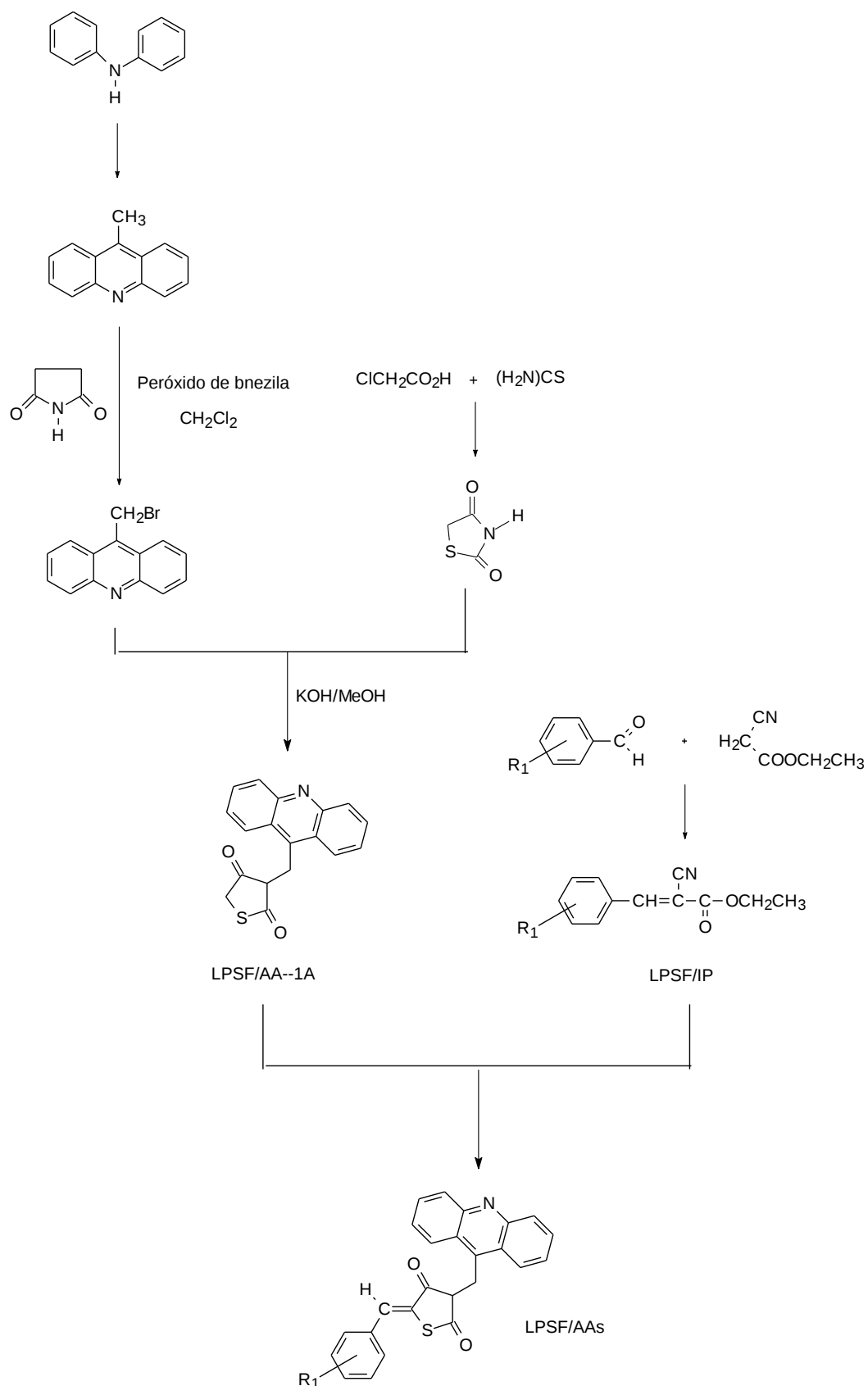
Cromatografia em camada delgada foi realizada em placas Merk silicagel 60 F254, de 0,25mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366nm).

Todos os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos, assim como os para análises, pertencem às marcas Sigma/Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis.

4.4. Descrição da Metodologia e dos Compostos Obtidos

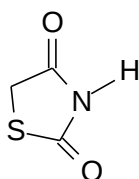
As sínteses dos derivados tiazolidínicos foram realizadas de acordo com a via plena convergentes, onde se realizou separadamente a obtenção de todos os intermediários do núcleo acridínico, e paralelamente foram obtidos a tiazolidina-2,4-

diona e os ésteres de Cope, que permitiram a síntese dos novos derivados tiazolidínicos substituídos nas posições 2 e 3 (Esquema 7).



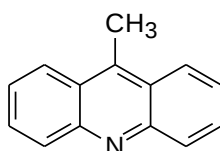
Esquema 7: Diagrama de síntese dos derivados tiazacridínicos

4.4.1. Obtenção da tiazolidina-2,4-diona



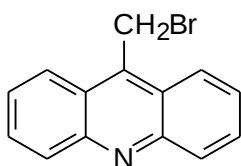
Em um balão de fundo redondo foi adicionado a tiouréia (5 g – 0,0658 mols) e o ácido monocloroacético (6,35 g – 0,0673 mol) previamente dissolvidos em água destilada. Aqueceu-se a mistura por 18 horas em banho de óleo e refluxo. Em seguida, deixou-se o produto obtido em repouso por 24 horas na geladeira. Formaram-se cristais brancos correspondentes a tiazolidina-2,4-diona, cuja purificação foi realizada através de cristalizações sucessivas em água destilada.

4.4.2. Obtenção da 9-metil-acridina (LPSF/AC-1)



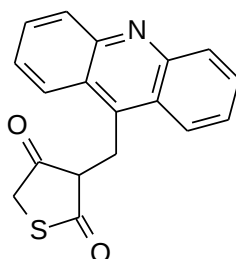
Foram colocados para reagir em balão de fundo redondo de 500 mL (2,5 g - 0,0147 mols) de difenilamina, 3 mL de ácido acético e cloreto de zinco (10 g - 0,0734 mols), que foram aquecidos a uma temperatura de 220°C durante 8 horas em banho de óleo e refluxo. Inicialmente, esta mistura reacional foi tratada com uma solução recém preparada de ácido sulfúrico e, em seguida, alcalinizada pela adição de uma solução de hidróxido de amônio. A 9-metil acridina (LPSF/AC-1) foi isolada através de extração com tolueno. O produto foi purificado através de cromatografia sob pressão em sílica gel 60, utilizando como sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt na proporção de 7:3.

4.4.3. Obtenção da 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160)-



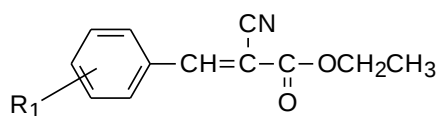
Em um balão de 50 mL foi adicionado a 9-metil-acridina (500 mg – 0,0025 mols), 1 Eq do N-bromosuccinamida, 1 Eq do peróxido de benzoíla em 18 mL de clorofórmio. A reação foi aquecida em banho de óleo à refluxo e acompanhada por CCD durante 5 horas. A 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160) foi filtrada e a água-mãe evaporada a secura. O material obtido foi solubilizado em acetato de etila e lavado com uma solução de HCl 1N. A fase aquosa foi alcalinizada com KHCO_3 , havendo a precipitação do derivado acridínico. O produto foi purificado através de extração com acetato de etila.

4.4.4. Obtenção da 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-1A)



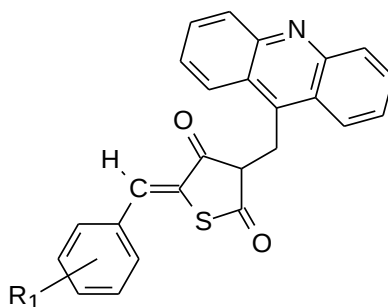
Em um balão de fundo redondo foram adicionados tiazolidina-2,4-diona (1,136 g – 0,0097 mols), 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160) (2,6397 g – 0,0097 mols), de hidróxido de potássio (0,5436 g – 0,0097 mols) dissolvidos em metanol. A mistura reacional foi aquecida a 65 °C em banho de óleo e refluxo, por 15 horas, levando a formação da 3-acridin-9-ilmetil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-1A).

4.4.5. Obtenção de ésteres de Cope (LPSF/IPs)



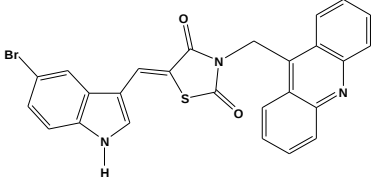
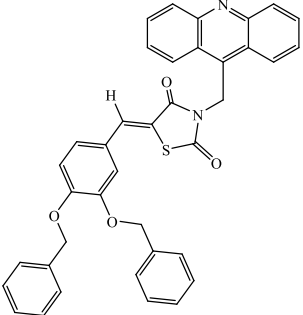
Em um balão de fundo redondo foram adicionados quantidades equimolares do aldeído aromático substituído e o cianoacetato de etila em presença de trietilamina como catalisador. A mistura reacional foi aquecida a 110 °C em banho de óleo e refluxo, durante 4 horas. Os ésteres de Cope (LPSF/IPs) obtidos foram purificados através da solubilização em etanol e precipitação em água destilada.

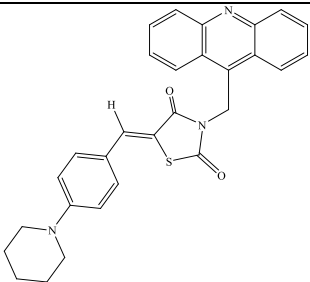
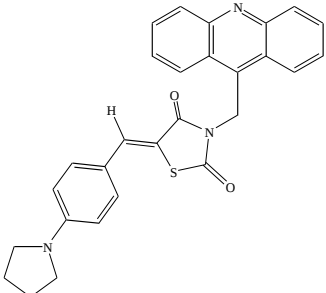
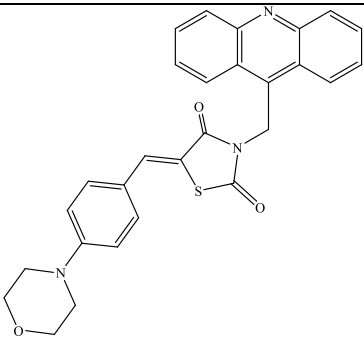
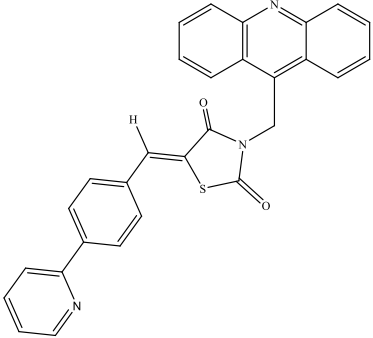
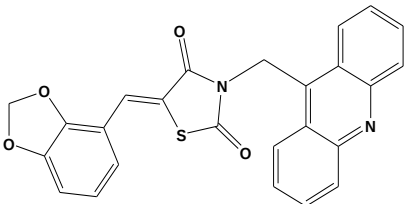
4.4.6. Obtenção da 3-(acridin-9-ilmetil)-5-arylidenotiazolidina-2,4-diona (LPSF/AAs)

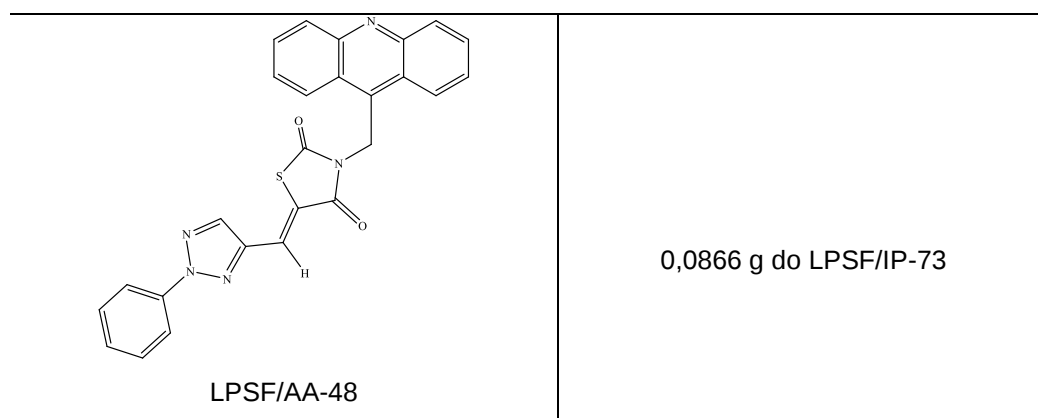


Em um balão de fundo redondo foram adicionados 3-(acridin-9-ilmetil)-5-arylidenotiazolidina-2,4-diona (0,1g - 0,3236 mmols) (LPSF/AA-1A) com o respectivo composto intermediário, éster de Cope (LPSF/IP), 250 μ L de morfolina como catalisador e 8 mL etanol absoluto. A reação foi aquecida a 60° C em banho de óleo e refluxo, e acompanhada por CCD, sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt na proporção de 7:3, durante 4 horas. Após filtração os produtos obtidos foram cristalizados em acetona (Tabela 2)

Tabela 2 – Estrutura química dos compostos sintetizados com as respectivas quantidades dos LPSF/IPs utilizadas para cada síntese.

Compostos	Quantidades de LPSF/IP
 LPSF/AA-29	0,1029 g do LPSF/IP-29
 LPSF/AA-35	0,1340 g do LPSF/IP-79

 LPSF/AA-36	0,0919 g do LPSF/IP-78
 LPSF/AA-38	0,0873 g do LPSF/IP-75
 LPSF/AA-39	0,0935 g do LPSF/IP-76
 LPSF/AA-40	0,0919 g do LPSF/IP-82
 LPSF/AA-41	0,0880 g do LPSF/IP-83

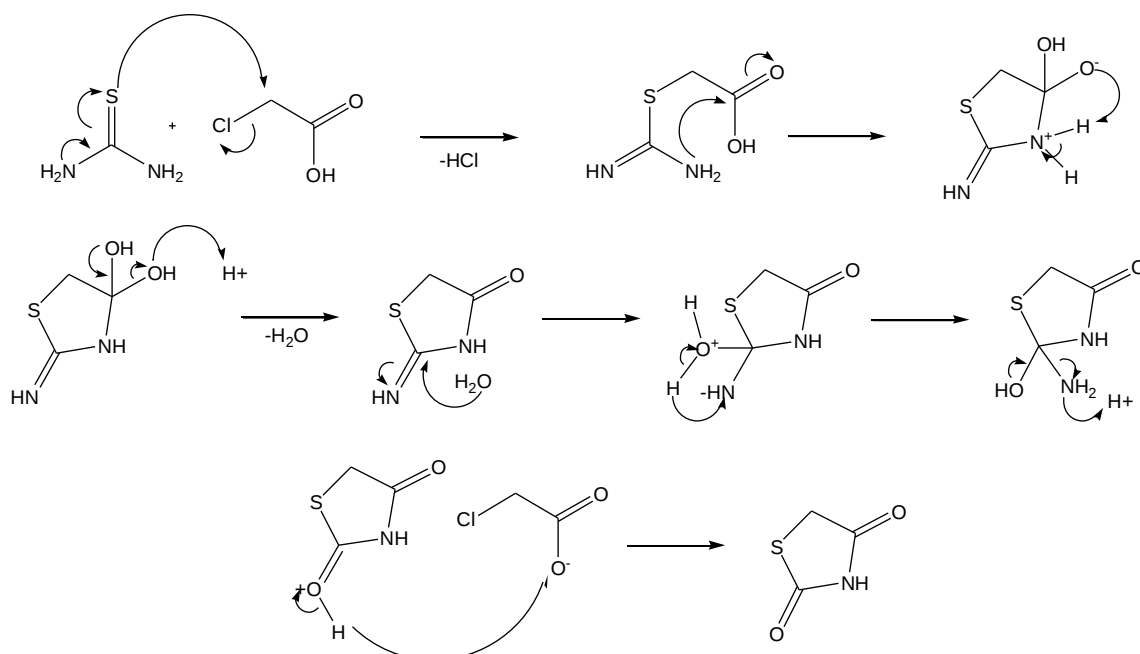


4.5. Resultados e Discussão

4.5.1. Mecanismo reacional

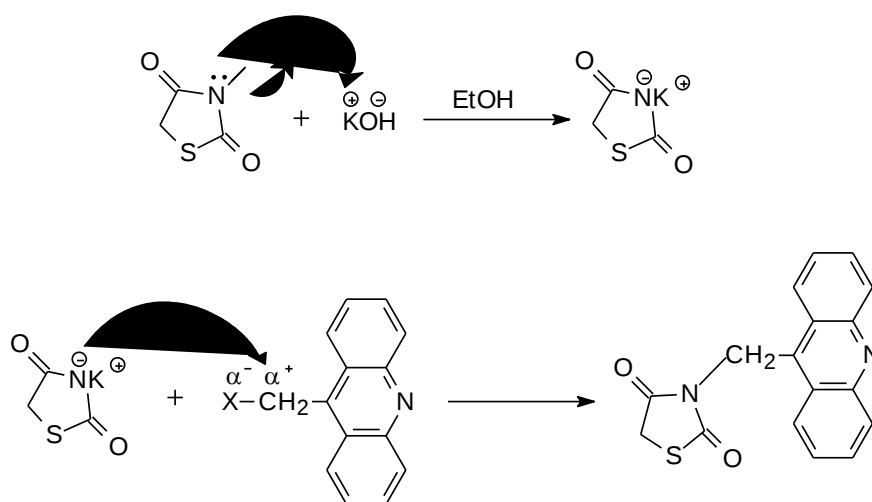
Iniciam-se com a síntese da tiazolidina-2,4-diona, que foi realizada através da reação de ácido monocloroacético com a tiouréia em meio aquoso. Nesta reação ocorre um processo de ciclização que forma a tiazolidina-2,4-diona (LIBERMAN, 1948).

No esquema 8 detalhamos o mecanismo da reação para a obtenção do anel tiazolidínico.



Esquema 8. Mecanismo da reação de ciclização da tiazolidina-2,4-diona

Em uma segunda etapa temos a síntese dos derivados 3-benzil-tiazolidina-2,4-dionas, através de reações de N-alkilação da tiazolidina-2,4-diona com a 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160), na presença de base em solvente metanol, que levou inicialmente a formação de um sal, e posterior adição do 9-bromo-metil-acridina (LPSF/AC-160) com a formação final do produto intermediário. Quando não apresenta substituição no átomo de nitrogênio, a tiazolidina-2,4-diona comporta-se como um ácido fraco, que reage com haletos de alquila, substituídos ou não, em soluções alcalinas conduzindo à formação de sais. Tal metodologia é consolidada na literatura por diversos autores, tendo como diferença o meio básico utilizado (DAVIS E DAINS, 1935; LO, SHROPSHIRE, CROXALL, 1953). O mecanismo é concertado e S_N2 , ou seja, no mesmo momento que o nucleófilo ataca o carbono positivo o halogênio por ser um bom grupo de partida sai da molécula e se forma o produto final da reação (Esquema 9).



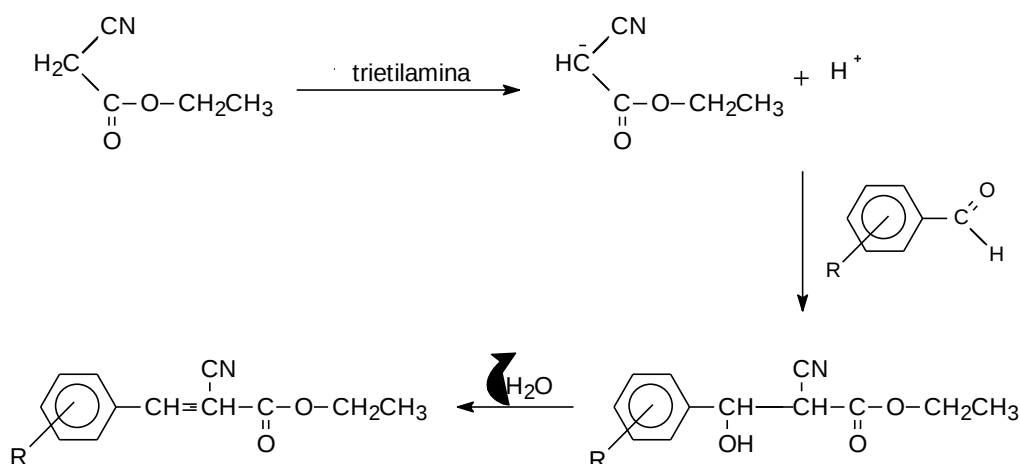
Esquema 9. Mecanismo reacional de N-alkilação da tiazolidina-2,4-diona

Em paralelo foi realizado a síntese dos ésteres cianocinâmicos (LPSF/IP), que se processou a partir da condensação de Knoevenagel com aldeídos aromáticos e cianoacetato de etila, em tolueno e na presença de morfolina.

O mecanismo reacional de formação dos ésteres cianocinâmicos inicia-se pela retirada do hidrogênio metilênico do cianoacetato de etila através da trietilamina. A seguir, o carbânio formado, estabilizado através do equilíbrio ataca o carbono α -carbonila que tem sobre si uma carga parcial positiva resultante do efeito

indutivo provocado pelo átomo de oxigênio formando o 2-ciano-3-(1*H*-indol-3-il-metileno)-acrilato de etila (CAREY & SUNDBERG, 1990).

Derivados de aldeídos aromáticos, tais como os ésteres de Cope, são obtidos através da reação de condensação do tipo Knoevenagel entre aldeídos aromáticos substituídos e cianoacetato de etila, em presença de uma base, normalmente a trietilamina. Este éster cianocinâmico atua como um intermediário para as reações de condensações em posição 5 da tiazolidina-2,4-diona *N*-alquilada ou não (Esquema 10).



Esquema 10. Reação de condensação de Knoevenagel

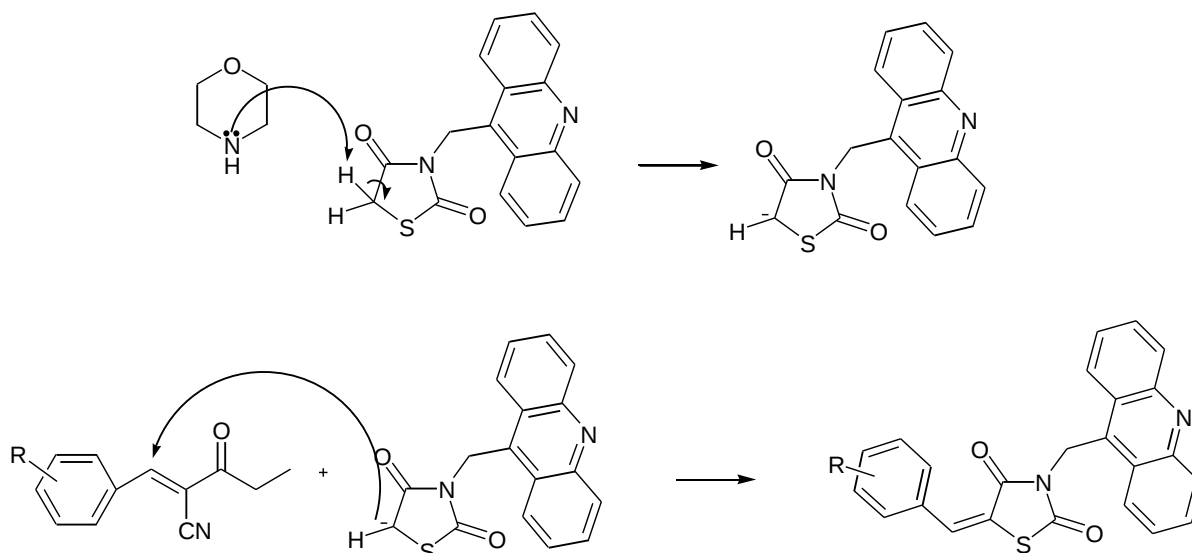
Estes intermediários foram utilizados para obtenção dos substituintes benzilidênicos, na posição cinco do anel tiazolidina-2,4-diona formando os derivados tiazacridínicos.

A formação da dupla exocíclica na posição 5 da 3-acridin-9ilmetil-tiazolidina-2,4diona (LPSF/AA-1A) ocorreu devida a desprotonação pela ação da morfolina, que conduz a formação de um carbânion, que leva a um ataque do carbono β do 2-ciano-3-fenil-acrilato de etila (LPSF/IP), conduzindo aos novos derivados tiazacridínicos (LPSF/AAs) (SANTOS et al., 2005; MOURÃO et al., 2005).

A posição 5 do anel tiazolidínico apresenta uma reatividade característica frente a vários reagentes. O carbono metilênico comporta-se como um nucleófilo e as reações ocorrem normalmente em presença de uma base, a tiazolidina-2,4-diona reage como um ânion. A formação deste ânion é facilitada pela presença dos

grupamentos carbonílicos nas posições 2 e 4, e são dependentes do efeito indutivo negativo do heteroátomo, obedecendo a seguinte ordem: $S > NH > NCH_3 > O$ (BARONOV e KOMARISTA, 1965).

No esquema 11 podemos observar o suposto mecanismo da reação de adição de Michael para derivados tiazolidínicos utilizando-se morfolina como catalizador.



Esquema 11. Suposto mecanismo da reação de adição de Michael em derivados tiazolidínicos

4.5.2. Determinação da Configuração da Dupla Exocíclica

As tiazolidinas-2,4-dionas podem sofrer condensação com aldeídos aromáticos substituídos e reação de adição com ciano acrilatos de etila substituídos, conduzindo a formação de derivados α,β – insaturados. Estes derivados, teoricamente, podem existir nas configurações diastereoisoméricas *Z* e *E* (Figura 12).

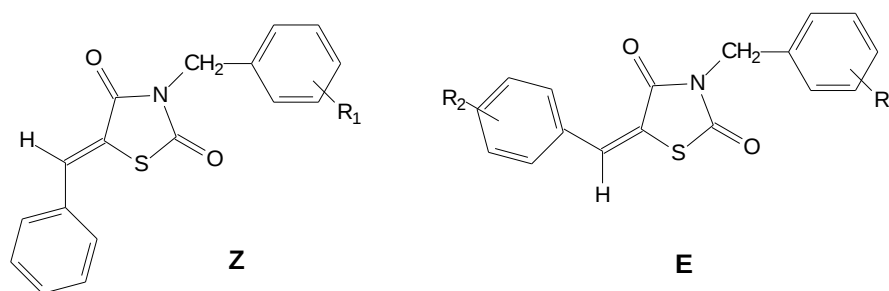


Figura 7 - Estruturas teóricas dos diastereoisômeros *Z* e *E* para as tiazolidonas substituídas

Diversos autores confirmaram a configuração *Z* ou *E* da dupla ligação em várias moléculas contendo os anéis tiazolidina-2,4-diona, imidazolidinadiona e rodanina, bem como derivados de hidantoinas e tiohidantoinas (MENEZES et al., 1992; LIMA et al., 1992).

Por exemplo, foi determinada a configuração da dupla ligação exocíclica em derivados 5-arilideno-tiazolidina-2,4-diona. Apenas para um das moléculas da série sintetizada, esta configuração foi determinada por estudos de difração de Raio-X, sendo identificada como *Z* apresentando deslocamentos químicos na faixa de 7,72-7,97 ppm. Nos espectros de RMN ^{13}C , os sinais do C-H arilideno apareceram na faixa de 130,1-132,8 ppm (Bruno, 2002).

Este fato deve-se a maior desblindagem por parte do grupo carbonila (C=O) adjacente (posição 4), em comparação ao mesmo efeito observado pelo átomo de enxofre (S-1).

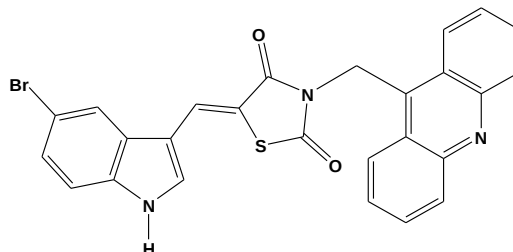
4.5.3. Características físico-químicas e resultados espectroscópicos

4.5.3.1. Tiazolidina-2,4-diona

A tiazolidina-2,4-diona, de fórmula molecular $\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}_2\text{S}$ (MM = 117), após purificação apresenta-se na forma de cristais brancos. Este composto foi obtido com rendimento de 84%, apresentando uma faixa de fusão 121-122°C [ponto de fusão na literatura 122°C (KOCHKANYAN; ISRAELYAN; ZARITOUSKII, 1978) e R_f = 0,51, em sistema de eluição $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 96:4. RMN ^1H (δ , ppm) – DMSO – d_6 : 4.11 ppm (CH_2 , s, 2H); 12.00 ppm (NH, s, 1H) IV (cm^{-1}): 3115 (NH), 1670 e 1735 (C=O).

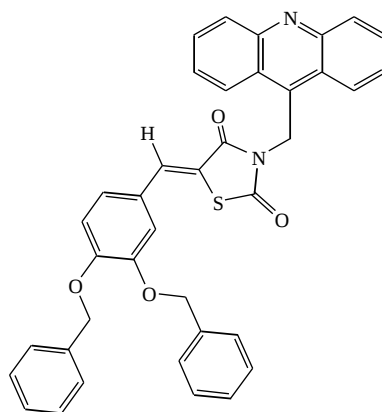
4.5.3.2. Derivados tiazacridínicos

(Z)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-((5-bromo-1H-indol-3-il)-metileno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/AA-29)



$C_{26}H_{16}BrN_3O_2S$. Rdt 53,25%. P.F. 297-298°C. CDC (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,4. IR (KBr, cm^{-1}) 1316, 1453, 1600, 1682, 1734, 3433. 1H NMR 400 MHz (δ ppm, $DMSO-d_6$) 5.92 (s, 2H, CH_2), 7.67 (s, 1H), 12.27 (s, NH), 6.89 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 7.69 (t, 2H, acridina, $J=8.0$ Hz e $J=7.2$ Hz), 7.78 (s, 1H, $CH=$), 7.86 (t, 2H, acridina, $J=8.0$ Hz e $J=7.2$ Hz), 8.18 (d, 2H, acridina, $J=8.8$ Hz), 8.44 (d, 2H, acridina, $J=9.2$ Hz). MS, m/z (ES+) 514.0026 $[M+H]^+$.

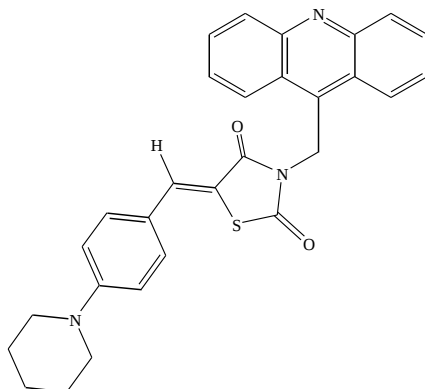
(Z)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-(3,4-bis-(benzilóxi)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/AA-35)



$C_{38}H_{28}N_2O_4S$. Rdt 54,44%. P.F. 232°C. CCD (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,38. IR (KBr, cm^{-1}) 1265, 1381, 1585, 1677. 1H NMR 400 MHz (δ ppm, $DMSO-d_6$) 5.17 (s, 2H, O- CH_2), 5.21 (s, 2H, O- CH_2), 5.91 (s, 2H, CH_2), 7.15-7.45 (m, 13H, aromáticos), 7.66-7.69 (m, 2H, acridina), 7.86-7.87 (m, 2H, acridina), 7.84 (s, 1H, $CH=$), 8.18 (d,

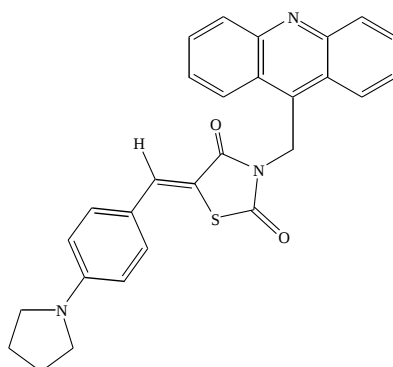
2H, acridina, J=8.8 Hz), 8.44 (d, 2H, acridina, J=8.4 Hz) . MS, m/z (ES+) 609.1856 [M+H]⁺.

(Z)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-(4-(piperidin-1-il)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/AA-36)



C₂₉H₂₅N₃O₂S. Rdt 39,93%. P.F. 232-233°C. CCD (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,33. IR (KBr, cm⁻¹) 1377, 1576, 1677, 3434. ¹H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO-d₆) 1.48-1.59 (m, 6H, piperidina), 3.36-3.37 (m, 4H, piperidina), 5.91 (s, 2H, CH₂), 6.99 (d, 2H, benzilideno, J= 9.2 Hz), 7.39 (d, 2H, benzilideno, J=9.2 Hz), 7.66-7.69 (m, 2H, acridina), 7.83-7.87 (m, 2H, acridina), 7.79 (s, 1H, CH=), 8.18 (d, 2H, acridina, J=8.8 Hz), 8.47 (d, 2H, acridina, J=8.8 Hz) . MS, m/z (ES+) 480.1710 [M+H]⁺.

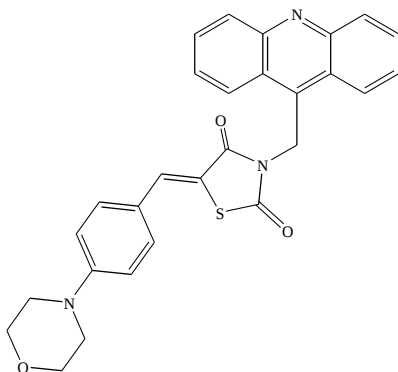
(Z)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-(4-(pirrolidin-1-il)-benzilideno)-tiazolidino-2,4-diona
(LPSF/AA-38)



C₂₈H₂₃N₃O₂S. Rdt 22,73%. P.F. 236°C. CDC (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,35. IR (KBr, cm⁻¹) 1265, 1381, 1585, 1677. ¹H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO-d₆) 5.17 (s, 2H, CH₂), 1.59 (s, 2H, CH₂), 2.80 (s, 4H, CH₂), 6.54 (s, 2H, aromático), 7.12 (s, 2H,

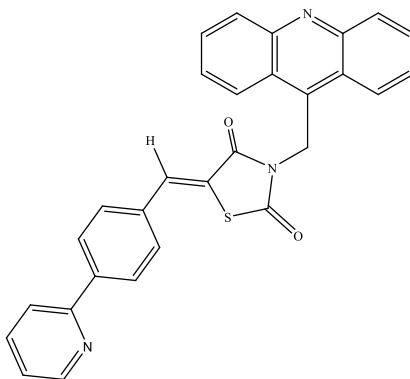
aromático), 7.57 (s, 1H, CH), 7.86-7.87 (m, 2H, acridina), 7.84 (s, 1H, CH=), 8.18 (d, 2H, acridina, $J=8.8$ Hz), 8.44 (d, 2H, acridina, $J=8.4$ Hz) . MS, m/z (ES+) 609.1856 $[M+H]^+$.

(Z)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-(4-morfolino-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/AA-39)



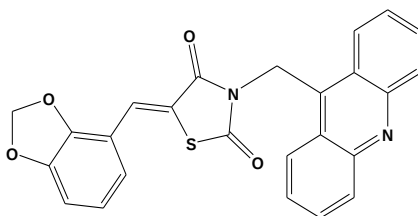
$C_{28}H_{23}N_3O_3S$. Rdt 41,83%. P.F. 243°C. CCD (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,43. IR (KBr, cm^{-1}) 1373, 1585, 1678, 1731. 1H NMR 400 MHz (δ ppm, $DMSO-d_6$) 3.27 (t, 2H, morfolinil, $J=5.2$ Hz e $J=4.4$ Hz), 3.71 (t, 2H, morfolinil, $J=5.2$ Hz e $J=4.4$ Hz), 5.91 (s, 2H, CH_2), 7.03 (d, 2H, benzilideno, $J=9.2$ Hz), 7.44 (d, 2H, benzilideno, $J=9.2$ Hz), 7.65-7.70 (m, 2H, acridina), 7.83-7.87 (m, 2H, acridina), 7.82 (s, 1H, CH=), 8.18 (d, 2H, acridina, $J=8.8$ Hz), 8.47 (d, 2H, acridina, $J=8.8$ Hz) . MS, m/z (ES+) 482.1512 $[M+H]^+$.

(Z)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-(4-(piridin-2-il)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/AA-40)



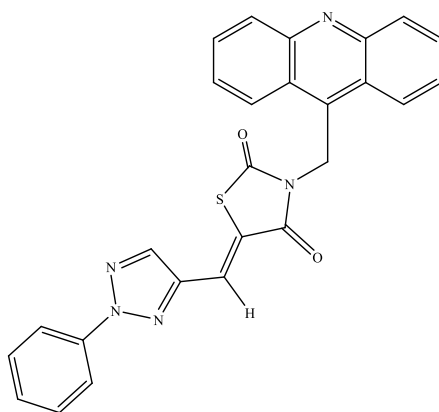
C₂₉H₁₉N₃O₂S. Rdt 55,63%. P.F. 269°C. CCD (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,26. IR (KBr, cm⁻¹) 1377, 1467, 1680, 1748, 3418. ¹H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO-d₆) 5.94 (s, 2H, -CH₂), 7.39 (dd, 1H, pirimidina, J= 4.8 Hz e J= 5.6 Hz), 7.70 (d, 1H, pirimidina, J= 8.4 Hz), 7.84-7.93 (m, 5H, aromáticos), 7.99 (s, 1H, CH=), 8.04 (d, 2H, acridina, J=8.0 Hz), 8.19 (d, 2H, benzilideno, J=8.8 Hz), 8.23 (d, 2H, acridina, J=8.4 Hz), 8.47 (d, 2H, benzilideno, J=8.8 Hz), 8.69 (d, 1H, pirimidina, J= 4.4 Hz). MS, *m/z* (ES⁺) 474.0589 [M+H]⁺.

(*Z*)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/AA-41)



C₂₅H₁₆N₂O₄S. Rdt 70,29%. P.F. 252-253°C. CCD (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,46. IR (KBr, cm⁻¹) 1245, 1455, 1613, 1669, 3420. ¹H NMR 400 MHz (δ ppm, DMSO-d₆) 5.92 (s, 2H, CH₂), 6.14 (s, 2H, benzodioxol), 6.94 (s, 2H, benzodioxol), 6.97 (d, 1H, benzodioxol, J=8.4 Hz), 7.04 (d, 1H, benzodioxol, J=8.4 Hz), 7.69 (t, 2H, acridina, J= 8.0 Hz e J= 7.2 Hz), 7.78 (s, 1H, CH=), 7.86 (t, 2H, acridina, J= 8.0 Hz e J= 7.2 Hz), 8.18 (d, 2H, acridina, J=8.8 Hz), 8.44 (d, 2H, acridina, J=9.2 Hz). MS, *m/z* (ES⁺) 441.0281 [M+H]⁺.

(*Z*)-3-(acridin-9-ilmetil)-5-((2-fenil-2*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metileno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF/AA-48)



$C_{26}H_{17}N_5O_2S$. Rdt 69,05%. P.F. 239-240°C. CCD (*n*-hexano:acetato de etila, 7:3) R_f 0,5. IR (KBr, cm^{-1}) 1374, 1540, 1679, 1732. 1H NMR 400 MHz (δ ppm, $DMSO-d_6$) 5.91 (s, 2H, CH_2), 7.38 (t, 1H, fenil, $J=7.2$ Hz e $J=7.6$ Hz), 7.53 (t, 2H, acridina, $J=7.6$ Hz e $J=8.4$ Hz), , 7.68 (t, 2H, acridina, $J=8.4$ Hz e $J=7.2$ Hz), 7.84-7.89 (m, 4H, aromáticos), 8.09 (s, 1H, $CH=$), 8.19 (d, 2H, acridina, $J=8.4$ Hz), 8.46 (d, 2H, fenil, $J=8.8$ Hz), 8.82 (s, 1H, triazol). MS, m/z (ES+) 463.0565 $[M+H]^+$.

5. Parte Biológica

5.1. Ensaio biológico utilizando o MTT

Diversos métodos colorimétricos e de fluorescência são utilizados para estudos relacionados à morte celular. Por exemplo, é possível detectar a quebra da membrana plasmática pela avaliação de enzimas, normalmente do meio intracelular, presentes em sobrenadante de cultura de células, como a lactato desidrogenase. Inclusive a atividade da cadeia respiratória mitocondrial é amplamente considerada um indicador do número de células viáveis e é medida para avaliação de morte ou proliferação celular (LeBel, 1992).

Os protocolos mais comuns envolvem a permeabilidade de sais de tetrazólio através da membrana plasmática. Estes sais são postos em contato com células vivas e são convertidos em produtos coloridos pelas mitocôndrias metabolicamente ativas (de la Motte, 2007; LeBel, 1992; Vitale, 2007).

O tetrazólio de primeira geração amplamente utilizado para pesquisa em morte celular é o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), ele é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais a cristais de formazan insolúveis em água que se acumulam no citosol. Com ele é possível a análise simultânea de um grande número de espécimes, age rapidamente e não requer o processamento prévio de amostras, e é de fácil uso dispensando a necessidade de equipamentos de laboratório especializados (Galluzzi, 2009).

Entretanto, a conversão do MTT pelas enzimas mitocondriais pode refletir alterações metabólicas que não são necessariamente relacionadas com o número de células viáveis. O consumo excessivo de meio e a alta densidade celular na cultura, são situações comuns que resultam numa diminuição das funções das mitocôndrias. Portanto, o uso desse método colorimétrico é indicado apenas nas fases preliminares do estudo de morte celular. Neste tipo de estudo, inúmeros parâmetros e condições devem ser avaliados e controlados, os ensaios devem corroborar uns com os outros unindo um conjunto de dados para a confirmação da citotoxicidade de algum espécime (Galluzzi, 2009).

5.1. Materiais e métodos

Foram utilizadas células tumorais aderentes das linhagens T47D (câncer de mama), NG97 (glioma humano) e HEPG2 (carcinoma hepático), também foram utilizadas as linhagens de células não aderentes Jurkat, derivadas de linfócitos T de leucemia, e a Raji, derivada de linfoma humano.

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de células (75 cm³, correspondentes a 250 mL), mantidas em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol da Invitrogen. Para suplementação do meio de cultura foi usado Soro Bovino Fetal a 10%, os antibióticos penicilina, 100 U/mL, e estreptomicina, 100 µg/mL, e a solução tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico), todos da Invitrogen. Para coloração das células foram utilizados o corante azul de Trypan, para realização da contagem das células, e o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), todos da Invitrogen. Os testes realizados em placas de cultura de 96 poços da TPP e acompanhados por microscópio invertido da Leica.

Em placas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio RPMI-1640, suplementado com soro bovino fetal, contendo 10⁴ células tumorais em cada poço. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 5 % e 37 °C por 24h para adaptação das células à superfície dos poços. Após este período de incubação, os derivados foram adicionados às células nas concentrações de 250 µM, 100 µM, 50 µM, 10 µM e 1 µM em triplicata em cada placa. As placas foram incubadas novamente em estufa de CO₂ por 72 horas. Após esse tempo, 20 µL da solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a 0,5 mg/mL foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por mais 3 horas para ocorrer a reação do MTT com as células e formar os cristais insolúveis de Formazan. Decorridas 3 horas, foram retirados 100 µL de sobrenadante de cada poço e descartados e, posteriormente, foram adicionados 130 µL da solução de lauril sulfato de sódio, para a dissolução dos cristais formados. Passadas 24 horas foi possível a leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 570nm.

Com os valores de absorbância obtidos pela leitura, foi possível obter a porcentagem de viabilidade celular (quantidade de células vivas) resultante do tratamento com cada composto testado em suas devidas concentrações.

Foi possível avaliar a atividade dos compostos mediante o percentual de inibição do crescimento celular (%IC), obtido pela absorbância do controle com o

veículo DMSO (A_{CN}) e absorbância das células tratadas com os compostos (A_{CT}), de acordo com a fórmula abaixo:

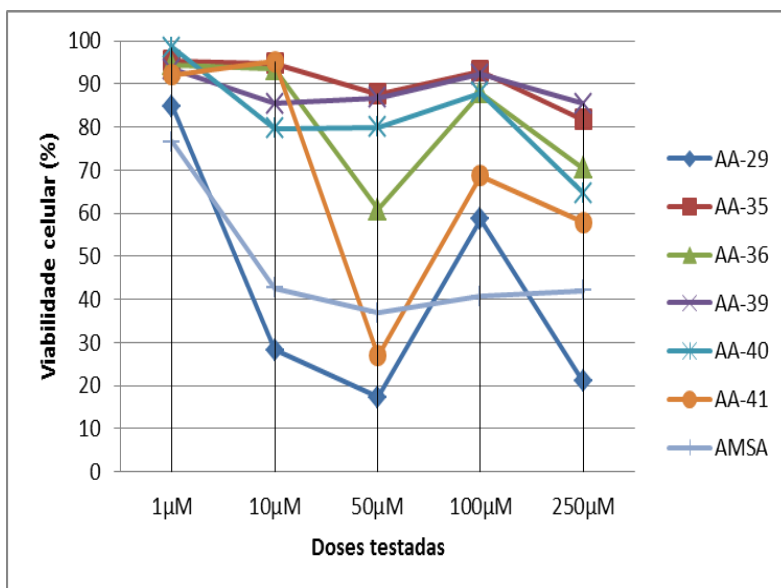
$$\%CI = 100 \times (1 - A_{CT}/A_{CN})$$

Foram avaliados quanto à citotoxicidade os seguintes compostos: LPSF/AA-29, LPSF/AA-35, LPSF/AA-36, LPSF/AA-39, LPSF/AA-40 e LPSF/AA-41. Todos foram dissolvidos em DMSO (Sigma Chemical) a 20 mg/ml e armazenados na concentração estoque de 10 mM e 50 mM. Para os testes, foram realizadas diluições diretamente no meio de cultura e preparadas as doses de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 5 μ M e 1 μ M. Para controle positivo do experimento, foi utilizada a amsacrina nas mesmas doses. A concentração final de DMSO, em todos os testes incluindo os controles, foi de 0,1%.

5.2. Resultados e Discussão

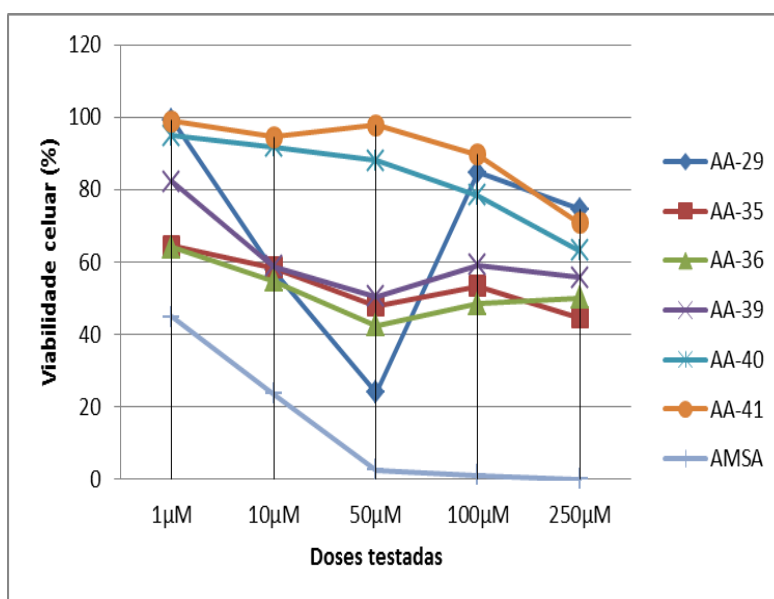
Os resultados iniciais da atividade citotóxica das amostras estão representados pela percentagem de viabilidade celular. Os dados foram analisados a partir da média de 3 experimentos independentes. Os gráficos seguintes mostram os resultados obtidos com todos os compostos testados em cada linhagem celular utilizada.

Figura 8 – Viabilidade celular (%) da linhagem T47D em função das doses testadas.



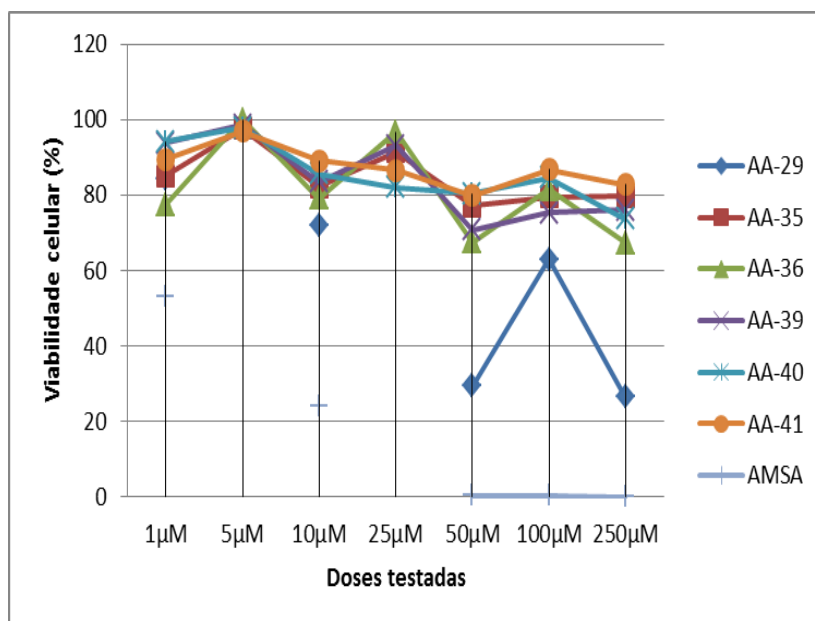
Amsacrina (AMSA) foi utilizada como controle dos experimentos.

Figura 9- Viabilidade celular (%) da linhagem HEPG2 em função das doses testadas.



Amsacrina (AMSA) foi utilizada como controle dos experimentos.

Figura 10- Viabilidade celular (%) da linhagem NG97 em função das doses testadas.



Amsacrina (AMSA) foi utilizada como controle dos experimentos.

Figura 11- Viabilidade celular (%) da linhagem Jurkat em função das doses testadas.

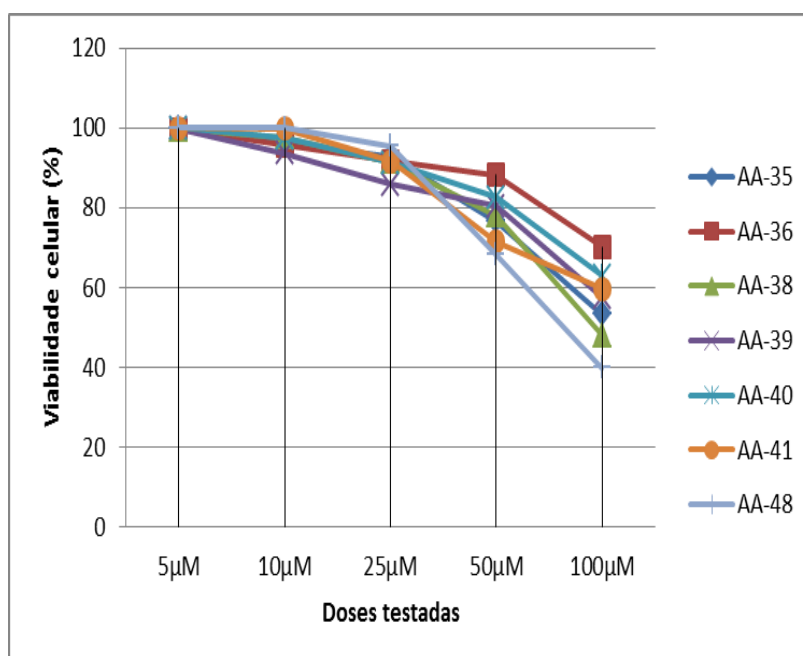
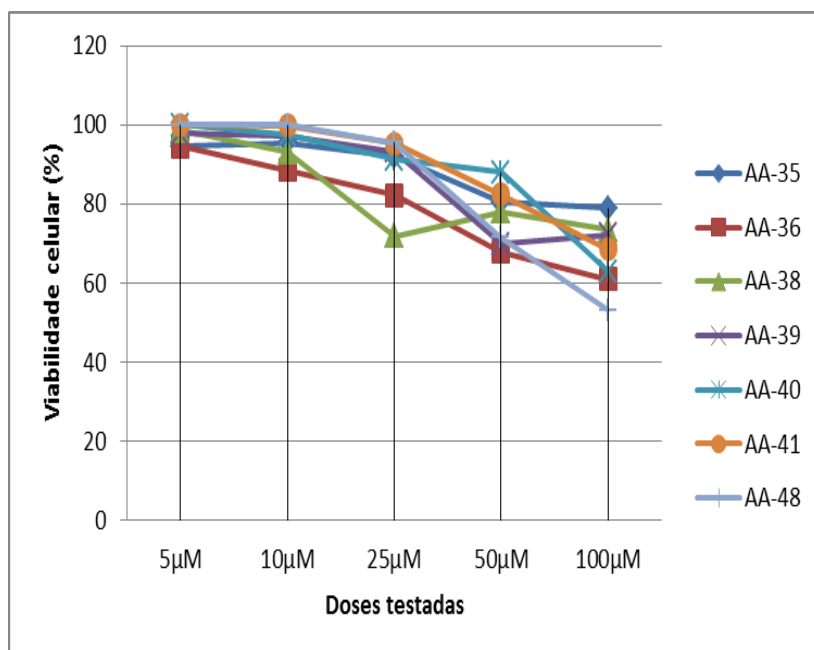


Figura 12- Viabilidade celular (%) da linhagem Raji em função das doses testadas.



As tabelas abaixo mostram os valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) que representam a concentração do composto testado capaz de inibir 50% das células tumorais. Os cálculos foram realizados por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ calculados para os compostos testados frente as linhagens T47D, HEPG97 e NG97.

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL)		
	T47D	HEPG2	NG97
LPSF/AA-29	31,30	68,03	39,59
LPSF/AA-35	92,31	48,63	79,31
LPSF/AA-36	73,14	46,95	81,34
LPSF/AA-39	87,49	55,04	74,02
LPSF/AA-40	86,42	87,67	80,13
LPSF/AA-41	51,13	97,11	83,19

Tabela 4 - Valores de IC₅₀ calculados para os compostos testados frente as linhagens Raji e Jurkat.

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL)	
	RAJI	JURKAT
LPSF/AA-35	80,33041	76,66
LPSF/AA-36	68,31595	86,79
LPSF/AA-39	71,06257	78,18
LPSF/AA-40	86,40251	82,24
LPSF/AA-41	82,31334	71,40
LPSF/AA-48	71,41344	68,26
LPSF/AA-38	74,46906	78,04

Podemos observar que o substituinte 5-bromo-1*H*-indol do composto LPSF/AA-29 contribuiu positivamente para a atividade *in vitro* quando comparado aos demais derivados acridínicos para as linhagens T47D, HEPG2 e NG97, dado confirmado com o valor de IC₅₀ que foi o melhor para estas linhagens. Para a linhagem T47D, obteve melhor resultado do que o controle (AMSA), na dose de 50µM.

Também foi possível observar que o substituinte triazol presente no composto LPSF/AA-48 possibilitou uma maior toxicidade frente as linhagens Raji e Jurkat, principalmente na dose de 100 µM.

Os derivados tiazacridínicos têm-se demonstrado moléculas promissoras com atividade antitumoral, como relatado recentemente por trabalhos do grupo (BARROS et al, 2012; PITTA et al., 2012; PIGATTO et al., 2011; PIGATTO et al, 2012). Os resultados desse trabalho podem estar relacionados a vários fatores como parâmetros eletrônicos e estéricos, conformação assumida pela molécula no seu sítio de ação, e até mesmo a solubilidade do composto. Sendo esta última uma dificuldade encontrada durante a realização dos experimentos e que é limitante para a ação biológica dos compostos.

Conclusão

6. Conclusão

Foram sintetizados 8 novos derivados tiazacridínicos substituídos:

3-(acridin-9-ilmetil)-5-(5-bromo-1*H*-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-29);

3-(acridin-9-ilmetil)-5-(3,4-*bis*-(benzilóxi)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-35);

3-(acridin-9-ilmetil)-5-(4-(piperidin-1-il)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-36);

3-(acridin-9-ilmetil)-5-(5-(4-(pirrolidin-1-il)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-38);

3-(acridin-9-ilmetil)-5-(4-morfolino-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-39);

3-(acridin-9-ilmetil)-5-(4-(piridin-2-il)-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-40);

3-(acridin-9-ilmetil)-5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-41);

3-(acridin-9-ilmetil)-5-((2-fenil-2*H*-1,2,3-triazol-4-il)-metileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA-48).

Todos os compostos tiveram suas características físico-químicas definidas e os que apresentaram melhores rendimentos foram o LPSF/AA-41 e o LPSF/AA-48 com valores de 70,29 % e 69,05 %, respectivamente.

Dentre os derivados obtidos, seis foram avaliados quanto ao potencial citotóxico frente as linhagem de células tumorais T47D, HEPG2 e NG97; e sete, foram avaliados frente as linhagens Raji e Jurkat.

O composto LPSF/AA-29 se destacou por apresentar menores valores de viabilidade celular para as linhagens T47D, HEPG2 e NG97 de células testadas, chamando atenção para a dose de 50 µM que foi a melhor das linhagens T47D e NG97.

O composto LPSF/AA-48 apresentou melhores resultados para as linhagens Raji e Jurkat na dose de 100µM.

7. Perspectivas

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos derivados tiazacridínicos em outras linhagens de células tumorais humanas;

Avaliar luminescência dos compostos produzidos, determinando os comprimentos de onda de emissão e excitação além do rendimento quântico dos compostos;

Verificar as propriedades de ligação ao DNA através de ensaio *in vitro* de ligação por determinação fotoluminescente.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

ABALA, C. *et al.* Transición epidemiológica em América Latina: comparación de cuatro países. **Rev. Med. Chil.** 125 (6), 719-27. Junho, 1997.

ACHESON, R. M. Acridines. London: Interscience Publishers LTD. 1956.
action of antitumor benzo[b]acronycine antitumor agents. **Ann. Pharm.** 63, 44– 52. 2005.

ADAMS, J. M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential. **Curr Opin Immunol.** 19, 488. 2007.

ALBERT, A. The Acridines: Their Preparation, Physical, Chemical, and Biological properties and Uses. 2nd ed. London, 1966.

ASTLE, M. J.; ZASLOWSKY, J. A. Reactions Catalyzed by Anion Exchange Resins Knoevenagel Condensation. **Ind. Eng. Chem.** 44 (12), pp 2867–2869. 1952.

BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO, M. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? Anticancer Agents. **Med. Chem.** 7, 139–169. 2007.

BONGUI, B. *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of acronycine analogues in the benzo[c]pyrano[3,2-h]acridin-7-one and naphtho[1,2-b][1,7] and [1,10]-phenanthrolin-7(14H)-one series. **Chem. Pharm. Bull.** 53, 1540–1546. 2005.

BRANA, M. F.; CACHO, M.; GRADILLAS, A.; PASSCUAL-TERESA, B.; RAMOS, A. **Curr. Pharm. Des.** 17, 1745–1780. 2001.

BRASILEIRO FILHO, G. *et al.* Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. **Bogliolo Patologia.** 5º edição. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 1994.

BURRES, N.S.; SAZESH, S.; GUNAWARDANA, G.P.; CLEMENT, J.J. Antitumor activity and nucleic acid binding properties of dercitin, a new acridine alkaloid isolated from a marine Dercitus species sponge. **Cancer Res.** 49, 5267–5274. 1989.

CALLERY, P.; GANNETT, P. Cancer and Cancer Chemotherapy. 2002. *In*: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5.ed. 2002.

CAMILO, F. F.; GRUBER, J. Reações de Diels-Alder entre compostos carbonílicos a,b-insaturados e ciclopentadieno. Revisão. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 1998.

COPE, A. C. Condensation Reactions. I. The Condensation of Ketones with Cyanoacetic Esters and the Mechanism of the Knoevenagel Reaction. **J. Am. Chem. Soc.** 59 (11), pp 2327–2330. 1937.

CORREA, W. H. *et al.* A thermodynamic investigation of solvent-free reactions. **Green Chem.** 5, 30-33. 2003.

D.E. THURSTON. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs. **CRC Press**. 2007.

DE LA MOTTE ROUGE, T. *et al.* A novel epidermal growth factor receptor inhibitor promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells resistant to erlotinib. **Cancer Res.** 67, 6253 – 6262. 2007.

DENNY, W.A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Curr. Med. Chem.**, 9, 1655–1665. 2002.

DENNY, W.A.; BAGULEY, B.C. Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy. **Curr. Top Med. Chem.** 3, 339–353. 2003.

DOH-URA, K.; IWAKI, T.; CAUGHEY. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors Inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. **B. J. Virol.** 74, 4894–4897. Maio, 2000.

DUFLUS, A.; BIGG, D.; LHOMME, J.; BONNAND, B. Preparation of 4-(amidomethyl)-3-(dimethylamino)acridine anticancer agents via the Ritter reaction. **Fr. Demande FR 2,716,454** (C1. C07D401/12), 25 Aug 1995, Appl. 94/1,971, 22 Feb 1994; 17 pp (Fr) In: **Chem. Abs.**, v. 124, 117108m, p. 1244, 1996.

FERGUSON, L.R.; DENNY, W.A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutat. Res.** 623, 14–23. 2007.

FERLIN, M. G. *et al.* Synthesis and antiproliferative activity of some variously substituted acridine and azacridine derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** 35, 827-837, 2000.

GALLUZZI, L. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death and Differentiation.** 16, 1093–1107. 2009.

GAWANDEA, M. B.; JAYARAM, R. V. A novel catalyst for the Knoevenagel condensation of aldehydes with malononitrile and ethyl cyanoacetate under solvent free conditions. **Catalysis Communications.** v. 7, n. 12, pp. 931-935, dez. 2006.

GLOBOCAN 2008 (IARC), Section of Cancer Information. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> >. Acesso em: 14 novembro 2011.

GNIAZDOWSKI, M.; SZMIGIERO, L. Nitracrine and its congeners - an overview. **Gen. Pharmacol.** 26, 473–481. 1995.

GOODELL, J. R.; MADHOK, A. A.; HIASA, H.; FERGUSON, D. M. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 14, 5467–5480. 2006.

GUERRO, M.; ROBERT, A.; MICHELOT, G.; VALENTIC, N. Conditions de la condensation de Knoevenagel–Cope pour la synthèse de cétones α,β -éthyléniques. Knoevenagel–Cope condensation conditions applied to ketolisation reaction. **Comptes Rendus Chimie**. v. 5, n. 3, pp. 171-175, mar. 2002.

GUROVA, K. New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. **Fut. Oncol.** 5 (10) 1685–1713. December, 2009.

HAGIWARA, H.; ISOBE, K.; HOSHI, T.; SUZUKI, T. Knoevenagel reaction in water catalyzed by amine supported on silica gel. **Molecular Diversity**. v. 9, n. 4, pp. 317-320, nov. 2005.

HECHT, S. Bioorganic Chemistry, Nucleic Acids, **Oxford University Press**, New York, 1996.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded ...principles and recent developments. **Top. Curr. Chem.** 258, 161-204. 2005.

INCA, 2011. Disponível em: <<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/prepararModelo07.action>>. Acesso em: 14 novembro 2011.

JANUS, E.; STEFANIAK, W. The Diels–Alder Reaction in Phosphonium Ionic Liquid Catalysed by Metal Chlorides, Triflates and Triflimides. **Catalysis Letters**. v. 124, n. 1-2, pp. 105-110, ago. 2008.

KOCHIKYAN, T. V.; ARUTYUNYAN, V. S.; ARUTYUNYAN, E. V.; AVETISYAN, A. A. Condensation of 4-Substituted 2-Ethoxycarbonyl-4-pentanolides with α,β -Unsaturated Compounds. **Russian Journal of Organic Chemistry**. v. 39, n. 8, pp. 1140-1143, ago. 2003.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 20,70-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.** 5: 227–231. 1992.

LIU, Q. *et al.* Synthesis, DNA binding and cleavage activity of macrocyclic polyamines bearing mono- or bis-acridine moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry.** 45, 5302e5308. 2010.

LORENTE, A.; VAZQUEZ, Y.G.; FERNANDEZ, M.J.; FERRANDEZ, A. Bis-Acrindines with Aromatic Linking Chains. Synthesis, DNA Interaction and Antitumor Activity. **Bioorg. Med.Chem.** 12, 4307–4312. 2004.

MAGALHÃES, L. R. Síntese, Elucidação Estrutural, Estudo Configuracional e Atividade Biológica de Imidazolidinas e Tiazolidinas Substituídas. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil, 2003.

MARTÍNEZ, R.; CHACÓN-GARCÍA, L. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work **Curr. Med. Chem.** 12, 1345–1359. 2005.

MATHEW, R.; KARANTZA-WADSWORTH, V. WHITE E. Role of autophagy in cancer. **Nat Rev Cancer.** 7, 961. 2007.

MOURA, R. O. Síntese, elucidação estrutural e atividade antitumoral de derivados derivados imidazo-acridínicos e tiazol-acridínicos. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil, 2005.

OGATA, Y.; TSUCHIDA, M. Kinetics of the Knoevenagel Condensation of Benzaldehydes with Diethyl Malonate. **J. Am. Chem. Soc.** 81 (9), pp 2092–2094. 1959.

OGUL'CHANSKY T.YU., LOSYTSKY M.Y., KOVALSKA V.B., YASHCHUK V.M., YARMOLUK S.M. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. Aggregation of cyanine dyes in presence of DNA and its manifestation in absorption and fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part A*. 57, P.1525–1527. 2001.

PIGATTO, M. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; VESSECCHI, R.; ASSIS, M. D.; SANTOS, J. S.; COSTA, T. D.; LOPES, N. P. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **European Journal of Medicinal Chemistry** 46, 4245 e 4251. 2011.

PITTA, I.V.; GALDINO, S.L.; LIMA, M.C.A. Acridine Derivates with Antitumoral Activity. Patent number WO/2007/109871. 2007.04.10. Federal University of Pernambuco-UFPE, Brazil.

POOT, M.; HILLER, K. H.; HEIMPEL, S.; HOEHN, H. Distinct patterns of cell cycle disturbance elicited by compounds interfering with DNA topoisomerase I and II activity. **Experimental Cell Research**, 218, p.326. 1995.

PRATT, E. F.; WERBLE, E. Reaction Rates by Distillation. III. The Effect of Changes in Structure on the Rate of the Knoevenagel Reaction. **J. Am. Chem. Soc.** 72 (10), pp 4638–4641. 1950.

PROUT, F. S.; ABDEL-LATIF, A. A.; KAMAL, M. R. Catalyst Study of the Knoevenagel Condensation. **J. Chem. Eng. Data**. 8 (4), pp 597–599. 1963.

RADCHENKO, O. S.; SIGIDA, E. N.; BALANEVA, N. N.; DMITRENOK, P. S.; NOVIKOVA, V. L. Abnormal Reactions of 2-Methoxy-4,9-dimethyl-1-nitroacridine with Selenous Acid and Selenium(IV) Oxide. Synthesis of 1H-Selenopheno[2,3,4-k,l]acridine-1-one: A New Seleno-Containing Ring System. **Journal of Heterocyclic Chemistry**. Janeiro, 2011.

RAZA, A. *et al.* Novel acridine-based agents with topoisomerase II inhibitor activity suppress mesothelioma cell proliferation and induce apoptosis. **Invest New Drugs**. July, 2011.

RENÉ, B; FOSSÉ, P; KHÉLIFA, T; JACQUEMIN-SABLON, A; BAILLY, C. Cytotoxicity and interaction of amsacrine derivatives with topoisomerase II: role of the 1' substitute on the aniline nucleus. **Bull Cancer**. 84(10):941–948, 1997.

ROCHA PITTA, M. G. Novos Agentes Anticâncer Tiazacridínicos Substituídos: Síntese, Estrutura e Efeitos Biológicos. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil, 2010.

RUNDON, R. W. Cancer Biology. 4^o ed. Oxford University Press. New York, 2007.

SABOLOV´A, D.; KOŽURKOV´A, M.; KRISTIAN, P.; DANIHEL, I.; PODHRADSKÝ, D.; IMRICH, J. Determination of the binding affinities of plasmid DNA using fluorescent intercalators possessing an acridine skeleton. **International Journal of Biological Macromolecules** 38, 94–98. 2006.

SALUNKHE, M. M.; HARJANIA, J. R.; NARAA, S. J. Lewis acidic ionic liquids for the synthesis of electrophilic alkenes via the Knoevenagel condensation. **Tetrahedron Letters**. v. 43, n. 4, pp. 1127-1130, fev. 2002.

SAMMELSON, R. E.; KURTH, M. J. Carbon–Carbon Bond-Forming Solid-Phase Reactions. Part II. **Chem. Rev.**, 2001, 101 (1), pp 137–202.

SEGUIN, E.; TILLEQUIN, F. Structure activity relationships and mechanism of action of antitumor benzo[b]acronycine antitumor agents. **Ann. Pharm.** 63, 44 – 52. 2005.

SHEWACH, D.S.; KUCHTA, R.D. Introduction to Cancer Chemotherapeutics **Chem. Ver.** Vol. 109, No. 7. 109, 2859–2861. 2009.

SILVA, F. S. V. C. B. Síntese e avaliação biológica de novos derivados acridino-tiazolidínicos e benzilideno-imidazolidínicos. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brasil, 2001.

SILVA, T. G. **Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Novos Derivados Acridínicos-Tiazolidínicos e Acridino-Imidazolidínicos**. (Doutorado em Co-tutela na área de Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal) Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil. Université de La Méditerranée Faculté de Pharmacie de Marseille, France, 2003.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 2 v.

SONG, G.; CAI, Y.; PENG, Y. Amino-functionalized Ionic Liquid as an Efficient and Recyclable Catalyst for Knoevenagel Reactions in Water. **Catalysis Letters**. v. 109, n. 1-2, pp. 61-64, mai. 2006.

TABARRINI, O. *et al.* Design and synthesis of modified quinolones as antitumoral acridones. **J. Med. Chem.**, v. 42, n. 12, p. 2136-2144, 1999.

THOMAS, G. Química medicinal uma introdução. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

Thurston, D. E. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs, CRC Press. Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2007.

VITALE, I.; GALLUZZI, L.; VIVET, S.; NANTY, L.; DESSEN, P.; SENOVILLA, L. Inhibition of Chk1 kills tetraploid tumor cells through a p53-dependent pathway. **PLoS ONE**. 12, e1337. 2007.

WAINWRIGHT, M. Acridine – a neglected antibacterial chromophore. **J. Antimicrob. Chemother.** 47, 1–13. 2001.

WANG, J.; XU, J.; WU, Q.; LV, D.; LIN, X. Promiscuous enzyme-catalyzed regioselective Michael addition of purine derivatives to α,β -unsaturated carbonyl compounds in organic solvent. **Tetrahedron**. v. 65, n. 12, pp. 2531-2536, mar. 2009.

WATERS, W. F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *J Community*. 26 (2), 79-92. Abril, 2001.

YARMOLUK, S.M.; KOVALSKA, V.B.; KRYVOROTENKO, D.V.; BALANDA, A.O.; OGUL'CHANSKY, T.YU. *Spectrochim. Acta A, Mol. Biomol. Spectrosc.* 57, 1533–1540. 2001.