

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



MIGUEL ANGELO SANTOS PINHEIRO SEGUNDO

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA E INCREMENTO DE SOLUBILIDADE DE NOVOS
DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS.**

Recife
2020

MIGUEL ANGELO SANTOS PINHEIRO SEGUNDO

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA E INCREMENTO DE SOLUBILIDADE DE NOVOS
DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Co-Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

Recife

2020

P654d Pinheiro Segundo, Miguel Angelo Santos
Desenvolvimento, avaliação preliminar da atividade antiproliferativa e incremento de solubilidade de novos derivados espiro-acridínicos/ Miguel Angelo Santos Pinheiro Segundo. - 2020.
180 f.: il.

Orientador: Ricardo Olímpio de Moura.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde (CCS). Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências e apêndices.

1. Antineoplásicos. 2. Acridinas. 3. Simulação de Acoplamento Molecular. 4. Interação com DNA. 5. Complexo de inclusão. I. Moura, Ricardo Olímpio de (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2020-226)

MIGUEL ANGELO SANTOS PINHEIRO SEGUNDO

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA E INCREMENTO DE SOLUBILIDADE DE NOVOS
DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 25/08/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Presidente)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus avós maternos, José e Floracy (in memoriam) e paternos João e Maria de Lourdes (in memoriam).

Aos meus pais, Miguel (paizão) e Maria de Fátima (meu grande amor) por todo amor, respeito, dedicação, carinho, atenção e tudo de possível e impossível que eles fizeram e fazem até hoje por mim dando sempre o melhor. Sem vocês nada disso seria possível. (Eu amo vocês).

Às minhas irmãs Maria Teresa (Lelinha) e Edilene (Dillzinha), por elas estarem sempre juntas me apoiando em tudo que acreditei nessa vida. Meu sobrinho “Pig” e meus primos Cássio, Maria Antônia e Diana.

A meu amor de vida João Antunes Vasconcelos (Vidinha), minha âncora, meu alicerce emocional, por todo cuidado, preocupação e encorajamento nos momentos mais difíceis dessa trajetória e de todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos: João Vasconcelos, Jofre Neto, Wilton Vieira, Paulo Telles e Eduardo Guimarães (Lindos), Gustavo Ramalho, Marcos Aragão, Osvaldo Santos, Cristiana Peres e Lucas Silva, não esquecendo de Hélder Vaz e Simone Figueiredo, com vocês a meu lado, tudo se resume a amizade, felicidade e conquistas e esta foi nossa.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo ao Criador do Universo, por sempre se fazer presente em todos os momentos de luta e de glória, proporcionando os ensinamentos da vida e por mais uma conquista alcançada.

Especialmente, ao Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, meu orientador, responsável pelo meu conhecimento e aprendizado científico, e que me fez aprender a pensar na ciência, na química farmacêutica e medicinal, e principalmente na vida com um olhar crítico e construtivo.

Incondicionalmente, à Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima, a quem posso chamar de mãe científica, pelo acolhimento em seu laboratório (LQIT-UFPE), por toda sua paciência, carinho e preocupação desde o meu ingresso em seu laboratório do mestrado até aqui.

Pela minha primeira oportunidade de estágio voluntário em pesquisa científica, no Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), com a Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães.

Ao Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira da Universidade Federal da Paraíba, por sua co-orientação essencial na 2^a etapa deste trabalho com a tecnologia farmacêutica.

Aos Professores Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio André Brayner dos Santos do Laboratório de Microscopia Eletrônica centralizado (LIKA-UFPE), pela colaboração na caracterização do complexo de inclusão desse trabalho, não esquecendo das excelentes micrografias realizadas com toda paciência e cuidado de Rafael José Padilha.

Ao Dr. Marcelo Rabelo por sua contribuição nos estudos de modelagem molecular do complexo de inclusão.

Em agradecimento à Eliete Barros do Departamento de Química Fundamental (DQF-UFPE), à João Rangel do Laboratório de Combustíveis (LAC-UFPE) e à Gian Duarte e Amanda Félix do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pela caracterização e obtenção dos espectros de RMN, infravermelho e massas, respectivamente.

A minha grande amiga, Prof.^a Dr.^a Sarah Brandão Palácio, um presente dado pela vida no momento em que mais precisava para meu ingresso na ciência.

Aos meus amigos do LQIT-UFPE, Jamerson Oliveira, Sérgio Almeida, Anekécia Silva, Elizabeth Lafayette, Sybelle Lacerda, Nayara Leite, Cézar Amorim, Tiago Bento, Íris Trindade e Amélia Galdino pelo companheirismo, convivência e ensinamentos de cada um em sua área específica e os demais Paula, Keriolaine, Luiz, Edson, Alana, Pedro, Bruno, Suellen, Hannah, Natanael, Cleberson e Charles por toda contribuição, colaboração e apoio durante o desenvolvimento do trabalho, e durante os momentos de descontração no laboratório.

Aos colegas do LSVM-UEPB (Campus João Pessoa) Camila, Fernanda, Marine, Rodrigo, Rayssa, Silvana, Michele, Felipe e Malu por todo acolhimento e apoio no laboratório e em João Pessoa contribuindo de forma grandiosa para este trabalho. Especialmente, para Camila Melo, por toda boa vontade e disponibilidade em sanar minhas dúvidas na etapa da tecnologia farmacêutica e todos os gráficos plotados e suporte emocional.

Aos colegas do LDSF-UEPB (Campus Campina Grande) Jamire, William, Sonaly, Michelle, Gleyton, Lidiane, Raíssa e Yvnni por todas as horas aulas juntas como nosso orientador, todos os momentos de bancada nos laboratórios e toda colaboração necessária de cada um que tive muito bem-vinda. Especialmente, ao meu amigo Gleyton Leonel, por todo suporte no estudo *docking* e todas as dúvidas possíveis.

A cada membro da Secretaria do PPGCF-UFPE, por todos as dúvidas, declarações, reclamações e problemas solucionados, em especial a Nerilim Trajano que me acompanhou desde o meu estágio voluntário em pesquisa até aqui.

À CAPES, pelo seu suporte financeiro.

Por fim, a Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Estadual da Paraíba (Campus João Pessoa e Campina Grande), professores, alunos e funcionários destas, onde tive oportunidade de conviver e adquirir novos conhecimentos importantes para minha formação acadêmica.

Meu agradecimento será eterno a todos vocês, onde posso resumir mais um ciclo de vida que está se fechando numa só palavra, TUDO!

Muito obrigado!

RESUMO

Apesar da diversidade de terapias desenvolvidas visando moléculas de sinalização envolvidas no processo de carcinogênese, a quimioterapia ainda se destaca como uma das principais modalidades de tratamento do câncer. Intercaladores de DNA tais como derivados de acridina possuem atividade inibitória frente a enzimas reguladoras nucleares (topoisomerasas), além de uma forte interação com pares de bases do DNA. No presente trabalho, treze novos derivados espiro-acridínicos foram sintetizados, caracterizados físico-quimicamente e estruturalmente, e avaliado o perfil de interação com possíveis alvos, avaliada a citotoxicidade frente a diferentes linhagens tumorais e delineado seu perfil farmacocinético. Os derivados finais apresentaram rendimento (31 a 91 %) e faixas de fusão (1-2 °C). A maioria dos derivados apresentaram sinais característicos dos grupos funcionais propostos nas estruturas, através do RMN de ^1H , com simpletos referentes ao grupo NH acridínico, além de prótons oriundos da formação da ligação C=N (imínico) e C=C (vinílico) corroborando para a elucidação estrutural de todos os derivados. Os espectros de RMN de ^{13}C evidenciaram as absorções dos átomos de carbono característicos dos derivados espiro-acridínicos, principalmente o deslocamento que mostrou o carbono quaternário evidenciado nos sinais (69,02 a 70,80 ppm) o qual demonstra a ocorrência da ciclização espontânea e a formação do conjugado espiro-acridínico dando indício principal do sucesso reacional. Dentre os treze derivados em estudo, os AMTAC's 21, 22 e 23 se destacaram nos resultados de *docking*, sendo considerados os mais promissores na interação com os alvos topoisomerase II α -DNA e DNA, por apresentarem melhores scores de energia livre (-9.73 Kcal mol $^{-1}$ a -10.91 Kcal mol $^{-1}$), demonstrando maior facilidade de se apresentar na conformação ideal, possuindo assim melhor afinidade. Com relação a citotoxicidade dos derivados frente a diferentes linhagens, destacamos as linhagens de câncer de mama (MCF-7) e câncer de cólon (HCT-116), que foram avaliadas com resultados bons a moderados. O AMTAC-19 apresentou inibição de 88,5% frente às células HCT-116 na concentração de 50 μM . Já as células MCF-7 se mostraram menos ativas, com a maior inibição demonstrada também pelo AMTAC-19 (66,2%). Para o estudo de complexação com ciclodextrinas, o *docking* do complexo AMTAC-02: HP β CD foi o mais energeticamente favorável com energia de ligação (-6,60 K cal / mol e 9 contatos hidrofóbicos). A solubilidade de fases apresentou curva de

inclinação de 0,0003 confirmando a estequiometria de 1:1. O MEV apresentou morfologicamente micrografias sugestivas da complexação AMTAC-02: HP β CD e a espectroscopia de IV, apresentou grupos funcionais que podem favorecer a formação do complexo em bandas de absorção entre 3.350 e 3.362 cm^{-1} (NH), 1.720 e 1.725 cm^{-1} (C=O), e em 2.235 cm^{-1} (CN). No estudo preditivo farmacocinético *in silico*, os derivados sintetizados apresentaram-se com caráter lipossolúvel alto, inibições a isoformas CYPs importantes para o metabolismo na biofase, probabilidades baixas de metabolizações, que acometem características importantes para posteriores estudos *in vivo*.

Palavras-chave: Antineoplásicos. Acridinas. Simulação de Acoplamento Molecular. Interação com DNA. Complexo de inclusão

ABSTRACT

Despite the diversity of therapies developed targeting signaling molecules involved in the process of carcinogenesis, chemotherapy still stands out as one of the main modalities of cancer treatment. DNA intercalators such as acridine derivatives have inhibitory activity against nuclear regulatory enzymes (topoisomerases), in addition to a strong interaction with DNA base pairs. In the present work, thirteen new spiro-acridine derivatives were synthesized, characterized physically-chemically and structurally, and the profile of interaction with possible targets was evaluated, the cytotoxicity was evaluated against different tumor strains and their pharmacokinetic profile was outlined. The final derivatives showed a yield (31 to 91%) and melting ranges (1-2 °C). Most derivatives showed signs characteristic of the functional groups proposed in the structures, through ^1H NMR, with simplets referring to the NH acridinic group, in addition to protons originating from the formation of the C = N (iminic) and C = C (vinyl) bond corroborating for the structural elucidation of all derivatives. The ^{13}C NMR spectra showed the absorption of carbon atoms characteristic of the spiro-acridine derivatives, mainly the displacement that showed the quaternary carbon shown in the signals (69.02 to 70.80 ppm) which demonstrates the occurrence of spontaneous and the formation of the spiro-acridine conjugate giving the main indication of reaction success. Among the thirteen derivatives under study, AMTAC's 21, 22 and 23 stood out in the docking results, being considered the most promising in the interaction with the topoisomerase II α -DNA and DNA targets, for presenting better scores of free energy (-9.73 Kcal mol⁻¹ to -10.91 Kcal mol⁻¹), showing greater ease of presenting in the ideal conformation, thus having better affinity. Regarding the cytotoxicity of derivatives against different strains, we highlight the breast cancer (MCF-7) and colon cancer (HCT-116) strains, which were evaluated with good to moderate results. AMTAC-19 showed an inhibition of 88.5% compared to HCT-116 cells at a concentration of 50 μM . MCF-7 cells were less active, with the greatest inhibition also demonstrated by AMTAC-19 (66.2%). For the study of complexation with cyclodextrins, the docking of the AMTAC-02: HP β CD complex was the most energetically favorable with binding energy (-6.60 K cal / mol and 9 hydrophobic contacts). The phase solubility showed an inclination curve of 0.0003 confirming the stoichiometry of 1: 1. The SEM showed morphologically suggestive micrographs of the AMTAC-02: HP β CD complex and IR spectroscopy, presented functional groups that

can favor the formation of the complex in absorption bands between 3,350 and 3,362 cm^{-1} (NH), 1,720 and 1,725 cm^{-1} (C = O), and at 2,235 cm^{-1} (CN). In the predictive pharmacokinetic study in silico, the synthesized derivatives presented with high fat soluble character, inhibitions of CYPs isoforms important for metabolism in the biophase, low probabilities of metabolizations, which affect important characteristics for later in vivo studies.

Keywords: Antineoplastic agents. Acridines. Molecular Coupling Simulation. Interaction with DNA. Inclusion complex

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.	30
Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 na Região Nordeste do país por sexo, exceto pele não melanoma*.	32
Figura 3 – Taxas brutas de incidência estimadas para 2020 por sexo, segundo Estado de Pernambuco e a capital Recife.	33
Figura 4 – Recorte da estrutura do DNA.	37
Figura 5 – Representação esquemática de possíveis modos de interação ligante-DNA.	39
Figura 6 – Estrutura básica da acridina.	41
Figura 7 – Estrutura da Proflavina, Acriflavina e Mepacrina.	41
Figura 8 – Estrutura da Amsacrina.	42
Figura 9 – Estruturas químicas dos derivados DACA e PZA.	43
Figura 10 – Derivados acridínicos sintetizados por Barros e colaboradores.	46
Figura 11 – Derivados da Aminoacridina.	47
Figura 12 – Novos derivados imidazacridínicos e tiazacridínicos.	47
Figura 13 – Composto N-2-metilpiridina-9-aminoacridina.	48
Figura 14 – Derivado Benzimidazólico-acridínico.	49
Figura 15 – Estruturas químicas dos compostos 3a e 3f.	49
Figura 16 – Novos derivados espiro-acridínicos obtidos com ciclização espontânea.	50
Figura 17 – Derivados sintetizados por SALEM e colaboradores.	51
Figura 18 – Derivado 9-benziamino-acridina.	51
Figura 19 – Estrutura do AMTAC-06.	52
Figura 20 – Estrutura do AMTAC-01 e AMTAC-02	53
Figura 21 – Estrutura do AMTAC-17.	53
Figura 22 – Representação esquemática da α -CD (a); β -CD (b) e γ -CD (c)	60
Figura 23 – Conformação tridimensional tronco-cônica das ciclodextrinas formadas por moléculas de glicose.	61

Figura 24 – Representação ilustrativa da formação do complexo de inclusão droga-ciclodextrina 1:1 (A) e 1:2 (B).....	62
Figura 25 – Localização dos grupos hidroxilas na α -CD. As setas indicam os grupos hidroxilas situados em C2, C3 e C6.....	63
Figura 26 – Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina.	64
Figura 27 – Representação 2D das interações entre o ligante Etoposídeo e o alvo topoisomerase II α	87
Figura 28 – Representação 2D das interações entre AMTAC-01 e o alvo topoisomerase II α	88
Figura 29 – Representação 2D das interações entre AMTAC-21 e o alvo topoisomerase II α	89
Figura 30 – Representação 2D das interações entre AMTAC-22 e o alvo topoisomerase II α	89
Figura 31 – Representação 2D das interações entre AMTAC-23 e o alvo topoisomerase II α	90
Figura 32 – Representação 3D das interações entre Acridina com o alvo DNA.....	92
Figura 33 – Representação 3D das interações entre o composto AMTAC-17 com o alvo DNA.	93
Figura 34 – Representação 3D das interações entre o composto AMTAC-21 com o alvo DNA.	93
Figura 35 – Representação 3D das interações entre o composto AMTAC-23 com o alvo DNA.	94
Figura 36 – Espectro de IV do AMTAC-17.	108
Figura 37 – Espectro de IV do ACMD-02.	109
Figura 38 – Espectro de RMN 1H AMTAC-17.....	111
Figura 39 – Espectro de RMN 1H AMTAC-17 ampliado.	112
Figura 40 – Espectro de RMN de 13C do AMTAC-17.....	114
Figura 41 – Espectro de RMN 1H ACMD-03.....	116
Figura 42 – Espectro de RMN 1H ACMD-03 ampliado.	117
Figura 43 – Espectro de RMN 13C ACMD-03.....	118
Figura 44 – Modelo BOILED-Egg da série AMTAC.....	123
Figura 45 – Modelo BOILED-Egg da série ACMD.....	128

Figura 46 – Melhores resultados de docking para o complexo de inclusão.	135
Figura 47 – Diagrama de solubilidade de fases do complexo AMTAC-02:	
HP β CD a 25° C.	136
Figura 48 – Dados Espectrais de DRX.	138
Figura 49 – Dados Espectrais de IV.	139
Figura 50 – Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV): AMTAC-02 (a);	
HP β CD (b); mistura física (c); e complexo de inclusão (d).	140

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Linhagens de células tumorais e não tumorais utilizadas no estudo	77
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reação de obtenção do anel acridina via formação de acridona pela reação de Ullman-Jourdan.	43
Esquema 2 – Reações de acoplamento de Ullman e Golberg.	44
Esquema 3 – Reação Global e Mecanismo para obtenção do AC-01 via reação de Bernthsen.	45
Esquema 4 – Esquema reacional de obtenção dos derivados espiro- acridínicos.	96
Esquema 5 – Mecanismo reacional para a obtenção dos derivados espiro- acridínicos.	100
Esquema 6 – Esquema reacional e provável mecanismo para a obtenção do intermediário JM-01.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.	29
Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*.....	31
Tabela 3 – Estimativas para Pernambuco e Recife em 2020 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*.	32
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.	60
Tabela 5 – Moléculas avaliadas por Docking da série ACMD.	67
Tabela 6 – Moléculas avaliadas por Docking da série AMTAC.	68
Tabela 7 – Docking molecular das séries ACMD e AMTAC no alvo topoisomerase II α (PDB ID 5GWK).....	85
Tabela 8 – Docking molecular com derivados espiro-acridínicos no alvo DNA (PDB ID 1G3X) para as séries ACMD e AMTAC.	91
Tabela 9 – Obtenção do AC-01, ACN-01 e AC-02	97
Tabela 10 – Intermediários obtidos da série 2-ciano-N'-benzilideno-acetohidrazida (JR's)	98
Tabela 11 – Derivados finais sintetizados da série AMTAC e suas respectivas características físico-químicas	101
Tabela 12 – Intermediários obtidos da série 2-ciano-N'-benzilideno-acetohidrazida (JM's) com suas respectivas características físico-químicas	103
Tabela 13 – Derivados finais sintetizados da série ACMD e suas respectivas características físico-químicas	104
Tabela 14 – Dados das massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados dos AMTAC's.....	106
Tabela 15 – Dados das massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados dos ACMD's.....	107
Tabela 16 – Dados espectrais de IV da série AMTAC.	108

Tabela 17 – Dados espectrais de IV da série ACMD.	110
Tabela 18 – Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO- d_6 , 300 MHz) da série AMTAC.....	112
Tabela 19 – Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) da série AMTAC.....	113
Tabela 20 – Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 300 MHz) da série AMTAC.	114
Tabela 21 – Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) da série AMTAC.	115
Tabela 22 – Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO- d_6 , 300 MHz) da série ACMD.....	117
Tabela 23 – Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 300 MHz) da série ACMD	118
Tabela 24 – Efeito dos AMTAC's na viabilidade das células tumorais e não tumoral	119
Tabela 25 – Efeito dos ACMD's na viabilidade das células tumorais e não tumoral	121
Tabela 26 – Valores de Log P da série AMTAC.....	124
Tabela 27 – Parâmetros druglikeness.....	125
Tabela 28 – Propriedades de solubilidade da série AMTAC.	125
Tabela 29 – Valores de Log Kp da série AMTAC.....	126
Tabela 30 – Interação das moléculas analisadas da série AMTAC com as isoformas de CYP450.	127
Tabela 31 – Valores de Log P da série ACMD.....	131
Tabela 32 – Propriedades de solubilidade da série ACMD	131
Tabela 33 – Valores de Log Kp da série ACMD.....	133
Tabela 34 – Interação das moléculas analisadas da série ACMD com as isoformas de CYP450.	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

β -CD – Beta-ciclodextrina

BSA – *Bovine Serum Albumin* - Albumina do soro bovino

CCD – Cromatografia de camada delgada

CD – Ciclodextrina

ctDNA – *calf thymus* DNA – DNA de timo bovino

CI₅₀ – Inibição em 50% das células

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

DMF – Dimetilformamida

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRX – Difractometria de raios-X

EC – Eficiência de complexação

EtOH – Etanol

FDA – *Food and Drugs Administration* – Administração de Alimentos e Medicamentos

GBD – *Global Burden of Disease* – Carga Global da Doença

HC – *Hydrophobic contact* – Contato hidrofóbico

HP β CD – 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IV – Infravermelho

K_s – Constante de estabilidade aparente

m-AMSA – Amsacrina

MHz – Mega-hertz

MS – *Mass spectrometry* – Espectrometria de massas

LAC – Laboratório de combustíveis

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

LqIT – Laboratório de Química e Inovação Terapêutica

LSVM – Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas

R_f – Fator de retenção

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

WHO – *World Health Organization* – Organização das Nações Unidas

δ – Deslocamento químico

ppm – parte por milhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
3.1	CÂNCER	28
3.2	TERAPIA ANTITUMORAL	34
3.3	RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS	35
3.4	DNA E TOPOISOMERASES COM POSSÍVEIS ALVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTITUMORAIS	36
3.5	ACRIDINA E DERIVADOS ACRIDÍNICOS	40
3.6	MECANISMOS DE SÍNTESE PARA OBTENÇÃO DO ANEL ACRIDÍNICO E SUAS MODIFICAÇÕES	42
3.7	DERIVADOS ACRIDÍNICOS X TERAPIA DO CÂNCER	46
3.8	ESTRATÉGIAS DE PLANEJAMENTO MOLECULAR	54
3.8.1	Docking molecular	54
3.9	REGRAS: LIPINSKI X VEBER	56
3.10	A IMPORTÂNCIA DA PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA	57
3.11	AS TECNOLOGIAS COMO FERRAMENTAS PARA APERFEIÇOAMENTO FARMACOCINÉTICO	59
3.11.1	Ciclodextrinas (CDs)	59
3.11.2	Ciclodextrinas modificadas	62
3.11.3	Formação do Complexo de Inclusão (CI)	63
4	PARTE EXPERIMENTAL (1ª ETAPA)	66
4.1	ESTUDO IN SILICO	66
4.1.1	Docking molecular	66
4.2	ESTUDO QUÍMICO	69
4.2.1	Reagentes e Solventes	69
4.2.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	70
4.2.3	Ponto de Fusão (PF)	70
4.2.4	Cálculo teórico do Log P	70
4.2.5	Aparência	70

4.2.6	Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)	71
4.2.7	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	71
4.2.8	Espectrometria de Massas (EM)	71
4.3	METODOLOGIAS DE SÍNTESE	72
4.3.1	Etapas de síntese dos derivados espiro-acridínicos	72
4.3.1.1	Síntese da 9-metilacridina (AC-01).....	72
4.3.1.2	Síntese do [N-(acridina-9-il-metileno)-N,N-dimetil-benzeno-1,4-diamino] (ACN-01).....	73
4.3.1.3	Síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC-02).....	73
4.3.2	Procedimento geral para obtenção dos intermediários da série 2-ciano-<i>N'</i>-benzilideno-acetohidrazida (JR's)	74
4.3.2.1	Síntese do 2-ciano- <i>N'</i> -benzilideno-acetohidrazida	74
4.3.3	Procedimento geral para obtenção dos intermediários da série 2-ciano-<i>N</i>-fenil-acetamida (JM's)	75
4.3.3.1	Síntese do 2-ciano- <i>N'</i> -fenil-acetamida.....	75
4.3.4	Procedimento geral para obtenção da série 1'-(benzilideno-amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC's)	75
4.3.4.1	Síntese do 1'-((4-metoxibenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila	75
4.3.5	Procedimento geral para obtenção da série 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (ACMD's)	76
4.3.5.1	Síntese do 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila	76
4.4	ESTUDO BIOLÓGICO	77
4.4.1	Avaliação da citotoxicidade	77
4.4.1.1	Linhagens celulares e cultivo.....	77
4.4.1.2	Ensaio de redução do MTT	78
4.5	PARTE EXPERIMENTAL (2ª ETAPA)	79
4.5.1	Estudo tecnológico farmacêutico	79
4.5.2	Estudo de modelagem molecular do complexo de inclusão	79
4.5.3	Estudo de solubilidade de fases	81
4.5.4	Preparação do complexo de inclusão (AMTAC-02: HPβCD)	82

4.5.4.1	Preparação da mistura física.....	82
4.5.4.2	Liofilização.....	82
4.5.5	Difratometria de raios-X (DRX)	83
4.5.6	Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)	83
4.5.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	83
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO (1ª ETAPA)	85
5.1	<i>DOCKING MOLECULAR</i>	85
5.1.1	Alvo topoisomerase IIα / DNA (PDB ID 5GWK)	85
5.1.2	Alvo DNA (PDB ID 1G3X)	91
5.2	ESTUDO QUÍMICO	95
5.2.1	Descrição dos novos derivados espiro-acridínicos.....	95
5.2.2	Síntese e caracterização dos novos derivados espiro-acridínicos.....	96
5.2.3	Identificação e caracterização química dos derivados	106
5.2.3.1	Espectrometria de Massas (EM)	106
5.2.3.2	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	107
5.2.3.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	110
5.3	ESTUDO BIOLÓGICO	119
5.3.1	Avaliação da citotoxicidade.....	119
5.4	PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA <i>IN SILICO</i>	122
5.4.1	Predição farmacocinética da série AMTAC.....	122
5.4.2	Predição farmacocinética da série ACMD	127
5.5	PARTE EXPERIMENTAL (2ª ETAPA).....	134
5.5.1	Estudo tecnológico farmacêutico	134
5.5.2	Estudo de modelagem molecular do complexo de inclusão.....	134
5.5.3	Estudo de solubilidade de fases do complexo AMTAC-02: HPβC	136
5.5.4	Difratometria de raios-X (DRX)	137
5.5.5	Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)	138
5.5.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	139
6	PERSPECTIVAS.....	141
7	CONCLUSÕES	142
	REFERÊNCIAS.....	144
	APÊNDICE A – INTERMEDIÁRIOS OBTIDOS DA SÉRIE JR.....	153
	APÊNDICE B – DERIVADOS OBTIDOS DA SÉRIE AMTAC	154

APÊNDICE C – INTERMEDIÁRIOS OBTIDOS DA SÉRIE JM	156
APÊNDICE D – DERIVADOS DA SÉRIE ACMD.....	157
APÊNDICE E – ESPECTROS DE MASSAS DA SÉRIE AMTAC.....	158
APÊNDICE F – ESPECTROS DE MASSAS DA SÉRIE ACMD	162
APÊNDICE G – ESPECTROS DE IV DA SÉRIE AMTAC	164
APÊNDICE H – ESPECTROS DE IV DA SÉRIE ACMD	168
APÊNDICE I – ESPECTROS DE RMN ^1H DA SÉRIE AMTAC	169
APÊNDICE J – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DA SÉRIE AMTAC.....	173
APÊNDICE K – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SÉRIE ACMD	177
APÊNDICE L – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SÉRIE ACMD	179

1 INTRODUÇÃO

O câncer continua a crescer globalmente, exercendo enorme pressão emocional e financeira sobre os indivíduos, famílias, comunidades e sistemas de saúde. Muitos sistemas de saúde em países de baixa e média renda não estão preparados para lidar com esse fardo, e um grande número de pacientes com câncer em todo o mundo não têm acesso a diagnósticos e tratamentos de qualidade oportunos. Em países onde os sistemas de saúde são fortes, as taxas de sobrevivência de muitos tipos de câncer estão melhorando graças à detecção precoce acessível, tratamento de qualidade e cuidados de sobrevivência (FERLEY et. al., 2019; MS / INCA, 2020; WHO, 2020).

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, representando uma estimativa de 9,6 milhões de mortes, ou uma em cada seis mortes, em 2018. Os tipos mais comuns de câncer em homens são: pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado, enquanto câncer de mama, colorretal, pulmão, cervical e tireoide são os mais comuns entre as mulheres. A estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 para o Brasil, aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (MS / INCA, 2020; WHO, 2020).

Mesmo diante de uma gama de terapias atuais existentes, visando moléculas de sinalização envolvidas no processo de carcinogênese, a quimioterapia, ainda vem se destacando como uma das principais modalidades de tratamento do câncer (ALMEIDA et al., 2005; MS / INCA, 2020).

Independente do mecanismo de ação, o objetivo primário do tratamento quimioterápico é alcançar o maior nível de morte celular tumoral possível, preservando as células normais. Agentes antineoplásicos agem em nível celular, principalmente, naquelas em intenso processo de divisão mitótica, interferindo assim, no seu crescimento e proliferação. (MS / INCA, 2020; ALMEIDA et al., 2005)

Fármacos quimioterápicos apresentam diferentes mecanismos de ação. Dentre eles, cita-se o dano direto ao DNA e a condução à apoptose; inibição do processo mitótico; ação sobre microtúbulos; antibióticos antitumorais; ação de inibidores das topoisomerasas e outros antimetabólitos celulares (ALMEIDA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2015; 2016).

Dentre estes destacamos, os derivados de acridina que se apresentam como uma das opções de quimioterápicos por possuírem um núcleo privilegiado, o qual vem sendo investigado e utilizado para o tratamento do câncer por mais de um século. Esses derivados possuem atividade inibitória frente a enzimas reguladoras nucleares, como as topoisomerase, além de uma forte interação com pares de bases do DNA. Por isto, pesquisadores vêm buscando a descoberta de novos candidatos a fármacos intercaladores do DNA e um número expressivo de moléculas tem sido avaliado quanto às suas propriedades antitumorais e intercaladoras. (PATEL et al., 2010; BARROS et al., 2012; LAFAYETTE et al., 2013; GOUVEIA et al., 2018).

Uma das grandes limitações dos derivados acridínicos, além da sua toxicidade é o seu perfil farmacocinético, principalmente sua biodisponibilidade e atuação em tumores sólidos, o que nos impulsiona a descoberta de novas opções de tecnologia farmacêutica como, por exemplo, o uso das ciclodextrinas como incremento de solubilidade, com o intuito de melhorar a solubilidade e consequentemente a biodisponibilidade desses derivados (MELO et al., 2020).

Por ser um grande desafio no processo de desenvolvimento de novos compostos, a terapia oncológica passa por inúmeras etapas até a identificação rápida para que compostos *leads* se tornem eficazes. O uso de ferramentas como bancos de dados *in silico* disponíveis surge como alternativa aos *screenings* iniciais de novos derivados (LUCIANO et al., 2018; KOLB; IRWIN, 2009).

O processo de triagem de novos protótipos a fármacos pode ser facilitado através de estratégias que combinem essas ferramentas e evidenciem um delineamento entre características físico-químicas e biológicas para terapias alvo-dirigidas. Propriedades de afinidade eletrônica ao alvo tão somente não atribuem a uma molécula uma potencialidade de fármaco, é preciso aprofundar em características que envolvam sua farmacocinética, que relacionadas com propriedades da farmacodinâmica completam a ideia de um fármaco eficiente (LUCIANO et al., 2018; KOLB; IRWIN, 2009).

Em circunstâncias dos fatos citados acima, há uma grande necessidade pela busca contínua de novas moléculas aromáticas heterocíclicas que possuam afinidade com o DNA e suas enzimas reguladoras, baseada na necessidade de alternativas terapêuticas com maior eficácia e que sejam menos adversas para pacientes oncológicos, constituindo um novo arsenal no combate ao câncer. (LANG et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015, 2016).

O estudo de *docking* molecular foi realizado para se ter uma prévia de possíveis novos compostos que interajam por topoisomerase, já que o *docking* permite prever o comportamento de moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, também, elucidar as interações com as moléculas, permitindo a predição da conformação, posição, orientação do ligante dentro dos sítios e avaliação da afinidade de ligação. Prevendo inclusive quão bem um composto pode se ligar ao alvo, onde isso acontece, e que tipos de interações poderão formar no local de ligação (RODRIGUES et al., 2012; HASSAN et al., 2015).

Ademais, as técnicas de *docking* molecular permitem estimativas da energia livre de ligação entre o composto e a proteína, antes mesmo da síntese do determinado composto. Ainda, essa previsão diminui os custos, tendo em vista que os gastos computacionais com esses estudos são bem menores, quando comparados aos gastos laboratoriais. Fazendo assim, uma preleção dos compostos mais promissores e apresentariam uma boa interação com o sítio ativo do receptor (RODRIGUES et al., 2012; GOUVEIA et al., 2018).

Desse modo, levando-se em consideração a potencialidade de compostos com esse perfil químico e dando continuidade ao trabalho do nosso grupo de pesquisa (GOUVEIA, et al., 2018), esse trabalho propôs o desenvolvimento de duas séries de novos derivados espiro-acridínicos com potencial ação antitumoral. E para tanto, foi dividido em duas etapas: na primeira etapa foi realizado o estudo de *docking* molecular, síntese e caracterização dos novos derivados espiro-acridínicos, seguido da avaliação da citotoxicidade frente a linhagens tumorais e delineado seu perfil farmacocinético *in silico*. Na segunda etapa foi realizado o estudo tecnológico farmacêutico do AMTAC-02 já elucidado nos trabalhos de ALMEIDA e colaboradores (2015/ 2016) mostraram que essa molécula isolada possui tanto atividade anticancerígena (ALMEIDA et al., 2015; 2016), quanto para doenças negligenciadas (SERAFIM et al., 2018), partindo disso, foi utilizada a ferramenta de *docking* molecular e incremento de solubilidade através da complexação do AMTAC-02 com ciclodextrinas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e otimizar novos *scaffolds* espiro-acridínicos, como potencias antitumorais e incrementar sua solubilidade por meio de complexo de inclusão em ciclodextrinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar um *screening* virtual por meio de *docking* molecular dos novos derivados espiro-acridínicos mais promissores com os derivados em alvos já conhecidos com DNA e topoisomerases II α ;
- ✓ Promover a síntese química dos novos derivados espiro-acridínicos e caracterizar suas propriedades físico-químicas;
- ✓ Elucidar estruturalmente os derivados através de diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos derivados obtidos frente a diferentes linhagens de células tumorais;
- ✓ Delinear o perfil farmacocinético *in silico* dos derivados sintetizados;
- ✓ Incrementar a solubilidade através de formação de complexo de inclusão.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CÂNCER

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define câncer como um grande grupo de doenças que podem começar em quase todos os órgãos ou tecidos do corpo quando células anormais crescem incontrolavelmente, vão além de seus limites usuais para invadir partes adjacentes do corpo e / ou se espalhar para outros órgãos. Esse último processo é chamado de metástase e é uma das principais causas de morte por câncer. Nomes comuns são dados a essa enfermidade como neoplasia e tumor maligno (WHO, 2020).

O aparecimento do câncer está diretamente vinculado a uma multiplicidade de causas suficientes para constituírem uma causa necessária. Há diversas causas externas (meio ambiente) e internas (hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas). Os fatores podem interagir de diversas formas, dando início ao surgimento do câncer (FERLEY et. al., 2019; MS / INCA, 2020).

Os estímulos ambientais agem sobre genes especiais (proto-oncogenes), presentes em células normais, transformando-os em oncogênese – responsáveis pela malignização celular. Um exemplo dessa relação é entre o tabagismo e o câncer de pulmão. Já o processo da formação de neoplasia, dá-se o nome de carcinogênese, que abrange os estágios de iniciação, promoção e progressão (FERLEY et. al., 2019; MS / INCA, 2020).

O câncer foi a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por uma estimativa de 9,6 milhões de mortes, ou uma em cada seis mortes. Sua incidência varia entre homens e mulheres, sendo nos homens os cânceres de pulmão, próstata, colo-retal, estômago e fígado, como os tipos mais comuns, enquanto mama, câncer colorretal, pulmonar, cervical e tireóide são os mais comuns em mulheres (WHO, 2018; WHO, 2020).

Em 2018, uma estimativa mundial apontou que ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma). O mais incidente no mundo é o câncer de pulmão (2,1 milhões) seguido pelo de mama (2,0 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). Os tipos mais frequentes de câncer nos homens foram pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e

reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). Nas mulheres, foram câncer de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%) (BRAY et al., 2018).

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (MS / INCA, 2020).

A seguir está representada uma síntese das estimativas de incidência de novos casos de câncer para o ano 2020, onde estas podem ser observadas nas Tabelas 1, 2 e 3. As Figuras 1, 2 sintetizam a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 no Brasil e na Região Nordeste, por sexo, exceto pele não melanoma. A Figura 3 apresentam taxas brutas de incidência estimadas para 2020 por sexo, segundo Estado de Pernambuco e a capital Recife de acordo com dados do Ministério da Saúde e do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Vale salientar que essas estimativas estão de acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), já que para ela o câncer é um problema de saúde pública mundial, principalmente entre os países em desenvolvimento onde a população tem menos acesso a serviços de prevenção e tratamento ocasionando maiores índices. (WHO, 2018; MS / INCA, 2020).

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVAS DE NOVOS CASOS		
	HOMENS	MULHERES	TOTAL
PRÓSTATA	65.840	-	65.840
MAMA FEMININA	-	66.280	66.280
COLO DO ÚTERO	-	16.710	16.710
TRAQUEIA, BRÔNQUIO E PULMÃO	17.760	12.440	30.200
CÓLON E RETO	20.540	20.470	41.010
ESTÔMAGO	13.360	7.870	21.230
CAVIDADE ORAL	11.200	4.010	15.210
LARINGE	6.470	1.180	7.650
BEXIGA	7.590	3.050	9.480
ESÔFAGO	8.690	2.700	10.640
OVÁRIO	-	6.650	6.650

LINFOMA DE HODGKIN	1.590	1.050	2.640
LINFOMA NÃO HODGKIN	6.580	5.450	12.030
GLÂNDULA TIREOIDE	2.310	11.950	14.260
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	5.870	5.230	11.100
LEUCEMIAS	5.920	4.890	10.810
CORPO DO ÚTERO	-	6.540	6.540
PELE MELANOMA	2.200	4.250	6.450
OUTRAS LOCALIZAÇÕES	48.060	42.390	90.450
TODAS AS NEOPLASIAS, EXCETO PELE NÃO MELANOMA	225.980	223.110	449.090
PELE NÃO MELANOMA	83.770	93.160	176.930
TODAS AS NEOPLASIAS MALIGNAS	309.750	316.280	
TODAS AS NEOPLASIAS MALIGNAS CORRIGIDAS PARA SUB-REGISTRO	387.980	297.980	685.960

Fonte: Adaptado de MS / INCA 2020.

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Fonte: Adaptado de MS / INCA 2020.

Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVAS DE NOVOS CASOS		
	HOMENS	MULHERES	TOTAL
PRÓSTATA	20.570	-	20.570
MAMA FEMININA	-	13.190	13.190
COLO DO ÚTERO	-	5.250	5.250
TRAQUEIA, BRÔNQUIO E PULMÃO	3.120	2.640	5.760
CÓLON E RETO	2.540	3.220	5.760
ESTÔMAGO	3.000	2.090	5.090
CAVIDADE ORAL	2.180	1.120	3.300
LARINGE	1.420	310	1.730
BEXIGA	990	560	1.550
ESÔFAGO	1.580	680	2.260
OVÁRIO	-	1.690	1.690
LINFOMA DE HODGKIN	270	230	500
LINFOMA NÃO HODGKIN	1.120	990	2.110
GLÂNDULA TIREOIDE	250	2.360	2.610
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	1.340	1.250	2.590
LEUCEMIAS	1.430	1.210	2.640
CORPO DO ÚTERO	-	1.1520	1.520
PELE MELANOMA	440	560	1.000
OUTRAS LOCALIZAÇÕES	9.960	9.450	19.410
TODAS AS NEOPLASIAS, EXCETO PELE NÃO MELANOMA	50.510	48.320	98.830
PELE NÃO MELANOMA	18.630	18.750	37.380
TODAS AS NEOPLASIAS	69.140	67.070	136.210

Fonte: Adaptado de MS / INCA 2020.

Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 na Região Nordeste do país por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	20.570	40,7%	Homens	Mulheres	Mama feminina	13.190	27,3%
Traqueia, brônquio e pulmão	3.120	6,2%			Colo do útero	5.250	10,9%
Estômago	3.000	5,9%			Cólon e reto	3.220	6,7%
Cólon e reto	2.540	5,0%			Traqueia, brônquio e pulmão	2.640	5,5%
Cavidade Oral	2.180	4,3%			Glândula tireoide	2.360	4,9%
Esôfago	1.580	3,1%			Estômago	2.090	4,3%
Leucemias	1.430	2,8%			Ovário	1.690	3,5%
Laringe	1.420	2,8%			Corpo do útero	1.520	3,1%
Sistema nervoso central	1.340	2,7%			Sistema nervoso central	1.250	2,6%
Linfoma não Hodgkin	1.120	2,2%			Leucemias	1.210	2,5%

Fonte: Adaptado de MS / INCA 2020.

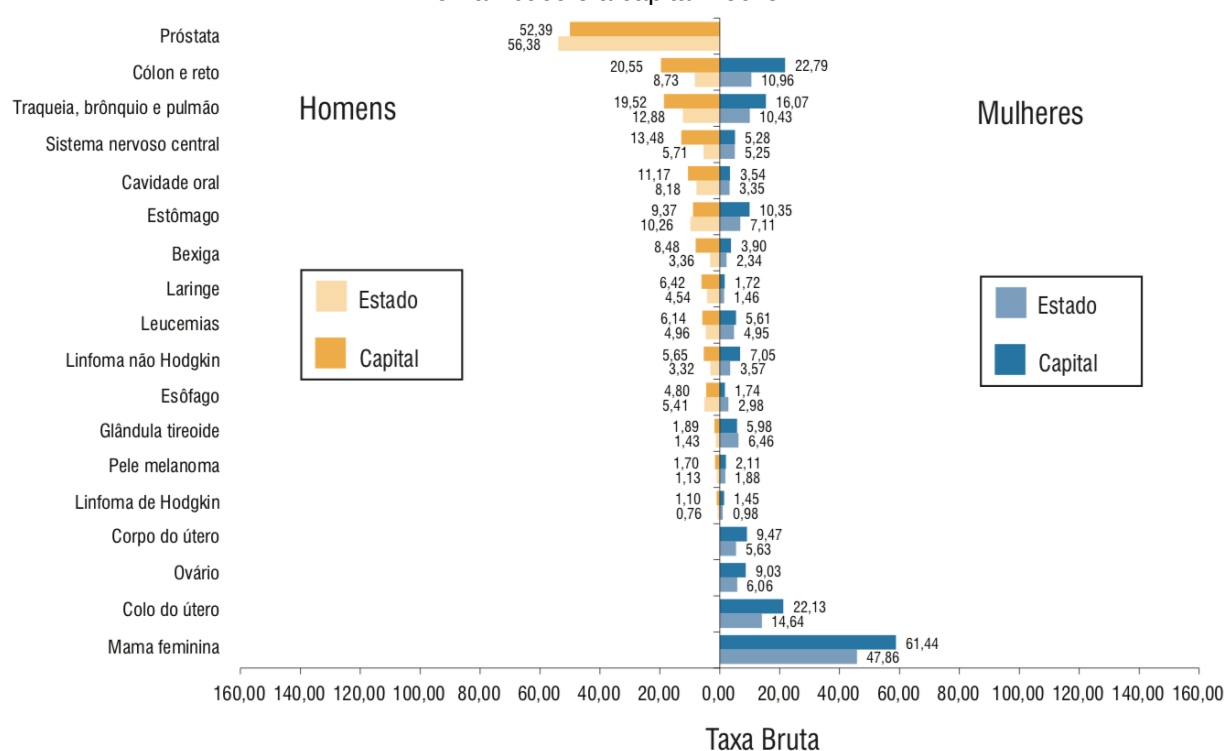
Tabela 3 – Estimativas para Pernambuco e Recife em 2020 das taxas brutas e ajustadas a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVAS DE NOVOS CASOS		
	HOMENS	MULHERES	TOTAL
PRÓSTATA	2.630	-	2.630
MAMA FEMININA	-	2.390	2.390
COLO DO ÚTERO	-	730	730
TRAQUEIA, BRÔNQUIO E PULMÃO	600	520	1.120
CÓLON E RETO	410	550	960
ESTÔMAGO	480	350	830
CAVIDADE ORAL	380	170	550
LARINGE	210	70	280
BEXIGA	160	120	280
ESÔFAGO	250	150	400
OVÁRIO	-	300	300
LINFOMA DE HODGKIN	40	50	90
LINFOMA NÃO HODGKIN	150	180	330
GLÂNDULA TIREOIDE	70	320	390
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	270	260	530
LEUCEMIAS	230	250	480
CORPO DO ÚTERO	-	280	280
PELE MELANOMA	50	90	140
OUTRAS LOCALIZAÇÕES	2.030	2.020	4.050

TODAS AS NEOPLASIAS, EXCETO PELE NÃO MELANOMA	7.960	8.800	16.760
PELE NÃO MELANOMA	3.630	2.140	5.770
TODAS AS NEOPLASIAS	11.590	10.940	22.530

Fonte: Adaptado de MS / INCA 2020.

Figura 3 – Taxas brutas de incidência estimadas para 2020 por sexo, segundo Estado de Pernambuco e a capital Recife.



Fonte: Adaptado de MS / INCA 2020.

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) que reafirma seu propósito de fortalecimento da vigilância do câncer oferecendo as estimativas para cada ano do triênio 2020-2022, com a certeza de que esta se constituirá em uma ferramenta a ser utilizada por gestores, profissionais da saúde e de áreas afins, bem como pela sociedade em geral, no apoio à implementação das ações de prevenção e controle de câncer.

3.2 TERAPIA ANTITUMORAL

É essencial para o tratamento adequado e eficaz do câncer um diagnóstico correto, já que todo tipo de câncer requer um regime de tratamento específico que engloba uma ou mais modalidades como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A determinação dos objetivos do tratamento e dos cuidados paliativos é um passo importante, e os serviços de saúde devem ser integrados e centrados nos pacientes. O objetivo principal é geralmente curar o câncer ou prolongar consideravelmente a vida. (WHO, 2018; MS / INCA, 2020).

A quimioterapia, para a maioria dos cânceres, quase sempre está presente no esquema terapêutico, alternando com doses de radioterapia, antes e após tratamento cirúrgico (GANDHI et al., 2015; SORENSEN et al., 2015), combinada com imunoterapia celular (CUI et al., 2015) ou anticorpos (YU et al., 2013) e alternada com terapia hormonal (SHIEN et al., 2014; SCHAEFER et al., 2016). Mesmo com esses avanços realizados no tratamento do câncer, ainda persistem efeitos colaterais nas células normais de crescimento rápido, como as do epitélio intestinal, folículos pilosos e as da medula óssea, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010).

Diversas terapias que visam moléculas de sinalização envolvidas no processo de carcinogênese foram desenvolvidas. Mas, a quimioterapia, mesmo com essa gama de alternativas terapêuticas oncológicas, ainda tem sido uma das principais modalidades de tratamento do câncer. (AGGARWAL, 2010; MASUI et al., 2013).

Dentre as opções de quimioterápicos, existem fármacos com diversos mecanismos de ação. Esses fármacos que compõem o arsenal terapêutico contra o câncer são divididos em ciclo-celular específicos (CCS, “*Cell Cycle-Specific*”) e ciclo-celular não específicos (CCNS, “*Cell Cycle-NonSpecific*”) (ALMEIDA et al., 2005).

O primeiro grupo atua sobre as células que se encontram no ciclo celular e dentre eles destacam-se: alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina), taxol (derivado da *Taxus brevifolia* e do *Taxus baccata*) e podofilotoxinas (extraídas da raiz do *Podophyllum peltatum*). Já o segundo, tem sua ação direcionada às células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo celular ou em repouso (fase G₀). Exemplos de CCNS são os antibióticos naturais, como as antraciclinas e

mitomicina e os complexos de coordenação de platina, que têm a cisplatina (*cis*-DDP) como exemplo (ALMEIDA et al., 2005).

Tais antineoplásicos, apresentam diferentes mecanismos de ação, por exemplo, causar dano direto ao DNA e condução à apoptose; inibição do processo mitótico; ação sobre microtúbulos; antibióticos antitumorais; ação inibidora da topoisomerase e outros antimetabólitos celulares e independente do mecanismo de ação, o objetivo primário do tratamento quimioterápico é alcançar o maior nível de morte celular tumoral possível, preservando células normais (MASUI et al., 2013).

Esses fármacos são classificados e divididos de acordo com suas classes químicas e mecanismos de ação, tais como: agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais e inibidores mitóticos (MASUI et al., 2013).

Os mais antigos e usados são os agentes alquilantes polifuncionais, devido a sua atividade através da interação com o DNA. Já os antimetabólitos inibem a biossíntese de moléculas essenciais para o processo de divisão celular. Antibióticos antitumorais, apesar de não atuar em ciclos celulares específicos, possuem atividade inibitória da síntese de proteínas e DNA. Os inibidores mitóticos impedem a migração dos cromossomos durante a metáfase exercendo sua função na proteína tubulina (proteína formadora dos microtúbulos e do fuso mitótico), (ALMEIDA et al. 2005; INCA / MS, 2018).

3.3 RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

Um dos principais obstáculos na terapia do câncer convencional é a resistência a múltiplas drogas (MDR, "*Multidrug Resistance*"). Ela é definida como a resistência apresentada pelas linhagens de células aos agentes quimioterápicos, provocando uma baixa concentração intracelular desses agentes (PALAKURTHI et al., 2012; MISRA et al.; 2014).

Progressos realizados para compreender os mecanismos de resistência como a descoberta de mutações, por exemplo, permitiram conhecer diversas possibilidades para superá-la e desenvolver novos fármacos antineoplásicos ao longo dos últimos anos (HU; ZHANG, 2016).

Os dois tipos de resistência a medicamentos antitumorais mais conhecidos são: resistência intrínseca, quando não há resposta mesmo no primeiro ciclo do

tratamento, e a resistência adquirida, quando surge no segundo ciclo (pós-terapia) (HUBER et al., 2010; MISRA et al.; 2014).

Como mencionado acima, a ocorrência de MDR pode ser atribuída a diversos tipos de mecanismos, tais como aberrações genéticas ou por alteração do influxo de drogas ou atividade de efluxo (PALAKURTHI et al., 2012; MISRA et al.; 2014), como por exemplo a expressão de Glicoproteína-P que é o mecanismo mais conhecido.

Essa proteína é codificada pelo gene MDR-1 e pertencente à superfamília de transportadores de membrana ABC (*ATP-binding cassette*), cujo mecanismo de transporte é ATP-dependente (SHEKARI et al., 2015). Ela proporciona o conhecimento dos agentes quimioterápicos e os transporta para fora da célula por meio de bombas de efluxo, reduzindo a absorção, ocasionando o uso excessivo de doses para aniquilar células tumorais, induzindo efeitos secundários adversos em tecidos normais (HUBER et al., 2010; SU et al.; 2014).

Nesse contexto, a busca por novas moléculas, como por exemplo aromáticas heterocíclicas, que possuam afinidade com o DNA e suas enzimas reguladoras é contínua, e baseada na necessidade de alternativas terapêuticas com maior eficácia, e que sejam menos adversas para os pacientes oncológicos, constituindo um novo arsenal no combate ao câncer (LANG et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015).

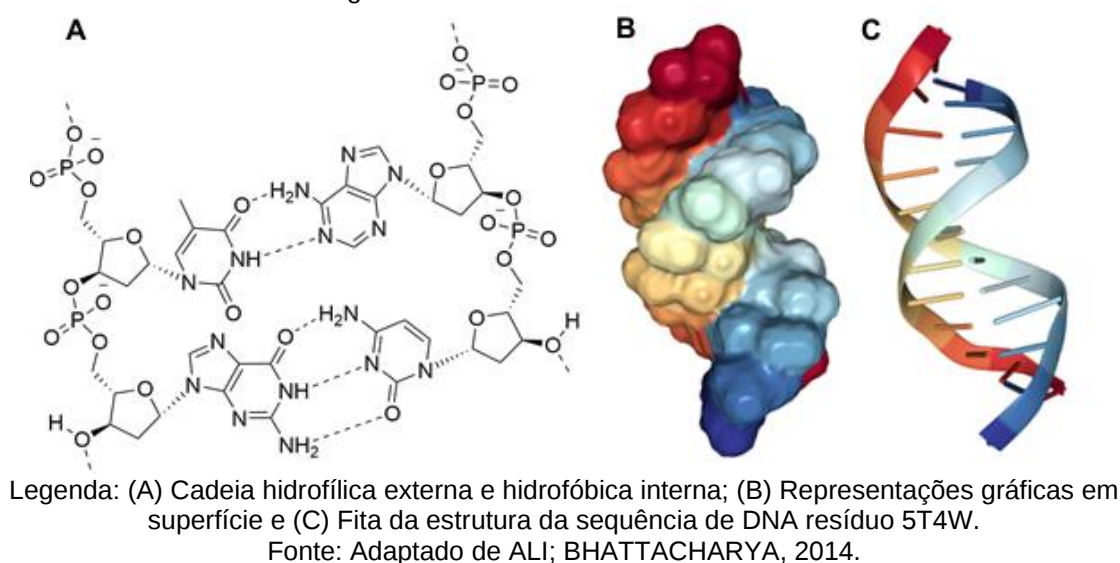
3.4 DNA E TOPOISOMERASES COM POSSÍVEIS ALVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTITUMORAIS

Descoberto em 1868 pelo suíço Dr. Friedrich Miescher, o ácido desoxirribonucleico (ADN) ou, como é mais conhecido por sua sigla em inglês, DNA, é a macromolécula responsável pelo armazenamento de toda a informação genética do organismo vivo e pela transmissão dos caracteres através das gerações, porém sua estrutura só foi elucidada em 1952 por Francis Crick e James Watson, o que levou ao conhecimento atual de que o DNA contém a informação genética e as características e funções de cada célula. Os estudos sugeriram uma estrutura formada por duas cadeias helicoidais entrelaçadas sobre o mesmo eixo, formando a dupla hélice de DNA (CRICK; WATSON et al., 1953; DAHM et al., 2008; LIU et al., 2015).

O DNA é um composto orgânico constituído de dupla hélice formada por duas cadeias antiparalelas complementares contendo fosfato de açúcar e bases nitrogenadas, ligadas entre si por ligações de hidrogênio, as quais estabilizam sua

estrutura. O enrolamento dessas duas cadeias forma sulcos maiores e menores proporcionando suporte para o reconhecimento de proteínas e uma região que favorece a ligação de moléculas pequenas (ALI; BHATTACHARYA, 2014). A complexidade da sua estrutura pode ser vista na Figura 4, onde observamos que essa estrutura é mantida por interações π - π (pi-pi) entre os anéis das bases nitrogenadas, ligações de hidrogênio e atração eletrostática entre os cátions em solução e o caráter aniônico da cadeia pentose-fosfato.

Figura 4 – Recorte da estrutura do DNA.



De fundamental importância para a estabilidade e manutenção dos organismos vivos, a transmissão da informação genética depende da preservação e correta duplicação do DNA. Danos causados ao genoma podem gerar erros na sequência específica dessa molécula durante o processo de transcrição e replicação do DNA, esses erros podem ser copiados, levando a mutações na estrutura da dupla-hélice (BERNSTEIN et. al., 2013).

Efeitos maléficos ao organismo são gerados por estas mutações, como doenças graves como o câncer, envelhecimento e morte celular. O uso de pequenas moléculas (fármacos) que tem a capacidade de interagir e promover a fragmentação do DNA tem como objetivo remediar esse efeito, ao causar a morte celular programada (apoptose) e evitar a propagação dessas mutações (BERNSTEIN et. al., 2013).

Na literatura, o DNA vem sendo reportado como um dos principais alvos biológicos para novos agentes quimioterápicos, onde estes, por meio de interações

com essa biomolécula, podem provocar a parada do ciclo celular e induzir a apoptose (LANG et al.; 2013; ZHAO et al., 2013; OLSZEWSKA et al., 2014).

A complexidade da estrutura do DNA permite que ligantes atuem de diversas maneiras, e pode ter como objetivo não apenas o uso como alvo de fármacos antitumorais e modeladores genéticos, mas também para estudos de marcadores por meio de fluorescência, reforçando assim a sua importância (LAH et al., 2008).

A complexação dos ligantes que tem como alvo a molécula do DNA pode ocorrer por alguns mecanismos de interação entre o ligante e a macromolécula. Um desses mecanismos de interação mais conhecido de fármacos antitumorais é a alquilação de nucleófilos na dupla hélice (BARRA, et al. 2015).

Agentes alquilantes mais efetivos são capazes de promover a formação de carbocátions que se ligam covalentemente com os sítios ricos em elétrons do DNA. Essa ligação inibe a transcrição e replicação do DNA, levando a fragmentação deste ácido nucleico e morte celular (BARRA, et al. 2015). Um importante exemplo de agente antitumoral que forma ligações covalentes com o DNA é a cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II), $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), que forma uma ligação estável entre duas bases nitrogenadas adjacentes após sofrer hidrólise, trocando seus grupos abandonadores (Cl) por moléculas de água (LAH, et al., 2008; SHENG, et al., 2013).

Um dos tipos de interação mais comum entre compostos químicos e o DNA é a intercalação (GOUVEIA et al., 2018). Dentre eles, destacamos os compostos planares que são capazes de se inserir entre os pares de bases nitrogenadas, formando complexos relativamente estáveis. Nesse caso não há a formação de ligações covalentes, mas as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio são muito fortes e capazes de induzir mudanças na estrutura levando à um desenovelamento da dupla hélice e alongamento do DNA, interrompendo suas funções.

Bons intercaladores possuem tanto uma estrutura planar capaz de se inserir entre as bases nitrogenadas quanto grupos básicos, catiônicos ou eletrofílicos (SYNDER et al., 2007), como por exemplo, a Doxorubicina, adriamicina (THORN, et al., 2011) e a amsacrina (JENSEN, et al., 1985) que são bem conhecidos como fármacos antitumorais intercaladores.

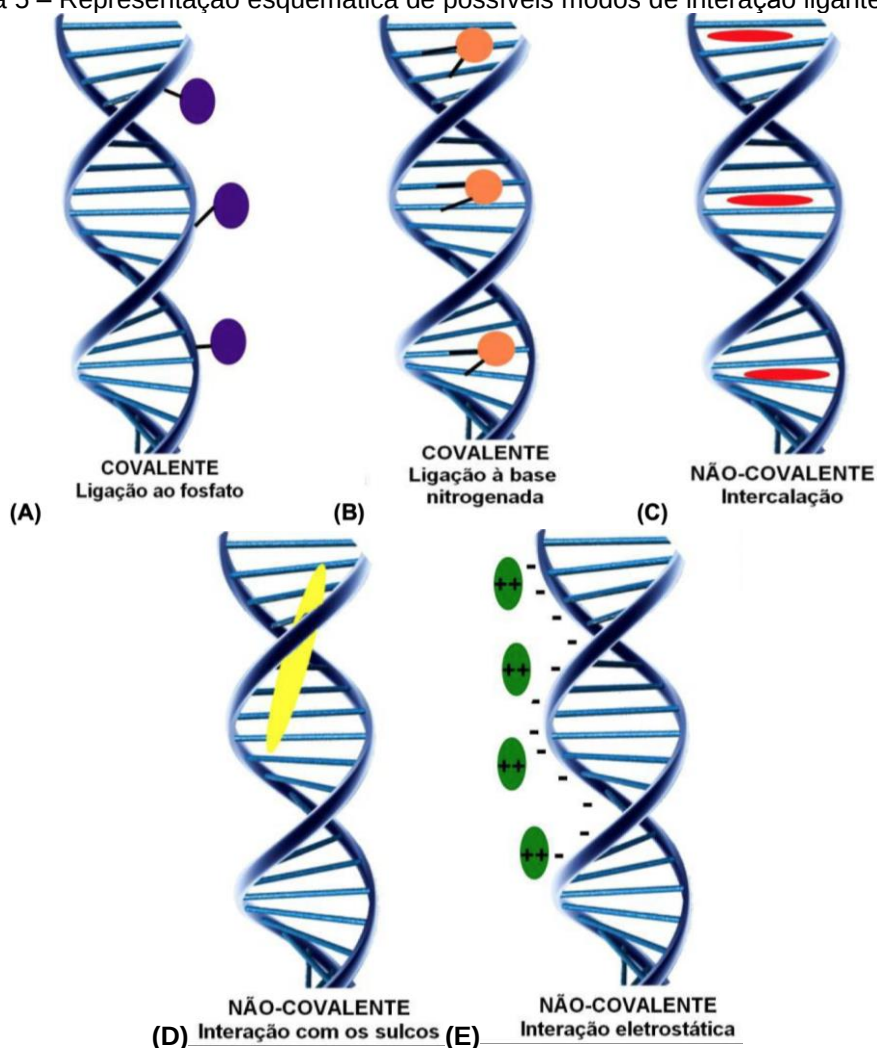
Estudos realizados com intercaladores são extensos, porém o grande problema da aplicação de intercaladores ocorre devido a sua baixa especificidade, resultando em uma alta toxicidade para células normais proliferativas (TSE et al., 2004).

Ademais, algumas moléculas orgânicas também têm a capacidade de se ligar ao DNA pelas fendas desta macromolécula. Ligantes de fenda menor são geralmente ligantes orgânicos heterociclos e modificam pouco a estrutura do DNA, podendo levar a uma compactação da molécula (MIZUTA et al., 2018; HAJIAN et al., 2017).

Esses ligantes oferecem maior seletividade na inibição de uma expressão genética específica, portanto são as moléculas que tem o maior potencial de seletividade no tratamento de doenças quando o alvo é o DNA (LAH, et al., 2007).

A interação de ligantes pequenos com a fenda menor ocorre, pois, estes ligantes geralmente se encaixam perfeitamente na estrutura e formam extensivas ligações de van der Waals e ligações de hidrogênio (DOLENC et al., 2006; SHENG et al., 2013). A Figura 5 ilustra esquematicamente os tipos de interações citados anteriormente.

Figura 5 – Representação esquemática de possíveis modos de interação ligante-DNA.



Fonte: Adaptado de BARRA et al., 2015.

Derivados acridínicos têm sua atividade biológica atrelada ao fato de que elas são estruturas aromáticas planares. Sua capacidade de ligar ao DNA vem direcionando as pesquisas em drogas antitumorais para a elucidação do mecanismo de ação das acridinas, onde podemos destacar alguns dos seus alvos biológicos como: as topoisomerasas I e/ou II, a telomerase e telômeros / proteínas quinases (JANOVEC et al., 2011; BARROS et al., 2012; OLSZEWSKA et al., 2014).

Além disso, esses derivados suprimem a atividade das topoisomerasas I e II que são enzimas ubíquas responsáveis pelo enovelamento e desenovelamento do DNA, além de controlar a proliferação celular, a sobrevivência e a apoptose (LI et al., 2014; OLSZEWSKA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2015). As topoisomerasas I e II conduzem uma quebra transitória nas fitas de DNA o que causa alteração na sua topologia. Enquanto a topoisomerase I quebra apenas uma fita do DNA, a topoisomerase II quebra as duas (NELSON; COX, 2006).

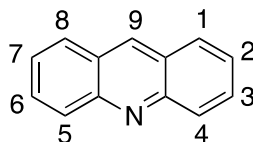
Vale salientar que a topoisomerase II possui duas isoformas. A primeira isoforma é a topoisomerase II α . Ela é essencial para a realização de mitose e é uma enzima expressa preferencialmente em células em proliferação. Já a segunda isoforma é a topoisomerase II β . Enzima necessária para o desenvolvimento normal, mas não essencial para a proliferação celular e expressa em todas as células (NITISS, 2009; ALMEIDA et al., 2016). É importante que a enzima topoisomerase II α esteja presente como alvo terapêutico na terapia anticâncer, visto que as células tumorais estão em intensa proliferação, o que tem levado essa enzima a ser um dos alvos potenciais para o desenvolvimento de novos agentes que atuem especificamente na célula tumoral.

3.5 ACRIDINA E DERIVADOS ACRIDÍNICOS

Amplamente estudados como antimaláricos, antiprotozoários, antibacterianos e antitumorais, acridina e seus derivados são agentes quimioterápicos conhecidos como sondas de ácidos nucleicos, relevantes no desenvolvimento de novos agentes biológicos (GHOSH et al., 2010). Uma das principais características desses derivados é sua apresentação como moléculas aromáticas policíclicas planares (Figura 6) que se ligam firmemente, mas de forma não covalente e reversível ao DNA (FERGUSON; DENNY, 2007). A depender da função do substituinte inserido, os derivados acridínicos antitumorais se comportam como agentes intercalantes do DNA, como

inibidores específicos da topoisomerase I e/ou II e ainda inibidores da telomerase (BELMONT et al., 2007).

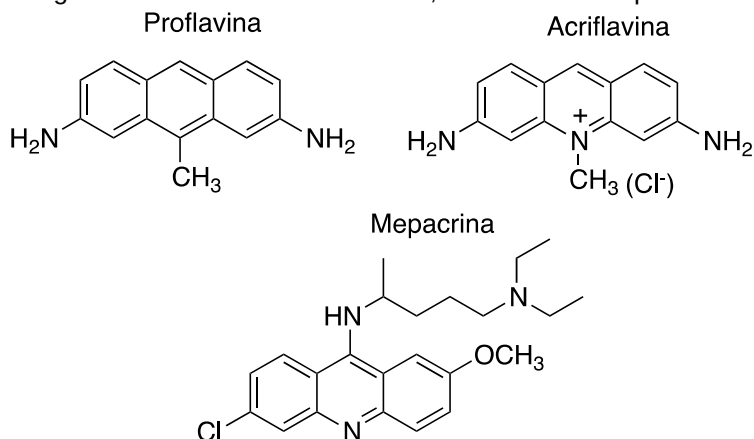
Figura 6 – Estrutura básica da acridina.



Fonte: Elaborado pelo autor

Descoberta na Alemanha em 1870, por Graebe e Caro, em frações do alcatrão, o núcleo acridina e seus derivados têm sido alvo de estudos devido a versatilidade da sua síntese e aplicações (SCHMIDT; LIU, 2015). Inicialmente, a acridina foi utilizada como corante, mas seu uso clínico tornou-se promissor em 1913, quando foi utilizada na clínica médica como antibacteriano, através da proflavina e acriflavina (Figura 7) descoberta por Browning (ALBERT, 1966); e a partir de 1940, a mepacrina vêm sendo utilizada no tratamento do câncer e como antimalárico (GREENWOOD, 1995).

Figura 7 – Estrutura da Proflavina, Acriflavina e Mepacrina.



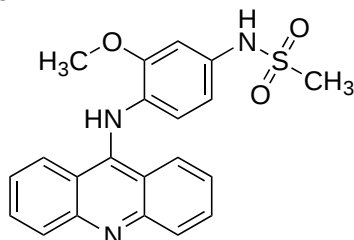
Fonte: Adaptado de ALBERT, 1966; GREENWOOD, 1995.

Sua aplicação na clínica antitumoral aconteceu apenas em 1976 com a inserção da amsacrina (m-AMSA), que foi um dos primeiros derivados acridínicos a apresentar atividade intercalante de DNA e considerada como inibidora de topoisomerase II (Figura 8) (BARROS et al., 2012; BARROS et al., 2013; KUMAR et al., 2013).

Há uma busca constante por modificações químicas neste composto protótipo para melhorias na terapia do câncer devido a problemas como efeitos secundários:

resistência a medicamentos, biodisponibilidade reduzida e associação com a produção de radicais livre e seu metabolismo o que pode causar aos tecidos normais sérios danos (BARROS et al., 2013; LANG et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

Figura 8 – Estrutura da Amsacrina.



Fonte: Adaptado de BARROS et al., 2013.

A partir de então muita atenção foi dada a esses derivados o que vem impulsionando estudos de planejamento e síntese dos mesmos até os dias atuais.

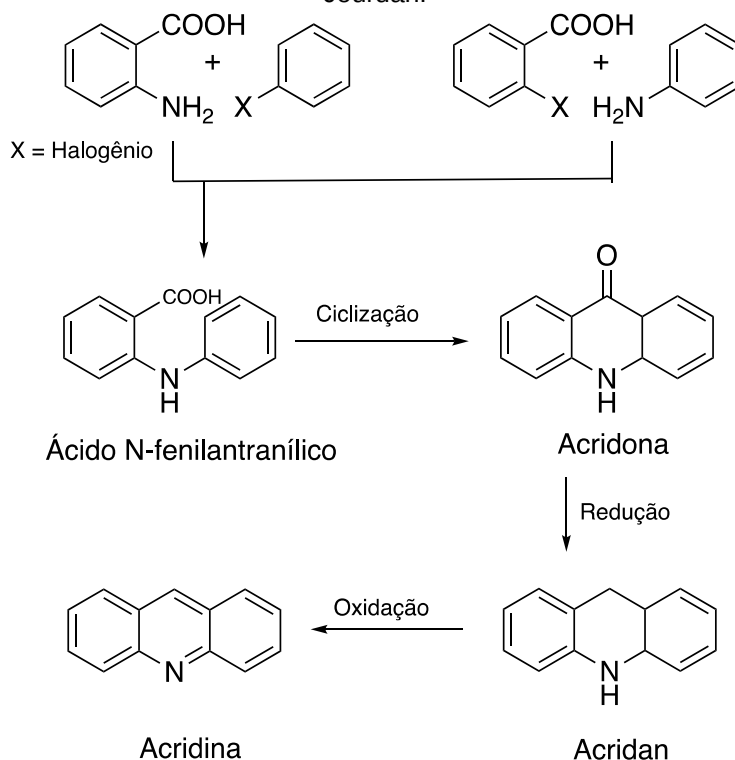
3.6 MECANISMOS DE SÍNTESE PARA OBTENÇÃO DO ANEL ACRIDÍNICO E SUAS MODIFICAÇÕES

Quimicamente a acridina pode ser modificada, seja por introdução de substituintes, ou por adição de anéis heterocíclicos, conduzindo a derivados acridínicos distintos com diferentes atividades biológicas no combate a vários tipos de doenças e com uma melhor relação estrutura-atividade com o receptor molecular desejado (BARROS et al., 2012; KALIRAJAN et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015; GAO et al., 2015).

Três níveis de oxidação podem ser apresentados: acridona, acridan e acridina (Esquema 1). A obtenção desse anel no nível de oxidação acridina geralmente procede do seu correspondente acridona, devido à facilidade da formação do anel a partir da ciclização da difenilamina-2-ácido carboxílico com ácido fortes, reação proposta por Ullman-Jourdan (ALBERT, 1966) observada no (Esquema 1) onde duas etapas de transformação da acridona para acridina são mostradas.

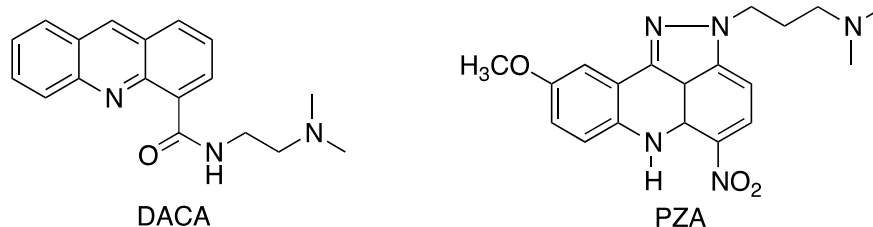
Primeiro na presença de agentes redutores (amálgama de sódio, alumínio e amálgama de mercúrio) e em seguida, em meio oxidativo (ácido nítrico, ácido clorídrico). Logo abaixo desse esquema (Figura 9) temos dois exemplos de derivados obtidos por essa metodologia: o DACA (*N*-(2- (dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida) (ANTONINI, 2004) e o PZA (pirazolacridinas) (MAGNANO et al., 2004).

Esquema 1 – Reação de obtenção do anel acridina via formação de acridona pela reação de Ullman-Jourdan.



Fonte: Adaptado de ALBERT, 1966.

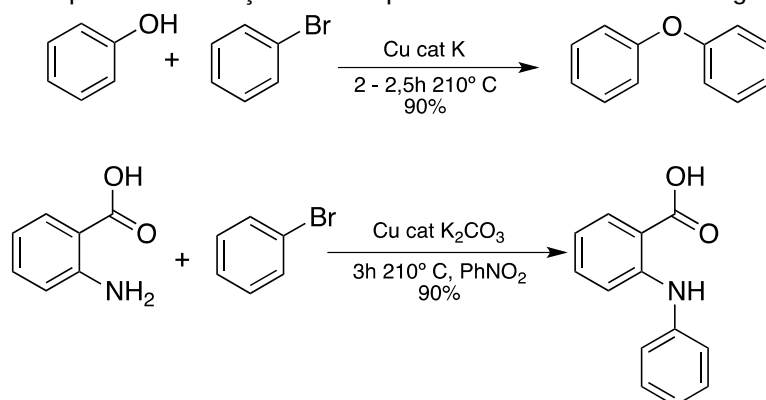
Figura 9 – Estruturas químicas dos derivados DACA e PZA.



Fonte: Adaptado de ANTONINI, 2004; MAGNANO et al., 2004.

Ademais, a literatura também ressalta no trabalho de Kunz e colaboradores (2003) as reações de Ullman como um dos métodos principais para obtenção dos intermediários dos núcleos acridina. Esta reação consiste basicamente em um acoplamento catalisado por cobre de haletos de arila com álcool ou amina para a síntese de aril-éter ou arilaminas (Esquema 2).

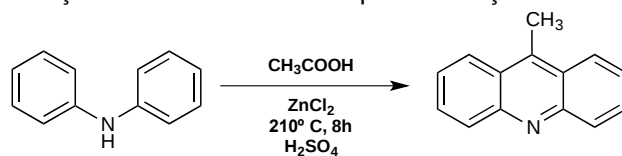
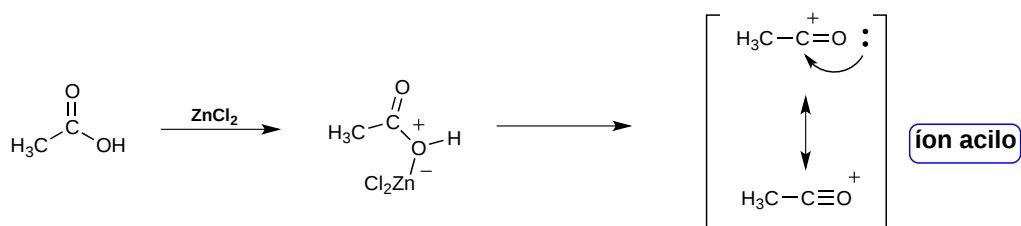
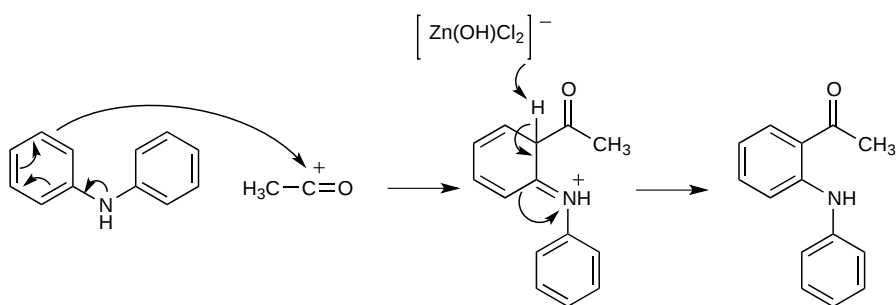
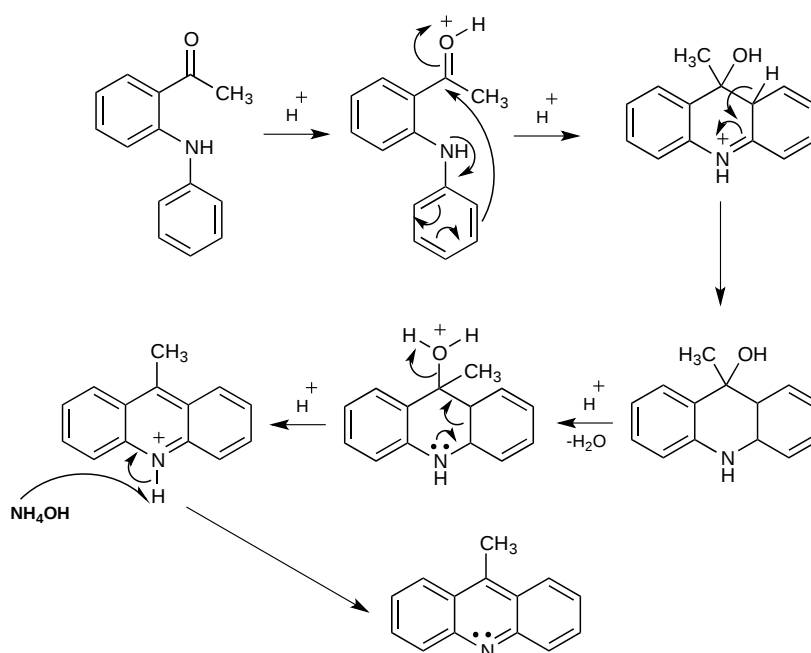
Esquema 2 – Reações de acoplamento de Ullman e Golberg.



Fonte: Adaptado de KUNZ et al., 2003.

Na sequência (Esquema 3) Donald e colaboradores (2010) mostram a síntese global da metilacridina via reação de Bernthsen. A síntese ocorre em três etapas: (i) a reação se inicia com o ácido acético sendo ionizado pelo cloreto de zinco, levando a formação de um intermediário, o íon acílo, na etapa seguinte (ii) ocorre uma acilação de Friedel-Crafts com a difenilamina onde o cátion formado anteriormente formado é atraído pela alta densidade de elétrons do anel aromático quando o nitrogênio coloca seu par de elétrons livres na ressonância aromática, e na etapa posterior (iii) ocorre a ciclização pela presença do ácido sulfúrico que protona a hidroxila. Exemplos de trabalhos que utilizaram essa reação para formação inicial do anel acridina são Moura (2009), Barros et al. (2012), Lafayette et al. (2013) e Almeida et al. (2015); Gouveia (2018) e Silva (2020).

Esquema 3 – Reação Global e Mecanismo para obtenção do AC-01 via reação de Bernthsen.

**1ª Etapa: Formação do íon acilo****2ª Etapa: Acilação da difenilamina****3ª Etapa: Ciclização**

Fonte: Adaptado de DONALD, et al., 2010.

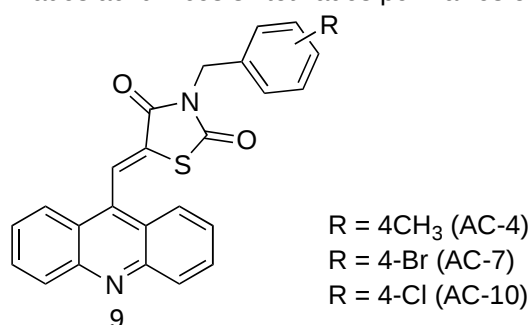
Vale salientar que essas sínteses devidas as suas condições reacionais e a utilização de solventes altamente tóxicos e elevadas temperaturas exigem bastante atenção e cuidado para a obtenção dos derivados acridínicos.

3.7 DERIVADOS ACRIDÍNICOS X TERAPIA DO CÂNCER

Tanto seus derivados quanto a acridina, apresentam em seu núcleo uma excelente reatividade. Diversas publicações têm sido relatadas anualmente, exibindo sínteses de compostos com substituições na posição 9 do anel acridínico (posição *para*-nitrogênio). Isso está atrelado ao fato de que essa região seja a mais disponível para ataques nucleofílicos (SCHMIDT; LIU, 2015), mas outros trabalhos com síntese de derivados acridínicos substituídos em outras posições também têm sido investigados.

Derivados tiazoacridínicos foram demonstrados no trabalho de Barros e colaboradores (2013), com excelentes resultados frente a inibição da topoisomerase I e também se mostrou promissor como droga anticâncer (Figura 10). Eles realizaram a citotoxicidade de três derivados acridínicos frente as células de carcinoma do cólon humano (HCT-8). Após 12 horas, as porcentagens de células na fase G₂/M foram de 19,7 % (AC-4), 19,2 % (AC-7) e 19,9 % (AC-10), e apresentaram redução na quantidade destas células passadas 24 horas.

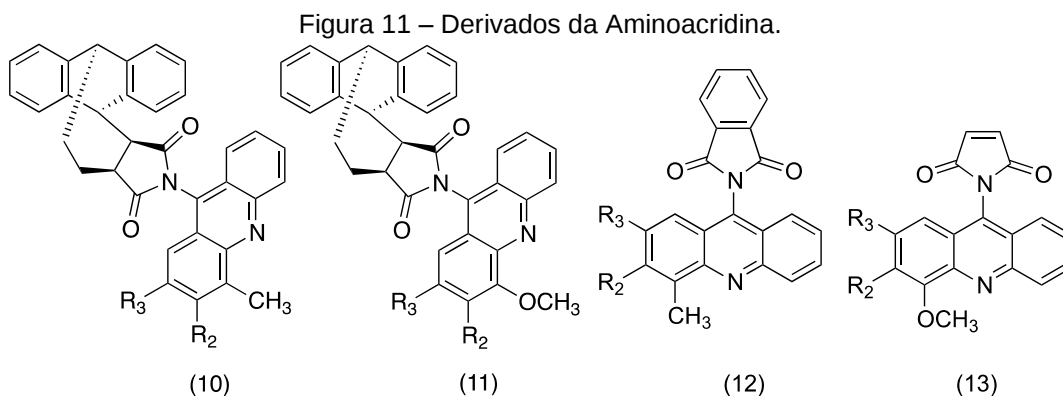
Figura 10 – Derivados acridínicos sintetizados por Barros e colaboradores.



Fonte: Adaptado de BARROS et al., 2013.

Buscando novos derivados acridínicos mais potentes, Arya et al. (2014) também sintetizaram uma nova série de compostos derivados de 9-aminoacridina (Figura 11). Eles fizeram uso da condensação com diidroantraceno. Os derivados obtidos foram avaliados quanto à atividade anticancerígena *in vitro* contra linhagens de células de câncer de mama, pulmão, colón, ovário e fígado e os melhores valores

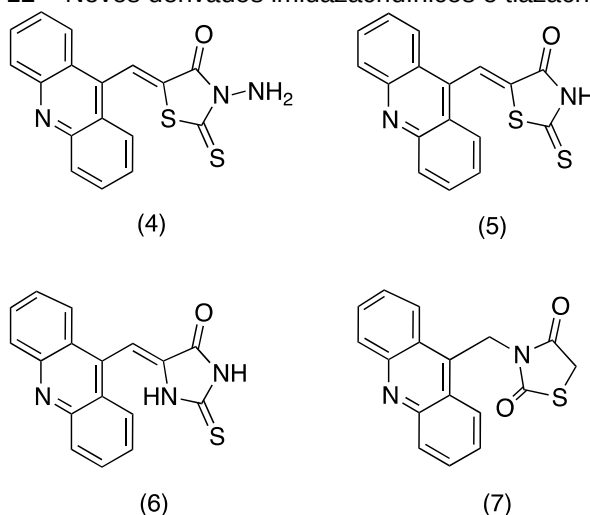
de C150 foram mostrados pelos derivados: 10 (5,4 μM), 11 (4,2 μM), 12 (4,5 μM) e 13 (2,4 μM), apresentando boa atividade anticancerígena.



Fonte: Adaptado de ARYA et al., 2014.

A avaliação do nosso grupo de pesquisa no trabalho de Lafayette et al. (2013) foi das propriedades de ligação de derivados imidazacridínicos e tiazacridínicos ao DNA (Figura 12). Neste estudo, ficou compreendido o mecanismo de ligação das moléculas ao DNA através das técnicas de absorção eletrônica, fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular. Realizou-se também a análise de intercalação e se observou que os derivados 4 ($K_b = 1,46 \times 10^4$), 5 ($K_b = 2,37 \times 10^4$) e 6 ($K_b = 3,25 \times 10^4$) forneceram uma visão sobre o mecanismo de ligação ao DNA com esses derivados, sugerindo tanto intercalação e ligação externa. Esses derivados ainda demonstraram atividade inibitória para topoisomerase I humana, com exceção do derivado 5-acridin-9-ilmetilideno-2-tioxo-1,3-tiazolidin-4-ona (5).

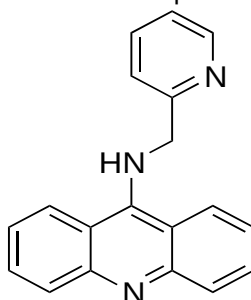
Figura 12 – Novos derivados imidazacridínicos e tiazacridínicos.



Fonte: Lafayette e colaboradores (2013).

Li et al. (2014) sintetizaram uma outra série de derivados acridínicos avaliando a atividade antiproliferativa contra as células K562 (Leucemia) e células HepG-2 (câncer de fígado), onde o derivado N-2-metilpiridina-9-aminoacridina (Figura 13) com o grupo piridin-2-il-metanamino substituído na posição C-9 apresentou boa atividade antitumoral contra as linhagens celulares avaliadas. Foi constatado através dos espectros de absorção de UV-vis e de emissão de fluorescência que o composto citado pode interagir com o DNA, provocando uma distorção estrutural. Também foi avaliada a inibição da topoisomerase I de DNA mediada por relaxamento do plasmídeo pBR322 de DNA, onde o mesmo, exibiu atividade inibitória de 1 μ M, ao mesmo tempo que possuiu atividades indetectáveis a 0,5 μ M, em conformidade com sua atividade antiproliferativa.

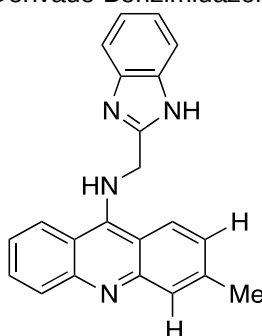
Figura 13 – Composto N-2-metilpiridina-9-aminoacridina.



Fonte: Adaptado de LI et al., 2014.

Novos derivados acridínicos com atividade anticâncer foram apresentados no trabalho de Gao et al. (2015), onde eles sintetizaram uma série de novos compostos benzimidazólicos. O ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio e de brometo de tetrazólio) indicou que a maioria dos compostos sintetizados apresentaram boa atividade antiproliferativa, tendo maior destaque o derivado 25 (Figura 14) que apresentou atividade contra as células K562 (leucemia) e HepG-2 (câncer de fígado) e ainda se ligava ao DNA, por inibição a topoisomerase I, além de induzir a apoptose em linhagens de células K562. Os resultados sugerem que o mesmo, apresenta forte potencial como novo agente antitumoral e indutor de apoptose.

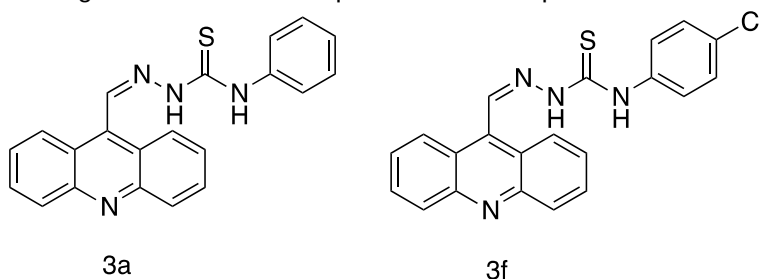
Figura 14 – Derivado Benzimidazólico-acridínico.



Fonte: Adaptado de GAO et al., 2015.

Nos estudos do nosso grupo de pesquisa, Almeida et al. (2015), foi utilizado o núcleo acridina como farmacóforo e modificações estruturais foram realizadas através da adição de diferentes porções de tiossemicarbazida substituído. No total, oito novos compostos foram sintetizados e as propriedades de ligação de DNA e atividades antiproliferativas foram avaliadas. O composto mais eficaz na ligação a ctDNA *in vitro* ($K_b = 1,0 \times 10^6$) foi o (Z)-2-(acridin-9-il-metileno)-N-(4-clorofenil)hidrazinacarbotioamida (3f), enquanto que o composto mais ativo no ensaio de atividade antiproliferativa (GI50 menor do que 10 μ M para todas as linhas de células de tumor) foi o (Z)- 2-(acridin-9-il-metileno) -N-fenilhidrazinacarbotioamida (3a) (Figura 15).

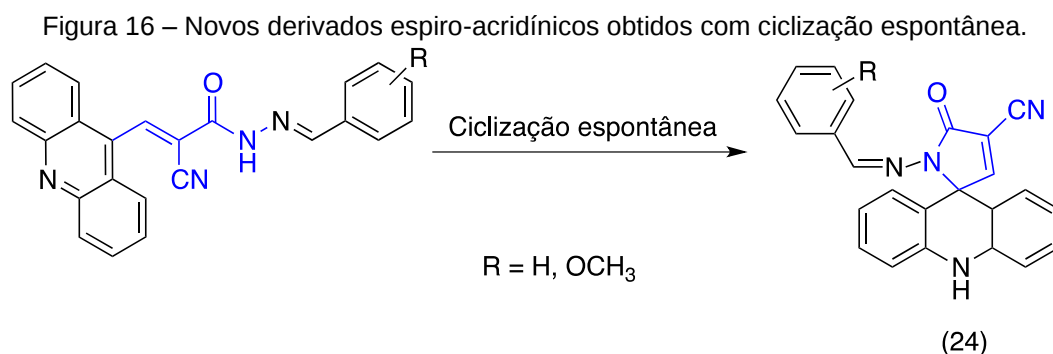
Figura 15 – Estruturas químicas dos compostos 3a e 3f.



Fonte: ALMEIDA et al., 2015.

De acordo com alguns trabalhos, a literatura tem reportado sobre a reatividade do anel acridina na posição do carbono 9, onde neste há uma ocorrência de ciclização espontânea dos compostos. A exemplo disso temos o trabalho de Vilkova e colaboradores (2014), que sintetizaram uma série de compostos espiro-acridínicos por ciclização espontânea. Os pesquisadores destacaram uma susceptibilidade particular no carbono 9 do núcleo acridina em sofrer um ataque nucleofílico intramolecular e, subsequentemente, a formação de um anel espiro de cinco membros ligado a acridina.

Em outro trabalho advindo do nosso grupo de pesquisa também de Almeida e colaboradores (2016), foram sintetizadas duas novas espiro-acridinas através da introdução de 2-ciano-N-acilidrazona entre os anéis fenil e a acridina, seguido por ciclização espontânea confirmado por meio de técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C bidimensionais, das quais o derivado 24 obteve maior destaque (Figura 16). Neste mesmo estudo foi avaliada as interações das moléculas com DNA, onde tanto o AMTAC-01 quanto o AMTAC-02 apresentaram capacidade para se ligar ao DNA, demonstrando uma constante de ligação, determinada por espectroscopia UV-vis, de 104 M^{-1} . Nos ensaios antiproliferativos o AMTAC-01 e AMTAC-02 foram mais ativos contra linhas de células tumorais da próstata e melanoma, respectivamente. E em relação a inibição das enzimas topoisomerases I e II α os compostos não apresentaram atividade inibidora de topoisomerase I, porém, ambos os derivados exibiram inibição da topoisomerase II α proporcionando uma atividade comparável a Amsacrina na dose de $100 \mu\text{M}$.

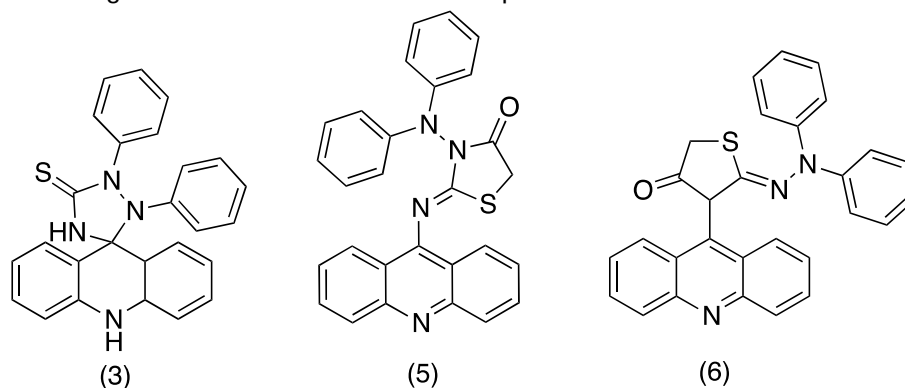


Fonte: ALMEIDA et al. 2016.

Ainda no mesmo ano, estudos de Salem et al. (2016) sintetizaram três novos derivados espiro-triazolidina (3) e tiazolidinona-acridinas (5 e 6) difenil substituídos (Figura 17) e avaliaram sua interação com DNA através de técnicas de UV-vis, fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular e viscosidade. Os derivados foram agentes eficazes em interagir com DNA de acordo com o que foi estimado pela constante de ligação K_b em $0,34$ a $0,93 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Também foi avaliada a inibição das topoisomerase I e II, onde os compostos inibiram ambas. Ainda neste mesmo estudo, a atividade biológica dos compostos 3, 5 e 6 em diferentes concentrações (10 , 20 e $50 \mu\text{M}$) foi avaliada frente a células HL-60. Os resultados foram analisados por meio de diversas técnicas diferentes de detecção (MMP, alterações na atividade metabólica/ viabilidade e a análise da distribuição do ciclo celular), onde o derivado 5

demonstrou forte efeito sobre a fisiologia mitocondrial. Já na análise de viabilidade celular os derivados 3 e 6 foram menos eficazes do que o 5.

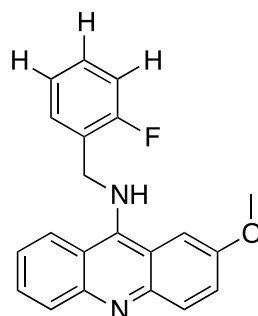
Figura 17 – Derivados sintetizados por SALEM e colaboradores.



Fonte: SALEM et al., 2016.

Continuando estudos na busca de novos agentes anticâncer, Zhang et al. (2016) sintetizou uma série de derivados 9-benzilamino-acridina. Esses derivados apresentaram atividade antiproliferativa com valores de CI₅₀ menores que 10 µM. A avaliação desses derivados foi realizada quanto aos seus efeitos inibidores de topoisomerase I e II, exibindo excelentes resultados. O derivado 26 (Figura 18) se mostrou eficiente contra linhagens de células cancerígenas A549 (câncer de pulmão). Além disso, o mesmo derivado induziu apoptose para as mesmas células. O estudo demonstrou que o derivado de 9-benzilamina acridina se apresentou como um potente agente antitumoral.

Figura 18 – Derivado 9-benzilamino-acridina.

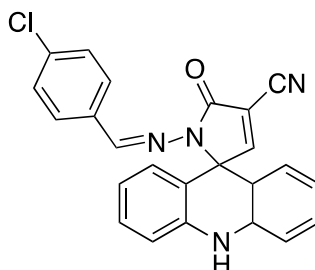


Fonte: Adaptado de ZANG et al., 2016.

Em 2018, Gouveia e colaboradores, sintetizaram nove novas espiro-acridinas baseado no trabalho de Almeida e colaboradores (2016). Os compostos foram testados quanto à sua interação BSA e DNA *in vitro*, além da atividade de inibição da

topoisomerase. Todos os compostos interagiram com BSA, o que foi demonstrado pela constante de supressão de fluorescência de 104 M^{-1} . Dentre os compostos testados o 1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5',9a,10-tetrahidro-4aH-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06) (Figura 19) com cloro na posição para no anel fenil apresentou inibição topoisomerase II de 84,34% em comparação com os controles positivos utilizados. Estudos de *docking* indicaram que o AMTAC-06 foi capaz de intercalar os pares de bases de DNA no sítio ativo da topoisomerase II α , impedindo a conexão do DNA após o intervalo.

Figura 19 – Estrutura do AMTAC-06.

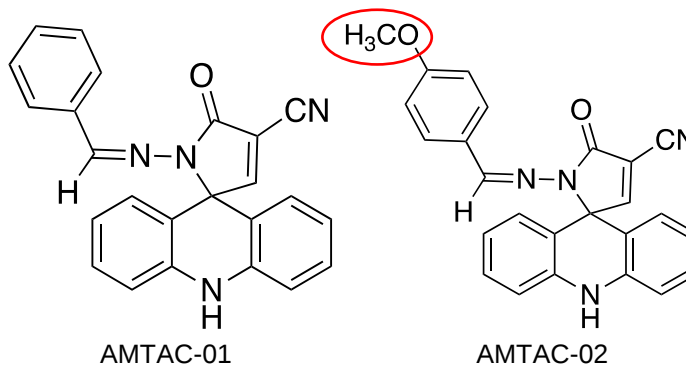


Fonte: Adaptado de GOUVEIA et al., 2018.

Outro trabalho também do nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA et al., 2019) avaliou as espiro-acridinas como inibidores da tirosinase, uma enzima chave para a melanogênese. Foram sintetizados: 3- (acridin-9-il) -N-benzilideno-2-cianoacrilohidrazida (AMTAC-01) e 3- (acridin-9-il) -2-ciano-N- (4-metoxibenzilideno)-acrilohidrazida (AMTAC-02) e sua inibição enzimática e tipos de mecanismos foram investigados. Além disso, a interação desses compostos com a enzima foi estudada por espectroscopia UV-Vis, espectrofluorimetria, titulação de RMN de ^1H , bem como *docking* molecular. O AMTAC-01 difere estruturalmente do AMTAC-02 por um grupo metoxila, que causa um tipo de inibição diferente. Nesse sentido, o AMTAC-01 apresentou inibição não competitiva e o AMTAC-02 do tipo misto, evidenciando a relevância do grupo metoxila para a inibição enzimática. Os resultados espectroscópicos corroboraram os resultados enzimáticos que mostraram que o AMTAC-02 se liga mais fortemente do que o AMTAC-01 à enzima. Além disso, a titulação de RMN e os encaixes moleculares revelaram os grupos químicos envolvidos e o modo de interação, o que lança luz sobre o projeto racional de novos inibidores baseados em acridinas. Estudos de ancoragem confirmaram que as âncoras metoxila AMTAC-02 em uma posição que bloqueia completamente o acesso ao local de ligação

e ilustra o modo de inibição dos AMTAC's. *Dockings* sugeriram que esta interação está ausente no caso da tirosinase humana e apontam para um modo semelhante de inibição para ambos os AMTAC's neste caso.

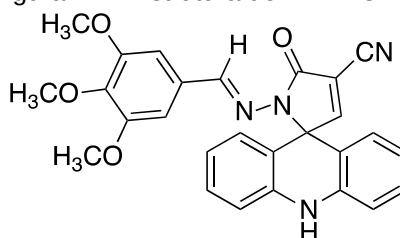
Figura 20 – Estrutura do AMTAC-01 e AMTAC-02



Fonte: ALMEIDA et al., 2015.

Estudos realizados por Silva e colaboradores (2020) com um dos derivados do nosso grupo de pesquisa sintetizaram e testaram um novo derivado espiro-acridínico (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrile (AMTAC-17) (Figura 21) quanto a efeitos antitumorais. Neste estudo foi utilizado o modelo de carcinoma de Ehrlich ascítico para investigar a atividade antitumoral do AMTAC-17 (12,5, 25 ou 50 mg / Kg, i.p.) após sete dias de tratamento. O AMTAC-17 apresentou baixa toxicidade e seu efeito antitumoral *in vivo* envolveu a modulação do sistema imunológico para um perfil citotóxico de Th1 e uma redução da angiogênese do tumor.

Figura 21 – Estrutura do AMTAC-17.



Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2020.

Mediante os dados apresentados na literatura, e os já obtidos por nosso grupo de pesquisa, surgiu a necessidade de ampliar a avaliação de novos derivados acridínicos, buscando explorar esse promissor *scaffold*, na busca por possíveis fármacos para o tratamento do câncer.

3.8 ESTRATÉGIAS DE PLANEJAMENTO MOLECULAR

3.8.1 Docking molecular

A descoberta de moléculas com potencial atividade biológica é um processo que envolve um longo período de tempo e financiamento para o desenvolvimento dos estudos pré-clínicos e clínicos até a aplicação no mercado (AMARO et al., 2018)

De maneira geral, poucos são os compostos estudados que chegam aos consumidores. Estudos computacionais para design de novos fármacos foram iniciados na década de 1970, depois do surgimento das primeiras estruturas cristalográficas de proteínas, percebeu-se que o design racional de fármacos poderia ser feito através dos melhores resultados obtidos por potenciais ligantes em estudo (CHEN, Y.C., 2015; GUPTA et al., 2018)

O uso de modelos computacionais como o CADD (*Computer-Aided Drug Design*) promove maior eficiência na descoberta de biomoléculas, chegando a reduzir em até 50% o custo e tempo de pesquisa na descoberta de novos fármacos. O *screening* virtual é muito comum na indústria farmacêutica, já que o processo de desenvolvimento de fármacos é longo e caro, logo com o objetivo de simplificar o processo estudos de *docking* são amplamente utilizados, visto que, este é uma tecnologia computacional e simboliza um procedimento de amostragem conformacional, de modo que várias conformações de ancoramento são exploradas, com o objetivo de prever a afinidade e as propriedades de ligação de fármacos em relação a um alvo, determinando sua conformação ideal (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010; SAXENA et al., 2009).

Dentro desse contexto, *docking* molecular é uma ferramenta de simulação computacional *in silico* que permite estudar a interação entre pequenas moléculas (ligantes) e proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (receptores), que pode ser útil no desenvolvimento e planejamento de fármacos. Seu maior objetivo é prever o modo de ligação e a afinidade de pequenas moléculas dentro do sítio ativo de um possível receptor. A possibilidade de associação com uma grande biblioteca de compostos (*virtual screening*) torna-o capaz de conclusões sobre possíveis sucessos no planejamento de fármacos (SILVA, 2015).

Ademais, o estudo de *docking* molecular consiste na busca por moléculas bioativas, que são estudadas para um determinado alvo molecular com intuito de

estabelecer qual ou quais delas demonstram melhor acoplamento ao sítio ativo do alvo. Os resultados gerados nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio do alvo molecular selecionado. Assim, a molécula que necessitar de uma menor quantidade de energia para se ligar ao sítio ativo, na teoria, apresentará melhor resultado de atividade biológica (BARROS, 2015).

Tomando como base esses resultados, diversas estruturas moleculares de possíveis compostos bioativos podem ser testadas, com objetivo de obter um *screening* virtual, em que aquelas que se apresentarem como mais promissoras passam para as etapas de síntese e avaliação de suas respectivas atividades biológicas, aperfeiçoando a fase inicial do desenvolvimento de um novo fármaco (BARROS, 2015).

A estrutura do ligante e da biomolécula são fornecidas a partir de bancos de dados de proteínas e ácidos nucleicos PDB (*Protein Data Bank*) e UniProt. Através desses dados, o *docking* busca avaliar parâmetros de conformações ideais e valores de energia livre, permitindo a escolha e estudo de ligantes com maior probabilidade de interação com o sítio ativo (ANTUNES et. al., 2015; FORLI et. al., 2016).

O estudo de fatores entrópicos e entálpicos avalia a distribuição de cargas dos ligantes, sua flexibilidade, interações com moléculas de água presente no meio e permite determinar estruturas que apresentem um maior desempenho para desenvolvimento de alvos moleculares e auxilia na compreensão de alguns mecanismos de ação (ANTUNES et. al., 2015; FORLI et. al., 2016).

A maioria dos programas de *docking* molecular para investigar a afinidade de ligação de moléculas com atividade biológica com seus receptores são compostos por dois componentes essenciais: o algoritmo de pesquisa conformacional e a função de energia (*score*) (SAXENA et al., 2009).

O algoritmo de pesquisa busca combinações de ligações ideais, analisando os graus de liberdade rotacional, translacional e conformacional do ligante. Já a *score* estima a energia livre de ligação e a constante de ligação, enquanto menor a energia de ligação do complexo proteína-ligante, maior a estabilidade do complexo, isso significa que o tempo de contato do ligante com o receptor ocorre majoritariamente naquela determinada conformação (GUPTA et al., 2018).

Se a proteína estiver co-cristalizada com o substrato nativo ou inibidor do receptor, é possível a reprodução conformacional do complexo proteína-ligante

através do docking, possibilitando a determinação do potencial e direcionamento da atividade do ligante em estudo. O desvio quadrático médio (RMSD) entre as coordenadas do ligante co-cristalizado e a melhor conformação do ligante obtida no redocking usando softwares próprios para o estudo de docking pode ser usado para avaliar a predição de resultados (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010).

3.9 REGRAS: LIPINSKI X VEBER

Lipinski relata em sua regra que, um composto pode apresentar má absorção ou permeação pelo organismo quando ele apresenta: (i) peso molecular superior a 500 g mol^{-1} ; (ii) lipofilicidade expressa como cLogP maior que 5 (ou MLogP acima de 4,15); (iii) número de grupos aceptores de hidrogênio maior que 10 (expressos como a soma de átomos de N e O); e (iv) número de grupos doadores de hidrogênio maior que 5 (expressos como a soma de grupamentos OH e NH). Apesar de serem 4 parâmetros eles ficaram conhecidos com regra dos cinco atrelado ao fato dos valores das propriedades serem múltiplos de cinco (LIPINSKI et al., 2012). Esses parâmetros tornaram-se amplamente utilizadas com aceitação atribuída a sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Amplamente utilizadas como um padrão de referência, essas regras têm embasamento na pesquisa, documentação e justificativa sólidas, além de permitir a avaliação das propriedades farmacocinéticas dos compostos de forma eficaz. Obedecendo a essas regras estes compostos têm maior probabilidade de serem absorvidos pelo organismo após ingestão oral. As propriedades associadas às regras de Lipinski são determinadas a partir do exame da estrutura e através da utilização de *softwares* amplamente disponíveis (LIPINSKI et al., 2012; DI et al., 2018).

Veber e colaboradores propuseram regras adicionais investigando propriedades estruturais que aumentassem a biodisponibilidade oral em ratos. Tal estudo concluiu que são características determinantes da biodisponibilidade oral: a flexibilidade molecular, a área de superfície polar (ASP) e número de ligações de hidrogênio. Os parâmetros adotados são de simples identificação, as ligações rotacionáveis e o número de átomos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio podem ser contados de forma visual ou através de *software*, assim como a ASP também é calculada via *software*. Em conclusão, de acordo com as regras de Veber para uma boa biodisponibilidade oral em ratos são: (i) os compostos devem apresentar no máximo 10 ligações rotacionáveis; área de superfície polar menor ou

igual a 140 Å²; ou no máximo um total de 12 ligações de hidrogênio (aceptores mais doadores).

3.10 A IMPORTÂNCIA DA PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA

A terapia oncológica é desafiadora e o processo de desenvolvimento de novos compostos passa por inúmeros desafios até a identificação rápida de compostos *leads* eficazes (LUCIANO et al., 2018).

Estes últimos, podem ser caracterizados em um curto espaço de tempo e com menor custo através do uso de modelos *in silico* ADME, quando comparado às alternativas de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Vale salientar que esses modelos *in silico* são úteis no desenvolvimento de correlações adequadas entre estruturas químicas e propriedades de ADME para aumentar a solubilidade, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e, conseqüentemente, parâmetros clínicos, como meia-vida, estabilidade e eficácia terapêutica. Portanto, eles devem ser projetados permitindo que a triagem de compostos seja baseada em seu provável comportamento farmacocinético e eliminando candidatos a fármacos não viáveis (HONÓRIO; MODA; ANDRICOPULO, 2013).

O uso de ferramentas como bancos de dados *in silico* disponíveis surge como alternativa aos *screenings* iniciais de novos compostos. O processo de triagem de novos protótipos a fármacos pode ser facilitado através de estratégias que combinem essas ferramentas e evidenciem um delineamento entre características físico-químicas e biológicas para terapias alvo-dirigidas (LUCIANO et al., 2018; KOLB; IRWIN, 2009).

Propriedades de afinidade eletrônica ao alvo tão somente não atribuem a uma molécula uma potencialidade de fármaco, é preciso aprofundar em características que envolvam sua farmacocinética, que relacionadas com propriedades da farmacodinâmica completam a ideia de um fármaco eficiente. (LUCIANO et al., 2018; KOLB; IRWIN, 2009).

Parâmetros importantes como: coeficiente de partição (log P), coeficiente de solubilidade (log S) e metabolismo de fármacos estão diretamente ligados à potencialidade dos fármacos (YOUNG et al., 2011; LIPINSKI et al., 2012; SANGSTER, 1989)

O log P é utilizado para estimar como uma droga pode ser transferida entre diferentes meios biológicos e também para previsão da hidrofobicidade de uma molécula (YOUNG et al., 2011; LIPINSKI et al., 2012; SANGSTER, 1989); Já, o log S, representa normalmente a solubilidade de compostos orgânicos, onde S é a concentração do composto em mol/L. Esse parâmetro é considerado, pois a solubilidade aquosa e a hidrofobicidade estão diretamente ligadas a capacidade de permeação na membrana. No geral, cerca de 85% dos fármacos tem valores de log S entre -1 e -5, moléculas acima -1 estão relacionadas com estruturas muito polares, tais como açúcares ou pequenos peptídeos, que apresentam baixa permeabilidade de membrana na ausência de transporte ativo (JORGENSEN et al., 2002; HUUSKONEN et al., 1998).

Além desses parâmetros, também é realizado um enfoque em relação ao metabolismo dos fármacos. Métodos *in silico* empregados para o estudo do metabolismo de fármacos compreendem estratégias computacionais capazes de prever os sítios estruturais lábeis ao metabolismo, prever o metabólito potencial e pressagiar a interação de um determinado fármaco com a enzima metabolizadora alvo (DAINA; MICHERLIN; ZOETE, 2017).

Eles são divididos em: métodos baseados na estrutura do receptor (p. ex. *docking*) e métodos baseados na estrutura do ligante (p. ex. QSAR) (GRAAF et al., 2005; KIRCHMAIR et al., 2012; BOYER et al., 2002; BARREIRO; FRAGA et al., 2015). Diversos programas gratuitos para predição do metabolismo *in silico* foram desenvolvidos, como o SwissADME desenvolvido pela *Swiss Institute of Bioinformatics* na Suíça (DAINA; MICHERLIN; ZOETE, 2017).

Independentemente da opção do método empregado no estudo do metabolismo de fármacos (*in vivo*, *in vitro* ou *in silico*), o conhecimento prévio sobre a reatividade química de um determinado substrato (fármaco), frente às diferentes enzimas metabólicas, consiste em condição indispensável para o sucesso do estudo (GRAAF et al., 2005; KIRCHMAIR et al., 2012).

Visto isso, enzimas primordiais no processo de formação e no tratamento do câncer são as enzimas do citocromo P450 (CYPs), em decorrência da sua atuação na ativação metabólica de vários pré-carcinógenos, como também sua cooperação para ação ou inativação de drogas anticâncer (GRAAF et al., 2005; KIRCHMAIR et al., 2012; BOYER et al., 2002; BANDEIRA et al., 2014).

Porém, destaca-se que as CYPs que exercem função de metabolização dos xenobióticos são diferentes das que estão relacionadas com a ativação de pré-carcinógenos: a primeira, relaciona-se com o processo de metabolização derivado do polimorfismo interindividual, atuam na biotransformação; a outra classe tem como principal função inativar drogas anticâncer e ativar pré-carcinógenos (GRAAF et al., 2005; KIRCHMAIR et al., 2012; BOYER et al., 2002; BANDEIRA et al., 2014).

O estudo da biotransformação metabólica através das CYPs é um fator chave na eliminação de drogas. De acordo com a literatura, estima-se que 50% a 90% das moléculas terapêuticas sejam substrato das cinco principais isoformas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) (TESTA et al., 2007; DI et al., 2014).

Neste contexto, a busca por novas moléculas aromáticas heterocíclicas que possuam afinidade com o DNA e suas enzimas reguladoras é contínua, e baseada na necessidade de alternativas terapêuticas com maior eficácia, e que sejam menos adversas para os pacientes oncológicos, constituindo um novo arsenal no combate ao câncer (LANG et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015).

3.11 AS TECNOLOGIAS COMO FERRAMENTAS PARA APERFEIÇOAMENTO FARMACOCINÉTICO.

Uma das grandes limitações de muitos candidatos a fármacos antitumorais, incluindo os derivados acridínicos, é o seu perfil farmacocinético, principalmente a sua biodisponibilidade e atuação em tumores sólidos, o que nos impulsiona a descoberta de novas opções de tecnologia farmacêutica como, por exemplo, a partir do uso das ciclodextrinas como incremento de solubilidade, com o intuito de melhorar a solubilidade e consequentemente a biodisponibilidade dos mesmos.

3.11.1 Ciclodextrinas (CDs)

O emprego farmacêutico mais importante inerente as ciclodextrinas são: o aumento da solubilidade, estabilidade, segurança e biodisponibilidade de fármacos. Esses oligossacarídeos cíclicos apresentam também grande importância no desenvolvimento de fármacos pouco solúveis em água, e ainda proporcionam um aumento de solubilidade ao fármaco, devido as suas propriedades de formação de

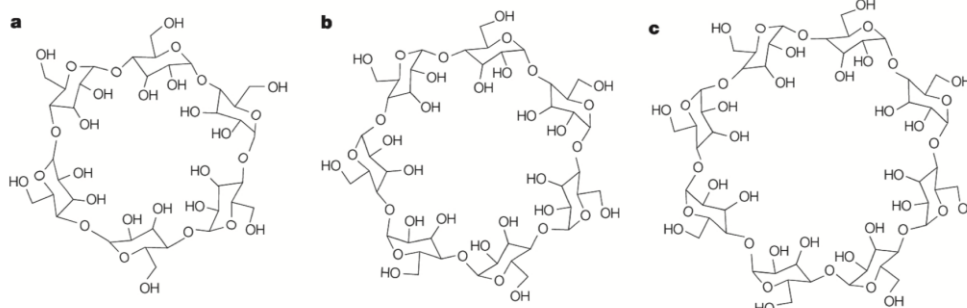
complexos de inclusão, que atuam como carreador hidrofílico desses fármacos. (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

As CDs são conhecidas como ciclomaltoose, cicloamilose, ou ainda, dextrinas de Schardinger (BONNET et al., 2015), já que os primeiros detalhes de preparação, descrição e isolamento das CDs foram descritos por ele em 1903 (DEL VALLE, 2004).

Elas são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas por meio de ligações glicosídicas, obtidas a partir da degradação enzimática do amido (enzima ciclodextrina glicosiltransferase) de espécies como a mandioca, batata, milho, entre outros. As macromoléculas produzidas dependem do tipo de microorganismo que produz a enzima e das condições de reação (LOFTSSON; MASSON, 2001).

As CDs de maior importância e ocorrência natural são as α , β e γ -CDs, constituídas respectivamente, por seis, sete e oito monômeros de D-(+)-glicopiranoses, unidas por ligações α -1,4 glicosídicas (Figura 22) e suas características físicas e químicas distintas estão representadas (Tabela 4) (MURA, 2014; LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

Figura 22 – Representação esquemática da α -CD (a); β -CD (b) e γ -CD (c).



Fonte: Adaptado de MAAZAOUI, ABDERRAHIM, 2015.

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.

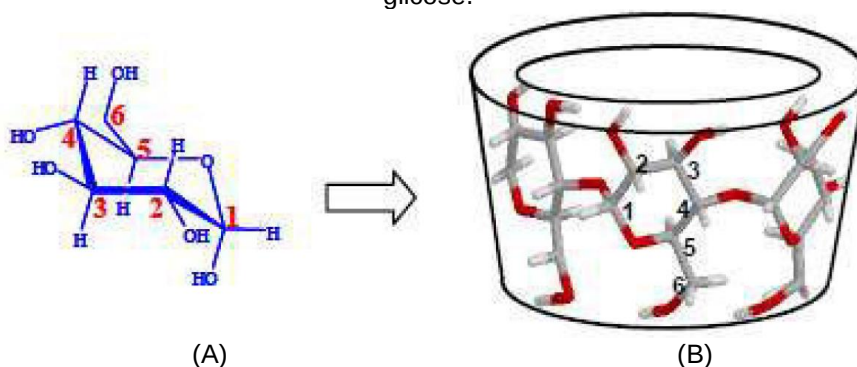
	α - CD	β - CD	γ - CD
Número de unidades de glicose	6	7	8
Peso molecular (g mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25°C (% m/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	14,6	15,4	17,5
Altura da cavidade (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å)	174	262	427
Conteúdo de água ligada (% m/m)	10,2	12,2 – 14,5	8,13 – 17,7
Moléculas de água na cavidade	6	11	17

Fonte: Adaptado de DEL VALLE, 2004; MURA, 2014; VENTURINI et. al., 2008.

Podemos observar (Figura 23) que moléculas de CDs possuem conformação tronco-cônica, onde os grupos hidroxílicos estão orientados para o exterior do cone, o que lhe confere um caráter hidrofílico na sua superfície externa. Ao passo que, internamente sua cavidade é formada pelo esqueleto carbônico dos resíduos de glicose e apresenta ligações do tipo éter, conferindo um caráter hidrofóbico a essa região (RAMESH et al., 2014; SÁ BARRETO; CUNHA-FILHO, 2008).

A solubilidade aquosa intrínseca das CDs e sua grande capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas é devido a disposição dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos no exterior e interior da cavidade delas, respectivamente (RAMESH et al., 2014; SÁ BARRETO; CUNHA-FILHO, 2008).

Figura 23 – Conformação tridimensional tronco-cônica das ciclodextrinas formadas por moléculas de glicose.



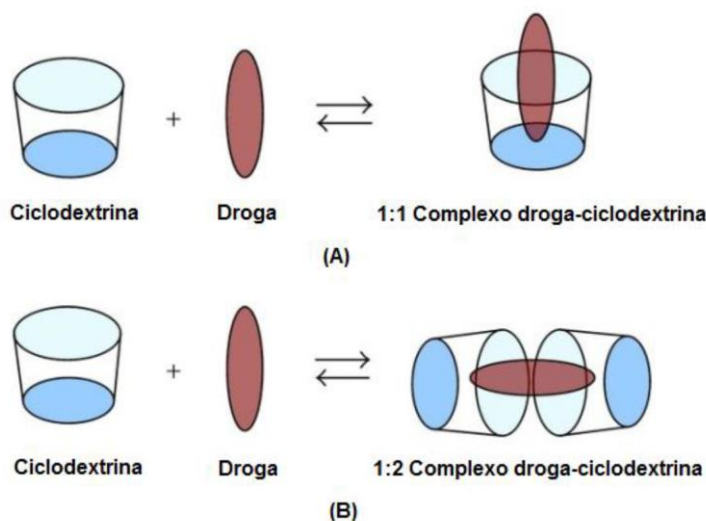
Legenda: (A) Molécula de glicose com a marcação dos carbonos de 1 a 6; (B) Representação tridimensional do posicionamento das unidades de glicose na molécula de ciclodextrina.

Fonte: Adaptado de BUDAL, 2003.

A forma molecular e as características anfifílicas conferem às CDs a capacidade de capturar moléculas ou porções hidrófobas de moléculas maiores em soluções aquosas. Essa captura é realizada através de ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou por transferência de carga dentro de sua cavidade (CARVALHO, 2013; JAMBHEKAR, BREEN, 2015).

Uma diversidade de moléculas hóspedes de acordo com sua forma, tamanho e polaridade adequados podem se encaixar em diferentes CDs, possibilitando a formação de complexo de inclusão 1:1 ou 1:2, tal como ilustrado na Figura 24 (GOPALAN; ANNASELVI; SUBRAMANIAM, 2012; HUANG; LONDON, 2013).

Figura 24 – Representação ilustrativa da formação do complexo de inclusão droga-ciclodextrina 1:1 (A) e 1:2 (B).



Fonte: Adaptado de SAVJANI, GAJJAR, 2012.

3.11.2 Ciclodextrinas modificadas

A baixa solubilidade aquosa das CDs naturais, provavelmente, está relacionada com a força de ligação das moléculas de CDs no estado cristalino. Dentre elas, a β -CD apresenta a menor solubilidade aquosa por formar ligações de hidrogênio intramoleculares e apresentar uma interação reduzida com as moléculas de água ao redor. Entretanto, apesar da β -CD ser uma das mais empregadas na indústria farmacêutica, devido ao seu baixo custo (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007), é importante ressaltar que sua utilização é limitada em soluções parenterais. Ela possui solubilidade reduzida em água, o que leva a um aumento de sua tendência a cristalização.

Além disso, a β -CD é nefrotóxica por via endovenosa. Como ela não é metabolizada, acaba se acumulando nos rins na forma de complexos cristalinos insolúveis (UEKAMA et al., 1998).

No intuito de aumentar sua solubilidade e inserir outras funcionalidades surge a necessidade de realizar modificações na β -CD diante dos fatores anteriormente citados.

Na Figura 25, podemos observar a localização dos grupos hidroxilas na β -CD. Ela, assim como as demais CDs naturais, apresenta diversos grupos hidroxílicos,

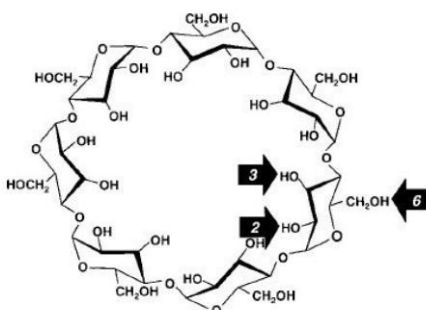
sendo a hidroxila ligada ao carbono 6 mais reativa que a ligada ao carbono 3, onde esses grupos podem ser quimicamente modificados.

Entretanto, a preparação de derivados homogêneos e seletivos não é tarefa simples, uma vez que a α , β e γ -CDs, apresentam 18, 21 e 24 grupos hidroxílicos passíveis de substituição, respectivamente (UEKAMA et al., 1998; FRÖMMING; SZEJTLI, 1992).

Dentre estes derivados, a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) vem sendo reportada na literatura como segura para administração oral e parenteral, além de ser descrita nos compêndios oficiais da Farmacopeia Americana e Europeia e ser citada na lista de excipientes farmacêuticos considerados inativos pelo FDA (GOULD; SCOTT, 2005, GUEDES et al., 2008).

Essa CD derivada é obtida pelo tratamento de β -CD com óxido de propileno e possui uma solubilidade em água superior a 600mg/mL (GOULD; SCOTT, 2005, GUEDES et al., 2008, LOFTSSON; HREINSDOTTIR, 2007, STELLA; RAJEWSKI, 1997).

Figura 25 – Localização dos grupos hidroxilas na β -CD. As setas indicam os grupos hidroxilas situados em C2, C3 e C6.



Fonte: Adaptado de UEKAMA et al., 1998.

3.11.3 Formação do Complexo de Inclusão (CI)

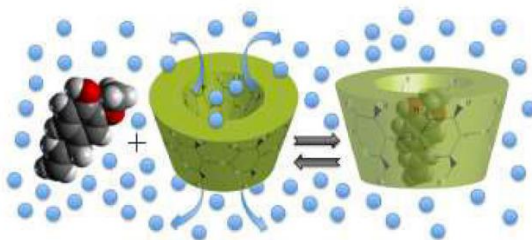
Villiers e Schardinger estabeleceram há mais de 100 anos a formação do complexo de inclusão entre fármacos e ciclodextrinas, sendo caracterizado em 1903, por Schardinger como oligossacarídeos cíclicos (JAMBHEKAR, BREEN, 2015). De acordo com Loftsson et al. (1994) essa complexação fármaco-ciclodextrina é um fenômeno molecular estequiométrico, onde uma molécula (dita hóspede, ligante, substrato, *guest*) pode interagir com a cavidade interior da CD (dita molécula

hospedeira, *host*). Essa complexação se dá através da inclusão total ou parcial do hóspede na cavidade interna da CD.

A estabilidade da formação de um CI está atrelada a uma variedade de forças não covalentes, como forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras. Durante a complexação nenhuma ligação covalente é quebrada ou formada, sendo a variação de entalpia resultante da liberação das moléculas de água da cavidade interna da CD a força motriz mais importante desta interação (DEL VALLE, 2004).

Na (Figura 26) podemos observar as etapas componentes do mecanismo completo de inclusão: (i) dessolvatação do hóspede e da cavidade interna da CD; (ii) ocorrência de mudanças conformacionais, tanto na CD quanto no hóspede; (iii) interação hóspede-hospedeiro; (iv) reorganização do solvente ao redor e na cavidade interna da CD, e; (v) relaxamento estrutural do complexo formado (VENTURINI et al., 2008).

Figura 26 – Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina.



Fonte: Adaptado de MURA, 2014.

Ademais, mesmo após a formação do CI, a caracterização faz-se necessária para o conhecimento do sistema obtido. Isso está ligado ao fato de que o produto obtido seja um CI, podendo ser uma mistura simples de CD com moléculas hóspedes (PIRES, 2011). Essa caracterização é realizada através de métodos de análises para avaliar a formação do CI, como calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (IR) e ressonância magnética nuclear (RMN), para confirmar mudanças nas propriedades físico-químicas do fármaco após a complexação (FREITAS et al., 2012).

No estudo de ELEAMEN e colaboradores (2016) um complexo 6CN10: HP- β -CD foi preparado com sucesso pelo método de liofilização e forneceu um meio alternativo de superar a baixa solubilidade aquosa do 6CN10, um derivado de 2-aminotiofeno fracamente solúvel em água com propriedades antifúngicas. O complexo

foi caracterizado por análise térmica, infravermelho / Raman espectroscopia, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura. Além disso, foi utilizado dados do estudo de solubilidade de fase, espectroscopia de RMN ^1H e 2D e modelagem molecular a fim de investigar as interações entre 6CN10 e HP- β -CD. A complexação molecular do mecanismo proposto com dados IV, RMN e *docking* dados mostraram que o 6CN10 é capaz de formar complexos com HP β CD, mas de preferência pela porção externa, gerando a formação de inclusão e, preferencialmente complexos de não inclusão. Além disso, IV, Raman, TG-DTA, DRX e MEV confirmam que o complexo 6CN10: HP- β -CD pode levar a modificações nas características físico-químicas da droga, como estabilidade térmica e propriedades de cristalinidade. A respeito da atividade antifúngica, houve um aumento considerável de solubilidade do 6CN10 na forma complexada, potencialmente melhorada a eficácia antifúngica *in vitro* do 6CN10 (até 7 vezes).

Um trabalho mais recente também do nosso grupo de pesquisa (MELO et al., 2020) desenvolveu um complexo de inclusão de AMTAC-01 e HP β CD foi com sucesso com uma constante de estabilidade aparente (K_s) igual a $1145,3 \text{ M}^{-1}$ e amplamente caracterizado usando MEV, DRX RMN, IV, Raman e espectrofotometria de fluorescência. Sua estequiometria de inclusão foi determinada como 1: 1 usando o ensaio de solubilidade de fase. Observou-se melhora nas propriedades físico-químicas, com diminuição da estrutura cristalina do fármaco quando incorporado ao complexo de inclusão, o que pode favorecer sua solubilidade em fluidos biológicos. Assim, o complexo de inclusão AMTAC-01: HP β CD pode ser usado para investigações anticâncer *in vitro* e *in vivo* no futuro.

4 PARTE EXPERIMENTAL (1ª Etapa)

4.1 ESTUDO IN SILICO

4.1.1 *Docking* molecular

Para a obtenção dos alvos biológicos topoisomerase II α -DNA (PDB ID 5gwk) e DNA (PDB ID 1g3x) foi utilizado o *Protein Data Bank* (PDB) e, logo em seguida, foi iniciado o processo de preparação dos alvos. Para o estudo de interação da molécula-alvo, a macromolécula foi baixada no formato PDB e aberta no programa *PyMOL Win*, realizou-se a remoção da água, assim como de pequenas moléculas (ex: Mg, Cl, Fe). Após esse procedimento foi extraído o ligante, que consiste em um fármaco já utilizado para o alvo, sendo inclusive utilizado como parâmetro para a realização do *redocking*, validando o método utilizado. Desta forma o alvo tratado ficou pronto para o estudo de *docking*.

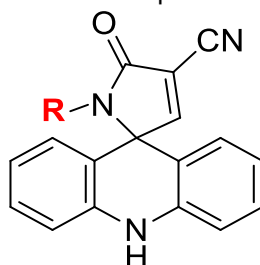
Foram analisados dezesseis derivados (ACMD-01, ACMD-02, ACMD-03, ACMD-04, ACMD-05, ACMD-06, AMTAC-01, AMTAC-02, AMTAC-04, AMTAC-15, AMTAC-17, AMTAC-18, AMTAC-19, AMTAC-21, AMTAC-22 e AMTAC-23) (Tabela 5 e 6), foram desenvolvidos de um fragmento privilegiado (núcleo acridínico), a partir de planejamentos moleculares como o baseado na estrutura do receptor (*Structure Based Drug Design* - SBDD) levando em consideração o alvo biológico, além do planejamento fundamentado no fragmento privilegiado de droga já descoberta (*Fragment Based Drug Discovery* - FBDD) que por sua vez, é a amsacrina (m-AMSA). Os compostos promissores como nos trabalhos de ALMEIDA et al. (2016), GALDINO et al. (2018) e SILVA et al. (2018) foram pioneiros no desenho desses derivados e que a proposta seria observar as modificações bioisostéricas no anel benzilidênico e a influência dos mesmos na resposta biológica.

Os ligantes foram desenhados no *Chemdraw ultra* 16.0 (Tabela 5 e 6) em seguida foram submetidos no programa *Chem 3D pro* 2.0 para a análise conformacional através do cálculo de mecânica molecular mínima e dinâmica (MM2) obtendo a conformação com menor energia. Após o cálculo do MM2, os compostos foram salvos no formato MOL2.

Para validação, foi realizado como método o *redocking*, visto que as estruturas cristalográficas dos alvos biológicos estão co-cristalizados com os ligantes. Este

método consiste em submeter o mesmo ligante co-cristalizado com o biorreceptor em questão dos estudos de *docking* molecular e observar se as interações com os resíduos de aminoácidos-chave e a orientação são preservados, ou seja, que o desvio quadrático médio (RMSD) entre o ligante entre o ligante cristalográfico e a proteína ou enzima seja o menor possível, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico* (MOURA, 2019). Para realizar a validação do método além do programa *AutoDock Tools* 1.5.6 foi utilizado o *Discovery Studio* 2.0 no qual é possível observar a sobreposição entre o ligante cristalografado e a molécula em estudo.

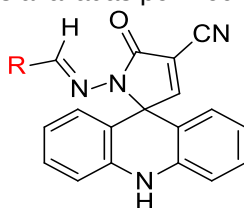
Tabela 5 – Moléculas avaliadas por Docking da série ACMD.



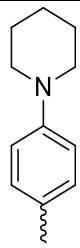
ACMD	NOMENCLATURA	R
1	5'-oxo-1'-fenil-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila	
2	1'-(4-bromofenil) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila	
3	1'-(4-clorofenil) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila	
4	1'-(4-fluorofenil) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila	
5	1'-(4-nitrofenil) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila	
6	1'-(4-metoxifenil) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila	

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6 – Moléculas avaliadas por Docking da série AMTAC.



AMTAC	NOMENCLATURA	R
1	(E) -1' - (benzilidenoamino) - 5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
2	(E) -1' - ((4-metoxibenzilideno) amino) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
4	(E) -1' - ((3-nitrobenzilideno) amino) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
15	(E) -1' - ((4-(metilsulfonil) benzilideno) amino) - 5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
17	(E) -5'-oxo-1' - ((3,4,5-trimetoxibenzilideno) amino) - 1', 5'-di-hidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
18	(E) -1' - ((2,4-dimetoxibenzilideno) amino) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
19	(E) -1' - ((4-bromobenzilideno) amino) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
21	(E) -5'-oxo-1' - ((quinolin-6-ilmetileno) amino) -1', 5'-di-hidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	
22	(E) -1' - (((1H-Indol-6-il) metileno) amino) -5'-oxo-1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	

23	(E) -5'-oxo-1' - ((4-(piperidin-1-il) benzilideno) amino) -1', 5'-dihidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila	

Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.2 Predição farmacocinética

As predições farmacocinéticas se deram com a utilização de algumas plataformas *online*, disponibilizadas de maneira gratuita e que apresentaram resultados mais propícios para discussões e correlações. O programa utilizado para prever propriedades de absorção, Log P, Log S, alguns inibidores de CYP450, como também, comparações de “*druglikeness*” foi o *SwissADME* desenvolvido pela *Swiss Institute of Bioinformatics* na Suíça, (DAINA, MICHIELIN, ZOETE, 2017). Parâmetros relacionados ao metabolismo dos novos derivados foram obtidos na plataforma *Xenosite*, pela Universidade de Medicina de Washington, EUA. Baseado em artigos como Zaretski, Matlock e Swamidass (2013) e Dang et al. (2016), apresentam uma interface que necessita apenas que sua estrutura esteja no formato *smiles*, formato este gerado pelo *ChemDraw Ultra 16.0*.

4.2 ESTUDO QUÍMICO

4.2.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram: etanol absoluto, ácido acético glacial, trietilamina, benzeno, clorofórmio, diclorometano, álcool isopropílico, metanol, dimetilformamida (DMF), acetato de etila (AcOEt), n-hexano (Hex), 2-cianoacetohidrazina, difenilamina, cloreto de zinco, *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina, ácido sulfúrico, hidróxido de amônio, ácido clorídrico, água destilada, 4-metóxi-benzaldeído, 3-nitro-benzaldeído, 4-metil-sufonil-benzaldeído, 3,4,5-trimetoxi-benzaldeído, 2,4-dimetoxi-benzaldeído, 4-bromo-benzaldeído, 4-quinolina-benzaldeído, 3-indol-benzaldeído, 4-piperidinil-benzaldeído, anilina, 4-nitro-anilina, 4-cloro-anilina, 4-fluor-anilina, 4-bromo-anilina. Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos

compostos e suas análises pertencem aos fabricantes *Sigma-Aldrich*®, *Acros*®, *Merck*®, *Vetec*® e *Quimis*®. Para o incremento de solubilidade foram utilizadas beta-ciclodextrina e 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina *Sigma-Aldrich*®.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram conduzidas em placas de sílica gel 60 F254 da MERCK de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 ou 366 nm.

4.2.3 Ponto de Fusão (PF)

Os pontos de fusão foram medidos no equipamento *Fisatom*, Modelo 431, em tubos capilares visualizados no sistema óptico com aumento de 4x.

4.2.4 Cálculo teórico do Log P

O cálculo do Log de P foi realizado através do programa *ChemDraw* 16.0, sendo o Log de P teórico, calculado para cada molécula sintetizada.

4.2.5 Aparência

A aparência dos compostos (cor e textura) foi avaliada apenas por observação visual do produto.

4.2.6 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos pela técnica de refletância total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*) na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} em equipamento *Perkin Elmer, Spectrum 400*, e os resultados foram interpretados através de gráficos plotados no *software* Origin 8.0. As análises foram realizadas no Laboratório de Combustíveis (LAC-UFPE).

4.2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros *Varian* Modelo *Plus* 300 MHz (UFPE). Também foram obtidos espectros em espectrômetros *Bruker Avance* de 400 e 500 MHz, *Ultrashield*® na UFPB e UFRRJ, respectivamente. Os espectros foram plotados e interpretados através do *software* Mestre Nova 12.0. Como solvente das amostras foi utilizado DMSO- d_6 (*Sigma-Aldrich*®). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) indicadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), multiplete (m).

4.2.8 Espectrometria de Massas (EM)

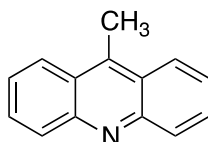
As medidas das massas exatas foram obtidas em espectrômetro de massa MALDI-TOF *Autoflex III* (*Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA*). Laser Nd:YAG, smartbeam 1,355 nm Freq. laser: 100 Hz, Programa: *FlexControl* Versão 3.0 (*Bruker Daltonics*) Placa MALDI: MTP 384 *ground steel* (*Bruker*), Adaptador para placa: MTP *target frame III* (*Bruker*). A exportação dos dados foi realizada no programa *FlexAnalysis* versão 3.0 (*Bruker Daltonics*) e a calibração externa utilizando matriz alfa-ciano e mistura padrão de peptídeos (*Bruker*). Foi utilizado o modo refletido positivo do equipamento e as amostras foram diluídas em DMSO (20 μL). A matriz é composta de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico - HCCA (10 mg/mL) em acetonitrila (ACN) 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,3%. Uma amostra (1 μL) foi aplicada na placa e deixada na estufa a aproximadamente 50 °C, até completa secagem e a aplicação dos calibrantes foi realizado através do método da gota seca. O calibrante

foi misturado à matriz (proporção volume matriz: amostra = 2:1) e a mistura foi aplicada na placa e deixada em temperatura ambiente até secar. As análises foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.3 METODOLOGIAS DE SÍNTESE

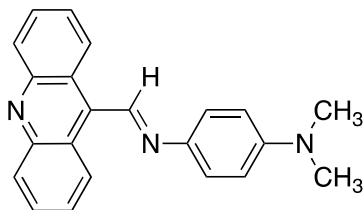
4.3.1 Etapas de síntese dos derivados espiro-acridínicos

4.3.1.1 Síntese da 9-metilacridina (AC-01)



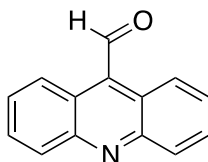
Para síntese da 9-metil acridina (AC-01) foi pesado 5,0000 g (0,0296 mols) de difenilamina e 9,0000 g (0,0660 mols) de cloreto de zinco, ambos foram misturados adicionando-se 5 mL de ácido acético. A mistura reacional foi aquecida a uma temperatura de 210 °C, durante 8 horas. A solução resultante foi tratada inicialmente com uma solução de ácido sulfúrico a 20 % e, em seguida, alcalinizada através da adição de uma porção de hidróxido de amônio até pH 8. A 9-metil-acridina foi extraída com acetato de etila e para extração do solvente levou-se a mistura para um rotaevaporador em uma temperatura de 40 °C até obtenção do bruto da reação. Os cristais foram purificados através de coluna cromatográfica sob pressão em sílica gel 60, utilizando como sistema de eluição n-hexano/ AcOEt 9:1. O produto obtido se apresentou na forma de cristais amorfos amarelos tendo sua faixa de fusão entre 115-118 °C, razão de frente de 0,47 e um rendimento de 68 %, podendo ser considerado satisfatório.

4.3.1.2 Síntese do [N-(acridina-9-il-metileno)-N,N-dimetil-benzeno-1,4-diamino] (ACN-01)



Em um balão de 250 mL foi adicionado 0,9000 g (0,0047 mols) de AC-01 e 1,7646 g (0,0117 mols) de *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina, na presença de 20 mL de EtOH, sob agitação magnética, em refluxo de 78 °C, durante aproximadamente 8 horas. Acompanhando a reação por CCD, verificou-se que, após esse tempo, todo o produto de partida já havia sido consumido. A solução reacional obtida foi lavada com EtOH aquecido, levando a precipitação dos cristais, seguida de filtração. Após os cristais secos, percebeu-se através de placas de CCD que os cristais continham impurezas, logo a reação foi novamente diluída em etanol/ água e aquecida até a diminuição do volume e ao resfriar ocorre novamente a precipitação dos cristais. Sendo novamente filtrada, obteve-se cristais mais puros. Foram obtidos cristais na coloração vermelho-telha assemelhando-se a cor relatada na literatura (MOURA, 2009). Sua faixa de fusão teve variação entre 271-273 °C e sua *R_f* foi de 0,62. No final da reação obteve-se um rendimento de 74 %.

4.3.1.3 Síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC-02)

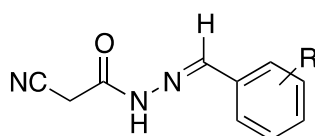


Foram colocados em um balão de fundo redondo, o produto obtido na etapa anterior (ACN-01, 3,000 g = 0,0092 mols) e 60 mL de ácido clorídrico a 6 M (molar). A reação foi aquecida a uma temperatura de 78 °C, mantida sob agitação e refluxo durante 6 horas. Passado este tempo, verificou-se, através de placas de CCD, que a reação havia finalizada, e observou-se a formação de precipitados. O precipitado foi filtrado e lavado com 50 mL de uma solução de ácido clorídrico a 2 M, sendo

novamente o precipitado solubilizado em uma solução de HCl/ H₂O até pH 2. A solução foi filtrada e na fase aquosa foi adicionado NaHCO₃ até elevação do pH para 8, ocorrendo a precipitação dos cristais desejados de AC-02 que foi posteriormente filtrado e lavado sucessivamente com água destilada. Após completa secagem, o AC-02 foi purificado em etanol/ água sendo aquecido para diminuição do volume e depois adicionado água destilada para cristalização do produto desejado. Os cristais obtidos apresentaram-se na sua cor característica amarela. Após ser devidamente pesado, o composto teve um rendimento de 82 % e faixa de fusão entre 144-147 °C e R_f de 0,60.

4.3.2 Procedimento geral para obtenção dos intermediários da série 2-ciano-*N'*-benzilideno-acetohidrazida (JR's)

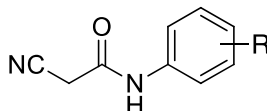
4.3.2.1 Síntese do 2-ciano-*N'*-benzilideno-acetohidrazida



Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3000 g (0,0030 mols) de 2-cianoacetohidrazida e 1 equivalente molar dos diferentes aldeídos aromáticos substituídos em 10,0 mL de etanol – EtOH em meio ácido sob agitação magnética e temperatura ambiente durante aproximadamente 6 horas. Após acompanhamento com CCD, verificou-se que no meio reacional não havia mais produto de partida, concluindo-se que a reação havia finalizado. Para extração e obtenção dos cristais desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada, para precipitação do produto, o qual foi posteriormente filtrado. Os cristais obtidos foram purificados através de lavagens sucessivas com uma mistura de etanol/água. Após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado. Todos os intermediários obtidos apresentaram faixa de fusão com intervalo entre 2 °C. O sistema de eluição utilizado foi n-hexano: AcOEt nas proporções 1:1, 6:4 e 7:3 com R_f's que variaram de 0,40 a 0,55.

4.3.3 Procedimento geral para obtenção dos intermediários da série 2-ciano-N-fenil-acetamida (JM's)

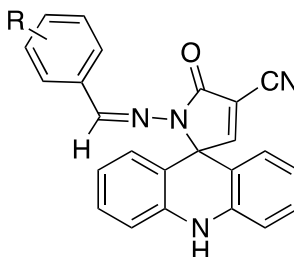
4.3.3.1 Síntese do 2-ciano-N'-fenil-acetamida



Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3000 mL (0,0030 mols) de 2-ciano-acetato de etila e 1 equivalente molar das diferentes anilinas aromáticos substituídas em 10,0000 mL de dimetilformamida (DMF) sob agitação magnética e refluxo com temperatura de aquecimento de 170 °C durante aproximadamente 24 horas. Após acompanhamento com CCD, verificou-se que no meio reacional não havia mais produto de partida, concluindo-se que a reação havia finalizado. Para extração e obtenção dos cristais desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada, para precipitação do produto, o qual foi posteriormente filtrado. Os cristais foram purificados por recristalização em etanol/água. Após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado.

4.3.4 Procedimento geral para obtenção da série 1'-(benzilideno-amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC's)

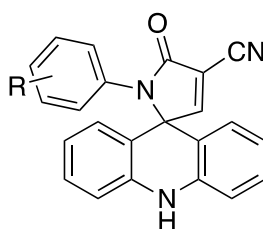
4.3.4.1 Síntese do 1'-((4-metoxibenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila



Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3000 g (0,0014 mols) de AC-02 com 1 equivalente molar dos intermediários JR's previamente sintetizados na presença de 10,0000 mL de EtOH em meio básico sob agitação magnética e refluxo a 60 °C durante aproximadamente 3 horas. Após acompanhamento com CCD, verificou-se que no meio reacional não havia mais produto de partida, concluindo-se que a reação havia finalizado. Para extração e obtenção dos cristais desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada, para precipitação do produto, o qual foi posteriormente filtrado. Os cristais obtidos foram purificados através de recristalização em etanol/ água que foi aquecido para diminuição do volume com posterior resfriamento e adição de água destilada para cristalização do produto. Após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado.

4.3.5 Procedimento geral para obtenção da série 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (ACMD's)

4.3.5.1 Síntese do 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila



Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3000 g (0,0014 mols) de AC-02 com 1 equivalente molar dos intermediários JM's previamente sintetizados na presença de 10,0000 mL de etanol – EtOH em meio básico sob agitação magnética e refluxo a 78 °C por aproximadamente 3 horas. Após acompanhamento com CCD, verificou-se que no meio reacional não havia mais produto de partida, concluindo-se que a reação havia finalizado. Para extração e obtenção dos cristais desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada, para precipitação do produto, o qual foi posteriormente filtrado. Os cristais obtidos foram purificados através de recristalização em etanol/água que foi aquecido para diminuição do volume com posterior

resfriamento e lavagens sucessivas com água destilada para purificação do produto. Após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado.

4.4 ESTUDO BIOLÓGICO

4.4.1 Avaliação da citotoxicidade

4.4.1.1 Linhagens celulares e cultivo

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas diversas linhagens celulares tumorais humanas (HCT-116, HeLa, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231 e SK-MEL-28) e uma linhagem não tumoral murina (L929) (Quadro 1). Estes ensaios foram realizados no Laboratório de OncoFarmacologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), com a colaboração da Prof.^a Dr.^a Marianna Vieira Sobral. As células HCT-116 e L929 foram fornecidas pelo Dr. Manoel de Moraes (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil). HeLa, PC-3 e SK-MEL-28 foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). MCF-7 e MDA-MB-231 foram fornecidas pela Dra. Danielly C. Ferraz da Costa, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil).

Quadro 1 – Linhagens de células tumorais e não tumorais utilizadas no estudo

LINHAGENS	TIPO HISTOLÓGICO	ORIGEM	MEIO DE CULTURA
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	RPMI
HeLa	Adenocarcinoma de colo do útero	Humana	DMEM
PC-3	Carcinoma de próstata	Humana	RPMI
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Humana	RPMI
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	Humana	DMEM
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
L929	Fibroblasto (não tumoral)	Murina	RPMI

Fonte: Elaborado pelo autor.

As linhagens celulares foram cultivadas (5×10^4 células / mL) em frascos de cultivo utilizando o meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) ou *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), e 1% de solução de antibióticos (penicilina 10.000 U/ml e estreptomicina

10 mg/mL) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). As células foram manipuladas em fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, e ao atingirem 80% de confluência foi feita a adição de 2 mL de uma solução de tripsina 0,25% (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA), por 5-10 minutos, para o deslocamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco. Após esse período, adicionou-se meio suplementado com SBF, na mesma proporção de tripsina, para interromper a ação desta. As células foram centrifugadas a 500 xg por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada por meio da utilização do corante azul de Tripán (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA).

4.4.1.2 Ensaio de redução do MTT

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), o qual é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Uma vez solubilizado, o produto formado (formazan) pode ser quantificado espectrofotometricamente e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As células foram distribuídas (100 µL) em placas de 96 poços na concentração de 3x10⁵ células/mL. Após 24 horas, foram preparadas soluções estoque (20 mM) das substâncias teste, dissolvidas em DMSO (100%), da qual foram produzidas soluções de trabalho (50 µM), diluídas em meio RPMI-1640 ou DMEM, não ultrapassando a concentração final de 0,25% de DMSO. As substâncias (50 µM) foram incubadas com a suspensão celular por 72 horas, em uma estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. Prosseguido o período de incubação, as placas foram centrifugadas (500 xg, 5 min, 25 °C), o sobrenadante foi parcialmente removido e a solução de MTT adicionada (5 mg/mL em PBS) (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 3 horas, em seguida foi adicionado 100 µL de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10% e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos *overnight*. A absorbância foi

mensurada em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 570 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados no programa *GraphPadPrism* 7.0, realizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. A porcentagem de inibição foi calculada no referido programa. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas, considerando a resposta nas diferentes linhagens celulares como: amostra sem atividade (1 a 20% de inibição do crescimento celular), com pouca atividade (20 a 50% de inibição), com atividade moderada (50 a 70% de inibição) e com muita atividade (70 a 100% de inibição) (COSTA et al., 2020).

4.5 PARTE EXPERIMENTAL (2ª ETAPA)

4.5.1 Estudo tecnológico farmacêutico

Foi realizado neste trabalho uma segunda etapa experimental baseada nas limitações apresentadas pelos derivados de acridina, seu perfil farmacocinético e principalmente sua biodisponibilidade, o que nos impulsionou a optar pela tecnologia farmacêutica a partir do uso das ciclodextrinas como incremento de solubilidade, com o intuito de melhorar a solubilidade e consequentemente a biodisponibilidade dessas moléculas.

Dando continuidade ao trabalho do nosso grupo, o AMTAC-02 por apresentar uma boa atividade antitumoral, mas baixa solubilidade em água, este foi ressintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM-UEPB) segundo procedimento prévio de acordo com a metodologia descrita por Almeida et al. (2016). Foram utilizadas para complexação dois tipos de ciclodextrina: a β -ciclodextrina (β -CD) e a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) ambas adquiridas pela *Sigma-Aldrich*®. Outros reagentes, solventes e produtos químicos foram de grau analítico e utilizados sem purificação.

4.5.2 Estudo de modelagem molecular do complexo de inclusão

A modelagem molecular foi utilizada para elucidar os aspectos específicos da interação intermolecular e calcular a energia de interação entre o hóspede (fármaco),

AMTAC-02, e os hospedeiros (ciclodextrinas), β -CD e HP β CD. Existem vários relatos na literatura utilizando modelagem molecular de fármacos em complexos de inclusão de derivados da ciclodextrina (CAVALCANTI et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012; MILETIC et al., 2013; SILVA et al., 2016). Para tratar deste problema, dois aspectos da síntese de derivados foram levados em consideração: i) Regiosseletiva: a reação ocorre preferencialmente no grupo hidroxila primário OH (6), uma vez que estes são mais acessíveis, seguidos pelas hidroxilas secundária OH (2) com a maior acidez ($pK_a = 12,2$) (WENZ et al., 1994). ii) Formação de derivados homólogos com menor e maior razão de substituição molar (MS) (TREIB et al., 1999) também são formados em adição ao produto (WENZ et al., 1994).

Nossa abordagem foi construir 1000 estruturas (40 configurações com 25 diferentes conformações) para o HP β CD, partindo da estrutura tridimensional da β -ciclodextrina (β -CD) (SAENGER et al., 1998). As 40 configurações foram construídas considerando os dois aspectos da síntese mencionados anteriormente. Levando em conta a relação MS de 0,7, parece razoável considerar que a estrutura HP β CD (7 unidades de glicose) possui, em média, 5 unidades de HP. Assim, foram construídas 20 configurações com 5 unidades de HP, 10 com 4 unidades de HP e 10 com 6 unidades de HP. Para cada unidade HP adicionada foi considerada a probabilidade de 70% para OH (6) 20% para OH (2) e 10% OH (3) para selecionar a posição OH. A pesquisa de conformeros foi realizada utilizando o Algoritmo Genético e a Função de Pontuação de Energia disponível na biblioteca *OpenBabel* (O'BOYLE et al., 2011) com parâmetros de convergência padrão. As otimizações geométricas de todas as 1000 estruturas foram calculadas usando o campo de força do MMFF94s (HALGREN, 1999).

Em seguida, os valores da energia de interação intermolecular para os hospedeiros: complexos HP β CD: AMTAC-02, e β -CD: AMTAC-02 foram calculados usando o *software Autodock VINA* (TROTT; OLSON, 2011) considerando toda a estrutura do host como o local ativo com o parâmetro exaustividade ajustado para 8.

Toda a metodologia de modelagem molecular foi realizada de forma automatizada utilizando a plataforma *CycloMolder* (RABELLO, 2016).

4.5.3 Estudo de solubilidade de fases

O estudo de solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors (1965). Uma quantidade em excesso de AMTAC-02 (2 mg) foi adicionada a água destilada (2 mL) contendo diferentes quantidades de HP β CD, variando de 0 a 160 μ M. As suspensões foram misturadas por agitação orbital (Modelo TS20 0 0A VDRL, Biomixer, Brasil) a 150 rpm por 72 h a 25 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C. Em seguida, as amostras foram filtradas através de filtros de membrana hidrofílica (0,45 μ m, Kasvi, Brasil). As concentrações do AMTAC-02 foram determinadas espectrofotometricamente a λ = 274 nm (modelo SP-20 0 0 UV, Spectrum, EUA). Os dados de solubilidade foram obtidos pelo seguimento linear de diagramas. Assumindo a formação de um complexo com razão estequiométrica 1: 1, a constante de estabilidade aparente (K_s) do AMTAC-02 foi calculada a partir relação linear entre a concentração molar do AMTAC-02 em solução, em função da concentração molar da HP β CD, de acordo com a Eq. 1 (HIGUCHI; CONNORS, 1965), onde o S_0 é a solubilidade do AMTAC-02 na ausência de HP β CD.

- $K_s = \text{slope}/S_0 \times (1 - \text{slope})$
(Eq. 1)

A eficiência de complexação (CE) do AMTAC-02 foi determinada a partir de dados da curva de solubilidade de fases de acordo com a Eq. 2 (LOFTSSON et al., 2005).

- $CE = \text{slope} / (1 - \text{slope})$
(Eq. 2)

A razão AMTAC-02: HP β CD foi calculada de acordo com a Eq. 3 (LOFTSSON et al., 2007)

- $\text{AMTAC-02:HP}\beta\text{CD} = 1 / (1 + 1/CE)$
(Eq. 3)

4.5.4 Preparação do complexo de inclusão (AMTAC-02: HP β CD)

Este método foi realizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas na UEPB (LSVM-UEPB). O complexo AMTAC-02: HP β CD foi preparado dissolvendo 71,49 mg de HP β CD e 20 mg de AMTAC-02 em 5 mL de água deionizada. A solução foi mantida sob agitação magnética (modelo RH basic 2, IKA, Alemanha) durante 72 h a 25 °C. Mais tarde, a solução foi congelada a -80 °C e liofilizada (Alpha 1-2 LD plus, Christ, Alemanha) por 24 h a -55 °C para obter um pó seco. O complexo foi armazenado à temperatura ambiente até experimentos subsequentes. (ELEAMEN, et al., 2016; MELO, et al., 2020)

4.5.4.1 Preparação da mistura física

Este método baseia-se na simples mistura dos componentes sem adição de água destilada. Em alguns casos são necessários vários dias para se detectar a formação de complexos de inclusão. Para o preparo da mistura, quantidades estequiométricas de AMTAC-02 e HP β CD foram pesadas e misturadas até se obter um sólido simples da mistura física. O produto obtido foi acondicionado em frascos hermeticamente fechados e recobertos com papel alumínio (ELEAMEN, et al., 2016).

4.5.4.2 Liofilização

Consiste na eliminação de solvente dos sistemas em solução, através de um prévio congelamento e posterior secagem a pressões reduzidas. Esta técnica permite a obtenção de complexos de inclusão com elevado rendimento e um baixo estresse térmico. Soluções com os complexos de inclusão em meio aquoso foram congeladas e liofilizadas (Liofilizador *Labconco Freezone 4.5*) até a total eliminação do solvente pela técnica de liofilização (MENDONÇA et al., 2012). O AMTAC-02 e a HP β CD foram pesados com precisão em uma relação molar de 1: 1 e dissolvidos em 5 mL de água destilada sob agitação durante 72 horas a 25° C. A solução foi congelada a -20° C *overnight* no congelador do refrigerador. Após *overnight*, a solução foi congelada a -65° C no compartimento interno do liofilizador por duas horas. Em seguida, a solução

foi liofilizada em secagem primária durante 24 horas (pressão 1 mbar) (ELEAMEN, et al., 2016). A recuperação total foi calculada de acordo com a seguinte equação:

- Recuperação Total (%) = $\text{Pó Recuperado} / \text{Inicial (AMTAC-02: HP}\beta\text{CD)} \times 100$ (Eq.4)

4.5.5 Difratomeria de raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raios X foram obtidos em temperatura ambiente com um difratômetro (modelo D8, *Advance, Bruker*) utilizando uma radiação de Cu-K Ni-filtrada, uma voltagem de 30 kV e uma corrente de 30 mA. A varredura foi empregada para 2 ° / min em um ângulo de difração de 2 θ variando de 5 ° a 80 °. A análise foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE.

4.5.6 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos pela técnica de refletância total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*) na faixa de 4000 a 700 cm⁻¹ em equipamento Modelo *IRPrestige-21, Shimadzu* – Japão, e os resultados foram interpretados através de gráficos plotados no *software* Origin 8.0. As análises foram realizadas Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras foi avaliada por um microscópio eletrônico de varredura (XL 30 ESEM, Philips) ajustado em 20Kv. Antes do exame, as amostras foram revestidas por pulverização catódica com ouro-paládio sob atmosfera de argônio. A microscopia foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami na Universidade Federal de Pernambuco (LIKA – UFPE).

Na MEV, a amostra é irradiada por um fino feixe de elétrons. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície desta amostra, uma série de radiações são emitidas, sendo que os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. De acordo com as

variações existentes na superfície da amostra, o feixe de elétrons primários que vai varrendo a amostra infere em modificações nos seus sinais que são responsáveis por gerar as imagens e fornecer dados de variação de composição (REIMER, 1998).

Nos estudos de complexos de inclusão com CDs, a MEV normalmente avalia a redução de cristalinidade das partículas obtidas por diferentes métodos de síntese para a formação dos complexos de inclusão. Alterações drásticas no formato das partículas, assim como em seu aspecto e tamanho são fortes indicadores quanto à existência de novas fases sólidas (LYRA et al., 2010). No entanto, mesmo com mudanças claras no estado de cristalização dos reagentes precursores e produto obtido, este método não é capaz, por si só, de confirmar a formação do complexo de inclusão (SINGH et al., 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO (1ª Etapa)

5.1 DOCKING MOLECULAR

Através da literatura, pode-se observar que muitos candidatos a fármacos possuem objetivo de inibir a topoisomerase II, seguindo o mecanismo de ação de fármacos de referência como o etoposídeo e também a amsacrina que por sua vez, além de atuar na supressão da topoisomerase II, pode formar um complexo ternário, caracterizando-se como intercalador de DNA. A enzima topoisomerase II α é essencial para a sobrevivência de células proliferativas e seus níveis são regulados no ciclo celular, apresentando o pico de concentração em G2/M, sendo a isoforma mais associada com a replicação (ALMEIDA et al., 2016).

Os novos derivados espiro-acridínicos desse estudo foram avaliados por meio de *docking* molecular, levando-se em consideração os resultados do AMTAC-01 (ALMEIDA et al., 2016).

5.1.1 Alvo topoisomerase II α / DNA (PDB ID 5GWK)

Na Tabela a seguir, estão descritos os resultados de *docking* molecular dos derivados de núcleo acridínico obtidos nesse estudo no alvo terapêutico topoisomerase II α .

Tabela 7 – Docking molecular das séries ACMD e AMTAC no alvo topoisomerase II α (PDB ID 5GWK).

DERIVADOS ACRIDÍNICOS	ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO (K _{CAL} mol ⁻¹)	CONSTANTE DE AFINIDADE (nM ^A , μ M ^B)
ACMD-01	-8.52	570.55 ^a
ACMD-02	-9.25	165.08 ^a
ACMD-03	-8.72	405.14 ^a
ACMD-04	-8.37	726.89 ^a
ACMD-05	-7.72	2.21 ^b
ACMD-06	-8.69	423.54 ^a
AMTAC-01	-9.40	129.23 ^a
AMTAC-02	-9.55	100.42 ^a
AMTAC-04	-9.99	47.60 ^a
AMTAC-15	-10.34	26.50 ^a

AMTAC-17	-9.71	75.68 ^a
AMTAC-18	-9.46	117.00 ^a
AMTAC-19	-10.16	35.75 ^a
AMTAC-21	-10.37	25.19 ^a
AMTAC-22	-10.56	18.08 ^a
AMTAC-23	-10.91	10.11 ^a
LIGANTE ETOPOSÍDEO	-11.2	6.18 ^a

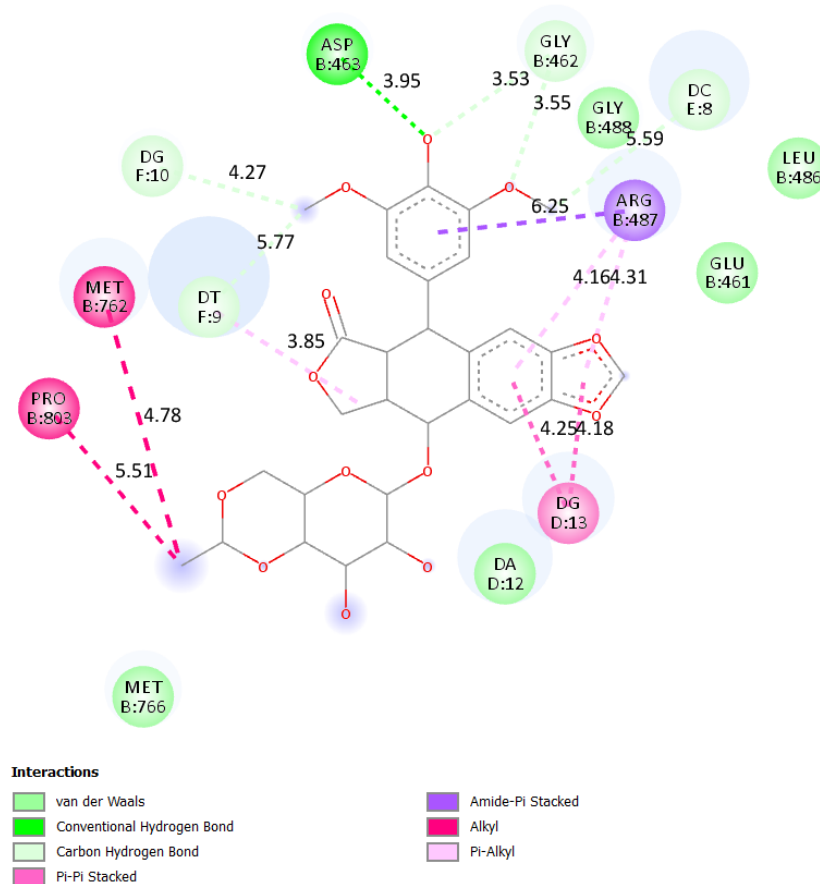
Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao analisar a Tabela 7, observou-se que o ligante etoposídeo apresentou menor energia livre de ligação ($-11.2 \text{ Kcal mol}^{-1}$) e menor constante de afinidade (6.18 nM) quando comparado com os derivados espiro-acridínicos. Dentre os derivados espiro-acridínicos os três melhores foram AMTAC-23, 22 e 21 com energia livre de ligação -10.91 , -10.56 , $-10.37 \text{ Kcal mol}^{-1}$ e constante de afinidade 10.11, 18.08 e 25.19 nM, respectivamente.

Quando comparadas as séries ACMD e AMTAC, é notável que os AMTAC's apresentaram maior afinidade em relação ao alvo, sendo justificado pela presença de valores menores de energia livre de ligação e constante de afinidade que inclusive se aproximam dos valores do ligante etoposídeo, com destaque para o AMTAC-23.

Na sequência (Figura 27), observa-se interações entre o ligante etoposídeo em seu sítio de ligação no alvo topoisomerase II α em que se pode destacar uma ligação de hidrogênio convencional com o resíduo Arg463 e cinco ligações carbono-hidrogênio com Gly462, DC E:8, DG F:10 e DT F:9. Adicionalmente demonstrou-se interações π - π *stacked* (DG D:13), π -alquil (Arg487 e DT F:9), Amida π -stacked (Arg 487) e alquil (Met762 e Pro803). Sendo notável uma quantidade favorável de ligações de hidrogênio.

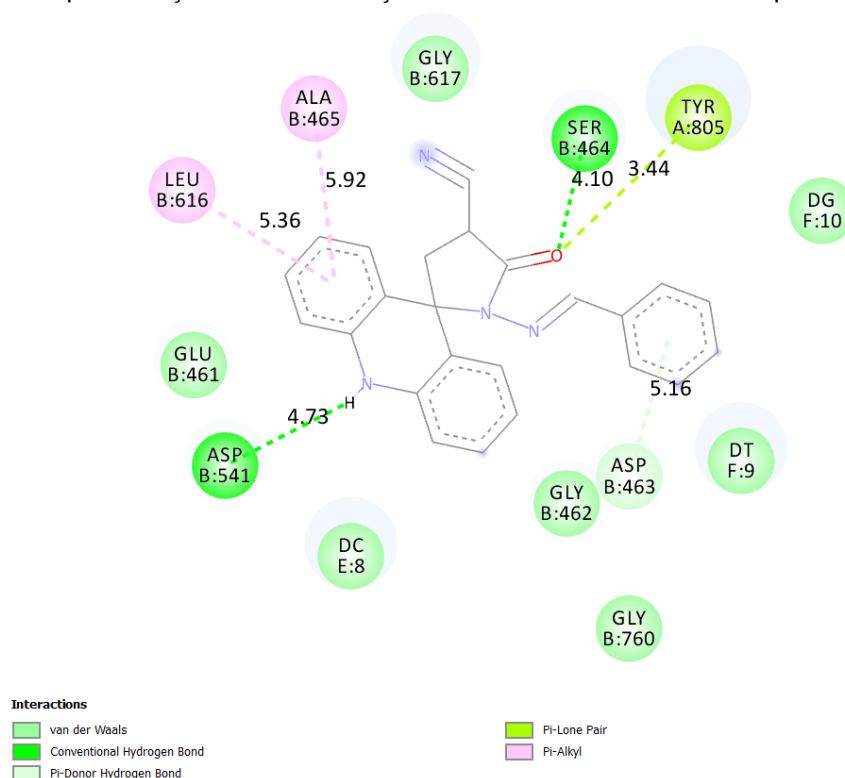
Figura 27 – Representação 2D das interações entre o ligante Etoposídeo e o alvo topoisomerase II α .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Visto que os compostos em estudo foram baseados nas estruturas do AMTAC-01 e AMTAC-06, é importante observar os tipos de interações realizadas e com quais resíduos. Gouveia e colaboradores (2018) realizaram *docking* molecular utilizando o alvo Topo II α -DNA (PDB ID 5GWK), de modo que é válida a comparação. O AMTAC-06 demonstrou interações π -alquil (Arg487) e π - π stacked (DT-9 e DA-12). Já o trabalho de Almeida e colaboradores (2016) não apresentam resultados de *docking* molecular, por este motivo o composto AMTAC-01 foi incluído nos estudos. Na Figura 28 observou-se interações convencionais de hidrogênio (Asp541, Ser464), π -doador de ligação de hidrogênio (Asp463), π -alquil (Leu616, Ala465) e π -par de elétrons livres (Tyr805). Pode-se destacar que AMTAC-06 apresenta interação π -alquil (Arg487) e AMTAC-01 interage com o resíduo Asp463 que constituem resíduos importantes para o desempenho do ligante etoposídeo.

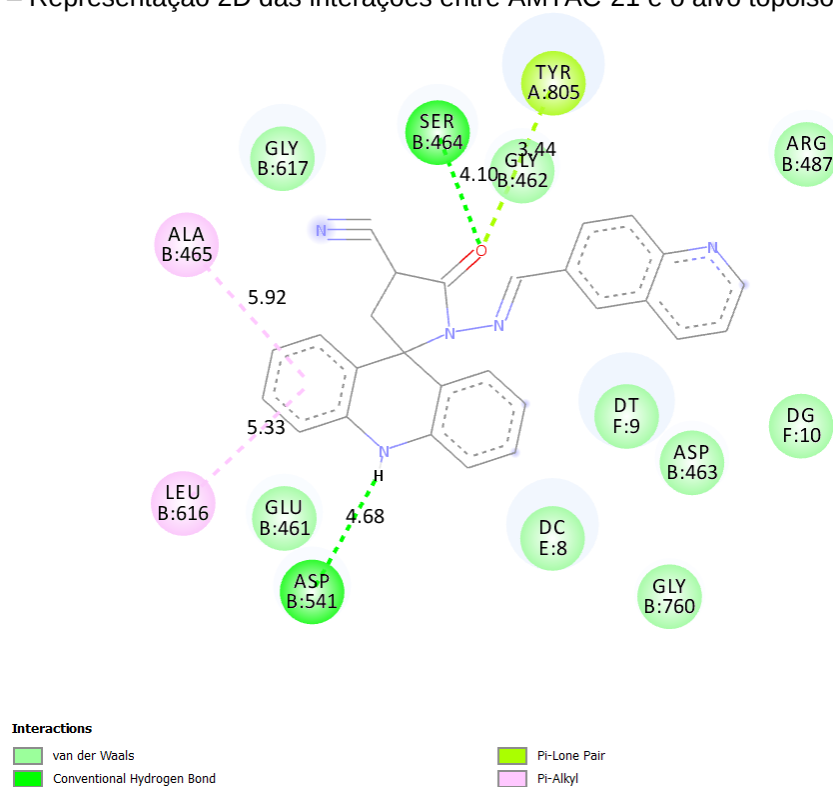
Figura 28 – Representação 2D das interações entre AMTAC-01 e o alvo topoisomerase II α .



Fonte: Elaborado pelo autor.

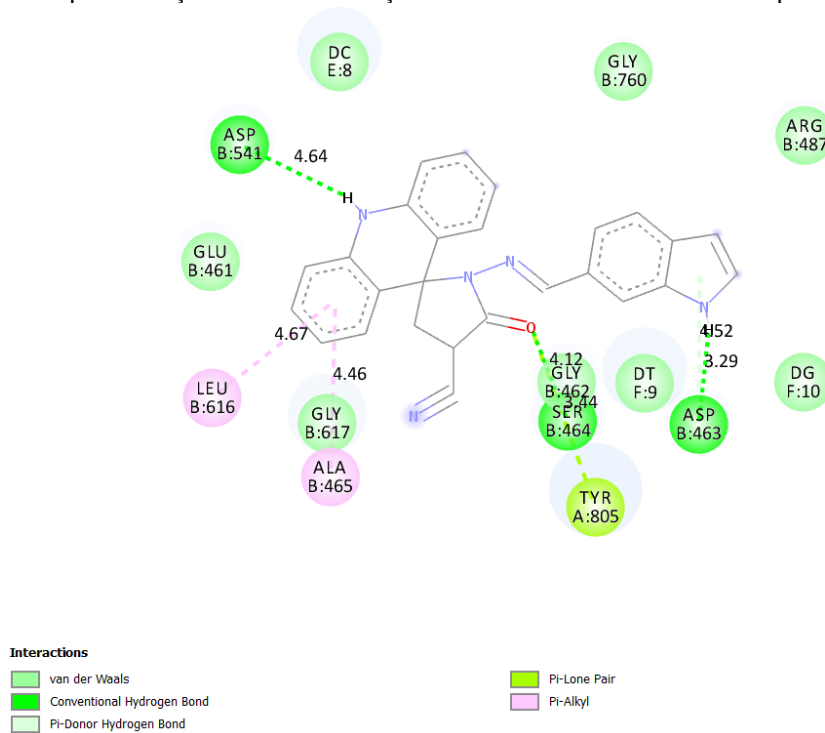
Nas Figuras 29, 30 e 31 demonstra-se as interações realizadas pelos compostos AMTAC-21, AMTAC-22 e AMTAC-23. Nota-se que o AMTAC-21 apresenta ligações de hidrogênio convencionais (Asp541, Ser464), π -par de elétrons livres (Tyr805) e π -alquil (Ala465, Leu616). O AMTAC-22 por sua vez, ligações de hidrogênio convencionais (Asp541, Ser464, Asp463), π -doador de ligação de hidrogênio (Asp463), π -par de elétrons livres (Tyr805) e π -alquil (Ala465, Leu616). Por fim, AMTAC-23 demonstrou ligações de hidrogênio convencionais (Asp541, Ser464), carbono-hidrogênio (Asp463), π -par de elétrons livres (Tyr805), π -ânion (Asp541), π -alquil (Ala465, Leu616) e Alquil (Arg487).

Figura 29 – Representação 2D das interações entre AMTAC-21 e o alvo topoisomerase II α .



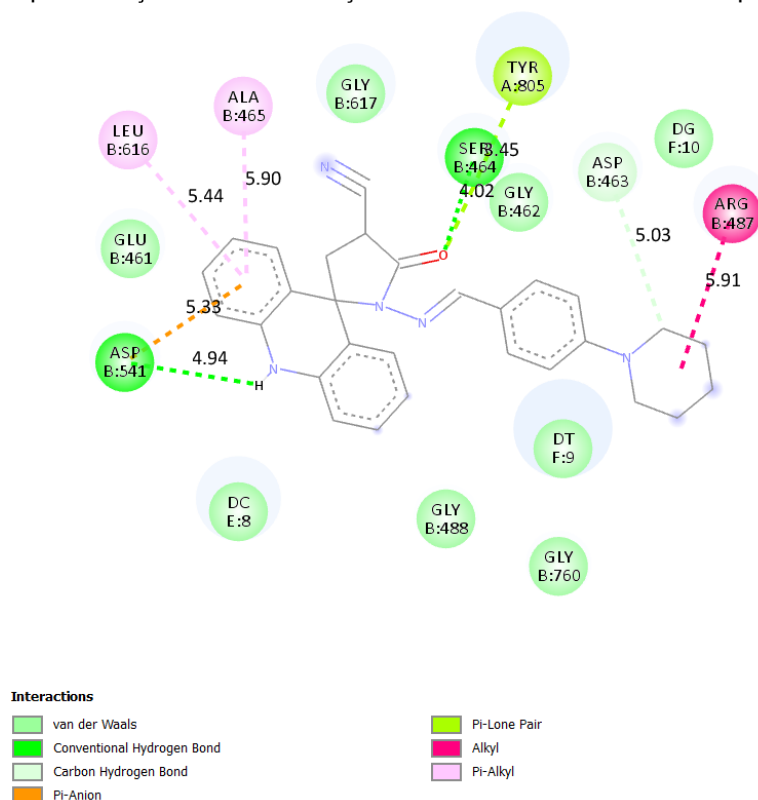
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 – Representação 2D das interações entre AMTAC-22 e o alvo topoisomerase II α .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 – Representação 2D das interações entre AMTAC-23 e o alvo topoisomerase II α



Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando AMTAC-21 e AMTAC-01 é notável a semelhança dos tipos de interações e os resíduos que participaram das mesmas, porém o AMTAC-01 apresenta uma ligação π -doador de hidrogênio com Asp463 adicional que provavelmente não foi favorável, já que o AMTAC-21 teve melhor desempenho, como observado anteriormente o ligante etoposídeo realizou interação com o mesmo resíduo, porém por meio de uma ligação de hidrogênio convencional que demonstrou-se mais adequada. Tal fato é comprovado pelos resultados do AMTAC-22 no alvo, pois este exibiu as mesmas interações que o AMTAC-01, porém como realizou adicionalmente uma ligação de hidrogênio convencional com Asp463 foi superior ao AMTAC-01 e AMTAC-21, mostrando vantagem na combinação dos dois tipos de interação em relação a esse resíduo.

Entre os compostos em estudo, o AMTAC-23 demonstrou o melhor desempenho, apresentando energia livre de ligação e constante de inibição próximas do ligante etoposídeo. No lugar de uma ligação de hidrogênio convencional com Asp463 como realizado pelo etoposídeo e o AMTAC-22, foi observada uma ligação carbono-hidrogênio. Adicionalmente, nota-se interação π -ânion com Asp541 e alquil

com Arg487, ligações π -alquil com Arg487 foram executadas pelo etoposídeo e o AMTAC-06, logo é importante para a performance nesse alvo.

5.1.2 Alvo DNA (PDB ID 1G3X)

Na Tabela 8, estão descritos os resultados de *docking* das moléculas de núcleo acridínico obtidos para o DNA isolado como alvo terapêutico.

Tabela 8 – Docking molecular com derivados espiro-acridínicos no alvo DNA (PDB ID 1G3X) para as séries ACMD e AMTAC.

DERIVADOS ACRIDÍNICOS	ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO (K _{CAL} mol ⁻¹)	CONSTANTE DE AFINIDADE (nM ^A , μ M ^B)
ACMD-01	-8.07	1.22 ^b
ACMD-02	-9.07	225.25 ^a
ACMD-03	-8.40	694.07 ^a
ACMD-04	-8.37	737.63 ^a
ACMD-05	-7.36	4.06 ^b
ACMD-06	-8.63	474.46 ^a
AMTAC-01	-9.29	155.89 ^a
AMTAC-02	-9.40	129.58 ^a
AMTAC-04	-9.42	125.32 ^a
AMTAC-15	-9.94	51.98 ^a
AMTAC-17	-9.95	51.08 ^a
AMTAC-18	-9.42	124.06 ^a
AMTAC-19	-9.68	79.82 ^a
AMTAC-21	-10.08	41.05 ^a
AMTAC-22	-9.73	73.82 ^a
AMTAC-23	-10.40	23.73 ^a
LIGANTE 9-ACRIDINA	-6.99	7.58 ^b

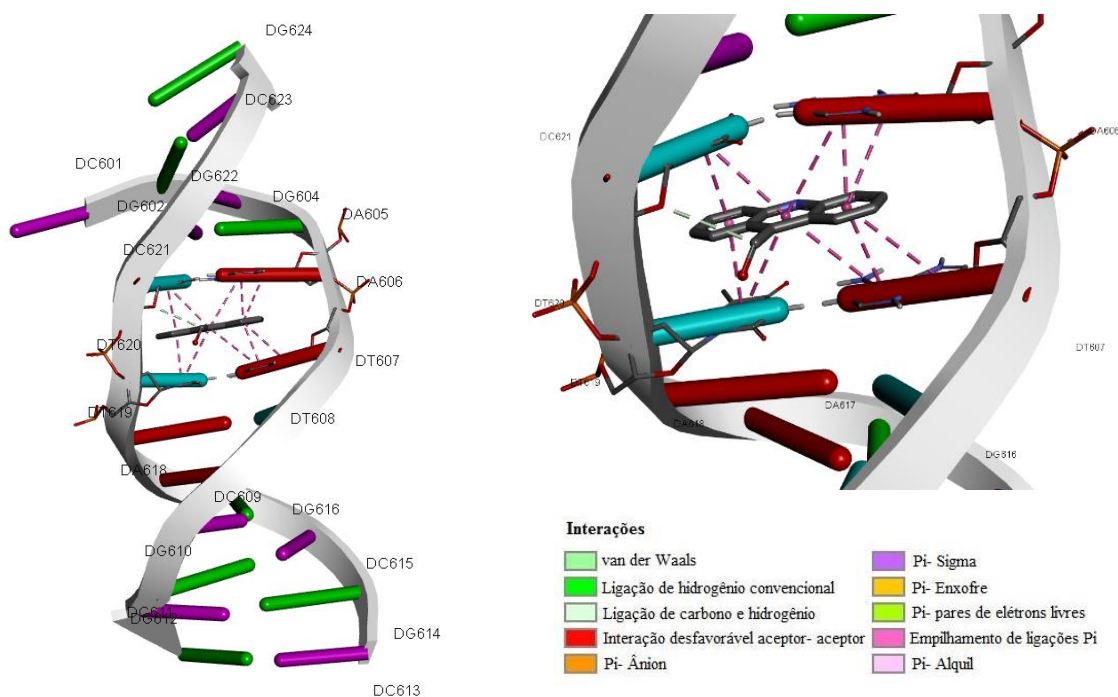
Fonte: Elaborado pelo autor.

Sendo essa energia inferior a todos os derivados avaliados nesse estudo, ao observar a Tabela 8, pontua-se que a acridina, ligante co-cristalizado, apresenta maior energia livre de ligação com -6.99 Kcal mol⁻¹ e valor de constante de afinidade 7.58 μ M, quando comparado com os compostos em estudo. Dentre os derivados espiro-acridínicos, destacam-se AMTAC-23, AMTAC-21 e AMTAC-17 com energia livre de ligação -10.40, -10.08, -9.95 Kcal mol⁻¹ e constante de afinidade 23.73, 41.05 e 51.08 nM, respectivamente. Assim como observado anteriormente para topoisomerase II α -

DNA, ao comparar as séries AMTAC e ACMD, os AMTAC's demonstraram maior afinidade em relação ao DNA.

Através da Figura 32, pode-se dizer que a acridina realiza majoritariamente interações do tipo π - π *stacked* em relação ao DNA, mais precisamente com os resíduos das seguintes bases nitrogenadas: DA605, DA606, DT620 e DT619, assim como uma ligação carbono-hidrogênio com DT620. Como os outros compostos no estudo realizado demonstraram-se mais promissores, devido aos valores menores de energia livre de ligação e constante de afinidade, pode-se justificar tais resultados devido a interações adicionais com o alvo.

Figura 32 – Representação 3D das interações entre Acridina com o alvo DNA.

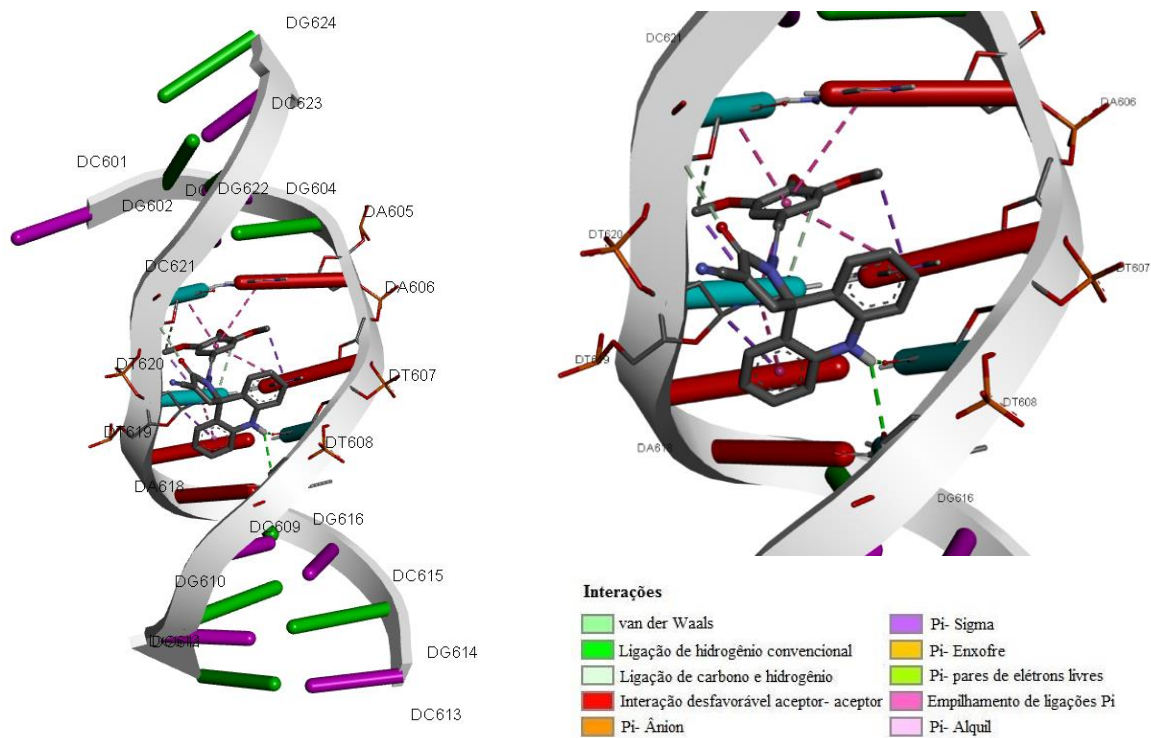


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas figuras 33, 34 e 35 estão demonstradas as interações realizadas pelos compostos AMTAC-17, AMTAC-21 e AMTAC-23. Nota-se que o AMTAC-17 apresentou ligações de hidrogênio convencionais (DT607 e DT608), carbono-hidrogênio (DT620), π - π *stacked* (DA605, DA606, DT619 e DT620) e π -sigma (DA606 e DT619). O AMTAC-21 por sua vez, apresentou ligações de hidrogênio convencional (DT607), carbono-hidrogênio (DT620), π - π *stacked* (DA605, DA606, DT619 e DT620) e π -sigma (DT619). Finalmente, o AMTAC 23 exibiu ligações de hidrogênio

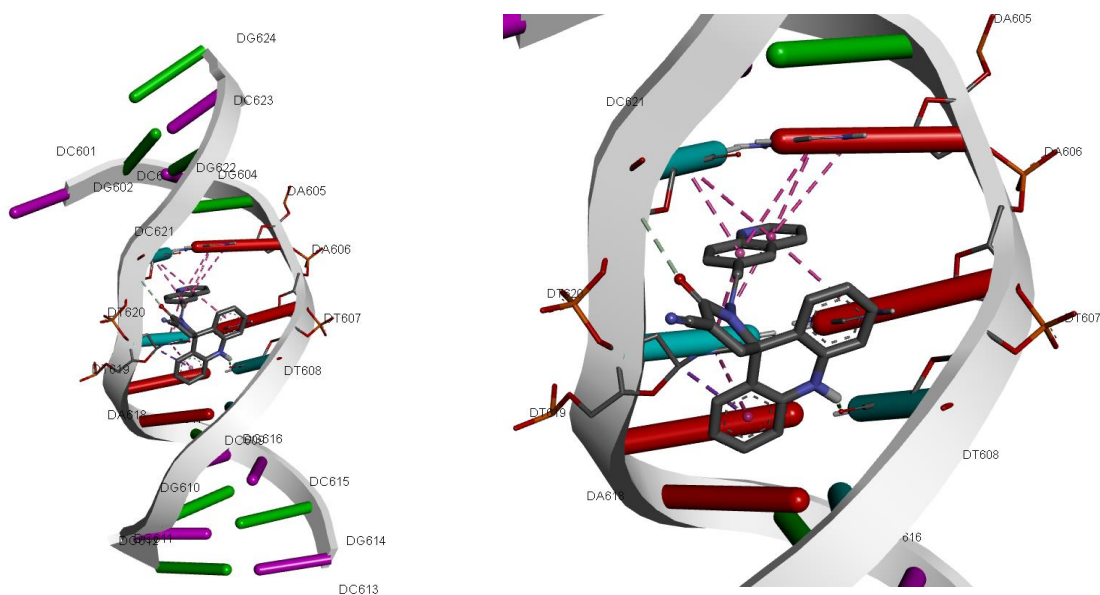
convencionais (DA606 e DT620), carbono-hidrogênio (DA605, DA606 e DT608) e π - π stacked (DA605, DA606, DT619 e DT620).

Figura 33 – Representação 3D das interações entre o composto AMTAC-17 com o alvo DNA.



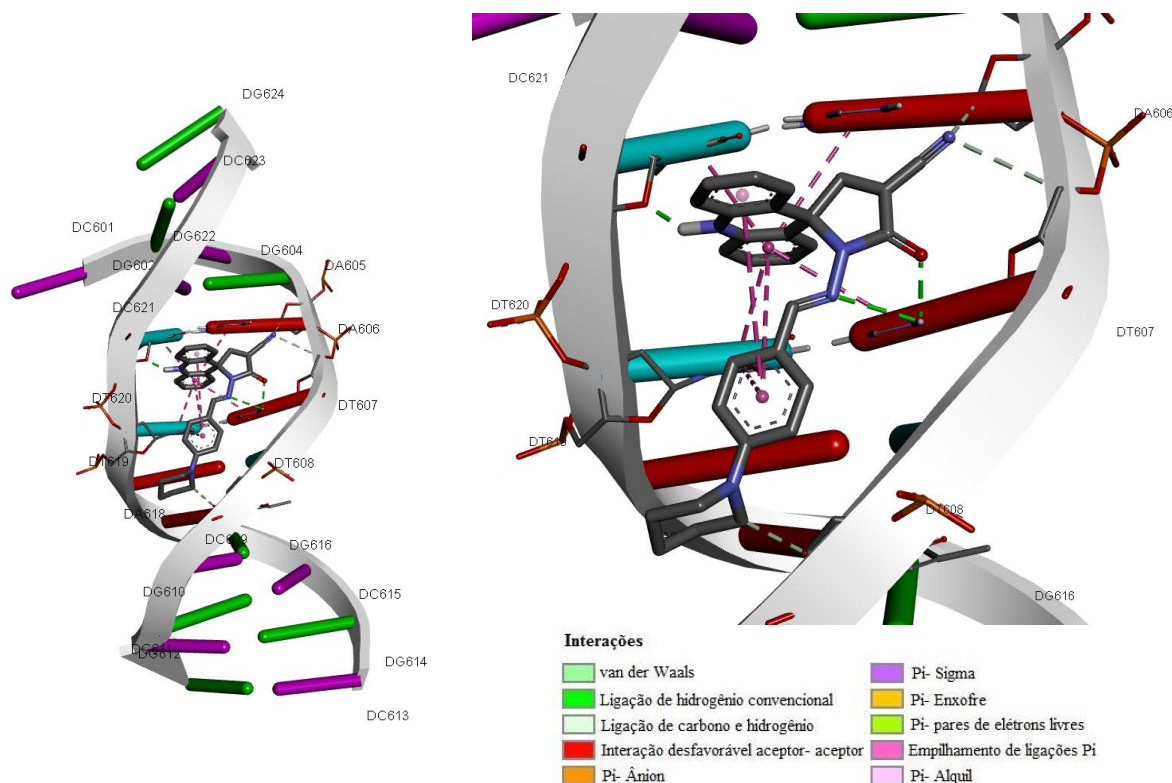
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34 – Representação 3D das interações entre o composto AMTAC-21 com o alvo DNA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 – Representação 3D das interações entre o composto AMTAC-23 com o alvo DNA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O AMTAC-17 executou interações π - π *stacked* e carbono-hidrogênio com os mesmos resíduos de bases nitrogenadas que o ligante acridina, apresentando adicionalmente ligações convencionais de hidrogênio com DT607 e DT608 e π -sigma com DA606 e DT619, o que justifica superior afinidade quando comparado com a acridina. Porém, o AMTAC-21 por apresentar maior número de ligações π - π *stacked* cuja presença é fundamental para o processo de interação com o DNA, obteve melhor performance no alvo. O AMTAC-23 demonstrou melhor desempenho em relação aos outros compostos em estudo, com menores valores de energia livre de ligação e constante de afinidade. Tal atuação é justificada pela presença de ligações π - π *stacked*, mas além disso foi observado maior número de ligações convencionais de hidrogênio e carbono-hidrogênio, assim como não foi realizado interações π -sigma, fato que pode ser relevante visto que ao comparar os três melhores compostos, a afinidade aumentou com redução de interações desse tipo. Em contraste com maior afinidade diretamente proporcional ao aumento de ligações de hidrogênio.

Mediante os resultados apresentados nos estudos preliminares de *docking* molecular e a potencialidade já descrita na literatura dos derivados acridínicos, decidiu-se por realizar a síntese de todos os compostos planejados e posterior

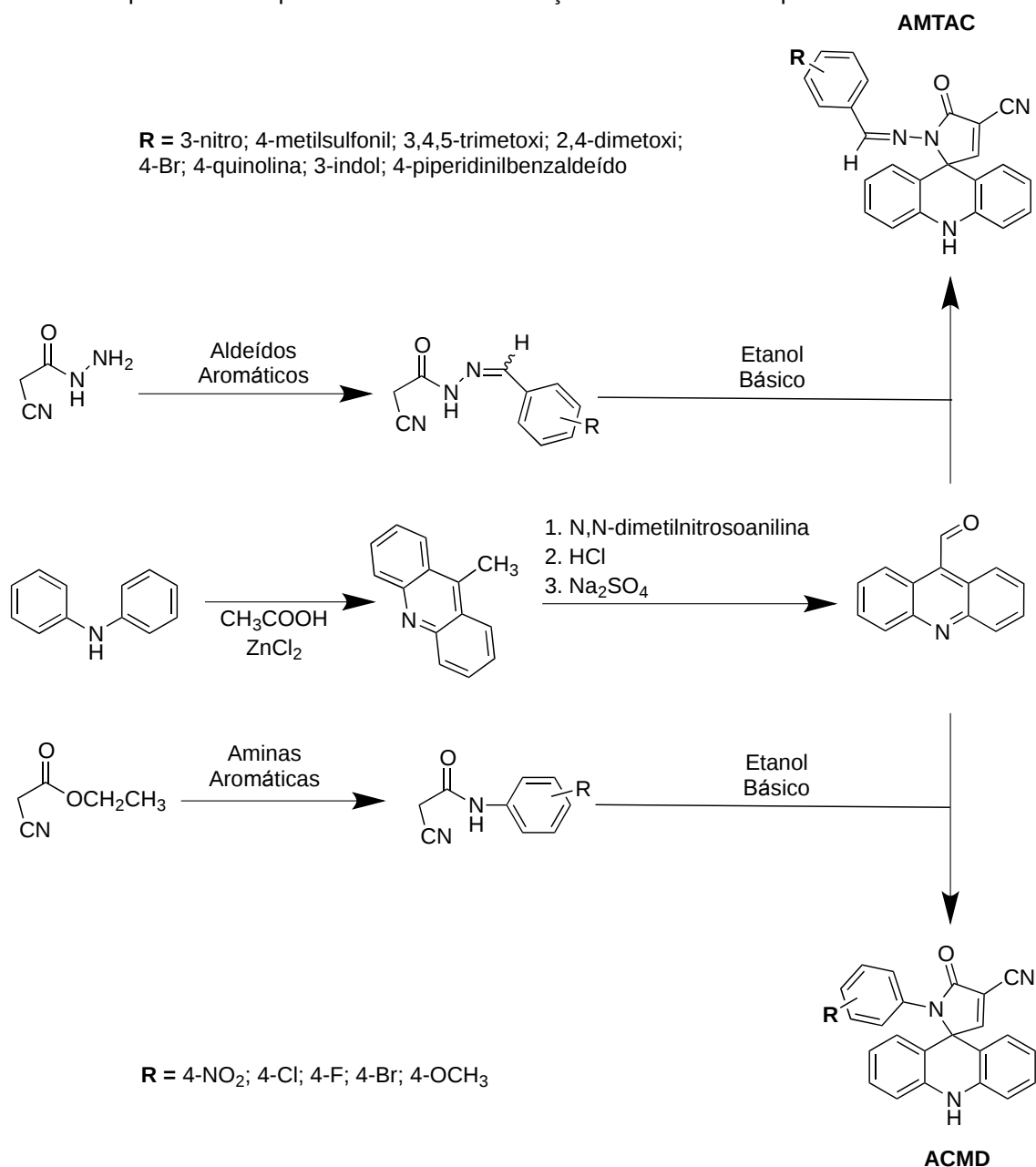
avaliação em diferentes linhagens celulares tentando confrontar os dados de *docking* com os resultados biológicos *in vitro* e validar o DNA e Topo/DNA como possíveis alvos terapêuticos.

5.2 ESTUDO QUÍMICO

5.2.1 Descrição dos novos derivados espiro-acridínicos

A rota sintética empregada para a obtenção dos derivados espiro-acridínicos foi por via paralela e convergente, onde se realizou a síntese dos intermediários 2-ciano-*N'*-(benzilideno)acetohidrazida (JR's) e 2-ciano-*N*-(fenil)acetamida (JM's) e do aldeído acridínico. Para a obtenção dos JR's partimos da 2-ciano-acetohidrazida que foi condensada com diferentes aldeídos aromáticos em meio etanólico e básico. Já a série dos JM's ocorreu por meio de uma reação de amidação, partindo do 2-ciano-acetato de etila com diferentes anilinas aromáticas em DMF a 160 °C. Para a síntese do aldeído acridínico partimos da difenilamina que sofreu uma reação de acilação seguida de ciclização em meio ácido, obtendo-se o derivado 9-metilacridínico que após sucessivas oxidações obtivemos o derivado 9-carboxialdeído-acridínico. Para obtenção dos derivados espiro-acridínicos partimos do aldeído acridínico que foi condensado com os intermediários JR's e JM's em meio etanólico e básico que sofreram ciclização espontânea conduzindo aos derivados finais de acordo com o esquema seguinte.

Esquema 4 – Esquema reacional de obtenção dos derivados espiro-acridínicos.



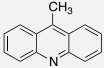
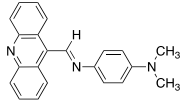
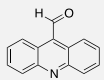
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Síntese e caracterização dos novos derivados espiro-acridínicos

Tendo em vista os resultados dos estudos *in silico* para o desenvolvimento de novas moléculas com finalidade terapêutica contra o câncer, foram sintetizados todos os novos derivados espiro-acridínicos propostos, onde esses foram avaliados frente a diferentes linhagens celulares tumorais, como também serão futuramente avaliadas suas interações com o DNA, para escolha da molécula mais promissora para ensaios de inibição das topoisomerasas.

Inicialmente, foi sintetizado o núcleo da acridina, partindo pela 9-metil- acridina (AC-01) seguido de oxidação conduzindo ao ACN-01, onde este sofre hidrólise à acridina-9-carboxaldeído (AC-02), conforme descrito na metodologia desse estudo e suas características físico-químicas se encontram dispostas na tabela a seguir.

Tabela 9 – Obtenção do AC-01, ACN-01 e AC-02

DERIVADOS ACRIDÍNICOS	ESTRUTURA	TEMPO (H)*	REND. (%)	LOG P**
AC-01		8	68	4,03
ACN-01		8	74	5,69
AC-02		6	82	3,29

*Sistema de eluição n-hexano: AcOEt nas proporções 7:3

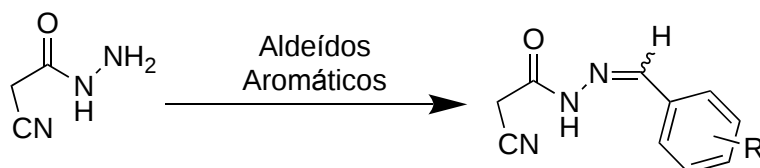
**Log P teórico calculado pelo programa ChemDrawUltra versão 16.0

Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor do rendimento previamente mostrado na Tabela 9 para o AC-01, foi de 68 %, condizente com o valor reportado na literatura por Moura e colaboradores (2009). A síntese da 9-metil-acridina, foi realizada de acordo com Tsuge e colaboradores (1963) a partir do ácido acético, cloreto de zinco e difenilamina. Com a obtenção da 9-metilacridina, foi realizado o processo de oxidação desta com N,N-dimetil-4-nitrosoanilina em meio etanólico que apresentou rendimento de 74%, estando de acordo com a literatura e, por fim, sua hidrólise em meio ácido levando a formação da 9-carboxi-aldeído acridina com 82 % de rendimento. Na Tabela 5 também estão descritas as características físico-químicas da acridina-9-carboxaldeído, (AC-02). O composto obtido AC-02 apresentou-se na forma de sólido amorfo amarelo rendimento satisfatório de 82 %, faixa de fusão com oscilação de 3 °C, e R_f (fator de retenção) de 0,6 no sistema n-hexano/ AcOEt 6:4. Exemplos de trabalhos recentes que utilizaram esse mecanismo reacional para formação inicial do anel 9-metil-acridina são de Barros et al. (2012), Lafayette et al. (2013), Almeida et al. (2015; 2016), e para o aldeído de acridina Gouveia et al. (2018) e Silva et al. (2020).

Os intermediários *N*-acilhidrazônicos foram obtidos a partir de uma reação de condensação seguida de desidratação. A reação em meio etanólico e catalisada por ácido acético ocorreu inicialmente através da transferência simultânea de próton e adição nucleofílica, proporcionando a condensação e por fim há uma desidratação conduzindo a formação do composto esperado (Esquema 1, página 43). Na sequência (Tabela 10), encontram-se os intermediários obtidos.

Tabela 10 – Intermediários obtidos da série 2-ciano-*N*'-benzilideno-acetohidrazida (JR's)



JR's	Aldeídos Aromáticos	Intermediários	Tempo (h)	Rendimento* (%)	Log P**
JR-04			6	97,99 ^b	0,37
JR-10			6	76,19 ^a	1,77
JR-11			6	82,28 ^b	1,54

Tabela 10: Continuação

JR-16			6	57,68 ^a	0,50
JR-18			6	76,42 ^b	2,66
JR-19			6	70,20 ^b	0,99
JR-20			6	89,10 ^b	2,68
JR-23			6	74,46 ^b	1,90

*Sistema de eluição n-hexano: AcOEt nas proporções (a) 1:1; (b) 6:4 e (c) 7:3

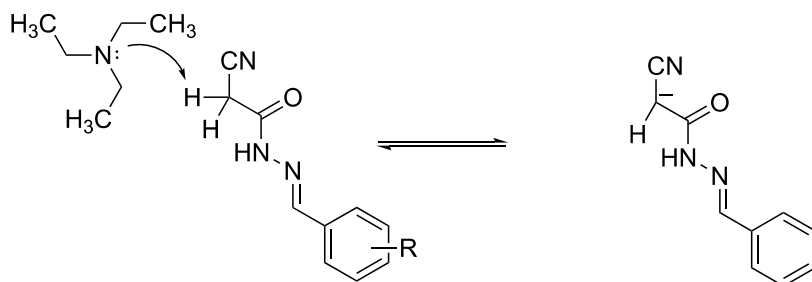
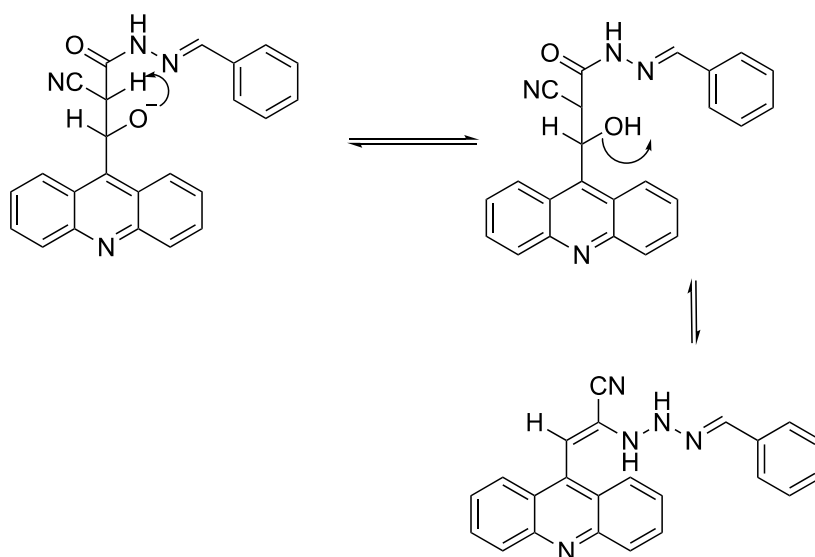
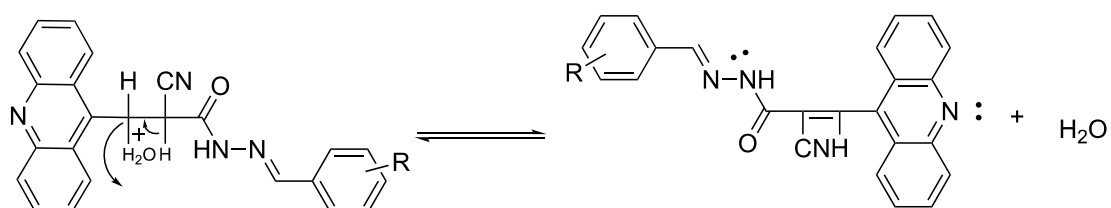
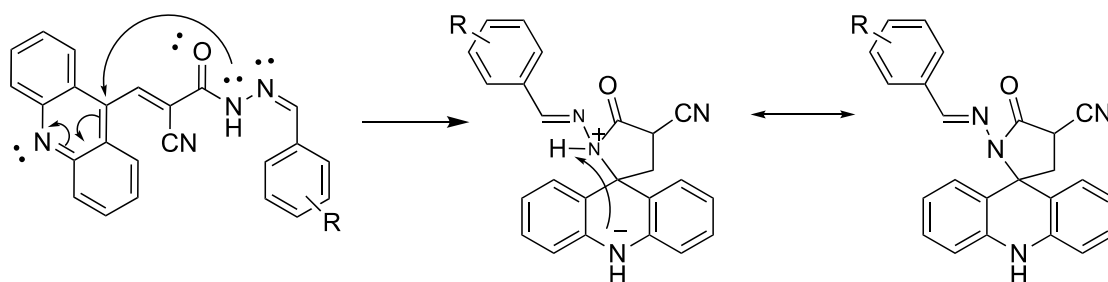
**Log P teórico calculado pelo programa ChemDrawUltra versão 16.0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dando continuidade a síntese do trabalho, foram sintetizados os compostos finais dos intermediários JR's exibidos anterior que foram denominados de AMTAC's. Foi proposta uma reação de condensação do tipo Knoevenagel, que consiste na reação entre um composto carbonílico (aldeídos ou cetonas) e outro contendo o grupo metileno ativado, resultando na formação do aducto com uma ligação dupla carbono-carbono (CUNHA & SANTANA, 2012).

Logo, em meio etanólico e catalisada por trietilamina, a reação ocorreu em três etapas: (i) na primeira etapa ocorreu a ionização do derivado *N*-acilhidrazônico. Na etapa subsequente, (ii) ocorreu a condensação do íon com o AC-02, e por fim, (iii) há uma desidratação conduzindo a formação do composto esperado, que em seguida sofre uma ciclização espontânea que pode ser observada no Esquema seguinte.

Esquema 5 – Mecanismo reacional para a obtenção dos derivados espiro-acridínicos.

1ª Etapa**2ª Etapa****3ª Etapa****Ciclização Espontânea**

Fonte: Elaborado pelo autor.

As características físico-químicas da série 1'-(benzilidenoamino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC's) estão dispostas na tabela 11.

Tabela 11 – Derivados finais sintetizados da série AMTAC e suas respectivas características físico-químicas

AMTAC	Intermediário	Produto	Tempo (h)	Rendimento* (%)	Log P**
02			3	70,40 ^c	3,39
04			3	88,07 ^a	3,36
15			3	61,62 ^b	3,32
17			3	81,28 ^b	3,14
18			3	43,67 ^b	3,27
19			3	72,40 ^c	4,35
21			3	90,88 ^a	3,60
22			3	53,24 ^a	3,12
23			3	35,87 ^b	4,54

*Sistema de eluição n-hexano: AcOEt nas proporções (a) 1:1; (b) 6:4 e (c) 7:3

**Log P teórico calculado pelo programa ChemDrawUltra versão 16.0

Fonte: Elaborado pelo autor.

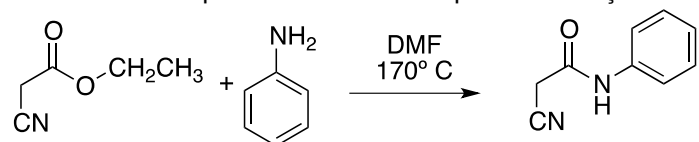
Os derivados da série AMTAC foram sintetizados de maneira satisfatória, visto que seus rendimentos foram superiores a 40 %, sendo o maior 90,88 % (AMTAC-21), exceto o AMTAC-23, que apresentou rendimento de 35,87 %, no qual pode estar atribuído a erros no processo de purificação. Entretanto, a maioria dos compostos

demonstraram viabilidade da rota utilizada, associado à facilidade de purificação, que foi realizada apenas por filtração, lavagem com EtOH e recristalização dos precipitados obtidos. As faixas de fusão oscilaram entre 1 e 3 °C, bem como seus *R_f*'s foram acima de 0,43. O sistema de eluição utilizado para os compostos foi n-hexano/ AcOEt nas proporções 1:1; 6:4 e 7:3. Todos os compostos foram obtidos na forma de sólido amorfo, com coloração característica de cada um como: amarelo, marrom e laranja.

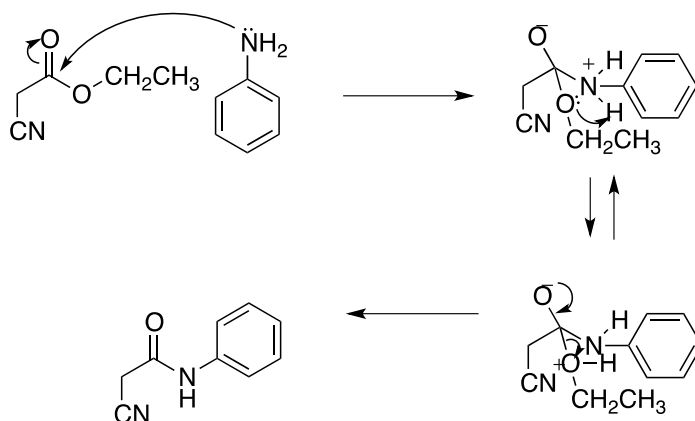
Também foram sintetizados uma nova série de intermediários a partir do 2-ciano-*N*-fenilacetamida (JMs) que ocorreu através de uma reação de amidação como mostrado no Esquema 6.

Nesse mecanismo, proposto por Silva e colaboradores (2018), inicialmente ocorre a ressonância da carbonila favorecendo um ataque nucleofílico dos pares de elétrons livre do nitrogênio da anilina ao carbono da carbonila da função éster 2-cianoacetato de etila. Em seguida, o nitrogênio transfere um hidrogênio para o oxigênio da função éster em um processo chamado de prototropismo produzindo o íon etanólico e, por conseguinte, sua eliminação na forma da molécula de etanol, chegando à formação da amida.

Esquema 6 – Esquema reacional e provável mecanismo para a obtenção do intermediário JM-01.



MECANISMO REACIONAL



JM-01

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os intermediários da série JM foram sintetizados, porém seus rendimentos não foram tão satisfatórios, pois apresentaram valores inferiores a 50 %, exceto o maior 76,12 % (JM-01), no qual pode estar atribuído a influência do substituinte no anel aromático, e/ou erros no procedimento de purificação.

Entretanto, a maioria dos compostos demonstraram viabilidade da rota utilizada, associado à facilidade de purificação, que foi realizada apenas por filtração, lavagem com EtOH e recristalização dos precipitados obtidos.

As faixas de fusão de oscilaram entre 1 e 3 °C, bem como seus R_f foram acima de 0,40. O sistema de eluição utilizado para os compostos foi n-hexano/ AcOEt nas proporções 1:1; 6:4 e 7:3. (Tabela 12). Vale salientar que o intermediário JM-01 foi ressintetizado, pois o mesmo já se encontra elucidado no trabalho de Silva et al. (2018)

Tabela 12 – Intermediários obtidos da série 2-ciano-N'-benzilideno-acetohidrazida (JM's) com suas respectivas características físico-químicas

JM	Amina Aromáticas	Intermediário	Tempo (H)	Rendimento* (%)	Log P**
01			24	76,12	1,14
02			24	28,83	0,52
03			24	34,40	1,70
04			24	42,02	1,30
05			24	34,91	1,97
06			24	21,43	1,02

*Sistema de eluição n-hexano: AcOEt nas proporções (a) 1:1; (b) 6:4 e (c) 7:3

**Log P teórico calculado pelo programa ChemDrawUltra versão 16.0

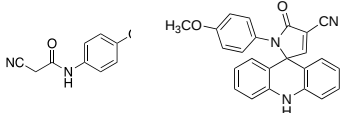
Fonte: Elaborado pelo autor.

Semelhante ao mecanismo dos AMTAC's os derivados finais da série ACMD, foram obtidos a partir dos intermediários apresentados anteriormente na Tabela 12, partindo de uma reação de condensação do tipo Knoevenagel, onde um composto carbonílico (aldeídos ou cetonas) e outro contendo o grupo metileno ativado, interagem resultando na formação de um novo composto que apresenta uma ligação dupla carbono-carbono (C=C), na presença de uma base, onde foi utilizada a trietilamina (NEt₃).

A maioria dos derivados da série ACMD foram sintetizados de maneira satisfatória, visto que seus rendimentos foram superiores a 50 %, sendo o maior 87,20 % (ACMD-02), exceto o ACMD-03, que apresentou rendimento de 30,91 %, no qual pode estar atribuído a erros no processo de purificação. Entretanto, a maioria dos compostos demonstraram viabilidade da rota utilizada, associado à facilidade de purificação, que foi realizada apenas por filtração, lavagem com EtOH e recristalização dos precipitados obtidos. As faixas de fusão de oscilaram entre 1 e 3 °C, bem como seus R_fs foram acima de 0,50. O sistema de eluição utilizado para os compostos foi n-hexano/ AcOEt nas proporções 1:1; 6:4 e 7:3. Todos os compostos foram obtidos na forma de sólido amorfo, com coloração característica de cada um como amarelo, marrom e laranja (Tabela 13).

Tabela 13 – Derivados finais sintetizados da série ACMD e suas respectivas características físico-químicas

ACMD	Intermediário	Produto	Tempo (h)	Rendimento* (%)	Log P**
01			3	74,67	4,09
02			3	87,20	4,92
03			3	30,91	4,65
04			3	68,58	4,25
05			3	48,69	3,81

06		3	69,01	3,97
-----------	---	----------	--------------	-------------

*Sistema de eluição n-hexano: AcOEt nas proporções (a) 1:1; (b) 6:4 e (c) 7:3

**Log P teórico calculado pelo programa ChemDrawUltra versão 16.0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Da mesma maneira como observado na série AMTAC, as rotas demonstradas para os derivados sintetizados da série ACDM apresentaram boa viabilidade de síntese. Um fator que favoreceu essas rotas pode estar associado à facilidade de purificação, que foi realizada apenas por filtração, seguido de recristalização em EtOH dos precipitados obtidos, evitando a demanda de longa duração para purificação na coluna de sílica e perda de produto final.

Quanto às faixas de fusão dos derivados das duas séries sintetizadas, foi observado pouca oscilação variando de 1 a 3º C, levando a acreditar que foram obtidas moléculas com certo grau de pureza, já que a faixa de variação não apresentou intervalos longos dentre os derivados obtido. Os fatores de retenção (*R_f*s) foram realizados em vários sistemas n-hexano/ AcOEt buscando um valor mais centralizado e as concentrações variaram em 1:1; 6:4 e 7:3.

Quanto aos valores de Log P, todos os valores aqui apresentados tanto para a série AMTAC quanto ACMD, foram teóricos calculados pelo programa *ChemDraw* 16.0, onde os mesmos ficaram abaixo de 5, variando de 3,12 a 4,92. Os derivados mais hidrofílicos estão dentro da faixa estabelecida pela regra de Lipinski, que preconiza que uma molécula para ser um bom fármaco deve apresentar valores de Log P abaixo de cinco, entretanto, outros parâmetros como: massa molecular menor ou igual a 500 g/mol; aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a cinco.

O AMCD-02 apresentou um Log P = 4,92, sendo um dos mais elevados quando comparados com os outros derivados aqui apresentados, o que demonstra uma maior hidrofobicidade diante dos demais. Todos os derivados apresentaram massa molecular menor que 500 g/mol, além das moléculas citadas se enquadrarem na quantidade de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio.

5.2.3 Identificação e caracterização química dos derivados

Os novos derivados espiro-acridínicos, foram identificados e caracterizados a partir das técnicas de espectrometria de massas (EM), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , representados nas tabelas seguintes e com os respectivos espectros nos anexos.

5.2.3.1 Espectrometria de Massas (EM)

Nas tabelas abaixo (14 e 15), podem ser observados os dados das massas exatas dos íons moleculares, tanto dos valores obtidos quanto dos calculados para os produtos finais desse estudo AMTAC's e ACMD's. Todos os derivados tiveram uma diferença entre a massa calculada e a massa encontrada de seus íons moleculares menor ou igual a 1, o que é consideravelmente aceitável, demonstrando que o íon molecular é de fato um íon estável.

Tabela 14 – Dados das massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados dos AMTAC's.

AMTAC	MASSA CALCULADA	M/Z	MASSA ENCONTRADA
04	421,4076	422,1208 (26,0%), 423,1242 (3,2%)	421,8431
15	454,5004	455,1133 (27,0%), 456,1058 (4,5%)	454,0050
17	466,4880	467,1675 (29,2%), 468,1708 (4,1%)	467,0608
18	436,4620	437,1569 (28,1%), 438,1603 (3,8%)	436,9372
19	455,3061	456,0409 (97,3%), 455,0463 (26,0%)	454,8836
21	427,4568	428,1467 (29,2%), 429,1500 (4,1%)	427,8930
22	415,4461	416,1467 (28,1%), 417,1500 (3,8%)	415,8606
23	459,5417	460,2093 (31,4%), 461,2126 (4,7%)	456,0856

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 15 – Dados das massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados dos ACMD's.

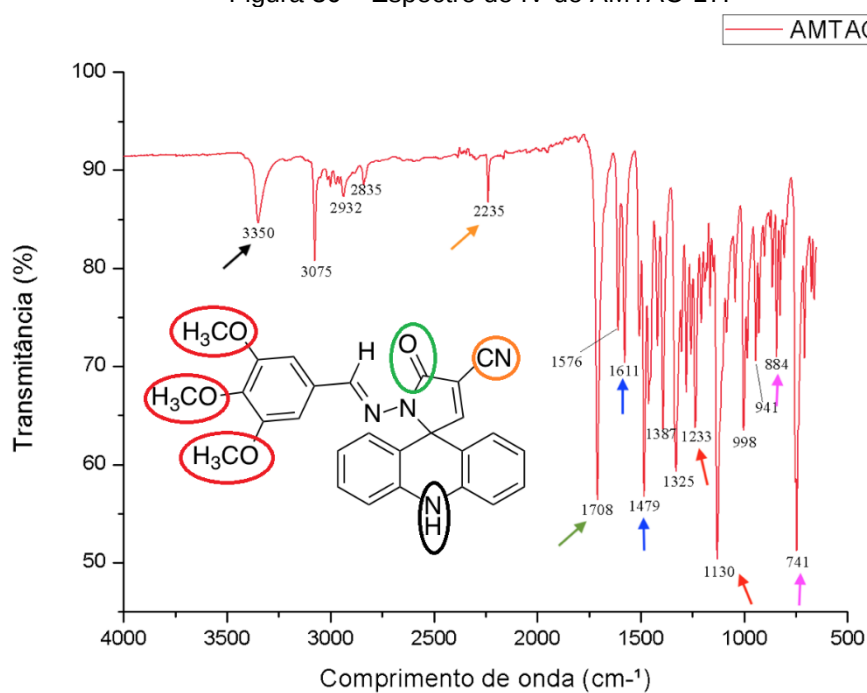
ACMD	MASSA CALCULADA	M/Z	MASSA ENCONTRADA
01	349,3847	3501249 (24,9%), 351,1282 (3,0%)	350,1168
02	428,2808	429.0300 (97,3%), 428.0354 (24,9%)	427,7819
04	367,3752	368,1154 (24,9%), 369,1188 (3,0%)	367,6224
06	379,4107	380,1354 (26,0%), 381,1388 (3,2%)	379,6972

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Na Figura 36, encontra-se o espectro de IV do AMTAC-17, no qual foi observado uma banda de pouca intensidade em 3.350 cm^{-1} sugestivo da ligação N-H. Foram vistas bandas em 2.235 e 1.708 cm^{-1} sugestivas para grupos nitrila e carbonila, respectivamente, e ainda bandas em 1.611 e 1.479 sugestivas para C=C de aromáticos. Também foram encontradas absorções em 1.223 e 1.130 cm^{-1} o que sugere estiramento de Ar-OCH₃, e ainda em 884 e 741 (estiramento C-H de aromático). Todos os valores das absorções de IV para os compostos da série AMTAC estão sumarizados na Tabela 16.

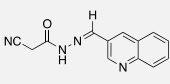
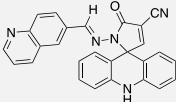
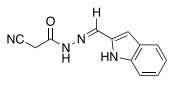
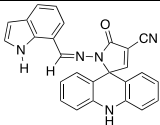
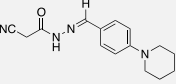
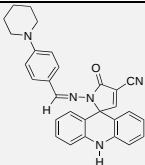
Figura 36 – Espectro de IV do AMTAC-17.



Assim como o AMTAC-17, os demais derivados dessa série também apresentaram bandas características de seus grupos funcionais como observado na Tabela seguinte.

Tabela 16 – Dados espectrais de IV da série AMTAC.

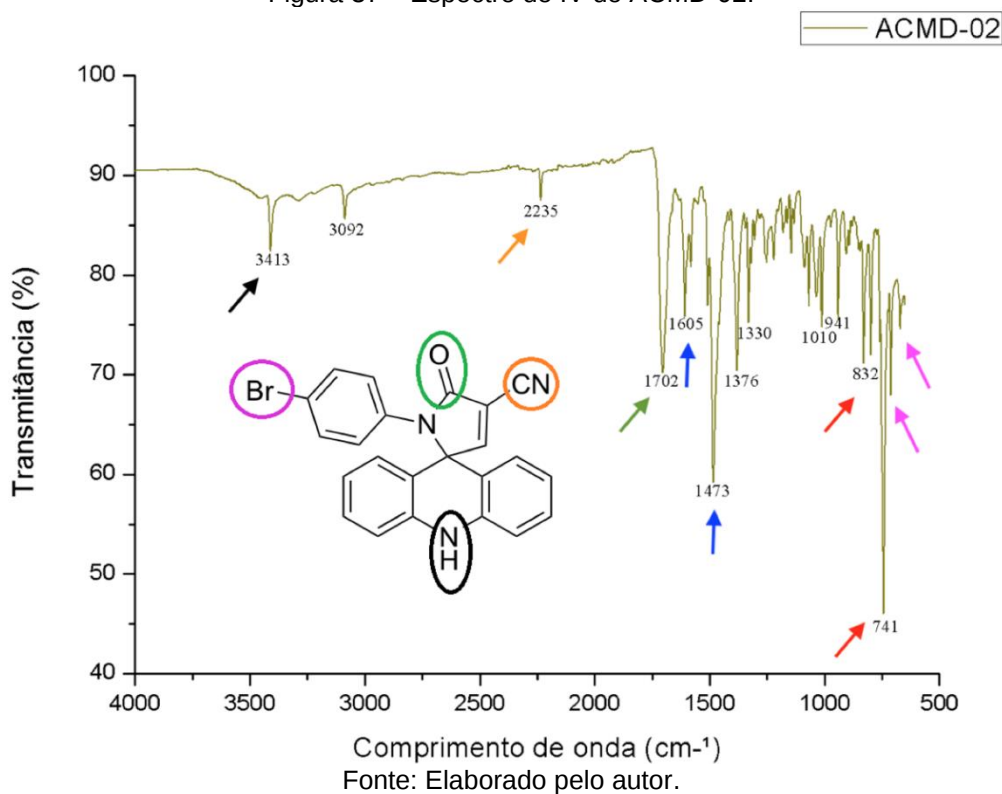
AMTAC	Intermediário	Produto	Tempo (h)	Rendimento o* (%)	Log P**
02			3	70,40 ^c	3,39
04			3	88,07 ^a	3,36
15			3	61,62 ^b	3,32
17			3	81,28 ^b	3,14
18			3	43,67 ^b	3,27
19			3	72,40 ^c	4,35

21			3	90,88^a	3,60
22			3	53,24^a	3,12
23			3	35,87^b	4,54

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 37 encontra-se o espectro de IV do ACMD-02, onde foi observado uma banda de pouca intensidade em 3.413 cm^{-1} sugestivo da ligação N-H. Aparecem bandas em 2.235 e 1.679 cm^{-1} sugestivas para grupos nitrila e carbonila, respectivamente, e ainda bandas em 1.611 e 1.479 sugestivas para C=C de aromáticos. Também foram encontradas as absorções em 832 (dobramento C-H de aromático) e 741 (dobramento C-H fora do plano de aromático monossustituído). Os valores das absorções de IV para os compostos da série ACMD estão sumarizados na Tabela 17.

Figura 37 – Espectro de IV do ACMD-02.



Na Tabela 17, encontram-se os dados referentes as bandas de absorção dos derivados da série ACMD, onde podemos observar os sinais característicos dos grupos funcionais esperados para essas estruturas coincidindo com os valores encontrados por Silva e colaboradores (2018).

Tabela 17 – Dados espectrais de IV da série ACMD.

ACMD	IV (valores em cm^{-1})
02	3413 (estiramento N-H amida secundária); 2235 (estiramento CN); 1702 (estiramento C=O); 1606 (dobramento N-H); 1473 (estiramento C=C de aromático); 832 (dobramento =C-H); 741 (dobramento C-H fora do plano de aromático monossustituído).
04	3298 (estiramento N-H amida secundária); 2240 (estiramento CN); 1679 (estiramento C=O); 1611 (estiramento C=C de aromático); 1336-1085 (dobramento de C-F); 838 (dobramento =C-H); 747 (dobramento C-H fora do plano de aromático monossustituído).
06	3304 (estiramento N-H amida secundária); 3092 (estiramento =C-H alceno); 2235 (estiramento CN); 1679 (estiramento C=O); 1611 e 1479 (estiramento C=C de aromático); 1249 e 1085 (dobramento de ArOCH_3); 832 (dobramento =C-H); 753 (dobramento C-H fora do plano de aromático monossustituído).

Fonte: Elaborado pelo autor.

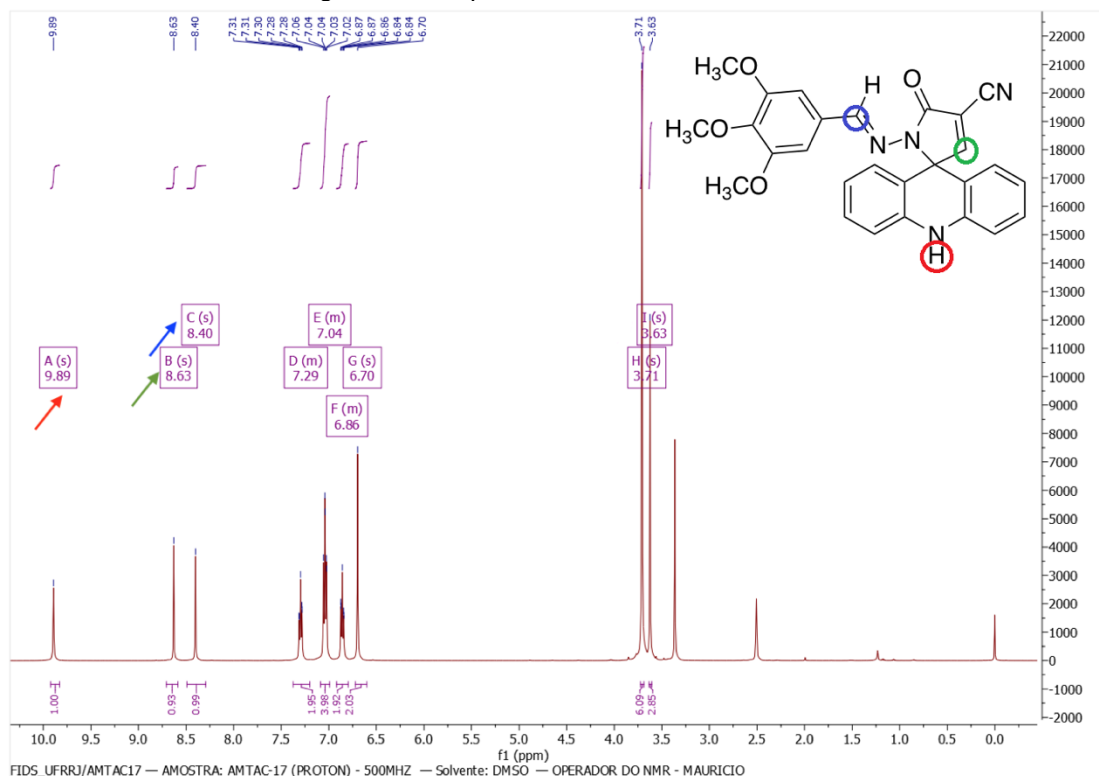
5.2.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Na caracterização dos derivados da série AMTAC e ACMD, alguns pontos importantes na elucidação estrutural dos mesmos foram observados através da análise de RMN de ^1H . Nesses espectros apareceram para ambas as séries, simpletos, referentes ao grupo NH, os quais apresentaram deslocamento químico com variação de 9,79 a 11,49 ppm (integral para 1 hidrogênio em cada pico). Outro ponto importante presente nos nossos derivados, foi a presença dos prótons isolados sugestivos da formação da ligação C=C (vinílico) e C=N (imínico), que apresentaram variações de deslocamentos 8,37 a 8,93 ppm e 8,15 a 8,74 ppm, respectivamente. Além disso, em todos os espectros analisados se observaram sinais de duplete (d) e multiplete (m) na região característica de grupamentos aromáticos e da acridina,

corroborando com os resultados de Almeida e colaboradores (2016) para série AMTAC e com Silva e colaboradores (2018) para a série ACMD.

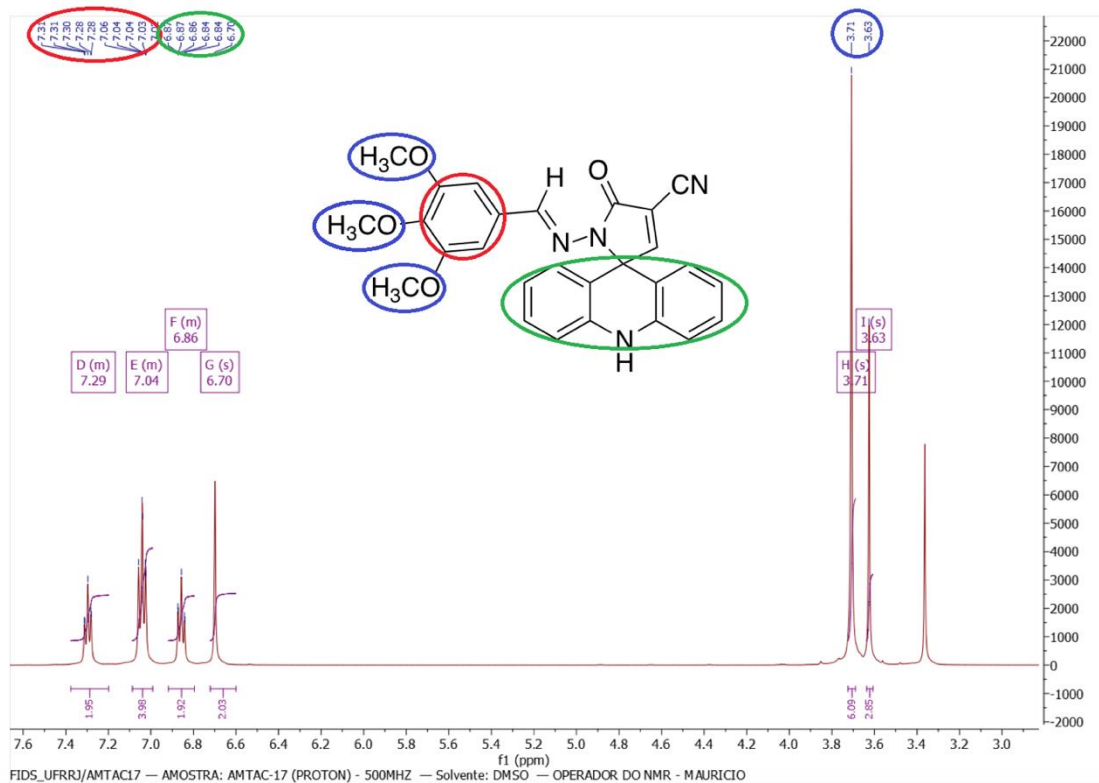
A seguir encontra-se o espectro de RMN de ^1H do AMTAC-17 (Figura 38), e os dados espectrais de RMN ^1H (δ em ppm) dos demais derivados dessa série (Tabelas 18 e 19).

Figura 38 – Espectro de RMN ^1H AMTAC-17.



Como pode ser observado no espectro do AMTAC-17, o primeiro simpleto apresentou sinal em 9,82 ppm sugestivo para o grupamento NH, os simpletos subsequentes se apresentaram em 8,63 e 8,40 ppm, sugestivos para os grupamentos vinílico e imínico, respectivamente. Os outros sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático e do anel acridínico, encontram-se ampliados na Figura 39.

Figura 39 – Espectro de RMN 1H AMTAC-17 ampliado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como observado na Figura anterior, nas regiões de deslocamento químico entre 7,29 – 6,86, sugere-se sinais característicos do anel acridínico na forma de multipletos correspondente a oito hidrogênios. Já o deslocamento em 6,70, apresenta dois hidrogênios sugestivos do anel aromático não acridínico. Por fim, nas regiões de 3,71 contendo seis hidrogênios e 3,63 contendo três hidrogênios são correspondentes dos grupos metoxilas ligados ao anel aromático não acridinas.

Assim como o AMTAC-17, os demais derivados dessa série também apresentaram deslocamentos químicos para os átomos de hidrogênio correspondentes as estruturas esperadas, podendo ser observado nas Tabelas seguintes.

Tabela 18 – Dados espectrais de RMN de ¹H (δ, DMSO-d₆, 300 MHz) da série AMTAC.

AMTAC	DESLOCAMENTO (ppm)
04	δ = 9,88 (s, 1H, NH); 8,51 (s, 1H, CH); 8,40 (s, 1H, N=CH); 8,12 (m, 2H, aromático); 7,76 (m, 1H, aromático); 7,59 (m, 1H, aromático); 7,28 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,01 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,85 (m, 2H, espiro-acridínico).

15	δ = 9,88 (s,1H,NH); 8,51 (s,1H, CH); 8,30 (s, 1H, N=CH); 7,83 (d, CH aromático, J = 9 Hz); 7,58 (d, CH, aromático, J = 9 Hz); 7,28 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,00 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,84 (m, 2H, espiro-acridínico); 3,10 (s, 3H, CH ₃).
19	δ = 9,84 (s,1H, NH); 8,45 (s,1H, CH); 8,24 (s, 1H, N=CH); 7,47 (m, 2H, aromático); 7,45 (d, 2H, aromático, J = 8,4 Hz); 7,26 (m, 2H, aromático/ 2H espiro-acridínico); 6,98 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,83 (m, 2H, espiro-acridínico).
21	δ = 10,10 (s,1H,NH); 9,76 (s,1H, NH); 8,80 (m, 1H, quinolina); 8,74 (s, 1H, NH); 8,59 (s, 1H, N=CH); 7,97 (m, 1H, quinolina); 7,73 (m, 1H, quinolina); 7,54 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,30 – 7,07 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,87 (m, 2H, espiro-acridínico).
22	δ = 11,49 (s,1H,NH); 9,79 (s,1H, NH); 8,93 (s, 1H, CH); 8,45 (s, 1H, N=CH); 7,62 (m, 2H, indol); 7,34 (m, 1H, indol); 7,26 (m, 2H, indol); 7,11 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,05 – 6,93 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,85 (m, 2H, espiro-acridínico).
23	δ = 9,79 (s,1H,NH); 8,37 (s, 1H, CH); 8,15 (s, 1H, N=CH); 7,25 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,15 (d, 2H, aromático, J = 8,7 Hz); 6,99 (d, 2H, espiro-acridínico, J = 8,1 Hz); 6,99 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,84 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,77 (d, 2H, aromático, J = 8,7Hz); 3,14 (s, 4H, piperidinil); 1,47 (s, 6H, piperidinil).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 19 – Dados espectrais de RMN de ¹H (δ , DMSO-d₆, 500 MHz) da série AMTAC.

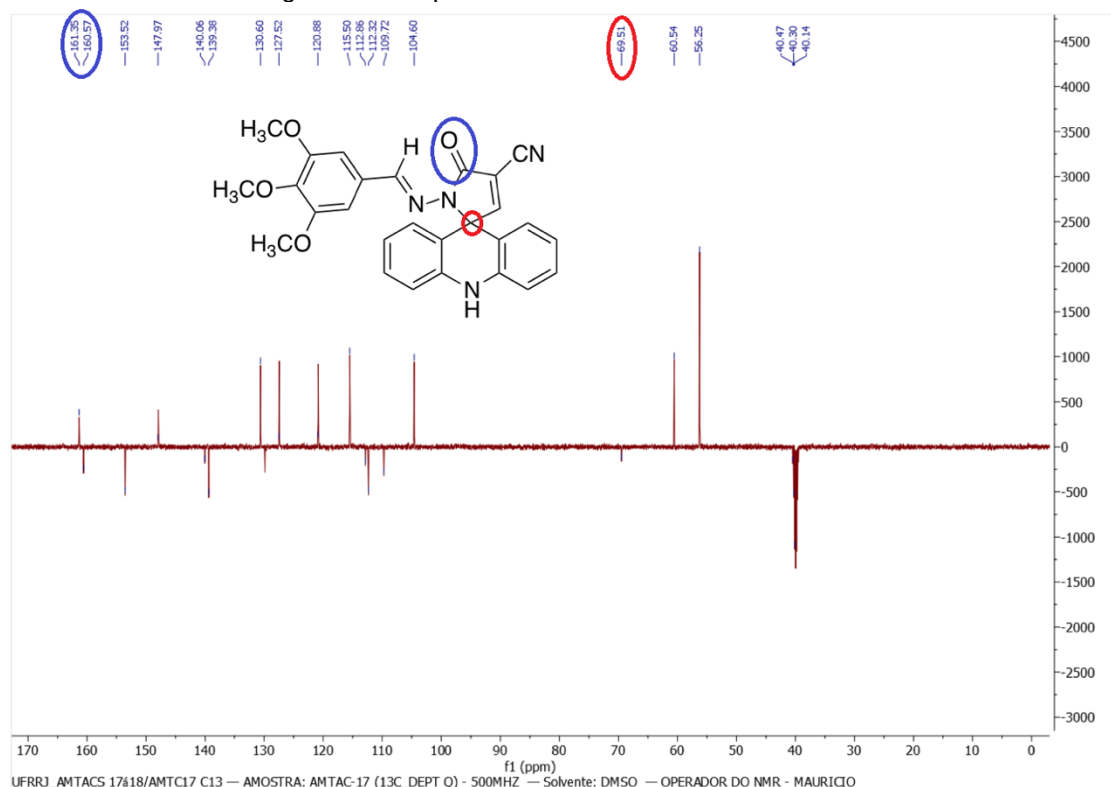
AMTAC	DESLOCAMENTO (ppm)
17	δ = 9,89 (s, 1H, NH); 8,63 (s, 1H, CH); 8,40 (s, 1H, N=CH); 7,29 (m, 2H, acridínico); 7,04 (m, 4H, acridínico); 6,86 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,70 (s, 2H, aromático); 3,71 (s, 6H, OCH ₃); 3,63 (s, 3H, OCH ₃).
18	δ = 9,83 (s,1H, NH); 8,51 (s, 1H, CH); 8,50 (s, 1H, N=CH); 7,40 (m, 1H, aromático); 7,26 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,97 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,81 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,47 (m, 2H, aromático); 3,72 (s, 6H, OCH ₃); 3,71 (s, 3H, OCH ₃).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos espectros de RMN de ¹³C da série AMTAC, os sinais mostrados nos deslocamentos entre 69,02 a 69,72 evidenciaram a presença de carbono quaternário, o qual demonstrou a ocorrência da ciclização espontânea das moléculas de acordo com o reportado na literatura por Vilkova et al. (2014), Almeida et al. (2016).

Os deslocamentos dos carbonos referentes à carbonila (C=O) aparecem nos sinais entre 160,82 a 163,25 ppm. Abaixo se encontra o espectro de RMN de ^{13}C do AMTAC-17 (Figura 40), seguido das Tabelas 20 e 21 com os dados espectrais de RMN de ^{13}C para série AMTAC.

Figura 40 – Espectro de RMN de ^{13}C do AMTAC-17.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 20 – Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 300 MHz) da série AMTAC.

AMTAC'S	DESLOCAMENTO (ppm)
04	$\delta = 161,4(\text{C}, \text{C}=\text{O}); 148,5 (\text{C}, \text{C}=\text{C}); 145,2 (\text{C}, \text{Ar}); 139,0 (\text{C}, \text{Ar}); 135,7 (\text{C}, \text{Ar}); 133,4 (\text{C}, \text{Ar}); 131,0 (\text{C}, \text{Ar}); 130,8 (\text{C}, \text{Ar}); 127,3(\text{C}, \text{Ar}); 125,2 (\text{C}, \text{Ar}); 121,1 (\text{C}, \text{Ar}); 121,0 (\text{C}, \text{Ar}); 115,6 (\text{C}, \text{Ar}); 112,5 (\text{C}, \text{CN}); 111,3 (\text{C}, \text{Ar}); 108,5 (\text{adjacente a CN}); 69,4 (\text{C}, \text{sp}^3).$
15	$\delta = 162,3 (\text{C}, \text{C}=\text{O}); 161,5 (\text{C}, \text{C}=\text{C}); 146,5 (\text{C}, \text{Ar}); 145,5 (\text{C}, \text{Ar}); 142,1 (\text{C}, \text{Ar}); 138,9 (\text{C}, \text{Ar}); 138,6 (\text{C}, \text{Ar}); 130,8 (\text{C}, \text{Ar}); 128,0 (\text{C}, \text{Ar}); 127,3(\text{C}, \text{Ar}); 121,1 (\text{C}, \text{Ar}); 115,6 (\text{C}, \text{Ar}); 112,5 (\text{C}, \text{CN}); 111,3 (\text{C}, \text{Ar}); 108,5 (\text{adjacente a CN}); 69,3 (\text{C}, \text{sp}^3), 43,2 (\text{C}, \text{CH}_2); 42,7 (\text{C}, \text{CH}_3 \text{ metil-sulfonil}).$
19	$\delta = 161,2 (\text{C}, \text{C}=\text{O}); 161,5 (\text{C}, \text{C}=\text{C}); 146,3 (\text{C}, \text{Ar}); 145,5 (\text{C}, \text{Ar}); 138,9 (\text{C}, \text{Ar}); 133,1 (\text{C}, \text{Ar}); 132,3 (\text{C}, \text{Ar}); 130,7 (\text{C}, \text{Ar}); 129,0 (\text{C}, \text{Ar}); 127,3 (\text{C}, \text{Ar}); 124,4 (\text{C}, \text{Ar}); 121,0 (\text{C}, \text{Ar}); 115,6$

	(C, Ar); 112,5 (C, CN); 111,4 (C, Ar); 108,4 (adjacente a CN); 69,3 (C, sp ³).
21	δ = 161,5 (C, C=O); 161,3 (C, C=C); 150,8 (C, Ar); 148,6 (C, Ar); 143,5 (C, Ar); 139,1 (C, Ar); 137,0 (C, Ar); 130,9 (C, Ar); 130,2 (C, Ar); 127,9 (C, Ar); 124,7 (C, Ar); 121,0 (C, Ar); 120,1 (C, Ar); 115,6 (C, Ar); 112,7 (C, CN); 111,5 (C, Ar); 104,4 (adjacente a CN); 69,3 (C, sp ³).
22	δ = 161,6 (C, C=O); 160,8 (C, C=C); 148,8 (C, Ar); 139,2 (C, Ar); 137,2 (C, Ar); 131,7 (C, Ar); 130,2 (C, Ar); 127,3 (C, Ar); 124,1 (C, Ar); 123,1 (C, Ar); 122,1 (C, Ar); 120,6 (C, Ar); 115,4 (C, Ar); 112,9 (C, CN); 111,8 (C, Ar); 110,0 (adjacente a CN); 69,7 (C, sp ³).
23	δ = 160,8 (C, C=O); 160,7 (C, C=C); 153,0 (C, Ar); 149,4 (C, Ar); 138,9 (C, Ar); 130,6 (C, Ar); 128,8 (C, Ar); 127,2 (C, Ar); 124,4 (C, Ar); 122,5 (C, Ar); 120,9 (C, Ar); 115,5 (C, Ar); 112,8 (C, CN); 111,8 (C, Ar); 108,4 (adjacente a CN); 69,7 (C, sp ³); 24,2 (C, extremidade do piperidinil)

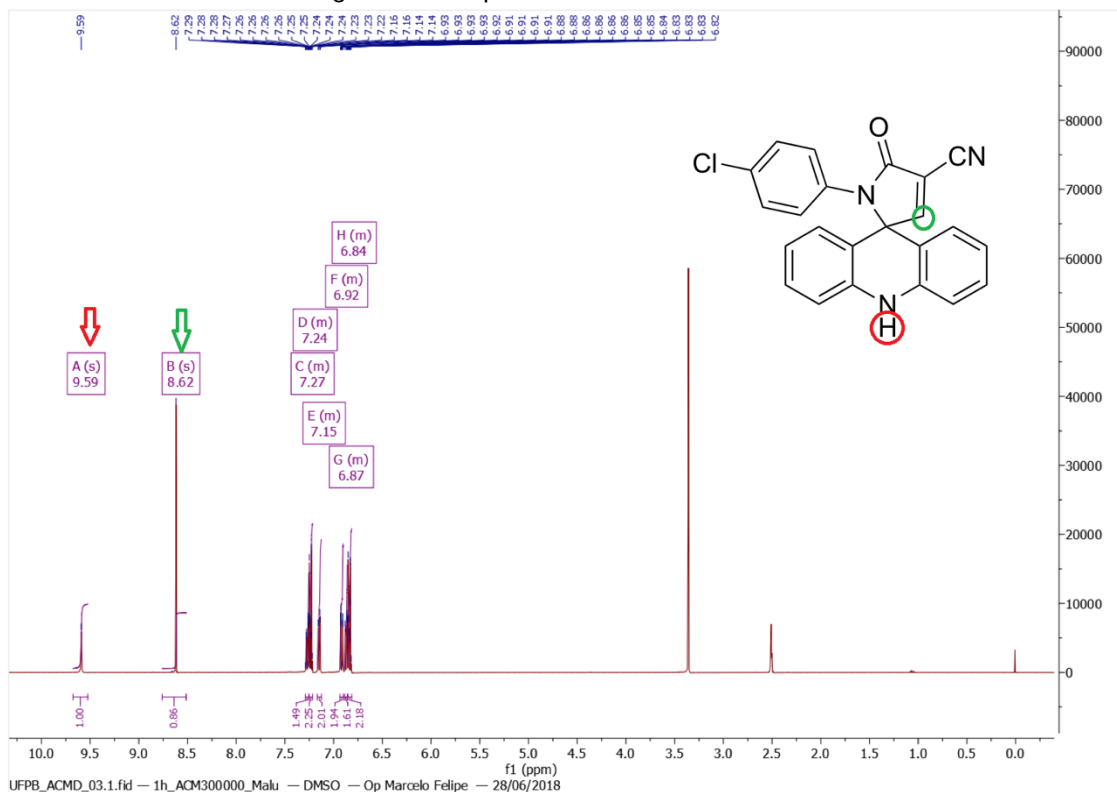
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 21 – Dados dos espectros de RMN de ¹³C (δ , DMSO-d₆, 500 MHz) da série AMTAC.

AMTAC	DESLOCAMENTO (ppm)
17	δ = 161,6 (C, C=O); 160,8 (C, C=C); 148,8 (C, Ar); 139,2 (C, Ar); 137,2 (C, Ar); 131,7 (C, Ar); 130,2 (C, Ar); 127,3 (C, Ar); 124,1 (C, Ar); 123,1 (C, Ar); 122,1 (C, Ar); 120,6 (C, Ar); 115,4 (C, Ar); 112,9 (C, CN); 111,8 (C, Ar); 110,0 (adjacente a CN); 69,7 (C, sp ³).
18	δ = 163,2 (C, C=O); 160,8 (C, C=C); 159,9 (C, Ar); 143,3 (C, Ar); 139,1 (C, Ar); 130,5 (C, Ar); 127,5 (C, Ar); 126,5 (C, Ar); 120,7 (C, Ar); 115,4 (C, Ar); 113,0 (C, Ar); 112,4 (C, CN); 111,7 (C, Ar); 108,5 (adjacente a CN); 69,0 (C, sp ³).

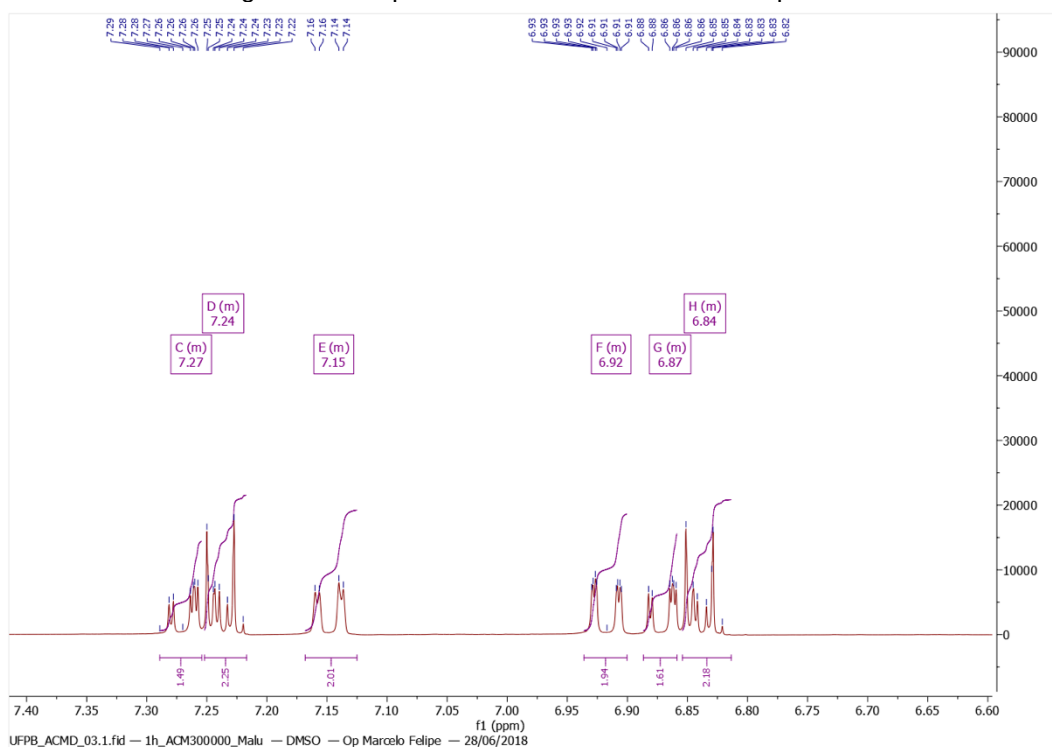
Fonte: Elaborado pelo autor.

Também foram avaliados os espectros de RMN de ¹H da série ACMD. Pontos característicos na elucidação estrutural dos novos derivados, foram realizados e apareceram simpletos referentes ao grupo NH, o qual apresentou deslocamento químico variando entre 9,48 a 9,59 ppm (integral para 1 hidrogênio em cada pico). Além disso, em todos os espectros analisados observaram-se sinais de simpleto (s), duplete (d) e multiplete (m) na região característica de grupamentos aromáticos e da acridina corroborando com os resultados de Silva e colaboradores (2018). Na sequência, temos o espectro de RMN de ¹H do ACMD-03 (Figura 41).

Figura 41 – Espectro de RMN ^1H ACMD-03.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No espectro de ^1H do ACMD-03, o primeiro simpleto apresentou sinal em 9,59 ppm sugestivo para o grupamento NH, seguido de simpleto subsequente apresentado no sinal de 8,62 ppm, sugestivo para o grupamento vinílico. Os outros sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático e do anel acridínico, encontram-se ampliados na Figura 42.

Figura 42 – Espectro de RMN ^1H ACMD-03 ampliado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os demais derivados dessa série também apresentaram deslocamentos químicos para os átomos de hidrogênio correspondentes as estruturas esperadas, podendo ser observado na Tabela 22.

Tabela 22 – Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO- d_6 , 300 MHz) da série ACMD

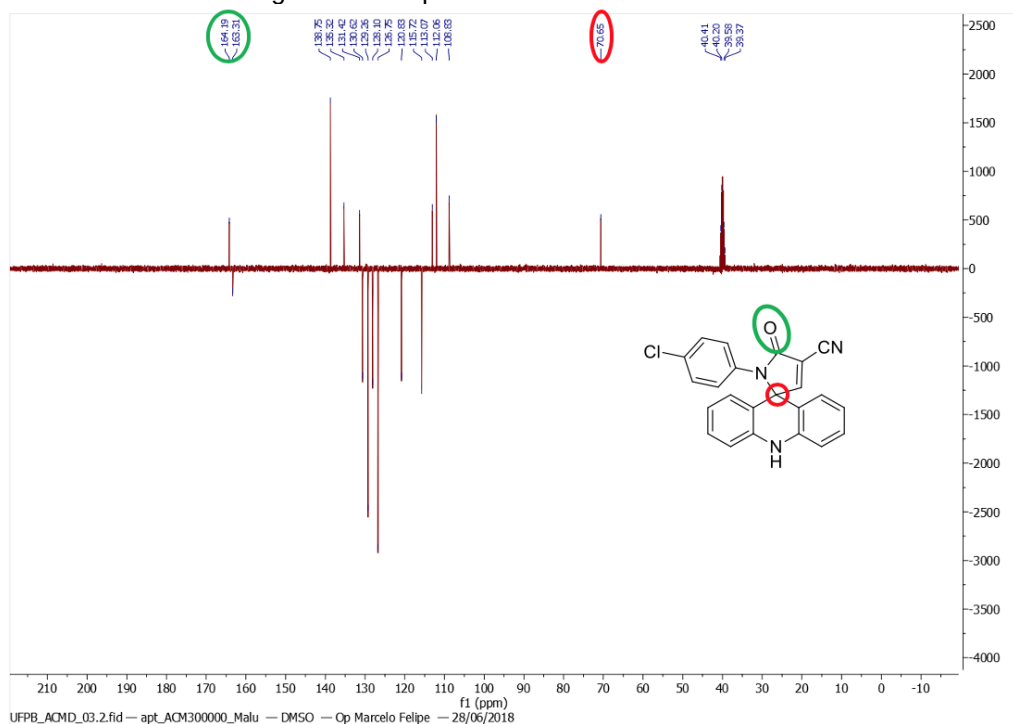
ACMD	DESLOCAMENTO (ppm)
02	δ = 9,57 (s, 1H, NH); 8,84 (s, 1H, CH); 8,51 (s, 1H, N=CH); 7,42 (m, 1H, acridínico); 7,31 (d, 2H, J = 8,6 Hz); 7,24 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,08 (d, 2H, J = 7,8 Hz); 6,90 (s, 1H, espiro-acridínico); 6,87 (m, 3H, espiro-acridínico); 6,83 (s, 1H, espiro-acridínico); 6,71 (d, 2H, J = 8,6 Hz).
03*	δ = 9,59 (s, 1H, NH); 8,62 (s, 1H, CH); 7,27 (m, 1H, aromático); 7,24 (m, 2H, aromático); 7,15 (m, 2H, aromático); 6,92 (m, 2H espiro-acridínico); 6,87 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,84 (m, 2H, espiro-acridínico).
04	δ = 9,51 (s, 1H, NH); 8,52 (s, 1H, CH); 7,24 (m, 2H, aromático); 7,12 (m, 2H, aromático); 6,95 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,88 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,67 (m, 2H, espiro-acridínico).

06	δ = 9,48 (s, 1H, NH); 8,54 (s, 1H, CH); 7,18 (m, 4H, aromático); 6,87 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,60 (m, 4H, espiro-acridínico); 3,59 (m, 3H, OCH ₃).
-----------	--

*RMN de ¹H (δ , DMSO-d₆, 400 MHz) da série ACMD
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise dos espectros de RMN de ¹³C da série ACMD, foram evidenciados os deslocamentos dos carbonos quaternários que apareceram entre 70,62 a 70,80, o qual demonstra a ocorrência da ciclização espontânea das moléculas de acordo com Vilkova et al. (2014) e Silva et al. (2018). Carbonos referentes à carbonila (C=O) foram encontrados nos deslocamentos químicos entre 163,20 a 164,30 ppm. A seguir se encontra o espectro de RMN de ¹³C do ACMD-03 (Figura 43). E em seguida a Tabela 23 com os dados espectrais de RMN de ¹³C dos demais derivados da série ACMD.

Figura 43 – Espectro de RMN ¹³C ACMD-03.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 23 – Dados dos espectros de RMN de ¹³C (δ , DMSO-d₆, 300 MHz) da série ACMD

ACMD	DESLOCAMENTO (ppm)
02	δ 164,4(C, C=O); 163,2 (C, C=C); 138,8 (C, Ar); 135,2 (C, Ar); 132,1 (C, Ar); 130,6 (C, Ar); 128,7 (C, Ar); 127,7 (C, Ar); 120,7(C, Ar); 120,2 (C, Ar); 115,6 (C, Ar); 112,7 (C, CN); 111,7 (C, Ar); 108,8 (adjacente a CN); 70,6 (C, sp ³).

03*	δ 164,1(C, C=O); 163,3 (C, C=C); 138,7 (C, Ar); 135,3 (C, Ar); 131,4 (C, Ar); 130,6 (C, Ar); 129,2 (C, Ar); 128,1 (C, Ar); 126,7 (C, Ar); 120,8 (C, Ar); 115,7 (C, Ar); 113,0 (C, CN); 112,0 (C, Ar); 108,8 (adjacente a CN); 70,6 (C, sp ³).
04	164,0 (C, C=O); 163,3 (C, C=C); 138,7 (C, Ar); 130,6 (C, Ar); 128,2 (C, Ar); 120,8 (C, Ar); 117,3 (C, Ar); 116,2 (C, Ar); 115,9 (C, CN); 115,3 (C, Ar); 112,9 (C, Ar); 111,7 (C, Ar); 109,3 (adjacente a CN); 70,8 (C, sp ³).
06	163,8 (C, C=O); 163,2 (C, C=C); 138,7 (C, Ar); 130,4 (C, Ar); 128,4 (C, Ar); 127,6 (C, Ar); 120,6 (C, Ar); 115,6 (C, Ar); 114,4 (C, Ar); 114,3 (C, Ar); 113,1 (C, CN); 112,1 (C, Ar); 109,9 (adjacente a CN); 70,6 (C, sp ³).

*RMN de ¹³C (δ , DMSO-d₆, 400 MHz) da série ACMD
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 ESTUDO BIOLÓGICO

5.3.1 Avaliação da citotoxicidade

O potencial citotóxico dos derivados acridínicos das séries AMATAC (Tabela 24) e ACMD (Tabela 25), testados em linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, SK-MEL-28) e em linhagem de célula não tumoral murina (L929), após tratamento de 72 horas, está demonstrado nas Tabelas a seguir.

Tabela 24 – Efeito dos AMTAC's na viabilidade das células tumorais e não tumoral

Amostras teste/ Linhagens Celulares	% DE INIBIÇÃO						
	HCT-116	HeLa	PC-3	MCF-7	MDA-MB-231	SK-MEL-28	L929
AMTAC-02	58,66 ± 1,32*	59,16 ± 0,55*	27,72 ± 0,69*	74,98 ± 1,79*	45,9 ± 1,01*	50,08 ± 2,62*	61,99 ± 0,86*
AMTAC-04	82,95 ± 0,72*	48,87 ± 0,64*	30,49 ± 0,11*	41,3 ± 0,92*	22,08 ± 1,85*	44,01 ± 2,78*	39,3 ± 0,24*
AMTAC-15	28,5 ± 0,64*	5,56 ± 0,40	5,99 ± 1,06	22,60 ± 1,70*	3,35 ± 0,25	0 ± 2,38	9,0 ± 1,20
AMTAC-17	70,16 ± 0,88*	56 ± 0,59*	48,32 ± 3,15*	38,7 ± 1,50*	30,13 ± 3,44*	28,87 ± 2,50*	35,28 ± 2,10*
AMTAC-18	54,3 ± 1,24*	24,92 ± 1,43*	26,87 ± 0,91*	37,9 ± 0,49*	12,03 ± 0,80*	15,79 ± 0,98*	44,6 ± 0,71*

AMTAC-19	88,56 ± 0,58*	78,45 ± 0,42*	56,38 ± 1,39*	66,21 ± 1,30*	N.T.	62,28 ± 1,59*	70,4 ± 1,74*
AMTAC-21	70,60 ± 0,98*	59,73 ± 0,18*	42,21 ± 0,82*	60,60 ± 1,55*	22,38 ± 1,15*	33,56 ± 4,06*	98,60 ± 0,28*
AMTAC-22	67,20 ± 1,19*	62,38 ± 1,06*	50,98 ± 0,85*	64,50 ± 0,97*	35,88 ± 1,37*	25,96 ± 4,15*	88,9 ± 0,38*
AMTAC-23	33,41 ± 0,24*	11,67 ± 0,47*	0 ± 0,85	20,8 ± 1,39*	10,77 ± 1,06*	0 ± 0,32	11,93 ± 1,91

Avaliadas pelo ensaio do MTT, após 72 horas de tratamento. Dados obtidos a partir de um experimento realizado em triplicata e apresentados em valores de porcentagem de inibição (%) obtidos a partir da média ± e.p.m. em comparação com o controle negativo (células e meio de cultura), analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A triagem farmacológica foi realizada utilizando a concentração de 50 µM dos compostos testes. O controle foi considerado como 100% de viabilidade. *p < 0,05 comparado ao grupo controle. N.T.: não testado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Avaliando os resultados referentes à série AMTAC, pode-se observar que os AMTAC's 04, 17, 19 e 21 apresentaram muita atividade na linhagem HCT-116 (carcinoma colorretal humano), com percentuais de inibição do crescimento celular de $82,95 \pm 0,72\%$; $70,16 \pm 0,88\%$; $88,56 \pm 0,58\%$ e $70,60 \pm 0,98\%$, respectivamente. Em contrapartida, AMTAC-02 apresentou muita atividade ($74,98 \pm 1,79\%$ de inibição) em MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano).

Os AMTAC's apresentaram atividade moderada em determinadas linhagens tumorais, dentre elas podemos citar: AMTAC-02 (HCT-116: $58,66 \pm 1,32\%$; HeLa: $59,16 \pm 0,55\%$; SK-MEL-28: $50,08 \pm 2,62\%$); AMTAC-17 (HeLa: $56 \pm 0,59\%$); AMTAC-18 (HCT-116: $54,3 \pm 1,24\%$); AMTAC-19 (PC-3: $56,38 \pm 1,39\%$; MCF-7: $66,21 \pm 1,30\%$; SK-MEL-28: $62,28 \pm 1,59\%$); AMTAC-21 (HeLa: $59,73 \pm 0,18\%$; MCF-7: $60,60 \pm 1,55\%$) e AMTAC-22 (HCT-116: $67,20 \pm 1,19\%$; HeLa: $62,38 \pm 1,06\%$; PC-3: $50,98 \pm 0,85\%$; MCF-7: $64,50 \pm 0,97\%$). As demais moléculas desta série apresentaram pouca ou nenhuma atividade frente às linhagens tumorais avaliadas neste ensaio.

Considerando apenas as moléculas que tiveram muita atividade, quando avaliadas em relação à citotoxicidade em células não tumorais (linhagem L929, fibroblasto murino), pode-se sugerir que os AMTAC's 04 e 17 foram pouco citotóxicas ($39,3 \pm 0,24\%$ e $35,28 \pm 2,10\%$ de inibição do crescimento celular, respectivamente), porém, os AMTAC's 02, 19 e 21 apresentaram citotoxicidade para a linhagem L929 com percentuais de inibição de $61,99 \pm 0,86\%$, $70,4 \pm 1,74\%$ e $98,60 \pm 0,28\%$, respectivamente.

Vale salientar que os dados para as duas séries foram analisados pelo programa *GraphPadPrism* 7.0, realizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e a porcentagem de inibição foi calculada pelo referido programa. Já escala de intensidade utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas, considerando a resposta nas diferentes linhagens celulares está em concordância com o trabalho de Costa e colaboradores (2020).

Com relação à série ACMD (Tabela 25), o derivado ACMD-01 apresentou alta atividade em HCT-116 ($71,9 \pm 1,72\%$ de inibição), enquanto ACMD-02 apresentou atividade moderada em HCT-116 ($61,9 \pm 1,06\%$ de inibição). As demais moléculas desta série apresentaram pouca ou nenhuma atividade frente às linhagens tumorais avaliadas neste ensaio (COSTA et al., 2020).

Tabela 25 – Efeito dos ACMD's na viabilidade das células tumorais e não tumoral

Amostras teste/ Linhagens Celulares	% DE INIBIÇÃO						
	HCT-116	HeLa	PC-3	MCF-7	MDA-MB-231	SK-MEL-28	L929
ACMD-01	$71,9 \pm 1,72^*$	$11,72 \pm 0,50^*$	$16,51 \pm 1,31^*$	$31,4 \pm 0,81^*$	$14,69 \pm 1,19^*$	$11,05 \pm 2,07^*$	$48,0 \pm 0,40^*$
ACMD-02	$61,9 \pm 1,06^*$	$27,22 \pm 0,81^*$	$22,53 \pm 1,20^*$	$30,2 \pm 1,14^*$	$27,17 \pm 0,64^*$	$12,35 \pm 1,06^*$	$49,2 \pm 0,31^*$
ACMD-03	$48,4 \pm 1,52^*$	$46,13 \pm 1,63^*$	$26,67 \pm 1,41^*$	$23,6 \pm 1,19^*$	$24,55 \pm 1,24^*$	$37,84 \pm 2,82^*$	$28,9 \pm 1,41^*$
ACMD-04	$21,7 \pm 1,15^*$	$12,18 \pm 0,81^*$	$19,76 \pm 1,22^*$	$22,4 \pm 1,63^*$	$12,76 \pm 2,27^*$	$10,47 \pm 1,74$	$29,4 \pm 0,41^*$
ACMD-05	$5,90 \pm 1,39$	$0 \pm 0,67$	$0 \pm 1,58$	$8,3 \pm 0,45$	$10,39 \pm 0,48^*$	$28,52 \pm 1,18^*$	$0 \pm 1,20$
ACMD-06	$19,8 \pm 1,01^*$	$14,92 \pm 0,66^*$	$0 \pm 3,01$	$4,6 \pm 0,91$	$13,56 \pm 1,63^*$	$4,16 \pm 0,65$	$24,2 \pm 0,73^*$

Avaliadas pelo ensaio do MTT, após 72 horas de tratamento. Dados obtidos a partir de um experimento realizado em triplicata e apresentados em valores de porcentagem de inibição (%) obtidos a partir da média $\pm$ e.p.m. em comparação com o controle negativo (células e meio de cultura), analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. A triagem farmacológica foi realizada utilizando a concentração de 50 μ M dos compostos testes. O controle foi considerado como 100% de viabilidade. *p < 0,05 comparado ao grupo controle. N.T.: não testado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA *IN SILICO*

De fundamental importância para a discussão no planejamento de um novo fármaco, o perfil de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um composto (ADME) pode contribuir para o aumento de sua atividade biológica (HAY et al., 2014).

As características farmacocinéticas preliminares dão alguns indícios da necessidade de formas farmacêuticas, características de solubilidade em água, perfis de absorção gastrointestinal, capacidade de atravessar a barreira hematocefálica, possíveis alvos biológicos, relações estrutura-atividade, que podem justificar ou direcionar seu planejamento para os testes biológicos (HAY et al., 2014).

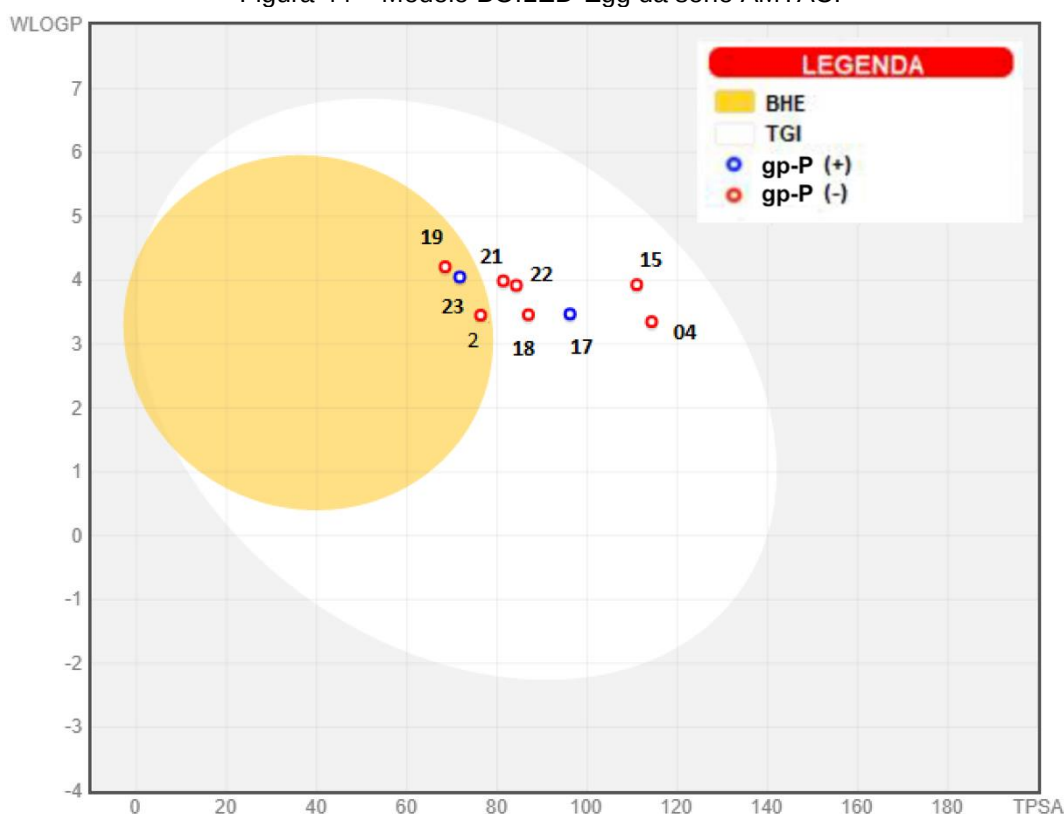
Essas características podem potencializar o desenvolvimento de novos fármacos, correlacionando propriedades ADME, que na fase embrionária do processo de síntese, permitem selecionar compostos mais promissores, diminuindo consideravelmente falhas relacionadas à farmacocinética nas fases clínicas (HAY et al., 2014).

As predições farmacocinéticas *in silico* do presente trabalho foram realizadas para as moléculas finais das séries ACMD e AMTAC, planejadas e desenvolvidas como estratégia preliminar de associar as propriedades estruturais e físico-químicas destas às suas possíveis performances de ordem cinética, ou seja, absorção, distribuição, biotransformação e eliminação (BARREIRO; FRAGA, 2015).

5.4.1 Predição farmacocinética da série AMTAC

Em concordância com a série ACMD, o primeiro parâmetro avaliado para a presente série foi o *BOILED-Egg*. A figura a seguir ilustra os derivados sintetizados, representados apenas por números para uma melhor visualização do perfil dos mesmos.

Figura 44 – Modelo BOILED-Egg da série AMTAC.



Legenda: BHE = barreira hematoencefálica; TGI = trato gastrointestinal; P-gP (+) = substrato da glicoproteína P; P-gP (-) = não substrato da glicoproteína P.

Fonte: Adaptado de SwissADME, 2020.

A Figura 44 exibiu que todos os derivados da série AMTAC apresentaram uma probabilidade de serem absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI), representado na área em branco da Figura. Sugerindo também o favorecimento de uma possível administração por via oral devido a esta característica. Já na área em amarelo da Figura temos apenas os AMTAC's 19 e 23 que, além de apresentarem capacidade de serem absorvidos pelo TGI (área em branco na figura), também apresentaram a possibilidade de permear a barreira hematoencefálica (BHE).

Em relação a possível capacidade dos AMTAC's serem substratos ou não da glicoproteína-P (gp-P), a Figura 44 exibiu que os AMTAC's 2, 4, 15, 18, 19, 21 e 22 se apresentaram como inibidores da gp-P (vermelho), e os AMTAC's 17 e 23 (azul) como substrato da mesma.

O Log P da série AMTAC está contido na Tabela seguinte e foram utilizados os mesmos parâmetros da série antecedente.

Tabela 26 – Valores de Log P da série AMTAC.

AMTAC	Peso Molecular	WLogP	MLog P	Aceptores H	Doadores H	Ligações rotacionais
02	406,44	3,45	2,67	4	1	3
04	421,41	3,35	2,09	5	1	3
15	454,50	3,93	2,55	5	1	3
17	466,49	3,47	2,02	6	1	5
18	436,46	3,46	2,34	5	1	4
19	455,31	4,21	3,59	3	1	2
21	427,46	3,99	2,91	4	1	2
22	415,45	3,92	2,74	3	2	2
23	459,54	4,05	3,47	3	1	3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores obtidos para WLog P desta série exibiu um maior valor para o AMTAC-19 (WLogP = 4,21) e o menor valor para o AMTAC-04 (WLogP = 3,35), assim como na série ACMD não houve extrapolação do máximo estabelecido pelo *druglikeness* de Ghose, Viswanadhan e Wendoloski (1999) ($-0,4 \leq \text{WLogP} \leq 5,6$) e Egan, Merz e Baldwin (2000) ($\text{WLogP} \leq 5,88$). Ao passo que os valores obtidos de MLogP para o AMTAC-19 foi de 3,59 e o menor foi 2,02 para o AMTAC-17, também não extrapolando o valor estabelecido por Lipinski e colaboradores (2001) ($\text{MLogP} \leq 4,15$ ou $\text{CLogP} \leq 5$).

Os resultados de Log P aliados a valores de outros parâmetros particulares de cada método, tais como: peso molecular, número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio e as ligações rotacionais podem sugerir ao estudo que todos os derivados da série AMTAC foram condizentes com critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, Ghose e Egan. Parâmetros estes que podem ser visualizados na Tabela 27.

Tabela 27 – Parâmetros druglikeness.

DRUGLIKENESS	PARÂMETROS
Lipinski	Peso molecular ≤ 500
	MLogP $\leq 4,15$
	Aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10
	Doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5
Ghose	$160 \leq \text{Peso molecular} \leq 480$
	$-0,4 \leq \text{WLogP} \leq 5,6$
	$40 \leq \text{Refratividade molar} \leq 130$
	$20 \leq \text{Átomos} \leq 70$
Egan	$\text{WLogP} \leq 5,88$
	Área de superfície polar topológica $\leq 131,6$

Fonte: Adaptado de SwissADME, 2020.

Nos dados da Tabela 28 como observado a seguir, a maioria dos derivados da série AMTAC se apresentaram como moderadamente solúveis ou pouco solúveis de modo que a solubilidade foi definida de acordo com o parâmetro de Log S: insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 < moderadamente solúvel < -4 < solúvel < -2 < muito solúvel < 0 < altamente solúvel.

Tabela 28 – Propriedades de solubilidade da série AMTAC.

AMTAC	ESOL		Ali		SILICOS-IT	
	Log S	Solubilidade (mol/L)	Log S	Solubilidade (mol/L)	Log S	Solubilidade (mol/L)
02	-5,21	$6,13 \times 10^{-6}$	-5,50	$3,16 \times 10^{-6}$	-7,77	$1,69 \times 10^{-6}$
	MS		PS		PS	
04	-5,20	$6,26 \times 10^{-6}$	-6,12	$7,53 \times 10^{-7}$	-7,01	$9,73 \times 10^{-8}$
	MS		PS		PS	
15	-5,02	$9,59 \times 10^{-6}$	-5,43	$3,70 \times 10^{-6}$	-7,91	$1,22 \times 10^{-8}$
	MS		MS		PS	
17	-5,37	$4,31 \times 10^{-6}$	-5,83	$1,49 \times 10^{-6}$	-7,97	$1,07 \times 10^{-8}$
	MS		MS		PS	
18	-5,29	$5,16 \times 10^{-6}$	-5,66	$2,17 \times 10^{-6}$	-7,87	$1,34 \times 10^{-8}$
	MS		MS		PS	
19	-6,05	$8,93 \times 10^{-7}$	-6,05	$8,84 \times 10^{-7}$	-8,45	$3,54 \times 10^{-9}$
	PS		PS		PS	

21	-5,66	$2,21 \times 10^{-6}$	-5,88	$1,32 \times 10^{-6}$	-8,93	$1,18 \times 10^{-9}$
	MS		MS		PS	
22	-5,48	$3,28 \times 10^{-6}$	-5,79	$1,61 \times 10^{-6}$	-8,52	$3,00 \times 10^{-9}$
	MS		MS		PS	
23	-6,12	$7,65 \times 10^{-7}$	-6,40	$3,97 \times 10^{-7}$	-8,32	$4,80 \times 10^{-9}$
	PS		PS		PS	

MS = moderadamente solúvel; PS = pouco solúvel

Fonte: Adaptado SwissADME, 2020.

Executando o método Ali para esta série e levando em consideração o aumento nos valores de Log P e no peso molecular, a tabela apresentou que as substituições realizadas no núcleo acridínico dos AMTAC's acometem às suas moléculas uma piora na solubilidade destas, quando comparamos os núcleos entre si da série testada para este método. O AMTAC-21 foi o derivado que apresentou o melhor resultado de solubilidade entre os demais com valor de $1,32 \times 10^{-6}$.

O Log K_p calculado para esta série estão disponíveis na Tabela 29, de modo que foi possível observar que os derivados provavelmente apresentariam baixa permeabilidade na pele, apresentando valores que variaram de $-6,64 \text{ cm s}^{-1}$ (AMTAC-15) a $-5,45 \text{ cm s}^{-1}$ (AMTAC-23).

Tabela 29 – Valores de Log K_p da série AMTAC.

AMTAC	Log KP (permeação cutânea) CM S⁻¹
02	-5,83
04	-6,02
15	-6.64
17	-6,23
18	-6.03
19	-5,61
21	-5,75
22	-5.77
23	-5.45

Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, a predição metabólica para a série AMTAC também foi executada frente a cinco isoformas das enzimas citocromo P450 (CYP) quanto a sua capacidade de inibição por meio do *SwissADME*. Diante disso, os resultados estão expostos na Tabela a seguir.

Tabela 30 – Interação das moléculas analisadas da série AMTAC com as isoformas de CYP450.

AMTAC	Inibidor CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor CYP3A4
02	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
04	Não	Sim	Sim	Não	Sim
15	Não	Sim	Sim	Não	Sim
17	Não	Sim	Sim	Não	Sim
18	Não	Sim	Sim	Não	Sim
19	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
21	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
22	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
23	Não	Sim	Sim	Não	Sim

Fonte: Elaborado pelo autor.

A isoenzima CYP1A2 diferentemente dos resultados da série ACMD se apresentou possivelmente inibida apenas para os AMTAC's 19, 21 e 22. Os AMTAC's 04, 15, 17, 18 e 23 não inibiram a mesma. Já as isoenzimas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 exibiram o mesmo perfil dos resultados da série ACMD.

5.4.2 Predição farmacocinética da série ACMD

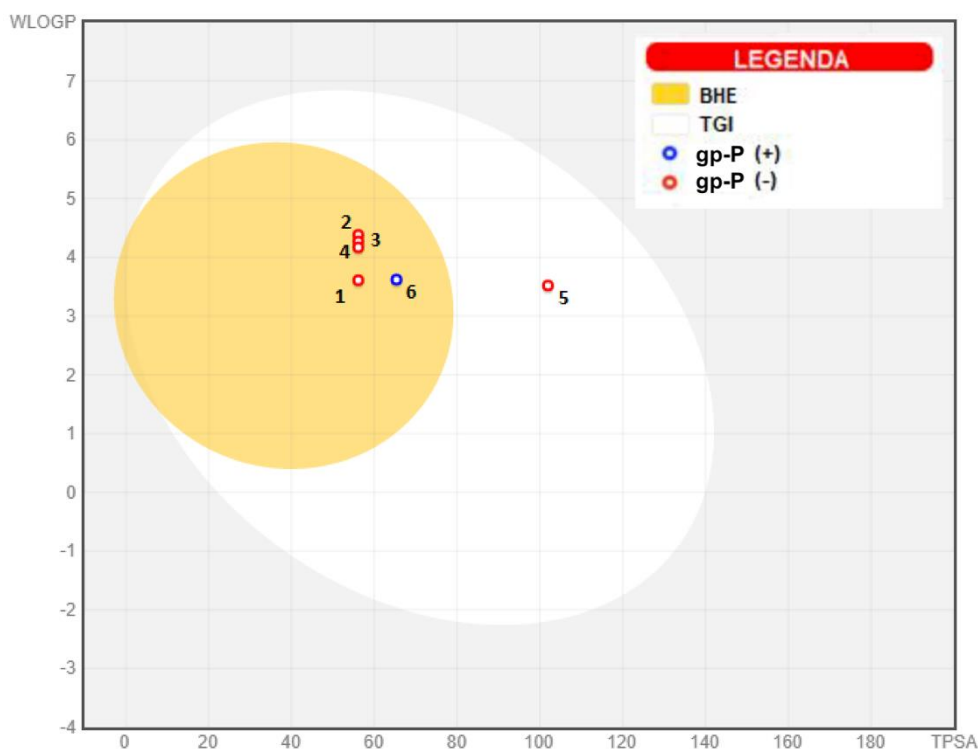
Com a finalidade de prever a permeação da barreira hemato-encefálica e a absorção gastrointestinal de pequenas moléculas, o método de permeação *Brain Or Intestinal EstimateD (BOILED-Egg)* foi o primeiro parâmetro avaliado.

Ele propõe um modelo preditivo baseado em dois descritores físico-químicos: polaridade (área de superfície polar topológica, TPSA) e lipofilia (coeficiente de partição n-octanol/água de Wildman e Crippen, WlogP), que são diretamente

traduzidos em um *design* molecular devido à velocidade, precisão e simplicidade conceitual do modelo (DAINA; ZOETE, 2016).

A informação fornecida por esse método avalia o padrão de absorção dos compostos desenvolvidos de acordo com os parâmetros citados, de modo a auxiliar nas possíveis vias de administração e até mesmo alvos moleculares planejados para o fármaco. A figura a seguir ilustra o modelo obtido para os derivados analisados da série ACMD, que foram representados apenas em números para uma melhor visualização do perfil dos mesmos.

Figura 45 – Modelo BOILED-Egg da série ACMD.



Legenda: BHE = barreira hematoencefálica; TGI = trato gastrointestinal; P-gP (+) = substrato da glicoproteína P; P-gP (-) = não substrato da glicoproteína P.

Fonte: Adaptado de SwissADME (2020).

De acordo com o ilustrado na Figura 45, todos os derivados da série ACMD apresentaram uma probabilidade de serem absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI), representado na área em branco da Figura 45.

Tal característica sugere o favorecimento de uma possível administração por via oral, que é comumente preferível pelos pacientes em contraste com a via parenteral.

Já na área em amarelo da Figura temos os ACMD's 1, 2, 3, 4 e 6, que além de apresentarem capacidade de serem absorvidos pelo TGI (área em branco na figura), também apresentaram a possibilidade de permear a barreira hematoencefálica (BHE).

Vale salientar que a BHE age como uma barreira física e impõe diversos obstáculos que podem resultar na obstrução da passagem de vários fármacos, incluindo agentes antineoplásicos e antibióticos (UPADHYAY, 2014). Dessa maneira, essa propriedade inerente a essas moléculas pode auxiliar no tratamento de doenças onde a permeação da BHE seja necessária, como em tumores intracranianos, caso esses derivados sejam ativos.

Destaca-se outra informação nesta figura que é a possível capacidade dos ACMD's serem substratos ou não da glicoproteína-P (gp-P). Esta última, é responsável por dificultar a permeabilidade às membranas biológicas e sua principal função é a proteção do sistema nervoso central dos xenobióticos, como também ela é superexpressa em algumas células tumorais e leva a câncer multirresistentes. O fato de um composto não ser substrato desta proteína seria mais um indício que sua absorção e atividade seriam favorecidas (SZAKÁC, et al.; SHAROM, 2008; SRIVALLI; LAKSHMI, 2012).

Diante disto, dados fornecidos pelo *SwissADME* em conjunto com informações obtidas pelo *pkCSM* sobre a possível inibição da proteína, foi observado também na Figura 43 que os ACMD's 1, 2, 3, 4 e 5 se apresentaram como inibidores da gp-P (vermelho), e excepcionalmente o ACMD-06 (azul) como substrato da mesma.

De acordo com Srivalli e Lakshmi (2012), os substratos da gp-P variam em relação a tamanho, estrutura e propriedades químicas, uma vez que o critério principal que submete um substrato ao efluxo pela gp-P é a sua interação com a bicamada lipídica, uma ampla gama de fármacos catiônicos, lipofílicos e planares se tornam substratos proteicos, apesar de sua dissimilaridade estrutural.

Ademais, um dos principais limitantes no tratamento anticâncer tem sido esse mecanismo de efluxo, a partir da superexpressão de bombas de efluxo ATP-dependentes em alguns tumores, sendo responsável pela remoção dos fármacos do meio intracelular para o meio extracelular, como, por exemplo: taxanos, inibidores de topoisomerase e antimetabólitos (BAGULEY, 2010; HOLOHAN et al. 2013).

Esse fenômeno causa uma diminuição na concentração do fármaco na célula cancerígena e consequente falha no tratamento, estando associado principalmente aos cânceres de rins, cólon, fígado, leucemias, linfomas e, mais recentemente, câncer

de próstata, pulmão e mama (BAGULEY, 2010; HOLOHAN et al. 2013; MISRA et al., 2014; NOOTER et al., 1997; SERES et al., 2011; TRILLER et al., 2006; ZALCBERG et al., 2000).

O parâmetro Log P é avaliado por uma gama de preditores (iLogP, xLogP3, WLogP, MLogP, Silicos-IT), obtendo-se posteriormente um valor de Log P consensual com base nesses parâmetros. A técnica mais utilizada para prever este valor de log P, é usar essa gama de preditores, para selecionar os métodos mais precisos para uma determinada série química ou gerar uma estimativa consensual.

No presente estudo, foram ressaltados os parâmetros de valores de Log P para a série ACMD, representados na Tabela 26 utilizando dois métodos que fundamentam as *druglikeness* de Lipinski e Ghose. O WLogP, criado por Wildman e Crippen (1999), utilizado por Ghose, onde aplicado em um conjunto de 9920 moléculas, com $r^2 = 0,918$ (dado estatístico), apresentou um método que acrescentou 68 parâmetros ajustáveis ao cálculo de Log P.

O termo “*druglikeness*” surgiu a partir dos parâmetros originados nos trabalhos de Lipinski (1997), Ghose (1999), Veber (2002) e colaboradores. Ele consiste em um conjunto complexo de características que por semelhanças atribuem uma potencialidade a novas moléculas considerando parâmetros de biodisponibilidade de fármacos já conhecidos (URSU et al., 2011).

O MLogP, metodologia de Moriguchi (1994), utilizada por Lipinski, considera parâmetros como: átomos lipofílicos, átomos hidrofílicos, ligações insaturadas, hidrogênios livres, rigidez da estrutura, entre outras que foram acompanhadas em 1230 compostos e analisados estatisticamente originando este método.

Dessa maneira, a Tabela seguinte traz os resultados de Log P obtidos para série ACMD, de modo que foi possível observar o maior valor no ACMD-02 (WLogP = 4,38) e o menor valor no ACMD-05 (WLogP = 3,52), não havendo extrapolação do máximo estabelecido pelo *druglikeness* de Ghose, Viswanadhan e Wendoloski (1999) ($-0,4 \leq \text{WLogP} \leq 5,6$) e Egan, Merz e Baldwin (2000) ($\text{WLogP} \leq 5,88$). Ao passo que os valores obtidos de MLogP para o ACMD-02 foi de 3,74 e o menor foi 2,19 para o ACMD-05, também não extrapolando o valor estabelecido por Lipinski e colaboradores (2001) ($\text{MLogP} \leq 4,15$ ou $\text{CLogP} \leq 5$).

Tabela 31 – Valores de Log P da série ACMD.

ACMD	Peso molecular	WLogP	MLogP	Aceptores H	Doadores H	Ligações rotacionais
01	349,38	3,61	3,15	2	1	1
02	428,28	4,38	3,74	2	1	1
03	383,83	4,27	3,63	2	1	1
04	367,38	4,17	3,53	3	1	1
05	394,38	3,52	2,19	4	1	2
06	379,41	3,62	2,80	3	1	2

Fonte: Elaborado pelo autor.

O estudo de solubilidade da série ACMD está representado na Tabela 32 e o mesmo foi realizado frente a três métodos: (i) método ESOL, estudo fundamentado em 2874 compostos que através de regressão linear analisando nove propriedades moleculares estima a solubilidade a partir de uma estrutura molecular. O Log P do octanol foi o parâmetro mais significativo, seguido pelo peso molecular, proporção de átomos pesados em sistemas aromáticos e número de ligações rotativas (DELANEY, 2004); (ii) o segundo método, adaptado por Ali e colaboradores (2012) é baseado em estudos apresentados que mostram que a Equação Geral de Solubilidade (GSE) é capaz de prever para dentro de 1 unidade logarítmica, a solubilidade aquosa experimental (Log S) para 81% dos compostos em um conjunto de dados de 1265 estruturas químicas diversas ($-8,48 < \text{Log S} < 1,58$) (ALI et al., 2012); (iii) o preditor de solubilidade do SwissADME desenvolvido pelo SILICOS-IT foi o último método realizado. O coeficiente de correlação linear deste método fragmentário corrigido pelo peso molecular é $R^2 = 0,75$, onde essa correlação linear demonstra forte ligação entre os valores previstos e experimentais. A correlação do método de Ali é 0,81 e de ESOL 0,69.

Tabela 32 – Propriedades de solubilidade da série ACMD

ACMD	ESOL		ALI		SILICOS-IT	
	Log S	Solubilidade (mol/L)	Log S	Solubilidade (mol/L)	Log S	Solubilidade (mol/L)
01	-5,02	$9,49 \times 10^{-6}$	-4,99	$1,01 \times 10^{-5}$	-7,60	$2,53 \times 10^{-8}$
	MS		MS		PS	

02	-5,93	$1,18 \times 10^{-6}$	-5,71	$1,95 \times 10^{-6}$	-8,38	$4,13 \times 10^{-9}$
	MS		MS		OS	
03	-5,62	$2,42 \times 10^{-6}$	-5,65	$2,25 \times 10^{-6}$	-8,19	$6,50 \times 10^{-9}$
	MS		MS		PS	
04	-5,18	$6,61 \times 10^{-6}$	-5,10	$7,97 \times 10^{-6}$	-7,86	$1,37 \times 10^{-8}$
	MS		MS		PS	
05	-5,08	$8,33 \times 10^{-6}$	-5,78	$1,66 \times 10^{-6}$	-6,94	$1,14 \times 10^{-7}$
	PS		PS		PS	
06	-5,09	$8,13 \times 10^{-6}$	-5,16	$6,96 \times 10^{-6}$	-7,70	$1,99 \times 10^{-8}$
	MS		MS		PS	

MS = moderadamente solúvel; PS = pouco solúvel

Fonte: Adaptado de SwissADME, 2020.

Ainda na Tabela anterior, com a execução do método Ali temos a comparação de solubilidade em unidades de mol/L. Levando em consideração o aumento nos valores de Log P e no peso molecular a tabela apresentou que as substituições feitas no núcleo acridínico na série ACMD acometem às suas moléculas uma piora na solubilidade destas, quando comparamos os núcleos entre si da série testada. Podemos observar que o ACMD-01 que não é substituído, apresentou solubilidade de $1,01 \times 10^{-5}$. A substituição no anel benzênico também influenciou na solubilidade dos ACMD's 2 e 5 que foram os derivados substituídos com bromo e o grupo nitro, estes derivados apresentaram menores valores de solubilidade. O derivado não substituído desta série apresentou o melhor resultado de solubilidade entre os demais.

Adicionalmente, a Tabela 33 exibe outra informação relevante, Log Kp. Apresentado por Potts e Guy (1992), o Log Kp visa prever o coeficiente de permeabilidade do fármaco sobre a epiderme por meio de um modelo que se baseia no peso molecular e no Log P do composto. Os autores relataram que o valor de Log Kp está diretamente relacionado a capacidade de permeação do composto. Os resultados para os derivados da série ACMD estão disponíveis na Tabela 29, de modo que foi possível observar que os derivados provavelmente apresentariam baixa permeabilidade na pele, apresentando valores que variaram de $-5,91 \text{ cm s}^{-1}$ (ACMD-05) a $-4,75 \text{ cm s}^{-1}$ (ACMD-03).

Tabela 33 – Valores de Log Kp da série ACMD.

ACMD	LOG KP (permeação cutânea) CM S ⁻¹
01	-5.51
02	-5.50
03	-5.28
04	-5.55
05	-5.91
06	-5.72

Fonte: Elaborado pelo autor.

Finalizando o estudo *in silico* da série ACMD, foi realizada a predição metabólica frente a cinco isoformas das enzimas citocromo P450 (CYP) quanto a sua capacidade de inibição por meio do *SwissADME*. Embora diversas famílias do CYP450 humano sejam conhecidas, apenas as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 são importantes na biotransformação de drogas. Dentre essas famílias, as isoenzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 são reconhecidas como as mais importantes para o metabolismo de drogas (AUDI; PUSSI, 2000). Diante disso, os resultados estão expostos na Tabela a seguir.

Tabela 34 – Interação das moléculas analisadas da série ACMD com as isoformas de CYP450.

ACMD	Inibidor CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor CYP3A4
01	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
02	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
03	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
04	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
05	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
06	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

Fonte: Elaborado pelo autor.

As CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9 são enzimas responsáveis por realizar reações de oxidação sobre seus substratos e são possivelmente inibidas por todos os derivados analisados da série supracitada. A CYP2D6, a isoenzima mais estudada dentre todas as que compõem o sistema CYP450, está envolvida nas reações de hidroxilação, *O*-desmetilação e possivelmente *N*-desalquilação, não apresentou potencialidade de interagir com nenhum derivado da série testada. Por fim, a isoenzima CYP3A4, que é responsável por aproximadamente 50% do metabolismo de xenobióticos em humanos e está envolvida em reações de *O*-desalquilação e *N*-desalquilação e desmetilação, apresentou a probabilidade de interagir com todas as moléculas da série proposta (AUDI; PUSSI, 2000; HONÓRIO; MODA; ANDRICOPULO, 2013).

5.5 PARTE EXPERIMENTAL (2ª ETAPA)

5.5.1 Estudo tecnológico farmacêutico

5.5.2 Estudo de modelagem molecular do complexo de inclusão

Para o estudo de modelagem molecular do complexo de inclusão foram selecionadas duas ciclodextrinas. A melhor solução de *docking* para o complexo β -CD:AMTAC-02 está representado na Figura 45-A, com valores de energia de -6,60 kcal / mol, 3 ligações de hidrogênio (HB) de 2,9, 2,9, 3,0 Å e 9 contatos hidrofóbicos (HC). Enquanto a melhor solução de *docking* para o complexo HP β CD: AMTAC-02 pode ser encontrada na Figura 45-B, com valores de energia de -7,9 kcal / mol, 3 HB de 3,1, 3,1, 3,3 Å e 13 HC.

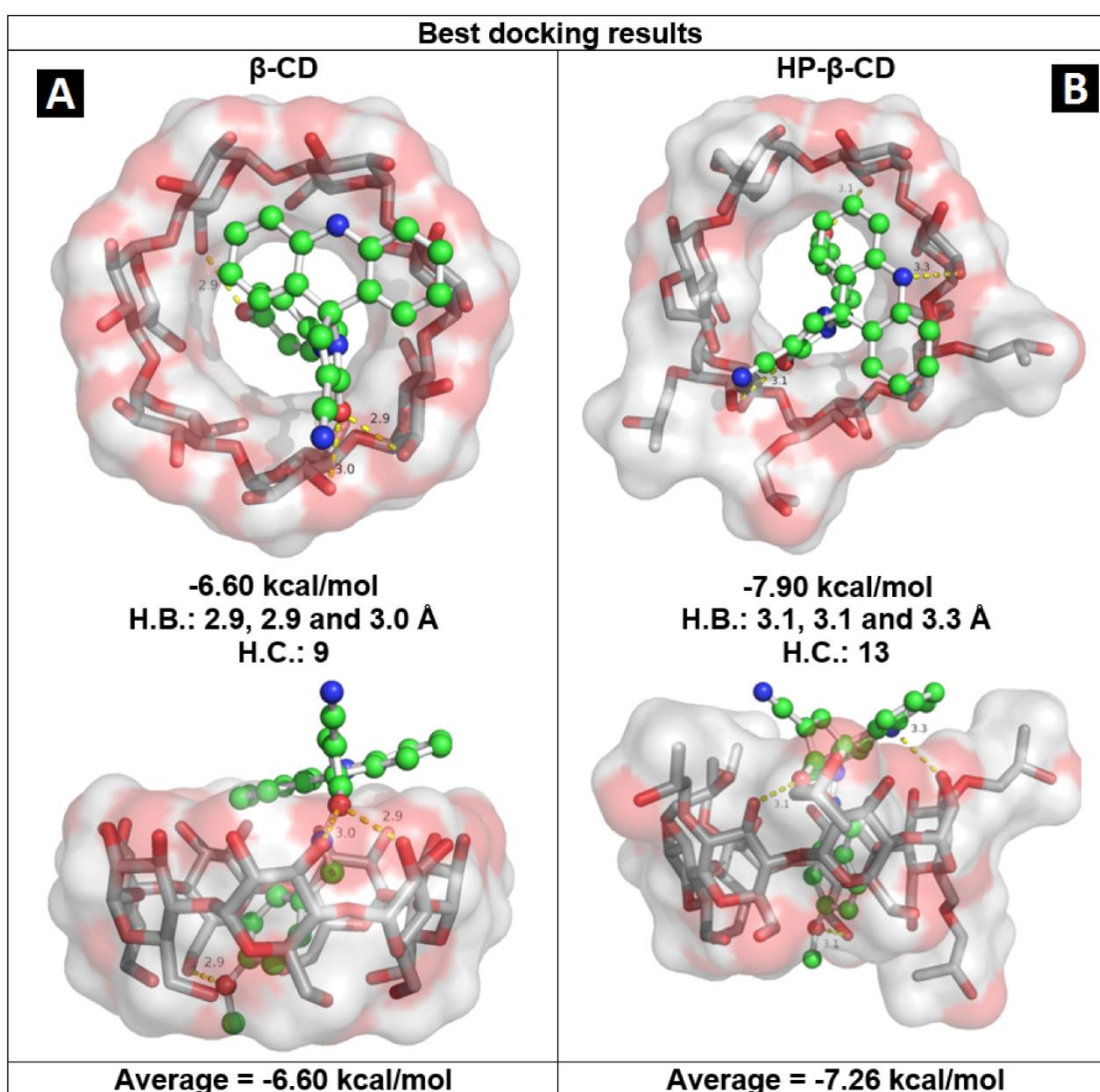
Os resultados do *docking* mostraram que o complexo formado com o hospedeiro (HP β CD) foram mais energeticamente favoráveis que o com a β -CD, para o hóspede (AMTAC-02), como observado nas Figuras 45-A e B. Os substituintes hidroxipropílicos (HP) tiveram um papel importante na diferença de interação intermolecular entre estes complexos, aumentando os contatos hidrofóbicos e favorecendo assim a estabilização do complexo formado com a HP β CD.

As Figuras 46-A e B exibem os melhores resultados de modelagem molecular do AMTAC-02 como: energia de ligação de ancoragem, distância de ligação de hidrogênio (HB) e quantidade de contatos hidrofóbicos (HC) para a melhor solução de

ancoragem para os complexos β -CD: AMTAC-02 (A) e HP- β -CD: AMTAC-02 (B) e a média de toda a energia de ligação de ancoragem para cada complexo.

Diante do exposto e tendo em vista um aumento da solubilidade do AMTAC-02, neste trabalho foi selecionada a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β C) e preparado um complexo de inclusão AMTAC-02: HP β C, de acordo com o trabalho do nosso grupo de pesquisa ALMEIDA e colaboradores 2015 e 2016 que mostraram que o fármaco isolado possui tanto atividade anticancerígena (ALMEIDA et al., 2015; 2016), quanto para doenças negligenciadas (SERAFIM et al., 2018).

Figura 46 – Melhores resultados de docking para o complexo de inclusão.

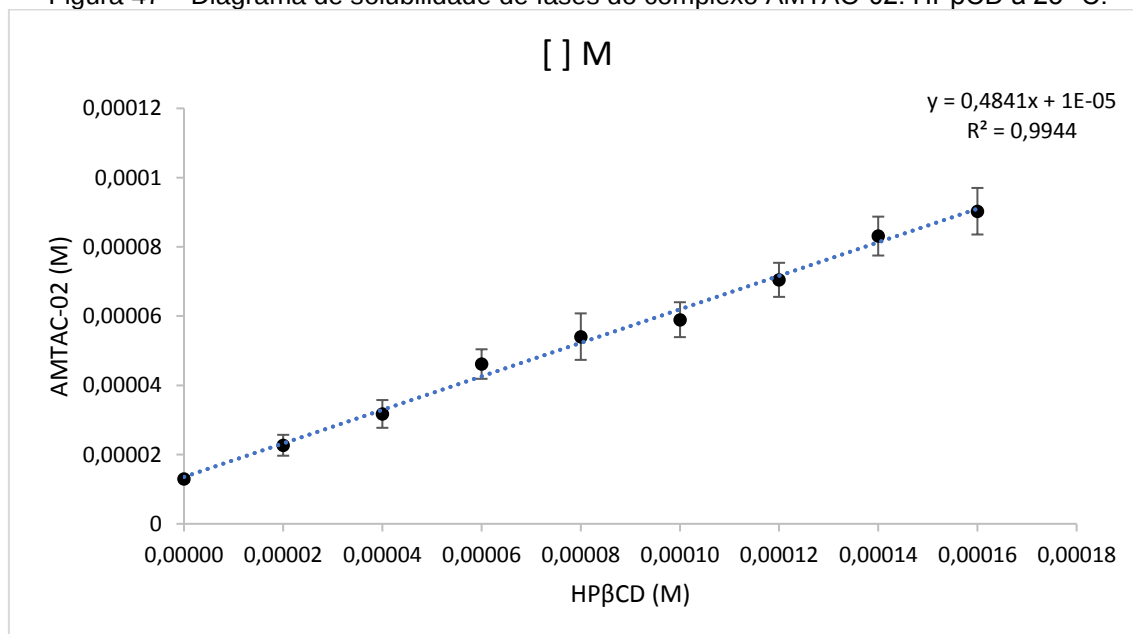


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.3 Estudo de solubilidade de fases do complexo AMTAC-02: HP β CD

O diagrama de solubilidade de fases é um método amplamente aceito para avaliar o efeito da complexação com ciclodextrina na solubilidade do fármaco (HIGUCHI; CONNORS, 1965). A Figura 47 exibe o perfil de solubilidade do AMTAC-02 que aumentou linearmente com o aumento da concentração de HP β CD, evidenciando um diagrama do tipo A, sendo, portanto, um complexo de inclusão solúvel em água. A curva obtida apresentou um valor de inclinação de 0,0003, sendo este um valor inferior a 1, confirmando com o gráfico, dessa forma, a formação de um complexo com estequiometria 1:1, ou seja, de primeira ordem em relação a HP β CD e ao AMTAC-02, conforme a teoria de Higuchi e Connors (1965). Outro fator que possibilita a confirmação da estequiometria 1:1 é o valor do coeficiente de correção próximo a 1 ($R^2=0,9944$).

Figura 47 – Diagrama de solubilidade de fases do complexo AMTAC-02: HP β CD a 25° C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil de solubilidade do AMTAC-02 em soluções aquosas contendo HP β CD foi apresentado na Figura acima. A concentração de AMTAC-02 solubilizada em água destilada aumentou linearmente com a adição da HP β CD. O uso da HP β CD tem a vantagem de ter grupos hidroxipropil que expandem a região hidrofóbica da ciclodextrina, aumentando a capacidade de se ligar à molécula hóspede através de interações hidrofóbicas (ZHOU et al, 2013; LIU et al., 2012; LIMA et al., 2019).

Além disso, o grau de substituição dos grupos hidroxila secundários da ciclodextrina também poderia alargar a sua cavidade e a sua capacidade de formar complexos de inclusão; quanto maior a substituição, maior a ação complexa (YUAN et al., 2008).

O valor de S_0 (solubilidade do AMTAC-02 na ausência de HP β CD) foi 0,012951 mM e o valor da inclinação da parcela linear foi 0,00003; o valor da inclinação e o valor de S_0 são importantes para obter o valor da constante de estabilidade (K_s). O coeficiente de determinação foi de 0,9944, sugerindo uma estequiometria de 1:1 da formação complexa, e indicando um diagrama de solubilidade de fase do tipo A de acordo com Higuchi e Connors (1965).

Ademais, a formação do complexo estequiométrico droga-ciclodextrina 1: 1 é o tipo mais comum de associação, onde uma única molécula de composto é incluída na cavidade de uma molécula de ciclodextrina (OL'KHOVICH et al., 2019; POSE-VILARNOVO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2007).

Neste estudo, a constante de estabilidade para a complexação de HP β CD com AMTAC-02 foi de $1.145,38 \text{ M}^{-1}$, quanto maior o valor de K_s , maior a possibilidade de obtenção de um complexo de inclusão entre a molécula hóspede e a ciclodextrina e, portanto, maior solubilidade do medicamento e eficiência de complexação na cavidade da ciclodextrina (ZHOU et al., 2013; LIMA et al., 2019).

Baseado na literatura, os valores de K_s ideais devem estar entre 50 e 2000 M^{-1} (LOFTSSON et al., 2005; ARAÚJO et al., 2007). Valores mais baixos sugerem complexos instáveis e valores muito altos ($> 10000 \text{ M}^{-1}$) sugerem que a droga está fortemente ligada, o que pode reduzir sua biodisponibilidade (MARCOLINO et al., 2019; LOFTSSON et al., 2007).

5.5.4 Difratomia de raios-X (DRX)

A difratometria de raios X é um método útil para a detecção de complexação de CD em estado sólido ou microcristalino. Os padrões de DRX da mistura física e o respectivo complexo de inclusão (AMTAC-02: HP β C) estão apresentados na Figura 48.

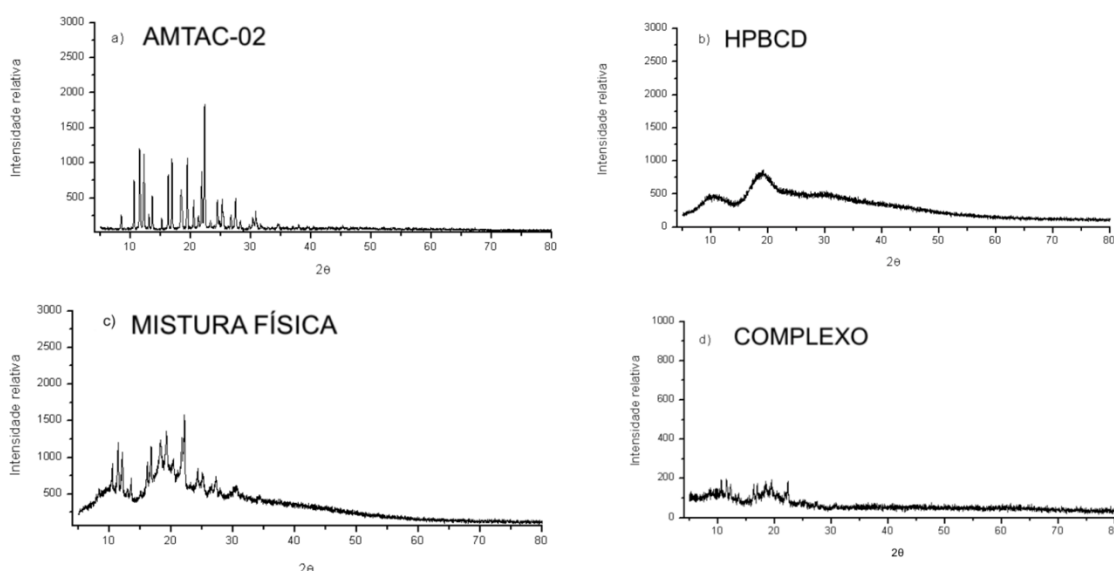
O padrão de DRX do AMTAC-02 apresentou vários picos de difração, comprovando sua natureza cristalina (Figura 48-a). A HP β CD exibiu um padrão típico

de difração cristalina, confirmado com seu caráter amorfo conforme observado na Figura 48-b.

O padrão de difração de raios X da mistura física com razão molar de 1: 1, apresenta características da HP β CD, e também alguns picos de cristalinidade do AMTAC-02 são observados (Figura 48-e).

Os picos agudos do padrão indicaram a retenção da estrutura cristalina do AMTAC-02 na mistura física (Figura 48-c). No entanto, o padrão de DRX do complexo de inclusão foi evidentemente diferente do padrão de DRX da HP β CD comercial (Figura 47-b), com intensa redução dos picos pontiagudos, indicando a formação de material amorfo. Estes resultados indicam a formação do complexo de inclusão AMTAC-02: HP β CD de acordo com Eleamen e colaboradores (2016).

Figura 48 – Dados Espectrais de DRX.



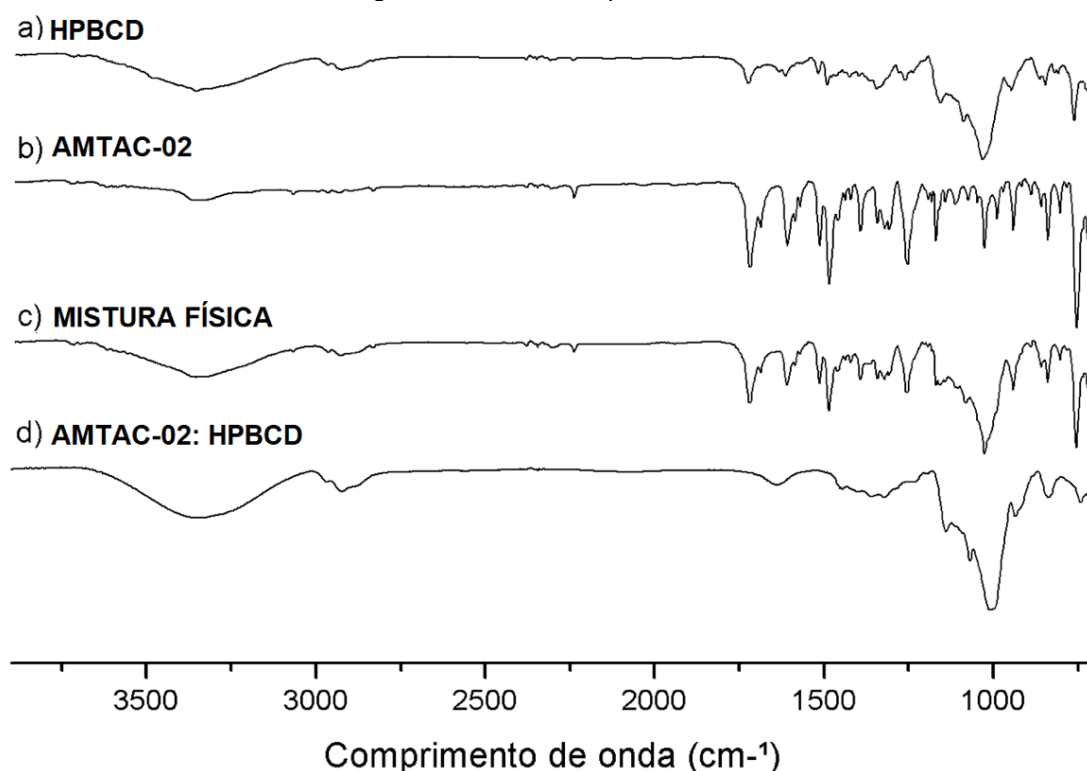
Fonte; Autor.

5.5.5 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

Nos espectros de IV, foram encontrados sinais característicos da HP β CD (Figura 49-a) e do AMTAC-02 (Figura 49-b). Observando o espectro da mistura física (Figura 49-c), encontramos as intensidades tanto do fármaco, quanto da ciclodextrina. Já, observando os sinais característicos do complexo AMTAC-02:HP β CD (Figura 49-d), nota-se que as intensidades aparecem em bandas diferentes, e que os deslocamentos também mudaram tanto do fármaco, quanto da ciclodextrina, e isso é característico de que houve uma interação entre o fármaco e o complexo para

formação da complexação entre hóspede e hospedeiro. Alguns grupos funcionais que podem favorecer essa complexação são as nitrilas encontradas nas bandas de absorção em 3.350 e 3.362 cm^{-1} , as carbonilas em 1.720 e 1.725 cm^{-1} e a banda NH em 1.714 cm^{-1} da amina secundária do AMTAC-02. Esse NH da amina secundária do fármaco é um doador de ligação de hidrogênio, e tanto a carbonila quanto a nitrila são aceptores de ligação de hidrogênio, o que favorece as interações eletrostáticas entre o fármaco e a CD. Além disso, as regiões aromáticas no espectro podem favorecer as interações hidrofóbicas entre fármaco e CD, como previamente observado no estudo de *docking*, citado anteriormente (ELEAMEN et al., 2016; MELO et al., 2020).

Figura 49 – Dados Espectrais de IV.



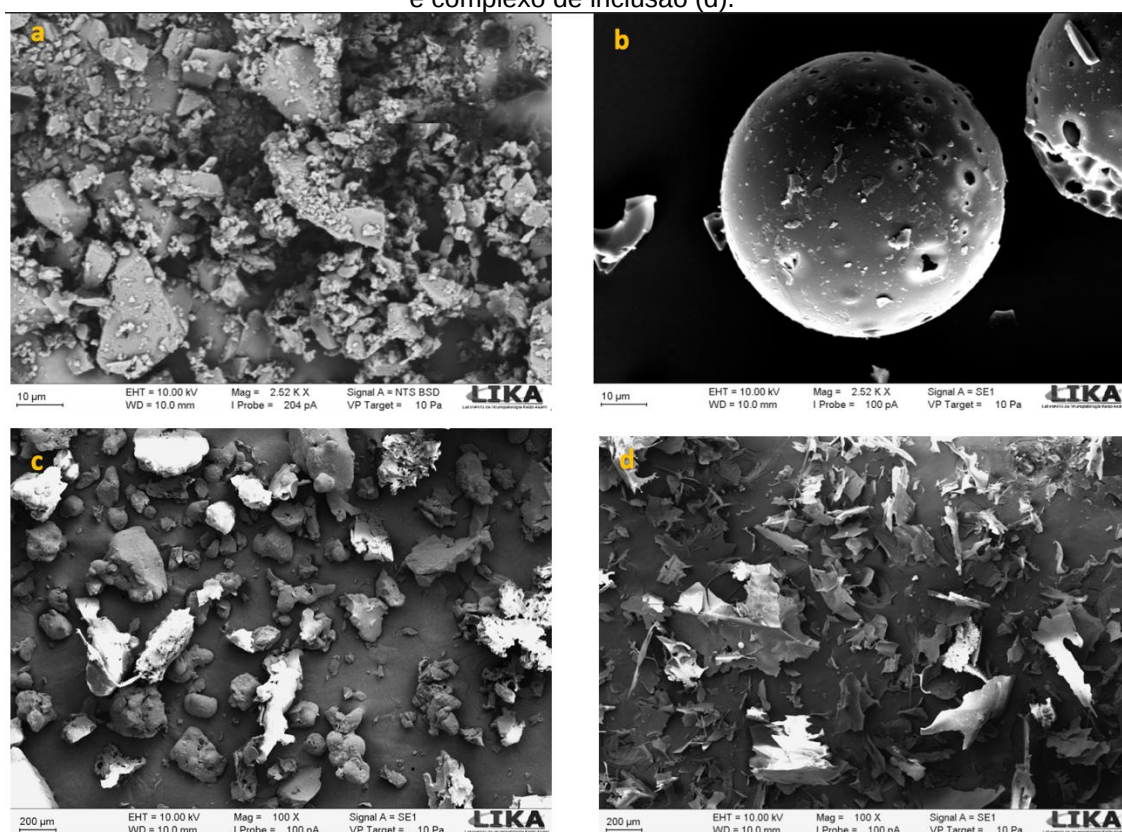
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A micrografia da HP β CD (Figura 50-b) mostra seus cristais típicos, na forma de paralelogramos monoclinicos, com dimensões de algumas dezenas de micra, superfície e contornos definidos. Assim, na análise da micrografia relativa ao complexo de inclusão (Figuras 50-d), ficam claras as mudanças morfológicas do material frente aos seus precursores (ELEAMEN et. al., 2016; MELO et al. 2020).

Observa-se que houve pequena redução da cristalinidade do material com a formação de agregados amorfos, característico da modificação química superficial, de dimensões menores às encontradas nos cristais das substâncias puras, como podem ser vistos na Figura 50 a e b, respectivamente. Essa redução da cristalinidade para partículas menores mais laminares e agregadas amorfas, sugere a presença de uma nova fase sólida. Essas mudanças no aspecto morfológico das amostras complexadas sugerem a existência de uma única fase anterior relacionado corroborando com a literatura no trabalho de Melo e colaboradores (2020). A comparação dessas imagens sugere a formação do complexo AMTAC-02: HP β CD.

Figura 50 – Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV): AMTAC-02 (a); HP β CD (b); mistura física (c); e complexo de inclusão (d).



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar *in vitro* a capacidade de interação com DNA e BSA dos derivados inéditos por meio de espectroscopia de absorção em UV-visível, emissão de fluorescência e viscosidade;
- ✓ Verificar a capacidade de inibição das enzimas topoisomerases I e II humana dos derivados mais ativos em testes proliferativos;
- ✓ Dar continuidade ao incremento de solubilidade executando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear, Raman, Análise Térmica, Espectrofotometria de Fluorescência para melhor comprovação da complexação AMTAC-02: HP β CD.
- ✓ Publicação de artigos científicos.

7 CONCLUSÕES

Visando a obtenção de potenciais fármacos quimioterápicos, esse trabalho propôs a síntese, avaliação preliminar da atividade antiproliferativa e incremento de solubilidade de novos derivados espiro-acridínicos. Baseado nos estudos preliminares de Almeida (2016) e Gouveia (2018) e Silva (2018), realizando-se o enfoque no anel acridínico.

Na 1ª etapa do trabalho, realizou-se o *docking* molecular frente a alvos previamente descritos como potenciais alvos para os derivados espiro-acridínicos. Desse modo, as moléculas avaliadas frente aos alvos Topo II α -DNA AMTAC's 23, 22 e 21 apresentaram superioridade de desempenho com energia livre de ligação: -10.91, -10.56, -10.37 Kcal mol⁻¹ e constante de afinidade: 10.11, 18.08 e 25.19 nM, respectivamente. Destacando-se a proximidade do AMTAC-23 com o ligante etoposídeo que apresentou energia livre de ligação (-11.2 Kcal mol⁻¹) e constante de afinidade (6.18 nM). Em relação ao alvo DNA, os três compostos selecionados exibiram energia livre de ligação -10.40, -9.73, -10.08 Kcal mol⁻¹ e constante de afinidade 23.73, 73.82 e 41.05 nM, respectivamente, enquanto o ligante acridina apresentou energia livre de ligação (-6.99 Kcal mol⁻¹) e constante de afinidade (7.58 μ M).

Realizou-se a síntese de treze novos derivados espiro-acridínicos, por via paralela e convergente, sendo oito deles derivados da série AMTAC. E cinco derivados foram sintetizados, partindo dos intermediários 2-ciano *N*-fenilacetamida para obtenção dos derivados da série ACMD.

A maioria dos derivados para as duas séries foram sintetizados através de eficientes metodologias de síntese e purificação, apresentando rendimentos reacionais satisfatórios. Todos foram caracterizados físico-quimicamente, bem como por métodos espectroscópicos unidimensionais. Os espectros analisados apresentaram-se consistentes com as respectivas estruturas químicas.

A citotoxicidade dos derivados frente a linhagens HCT-116, MCF-7 e L929, foram avaliadas. O AMTAC-19 apresentou percentuais de inibição de 88,5 % do crescimento celular. Em MCF-7, os AMTAC's 04 e 17 tiveram pouca atividade (41,3 e 38,7% de inibição, respectivamente), enquanto os AMTAC's 19 e 21 apresentaram atividade moderada (66,2 e 60,6% de inibição, respectivamente). Em células normais (L929), os AMTAC's 04 e 17 foram pouco citotóxicas (39,3 e 49,2% de inibição do crescimento celular, respectivamente), porém os AMTAC's 19 e 21 foram muito

citotóxicas para a linhagem normal (70,4 e 98,6% de inibição, respectivamente). Na série ACMD, o ACMD-01 apresentou alta atividade em HCT-116 (71,9% de inibição do crescimento celular) e pouca atividade em MCF-7 e L929 (31,4 e 48% de inibição do crescimento celular, respectivamente). O ACMD-02 apresentou atividade moderada em HCT-116 (61,9% de inibição), enquanto os demais ACMD's apresentaram pouca atividade (ACMD-03 e 04) ou nenhuma atividade (ACMD-05 e 06).

Na 2ª etapa do trabalho, o estudo de *docking* para o complexo de inclusão realizado com o AMTAC-02 e dois tipos de ciclodextrinas: β -ciclodextrina e HP β CD, apontaram que o melhor resultado foi para o complexo AMTAC-02: HP β CD, que após o estudo de *docking* foram confirmados experimentalmente.

O complexo de inclusão formado entre AMTAC-02:HP β CD foi preparado com êxito pelo método de liofilização, proporcionando uma alternativa preliminar para superar a baixa solubilidade aquosa do AMTAC-02.

Predições farmacocinéticas foram realizadas para conhecimento das propriedades de ADME e de metabolização dos novos derivados espiro-acridínicos. Os derivados sintetizados apresentaram-se com caráter lipossolúvel alto, inibições a isoformas CYPs importantes para o metabolismo na biofase, probabilidades baixas de metabolizações, que acometem características importantes para posteriores estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B. Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. **In International Journal of Cancer**. v. 127, n. 2, p. 257-68, 2010
- ALBERT, A. **The acridine**. 2º Ed. London: Edward Arnold Publishers, Ltd. p. 1966.
- ALBINO, S. L., Planejamento, síntese e avaliação do perfil quimioterápico de derivados tiosemicarbazônicos hibridizados a núcleos heterocíclicos, 251, 2020. Dissertação.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 22, p. 4506-4521, 2014.
- ALMEIDA VL, LEITÃO A, REINA LCB, MONTANARI CA, DONNICI CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**. 2005; 28:118-29.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538-1556, 2017.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467-475, 2016.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 13023-13042, 2015.
- ARRAIS, A., SAVARINO, P.: Raman spectroscopy is a convenient technique for the efficient evaluation of cyclodextrin inclusion molecular complexes of azo-dye colorants and largely polarisable guest molecules. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry** 64(1-2), 73-81 (2009).
- ARYA, S., KUMAR, A., KUMAR, N., ROY, A. S. M. S. Synthesis and anticancer activity evaluation of some acridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**. v. 24, p. 1942–1951, mai 2014.
- BARROS, F. W. A.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTI, B. C.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; LIMA, M. C. A.; et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**. p. 37–46. 2013.

BARROS, F. W. A.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; BEZERRA, D. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; MOURA, M. A. F. B.; ABREU, F. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; GOULART, M. O. F. Synthesis and citotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 3533-3539, 2012.

BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO, M. Acridine and Acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 139-169, 2007.

BONASSA EMA. Alterações metabólicas. In: Bonassa EMA, Santana TR. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. São Paulo (SP): Atheneu; 2005. p. 169-175.

BRANDÃO, HN; DAVID, JP; COUTO, RD; NASCIMENTO, JAP; DAVID, JM. Química e farmacologia de quimioterápicos anti-neoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Taxas de mortalidade por câncer**. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=19465>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery, Amsterdam**, v. 59, n. 7, p. 645-666, July 2007.

BUDAL, R. M. Estudos de formação de complexo de inclusão em ciclodextrinas. 2003. Tese de doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

CARVALHO, I. M. **Ciclodextrinas: novas aplicações**. Dissertação apresentada para a Universidade Fernando Pessoa para obtenção do título de mestre, Porto, 2013.

CUI, F.; HUO, R.; HUI, G.; LV, X.; JIN, J.; ZHANG, G.; ZING, W. Study on the interaction between aglycon of daunorubicin and calf thymus DNA by spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1001, p. 104-110, 2011.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ BARRETO, L. C. L. Utilização de CDs na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Science**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

D'ADDARIO G1, PINTILIE M, LEIGHL NB, FELD R, CERNY T, Shepherd FA. Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a metaanalysis of the published literature. **J Clin Oncol**. v. 23, n. 13, p. 2926-36, mai 2005

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, mai 2004.

DE JESUS, M. B. et al. Improvement of the oral praziquantel anthelmintic effect by cyclodextrin complexation. *Journal of Drug Targeting*, Yverdon, v. 18, n. 1, p. 21–26, Jan. 2010.

ELEAMEN, G. R. A.; COSTA, S. C.; LIMA-NETO, R. G.; R. P. NEVES, ROLIM, PEDRO, L. A.; ROLIM-NETO, J. P.; MOURA, R. O.; AQUINO T. M.; BENTO, E. S.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; MENDONÇA, E. A. M.; OLIVEIRA, E. E. Improvement of Solubility and Antifungal Activity of a New Amino thiophene Derivative by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 00, n. 00, p. 1-10, 2016.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutation Research**. v. 623, p. 14-23, 2007.

FREITAS, M. R.; ROLIM, L. A.; SOARES, M. F.; ROLIM-NETO, P. J.; ALBUQUERQUE, M. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1095-1100, 2012.

FRÖMMING, K. H.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins in pharmacy. **Kluwer Academic Publishers**, London, v. 5, cap. β , p. 19-12, 1992.

GANDHI, N. M.; BARAS, A.; MUNARI, E.; FARAJ, S.; REIS, L. O.; LIU, J. J.; KATES, M.; HOQUE, M. O.; et al. Gemcitabine and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive urothelial carcinoma: Predicting response and assessing outcomes. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 33, p. 204.e1–204.e7, 2015.

GAO, C.; LI, B.; ZHANG, B.; SUN, Q.; LI, L.; LI, X.; CHEN, C.; TAN, C.; LIU, H.; JIANG, Y. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 1800–1807, abr 2015.

GBD 2015. Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**. **2016 Oct**; 388 (10053):1659-1724.

GHOSH, R.; BHOWIK, S.; BAGCHI, A.; DAS, D.; GHOSH, S. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: biophysical studies on its binding to DNA. **European Biophysics Journal**. v. 39, p. 1243-1249, 2010.

GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**; **2013**.

GOPALAN, P. R.; ANNASELVI, A. G.; SUBRAMANIAM, P. Preparation and characterization of inclusion complexes of isoproturon with native and modified β -

cyclodextrins. **International Journal of Agriculture and Food Science**, v.2, n. 4, p. 164-169, 2012.

GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic Med. Chem.** v. 26, p. 5911–5921, 2018.

GREENWOOD, D. Conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 36, p. 857-872, 1995.

HALGREN, T. A. et al., MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. **J Comp. Chem.**, v. 20, p. 720-729, 1999.

HAIYEE, Z.A., SAIM, N., SAID, M., ILLIAS, R.M., MUSTAPHA, W.A.W., HASSAN, O.: Characterization of cyclodextrin complexes with turmeric oleoresin. **Food Chemistry** 114(2), 459-465 (2009).

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques. Advances in **Analytical Chemistry and Instrumentation**, New York, v. 4, p. 117-121, 1965.

HOSSAIN, M.; KUMAR, G.S. DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguarine versus ethidium: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. **Journal Chemistry Thermodynamics**, v. 41, p. 764-774, 2009.

HUANG, Z.; LONDON, E. Effect of Cyclodextrin and Membrane Lipid Structure upon Cyclodextrin–Lipid Interaction. **Langmuir**, v. 29, p. 14631-14638, 2013.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, Resistência A Múltiplas Drogas (Mdr) e Relação Estrutura Atividade De Moduladores. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 10, 2148-2154, 2010.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de novos casos de câncer no Brasil em 2018**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso em: 30 jul. 2017.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, 2015.

JANOVEC, L.; KOZUURKOVA, M.; SABOLOVA, D.; UNGVARSKY, J.; PAULIKOVA, H.; PLSIKOVA, J.; VANTOSA, Z.; IMRICH, J. Cytotoxic 3,6-bis((imidazolidionone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 1790-1801, 2011.

KUMAR, R.; SHARMA, A.; SHARMA, S.; SILAKARI, O.; SINGH, M.; KAUR, M. Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. **Arabian Journal of Chemistry**, in press, 2013.

LAFAYETTE, E. A.; ALMEIDA, S. M. V.; PITTA, M. G. R.; BELTRÃO, E. I. C.; SILVA, T. G.; MOURA, R. O.; PITTA, I. R.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; LIMA, M. C. A. Synthesis, DNA Binding and Topoisomerase I Inhibition Activity of Thiazacridine and Imidazacridine Derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 15035-15050, 2013. doi:10.3390/molecules181215035.

LANG, X. L.; SUN, Q. S.; CHEN, Y. Z.; LI, L. L.; TAN, C. Y.; LIU, H. X.; GAO, C. M.; JIANG, Y. Y. Novel synthetic 9-benzyloxyacridine analogue as both tyrosine kinase and topoisomerase I inhibitor. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, p. 677–680, 2013.

LANG, X.; LI, L.; CHEN, Y.; SUN, Q.; WUA, Q.; LIU, F.; TAN, C.; LIU, H.; GAO, C.; JIANG, Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 21, 4170–4177. 2013.

LEI, H.; WANG, X.; WU, C. Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 38, p. 279–289, 2012.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161–165, 2009.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4-17

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, p. 1-11, 2006.

LOFTSSON, T.; FRIKDRÍKSDÓTTIR, H.; SIGURKDARDÓTTIR, A. M.; UEDA, H. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 110, n. 2, p. 169-177, 1994.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam**, v. 225, n. 1-2, p. 15-30, ago 2001.

LOFTSSON, T., HREINSDÓTTIR, D., MÁSSON, M.: Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. **International Journal of Pharmaceutics** v. 302, n. 1–2, p. 18-28, 2005.

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 31, n. 2, p. 117-124, ago 2010.

MASUI, K.; GINI, B.; WYKOSKY, J.; ZANCA, C.; MISCHÉL, P. S.; FURNARI, F. B.; et al. A tale of two approaches: complementary of mechanisms of cytotoxic and targeted

therapy resistance may inform next-generation cancer treatments. **Carcinogenesis**. v. 34, p. 725-38, 2013.

MELO, C. O. et al. Preparation and Characterization of Spiro-Acridine Derivative and 2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin Inclusion Complex. **J. Mol. Struct.** 1222, 128945, 2020.

MENDONÇA, E. A. M.; LIRA, M. C. B.; RABELLO, M. M.; CAVALCANTI, I. M. F.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; LIMA, M. D. C. A.; PITTA, M. G. R.; HERNANDES, M. Z.; SANTOS-MAGALHAES, N. S. Enhanced Antiproliferative Activity of the New Anticancer Candidate LPSF/AC04 in Cyclodextrin Inclusion Complexes Encapsulated into Liposomes. **Aaps Pharmscitech** 13(4), 1355-1366 (2012). doi:10.1208/s12249-012-9853-9

MENEZES, T. M.; ALMEIDA, S. M. V.; MOURA, R. O.; SEABRA, G.; LIMA, M. DO C. A.; NEVES, J. L.; Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 122, p. 289-297, 2019.

MISRA, R.; DAS, M.; SAHOO, B. S.; SAHOO, S. K. Reversal of multidrug resistance in vitro by co-delivery of MDR1 targeting siRNA and doxorubicin using a novel cationic poly (lactide-co-glycolide) nanoformulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 475, 372–384. 2014.

MOURA, R. O. Síntese e avaliação in vitro de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos, pirimidínicos e piridínicos acridínicos. 2009. 238 f. Tese.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 228-250, 2014.

NAIK, P. N.; CHIMATADAR, S. A.; NANDIBEWOOR, S. T. Pharmacokinetic Study on the Mechanism of Interaction of Sulfacetamide Sodium with Bovine Serum Albumin: A Spectroscopic Method. *Biopharm. Drug Dispos.* 31: 120–128. 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 4º Ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer** 9. p. 338-350. 2009.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3 p. 33, 2011.

PALAKURTHI, S.; YELLEPEDDI, V. K.; VANGARA, K. K. Recent trends in cancer drug resistance reversal strategies using nanoparticles. *Exp. Opin. Drug Deliv.* v. 9, p. 287–301. 2012.

PIRES, M. A. S. **Preparo de compostos de inclusão de hidroclorotiazida, pioglitazona e claritromicina em ciclodextrinas por diferentes técnicas: caracterização e estudos biológicos.** Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Belo Horizonte, 2011.

PIZARRO, A. M.; SADLER, P. J. Unusual DNA models for metal anticancer complexes. **Biochimie.** 2009; 91: 1198-1211.

PLUMMER, M.; DE MARTEL, C.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; FRANCESCHI, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet Glob Health.** 2016 Sep;4(9):e609-16.

RABELLO, M. M., **Desenvolvimento e automação de metodologias in silico para o estudo de complexos de inclusão utilizados na inovação terapêutica.** (Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016).

RAMESH, C.N.; BHUVANESWARA, R.C.; BALAKRISHNAN, M.; SEKHAR, K.B.C. Preparation and characterization of pioglitazone hcl solid inclusion complex - an solubility enhancement technique. **International Journal of Biopharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 180-183, 2014.

REIMER, L. Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. New York: Springer, 1998.

SÁ BARRETO, L. C. L.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Ciclodextrinas: Importante excipiente farmacêutico funcional. **Latin America Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, p. 629-626, 2008.

SAENGER, W. et al. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1787-1802, 1998.

SALEM, O. M.; VILKOVÁ, M.; JANOCKOVÁ, J.; JENDZELOVSKY, R.; FEDOROCKO, P.; ZILECKÁ, E.; KASPÁRKOVÁ, J.; BRABEC, V.; IMRICH, J.; KOZURKOVÁ, M. New spiro tria(thia)zolidine–acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules** 86. 690–700. 2016.

SANTOS, G. C. Avaliação do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em células da linhagem PC12 [tese]. São Paulo: **UNESP, Faculdade De Ciências Farmacêuticas**; 2008.

SCHAEFER, L.; REINHARDT, D. P. Special issue: Extracellular matrix: Therapeutic tools and targets in cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 97,1-3. 2016.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Recent Advances in the Chemistry of Acridines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, Volume 115 ISSN 0065-2725. 2015.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. **Journal Heterocyclic Chemistry**, v. 47, p. 491-502, 2010.

SHEN, H.; GU, Z.; JIAN, K.; QI, J. In vitro study on the binding of gemcitabine to bovineserum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 75, p. 86– 93, 2013.

SHIEN, T.; IWATA, H.; FUKUTOMI, T.; INOUE, K.; AOGI, K.; KINOSHITA, T.; ANDO, J.; TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, K.; SHIBATA, T.; FUKUDA, H. Tamoxifen plus tegafururacil (TUFT) versus tamoxifen plus Adriamycin (doxorubicin) and cyclophosphamide (ACT) as adjuvant therapy to treat node positive premenopausal breast cancer (PreMBC): results of Japan Clinical Oncology Group Study 9404. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.74, p. 603–609, 2014.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. v. 22, p. 7265-79, 2003.

SINGLA, P.; LUXAMI, V.; PAUL, K. Synthesis and in vitro evaluation of novel triazine analogues as anticancer agents and their interaction studies with bovine serum albumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 117. 59-69.2016.

SILVA, C. V. N. S., et al., Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP- β -CD inclusion complex encapsulated in microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016: p. 494.

SINGH, R. et al. Characterization of cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v. 2, n. 3, p. 171-183, jan 2010.

SOUSA, G. L. S., Síntese e avaliação do potencial antitumoral de novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos. 2019, 250 p. Dissertação.

SORENSEN, S.F.; CARUS, A.; MELDGAARD, P. Intravenous or oral administration of vinorelbine in adjuvantchemotherapy with cisplatin and vinorelbine for resected NSCLC. **Lung Cancer**, v. 88, p. 167-173, 2015.

STELLA, V. J. et al. Mechanism of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 3-16, Mar. 1999.

STEWART BW, WILD CP, editors. World cancer report 2014 Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.

SU, Z.; CHEN, M.; XIAO, Y.; SUN, M.; ZONGA, L.; ASGHAR, S.; DONG, M.; LI, H.; PING, Q.; ZHANG, C., ROS-triggered and regenerating anticancer nanosystem: An effective strategy to subdue tumor's multidrug resistance. **Journal of Controlled Release**. 196, 370–383. 2014.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, July 1998.

SZYMANSKI, J.; SZYMANSKI, P. Novel tetrahydroacridine derivatives inhibit human lung adenocarcinoma cell growth by inducing G1 phase cell cycle arrest and apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 68, 959–967. 2014.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, p. 455-461, 2010. Doi: 10.1002/jcc.21334.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier system. Chemical synthetic acridine-based derivatives as topoisomerase I Inhibitors. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 1021–1024, jul 2014.

VARLAN, A.; HILLEBRAND, M. Bovine and Human Serum Albumin Interactions with 3- Carboxyphenoxathiin Studied by Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy. **Molecules**,15; 3905-3919; 2010.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das cyclodextrins. **Química Nova**, v. 11, p. 160-168, 2008.

VILKOVA, M.; PROKAIOVA, M.; IMRICH, J. Spontaneous cyclization of (acridin-9-ylmethyl)thioureas to spiro [dihydroacridine-90(100H),5-imidazolidine]-2-thiones, a novel type of acridine spirocycles. **Tetrahedron**, 70 944e961. 2014.

VILLAVERDE, J. et al. Inclusion complexes of α - and γ -cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterization. II. Enhanced solubilisation and removal from soils. *Chemosphere*, Oxford. v. 60, n. 5, p. 656–664, Aug. 2005.

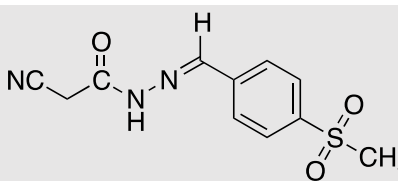
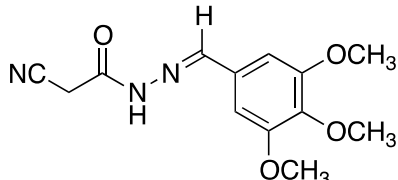
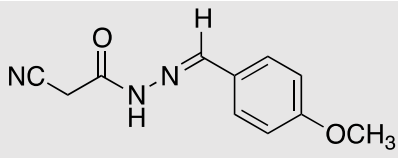
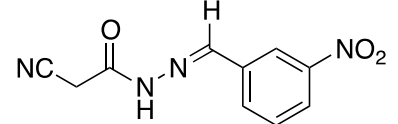
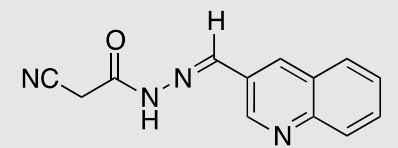
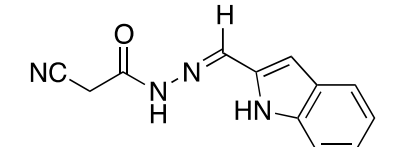
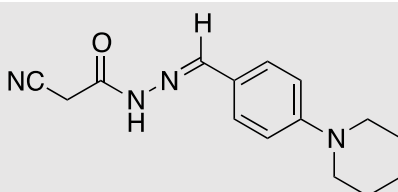
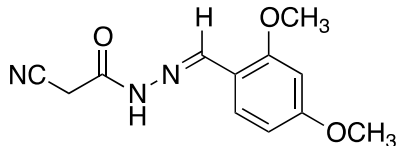
WENZ, G. Cyclodextrins as Building Blocks for Supramolecular Structures and Functional Units. **Angewandte Chemie International Edition**, v.33 p. 803-822, 1994. Doi: 10.1002/anie.199408031.

YU, K.-D.; LIU, G.-Y.; CHEN, C.-M.; LI, J.-W.; WU, J.; LU, J.-S.; SHEN, Z.-Z.; SHAO, Z.-M. Pathologic Complete Remission in Aggressive HER2-Positive Breast Cancers, especially in Luminal-B Subtype, Compared with a Once-Every-3-Weeks Schedule. **The Oncologist**, v.18, p. 511-517, 2013.

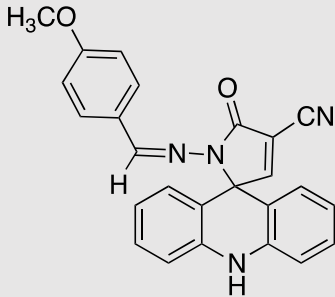
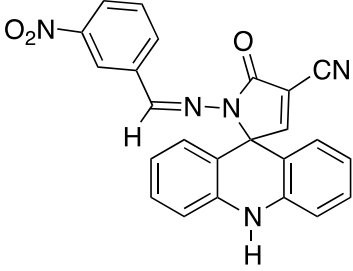
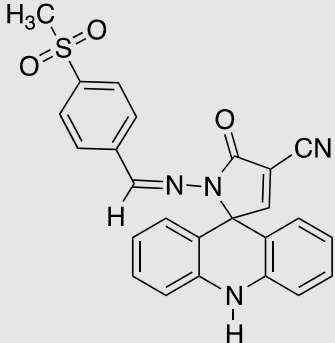
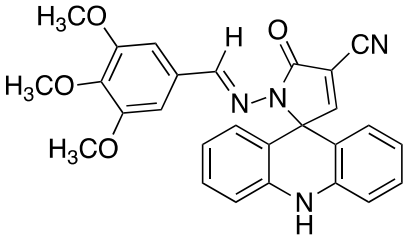
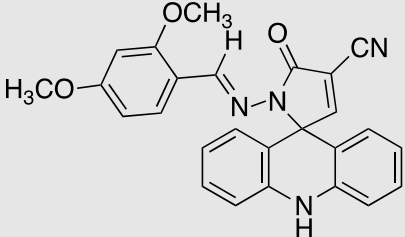
YU, W.; SHI, L.; HUI, G.; CUI, F. Synthesis of biological active thiosemicarbazone and characterization of the interaction with human serum albumin. **Journal of Luminescence**, v.134, p. 491-497, 2013.

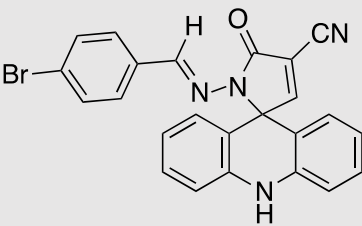
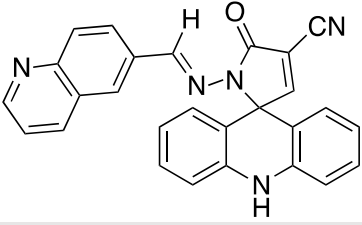
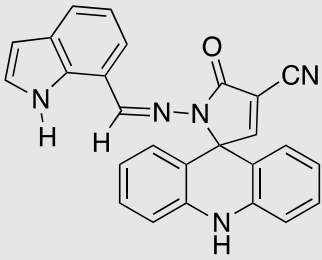
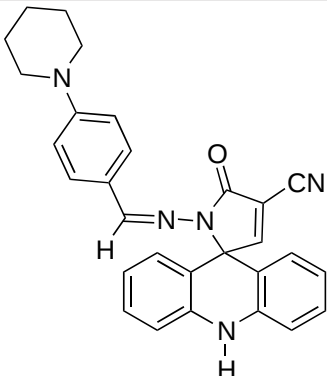
ZHANG, W.; ZHANG, B.; YANG, T.; WANG, N., GAO, C.; TAN, C.; LIU, C.; JIANG, Y. Synthesis and Antiproliferative Activity of 9-Benzylamino-6-chloro-2-methoxy-acridine derivatives as Potent DNA-binding Ligands and Topoisomerase II Inhibitors, **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.116, p. 59-70, jun 2016.

APÊNDICE A – INTERMEDIÁRIOS OBTIDOS DA SÉRIE JR

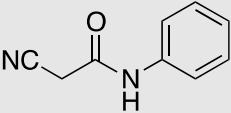
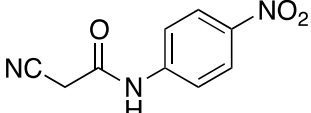
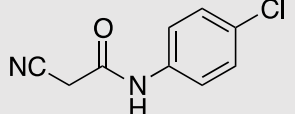
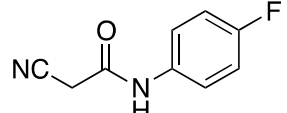
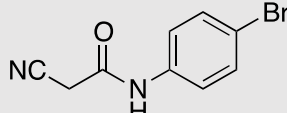
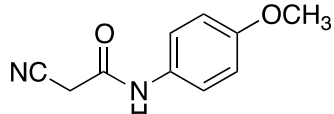
INTERM.	F.M	f.e	NOME
JR-04	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₃ S		2-ciano- <i>N'</i> -(4-(metilsulfonil)benzilideno)acetohidrazida
JR-10	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₄		2-ciano- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetoxybenzilideno)acetohidrazida
JR-11	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂		2-ciano- <i>N'</i> -(4-metoxibenzilideno)acetohidrazida
JR-16	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₃		2-ciano- <i>N'</i> -(3-nitrobenzilideno)acetohidrazida
JR-18	C ₁₃ H ₉ N ₃ O		2-ciano- <i>N'</i> -(quinolin-3-ilmetileno)acetohidrazida
JR-19	C ₁₂ H ₉ N ₃ O		<i>N'</i> -((1 <i>H</i> -indol-2-il)metileno)-2-cianoacetohidrazida
JR-20	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O		2-ciano- <i>N'</i> -(4-(piperidin-1-il)benzilideno)acetohidrazida
JR-23	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃		2-ciano- <i>N'</i> -(2,4-dimetoxibenzilideno)acetohidrazida

APÊNDICE B – DERIVADOS OBTIDOS DA SÉRIE AMTAC

derivados	F.M.	f.e.	nome
AMTAC-02	$C_{25}H_{20}N_4O_2$		1'-((4-metoxi-benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
AMTAC-04	$C_{24}H_{17}N_5O_3$		1'-((3-nitro-benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
AMTAC-15	$C_{25}H_{18}N_4O_3S$		1'-((4-(metil-sulfonil)benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
AMTAC-17	$C_{27}H_{24}N_4O_4$		(<i>E</i>)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
AMTAC-18	$C_{26}H_{22}N_4O_3$		(<i>E</i>)-1'-((2,4-dimetoxi-benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

DERIVADOS	F.M	F.E.	NOME
AMTAC-19	C ₂₄ H ₁₇ BrN ₄ O		(<i>E</i>)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
AMTAC-21	C ₂₇ H ₁₉ N ₅ O		(<i>E</i>)-5'-oxo-1'-((quinolina-6-il-metileno)amino)-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
AMTAC-22	C ₂₆ H ₁₉ N ₅ O		1'-(((1 <i>H</i> -indol-7-il)metileno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
AMTAC-23	C ₂₉ H ₂₇ N ₅ O		5'-oxo-1'-((4-(piperidina-1-il) benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

APÊNDICE C – INTERMEDIÁRIOS OBTIDOS DA SÉRIE JM

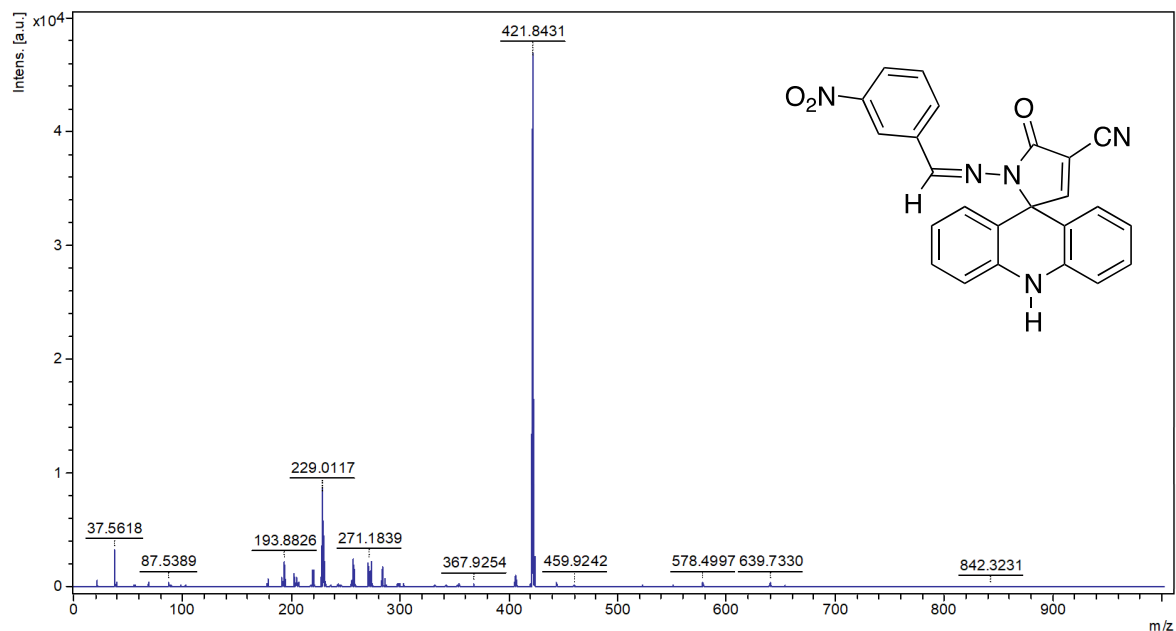
DERIVADOS	F.M	F.E.	NOME
JM-01	$C_9H_8N_2O$		2-ciano- <i>N</i> -fenil-acetamida
JM-02	$C_9H_7N_3O_3$		2-ciano- <i>N</i> -(4-nitro-fenil)-acetamida)
JM-03	$C_9H_7ClN_2O$		2-ciano- <i>N</i> -(4-cloro-fenil)-acetamida)
JM-04	$C_9H_7FN_2O$		2-ciano- <i>N</i> -(4-fluor-fenil)-acetamida)
JM-05	$C_9H_7BrN_2O$		2-ciano- <i>N</i> -(4-bromo-fenil)-acetamida)
JM-06	$C_{10}H_{10}N_2O_2$		2-ciano- <i>N</i> -(metoxi-fenil)-acetamida)

APÊNDICE D – DERIVADOS DA SÉRIE ACMD

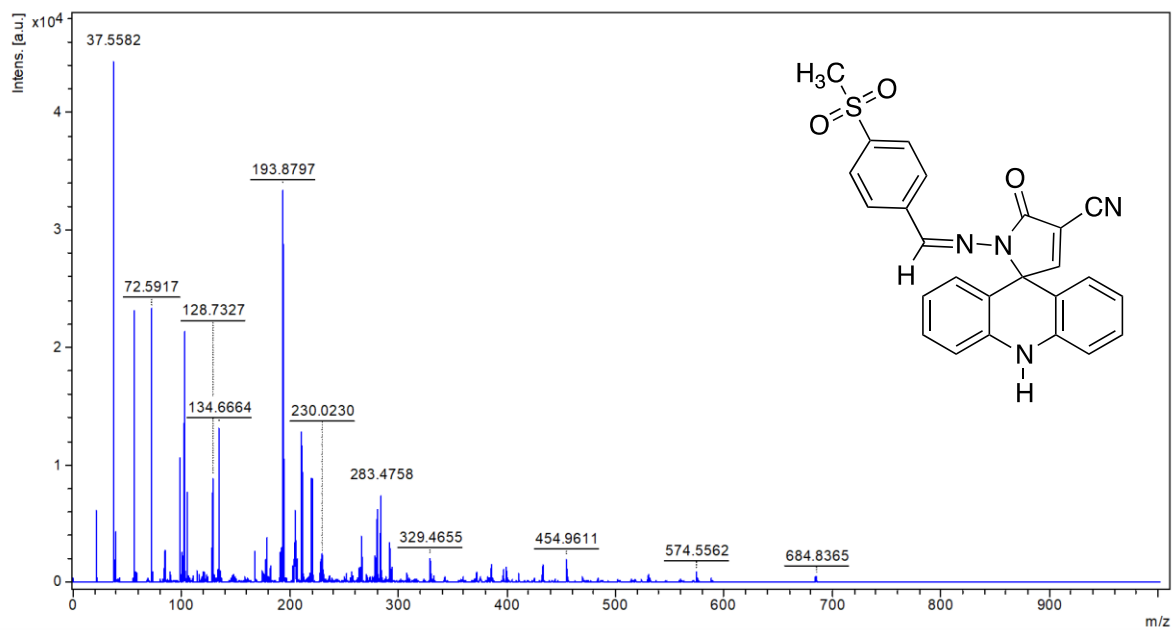
DERIVADOS	F.M	F.E.	NOME
ACMD-01	$C_{23}H_{17}N_3O$		5'-oxo-1'- fenil-1',5'- dihidro-10 <i>H</i> - espiro[acridina-9,2'- pirrol]-4'-carbonitrila
ACMD-02	$C_{23}H_{16}N_4O_3$		1'-(4-bromo- fenil)-5'- oxo-1',5'- dihidro -10 <i>H</i> - espiro[acridina-9,2'- pirrol]-4'-carbonitrila
ACMD-03	$C_{23}H_{16}ClN_3O$		1'-(4-cloro- fenil)-5'- oxo-1',5'- dihidro -10 <i>H</i> - espiro[acridina-9,2'- pirrol]-4'-carbonitrila
ACMD-04	$C_{23}H_{16}FN_3O$		1'-(4-fluor- fenil)- 5'- oxo-1',5'- dihidro -10 <i>H</i> - espiro[acridina-9,2'- pirrol]-4'-carbonitrila
ACMD-05	$C_{23}H_{16}BrN_3O$		1'-(4-nitro- fenil)-5'- oxo-1',5'- dihidro -10 <i>H</i> - espiro[acridina-9,2'- pirrol]-4'-carbonitrila
ACMD-06	$C_{24}H_{19}N_3O_2$		1'-(4-metoxi- fenil)-5'- oxo-1',5'- dihidro -10 <i>H</i> - espiro[acridina-9,2'- pirrol]-4'-carbonitrila

APÊNDICE E – ESPECTROS DE MASSAS DA SÉRIE AMTAC

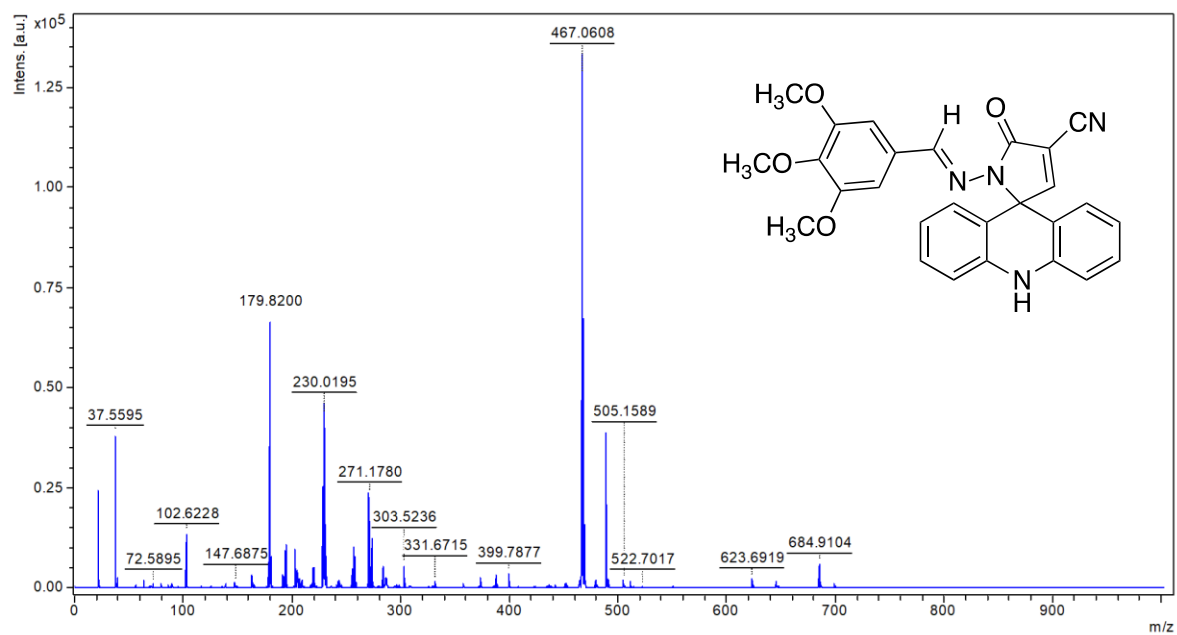
AMTAC-04



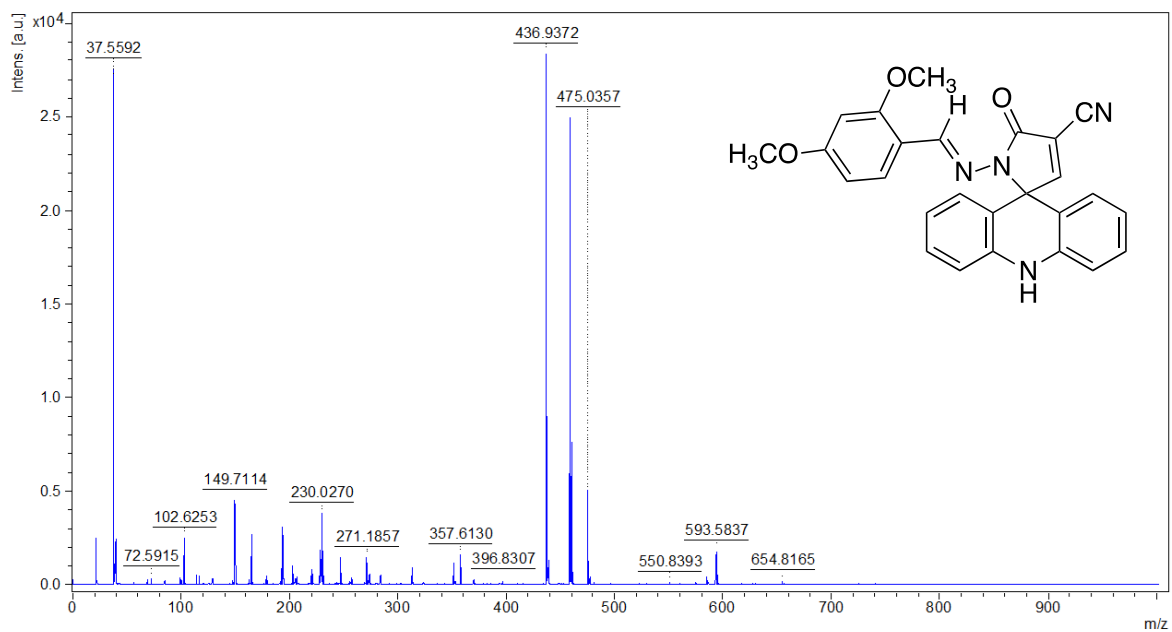
AMTAC-15



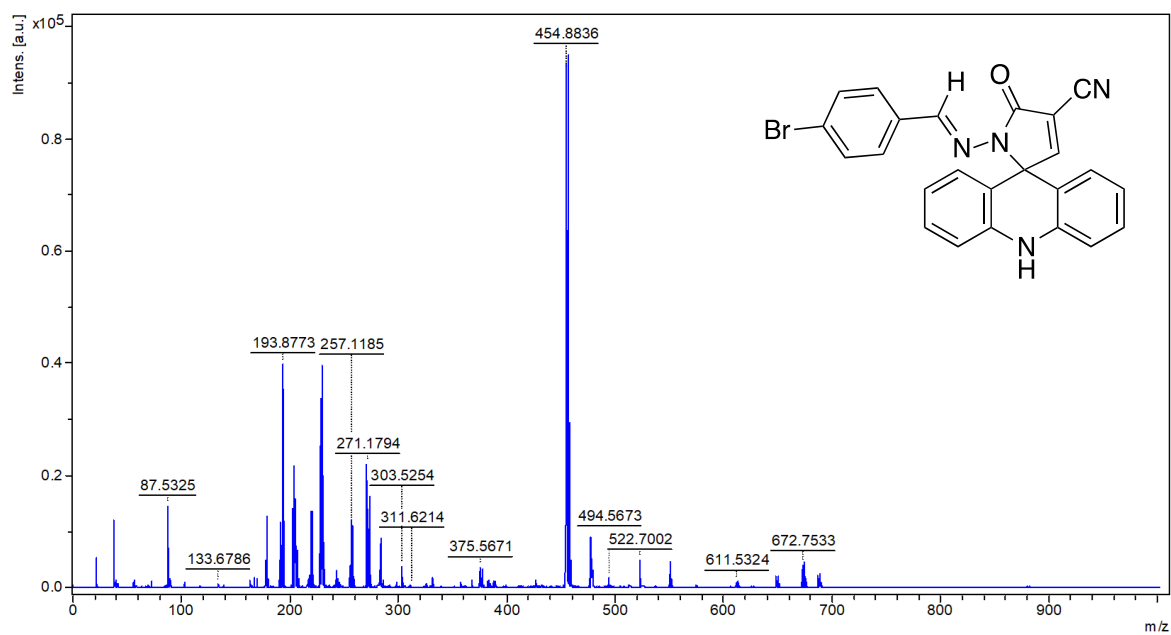
AMTAC-17



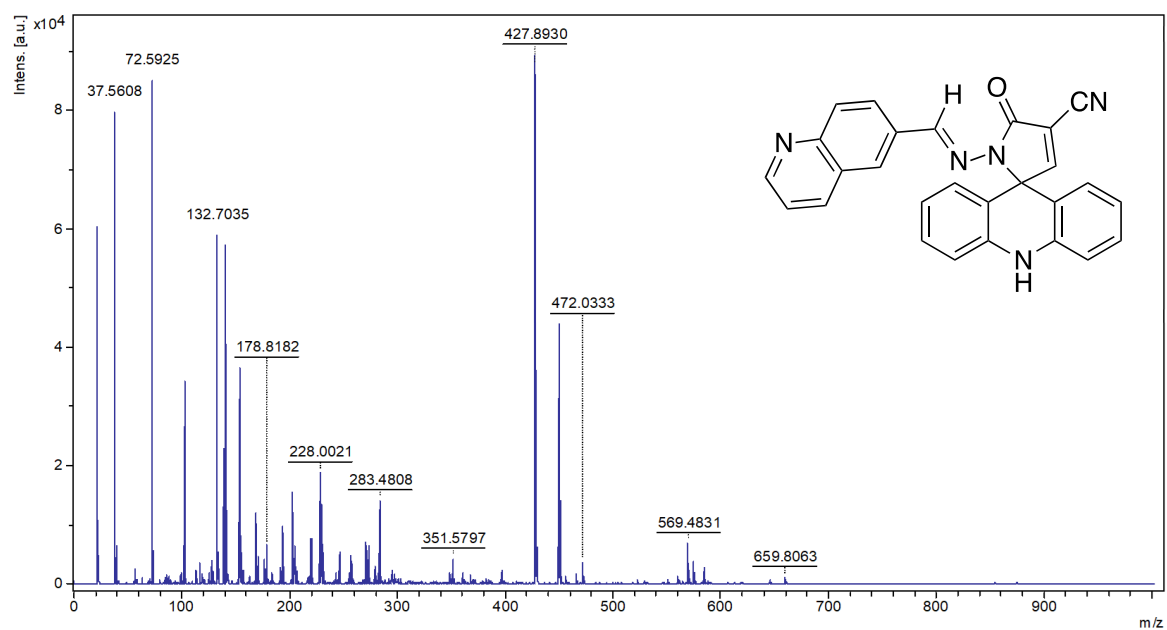
AMTAC-18



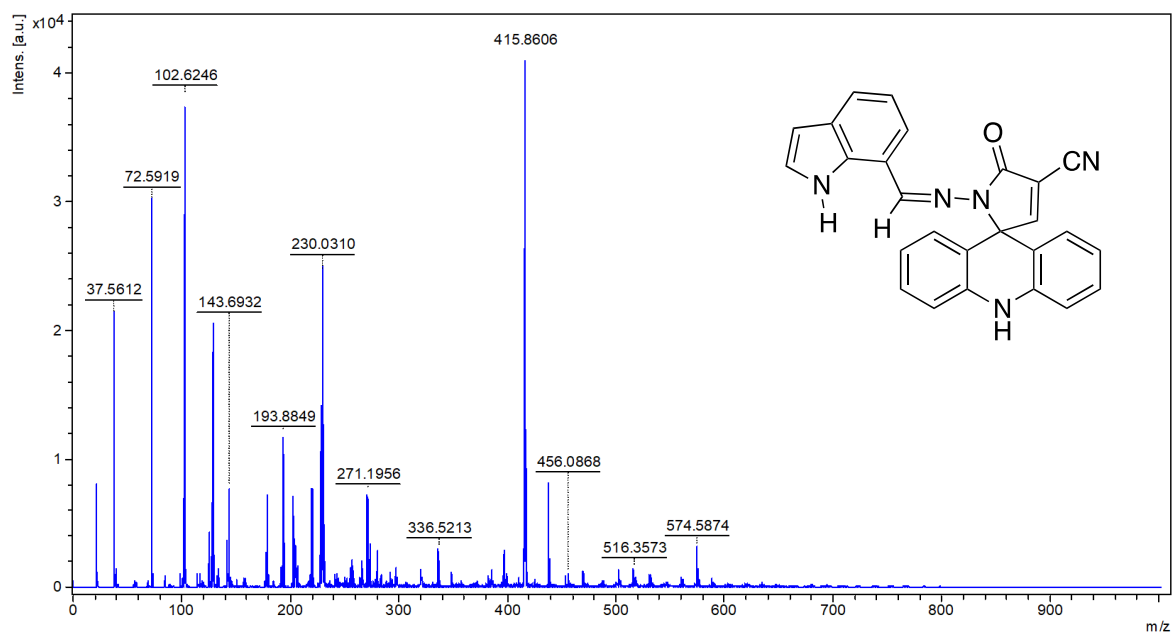
AMTAC-19



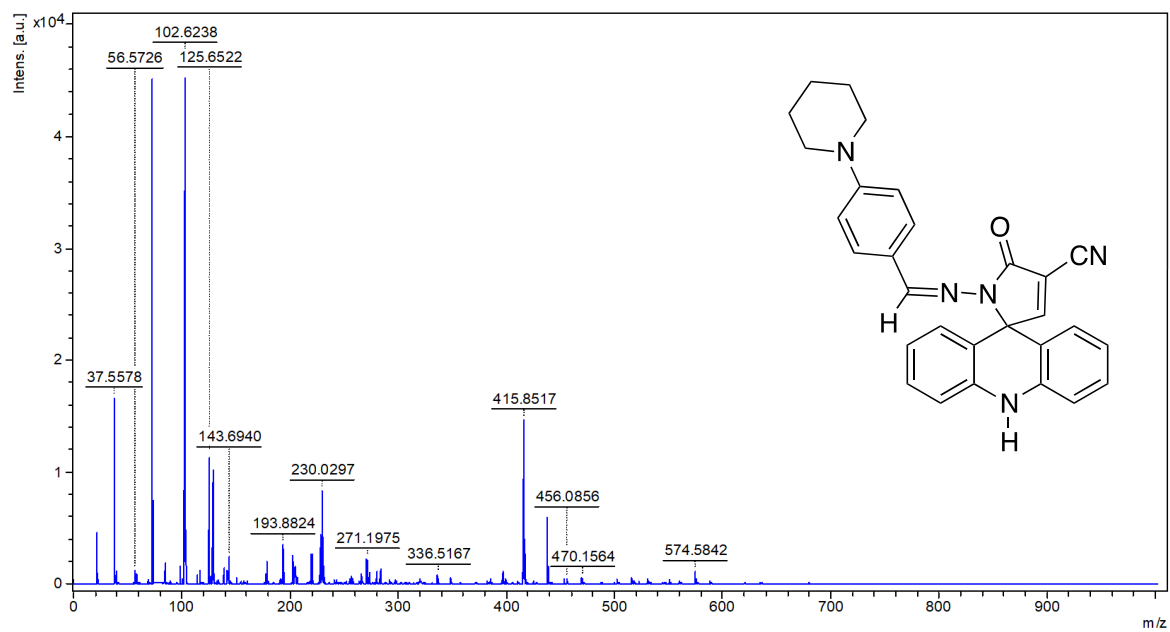
AMTAC-21



AMTAC-22

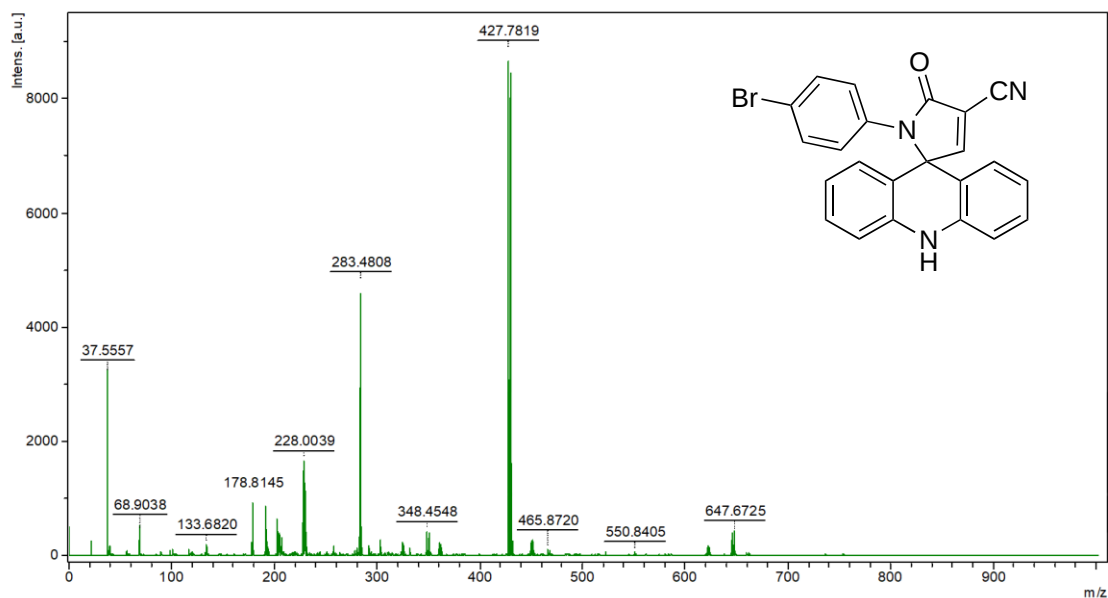


AMTAC-23

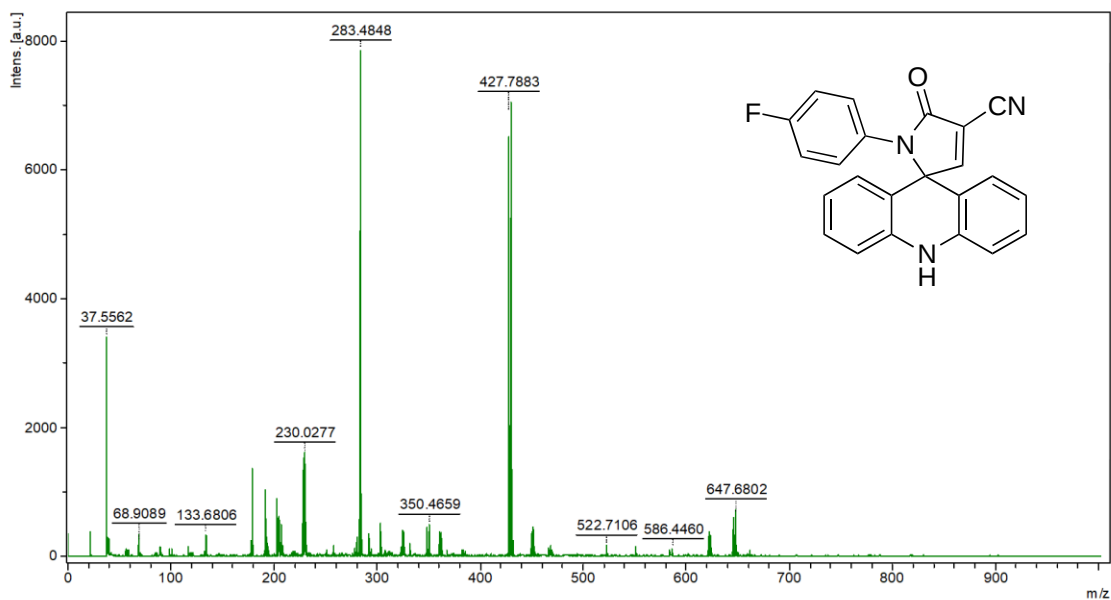


APÊNDICE F – ESPECTROS DE MASSAS DA SÉRIE ACMD

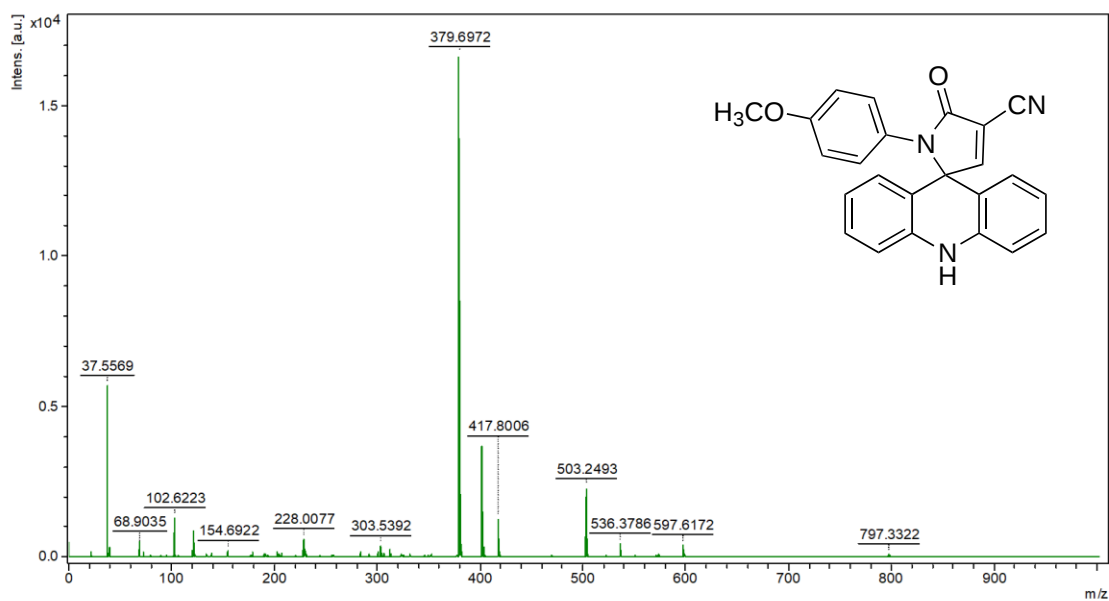
ACMD-02



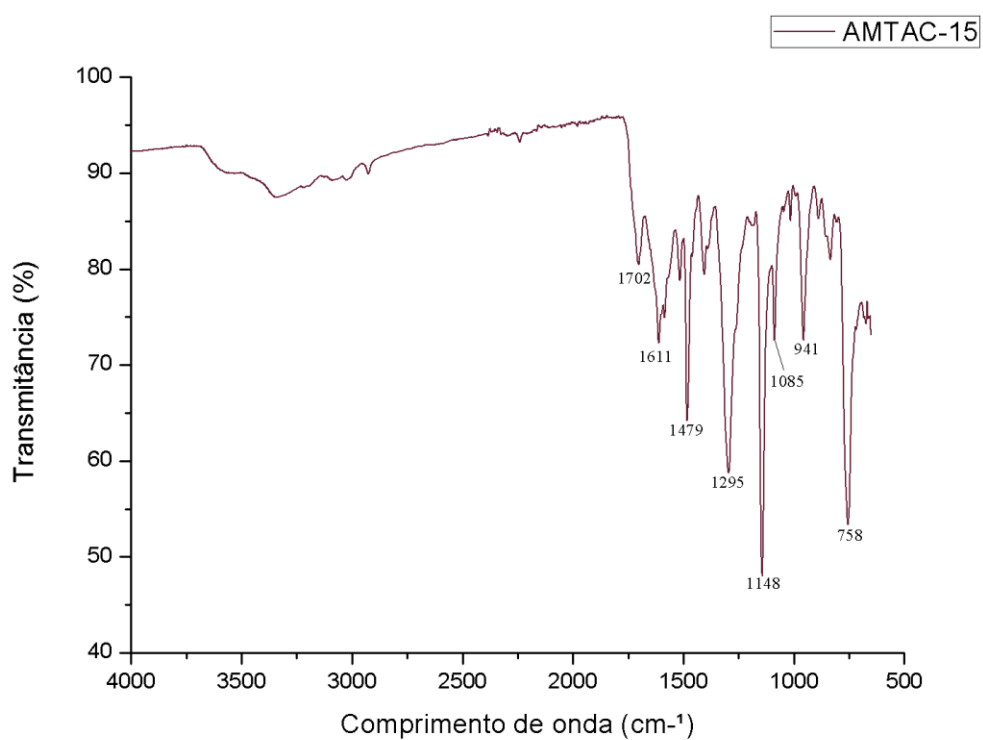
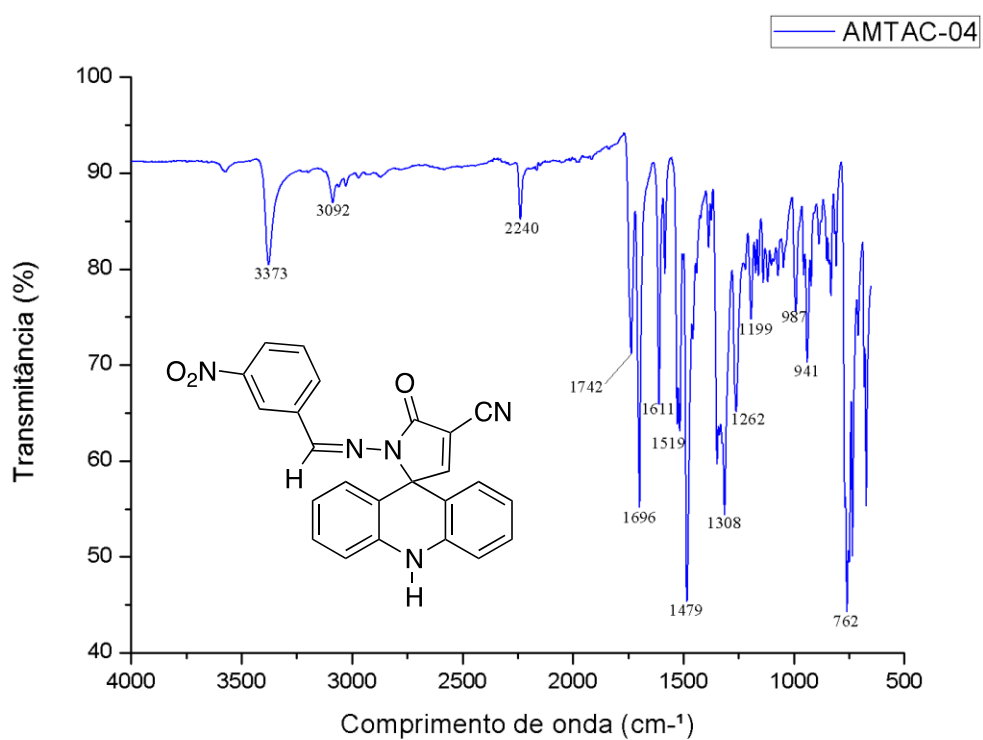
ACMD-04

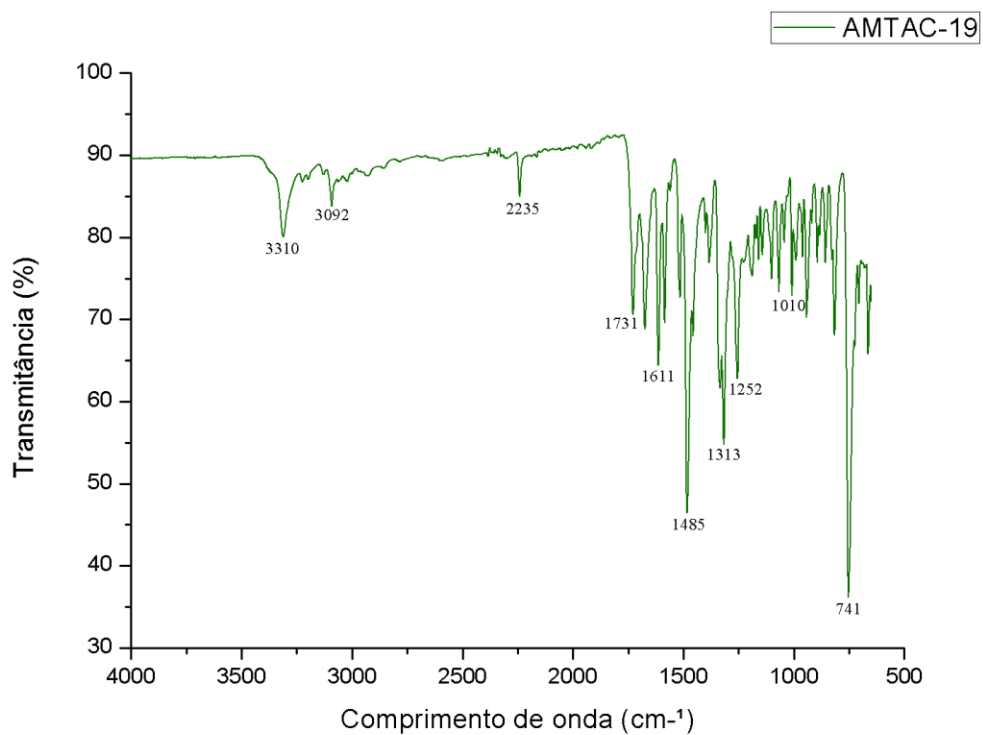
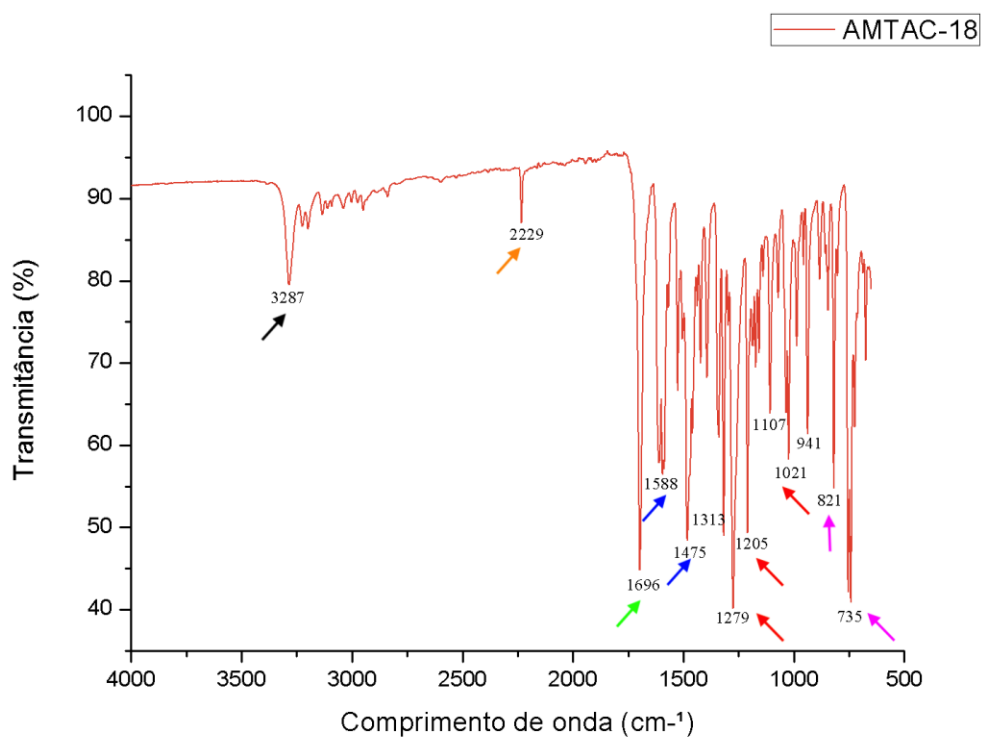


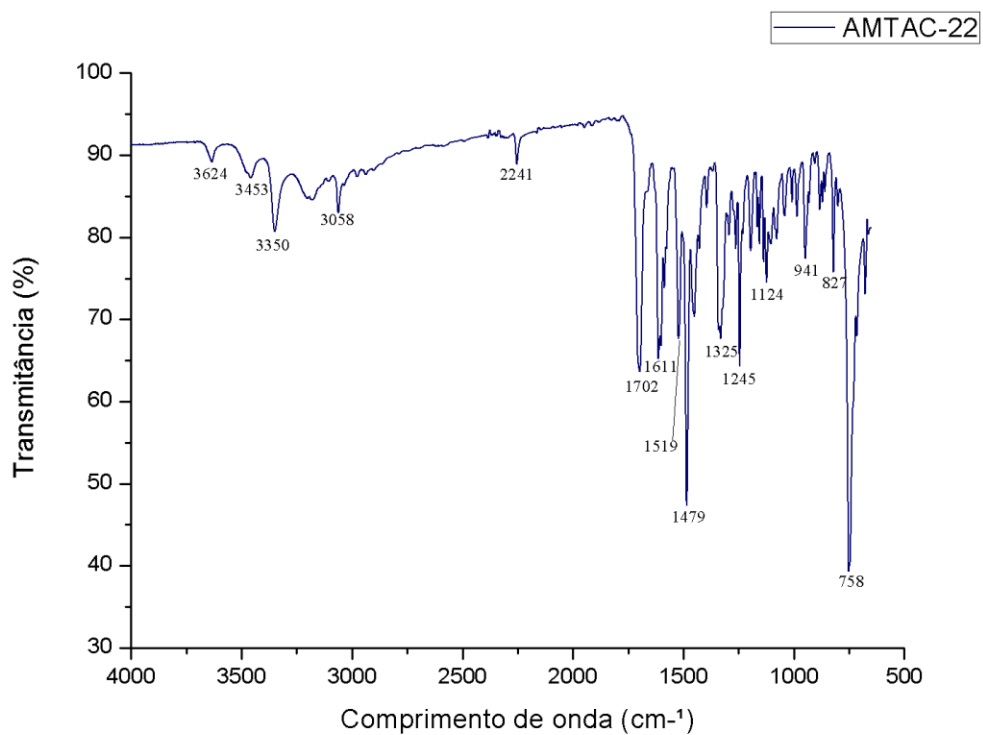
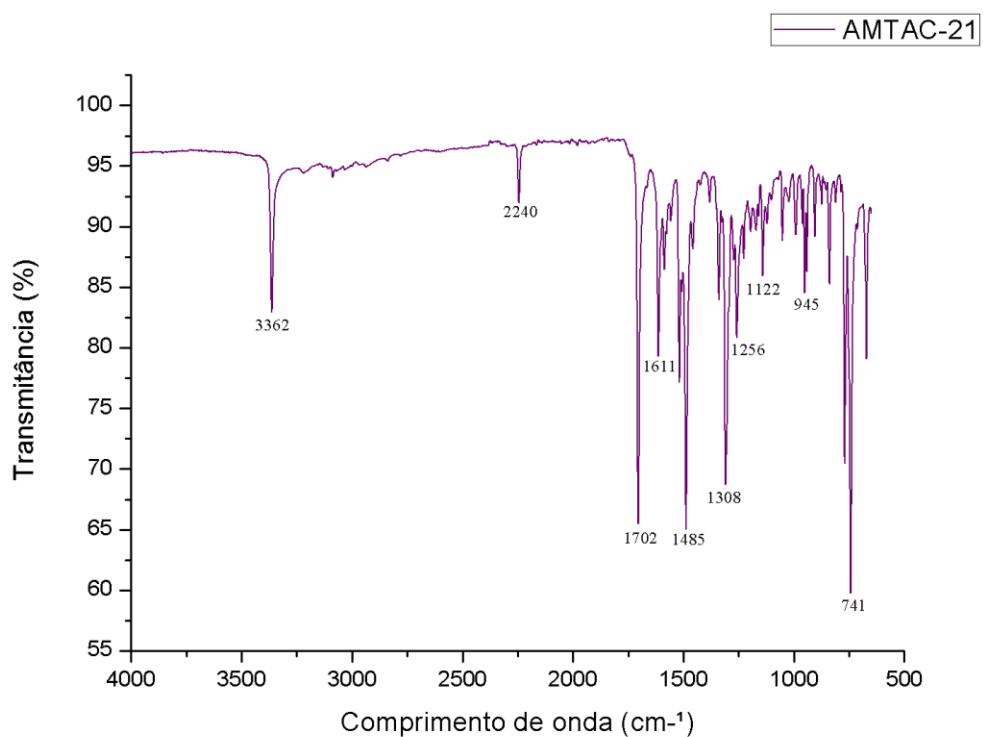
ACMD-06

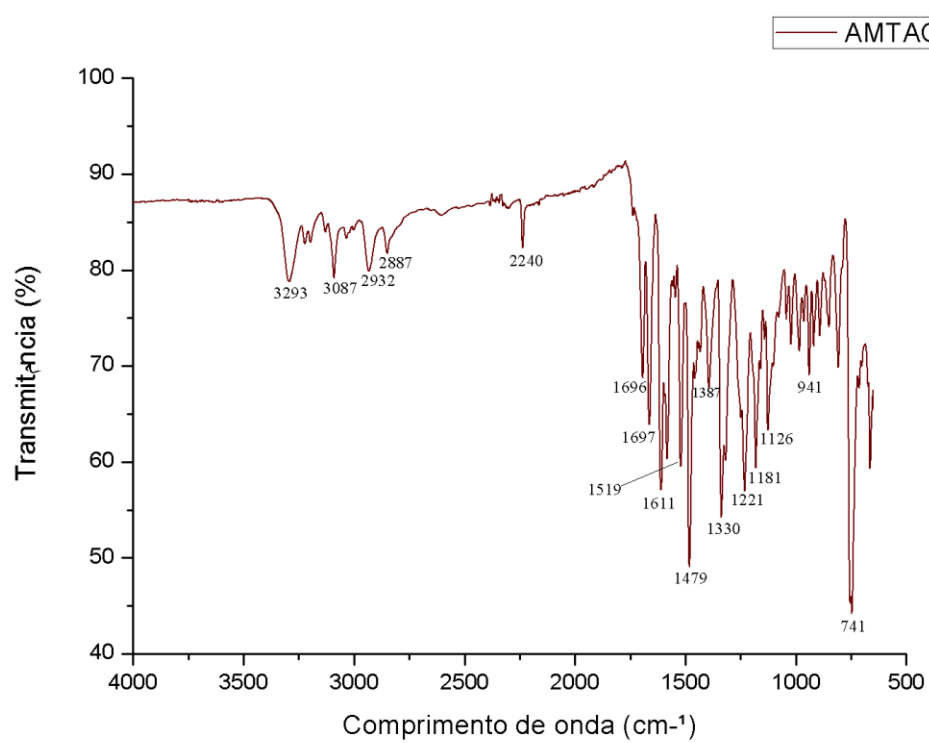


APÊNDICE G – ESPECTROS DE IV DA SÉRIE AMTAC

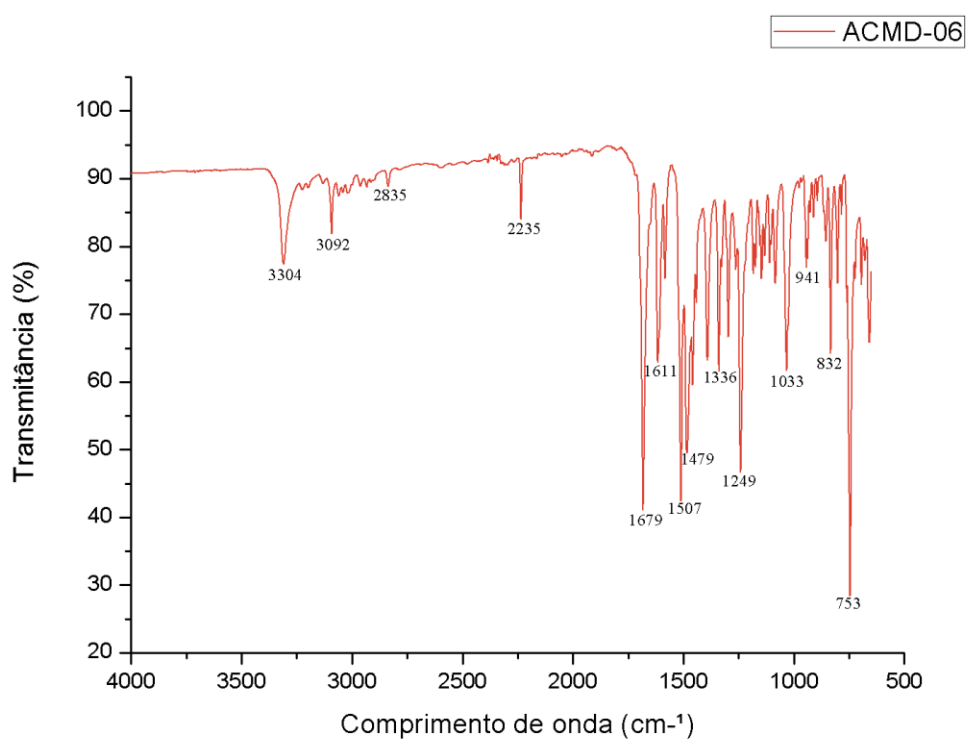
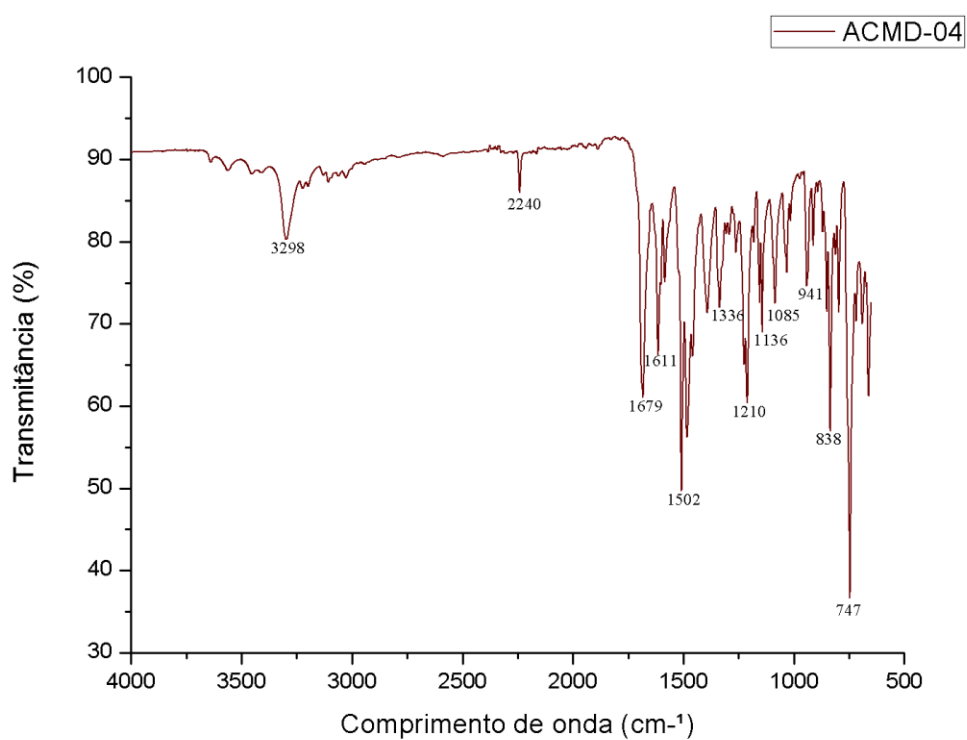






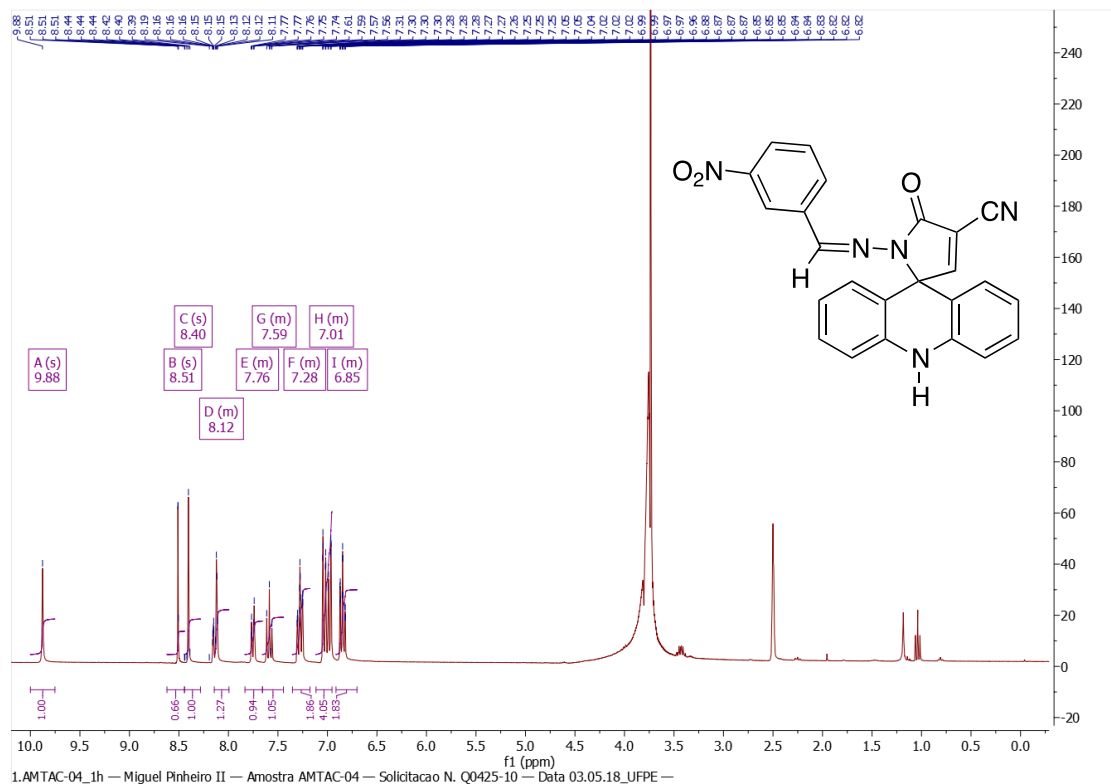


APÊNDICE H – ESPECTROS DE IV DA SÉRIE ACMD

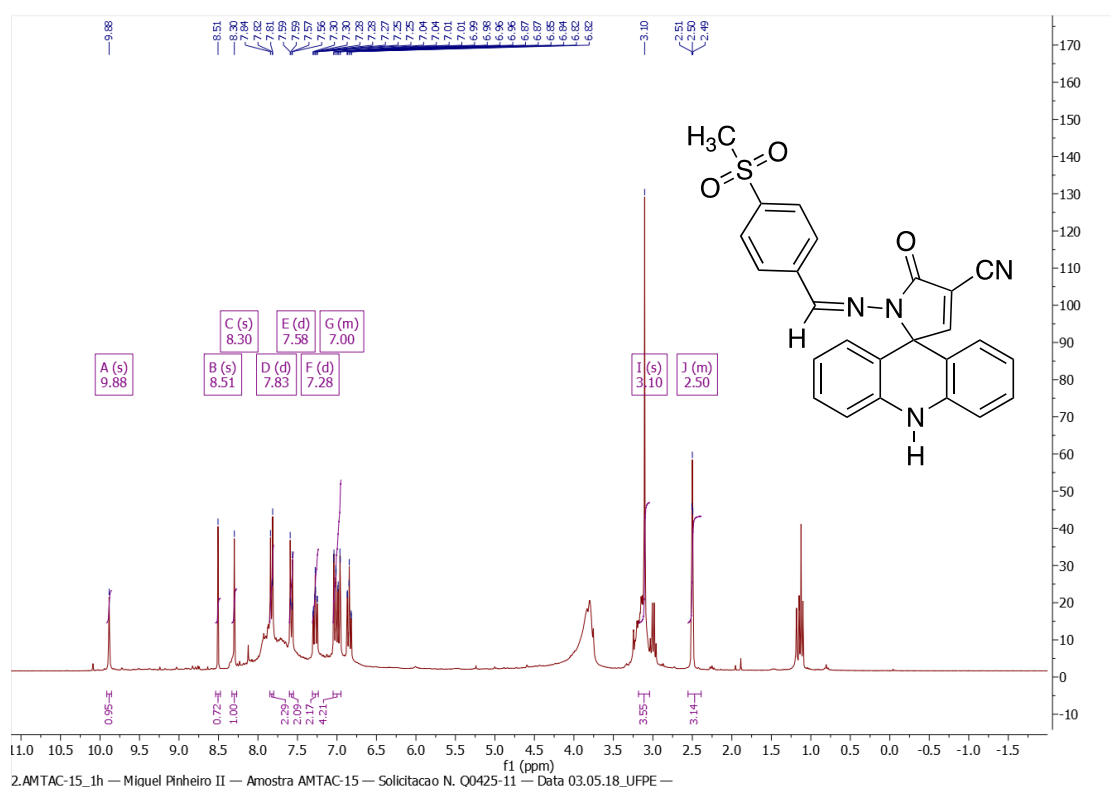


APÊNDICE I – ESPECTROS DE RMN ¹H DA SÉRIE AMTAC

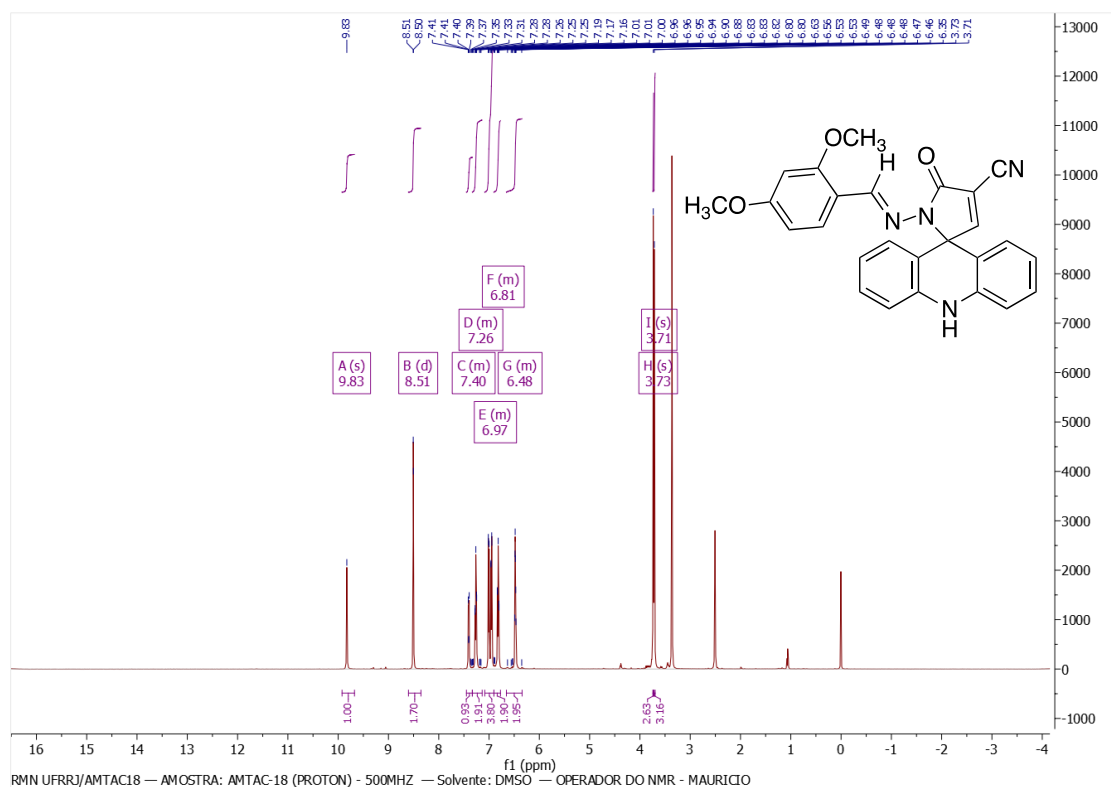
AMTAC-04



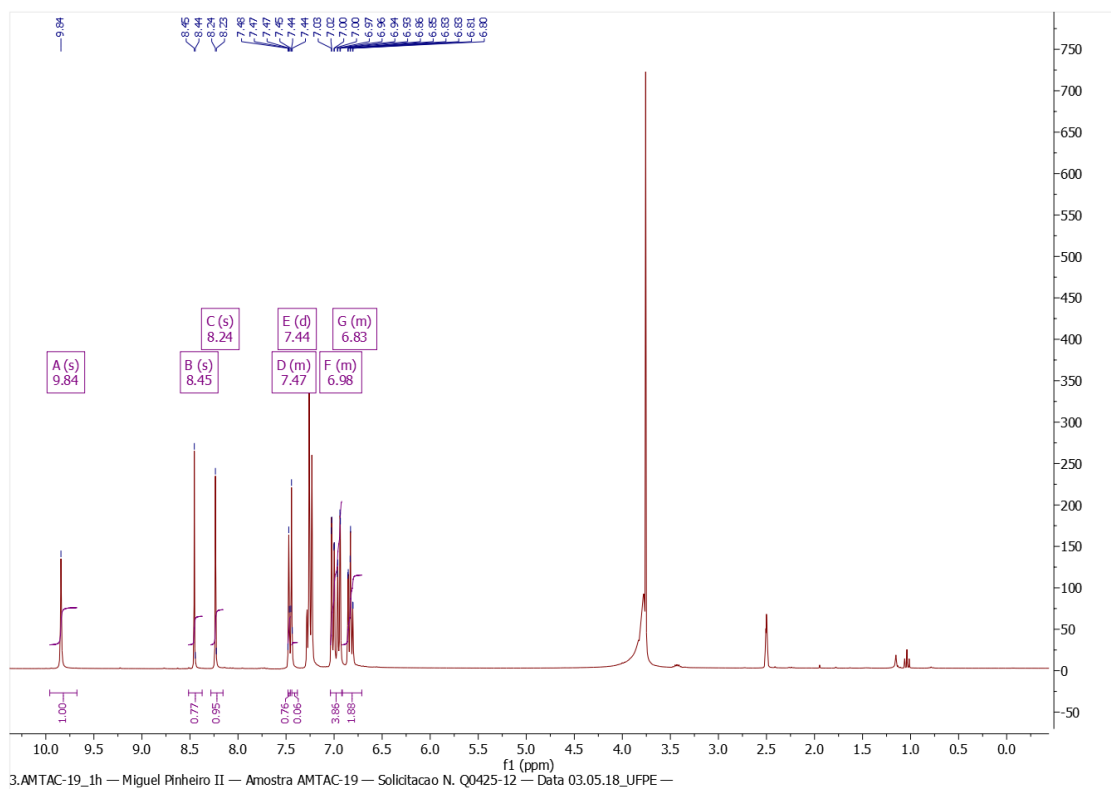
AMTAC-15



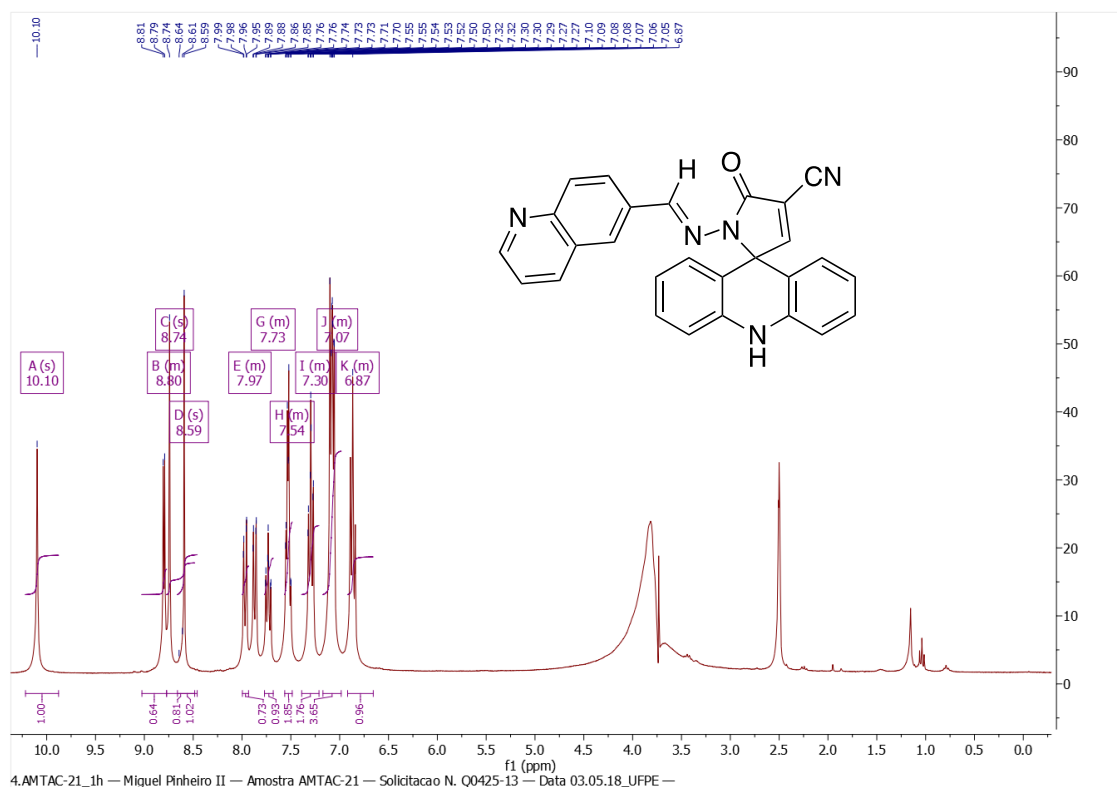
AMTAC-18



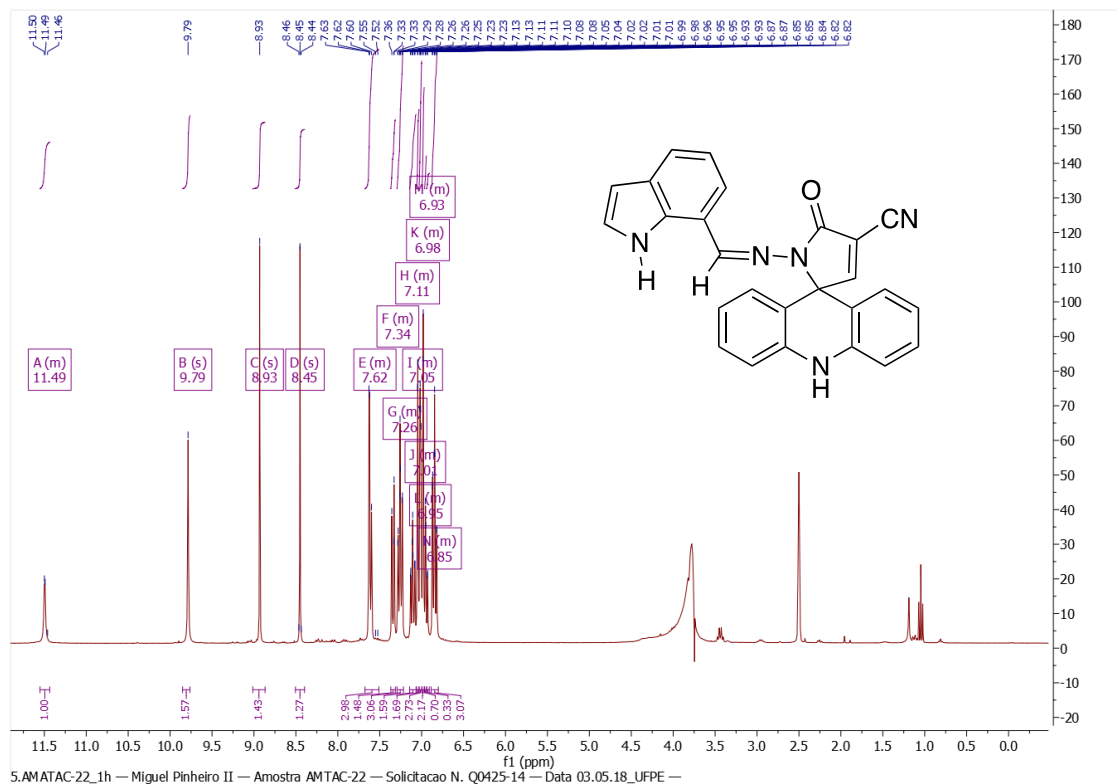
AMTAC-19



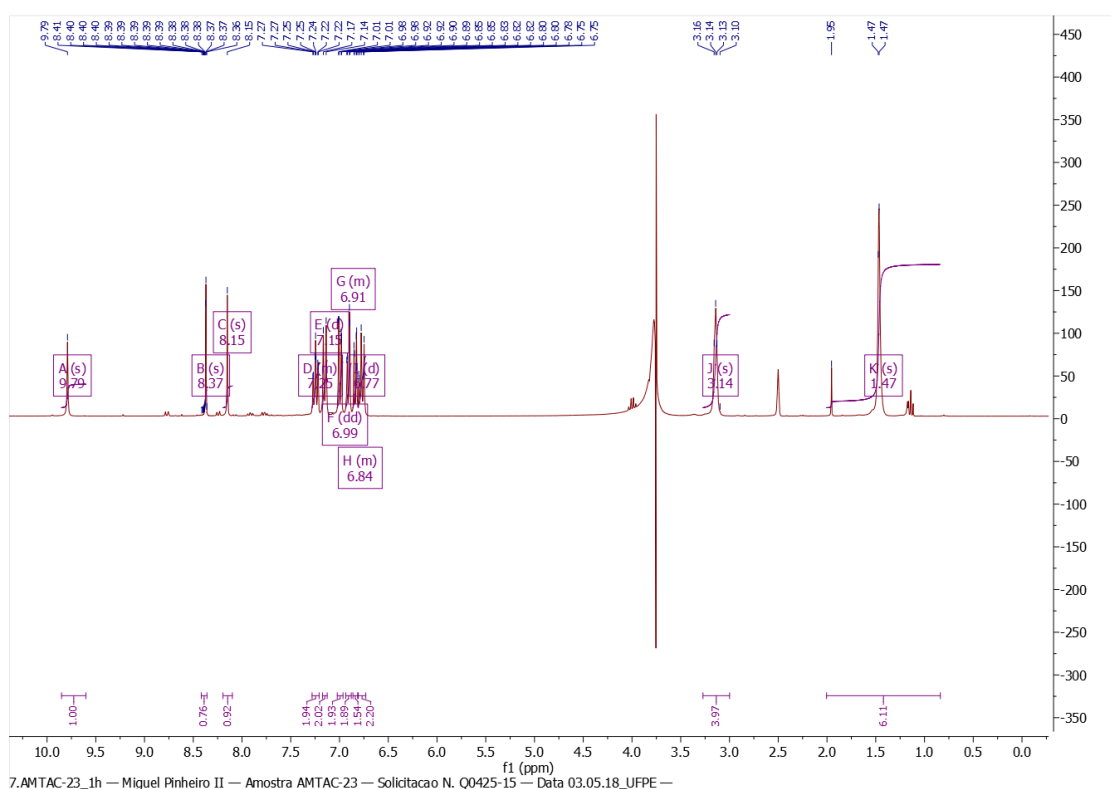
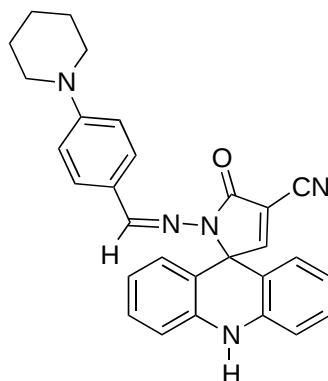
AMTAC-21



AMTAC-22



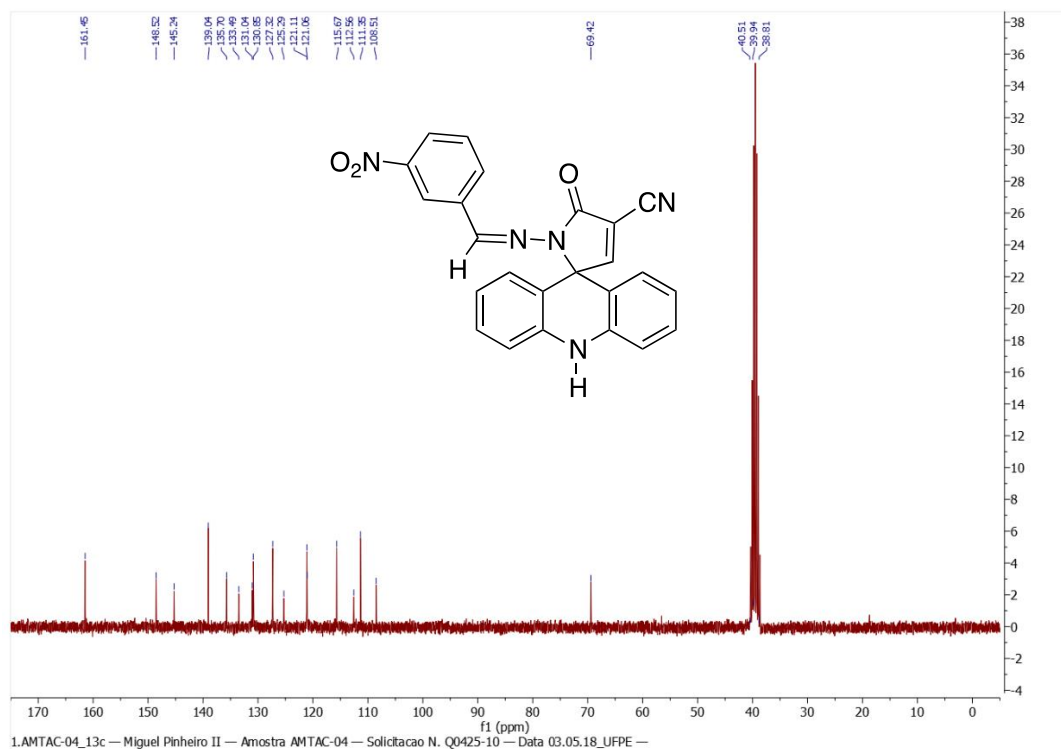
AMTAC-23



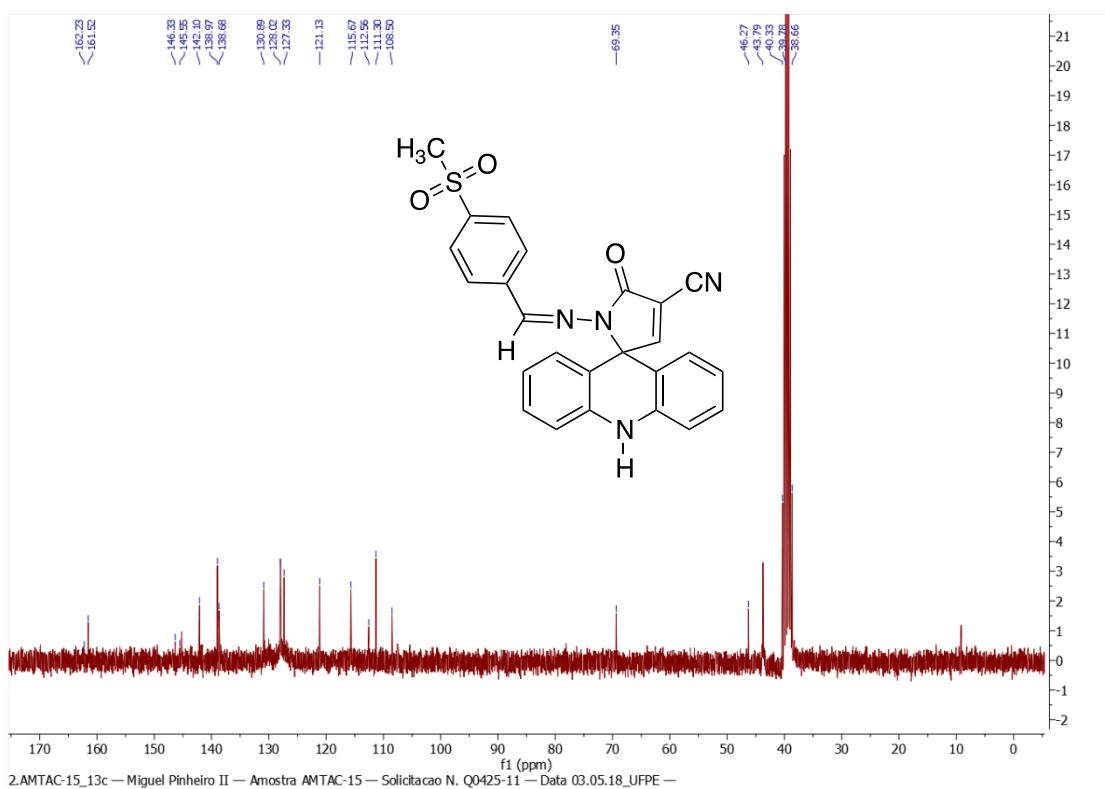
7.AMTAC-23_1h — Miguel Pinheiro II — Amostra AMTAC-23 — Solicitacao N. Q0425-15 — Data 03.05.18_UFPE —

APÊNDICE J – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DA SÉRIE AMTAC

AMTAC-04

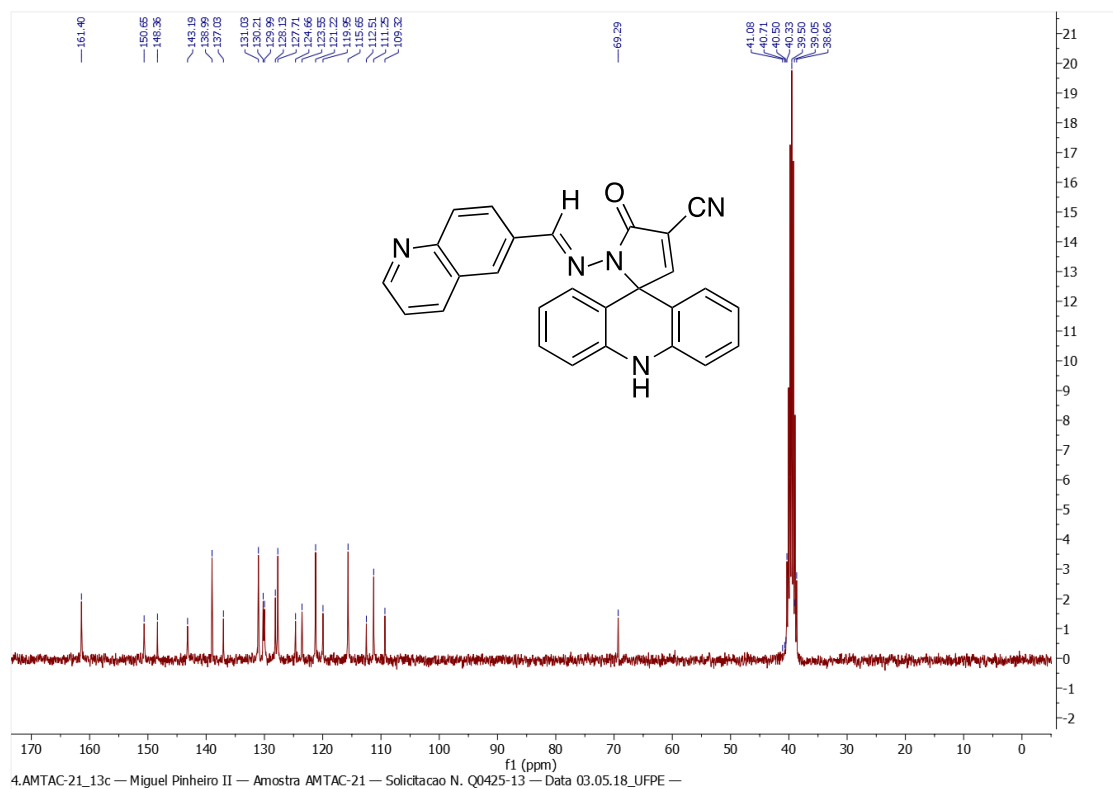


AMTAC-15

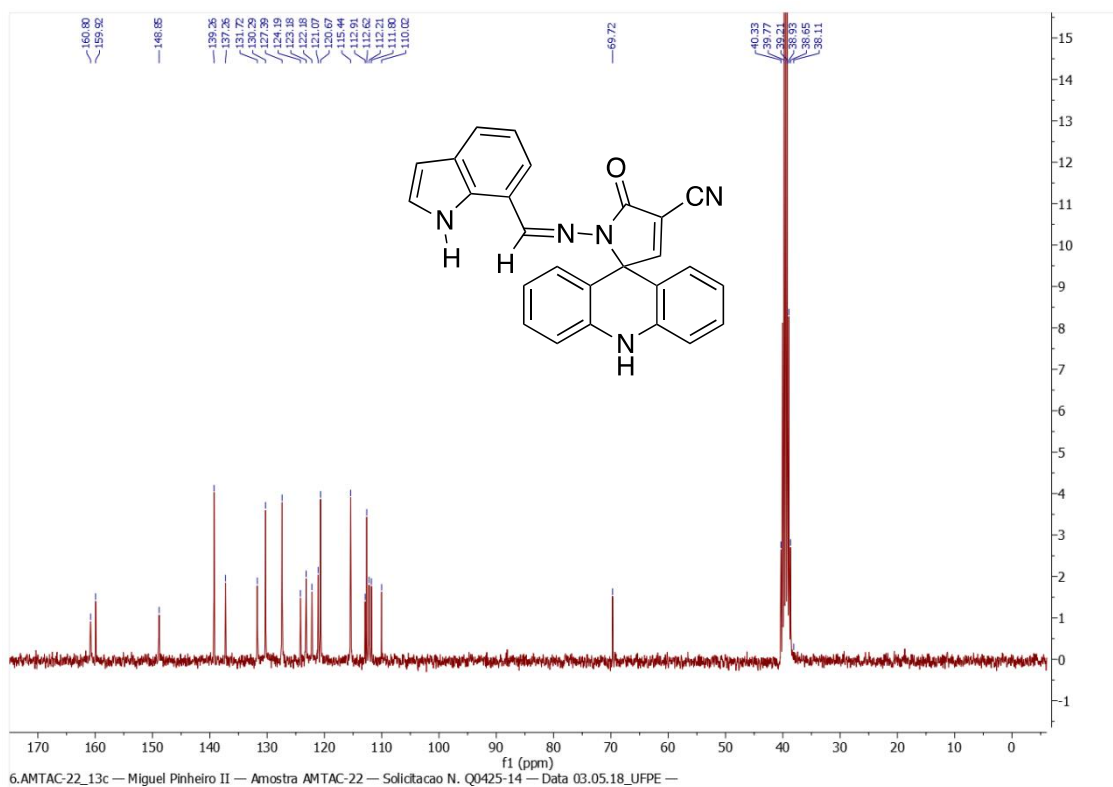




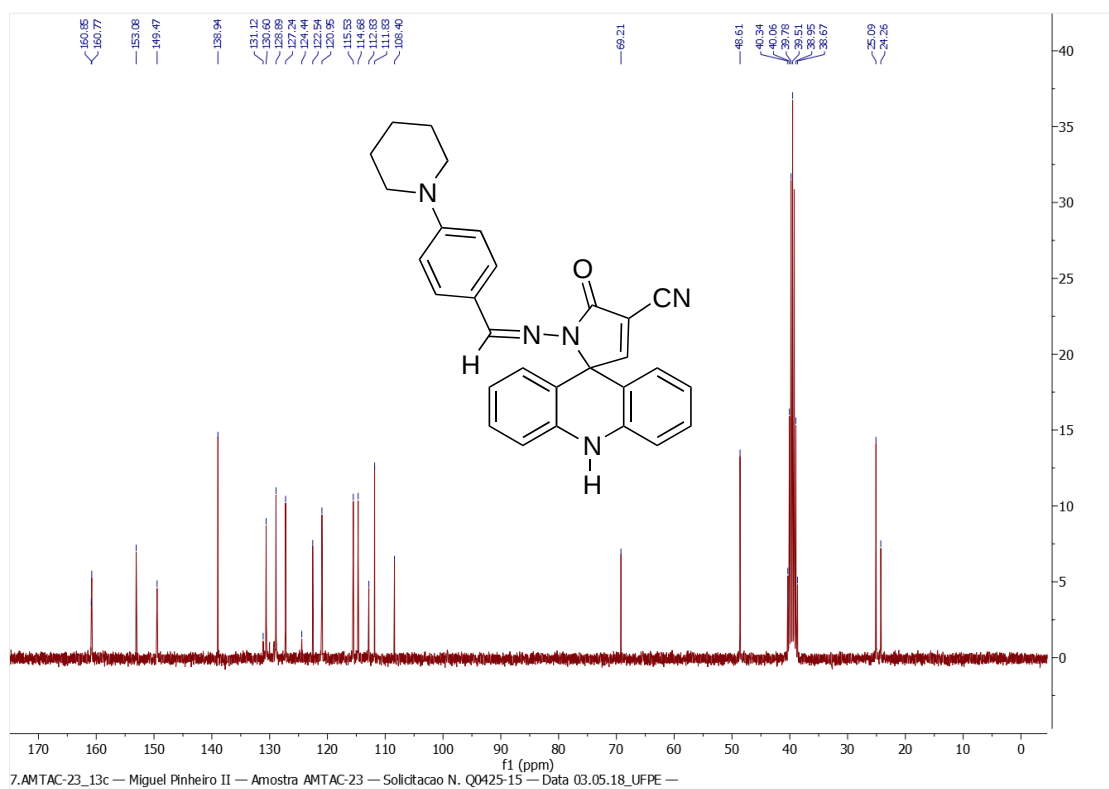
AMTAC-21



AMTAC-22

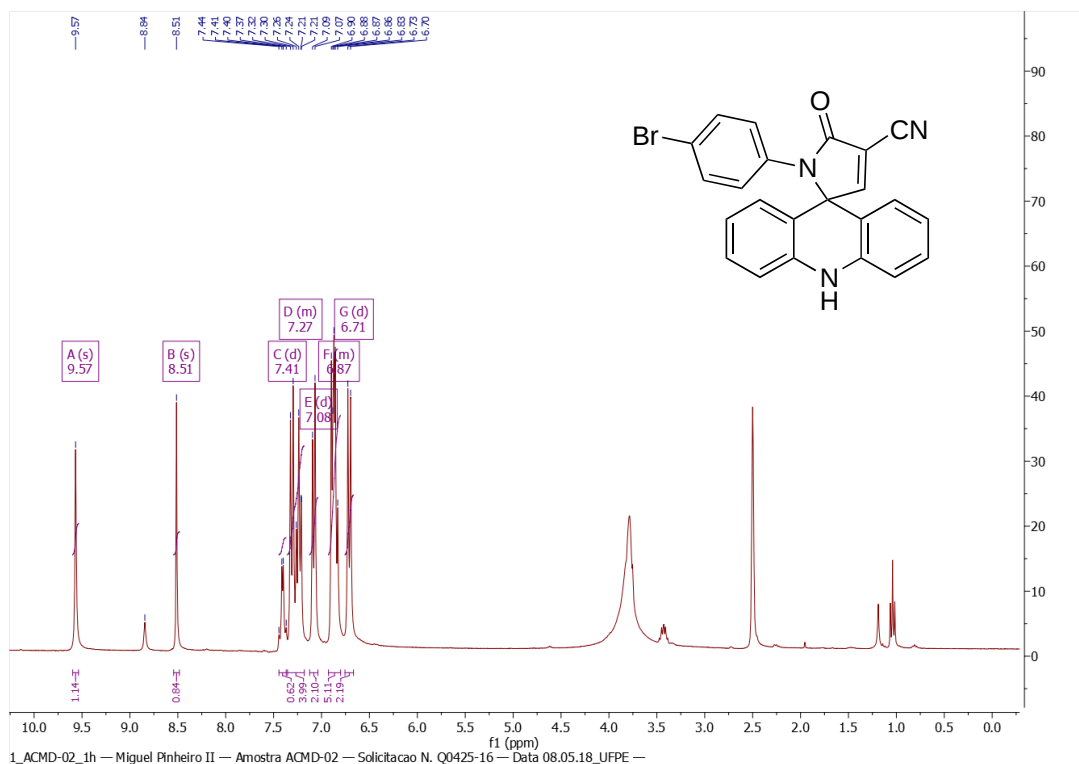


AMTAC-23

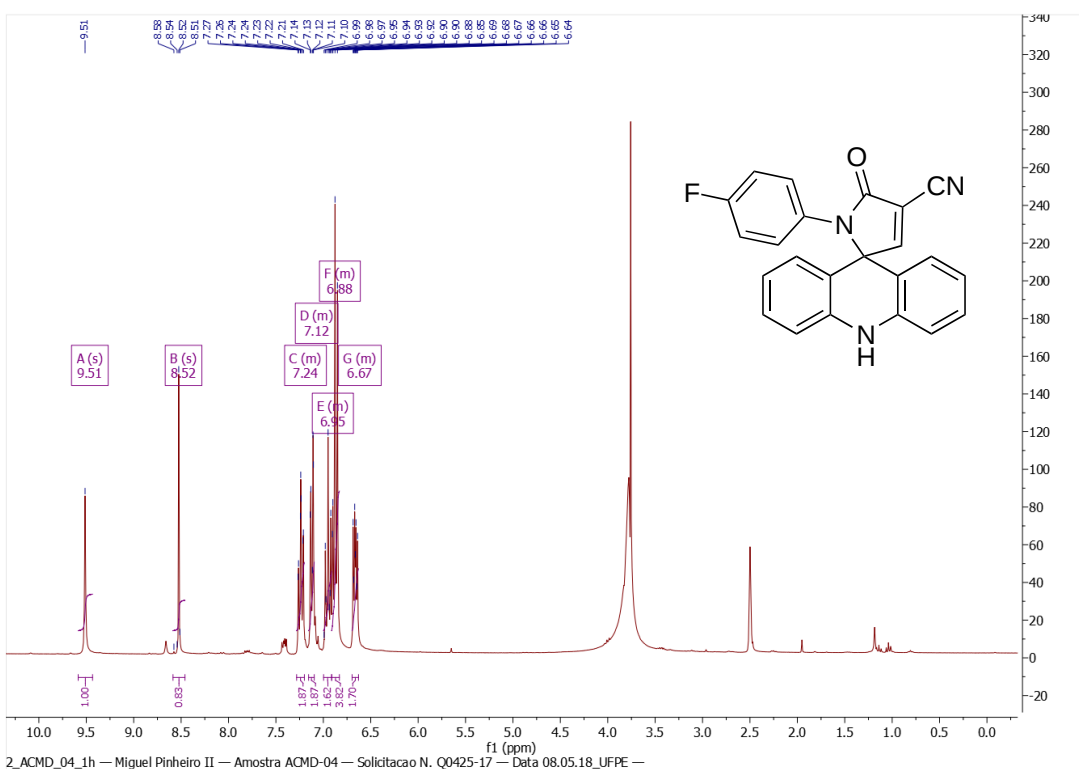


APÊNDICE K – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SÉRIE ACMD

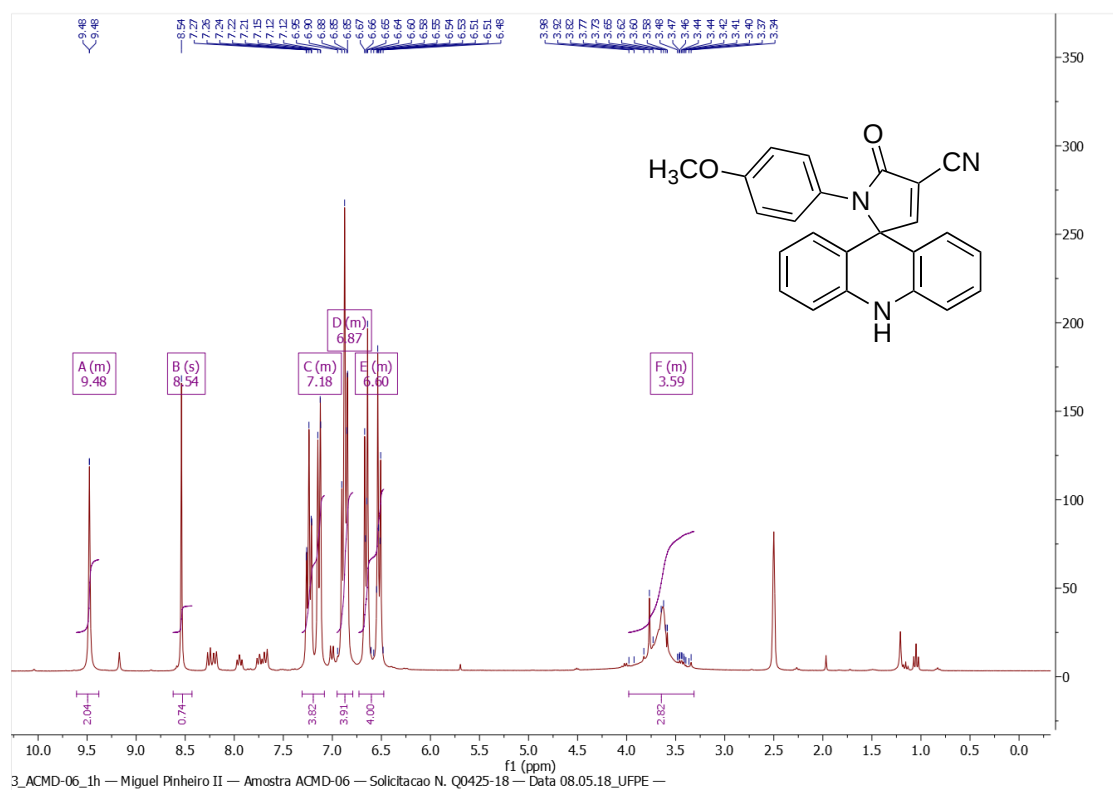
ACMD-02



ACMD-04

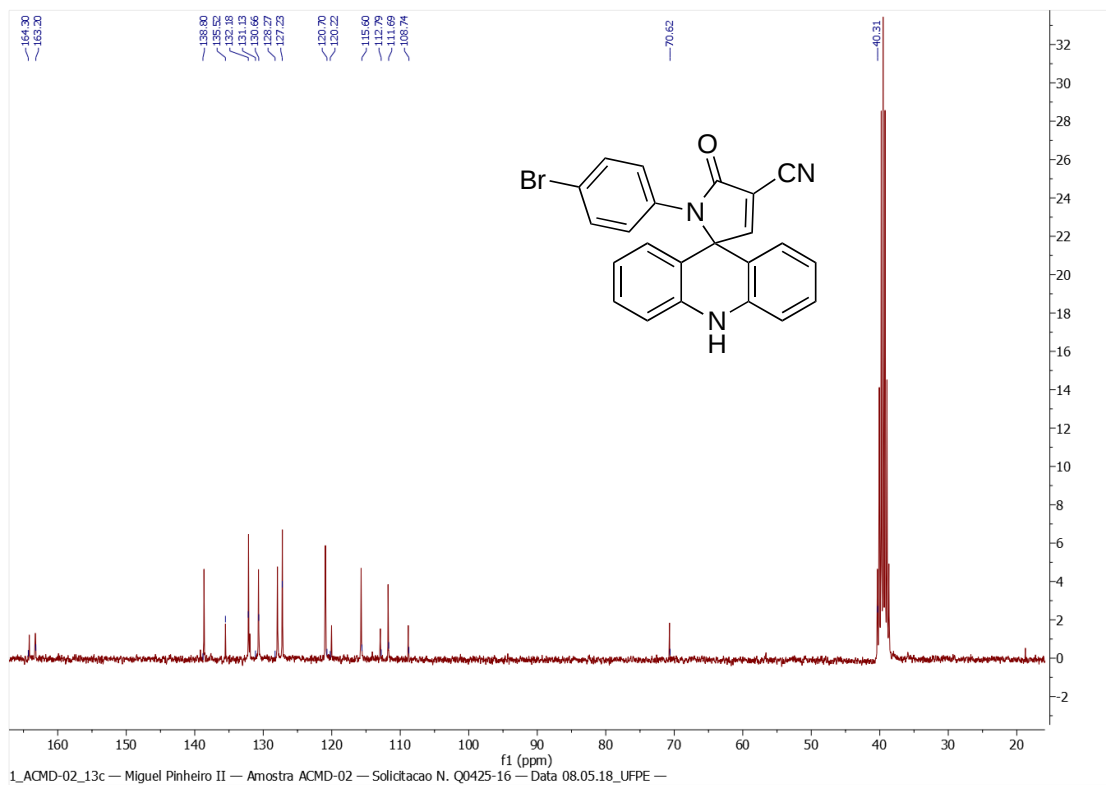


ACMD-06

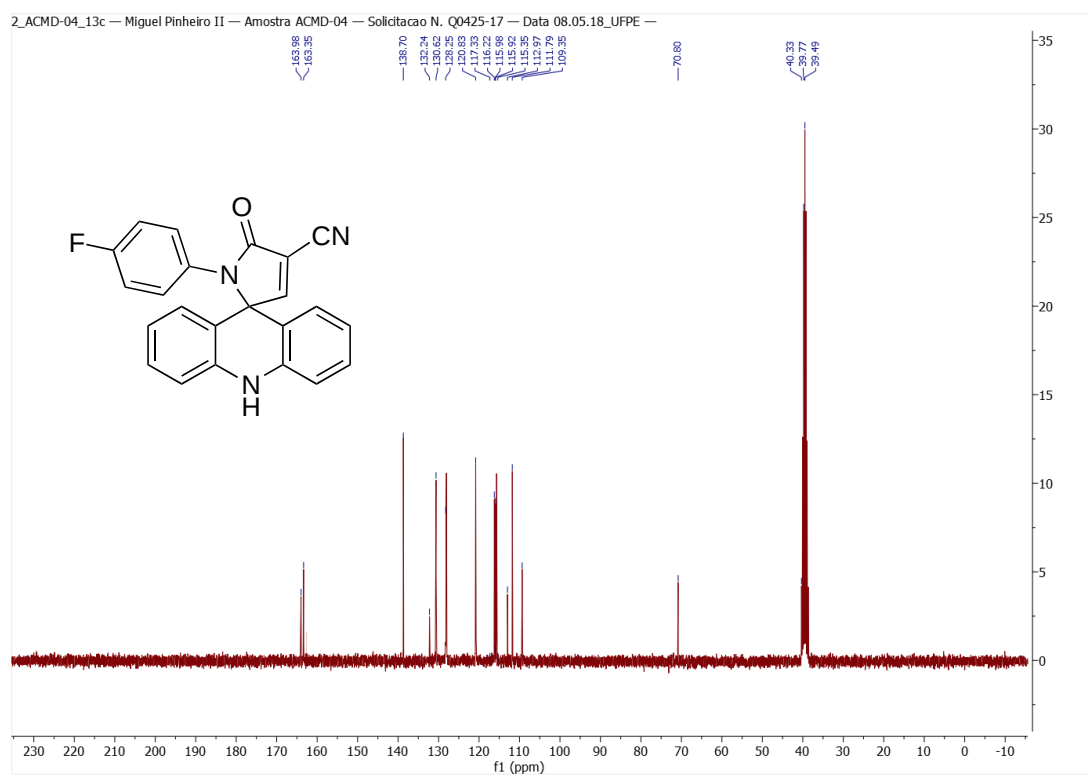


APÊNDICE L – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SÉRIE ACMD

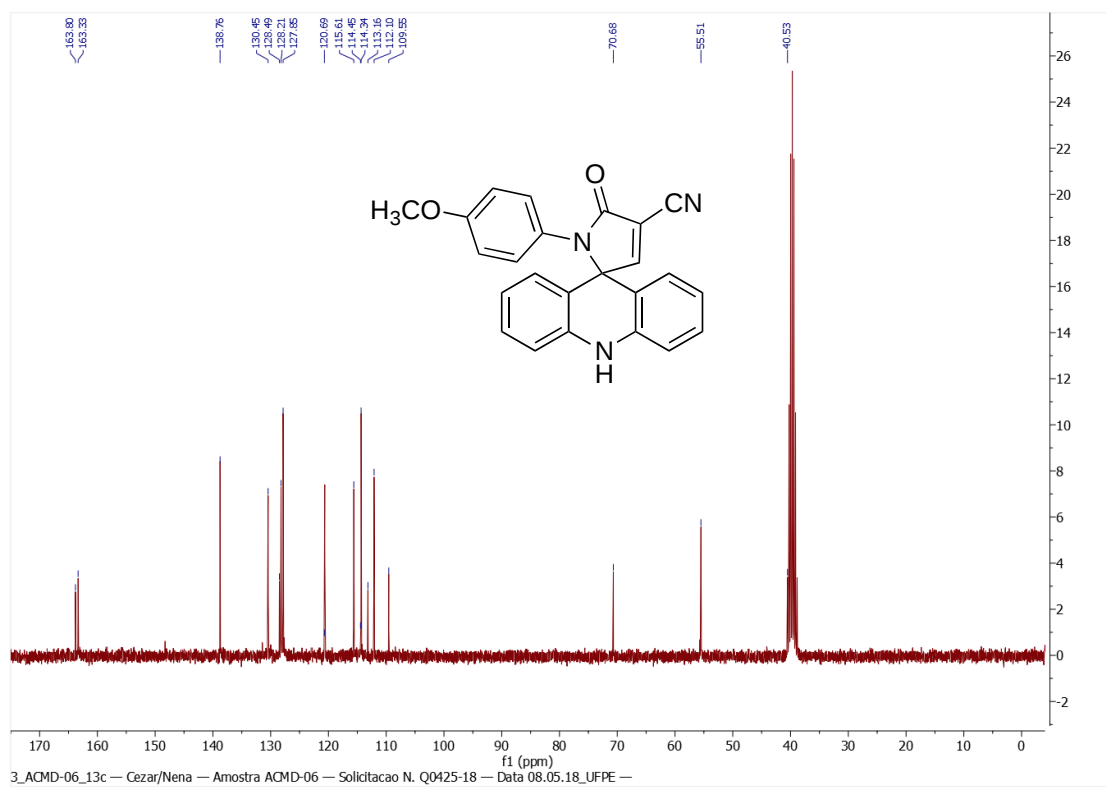
ACMD-02



ACMD-04



ACMD-06



3_ACMD-06_13c — Cezar/Nena — Amostra ACMD-06 — Solicitacao N. Q0425-18 — Data 08.05.18_UFPE —