



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CÂMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

MIRELLY BARBOSA SANTOS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL PARA CÂNCER DE
CÓLON DE NOVOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS**

**CAMPINA GRANDE
2021**

MIRELLY BARBOSA SANTOS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL PARA CÂNCER DE
CÓLON DE NOVOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia
da Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

Coorientador: Me. Jamire Muriel da Silva

**CAMPINA GRANDE
2021**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237p Santos, Mirelly Barbosa.
Planejamento, síntese e avaliação antitumoral para câncer de cólon de novos derivados espiro-acridínicos [manuscrito] / Mirelly Barbosa Santos. - 2021.
74 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.
"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Câncer de cólon. 2. Derivados espiro-acridínicos. 3. Química medicinal. I. Título
21. ed. CDD 615.19

MIRELLY BARBOSA SANTOS

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL PARA CÂNCER DE
CÓLON DE NOVOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS

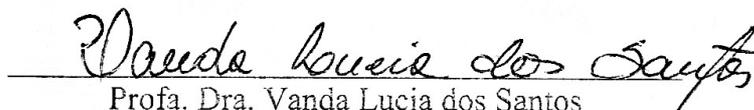
Trabalho de Conclusão de Curso em
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

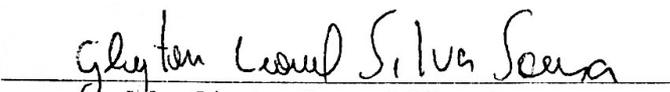
Área de concentração: Química
Medicinal

Aprovada em: 12 / 02 / 2021.

BANCA EXAMINADORA


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


Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Me. Gleyton Leonel Silva Sousa
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

DEDICATÓRIA

À Deus, sem ele nada seria possível. Aos meus pais, Josinalva e Manoel, por todo amor, carinho, incentivo e apoio. À meu irmão Carlos Emanuel, por todo amor e carinho. E a meu esposo Matheus, por todo companheirismo, amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus, porque até aqui me guardou, guiou meu caminhar e me deu forças para perseverar até o fim.

Agradeço a meus pais Josinalva Barbosa e Manoel Germano, por todo amor incondicional, por sempre me incentivar e apoiar, por fazer o possível e um pouco mais para que eu pudesse alcançar meus objetivos e crescer profissionalmente. À meu irmão Carlos Emanuel, por todo amor e carinho.

A meu esposo Matheus Alves, que esteve ao meu lado durante essa caminhada, me incentivando e auxiliando, comemorando as conquistas e tentando me alegrar nos momentos difíceis. Por todo amor e carinho, obrigada.

Aos meus amigos Flávia, Genilza, Raquel, Mônica, Lucas, Gerlane e Jayne, por todo companheirismo, carinho e compreensão. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e feliz.

Sou grata a meu orientador Dr. Ricardo Olímpio, quem considero um amigo, por ter me aceitado como sua orientanda, por todo apoio, incentivo, paciência e por todo conhecimento transmitido.

Ao meu coorientador Jamire Muriel, que muito me ensinou e apoiou, agradeço pelos conhecimentos compartilhados, por toda paciência e alegria mesmo nos momentos que tudo parecia dar errado.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, que me transmitiram seus conhecimentos, me auxiliaram, incentivaram e tornaram os dias mais alegres.

Aos meus familiares e amigos que me incentivaram e apoiaram.

A todos que de forma direta ou indireta estiveram do meu lado e foram fundamentais para minha construção acadêmica.

RESUMO

O câncer de cólon é o terceiro tumor mais incidente entre todos os tipos de cânceres no mundo e seu tratamento quimioterápico está comumente associado a toxicidade e resistência medicamentosa. O desenvolvimento de novos fármacos com atividade anticâncer é crescente, e nesse contexto derivados acridínicos são descritos devido seu potencial como agentes anticâncer. Nessa perspectiva, o presente trabalho objetivou planejar e sintetizar novos derivados espiro-acridínicos a partir dos *scaffolds* previamente identificados e avaliar *in silico* e *in vitro* a atividade antitumoral frente o câncer de colón. Foram obtidos seis compostos espiro-acridínicos substituídos (T-01, T-02 e T-03) com diferentes resíduos ácidos ou não (AMTAC-04, AMTAC-17, AMTAC-19), dos quais, cinco são inéditos. As rotas sintéticas utilizaram o método de condensação, ciclização e *N*-alquilação, obtendo-se rendimentos reacionais satisfatórios, variando de 66 – 97 %. Os compostos foram obtidos na forma de pó amorfo com diferentes tonalidades de amarelo. As estruturas dos compostos AMTAC-04, AMTAC-17 e AMTAC-19 foram elucidadas por meio das técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C , EM e IV. Já para o composto T-01 foi realizada apenas a técnica de IV, que revelou a presença de bandas de absorção características de grupos funcionais propostos na estrutura. A avaliação *in silico* de *docking* molecular demonstrou que todos os compostos são capazes de interagir com o alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG), sendo o AMTAC-04 aquele que apresentou melhor perfil de interação com valores de $\Delta G = -11.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i = 6.95 \text{ nM}$. A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagem celular de câncer colorretal humano (HCT-116) e de células normais L929 (fibroblasto murino) realizado com os compostos da série AMTAC, demonstrou o AMTAC-04 como o mais promissor por apresentar menor citotoxicidade em células normais. O estudo farmacocinético *in silico* (ADME) realizado com o composto AMTAC-04, demonstrou que o mesmo é condizente com critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, com potencial de absorção gastrointestinal e provável de atuar como inibidor ou substrato da Glicoproteína P e de diferentes isoformas da CYP450. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos derivados espiro-acridínicos sintetizados e a importância de estudos posteriores.

Palavras-chave: Câncer de cólon. Derivados espiro-acridínicos. Química Medicinal.

ABSTRACT

Colon cancer is the third most incident tumor among all cancer types worldwide and its chemotherapy treatment is commonly associated with toxicity and drug resistance. The development of new drugs with anticancer activity is increasing and, in this context, acridine derivatives are described due to their potential as anticancer agents. In this perspective, the present work aimed to design and synthesize new spiro-acridine derivatives from previously identified scaffolds and to evaluate their *in silico* and *in vitro* antitumor activity against colon cancer. Six substituted spiro-acridine compounds (T-01, T-02 and T-03) with varying acid or non-acid residues (AMTAC-04, AMTAC-17, AMTAC-19) were obtained, of which, five are unpublished. The synthetic routes comprised condensation, cyclization and *N*-alkylation methods, obtaining satisfactory reaction yields, ranging from 66 - 97%. The compounds were obtained as amorphous powders in different shades of yellow. The structures of AMTAC-04, AMTAC-17 and AMTAC-19 were elucidated using ¹H and ¹³C NMR, EM and IV spectroscopic techniques. For the T-01 compound, the IV technique alone was performed, which revealed the presence of absorption bands characteristic of functional groups proposed in the structure. *In silico* molecular docking evaluation demonstrated that all compounds are capable of interacting with the target thymidylate synthase (PDB ID 6QXG), in which AMTAC-04 demonstrated the best interaction profile with values of $\Delta G = -11.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $K_i = 6.95 \text{ nM}$. The evaluation of cytotoxic activity *in vitro* against the human colorectal cancer cell line (HCT-116) and normal L929 cells (murine fibroblast) performed with the compounds of the AMTAC series, presented AMTAC-04 as the most promising for demonstrating the least cytotoxicity in normal cells. The pharmacokinetic *in silico* study (ADME) carried out with the compound AMTAC-04, demonstrated that it is consistent with druglikeness criteria established by Lipinski, with gastrointestinal absorption potential and inclined to act as an inhibitor or substrate of P-glycoprotein and different isoforms of CYP450. The results obtained demonstrate the potential of the spiro-acridine derivatives synthesized and the importance of further studies.

Keywords: Colon cancer. Spiro-acridine derivatives. Medicinal Chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para cada ano do triênio 2020-2022 por sexo, exceto pele não melanoma*	16
Figura 2 - Estrutura química da acridina	22
Figura 3 - Estrutura das moléculas (A) Mepacrina e (B) Amsacrina (m-AMSA)	23
Figura 4 - Estrutura do composto 9a	24
Figura 5 - Estrutura do composto 8m	24
Figura 6 - Estrutura química da AMTAC-01, AMTAC-02 e AMTAC-06	25
Figura 7 - Estrutura da AMTAC-17	26
Figura 8 - Espectro de IV do AMTAC-04	41
Figura 9 - Espectro de IV do AMTAC-17	42
Figura 10 - Espectro de IV do AMTAC-19	43
Figura 11 - Espectro IV do T-01	44
Figura 12 - Espectro do ACMD-01	45
Figura 13 - Espectro de RMN ¹ H AMTAC-17	46
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹³ C do AMTAC-17	48
Figura 15 - Redocking do 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato	49
Figura 16 - Docking do composto AMTAC-04 (A) e do composto T-03 (B) no alvo Timidilato sintase	50
Figura 17 - Docking do ligante co-cristalizado (A) e do composto AMTAC-04 (B) no alvo Timidilato sintase	51
Figura 18 - Modelo Boiled-Egg	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características Físico-químicas dos compostos espiro-acridínicos (AMTAC's)....	38
Tabela 2- Características Físico-Químicas dos compostos espiro-acridínicos ácidos sintetizados	39
Tabela 3 - Dados das massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados da série AMTAC.....	41
Tabela 4 - Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO-d ₆ , 300 MHz) da série AMTAC.....	47
Tabela 5 - Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO-d ₆ , 500 MHz) da série AMTAC.....	47
Tabela 6 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO-d ₆ , 300 MHz) da série AMTAC	48
Tabela 7 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO-d ₆ , 500 MHz) da série AMTAC	48
Tabela 8 - Resultados do docking molecular entre os compostos sintetizados, o composto controle e a Timidilato sintase (PDB ID 6QXG)	50
Tabela 9 - Efeito dos compostos da série AMTAC na viabilidade das células HCT-116 e L929, após 72 horas de tratamento	52
Tabela 10 - Relação entre a molécula estudada e a glicoproteína P.....	55
Tabela 11 - Determinação da solubilidade aquosa do composto AMTAC-04.....	56
Tabela 12 - Interação do composto AMTAC-04 com as diferentes isoformas das enzimas citocromo P450.....	57

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Estratégias de modificação molecular realizadas para o planejamento e desenvolvimento da série AMTAC	27
Esquema 2 - AMTAC's com resíduo ácido.....	28
Esquema 3 - Novos compostos sintetizados com resíduo ácido	28
Esquema 4 - Rota sintética para obtenção dos compostos da série AMTAC.....	29
Esquema 5 - Rota sintética para obtenção dos compostos T-01, T-02 e T-03	30
Esquema 6 - Estrutura química dos compostos AMTAC-01 e AMTAC-02.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ATP	Adenosina trifosfato
BBB	Barreira hematoencefálica
CC	Câncer de Cólon
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCD	Câncer de Cólon do lado direito
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCE	Câncer de Cólon do lado esquerdo
CYP	Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dUMP	2'-desoxiuridina-5'-monofosfato
EM	Espectrometria de Massas
F.	Faixa de fusão
FBDD	Descoberta de droga baseada em fragmento
FdUMP	5-fluoro-dUMP
HCT116	Células de câncer de cólon humano
IV	Espectroscopia de absorção no Infravermelho
KI	Constante de Inibição Estimada
L929	Linhagem de células normais (fibroblasto murino)
LGA	Algoritmo genético Lamarckiano
m-AMSA	Amsacrina
MM2	Mecânica molecular mínima e dinâmica
MTHF	N10-metilenotetrahidrofolato
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PD	Perfil farmacodinâmico
PDB	Protein Data Bank
P-gp	Glicoproteína P
PK	Perfis farmacocinéticos
PM	Peso Molar
Rend.%	Rendimento
Rf	Fator de retenção

RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
SAR	Relação estrutura atividade
SBDD	Desenho de droga baseado na estrutura do receptor
LBDD	Design de drogas baseado no ligante
SBF	Soro bovino fetal
SW480	Células de câncer de cólon humano
TS	Timidilato sintase
ΔG	Energia Livre de Ligação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	Câncer de Cólon	16
3.1.1	<i>Tratamento Quimioterápico para Câncer de Cólon</i>	17
3.2	Química Medicinal	18
3.2.1	<i>Planejamento de fármacos</i>	18
3.2.2	<i>Estratégia de modificação molecular</i>	19
3.2.2.1	<i>Bioisosterismo</i>	19
3.2.3	<i>Estratégias computacionais aplicadas a química medicinal</i>	19
3.2.3.1	<i>Docking molecular</i>	20
3.2.3.2	<i>Predições Farmacocinéticas in silico</i>	21
3.3	Acridina e seus derivados	22
3.4	Derivados acridínicos como potenciais agentes antitumorais	23
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Estratégia de desenvolvimento	27
4.2	Síntese Orgânica	29
4.2.1	<i>Procedimento geral para obtenção da série 1'-(benzilideno-amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTACs)</i>	29
4.2.2	<i>Procedimento para obtenção da série 2-(4'-ciano -5'-oxo-1'-fenil -1',5'-diidro -10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-10-il)</i>	30
4.3	Estudo Químico	31
4.3.1	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	31
4.3.2	<i>Fator de retenção</i>	32
4.3.3	<i>Rendimento da reação</i>	32
4.3.4	<i>Ponto de Fusão</i>	32
4.3.5	<i>Cálculo teórico do Log de P</i>	32
4.3.6	<i>Aparência</i>	32
4.3.7	<i>Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)</i>	33
4.3.8	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	33

4.3.9	<i>Espectrometria de Massas (EM)</i>	33
4.4	Estudo de <i>docking</i> molecular	34
4.4.1	<i>Obtenção e preparação das enzimas</i>	34
4.4.2	<i>Preparação dos ligantes</i>	34
4.4.3	<i>Estudos de <i>docking</i> molecular para validação (redocking)</i>	35
4.4.4	<i>Obtenção das interações 2D entre os alvos e os ligantes</i>	35
4.5	Estudo Biológico	35
4.6	Predições farmacocinéticas <i>in silico</i>	36
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	37
5.1	AMTAC-01 e AMTAC-02 com resíduo ácido	37
5.2	Estudo químico	37
5.2.1	<i>Síntese e caracterização dos novos derivados espiro-acridínicos</i>	37
5.2.2	<i>Identificação e caracterização química dos derivados</i>	40
5.2.2.1	<i>Espectrometria de Massas (EM)</i>	40
5.2.2.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho (IV)</i>	41
5.2.2.3	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	45
5.3	<i>Docking</i> molecular	49
5.4	Estudo Biológico	52
5.5	Predições Farmacocinéticas	53
6	COSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado o principal problema de saúde pública no mundo. Estimativas mundiais no ano 2018 revelaram a ocorrência 18 milhões de novos casos no mundo, com 9,6 milhões de óbitos. Entre os mais variados tipos de câncer, destaca-se o de cólon e reto, como o terceiro mais incidente (1,8 milhão), sendo estimados para o Brasil, em cada ano do triênio 2020-2022, a ocorrência de 41 mil novos casos (INCA, 2019).

O câncer de cólon é resultante de uma cascata de mutações genéticas que promovem a replicação de DNA de forma progressiva e desordenada, causando a mitose acelerada de colonócitos. O acúmulo das múltiplas mutações genéticas resulta na transição da mucosa normal do cólon para a formação de um adenoma benigno, podendo progredir para neoplasia maligna (CAPPELL, 2008).

O tratamento do câncer de cólon pode incluir cirurgia, criocirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia direcionada. O tratamento quimioterápico não apresenta resultados satisfatórios, uma vez que, comumente está associado ao surgimento de efeitos adversos como anemia, neutropenia, toxicidade hepática, entre outros, e posterior surgimento de resistência medicamentosa. Dessa forma, a cirurgia ainda é o tratamento de escolha mesmo com a probabilidade de reincidência do tumor após o processo cirúrgico (BANERJEE *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de novos quimioterápicos anticâncer mais eficazes e seguros, torna-se cada vez mais necessário. Nesse contexto, os derivados acridínicos são amplamente estudados devido sua potencial ação antitumoral. A estrutura planar desses compostos permite que eles se liguem fortemente ao DNA e atuem como intercaladores entre os pares de base do DNA. Eles também são capazes de inibir enzimas importantes como telomerase e proteínas quinases, e as enzimas DNA-topoisomerase I ou II. Porém, problemas como efeitos colaterais, baixa biodisponibilidade e resistência aos medicamentos, tem limitado o uso de algumas acridinas, e demonstrado a necessidade no estudo de novos derivados (CHEN *et al.*, 2019; GOUVEIA *et al.*, 2018).

Desse modo, conhecendo o potencial anticâncer dos derivados acridínicos e a importância dos diferentes métodos e técnicas empregadas pela química medicinal no processo de desenvolvimento de novas drogas, o presente trabalho propõe o planejamento de novos derivados espiro-acridínicos a partir de *scaffolds* previamente identificados, a síntese, sua avaliação quanto a citotoxicidade em células tumorais para câncer de colón e avaliação quanto as suas propriedades farmacocinéticas, *in silico*.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Planejar e sintetizar novos derivados espiro-acridínicos a partir dos *scaffolds* previamente identificados e avaliar *in silico* e *in vitro* a atividade antitumoral frente o câncer de colón.

2.2 Objetivos Específicos:

- Promover empiricamente o planejamento das novas moléculas;
- Realizar a síntese dos compostos planejados por rotas sintéticas já consolidadas pelo grupo de pesquisa;
- Caracterizar físico-quimicamente e estruturalmente os compostos sintetizados;
- Realizar estudo de *docking* molecular em alvo relacionado ao câncer;
- Avaliar sua capacidade antitumoral *in vitro* frente a linhagem de câncer de colón (HCT-116);
- Avaliar suas propriedades farmacocinéticas *in silico*.

de desenvolvimento, o câncer pode diferir quanto a mutações genéticas, epidemiologia, apresentação clínica, prognósticos e resposta ao tratamento (KISHIKI *et al.*, 2019; ZHONG *et al.*, 2019).

O tratamento para CC inclui cirurgia, criocirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia direcionada. A cirurgia é o tratamento primário e promove a cura de cerca de 50% dos pacientes, mas ocorrem elevadas recidivas, culminando em morte. Porém, com a quimioterapia adjuvante é possível melhorar a sobrevivência dos pacientes e controlar a redução do tamanho do tumor. Quando a quimioterapia é utilizada como principal estratégia terapêutica, diferentes drogas ou combinações de drogas são utilizadas com objetivo de reduzir a divisão celular do câncer (BANERJEE *et al.*, 2017; PEDERSEN *et al.*, 2020).

O CC pode apresentar-se em quatro estágios distintos e o tratamento irá variar de acordo com o estágio. O estágio I do CC é definido como um tumor que pode invadir nos casos mais graves a musculatura própria do cólon, nestes pacientes apenas o tratamento cirúrgico é utilizado, não sendo recomendado nenhuma quimioterapia adjuvante. O CC em estágio II é definido como um tumor que invade na pior das hipóteses os órgãos jacentais, porém sem envolvimento nodal. Nestes casos o benefício da quimioterapia adjuvante não é clara (TAIEB; ANDRÉ; AUCLIN, 2019).

No CC em estágio III, o tumor cresce através ou além da camada muscular da parede do cólon sem se espalhar para locais distantes, nesse estágio o tratamento adjuvante é recomendado, pois a quimioterapia pode reduzir o risco de recorrência em 14% (TAIEB; ANDRÉ; AUCLIN, 2019; LEE *et al.*, 2020; DING *et al.*, 2020). Alguns pacientes com CC em estágio IV apresenta potencialmente metástases ressecáveis, mas cerca de 75-90% apresentam doença irrisecável, sendo a quimioterapia a principal opção (BIRKETT *et al.*, 2019).

3.1.1 Tratamento Quimioterápico para Câncer de Cólon

A quimioterapia convencional para o CC é realizada principalmente com os medicamentos como fluoropirimidinas ou oxaliplatina. O 5-fluorouracil (5-FU) é o tratamento de primeira linha contra o câncer há muitos anos. Embora o tratamento quimioterápico seja necessário, ele está associado a toxicidades de curto e longo prazo, sendo útil em apenas 15 a 25% dos pacientes tratados. Muitos efeitos colaterais como, síndrome mão-pé, diarreia, toxicidade gastrointestinal, mucosite, náusea, vômito, fadiga, distúrbios hematológicos e toxicidade hepática são observados (BANERJEE *et al.*, 2017; MEHTA; PATEL, 2019; TAIEB; ANDRÉ; AUCLIN, 2019).

Outra barreira que tem dificultado o tratamento é o grande surgimento de resistência aos medicamentos atualmente disponíveis para uso clínico, até mesmo os de primeira linha na terapia do CC. Transportadores ABC, como ABCB1, ABCC1 e ABCG2 funcionam como bombas de efluxo que realizam o transporte de substâncias para fora das células, a superexpressão desses transportadores é uma das principais causas da resistência medicamentosa em células de CC. É observado que na maioria dos cânceres metastáticos a resistência à terapia adjuvante se desenvolve em 3 a 12 meses após o início do tratamento quimioterápico. De tal modo, é notória a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos (GAO *et al.*, 2020; MEHTA; PATEL, 2019).

3.2 Química Medicinal

A química medicinal compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica., ela é a disciplina responsável pelo estudo de aspectos relacionados à descoberta, invenção e preparação de substâncias bioativas de interesse terapêutico e dos fatores moleculares como o modo de ação dos fármacos, incluindo a compreensão da relação entre estrutura química e atividade (SAR, do inglês *Structure-Activity Relationships*), assim como aspectos farmacocinéticos como à absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (AMARAL *et al.*, 2017; MIKOVSKI *et al.*, 2018).

3.2.1 Planejamento de fármacos

No início da fase de descoberta de novos fármacos, os estudos buscam a identificação e otimização de moléculas pequenas com potencial de desenvolvimento clínico. Durante esse processo as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal desempenham papel fundamental. As moléculas com propriedades bioativas (*hits*) podem ser identificadas partindo-se do planejamento racional, de triagens reais ou virtuais de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Diferentes estratégias de planejamento de fármacos podem ser utilizadas: a descoberta de drogas baseadas em fragmentos (FBDD, do inglês *fragment based drug discovery*) que permite identificar compostos de baixo peso moléculas com capacidade de ligar-se a macromoléculas terapeuticamente relevantes em uma faixa de afinidade de micromolar a milimolar; o planejamento de um novo fármaco baseado na estrutura do receptor (SBDD, do

inglês *structure-based drug design*) de acordo com a compreensão do local de ligação de um composto e planejamento baseado na estrutura de ligantes bioativos (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) quando a estrutura do alvo farmacológico é desconhecida (BISSARO; STURLESE; MORO, 2020; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

3.2.2 Estratégia de modificação molecular

Para otimizar a estrutura química de um composto protótipo, diferentes modificações moleculares podem ser realizadas. Estas modificações permitem o melhoramento de características fundamentais para atividade biológica, como o aumento da potência e seletividade, adequação do perfil farmacocinético e diminuição da toxicidade. Diferentes estratégias de modificação molecular podem ser realizadas, tais como homologação, bioisosterismo, simplificação e hibridação molecular (LIMA, 2007).

3.2.2.1 Bioisosterismo

O bioisosterismo é uma estratégia de modificação molecular baseada na substituição de fragmentos moleculares intercambiáveis, que podem ser átomos, grupos funcionais e subunidades. Esses fragmentos apresentam volume molecular, forma, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes. O bioisosterismo é utilizado com intuito de melhorar os perfis farmacocinéticos (PK), farmacodinâmicos (PD) e toxicológicos em um composto protótipo inicial (LIMA; BARREIRO, 2017).

O bioisosterismo é classificado em clássico e não clássico. O bioisosterismo clássico é aquele que inclui átomos, grupos e radicais com camadas periféricas de elétrons com a mesma valência e estão dispostos em átomos ou grupos mono, di, tri ou tetravalentes. Essa classificação também abrange o conceito de equivalentes de anéis. No bioisosterismo não clássico os elementos estruturais apresentam funcionalidade, mas podem diferir substancialmente na representação eletrônica, físico-química, estérica e topológica. Os compostos considerados bioisosteros devem afetar os sistemas bioquimicamente associados como agonistas ou antagonistas (LIMA; BARREIRO, 2017; MEANWELL, 2011).

3.2.3 Estratégias computacionais aplicadas a química medicinal

3.2.3.1 Docking molecular

Nos últimos anos, os métodos computacionais tem auxiliado significativamente no processo de desenvolvimento de novas compostos bioativos. Os programas de encaixe molecular são procedimentos de simulação *in silico* que permitem prever o comportamento de uma molécula dentro de uma representação tridimensional de estruturas de proteínas. Muitos dos medicamentos utilizados clinicamente como captopril e saquinavir beneficiaram-se de ferramentas computacionais para seu desenvolvimento (CROSS *et al.*, 2009; SLEDZ; CAFLISCH, 2018).

Dentre os métodos computacionais temos o *docking* molecular, que permite modelar a interação entre pequenas moléculas e uma proteína no nível atômico, auxiliando na compreensão do modo de interação dessas moléculas no local de ligação de proteínas alvo e permitindo elucidar processos bioquímicos fundamentais. A previsão da conformação do ligante, sua posição e orientação dentro dos alvos (geralmente chamados de *pose*), bem como a avaliação da afinidade de ligação, são partes essenciais para o processo de encaixe (MENG *et al.*, 2011).

Com base na estrutura de macromoléculas como proteínas, consideradas potenciais alvos farmacológicos, é possível desenvolver novos compostos capazes de interagir com esses alvos modulando sua atividade. O *docking* molecular é comumente utilizado em diferentes estágios de desenvolvimento de medicamentos e sua aplicação vai do desenvolvimento de uma composto baseado no ligante a otimização de compostos leads potencialmente ativos. As estruturas alvos são obtidas em banco de dados, entre eles o Protein Data Bank (PDB) é aquele que disponibiliza maior número de estruturas alvos para estudos de ancoragem (ELOKELY; DOERKSEN, 2013; SHOICHET *et al.*, 2002).

Existe uma grande variedade de programas de *docking*, Os mais comumente utilizados são DOCK, OURO e AUTODOCK, porém outros incluindo GOLD, FLEXX, ZDOCK, M-ZDOCK, MSDOCK, Surflex , MCDOCK também são relatados. Cada programa é baseado em algoritmos de busca específicos e apresentam seu próprio conjunto de parâmetros e método de pesquisa (DIAS; AZEVEDO JR, 2008; SLEDZ; CAFLISCH, 2018).

O programa de *docking* pode buscar o melhor ajuste entre duas ou mais moléculas levando em consideração diversos parâmetros obtidos das coordenadas de entrada do receptor e do ligante, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, flexibilidade da estrutura do receptor ou ligante e complementaridade geométrica. Para otimizar e classificar os

resultados, são utilizadas pontuações capazes de avaliar a afinidade de ligação intermolecular ou energia livre de ligação (DIAS; AZEVEDO JR 2008).

3.2.3.2 *Predições Farmacocinéticas in silico*

O processo de descoberta e otimização de novos agentes terapêuticos é demorado e caro e os custos no processo de desenvolvimento tendem a aumentar conforme progride os testes clínicos. Antes da era da modelagem *in silico*, as moléculas sintetizadas eram avaliadas por diferentes testes *in vitro* e *in vivo*. Com o surgimento da modelagem *in silico*, foi possível ter acesso a propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas em estágios iniciais do desenvolvimento de drogas, aumentando a produtividade e reduzindo os custos (ALQAHTANI, 2017; TAO *et al.*, 2015).

Métodos *in silico* tem sido utilizados como ferramenta para previsão de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de novos compostos bioativos. Esses métodos utilizam apenas a estrutura química dos compostos e as previsões são obtidas utilizando propriedades moleculares teóricas, calculadas em segundos. De tal modo, os parâmetros ADME permitem a seleção de bons candidatos a fármacos e são de extrema importância para definição da dose ideal, intervalo de dosagem e margens de segurança (GLEESON; HERSEY; HANNONGBUA, 2011).

Devido à complexidade dos mecanismos biológicos e os diferentes fatores que estão envolvidos nos processos *in vivo*, a previsão de propriedades ADME é comumente simplificado para os componentes principais ou dividido em vários processos únicos. Os modelos *in silico* ADME podem ser realizados por exemplo, considerando apenas a biotransformação mediada por uma enzima hepática para o processo de metabolização e a ligação às proteínas plasmáticas para a fase de distribuição (WANG *et al.*, 2015).

A absorção de compostos bioativos é um processo complexo e de grande interesse durante o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, uma vez que, a via de administração oral apresenta-se segura e conveniente para maior parte da população. Fatores como solubilidade e permeabilidade, pH, motilidade gástrica e presença de transportadores de efluxo como a glicoproteína P (P-gp), são responsáveis por efeitos significativos na absorção de medicamentos. De tal modo, os modelos de absorção *in silico* tem grande utilidade na identificação precoce de problemas relacionados ao processo de absorção (DOKOUMETZIDIS; VALSAMI; MACHERAS, 2007; STILLHART *et al.*, 2020).

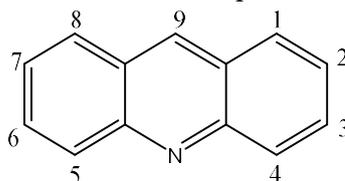
A regra dos 5 descrita por Lipinski *et al.* (1997) tem sido utilizada para selecionar compostos leads com provável biodisponibilidade oral baseando-se em regras simples relacionadas as propriedades moleculares dos compostos. Esta regra estipula que o composto para apresentar boa absorção oral deve possuir peso molecular (≤ 500 g mol⁻¹), baixo coeficiente de partição octanol/água (LogP) (≤ 5), número de doadores de ligação de hidrogênio (≤ 5) e número de aceptores de ligação de hidrogênio (≤ 10) (GLEESON; HERSEY; HANNONGBUA, 2011; WANG *et al.*, 2015).

Os processos metabólicos também são bastante discutidos, especialmente aqueles mediados pelas enzimas do citocromo P450 (CYP). As enzimas do citocromo P450 pertencem a superfamília das monoxigenases contendo grupamento heme, em humanos elas são responsáveis pelo metabolismo de inúmeras substâncias endógenas e exógenas. As CYPs são conhecidas por atuar no metabolismo oxidativo de fase I de diversas drogas e desempenham papel fundamental na eficácia do tratamento farmacológico, estando também associada a alguns efeitos tóxicos. Devido sua importância, diversas ferramentas e métodos computacionais foram desenvolvidos para prever o metabolismo por CYPs (EDAMATSU *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2019).

3.3 Acridina e seus derivados

A acridina foi identificada em 1870 por Graebe e Caro como uma impureza de antraceno bruto, isolado do alcatrão de carvão. Essa substância estável, cristalina e básica era responsável por causar um efeito irritante na pele e por isso recebeu o nome de acridina (SCHMIDT; LIU, 2015). Ela é um composto aromático policíclico com estrutura planar, apresentando três anéis aromáticos fusionados, com a presença do átomo de nitrogênio no anel central (figura 2) (CHAGAS, 2016; SILVA, 2018).

Figura 2 - Estrutura química da acridina



Fonte: Aatoria (2021).

Os compostos derivados da acridina são comumente descritos na literatura por apresentar grande variedade de atividades biológicas, entre elas está a atividade fungicida,

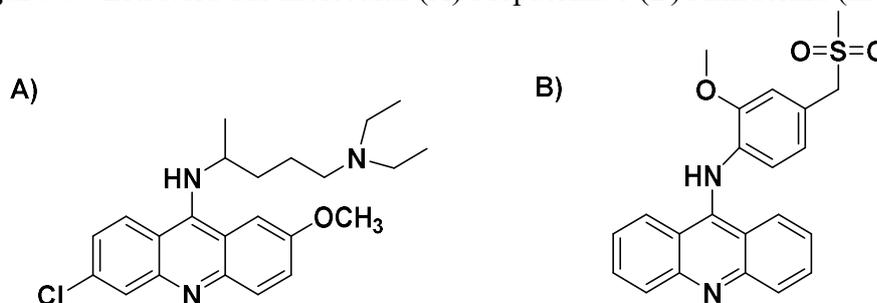
antiparasitária, antimicrobiana, antitumoral, analgésicas e anti-inflamatórias. Sabe-se que esses compostos são capazes de inibir enzimas topoisomerases e interagir com o DNA, podendo intercalar entre os pares de bases levando a parada do ciclo celular e apoptose (DAI *et al.*, 2019).

Muitos compostos são obtidos realizando-se substituição no carbono 9 do núcleo acridínico, pois devido sua reatividade este núcleo torna-se susceptível a ataques nucleofílicos. O ataque nucleofílico intramolecular no carbono 9 permite a formação de um anel espiro de cinco membros ligado a acridina e a ocorrência de ciclização espontânea destes compostos (GOUVEIA, 2017).

3.4 Derivados acridínicos como potenciais agentes antitumorais

As pesquisas sobre a atividade anticâncer dos compostos acridínicos tiveram início na década de 1920 e, em 1930, o agente acridínico Mepacrina (A) foi descoberto e utilizado como a primeira droga sintética antimalárica com atividade comparável a quinina (CHAGAS, 2016). Outro derivado acridínico, a Amsacrina (m-AMSA, B) (Figura 3) é atualmente utilizado na clínica para tratamento da leucemia devido à sua capacidade de intercalação de DNA e inibição das enzimas topoisomerase I ou II (CHEN *et al.*, 2019).

Figura 3 - Estrutura das moléculas (A) Mepacrina e (B) Amsacrina (m-AMSA)

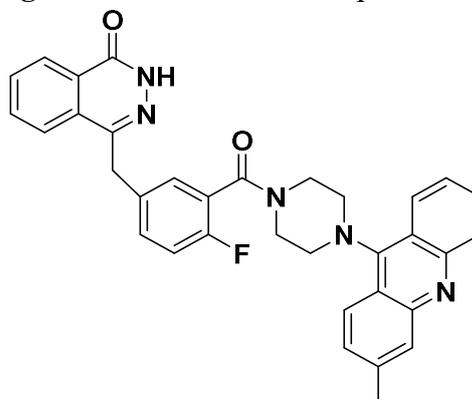


Fonte: Adaptado de Chagas (2016) e Chen *et al.* (2019).

Na busca por novos derivados acridínicos com atividade anticâncer, Dai *et al.* (2019) projetaram e sintetizaram derivados da ftalazinona acridina como inibidores de *Poli (ADP-ribose) polimerase* (PARP) e topoisomerases. Dentre os compostos, o 4-(4-fluoro-3-(4-(3-metilacridina-9-yl) piperazina-1-carbonil)-benzil)-ftalazina-1(2H)-ona (9a) (Figura 4), apresentou atividade de inibição da Topo II a 10 mol / L, e fraca atividade inibitória de PARP-1. Um ensaio de ligação à anexina-V / PI foi realizado com células de câncer de cólon humano (HCT116) com o composto 9a nas concentrações de 10, 25, e 50 mol / L o mesmo foi capaz de

causar apoptose das células de 0,5%, 22,9% e 81,5%, respectivamente, sugerindo que o composto 9a poderia induzir apoptose de uma maneira dependente da dose.

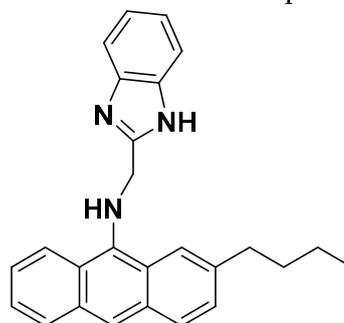
Figura 4 - Estrutura do composto 9a



Fonte: Dai *et al.* (2019).

Chen *et al.* (2015) investigaram os mecanismos subjacentes à ação anticâncer do derivado benzimidazol acridina N-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl) metil)-2- butilantraceno -9- amina (8m) (Figura 5) contra células cancerígenas do cólon humano *in vitro*, e através de ensaio de viabilidade celular observaram que o composto 8m foi capaz de reduzir potencialmente a viabilidade do câncer de cólon humano em linhas celulares SW480 e HCT116 com valores de IC50 de 6,77 e 3,33 μM , respectivamente. A atividade contra células cancerígenas de câncer de cólon *in vitro* foi associada a capacidade do composto de induzir as vias de apoptose intrínseca e extrínseca através da via ROS-JNK1.

Figura 5 - Estrutura do composto 8m



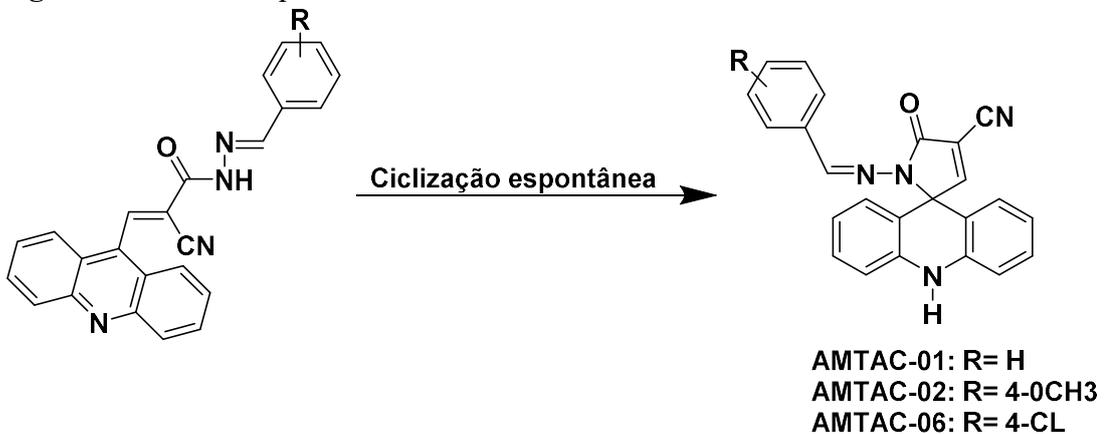
Fonte: Chen *et al.* (2015).

Com o intuito de obter derivados acridínicos com potencial atividade anticâncer, Almeida *et al.* (2016) realizaram a síntese de dois novos compostos espiro-acridínicos através da introdução de 2-ciano-N-acilidrazona entre a acridina e os anéis fenil. Os compostos

sintetizados foram (E)-1'-(benzilidenoamino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-spiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-01) e (E)-1'-((4-metoxibenzilideno)-amina)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-spiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-02) (Figura 6), eles apresentaram capacidade de se ligar ao DNA, não apresentaram atividade inibidora de Topoisomerase I, mas ambos foram capazes de inibir a Topoisomerase II α com atividade semelhante a Amsacrina na dose 100 μ M.

Baseados no estudo de Almeida *et al.* (2016), novos derivados espiro-acridínicos com diferentes substituintes no anel fenil foram sintetizados por Gouveia *et al.* (2018) e avaliados quanto à sua ligação ao DNA, inibição da topoisomerase II α humana e interação a albumina sérica bovina (BSA). Dentre os compostos estudados, a 1-(4-clorobenzilidenoamino)-5-oxo-1,5-diidro-10H-spiro [acridina-9,2 pirrol]4- carbonitrila (AMTAC-06) (Figura 6) apresentou inibição da topoisomerase II de 84,34% em comparação aos controles positivos e foi capaz de intercalar os pares de bases de DNA no local ativo da topoisomerase II α . De tal modo, AMTAC-06 revelou-se um composto promissor por apresentar tanto capacidade de interagir com o DNA e proteínas plasmáticas, como também inibindo a topoisomerase II humana.

Figura 6 - Estrutura química da AMTAC-01, AMTAC-02 e AMTAC-06

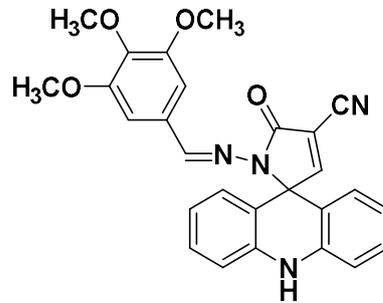


Fonte: Adaptado de Almeida *et al.* (2016) e Gouveia *et al.* (2018).

Ao observar a atividade antiproliferativa do derivado espiro-acridina metoxilado no grupo benzilidênico (AMTAC-02) obtido por Almeida *et al.* (2016); Silva *et al.* (2019) realizou a síntese de um novo composto espiro-acridina semelhante a AMTAC-02 mas com adição de dois grupos metoxil, ambos na posição meta em relação ao anel benzilideno, cuja nomenclatura química é (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5- trimetoxibenzilideno)-amina)-1',5'-diidro-10H-spiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-17) (Figura 7). A AMTAC-17 demonstrou atividade sobre um tumor de Ehrlich (modelo de carcinoma de ascite) transplantado em camundongos, estando

seu efeito antitumoral *in vivo* associado a modulação do sistema imunológico para um perfil Th1 citotóxico e redução da angiogênese do tumor.

Figura 7 - Estrutura da AMTAC-17



Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2019).

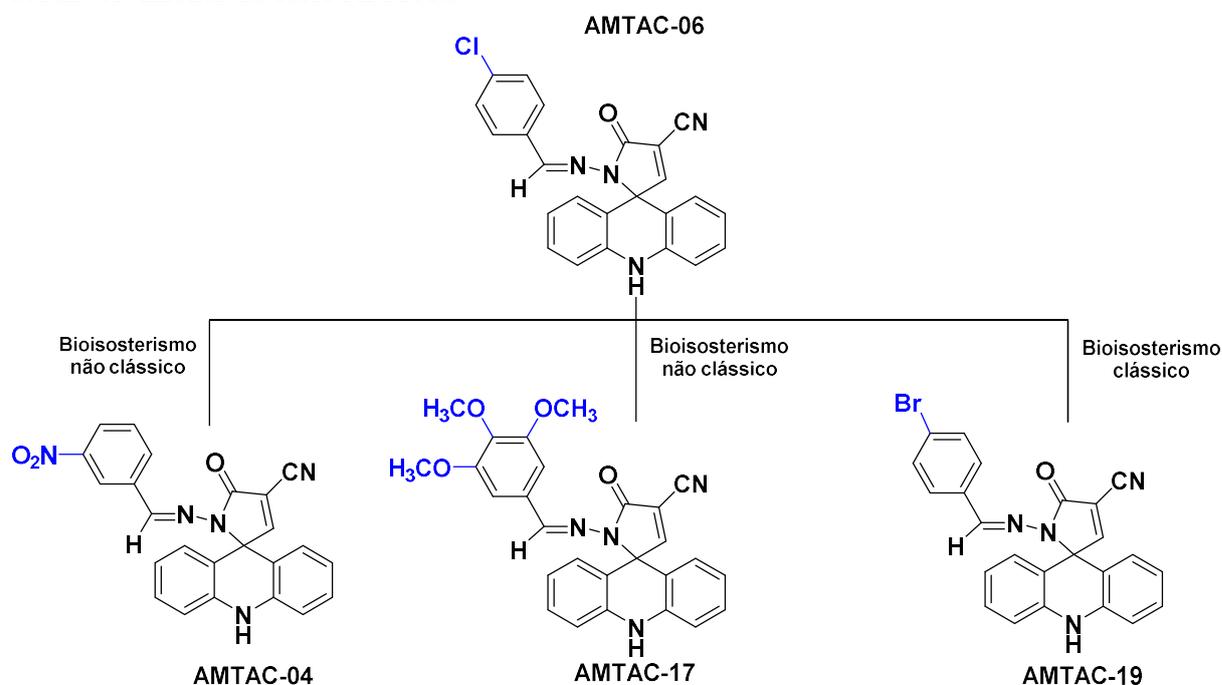
Tendo em vista a problemática do câncer, é notória a necessidade de quimioterápicos anticâncer mais eficazes, seguros e menos susceptíveis a resistência medicamentosa. Como demonstrado, os derivados acridínicos apresentam potencial atividade antitumoral e podem ser considerados promissores para o desenvolvimento de novos compostos *leads* destinados ao tratamento do câncer.

4 METODOLOGIA

4.1 Estratégia de desenvolvimento

Conhecendo a promissora atividade antitumoral do AMTAC-06 projetada por Gouveia *et al.* (2018), esse estudo levou em consideração a técnica de bioisosterismo clássico e não clássico para o desenvolvimento de novos compostos da série AMTAC com diferentes substituições nas posições *meta* e *para* no anel fenil da AMTAC-06, como demonstrado no esquema 1.

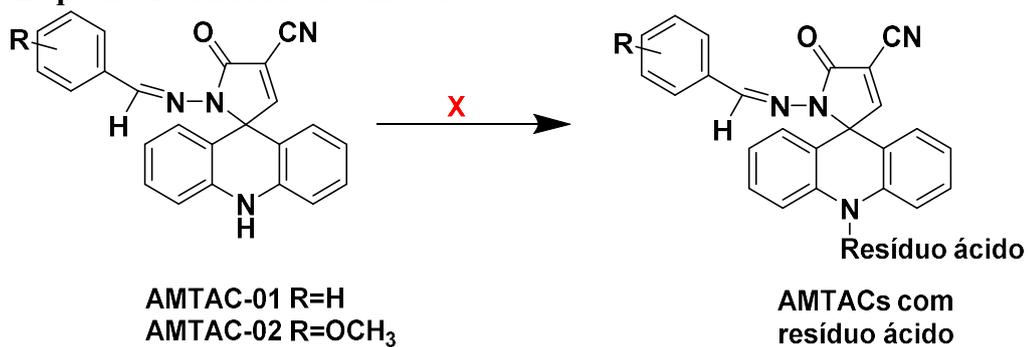
Esquema 1 -Estratégias de modificação molecular realizadas para o planejamento e desenvolvimento da série AMTAC



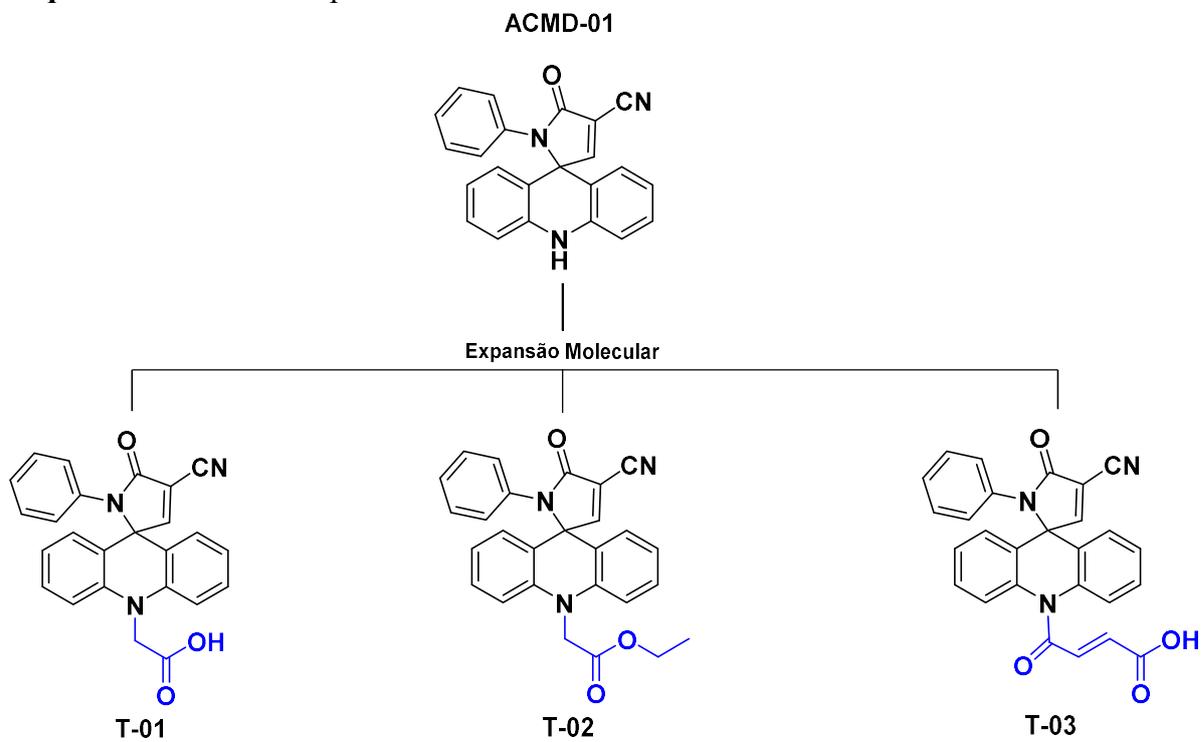
* A AMTAC-17 já foi descrita por Silva *et al.* (2019).

Fonte: Autoria (2021).

Posteriormente, realizou-se a tentativa de síntese da AMTAC-01 e AMTAC-02 com resíduos ácidos por diferentes rotas sintéticas, porém a reação não ocorreu e não obteve-se a molécula desejada (Esquema 2), provavelmente devido os hidrogênios da função imina e NH destes compostos apresentam acidez semelhante, o que poderia influenciar na reação. Decorrente disto, partiu-se do ACMD-01 descrito por SILVA (2018), uma molécula simplificada do AMTAC-01 e realizou-se a síntese de três novos compostos espiro-acridínicos com diferentes resíduos ácidos, sendo eles: T-01, T-02 e T-03 (Esquema 3).

Esquema 2 - AMTAC's com resíduo ácidob

Fonte: Aatoria (2021).

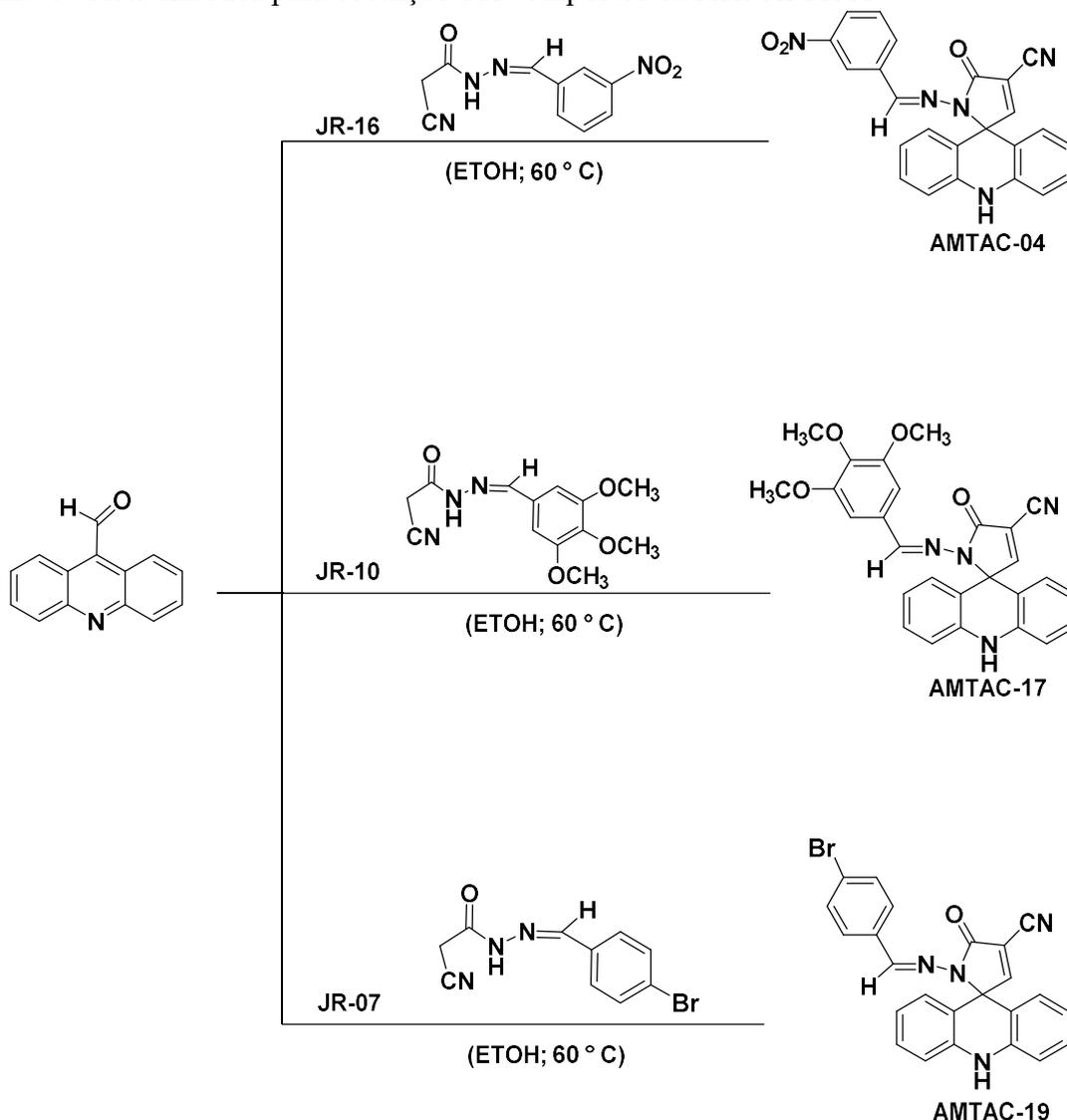
Esquema 3 - Novos compostos sintetizados com resíduo ácido

Fonte: Aatoria (2021).

4.2 Síntese Orgânica

4.2.1 Procedimento geral para obtenção da série 1'-(benzilideno-amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirró]l-4'-carbonitrila (AMTACs)

Esquema 4 - Rota sintética para obtenção dos compostos da série AMTAC



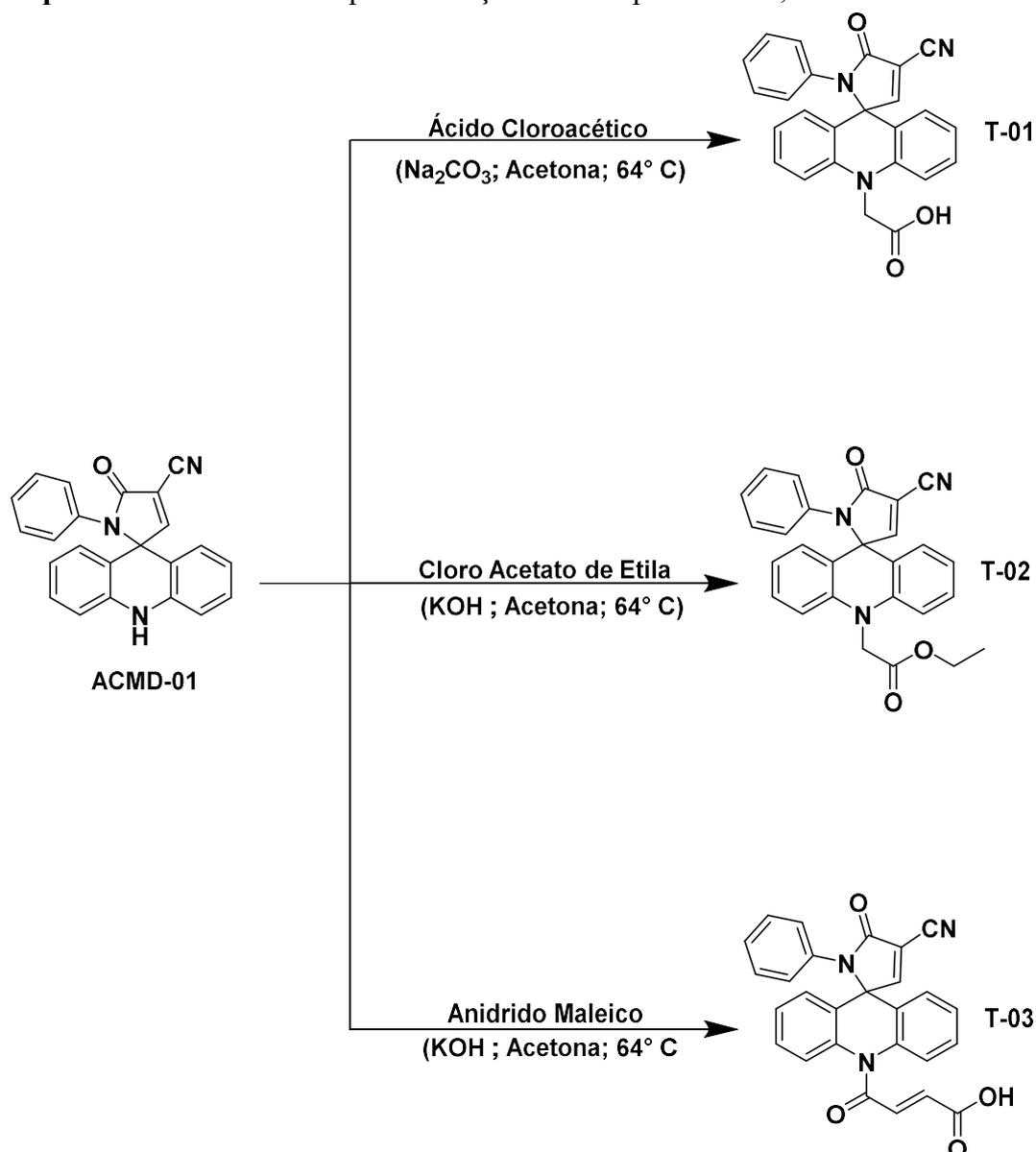
Fonte: Aatoria (2021).

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3000 g (0,0014 mols) de AC-02 previamente sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa e já descrito por Almeida *et al.* (2016) e Gouveia *et al.* (2018), com 1 equivalente molar dos intermediários JRs previamente sintetizados por Segundo (2020) na presença de 10,0000 mL de EtOH em meio básico sob agitação magnética e refluxo a 60°C durante aproximadamente 3 horas. A mesma foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Para extração e obtenção dos cristais

desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada, para precipitação do produto, o qual foi posteriormente filtrado. Os cristais obtidos foram purificados através de recristalização em etanol/ água que foi aquecido para diminuição do volume com posterior resfriamento e adição de água destilada para cristalização do produto. Após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado.

4.2.2 Procedimento para obtenção da série 2-(4'-ciano -5'-oxo-1'-fenil -1',5'-diidro -10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-10-il)

Esquema 5 - Rota sintética para obtenção dos compostos T-01, T-02 e T-03



Fonte: Autoria (2021).

Procedimento de síntese T-01: Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,05 g (0,000143 mols) de ACMD-01, 0,028 g de Na_2CO_3 e 8 mL de acetona. Deixou-se sob agitação por 5 minutos e em seguida adicionou-se 0,054 g (4 eq) de ácido cloroacético, a temperatura de 64°C . Após 5:00 horas de reação observou-se que a mesma não havia evoluído, então adicionou-se uma solução de KOH (2 eq de KOH \ 2 mL de água destilada) a reação. A mesma foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). A reação chegou ao final após aproximadamente 24 horas. Para precipitação dos cristais desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada e ácido acético, até obter pH 4. A reação foi filtrada e após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado.

Procedimento de síntese T-02: Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,05 g (0,000143 mols) de ACMD-01 e 10 mL de acetona. Em seguida, adicionou-se ao meio reacional uma solução de KOH (3 eq de KOH \ 2 mL de água destilada) e 0,025 mL de cloroacetato de etila. Após 22 horas de reação, foi adicionado mais 1 eq de KOH, pois a reação estava progredindo lentamente. A reação ficou sob agitação magnética e refluxo a 64°C . A mesma foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). A reação chegou ao final após aproximadamente 48 horas. Para precipitação dos cristais desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada. A reação foi filtrada e após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado.

Procedimento de síntese T-03: Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,05 g (0,000143 mols) de ACMD-01 e 10 mL de acetona. Em seguida, adicionou-se ao meio reacional uma solução de KOH (2 eq de KOH \ 1 mL de água destilada) e 0,028 g de anidrido maleico. A reação ficou sob agitação magnética e refluxo a 64°C . A mesma foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). A reação chegou ao final após aproximadamente 20 horas. Para precipitação dos cristais desejados, foi adicionado ao meio reacional água destilada e ácido acético, até obter pH 4. Posteriormente realizou-se a filtração e após secagem do produto puro o mesmo foi adequadamente armazenado.

4.3 Estudo Químico

4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

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

4.3.2 Fator de retenção

A mensuração do fator de retenção dos compostos sintetizados foi realizada por intermédio de CCDA em placas FLUKA Analytical Sílica Gel com espessura de 0,2mm, a partir da comparação das medidas obtidas para os compostos com o sistema eluente predeterminado. As revelações foram realizadas por meio de câmara de emissão de radiação ultravioleta, Boitton®, em comprimentos de onda ultravioleta 254 e 365 nm.

4.3.3 Rendimento da reação

Realizou-se o cálculo do rendimento da reação por intermédio da pesagem dos compostos em uma balança analítica, obtendo-se o valor em gramas, com seguinte conversão do valor para mols. A partir desse, realizou-se a relação entre o número de mols do produto em relação ao número de mols do reagente de partida, dando-se o resultado em porcentagem. Seguem as fórmulas (1) (2):

$$(1) \quad \text{Número de mols (produto)} = \frac{m \text{ produto}}{MM \text{ produto}}$$

$$(2) \quad \frac{\text{número de mols do produto obtido}}{\text{número de mols do reagente de partida}} \times 100 = \text{rendimento (\%)}$$

4.3.4 Ponto de Fusão

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

4.3.5 Cálculo teórico do Log de P

O Log de P teórico foi obtido para todas as moléculas sintetizadas através do programa SwissADME.

4.3.6 Aparência

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

4.3.7 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

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

4.3.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros *Varian Modelo Plus 300 MHz* (UFPE). Também foram obtidos espectros em espectrômetros *Bruker Avance* de 400 e 500 MHz, *Ultrashield*[®] na UFPB e UFRRJ, respectivamente. Os espectros foram plotados e interpretados através do *software Mestre Nova 12.0*. Como solvente das amostras foi utilizado DMSO_d_6 (*Sigma-Aldrich*[®]). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) indicadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), multiplete (m).

4.3.9 Espectrometria de Massas (EM)

As medidas das massas exatas foram obtidas em espectrômetro de massa MALDI-TOF *Autoflex III* (*Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA*). Laser Nd:YAG, smartbeam 1,355 nm Freq. laser: 100 Hz, Programa: *FlexControl Versao 3.0* (*Bruker Daltonics*) Placa MALDI: MTP 384 *ground steel* (*Bruker*), Adaptador para placa: MTP *target frame III* (*Bruker*). A exportação dos dados foi realizada no programa *FlexAnalysis versao 3.0* (*Bruker Daltonics*) e a calibração externa utilizando matriz alfa-ciano e mistura padrão de peptídeos (*Bruker*). Foi utilizado o modo refletido positivo do equipamento e as amostras foram diluídas em DMSO (20 μL). A matriz é composta de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico - HCCA (10 mg/mL) em acetonitrila (ACN) 50% e ácido tricloroacético (TFA) 0,3%. Uma amostra (1 μL) foi aplicada na placa e deixada na estufa a aproximadamente 50 °C, até completa secagem e a aplicação dos calibrantes foi realizado através do método da gota seca. O calibrante foi misturado a matriz (proporção volume matriz: amostra = 2:1) e a mistura foi aplicada na placa e deixada em temperatura

ambiente até secar. As análises foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.4 Estudo de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular dos compostos com as enzimas foram realizados através do software AutoDock Tools (ADT) 1.5.6. Por fim, baseando-se nos estudos de Amin et al. (2019), a estrutura cristalográfica do timidilato sintase (TS) complexado com o inibidor 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato foi obtida no banco de dados Protein Data Bank (PDB ID: 6QXG). Para esse alvo será utilizado o centro do grid em 40.506; -33.337 e 19.767 Å, dimensões de 40 × 40 × 40 Å nos eixos X, Y e Z.

Em seguida foram gerados os cálculos de interação utilizando o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS et al., 1998) para busca global e local nas simulações de docking, através do AutoDock 4.2 do ADT, gerando escore baseado na Energia Livre de Ligação (ΔG), e também simulando uma Constante de Inibição Estimada (Ki).

4.4.1 Obtenção e preparação das enzimas

A estrutura cristalográfica da proteína foi baixada da plataforma Brookhaven Protein Data Bank (www.rcsb.com) (ALPHONSA, 2019). Em seguida foi iniciado o processo de preparação desses alvos biológicos. Esse processo foi executado através do programa PyMOL Win, onde ocorreu a remoção das moléculas de solvente (por exemplo, a água) e pequenos cofatores como ferro, magnésio, cloro. Além disso, foi extraído o ligante co-cristalizado na enzima, que posteriormente foi empregada no processo de validação da metodologia.

Além do PyMOL Win para esse processo de tratamento das enzimas, também utilizou-se o software AutoDock Tools 1.5.6 que adiciona geometricamente à estrutura da enzima, átomos de hidrogênio polar. Já os átomos de hidrogênio não-polares foram mesclados com os respectivos átomos de carbono. As cargas atômicas parciais foram inseridas utilizando o método de Gasteiger Marsili (GASTEIGER; MARSILI, 1980; MORRIS *et al.*, 1998).

4.4.2 Preparação dos ligantes

As estruturas dos ligantes foram desenhadas no programa Marvin e, em seguida, submetidas no programa Chem3D Pro 12.0 para análise conformacional através do cálculo de

mecânica molecular mínima e dinâmica (MM2) obtendo a conformação com menor energia. Por fim, as estruturas foram salvas no formato MOL2.

4.4.3 Estudos de docking molecular para validação (redocking)

Para a validação da metodologia foi realizada a redocagem através do software AutoDock Tools 1.5.6. Esse método consiste em submeter o ligante co-cristalizado na estrutura cristalográfica ao estudo de *docking* molecular e observar se a orientação espacial do ligante está preservada, ou seja, o RMSD (root-mean-square deviation) entre o ligante cristalográfico e a proteína ou enzima seja o menor possível, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico*. Ou seja, a confiabilidade dos dados gerados através dos estudos de *docking* molecular modifica de acordo com a semelhança existente entre a solução de menor energia e o modo de ligação experimental.

Segundo Yusuf *et al.* (2008), o valor referente ao desvio meio da raiz quadrada amplamente aceito e confiável para que se reproduza um modo de ligação conhecido é de $\leq 2,0$. Além, do AutoDock Tools 1.5.6 foi utilizado também o programa preditivo Discovery Studio 2.0 onde é possível observar a sobreposição entre o ligante cristalografado na enzima e a molécula após o estudo de docking molecular.

4.4.4 Obtenção das interações 2D entre os alvos e os ligantes

As imagens em 2D foram obtidas através do programa Discovery Studio 2017 R2 Client, no qual possibilita a visualização das interações ocorridas entre o ligante e o alvo, assim como as distâncias das mesmas. E dessa maneira, foi possível analisar os tipos de interações ocorridas, quais os aminoácidos do sítio ativo da enzima que estão interagindo com a molécula e as ligações mais estáveis através da análise da distância de ligação molécula alvo (SINGH; JANA, 2017).

4.5 Estudo Biológico

Em parceria com a Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob supervisão da Prof. Dra. Marianna Vieira Sobral e do Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães, para avaliação da citotoxicidade foi utilizada a linhagem de células tumorais humanas HCT-116 (carcinoma colorretal humano). A linhagem de células normais L929 (fibroblasto murino) também foi

utilizada nesta triagem preliminar. Todas as células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

A citotoxicidade foi mensurada por meio do ensaio de redução do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983).

As células foram adicionadas em placas de 96 poços, na concentração de 3×10^5 células/mL. Em seguida, foram preparadas soluções estoque de 20 mM das substâncias, dissolvidas em DMSO (100%), da qual foram produzidas soluções de trabalho na concentração teste (50 µM), diluídas em meio RPMI-1640, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO. O DMSO (20%) foi utilizado como controle positivo. Após 72 h de incubação as placas foram centrifugadas (500 g, 5 min, 25 °C), foi removido 110 µL do sobrenadante, sendo adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma-aldrich). As placas foram incubadas por 3 h em estufa de 5% de CO₂, a 37 °C, para redução do sal e formação dos cristais de formazan. Após o período de incubação, foi adicionado 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) (10% HCL 0,01 N), para a solubilização dos cristais de formazan. As placas foram cobertas com um papel alumínio e deixadas *overnight* em um agitador. A absorbância foi medida em um leitor de placa, no comprimento de onda de 570 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata. Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prism 5.0*, realizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. A porcentagem de inibição foi calculada no referido programa.

4.6 Predições farmacocinéticas *in silico*

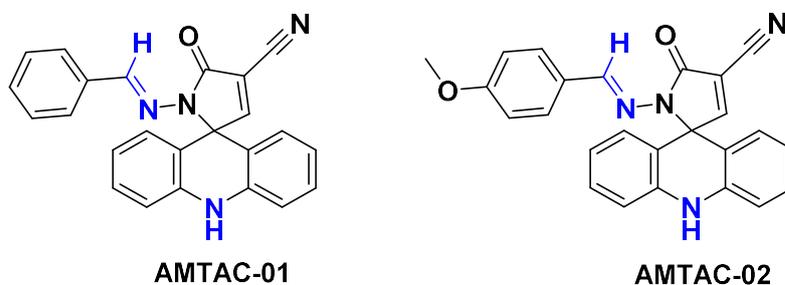
As predições farmacocinéticas foram realizadas utilizando os programas SwissADME e pkCSM, estes são disponibilizados de forma online e gratuita. Os programas foram utilizados para prever propriedades de absorção, interação com Glicoproteína P, Log de S, interação com diferentes isoformas da CYP450 e para analisar se os compostos obedeciam a regra dos 5 de Lipinski.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 AMTAC-01 e AMTAC-02 com resíduo ácido

Realizou-se a tentativa de obtenção dos compostos espiro-acridínicos AMTAC-01 e AMTAC-02, já sintetizados por Almeida *et al.* (2016), com resíduos ácidos, porém a reação não aconteceu, provavelmente devido a função imina dos derivados citados, uma vez que os hidrogênios da função imina e NH apresentam acidez semelhante, o que poderia influenciar na reação.

Esquema 6 - Estrutura química dos compostos AMTAC-01 e AMTAC-02



Fonte: Aatoria (2021).

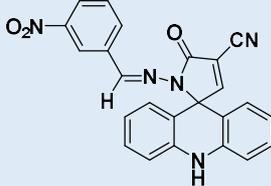
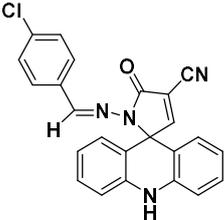
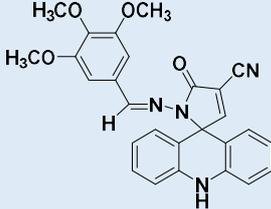
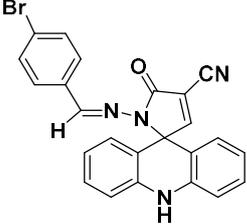
Para contornar a situação, foi utilizado uma estratégia de simplificação molecular, onde foi removida do AMTAC-01 a função imina, conduzindo ao derivado ACMD-01 previamente sintetizado por Silva (2018). A partir desse composto, foi realizada a síntese de três novos compostos espiro-acridínicos contendo diferentes resíduos de ácidos carboxílicos ou seus derivados, os quais estão discutidos neste trabalho.

5.2 Estudo químico

5.2.1 Síntese e caracterização dos novos derivados espiro-acridínicos

As características físico-químicas pertinentes a cada um dos composto sintetizados da série AMTAC encontram-se dispostas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características físico-químicas dos compostos espiro-acridínicos (AMTAC's)

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	P.M.	REND. (%)	F.F. (° C)	R.F.	LOG P
AMTAC-04		423,133	88,07	235 – 237	0,50 ^a	3,36
AMTAC-06		410,855	24,00	240-242	0,54 ^c	5,18
AMTAC-17		468,504	81,28	237 – 239	0,43 ^b	3,14
AMTAC-19		457,322	72,40	218 – 218	0,50 ^c	4,35

Legenda: PM (Peso Molar); Rend.% (Rendimento); F.F. (Faixa de fusão) (o C); R_f (Fator de retenção). *Sistema de aluição n-hexano: AcOEt nas proporções (a) 1:1; (b) 6:4 e (c) 7:3.

Fonte: Aatoria (2021).

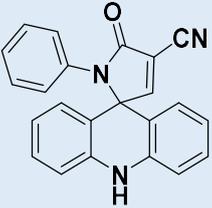
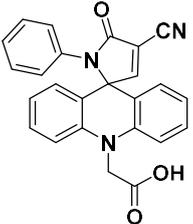
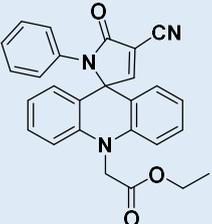
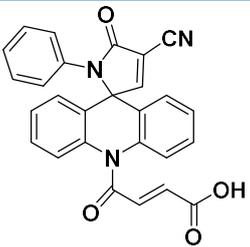
Os dados apresentados para os compostos AMTAC-06 e AMTAC-17 foram obtidos de Gouveia (2017) e Silva *et al.* (2019), respectivamente.

Como é possível observar na tabela 1, o rendimento obtido para os compostos AMTAC-04, AMTAC-17 e AMTAC-19 foram superiores ao protótipo AMTAC-06, com o rendimento variando de 72,40 a 88,07 % para os novos compostos e 24% para AMTAC-06. Não houve variação na faixa de fusão para o composto AMTAC-19, já para os demais compostos a variação foi de apenas 2° C. Esse pequeno intervalo de variação é sugestivo de certo grau de pureza dos compostos. Os R_f's apresentaram valores acima de 0,43. O sistema de aluição utilizado para os compostos foi n-hexano/ AcOEt nas proporções 1:1; 6:4 e 7:3. Todos os compostos foram obtidos na forma de sólido amorfo, com coloração característica: amarelo,

marrom e laranja. Tanto o Log P teórico quanto a massa molecular dos novos compostos estudados, enquadraram-se nos parâmetros de Lipinski.

As características físico-químicas dos compostos espiro-acridínicos com resíduo ácido sintetizados encontram-se descritos na tabela 2. O peso molecular teórico, a forma molecular e o Log de P foram obtidos através do programa SwissADME.

Tabela 2 - Características Físico-Químicas dos compostos espiro-acridínicos ácidos sintetizados

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	PM	REND. (%)	RF	FF (° C)	LOGP
ACMD-01		349,12	74	0,57 ^b	240-242	4,09
T-01		407,13	69	0,66 ^a	261-263	3,59
T-02		435,16	97	0,74 ^a	245-249	4,02
T-03		447,12	66	0,85 ^a	267-268	3,38

Legenda: PM (Peso Molar); Rend.% (Rendimento); F.F. (Faixa de fusão) (o C); Rf (Fator de retenção). *Sistema de aluição n-hexano: AcOEt nas proporções (a) 1:1; (b) 6:4 e (c) 7:3. O intermediário ACMD-01 já se encontra elucidado no trabalho de Silva (2018).

Fonte: Autoria (2021).

Os compostos finais T-01, T-02 e T-03 obtiveram rendimento satisfatório, com valores superiores aqueles obtidos para outros compostos com estrutura química semelhante já

desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa. Os rendimentos obtidos para T-01, T-02 e T-03 foram de 69%, 97% e 66% respectivamente, semelhante ao intermediário ACMD-01 que apresentou rendimento de 74%. O fator de retenção dos compostos foi realizado em placa de sílica, utilizando-se o sistema hexano/acetato na concentração 7:3 e 6:4 respectivamente, obtendo-se valores superiores a 0,50. As faixas de fusão apresentaram pequena variação oscilando de 2 a 4°C, sendo sugestivo da pureza dos compostos. Todos os compostos foram obtidos na forma de sólido amorfo e apresentaram coloração semelhante, variando pouco na intensidade do amarelo. Os valores teóricos de Log P e peso molecular dos compostos sintetizados enquadraram-se nos parâmetros de Lipinski.

5.2.2 Identificação e caracterização química dos derivados

Para identificação e caracterização dos novos derivados espiro-acridínicos AMTAC-04, AMTAC-17 e AMTAC-19, foram utilizadas as técnicas de EM, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , que estão detalhados nas imagens e tabelas seguintes. Devido a pandemia do COVID-19 vivenciada em 2020 e que ainda perdura, não foi possível realizar a caracterização estrutural dos derivados espiro-acridínicos com resíduos ácidos, apenas o T-01 foi preliminarmente caracterizado utilizando-se apenas a técnica de IV. O complemento para os compostos não detalhados, encontra-se no apêndice.

5.2.2.1 Espectrometria de Massas (EM)

É possível observar na tabela 3, os dados das massas exatas dos íons moleculares, tanto dos valores obtidos quanto dos calculados para as AMTACs. A diferença entre a massa calculada e a massa encontrada dos íons moleculares dos compostos estudados foi menor ou igual a 1, o que é consideravelmente aceitável, demonstrando que o íon molecular é um íon estável.

Tabela 3 - Dados das massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados da série AMTAC

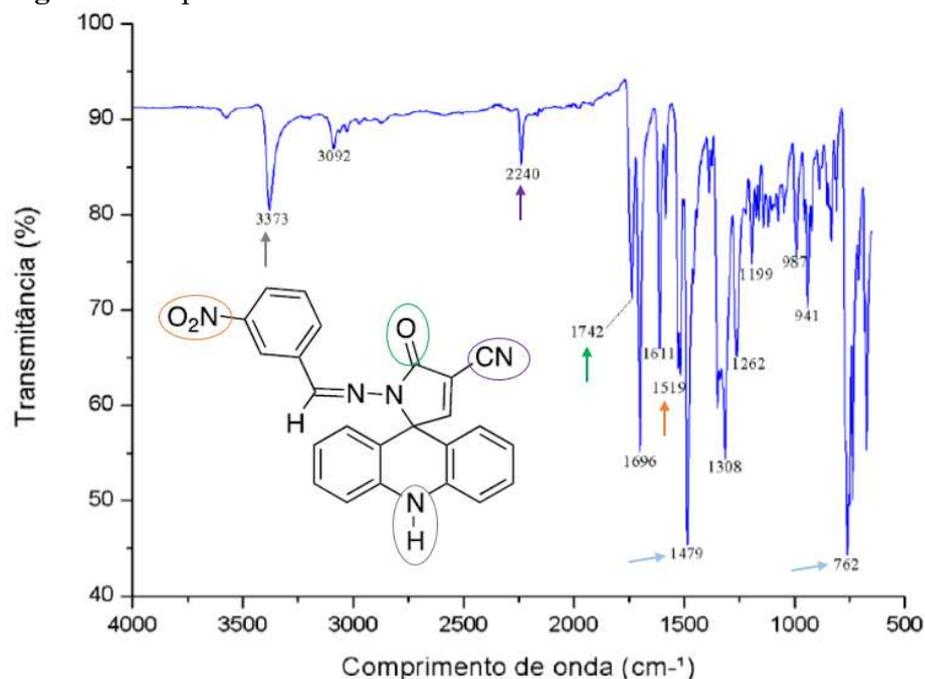
	MASSA CALCULADA	M/Z	MASSA ENCONTRADA
<i>AMTAC-04</i>	421,4076	422,1208 (26,0%), 423,1242 (3,2%)	421,8431
<i>AMTAC-17</i>	466,4880	467,1675 (29,2%), 468,1708 (4,1%)	467,0608
<i>AMTAC-19</i>	455,3061	456,0409 (97,3%), 455,0463 (26,0%)	454,8836

Fonte: Aatoria (2021).

5.2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho das AMTAC's tiveram suas principais bandas identificadas como pode se observar nos espectros a seguir. O composto AMTAC-04 demonstrado na figura 8 apresentou no IV uma banda em 3373 cm^{-1} sugestiva da ligação N-H da amida secundária; as bandas observadas em 2240 e 1742 cm^{-1} foram sugestivas para grupos nitrila e carbonila respectivamente. Outras bandas foram observadas em 1611 e 1479 cm^{-1} (sugestivas do estiramento C=C de aromático), em 1519 cm^{-1} (estiramento de NO_2) e 762 cm^{-1} (estiramento C-H fora do plano de aromático monossustituído).

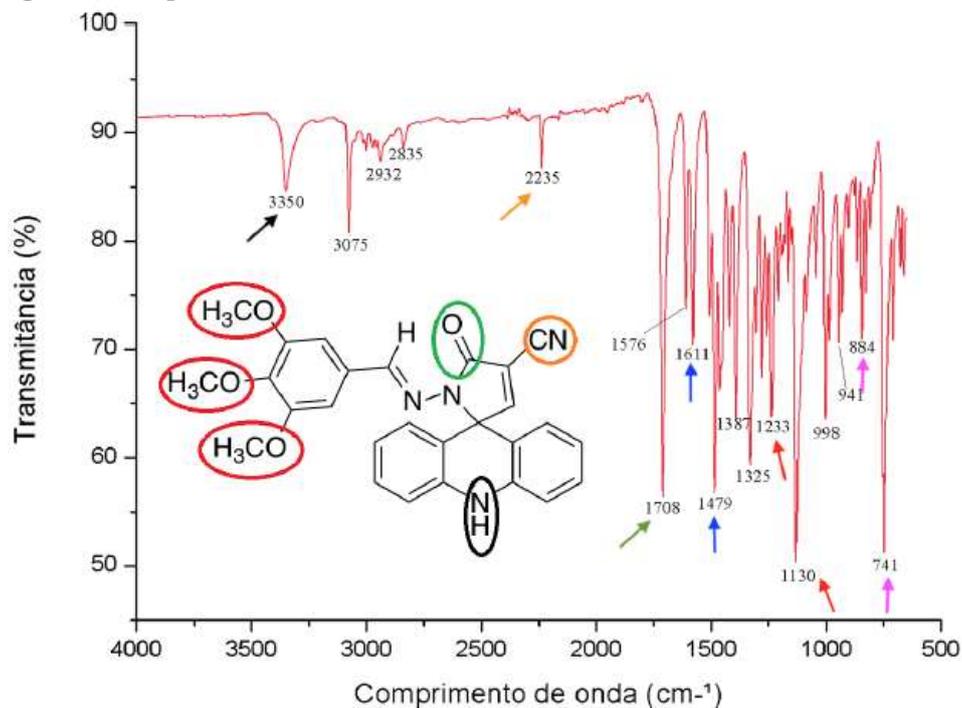
Figura 8 - Espectro de IV do AMTAC-04



Fonte: Aatoria (2021).

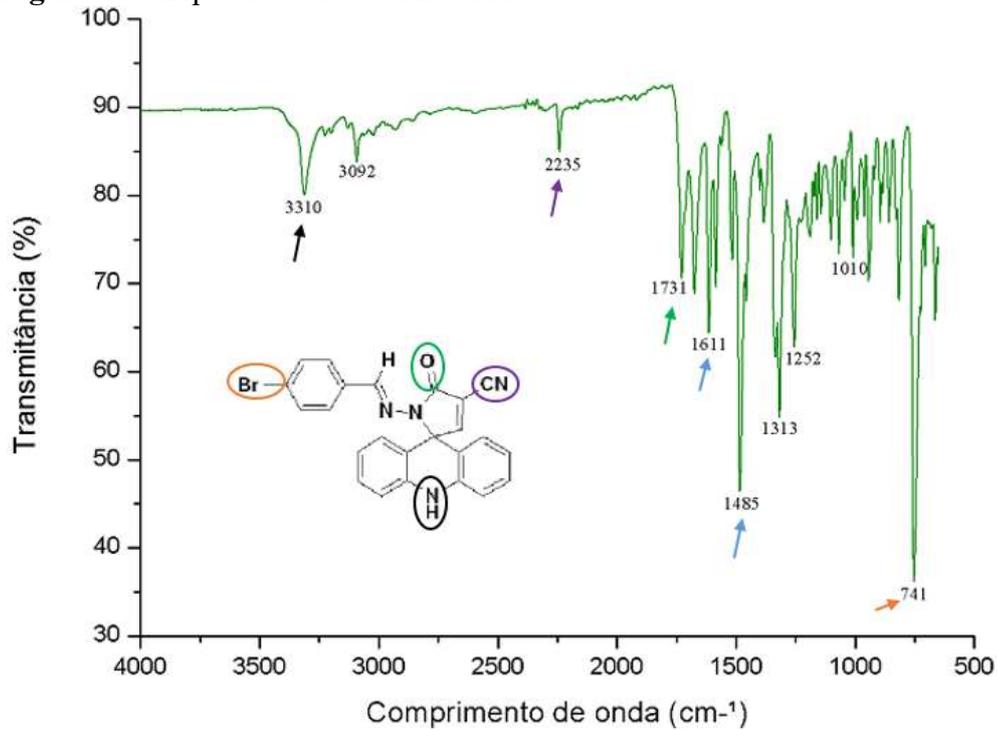
Como observado na figura 9, o IV da AMTAC-17, apresentou uma banda em 3.350 cm^{-1} sugestivo da ligação N-H. Outras bandas foram observadas em 2.235 e 1.708 cm^{-1} sugestivas para grupos nitrila e carbonila, respectivamente, bem como bandas em 1.611 e 1.479 cm^{-1} sugestivas para C=C de aromáticos. Também foram encontradas absorções em 1.223 e 1.130 cm^{-1} o que sugere estiramento de Ar-OCH₃, e ainda em 884 e 741 cm^{-1} (estiramento C-H de aromático).

Figura 9 - Espectro de IV do AMTAC-17



Fonte: Aatoria (2021).

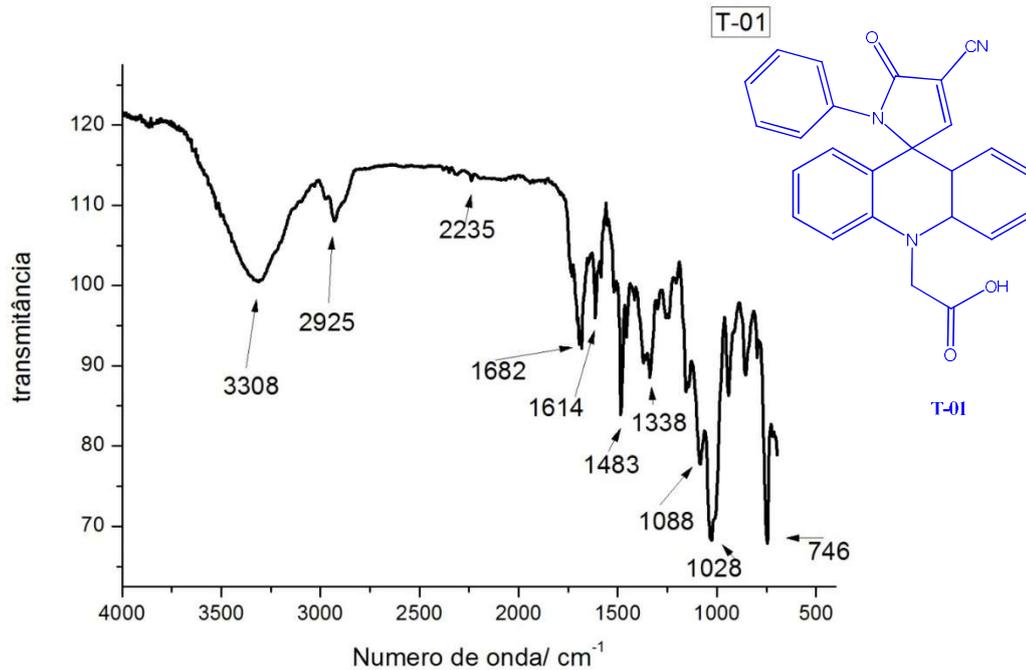
Na figura 10 é possível observar o IV da AMTAC-19, no qual foi observado uma banda em 3310 cm^{-1} sugestiva do grupamento N-H; e outras bandas em 2235 cm^{-1} sugestiva do estiramento CN e em 1731 cm^{-1} sugestiva do estiramento C=O. Demais absorções foram observadas em 1611 e 1485 cm^{-1} (estiramento C=C de aromático) e 741 (estiramento C-Br de aromático).

Figura 10 - Espectro de IV do AMTAC-19

Fonte: Aatoria (2021).

O espectro de infravermelhos do derivado T-01 possibilitou a sugestão da sua estrutura, como demonstrado nos espectros a seguir. Na estrutura do T-01, figura 11, verifica-se as bandas características do ácido carboxílico, uma banda larga e média em 3308 cm⁻¹ característicos do estiramento O – H de hidroxila (-OH) carboxílica, e conseqüentemente outra banda que comprova a presença do resíduo de ácido que é uma banda que aparece em 1338 cm⁻¹. Essa banda é de estiramento C – O e deve sempre está presente na faixa de 1340 a 1200 cm⁻¹ para confirma a função orgânica ácido carboxílico (PAVIA *et al.*, 2015). Essa banda de estiramento C – O pode aparecer em duplete, tendo em vista que é comum os oxigênio e hidrogênios podem fazer ligações de hidrogênios intermoleculares e assim aparecer as duas bandas (BARBOSA, 2007).

Figura 11 - Espectro IV do T-01



Fonte: Aatoria (2021).

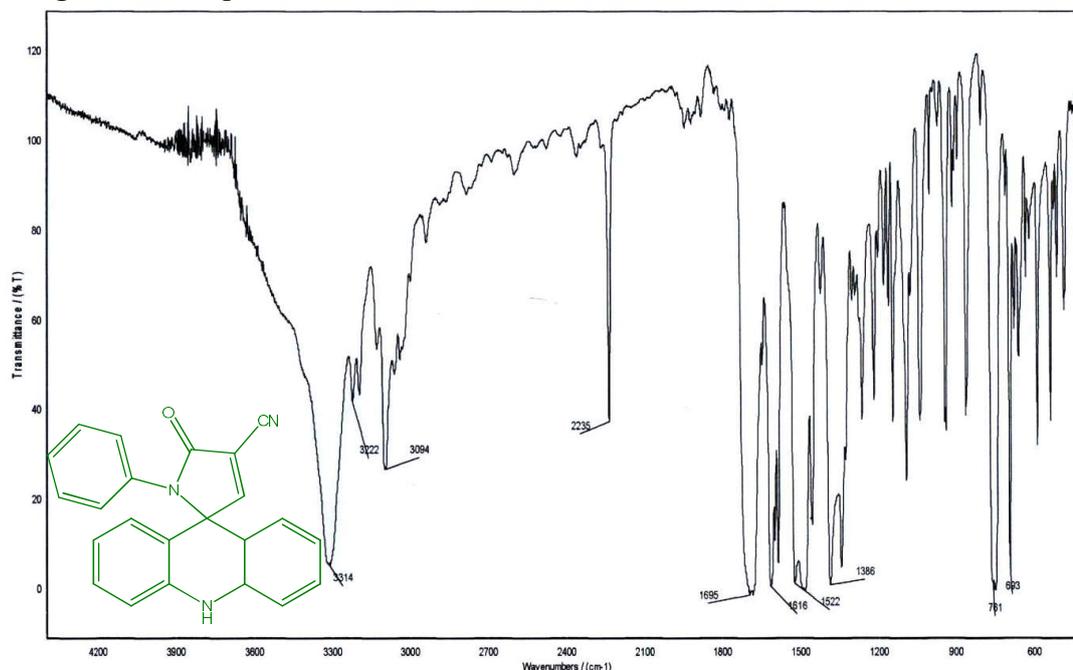
Uma banda também importante observada, encontra-se no comprimento de onda igual a 1682 cm^{-1} característica do estiramento $\text{C}=\text{O}$ do ácido carboxílico. Esse valor encontra-se abaixo da faixa de referência que vai de $1730\text{--}1210\text{ cm}^{-1}$ (PAVIA *et al.*, 2015), porém esse decréscimo é devido às ligações de hidrogênios intermoleculares que enfraquecem a ligação $\text{C}=\text{O}$ (BARBOSA, 2007).

Uma banda que ajuda na identificação e confirmação da molécula é a banda em 1028 cm^{-1} que corresponde à deformação angular da ligação $\text{O}-\text{H}$, que a literatura indica a faixa de $1040\text{ a }935\text{ cm}^{-1}$ para o surgimento dessa banda, com forte intensidade. Outras duas bandas também importantes para a revelação da estrutura encontra-se em 2925 cm^{-1} e 1483 cm^{-1} que é característico de estiramento e dobramento, respectivamente, de $\text{C}-\text{H } sp^3$. A estrutura, como pode ser observado na figura 11, apresenta na posição α da carbonila um carbono CH_2 , banda não presente no reagente de partida ACMD-01.

Outras bandas características estão destacadas no espectro. Uma banda fraca, que segundo a literatura (PAVIA *et al.*, 2015) deveria aparecer como média é a banda característica do grupamento nitrila em 2235 cm^{-1} , as bandas características de $\text{C}=\text{C}$, de anéis aromáticos em destaque a banda em 1614 cm^{-1} , e as bandas de deformação angular de $\text{C}-\text{H}$ fora do plano na faixa de $900\text{ a }730\text{ cm}^{-1}$ em destaque a banda 746 cm^{-1} .

Para confirmar a possibilidade da síntese dos novos compostos (pelo menos do T-01), foram comparados os espectros de infravermelho do composto de partida ACMD-01, que apresentou-se totalmente diferente como é possível observar na figura 12 abaixo.

Figura 12 – Espectro do ACMD-01



Fonte: Silva (2018).

Dessa forma, a síntese do composto T-01 pode ser sugerida, porém ainda se faz necessário mais análises futuras como, por exemplo, de Ressonância Magnética Nuclear – RMN, assim como para os demais compostos dessa série (T-02 e T-03).

5.2.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

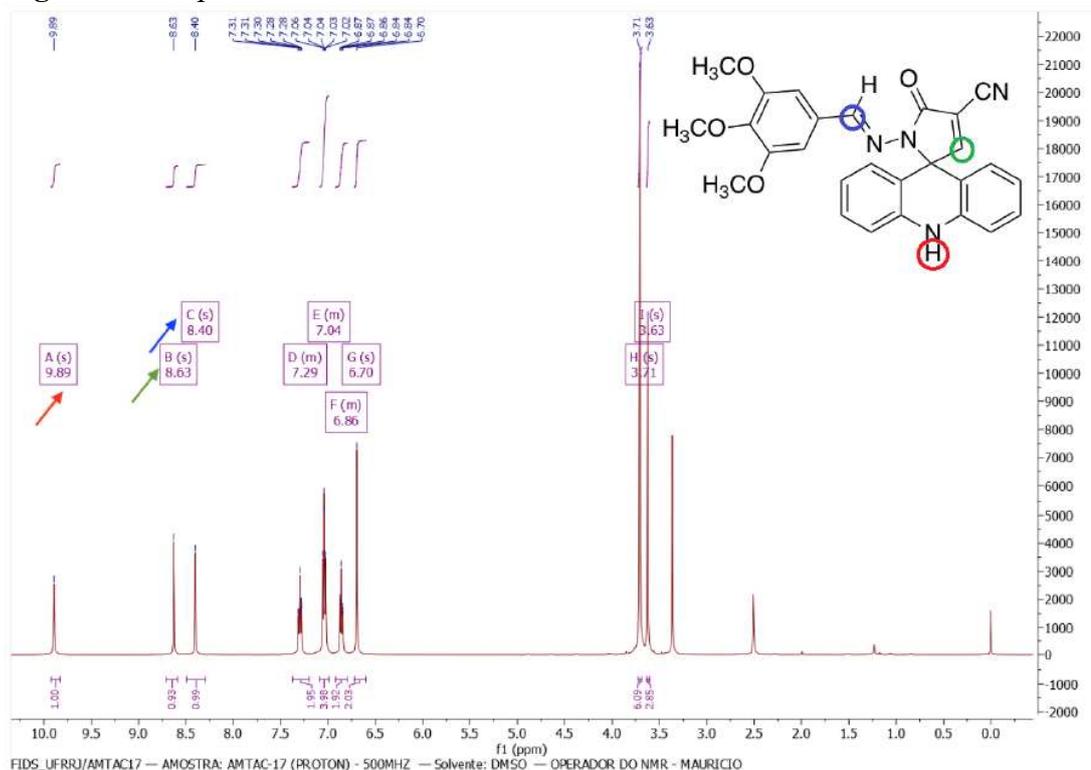
A análise de RMN de ^1H , permitiu a visualização de pontos importantes na elucidação estrutural dos compostos sintetizados neste estudo. Os espectros apresentaram simpletos referentes ao grupo NH com deslocamento químico variando de 9,84 a 9,89 ppm (integral para 1 hidrogênio em cada pico). Também observou-se a presença dos prótons isolados sugestivos da formação da ligação C=C (vinílico) e C=N (imínico), que apresentaram variações de deslocamentos 8,45 a 8,63 ppm e 8,24 a 8,40 ppm, respectivamente. Outra importante característica observada em todos os espectros analisados foi a presença de sinais de duplete (d) e multiplete (m) na região característica de grupamentos aromáticos e da acridina,

corroborando com os resultados encontrados na literatura para série AMTAC (ALMEIDA *et al.*, 2016; GOUVEIA *et al.*, 2018).

Neste trabalho apenas o RMN de ^1H do AMTAC-17 foi detalhado e os dados espectrais de RMN ^1H (δ em ppm) dos demais compostos da série AMTAC desenvolvidos nesse estudo encontra-se na Tabela 4. Como pode ser observado no espectro do AMTAC-17 representado na Figura 13, o primeiro simpleto apresentou sinal em 9,89 ppm sugestivo para o grupamento NH, os simpletos subsequentes se apresentaram em 8,63 e 8,40 ppm, sugestivos para os grupamentos vinílico e imínico, respectivamente.

Os outros sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático e do anel acridínico da AMTAC-17, são observados nas regiões de deslocamento químico entre 7,29 – 6,86, sinais sugestivos do anel acridínico na forma de multiplete correspondente a oito hidrogênios. O simpleto em 6,70, é característico do alceno do ciclo derivado do pirrol. Por fim, nas regiões de 3,71 contendo seis hidrogênios e 3,63 contendo três hidrogênios são correspondentes dos grupos metoxilas ligados ao anel aromático não acridínico (Figura 13).

Figura 13 - Espectro de RMN ^1H AMTAC-17



Fonte: Aatoria (2021).

Assim como o AMTAC-17, os derivados AMTAC-04 e AMTAC-19 também apresentaram deslocamentos químicos para os átomos de hidrogênio correspondentes as estruturas esperadas, podendo ser observado nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO-d₆, 300 MHz) da série AMTAC

	DESLOCAMENTO (PPM)
AMTAC-04	$\delta = 9,88$ (s, 1H, NH); 8,51 (s, 1H, CH); 8,40 (s, 1H, N=CH); 8,12 (m, 2H, aromático); 7,76 (m, 1H, aromático); 7,59 (m, 1H, aromático) 7,28 (m, 2H, espiro-acridínico); 7,01 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,85 (m, 2H, espiroacridínico).
AMTAC-19	$\delta = 9,84$ (s, 1H, NH); 8,45 (s, 1H, CH); 8,24 (s, 1H, N=CH); 7,47 (m, 2H, aromático); 7,45 (d, 2H, aromático, J = 8,4 Hz); 7,26 (m, 2H, aromático/ 2H espiro-acridínico); 6,98 (m, 4H, espiro-acridínico); 6,83 (m, 2H, espiroacridínico).

Fonte: Aatoria (2021).

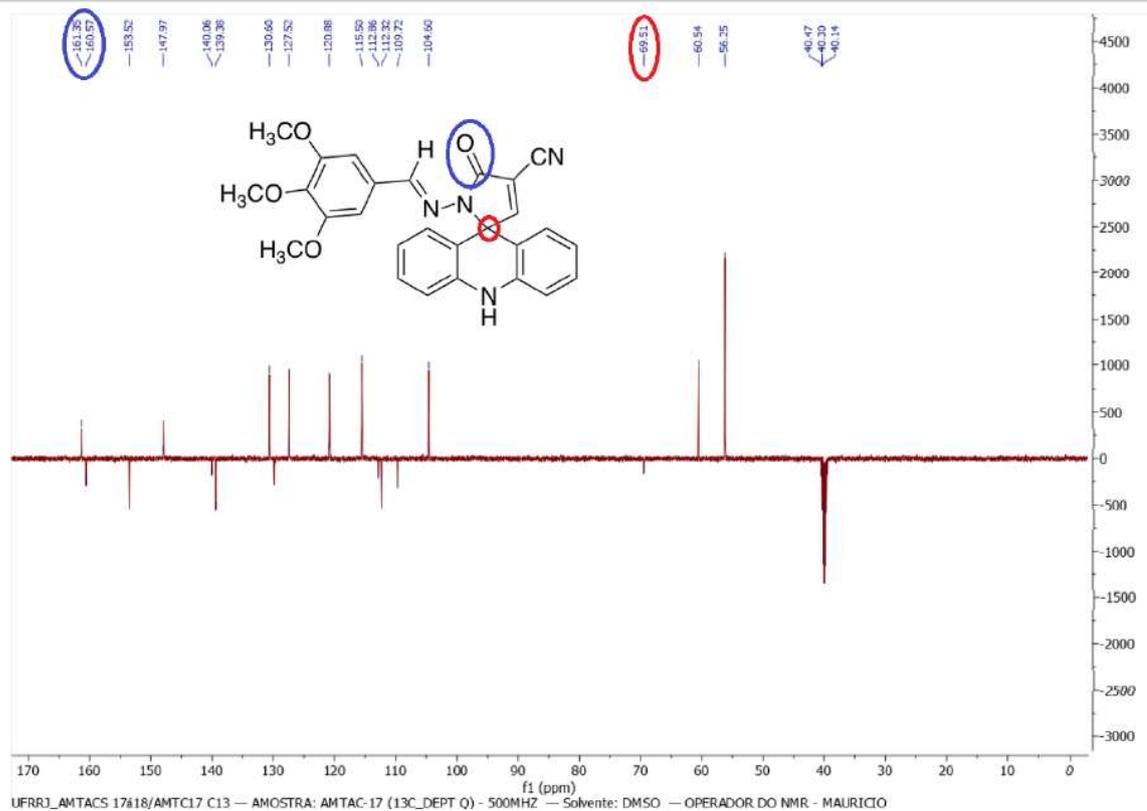
Tabela 5 - Dados espectrais de RMN de ^1H (δ , DMSO-d₆, 500 MHz) da série AMTAC

	DESLOCAMENTO (PPM)
AMTAC-17	$\delta = 9,89$ (s, 1H, NH); 8,63 (s, 1H, CH); 8,40 (s, 1H, N=CH); 7,29 (m, 2H, acridínico); 7,04 (m, 4H, acridínico); 6,86 (m, 2H, espiro-acridínico); 6,70 (s, 2H, aromático); 3,71 (s, 6H, OCH ₃); 3,63 (s, 3H, OCH ₃).

Fonte: Aatoria (2021).

Os espectros de RMN de ^{13}C da série AMTAC, revelaram sinais nos deslocamentos entre 69,28 a 69,51 ppm que evidenciam a presença de carbono quaternário formado após o processo espontâneo de ciclização, como está descrito por Gouveia *et al.* (2018). Os deslocamentos dos carbonos referentes a carbonila (C=O) aparecem nos sinais entre 161,29 a 161,45 ppm. Abaixo se encontra o espectro de RMN de ^{13}C do AMTAC-17 (Figura 14), seguido das Tabelas 6 e 7 com os dados espectrais de RMN de ^{13}C para série AMTAC.

Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C do AMTAC-17



Fonte: Aatoria (2021).

Tabela 6 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 300 MHz) da série AMTAC

	DESLOCAMENTO (PPM)
AMTAC-04	$\delta = 161,4(\text{C}, \text{C}=\text{O}); 148,5 (\text{C}, \text{C}=\text{C}); 145,2 (\text{C}, \text{Ar}); 139,0 (\text{C}, \text{Ar}); 135,7 (\text{C}, \text{Ar}); 133,4 (\text{C}, \text{Ar}); 131,0 (\text{C}, \text{Ar}); 130,8 (\text{C}, \text{Ar}); 127,3(\text{C}, \text{Ar}); 125,2 (\text{C}, \text{Ar}); 121,1 (\text{C}, \text{Ar}); 121,0 (\text{C}, \text{Ar}); 115,6 (\text{C}, \text{Ar}); 112,5 (\text{C}, \text{CN}); 111,3 (\text{C}, \text{Ar}); 108,5 (\text{adjacente a CN}); 69,4 (\text{C}, \text{sp}^3).$
AMTAC-19	$\delta = 161,2 (\text{C}, \text{C}=\text{O}); 161,5 (\text{C}, \text{C}=\text{C}); 146,3 (\text{C}, \text{Ar}); 145,5 (\text{C}, \text{Ar}); 138,9 (\text{C}, \text{Ar}); 133,1 (\text{C}, \text{Ar}); 132,3 (\text{C}, \text{Ar}); 130,7 (\text{C}, \text{Ar}); 129,0 (\text{C}, \text{Ar}); 127,3 (\text{C}, \text{Ar}); 124,4 (\text{C}, \text{Ar}); 121,0 (\text{C}, \text{Ar}); 115,6 (\text{C}, \text{Ar}); 112,5 (\text{C}, \text{CN}); 111,4 (\text{C}, \text{Ar}); 108,4 (\text{adjacente a CN}); 69,3 (\text{C}, \text{sp}^3).$

Fonte: Aatoria (2021).

Tabela 7 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) da série AMTAC

	DESLOCAMENTO (PPM)
AMTAC-17	$\delta = 161,6 (\text{C}, \text{C}=\text{O}); 160,8 (\text{C}, \text{C}=\text{C}); 148,8 (\text{C}, \text{Ar}); 139,2 (\text{C}, \text{Ar}); 137,2 (\text{C}, \text{Ar}); 131,7 (\text{C}, \text{Ar}); 130,2 (\text{C}, \text{Ar}); 127,3 (\text{C}, \text{Ar}); 124,1 (\text{C}, \text{Ar}); 123,1 (\text{C}, \text{Ar}); 122,1 (\text{C}, \text{Ar}); 120,6 (\text{C}, \text{Ar}); 115,4 (\text{C}, \text{Ar}); 112,9 (\text{C}, \text{CN}); 111,8 (\text{C}, \text{Ar}); 110,0 (\text{adjacente a CN}); 69,7 (\text{C}, \text{sp}^3).$

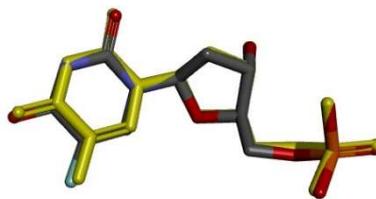
Fonte: Aatoria (2021).

5.3 Docking molecular

A Timidilato sintase (TS) é uma enzima essencial para a replicação do DNA humano e por isso é alvo promissor para o desenvolvimento de quimioterápicos anticâncer. Esta enzima catalisa a metilação redutiva de 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) para 2-desoxitimidina-5-monofosfato (dTMP), uma unidade de construção de DNA, onde o cofator N5, N10-metilenotetrahidrofolato (MTHF) atua como doador de grupo metileno e agente redutor. A inibição da TS é relatada por ocasionar apoptose celular. Um forte inibidor da Timidilato sintase é o 5-fluoro-dUMP (FdUMP), a forma ativa de vários medicamentos incluindo o 5-fluorouracil, droga de escolha para o tratamento de câncer colorretal metastático (AMIN *et al.*, 2019; SOBICH *et al.*, 2019).

Para melhor compreensão dos mecanismos anticâncer dos compostos estudados, o *docking* molecular foi realizado com a estrutura cristalográfica da Timidilato sintase (TS) complexada com o inibidor 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (PDB ID 6QXG). Para validação do método utilizado, foi realizado o procedimento de *redocking* com o ligante co-cristalizado 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato conforme visualizado na Figura 15. Esse procedimento permite obter, a partir da realização do *docking* entre o ligante co-cristalizado e o bioreceptor em questão, a preservação da orientação espacial do ligante.

Figura 15 - Redocking do 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato



Fonte: Aatoria (2021).

Após a validação do método, o *docking* molecular foi realizado com os compostos estudados para avaliar a interação dos mesmos com a enzima Timidilato sintase *in silico*. O ligante co-cristalizado 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato foi utilizado como controle. A Energia Livre de Ligação (ΔG) e a Constante de Inibição Estimada (K_i), foram os parâmetros utilizados para analisar a afinidade entre os compostos e o alvo. Os resultados obtidos para o *docking* molecular dos compostos, encontram-se na tabela 8.

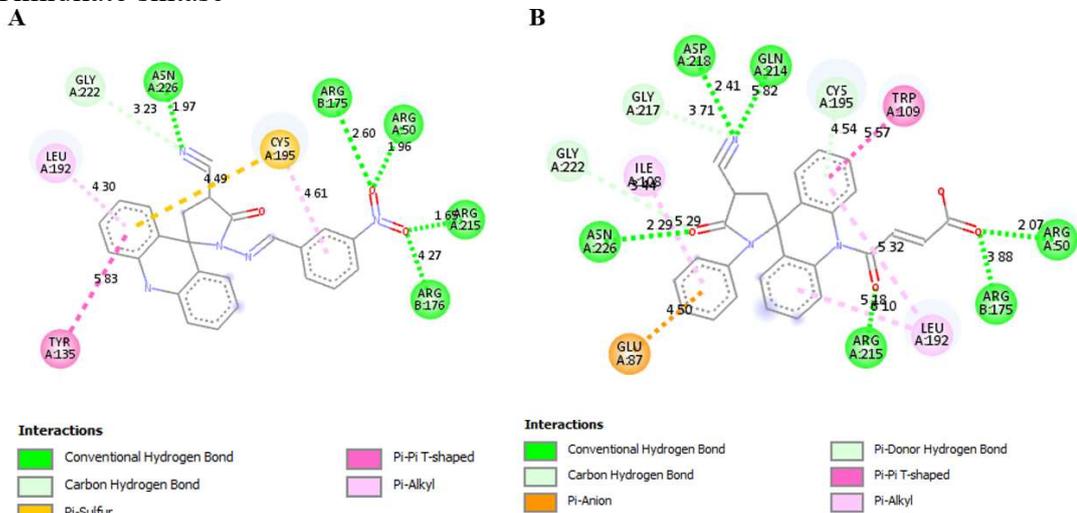
Tabela 8 - Resultados do docking molecular entre os compostos sintetizados, o composto controle e a Timidilato sintase (PDB ID 6QXG)

Compostos	Energia Livre de Ligação (kcal mol ⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
AMTAC-04	-11.13	6.95
AMTAC-06	-8.44	652.66
AMTAC-17	-8.93	285.68
AMTAC-19	-8.30	828.28
ACMD-01	-8.93	286.2
T01	-8.37	729.03
T02	-9.24	169.28
T03	-10.90	10.29
LIGANTE (<i>Redocking 0.28</i>)	-11.54	3.47

Fonte: Aatoria (2021).

Como observado na Tabela 8 os compostos AMTAC-04 e T-03 apresentaram melhor interação com o alvo, com valores de Energia Livre de Ligação mais próximas aos obtidos para o ligante co-cristalizado 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato. Como demonstrado na figura 16, os compostos AMTAC-04 e T-03 interagiram com o alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG) principalmente por ligação de hidrogênio e ligação de carbono e hidrogênio, observando-se também interações por empilhamento π - π , π -Alquil, π -Cátion, π -Ânion e ligação de carbono e hidrogênio. A presença de anéis aromáticos e grupos aceptores de ligações de hidrogênio foram essenciais para interação com o alvo.

Figura 16 - Docking do composto AMTAC-04 (A) e do composto T-03 (B) no alvo Timidilato sintase

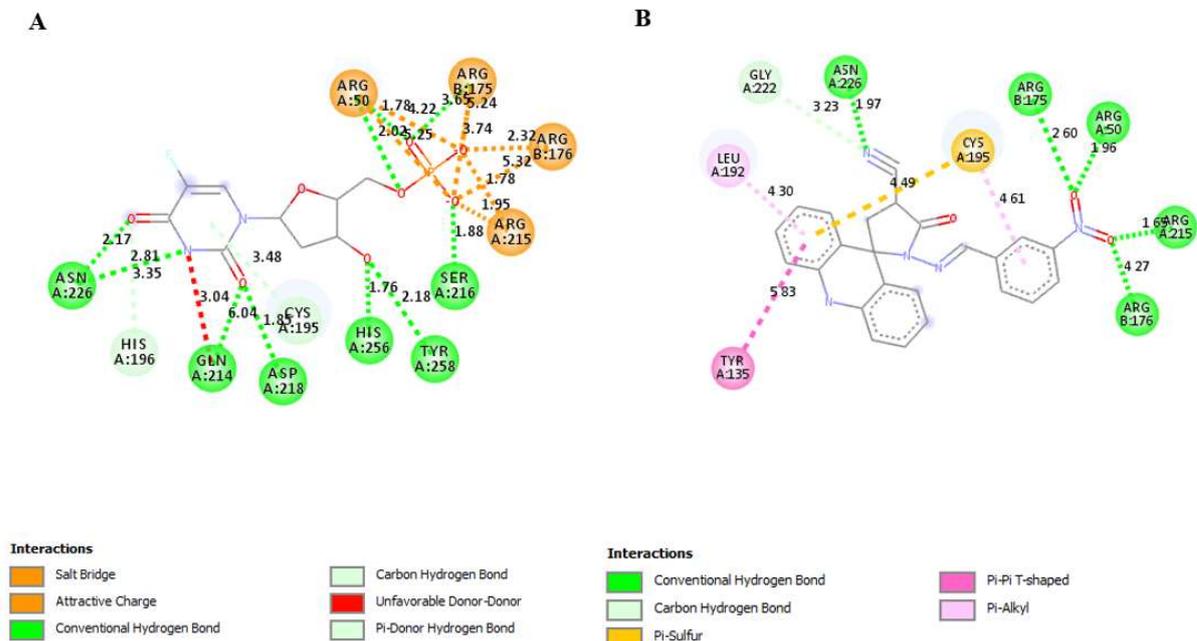


Fonte: Aatoria (2021).

O AMTAC-04 apresentou o melhor resultado entre todos os compostos, com valores de $\Delta G = -11.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i = 6.95 \text{ nM}$, enquanto que, o ligante co-cristalizado apresentou valores de $\Delta G = -11.54 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $K_i = 3.47 \text{ nM}$. As interações realizadas entre o AMTAC-04 e o ligante co-cristalizado com o alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG) podem ser observadas na figura 17. Segundo a literatura, os aminoácidos Arg50, Ser216, Asn226 e Asp218 são essenciais para a interação com inibidores da TS (AMIN *et al.*, 2019).

Ao observar a figura 17, nota-se que as interações do tipo ligação de hidrogênio ocorrem de forma maioritária para ambos compostos, demonstrando papel fundamental para inibição deste alvo. Podemos evidenciar a interação entre os grupos aceptores de ligação de hidrogênio e os aminoácidos ASN 226 e ARG 50, realizada por ambas moléculas. Apesar do composto AMTAC-04 não realizar o mesmo número de interações com o alvo, nem as ligações de caráter iônico como o ligante co-cristalizado, ele é capaz de interagir com o alvo através de empilhamento π - π , π -Alquil e π -Enxofre, o que poderia justificar os valores semelhantes de ΔG encontrados entre o mesmo e o ligante.

Figura 17 - Docking do ligante co-cristalizado (A) e do composto AMTAC-04 (B) no alvo Timidilato sintase



Fonte: Aatoria (2021).

5.4 Estudo Biológico

Apesar dos resultados favoráveis obtidos para todos os compostos no estudo de *docking* molecular, a atividade citotóxica frente a linhagem celular HCT-116 (carcinoma colorretal humano) e L929 (fibroblasto murino) foi determinada apenas para os compostos da série AMTAC. Como não foi possível realizar a caracterização estrutural dos compostos T-01, T-02 e T-03, os mesmos não foram incluídos nesse estudo.

Para avaliar o potencial citotóxico das amostras em estudo, utilizou-se a seguinte escala: amostra sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%). Todas as amostras foram testadas na concentração de 50 μ M, apresentando citotoxicidade conforme a tabela abaixo (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito dos compostos da série AMTAC na viabilidade das células HCT-116 e L929, após 72 horas de tratamento

Produtos teste/ linhagens celulares	% de inibição			
	HCT- 116	Erro	L929	Erro
AMTAC-04	82,9*	0,721	39,3*	0,241
AMTAC-17	84,7*	0,758	49,2*	0,376
AMTAC-19	88,5*	0,585	70,4*	1,749

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de um experimento independente em triplicata ou quadruplicata, testado na concentração de 50 μ M. Em vermelho são destacados os dados que demonstram muita atividade (70 - 100% de inibição). Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Fonte: Aatoria (2021).

Os compostos AMTAC-04, AMTAC-17, AMTAC-19 apresentaram boa atividade citotóxica para a linhagem HCT-116 (carcinoma colorretal humano), com percentuais de inibição de 82,9; 84,7 e 88,5 % do crescimento celular, respectivamente. Quando analisada a citotoxicidade em células normais linhagem L929 (fibroblasto murino), pode-se observar que o aumento da atividade citotóxica sobre células HCT-116 também correspondeu ao aumento da atividade citotóxica sobre células L929. Na Linhagem L929 a AMTAC-04 e

AMTAC-17 foram menos citotóxicas (39,3 e 49,2% de inibição do crescimento celular, respectivamente), enquanto que a AMTAC-19 foi mais citotóxica, com percentual de 70,4 %.

Dentre os compostos analisados, o AMTAC-04 foi aquele que apresentou melhor resultado no estudo *in vitro*. O valor obtido de 82,9 % de inibição para células HCT-116 e 39,3 % para a linhagem L929 demonstra que o AMTAC-04 apresenta potencial atividade antitumoral e melhor seletividade que os demais compostos testados.

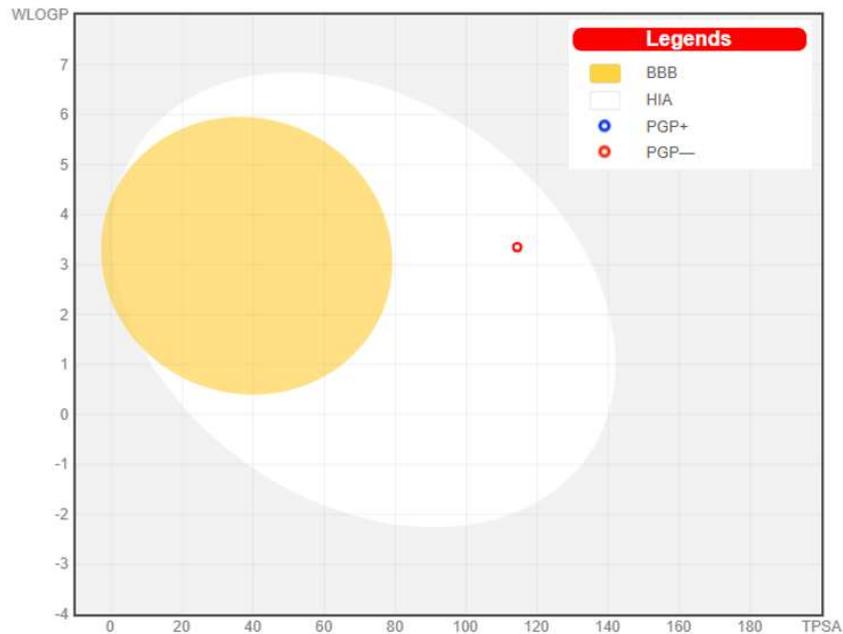
É possível notar que os resultados obtidos no estudo *in vitro* corroboram com aqueles obtidos no estudo *in silico* de *docking* molecular, demonstrando o potencial antitumoral para todos os composto da série AMTAC, em especial a AMTAC-04.

5.5 Predições Farmacocinéticas

Devido os promissores resultados obtidos para o AMTAC-04 no estudo de *docking* molecular e no estudo *in vitro* de citotoxicidade, o mesmo foi selecionado para posterior estudo farmacocinético *in silico* usando os programas SwissADME e pkCSM.

A absorção gastrointestinal e hematoencefálica (BBB) são dois fatores importantes e decisivos no processo de desenvolvimento de uma droga, e são fundamentais na escolha da via de administração, escolha de alvos farmacológicos e previsão de alguns efeitos indesejáveis. Nesse contexto, o modelo Boiled-Egg disponível no SwissADME permite avaliar a absorção gastrointestinal e a permeação cerebral de diferentes moléculas em função da posição das mesmas no WlogP (coeficiente de partição n-octanol/água de Wildman e Crippen) versus no TPSA (área de superfície polar topológica). A região branca representada no modelo (Figura 18) corresponde a área de alta probabilidade de absorção passiva pelo trato gastrointestinal, já a região amarela representa alta probabilidade de penetração no cérebro (DAINA; ZOETE, 2016).

Como demonstrado na figura 18 o composto AMTAC-04 apresentou alta probabilidade de ser absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo esta uma característica extremamente importante para fármacos destinados a administração por via oral (CHOWDHURY; HOSSAIN; RAFE, 2020). A capacidade de permear a barreira hematoencefálica (BBB) apesar de ser uma característica fundamental para a distribuição de moléculas com ação central, está atrelada ao surgimento de efeitos indesejáveis. O AMTAC-04 não foi capaz de permear a BBB, mas para tal composto cujo alvo planejado é o câncer de cólon, tal característica pode implicar em maior seletividade e redução de efeitos neurotóxicos (DAINA; ZOETE, 2016).

Figura 18 - Modelo Boiled-Egg

Legenda: BBB = barreira hematoencefálica; TGI = trato gastrointestinal

PGP⁺ = substrato da glicoproteína P; PGP⁻ = não substrato da glicoproteína P.

Fonte: Adaptado de *SwissADME* (2021).

Adicionalmente, o SwissADME demonstrou que o AMTAC-04 enquadra-se na “regra dos 5” de Lipinski, descrita anteriormente. Esse resultado sugere que o composto é passível de sofrer absorção intestinal, corroborando com os achados para o modelo *Boiled-Egg*.

O modelo Boiled-Egg também permite identificar se os compostos são potenciais substratos para a Glicoproteína P (P-gp). A P-gp é codificada nos humanos pelo gene de resistência a múltiplas drogas (ABCB1) e funciona como um transportador transmembrana dependente de ATP. A P-gp é expressa em diversos tecidos, incluindo intestino, placenta, rins e membrana apical da BBB. Elas atuam impedindo a absorção de algumas substâncias pelos tecidos podendo também mediar o processo de excreção de diferentes biomoléculas e metabólitos (ZHONG *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2014).

A expressão da P-gp nos tecidos pode provocar o efluxo de muitas drogas terapêuticas diminuindo sua concentração intracelular, podendo ocasionar resistência a múltiplas drogas e consequente falha na quimioterapia. Diferentes drogas quimioterápicas anticâncer como doxorrubicina e paclitaxel são substratos da P-gp. De tal modo a P-gp é determinante no processo de resistência a drogas, especialmente para os quimioterápicos anticânceres (ZHONG *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2014). Nesse contexto, utilizou-se os dados obtidos no *SwissADME* e no pkCSM para prever se o AMTAC-04 é um provável substrato ou inibidor da P-gp, conforme está demonstrado na tabela 10.

Tabela 10 - Relação entre a molécula estudada e a glicoproteína P

Composto	SwissADME	pkCSM		
	Substrato P-gP	Substrato P-gP	Inibidor P-gP I	Inibidor P-gP II
AMTAC-04	Não	Sim	Sim	Sim

Fonte: Autoria (2021).

Observa-se na tabela 10 que houve divergência entre os resultados obtidos no *SwissADME* e *pkCSM* quanto o potencial do AMTAC-04 ser substrato ou não para glicoproteína P. A capacidade de ser substrato da P-gp é uma característica desfavorável devido sua relação intrínseca com o processo da resistência a quimioterápico anticâncer. Desse modo, é fundamental a realização de estudos mais detalhados e precisos.

Os fatores determinantes para uma molécula tornar-se substratos da P-gp são diversificados e complexos. Em estudo desenvolvido por Didziapetris *et al.* (2013), eles observaram que grandes compostos aceitadores de ligação de hidrogênio e compostos básicos são mais prováveis de serem substrato da P-gp, do que pequenas moléculas, compostos com baixa capacidade de ligação de hidrogênio e compostos ácidos.

Em humanos a P-gp apresenta duas isoformas, onde a de classe I está relacionada ao transporte de drogas e a de classe II está relacionada com a exportação de fosfatidilcolina para a bile (AMIN, 2013). Inibidores da P-gp são responsáveis por aumentar o acúmulo intracelular de seus substratos, desse modo, a inibição da P-gp pode originar efeitos negativos, como aumentar a biodisponibilidade de alguns fármacos para níveis potencialmente perigosos, ou efeitos positivos, como melhorar a eficácia dos anti-neoplásicos através do bloqueio seletivo (ARAÚJO, 2015). O estudo de inibição das isoformas I e II da P-gp, demonstrou que o AMTAC-04 foi capaz de inibir as duas isoformas da glicoproteína P.

A solubilidade é um parâmetro fundamental e limitante no processo de absorção e biodisponibilidade das drogas. Apesar de muitos medicamentos comercializados serem classificados como fracamente solúvel, a baixa solubilidade aquosa de um candidato a fármaco pode ocasionar concentrações abaixo do nível terapêutico em ensaios *in vitro* e interromper o processo de desenvolvimento (FINK *et al.*, 2020). Com a utilização dos métodos *in silico* ESOL, ALI e SILICOS-IT disponíveis no *SwissADME* é possível determinar a provável solubilidade em água (Log S) de compostos nas fases iniciais do seu desenvolvimento. Segundo esses métodos, os compostos são definidos como insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 <

solubilidade moderada $-4 < \text{solúvel} < -2 < \text{muito solúvel} < 0 < \text{altamente solúvel}$ conforme o resultado de Log S.

A tabela 11 exposta abaixo apresenta o resultado de solubilidade aquosa para o composto AMTAC-04 estudado segundo os métodos ESOL, ALI e SILICOS-IT e suas respectivas classificações. Conforme demonstrado, a AMTAC-04 foi moderadamente solúvel no método ESOL e pouco solúvel no método ALI e SILICOS-IT.

Tabela 11 - Determinação da solubilidade aquosa do composto AMTAC-04

Compostos	Log S (ESOL)	Log S (Ali)	Log S (SILICOS-IT)	Classificação
AMTAC-04	-5,20	-6,12	-7,01	MS\ PS \PS

Legenda: MS= Moderadamente Solúvel; PS= Pouco solúvel

Fonte: Aatoria (2021).

As enzimas do citocromo P450 (CYPs) desempenham papel crucial no metabolismo dos fármacos, e alterações em sua expressão ou função pode resultar em percas significativas para o paciente. A inibição de um grande número de CYPs pode resultar em efeito tóxicos, sendo esta a principal causa de interações medicamentosas. As principais CYPs codificadas em humanos correspondem a CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4. Os membros da família CYP3A representam 28% do total de CYPs hepáticos, metabolizando quase 50% dos drogas. Os membros da família CYP2D6 representam <2% das CYPs hepáticas, mas são responsáveis pelo metabolismo de aproximadamente 25% das drogas usadas clinicamente (EDAMATSU *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2019). Dentre as reações realizadas por CYPs a mais comum é a hidroxilação de ligações C–H, porém outras reações como epoxidação de ligação dupla C=C, descarboxilação, dessulfuração, desaminação, peroxidações, N-, S- e O-desalquilações e Sulfoxidações também são relatadas (NARDO; GILARDI, 2020).

Com o objetivo de compreender o provável modo de metabolização do composto AMTAC-04, o mesmo foi avaliado quanto sua capacidade de inibir ou de atuar como substrato frente a cinco isoformas das enzimas citocromo P450 (CYP) por intermédio do pkCSM (Tabela 12).

Tabela 12 - Interação do composto AMTAC-04 com as diferentes isoformas das enzimas citocromo P450

Compostos	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6		CYP3A4	
	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Inibidor	Substrato	Inibidor	Substrato
AMTAC-04	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim

Fonte: Aatoria (2021).

Como demonstrado na tabela 12, o AMTAC-04 foi provável de interação com a maioria das isoformas da CYP analisadas, atuando como inibidor e/ou substrato. Ele foi capaz de inibir as isoformas CYP1A2, CYP219 e CYP2C9 e ser substrato apenas da CYP3A4. Apesar de inibir CYPs importantes para o processo de metabolização de muitos fármacos, o AMTAC-04 não foi provável de inibir a CYP3A, que como descrito anteriormente, é responsável pela metabolização de quase 50% das drogas. A capacidade desse composto ser substrato da CYP3A4 demonstra que ele é passível de metabolização, o que diminui as chances do mesmo se acumular no organismo e provocar efeitos tóxicos.

Nos estudos farmacocinéticos *in silico*, o AMTAC-04 apresentou-se promissor, com potencial absorção gastrointestinal e consequente perfil para ser administrado por via oral, não sendo passivo de permear a barreira hematoencefálica. Adicionalmente, ele apresentou provável atividade inibitória frente a Glicoproteína P, bem como a capacidade de atuar como inibidor ou substratos para diferentes isoformas da CYP450. Sua capacidade de atuar como inibidor ou substrato da Glicoproteína P não ficou clara.

6 COSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos foram sintetizados de modo satisfatório e caracterizados físico-quimicamente, apresentando bom rendimento reacional e aceitável grau de pureza para estudos preliminares.

Os compostos da série AMTAC tiveram suas estruturas químicas elucidadas por meio das técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , EM e IV. Para a segunda série, foi possível apenas a realização do IV do composto T-01, o qual demonstrou bandas de absorção características de grupos funcionais propostos na estrutura.

No estudo de *docking* molecular com o alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG) realizado com todos os compostos, o AMTAC-04 foi o mais promissor, com valores de ΔG e K_i semelhantes aos obtidos para o ligante cocriticalizado.

Na avaliação da atividade citotóxica *in vitro* o composto AMTAC-04 foi o mais promissor, pois apresentou bom perfil de inibição (82,9 %) frente a linhagem celular HCT-116 e menor citotoxicidade em células normais.

O estudo *in silico* de ADME realizado para o composto mais promissor AMTAC-04, demonstrou que o mesmo é condizente com critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, apresenta potencial absorção gastrointestinal e é provável de atuar como inibidor ou substrato de diferentes isoformas da CYP450. Sua capacidade de atuar como inibidor ou substrato da Glicoproteína P não ficou clara.

Devido a pandemia do COVID-19, não foi possível realizar a elucidação estrutural dos compostos espiro-acridínicos ácidos e posteriormente avaliar sua atividade citotóxica *in vitro* frente linhagens celulares tumorais. Desse modo, pretende-se dar continuidade a esta pesquisa assim que possível.

REFERÊNCIAS

- ALQAHTANI, S. In silico ADME-Tox modeling: progress and Prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, 2017.
- ALMEIDA, S. M. V. *et al.* New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p.467-475, nov. 2016.
- ALPHONSA, T. A. (E)-1-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-yl)-3-phenyl prop-2-en-1-ones: Design, synthesis, anti-cancer activity and molecular docking studies. **Chemical Data Collections**, v. 25, p. 100310, 2020.
- AMARAL, A. T. *et al.* A evolução da Química Medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da Sociedade Brasileira de Química. **Química Nova**, p. 694-700, 2017.
- AMIN, L. H. T. *et al.* Design, synthesis, anticancer evaluation and docking studies of new pyrimidine derivatives as potent thymidylate synthase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, p. 103159, 2019.
- AMIN, M. L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. **Drug Target Insights**, Auckland, v. 7, p. 27-34, 2013.
- ARAÚJO, A. P. L. M. G. **O papel da glicoproteína-P nas interações fármaco-fármaco**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.
- BANERJEE, A. *et al.* Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 1224–1232, 2017.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa, 2007.
- BIRKETT, R. T. *et al.* Elective colon resection without curative intent in stage IV colon cancer. **Surgical Oncology**, v. 28, p. 110–115, 2019.
- BISSARO, M.; STURLESE, M.; MORO, S. The rise of molecular simulations in fragment-based drug design (FBDD): an overview. **Drug Discovery Today**, 2020.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 39 424, 2018.
- CAPPELL, M. S. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. **Gastroenterology clinics of north america**, v. 37, p. 1–24, 2008.
- CHAGAS, M. B. O. **Avaliação da atividade anticâncer e mecanismo de ação de novos agentes acridínicos**. 2016. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

- CHEN, K. *et al.* New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, p. 1074–1084, 2015.
- CHEN, R. *et al.* Design, Synthesis, Antimicrobial, and Anticancer Activities of Acridine Thiosemicarbazides Derivatives. **Molecules**, v. 24, p. 2-15, 2019.
- CHOWDHURY, S. M.; HOSSAIN, M. N.; RAFF, M. R. In silico design and evaluation of novel 5-fluorouracil analogues as potential anticancer agents. **Heliyon**, v. 6, p. e04978, 2020.
- CROSS, J.B. *et al.* Comparison of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 1455–1474, 2009.
- DAI, Q. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel phthalazinone acridine derivatives as dual PARP and Topo inhibitors for potential anticancer agents. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, p. 404–408, 2019.
- DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, p. 1117– 1121, 2016.
- DIAS, R.; AZEVEDO JR, W. F. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 1040-1047, 2008.
- DING, P. Q. *et al.* Obesity and Its Impact on Outcomes in Patients With Stage III Colon Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy. **Clin. Colorectal Cancer**, 2020.
- DOKOUMETZIDIS, A; VALSAMI, G.; MACHERAS, P. Modelling and simulation in drug absorption processes. **Xenobiotica**, v. 37, n. 10–11, p. 1052–1065, 2007.
- EDAMATSU, H. *et al.* Identification and *in silico* prediction of metabolites of tebufenozide derivatives by major human cytochrome P450 isoforms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2020.
- ELOKELY, K. M.; DOERKSEN R. J. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 8, p. 1934–1945, 2013.
- FINK, C. Identification of solubility-limited absorption of oral anticancer drugs using PBPK modeling based on rat PK and its relevance to human. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2020.
- GAO, Q. *et al.* IRE1 α -targeting downregulates ABC transporters and overcomes drug resistance of colon cancer cells. **Cancer Lett.** v. 476, p. 67–74, 2020.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity: a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, Oxford, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GLEESON, M P.; HERSEY, A.; HANNONGBUA, S. In-Silico ADME Models: A General Assessment of their Utility in Drug Discovery Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 358-381, 2011.

GOUVEIA, R. G. *et al.* . Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel spiro-acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 26, n. 22, p. 5911-5921, 2018.

GOUVEIA, R. G. **Síntese, caracterização estrutural e avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos derivados espiro-acridínicos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, 2010.

HU, T. *et al.* Reversal of P-glycoprotein (P-gp) mediated multidrug resistance in colon cancer cells by cryptotanshinone and dihydrotanshinone of *Salvia miltiorrhiza*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1264–1272, 2014.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Goes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p. 120, 2019.

KISHIKI, T. *et al.* The impact of tumor location on the biological and oncological differences of colon cancer: Multi-institutional propensity score-matched study. **American Journal of Surgery**, v. 217, 2019.

LEE, S. Y. *et al.* Nutritional risk screening score is associated with omission of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. **American Journal of Surgery**, 2020.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Beyond Bioisosterism: New Concepts in Drug Discovery. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**, v. 1–8, 2017.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

MEANWELL, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 2529–2591, 2011.

MEHTA, A.; PATEL, B. M. Therapeutic opportunities in colon cancer: Focus on phosphodiesterase inhibitors. **Life Sciences**, v. 230, p. 150–161, 2019.

MENG, X., *et al.* Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, p. 146-157, 2011.

MIKOVSKI; D. *et al.* Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 13, 2018.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MOURA, R. O. **Síntese e avaliação in vitro de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos, pirimidínicos e piridínicos acridínicos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

NARDO, G. D.; GILARDI, G. Natural Compounds as Pharmaceuticals: The Key Role of Cytochromes P450 Reactivity. **Trends in Biochemical Sciences**, 2020.

PAVIA, D. L.; *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage, 2015.

PEDERSEN, M. R. V. *et al.* Reporting colon cancer staging using a template. **European Journal of Radiology Open**, v. 7, p. 100213, 2020.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Recent Advances in the Chemistry of Acridines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 115, 2015.

SEGUNDO, M. A. S. **Desenvolvimento, avaliação preliminar da atividade antiproliferativa e incremento de solubilidade de novos derivados espiro-acridínicos**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

SHOICHET, B. K. *et al.* Lead discovery using molecular docking. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 439–446, 2002.

SILVA, D. K. F. *et al.* Antitumor effect of a novel spiro-acridine compound is associated with up-regulation of Th1-type responses and antiangiogenic action. **Molecules**, v. 25, p. 1–9, 2019.

SILVA, J. M. **Planejamento e desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quinolínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.

SINGH, A.; JANA, N. K. Discovery of potential Zika virus RNA polymerase inhibitors by docking-based virtual screening. **Computational Biology and Chemistry**, Oxford, v. 71, p. 144-151, 2017.

SLEDZ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p. 93–102, 2018.

SOBICH, J. *et al.* Thymidylate synthase-catalyzed, tetrahydrofolate-dependent selfinactivation by 5-FdUMP. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 674, p. 108106, 2019.

STILLHART, C. *et al.* Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations—An UNGAP review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 147, p. 105280, 2020.

TAIEB, J.; ANDRÉ, T.; AUCLIN, E. Refining adjuvant therapy for non-metastatic colon cancer, new standards and perspectives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 75, p. 1–11, 2019.

TAO, L. *et al.* Recent progresses in the exploration of machine learning methods as in-silico ADME prediction tools. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2015.

WANG, D. *et al.* In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 48, n. 4, p. 488–515, 2015.

WU, J. *et al.* Molecular probes for human cytochrome P450 enzymes: Recent progress and future perspectives. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 427, p. 213600, 2021.

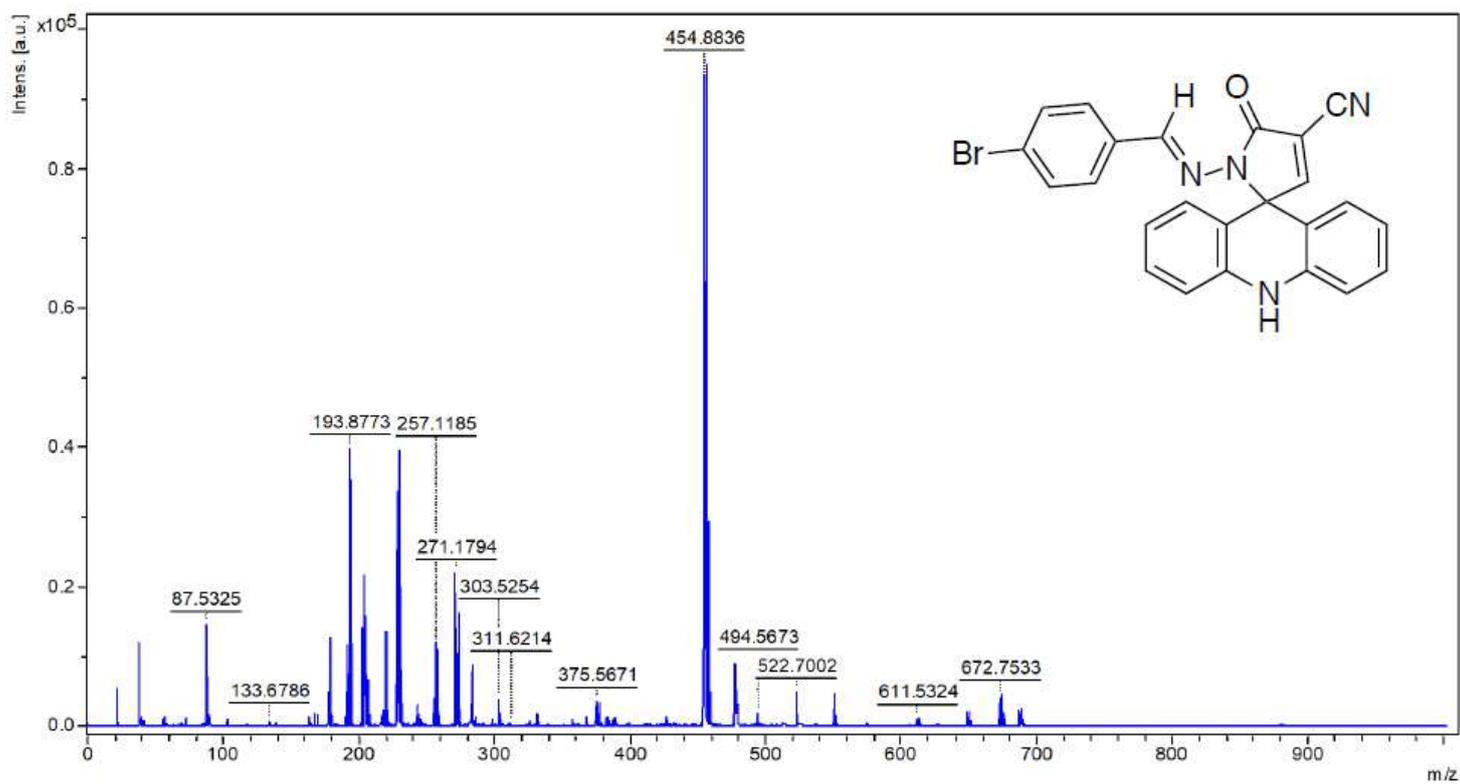
YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G. J.; SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 48, n. 7, p. 1411-1422, 2008.

ZHAO, L. *et al.* Strategies for the development of highly selective cytochrome P450 inhibitors: Several CYP targets in current research. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, p. 2016–2024, 2019.

ZHONG, M. E. *et al.* Serum extracellular vesicles contain SPARC and LRG1 as biomarkers of colon cancer and differ by tumour primary location. **EBioMedicine**, v 50, p. 211–223, 2019.

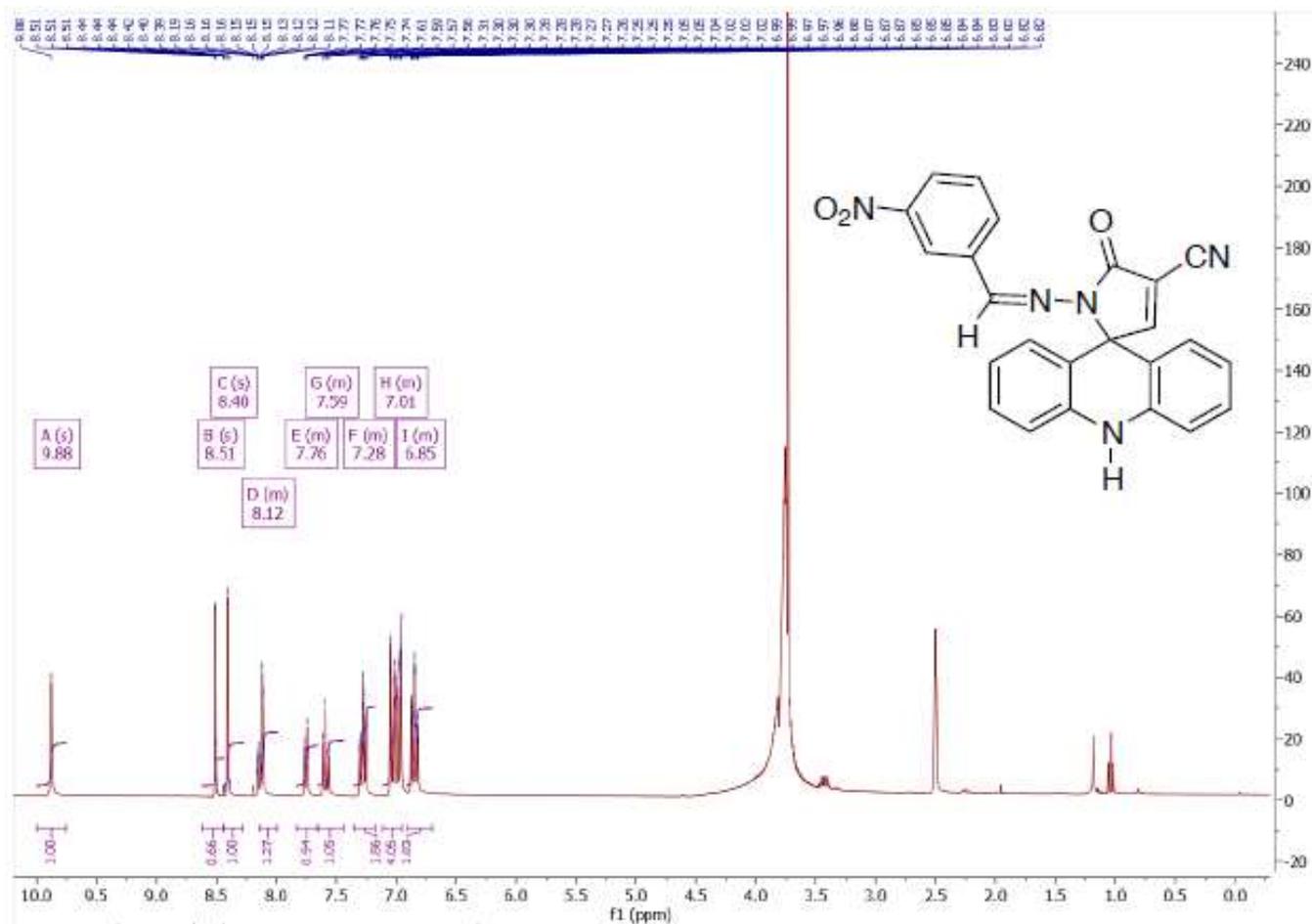
ZHONG, J, *et al.* Canagliflozin inhibits p-gp function and early autophagy and improves the sensitivity to the antitumor effect of doxorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 175, p. 113856, 2020.

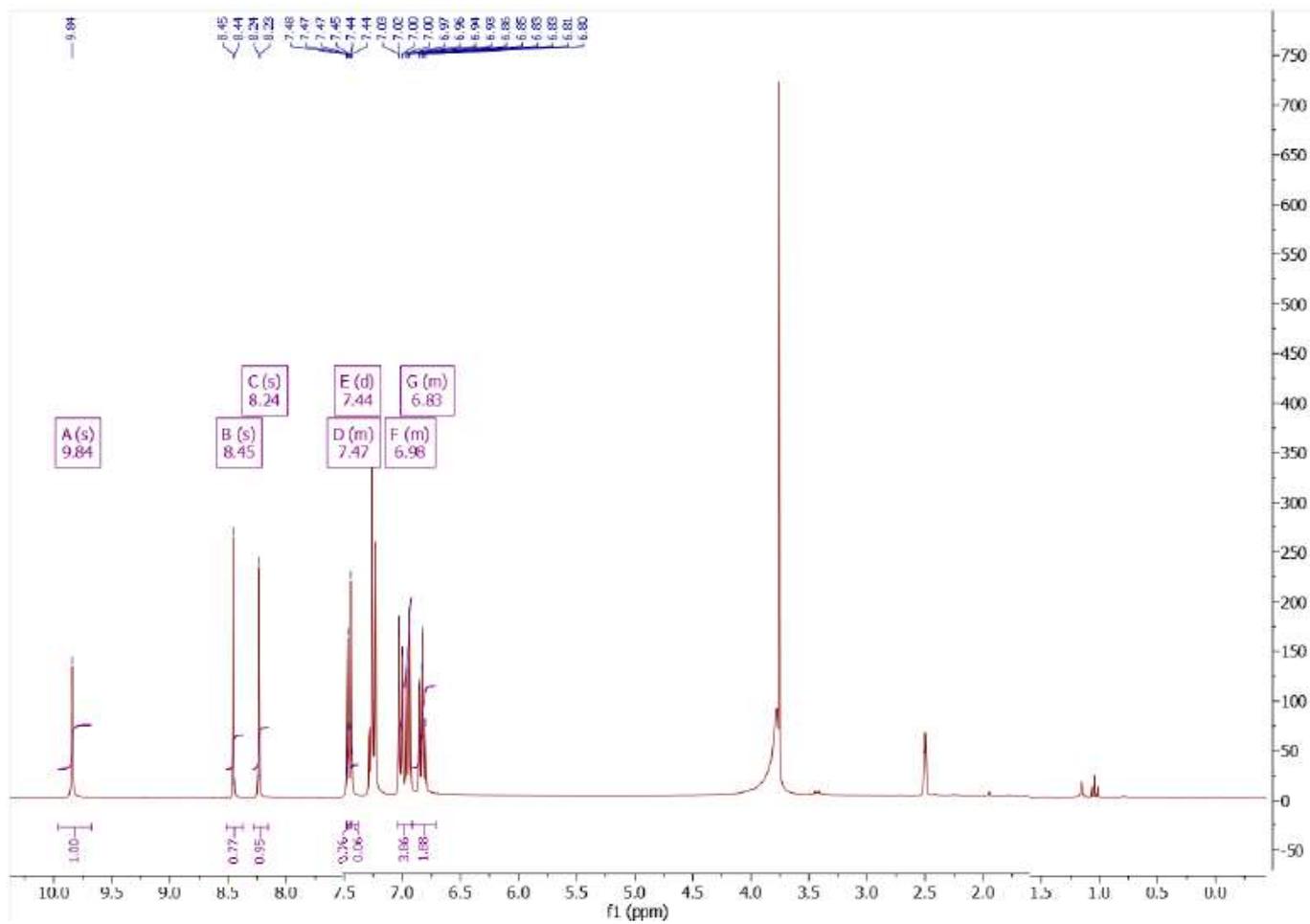
ANEXO 3- Espectro de massa da molécula AMTAC-19

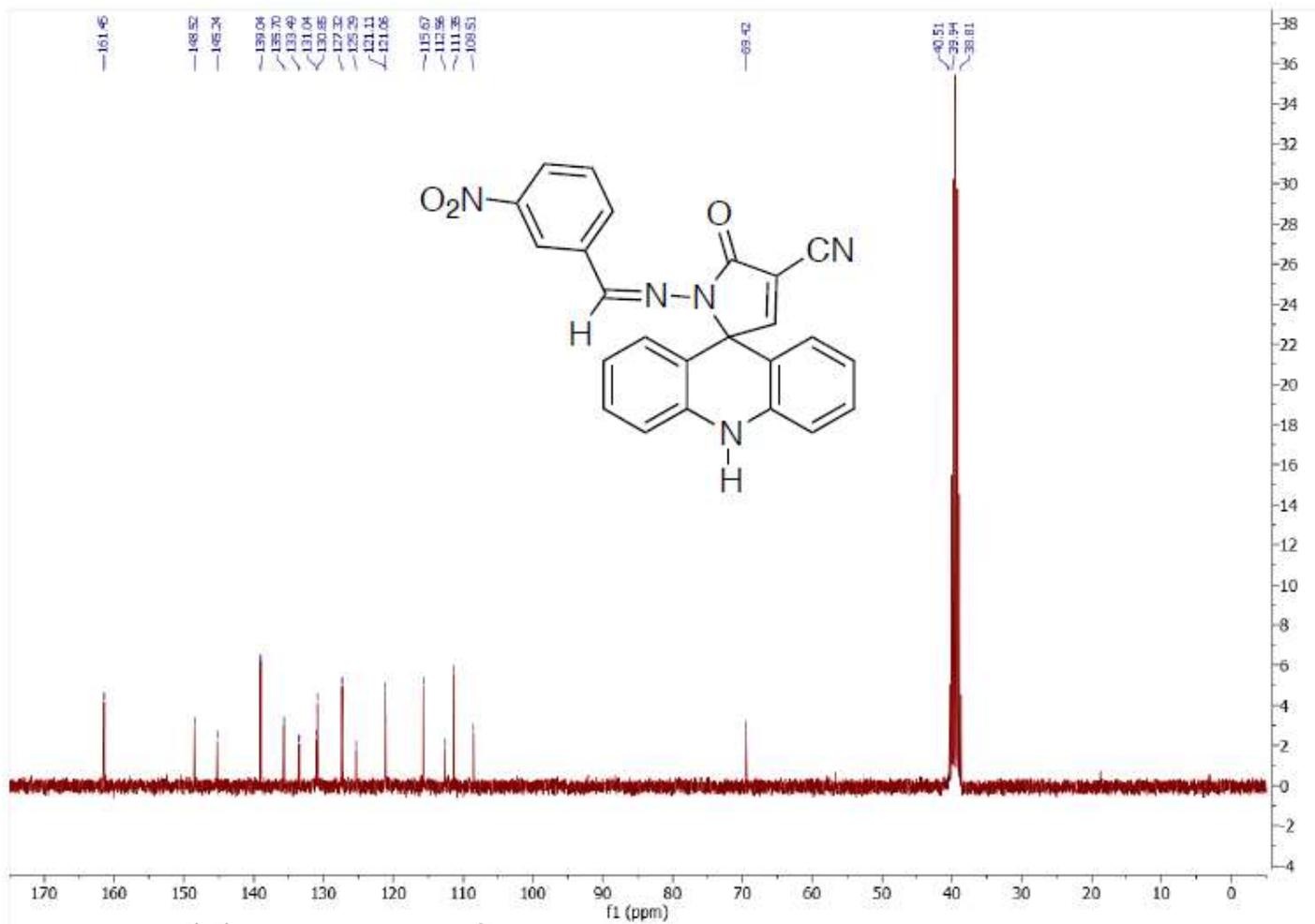


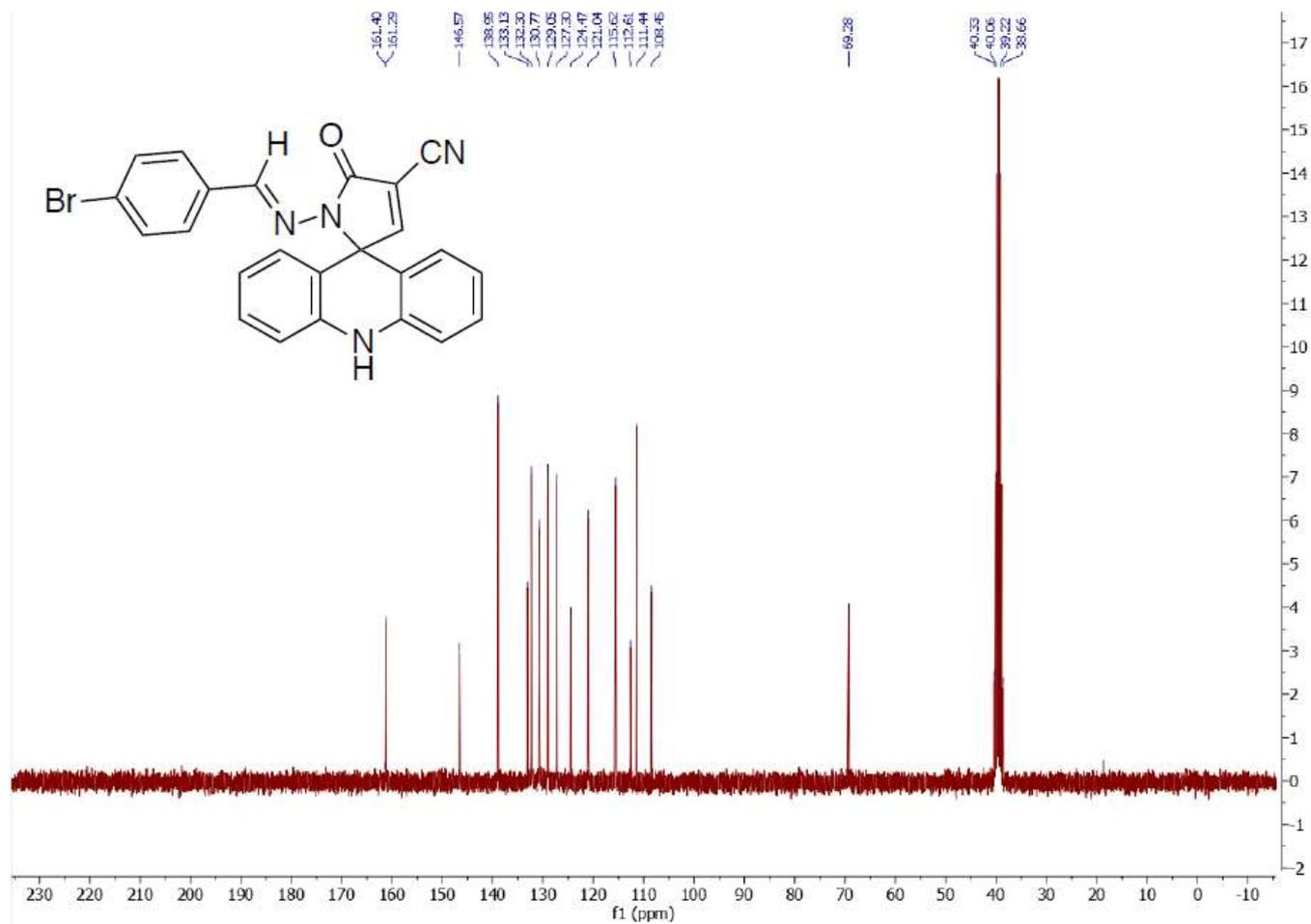
ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA SÉRIE AMTAC

ANEXO 4 – Espectro de RMN de ^1H da AMTAC-04



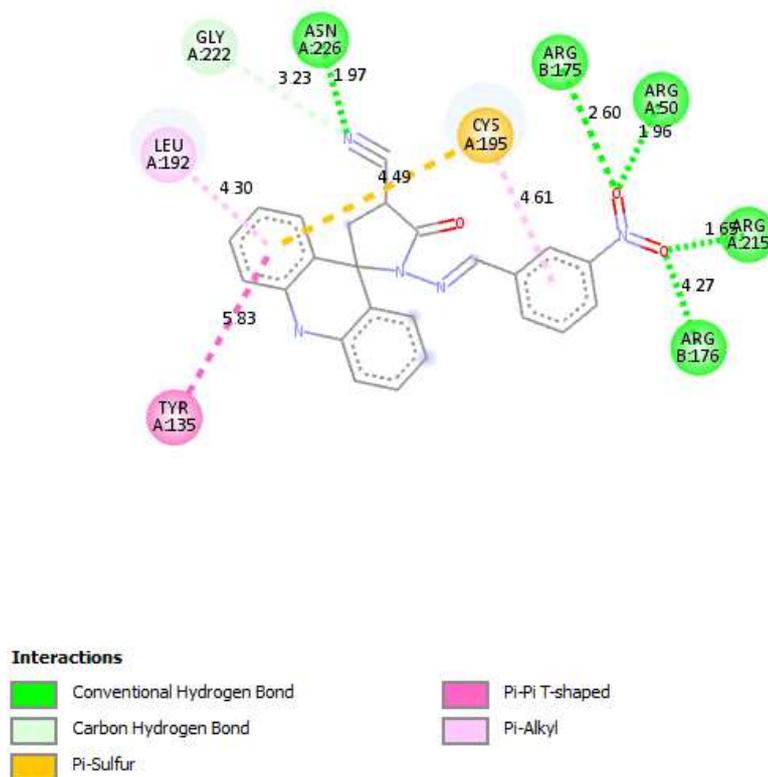
ANEXO 5 – Espectro de RMN de ^1H da AMTAC-19

ESPECTROS DE RMN ^{13}C DA SÉRIE AMTACANEXO 6 - Espectros de RMN ^{13}C da molécula AMTAC-04

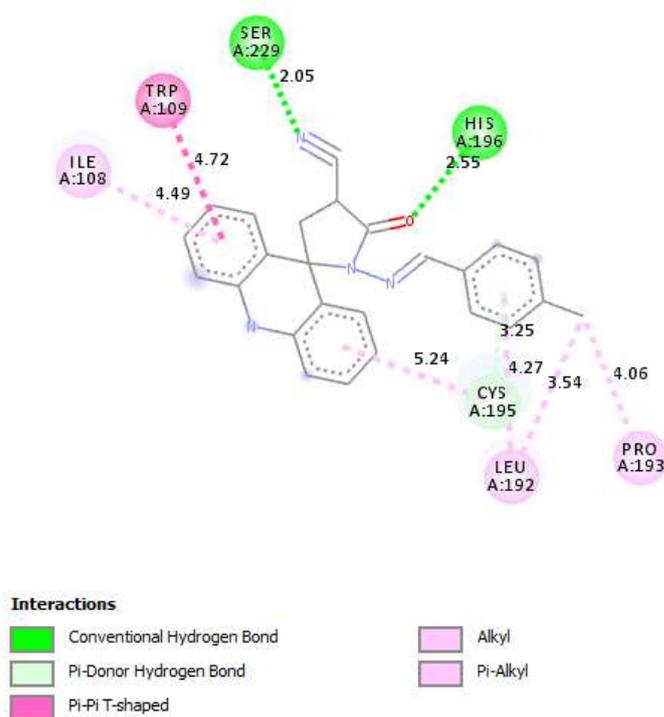
ANEXO 7 - Espectros de RMN ^{13}C da molécula AMTAC-19

DOCKING MOLECULAR DE TODOS OS COMPOSTOS SINTETIZADOS

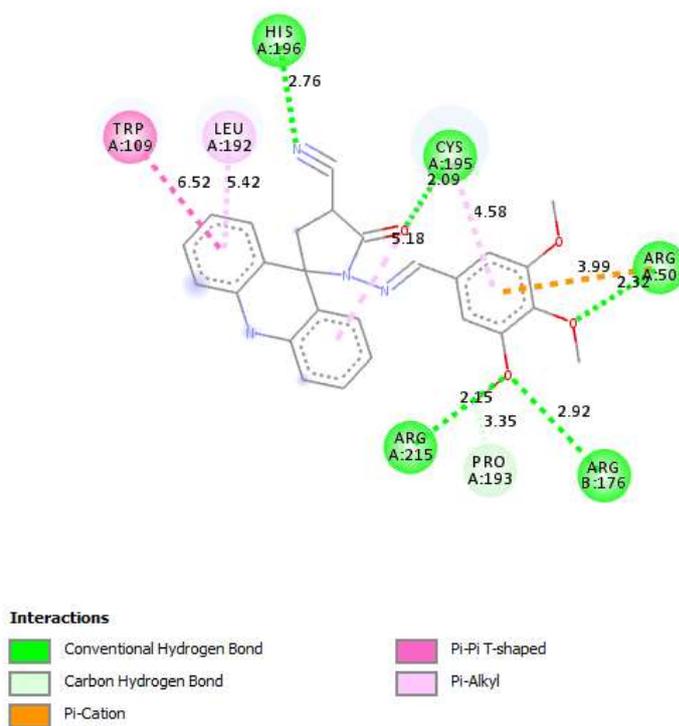
ANEXO 8 - Docking molecular da molécula AMTAC-04 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



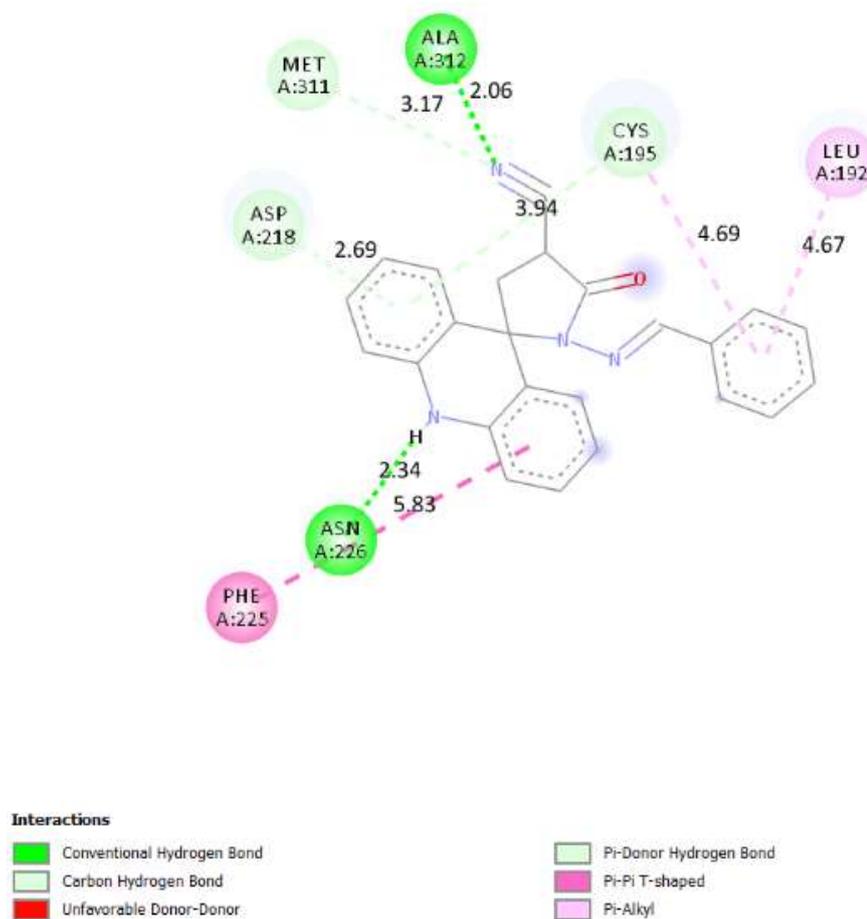
ANEXO 9 - Docking molecular da molécula AMTAC-06 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



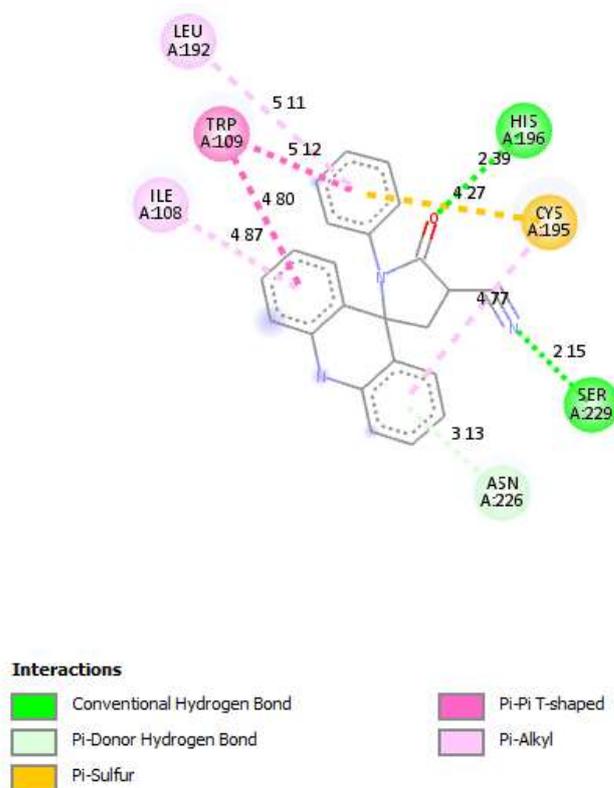
ANEXO 10 - Docking molecular da molécula AMTAC-17 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



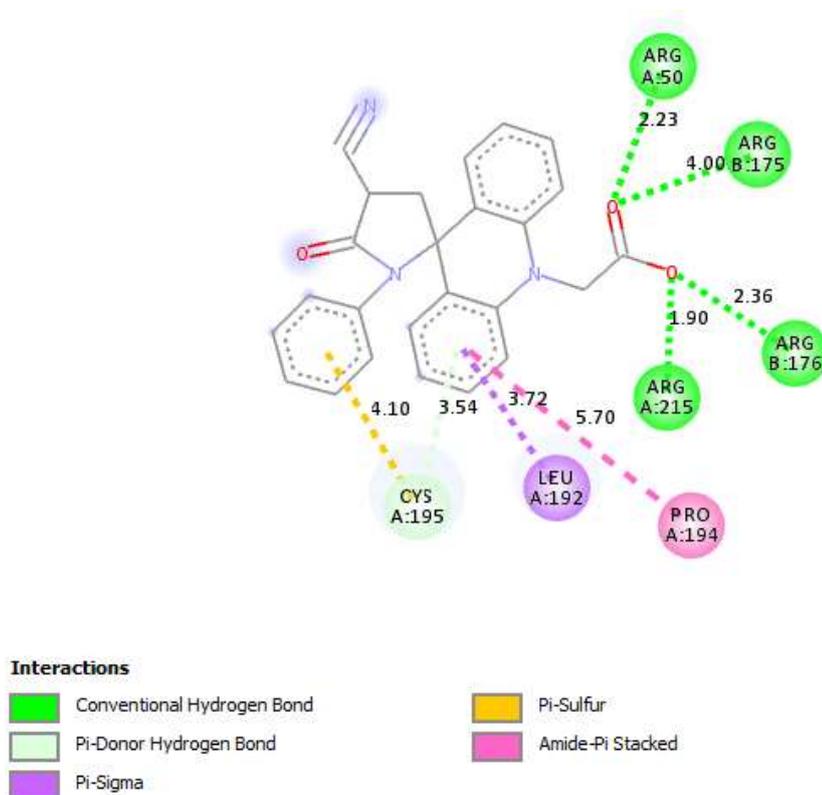
ANEXO 11 - Docking molecular da molécula AMTAC-19 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



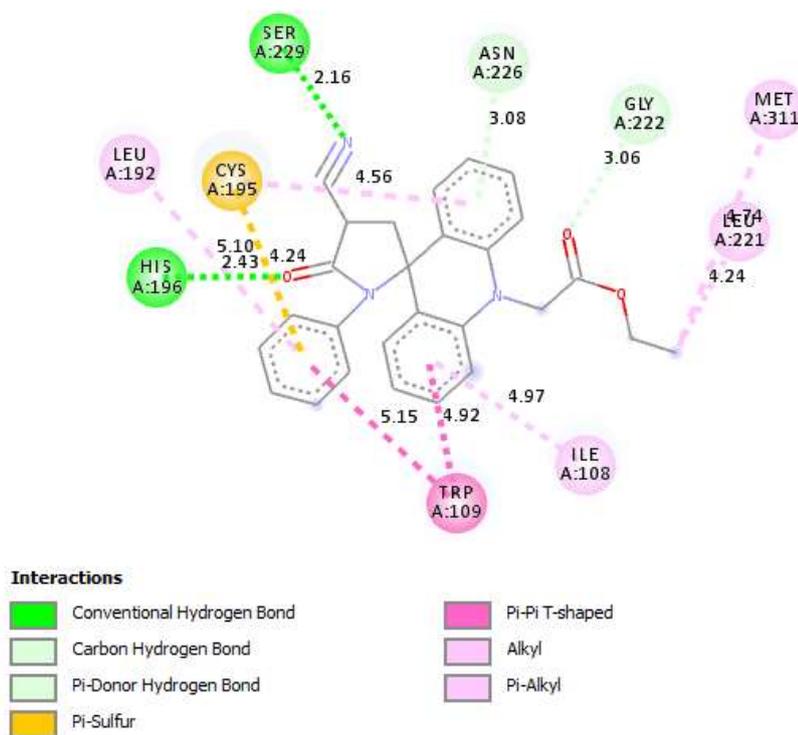
ANEXO 12 - Docking molecular da molécula ACMD-01 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



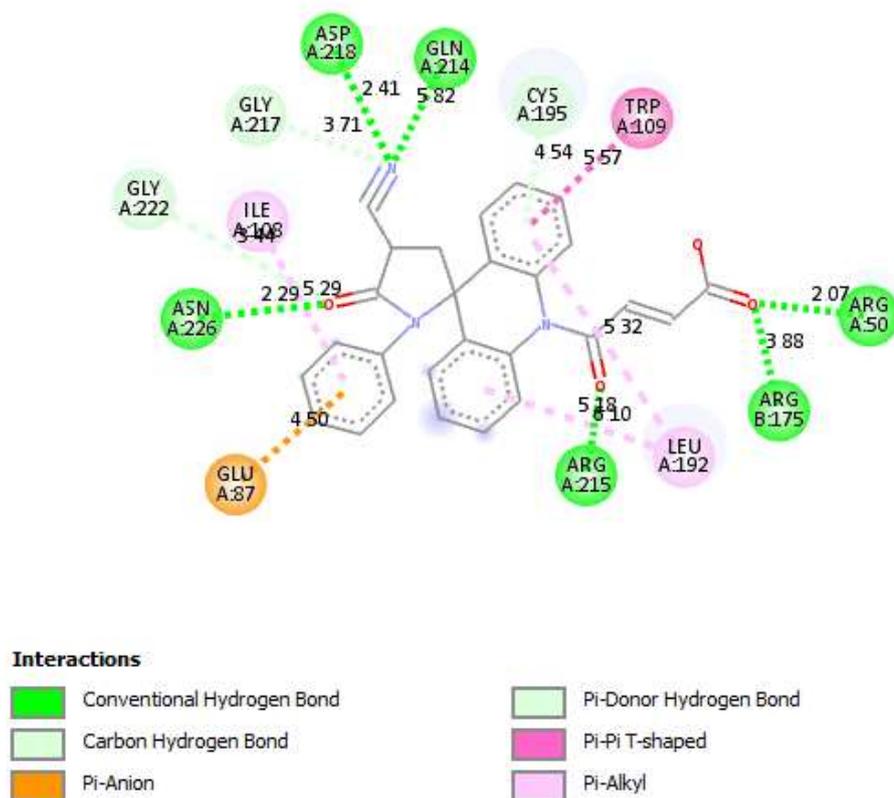
ANEXO 13 - Docking molecular da molécula T-01 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



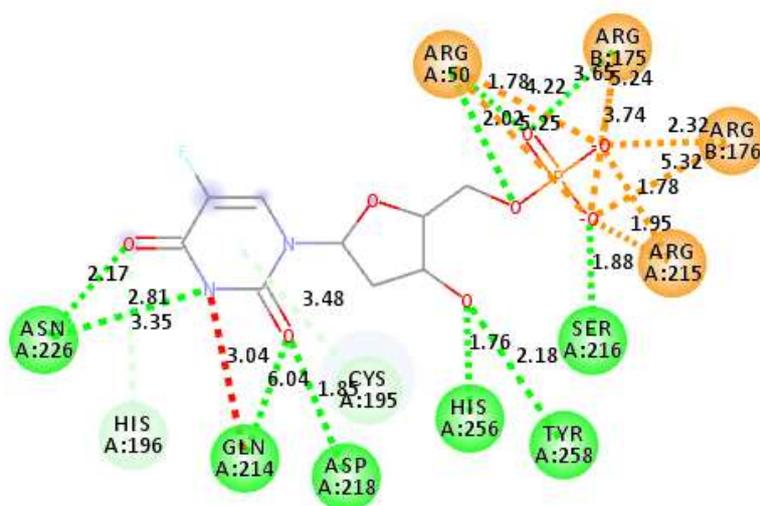
ANEXO 14 - Docking molecular da molécula T-02 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



ANEXO 15 - Docking molecular da molécula T-03 no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



ANEXO 16 - Docking molecular do ligante co-cristalizado 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato no alvo timidilato sintase (PDB ID 6QXG)



Interactions

	Salt Bridge		Carbon Hydrogen Bond
	Attractive Charge		Unfavorable Donor-Donor
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Donor Hydrogen Bond