



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CAMPUS V – MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANA LIGIA DA COSTA PEREIRA

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E *SCREENING* ANTIMALÁRICO DE
NOVOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS ACRIDÍNICOS**

**JOÃO PESSOA – PB
2016**

ANA LIGIA DA COSTA PEREIRA

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E *SCREENING* ANTIMALÁRICO DE
NOVOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS ACRIDÍNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas
da Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento das exigências para a obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr Ricardo Olimpio de Moura

**JOÃO PESSOA-PB
2016**

P436s Pereira, Ana Ligia da Costa
Síntese, elucidação estrutural e screening antimalárico de
novos derivados N-acilidrazônicos acridínicos [manuscrito] / Ana
Ligia da Costa Pereira. - 2016.
70 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura,
Departamento de Farmácia".

1. Malária. 2. Atividade antimalárica. 3. Doenças
negligenciadas. 4. 9-aminoacridina I. Título.

21. ed. CDD 613.936 2

ANA LIGIA DA COSTA PEREIRA

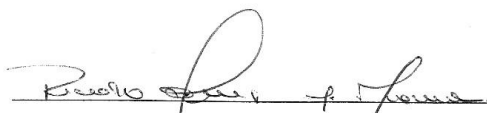
SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E *SCREENING* ANTIMALÁRICO DE NOVOS
DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS ACRIDÍNICOS

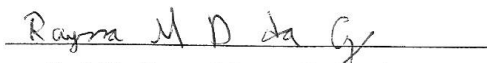
Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.


Área de concentração: Síntese e Planejamento de Fármacos

Aprovada em: 23/05/2016.

BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Me. Rayssa Marques Duarte da Cruz
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)


Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

DEDICATORIA

A minha mãe, Geralda, por todo amor, carinho,
cuidado e dedicação em todos esses anos.

A minha irmã, Emanuella, por toda paciência,
compreensão, amor e amizade.

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe por todo amor, esforço e puxões de orelha durante todos esses anos. A senhora sempre lutou comigo nas dificuldades e me apoiou nas minhas empreitadas na crença de que eu sou capaz, a minha base é a senhora. Nunca esquecerei sua dedicação para comigo.

À minha irmã, pela paciência, compreensão e apoio durante esses quatro anos os quais não pude da muita atenção, mas os poucos momentos de conversa e lazer (como assistir animes) com você melhorava o meu dia.

Ao meu orientador, o prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, por primeiramente ter me aceitado como sua aluna, por todo conhecimento passado e pela sua paciência, apoio e compreensão diante das minhas limitações, sem o senhor este trabalho nunca seria possível.

Ao prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior e ao prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira pelo conhecimento e esclarecimento de dúvidas.

A todos os meus amigos do laboratório, mas em especial a Isadora, Jéssica (pitoco) e a Rawny pela companhia durante os trabalhos e pelas conversas.

Aos meus professores do curso, pelo aprendizado e formação acadêmica.

Aos colegas de turma, tanto aqueles que permaneceram quanto aos que se foram, os quais ainda me permitiu cultivar boas memórias e amadurecer como pessoa, mas agradeço principalmente a minha amiga Elizabeth Vieira pela amizade nos momentos bons e ruins (agonias) durante a graduação e pelas series de televisão que ela me apresentou.

E por fim aos meus livros, que me proporcionavam grandes momentos de lazer, e a algumas circunstâncias da vida que me fizeram crescer e dar mais valor ao lazer e as pequenas coisas.

“Se fracassar, ao menos fracasse ousando grandes feitos, de modo que a sua postura não seja nunca a dessas almas frias e tímidas que não conhecem nem a vitória nem a derrota”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

Responsável por atingir, uma grande parcela da população mundial, a malária, constitui um dos grandes desafios da saúde no século XXI. A resistência e toxicidade dos quimioterápicos englobam os principais motivos para a busca de novos antimaláricos. Logo, o presente trabalho tem como objetivo a síntese, caracterização, elucidação estrutural e avaliação antimalárica para derivados *N*-acilidrazônicos-acridínicos. As sínteses das novas moléculas deram-se de modo linear, onde se obteve a molécula ACS-AZ, a partir da acridina comercial (6,9 dicloro-2-metoxi-acridina) e a 2-cianocetohidrazina em meio etanólico. A segunda etapa da síntese empenhou-se na obtenção dos derivados por meio do ACS-AZ e quantidades equimolares de diferentes aldeídos substituídos em meio básico e etanol e uma cetona cíclica, também em meio básico e tolueno. Após a finalização das reações as 7 novas moléculas, realizou-se a caracterização físico-química e elucidação estrutural (RMN¹H, ¹³C, IV e espectrometria de massa) para algumas moléculas seguido de avaliação biológica (IC₅₀ para cepas W2 de *P. falciparum*, teste de toxicidade para HepG2 e ensaio de hemólise). Os novos derivados apresentaram rendimento entre 39% a 89,74%, pontos de fusão entre 208°C e 283 C. Os valores de elucidação estrutural mostraram-se compatíveis com as moléculas propostas apresentando δ em 7,22-8,77 ppm (hidrogênios do anel aromático); 4.11ppm (s, 2H, CH₂) e 8.71ppm (s, 1H,C=CH). Para o teste biológico de IC₅₀, a molécula ACS-AZ 01 (0.9±0.8µM) possui melhor atividade antimalárica, baixa toxicidade e alto nível de seletividade (IS=90). Já as moléculas ACS-AZ 04 e ACS-AZ 05 que apresentaram IC₅₀ igual a 3.2±0.2µM e 2.4±1.1µM, respectivamente, mostram menor toxicidade (HepG2>200) e IS>62. Comparando o ACS-AZ 01 com a droga comercial amsacrina (IC₅₀ W2 0.8±0.1µM; HepG2 5.2 ±0.6µM e IS 7), notou-se que o valor de ACS- AZ 01 para cepas W2 possui diferença pouco significativa. Todavia para HepG2 e IS o ACS-AZ 01 possui resultados superiores. Em comparação com a primaquina (IC₅₀ W2 1.7±0.1µM; HepG2 5.2±0.6 µM e IS 49) o ACS-AZ 01 apresentou melhor atividade antimalárica, menor toxicidade e maior IS que essa droga comercial. Os resultados, demonstraram que a presença de substituintes fixos modula a atividade biológica do *scaffold* de acridina. Quanto ao teste de hemólise observou-se que nenhuma molécula causou lise significativas estando todas com o valor abaixo de 20%.

PALAVRAS-CHAVES: Malária, Doenças Negligenciadas, Atividade antimalárica, 9-aminoacridina.

ABSTRACT

Responsible for reaching a large portion of the world population, malaria is one of the major health challenges in the twenty-first century. The Resistance and toxicity of chemotherapy drugs include the main reasons for the search for new antimalarial. Therefore, this study aims is to the synthesis, characterization, structural elucidation and antimalarial evaluation for *N*-acylhydrazone-acridine derivatives. The synthesis of new molecules has occurred in a linear pathway, which was obtained ACS-AZ molecule from commercial acridine (6,9-dichloro-2-methoxy-acridine) and 2-cyanoacetohydrazide in ethanol. The second step of the synthesis consisted in obtaining the derivatives by ACS-AZ and equimolar amounts of different substituted aldehydes in basic medium ethanol. Already with the cyclic ketone, was in basic medium and toluene. After completion of the reactions all, 7 new molecules were sent to physico-chemical characterization and some for structural elucidation ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR (cm^{-1}) and mass spectrometry) followed by biological evaluation (IC_{50} for P. W2 strains *falciparum*, toxicity and hemolysis assay HepG2). The new derivatives showed yield values between 39% to 89,74%, melting points between 208°C and 283°C. The structural elucidation were consistent with the proposed molecules having values δ in 7.22 to 8.77 ppm (hydrogens of the aromatic ring); 4.11ppm (s, 2H, CH_2) and 8.71ppm (s, 1 H, $\text{C}=\text{CH}$). For the IC_{50} bioassay, ACS-AZ 01 molecule ($0.9\pm 0.8\mu\text{M}$) has better antimalarial activity, low toxicity and high selectivity (IS=90). The ACS-AZ 04 and AZ-ACS 05 molecules showed IC_{50} equal to $3.2\pm 0.2\mu\text{M}$ and $2.4\pm 1.1\mu\text{M}$ respectively showed less toxicity (HepG2 > 200) and IS > 62. Comparing the ACS-AZ01 with commercial drug amsacrine (IC_{50} W2 $0.8\pm 0.1\mu\text{M}$; HepG2 $5.2\pm 0.6\mu\text{M}$ and IS 7), it is noted that the ACS-AZ 01 values for W2 strains has little significant difference. However for HepG2 and IS ACS-AZ01 has superior results. As compared primaquine (W2 IC_{50} $1.7\pm 0.1\mu\text{M}$; HepG2 $5.2\pm 0.6\mu\text{M}$ and IS 49) with ACS AZ-01 showed better antimalarial activity, lower toxicity and higher IS that commercial drug. The results showed that the presence of fixed substituents modulate the biological activity of the *scaffold* acridine. In hemolysis test it was observed that no molecule was capable of causing lysis greater than 20 % of erythrocytes.

KEY WORDS: Malaria, Neglected Diseases, antimalarial activity, 9-amino acridine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Ciclo de vida das espécies causadoras de malária em humanos.....	21
Figura 2.	Estrutura dos antimaláricos quinina (a), cloroquina (b) e mefloquina (c)....	23
Figura 3.	Estrutura química da artemisina.....	23
Figura 4.	Estrutura química da sulfadoxine (a) e pirimetamina (b).....	24
Figura 5.	Estrutura do antovaquone.....	24
Figura 6.	Esquema de otimização de estrutura Topliss.....	27
Figura 7.	Estrutura do núcleo acridínico.....	29
Figura 8.	Estrutura química a Amsacrina.....	29
Figura 9.	Estrutura química do AS-02 derivado 2-metil-9-cloroacridina.....	30
Figura 10.	Estrutura química d (N-[6-benzoilamino)-3-acridinil] acetamida.....	31
Figura 11.	Estrutura dos derivados 6-cloro-2-metoxi acridína com atividade antituberculose.....	31
Figura 12.	Estrutura química do azul de metileno.....	31
Figura 13.	Estrutura do derivado hibrida artemisina-acridína.....	32
Figura 14.	Estrutura química da molécula <i>N</i> - (2-Cloro-6-metoxi-9-cloro-antraceno-10-il) - <i>N</i> , <i>N'</i> -bis- (3-dimetilamino-propil) –acetamida].....	32
Figura 15.	Estrutura do derivado 9-aminoacridinico.....	33
Figura 16.	Estrutura química dos derivados 9-aniloacridina.....	33
Figura 17.	RMN ¹ H do ACS-AZ. Correlação da estrutura com os picos apresentados.	41
Figura 18.	RMN ¹ H do ACS-AZ 04. Correlação entre a estrutura e os picos apresentados.....	42
Figura 19.	Espectro de infravermelho do ACS-AZ. Correlacionado a estrutura com as bandas.....	43
Figura 20.	Espectroscopia de infravermelho do ACS-AZ 04. Correlação da estrutura com as bandas.....	43
Figura 21.	Diferenças estruturais entre (a) 6,9 dicloro-2 metoxi-acridina e (b) ACS-AZ.....	45

Figura 22	Diferenças estruturais entre ACS-AZ (a) e ACS-AZ 01 (b).....	46
Figura 23	Diferenças estruturais entre (a) ACS-AZ 01; (b) ACS-AZ 04; (c) ACS-AZ 05.....	47
Figura 24	Diferenças estruturais entre (a) ACS-AZ 06; (b) ACS-AZ 10; (c) ACS-AZ 12.....	48
Figura 25	Diferenças estruturais entre a amsacrina (a); primaquina (b) e ACS-AZ (c) e ACS-AZ 01 (d).....	49

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema1	Esquema reacional da obtenção dos derivados N-acilidrazônicos-acridinícos.....	34
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Derivado N-acilidrazônicos acridínicos e suas respectivas características físico-química.....	39
Tabela 2.	Dados do espectro em RMN ¹ H (δ em ppm) dos derivados N-acilidrazônicos acridínicos.....	40
Tabela 3.	Espectroscopia de infravermelho dos novos derivados acilidrazônicos acridínicos.....	42
Tabela 4.	Espectroscopia de ¹³ C dos compostos ACS-AZ e ACS-AZ 10.....	44
Tabela 5.	Espectrometria de massa dos compostos ACS-AZ e ACS-AZ 04.....	45
Tabela 6.	Atividade anti- <i>falciparum</i> , citotoxicidade em células hospedeiras e índice de seletividade.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Ensaio hemolítico para acridíνας (1ª experimento). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O+), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p <0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's)..... 50
- Gráfico 2.** Ensaio hemolítico para acridíνας (2ª experimento). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O+), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p <0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's)..... 50

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS MOLECULARES

BZD	Benzodiazepino
CO₂	Dióxido de carbono
DHRF-TS	Di-hidrofolato- redutase-timidilato-sintetase
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNs	Doenças Negligenciadas
EtOH	Etanol
P.F (°C)	Ponto de fusão em graus Célsius
FM	Formula molecular
I.V	Infravermelho
Log P	Coefficiente de Partição
<i>m</i>-AMSA	Amsacrina
Mfq	Mefloquina
ET₃N	Trietilanamina
P.M	Peso molecular
Rend(%)	Rendimento
Rf	Fator de retenção
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
δ ppm	Deslocamento químico em parte por milhão

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE SIGLAS

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS GERAIS	19
2.1	Objetivos específicos.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	Doenças Negligenciadas: Malária.....	20
3.2	Quimioterapia antimalárica.....	22
3.3	Necessidades de Novas Drogas e Planejamento de fármacos.....	25
3.4	Química e Atividade Antimalárica dos Derivados Acridínicos.....	28
4.	METODOLOGIA	34
4.1	Síntese das moléculas.....	34
4.1.1	<i>Obtenção do ACS-AZ</i>	35
4.1.2	<i>Obtenção dos derivados N-acilidrazônicos acridínicos com aldeídos substituídos</i>	35
4.1.3	<i>Obtenção dos derivados N-acilidrazônicos acridínicos com grupamento ciclo-</i> <i>alquil</i>	35
4.2	Caracterização Físico-Química.....	36
4.3	Elucidação Estrutural dos Compostos.....	36
4.4	Teste de Avaliação antimalárica.....	36
4.4.1	<i>Atividade anti P. falciparum</i>	37
4.4.2	<i>Toxicidade Celular</i>	37
4.4.3	<i>Ensaio de hemólise</i>	37
5.	RESULTADOS E DISCURSÃO	39
5.1	Síntese, Caracterização e Elucidação Estrutural.....	39
5.2	Avaliação Biológica.....	44
6.	CONCLUSÃO	52
7.	REFERENCIAS	53
8.	ANEXOS	62

1.INTRODUÇÃO

Condições de salubridade e baixos índices de desenvolvimento permeiam a realidade de quase 1,5 bilhões de pessoas ao redor do mundo. Ligado a essas condições e diante da vulnerabilidade dessas populações, as conhecidas Doenças Negligenciadas (DNs) são recorrentes e registram um histórico de mortes e morbidez nesses locais.

As DNs são grupo de infecções parasitárias que prevalecem em populações subdesenvolvidas e ocasionalmente esquecidas pela indústria farmacêutica (QUANSAH; SARPONG; KARIKARI, 2016). Dentre tantas DNs, uma em especial que persiste na contemporaneidade é a malária. Essa doença provocada por um protista com mais 150 espécies do gênero *Plasmodium sp*, pertencente ao filo Apicomplexa, e é transmitida aos humanos por meio da fêmea do mosquito *Anopholes* (NEVES et al., 2005).

Apesar de ser uma doença relativamente antiga o número de casos clínicos ainda são alarmantes, atingindo aproximadamente 214 milhões de pessoas ao redor do mundo (WHO, 2015), principalmente em localidades como África do Sul, Índia, Ásia, América Central e Brasil.

O tratamento para essa enfermidade consiste na utilização de uma gama de quimioterápicos baseados em núcleo quinolinicos e nas classes terapêuticas da artemisina, antifolatos e antovaques, de tal modo que essas podem ser expressas juntas (combinação de duas drogas) ou separadas.

Apesar da perspectiva do tratamento as altas doses em conjunto com o tratamento prologando se constituem extremamente tóxicos e muitas vezes de baixa aderência pelo paciente, provocando efeitos colaterais como anemia, problemas cardiovasculares, gastrointestinais dermatite, etc., (LEBRUN-VIGNES, 1999). Aliada à toxicidade, a resistência desse parasita a diferentes fármacos vem tornando o tratamento desafiador para autoridades da saúde e um dilema para os médicos (NEVES et al., 2005).

Diante dessas variáveis Abdon1 et al. (2001), destacam o crescente interesse na busca de esquemas terapêuticos que mesmo em tempo reduzido, proporcione ao paciente maior adesão ao tratamento e, ao mesmo tempo, eficácia e tolerância, minimizando efeitos colaterais e reduzindo custos.

Nesse contexto encontra-se a química medicinal e suas ferramentas para a busca de novos fármacos com amplo e eficaz potencial biológico, dentro as quais as chamadas “estruturas privilegiadas” e os bioisosteros se destacam pela sua flexibilidade e diversidade molecu-

lar. Dentro dessa proposta, compostos heterocíclico como os anéis acridínicos e seus derivados aparentam ser de grande ajuda e interesse para a indústria farmacêutica.

Conhecidos por um sistema policíclico planar com dois aromáticos ligados a um anel piridínico central e com grupos substituintes ou não, o núcleo acridínico possui uma gama de atividades biológicas descritas na literatura tais como: antitumoral, antiprion, antialzheimer, antileishmania, antitripanossomal (KUMAR et al., 2009; WAINWRIGHT., 2001; SONDHI et al., 2010; THI et al., 2008) e também antimalárica (GUETZOYAN et al., 2009).

Essa estrutura possui seu efeito biológico explicado por meio de intercalação de DNA, inibição da topoisomerase II e em alguns casos responsável pela inibição do citocromo *bcl* em parasitas (GUETZOYAN et al., 2007).

Sendo assim, com todas as informações dadas e a partir das ferramentas disponibilizadas pela química medicinal, o presente trabalho apresenta a síntese de núcleo acridínico, como estrutura privilegiada, acoplado a porções *N*-acilidrazônicos, conjuntamente com a avaliação biológica *in vitro* para potencial antimalárico, com o objetivo de buscar futuros fármacos que proporcionem menores custos, maior eficácia e menor toxicidade para os pacientes.

2. OBJETIVO GERAL

Sintetizar, determinar as propriedades físico-químicas, caracterizar estruturalmente e avaliar a atividade antimalárica frente a cepas resistentes de novos derivados *N*-acilidrazônicos acridínicos, que possam ser utilizados como possíveis candidatos a fármacos.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar, determinar as propriedades físico-químicas dos novos derivados;
- Elucidar as estruturas dos novos derivados *N*-acilidrazônicos-acridínicos através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Avaliar a atividade antimalárica dos novos compostos frente à cepa resistente W2 de *P.Falciparum*;
 - Determinar os valores de IC₅₀;
 - Determinar a toxicidade em células HepG2;
 - Determinar a toxicidade hemolítica em eritrócitos humanos não infectados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Doenças Negligenciadas: Malária

As doenças negligenciadas (DN) são um conjunto de doenças infecciosas parasitárias ligadas a fatores de pobreza e subdesenvolvimento das populações atingidas. Além das condições nas quais elas se manifestam as DNs despertam pouco interesse em pesquisas e desenvolvimento de fármacos para as indústrias farmacêuticas, devido ao retorno econômico pouco significativo (WERNECK et al., 2011).

Para Cohen et al. (2016) e Welburn et al. (2015) as principais DN são: doença de Chagas, doença do sono, leishmaniose visceral (LV), a filariose linfática, dengue, esquistossomose e por último, e uma das mais importantes a malária.

Conhecida como malietta, febre quartã ou tercã, a malária, em 2015, atingiu 214 milhões de pessoas ao redor o mundo e levou 438.000 a óbito (WHO, 2015). Como afirma Oliveira-Ferreira et al. (2010) a malária é a principal responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo, e até os dias atuais continua sendo um dos principais problemas de saúde pública. Essa infecção atinge principalmente os continentes Asiático, Americano e Africano, sendo o último o mais atingido por esse protozoário.

No Brasil, existe ocorrência de quase 143.000 casos registrados, sendo as regiões como Amazonas, Pará, Maranhão e Mato Grosso as mais atingidas totalizando quase 99% dos casos existentes (MINISTÉRIOS DA SAÚDE, 2016), sendo a transmissão dessa doença nesses estados dependentes de fatores econômicos, ambientais e socioculturais (SANTOS et al., 2012).

A malária, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium*, infectam mamíferos, répteis e aves, entretanto; somente 4 espécies são responsáveis por causar danos a saúde humana sendo estes: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (FRANÇA et al., 2008), sendo a última responsável pela maioria das mortes. Todos esses gêneros de *Plasmodium sp* tem como principal via de transmissão a fêmea do mosquito *Anopheles*, que inocula o hospedeiro através da picada. Contudo, como destaca Neves (2005), outras vias como transfusão de sangue, seringas compartilhadas, acidentes laboratoriais e até infecção congênita servem como meios de propagação do esporozóito.

O *Plasmodium sp* possui um ciclo de vida complexo que necessita de um vertebrado intermediários, para o sua fase assexuada; e um inseto vetor, onde realiza a etapa sexuada.

Durante esse processo são observadas quatro formas principais: esporozóito, trofozóito, merozóito, gametócito, oocinetos e oocistos (figura 1). (MEZA, 2004).

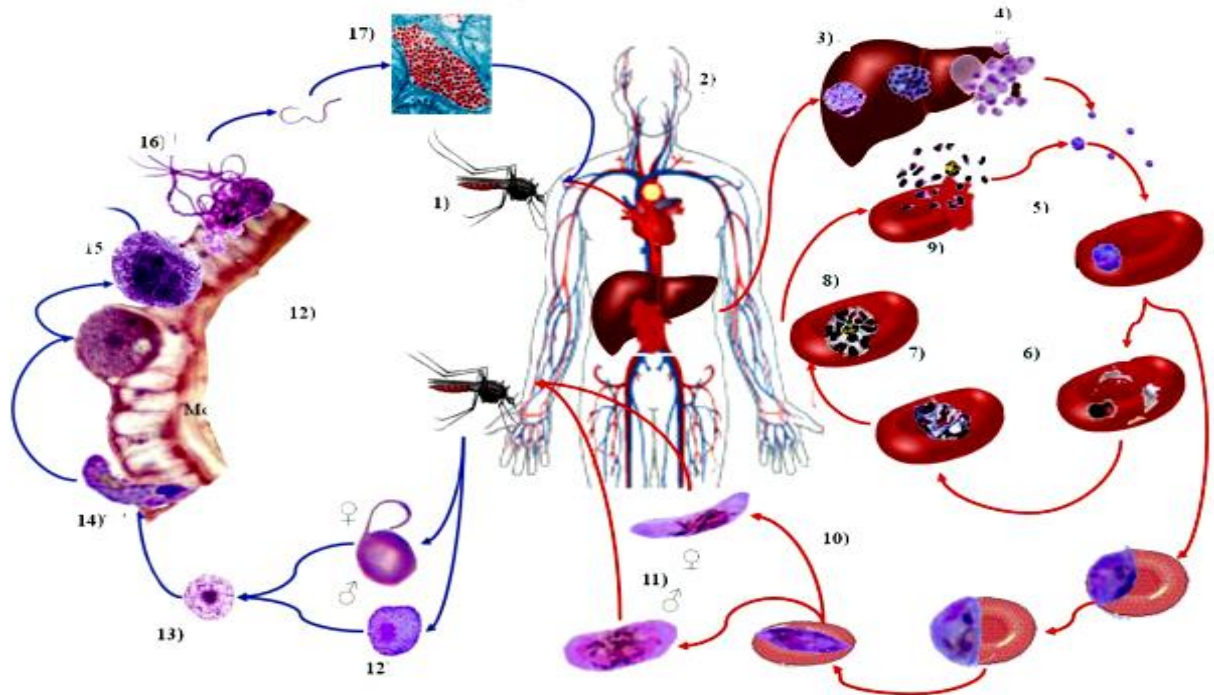


Figura 1: Ciclo de vida das espécies causadoras de malária em humanos. Os esporozóitos injetados (1) se encaminham até os hepatócitos (2) e se diferenciam em trofozóitos dando início a fase pré-eritrocitária (3). Após a reprodução assexuada do tipo esquizogônica, os trofozóitos se desenvolvem em esquizontes, com aproximadamente 16 merozóitos (4) que infestarão os eritrócitos (5), originando o ciclo eritrocitário que irá ocorrer sucessivas vezes (6,7, 8, 9) gerando novos merozoítos. Após ciclos sucessivos de propagação uma pequena porção desses merozoítos não mais se divide transformando-se em gametócitos (10 e 11) que depois de serem ingeridos pelo mosquito transforma-se, por meio da gametogênese; em macrogameta (gametócito feminino) e micro (gametócito masculino) (12). Após a fecundação dos microgametas ocorre a formação do zigoto (13). O zigoto passa a se movimentar por meio de contrações recebendo o nome de oocineto (14). Este se aloja na parede do intestino médio formando oocisto (15), que mais tarde inicia o processo de divisão esporogônica (16). Após o intervalo de 9 a 14 dias os oocistos se rompem liberando esporocistos (17), que por meio da hemolinfa alcançam os ductos das glândulas salivares do mosquito, reiniciando assim o ciclo. (Adaptado de HULL; DLAMINI, 2014)

A infecção causada pelo *Plasmodium sp* em humanos tende a desencadear sintomas característicos como: dores de cabeça, febres intervalares que duram de 3 a 4 horas, calafrios e mal estar. Após a crise, conhecida como fase aguda, o paciente poderá se recuperar espontaneamente. No entanto, após 2 a 4 dias os quadros sintomáticos se repetem como maior intensidade sendo necessário à intervenção médica para melhora do paciente (CAMARGO, 2003).

Quando não tratada adequadamente, a doença pode evoluir apresentando quadros clínicos de maior gravidade sendo esta fase conhecida por malária grave ou complicada. Os

principais sintomas observados em pacientes com malária grave são: dano cerebral, anemia, icterícia, inchaço do baço, problemas renais e em casos extremos, a morte (HOFFMAN et al., 2006; FRANÇA et al., 2008).

As principais medidas de prevenção contra malária ainda consiste em vacinação (aplicada antes dos três meses à visita da área endêmica) e combate ao vetor por meio de telas e inseticidas. Além disso, a quimioprofilaxia e os tratamentos dos doentes também são utilizados para o combate dessa doença evitando, em alguns casos, o endemismo (FERNANDO et al., 2011). Entretanto a resistividade desse agente etiológico aos quimioterápicos e sua complexidade estimula e enfatiza ainda mais a importância na busca de novas formas de tratamento, a fim de se evitar a mortalidade a morbidade e manter o controle e a transmissão do mesmo para outras pessoas.

3.2 Quimioterapia Antimalárica

A quimioterapia pode ser definida como o método que utiliza compostos químicos, chamados de quimioterápicos; no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Relacionados quase sempre ao tratamento de células cancerígenas, os quimioterápicos são usados também de forma mais abrangente para o tratamento de outros tipos de patologia tais como a malária.

Os fármacos antimaláricos são provenientes de produtos naturais ou dos compostos sintéticos obtidos na década de 40. Esses fármacos podem agir em determinado ponto da via metabólica do protista e interferindo conseqüentemente em algum estágio de vida desse, sendo a fase da esquizogônia sanguínea (responsável pela patogenia) e dos gametócitos as mais visadas para o tratamento (NEVES et al., 2005).

Os principais fármacos antimaláricos possuem sua ação voltada para pontos metabólicos essenciais da glicose ou da habilidade de digerir hemoglobina. Dentre esses se encontram os derivados da *chinchona* tais como a família quinolínica que incluem as 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas e álcoois quinolínicos. Os registros de uso desses componentes ultrapassam 400 anos, nos quais quininas (figura 2a), cloroquinas (figura 2b) e mefloquinas (figura 2c) integram o conjunto das drogas mais utilizadas até hoje para o tratamento malárico.

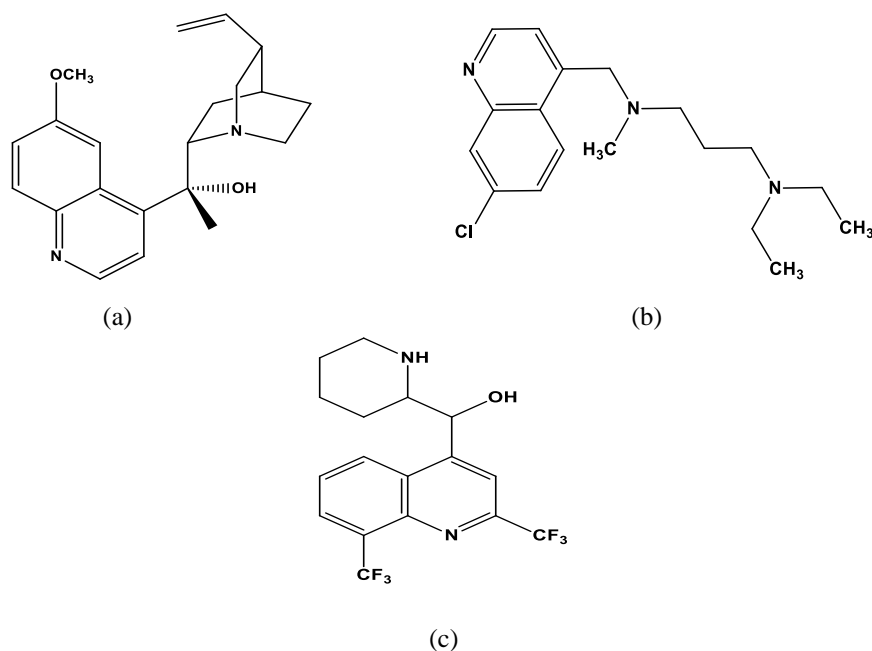


Figura 2: Estrutura dos antimaláricos: quinina (a), cloroquina (b) e mefloquina (c)

Outra classe que merece atenção por seu uso como quimioterápico antimalárico é a artemisina (figura 3) e seus derivados. Extraídos da erva medicinal chinesa *Artemisia annua*, a artemisina é usada desde 340. a.C como potente antimalárico (FU et al, 2016). Atualmente esse fármaco é considerado de suma importância para o tratamento contra malária devido a sua alta eficácia e baixa toxicidade.

A sua estrutura química se trata de uma lactona sesquiterpenica de alta estabilidade térmica, tendo o peróxido como ponte de ligação. O grupo endoperóxido da artemisina junto com o carbono 15 da sesquiterpenlactona tem sido o principal responsável pela ação antimalárica da substância (HA et al., 2016). A ação desse medicamento pode se dar a partir de estresse oxidativo produzido através da quebra do endoperóxido desse composto (KRUNGKRAI; KRUNGKRAI, 2016)

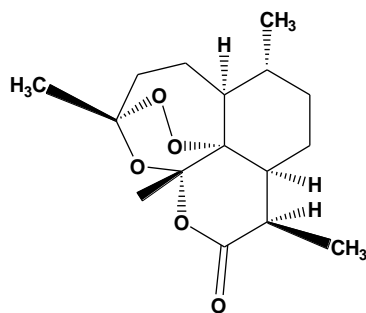


Figura 3: estrutura química da artemisina

Os antifolatos também são considerados para o tratamento dessa doença. Esses atuam como antagonistas do folato funcionando como esquizônticas no sangue. Os antifolatos são divididos em dois grupos de acordo com a sua ação: antifolatos I que são representados pelas sulfonamidas (figura 4a) e agem como competidores do (PABA), e conseqüentemente interferem na formação do DNA (SHARMA; ANAND, 1997); e antifolatos II que são antagonistas dos folatos e se ligam preferencialmente a enzima DHRF-TS (di-hidrofolato- redutase-timidilato-sintetase) (SEVERINI; MENEGON, 2015), no qual essa ligação impede a formação de aminoácidos e ácidos nucleicos do parasita e possuem como principais exemplos pirimetamina (figura 4b) e a trimitropina (BIAGINI et al., 2003). Apesar do seu uso, os antifolatos e seus derivados apresentam pouca tolerância oral, além de já possuir ineficácia contra cepas resistentes de malária; (FRANÇA et al., 2008).

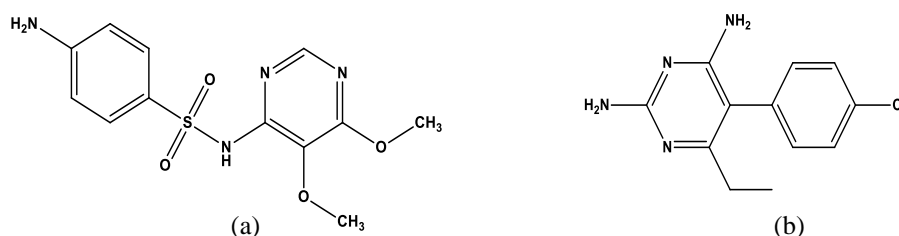


Figura 4: Estrutura química da sulfadoxine (a) e pirimetamina (b)

Outra classe de quimioterápicos que merece destaque é a hidroxi-naftoquinona conhecida por antovaques. Usadas não apenas para tratamento, mas também para prevenção contra malária em algumas localidades com resistência a cloroquina (MUSTAFA; AGRAWAL, 2008), a antovaquone (figura 5) é um análogo lipofílico da ubiquinona e um importante componente para o sistema de transferência de elétrons na mitocôndria, logo a sua ação consiste em inibir o complexo III (citocromo *bc1*) da cadeia transportadora de elétrons do hospedeiro (SUSWAM et al., 2001). Apesar do seu uso, esse composto possui uma baixa biodisponibilidade o que dificulta a sua eficácia, sendo ela muitas vezes utilizada com outras drogas tais como proguanil (CALDÉRON et al., 2013).

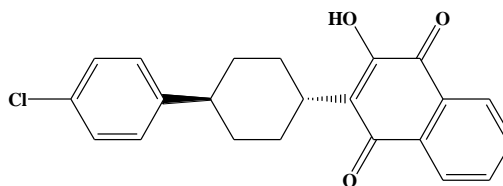


Figura 5: estrutura do antovaquone

Mesmo com o uso dessas drogas, a problemática da quimioterapia antimalárica vai além da quantidade de medicamentos utilizados para o tratamento. Um dos fantasmas que vem assolando essa área se trata da alta frequência de resistência do hospedeiro as drogas utilizadas.

A resistência de um parasita pode ser definida como a habilidade de um organismo resistir e se multiplicar mesmo a exposição de doses consideráveis da droga usada no tratamento (ORJUELA et al., 2004).

Indícios demonstram que o início da resistência aos antimaláricos decorre do final dos anos 50, no sudoeste asiático e na América do Sul (FRANÇA et al., 2008). Para Noronha et al. (2000), os motivos da resistência são decorrentes das pressões seletivas ocasionadas pelos fármacos dentro do hospedeiro, fatores ligados ao parasita, ao hospedeiro, condições socioeconômicas e uso abusivo dos medicamentos

Atualmente, registram-se casos de resistência para quase todos os antimaláricos como cloroquina, merfloquina, 4-aminoquinolínico, antifolatos, dentre outros. Não obstante, a artemisina, conhecida por sua alta eficácia, também vem apresentado casos isolados de resistência para *P. falciparum* ao Sul da Ásia (BOZDECH et al., 2014).

Outra realidade que complica ainda mais a quimioterapia antimalárica é toxicidade. A maioria das drogas voltadas para malária tende a ser mais tóxicas que os antibióticos, nos quais os principais medicamentos com maior toxicidade são os derivados da cloroquina (AVIÑA-ZUBIETA; ESDAILE, 2013). As altas doses e muitas vezes o tratamento prolongados, tendem a desenvolver reações adversas tais como: complicações gastrointestinais, cardiovasculares, oculares, epiteliais e neurológicas levando a uma dificuldade ainda maior do tratamento para o paciente.

3.3 Necessidade de Novas Drogas e Planejamentos de Fármacos

Conhecida por sua abrangência, a química medicinal, segundo Wermuth (2008), concerne na descoberta, desenvolvimento, identificação e interpretação do modo de ação biológico de compostos a nível molecular. Dentro dessa, a área de planejamento de fármacos merece destaque devido ao incremento contínuo de novos compostos medicinais de origem sintética.

A obtenção de uma nova droga na química medicinal envolve três grandes fases: descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo. A fase da descoberta caracteriza-se pela eleição do alvo biológico, utilização de estratégias de modificação molecular tais como; bio-

siosterismo, hibridização molecular e homologação, e ainda determinação da atividade farmacológica do ligante (LIMA, 2007).

Mesmo quando não conhecida a estrutura do alvo terapêutico o planejamento pode ser conduzido a partir da estrutura química do substrato natural, empregando as mesmas estratégias de modificação de alvos terapêuticos conhecidos (BARREIRO, 2009).

Uma das estratégias recentemente utilizadas na etapa da descoberta consiste na modificação das chamadas “estruturas privilegiadas” sendo essa uma abordagem frutífera e menos dispendiosa na obtenção de novas drogas (LIU et al., 2006).

Citadas pela primeira vez por Evans em 1988, as estruturas privilegiadas são definidas como fragmentos moleculares simples que possuem pontos ligantes para mais de um tipo de biorreceptor (BARREIRO, 2009). Essas estruturas têm características que tornam a sua interação com macromoléculas mais fácil e eficiente, no qual o sucesso da abordagem depende da escolha do *scaffold* inicial (MICCO et al., 2016)

Apesar da aparente facilidade, a identificação de uma estrutura privilegiada não pode estar relacionada apenas a sua frequência de aparição em certas subunidades de moléculas bioativas, pois para comprovação da sua farmacodinâmica necessita-se de estudos criteriosos que confirmem a importância da interação fármaco-receptor (SILVA, 2013).

Na indústria farmacêutica atual, um dos principais compostos utilizados como estrutura privilegiada é o benzodiazepino (BZD), o qual possui *scaffold* para medicamentos convulsivantes, ansiolíticos e sedativos (SMITH et al., 2014).

Uma segunda técnica utilizada para o planejamento que merece destaque é bioisosterismo. O conceito de bioisosterismo refere-se a compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentam volume molecular, formas, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes, assim como suas características biológicas (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Ainda de acordo com os autores, o bioisosterismo pode ser subdividido em bioisosterismos clássicos e não-clássicos. Os bioisosterismos clássicos se utilizam de grupos ou átomos monovalentes, divalentes e trivalentes; valência dos átomos; grupamentos, radicais e equivalência dos anéis aromáticos. As demais possibilidades e estruturas equivalentes tais como estruturas cíclicas, não cíclicas e grupos funcionais se encaixam na não clássica (LIMA; BARREIRO, 2005), sendo esta a mais utilizada em estratégias de bioisosterismo.

Além do uso de parâmetros tais como químicos e conformacionais para a substituição bioisotérica se deve avaliar rigorosamente: 1) tamanho, volume e distribuição eletrônica dos átomos; 2) grau de lipofilia (Log P) e solubilidade (pKa); 3) Reatividade dos grupos funcio-

nais ou subunidade estruturais do bioisostero; 4) fatores de conformação (LIMA; BARREIRO, 2005).

A segunda etapa do desenvolvimento de uma droga, otimização, lida com a melhoria de um composto ativo. O processo de otimização ocorre principalmente com o objetivo de aumentar a potência, a seletividade e diminuir a toxicidade. Essa etapa procura estabelecer as relações estrutura-atividade, de preferência com base na compreensão do modo de ação molecular (WERMUTH, 2008). Uma das metodologias bastante utilizada para essa etapa é o esquema de Topliss.

Conhecido por um esquema operacional para o planejamento de análogos (SANT'ANNA, 2002) a árvore de Topliss pode ser utilizado para substituinte de um carbono aromático ou alifático usando grupos substituintes fixos.

Essa abordagem é subdividida em dois métodos para correlacionar quantitativamente à estrutura química com a atividade biológica: o primeiro chamado de Método da Árvore de Decisão (figura 6) consiste em um modelo realizado em etapas, em que mudanças nas propriedades físico-químicas interferem na atividade biológica; o segundo chamado de “Método Manual” que é um modelo não estatístico, permite prever quais grupos substituintes podem aumentar significativamente sua atividade biológica (TOPLISS, 1977).

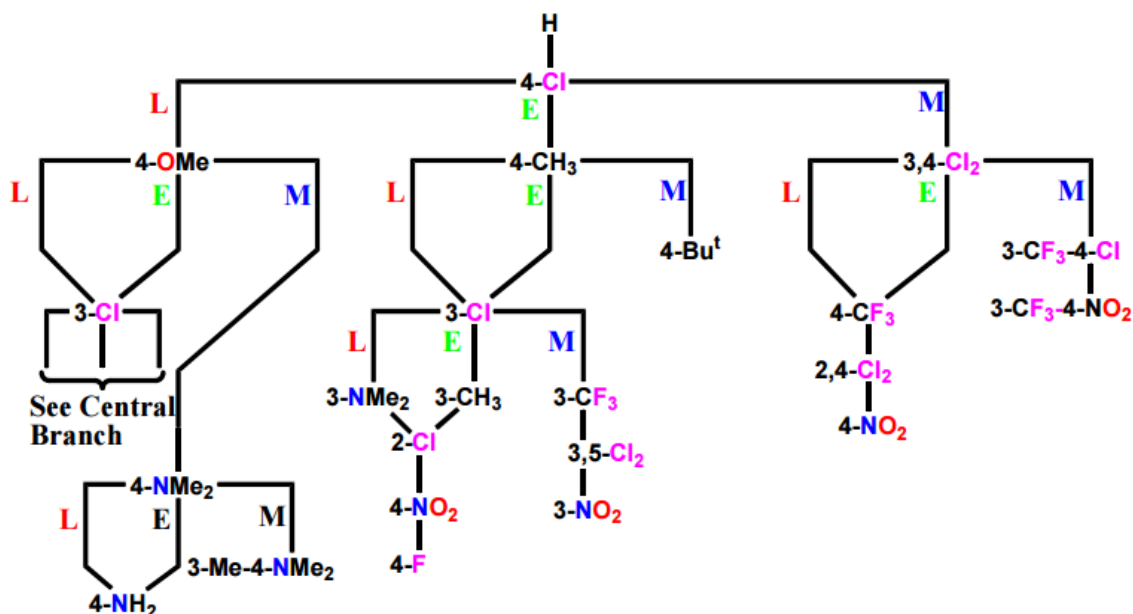


Figura 6: Esquema de otimização de estrutura da Árvore de Decisão de Topliss

O método manual de Topliss manifesta-se de forma contínua em que se avalia o efeito do composto original (líder) frente aos substituintes orientados pelo esquema. A eficácia da ação de cada derivado pode ser classificada em: igual (E), maior (M) ou menor (L) ao substituinte antecessor (figura 6). Esta comparação possibilita ao químico medicinal melhor enten-

dimento de forma simples dos efeitos eletrônicos e lipofílicos, maximizando as chances de obtenção de compostos mais ativos (JORGE et al., 2011) tornando essa metodologia bastante atraente para sua utilização.

Por fim a etapa de desenvolvimento, cuja finalidade é a continuação da melhoria das propriedades farmacocinéticas, consiste no ajuste das propriedades farmacêuticas de substâncias ativas para torná-los adequados para o uso clínico podendo ser realizada preparação para melhor absorção dos compostos, liberação contínua do fármaco, formulações de derivados solúveis em água ou técnicas que permitam a aderência do paciente (irritação, injeção dolorosa, indesejável propriedades organolépticas) (WERMUTH, 2008).

Mesmo com as estratégias para obtenção de novos fármacos, o mercado farmacêutico convive com a grande lacuna entre grandes gastos em pesquisa e poucos resultados lucrativos. Dos 30.0000 fármacos testados chegam às prateleiras apenas 0,003% (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008) estando os restantes barrados durante as outras etapas de segurança.

A dificuldade se aprofunda quando se trata das doenças negligenciadas, que possuem investimentos insatisfatórios na busca de novos medicamentos (VI

DOTTI; CASTRO, 2009). No qual, o mercado não possui força suficiente para garantir o desenvolvimento de remédios para as populações pobres, dando assim mais ênfase para medicamento de caráter “*lifestyle*” ou doenças de países desenvolvidos.

Aliada a esses fatores, a alta toxicidade dos quimioterápicos, o alto custo, a baixa eficácia junto com os mecanismos de resistência dos alvos biológicos enfatiza ainda mais a necessidade para a elaboração de novas drogas terapêuticas que sejam mais eficazes na resposta terapêutica e de fácil acesso para a população.

Diante do exposto é de grande importância entender os procedimentos para a produção de novos fármacos e suas características inerentes; para que então seja possível viabilizar ainda mais a produção de novos medicamentos de perfil mais eficaz, seguro e mais barato para o tratamento da população em geral.

3.4 Química e Atividade Antimalárica dos Derivados Acridínicos

Utilizada desde Primeira Guerra Mundial como bactericida, o núcleo acridínico vêm atraindo as atenções de diversas áreas como a química medicinal. Contida em várias fontes naturais, tais como plantas da família *Rutaceae*, e vários organismos marinhos (CAO et al., 2013; CHOLEWIŃSKIET et al., 2011) esse composto possui ampla atividade antitumoral

(ROWE et al., 1986), antiparasitária (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012) antituberculose (ALY; ABADI, 2004), anti-HIV (GUENDEL, 2009) e anti-príon (THI et al., 2008)

Esse cromóforo (figura 7) caracterizado por possuir um sistema policíclico planar com dois aromáticos ligados a um anel piridínico central e um ou dois grupos substituintes flexíveis, possui como ponto mais nucleofílico o nitrogênio do seu átomo central (SANCHEZ et al., 2006). Essa peculiaridade pode ser o responsável pela alta reatividade e capacidade de ionização desse composto (WAINWRIGHT, 2001).

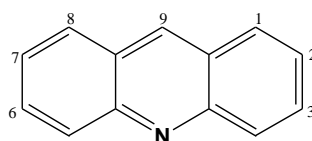


Figura 7: Estrutura do núcleo acridínico

Apesar de isolada pela primeira vez em 1870, por Carl Grabe e Heinrich Caro, essa substância de caráter acre só foi estudada com mais profundidade em 1888 por Auclert que se encarregou de encontrar a finalidade farmacológica para a mesma descobrindo que esse composto apresentava farmacologia semelhante com quininas e alcalóides.

Mesmo após descobrimento de várias outras substâncias que possuíam o núcleo acridínico com atividade biológica determinada, foi somente na década de 1970 que surgiu o primeiro derivado anilina acridínico conhecido como amsacrina ou *m*-AMSA (figura 8). Ainda utilizado para tratamento de vários tipos de câncer (principalmente leucemia e linfomas), a *m*-AMSA possui atividade de intercalador de DNA interferindo nos processos de replicação, recombinação, entre outros (JANGIR et al., 2012).

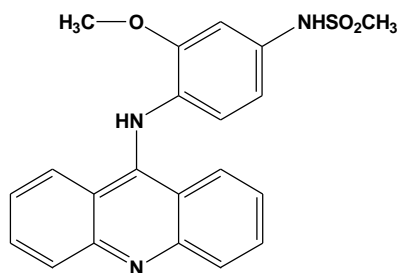


Figura 8: Estrutura química a Amsacrina

A obtenção do núcleo acridínico pode ser atribuída de diversas maneiras, o que permite ao pesquisador escolher o método que mais lhe convém. Corsaro et al. (2002) destacam que a alta reatividade do núcleo acridínico se deve ao seu caráter nucleofílico, o que permite vários ataques no C-9. Além disso, a existência do nitrogênio no anel piridínico leva a uma boa densidade eletrônica assegurando o ataque nucleofílico que favorece várias reações.

A afinidade do DNA por compostos heterocíclicos, permite que a acridína, com sua estrutura planar; possua atividade de intercalador de DNA, interferindo assim no ciclo celular (LAFAYETTE et al., 2013). Intercaladores de DNA são fármacos que possuem interação entre a sua estrutura planar e a dupla hélice permitindo uma acomodação dessa molécula entre os pares de base do DNA, ocasionando danos nos processos como replicação e transcrição (WILLIAMS et al., 1992).

Logo, a afinidade da ligação dos cromóforos da acridína com o DNA é baseado na interação empilhamento- π o qual permite o encaixe entre os espaços entre as duas cadeias de nucleotídeos (CHOLEWIŃSKI et al., 2011).

De acordo com Rowe et al. (1986) e Laffayette et al. (2013) a acridína também age como inibidor da proteína topoisomerase I, ligando-se entre essa enzima e diferentes sítios do DNA ou formando um complexo ternário que leva a clivagem do DNA, ademais esse composto também parece induzir a apoptose de células cancerígenas (BARROS et al., 2011). Além desses mecanismos segundo Valdés (2011), os derivados acridínicos possuem ação de inibição do complexo *bcl1* mitocondrial, inibição da formação da β -hematina e quimiosensibilização quando avaliados para malária.

Cada vez mais estudos demonstram a ação promissora dos derivados acridínicos. Kumar et al. (2013) sintetizaram grupos de derivados acridínicos a partir da reação do 2-metil-9-cloroacridina com várias aminas aromáticas em diferentes posições de acoplamento produzindo o derivado **AS-02** [(3-Cloro-fenil)-(2-metil-acridin-9-il)-amina] que possui boa atividade antitumoral e baixa toxicidade para linhagens de células A-549 (figura 9).

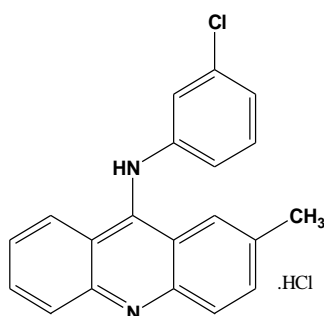


Figura 9: Estrutura química do AS-02 derivado 2-metil-9-cloroacridina

Giorgio et al (2007) também demonstram em seu trabalho que os derivados acridínicos apresentam atividade parasitária voltada para leishimania, no qual a molécula **3a** (*N*-[6-(benzoilamino)-3-acridinil] benzamida)] (figura 10) mostra-se a mais promissora para essa atividade.

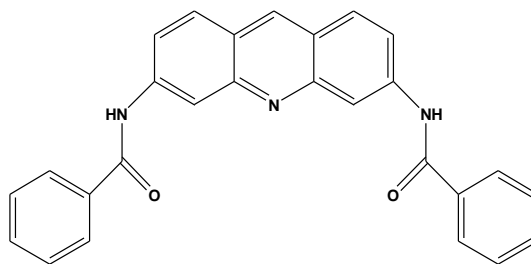


Figura 10: estrutura química da *N*-[6-benzoilamino]-3-acridinil

Não obstante, de acordo com o trabalho de Aly e Abadi (2004) os derivados acridínicos tais como 6,9-dicloro-2-metóxi-acridina e 9-cloro-2-metoxi-acridina quando condensados com semicarbazidas e tiosemicarbazidas formam moléculas com alta atividade antitubercular, no qual a molécula com melhor eficácia para essa atividade biológica foi o **17** (3-(amino 6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)- *N*- (5-metilisoxazol-3-il)-benzenossulfonamida) (figura 11 a).

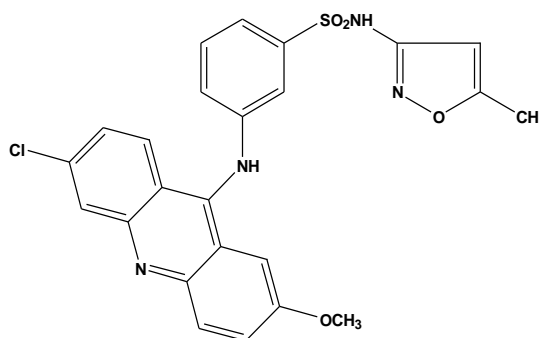


Figura 11: Estrutura dos derivados 6-cloro-2-metoxi acridina com atividade antituberculose

Além dessas atividades biológicas os derivados acridínicos apresentam finalidades biológicas voltadas para doenças negligenciadas (DN), tais como a malária. O primeiro núcleo acridínico utilizado como antimalárico foi o azul de metileno (figura 12). Descoberto a mais de 100 anos atrás, esse composto ainda é utilizado para a terapia antimalárica por ser de baixo custo. O uso do azul de metileno proporcionou a criação de novos arsenais antimaláricos, tais como a primaquina e outros 8-aminoquinolínicos (GARAVITO et al., 2008; KAUR et al., 2010).

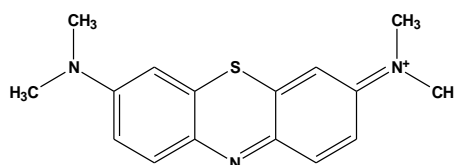


Figura 12: Estrutura química do azul de metileno

Com o passar do tempo e com as novas descobertas da química medicinal, vários outros compostos acridínicos foram sintetizados e utilizados por sua alta atividade antimalárica. Relatados por Jones et al. (2009) o composto **7**, mostrado na figura 13, proveniente da síntese de híbridos de artemesina-acridina apresentou boa atividade para cepas 3D7 de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, demonstrando que a presença do anel acridínico apresenta atividade biológica significativa para malária.

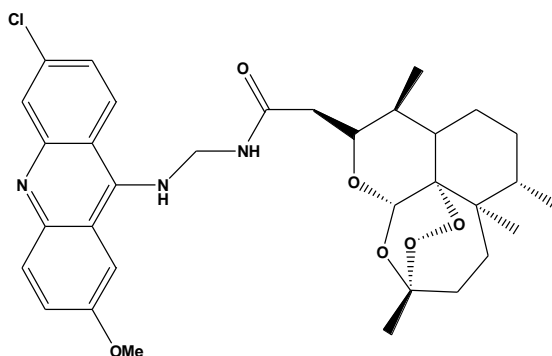


Figura 13: Estrutura do derivado híbrida artemesina-acridína

Korotchenko et al. (2015) sintetizaram e avaliaram a atividade antimalárica dos derivados 10-amidinobenzenapitiridina, com diferentes *N,N*-disubstituídos 3-cloropropilamina. Dessa serie o composto **13b** [*N*- (7-Cloro-2-metóxi benzo [b] [1,5] nafitiridin-10-il) -*N*, *N'*-bis [3- (dimetilamino) propil]-acetamida)] (figura 14) obteve a melhor atividade para todas as cepas *P. falciparum* *in vitro* e *in vivo* com menor toxicidade para células HepG2 e que poderá ser uma das candidatas a substituir a mefloquina como droga padrão.

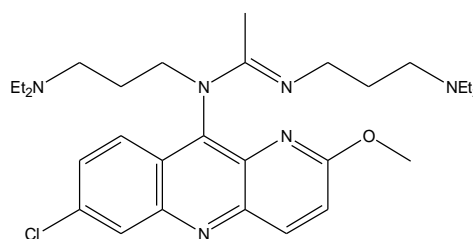


Figura 14: Estrutura química da molécula *N*- (7-Cloro-2-metoxi benzo [b] [1,5] nafitiridin-10-il) -*N*, *N'*-bis [3- (dimetilamino) propil]-acetamida

Ainda, no trabalho de Guetzoyan et al. (2007) em que foram sintetizados novos derivados 9-aminoacridínicos, se observou que o composto **2** (9-(6-Amino-hexilamino) -6-cloro-2-metóxi-acridina-dicloreto) (figura 15), apresentou melhor atividade *P. falciparum*, no qual o mesmo possuiu valores de inibição de $IC_{50}=0,18\mu M$; $IC_{50}=0,18\mu M$ e $IC_{50}=0,20\mu M$ para cepas 3D7, W2 e FCR3 (cloroquina resistentes), respectivamente apresentando-se como um promissor antimalárico.

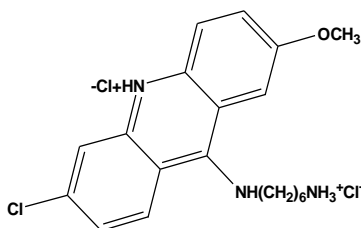


Figura 15: Estrutura química do 9- (6-Aminohexilamino) -6-cloro-2-metóxi-acridina-dicloreto

Segundo Sharma et al. (2014), derivados 9-aniloacridina condensados com diferentes aldeídos aromáticos resultaram no composto **40** (*N*- [4- (6-Cloro-2-metóxi-acridin-9-il-amino) -fenil] -2- [*N'* - (2-fluoro-piridin-3-il-metileno) -hidrazina]-2-oxo-acetamida) (figura 16) que apresenta atividade antimalárica para cepas K1 de *P. falciparum* como valor de $IC_{50}=42,43nM$ e $IS=4106,77nM$, o que indica boa atividade e baixa toxicidade.

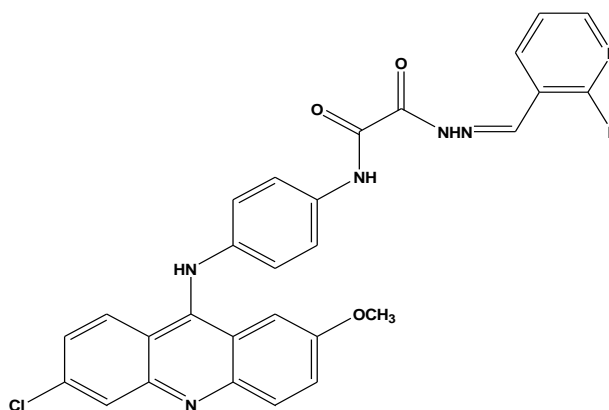


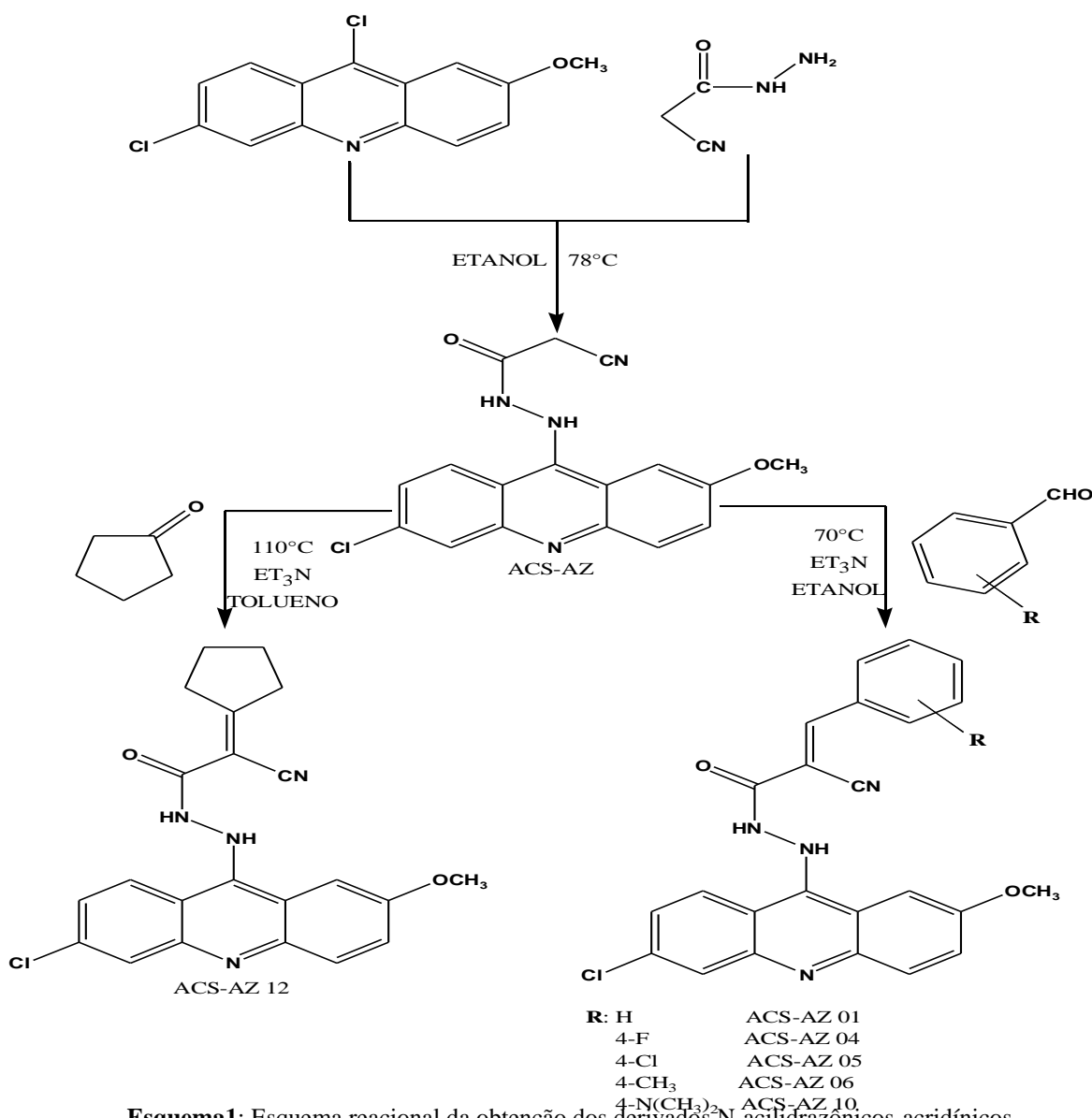
Figura 16: Estrutura química do composto *N*- [4- (6-Cloro-2-metóxi-acridin-9-il-amino)-fenil]-2-[*N'* (2-fluoro-piridin-3-il-metileno)- hidrazina]- 2-oxo -acetamida

Diante do demonstrado e da necessidade da busca de novos fármacos com ação anti-malárica, percebe-se que o núcleo acridínicos aparenta ser uma solução eficaz como quimioterápico antimalárico, e que posteriores modificações estruturais nesse *scaffold* pode incrementar a atividade biológica possibilitando a obtenção de futuros fármacos mais ativos e menos custosos.

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese das moléculas

A síntese dos derivados *N*-acilidrazônicos-acridínicos realizou-se de acordo com a via Linear, em que primeiramente, foi obtido, a partir dos produtos comerciais 6,9 dicloro-2-metóxi-acridina (CAS:86-38-4) e 2-cianocetahidrazina (CAS:88602-25G), em etanol, o derivado ACS-AZ. Posteriormente, a síntese dos derivados *N*-substituídos se deu através da condensação do ACS-AZ com diferentes aldeídos aromáticos substituídos em meio etanólico e básico e uma cetona cíclica em meio básico com tolueno (esquema 1).



Esquema1: Esquema reacional da obtenção dos derivados *N*-acilidrazônicos-acridínicos

4.1.1 Obtenções do ACS-AZ

Para a síntese do ACS-AZ (demonstrada no esquema 1) utilizou-se o seguinte procedimento padrão: em um balão de fundo redondo adicionou-se 1g de 6,9 dicloro-2 metóxi-acridina, seguida de 10 ml de EtOH (etanol) para solubilização. Após isso, colocou-se a 2-cianocetahidrazida (1 equivalente molar), e mais 5 ml de etanol. A reação se deu sob agitação e temperatura de 78 °C com duração de 3 horas. Acompanhou-se a reação de obtenção desse composto por CCD em sistema 9:1 clorofórmio/metanol. Após o consumo dos produtos de partida; parou-se a reação e essa foi posteriormente, filtrada e lavada com EtOH. O produto obtido foi encaminhado para as caracterizações físico-químicas, elucidação estrutural e testes biológicos.

4.1.2. Obtenção dos derivados do N-acilidrazônicos-acridínicos com aldeídos aromáticos substituídos

Obtiveram-se os derivados N-acilidrazônicos-acridínicos (esquema 1) de acordo com o seguinte procedimento descrito: Em um balão de fundo redondo adicionou-se 200 mg de ACS AZ, juntamente colocou-se 10 ml de EtOH. Posteriormente adicionaram-se em quantidades equimolares diferentes aldeídos aromáticos substituídos e 20 gotas de trimetilamina (ET₃N). Após serem colocadas no agitador magnético sob refluxo de 70°C acompanhou-se as por CCD em sistema *n*-hexano/AcOEt7:3.

As reações tiveram duração total variando de 8 a 24 horas. Após, constatada o consumo dos produtos de partidas, as novas moléculas foram filtradas e lavadas com EtOH. Os cristais obtidos foram encaminhados para a caracterização físico-química, elucidação estrutural e teste biológico.

4.1.3 Obtenção dos derivados do N-acilidrazônicos-acridínicos com grupamento cicloaquil

Realizou-se também um segundo caminho para essa rota sintética no qual se utilizou um substituinte cicloaquil. A síntese desse derivado (esquema 1), se deu a partir de 200mg de ACS-AZ solubilizadas em 10 ml tolueno. Posteriormente adicionou-se quantidade equimolar da ciclopentanona e cuidadosamente 20 gotas de ET₃N. Colocou-se a reação no agitador magnético em refluxo de 110°C, onde se constatou duração de 8 horas de reação. O restante

do procedimento metodológico foi executado da mesma forma que os demais produtos finais obtidos no trabalho.

4.2 Caracterização Físico-Químico

Após a síntese, realizou-se a caracterização dos compostos no qual foram avaliados: aparência; cálculo de fator de retenção (R_f); coeficiente de Lipoficidade (LogP) obtida a partir da utilização do programa CrewDram Ultra®; ponto de fusão (P.F) utilizando o aparelho Quimis Modelo Q-340M e o rendimento verificado pela fórmula:

$$R = \frac{\text{Massa esperada (g)} \times 100}{\text{Massa obtida (g)}}$$

4.3 Elucidação estrutural dos compostos

As moléculas sintetizadas tiveram sua comprovação estrutural através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H¹) e Espectroscopia de Carbono (RMN¹³C), no espectrômetro modelo Bruker AMX-300 MHz (300 MHz para 1H e 75,5 MHz para 13C) e solvente DMSO-d₆ da Sigma-Aldrich. Os deslocamentos químicos (δ) para o RMN H¹ são apresentados em ppm e as multiplicidades são dadas como s (singlete), d (duplete), t (triplete), m (multiplete), dd (duplo- duplete), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. Algumas desses também tiveram sua estrutura elucidadas através da técnica de Espectroscopia de Infravermelho (I.V), tendo os resultados registrados com um espectrofotômetro modelo Bruker IFS66 FT-IR (Bruker, Alemanha), utilizando pastilhas de KBr; e Espectrometria de Massa através do aparelho MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA).

4.4 Teste de Avaliação Antimalárica

Os testes foram realizados no Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), da Fiocruz-BA.

4.4.1 Atividade anti- *P. falciparum*:

As cepas W2 de *P. falciparum*, foram mantidas em cultura contínua de eritrócitos humanos (do grupo sanguíneo O⁺), utilizando o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de plasma humano. Os Parasitas cultivados a 1-2% e parasitemia de 2,5% do hematócrito foram distribuídos em placas de 96 poços de cultura e incubados com os compostos (previamente diluído com 4% de DMSO e meio de cultura). Após 24h de incubação, a [³H]-hipoxantina foi adicionada, a placa incubada novamente e os parasitas foram colhidos utilizando um coletor de células para quantificação da incorporação de [³H]-hipoxantina num contador de radiação-β. A inibição do crescimento do parasita foi avaliada por comparação com a absorção da [³H]-hipoxantina contra parasitas tratados e não tratados após 24 horas de incubação. Cada composto foi testado inicialmente a uma concentração de 10 μM, em triplicata, e os valores de IC₅₀ foram calculados de concentração em triplicata usando diferentes concentrações. A primaquina foi utilizada como droga padrão.

4.4.2 Toxicidade Celular

As células HepG2 foram mantidas em vermelho fenol livre em meio RPMI-1640 contendo 10% de fetal de bovino e 50μg mL⁻¹ de gentamicina. As células foram semeadas em placas de 96 poços (104 células / poço em 100μl de meio). Após 24 horas, os compostos, previamente diluído no meio RPMI-1640, foram adicionados em cinco concentrações em triplicado, e a placa foi incubada durante 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, 20% de azul de Alamar foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada durante 24 horas. A absorvância a 570 e 600 nm foi medida. Os controles com células tratadas e não tratadas foram feitos em triplicata na mesma placa.

4.4.3 Ensaio de hemólise

A atividade hemolítica dos compostos foi ensaiada em eritrócitos humanos frescos (tipo O⁺). As células foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato e 100μl desta suspensão (1% hematócrito) foi distribuído em cada cavidade de uma placa de 96 poços. Depois, com 100μl de cada composto (acridinas), previamente dissolvido em tampão fosfato salino, foram adicionados em triplicado à placa e incubou-se durante 1 h. A saponina (Sigma-

Aldrich, EUA) foi utilizado como droga hemolítica a 1% v/v. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (1500 rpm durante 10 min.), 100µl de cada sobrenadante foi transferido para outra placa de microtítulo. A hemoglobina libertada foi monitorizada através da medição da absorvância a 540 nm num espectrofotômetro. A percentagem de hemólise foi calculada como mostrado abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}}{\text{absorbância do controle com saponina}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSÃO

5.1 Síntese, Caracterização e Comprovação Estrutural

Foram sintetizados sete novos compostos codificados por **ACS-AZ** (2-Ciano- *N'*-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)-hidrazida), **ACS-AZ 01** (2-Ciano-3-fenil-acrílico- *N'*-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)-hidrazida), **ACS-AZ 04** (2-Ciano-3-(4-fluor-fenil)-acrílico- *N'*-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)-hidrazida), **ACS-AZ 05** (3-(4-Cloro-fenil)-2-ciano-acrílico- *N'*-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)-hidrazida), **ACS-AZ 06** (2-ciano-3-*p*-tolil- acrílico-*N'*-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)-hidrazina), **ACS-AZ 10** (Ciano-ciclohexilideno-acético- *N'*-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)-hidrazida) e **ACS-AZ 12** (Ciano-ciclopentilideno- *N'*-(6-cloro-2-metóxi-acridin-9-il)-hidrazida)

Tabela 1: Derivado N-acilidrazônicos acridinícos e suas respectivas características físico-químicas

Composto	Aparência	PM	Rend %	P.F (°C)	Rf	FM	Log P
ACS-AZ	Pó amarelo	340,07	75,30	259	0,90 ^b	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄ O ₂	2,65
ACS-AZ 01	Pó laranja	428,10	88,52	283	0,58 ^a	C ₂₇ H ₁₇ ClN ₄ O ₂	4,53
ACS-AZ 04	Pó vermelho	446,09	65	239	0,58 ^a	C ₂₄ H ₁₆ ClFN ₄ O ₂	4,69
ACS-AZ 05	Pó laranja	462,01	89,74	251	0,55 ^a	C ₂₄ H ₁₆ Cl ₂ N ₄ O ₂	5,09
ACS-AZ 06	Pó laranja	430,11	83,56	257	0,7 ^a	C ₂₄ H ₁₉ ClN ₄ O ₂	3,81
ACS-AZ 10	Pó vermelho	459,14	65,28	208	0,48 ^a	C ₂₅ H ₂₂ ClN ₅ O ₂	2,81
ACS-AZ 12	Pó marrom	406,11	39	269	0,51 ^a	C ₂₂ H ₁₉ ClN ₄ O ₂	3,85

P.M: peso molecular; Rend (%): rendimento; P.F (°C): ponto de fusão em graus Célsius; Rf: fator de retenção; FM: formula molécula; Log P: Coeficiente de Lipoficidade; ^an-hexano/acetato 7:3 (*n*-hexano/AcOEt 7:3) ^bclorofórmio/metano 9:1

Como mostrado na tabela 1 todas as moléculas, exceto o ACS-AZ 12, obtiveram rendimentos acima de 50% o que demonstra boa viabilidade da rota sintética adotada e fácil método de purificação. Entretanto, quanto ao rendimento de 39% do ACS-AZ 12 infere-se que esse resultado pode ser decorrente da existência do grupamento cetônico nessa molécula, uma vez que as cetonas são menos reativas que os aldeídos, interferindo no rendimento da reação. Quanto ao ponto de fusão observaram-se valores de 208 °C (ACS-AZ 10) a 283 °C (ACS-AZ 01).

Os pesos moleculares dessa série variaram entre 340,14 g/mol (ASC-AZ) a 462,01 g/mol (ACS-AZ 04). Já o fator de retenção (Rf) obteve os intervalos entre 0,48 e 0,7 no sistema 7:3 hexano e Rf= 0,90 em clorofórmio/metanol 9:1 para o ACS-AZ.

Em relação ao coeficiente de partição (Log P), todas as moléculas, com exceção do ACS-AZ05, apresentaram LogP <5, tendo os compostos ACS-AZ (2,85) e ACS-AZ 05 (5,09) apresentado, respectivamente; o maior e o menor LogP. Os resultados para peso molecular e LogP apresentam-se de modo satisfatórios e de acordo com a regra de Lipinsk, uma vez que esses valores podem indicar um bom perfil de biodisponibilidade (BARREIRO, FRAGA, 2015), resultando em um aumento da sua ação farmacológica.

Como forma de comprovar as novas entidades químicas realizou-se a elucidação estrutural dos compostos ACS-AZ, e ACS-AZ 04, por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H), espectroscopia de infravermelho (IV), RMN de ¹³C e espectrometria de massa. É bom ressaltar, que nem todas as moléculas tiveram suas elucidações citadas por motivos de tempo e atraso nos resultados.

Tabela 2: Dados do espectro em RMN ¹H (δ em ppm) dos derivados N-acilidrazônicos acridínicos obtidos

MOLÉCULA	RMN ¹ H
ACS-AZ	δ=12.11 (s,1H, NH), 11.02 (s, 1H, NH), 4.11 (s, 2H, CH ₂), 3.93 (s, 3H, OCH ₃), hidrogênios aromáticos: 8.77 (d, 1H, J= 9,6 Hz), 8.02–7.98 (m, 2H), 7.93 (1H, d, J= 9,3 Hz), 7.72 (dd, 1H, J= 9,3; Hz J=2,4 Hz), 7.51 (d, 1H, J= 7.8 Hz)
ACS-AZ 04	δ= 11.83 (s, 1H, NH), 8.71 (s, 1H, C=CH), 3.85 (s, 3H, OCH ₃) hidrogênio aromático: 8.21 (d,1H, J=9,0 Hz), 7.90 (d,1H, J= 8,7 Hz), 7.61–7.60 (m, 2H), 7.55 (d, 2H, J= 8,4 Hz), 7.52 (d, 2H, J= 9,9 Hz), 7.42 (dd, 1H J= 9,6 Hz), 7.22 (dd, 1H, J= 8,7 Hz)

singleto (s); duplete (d); duplo-duplete (dd), multiplete (m)

Na tabela 2, para a molécula ACS-AZ foram observados os valores de deslocamento (δ) em intervalos de 7.51-8.77 ppm que estão dentro do perfil dos aromáticos indicado por Silversteins e Webster (2000) que corresponde ao deslocamento químico dos hidrogênios do anel acridínico. Além disso, ainda nessa molécula, o singleto em 4.11 ppm (s, 2H) refere-se ao carbono metilênico (CH₂) da porção N-acilidrazônico, enfatizando a reação de acoplamento entre essas duas estruturas. Os valores em 3.85 ppm (s, 3H) e 3.93 ppm (s, 3H) são atribuídos a metoxila (OCH₃) (PAVIA et al., 2010) dos anéis acridínico.

Foi verificado também singletos com valores em 11.02 ppm (s, 1H), 11.83 ppm (s, 1H) e 12.11 ppm (s, 1H) que são correspondente a função amida desses compostos. Ainda sobre este, destaca-se na figura 17 dois pequenos picos desse grupamento no ACS-AZ que para Pavia et al. (2010) pode ser decorrente da característica variável da amida que se altera a depender do seu ambiente químico, temperatura e solvente utilizado.

Sobre o aldeído aromático substituídos do ACS-AZ 04, notou-se deslocamento químico em 7.52 ppm (d, 2H, $J=9,9\text{Hz}$) e 7.55 ppm (d, 2H, $J= 8,4\text{Hz}$) ppm (d, 2H) (tabela 2), que são condizentes com o padrão de δ de aromáticos na literatura de Pavia, et al (2010), admitindo a presença desse grupamento substituinte.

Comparando-se as figuras 17 (RMN ^1H do ACS-AZ) e 18 (RMN ^1H do ACS-AZ 04) nota-se no primeiro a inexistência do pico $\text{CH}=\text{C}$ e a presença desse no espectro do ACS-AZ 04 (singlet em 8.71 ppm) sugerindo então a confirmação da reação de condensação entre o aldeído aromático substituído e o ACS-AZ. Ainda, outro detalhe que se observa nas figuras 17 e 18 é ausência do singletto em 4.11 ppm do carbono metilênico, nos derivados substituídos, reafirmando o sucesso da condensação entre o anel acridínico e o aldeído aromático substituído.

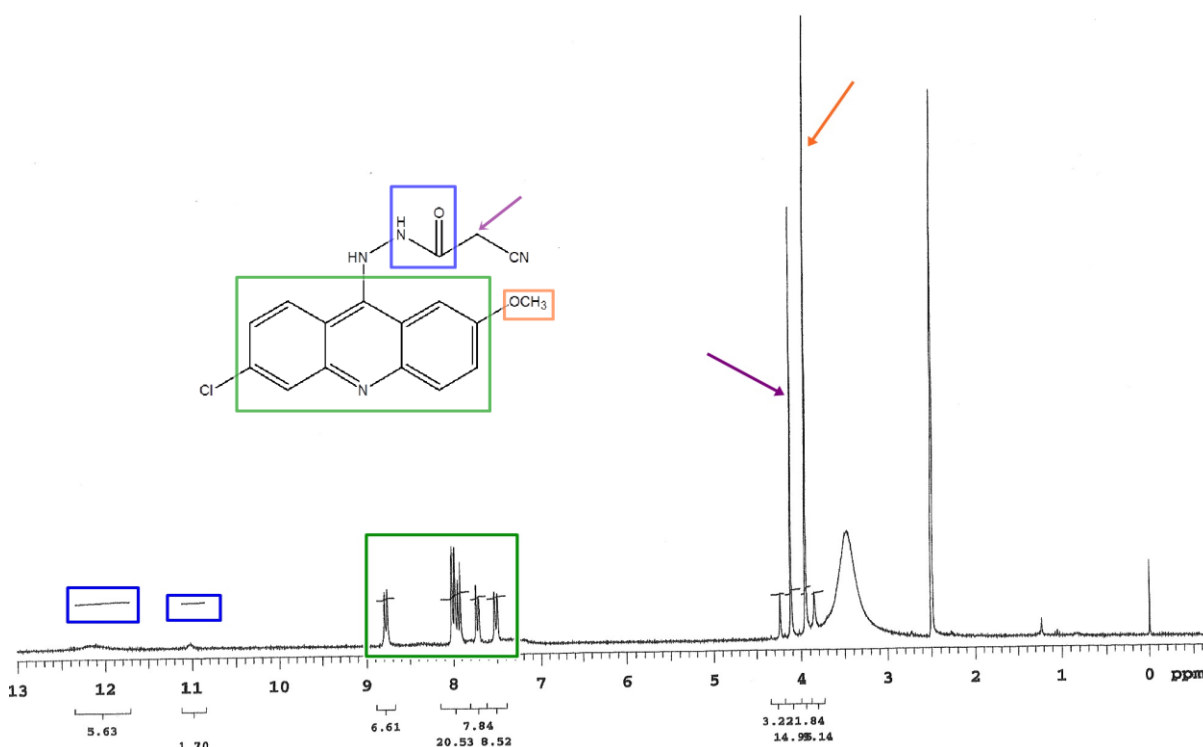


Figura 17: RMN ^1H do ACS-AZ. Correlação da estrutura com os picos apresentados

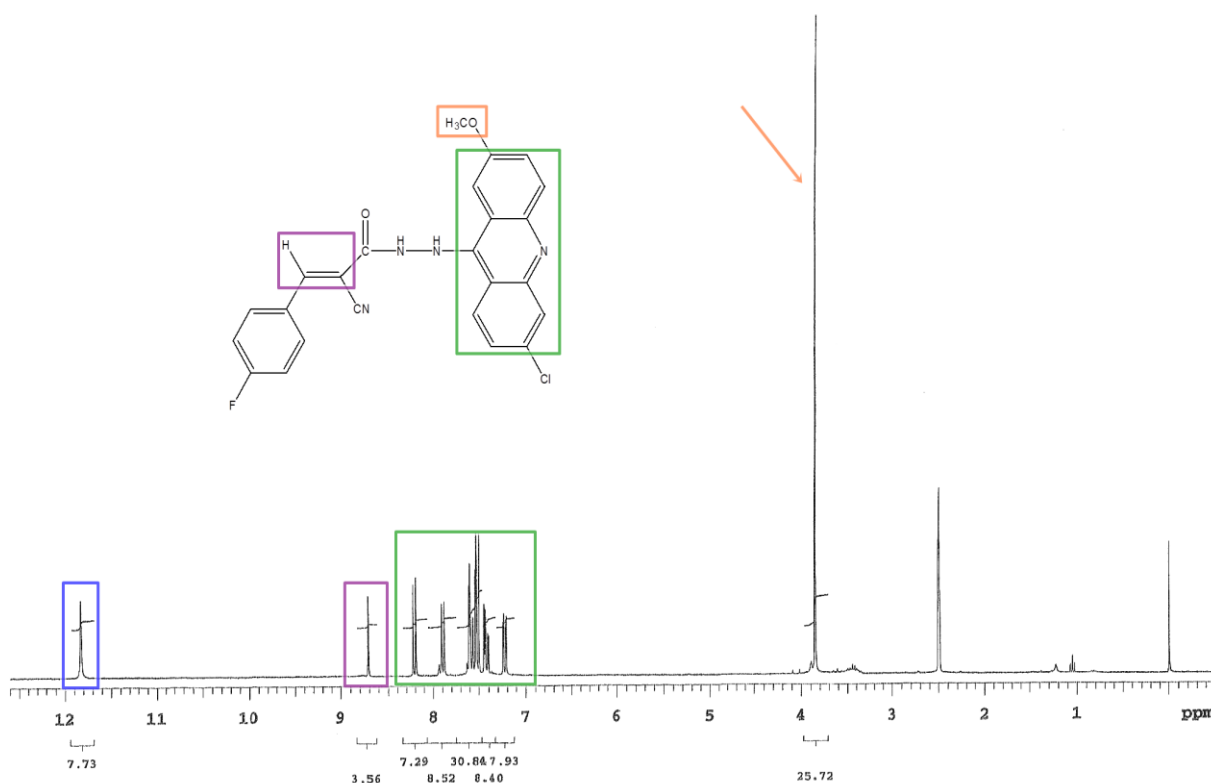


Figura 18: RMN ^1H do ACS-AZ 04. Correlação entre a estrutura e os picos apresentados

Nos espectros de infravermelho (IV) mostrados da tabela 3; nota-se que os valores de absorção entre os intervalos de 1.501 cm^{-1} a 1.586 cm^{-1} , referentes a C=C dos anéis aromáticos, coincide com os valores adotado desse grupamento na literatura de Clayden et al. (2001), o que de início indica a existência dos anéis aromáticos no ACS-AZ e ACS-AZ 04.

Os valores de absorção da função amida (HNC=O) podem ser observados dentro de um intervalo de $1.628\text{--}1.633\text{ cm}^{-1}$, estando todas de acordo com os valores de absorção ($1630\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$) propostos por Solomons e Fryhle (2001). A banda de valor igual 1.703 cm^{-1} corresponde a carboxila (C=O) do *scaffold* N-acilidrazônicos presente no ACS-AZ.

Tabela 3: espectroscopia de infravermelho dos novos derivados acilidrazônicos acridínicos

COMPOSTO	IV (valores em cm^{-1})
ACS-AZ	2.928 (CH_2 axial); 1.703 (C=O); 1.628 (HNC=O); 1.586, 1.506, 1.466 (C=C aromático); 1.426 (CH_2 Adj C=O angular); 1.250, 1.238, 1.029 (C-O-C)
ACS-AZ 04	2.353 (CN); 1.632 (HNC=O); 1.586 (C=C); 1.501 (C=C aromático); 1.367 (C-F aromático); 1.236 e 1.115 (C-O-C)

Para todos os compostos apresentados na tabela 3, o valor da banda de absorção do éter (C-O-C) entre $1029-1250\text{ cm}^{-1}$ condiz com a faixa de $1000-1300\text{ cm}^{-1}$ encontrada para esse grupamento em Silverstein e Webster (2000).

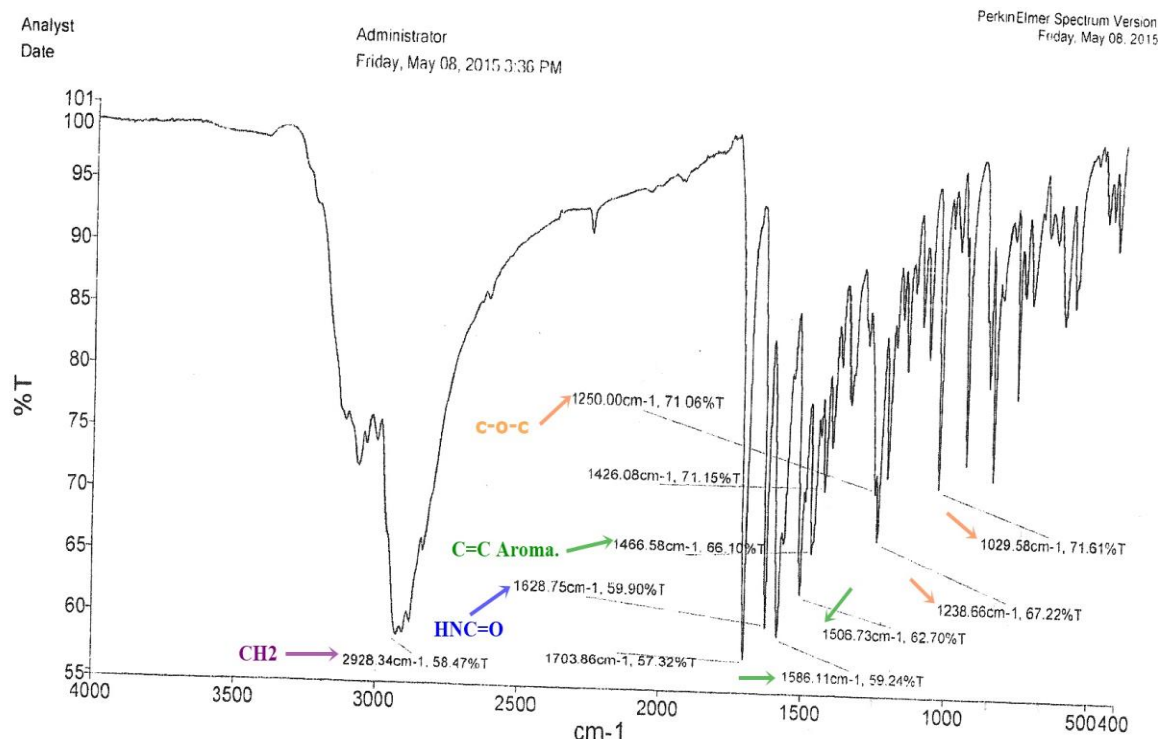


Figura 19: Espectro de infravermelho do ACS-AZ. Correlacionado a estrutura com as bandas

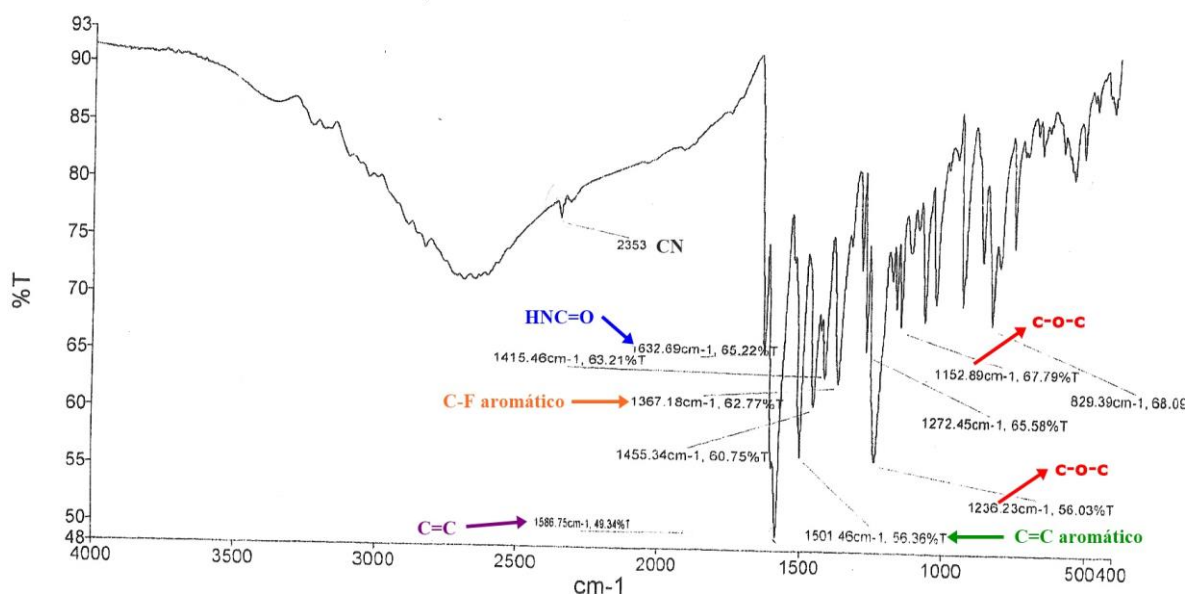


Figura 20: Espectroscopia de infravermelho do ACS-AZ 04. Correlação da estrutura com as bandas

Também é interessante notar a ausência e presença de determinados valores de absorção, tais como a absorção axial do CH₂ (2.928 cm^{-1}) presente na molécula do ACS-AZ, mas

ausente no ACS-AZ 04, tendo esta sido substituída pela ligação C=C (1.586cm^{-1}) no derivado, enfatizando novamente a ocorrência da reação de condensação e a obtenção da nova molécula.

Em relação ao RMN ^{13}C , em que se pode confirmar a quantidade de carbono presente em um composto, verificou-se que para o ACS AZ (tabela 4), pode existir 14 a 17 carbonos. Para o espectro de ACS-AZ 04 pode ser encontrado 22 a 24 C, sendo estes resultados dependentes da absorção dos carbonos homotrópicos nessas moléculas.

Tabela 4: RMN ^{13}C dos compostos ACS-AZ e ACS-AZ 10

COMPOSTO	DESLOCAMENTO QUÍMICO (δ PPM)
ACS-AZ	δ 24.14; 56.18; 103.080; 115.26; 117.48; 120.61; 124.17; 127.57; 134.89; 138.85; 139.85; 153.09; 155.90; 161.93
ACS-AZ 04	δ 55.39; 104.99; 101.60; 106.81; 115.27; 116.21; 119.29; 121.09; 121.25; 124.50; 128.32; 129.09; 130.01; 132.10; 135.62; 137.61; 141.07; 146.70; 150.40; 154.33; 165.90, 175.56

Quanto aos espectros de massa do ACS-AZ e ACS-AZ 04, mostrado na tabela 5, constatou-se que a massa esperada e a massa encontrada possuíram diferença de no máximo 1 unidade, sendo aceitável para a comprovação dessas estruturas.

Tabela 5: Espectrometria de massa dos compostos ACS-AZ e ACS-AZ 04

COMPOSTO	MASSA CALCULADA	MASSA ENCONTRADA
ACS-AZ	340.0727	341.0693
ACS-AZ 04	446.0946	447.0996

5.2 Avaliação Biológica

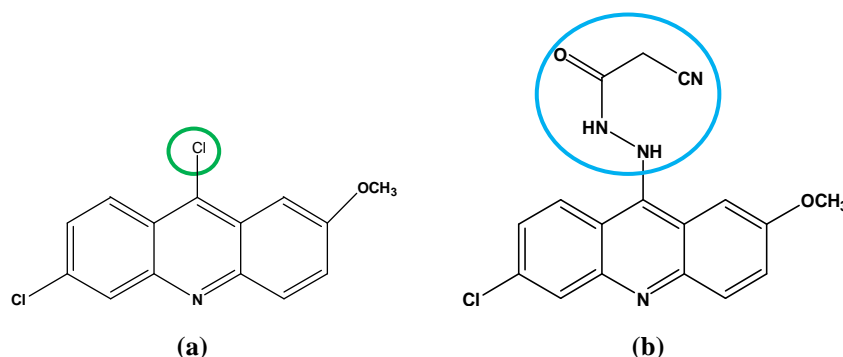
Após a síntese e as avaliações estruturais, os compostos ACS-AZ, ACS-AZ 01, ACS-AZ 04 e ACS-AZ 05 foram submetidos à avaliação biológica frente cepas de *P. falciparum*, citotoxicidade de células hospedeiras e índice de seletividade, sendo estes valores exposto abaixo na tabela 6.

Tabela 6: Atividade anti-*falciparum*, citotoxicidade em células hospedeiras e índice de seletividade

COMPOSTOS	IC ₅₀ ±D.P. (µM)		ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)
	CEPAW2 <i>P. falciparum</i> ^(a)	CÉLULAS HOSPEDEIRAS HepG2 ^(b)	
ACS-AZ	2.8±0.8	73.5±2.8	26
ACS-AZ 01	0.9 ±0.8	80.07±0.5	90
ACS-AZ 04	3.2±0.2	>200	>62
ACS-AZ 05	2.4±1.1	>200	>83
9DICAC	2.7±0.4	71.9±6.0	27
<i>m</i> -AMSA(amsacrina)	0.8±0.1	5.2±0.6	7
Primaquina	1.7±0.1	11.81±0.28	49

Observou-se que o 9DICAC (6,9-dicloro-2-metoxi-acridina) apresentou um valor de IC₅₀ de 2.7±0.4 µM frente a cepa W2 *P. falciparum*, IC₅₀ para as células hospedeira HepG2 de 71.9±6.0µM e índice de seletividade (IS) 27 (tabela 6), o que já indica uma considerável atividade antimalárica. Quando comparando o 9DICA com o ACS-AZ que possui valores IC₅₀ 2.8±0.8 µM IC₅₀ para HepG2 de 73.5±2.8µM e IS de 26 não se observou valores significativos de inibição para cepa W2.

O desempenho na atividade biológica do ACS-AZ pode ser explicado comparando-se às estruturas moleculares (figura 21). Deste modo visualiza-se que o incremento da 2-cianocetahidrazina não representou alteração relevante para a atividade farmacológica e toxicológica, uma vez que o núcleo acridínico por si só já apresenta atividade biológica.

**Figura 21:** Diferenças estruturais entre (a) 6,9 dicloro-2 metóxi-acridina e (b) ACS-AZ

Quando comparamos o ACS-AZ com o derivado substituído ACS-AZ 01, notou-se para o IC₅₀ das cepas W2, que o ACS-AZ 01 apresentou um valor 3,11 vezes menor que o ACS-

AZ. Ainda observou-se diferença significativa para células HepG2 e IS, onde o ACS-AZ 01 apresentou os maiores valores, indicando que a presença de um grupamento benzilideno favorece a atividade biológica, diminui a toxicidade e aumenta a especificidade celular.

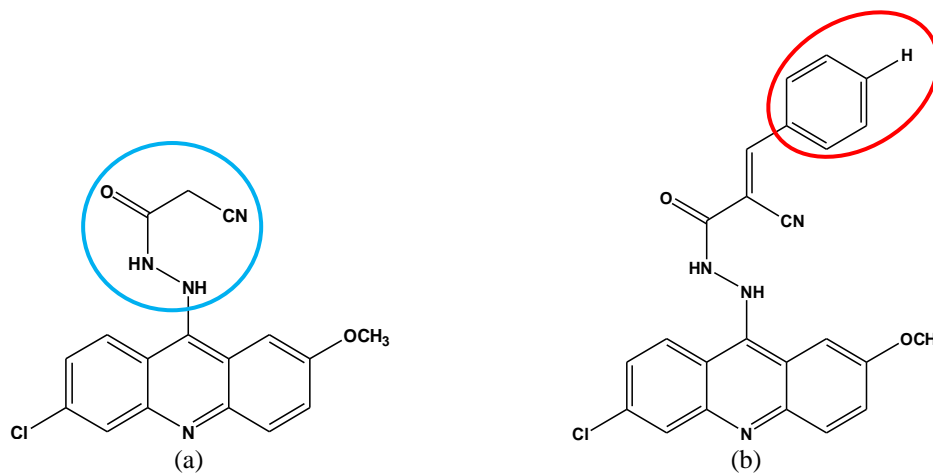


Figura 22: Diferenças estruturais entre ACS-AZ (a) e ACS-AZ 01 (b)

Segundo Gomes et al. (2014) para uma boa atividade antimalárica é necessário que o potencial antimalárico apresente valores reduzidos de IC_{50} , visto que isso minimiza o risco de falta de especificidade da droga por seu alvo, além de possibilitar a administração de doses menores, reduzindo assim a chance de ocorrerem efeitos adversos.

Em acordo com o citado dentro dos derivados substituídos a molécula que obteve melhor atividade antimalárica foi o ACS-AZ 01 tendo IC_{50} de $0.9 \pm 0.8 \mu M$; IC_{50} para HepG2 de $80.07 \pm 0 \mu M$ e IS iguais a 90 (tabela 6) sugerindo melhor especificidade e menores doses para o tratamento. Quanto ao ACS-AZ 04 e ACS-AZ 05 os testes mostraram valores de IC_{50} de $3.2 \pm 0.2 \mu M$ e $2.4 \pm 1.1 \mu M$, respectivamente. Entretanto, não se pode descartar a atividade biológica desses uma vez que a toxicidade das células hospedeiras HepG2 mostrou-se >200 e seus índices de seletividade >62 , que para Soares et al. (2015) revelam moléculas promissoras para o perfil farmacológico proposto.

Comparando-se os novos derivados estruturalmente entre si (figura 22) e levando em conta os grupos substituintes, nota-se que a introdução de grupos halogênios tais como flúor (ACS-AZ 04) e cloro (ACS-AZ 05) na posição *para* leva a um aumento de 3,5 e 2,6 vezes, respectivamente, do IC_{50} de W2 desses em relação ao átomo de hidrogênio (ACS-AZ 01) indicando que a presença desses halogênios modulam fatores eletrônicos e lipofílicos dos derivados de acridina, uma vez que esses substituintes induzem a efeitos indutivos e/ou mesoméricos.

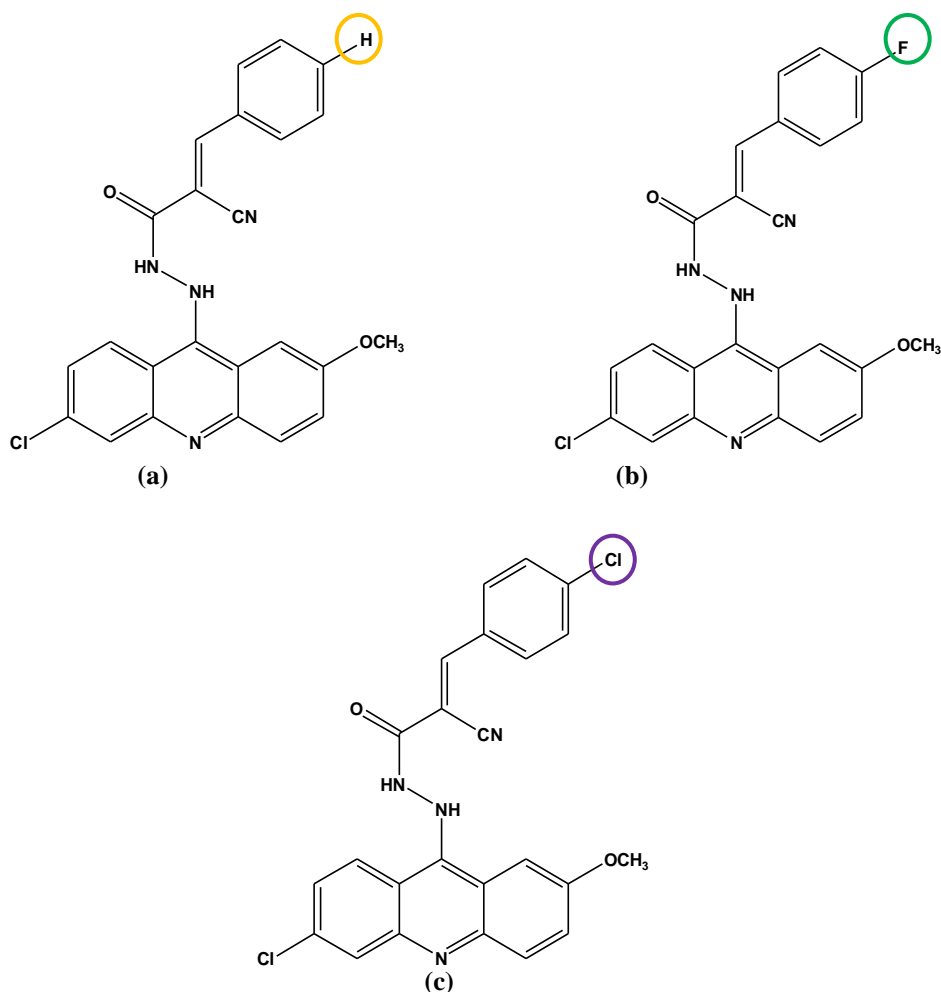


Figura 23: Diferenças estruturais entre (a) ACS-AZ 01; (b) ACS-AZ 04; (c) ACS-AZ 05

As interferências dos efeitos de indução e mesomeria são mais visualizadas quando se compara o ACS-AZ 04 e o ACS-AZ 05. O primeiro que apresentou IC_{50} igual $3.2 \pm 0.2 \mu M$, possui o F como retirador de elétrons sem efeito mesomérico, em contrapartida o ACS-AZ 05, com valor mais satisfatório de IC_{50} para o W2 que o ACS-AZ 04, possui o Cl que apresenta efeito indutivo negativo (I-) e mesomérico positivo (M+), indicando que o aumento da densidade eletrônica proveniente da mesomeria modula positivamente a atividade biológica, uma vez que estes podem alterar fatores lipofílicos e eletrônicos dos derivados de acridina.

Seguindo esse raciocínio, a obtenção dos compostos discutidos anteriormente, assim como o ACS-AZ 06 (figura 23a) com o 4-metil (doador por I+), ACS-AZ 12 (figura 23c) que possui um grupamento alquil-cíclico (com efeito I+) e o ACS-AZ 10 (figura 23b) com a dimetilamina (grupamento doador forte por efeito M+) que terão suas atividades biológicas testadas posteriormente; foram sintetizados seguindo o raciocínio da modificação do composto

hit pelo esquema de Topliss, o qual o troca de diferentes grupos substituintes fixos podem modular o efeito eletrônico dos derivados acridínico favorecendo ou não a atividade biológica.

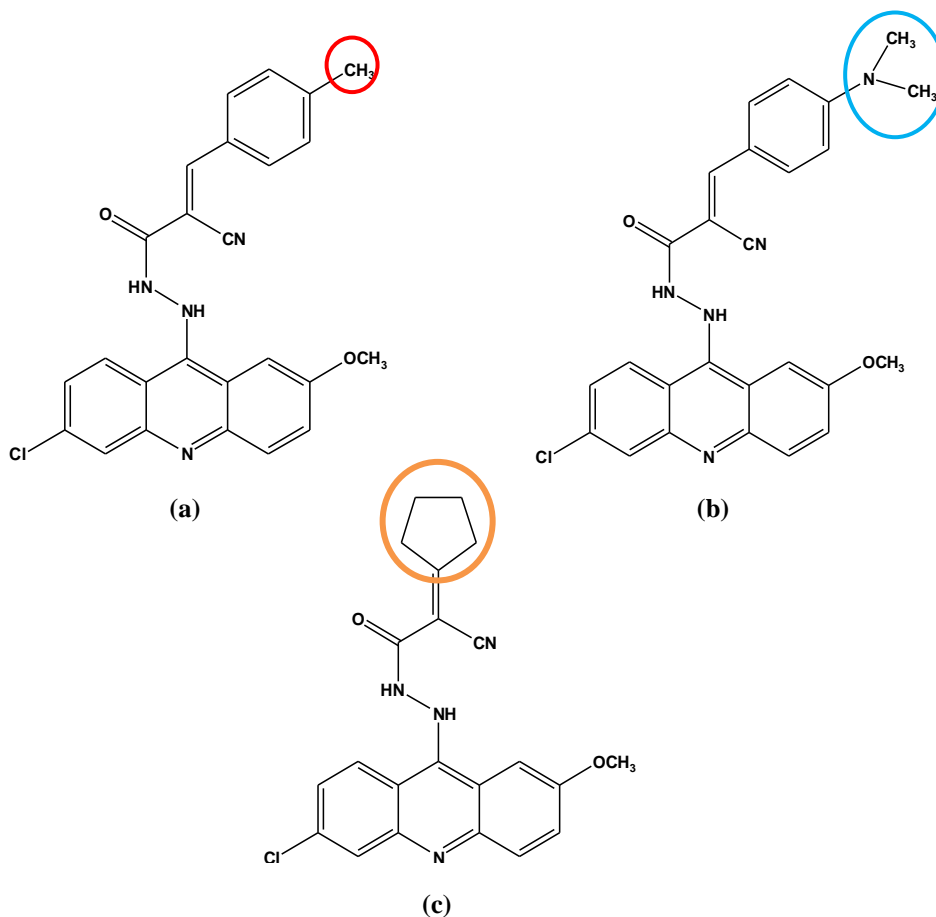


Figura 24: Diferenças estruturais entre (a) ACS-AZ 06; (b) ACS-AZ 10; (c) ACS-AZ 12

Com o intuito de avaliar a atividade antimalárica frente às drogas já comercialmente disponíveis, foram testadas como padrão, a (a) amsacrina e a (b) primaquina (figura 24). Ambas as moléculas amsacrina e ACS-AZ (figura 24c) apresentam um núcleo acridínico, todavia o ACS-AZ apresentou-se 3,6 vezes menos eficaz no IC_{50} que a amsacrina. O contrário se observar para HepG2 e SI, no qual o ACS-AZ se saiu melhor que a amsacrina indicando que a substituição do anel metóxi-fenil-sulfonamida da amsacrina pela da 2-cianocetohidrazina em conjunto com a adição do cloro e metóxi (Cl e OCH_3) no anel acridínico parece favorece ao perfil toxicológico proporcionando a diminuição da citotoxicidade e incrementando a seletividade.

Em comparação com a primaquina o ACS-AZ apresentou IC_{50} 1,64 vezes maior e valor de IS menor que essa droga comercial. É bom ressaltar, que mesmo a primaquina sendo

um produto com formulação farmacêutica e comercialmente disponível a segurança do seu uso junto a sua eficácia a cepas resistentes vem sendo questionada (KAUR et al, 2015).

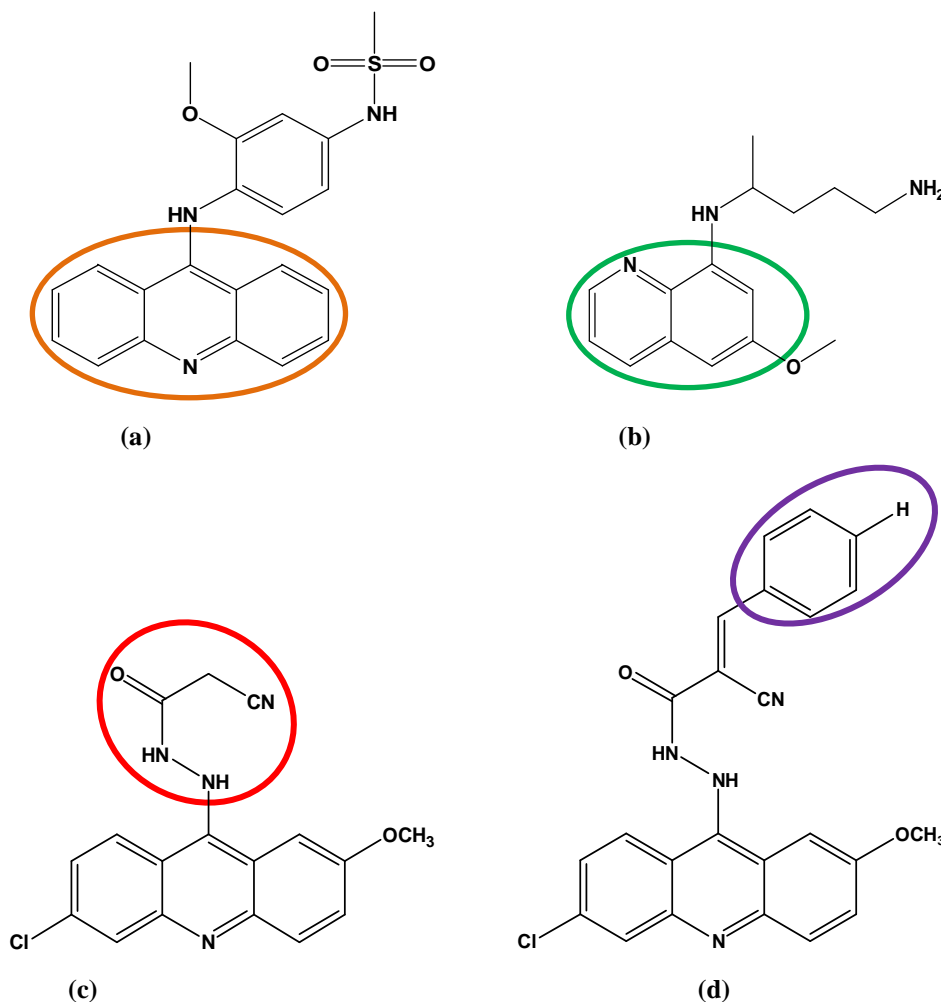


Figura 25: Diferenças estruturais entre a amsacrina (a); primaquina (b) e ACS-AZ (c) e ACS-AZ 01 (d)

Para a molécula de melhor atividade, ACS-AZ 01 (figura 24d), constatou-se IC_{50} 1,88 vezes menor que o da primaquina e diferença pouco significativa em comparação com a amsacrina. Os valores para as células hospedeiras HepG2 e IS, também se mostraram favoráveis para o ACS-AZ 01 em comparação com as duas drogas padrão. Baixa toxicidade e índices de seletividade elevados foram igualmente observados nos ACS-AZ 04 e ACS-AZ 05 quando se relacionam esses dois derivados com a primaquina e amsacrina (tabela 6).

Estruturalmente enfatiza-se que a condensação do ACS-AZ com os aldeídos aromáticos substituídos ou não, modulam positivamente a atividade biológica as tornando mais eficazes e/ou menos tóxicas para a atividade quimioterápica proposta.

Já sabendo da atividade biológica das novas moléculas e com o intuito de avaliar a

morte celular, foi realizado o teste de hemólise no qual tanto para o ensaio um (gráfico 1) como para o dois (gráfico 2) as moléculas não causaram lise das hemácias, tendo seus valores percentuais menores que 20% indicando outro mecanismo para a atividade biológica.

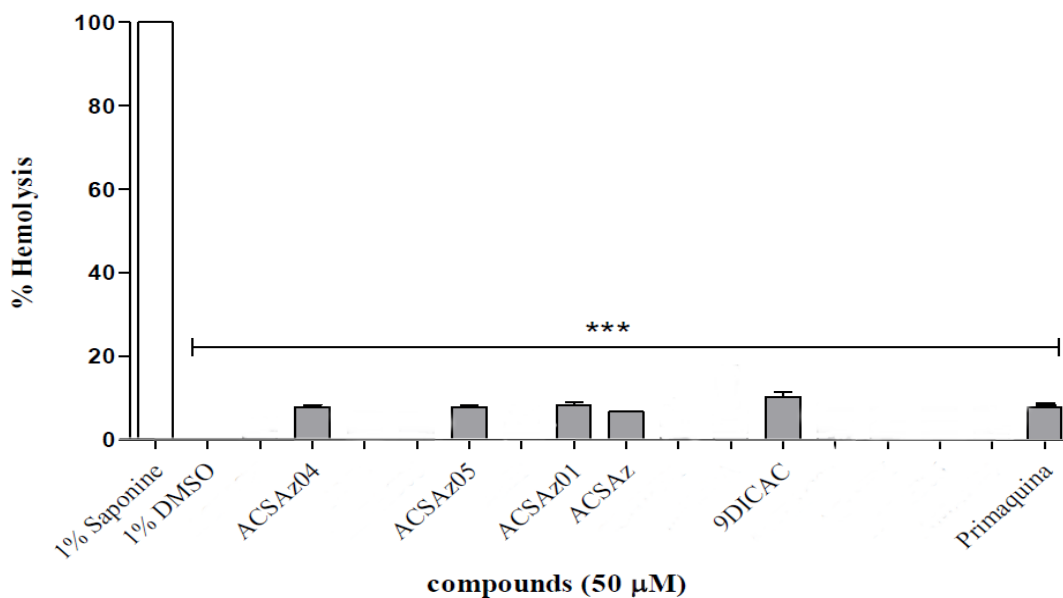


Gráfico 1: Ensaio hemolítico para acridíνας (1ª experiência). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O+), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p < 0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's).

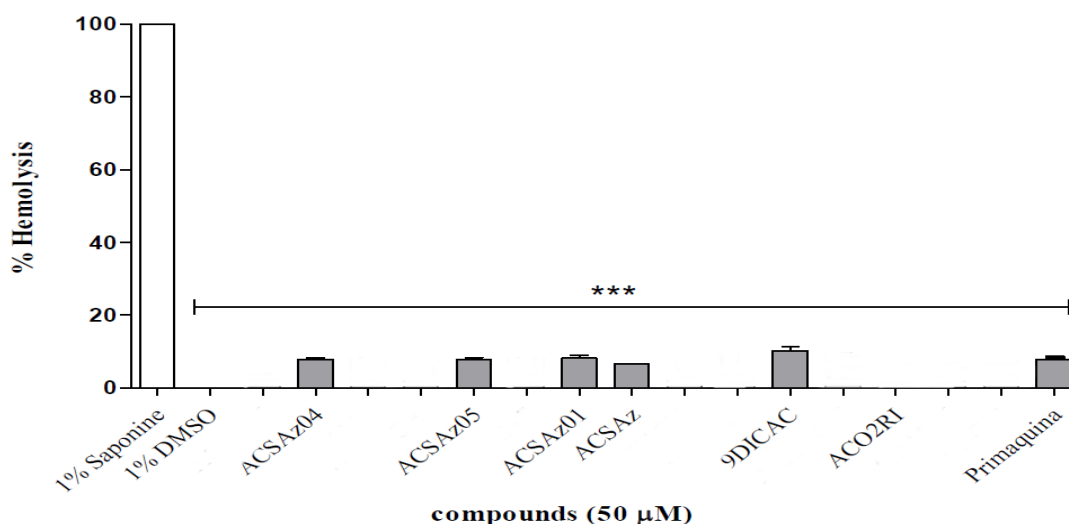


Gráfico 2: Ensaio hemolítico para acridíνας (2ª experiência). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O+), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p < 0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's).

Com esses resultados, infere-se que os efeitos citotóxicos dessas moléculas não são provenientes da danificação da membrana, mas podem atuar por meio de outros mecanismos.

Sendo assim, eventuais modificações no anel acridínico pode modular atividade biológica, obtendo-se possivelmente, como o apresentado no trabalho, moléculas que funcionem como potenciais antimaláricos de alta eficácia.

6. CONCLUSÃO

Foram obtidos sete novos derivados acilidrazônicos-acridínicos, nos quais todos tiveram suas características físico-químicas determinadas, demonstrando rendimentos, de 39 % a 89,74% indicando rota sintética satisfatória.

Das moléculas sintetizadas apenas ACS-AZ e ACS-AZ 04 tiveram suas estruturas elucidadas por espectroscopia de RMN¹H, ¹³C, infravermelho (IV) e espectrometria de massa. Todas apresentaram padrões de deslocamento e absorvância de acordo com a literatura confirmando a existências dessas moléculas.

A avaliação biológica voltada para atividade antimalárica consistiu no teste IC₅₀ para cepas W2 de *P. falciparum*, avaliação de citotoxicidade para HepG2, índice de seletividade (IS) e teste de hemólise.

Somente as moléculas ACS-AZ, ACS-AZ 01, ACS-AZ 04 e ACS-AZ 05 foram submetidas à avaliação biológica, no qual todas obtiveram resultados que pressupõe candidatas promissoras. Dentre essas se destaca o ACS-AZ 01 por apresentar IC₅₀ de 0.9±0.8µM, além de baixa toxicidade e altos índices de seletividade.

Para as moléculas ACS-AZ, ACS-AZ 04 e ACS-AZ 05 os resultados de IC₅₀ foram iguais a 2.8±0.8, 3.2±0,2µM e 2,4±1.1µM, respectivamente, dentre as quais se deve enfatizar a ACS-AZ 04 e ACS-AZ05, uma vez que ambas apresentaram IC₅₀ de HepG2>200, indicando baixa toxicidade, e valores de IS acima de 60, os que as tornam promissoras.

Ainda sobre atividade biológica, a condensação dos aldeídos aromáticos com o *scaffold* de acridina pode, possivelmente, modular a atividade biológica desse cromóforo por indução ou mesomeria ocasionada pelos diferentes substituintes na posição *para* do benzaldeído.

Quanto ao teste de hemólise, as moléculas testadas não causaram lise celular, tendo seus valores percentuais menores que 20% indicando que a atividade biológica não é causada por danificações nas membranas, podendo ser explicada por outros mecanismos.

Em vista disso, observa-se que as moléculas propostas apresentam-se como promissoras fármacos antimaláricos, uma vez que essas apresentaram resultados biológicos satisfatórios e que devem ser aprofundados a fim de se obter novos quimioterápicos mais ativos e seguros.

REFERENCIAS

ABDON, N. P. et al. Avaliação da resposta aos esquemas de tratamento reduzidos para malária vivax. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2001.

ALY, E I; ABADI, A. H. Synthesis and Antitubercular Activity of 6-Chloro (Unsubstituted)-2-Methoxy-9-Substituted Acridine Derivatives. **Arch Pharm Res**, v. 27, n. 7, p.713-719, 2004.

AVIÑA-ZUBIETA J. A; ESDAILE, J. M. **Dubois' Lupos Erythematosus and Related Syndromes**. 8. ed. Elsevier, p. 601-607, 2013.

BARREIRO, E. J. A. Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARROS, F. W.A. et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n.1, p.37-46, 2013.

BIAGINI, G. A; O'NEILL, P. L M; NZILA, A; WARD, S. A; BRAY, P. G. Antimalarial chemotherapy: young guns or back to the future?. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 479-487, 2003.

BOZDECH Z, FERREIRA P. E; MOK. S. A crucial piece in the puzzle of the artemisinin resistance mechanism in Plasmodium falciparum. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 8, p.345-346, 2015.

CALDERÓN F; WILSON, D. M; FRANCISCO-JAVIER, G. Antimalarial Drug Discovery: Recent Progress and Future Directions. In:WITTY, D. R. **Progress in Medicinal Chemistry**, v.52, 2013, p, 97-151.

CALIXTO, J. B; SIQUEIRA .Jr, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gaz. méd. Bahia**, v. 78, n.1, p.98-106, 2008.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.

CAO, C. et al. Microwave-assisted improved synthesis of pyrrolo [2, 3, 4-kl] acridine and dihydropyrrolo [2, 3, 4-kl] acridine derivatives catalyzed by silica sulfuric acid. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1613-1625, 2013.

CHOLEWIŃSKI, G; DZIERZBICKA, K; KOŁODZIEJCZYK, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 2, p. 305-336, 2011.

CLAYDEN, J; GEEVES, N; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 1. ed. Oxford, 2001.

COHEN, et al. Progress Report on Neglected Tropical Disease Drug Donation Programs. **Clinical Therapeutics**, v.1, n.1, p.1-12, 2016.

CORSARO, A. et al. 1,3-Dipolar cycloadditions of acridine with nitrile oxide. **Arkivoc**, v. 8, p. 5-15, 2002.

FERNANDO, S. D; RODRIGO, C; RAJAPAKSE, S. Chemoprophylaxis in malaria: drugs, evidence of efficacy and costs. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4. n.4, p. 330-336, 2011.

FRANÇA, T. C. C; SANTOS, M. G; FIGUEROA-VILLAR, J. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FU, J. et al. Distinctive morphological characteristics contribute to the identification of *Artemisia annua* L. germplasms with high yield and high artemisinin content. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.3, n.2, p.43-47, 2016.

GARAVITO, G.; BERTANI, S; Deharo, e Hallazgos Complementarios sobre la Actividad Antimalárica del Azul de Metileno y su Yotoxicidad. *Vitae*. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 15, n. 1, p. 91-95, 2008.

GIORGIO, C. D. et al. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.42, n.10, p. 1277-1284, 2007.

GOMES, P. R. et al. Synthesis and evaluation of antimalarial activity of curcumin derivatives. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 492-496, 2014.

GUENDEL, I. 9-aminoacridine Inhibition of HIV-1 Tat Dependent Transcription. **Virology Journal**, v. 6, n.114, p.1-14, 2009.

GUETZOYAN, L. et al. Antimalarial acridine: synthesis, in vitro, activity against *P. falciparum* and interaction with hemozoin. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v.17, n. 23, p. 8032, 2009.

GUETZOYAN, L. et al. In vitro efficiency of new acridine derivatives against *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medical Chemistry**. V. 15, n.9, p.3277, 2007.

HÁ, V. T. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel hydroxamic acids bearing artemisinin skeleton. **Bioorganic Chemistry**, v.6, p. 63-71, 2016.

HOFFMAN, S. L; CAMPBELL, C. C; WHITE, N. J. Malária. In: BOULEVARD, J. F. K. **Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice**. 2. ed. Filadélfia: Elsevier Churchill Livingstone, 2006, p. 1024–1062.

HULL, R; DLAMINI, Z. The role played by alternative splicing in antigenic variability in human endo-parasites. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 1, 2014. p.6., il. color.

JANGIR, D. K. et al. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 114, p.38-43, 2012.

JONES, M. et al. Antitumour and antimalarial activity of artemisinin–acridine hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, v.7, p. 2033-2037, 2009.

JORGE, S. D. et al. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, n.16, p. 5031-5038, 2011.

KAUR, H. et al. Primaquine–pyrimidine hybrids: Synthesis and dual-stage antiplasmodial activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 101, p. 266-273, 2015.

KAUR, K. et al. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3245–3264, 2010.

KOROTCHENKO, V. et al. Antimalarial Activity of 4-Amidinoquinoline and 10-Amidinobenzonaphthyridine **Derivatives**. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.58, n.8, p. 3411–3431, 2015.

KRUNGKRAI, J; KRUNGKRAI, S. R. Antimalarial qinghaosu/artemisinin: The therapy worthy of a Nobel Prize. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.6, n.5, p. 371-375, 2016.

KUMAR, A. et al. Synthesis of 9-anilinoacridine triazines as new class of hybrid antimalarial agents. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 19, n.24, p. 69-66, 2009.

KUMAR R.; KAUR M.; KUMARI M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Pol. Pharm**, v. 69, n.1, p.3-9, 2012.

KUMAR, R. et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, n.1, 2003.

LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15035-15050, 2013.

LEBRUN-VIGNES, B. Les antimalariques: pharmacologie, pharmacocinétique et toxicité chez l'adulte. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 29, p. 229-248, 1999.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456, 2007.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIU, J. et al Privileged structure-based quinazolinone natural product-templated libraries: Identification of novel tubulin polymerization inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 3, p. 686-690, 2006.

MEZA, D. L. M. Malaria y la resistencia a antimalaricos. **Duazary**, v. 1, n. 2, 2004.

MICCO, S. D. et al. 2,3-Dihydrobenzofuran privileged structures as new bioinspired lead compounds for the design of mPGES-1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 820–826, 2016.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Brasil registra menor número de casos de malária nos últimos 35 anos**. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o->

ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/23370-brasil-registra-menor-numero-de-casos-de-malaria-nos-ultimos-35-anos. Acesso em: 04 de maio de 2016

MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento de farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p.56, 1995.

MUSTAFA, M. S.; AGRAWAL, V. K. Atovaquone/proguanil: A new drug combination to combat malaria. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 64, n. 2, p. 167-168, 2008.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NORONHA, E. et al. Resistencia a Mefloquina do tipo III em crianças com malária falciparum em Manaus, AM, Brazil. **Revista da sociedade brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, n. 2, p.201-205, 2000.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Review Malaria in Brazil: an overview. **Malaria J**, v. 9, p. 115, 2010.

ORJUELA, P; GONZALES, I; OSORIO, L. Terapia combinada com estratégia em la preven-
cion de la resistênci a los antimaláricos. **Biomedica**, v. 24, n.4, p. 423-437, 2004.

PAVIA, D. L. et al. **Fundamentos de espectroscopia**. 1.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

QUANSAH, E; SARPONG, E; KARIKARI, T. K. Disregard of neurological impairments associated with neglected tropical diseases in Africa. **ENeurologicalSci**, v.3, p.11-14, 2016.

ROWE, T. C. et al. DNA Damage by Antitumor Acridines Mediated by Mammalian DNA Topoisomerase III. **Cancer research**, V.46, p. 2021-2026, 1986.

SÁNCHEZ, I. et al. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: The effect of N-and O-substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Quim. Nova**, v. 30, n. 6, p.1446-1455, 2007.

SANTOS, F. et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle de doenças negligenciadas. **Rev. Ciências Farm Basic Apli**, v.33, n.1, p. 40-41, 2012.

SEVERINI, C; MENEGON M. Resistance to antimalarial drugs: An endless world war against *Plasmodium* that we risk losing. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p.58–63, 2015.

SHARMA, M. Design and Synthesis of a New Class of 4-Aminoquinolinyl- and 9-Anilinoacridinyl Schiff Base Hydrazones as Potent Antimalarial Agents. **Chem Biol Drug Des**, v. 84, p. 175–181, 2014.

SHARMA, S; ANAND, N. Antifolats. **Pharmacochemistry Library**, v. 25, p.439, 1997.

SONDHI, S. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, n.2, p.555-563, 2010.

SILVA, T. F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 921-933, 2013.

SILVERSTEINS, R. M; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SMITH, S. G; SANCHEZ, R.; ZHOU M. Privileged Diazepine Compounds and Their Emergence as Bromodomain Inhibitors. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 5, p. 573–583, 2014.

SOARES, R. R et al. New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n.11, p. 2308–2313, 2015.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE; CRAIG, B. **Química Orgânica**, vol. 1 e 2. 7 ed. LTC, 2001.

SUSWAM, E; KYLE, D; LANG-UNNASCH, N. *Plasmodium falciparum*: the effects of atovaquone resistance on respiration. **Experimental parasitology**, v. 98, n. 4, p. 180-187, 2001.

THI, H. T. N. et al. Antiprion activity of functionalized 9-aminoacridines related to quina- crine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n. 14, p.6737–6746, 2008.

TOPLISS, J.G. A. Manual method for applying the Hansch approach to drug design. **J Med Chem**, v.20, n4, p.463-469, 1977.

VALDÉS, A. C. Acridine and acridinones: old and new structures with antimalarial activity. **The open medicinal chemistry journal**, v. 5, n. 1, p.11-20, 2011.

VIDOTTI, C. C. F; CASTRO, L. L. C. Fármacos Novos e Necessidades do Sistema Único de Saúde no Brasil. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 10, n. 2, p. 7-11, 2009.

WAINWRIGHT, M. Acridine- a neglected antibacterial chromophore. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 2001.

WELBURN, S. C. The neglected zoonoses-the case for integrated control and advocacy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 5, p. 433-443, 2015.

WERNECK, G. L; HASSELMANN, M. H; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39-62, 2011.

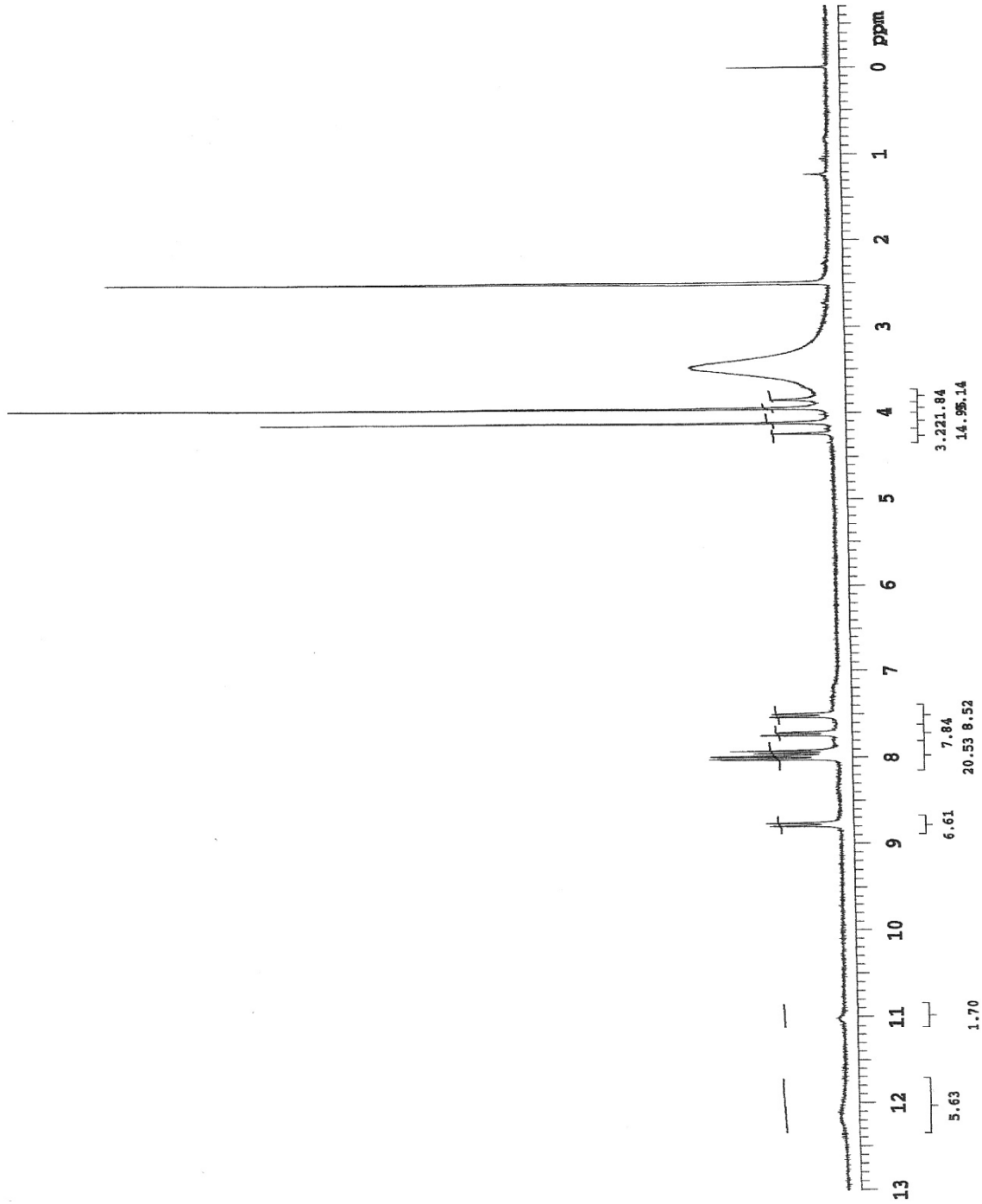
WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**.3.ed. Filadelfia: Elsevier, 2008.

WHO. World Health Organization. **World Malaria Report 2015: FACT SHEET**. Geneva: WHO, 2015.

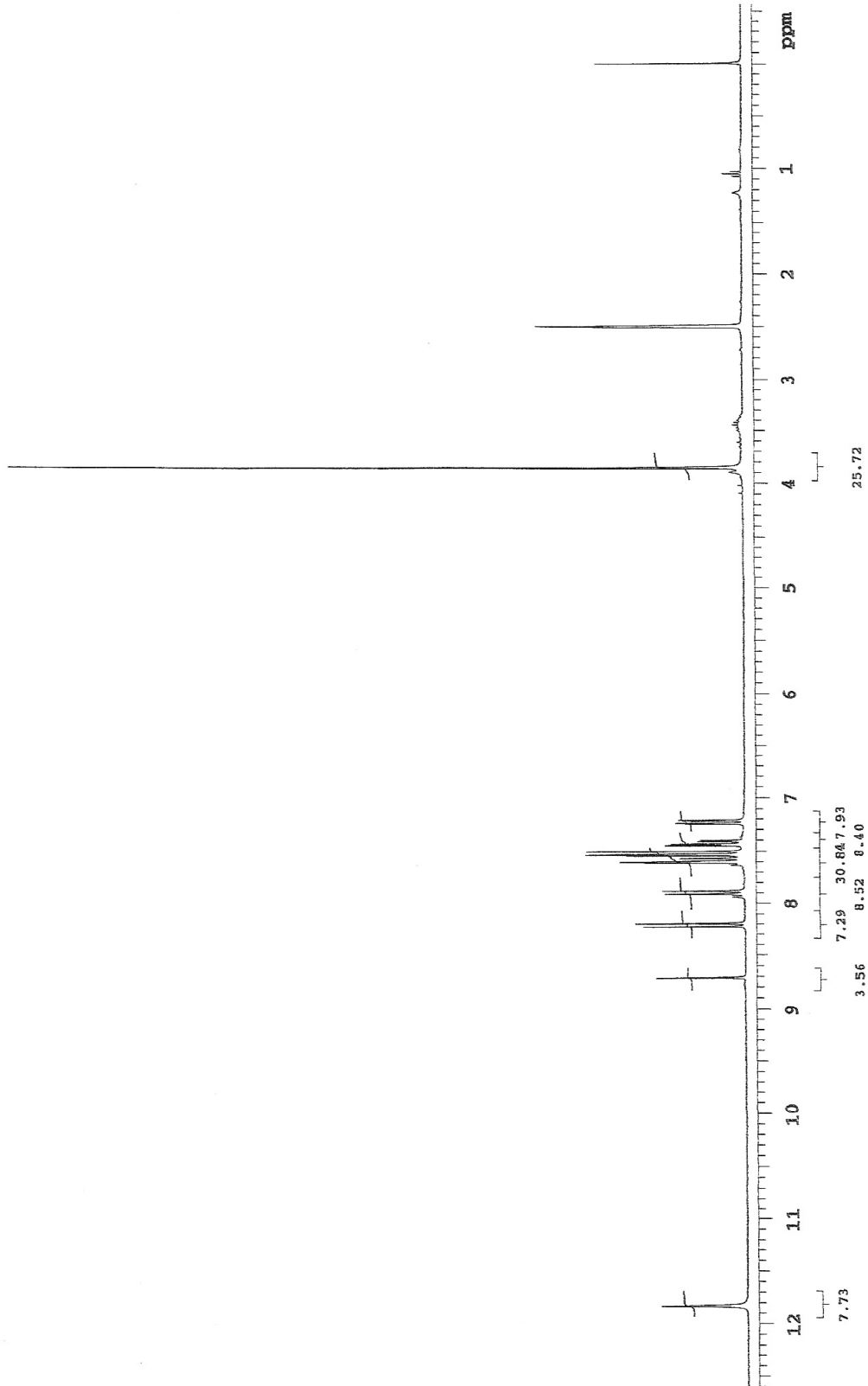
WILLIAMS, L. D. et al. DNA intercalation: Helix unwinding and neighbor-exclusion. **Structure and Function**, v.1, 7th Conversation in Biomolecular Stereodynamics, 1992.

8.ANEXOS

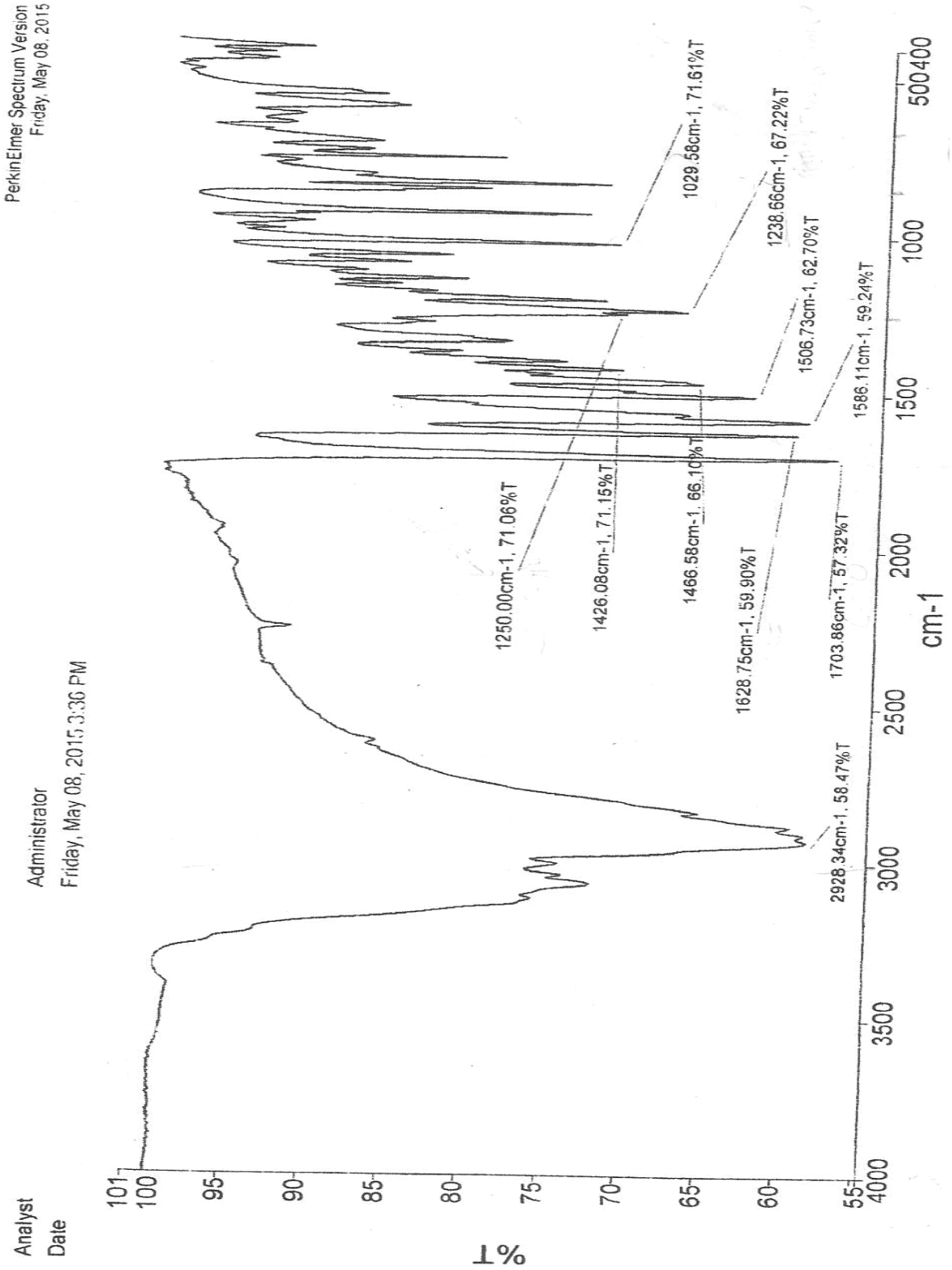
Anexo 1: Espectro de RMN ^1H do 2-Ciano- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida (**ACS-AZ**)



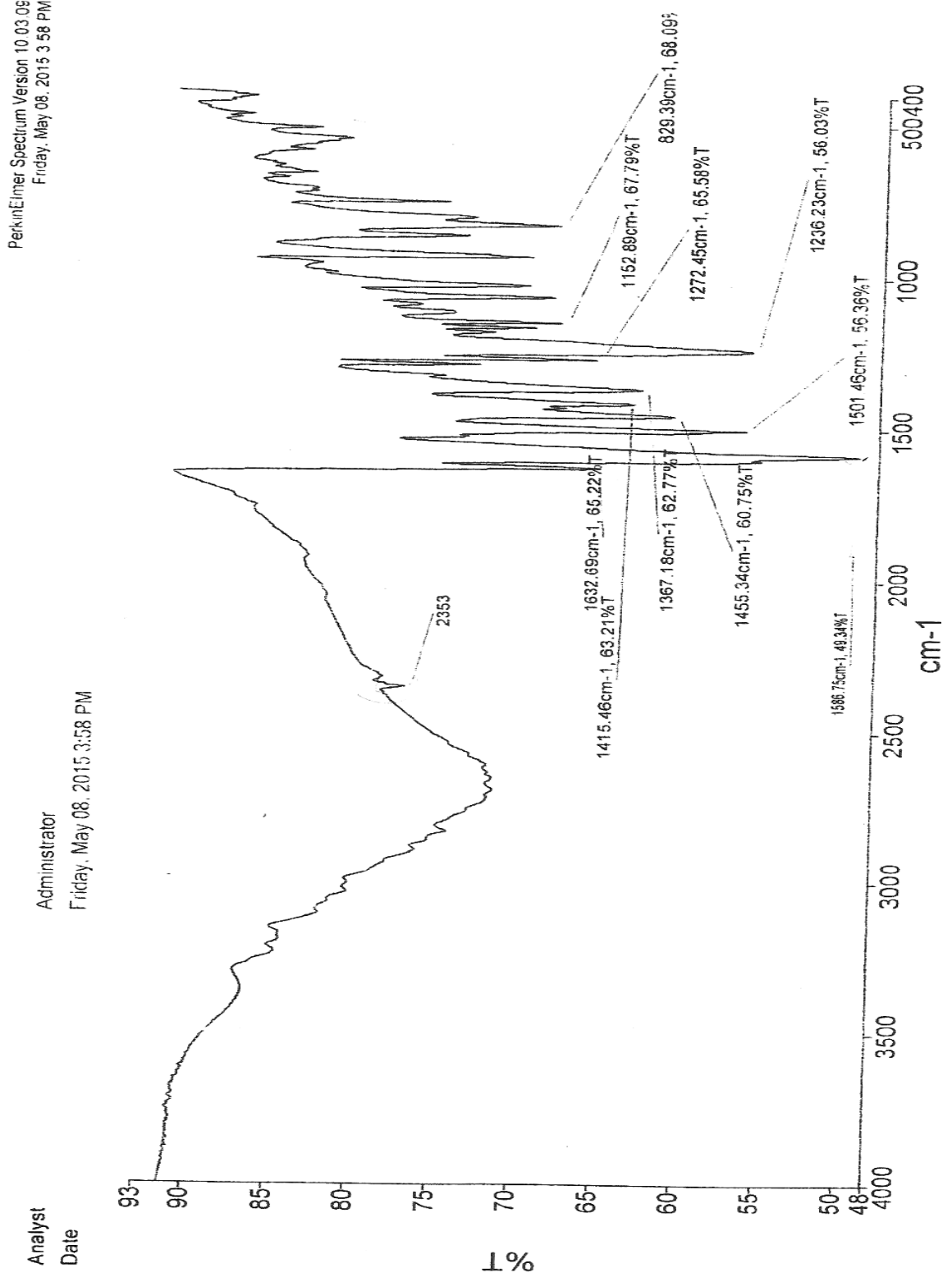
Anexo 2: Espectro de RMN ^1H do 2-Ciano-3-(4-fluor-fenil)-acrílico- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida) (**ACS-AZ 04**)

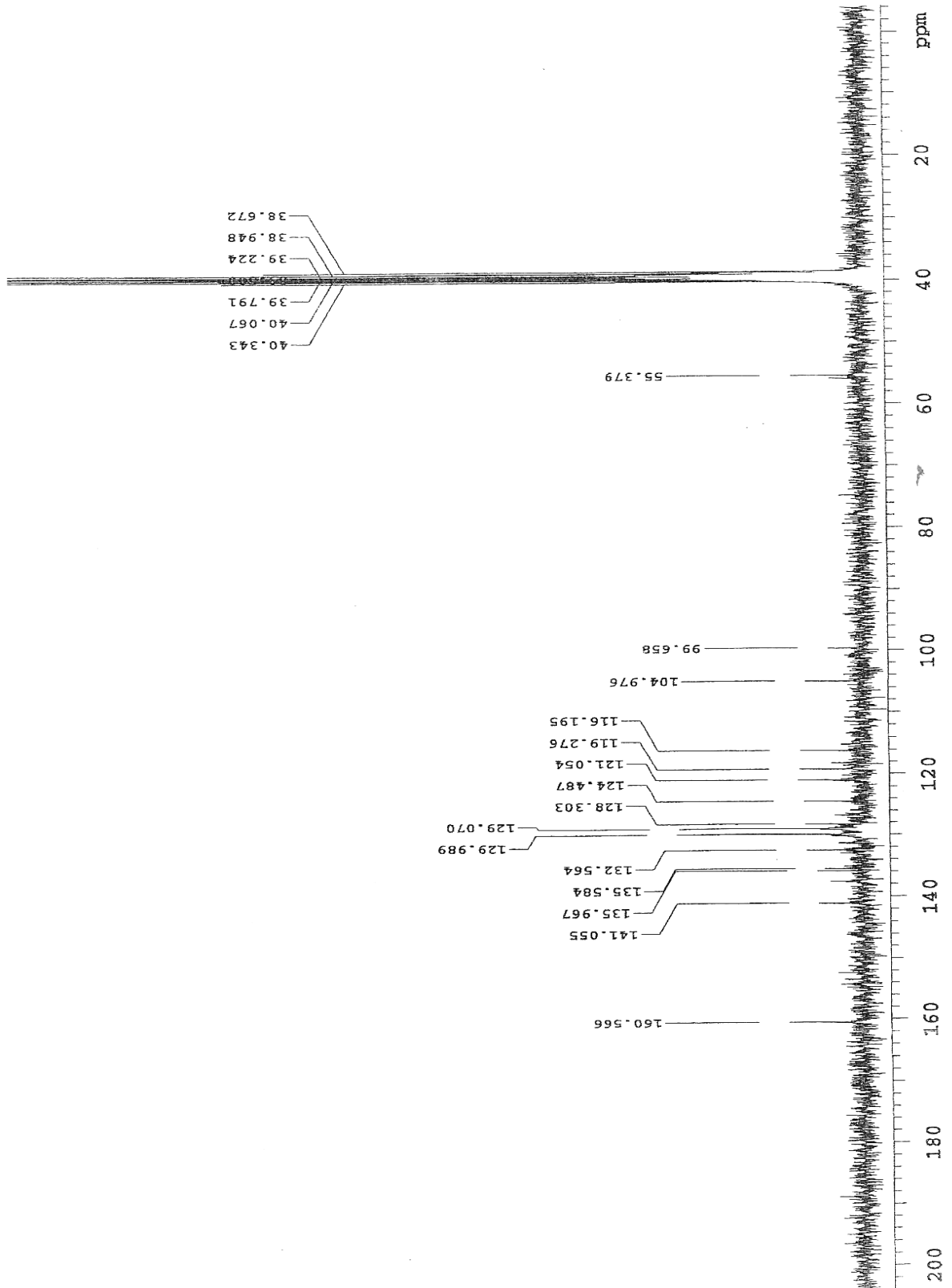


Anexo 3: Espectro de I.V do 2-Ciano- N'-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida (ACS-AZ)

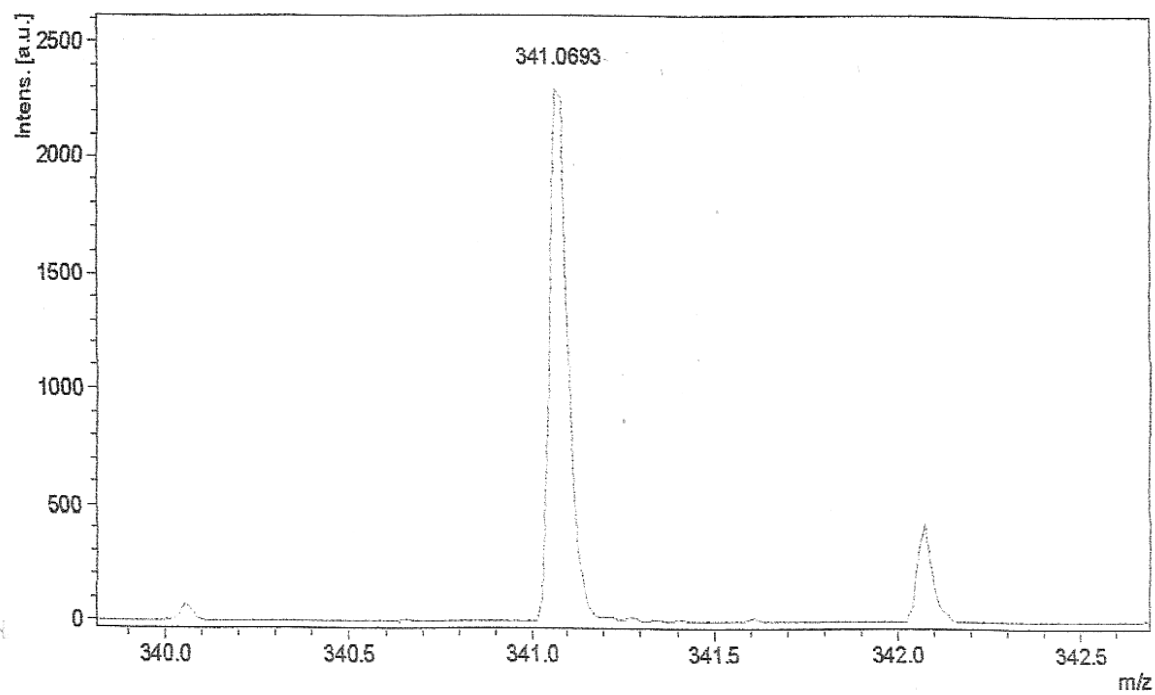
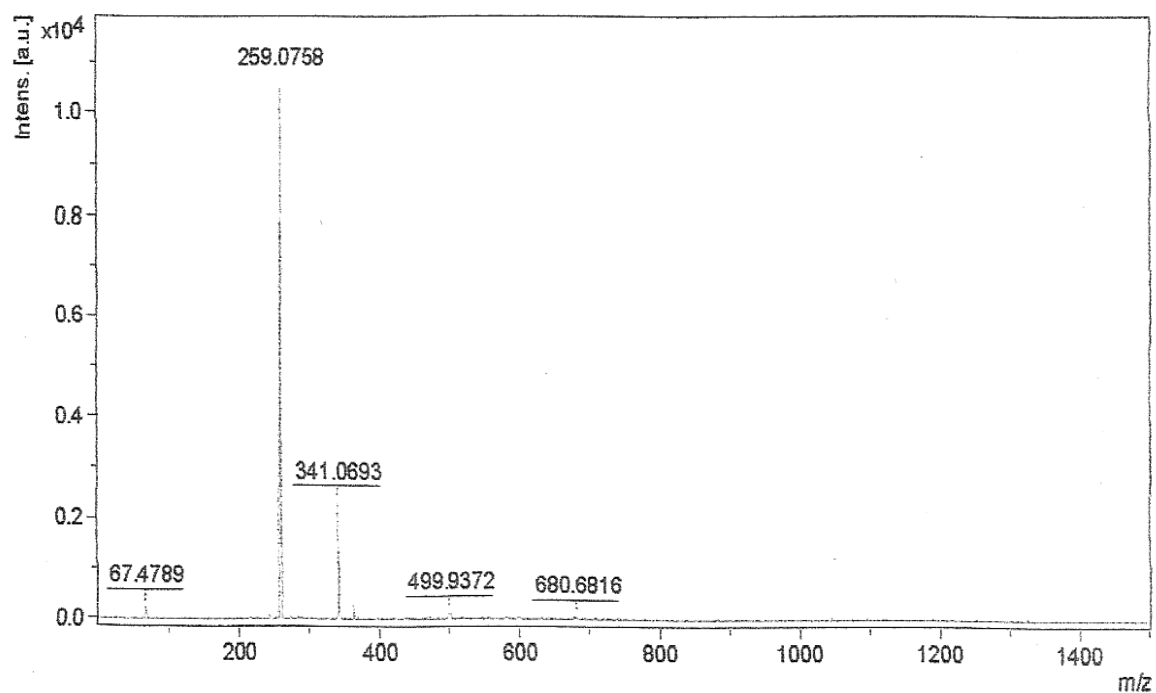


Anexo 4: Espectro de I.V do 2-Ciano-3-(4-fluor-fenil)-acrílico- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida) (ACS-AZ 04)

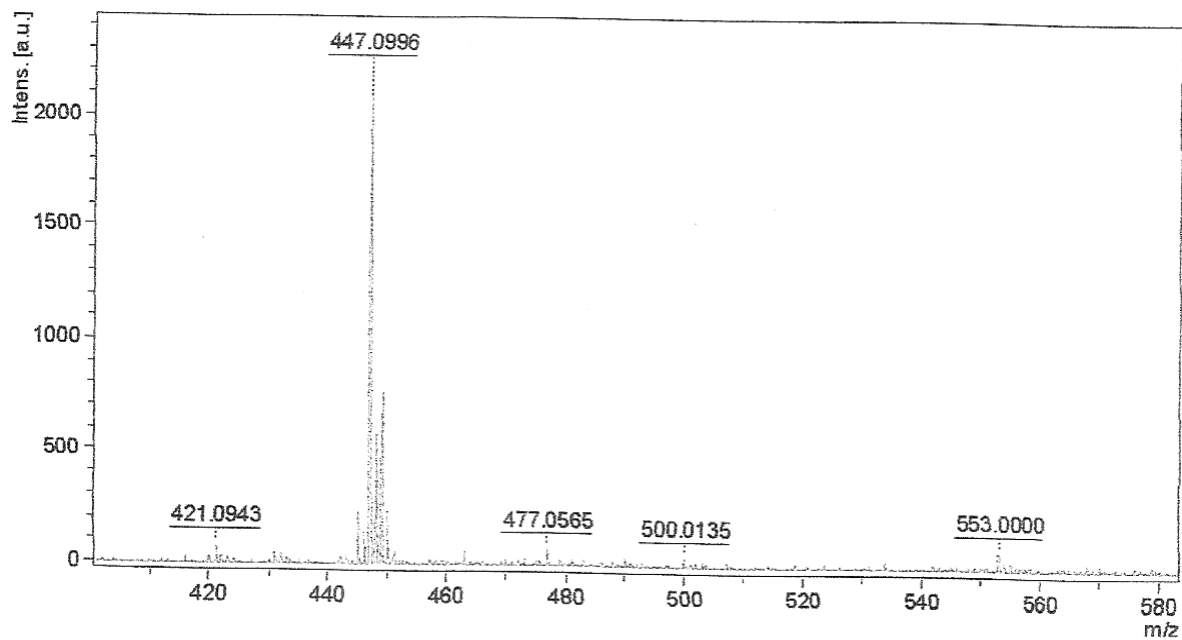
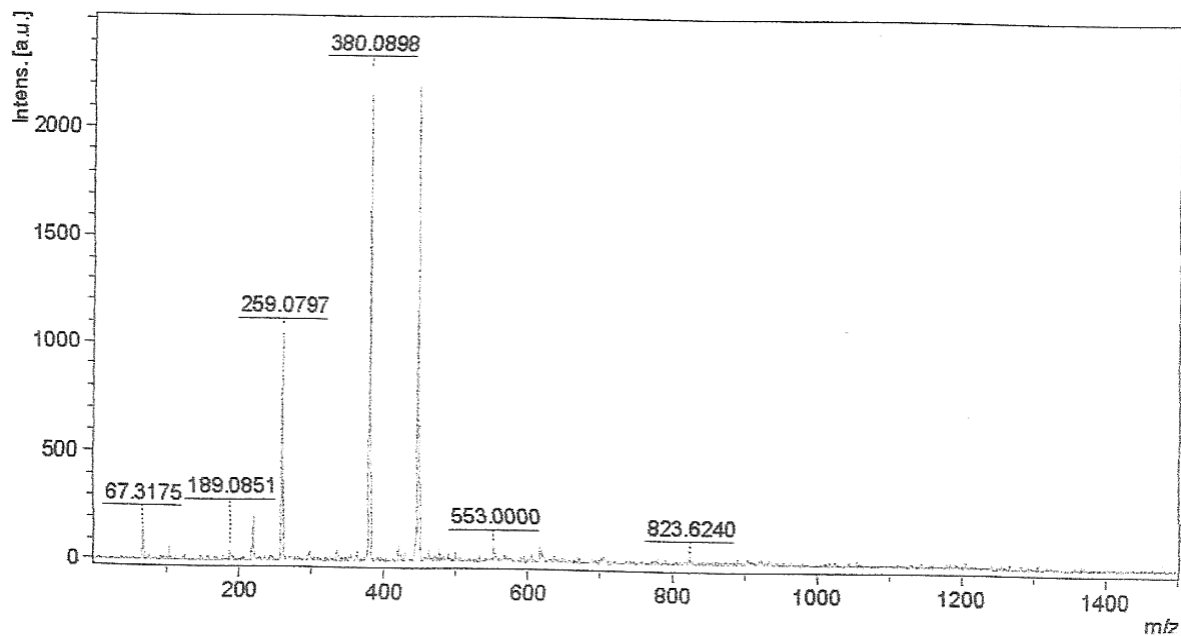


Anexo 4: Espectro de C^{13} do 2-Ciano- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida (ACS-AZ)

Anexo 5: Espectrometria de massa do 2-Ciano- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida (ACS-AZ)



Anexo 6: Espectrometria de massa do 2-Ciano-3-(4-fluor-fenil)-acrílico- *N'*-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-hidrazida) (ACS-AZ 04)



Anexo 7: Figuras das estruturas dos produtos de partida e compostos sintetizados.

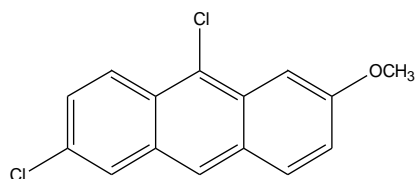


Figura 1: 6,9 dicloro-2-metoxiacridina

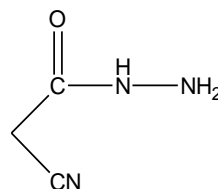


Figura 2: 2-cianocetohidrazina

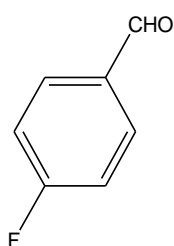


Figura 3: 4-flur-benzaldeído

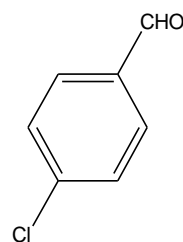


Figura 4:4-clorobenzaldeído

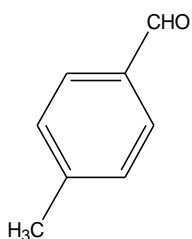


Figura 5: 4-metil benzaldeído

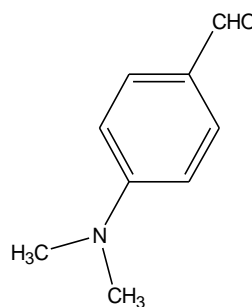


Figura 6: 4-dimeilamina-l benzaldeído

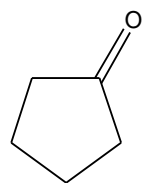


Figura 7: ciclopentanona

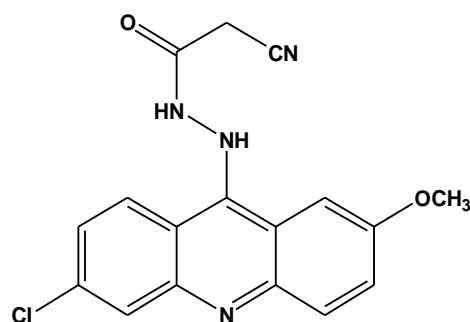


Figura 8: 2-Ciano- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il) hidrazida (ACS-AZ)

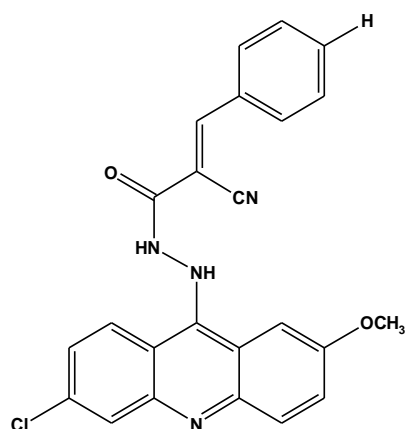


Figura 9: 2-Ciano-3-fenil-acrílico *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida

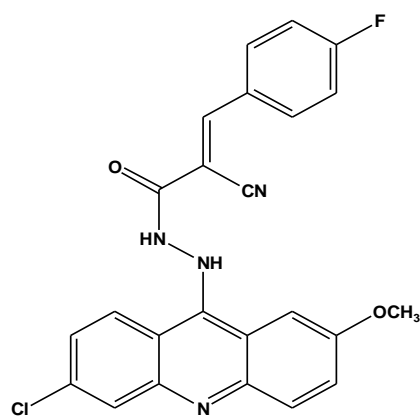


Figura 10: 2-Ciano-3-(4-fluor-fenil)-acrílico-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida

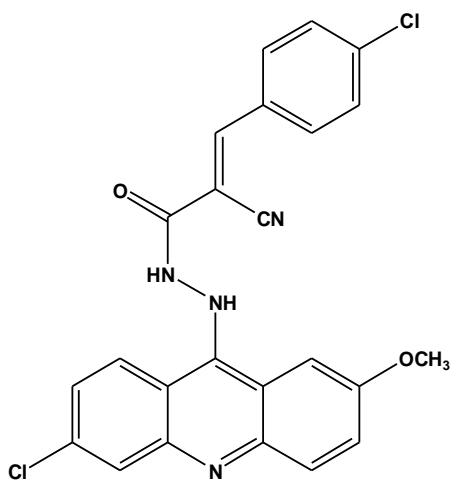


Figura 11: 3-(4-Cloro-fenil)-2-ciano-acrílico- *N'*-(2-cloro-6-metoxi-9,13-cloro-antraceno-10-il)-hidrazina

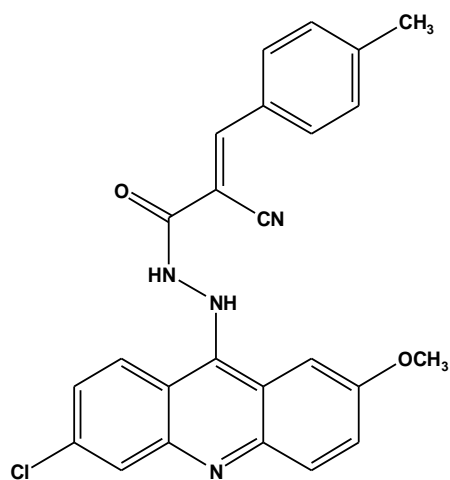


Figura 12: 2-ciano-3-*p*-tolil-acrílico *N'*-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida

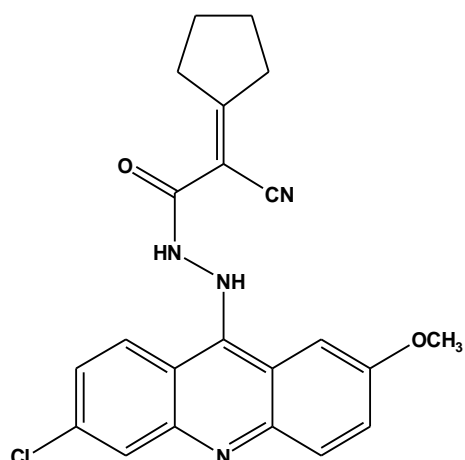


Figura 13: Ciano-ciclopentilideno- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida

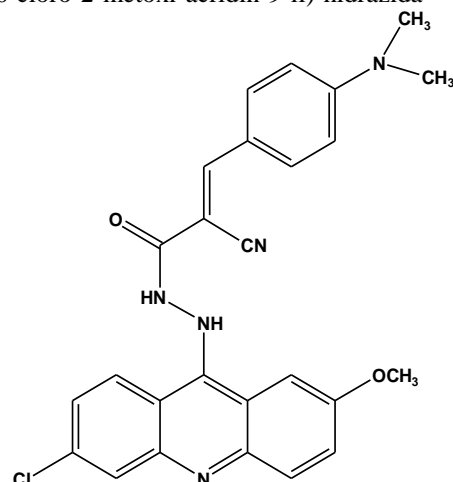


Figura 14: Ciano-ciclohexilideno-acético- *N'*-(6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-hidrazida