



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

VANESSA DE LIMA SERAFIM

**SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
POTENCIAIS FÁRMACOS ANTITUMORAIS E ANTIMALÁRICOS DE
DERIVADOS ACILIDRAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS.**

JOÃO PESSOA – PB

2014

VANESSA DE LIMA SERAFIM

SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
POTENCIAIS FÁRMACOS ANTITUMORAIS E ANTIMALÁRICOS DE
DERIVADOS ACILIDRAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS.

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura

JOÃO PESSOA – PB
2014

É expressamente proibida 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 da dissertação.

S481s Serafim, Vanessa de Lima
Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de potenciais fármacos antitumorais e antimaláricos de Derivados Acilidrazônicos-acridínicos. [manuscrito] : / Vanessa de Lima Serafim. - 2014.
81 p. : il.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2014.
"Orientação: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Acridina 2. Atividade antitumoral 3. Atividade antimalárica. I. Título.

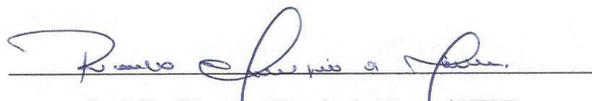
21. ed. CDD 547.2

VANESSA DE LIMA SERAFIM

SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
POTENCIAIS FÁRMACOS ANTITUMORAIS E ANTIMALÁRICOS DE
DERIVADOS ACILIDRAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS.

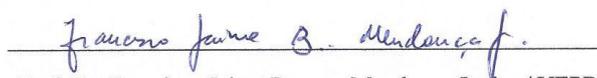
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento as exigências para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2014.



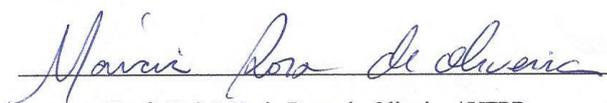
Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura / UEPB

Orientador



Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior / UEPB

Examinador



Profª. Drª. Márcia Rosa de Oliveira / UFPB

Examinadora

DEDICATÓRIA

A Deus, fonte de sabedoria e misericórdia, por nunca me desamparar.

A minha mãe, Aucilene, por toda motivação, amor e cuidado.

Ao meu pai, Valmir, por toda dedicação, incentivo e afeição.

Ao meu irmão, Junior, por todo companheirismo, ternura e cumplicidade.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Ricardo, por todo apoio, paciência e prestatividade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado esta oportunidade e por ter me ajudado a chegar até aqui, sem Ele nada seria, nada sou;

À minha mãe e ao meu pai, por nunca desistirem de mim, por terem lutado comigo todos os dias nesta árdua jornada, e por sempre terem acreditado que eu poderia vencer, mesmo com todas as dificuldades que a vida nos impôs;

A todos de minha família, por todo o apoio moral e financeiro, em especial as minhas tias Aucileide, Luciana, Lucicleide e Veronice, ao meu tio Valdemir, aos meus avós maternos Irani e Antônio e paternos Maria José e Francisco;

Ao querido orientador e amigo, o prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, por todo o conhecimento que me foi passado, pela sua infinita e mais que infinita bondade (risos), paciência e compreensão nos momentos mais difíceis;

Ao prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, por todo o conhecimento, auxílio nas atividades, esclarecimento de dúvidas e grande prestatividade;

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, por toda a prestatividade e contribuição direta para a consolidação deste trabalho,

Aos amigos que ganhei ao conhecer o Movimento dos Focolares, em especial Thaisa, Thairone e Rildo, por todo carinho e unidade;

Aos meus amigos de turma, por cada abraço de conforto, cada risada e cada momento de alegria que passamos juntos;

A Thais, Mayara e Bruno companheiros de turma e “aperreios” acadêmicos, que são também mais que amigos, são irmãos, e que contribuíram de forma direta durante todo esse processo de verdadeira evolução acadêmica e pessoal.

A Flávio, por toda cumplicidade, compreensão e paciência nos momentos mais difíceis, e por me ajudar em cada passo sempre estando ao meu lado.

“O amor se dobra para não se romper”.

Chiara Lubich

RESUMO

A humanidade tem sofrido diversas modificações ao longo dos anos, dentre as quais alterações no estilo de vida acabaram colaborando para o surgimento de doenças. Um dos principais problemas de saúde enfrentados pela humanidade é o câncer, entretanto existe um número limitado de medicamentos para os tratamentos disponíveis no mercado, enfatizando a necessidade urgente de buscar novos agentes. Dentre as opções de tratamento, a quimioterapia tem sido uma das propostas mais bem aceitas para combatê-lo e dentre eles destacamos os derivados acridínicos, que parecem superar mecanismos de resistências. Outro problema de saúde pública são as doenças negligenciadas, a malária tem se destacado por ser uma das mais graves infecções parasitárias da humanidade. Assim o trabalho tem como objetivo a síntese, elucidação estrutural e avaliação potencial antitumoral e antimalárica de novos derivados acridínicos. A síntese dos derivados acilidrazônicos-acridínicos ocorreu de forma paralela e convergente, onde os núcleos são sintetizados separadamente e depois condensados. A primeira etapa consiste na obtenção da 9-metilacridina, seguido de uma oxidação, para obtenção do aldeído acridínico. O método utilizado parte da obtenção da 9-metilacridina através da reação da difenilamina com ácido acético glacial, em seguida é oxidada a aldeído por duas etapas, a primeira consiste na formação de um intermediário reativo através da reação da 9-metilacridina acridina com *N,N*-dimetilnitrosoanilina em meio alcoólico, a segunda consiste em uma oxidação em meio ácido conduzindo a formação do aldeído. A obtenção dos compostos finais ocorreu a partir da reação da 2-cianoacetohidrazida com diferentes aldeídos aromáticos, e uma cetona cíclica, em meio etanólico e ácido, seguido da condensação com o aldeído acridínico em meio básico, etanólico, aquecido a 60°C. Como também a partir da reação do aldeído acridínico com a 2-cianoacetohidrazida em meio etanólico e ácido, e depois condensado com diferentes aldeídos aromáticos em meio básico, etanólico, aquecido a 60°C. Obtiveram-se 8 intermediários e 13 compostos finais que tiveram suas características físico-químicas determinadas através de faixa de fusão, cálculo do fator de retenção e aparência, como também alguns tiveram suas estruturas elucidadas por RMN ¹H. Na avaliação da atividade antitumoral pelo ensaio de MTT, observou-se que a molécula AMTAC₀₁ inibiu a proliferação das linhagens HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MCF-7 (câncer de mama) e HT-29 (câncer de colón) em 98,21%, 75% e 95,02%, já AMTAC₀₂ inibiu HL-60 e HT-29 em 96,98% e 88,34%. As moléculas AMAC₀₁ e AMAC₀₂ inibiram apenas HL-60 em 96,67% e 95,85%. Sendo que AMAC₀₃ inibiu apenas MCF-7 em 86,86%. Na avaliação da atividade antimalárica, realizada através de atividade Anti-*P. falciparum*, toxicidade celular e ensaio de hemólise, observamos que AMAC₀₁ possui atividade (IC₅₀ 1,2±0,82µM), já AMAC₀₂ apesar de apresentar seletividade, sua toxicidade é alta (5,83±0,81µM). AMTAC₀₂ e AMTAC₀₅ possuem atividade (IC₅₀ 0,29±0,1µM e 1,6±0,9µM respectivamente), porém apenas AMTAC₀₅ teve alto índice de seletividade (50). No ensaio de hemólise, nenhuma molécula causou lise celular significativa, sendo abaixo de 30%. Acreditamos assim que as moléculas sintetizadas são futuras candidatas a fármacos antitumorais e antimaláricos, mais eficazes e específicos.

PALAVRAS-CHAVE: Acridina, Atividade antitumoral, Atividade antimalárica, Híbridação Molecular, Resistência.

ABSTRACT

Humanity has undergone several modifications over the years, among which alterations in lifestyle ended up collaborating to the emergence of diseases. One of the major health problems facing humanity is cancer, however there is a limited number of drugs available for treatments on the market, highlighting the urgent need to find new agents. Among the treatment options, chemotherapy has been one of the most accepted proposals to combat it and among them include acridine derivatives, which seem to overcome mechanisms of resistance. Another problem of public health are neglected diseases, malaria has emerged as one of the most serious parasitic infections of mankind. Thus, aims the work the synthesis, structural elucidation and evaluation potential antitumor and antimalarial of new acridine derivatives. The synthesis of acridine-acylhydrazones derivatives occurred so parallel and convergent, in which nuclei are synthesized separately and then condensed. The first step consists in obtaining the 9-methyl-acridine, followed by an oxidation to obtain aldehyde. The method of the obtaining of 9-methyl-acridine through the reaction of diphenylamine with glacial acetic acid, then the aldehyde is oxidized by two steps, the first is the formation of a reactive intermediate from the reaction of 9-methyl-acridine with *N,N*-dimethylnitrosoaniline in medium alcoholic, the second is oxidation in medium acidic leading to the formation of the aldehyde. To obtain the final compounds occurs from the reaction of 2-cyano-aceto-hydrazide with different aromatic aldehydes and cyclic ketone and in an ethanol and acid medium, followed by condensation with the aldehyde of acridine in medium basic and ethanolic, heated at 60°C. As well as from the reaction of the aldehyde of acridine with 2-cyano-aceto-hydrazide in ethanol and acid medium, and then condensed with different aromatic aldehydes in basic ethanolic medium, heated at 60°C. Obtained 8 intermediaries, and 13 compounds final that their physical and chemical characteristics evaluated by melting range, calculation of retention factor and appearance, as well as some had their structures elucidated by ¹H NMR. In the evaluation of antitumor activity by the MTT assay, it was observed that the molecule AMTAC₀₁ inhibited proliferation of the lineages HL-60 (promyelocytic leukemia acute), MCF-7 (breast cancer), and HT-29 (colon cancer) in 98.21%, 75% and 95.02%, already AMTAC₀₂ inhibited HL-60 and HT-29 in 96.98% and 88.43%. The molecules AMAC₀₁ and AMAC₀₂ inhibited HL-60 in 96.67% and 95.85%. Since AMAC₀₃ only inhibited MCF-7 in 88.34%. In the evaluation of antimalarial activity, the activity performed by Anti-*P. falciparum*, cell toxicity and hemolysis assay, we observed that AMAC₀₁ own activity (IC₅₀ 1.2 ± 0.82 μM), already AMAC₀₂ despite having selectivity, is toxicity high (5.83±0.81 μM). AMTAC₀₂ and AMTAC₀₅ have activity (IC₅₀ 0.29±0.1 μM and 1.6±0.9 μM respectively), but only AMTAC₀₅ had high selectivity index (50). In hemolysis assay, the molecules not caused significant cell lysis, being less than 30%. We therefore believe that the synthesized molecules are future candidates for anticancer and antimalarial drugs, more effective and specific.

KEYWORDS: Acridine, Antitumor activity, Antimalarial activity, Molecular Hybridization, Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida das espécies de Plasmodium causadoras de malária em humanos.....	25
Figura 2.	Estrutura do núcleo acridínico.....	29
Figura 3.	Estrutura da 3-amino-9-aminofenil-acridina.....	30
Figura 4.	Estrutura dos antibacterianos (a) proflavina e (b) acriflavina.....	31
Figura 5.	Estrutura da Amsacrina (<i>m</i> -AMSA)	31
Figura 6.	Estrutura da 4-acridin-9-il-metileno-4 <i>H</i> -isoquinolina-1,3-diona (a) e 4-acridin-9-il-metileno-2-benzil-4 <i>H</i> -isoquinolina-1,3-diona (b).....	32
Figura 7.	Estrutura dos compostos 3g, 3m e 5g	32
Figura 8.	Esqueleto hidrazônico.....	33
Figura 9.	Estrutura do derivado acilidrazônico (E)-2-hidroxi-benzaldeído-5-(2,4-difluoro-fenil) -2-hidrazona furoíl com atividade antitumoral.....	34
Figura 10.	Derivados acilidrazônicos com potencial atividade antitumoral.....	34
Figura 11.	Derivado acilidrazônico (a) e acilidrazônico-acridínico com atividade antimalárica (b).....	34
Figura 12.	Gráfico de espectro de RMN ¹ H do composto AMAC ₀₁ . Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectros.....	52
Figura 13.	Gráfico de espectro de RMN ¹ H do composto AMAC ₀₂ . Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectros.....	53
Figura 14.	Gráfico de espectro de RMN ¹ H do composto AMTAC ₀₂ . Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectro.....	54
Figura 15.	Gráfico de espectro de RMN ¹ H do composto AMTAC ₀₅ . Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectros.....	54
Figura 16.	Diferenças estruturais entre os compostos (a) AMTAC ₀₁ e (b) AMTAC ₀₂ ..	56
Figura 17.	Diferenças estruturais entre as moléculas (a) AMAC ₀₁ , (b) AMAC ₀₂ , e (c) AMAC ₀₃	56
Figura 18.	Diferenças estruturais entre as moléculas (a) AMAC ₀₁ , (b) AMAC ₀₂ , e (c) AMAC ₀₃ , (d) AMAC ₀₄ e (e) AMAC ₀₆	58
Figura 19.	Diferenças estruturais entre as moléculas (a) AMTAC ₀₁ , (b) AMTAC ₀₂ , (c) AMTAC ₀₅ , (d) AMTAC ₀₃ , (e) AMTAC ₀₆	59
Figura 20.	Diferenças estruturais entre as moléculas (a) Amsacrina, (b) Primaquina e (c) Mefloquina	60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Rota sintética envolvendo a preparação de derivados tiazolidínicos- acridínicos.....	30
Esquema 2.	Rota sintética envolvendo a preparação de derivados da 9-(<i>N</i> -cinnamo-il-butil)aminoacridina.....	33
Esquema 3.	Esquema reacional de obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos.....	36
Esquema 4	Esquema reacional de obtenção da acridina-9-carboxaldeido em três etapas.....	38
Esquema 5.	Esquema reacional de obtenção do intermediário dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC.....	38
Esquema 6.	Esquema reacional de obtenção para os derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC.....	39
Esquema 7.	Esquema reacional de obtenção dos intermediários dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC.....	39
Esquema 8.	Esquema reacional de obtenção do intermediário CCH de um derivado acilidrazônico-acridínico da série AMTAC.....	40
Esquema 9.	Esquema reacional de obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC.....	41
Esquema 10.	Esquema reacional de obtenção do derivado acilidrazônico-acridínico, AMTAC ₀₅ , da série AMTAC.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Intermediários e acridina-9-carboxaldeído sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.....	47
Tabela 2.	Intermediários acilidrazônicos sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.....	48
Tabela 3.	Compostos da série AMAC sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.....	49
Tabela 4.	Compostos da série AMTAC sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.....	50
Tabela 5.	Dados dos espectros de RMN ¹ H (δ em ppm).....	51
Tabela 6.	Avaliação antitumoral pelo ensaio de MTT.....	55
Tabela 7.	Atividade Anti- <i>P. falciparum</i> , citotoxicidade em células hospedeiras e índice de seletividade	57

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Ensaio hemolítico para acridinas (série 1). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O⁺), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p <0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's)..... 61
- Gráfico 2.** Ensaio hemolítico para acridinas (série 2). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O⁺), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p <0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's)..... 62
- Gráfico 3.** Ensaio hemolítico para acridinas (2º experimento). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O⁺), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p <0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's)..... 62

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS MOLECULARES

AcOEt	Acetato de Etila
AcOH	Ácido Acético
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio
CH₂Cl₂	Diclorometano
CL₅₀	Concentração Letal Média
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
DIP	Doenças infecciosas parasitárias
DMSO	Dimetilsulfóxido
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanol
F.F	Faixa de fusão
HCl	Ácido Clorídrico
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MHz	Megahertz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
Na₂CO₃	Carbonato de Sódio
Na₂SO₄	Sulfato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NH₄OH	Hidróxido de amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
R_f	Fator de Retenção
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
ZnCl₂	Cloreto de Zinco
δ ppm	Deslocamento químico em parte por milhão

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE SIGLAS

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3.	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	Doenças crônicas não-transmissíveis: câncer.....	21
3.2	Doenças negligenciadas: malária.....	24
3.3	Resistências a quimioterápicos antitumorais e antimaláricos.....	26
3.4	A importância da química medicinal na pesquisa de novos agentes com atividade antitumoral e antimalárica.....	27
3.5	Derivados acridínicos e derivados acilidrazônicos com atividade antitumoral e antimalárica.....	29
4.	METODOLOGIA	36
4.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS	36
4.1.1	OBTENÇÃO DO NÚCLEO ACRIDÍNICO	37
4.1.1.1	Síntese da 9-metil-acridina (AC ₀₁ -RI).....	37
4.1.1.2	Síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC ₀₂ -RI).....	37
4.1.2	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ACILIDRAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS	38
4.1.2.1	Obtenção da série AMAC.....	38
4.1.2.2	Obtenção do intermediário da série AMAC.....	39
4.1.2.3	Obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC.....	39
4.1.2.4	Obtenção da série AMTAC.....	40
4.1.2.5	Obtenção dos intermediários da série AMTAC.....	40
4.1.2.6	Obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC.....	41
4.1.2.7	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	42
4.1.2.7.1	Pesagem dos reagentes e compostos.....	43
4.1.2.7.2	Faixa de fusão.....	43

4.1.2.7.3	Cromatografia em Camada Delgada.....	43
4.1.2.7.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)..	43
4.1.2.7.5	Cálculo do Log de P.....	44
4.2	AVALIAÇÃO ANTITUMORAL.....	44
4.2.1	Avaliação citotóxica.....	44
4.2.2	Linhagens utilizadas para a avaliação citotóxica.....	44
4.2.3	Ensaio para a avaliação citotóxica.....	45
4.2.4	Análise de dados.....	45
4.3	AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA.....	45
4.3.1	Atividade Anti- <i>P. falciparum</i>	45
4.3.2	Ensaio de hemólise.....	46
4.3.3	Toxicidade celular.....	46
4.3.4	Análise de dados.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	PARTE QUÍMICA.....	47
5.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	55
5.2.1	Avaliação antitumoral.....	55
5.2.2	Avaliação antimalárica.....	57
6.	CONCLUSÃO.....	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8.	ANEXOS.....	72
Anexo 1:	Espectro de RMN ¹ H da 2-ciano-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC ₀₁)....	72
Anexo 2:	Espectro de RMN ¹ H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC ₀₂).....	73
Anexo 3:	Espectro de RMN ¹ H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-benzilideno-hidrazida (AMTAC ₀₁).....	74
Anexo 4:	Espectro de RMN ¹ H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (AMTAC ₀₂).....	75
Anexo 5:	Espectro de RMN ¹ H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (AMTAC ₀₃).....	76
Anexo 6:	Espectro de RMN ¹ H da 3-acridin-9-il-2-ciano- acrilato-ciclohexilideno-hidrazida (AMTAC ₀₅).....	77
Anexo 7:	Espectro de RMN ¹ H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (AMTAC ₀₆).....	78
Anexo 8:	Figuras das estruturas dos compostos sintetizados.....	79

1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos têm sofrido diversas modificações ao longo dos anos, tanto no âmbito biológico, quanto no social e econômico. Algumas dessas alterações podem ser consideradas consequências dos estilos de vida ao decorrer da história, no qual através destas modificações os seres humanos passaram a ter um ritmo de vida cada vez mais acelerado e desordenado, o que passou a afetar o seu ciclo biológico, contribuindo com o surgimento de doenças.

Uma das classes de doenças que está aumentando significativamente sua incidência através de mudanças no estilo de vida, são as crônicas não-transmissíveis (DCNT), que são hoje responsáveis pela maioria das mortes em muitos países, seja de alta, média ou baixa condição socioeconômica. Esta classe é composta especificamente por: doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas, possuindo quatro fatores de risco compartilhados, que são o tabagismo, inatividade física, alimentação não saudável e uso prejudicial de álcool (BRASIL, 2005; GOULART, 2011). Embora as DCNT tenham etiologia multifatorial, o estilo de vida possui importante papel no seu aparecimento.

O câncer ganhou uma dimensão de destaque, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, surgirão 27 milhões de casos novos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente acometidas. Os maiores impactos desse fenômeno serão observados em países de baixas e médias rendas (INCA, 2011).

Atualmente, descreve-se o câncer como um grupo de doenças de organismos multicelulares superiores, de caráter multifatorial, podendo ser externos (relacionados ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural) ou internos ao organismo, (na maioria das vezes, geneticamente pré-determinados, sendo ligados à capacidade do mesmo de se defender das agressões externas) estando ambos inter-relacionados. Caracterizado por alterações na expressão de genes múltiplos, que conduz à desregulação do mecanismo celular normal para a divisão e diferenciação celular, resultando em um desequilíbrio da replicação e a morte celular, que favorece o crescimento de uma população de células tumorais. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações de células normais em malignas. Sendo

assim a incidência de casos de câncer tende apenas a aumentar ao longo dos anos (GUYTON; HALL, 2006; RUDDON, 2007; INCA, 2012; PATRICK, 2013).

Várias drogas estão disponíveis para o seu tratamento, porém estas possuem efeitos secundários graves, sendo inviável o uso contínuo das mesmas. Além disso, o surgimento de células resistentes tem enfraquecido sua eficácia, impulsionando a necessidade de se buscar novas opções terapêuticas, ou seja, novos fármacos mais eficientes que possam superar tais mecanismos de resistência (FORMARIZ et al., 2004; HOWELL, 2009; SONDEHI, 2010).

Outra classe de doenças que acomete indivíduos de todo o mundo são as “doenças negligenciadas”, que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte limitação ao desenvolvimento dos países.

O termo "doença negligenciada" data da década de 70 e refere-se a doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários, esta adoção do adjetivo tomou como base o fato de que tais enfermidades não despertam o interesse das grandes empresas farmacêuticas para a produção de medicamentos e vacinas. Além disso, a pesquisa neste setor não conta recursos suficientes, o que gera a escassez dos métodos de profilaxia disponíveis em todo o mundo. Dentre as doenças negligenciadas, as mais comuns são: dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária, tuberculose, entre outras. Segundo dados da OMS, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial (DECIT, 2010; SOUZA, 2010; INCT-IDN, 2013; ABC, 2013).

Dentre essa classe, a malária tem se destacado por ser considerada uma das mais graves infecções parasitárias da humanidade. É uma doença cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos por mosquitos vetores do gênero *Anopheles*. Quatro espécies podem produzir a infecção: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*. A *P. falciparum* e a *P. vivax*, são as mais comuns, sendo a primeira a mais letal. O Brasil é o país que concentra o maior número de casos no continente americano, estimando-se a ocorrência de mais de 300.000 casos anuais. É uma doença de grande incidência, sendo também conhecida como

paludismo, febre terçã (benigna ou maligna) febre quartã, tremedeira, batedeira ou, simplesmente, febre (GOMES, 2011; WHO, 2013; FIOCRUZ, 2013).

De acordo com o exposto sobre tais implicações e o difícil tratamento de DCNT e doenças negligenciadas, verifica-se a necessidade de desenvolvimento de novas formas de tratamento mais eficazes, que poderiam conseqüentemente, decrescer o número de casos destas em todo o mundo. Dentre as opções de tratamentos farmacológicos, destacamos os derivados acridínicos, que parecem ser eficazes e superarem mecanismos de resistência, como também têm sido bastante aceito por não apresentarem efeitos tóxicos severos.

Derivados acridínicos possuem suas atividades bem descritas na literatura, possuindo atividades antitumoral, fungicida, antiparasitárias, antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antimalárica, antiprion, anti-alzheimer, antileishmania e antitripanossomal (MAUËL, et al., 1993; GAMAGE, et al., 1994; MAY, et al., 2006; FANG et al., 2008; SONDHI et al., 2010; TOMAR et al., 2010; PRAJAPATI, et al., 2012; KUMAR et al., 2013).

A ideia de hibridação do núcleo acridínico com grupamentos acilidrazônicos substituídos surgiu devido à potencialidade biológica também documentada na literatura de tais derivados como: leishmanicida, antiplaquetária, anti-inflamatória antimetabólica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, entre outras (BARREIRO et al., 2002; CARDONA et al., 2005; MELNYK et al., 2006; SALUM, 2011; TIAN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; CACHIBA et al., 2012).

Diante desse quadro realizaram-se etapas de síntese, purificação e elucidação estrutural de novos compostos acilidrazônicos-acridínicos híbridos, acompanhados por ensaios *in vitro* visando à avaliação de seus potenciais antitumorais e antimaláricos. Assim, visualiza-se a possibilidade de desenvolvimento de novas moléculas sintéticas terapêuticamente úteis, derivados acridínicos, que possam servir como novos agentes terapêuticos mais eficazes e específicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver novos derivados acilidrazônicos-acridínicos híbridos, através da síntese e elucidação estrutural, e avaliar suas atividades antitumoral e antimalárica *in vitro* visando obter potenciais agentes terapêuticos mais seguros, eficazes e potentes.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Promover a síntese química de novos compostos derivados acilidrazônicos-acridínicos;
- ✓ Verificar as características físico-químicas dos novos compostos sintetizados;
- ✓ Elucidar estruturalmente os novos compostos obtidos através de técnicas espectroscópicas, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN H¹);
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral dos novos compostos frente a diferentes linhagens celulares através do método do MTT;
- ✓ Avaliar a atividade antimalárica dos novos compostos frente à cepa resistente W2 de *P. falciparum*;
- ✓ Determinar a toxicidade em células hospedeiras utilizando a linhagem de células HepG2, assim como os efeitos hemolíticos em eritrócitos humanos não infectados e calcular o índice de seletividade celular;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT): câncer

As transformações sociais e econômicas ao longo do tempo, as consequentes alterações no estilo de vida das sociedades contemporâneas, como por exemplo, as mudanças dos hábitos alimentares, o aumento do sedentarismo, do estresse e da expectativa de vida da população, colaboraram para o avanço da incidência das DCNT (OPAS, 2007).

Tais doenças, nas últimas décadas passaram a liderar causas de morte em todo o mundo, ultrapassando as taxas de mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias (DIP) (BOUSQUET; KHALTAEV, 2008). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (2011), seguindo tendência mundial, notam-se, no Brasil, processos de transição que têm produzido importantes mudanças no perfil das enfermidades que acometem a população, observando-se, a partir dos anos 1960, que as DIP deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituída pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias, essa transição epidemiológica, têm como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde.

Dentre todas estas DCNT, o câncer é uma das mais devastadoras, pois mesmo com o avanço da medicina e a cura para determinados tipos de câncer detectados precocemente, outros ainda não têm cura, ou ainda, as células tumorais se tornam resistentes aos fármacos disponíveis na clínica. Portanto, o tratamento para o mesmo continua um desafio para gestores de saúde pública, médicos e pesquisadores no mundo inteiro (SILVA, 2003; MOURA, 2009; KUMAR et al., 2013).

A palavra câncer de origem latina (*cancer*) significando “caranguejo” deve ter sido empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (INCA, 2012), sendo uma enfermidade caracterizada por crescimento desordenado e descontrolado de algumas células, bem como por um desvio

nos mecanismos de controle dos processos de proliferação e diferenciação celular e, atualmente está relacionada ao termo neoplasia maligna (ALMEIDA, 2005; SILVA, 2007; BRANDÃO, 2010; INCA, 2011).

Seus fatores de risco podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditários. A maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionado ao meio ambiente, que se entende por ambiente em geral (água, terra e ar), ocupacional (quando insalubre), social e cultural (estilo e hábitos de vida) e de consumo (alimentos, medicamentos, dentre outros) (ALMEIDA, 2005; RUDDON, 2007; INCA, 2011).

Segundo o INCA (2011), o câncer é conhecido há muitos séculos e foi amplamente considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global da doença pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos.

De acordo com o Globocan, da Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (IARC), da OMS, o número global de mortes por câncer aumentou para 8,2 milhões, demonstrando assim sua expansão nos países em desenvolvimento, sendo os casos de câncer de mama os que mais cresceram. Estima-se que 14,1 milhões de pessoas tenham desenvolvido câncer em 2012, e ainda espera-se que ocorra um aumento substancial nos casos mundiais, podendo chegar a 19,3 milhões em 2025, acompanhando a expansão e envelhecimento da população (IARC, 2013), dados que superam as expectativas apresentadas pelo INCA para o ano de 2030.

No Brasil, as estimativas da doença para o ano de 2014 são de aproximadamente 580 mil casos novos. Os cânceres mais incidentes na população brasileira serão pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil), e colo do útero (15 mil). Excetuando-se pele não melanoma, a ocorrência será de 394.450 casos novos, sendo 52% em homens e 48% entre as mulheres (INCA, 2014).

Há três abordagens tradicionais para o tratamento do câncer: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, porém é importante ressaltar que a quimioterapia é normalmente usada com cirurgia e radioterapia. Além disso, muitas vezes existe o caso em que se utiliza a terapia de combinação (o uso simultâneo de diversos fármacos

anticancerígenos, com diferentes mecanismos de ação), tornando-se mais eficaz do que o uso de uma única droga, tendo como vantagens o aumento da eficácia da ação, diminuição da toxicidade e evasão de resistência aos medicamentos (PATRICK, 2013).

Assim, a quimioterapia é uma das formas de tratamento mais utilizadas e tem como principal objetivo destruir células neoplásicas, preservando as normais, porém nem sempre isto ocorre, pois a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando também as células normais, particularmente as células de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, explicando a maior parte dos seus efeitos colaterais como: náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (ALMEIDA, 2005).

Os antineoplásicos são classificados de duas maneiras principais: de acordo com sua estrutura química e função em nível celular e com a especificidade no ciclo celular (BONASSA; SANTANA, 2005). Podendo ser divididos em ciclo-celular específicos (CCS) por ação metabólica bloqueadora da síntese de DNA e ciclo-celular não-específicos (CCNS) que interagem com o DNA por formação de ligações cruzadas (ALMEIDA, 2005).

Dentre os quimioterápicos mais utilizados, podemos classificá-los de forma geral como:

- ✓ Agentes alquilantes: mostardas nitrogenadas, etileniminas e metilmelaminas, alquil sulfonato, nitrosureias, trizenos e metais pesados;
- ✓ Antimetabólitos: análogo do ácido fólico, análogos das pirimidinas e análogos das purinas;
- ✓ Produtos naturais: alcalóides da Vinca (antimitóticos), taxanas (promoção de microtúbulos), epipodofilotoxinas (complexação com Topoisomerase II e DNA), análogos da camptotecina (inibição de topoisomerase I), antibióticos, modificadores de resposta biológica e enzimas;
- ✓ Miscelâneas: complexos de platina, ureia substituída, derivado de metilidrazina, supressor adrenocortical e inibidor da tirosina quinase.

Além do mais temos a presença das terapias coadjuvantes com hormônios e a imunoterapia que vem surtindo efeito significativo nos últimos anos (CALABRESI; CHABNER, 2003; WERMUTH, 2008; PATRICK, 2013).

Além destes existem outros fármacos para o tratamento do câncer, porém ainda não tiveram seus mecanismos de ação totalmente elucidados, contudo a resistência celular a estes tratamentos, bem como os efeitos colaterais tem dificultado os mesmos, sendo assim, é de suma importância à busca por novos métodos de tratamento e incremento de iniciativas urgentes, de modo a prevenir e controlar as DCNT, em particular o câncer.

3.2 Doenças negligenciadas: malária

Outra classe de doenças que vem acometendo a saúde da humanidade são as doenças negligenciadas, que são causadas por agentes infecciosos e parasitários. A OMS juntamente com a Organização Médicos Sem Fronteiras propuseram as denominações de “doenças negligenciadas” para se referir àquelas enfermidades, geralmente transmissíveis, cuja ocorrência se dá em maior número nos países em desenvolvimento, como exemplos, podemos citar: dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária, tuberculose, entre outras. Existem mais de um bilhão de pessoas que estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa aproximadamente um sexto da população mundial (DECIT, 2010; SOUZA et al., 2010; GARCIA et al., 2011).

Dentre estas doenças, a malária é a principal responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo, e até os dias atuais continua sendo um dos principais problemas de saúde pública (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

O Relatório Mundial da Malária de 2013 descreve que a malária causou aproximadamente 627 mil mortes e havia cerca de 207 milhões de casos em 2012. A doença está presente em aproximadamente 97 países e territórios com transmissão contínua, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, onde 35 países da África Central são os responsáveis pelo maior número de casos e óbitos, sendo que crianças com menos de cinco anos de idade e mulheres grávidas são mais severamente afetadas. A OMS também estima que morre uma criança a cada minuto de malária na África (WHO, 2013).

No Brasil, incide predominantemente na Amazônia Legal, que engloba os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (GOMES et al., 2011; BRASIL, 2013).

É uma doença infecciosa, causada por protozoários pertencentes ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, ordem *Eucoccidia*, família *Plasmodiidae*, sendo as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* as que mais comumente parasitam o homem, mas no Brasil, a malária humana está relacionada principalmente com as espécies *P. vivax* e *P. falciparum*, e só eventualmente a espécie *P. malariae*, e sua transmissão para o homem se dá através de mosquitos do gênero *Anopheles* (GOMES et al., 2011; PARISE; ARAÚJO; CASTRO, 2012; TEIXEIRA, 2011; WHO, 2013).

Segundo França e colaboradores (2008), os protozoários do gênero *Plasmodium* têm um ciclo de vida dividido entre um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor (figura 1). Os *P. falciparum*, *vivax* e *ovale* são parasitas exclusivos do homem enquanto que o *P. malariae* seria capaz também de infectar chimpanzés em condições naturais. O vetor é sempre um mosquito fêmea, do gênero *Anopheles*, embora das 380 espécies conhecidas de mosquitos desse gênero, apenas 60 possam transmitir a doença. As manifestações clínicas da malária, febres e calafrios, são associadas com a ruptura sincronizada dos eritrócitos infectados.

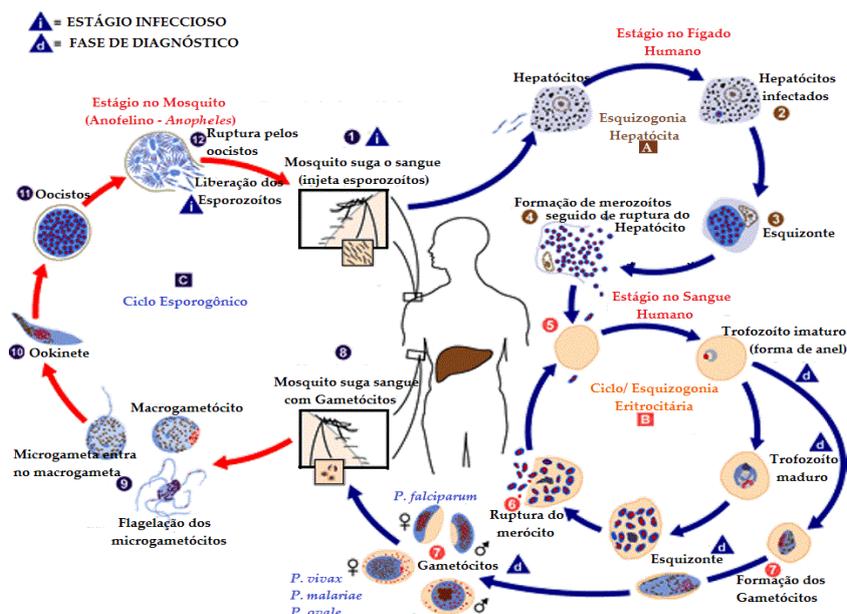


Figura 1. Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* causadoras de malária em humanos. Durante a alimentação sanguínea, a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas no hospedeiro humano

(1). Os esporozoítas infectam as células do fígado (2). Formando os esquizontes (3). A ruptura dos hepatócitos leva a liberação dos merozoítas (4). Após a replicação no fígado, ciclo pré-eritrocitário (A). Os parasitas sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos, ciclo-eritrocitário (B). Os merozoítas infectam as hemácias (5). O estágio de anel diferencia-se em trofozoíto e esquizonte (6). Alguns parasitas diferenciam-se em gametócitos (7), os quais são ingeridos pelo mosquito (8). No mosquito a multiplicação é conhecida como ciclo esporogônio (C). No estômago do mosquito, ocorre a geração dos zigotos (9). Os oocinetos (10) invadem a parede do estômago, em que é desenvolvido o oocisto (11). No oocisto são produzidos os esporozoítas (12) os quais, são liberados migram até a glândula salivar, em que invadem ativamente (Adaptado de FRANÇA et al., 2008).

Assim, a malária, dentre as doenças negligenciadas tem sido alvo de medidas preventivas, devido o seu alto grau de complexidade, porém ainda é de suma importância buscar uma melhoria nas formas de tratamento mediante a resistência apresentada pelo parasita às opções existentes.

3.3 Resistências a quimioterápicos antimaláricos e antitumorais

Um fato que favorece o aumento da morbidade e mortalidade da malária no mundo é a resistência-cruzada, e a resistência à cloroquina (CQR), bem como resistências aos outros quimioterápicos já existentes, como a mefloquina, quinina, primaquina, mepacrina, exceto os derivados de artemisinina, além do uso incorreto que aumentam a sua ineficiência (GUETZOYAN, 2009; KUMAR et al., 2009; VALDÉS, 2011; CALDERÓN; WILSON; GAMO, 2013).

Já um dos maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia no tratamento de alguns tipos de neoplasias é o desenvolvimento, por parte das células tumorais, do fenômeno de resistência aos fármacos utilizados, não havendo resposta ao tratamento em cerca de 90% dos casos principalmente de câncer metastático (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Esta resistência ocorre ou porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética (mutação) ou porque são estimuladas a desenvolver tipos celulares resistentes ao serem expostas às drogas, o que lhes permite enveredar por vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas, sendo também observada nos casos em que o tratamento é descontinuado, quando a população tumoral é ainda sensível às drogas, em que a quimioterapia é aplicada a intervalos irregulares e em doses inadequadas. Este fenômeno é denominado "resistência a múltiplas drogas"

(MDR) e está relacionado à diminuição da concentração intracelular do quimioterápico e a presença de uma glicoproteína, ligada à membrana plasmática, a glicoproteína 170-P (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010; INCA, 2013).

Desta forma, a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de superar esses mecanismos, tornam-se cada vez mais eminente, e nesse contexto, os derivados acridínicos como *N*-[2-(dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamina (DACA) e seus análogos estruturais representam uma classe de agentes intercaladores de DNA com atividade inibitória frente a enzimas reguladoras do processo de transcrição, topoisomerases I e II, apresentam um amplo espectro de atividade frente a tumores sólidos em modelos animais e aparentam não serem relativamente afetadas pelo fenômeno de MDR mediada pela glicoproteína-P devido a sua alta lipofobicidade (ATWELL, 1987; SCHNEIDER et al., 1988; BAGULEY, 1995).

A busca por novos fármacos que possam ser utilizados como alternativos aos já existentes no mercado têm sido motivados muitas vezes pela resistência dos microrganismos e células tumorais às drogas existentes, principalmente em países em desenvolvimento e para a busca de tais fármacos utilizamos as ferramentas disponíveis pela química medicinal, baseando-se nos princípios do bioisosterismo e hibridação molecular de forma a desenvolver novas alternativas terapêuticas.

3.4 A importância da química medicinal na pesquisa de novos agentes com atividade antitumoral e antimalárica

A Química Medicinal é uma área baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (SAR) (LIMA, 2007; BARREIRO, 2009).

Também estuda as razões moleculares da ação dos fármacos de maneira a descrever a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, hierarquizando as diferentes contribuições funcionais. No contexto inverso, inclui-se o

planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representarem novas entidades químicas, candidatas a protótipos de novos fármacos de uso seguro (BARREIRO, 2009).

A busca por novos fármacos mais eficazes e potentes é um desafio dos químicos medicinais, que através de estruturas já conhecidas ou do conhecimento de alvos biológicos, buscam a obtenção de novas entidades químicas para superar as dificuldades das existentes, que a cada dia tornam-se mais amplas devido às mudanças ocorridas no perfil da humanidade, bem como devido às resistências aos tratamentos.

Salienta-se que o sucesso nesta área depende do trabalho conjunto entre vários profissionais, incluindo biólogos, médicos, químicos, farmacêuticos, entre outros (CALIXTO; SIQUEIRA-JUNIOR, 2008; BARREIRO, 2009).

Já a busca por medicamentos anticancerígenos através da química medicinal tem aumentado com objetivo de encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença. Baseadas em avanços significativos na biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (BRANDÃO et al., 2010).

Outro aspecto relevante a se considerar no desenvolvimento de novos fármacos são as doenças negligenciadas ou doenças tropicais, que não dispõem de tratamentos eficazes, uma vez que os conhecimentos produzidos não são revertidos em novas ferramentas terapêuticas para as pessoas afetadas (SILVA, 2007; SOUZA, 2010). Sendo assim de suma importância que haja investimentos na inovação terapêutica para melhorar o tratamento destas doenças, em especial a malária, que possui escassez dos métodos de profilaxia disponíveis em todo o mundo (DIAS; DESSOY, 2009; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Os esforços para descoberta devem estar focados em identificar novos medicamentos que sejam estruturalmente distintos dos atuais e possuam um novo mecanismo antimalárico de ação, que atue eficazmente contra as cepas MDR existentes

e, em particular, que evitem a resistência cruzada (CALDERÓN; WILSON; GAMO, 2013).

Uma ferramenta útil no planejamento molecular é a estratégia de hibridação molecular de um composto-protótipo, baseada na combinação de determinadas características estruturais de diferentes substâncias bioativas para produzir um novo composto híbrido que possua melhor afinidade e eficácia, quando comparado com seus precursores, podendo resultar ainda, em um composto que apresente perfil de seletividade modificado, diferentes e/ou duais modos de ação e diminuição de efeitos colaterais indesejados (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2007).

Sendo assim, a importância da química medicinal está totalmente intrínseca na pesquisa de novos agentes terapêuticos com atividades antitumoral e antimalárica, visto que utilizando tais ferramentas poderemos torná-los mais eficazes e promissores.

3.5 Derivados acridínicos e derivados acilidrazônicos com atividade antitumoral e antimalárica.

A acridina é uma classe conhecida desde o século XIX, quando alguns de seus derivados foram desenvolvidos como pigmentos e corantes. As origens de seus inúmeros representantes podem ser diversas, sendo obtidos de fonte natural (planta ou organismo marinho) ou, primordialmente, sintética. Desde a Primeira Guerra Mundial suas propriedades biológicas são descritas, as quais foram avaliadas em infecções provocadas por bactérias, protozoários e também em modelos experimentais de câncer (BELMONT et al., 2007).

Derivados acridínicos são compostos caracterizados por apresentarem um sistema policíclico planar, formado por três ou quatro anéis e um ou dois grupos substituintes flexíveis (figura 2) (SANCHEZ, et al., 2006).

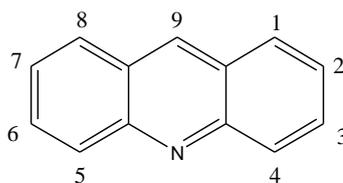
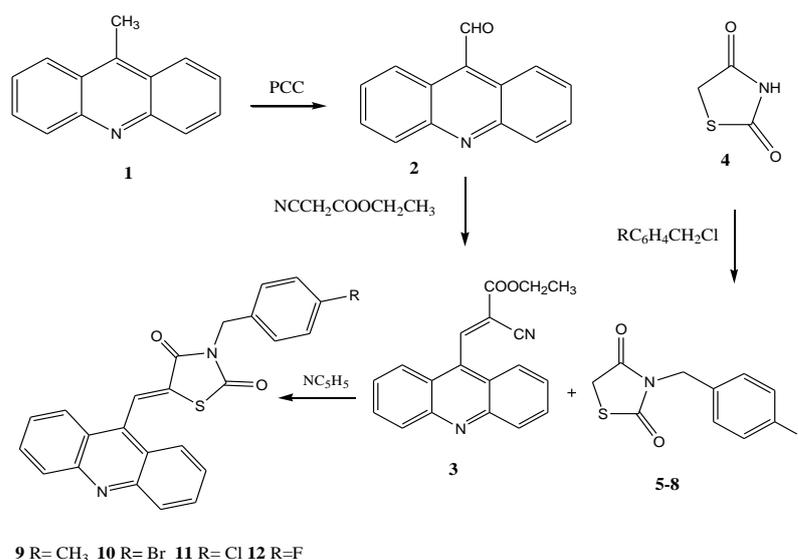


Figura 2. Estrutura do núcleo acridínico.

Cada vez mais estudos revelam que essa classe possui atividades promissoras para a inovação terapêutica. Pode-se então demonstrar sua viabilidade sintética, onde Barros e colaboradores (2012) sintetizaram novos derivados tiazolidínicos-acridínicos e avaliaram seu potencial citotóxico. A 9-metil-acridina foi preparada através da reação com difenilamina e cloreto de zinco em ácido acético. Subsequentemente, a oxidação da mesma com clorocromato de piridínio, resultando a 9-acridinaldeído como já relatado na literatura (TSUGE et al., 1963; MOSHER; NATALE, 1995) (esquema 1).



Esquema 1. Rota sintética envolvendo a preparação de derivados tiazolidínicos- acridínicos.

O interesse clínico do uso de derivados acridínicos se deu por volta de 1888, quando Auclert foi encarregado a encontrar o uso médico da 3-amino-9-aminofenil-acridina (figura 3), e em suas pesquisas descobriu que tal composto apresentava propriedades farmacológicas similares as quininas e alguns alcalóides.

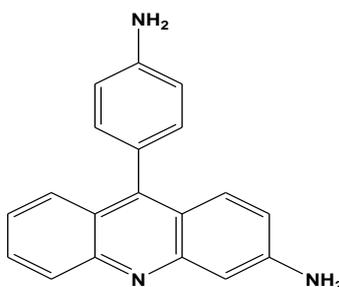


Figura 3. Estrutura da 3-amino-9-aminofenil-acridina.

Apenas em 1913 Browning descobriu a ação antibacteriana da proflavina e acriflavina (figura 4), e a partir de então esses compostos foram introduzidos na prática médica principalmente no período da Primeira Guerra Mundial (ALBERT, 1966).

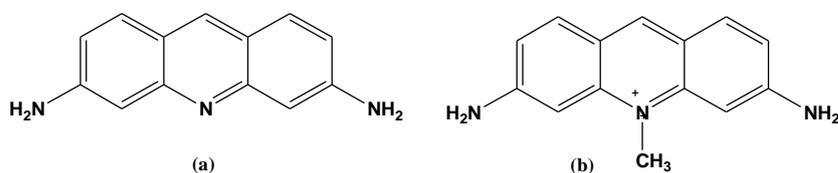


Figura 4. Estrutura dos antibacterianos (a) proflavina e (b) acriflavina.

Entretanto foi apenas na década de 1970, que surgiu o primeiro derivado anilinoacridínico, desenvolvido por Denny e colaboradores, a Amsacrina (N-[4-(acridin-9-il-amino)-3-metoxi-fenil]-metanosulfonamida – *m*-AMSA) (figura 5).

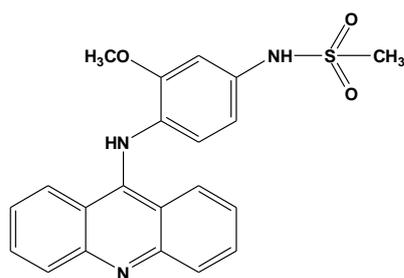


Figura 5. Estrutura da Amsacrina (*m*-AMSA)

Em 1976, a *m*-AMSA foi uma das pioneiras no tratamento contra leucemia promielocítica, sendo o primeiro fármaco no qual o seu modo de ação foi previsto como uma interação com o complexo DNA-Topoisomerase II (DENNY, 2004; CHILIN, et al., 2009).

Amsacrina ainda continua sendo utilizada no tratamento de leucemias agudas e linfomas, mas é ineficaz em tumores sólidos, seu uso clínico generalizado tem sido limitado por problemas, tais como efeitos secundários, a resistência, e a pobre biodisponibilidade dos medicamentos, que incentivaram a nova alteração estrutural destes compostos derivados do núcleo acridínico (BARROS et al., 2012).

Moura (2009), verificou o potencial antitumoral dos derivados isoquinolínicos acridínicos, 4-acridin-9-il-metileno-4*H*-isoquinolina-1,3-diona e 4-acridin-9-il-

metileno-2-benzil-4*H*-isoquinolina-1,3-diona (figura 6), frente as células tumorais HL-60 na dose de 25 µg/mL que foram capazes de inibir 97 e 99% do crescimento celular respectivamente, resultado considerado satisfatório quando comparado ao composto protótipo testado na mesma dose, a amsacrina, que apresentou 100% de inibição.

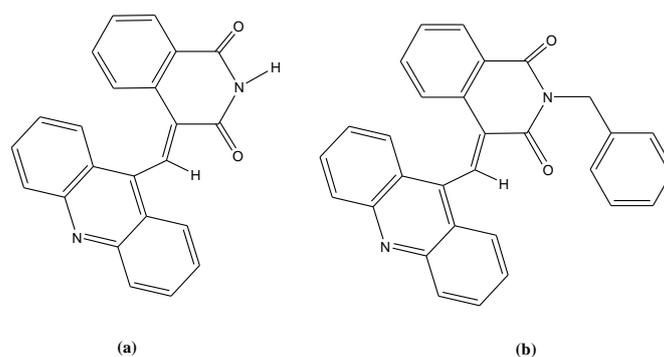


Figura 6. Estrutura da 4-acridin-9-il-metileno-4*H*-isoquinolina-1,3-diona (a) e 4-acridin-9-il-metileno-2-benzil-4*H*-isoquinolina-1,3-diona (b).

Sondhi e colaboradores (2010) fizeram a condensação de 9-cloro-2,4-acridinas não substituídas com várias aminas e 9-isotiocianato-2,4-acridinas não substituídas com diferentes aminas e avaliaram sua atividade antitumoral. Os compostos N-(3-(1*H*-imidazol-1-il)propil)-4-metoxiacridin-9-amina (**3g**), N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-4-metoxiacridin-9-amina (**3m**) e 1-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-3-(4-metilacridin-9-il)tiourea (**5g**) (figura 7) exibiram melhor atividade contra as linhagens celulares de mama (MCF-7), fígado (HEP-2), cólon (COLO-205, 502713, HCT-15), pulmão (A-549) e neuroblastoma (IMR-32).

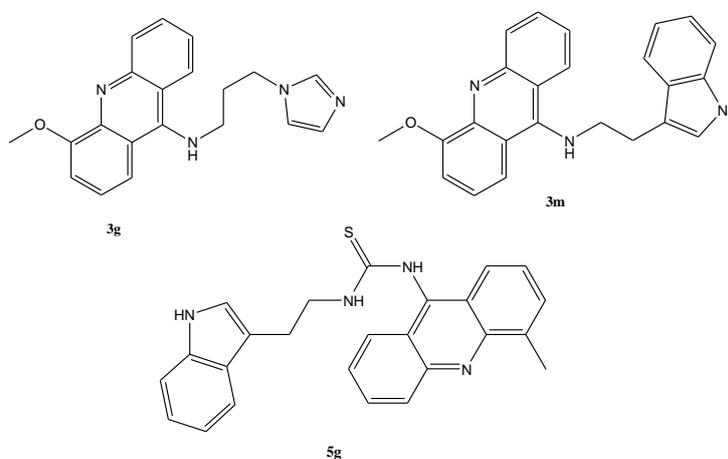
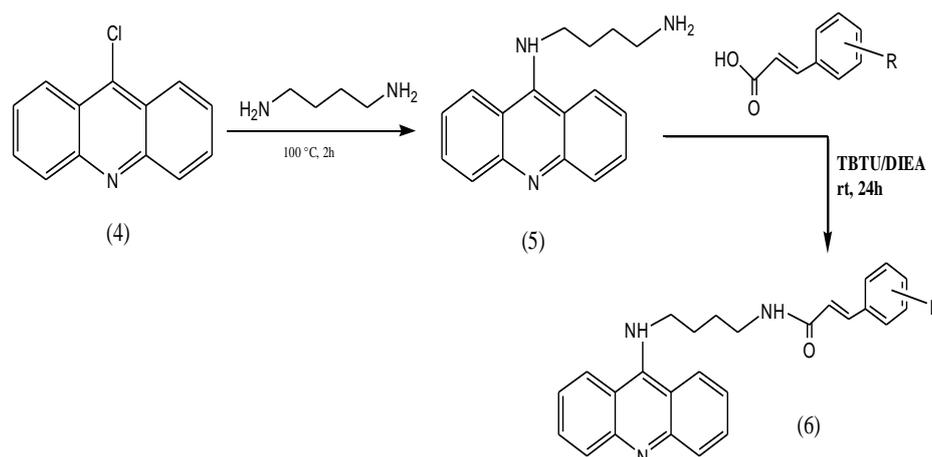


Figura 7. Estrutura dos compostos 3g, 3m e 5g.

Pérez e colaboradores (2013) sintetizaram e avaliaram o potencial antimalárico *in vitro* de 9-(*N*-cinnamo-il-butil)-aminoacridinas, estas foram sintetizadas reagindo 9-cloroacridina com butano-1,4-diamina, depois foi condensado com o ácido cinâmico através de um método padrão de acoplamento de peptídeos, como demonstrado no esquema 2, utilizando *N,N*-dimetilformamida (DMF) como solvente. Dois de seus derivados mais ativos apresentaram atividade *in vitro* contra *Plasmodium berghei*, maior que a primaquina, utilizada como droga padrão. Além do mais, os composto não são tóxicos para as células hepáticas humanas em concentrações até 5 μ M, sendo que o composto N-[4-(acridin-9-il-amino)-butil]-3-(4-metoxi-fenil)-acrilamida (**6d**) apresentou melhor relação atividade/citotoxicidade em uma concentração de 3 μ M (IC₅₀ 138 \pm 2).



Esquema 2. Rota sintética envolvendo a preparação de derivados da 9-(*N*-cinnamo-il-butil)aminoacridina.

Os derivados acilidrazônicos também se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos, uma vez que também suas diversas atividades biológicas já foram descritas na literatura (ALI, 2012).

As hidrazonas são bases Schiff pertencentes a uma classe de compostos caracterizada por conter o esqueleto $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{N}-\text{NR}_3\text{R}_4$ (figura 8) e que apresentam uma variedade de aplicações químicas e farmacológicas (PARRILHA, 2012). A funcionalidade hidrazona consiste no grupo farmacofórico de inúmeras substâncias (ALMEIDA et al., 2002).

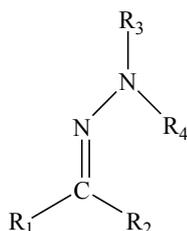


Figura 8. Esqueleto hidrazônico.

Cui e colaboradores (2010) sintetizaram derivados acilidrazônicos e avaliaram sua atividade antitumoral, descobrindo uma excelente seletividade do composto (E)-2-hidroxi-benzaldeído-5-(2,4-difluoro-fenil)-2-hidrazona furoíl (figura 9).

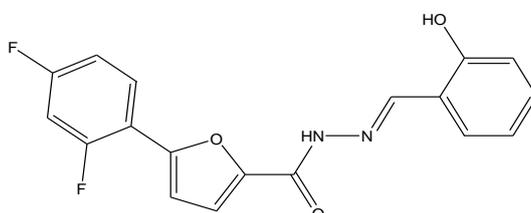


Figura 9. Estrutura do derivado acilidrazônico (E)-2-hidroxi-benzaldeído-5-(2,4-difluoro-fenil)-2-hidrazona furoíl com atividade antitumoral.

Kumar e colaboradores (2012) sintetizaram vários bis(indolil) baseados em hidrazonas, ativos contra várias linhagens de células tumorais (figura 10).

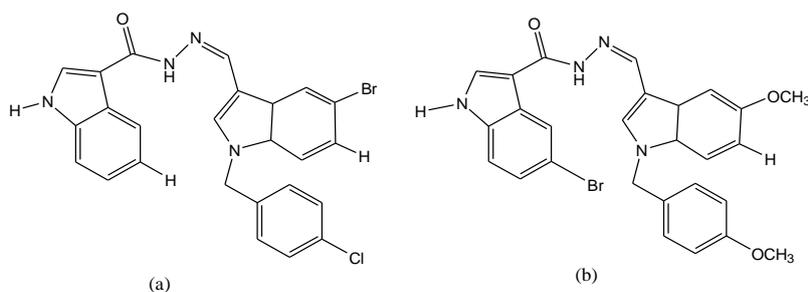


Figura 10. Derivados acilidrazônicos com potencial atividade antitumoral.

Os derivados acilidrazônicos também já tiveram o potencial de atividade antimalárica descrito na literatura (figura 11a) (IFA et al., 2000; MELNYK et al., 2006). Bem como, derivados acridinilhidrazônicos foram relatados como potenciais agentes antimaláricos frente a cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquinas (figura 11b) (GEMMA et al., 2006).

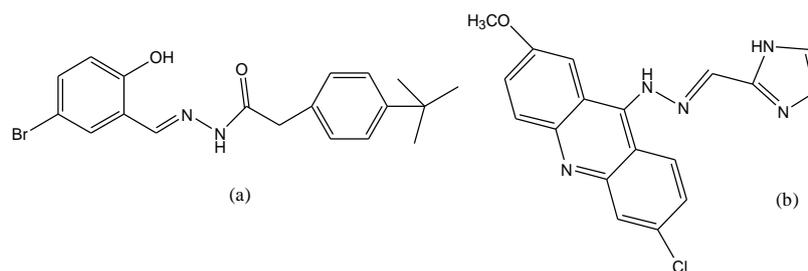


Figura 11. Derivado acilidrazônico (a) e acilidrazônico-acridínico com atividade antimalárica (b).

Segundo Zampirolli (2009), compostos hidrazônicos têm tido destaque nas últimas décadas por apresentarem ação contra diferentes tipos de patologias, chamando atenção, passando a serem sintetizados em larga escala.

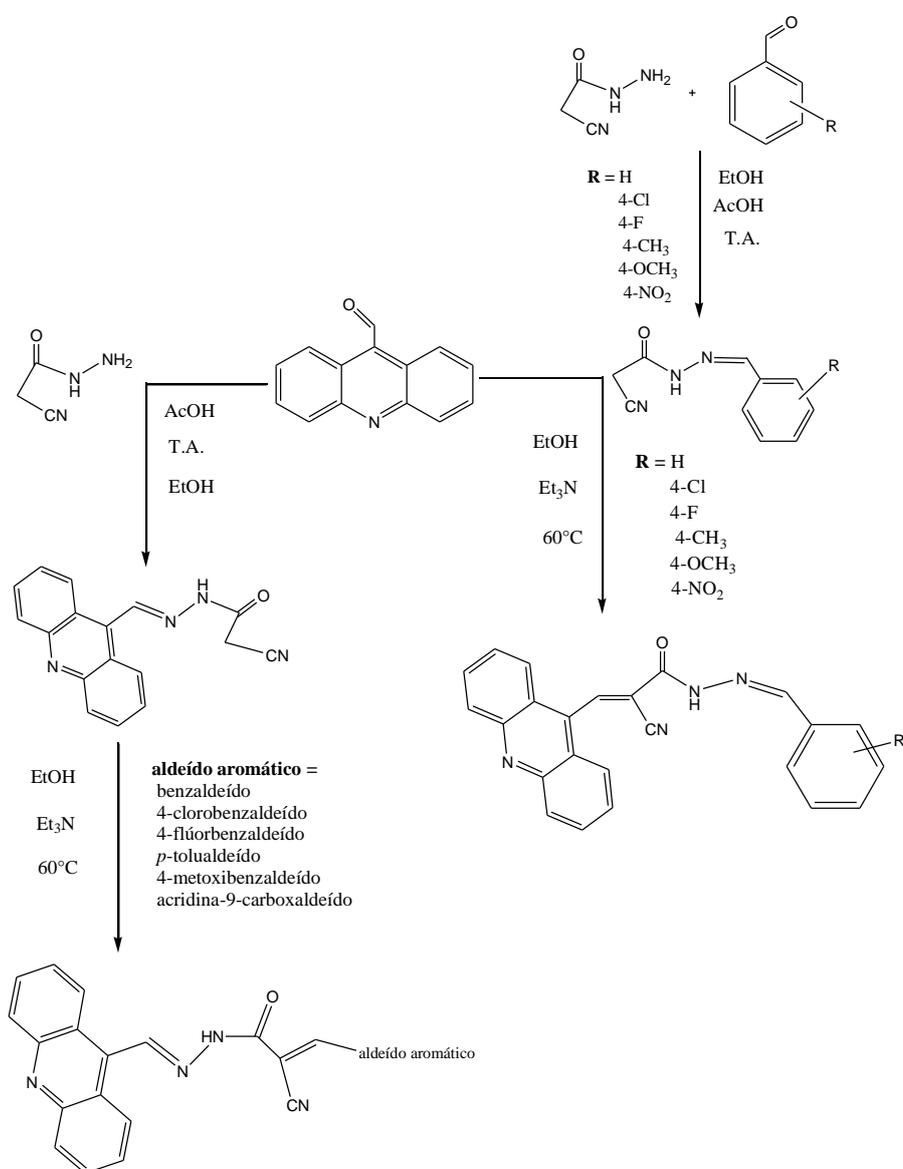
No Brasil, alguns núcleos de pesquisa vêm trabalhando na busca por novos fármacos derivados da *N*-acilidrazona, dentre eles, o grupo do Instituto de Tecnologia em Fármacos, da Fiocruz – RJ, e o do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), da UFRJ (BARREIRO, 2013).

Diante desse exposto, e em meio à necessidade da busca de novos fármacos com atividade antitumoral e antimalárica, bem como da grande potencialidade biológica que compostos contendo porções acilidrazônicas e anéis acridínicos possuem, nosso intuito foi desenvolver novos derivados híbridos acilidrazônicos-acridínicos que possam ser eficazes tanto para o tratamento de infecções parasitárias, como também para doenças neoplásicas.

4. METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

As sínteses dos derivados acilidrazônicos-acridínicos foram realizadas de acordo com a via plena convergente, onde se realizou separadamente a obtenção do núcleo acridínico e paralelamente foram obtidos todos os intermediários acilidrazônicos para serem acoplados ao anel acridínico, obtendo-se assim os compostos finais (esquema 3).



Esquema 3. Esquema reacional de obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos.

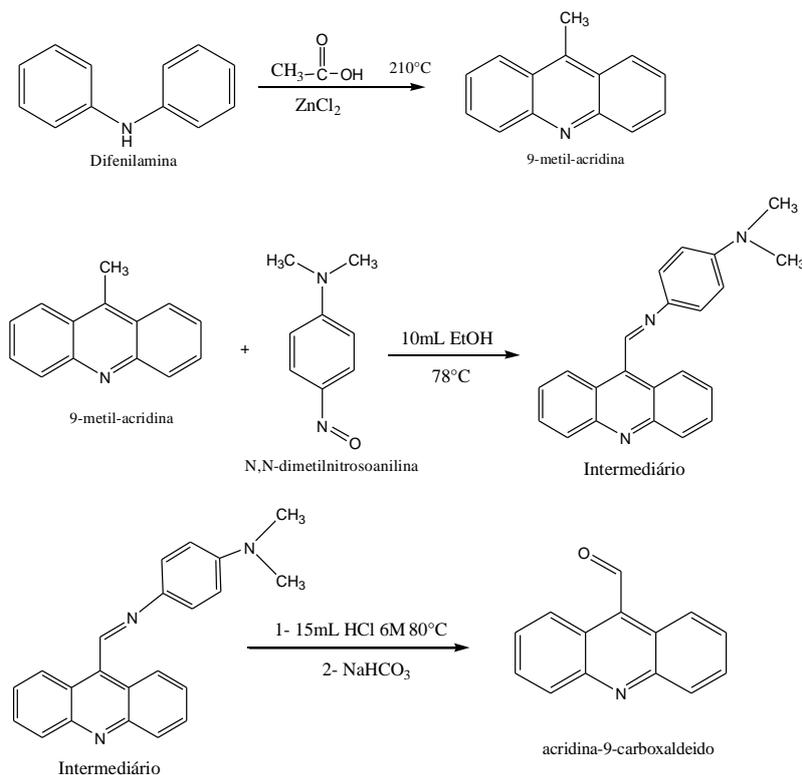
4.1.1 OBTENÇÃO DO NÚCLEO ACRIDÍNICO (esquema 4)

4.1.1.1 Síntese da 9-metil-acridina (AC₀₁-RI): Para obtenção da 9-metil-acridina foram utilizados 2,5 g (14,7 mmols) de difenilamina, 3 mL de AcOH (ácido acético) e 10 g (73,4 mmols) de ZnCl₂ (cloreto de zinco), que foram aquecidos a uma temperatura de 220°C, durante 8 horas. A mistura reacional foi tratada inicialmente com uma solução recém-preparada de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) a 10% e, em seguida, alcalinizada através da adição de uma solução de NH₄OH (hidróxido de amônia) a 30%. A 9-metil-acridina foi isolada através de uma extração com AcOEt (acetato de etila), e concentrada à secura em rotaevaporador a uma temperatura de 50°C. O produto obtido foi purificado através de cromatografia flash em sílica gel 60, utilizando como sistema de eluição *n*-hexano/AcOEt 7:3.

4.1.1.2 Síntese da acridina-9-carboxaldeído (AC₀₂-RI):

Procedimento 1° etapa: Dentro de um balão de 50 mL foi adicionado uma solução de 1g da 9-metil-acridina (1 equivalente) em 10 mL de EtOH (etanol), sob agitação. Em seguida foi adicionado (1,25 equivalente) da *N,N*-dimetilnitrosoanilina, sob refluxo, aqueceu-se até 78°C, por 8 horas. Filtrou-se ainda quente e o precipitado foi lavado com EtOH quente (3x5 mL). Após a lavagem com o EtOH, o produto estava praticamente puro, sendo utilizado na próxima etapa.

Procedimento 2° etapa: Em um balão de 100 mL foi adicionado 500 mg do produto obtido na primeira etapa em 15 mL de HCl (ácido clorídrico) a 6M durante 5-6 horas sob refluxo (75-78°C) e forte agitação. Em seguida o produto foi resfriado a temperatura ambiente e filtrado, sendo o precipitado lavado com HCl 2M. Após isso o precipitado foi colocado em um balão com água destilada (25-30 mL), sob agitação em banho de gelo, por aproximadamente 10 minutos, após foi adicionado, compassadamente, Na₂CO₃ (carbonato de sódio) ou NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) até pH entre 7 e 8. O aldeído foi extraído com CH₂Cl₂ (diclorometano) e a fase aquosa foi saturada com uma solução de NaCl (cloreto de sódio). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ (sulfato de sódio), e evaporado a secura em rotaevaporador.



Esquema 4. Esquema reacional de obtenção da acridina-9-carboxaldeido em três etapas.

4.1.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ACILIDRAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS

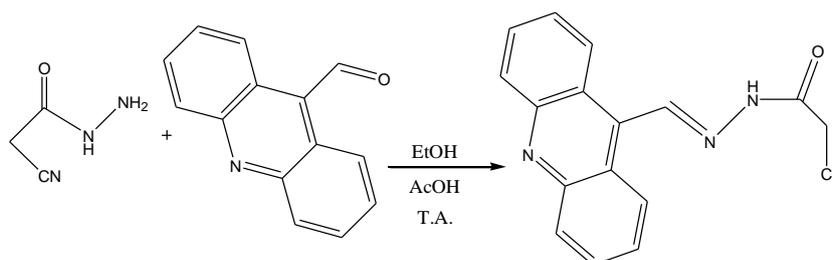
A síntese dos derivados acilidrazônicos-acridínicos foi realizada através de duas etapas reacionais diferentes, sendo assim designadas em duas séries, tão somente pela diferente forma de obtenção dos seus intermediários, sendo estas: a série AMAC e a série AMTAC.

4.1.2.1 Obtenção da série AMAC:

Para obtenção dos compostos da série AMAC, obteve-se um único intermediário (AMAC_{01}), este foi obtido através da reação de condensação da 2-cianoacetohidrazida com a acridina-9-carboxaldeido, onde em seguida condensou-se este intermediário com diferentes aldeídos aromáticos substituídos, obtendo-se os compostos finais da série AMAC.

4.1.2.2 Obtenção do intermediário da série AMAC:

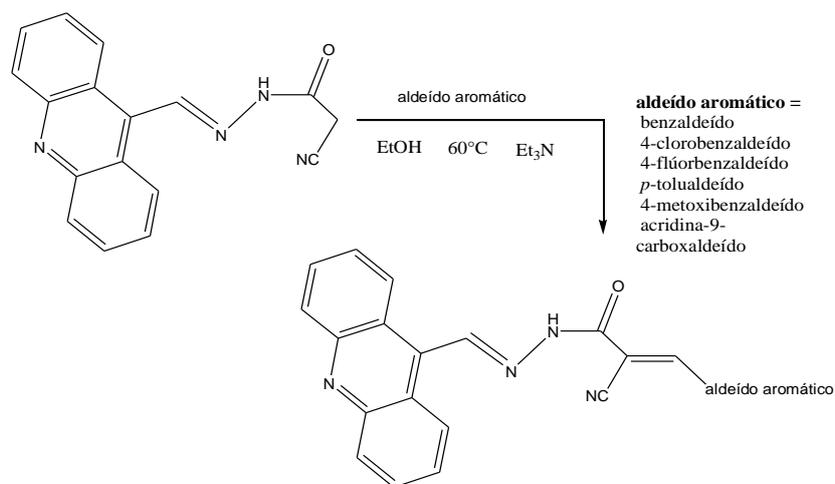
Para obtenção do intermediário (AMAC₀₁), seguiu-se o seguinte padrão reacional: Em um balão de fundo redondo adicionou-se a 2-cianoacetohidrazida e em seguida o EtOH para solubilizá-la, após adicionou-se a acridina-9-carboxaldeído, todos em quantidades equimolares. Compassadamente adicionou-se 20 gotas de AcOH como catalisador da reação, sob agitação e temperatura ambiente (esquema 5). Após 30 minutos observa-se a precipitação dos cristais, bem como a total mudança de coloração da reação. Acompanhou-se por CCD (Cromatografia em Camada Delgada), constatado o término da reação, verificou-se que a reação durou cerca de 4 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com EtOH, obtendo-se os cristais puros, onde estes foram colocados na estufa e posteriormente determinadas suas características físico-químicas.



Esquema 5. Esquema reacional de obtenção do intermediário dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC.

4.1.2.3 Obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC:

Para obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC, seguiu-se o seguinte padrão reacional: Em um balão de fundo redondo adicionou-se o AMAC₀₁ e em seguida o EtOH para solubilizá-la, após adicionou-se diferentes aldeídos aromáticos, todos em quantidades equimolares. Compassadamente adicionou-se de 20 gotas de Et₃N (triethylamina), como catalisador da reação, sob agitação e refluxo de aproximadamente 60°C (esquema 6). Acompanhou-se por CCD, constatado o término da reação, verificou-se que a reação durou cerca de 6 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com EtOH, obtendo-se os cristais puros, onde estes foram colocados na estufa e posteriormente determinadas suas características físico-químicas.



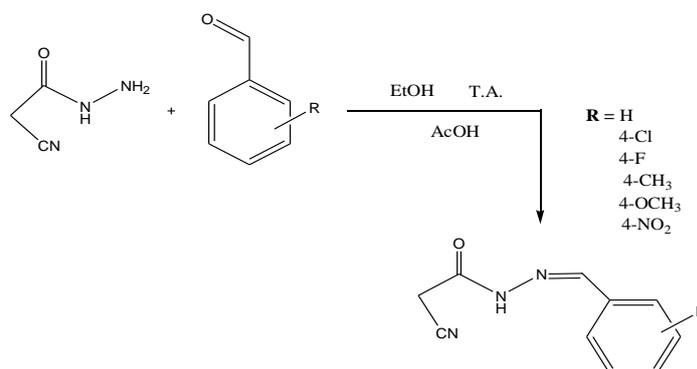
Esquema 6. Esquema reacional de obtenção para os derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC.

4.1.2.4 Obtenção da série AMTAC:

Para obtenção dos compostos da série AMTAC, obteve-se diferentes intermediários, estes foram obtidos através da reação de condensação da 2-cianoacetohidrazida com diferentes aldeídos aromáticos substituídos, onde em seguida os condensou-se com a acridina-9-carboxaldeído, obtendo-se os compostos finais da série AMTAC.

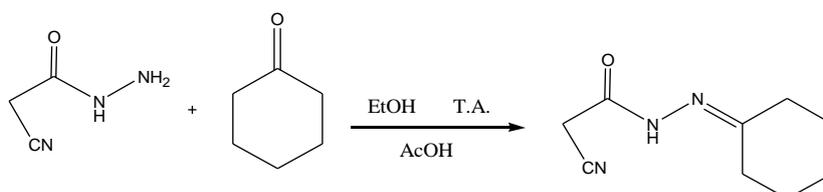
4.1.2.5 Obtenção dos intermediários da série AMTAC:

Para obtenção dos intermediários, seguiu-se o seguinte padrão reacional: Em um balão de fundo redondo adicionou-se a 2-cianoacetohidrazida e em seguida o EtOH para solubilizá-la, após adicionou-se diferentes aldeídos aromáticos, todos em quantidades equimolares. Compensadamente adicionou-se 20 gotas de AcOH, sob agitação e temperatura ambiente (esquema 7). Após 30 minutos observa-se a precipitação dos cristais bem como a total mudança de coloração da reação. Acompanhou-se por CCD, constatado o término da reação, verificou-se que a reação durou cerca de 6 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com EtOH, obtendo-se os cristais puros, onde estes foram colocados na estufa e posteriormente determinadas suas características físico-químicas.



Esquema 7. Esquema reacional de obtenção dos intermediários dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC.

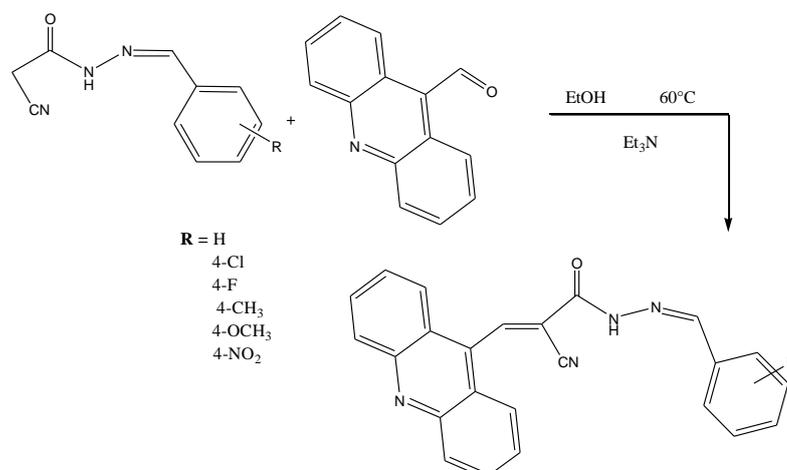
Porém para a obtenção do intermediário ciano-aceto-ciclohexil-metileno-hidrazida (**CCH**), utilizamos a metodologia acima citada, entretanto ao invés do aldeído aromático substituído foi utilizado a ciclohexanona como substrato, de acordo com o esquema 8.



Esquema 8. Esquema reacional de obtenção do intermediário CCH, de um derivado acilidrazônico-acridínico da série AMTAC.

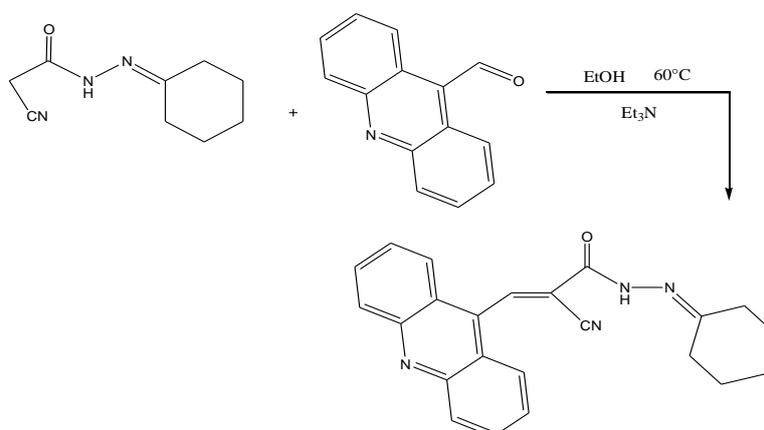
4.1.2.6 Obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC:

Para obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC, seguiu-se o seguinte padrão reacional: Em um balão de fundo redondo adicionou-se os diferentes intermediários e em seguida o EtOH para solubilizá-los, após adicionou-se a acridina-9-carboxaldeído, todos em quantidades equimolares. Compassadamente adicionou-se de 20 gotas de Et₃N, sob agitação e temperatura aproximada de 60°C em refluxo (esquema 9). Acompanhou-se por CCD, constatado o término da reação, verificou-se que a reação durou cerca de 6 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com EtOH, obtendo-se os cristais puros, onde estes foram colocados na estufa e posteriormente determinadas suas características físico-químicas.



Esquema 9. Esquema reacional de obtenção dos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC.

Entretanto para a obtenção do 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-ciclohexilideno-hidrazida (**AMTAC₀₅**) utilizamos o intermediário CCH, seguindo a mesma metodologia acima citada, representado no esquema 10.



Esquema 10. Esquema reacional de obtenção do derivado acilidrazônico-acridínico, **AMTAC₀₅**, da série AMTAC.

4.1.2.7 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Todos os compostos depois de sintetizados tiveram suas características físico-químicas determinadas, que se fazem saber: aparência, solubilidade, cálculo do fator de retenção (R_f), faixa de fusão (F.F). E por último, alguns dos compostos tiveram suas estruturas elucidadas através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H).

O rendimento dos compostos foi calculado, pesando-se a massa do produto obtido em gramas e em seguida calculado o número de mols referente à massa através da fórmula $n^{\circ} = m/PM$. Por fim foi calculada a percentagem de rendimento pela fórmula:

$$\frac{\text{número de mols do produto obtido} \times 100}{\text{número de mols do produto de partida}} = x$$

4.1.2.7.1 Pesagem dos reagentes e compostos

Para a pesagem dos reagentes e compostos foi utilizada uma balança analítica com cinco casas decimais SHIMADZU, modelo AUW220D.

4.1.2.7.2 Faixa de fusão

As faixas de fusão das moléculas sintetizadas foram determinadas através do aparelho Quimis® Modelo Q-340M e não foram corrigidas.

4.1.2.7.3 Cromatografia em Camada Delgada:

As cromatografias analíticas em camada delgada foram efetuadas em placas FLUKA Analytical sílica gel de 0,2mm de espessura com indicador fluorescente de 254nm. As revelações foram feitas por luz ultravioleta (254 ou 365nm).

4.1.2.7.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H):

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio foram obtidos em espectrômetro: Bruker Avance de 400 MHz, Ultrashield e o tratamento dos espectros foi feito no software MestReC 4.8.6.0.

4.1.2.7.5 Cálculo do Log de P

O cálculo do Log de P foi realizado através do programa ChewDram Ultra®, sendo este o Log de P teórico, calculado pelo programa a partir de cada estrutura das novas moléculas sintetizadas.

4.2 AVALIAÇÃO ANTITUMORAL

A avaliação antitumoral foi realizada pelo Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos e Laboratório de Cultura de Células - Departamento de Antibióticos na Universidade Federal de Pernambuco em Recife.

4.2.1 Avaliação citotóxica

A citotoxicidade dos compostos foi mensurada através de um rápido ensaio colorimétrico baseado na utilização do sal de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), primeiramente descrito por Mosmann em 1983 (com modificações) que avalia a viabilidade e proliferação celular pela atividade enzimática das desidrogenases - enzimas associadas com o retículo endoplasmático e a mitocôndria (MOSMANN, 1983; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). As células viáveis são capazes de converter o MTT amarelo, pela clivagem do anel do tetrazólio, à cristais de formazan azul-púrpura insolúveis que precipitam no citosol da célula. A posterior lise celular faz com que estes sais de formazano sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional à formação de cristais azul-púrpura de formazano (SCHERLISS, 2011). A detecção e quantificação dos cristais de formazano são realizadas por espectrofotometria.

4.2.2 Linhagens utilizadas para a avaliação citotóxica

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram HT-29 (câncer de colón) mantidas em meio de cultura DMEM, HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama) mantidas em meio de cultura RPMI. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

4.2.3 Ensaio para a avaliação citotóxica

As células HT-29, MCF-7 (10⁵ células/mL) e HL-60 (0,3 x 10⁶ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida os compostos dissolvidos em DMSO (1%) foram adicionados aos poços em concentração

final de 50 µg/mL. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL). Após 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

4.2.4 Análise de dados

Os experimentos foram realizados em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 5.0.

4.3 AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA

Os testes de atividade antimalárica foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), da Fiocruz-BA.

4.3.1 Atividade Anti- *P. falciparum*:

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

4.3.2 Ensaio de hemólise

A atividade hemolítica dos compostos foi ensaiada em eritrócitos humanos frescos (tipo O⁺). As células foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato e 100 µl desta suspensão (1% hematócrito) foi distribuído em cada cavidade de uma placa de 96 poços. Depois, com 100 µl de cada composto (acridinas), previamente dissolvido em tampão fosfato salino, foram adicionados em triplicata à placa e incubou-se durante 1 hora. Saponina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada como fármaco hemolítico a 1% v/v. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (1500 rpm durante 10 minutos), e 100 µl de cada sobrenadante foi transferido para outra placa de microtítulo. A saída da hemoglobina foi monitorizada por medição da absorbância a 540 nm num espectrofotômetro. A percentagem de hemólise foi calculada da seguinte maneira:

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

4.3.3 Toxicidade celular

As células HepG2 foram mantidas em vermelho-fenol livre em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 50 µg mL⁻¹ de gentamicina. As células foram semeadas em placas de 96 poços (104 células / poço em 100 µl de meio). Após 24 horas, os compostos, previamente diluído em meio RPMI-1640 foram adicionados, em cinco concentrações em triplicata, e a placa foi incubada durante 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, 20% de azul de Alamar foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada durante 24 horas. A absorbância a 570 e 600 nm foi medida. Controles com células tratadas e não tratadas foram executados em triplicata na mesma placa.

4.3.4 Análise de dados

Os experimentos foram realizados em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE QUÍMICA

Depois de sintetizados, todos os derivados foram purificados por diferentes métodos, a depender do composto, incluindo: lavagem sucessivas com solvente, recristalização usando co-solventes, e técnicas cromatográficas de coluna.

A acridina-9-carboxaldeído foi sintetizada através de três etapas reacionais, suas características físico-químicas se encontram dispostas na tabela 1.

TABELA 1. Intermediários e acridina-9-carboxaldeído sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.

Molécula	Aparência	PM	Rend %	FF (°C)	R _f	FM
AC ₀₁ -RI	Pó amarelo	193	60	115-117	0,5	C ₁₄ H ₁₁ N
AC ₀₂ -R	Pó marrom	311	75	218-220	0,59	C ₂₂ H ₁₉ N ₂
AC ₀₂ -RI	Pó amarelo	207	72,04	139-144	0,59	C ₁₄ H ₉ NO

F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção, PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular, Rend% - Rendimento (%).

A acridina-9-carboxaldeído (anexo 8 - figura 2) apresentou rendimento de 72,04% e faixa de fusão com oscilação de 5°C, bem como seu R_f (fator de retenção) foi 0,59 no sistema *n*-hexano/AcOEt 6:4, considerado satisfatório. O composto foi obtido na forma de pó amorfo amarelo (tabela 1).

Foram sintetizados oito intermediários acilidrazônicos, sendo um da série AMAC, 2-ciano-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₁) e os sete restantes da série AMTAC, que foram: ciano-aceto-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (AMCI), ciano-aceto-(4-fluor-benzilideno)-hidrazida (AMF), ciano-aceto-(4-nitro-benzilideno)-hidrazida (AMN), ciano-aceto-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (AMP), ciano-aceto-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (AMT), ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMZ), e ciano-aceto-ciclohexil-metileno-hidrazida (CCH) (anexo 8 – figuras 03 a 10). Todas as características físico-químicas destes compostos se encontram dispostas na tabela 2.

TABELA 2. Intermediários acilidrazônicos sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.

Molécula	Aparência	PM	Rend %	FF (°C)	R _f ^a	FM	Log P teórico
AMAC ₀₁	Pó amarelo	288,1	79,78	205-207	0,51	C ₁₇ H ₁₂ N ₄ O	3,17
AMCI	Pó amarelo	221	81,5	219-221	0,5	C ₁₀ H ₈ N ₃ OCl	2,22
AMF	Pó amarelo	205	100	206-208	0,48	C ₁₀ H ₈ N ₃ OF	1,82
AMN	Pó amarelo	232	30,25	202-210	0,5	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₃	0,50
AMP	Pó amarelo	201,1	57,7	199-206	0,51	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O	2,15
AMT	Pó bege	233,1	94	212	0,5	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂	1,54
AMZ	Pó branco	187,1	82,4	174-176	0,5	C ₁₀ H ₉ N ₃ O	1,67
CCH	Cristais amorfos	179,1	30	110-112	0,5	C ₉ H ₁₃ N ₃ O	1,31

F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção, PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular, Rend% - Rendimento (%). ^a *n*-hexano/AcOEt 7:3.

As sínteses dos intermediários ocorreram satisfatoriamente, de acordo com a tabela 2 seus rendimentos foram de 30% para CCH, justificado por ser uma cetona cíclica e apresenta menor reatividade que o aldeído, e 100% para AMF e suas faixas de fusão tiveram uma oscilação de 2°C, bem como seu R_f foi acima de 0,48, sendo que a maioria apresentou acima de 0,50 no sistema *n*-hexano/AcOEt 7:3.

A maioria dos compostos foram obtidos sob forma de pó, com coloração característica, tendo oscilações entre o amarelo e bege, com exceção do AMZ que foi pó branco e do CCH que foi obtido em forma de cristais marrom.

Foram obtidos seis novos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMAC: 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₂); 2-ciano-3-fenil-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₃); 2-ciano-3-(4-fluor-fenil)-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₄); 2-ciano-3-(4-cloro-fenil)-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₅); 2-ciano-3-*p*-toluil-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₆); 2-ciano-3-(4-metoxi-fenil)-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₇) (anexo 8 – figuras 11 a 16). Todos estes compostos obtidos também tiveram suas características físico-químicas determinadas dispostas na tabela 3.

TABELA 3. Compostos da série AMAC sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.

Molécula	Aparência	PM	Rend %	F.F	R _f	FM	Log P teórico
AMAC ₀₂	Pó amarelo	477,1	86,08	240-245	0,42 ^a	C ₃₁ H ₁₉ N ₅ O	6,61
AMAC ₀₃	Pó amarelo	376,1	64,36	206-210	0,52 ^a	C ₂₄ H ₁₆ N ₄ O	5,11
AMAC ₀₄	Pó verde	394,1	59,36	217-220	0,6 ^b	C ₂₄ H ₁₅ FN ₄ O	5,26
AMAC ₀₅	Pó mostarda	410,1	23	210-212	0,48 ^a	C ₂₄ H ₁₅ ClN ₄ O	5,66
AMAC ₀₆	Pó amarelo	390,1	29	236-238	0,53 ^b	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ O	5,59
AMAC ₀₇	Pó verde	406,1	54,64	213-215	0,42 ^a	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ O ₂	4,98

F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção, PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular, Rend% - Rendimento (%).

^a*n*-hexano/AcOet 7:3. ^b*n*-hexano/AcOet 6:4.

Os compostos da série AMAC também foram sintetizados satisfatoriamente, por se tratarem de produtos sintéticos, visto que seus rendimentos variaram entre 23% (AMAC₀₅) e 86,08% (AMAC₀₂), o que demonstra uma grande viabilidade da rota utilizada, associado a uma grande facilidade de purificação, que foi realizada apenas por filtração e lavagem com EtOH dos precipitados obtidos. Os pesos moleculares variaram de 373 (AMAC₀₃) a 477 (AMAC₀₂) e suas faixas de fusão tiveram uma oscilação de 2 a 5°C, bem como seus R_f a maioria foram 0,6 no sistema *n*-hexano/AcOEt 6:4, com exceção do AMAC₀₇ e AMAC₀₂ que foi de 0,42 no sistema *n*-hexano/AcOEt 7:3. Todos os compostos foram obtidos sob forma de pó amorfo, com coloração característica, a maioria dos produtos amarelo, tendo também mostarda e verde.

Também foram obtidos sete novos compostos derivados acilidrazônicos-acridínicos da série AMTAC: 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-benzilideno-hidrazida (AMTAC₀₁); 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₂); 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₃); 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-nitro-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₄); 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-ciclohexilideno-hidrazida (AMTAC₀₅); 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₆); 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-fluor-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₇) (anexo 8 – figuras 17 a 23). Estes compostos obtidos também tiveram suas características físico-químicas determinadas dispostas na tabela 4.

TABELA 4. Compostos da série AMTAC sintetizados e suas respectivas características físico-químicas.

Molécula	Aparência	PM	Rend %	F.F	R _f ^a	FM	Log P teórico
AMTAC ₀₁	Pó verde	376,1	79,82	217-222	0,44	C ₂₄ H ₁₆ N ₄ O	5,11
AMTAC ₀₂	Pó amarelo	406,1	63,5	236-240	0,56	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ O ₂	4,98
AMTAC ₀₃	Pó amarelo	390,1	39,21	228-234	0,4	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ O	5,59
AMTAC ₀₄	Pó amarelo	421,1	47,42	199-205	0,63	C ₂₄ H ₁₅ N ₅ O ₃	4,05
AMTAC ₀₅	Pó amarelo	368,1	39,37	216-219	0,52	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O	4,75
AMTAC ₀₆	Pó amarelo	410	58,82	240-243	0,51	C ₂₄ H ₁₅ ClN ₄ O	5,66
AMTAC ₀₇	Pó amarelo	394,1	38,36	230-232	0,53	C ₂₄ H ₁₅ FN ₄ O	5,26

F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção, PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular, Rend% - Rendimento (%). ^an-hexano/AcOEt 7:3.

Como podemos observar os compostos da série AMTAC também foram sintetizados satisfatoriamente, por se tratarem de produtos sintéticos, visto que seus rendimentos variaram entre 38,36% (AMTAC₀₇) e 79,82% (AMTAC₀₁), o que demonstra uma grande viabilidade da rota utilizada, associado a uma grande facilidade de purificação, que foi o mesmo da série anterior. Seus pesos moleculares variaram de 368 (AMTAC₀₅) a 421 (AMTAC₀₄) e suas faixas de fusão de oscilaram entre 3 e 5°C, bem como seus R_f foram acima de 0,50, porém sendo de 0,63 no sistema n-hexano/AcOEt 7:3 para o composto AMTAC₀₄. Todos os compostos foram obtidos sob forma de pó amorfo, com coloração característica, da maior parte dos produtos amarela, com apenas um composto diferente, sendo verde.

Apenas os compostos AMAC₀₁, AMAC₀₂, AMTAC₀₁, AMTAC₀₂, AMTAC₀₃, AMTAC₀₅ e AMTAC₀₆, tiveram suas elucidções estruturais obtidas (anexo 1 a 7), devido às dificuldades enfrentadas com as parcerias de outras instituições.

O RMN é um método que consiste na submissão dos compostos estudados a um campo magnético forte, onde tais moléculas irão absorver energia através de núcleos de ¹H ou ¹³C, e resultando em espectros característicos (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

Os dados resultantes das caracterizações espectroscópicas através de RMN ¹H das moléculas estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Dados dos espectros de RMN ^1H (δ em ppm).

Molécula	RMN ^1H
AMAC ₀₁	δ = 12,19 ppm (1H, s, NH); δ = 9,17 ppm (1H, s, =CH); δ = 4,31 ppm (2H, s, CH ₂); δ = 8,55 ppm (2H, d, aromático), J =8,4 Hz; δ = 8,18 ppm (2H, d, aromático), J =8,4 Hz; δ = 7,87 ppm (2H, t, aromático) J =7,6 Hz, J =1,2 Hz; δ = 7,69 ppm (2H, t, aromático) J =8,0 Hz, J =0,8 Hz; δ = 2,49 ppm DMSO (d6)
AMAC ₀₂	δ = 9,95 ppm, (1H, s, NH); δ = 9,29 ppm, (1H, s, CH); δ = 8,74 ppm, (1H, s, CH); δ = 8,09 ppm (2H, d, aromático) J =8,8 Hz; δ = 7,76 ppm (4H, m, aromático); δ = 7,36 ppm (2H, m, aromático); δ = 7,24 ppm (2H, d, aromático), J =8,0 Hz; δ = 7,07 ppm (2H, d, aromático), J =8,4 Hz; δ = 6,94 ppm (2H, t, aromático), J =7,6 Hz; δ = 2,49 ppm DMSO (d6)
AMTAC ₀₁	δ = 9,85 ppm (1H, s, NH); δ = 8,56 ppm (1H, s, CH); δ = 8,39 ppm (1H, s, CH); δ = 7,34 ppm (4H, m, aromático); δ = 7,27 ppm (2H, m, aromático); δ = 7,01 ppm (4H, t, aromático) J = 7,6 Hz; δ = 6,83 ppm (2H, t, aromático) J =7,6 Hz; δ = 2,49 ppm DMSO (d6)
AMTAC ₀₂	δ = 9,83 ppm (1H, s, NH); δ = 8,51 ppm (1H, s, CH); δ = 8,37 ppm (1H, s, CH); δ = 3,71 ppm (3H, s, OCH ₃); δ = 7,29 ppm (4H, m, aromático); δ = 7,00 ppm (4H, m, aromático); δ = 6,86 ppm (4H, m, aromático); δ = 2,49 ppm DMSO (d6)
AMTAC ₀₃	δ = 6,75 ppm (1H, s, NH); δ = 8,63 ppm (1H, s, CH); δ = 7,66 ppm, (1H, s, CH); δ = 2,29 ppm, (3H, s, CH ₃); δ = 7,36 ppm (2H, d, aromático) J = 8,4 Hz; δ = 7,28 ppm (2H, m, aromático); δ = 7,06 ppm (2H, d, aromático) J = 8,0 Hz; δ = 6,96 ppm (2H, m, aromático); δ = 6,93 ppm (4H, m, aromático); δ = 7,27 ppm (s, CDCl ₃)
AMTAC ₀₅	δ = 9,54 ppm (1H, s, NH); δ = 8,49 ppm (1H, s, CH); δ = 2,10 ppm (4H, m, ciclohexil); δ = 1,42 ppm (4H, s, ciclohexil); δ = 1,28 ppm (2H, s, ciclohexil); δ = 7,24 ppm (4H, m, aromático); δ = 6,96 ppm (4H, dd, aromático) J = 7,24 Hz; δ = 6,83 ppm (2H, t, aromático) J = 7,2 Hz; δ = 2,49 ppm DMSO (d6)
AMTAC ₀₆	δ = 9,86 ppm (1H, s, NH); δ = 8,55 ppm (1H, s, CH); δ = 8,39 ppm (1H, s, CH); δ = 7,37 ppm (4H, s, aromático); δ = 7,27 ppm (2H, s, aromático); δ = 7,01 ppm (4H, s, aromático); δ = 6,84 ppm (2H, s, aromático); δ = 2,49 ppm DMSO (d6)

simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), multiplete (m).

A molécula AMAC₀₁ possui um pico em 12,19 ppm referente ao sinal do NH, seguido de mais um pico em 9,17 ppm referente ao sinal do =CH. Além disso, possui um pico em 4,31 ppm referente ao sinal do CH₂ da 2-cianoacetohidrazida (figura 12).

Já AMAC₀₂ possui um pico em 9,95 ppm referente ao NH e dois simpletos em 9,29 e 8,74 ppm referentes ao =CH, além dos hidrogênios aromáticos acridínicos em uma faixa de 6,94 a 8,55 ppm (figura 13), sendo característicos da faixa de aromáticos que é entre 6,0 e 9,95 (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

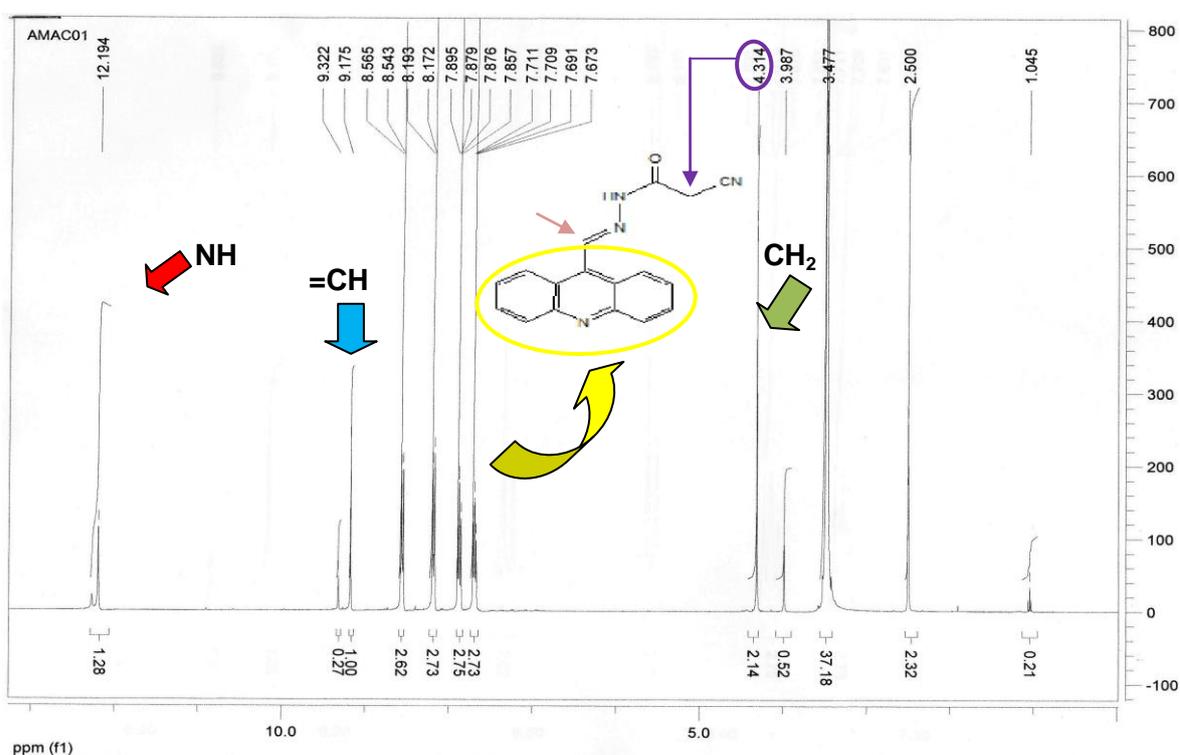


Figura 12. Gráfico de espectro de RMN ¹H do composto AMAC₀₁. Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectros.

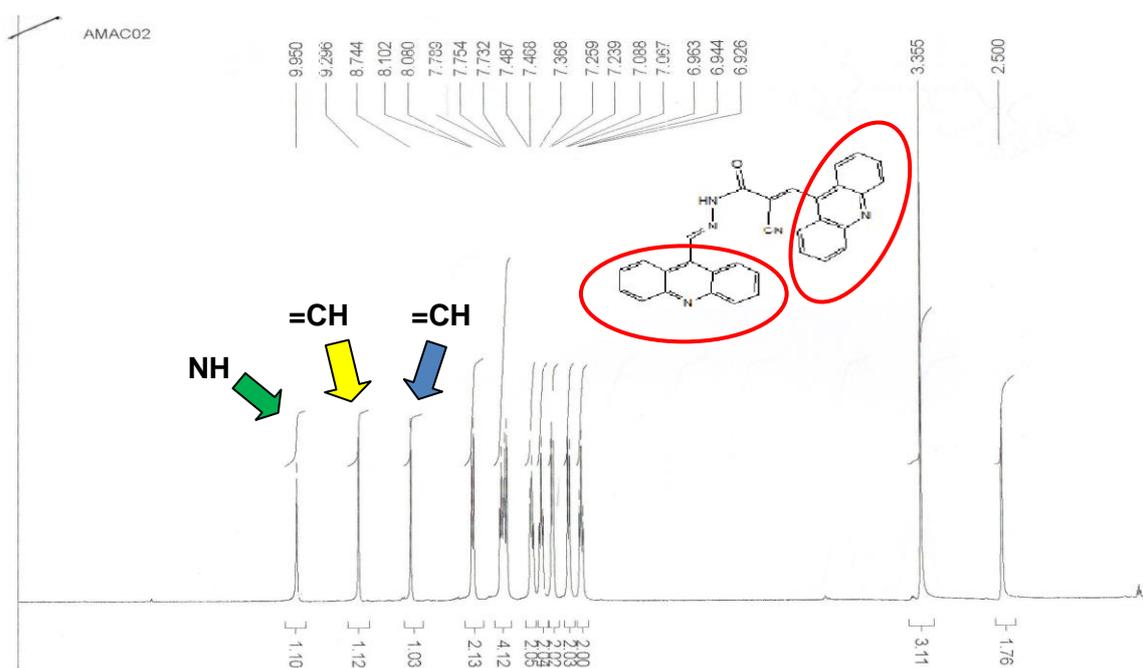


Figura 13. Gráfico de espectro de RMN ^1H do composto AMAC₀₂. Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectros.

Também observamos que as moléculas AMTAC₀₁, AMTAC₀₂, AMTAC₀₅ e AMTAC₀₆ possuem um pico entre 9,54 e 9,86 ppm referente ao sinal do NH, a única exceção é AMTAC₀₃, que apresenta o NH em 6,75 ppm, isso pode ser justificado pela mudança do solvente utilizado, pois este foi o único feito em CDCl₃.

Quase todas as moléculas da série apresentaram picos entre 7,66 e 8,63 ppm referentes ao sinal =CH, referentes aos picos das condensações com o aldeído, exceto o AMTAC₀₅ que foi condensado com uma cetona cíclica. A molécula AMTAC₀₂ possui um pico em 3,71 ppm referente ao sinal do OCH₃ (figura 14); AMTAC₀₃ possui um pico em 2,29 ppm referente ao sinal de CH₃ e a AMTAC₀₅ que apresenta picos entre 1,28 e 2,10 ppm referente ao ciclohexil (figura 15).

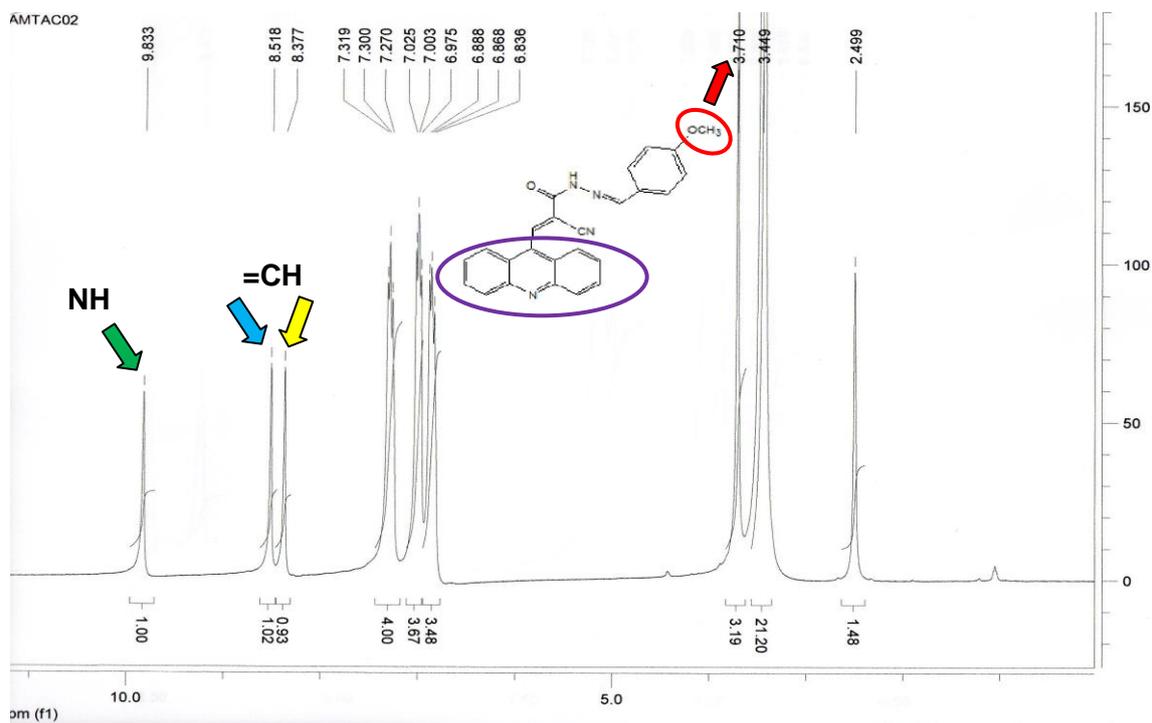


Figura 14. Gráfico de espectro de RMN ^1H do composto AMTAC₀₂. Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectros.

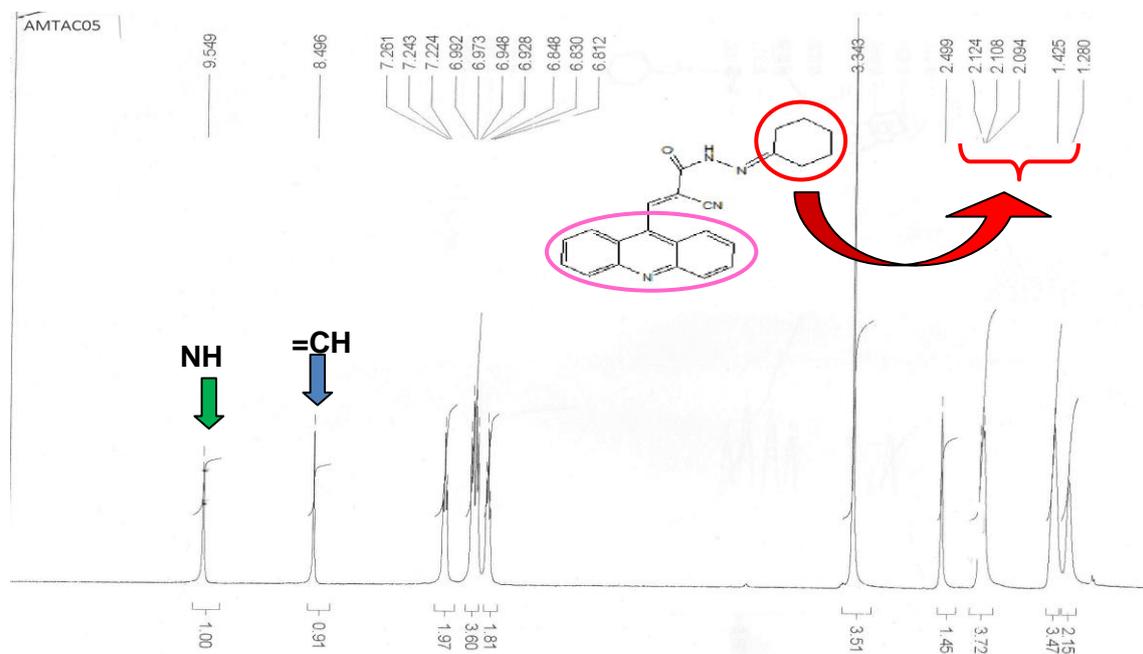


Figura 15. Gráfico de espectro de RMN ^1H do composto AMTAC₀₅. Uma correlação da estrutura com os picos apresentados nos espectros.

5.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

5.2.1 Avaliação antitumoral.

Os resultados da avaliação antitumoral dos compostos testados na concentração de 50 µg/mL são apresentados na tabela 6.

TABELA 6. Avaliação antitumoral pelo ensaio de MTT.

Produtos teste	% de inibição		
	HL-60	MCF-7	HT-29
AMTAC ₀₁	98,21	75	95,02
AMTAC ₀₂	96,98	71,47	88,34
AMAC ₀₁	96,67	40,28	35,39
AMAC ₀₂	95,85	44,03	N.T
AMAC ₀₃	58,53	86,86	N.T

N.T= não testado

De acordo com a tabela 6 podemos observar na série AMTAC que a molécula AMTAC₀₁ inibiu significativamente a proliferação das três linhagens utilizadas no ensaio de MTT para avaliação antitumoral inibindo respectivamente as linhagens de HL-60, MCF-7 e HT-29 em 98,21%, 75% e 95,02%. Já AMTAC₀₂ inibiu significativamente a proliferação de apenas duas das linhagens, inibindo respectivamente as linhagens de HL-60 e HT-29 em 96,98%, e 88,34%.

Já na série AMAC, a molécula AMAC₀₁ inibiu apenas a proliferação de HL-60 em um percentual de 96,67%, sendo não significativa para as outras duas linhagens, pois teve uma inibição abaixo de 75%. A molécula AMAC₀₂ também teve o mesmo padrão que AMAC₀₁ inibindo apenas HL-60 em 95,85%. Já a molécula AMAC₀₃ inibiu apenas a linhagem MCF-7 em 86,6%, mostrando um padrão diferente das outras moléculas, visto que nenhuma inibiu esta linhagem.

Analisando as estruturas das moléculas da série AMTAC (figura 16) observamos que a única diferença é a presença do grupo metóxi no anel benzilidênico, sendo um grupo elétron com efeito doador moderado que parece diminuir não muito significativamente a atividade biológica, porém precisamos avaliar com a presença de outros grupos, como o CH₃, para afirmativas mais seguras, assim acreditamos se grupos retiradores como o CF₃ ou halogênios poderiam aumentar a atividade.

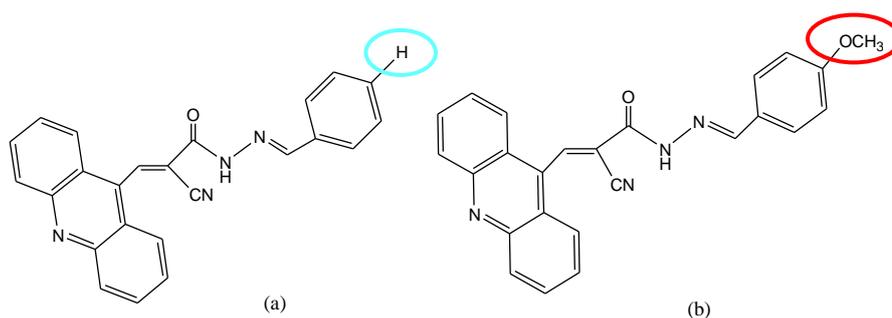


Figura 16. Diferenças estruturais entre as moléculas (a) AMTAC₀₁ e (b) AMTAC₀₂.

Observando AMAC₀₁ e AMAC₀₂ (figura 17) vimos que a condensação do aldeído de acridina na posição 2 da 2-ciano-acridina-9-il-metileno-hidrazida não altera significativamente a atividade para as linhagens HL-60 e MCF-7. Já a condensação com o benzaldeído (AMAC₀₃), observamos que há perda da atividade para HL-60, porém há um aumento expressivo para MCF-7, sendo isso um forte indicativo que a molécula pode atuar em alvos biológicos diferentes, de acordo com o tipo de câncer.

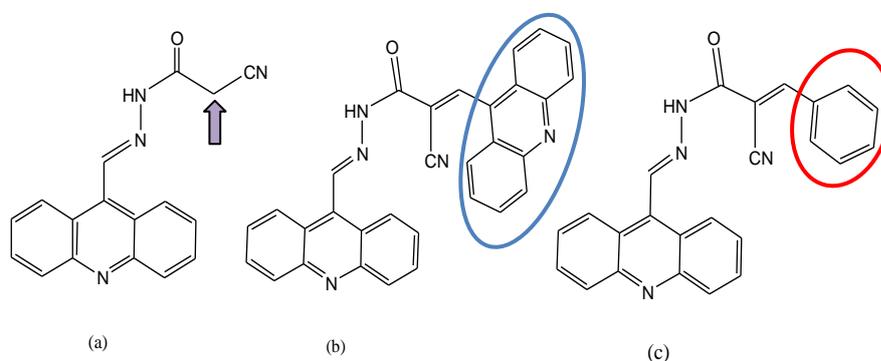


Figura 17. Diferenças estruturais entre as moléculas (a) AMAC₀₁, (b) AMAC₀₂, e (c) AMAC₀₃.

Por se tratar de um *screening inicial* acreditamos que poderemos descobrir melhores resultado com as amostras que apresentaram inibição maior que 75% em três linhagens, onde estas serão submetidas à determinação da concentração que inibe 50% do crescimento em relação ao controle negativo (CL₅₀), que também será realizado pelo mesmo laboratório para obter um resultado mais preciso da citotoxicidade dos compostos.

Acreditamos ainda que a solubilidade pode ter afetado os ensaios, porém não foi o determinante, pois o AMAC₀₁ apresenta o menor Log de P e mesmo assim tem

atividade inferior ao AMAC₀₃ para a linhagem MCF-7, indicando que não seria apenas a solubilidade e sim a reatividade da molécula para o seu alvo.

5.2.2 Avaliação antimalárica

Os resultados da avaliação da Atividade Anti-*P. falciparum* e citotoxicidade em células hospedeiras, bem como seus índices de seletividade se encontram dispostos na tabela 7.

Tabela 7. Atividade Anti-*P. falciparum*, citotoxicidade em células hospedeiras e índice de seletividade.

Compostos	IC ₅₀ ±D.P. (μM)		Índice de seletividade (SI) ^(c)
	Cepa W2 <i>P. falciparum</i> ^(a)	Células hospedeiras HepG2 ^(b)	
AMAC ₀₁	1,2±0,82	> 50	41
AMAC ₀₂	2,8±1,5	5,83±0,81	2
AMAC ₀₃	> 10	> 50	-
AMAC ₀₄	> 10	> 200	-
AMAC ₀₆	> 10	> 200	-
AMTAC ₀₁	3,2±0,05	19,71±0,53	6
AMTAC ₀₂	0,29±0,01	7,10±0,89	24
AMTAC ₀₃	> 10	> 50	-
AMTAC ₀₅	1,6±0,9	79,6±0,6	50
AMTAC ₀₆	2,8±0,2	12,2±0,5	4
<i>m</i> AMSA (amsacrina)	0,8±0,1	5,2±0,6	7
Mefloquina	0,04±0,01	11,81±0,28	295
Primaquina	1,7±0,1	82,9±0,2	49

^aOs compostos foram testados contra a fase eritrocítica da cepa W2 de *Plasmodium falciparum* e incubou-se durante 96 h, o experimento foi repetido utilizando-se concentrações em triplicata. ^bDeterminado por células HepG2 usando Alamar Azul. Todos os valores de IC₅₀ são a média ± desvio-padrão (DP), a partir de dois experimentos independentes. ^cCL₅₀/IC₅₀.

De acordo com a tabela 7, observamos que na série AMAC, a molécula AMAC₀₁ possui uma maior atividade antimalárica (IC₅₀ 1,2±0,82μM). As moléculas AMAC₀₃, AMAC₀₄, AMAC₀₆, não apresentam atividade relevante, pois apresentaram IC₅₀ >10μM, já para as células hospedeiras HepG2 apresentaram IC₅₀ > 50μM. Também podemos observar que desta série, a AMAC₀₁, a mais potente, possui o maior índice de seletividade (41). Já a molécula AMAC₀₂, apesar de apresentar IC₅₀ para

atividade antimalárica de $2,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$, apresenta um IC_{50} para HepG2 de $5,83 \pm 0,81 \mu\text{M}$ e um baixo índice de seletividade (2).

Observa-se também que na série AMTAC, as moléculas AMTAC_{02} e AMTAC_{05} possuem atividade antimalárica, pois apresentaram respectivamente IC_{50} de $0,29 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e $1,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$, e IC_{50} para as células hospedeiras HepG2 de $7,10 \pm 0,89 \mu\text{M}$ e $79,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$, porém apenas o AMTAC_{05} teve um alto índice de seletividade (50). Já AMTAC_{01} , AMTAC_{03} e AMTAC_{06} não apresentaram atividade antimalárica, pois seus índices de seletividade foram baixos.

Analisando a estruturas das moléculas AMAC_{01} e AMAC_{02} (figura 18), observamos que entre si a 1ª molécula (a) é 2 vezes mais potente que a 2ª (b) e apresenta aproximadamente 20 vezes maior seletividade para as células infectadas com o parasita, indicando que a condensação com um 2º aldeído acridínico, apesar de não alterar significativamente a atividade, aumenta a sua toxicidade, e quando condensado com aldeídos aromáticos substituídos (d) e (e) ou não (c), perdem sua atividade e seletividade.

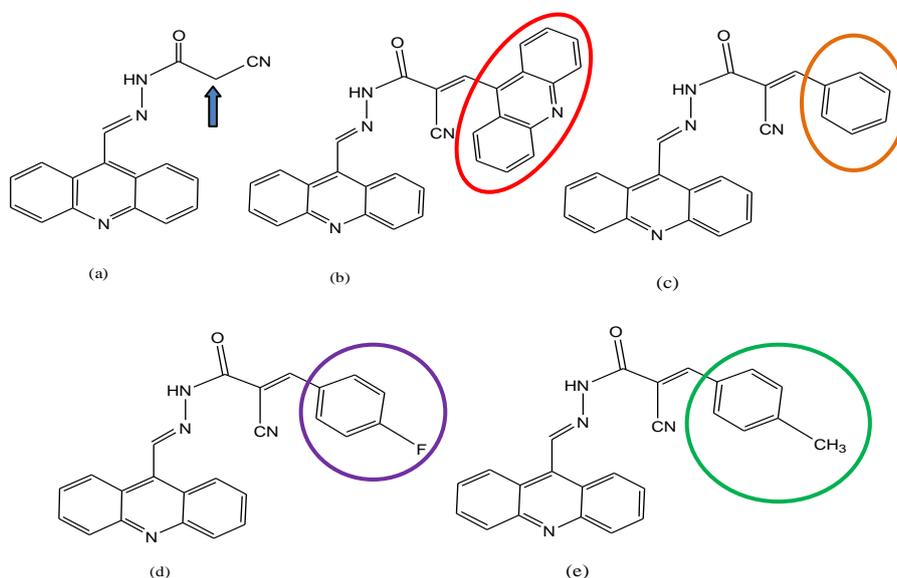


Figura 18. Diferenças estruturais entre as moléculas (a) AMAC_{01} , (b) AMAC_{02} , e (c) AMAC_{03} , (d) AMAC_{04} e (e) AMAC_{06} .

Analisando a série AMTAC, onde a condensação do aldeído acridínico ocorre no grupo metilênico da 2-cianoacetohidrazida, observamos uma mudança no perfil

farmacológico das moléculas, visto que quando comparadas entre si a AMTAC₀₁ e AMTAC₀₂ (figura 19), a 2^a (b) é aproximadamente 11 vezes mais potente que a 1^a (a) e apresenta índice de seletividade 4 vezes maior. A diferença estrutural é apenas a introdução do grupo metóxi no aldeído aromático em posição *para*, sendo este grupo um doador moderado. Quando é um grupo doador forte, observamos perda de atividade (no caso AMTAC₀₃ – molécula d) e quando é um grupo halogênio (no caso AMTAC₀₆ – molécula e), observamos uma resposta semelhante ao com o grupo benzaldeído (no caso AMTAC₀₁ - molécula a).

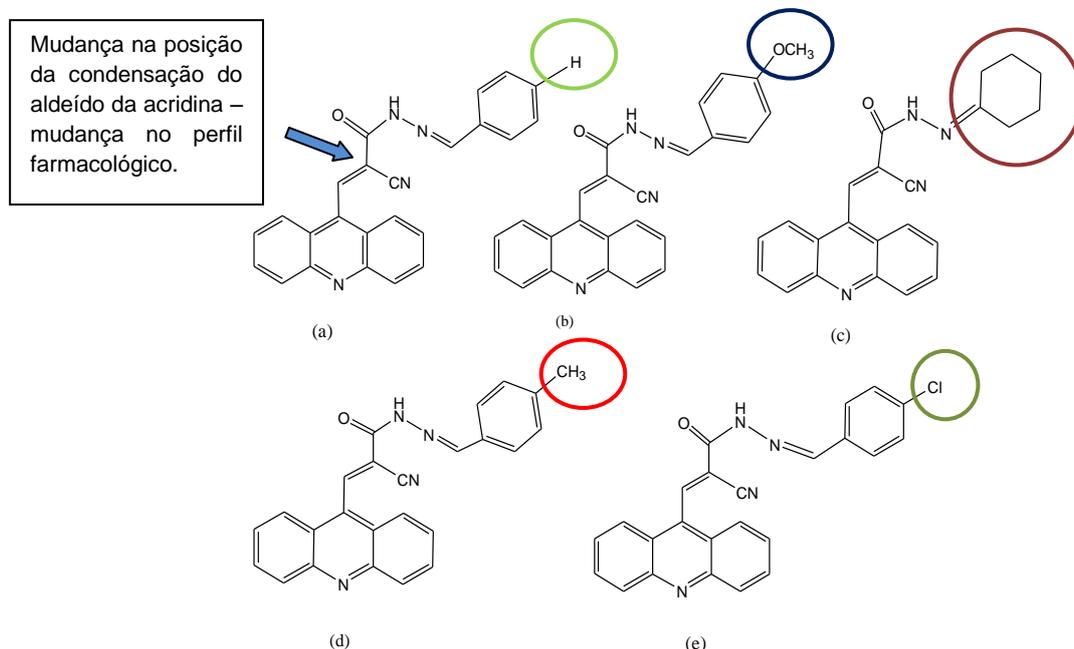


Figura 19. Diferenças estruturais entre as moléculas (a) AMTAC₀₁, (b) AMTAC₀₂, (c) AMTAC₀₅, (d) AMTAC₀₃, (e) AMTAC₀₆,

Com o intuito de comparar com um derivado acridínico conhecido na literatura por apresentar atividade antitumoral comprovada, testamos a *m*-AMSA (figura 20) e podemos observar que possui uma significativa atividade antimalárica, porém um índice de seletividade relativamente baixo, o que indica a sua toxicidade em relação às células do hospedeiro, destacando assim, a seletividade de alguns derivados acilidrazônicos-acridínicos que apresentaram maior índice.

Quando comparamos os resultados obtidos da Primaquina (figura 20) com uma das nossas moléculas (AMTAC₀₅ - figura 19), observa-se que, apesar da Primaquina apresentar atividade antimalárica (IC₅₀ 1,7±0,1µM) e índice de seletividade de 49, observou-se que a AMTAC₀₅ apresentou resultados semelhantes, mesmo sendo ainda um produto puro, sem estar incorporado em uma forma farmacêutica, indicando uma possível diminuição da dose quando incrementada a sua solubilidade. Ainda observamos que a condensação com a cetona cíclica (AMTAC₀₅), também favoreceu para a seletividade do composto, apresentando a melhor seletividade da série testada. A análise estrutural comparativa da mesma com a primaquina indica que compostos contendo grupos aminoalquílicos ou piperidínicos favorecem tanto a atividade como também a seletividade dos compostos, e que os compostos contendo grupos aromáticos, apesar de apresentarem significativa atividade, apresentam também toxicidade.

Por fim a mefloquina (figura 20), que apesar de ter apresentado o melhor resultado da série testada, já é um fármaco comercial, em uma forma farmacêutica definida. Entretanto é um dos únicos disponíveis para cepas resistentes, limitando assim as opções terapêuticas, além do que em alguns países foram encontrados casos de resistência a diversos tratamentos, inclusive ao mesmo abordado (DONDORP et al., 2009; ENSERINK, 2010).

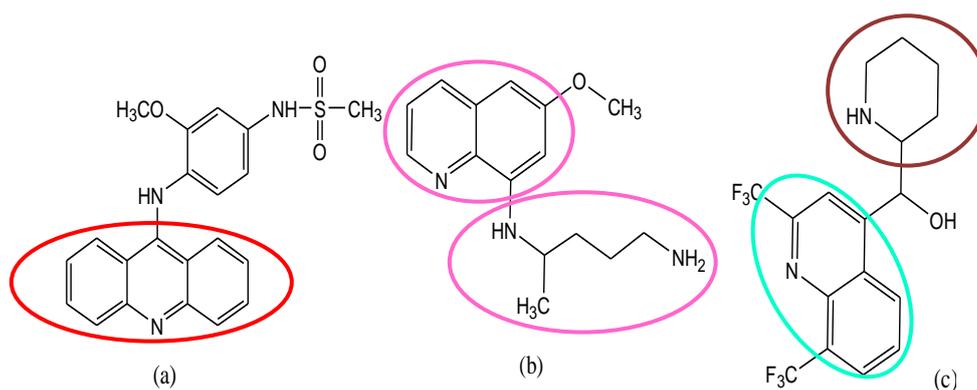


Figura 20: Diferenças estruturais entre as moléculas (a) Amsacrina, (b) Primaquina e (c) Mefloquina.

Com a intenção de justificar as diferentes atividades antimaláricas baseando-se nas estruturas dos compostos, comparamos as duas séries testadas com os fármacos de referência, buscando através do bioisosterismo e/ou similaridades estruturais, que

pu dessem indicar um possível farmacóforo. Como observado, as moléculas padrões apresentam um núcleo quinolínico (figura 20) em sua estrutura básica, as moléculas testadas apresentam um núcleo acridínico (figuras 18 e 19), que na verdade é um benzo[*b*]quinolínico e que substituições neste núcleo contribuem positivamente para atividade antimalárica, porém a natureza dos grupos substituintes e suas posições podem afetar de forma significativa a atividade biológica. Isso pode ser observado quando comparamos as duas séries testadas (AMTAC e AMAC).

Com o intuito de verificar se a morte celular não seria por lise da mesma, foram realizados ensaios de hemólise e de acordo com os gráficos 1, 2 e 3, podemos observar que moléculas testadas não causaram lise das hemácias (seus percentuais de hemólise não foram tão significativos, sendo abaixo de 30%), demonstrando que a atividade citotóxica das mesmas não é devido a danos de membrana, ou seja, nenhuma das moléculas testadas atuou danificando a membrana celular, sendo assim a morte das mesmas pode ter ocorrido por outros mecanismos, como apoptose por exemplo.

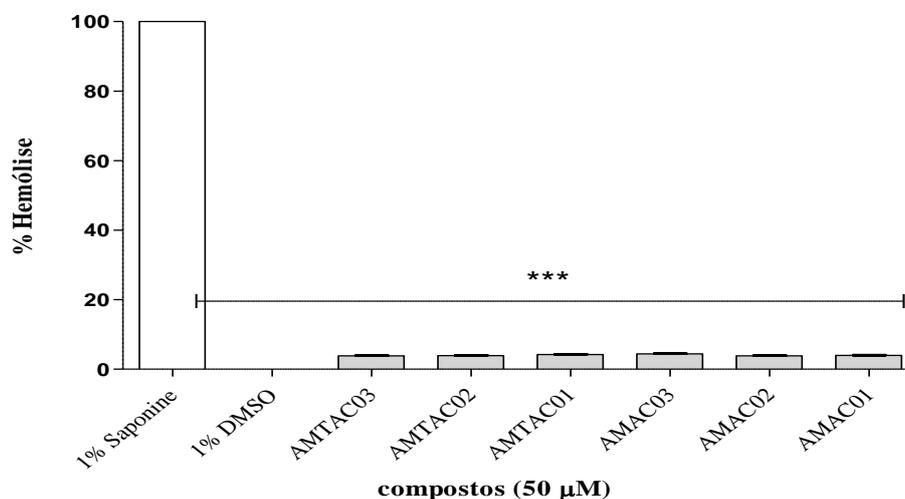


Gráfico 1: Ensaio hemolítico para acridinas (série 1). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O⁺), após 1 h de incubação com os compostos (50 μ M), em triplicata. *** p < 0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's).

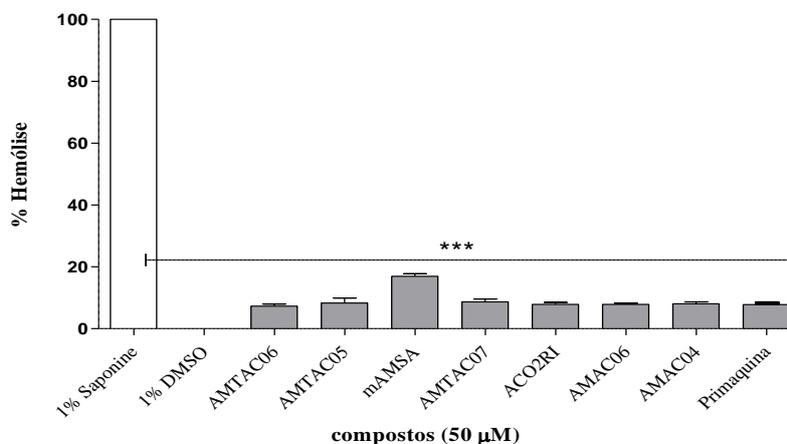


Gráfico 2: Ensaio hemolítico para acridinas (série 2). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O⁺), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p <0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's).

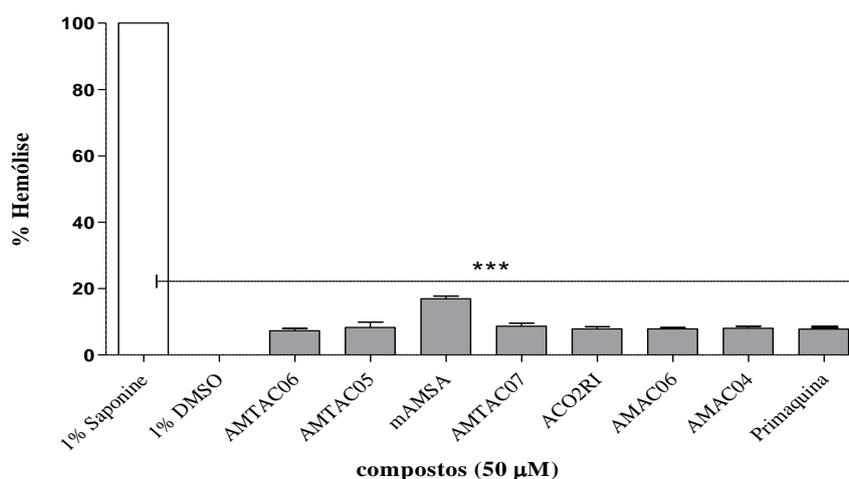


Gráfico 3: Ensaio hemolítico para acridinas (2º experimento). A atividade foi ensaiada em eritrócitos humanos infectados (tipo O⁺), após 1 h de incubação com os compostos (50 µM), em triplicata. *** p <0,0001 (ANOVA simples seguido pelo teste de Tukey's).

Desta forma acreditamos que os derivados acridínicos testados não são apenas moléculas promissoras para a quimioterapia do câncer, mas também fortes candidatos a fármacos antiparasitários, entretanto se faz necessários estudos mais aprofundados para que possamos garantir a eficácia dos mesmos nos seus alvos biológicos, e maior segurança para os seus futuros usuários.

6. CONCLUSÃO

Foram obtidos um intermediário da série AMAC e sete da série AMTAC, sendo obtidos seis compostos finais da série AMAC e sete compostos da série AMTAC, totalizando 13 novos derivados acilidrazônicos-acridínicos.

As rotas sintéticas utilizadas se mostraram satisfatórias e eficientes para a obtenção das moléculas, por se tratarem de produtos sintéticos, uma vez que seus rendimentos foram entre 23% (AMAC₀₅) e 86,08% (AMAC₀₂).

Todas as moléculas tiveram suas características físico-químicas determinadas, porém apenas as moléculas AMAC₀₁, AMAC₀₂, AMTAC₀₁, AMTAC₀₂, AMTAC₀₃, AMTAC₀₅ e AMTAC₀₆, tiveram suas estruturas elucidadas através de RMN ¹H.

A avaliação biológica que consistiu de avaliação antitumoral e antimalárica permitiu que observássemos que nas séries AMAC e AMTAC algumas moléculas são candidatas promissoras a terapêutica visto que apresentaram significativas atividades.

Destacamos que a molécula AMTAC₀₁ na avaliação antitumoral inibiu acima de 75% a proliferação das três linhagens utilizadas no teste de MTT.

Já a molécula AMTAC₀₅ na avaliação antimalárica teve um alto índice de seletividade (50) e IC₅₀ de 1,6±0,9 µM.

Observamos também a potencialidade de moléculas com atividade antitumoral como fortes candidatas para tratamento antimalárico ou até mesmo para outras doenças parasitárias, incentivando dessa forma novas pesquisas utilizando drogas consideradas já obsoletas para o tratamento do câncer como uma nova opção terapêutica para doenças negligenciadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABC. **Academia Brasileira de Ciências**. 2013. Disponível em: http://www.abc.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=92. Acesso em: 15 out 2013.
- ALBERT, A. **The Acridines**. 2.ed. London: Edward Arnold LTDA. cap. 19, p. 403-433, 1966.
- ALI, Md. R. et al. Review of biological activities of hydrazones. **Indonesian J. Pharm.** v. 23, n. 4, p. 193 – 202. 2012.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALMEIDA, V. M. et al. Síntese de Hidrazidas e *N*-acil-aril-hidrazonas, potencialmente bioativas, derivadas do Azabicyclo Pirrolidina[3,2-*d*]2-isoxazolina. *In: Anais da 25ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, 2002.
- ATWELL, G.J. et al. Potential antitumour agents. 50. *In vivo* solid tumor activity of derivatives of *N*-{2-(dimethylamino)-ethyl}-acridine-4-carboxamide. **J. Med. Chem.** v. 30, p. 664-669, 1987.
- BAGULEY, B. C. et al. Carbamate Analogue of Amsacrine with Activity Against Non-cycling Cells Stimulates Topoisomerase II Cleavage at DNA Sites Distinct From Those of Amsacrine. **Eur. J. of Cancer**. v. 33, n. 2, p. 272-2279, 1997.
- BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Rev. Virtual Quím.** v. 1, n. 1, p. 26-34. 2009.
- BARREIRO, E. J. As Longas Pernas do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®; <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio>): Histórico e Perspectivas. **Rev. Virtual Quím.** v. 5 n. 2, p. 266-282. 2013.
- BARREIRO, E. J. et al. A química medicinal de novos de *N*-Acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quím. Nova**. v. 25, n.1, 129-148, 2002.
- BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v. 20, p. 3533–3539. 2012.
- BELMONT, P. et al. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 7, p. 139-169, 2007.

- BONASSA, E. M. A; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. São Paulo (SP): Atheneu, p. 3-19. 2005.
- BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N. Vigilância global, prevenção e controle das doenças respiratórias crônicas: Uma abordagem integradora. **Organização Mundial da Saúde**. 150 p. Lisboa, 2008.
- BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro / Brasil**. Ministério da Saúde – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde. 80 p. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011**. Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde – Brasília. v. 44, n. 1, 16 p. 2013.
- CACHIBA, T. H. et al. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. **Quím Nova**, v.35, n.8, p. 1566-1569, 2012.
- CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GOODMAN e GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. 1647 p., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.
- CALDERÓN, F.; WILSON, D. M.; GAMO, F-J. Antimalarial Drug Discovery: Recent Progress and Future Directions. **Progress in Medicinal Chemistry**. Chapter Three. 01/2013; 52:97-151. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62652-3.00003-X>
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: desafios. **Gaz. Méd. Bahia**. v. 78 (Suplemento 1) p. 98-106. 2008.
- CARDONA, A. A. et al. Síntesis, Caracterización y Evaluación de Actividad Leishmanicida de Acil Hidrazonas. **Actualidades Biológicas**, 27, p.58, 2005.
- CHILIN, A. et al. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. **Bioorg. Med. Chem.** v. 15, n. 17(2), p. 523-9. doi: 10.1016/j.bmc.2008.11.072. 2009.
- CUI, Z. et al., New class of potent antitumor acylhydrazone derivatives containing furan. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 5576-5584. 2010.

DECIT. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 1, 200-2. 2010.

DENNY, W. A. Chemotherapeutic Effects of Acridine Derivatives. **Med. Chem. Rev.**, v. 1, p. 257-266, 2004.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DONDORP, A. M. et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **N Engl J Med** v. 361, p. 455-467. 2009.

ENSERINK, M. **Global public health. What's next for disease eradication?** Science. v. 330, p. 1736-1739. 2010.

FANG, L. et al. Synthesis and Biological Evaluation of NO-Donor-Tacrine Hybrids as Hepatoprotective Anti-Alzheimer Drug Candidates. **J. Med. Chem.**, v. 51 n. 4, p. 713-716. 2008. Doi: 10.1021/jm701491k

FIOCRUZ. **Malária**. Biblioteca de Ciências Biomédicas. 2013. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bibcb/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=104&sid=106>. Acesso em: 15 out 2013.

FORMARIZ, T. P. et al. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**. v. 16, n. 1-2, Jan/Fev. 2004.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* citotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**. v. 160, p. 171-177, 2006.

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

GAMAGE, S.A. et al. Synthesis and in-vitro evaluation of 9-anilino-3,6-diaminoacridines active against a multidrug-resistant strain of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J. of Med. Chem.**, v. 37. n 10, p. 1486-1494. 1994.

GARCIA, L. P. et al. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Texto para discussão**, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA, Brasília, 65 p., 2011.

GEMMA, S. et al. Synthesis of *N*1-arylidene-*N*2-quinolyl- and *N*2-acrydinylhydrazones as potent antimalarial agents active against CQ-resistant *P. falciparum* strains. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v.16, p. 5384-5388, 2006.

GOMES, A., P. et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Rev Bras Ter Intensiva**. v. 23, n. 3, p. 358-369. 2011.

GOULART, F. A. A. **Doenças crônicas não transmissíveis: estratégias de controle e desafios e para os sistemas de saúde**. Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde. Brasília- DF. 91 p. 2011.

GUETZOVAN, L. et al. Antimalarial acridines: Synthesis, in vitro activity against *P. falciparum* and interaction with hematin. **Bioorg. Med. Chem.** v. 17, p. 8032–8039. 2009. doi:10.1016/j.bmc.2009.10.005

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.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Editora: Elsevier, Rio de Janeiro, 1100 p. 2011.

HOWELL, L. A., et al. Synthesis and evaluation of 9-aminoacridine derived from benzyne click chemistry. **Bioorg. Med. Chem.** v. 19, p. 5880–5883. 2009.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, 2148-2154, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. Lyon, France: 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 20 dez. 2013.

IFA, D.R. et al. A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases by salicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds. **J. Mol. Struct**, v. 505, p.11-17, 2000.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 118 p. 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação; organização Luiz Claudio Santos Thuler. – 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro: Inca, 129 p. 2012.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 124 p. 2014.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Quimioterapia. 2013. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. Acesso em: 15 out 2013.

INCT-IDN. **Doenças negligenciáveis**. 2013. Disponível em: http://www.cdts.fiocruz.br/inct-idn/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=112&Itemid=61. Acesso em: 15 out 2013.

KUMAR, D. et al. Novel bis(indolyl)hydrazide–hydrazones as potent cytotoxic agents, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 212-215. 2012.

KUMAR, R. et al. Synthesis of 9-anilinoacridine triazines as new class of hybrid antimalarial agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 19, p. 6996–6999. 2009. doi:10.1016/j.bmcl.2009.10.010.

KUMAR, R. et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. **Arab. J. Chem.** 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.035>.

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

MAUËL, J., et al. 9-Anilinoacridines as Potential Antileishmanial Agents. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 37, n. 5. p. 991-996. 1993.

MAY, B. C. et al. Structure-activity relationship study of 9-aminoacridine compounds in scrapie-infected neuroblastoma cells. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 15;16. n. 18. p. 4913-6. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.050>

MELNYK, P. et al. Design, synthesis and *in vitro* antimalarial activity of an acylhydrazone library. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.16, p.31-35, 2006.

MOSHER, M.D.; NATALE, N.R. The preparation of intercalating isoxazoles via a nitrile oxide cycloaddition. **J. Het. Chem.**, v. 32, p.779-781, 1995.

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

MOURA, R.O. **Síntese e Avaliação Antitumoral *in vitro* de Novos Derivados Isoquinolínicos Quinazolínicos, Pirimidínicos e Piridínicos Acridínicos.** 2009. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas na área de Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal) Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE. Brasil. 2009.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v.9, n.1, p.1-15. 2010. <http://www.malariajournal.com/content/9/1/115>

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Estratégia e plano de ação regional para um enfoque integrado à prevenção e controle das doenças crônicas inclusive regime alimentar, atividade física e saúde. **Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde.** 52 p. 2007.

PARISE, E. V.; ARAÚJO, G. C.; CASTRO, J. G. D. Situação epidemiológica da malária no Estado do Tocantins, Brasil, a partir da emancipação política e administrativa, 1989 a 2009. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.21, n.1, p. 129-140, Brasília, 2012.

PARRILHA, G. L. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividades farmacológicas e relações de estrutura-atividade.** 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry.** 5th ed. New York: Oxford University Press. 848 p. 2013.

PÉREZ, B. et al. *In vitro* efficiency of 9-(N-cinnamoylbutyl)aminoacridines against blood- and liver-stage malaria parasites. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 23, p. 610–613. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.032>

PRAJAPATI, S.P. et al., Synthesis, characterization and antimalarial evaluation of new β -benzoylstyrene derivatives of acridina. **Arab. J. Chem.** 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.033>

RUNDON, R.W. **Cancer Biology**. 4th ed. Oxford University Press. New York. 568 p. 2007.

SALUM, L.B. **Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais**. 2011. 220 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada Biomolecular). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP. Brasil. 2011.

SÁNCHEZ, I. et al. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **Eur. J. Med. Chem.** v. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SCHERLISS, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. **Int J Pharm.** v. 411, p. 98-105, 2011.

SCHNEIDER, E. et al. Cell line selectivity and DNA breakage properties of the antitumour agent *N*-{2-(dimethylamino)-ethyl}acridine-4-carboxamide: role of DNA topoisomerases II. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** v. 24, p. 1783-1790. 1988.

SILVA, T. G. **Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Novos Derivados Acridino-tiazolidínicos e Acridino-Imidazolidínicos**. 2003. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Recife-PE. Brasil. 2003.

SILVA, T. H. Á. et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 43, n. 1, jan./mar., 2007.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C. Química Orgânica. v. 1 e 2. **Editora LTC**, v. 8, 2009.

SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** v. 45, p. 555–563. 2010.

SOUZA, W. et al. **Doenças negligenciadas**. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro. 56 p., 2010.

TEIXEIRA, J. R. M. **Avaliação terapêutica da malária por *Plasmodium vivax*: perfil cinético da cloroquina e primaquina**. 2011. 95 f. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

TIAN, B. et al. Synthesis and Antiviral Evaluation of New *N*-Acylhydrazones Containing Glycine Residue. **Chem Biol Drug Des**, v.77, p.189-198, 2011.

TOMAR, V., et al. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. **Eur. J. Med. Chem.** v. 45, p. 745–751. 2010.

TSUGE, O.; NISHINOHARA, M.; TASHIRO, M. Compounds related to acridine. I. Condensation of acridine derivatives having active methyl group and aromatic nitroso compounds. **Bull. Chem. Soc. Japan**, v. 44, n. 11, p. 1477-1485, 1963.

VALDÉS, A. F-C. Acridine and Acridinones: Old and New Structures with Antimalarial Activity. **J. Med. Chem.** v. 5, p. 11-20. 2011.

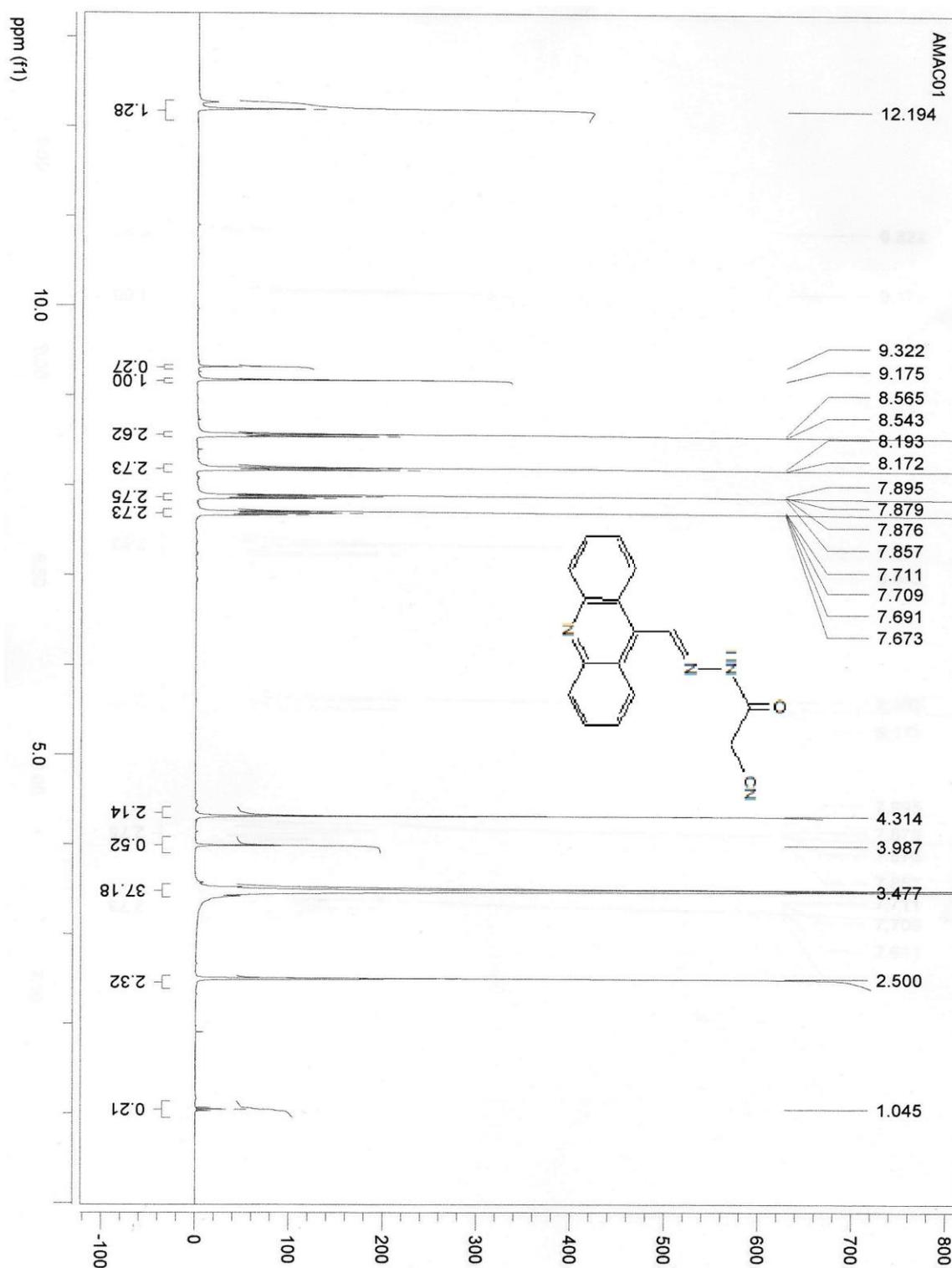
VIEGAS-JÚNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the desing of new drug prototypes, **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n.17, p. 1829-1852. 2007.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3rd. Academic Press. New York. 942 p. 2008.

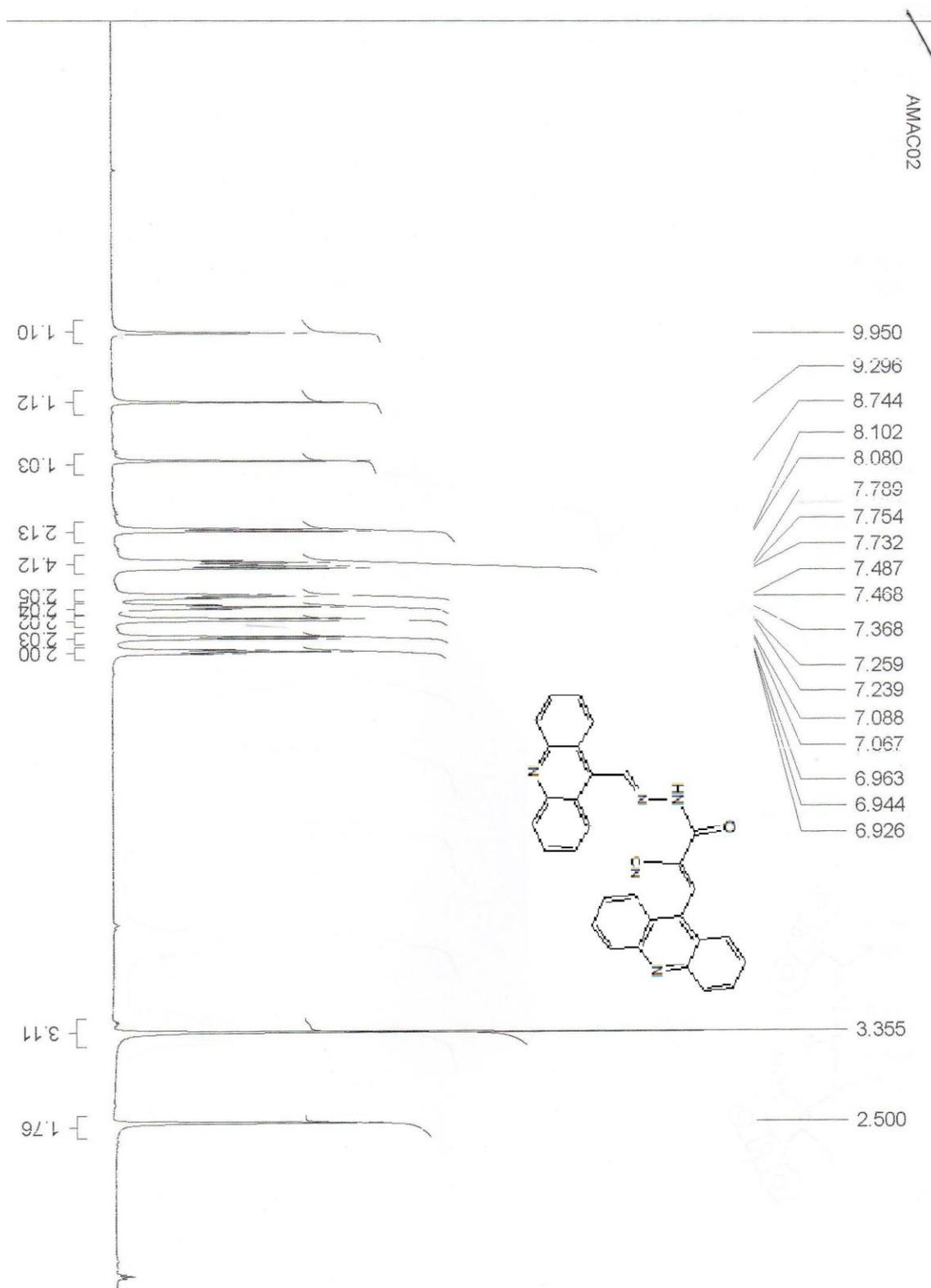
WHO. World Health Organization. World Malaria Report 2013: FACT SHEET. **Geneva: WHO**, 2013.

ZAMPIROLI, L. S. Dialquilfosforidilidrazonas derivadas de isatinas *N*-substituídas com potencial atividade biológica. **Dissertação (Mestrado em Química)**, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

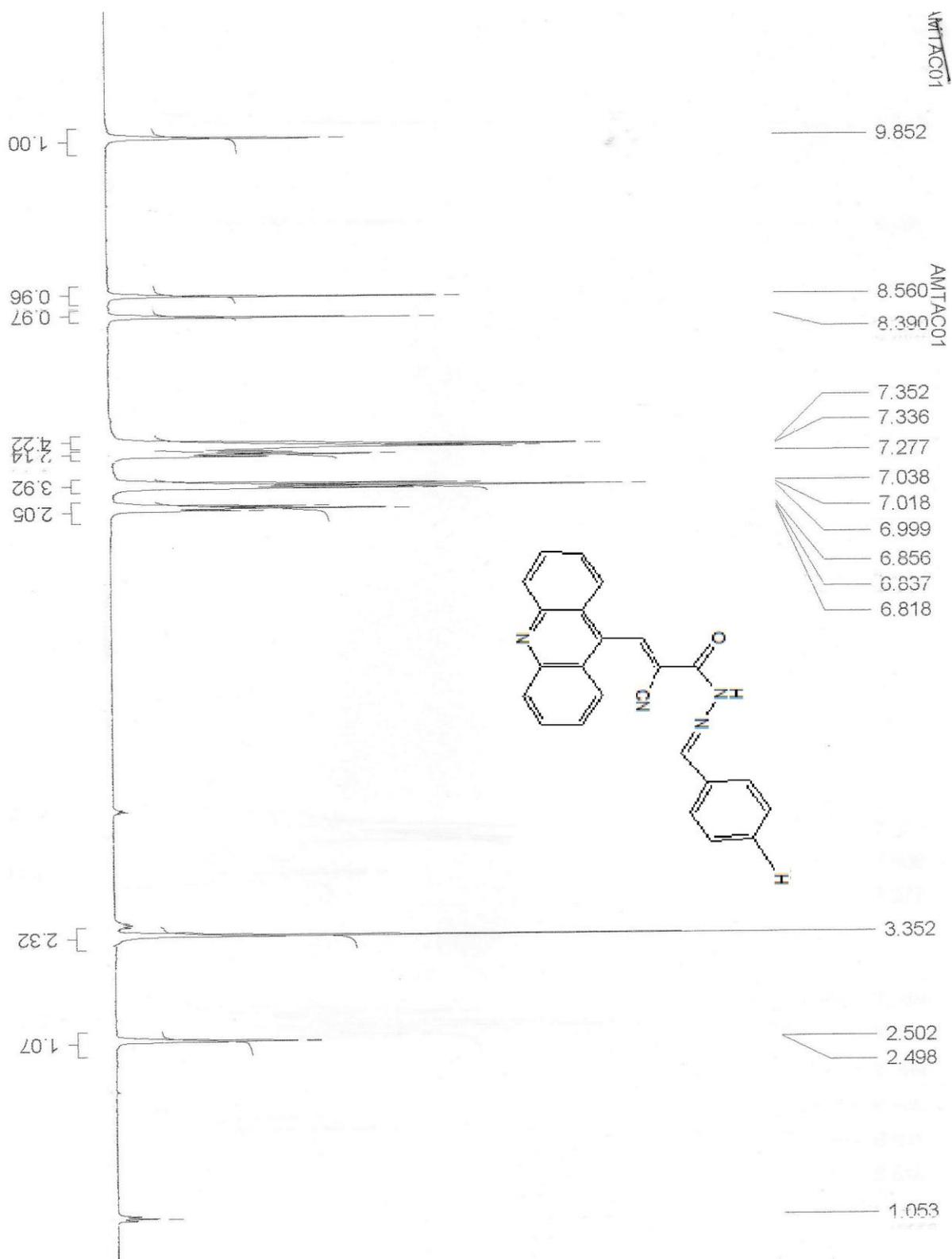
ANEXOS

Anexo 1: Espectro de RMN ^1H da 2-ciano-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₁).

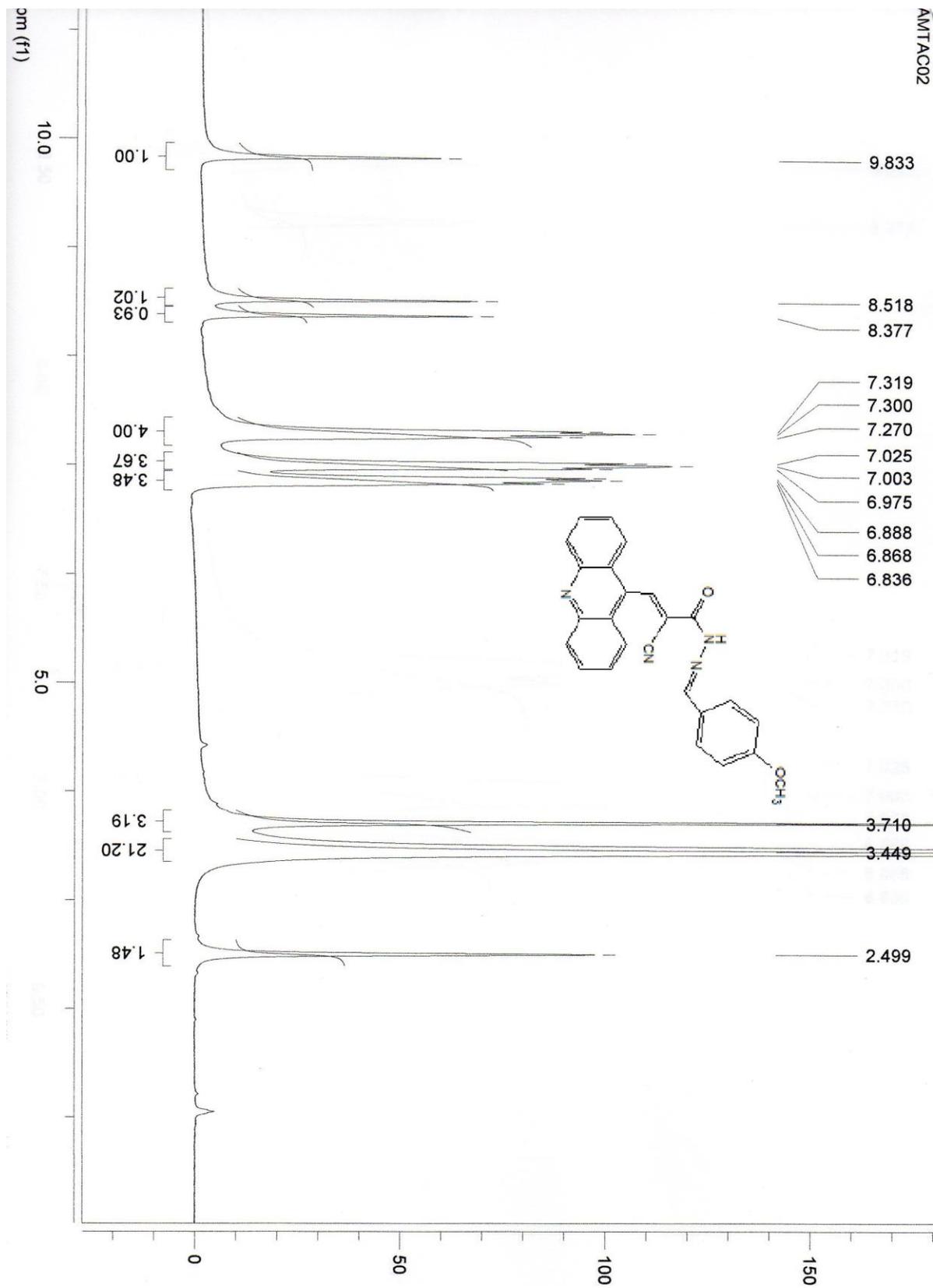
Anexo 2: Espectro de RMN ^1H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₂).



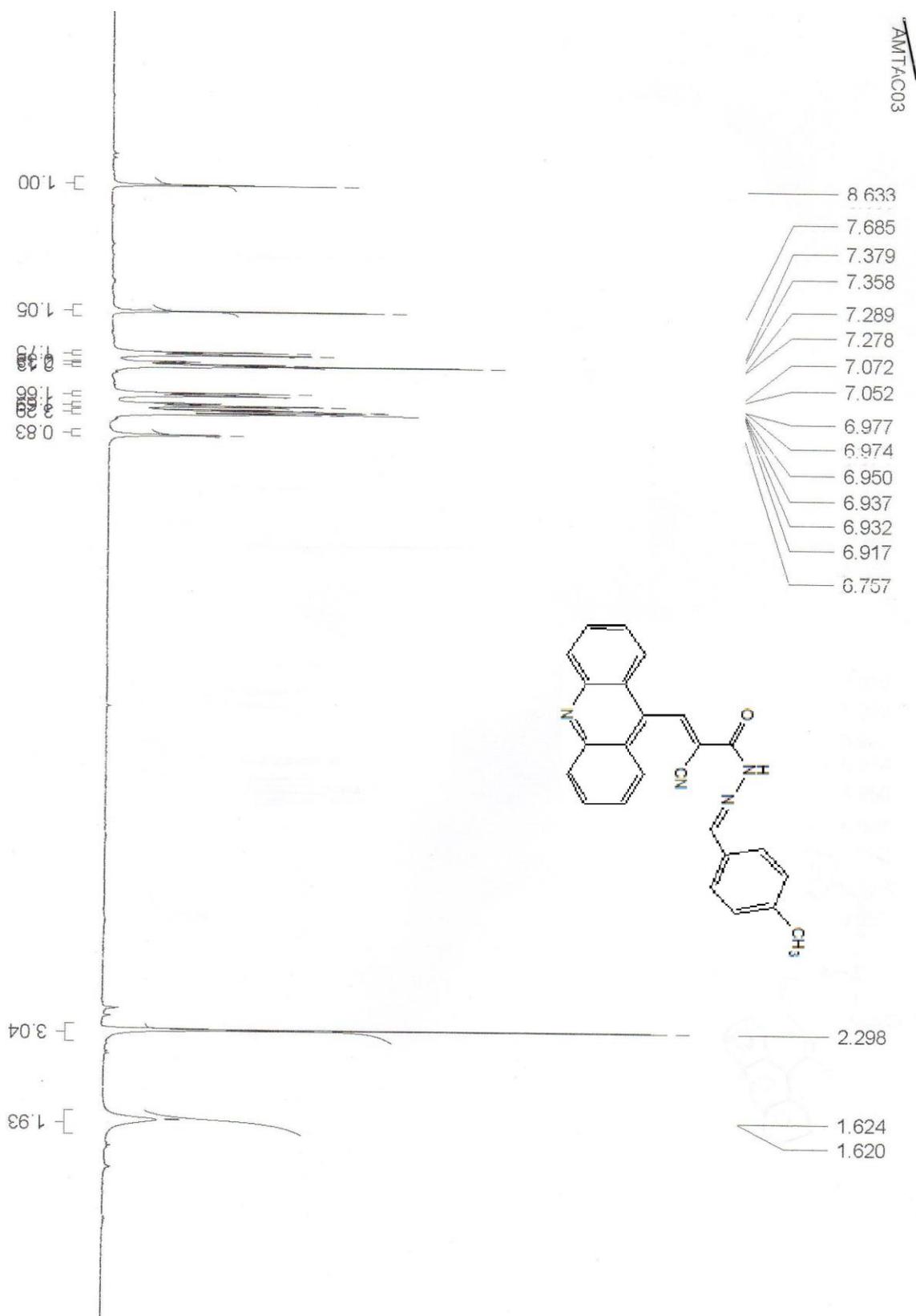
Anexo 3: Espectro de RMN ^1H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-benzilideno-hidrazida (AMTAC₀₁).



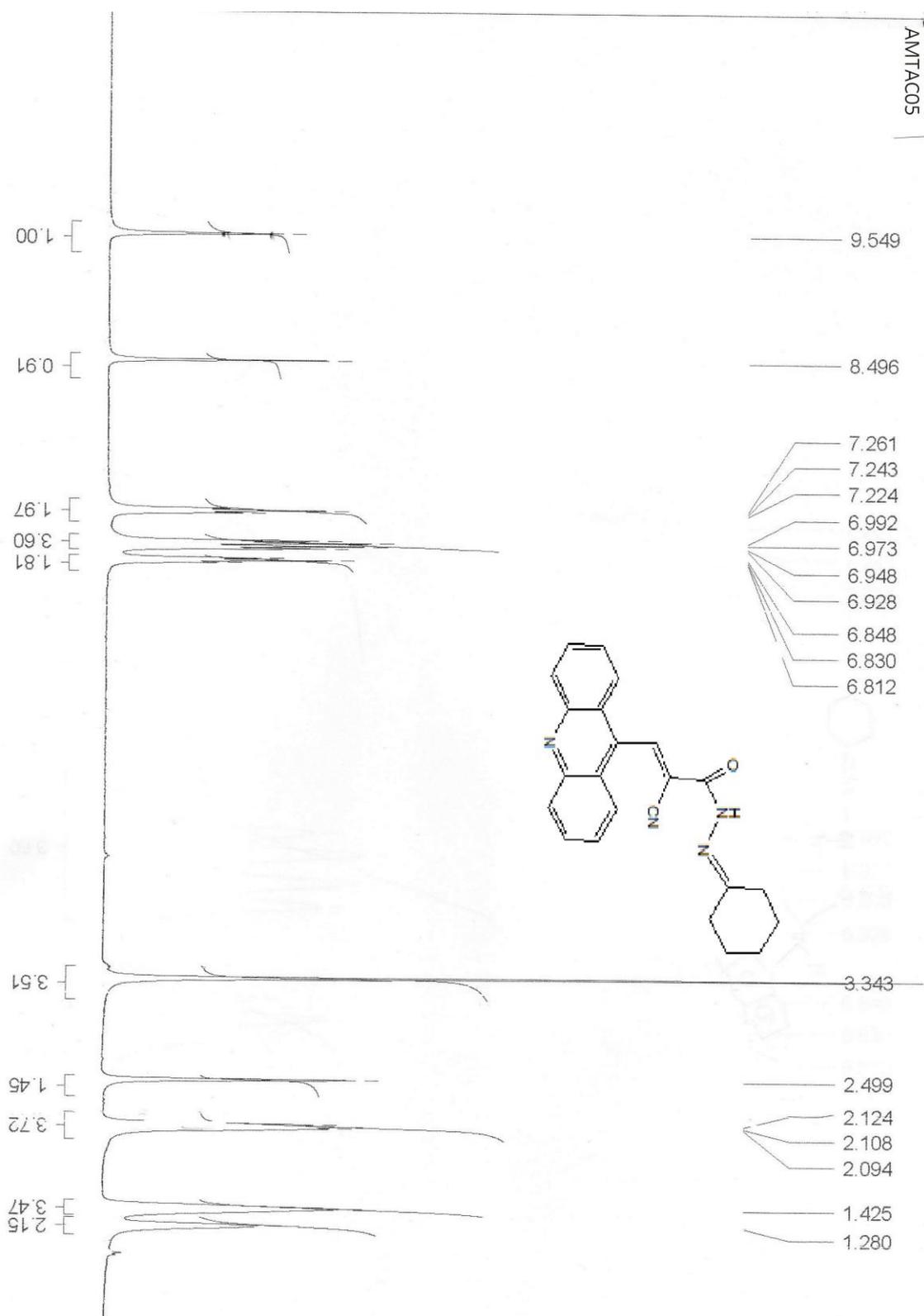
Anexo 4: Espectro de RMN ^1H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₂).



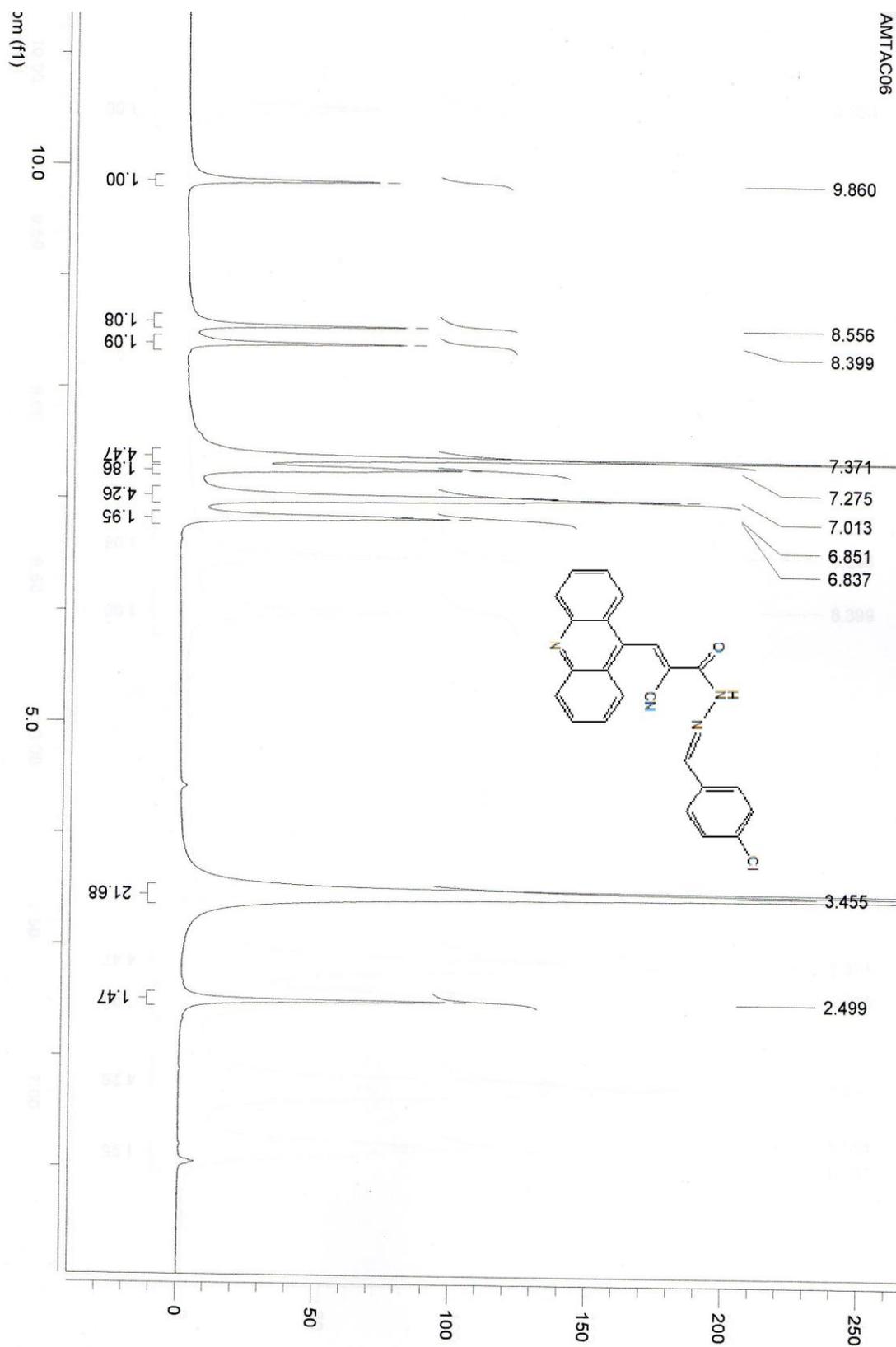
Anexo 5: Espectro de RMN ^1H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₃).



Anexo 6: Espectro de RMN ^1H da 3-acridin-9-il-2-ciano- acrilato-ciclohexilideno- hidrazida (**AMTAC₀₅**).



Anexo 7: Espectro de RMN ^1H da 3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₆).



Anexo 8: Figuras das estruturas dos compostos sintetizados.

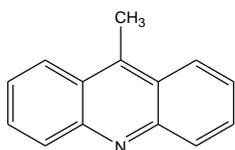


Figura 01: Estrutural da 9-metil-acridina (AC₀₁RI).

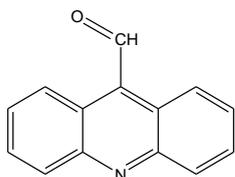


Figura 02: Estrutura da acridina-9-carboxaldeido (AC₀₂RI).

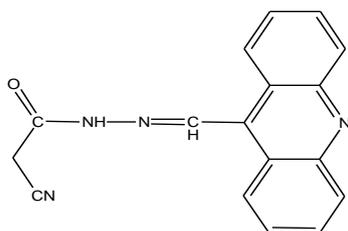


Figura 03: Estrutura molecular da 2-ciano-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₁).

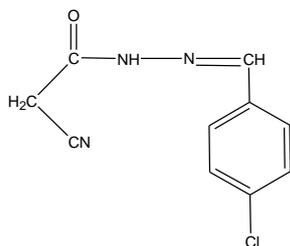


Figura 04: Estrutura molecular da ciano-aceto-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (AMCI).

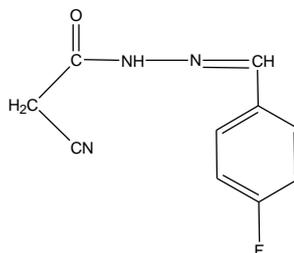


Figura 05: Estrutura molecular da ciano-aceto-(4-fluor-benzilideno)-hidrazida (AMF).

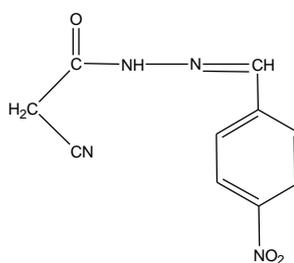


Figura 06: Estrutura molecular da ciano-aceto-(4-nitro-benzilideno)-hidrazida (AMN).

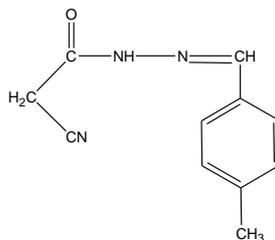


Figura 07: Estrutura molecular da ciano-aceto-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (AMP).

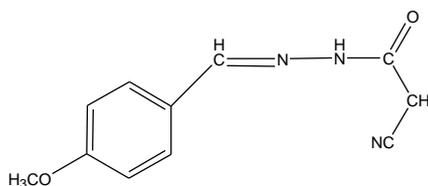


Figura 08: Estrutura molecular da ciano-aceto-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (AMT).

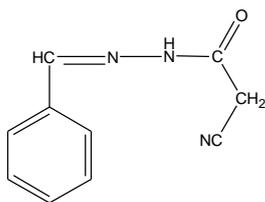


Figura 09: Estrutura molecular da ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMZ).

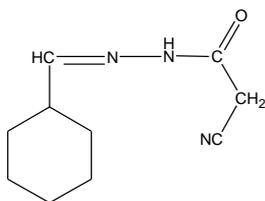


Figura 10: Estrutura molecular da ciano-aceto-ciclohexil-metileno-hidrazida (CCH).

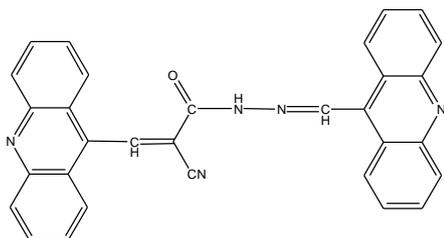


Figura 11: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₂).

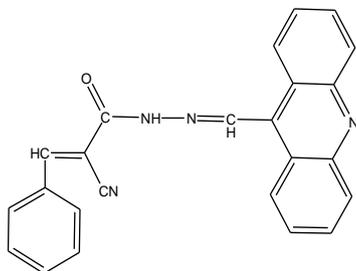


Figura 12: Estrutura molecular da 2-ciano-3-fenil-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₃).

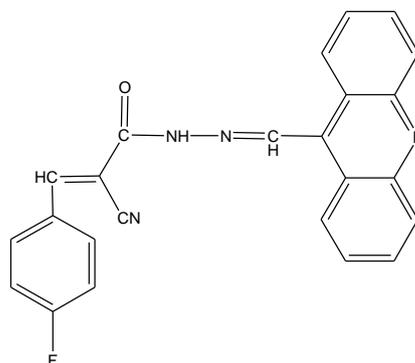


Figura 13: Estrutura molecular da 2-ciano-3-(4-fluor-fenil)-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₄).

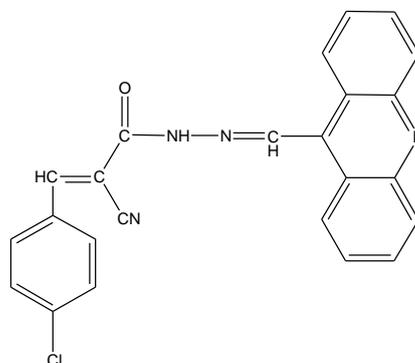


Figura 14: Estrutura molecular da 2-ciano-3-(4-cloro-fenil)-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₅).

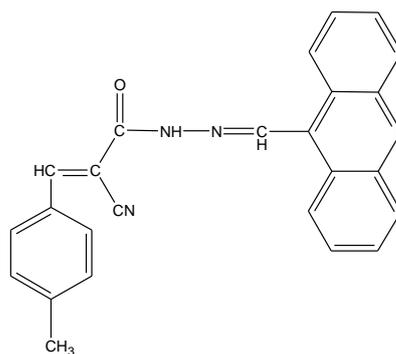


Figura 15: Estrutura molecular da 2-ciano-3-p-toluil-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₆).

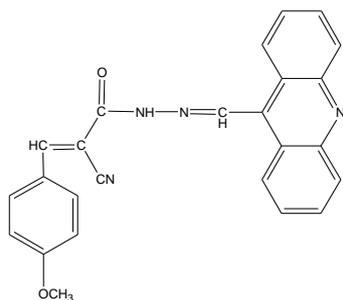


Figura 16: Estrutura molecular da 2-ciano-3-(4-metoxi-fenil)-acridin-9-il-metileno-hidrazida (AMAC₀₇).

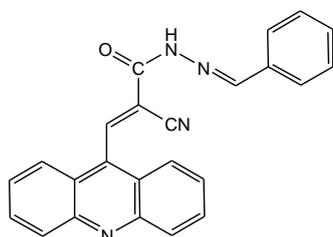


Figura 17: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-benzilideno-hidrazida (AMTAC₀₁).

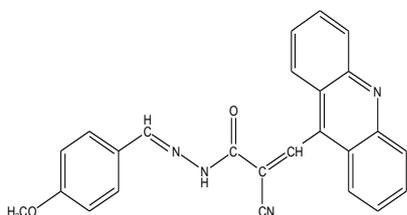


Figura 18: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-(4-metoxi-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₂).

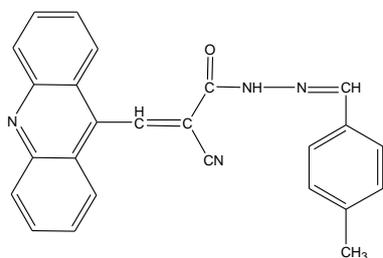


Figura 19: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-(4-metil-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₃).

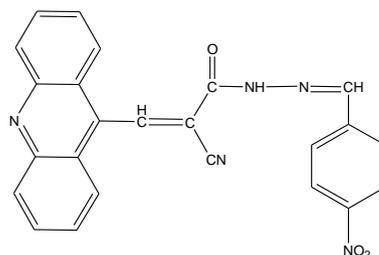


Figura 20: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-(4-nitro-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₄).

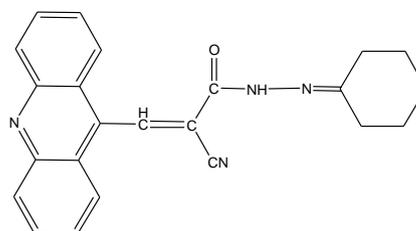


Figura 21: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-ciclohexilideno-hidrazida (AMTAC₀₅).

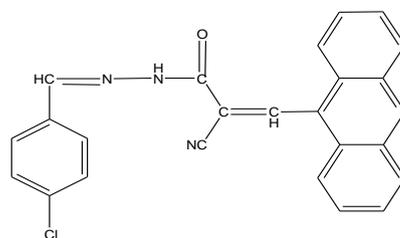


Figura 22: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₆).

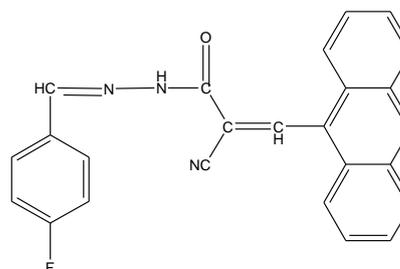


Figura 23: Estrutura molecular da 3-acridin-9-il-2-ciano-(4-fluor-benzilideno)-hidrazida (AMTAC₀₇).