



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**SONALY LIMA ALBINO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE NOVOS DERIVADOS  
ESPIRO-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIA**

**Campina Grande - PB**

**2017**

SONALY LIMA ALBINO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE NOVOS DERIVADOS  
ESPIRO-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade  
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência  
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

**Área de concentração:** Química Medicinal

**Orientador(a):** Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

**Coorientador(a):** Fernanda Silva Almeida

**Campina Grande – PB**

**2017**

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

A336d Albino, Sonaly Lima.  
Desenvolvimento e avaliação preliminar de  
novos derivados espiro-acridínicos com  
potencial atividade antileishmania [manuscrito] : /  
Sonaly Lima Albino. - 2017.  
70 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

"Coorientação: Profa. Esp. Fernanda Silva Almeida, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS.""

1. Atividade antipromastigota. 2. Leishmania amazonensis.  
3. Leishmania infantum. 4. Química medicinal.


21. ed. CDD 615.1


**SONALY LIMA ALBINO**

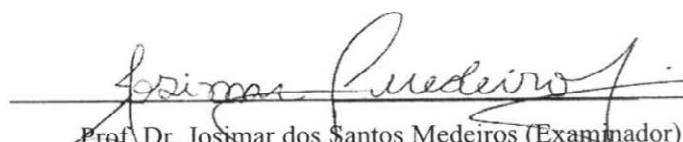
**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE NOVOS DERIVADOS  
ESPIRO-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Bacharelado em Farmácia da  
Universidade Estadual da Paraíba, em  
cumprimento à exigência para obtenção do grau de  
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 29/11/2017

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo (Examinador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Josimar dos Santos Medeiros (Examinador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me abençoado por toda essa trajetória.

À minha mãe, Solange, por todo amor, carinho e proteção.

A meu pai, Udenilson, por toda dedicação, confiança e incentivo.

À minha irmã, Suilanny, por todo companheirismo, afeto e cumplicidade.

Obrigado por serem meus alicerces. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter sempre regido o meu caminho e tê-lo caminhado ao meu lado, pelo seu amor incondicional e suas bênçãos infinitas.

Aos meus pais, Solange e Udenilson, por todo amor e cuidado demonstrados em todos e quaisquer momentos da minha vida, por todo apoio e incentivo dados constantemente, por todos ensinamentos e confiança depositados em mim que me tornaram o que sou hoje.

À minha irmã, Sulanny, por todas as vezes que me fez sorrir e me alegrar mesmo nos momentos de maior tensão, pelo companheirismo, cumplicidade, afeto e amizade que sempre tivemos.

À toda família, pelo apoio e incentivo durante toda essa jornada, em especial ao meu avô Cizino (*in memoriam*) que será sempre muito amado e lembrado em todos momentos de vitória. As minhas avós, Marina e Berenice, e as minhas tias, Sandra e Vilma, agradeço também pelo cuidado e carinho.

Ao professor Ricardo Olímpio de Moura, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos que tanto me acrescentaram e impulsionaram a crescer academicamente cada vez mais.

À futura mestre, Fernanda Silva Almeida, pela coorientação e pelos inúmeros momentos de ajuda, conversas, descontração e aprendizado.

Aos amigos e companheiros de curso, Ísis Valeska Lins, Caroline Bezerra, Eduardo Almeida, Renata Nóbrega, Isabela Motta e Natanael Teles, por compartilharem comigo esses anos de muito ensinamento, amizade, paciência e boas risadas. Agradeço, em especial, à Ísis e Carol pelo companheirismo que se iniciou no primeiro dia de aula e que há de ultrapassar vários anos após o último.

Aos amigos e colegas dos laboratórios LDSF e LSVM, por todo suporte e auxílio.

A todos professores responsáveis pela minha formação profissional, meu sincero agradecimento por todo conhecimento compartilhado.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para esse fim, agradeço.

## RESUMO

São denominadas doenças negligenciadas um grupo de doenças transmissíveis que se caracterizam por serem mais incidentes em países em desenvolvimento. Entre essas, estão incluídas as leishmanioses, doenças parasitárias causadas por diversas espécies do protozoário *Leishmania*. Atualmente, o tratamento para leishmaniose baseia-se principalmente na quimioterapia, entretanto, essa opção é limitada devido a complicações quanto a via de administração, alto custo da droga, toxicidade e resistência. A partir dessa premissa, encontra-se a necessidade do planejamento de novos fármacos por intermédio da química medicinal. E, nesse contexto, encontram-se os compostos acridínicos. Esses são compostos heterocíclicos com amplo espectro de ação capazes de desempenhar atividade leishmanicida. Dessa forma, esse estudo objetivou a realização da síntese, caracterização físico-química e estrutural dos novos derivados espiro-acridínicos e avaliação da atividade antileishmania frente a cepas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, visando a obtenção de possíveis candidatos a fármacos. Os compostos foram sintetizados pela condensação entre compostos *N*-acilidrazônicos substituídos e o núcleo aldeído de acridina em meio etanólico e básico, obtendo-se três derivados espiro-acridínicos. Esses apresentaram rendimentos variando de 55,79% a 79,82% e as faixas de fusão oscilando entre 3 e 6°C. A maioria dos compostos tiveram suas estruturas caracterizadas por meio de técnicas de espectroscopia de IV, EM, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C. O espectro de IV forneceu informações relacionadas aos grupos funcionais presentes na molécula, evidenciando as funções NH do núcleo acridínico, carbonila e nitrila. A técnica de espectrometria de massas demonstrou uma variação aceitável entre os resultados de MM calculada e encontrada por meio da técnica, atestando a estabilidade do íon molecular. O RMN <sup>1</sup>H evidenciou como principais deslocamentos singletos referentes a hidrogênios de ligação NH, HC=C e HC=N. O RMN <sup>13</sup>C evidenciou a ocorrência de ciclização espontânea no C-9 por meio dos sinais presentes entre 69,33 (AMTAC 06) e 69,37 (AMTAC 07) ppm, deslocamentos característicos de carbonos quaternários. A avaliação biológica desses compostos frente *L. amazonensis* forneceu IC<sub>50</sub> entre 0,31 e 0,52 µg/mL, sendo o AMTAC 06 o derivado a apresentar melhor potência provavelmente devido ao seu efeito mesomérico positivo. A atividade antipromastigota observada em *L. infantum* apresentou IC<sub>50</sub> variando de 2,04 a 6,79 µg/mL, no qual a molécula mais promissora foi o AMTAC 01, o que pode ser explicado pela ausência de influência do seu substituinte nos parâmetros lipofílicos e eletrônicos. Assim, conclui-se que os derivados espiro-acridínicos são eficazes contra formas promastigotas de duas espécies de *Leishmania* responsáveis por causar manifestações clínicas diferentes, sendo necessários estudos mais aprofundados para melhor entendimento do mecanismo de ação desses compostos como estratégia para melhoria da seletividade e potência dos mesmos.

**Palavras-Chave:** Atividade antipromastigota. *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Química medicinal.

## ABSTRACT

Neglected diseases are a group of transmissible diseases that are characterized as being more incidental in developing countries. These include leishmaniasis, parasitic diseases caused by several species of the protozoan *Leishmania*. Currently, the treatment for leishmaniasis is based mainly on chemotherapy, however, this option is limited due to complications involving the route of administration, high drug cost, toxicity and resistance. From this premise, there is a need to the planning of new drugs through medicinal chemistry. And, in this context, there are the acridine compounds. These are heterocyclic compounds with broad spectrum of action capable of performing leishmanicidal activity. Thus, this study aimed at the synthesis, physico-chemical and structural characterization of the new spiro-acridine derivatives and evaluation of antileishmania activity against strains of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*, in order to obtain possible drug candidates. The compounds were synthesized by condensation between substituted *N*-acylhydrazone compounds and acridine aldehyde nucleus in ethanol and basic medium, obtaining three spiro-acridine derivatives. These showed yields varying from 55.79% to 79.82% and the melting ranges varying from 3 to 6 ° C. Most of the compounds had their structures characterized by techniques of IR, MS, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR. The IR spectrum provided information about the functional groups present in the molecule, evidencing NH functions of the acridine nucleus, carbonyl and nitrile. The mass spectrometry technique demonstrated an acceptable variation between the results of molecular mass calculated and found by means of the technique, attesting the stability of the molecular ion. <sup>1</sup> H NMR showed as main displacements singlet shifts relative to NH linking hydrogens, HC=C and HC=N. <sup>13</sup>C NMR evidenced the occurrence of spontaneous cyclization in C-9 by means of the signals present between 69.33 (AMTAC 06) and 69.37 (AMTAC 07) ppm, characteristic of quaternary carbons. The biological evaluation of these compounds against *L. amazonensis* provided IC<sub>50</sub> between 0.31 and 0.52 µg / mL, with AMTAC 06 being the derivative that presented better potency, probably due to its positive mesomeric effect. The antipromastigote activity observed in *L. infantum* showed IC<sub>50</sub> ranging from 2.04 to 6.79 µg / mL, in which the most promising molecule was AMTAC 01, which can be explained by the lack of influence of its substituent on the lipophilic and electronic parameters. Thus, it is concluded that spiro-acridine derivatives are effective against promastigote forms of two species of leishmania responsible for causing different clinical manifestations, but further studies are necessary to better understand the mechanism of action of these compounds as a strategy to improve their selectivity and potency.

**Keywords:** Promastigote activity. *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Medicinal Chemistry.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Artrópode vetor da leishmaniose, <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	19
<b>Figura 2</b> - Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i> .....	20
<b>Figura 3</b> - Representações das manifestações clínicas .....	21
<b>Figura 4</b> - Provável estrutura química dos compostos antimoniais pentavalentes .....	23
<b>Figura 5</b> - 3-amino-9-aminofenil-acridina.....	25
<b>Figura 6</b> - Antibacterianos proflavina e acriflavina.....	25
<b>Figura 7</b> - Núcleo acridínico.....	26
<b>Figura 8</b> - <i>m</i> -Amsacrina.....	26
<b>Figura 9</b> - 1'-hexilamino-9-anilinoacridina .....	28
<b>Figura 10</b> - Derivados diaminoacridínicos .....	28
<b>Figura 11</b> - 4,5-di(hidroximetil)acridina.....	29
<b>Figura 12</b> - Estrutura química da pentamidina .....	34
<b>Figura 13</b> - Compostos espiro-acridínicos sintetizados.....	40
<b>Figura 14</b> - Espectroscopia de IV do AMTAC 07 .....	43
<b>Figura 15</b> - Espectro de massa da molécula AMTAC 06 .....	44
<b>Figura 16</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da AMTAC 07 .....	46
<b>Figura 17</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C da AMTAC 06.....	48
<b>Figura 18</b> - Diferenças estruturais entre (1) AMTAC 06 e (2) AMTAC 07 .....	49
<b>Figura 19</b> - Diferenças estruturais entre (1) AMTAC 01 e (2) AMTAC 06 .....	53

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1 -** Diagrama geral de síntese dos novos derivados espiro-acridínicos..... 35
- Esquema 2 -** Reação de redução do MTT..... 52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Características físico-químicas dos compostos sintetizados.....	40
<b>Tabela 2</b> - Dados obtidos por espectroscopia de IV para os compostos sintetizados.....	42
<b>Tabela 3</b> – Valores de massa obtidos por cálculo e experimentalmente .....	44
<b>Tabela 4</b> – Deslocamentos químicos dos derivados espiro-acridínicos por RMN <sup>1</sup> H (δ, DMSO-d <sub>6</sub> , 400MHz) .....	45
<b>Tabela 5</b> – Deslocamentos químicos dos derivados espiro-acridínicos por RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 e 125 MHz, respectivamente).....	47
<b>Tabela 6</b> - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> na presença dos derivados espiro-acridínicos.....	49
<b>Tabela 7</b> – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> na presença de drogas de referência .....	51
<b>Tabela 8</b> – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> na presença dos derivados espiro-acridínicos.....	52
<b>Tabela 9</b> - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> na presença de drogas de referência .....	53

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Diagrama de Craig.....	50
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>AmB</b>	Anfotericina B
<b>BOD</b>	Estufa de demanda biológica de oxigênio ( <i>Biochemical oxygen demand</i> )
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CCDA</b>	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMSO-<i>d</i>6</b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>DTNs</b>	Doenças Tropicais Negligenciadas
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico (desoxiribonucleic acid)
<b>EM</b>	Espectrometria de Massa
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>F.F</b>	Faixa de fusão
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração capaz de inibir 50% de crescimento
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose Cutânea Difusa
<b>LM</b>	Leishmaniose Mucocutânea
<b>Log P</b>	Coefficiente de Partição
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b><i>m</i>-AMSA</b>	Amsacrina
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2 <i>H</i> -brometo de tetrazólio
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino (phosphate buffered saline)
<b>QSAR</b>	Relação Estrutura-Atividade Quantitativa
<b>R<sub>f</sub></b>	Fator de Retenção

<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>SAR</b>	Relação Estrutura-Atividade ( <i>Structure-Activity Relationship</i> )
<b>SbIII</b>	Antimonial Trivalente
<b>SbV</b>	Antimonial Pentavalente
<b>UEPB</b>	Universidade Estadual da Paraíba
<b>δ ppm</b>	Deslocamento químico em parte por milhão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
2.1	Objetivos Gerais .....	17
2.2	Objetivos Específicos .....	17
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	18
3.1	Aspectos gerais sobre as leishmanioses.....	18
3.2	Tratamento quimioterápico para leishmaniose e suas limitações.....	22
3.3	Acridina e seus derivados .....	24
3.3.1	Derivados acridínicos como potenciais agentes quimioterápicos com ação antileishmania.....	27
3.4	DNA topoisomerases.....	29
3.4.1	Topoisomerases como alvo farmacológico .....	31
3.4.1.1	Topoisomerases de interesse para terapia antileishmania .....	32
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	35
4.1	Síntese dos derivados espiro-acridínicos.....	35
4.2	Caracterização físico-química e estrutural .....	36
4.2.1	Rendimento da reação .....	36
4.2.2	Fator de retenção .....	36
4.2.3	Faixa de fusão .....	36
4.2.4	Coefficiente de partição .....	37
4.2.5	Espectroscopia de Infravermelho .....	37
4.2.6	Espectrometria de Massas .....	37
4.2.7	Espectroscopia de Ressonância Magnética .....	37
4.3	Avaliação da atividade antileishmania .....	37
4.3.1	Atividade antipromastigota em cepas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	37

4.3.2	Atividade antipromastigota em cepas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
5.1	Compostos sintetizados e caracterização físico-química dos derivados espiro-acridínicos substituídos .....	40
5.2	Caracterização estrutural .....	41
5.2.1	Espectroscopia de Infravermelho .....	41
5.2.2	Espectrometria de Massas .....	43
5.2.3	Ressonância Magnética Nuclear.....	44
5.3	Atividade antileishmania .....	48
5.3.1	Avaliação da atividade antipromastigota sobre <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> ..	48
5.3.2	Avaliação da atividade antipromastigota sobre <i>Leishmania (L.) infantum</i> .....	51
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>66</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças parasitárias causadas por diversas espécies do protozoário *Leishmania*, estando essas inclusas no grupo de doenças tropicais negligenciadas. Essas são basicamente denominadas como doenças infecto-parasitárias causadas pela invasão do parasito aos macrófagos do hospedeiro (FEASEY et al., 2009; FUERTES et al., 2008; DI GIORGIO et al., 2003).

Assim, são denominadas como doenças tropicais negligenciadas (DTNs) um grupo de enfermidades transmissíveis que se caracterizam por serem mais incidentes em países em desenvolvimento e por possuírem uma grande precariedade em relação ao tratamento devido ao baixo potencial de lucro, fator esse que se mostra como um impedimento para impulsionar as companhias a inserirem recursos suficientes para pesquisa, desenvolvimento e produção nessa área (DIMITRI, 2012; GARCIA et al., 2011).

As DTNs totalizam 11,4% da carga total de doenças globais e são responsáveis por causar morbidade e mortalidade nos indivíduos afetados, representando um custo econômico visível aos países onde essas são incidentes. Apesar desses fatores, apenas 1,3% das drogas aprovadas durante os anos 1975-2004 foram destinadas ao tratamento das DTNs (CHATELAIN; IOSET, 2011).

Essas são causadas, em sua maioria, por protozoários e transmitidas por vetores (SANTOS et al., 2012). Nesse grupo estão inclusas várias afecções, as quais o Brasil é responsável por apresentar uma grande proporção das ocorrências da América Latina, tais como: Leishmaniose visceral (93%), hanseníase (86%), dengue (40%), leishmaniose cutânea (39%), doença de Chagas (25%), entre outras (MARTINS-MELO et al., 2016).

A descrição dos agentes etiológicos das leishmanioses ocorreu na Índia no fim do século XIX, mais precisamente a partir de 1885, quando foram descritas formas amastigotas em casos de leishmaniose visceral por Cunningham. Posteriormente, em 1903, foi descrita por Leishman e Donovan, a *Leishmania donovani*, agente etiológico do até então denominado Calazar indiano, enquanto que em paralelo foi retratada, por Wright, a *Leishmania tropical*, parasita responsável por causar o Botão do Oriente. Após o aparecimento e identificação de várias espécies pertencentes a esse gênero, em 1993 a OMS passou a considerar a Leishmaniose como a segunda doença de importância pública causada por protozoário (RATH et al., 2003).

Os tratamentos atuais para leishmaniose se apresentam insatisfatórios devido a limitações encontradas no que se diz respeito a via de administração das drogas, alto custo da droga, toxicidade e desenvolvimento de cepas resistentes (FUERTES et al., 2008). A partir dessa premissa encontra-se a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos antileishmania.

Os fármacos são introduzidos na clínica por meio de diversos processos, entre eles: acaso, triagem empírica, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação estrutural e planejamento racional, sendo esses dois últimos por advento da química medicinal (KROGH, 2001).

A química medicinal é uma área interdisciplinar baseada na química em união com as ciências de caráter biológico, tais como a bioquímica, farmacologia, biologia molecular, genética, imunologia, entre outros. Essa compreende a invenção, descobrimento, desenho, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, interpretação da forma de interação do fármaco com o alvo a nível molecular, a construção da sua relação estrutura-atividade e o estudo do seu metabolismo (WERMUTH et al., 2008; MONTANARI, 2011).

Dentre os compostos de interesse para terapêutica encontram-se os heterocíclicos, em particular os compostos nitrogenados, que constituem 95% dos compostos encontrados na terapêutica (BARREIRO; FRAGA, 2015). Nesse contexto, encontram-se os compostos acridínicos como potenciais entidades químicas de interesse para obtenção de novos fármacos.

A acridina e seus derivados caracterizam-se como estruturas tricíclicas planares com um átomo de nitrogênio em seu anel central com propriedades de aceptor/doador de elétrons, fator que possibilita a interação com ácidos nucleicos de DNA e RNA, desempenhando mecanismo de ação farmacológico como intercalador (CHEN et al., 2014).

Tal propriedade os caracteriza como agentes quimioterápicos com amplo espectro de atividade, apresentando propriedades antibacteriana, antitumoral, antimalárico, antiprotozoário, antifúngico, antitripanossômico, leishmanicida, entre outros (BONSE et al., 1999; GIRAULT et al., 2000; KAYA; YILDIRIR; ÇELIK, 2015; SÁNCHEZ et al., 2006).

Por esse e tantos outros motivos, o presente estudo se propõe a avaliar o perfil leishmanicida de novos derivados acridínicos, por meio da síntese e avaliação biológica frente a espécies de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Sintetizar, determinar as propriedades físico-químicas, caracterizar estruturalmente e avaliar a atividade antileishmania *in vitro* de derivados espiro-acridínicos, que possam ser utilizados como possíveis candidatos a fármacos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Promover a síntese química de novos compostos derivados acridínicos;
- Verificar as características físico-químicas dos novos compostos sintetizados;
- Caracterizar estruturalmente os novos compostos obtidos através de diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* em *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Aspectos gerais sobre as leishmanioses

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças parasitárias causadas por diversas espécies pertencentes ao reino Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomidae e gênero *Leishmania*. Esse gênero é caracterizado por reunir protozoários unicelulares, digenéticos, encontrados nas formas promastigota, flageladas livres ou aderidas ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e amastigota, forma intracelular sem flagelo livre encontrada nos hospedeiros vertebrados (GONTIJO; CARVALHO, 2003; NEVES et al., 2016).

Os hospedeiros envolvidos nesse processo são uma variedade de mamíferos, tais como roedores, canídeos, marsupiais e primatas, motivo esse pelo qual a leishmaniose pode ser considerada como uma zoonose. Nesse ciclo de transmissão, o homem participa como um hospedeiro acidental, fato motivado pela permanência do indivíduo em locais com alta probabilidade de transmissão. Embora não seja o habitat natural do vetor, devido à urbanização, esse tem se tornado cada vez mais frequente em ambientes domiciliares e peridomiciliares, favorecendo a infecção em humanos (QUINNELL; COURTENAY, 2009; MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987; NEVES et al., 2016; PRATA; SILVA, 2005).

A transmissão entre os hospedeiros é feita por intermédio de dípteros da família Psychodidae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Cerca de 400 espécies e subespécies de *Lutzomyia* já foram descritas, sendo 30 dessas de interesse clínico por serem potenciais vetores da doença. No Brasil, há uma prevalência das espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. welcomei*, *Lu. pessoai* e *Lu. migonei*, denominadas popularmente como “mosquito palha” (Figura 1). Essas são caracterizadas por possuírem pequeno porte (1 a 3 mm de comprimento), desempenharem a transmissão do parasito por intermédio da fêmea hematófaga, serem mais abundantes em regiões com climas quentes e temperados e desempenharem atividade noturna (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; DANTAS-TORRES, 2007; READY, 2013).

**Figura 1** - Artrópode vetor da leishmaniose, *Lutzomyia longipalpis*.

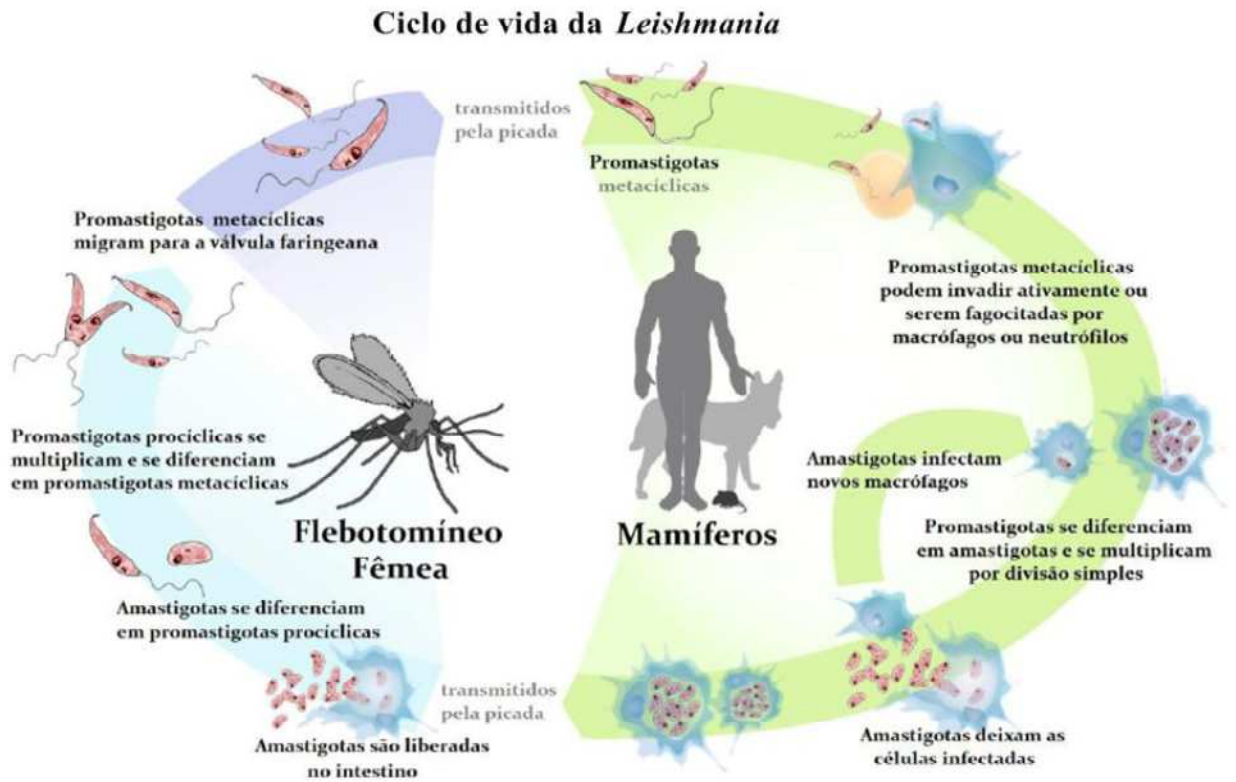


Fonte: Wilson (2009).

O ciclo biológico do parasito se inicia pela infecção do flebotomíneo que, durante o repasto sanguíneo, ingere macrófagos parasitados com as formas amastigotas provindo do mamífero contaminado. No intestino médio do inseto, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas, as quais se ligam, por meio do flagelo, às microvilosidades intestinais do inseto, garantindo a sua permanência e desenvolvimento naquele local. Assim, esses parasitos sofrem modificações morfológicas em favor das condições fisiológicas do vetor, tais como diminuição da temperatura e aumento do pH, originando formas parasitárias procíclicas, caracterizadas por desempenharem rápida multiplicação por divisão binária. Ao fim do seu processo evolutivo, os parasitos encontram-se em sua forma promastigota metacíclica, perdendo sua capacidade de divisão e obtendo um aumento na sua mobilidade, fator que favorece a migração desses para o probóscide do inseto (Figura 2) (BATES; ROGERS, 2004; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; NEVES et al., 2016).

Por meio de um novo repasto sanguíneo, a fêmea díptera inocula o parasito, juntamente com a sua saliva, que favorecerá a infecção ao desempenhar atividade anticoagulante, vasodilatadora, antiagregadora de plaquetas e quimiotática sobre monócitos e imunorreguladora. Assim, as formas promastigotas metacíclicas, internalizadas por macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas, se multiplicam, lisam o macrófago e disseminam-se por meio do sistema linfático e vascular, infectando outros macrófagos e realizando o ciclo novamente (Figura 2) (ANDRADE FILHO; GALATI; FALCÃO, 2007; CHAPPUIS et al., 2007; NEVES et al., 2016).

**Figura 2** - Ciclo biológico da *Leishmania* sp.



Fonte: Nursing (2017).

A depender da espécie do gênero *Leishmania* responsável pela infecção, são desenvolvidas diferentes manifestações clínicas. Atualmente, 30 espécies do gênero foram identificadas, sendo aproximadamente 20 dessas consideradas patogênicas quando transmitidas. Isso se dá pelo fato de que essas espécies apresentam características diferentes quanto à morfologia, patogenicidade e tipo de lesão causada, localização nos tecidos do hospedeiro, características imunológicas e moleculares, bem como características epidemiológicas (ASHFORD, 2000; CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

Essas irão se expressar em três manifestações clínicas principais classificadas como: Leishmaniose cutânea (ex.: *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. amazonensis*), leishmaniose mucocutânea (ex.: *L. braziliensis*) e leishmaniose visceral (ex.: *L. infantum* e *L. donovani*) (HUSSAIN et al., 2014) (Figura 3).

**Figura 3 - Representações das manifestações clínicas**



Fonte: Chappuis et al. (2007). (A) Paciente apresentando leishmaniose cutânea; (B) Leishmaniose mucocutânea presente nos lábios; (C) Caso de leishmaniose visceral, caracterizada por hepatoesplenomegalia.

Tais afecções são prevalentes em aproximadamente 88 países, afetam cerca de 12 milhões de indivíduos e apresentam a mortalidade anual em torno de 20 a 30 mil. Segundo dados, 90% dos casos de leishmaniose visceral concentram-se em apenas quatro países: Índia, Sudão, Brasil e Bangladesh. Assim como essa manifestação clínica, 90% das leishmanioses cutânea e mucocutânea também se concentram em alguns países nos quais, em ambos os casos, o Brasil está incluso (HUSSAIN et al., 2014; WHO, 2013).

As leishmanioses cutâneas (LC) e mucocutâneas (LM) podem ser agrupadas em um grupo chamado de leishmaniose tegumentar americana (LTA), que são caracterizadas por apresentarem infecções limitadas à derme (Figura 3). Tratando-se desse tipo de manifestação clínica, dentre as espécies causadoras no Brasil, destaca-se a *Leishmania (L.) amazonensis*, frequentemente encontrada nas florestas primárias e secundárias da Amazônia, bem como no Nordeste (principalmente na Bahia), no Sudoeste (Minas Gerais e São Paulo) e no Centro-Oeste. Seus hospedeiros naturais são marsupiais e roedores, e seus vetores (*Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca*) possuem hábitos noturnos, desempenham vôo baixo e são pouco antropofílicos. Ao infectar o hospedeiro humano, haverá o desenvolvimento de lesão ulceradas simples e limitadas, com borda elevada e fundo granuloso. Essas desenvolvem

em cerca de 40% dos casos a leishmaniose cutânea difusa (LCD), resultante de metástases do parasito de um sítio para outro por intermédio dos vasos linfáticos ou migração de macrófagos parasitados (BALANCO, 2004; BRASIL, 2010; NEVES et al., 2016).

Já a leishmaniose visceral (LV), também designada como calazar, é fatal em 95% dos casos se não tratada e distingue-se por acometer as vísceras do hospedeiro (Figura 3 c) (GOTO; LINDOSO, 2012; REITHINGE et al., 2007; WHO, 2013). No Brasil, a espécie causadora de LV é a *Leishmania (L.) chagasi* que, por parâmetros bioquímicos e moleculares, é considerada por especialistas como a mesma espécie que a *L. infantum*, que, por sua vez, possui maior relevância em países do Mediterrâneo e da Ásia. Os hospedeiros naturais conhecidos são as raposas, os canídeos e os marsupiais, sendo o vetor de maior relevância a *Lu. longipalpis*, característico por ser amplamente distribuído em áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas. A infecção desenvolverá um quadro clínico grave, no qual os parasitos *L. chagasi/L. infantum* passarão a infectar desde as células do sistema imunológico até as mais variadas vísceras (GONTIJO; MELO, 2004; NEVES et al., 2016).

### 3.2 Tratamento quimioterápico para leishmaniose e suas limitações

O tratamento para leishmaniose baseia-se principalmente na quimioterapia e encontra-se disponível desde o início do século 20. Desde a antiguidade os compostos de antimônio têm sido utilizados para diversos fins terapêuticos, sendo a droga antimonial trivalente (SbIII), tártaro emético, descrita em 1912, por Gaspar de Oliveira Vianna, para o tratamento de leishmaniose mucocutânea. Posteriormente, esse mesmo composto apresentou atividade contra leishmaniose visceral, entretanto, o uso do mesmo foi interrompido devido aos severos efeitos adversos (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; RATH et al., 2003).

Diante da necessidade de fármacos menos tóxicos que os antimonais trivalentes (tártaro emético, tioglicolato de sódio e antimônio e antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulgonato sódico), foram desenvolvidos os fármacos que são hoje utilizados como primeira linha de tratamento para casos de leishmaniose, os antimonais pentavalentes (SbV) (RATH et al., 2003).

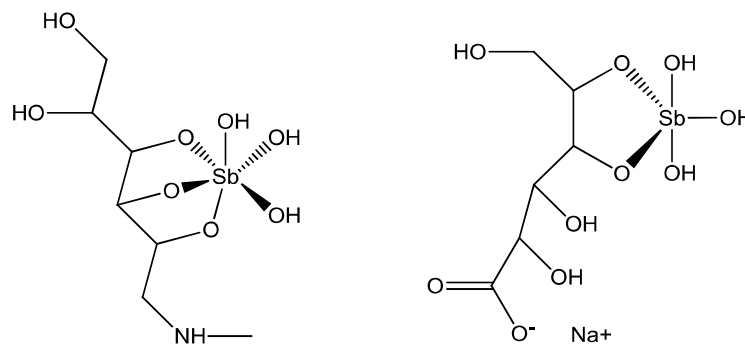
O primeiro composto a base de antimonial pentavalente foi desenvolvido por Bramachari, em 1920, através da síntese da uréia estibamina, derivado uréico do ácido *p*-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na clínica o primeiro composto antimonial pentavalente, o gluconato de antimônio (V) sódico, que posteriormente, durante a



Segunda Guerra Mundial, foi substituído pelo antimoniato de *N*-metilglucamina (também conhecido como antimoniato de meglumina e Glucantime®). Atualmente, o antimoniato de *N*-metilglucamina e o estilbogluconato de sódio (Pentostan®) são os derivados de maior destaque, sendo o último não comercializado no Brasil (Figura 4) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; RATH et al., 2003).

O derivado antimoniato de *N*-metilglucamina é obtido por meio da reação de síntese entre o ácido antimônico e a *N*-metilglucamina, sendo essa última obtida por meio da aminação redutora da glicose em presença de metilamina (RATH et al., 2003). Embora conhecida a via de síntese, os compostos não possuem ainda uma estrutura química definida, provavelmente devido ao estado amorfo desses (Figura 4) (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

**Figura 4** - Provável estrutura química dos compostos antimoniais pentavalentes



Fonte: Adaptado de Frézard, Demicheli e Ribeiro (2009). Compostos antimoniato de meglumina e estilbogluconato de sódio, respectivamente.

O mecanismo de ação desempenhado por esses fármacos não é bem esclarecido. Acredita-se que esses ajam inibindo a via glicolítica e oxidação de ácidos graxos dos parasitos. Além disso, também é sugerido que esses atuem como pró-fármacos, convertendo-se na sua forma reduzida, o SbIII, dentro do macrófago. Outro mecanismo sugerido é de que essas drogas se ligam aos sítios sulfrídricos da superfície da célula parasitária, provocando a morte da leishmania (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; GOLAN et al., 2014; MOHAPATRA, 2014).

Entretanto, um problema crescente encontrado no tratamento com esses fármacos é o desenvolvimento de formas parasitárias resistentes. Mecanismos como diminuição da absorção das drogas, aumento do mecanismo de efluxo, redução da concentração do fármaco

dentro do parasita, inibição da ativação do fármaco e inativação do fármaco ativo, são responsáveis pelo desenvolvimento de resistência do organismo aos SbV. O metabolismo do tiol e atividade dos transportadores do conjunto de ligação do ATP (ABC – *ATP binding cassette*), família de proteínas responsáveis pelo transporte de vários substratos através das membranas, também estão associados à evolução da resistência medicamentosa (MOHAPATRA, 2014; REES; JOHNSON; LEWINSON, 2009). Além disso, outra problemática que envolve essa classe de medicamentos são as reações adversas, como cardio, nefro e hepatotoxicidade (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

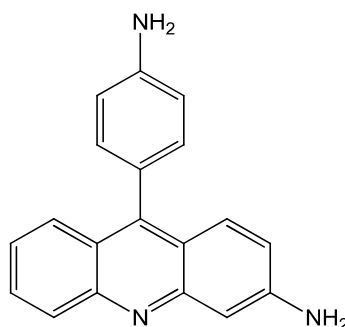
Em meio a essas dificuldades encontradas com os compostos antimoniais, encontram-se como opções o uso de outros fármacos, tais como anfotericina B na sua forma lipossômica, pentamidina, paromomicina e miltefosine (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). No entanto, os tratamentos atuais para leishmaniose ainda se apresentam insatisfatórios devido a limitações encontradas na via de administração das drogas, alto custo da droga e toxicidade (FUERTES et al., 2008).

A anfotericina B lipossomal, embora apresente uma toxicidade inferior a desempenhada pelos compostos SbV, essa apresenta como limitação o alto custo que inviabiliza sua comercialização e uso em países em desenvolvimento (TIUMAN et al., 2011). A pentamidina apresenta como desvantagem a alta toxicidade, incluindo eventos adversos tais como pancreatite, lesão renal, leucopenia, entre outros (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). A paromomicina, embora apresente uma ampla atividade antiparasitária, a administração por via oral é limitada devido a fraca absorção, fator que levou ao desenvolvimento de formulações parenterais. O miltefosine apresenta como principal limitante o seu potencial efeito teratogênico, sendo assim, proibido para mulheres grávidas (TIUMAN et al., 2011).

Portanto, a partir dessa premissa encontra-se a necessidade do planejamento de novos fármacos por intermédio da química medicinal.

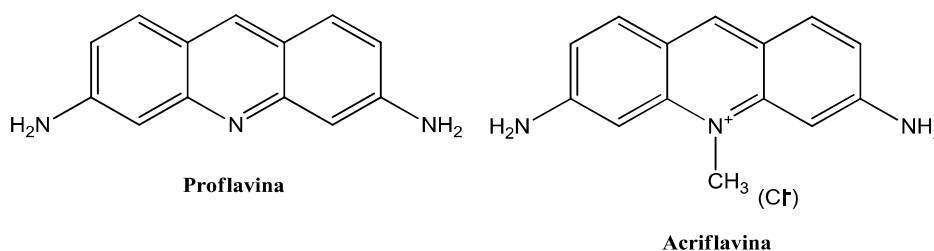
### **3.3 Acridina e seus derivados**

Primeiramente isoladas de frações de alcatrão por Carl Graebe e Heinrich Caro na Alemanha no ano de 1870, as acridinas apresentam-se como moléculas de interesse clínico desde 1888 quando Auclert investigou o uso farmacológico do 3-amino-9-aminofenil-acridina (Figura 5) (NASIM; BRYCHCY, 1979).

**Figura 5 - 3-amino-9-aminofenil-acridina**

Fonte: Moura (2009).

Em 1912 foi proposta a atividade tripanocida para acriflavina (Figura 6) por Ehrlich e Benda e, no ano seguinte, Carl Browning atribuiu a mesma molécula e a sua forma não metilada, a proflavina (Figura 6), a atividade antibacteriana. A partir dessas descobertas, as acridinas foram introduzidas na clínica durante a Primeira Guerra Mundial como antibacterianos para prevenção e tratamento de sepse em feridas. Desde então, a síntese do núcleo acridínico e dos seus análogos tem chamado atenção dos químicos orgânicos e medicinais (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012; WAINWRIGHT, 2001).

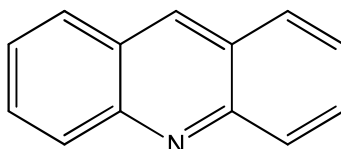
**Figura 6 - Antibacterianos proflavina e acriflavina**

Fonte: Wainwright (2001).

As acridinas,  $C_{13}H_9N$ , são compostos heterocíclicos caracterizados por possuírem um sistema policíclico com estrutura planar, sendo esse geralmente um sistema com três ou quatro anéis e um ou dois substituintes flexíveis (Figura 7). Essas moléculas são reconhecidas quimicamente como alcaloides do antraceno, possuindo denominações tais como: benzo[*b*]quinolina, dibenzo[*b,e*]piridina, 2,3,5,6-dibenzo-piridina ou 10-azaantraceno (SÁNCHEZ et al., 2006; SCHMIDT; LIU, 2015). Esse composto apresenta como

característica o ponto de fusão de 110°C e ponto de ebulição de 346°C, característica levemente básica e pKa de 5,6, semelhante ao da piridina (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012).

**Figura 7 - Núcleo acridínico**

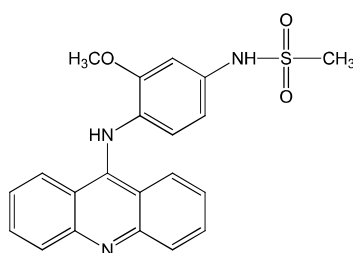


Fonte: Sánchez et al. (2006).

A atividade biológica das acridinas tem sido atribuída à capacidade de intercalação de DNA, mecanismo que ocorre por meio da inserção dos seus anéis planares entre as bases de DNA, fato esse possibilitado pela forte afinidade que o ácido dextrorribonucleico possui por compostos com perfil aromático heterocíclicos. A partir dessa intercalação, haverá a modificação estrutural da molécula biológica, alteração do desenrolamento da dupla hélice e do alongamento da cadeia de DNA (ALMEIDA et al., 2015; OLSZEWSKA et al., 2014).

Além da atividade intercalante de DNA, as acridinas apresentam outros alvos nucleares, tais como as topoisomerasas. O primeiro fármaco derivado das acridinas a ser atribuído esse modo de ação foi a *m*-Amsacrina (*m*-AMSA) (Figura 8). Essa molécula, derivada da 9-anilinoacridina, teve sua interação com topoisomerase II e DNA estudada detalhadamente, a partir da qual foi proposto que o fármaco forma um complexo ternário no qual a porção acridínica é responsável de intercalar o DNA e a porção anilínica interage com a topoisomerase, inibindo-a (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001). A *m*-AMSA tem sido utilizada na clínica desde 1976 no tratamento de leucemias linfocíticas e não linfocíticas, bem como linfomas de Hodgkin's e não Hodgkin's (BELMONT et al, 2007; KETRON et al., 2012).

**Figura 8 - *m*-Amsacrina**



Fonte: Ketron et al. (2012).

Segundo Belmont e colaboradores (2007), também são funções atribuídas aos derivados acridínicos: inibição de telomerase, inibição da glicoproteína-P, inibição de proteínas quinases, ataques às células cancerígenas em hipóxia e inibição de colinesterase.

A modificação molecular realizada nos compostos acridínicos, tais como a introdução de diferentes substituintes ou de anéis heterocíclicos, permite a expansão da pesquisa sobre a relação estrutura atividade para melhor entendimento da interação do fármaco com o receptor em questão (KALIRAJAN et al., 2012). As modificações moleculares também possibilitam a obtenção de diversas atividades biológicas, entre elas: antibacteriana, antitumoral, antimalárico, antiprotozoário, antifúngico, antitripanossômico, leishmanicida, antioxidante, anti-inflamatório e analgésico (BONSE et al., 1999; GIRAULT et al., 2000; KALIRAJAN et al., 2012; KAYA; YILDIRIR; ÇELIK, 2015; SÁNCHEZ et al., 2006).

### **3.3.1 Derivados acridínicos como potenciais agentes quimioterápicos com ação antileishmania**

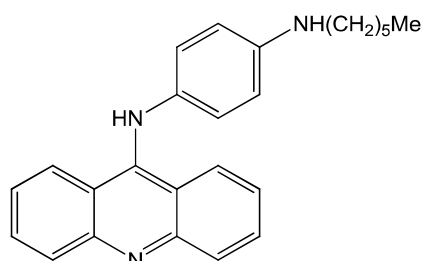
Como abordado anteriormente, os derivados acridínicos possuem ação contra protozoários, sendo um potencial ativo contra parasitos dos gêneros *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (CAROLE et al, 2005; DELMAS et al, 2004; GIRAULT et al., 2000).

Tal fato pode ser fundamentado pela semelhança existente entre as células parasitárias e as células tumorais, que são alvos farmacológicos de grande visibilidade no campo de pesquisa com compostos acridínicos. Essas apresentam homologia enquanto à capacidade de rápida proliferação, estratégias de evasão imunológica e de defesa, às vias bioquímicas que afetam o metabolismo do DNA, às vias de proteínas quinases, às enzimas de catabolismo de glicose e ao metabolismo de poliaminas (FUERTES et al., 2008).

Diversos compostos derivados das 9-anilinoacridinas são considerados clinicamente viáveis para o tratamento anticâncer e, por meio dessa premissa, Mauël e colaboradores (1993) realizaram o teste biológico da série 1'-substituídas-9-anilinoacridinas sobre cepas de *Leishmania major* em sua forma amastigota e promastigota, bem como testes de toxicidade em células Jurkat. Os resultados obtidos indicaram uma boa atividade antileishmania, onde os compostos, tais como os substituídos com 1'-NH-alquil, apresentaram uma inibição de crescimento superior a 80% sobre formas amastigotas em concentrações iguais ou inferiores a 1µM. Adicionalmente, observou-se que o composto 1'-hexilamino-9-anilinoacridina (Figura 9), apresentou baixa toxicidade (IC<sub>50</sub> de 17,0µM) em células Jurkat, enquanto que o mesmo

desempenhou alta atividade inibitória apresentada sobre *L. major*. Tal fato sugere a existência de diferenças entre os alvos, tornando as moléculas viáveis para determinada terapêutica de acordo com os seus substituintes e sua seletividade.

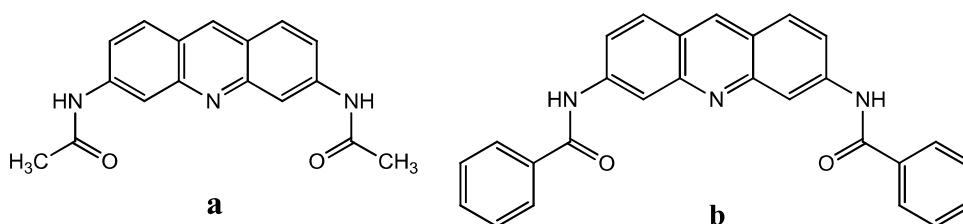
**Figura 9 - 1'-hexilamino-9-anilinoacridina**



Fonte: Mauël et al. (1993).

Duas novas séries de derivados diaminoacridínicos, inspiradas na proflavina e no N-(6-amino-3-acridinil), foram sintetizadas e avaliadas enquanto as suas atividades citotóxica e antileishmania por Di Giorgio e colaboradores (2007). Os compostos *N*-[6-(acetilamino)-3-acridinil]acetamida (Figura 10 a) e *N*-[6-(benzoamino)-3-acridinil]benzamida (Figura 10 b) apresentaram grande especificidade pelas células parasitárias de *Leishmania*, auxiliando no estabelecimento da relação estrutura-atividade (SAR), a qual concluiu que a presença dos seguintes grupos em acridinas 3,6-disubstituídas aumentam consideravelmente a especificidade da molécula para ação antileishmania, sugerindo que a simetria na conformação pode ser um fator interferente no metabolismo do parasito. Além disso, o estudo comprova que tais derivados acridínicos disubstituídos apresentam maior afinidade pelas espécies de leishmania em relação às células cancerígenas, que são mais atingidas por derivados diaminoacridínicos monosubstituídos. Assim, concluiu-se que a modificação molecular do composto modificou a seletividade do mesmo, aumentando sua ação antileishmania.

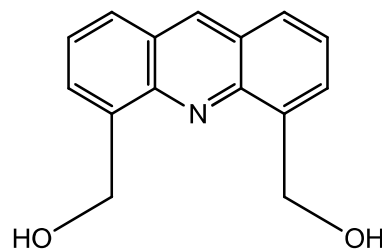
**Figura 10 - Derivados diaminoacridínicos**



Fonte: Di Giorgio et al. (2007). (A) *N*-[6-(acetilamino)-3-acridinil]acetamida e (B) *N*-[6-(benzoamino)-3-acridinil]benzamida

Pesquisas semelhantes foram realizadas por Carole e colaboradores (2005) por meio da avaliação *in vitro* da ação de derivados acridínicos mono e dissubstituídos frente a células parasitárias de *Leishmania* e células cancerígenas. As melhores ações leishmanicida em associação a uma baixa ação citotóxica foram desempenhadas pelos compostos 4,5-disubstituídos (Figura 11), enquanto que os compostos monosubstituídos na posição 4 apresentaram baixa atividade leishmanicida, fator que corrobora com as conclusões obtidas nos demais estudos.

**Figura 11** - 4,5-di(hidroximetil)acridina



Fonte: Carole et al. (2005). Derivado B'52 da série acridínica, o qual desempenhou notável atividade antiparasitária contra formas amastigotas de *Leishmania* ( $IC_{50} = 0,6 \mu M$ ), apresentando um índice de seletividade acima de 200%.

Estudos adicionais foram realizados por Caffrey e colaboradores (2007), Di Giorgio e colaboradores (2003), Gamage e colaboradores (1997), Werbovets e colaboradores (1992), Wong e colaboradores (2009), entre outros, todos corroborando para as evidências de que: existem desigualdades entre os alvos humanos e parasitários que são importantes fatores influentes para seletividade do fármaco; a modificação molecular dos compostos acridínicos irá afetar as suas afinidades por determinados alvos, estratégia que pode ser benéfica para obtenção de atividade antileishmania, tornando os derivados acridínicos promissores candidatos a fármacos com essa ação.

Assim, dentre os possíveis alvos visados para o desempenho da atividade leishmanicida, encontram-se as DNA topoisomerasas.

### 3.4 DNA topoisomerasas

As DNA topoisomerasas são as enzimas responsáveis pela resolução de transtornos de ordem topológicas que são desenvolvidos durante processos que requerem o desenrolamento das fitas de DNA, seja de forma temporária, como na transcrição ou recombinação, ou permanentemente, como na replicação. Essas irão promover uma quebra transitória nessa

cadeia, evitando a formação de superenrolamento ou super-helicoidização na molécula de DNA e consequente quebra das fitas (CHAMPOUX, 2001; JORGE, 2012).

Essas enzimas possuem o mesmo mecanismo de ação geral. Elas se caracterizam por serem capazes de manipular as fitas de DNA com grande velocidade e fidelidade, com energia provinda, dependendo do tipo da enzima, do superenrolamento do DNA ou da hidrólise do ATP (CORBETT; BERGER, 2004). Sua atividade catalítica consiste no ataque nucleofílico, mediado pelo resíduo catalítico tirosil da enzima, a ligação fosfodiéster existente entre os nucleotídeos de uma fita de DNA, originando uma ligação covalente temporária entre o fosfato e a tirosina (POMMIER, 2009).

Tais enzimas são diferenciadas e classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação em duas classes: topoisomerases I, que induzem a quebra de apenas uma fita; topoisomerases II, que promovem a quebra das duas fitas de DNA (POMMIER et al., 2010). Posteriormente, são subdivididas em subfamílias de acordo com seu mecanismo de ação, sequência de aminoácidos e similaridades estruturais (TEREKHOVA et al., 2012).

As enzimas topoisomerases do tipo I são subdivididas em IA (topoisomerases I e III de *Escherichia coli*, topoisomerases III de eucariotos e girase reversa encontrada em arqueobactérias hipertermófilas), IB (topoisomerases I de eucariotos, as topoisomerases poxvírus e enzimas homologas encontradas em certas bactérias) e IC (topoisomerase V de *Methanopyrus kandleri*) (DEWEESE; OSHEROFF; OSHEROFF, 2009; BAKER; RAJAN; MONDRAGÓN, 2009).

A subfamília IA é caracterizada por englobar enzimas de peso molecular de cerca de 67kDa de forma toroidal, que requerem íons de metal divalentes ( $Mg^{+2}$  e  $Zn^{+2}$ ) para realização da atividade catalítica por meio do ataque covalente ao fosfato da extremidade 5' da fita de DNA (BAKER; RAJAN; MONDRAGÓN, 2009; DEWEESE; OSHEROFF; OSHEROFF, 2009; TEREKHOVA et al., 2012). As enzimas da subfamília IB não compartilham nenhuma homologia estrutural ou sequencial com as topoisomerases IA, possuindo pesos moleculares de aproximadamente 90kDa (em eucariotos grandes) e 36kDa (em vírus e bactérias menores). Seu mecanismo de ação envolve o ataque covalente ao fosfato da extremidade 3' por meio de uma reação metal independente (BAKER; RAJAN; MONDRAGÓN, 2009; CHAMPOUX, 2001; DEWEESE; OSHEROFF; OSHEROFF, 2009; JORGE, 2012). A subfamília IC, constituída apenas pela topoisomerase V de *Methanopyrus kandleri*, desempenha o mesmo



mecanismo de ação que as enzimas IB, diferenciando-se dessas devido à falta de similaridades estruturais e sequenciais (BAKER; RAJAN; MONDRAGÓN, 2009).

As topoisomerasas II também se apresentam como um grande grupo de enzimas, nas quais alguns exemplares constituintes dessa classe de enzimas são: topoisomerase II de eucariotos; topoisomerase II viral; topoisomerase VI de Archaea; DNA girase bacteriana; topoisomerase IV de bactérias, entre outros. Eucariotos mais inferiores e invertebrados codificam apenas um tipo de topoisomerase II, enquanto que os vertebrados codificam duas isoformas dessa enzima, a topoisomerase II $\alpha$  e a II $\beta$ , as quais se diferenciam principalmente devido às suas funções celulares e aos seus padrões de expressão. As primeiras são muito incidentes e indispensáveis em células em proliferação, sendo requeridas para segregação dos cromossomos, enquanto que as enzimas II $\beta$  são dispensáveis a nível celular, mas aparentemente são necessárias para o desenvolvimento neural apropriado (DEWEESE; OSHEROFF, 2009; FONTERRE et al., 2007).

O mecanismo de ação envolvido na ação das topoisomerasas II é comum a todas as enzimas. Essas irão se ligar e clivar ambas as fitas de DNA por meio da ligação covalente de cada subunidade da enzima a extremidade 5' do DNA, formando uma ligação de fosfotirosina. A reação requer a presença de Mg<sup>+2</sup>, bem como a hidrólise de ATP, que é necessária para o giro enzimático e rápida cinética, exceto no ciclo de relaxamento ou decatenação/catenação, que podem acontecer na presença de um análogo do ATP não hidrolisável, o ADPNP (CHAMPOUX, 2001).

### **3.4.1 Topoisomerasas como alvo farmacológico**

Embora sejam enzimas de papel fisiológico fundamental, as topoisomerasas são alvos importantes para terapia antitumoral, antibacteriana, antileishmania, entre outras.

Os fármacos direcionados à topoisomerase, também chamados de inibidores de topoisomerase, podem ser classificados em dois grupos de acordo com o seu mecanismo de ação, sendo eles os “venenos de topoisomerase” e os inibidores catalíticos (DEWEESE; OSHEROFF, 2009).

Os “venenos de topoisomerase”, diferentemente dos demais fármacos direcionados para proteínas que agem capturando-as, irão agir aumentando a atividade da enzima ao formar uma ligação covalente entre essa e o DNA, havendo assim um aumento nas quebras da

molécula, o que formará intermediários prejudiciais ao metabolismo celular, induzindo eventos mutagênicos e letais. Esses podem agir de duas formas não necessariamente exclusivas, na qual alguns compostos agem inibindo a atividade da enzima em religar a fita de DNA clivada e outros agem aumentando os níveis de cisão. Além disso, os “venenos de topoisomerase” podem ser divididos como intercalantes ou não intercalantes de DNA, sendo os intercalantes capazes de se sobrepor entre as bases da cadeia nucleotídica, alterando a geometria requerida para religação das fitas de DNA e, conseqüentemente, aumentando o tempo do complexo enzima-DNA causado pelo “veneno de topoisomerase” (DEWEESE; OSHEROFF; OSHEROFF, 2009; DEWEESE; OSHEROFF, 2009; JORGE, 2012; NITISS, 2009).

Os inibidores catalíticos, diferentemente dos “venenos de topoisomerasas” que aumentam a atividade da enzima, irão impedir a atividade da mesma evitando a formação do complexo enzima-DNA, seja pela inibição da ligação da enzima com o DNA ou por impedir que a topoisomerase clive o DNA (JORGE, 2012).

#### **3.4.1.1 Topoisomerasas de interesse para terapia antileishmania**

Estudos evidenciam que as topoisomerasas de parasitas são suficientemente distintas das suas enzimas análogas de humanos, fato que as tornam alvos farmacológicos diferenciados e viáveis para o tratamento (DAS et al., 2004).

O isolamento da primeira enzima topoisomerase do tipo I em leishmania foi realizado por Broccoli e colaboradores (1999) em parasitas da espécie *L. donovani*.

Essa enzima é inibida pela camptotecina, fármaco antitumoral que se caracteriza por inibir a topoisomerase IB de humanos. A sua sensibilidade a esse fármaco é distinta da apresentada pelas células cancerígenas, evidenciando a existência de diferenças moleculares entre ambas as enzimas e a relevância dessa enzima de leishmanias como alvo farmacológico (MAJUMDER, 2008).

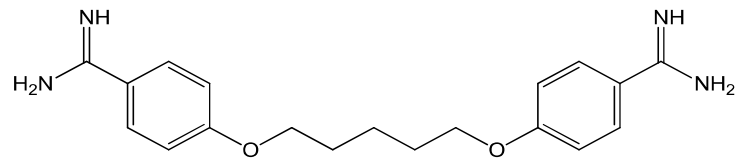
Por meio de pesquisas impulsionadas pela sensibilidade apresentada pela topoisomerase I de *L. donovani* frente a um fármaco “veneno de topoisomerase” conhecido, foram realizadas descobertas quanto à enzima. Essa apresenta como característica uma sequência de aminoácidos semelhante à encontrada no núcleo central de topoisomerasas eucarióticas do tipo IB, apresentando variância no C-terminal. Além disso, diferentemente das demais topoisomerasas I, que são codificadas por apenas um gene, essas são codificadas por

dois genes que se unem para formar uma enzima heterodimérica dentro do parasita. Embora sua ação seja metal independente, característica de enzimas IB e IC, quando na presença de  $Mg^{2+}$  sua atividade é potencializada (DAS et al., 2004; MAJUMDER, 2008).

A topoisomerase II está presente em vários parasitos que possuem cinetoplasto, inclusive em *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. De Sousa e colaboradores (2003) reportaram a similaridade entre topoisomerase II isolada de *L. chagasi* com as topoisomerasas II $\alpha$  e II $\beta$  humanas, apresentando essa homologia de 26,3% e 26,4%, respectivamente. Além desses resultados, o estudo indica considerável homologia entre topoisomerasas de *L. chagasi* com as de *L. donovani* (98,8%) e *L. infantum* (98,7%), o que nos indica que ambas espécies apresentem homologia similar às topoisomerasas humanas do tipo II. Dentre as diferenças mais evidentes, encontram-se as dimensões menores em relação aos demais tipos de topoisomerase II humana, o desempenho de atividade girase e a possibilidade de expressão da enzima tanto no núcleo quanto no cinetoplasto. Ademais, são divergentes os estudos que envolvem a energia necessária para sua ação, sendo essa enzima caracterizada como ATP dependente e independente (CHAKRABORTY; MAJUMDER, 1991; CHEESMAN, 2000; DAS et al., 2004; MAJUMDER, 2008). Assim, o baixo nível de homologia entre as enzimas humanas e parasitárias salienta a viabilidade do uso da topoisomerasas de *Leishmania* como alvo farmacológico, pois torna-o seletivo e, conseqüentemente, mais eficaz e menos citotóxico.

A pentamidina (Figura 12) é uma diamina aromática com propriedades antiprotozoárias utilizada como tratamento de primeira linha na LTA e de segunda linha no tratamento da LV. Seu mecanismo de ação não é inteiramente esclarecido, sendo atribuído a esse fármaco uma diversidade de ações, tais como: interação com kDNA; alteração da glicólise aeróbica; agregação ribossômica; inibição da síntese de DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios. Dentre esses mecanismos de ação, também é sugerido que esse fármaco desempenhe inibição da topoisomerase II do cinetoplasto. Apesar disso, o tratamento com essa droga é limitado devido à alta toxicidade apresentada por esta, como: hipoglicemia, hipotensão, cefaleia, taquicardia, tontura, pancreatite, lesão renal, leucopenia, anemia e até mesmo morte repentina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; GOLAN et al., 2014; MCGWIRE; SAROSKAR, 2014; MOHAPATRA, 2014; RATH et al., 2003).

**Figura 12** - Estrutura química da pentamidina



Fonte: Brunton, Chabner e Knollman (2012).

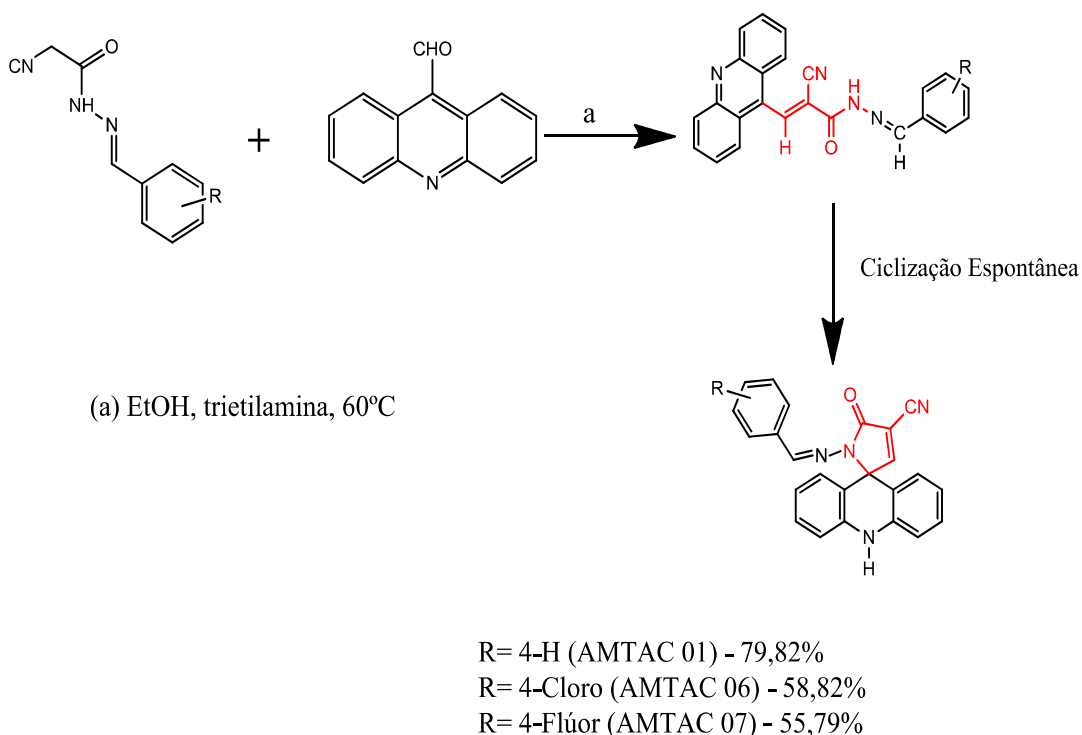
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Síntese dos derivados espiro-acridínicos

A síntese dos derivados espiro-acridínicos foi realizada no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), no Campus V, localizado na cidade de João Pessoa – PB.

Os derivados acridínicos foram sintetizados de acordo com os procedimentos experimentais otimizados previamente, que consistem inicialmente da reação de obtenção do núcleo acridínico, por métodos já preconizados pelo laboratório, seguido da condensação com derivados *N*-acilidrazônicos substituídos obtidos por meio da condensação da 2-cianoacetohidrazina e diferentes aldeídos aromáticos substituídos ou não, obtidos comercialmente ou sintetizados no laboratório (Esquema 1).

**Esquema 1** - Diagrama geral de síntese dos novos derivados espiro-acridínicos



Para obtenção desses derivados, foram utilizadas quantidades equimolares de ambos intermediários previamente preparados. Esses foram adicionados em um balão de fundo redondo, com capacidade de 50 mL, juntamente com 10 mL de etanol e 15 gotas de trietilamina. O sistema reacional foi deixado sob refluxo e aquecido a uma temperatura de

aproximadamente 60°C até o término da reação, a qual foi acompanhada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD). Os produtos foram filtrados e purificados por meio de lavagens sucessivas em etanol absoluto.

## 4.2 Caracterização físico-química e estrutural

As moléculas sintetizadas foram avaliadas quanto à aparência, solubilidade, fator de retenção ( $R_f$ ), faixa de fusão (F.F.), rendimento (%), peso molecular (P.M.) e coeficiente de partição ( $\log P$ ).

A comprovação estrutural de alguns dos compostos foi realizada por meio de técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 4.2.1 Rendimento da reação

O rendimento da reação foi calculado através da relação entre o número de mols do produto pesado em relação ao número de mols do produto de partida, dando-se o resultado em porcentagem. Segue a fórmula:

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

### 4.2.2 Fator de retenção

O fator de retenção dos compostos sintetizados foi mensurado por intermédio de cromatografias analíticas em camada delgada (CCDA) em placas FLUKA Analytical sílica gel de 0,2mm de espessura. Essa técnica também foi utilizada para o acompanhamento da reação. As revelações foram realizadas nos comprimentos de onda ultravioleta 254 e 366 nm.

### 4.2.3 Faixa de fusão

As faixas de fusão dos derivados espiro-acridínicos sintetizados foram estabelecidas através do aparelho Quimis® Modelo Q-340M e estas não foram corrigidas.

#### 4.2.4 Coeficiente de partição

O cálculo do log P teórico dos compostos foram realizados através do programa ChemDraw Ultra 12.0®, por meio do desenho das respectivas moléculas.

#### 4.2.5 Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos através da leitura das pastilhas de KBr em Espectrofotômetro de FTIR, IRPrestige-21, da Shimadzu®. Os dados foram tratados com auxílio do software Origin 8.0.

#### 4.2.6 Espectrometria de Massas

Os valores de massa molecular dos íons moleculares foram obtidos em espectrômetro Eletrospray Shimadzy LC/MS-IF-TOF em modo positivo.

#### 4.2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance de 400 ou 500 MHz, para RMN  $^1\text{H}$ , e 100 ou 125 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$ , Ultrashield® e, para o tratamento dos espectros, utilizou-se o software MestReC 4.8.6.0.

### 4.3 Avaliação da atividade antileishmania

#### 4.3.1 Atividade antipromastigota em cepas de *Leishmania (L.) amazonensis*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio de cultura ágar-sangue NNN (Novy-McNeal-Nicolle), associado ao meio líquido Schneider suplementado com 20% de soro bovino e 1% do antibiótico estreptomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e penicilina (100 U.I./mL), e incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) a aproximadamente 26°C. Essas foram provenientes do Banco de Culturas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A avaliação da atividade antipromastigota se inicia pela adição, a tubos de ensaio, de  $1 \times 10^6$  promastigotas/mL de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento, em ausência de compostos químicos adicionais ou em união com os derivados acridínicos e controles positivos. A avaliação do controle positivo realizou-se através a avaliação das drogas de referência Glucantime® [300mg/mL (Aventis Pharma, Brasil)] e a Anfotericina B® (AmB)

[1mg/mL (Cristália)] frente às formas promastigotas. As amostras foram armazenadas durante 72 horas a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  em BOD.

Após o término da incubação, retiraram-se alíquotas das amostras em questão, posteriormente diluídas em solução de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 mL de formol em 1 L de água destilada) numa proporção de 1:10. Procedeu-se com agitação das amostras diluídas em aparelho vortex por cerca de dois minutos e posterior quantificação das células em câmara de Neubauer por meio de microscopia óptica comum. A contagem do número de parasitos/mL seguiu a seguinte fórmula:

$$N^\circ \text{ de parasitos} = \text{média dos quatro quadrantes} \times \text{inverso da diluição da amostra} \times 10^4$$

As culturas em controle negativo, cujo crescimento é considerado 100%, foram utilizadas como parâmetro para o cálculo da concentração capaz de inibir 50% do crescimento ( $\text{IC}_{50}$ ).

O cálculo do  $\text{IC}_{50}$  foi realizado por meio do programa SPSS 13.0 for Windows utilizando-se o modelo probit de análise de regressão.

#### **4.3.2 Atividade antipromastigota em cepas de *Leishmania (L.) infantum***

As formas promastigotas de *L. infantum* foram isoladas de um paciente com quadro de leishmaniose visceral, em Natal – RN, sendo gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selma Maria Bezerra Jeronimo do Laboratório de Imunogenética do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Essas foram armazenadas em meio Schneider com pH 7 (Sigma-Aldrich, Sr. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico (penicilina 200 U.I./mL e estreptomicina 0,1 mg/mL - Gibco, BR) e 1% de urina masculina humana, numa temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  em estufa BOD.

Avaliou-se a atividade antileishmania dos compostos analisados utilizando o teste do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio). Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de meio Schneider suplementado e cerca de  $1 \times 10^6$  promastigotas por poço em uma placa de 96 poços. Posteriormente, foram adicionados os derivados acridínicos sintetizados em triplicata, previamente diluídos em meio Schneider suplementado para um volume final de 100  $\mu\text{L}$  para cada poço nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$ .



O controle negativo foi mantido na ausência de substâncias, contendo assim meio Schneider suplementado a 0,2% de DMSO. O controle positivo foi realizado na presença de dois fármacos de referência: Anfotericina B®, nas concentrações de 10 a 0,039 µg, e Glucantime®, 1,171 a 150 mg/mL. Os cálculos da porcentagem de inibição de crescimento das substâncias avaliadas foram realizados em relação à cultura controle.

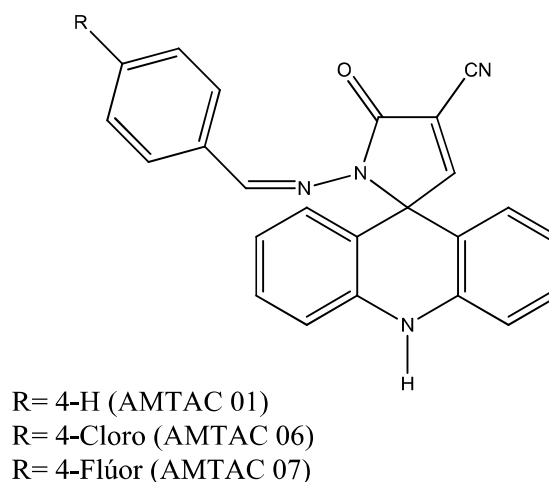
As amostras foram incubadas durante 72 h em estufa BOD numa temperatura média de 26°C. Após esse período, foram adicionados 10 µL de MTT diluído em tampão fosfato-salino a uma concentração final de 5 mg/mL. Posteriormente, as amostras foram incubadas por mais 4 h em estufa BOD a 26°C, seguido de adição de 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. A placa permaneceu em *overnight* para dissolução do formazan e, por último, foi realizada leitura a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Compostos sintetizados e caracterização físico-química dos derivados espiro-acridínicos substituídos

Foram sintetizados 3 novos derivados espiro-acridínicos substituídos, os quais podem ser vistos na figura 13.

**Figura 13** – Compostos espiro-acridínicos sintetizados



**Tabela 1** – Características físico-químicas dos compostos sintetizados

MOLÉCULA	Aparência	PM	Rend%	F.F.	R <sub>f</sub> <sup>A</sup>	FM	LogP
<b>AMTAC 01</b>	Pó verde	376,41	79,82	217-222	0,44	C <sub>24</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O	4,62
<b>AMTAC 06</b>	Pó amarelo	410,86	58,82	240-243	0,51	C <sub>24</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O	5,18
<b>AMTAC 07</b>	Pó amarelo	394,40	55,79	230-232	0,53	C <sub>24</sub> H <sub>15</sub> FN <sub>4</sub> O	4,78

F.F. – Faixa de fusão, R<sub>f</sub> – Fator de retenção, PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular, Rend% - Rendimento (%). <sup>a</sup>n-hexano/AcOEt 7:3.

Conforme mostrado na tabela 1, os derivados espiro-acridínicos obtiveram padrões de rendimentos distintos, variando entre 55,79% (AMTAC 07) e 79,82% (AMTAC 01), comprovando a viabilidade da rota sintética adotada, associado a uma metodologia de fácil purificação. Essa foi realizada por meio da filtração, lavagem com etanol e recristalização dos precipitados obtidos, respectivamente.

Os pesos moleculares dos compostos sintetizados variaram entre 376,41 (AMTAC 01) e 410,86 (AMTAC 06), e seus logP teóricos calculados apresentaram variação entre 4,62 (AMTAC 01) e 5,18 (AMTAC 06).

Por meio desses valores podemos realizar uma correlação com a regra dos 5 de Lipinski. Essa estabelece parâmetros estruturais desejáveis para obtenção de um perfil satisfatório de biodisponibilidade oral ao balancear as características físico-químicas dos compostos, compreendendo em fármacos hidrofílicos o suficiente para se dissolverem em meio aquoso e lipofílicos suficientes para atravessarem as barreiras biológicas. Os critérios definidos são: Massa molecular < 500 g/mol; log P < 5; grupamentos doadores de ligação de hidrogênio < 5 e grupamentos aceptores de ligação de hidrogênio < 10 (LEESON, 2012; LIMA, 2007; SINGH, 2016). Assim, os compostos espiro-acridínicos sintetizados apresentam-se dentro desses parâmetros, com exceção do AMTAC 06 que apresenta como limitação o log P igual a 5,18.

As faixas de fusão apresentadas por esses compostos oscilaram entre 3 e 6°C, indicando um grau de pureza aceitável, embora o desejável seja a variação de apenas 3°C. Os seus *Rf* foram acima de 0,44, no sistema *n*-hexano/AcOEt 7:3, encaixando-se nos valores ideais de *Rf* que variam entre 0,4 e 0,6 (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Os compostos foram obtidos sob a forma de pó amorfo, com coloração característica amarela, com exceção do AMTAC 01, que se apresentou como um pó verde.

## 5.2 Caracterização estrutural

A caracterização estrutural dos compostos derivados espiro-acridínicos sintetizados foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas de IV, EM, RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, conforme explanados nos seguintes tópicos e anexos.

### 5.2.1 Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica extensamente utilizada para identificação de grupos funcionais. Essa corresponde à interação entre a radiação infravermelha e a matéria que fornece energia para modificar as vibrações entre os átomos e consequente passagem da molécula para o estado excitado, que propiciará a detecção da energia pelo aparelho. Por meio da obtenção do comprimento de onda, que se restringe usualmente entre 400 e 4000 cm<sup>-1</sup>, e da transmitância, que serão variados de acordo com as

características dos átomos em questão, é possível a confirmação dos grupos funcionais da molécula e, possivelmente, consequente construção da sua estrutura molecular.

Assim, realizou-se a espectroscopia de IV para os compostos AMTAC 06 e AMTAC 07. Nota-se na tabela 2 os valores de absorção em comum às duas moléculas inerentes ao núcleo espiro-acridínico. Entre  $3.315\text{ cm}^{-1}$  a  $3.317\text{ cm}^{-1}$  evidenciam-se valores característicos de grupamentos NH referentes ao grupo presente no anel central do anel acridínico. Em  $1.676$  a  $1.701\text{ cm}^{-1}$  observaram-se valores de absorção sugestivos de grupamento carbonila. Ainda por meio desse método, foi possível observar em  $2.237\text{ cm}^{-1}$  uma banda estreita de média intensidade sugestiva de grupamento nitrila.

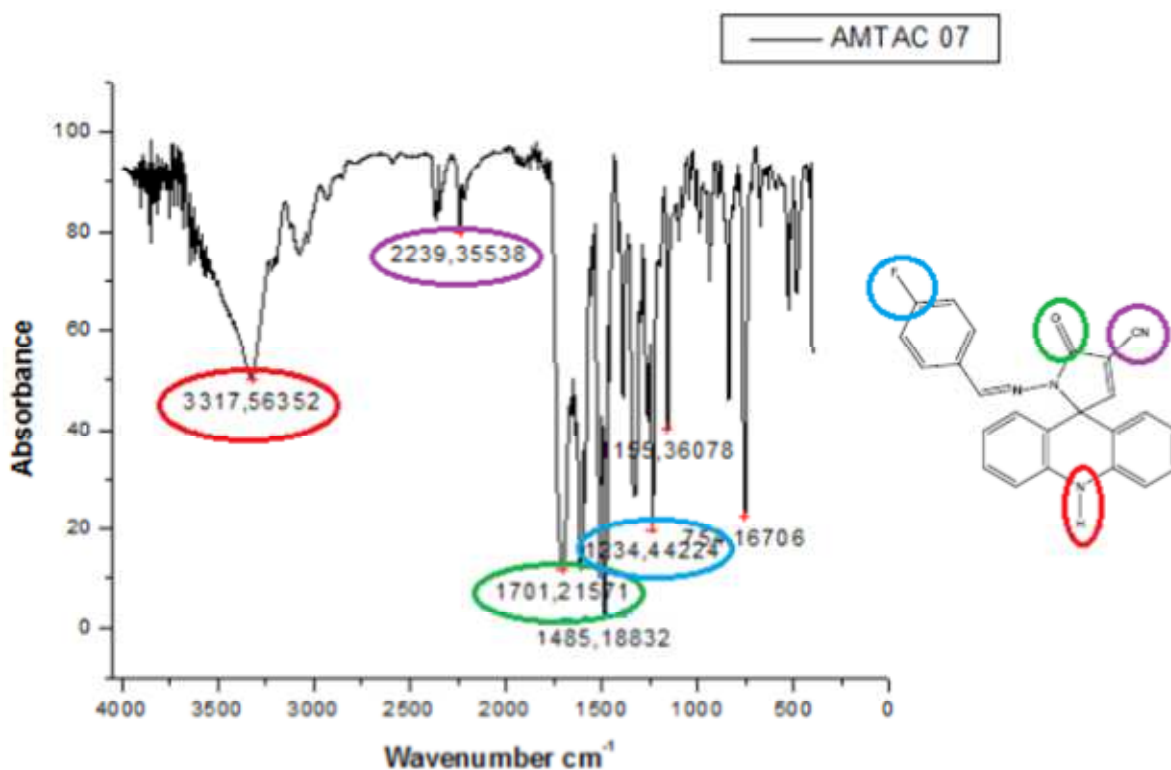
**Tabela 2** - Dados obtidos por espectroscopia de IV para os compostos sintetizados

<b>MOLÉCULA</b>	<b>IV (KBr) (CM<sup>-1</sup>)</b>
<b>AMTAC 06</b>	3315,6347 (NH); 3089,9632 (CH); 2239,3553 (CN); 1676,1411 (C=O); 1485,1883; 1334,7406 (CN de Aromáticos); 790, 8145 (Ar-Cl).
<b>AMTAC 07</b>	3317,5635 (NH); 2239,3553 (CN); 1701,2157 (C=O); 1485,1883; 1234,4422 (C-F).

Foi realizada por Almeida e colaboradores (2016) a espectroscopia de infravermelho da molécula AMTAC 01, que apresentou como bandas de absorção:  $3.291,85\text{ cm}^{-1}$  (NH),  $1.705,12\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1.614,95\text{ cm}^{-1}$  (C=N) e  $1.486,49\text{ cm}^{-1}$  (C=C). Os valores apresentaram-se coerentes com os obtidos para o núcleo espiro-acridínico das moléculas AMTAC 06 e AMTAC 07.

O espectro de IV do composto AMTAC 07 (Figura 14) evidencia as bandas de absorção características da molécula. Em  $3.317\text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda larga de média intensidade sugestiva de amina secundária (NH). Foram absorções de destaque também a banda de estreita de alta intensidade em  $1.701\text{ cm}^{-1}$  característica de ligação C=O e a banda de absorção de característica estreita de baixa intensidade localizada em  $2.239\text{ cm}^{-1}$  sugestiva de grupamento nitrila (CN). Por fim, observou-se a banda de absorção presente em  $1.234,4422\text{ cm}^{-1}$  sugestiva de ligação entre carbono aromático e flúor.

**Figura 14** - Espectroscopia de IV do AMTAC 07



### 5.2.2 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica que permite a determinação da massa molecular e a fórmula molecular de uma substância. Essa baseia-se na ionização da molécula introduzida no equipamento para obtenção do íon molecular (M) e demais picos, produzindo um gráfico da abundância relativa de cada fragmento carregado positivamente produzido, plotado contra seu valor  $m/z$  (BRUICE, 2006).

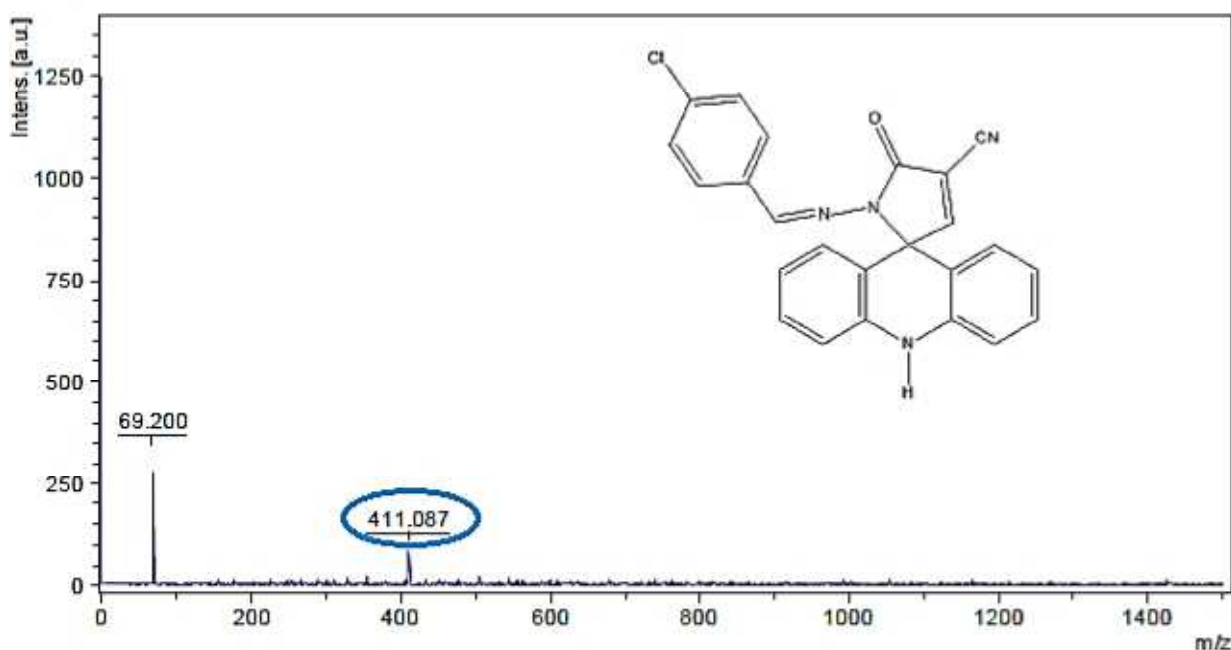
A seguinte técnica foi realizada para as moléculas AMTAC 06 e AMTAC 07. Segue na tabela 3 o comparativo entre os resultados de massa molecular calculada em relação a massa molecular encontrada. Os resultados demonstram uma variação aceitável entre ambos os resultados, o que atesta a estabilidade do íon molecular.

**Tabela 3** – Valores de massa obtidos por cálculo e experimentalmente

<b>MOLECULA</b>	<b>Massa calculada</b>	<b>M/Z</b>	<b>Massa encontrada</b>
<b>AMTAC 06</b>	410,86	411.0968 (26.0%) 411.0905 (1.5%)	411,0870
<b>AMTAC 07</b>	394,40	395.1263 (26.0%) 395.1200 (1.5%)	395,110

Adicionalmente, foi realizada por Almeida e colaboradores (2016) a espectrometria de massas do composto AMTAC 01, cujo apresentou uma massa molecular calculada de 376,1324 e experimental de 377,1240.

Segue na figura 15 o espectro de massa da molécula AMTAC 06, que apresentou como massa calculada 410,8551 e íon molecular correspondente a  $m/z = 411,087$ .

**Figura 15** - Espectro de massa da molécula AMTAC 06

### 5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear é uma técnica de espectroscopia utilizada na elucidação e identificação de compostos baseada na identificação de grupos passíveis de sofrer o fenômeno de ressonância, ou seja, aqueles átomos de número atômico ímpar e massa

molecular ímpar ou par. Na química orgânica, é dado um maior enfoque aos RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , que fornecem dados característicos do composto em questão de acordo com o ambiente químico dos átomos nele presentes.

A elucidação estrutural por RMN  $^1\text{H}$  (tabela 4) foi realizada para todos os derivados sintetizados. Tal técnica permite a diferenciação dos prótons de acordo com o deslocamento químico, integração e acoplamento de spins. Assim, foram pontos de relevância os picos em forma de singletos encontrados entre 9,79 a 9,85 ppm referentes ao sinal do NH, indicativo de que não houve acoplamento de spin. As moléculas apresentaram picos com variação entre 8,53 e 8,56 ppm referentes ao sinal =CH característico da condensação com o aldeído. Adicionalmente, os deslocamentos entre 8,39 e 8,48 ppm são sugestivos de hidrogênio de ligação imínica (C=N). Os resultados obtidos corroboraram com os relatados por Almeida et al. (2016).

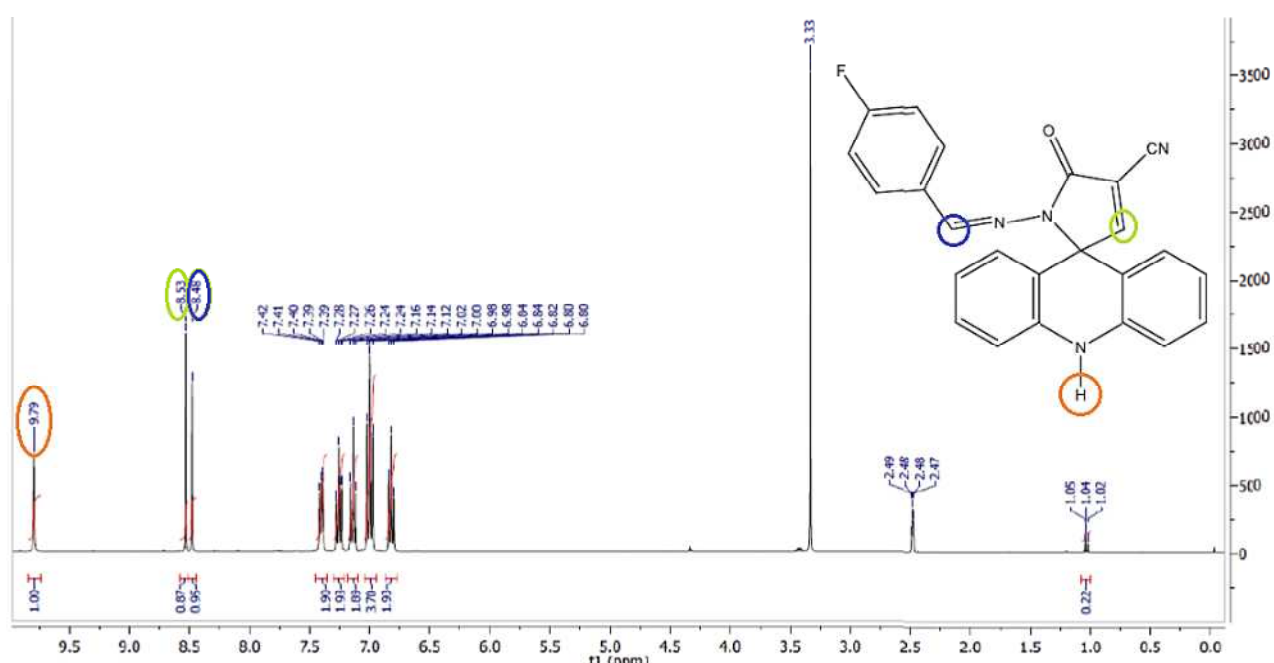
**Tabela 4** – Deslocamentos químicos dos derivados espiro-acridínicos por RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ , DMSO- $d_6$ , 400MHz)

<b>MOLÉCULA</b>	<b>Deslocamento (<math>\delta</math> em ppm)</b>
<b>AMTAC 01</b>	$\delta = 9,85$ ppm (s, 1H, NH); $\delta = 8,56$ ppm (s, 1H, CH); $\delta = 8,39$ ppm (s, 1H, N=CH); $\delta = 7,34$ ppm (m, 4H, aromático); $\delta = 7,27$ ppm (m, 2H, acridina); $\delta = 7,01$ ppm (t, 4H, acridina); $\delta = 6,83$ ppm (t, 2H, acridina).
<b>AMTAC 06</b>	$\delta = 9,82$ ppm (s, 1H, NH); $\delta = 8,55$ ppm (s, 1H, CH); $\delta = 8,42$ ppm (s, 1H, N=CH); $\delta = 7,38$ ppm (m, 4H, aromático); $\delta = 7,26$ ppm (m, 2H, acridina); $\delta = 7,00$ ppm (m, 4H, acridina); $\delta = 6,82$ ppm (m, 2H, acridina).
<b>AMTAC 07</b>	$\delta = 9,79$ ppm (s, 1H, NH); $\delta = 8,53$ ppm (s, 1H, CH); $\delta = 8,48$ ppm (s, 1H, N=CH); $\delta = 7,40$ ppm (m, 2H, aromático); $\delta = 7,26$ ppm (m, 2H, acridina); $\delta = 7,14$ ppm (m, 2H, aromático); $\delta = 7,00$ ppm (m, 4H, acridina); $\delta = 6,82$ ppm (m, 2H, acridina).

Segue na figura 16 o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado espiro-acridínico AMTAC 07. Esse apresentou como pontos principais um singlete em 9,79 ppm sugestivo de próton de

ligação NH, além do mais, o resultado de integração de prótons relevou a presença de apenas um hidrogênio com esse comportamento. Em 8,53 ppm destaca-se, em forma de singlete, o deslocamento químico sugestivo de hidrogênio de carbono vinílico (C=C). Complementarmente, em  $\delta = 8,48$  ppm se sobressai um singlete sugestivo de hidrogênio de ligação N=CH. Os demais hidrogênios da estrutura molecular do derivado apresentam ambientes químicos semelhantes por serem todos inerentes a carbonos de aromático e, conseqüentemente, manifestaram deslocamentos químicos similares. Tais resultados corroboraram para confirmação da estrutura molecular esperada.

**Figura 16** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da AMTAC 07



Além do RMN  $^1\text{H}$ , realizou-se a caracterização estrutural por RMN  $^{13}\text{C}$  dos derivados AMTAC 06 e AMTAC 07 (Tabela 5).



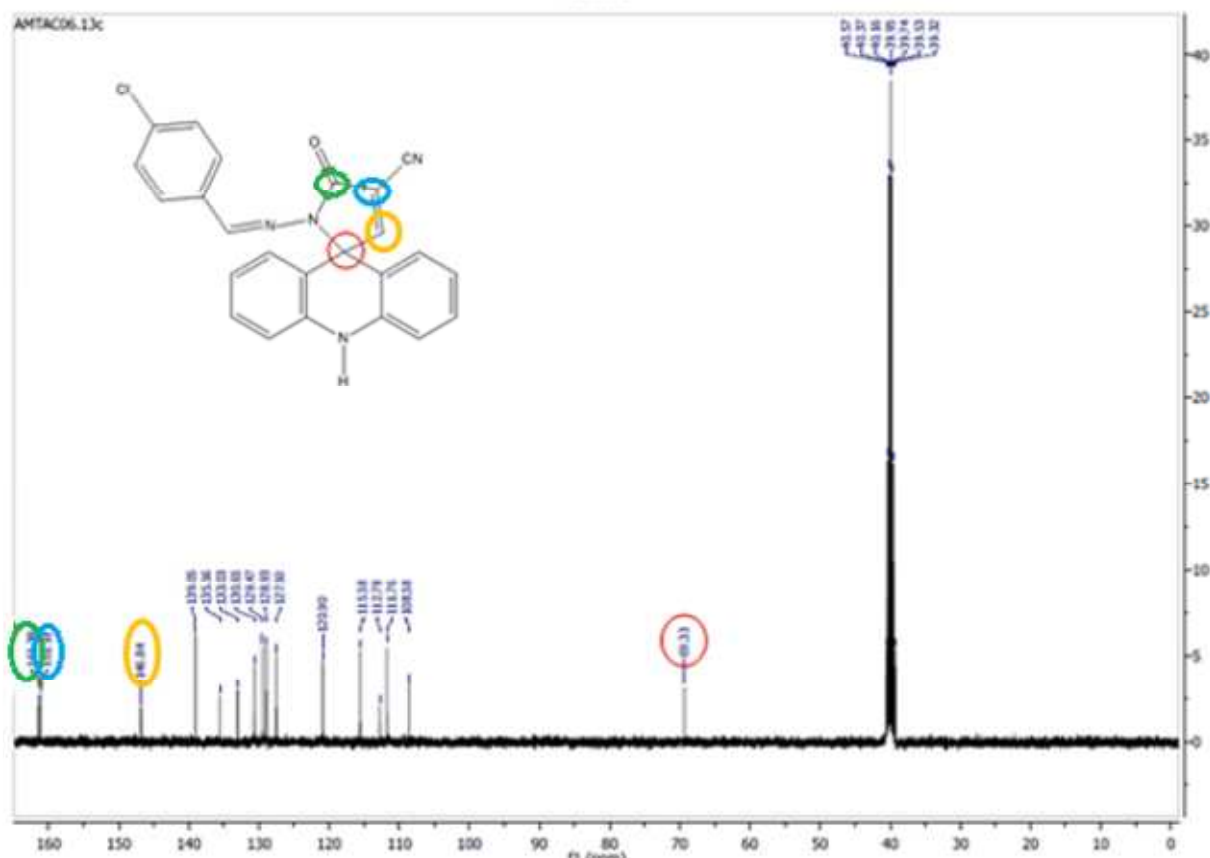
**Tabela 5** – Deslocamentos químicos dos derivados espiro-acridínicos por RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 e 125 MHz, respectivamente)

<b>MOLÉCULA</b>	<b>Deslocamento (δ em ppm)</b>
<b>AMTAC 06</b>	δ= 69,33; 108,58; 111,76; 112,78; 115,58; 120,90; 127,50; 128,93; 129,47; 130,65; 133,03; 135,56; 139,05; 146,84; 161,18; 161,38.
<b>AMTAC 07</b>	δ= 69,37; 108,68; 111,89; 112,78; 115,57; 116,32; 116,54; 120,87; 127,46; 129,52; 129,61; 130,58; 130,74; 130,77; 139,08; 147,40; 161,07; 161,07; 161,33; 162,54; 165,01

A partir dessa técnica foram evidenciados os deslocamentos dos carbonos de acordo com a estrutura do núcleo espiro-acridínico preconizado previamente por Vilková et al. (2014) e Almeida et al. (2016). Destacam-se os deslocamentos presentes entre 161,38 e 165,01 sugestivos de carbonila (C=O), os quais representam o carbono mais quimicamente desprotegido da molécula. Seguido desse, nota-se os deslocamentos entre 146,84 e 147,40 ppm característicos de carbono insaturado  $sp^2$  (C=C). Por fim, o principal deslocamento observado para ambas as moléculas foi entre 69,33 a 69,37 ppm característico de carbono quaternário, que evidencia a ocorrência da ciclização espontânea.

Na figura 17 é possível a visualização do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado espiro-acridínico AMTAC 06, o qual segue as características de deslocamento químico prenunciado. Por meio desse é possível observar as características que evidenciam a ciclização espontânea em C-9, tendo em vista que esse pico se apresenta mais desprotegido em relação aos demais carbonos  $sp^3$  hidrogenados. Outro fator esclarecedor pode ser a pequena intensidade do pico devido ao efeito nuclear overhauser (NOE), que proporciona uma maior intensidade nos picos de carbonos hidrogenados (PAVIA et al., 2010). Entretanto, esse fator não é conclusivo devido à extensa quantidade de carbonos  $sp^3$  hidrogenados com o mesmo padrão de deslocamento químico.

**Figura 17** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da AMTAC 06



O ataque intramolecular que caracteriza a ciclização espontânea dessa série ocorre entre o  $\text{N}_1$  da hidrazona e C-9 do núcleo acridínico. Segundo Schmidt e Liu (2015), a posição 9 do núcleo acridínico é suscetível ao ataque nucleofílico intramolecular e, nesse caso, conseqüente formação de um anel de cinco membros associado a essa posição (ALMEIDA et al., 2016).

### 5.3 Atividade antileishmania

#### 5.3.1 Avaliação da atividade antipromastigota sobre *Leishmania (L.) amazonensis*

Os derivados espiro-acridínicos sintetizados tiveram a sua atividade avaliada sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, apresentando valores de concentração inibitória mínima de 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) entre 0,31 (AMTAC 06) e 0,52  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (AMTAC 07) (Tabela 6) (Figura 18).

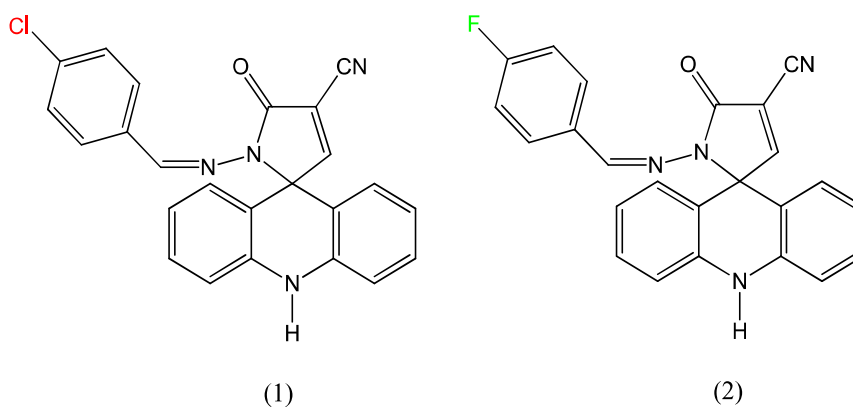
**Tabela 6** - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* na presença dos derivados espiro-acridínicos

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µM)
AMTAC 01	0,45	1,23
AMTAC 06	0,31	0,75
AMTAC 07	0,52	1,31

As atividades atribuídas aos derivados espiro-acridínicos avaliados podem estar relacionadas aos efeitos eletrônicos dos seus substituintes. Ambos halogênios utilizados como substituintes desempenham efeito indutivo negativo e efeito mesomérico positivo sobre a molécula a qual estão ligados. Entretanto, os últimos efeitos tendem a se sobressair em relação ao outro.

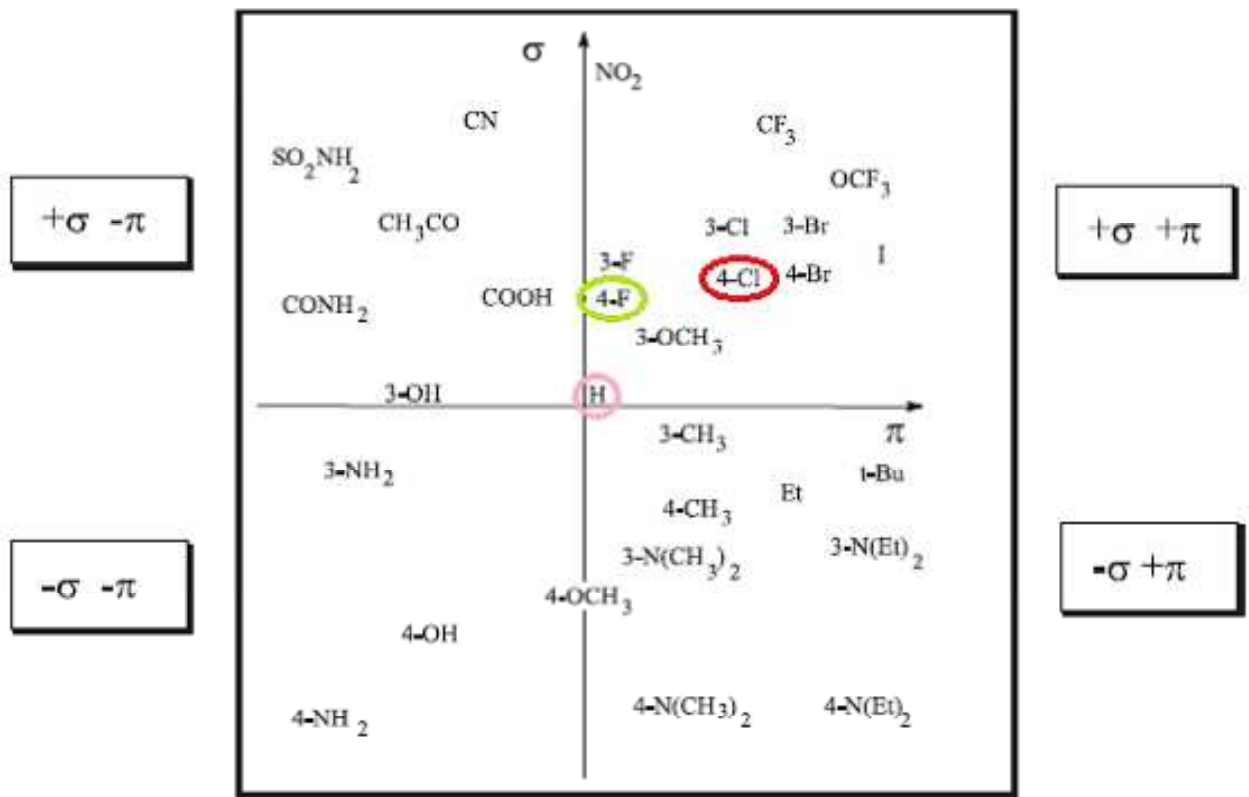
Portanto, acredita-se que a melhor potência designada ao derivado AMTAC 06 seja atribuída a um efeito mesomérico positivo mais evidente, o qual tende a aumentar a nuvem eletrônica sobre a estrutura química, favorecendo a atividade farmacológica antipromastigota. Em contrapartida, a menor atividade antipromastigota do AMTAC 07 pode estar associada a uma predominância do efeito indutivo negativo devido a característica de maior eletronegatividade inerente ao grupamento flúor, o qual diminui a nuvem eletrônica da estrutura química para concentrá-la sobre o substituinte. Assim, o AMTAC 01, sendo o derivado não substituído, apresentou uma atividade intermediária por não desempenhar efeitos eletrônicos.

**Figura 18** - Diferenças estruturais entre (1) AMTAC 06 e (2) AMTAC 07



Para o delineamento dos substituintes da série é utilizado o diagrama de Craig (Gráfico 1). Esse é um gráfico bidimensional extensamente utilizado em estudos de QSAR, cujo as coordenadas correlacionam os efeitos lipofílicos e eletrônicos dos grupamentos em substituição aromática (TAVARES, 2004). Por meio desse é possível a visualização do posicionamento dos grupamentos utilizados nessa série de compostos acrídnicos e como eles podem influenciar nas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, na ação da molécula.

**Gráfico 1 – Diagrama de Craig**



Fonte: Adaptado de Tavares (2004).

Assim, é possível visualizar os substituintes utilizados na série de compostos espiro-acrídnicos localizados no quadrante onde os efeitos eletrônicos e lipofílicos são positivos. Para cepa de *L. amazonensis*, o fator determinante para atividade aparenta ser o efeito eletrônico do substituinte, cujo a característica de efeito eletrônico mesomérico positivo colabora para uma melhor eficácia. Assim, para obtenção de resultados mais conclusivos para o estabelecimento da relação estrutura atividade, é necessária a síntese e avaliação de demais derivados com grupamentos substituintes pertencentes a diferentes quadrantes, para melhor determinar o padrão de substituinte desejável para ação farmacológica.

Esse método forneceu resultados de IC<sub>50</sub> para as drogas de referência Glucantime® e Anfotericina B®, os quais são observados na tabela 7.

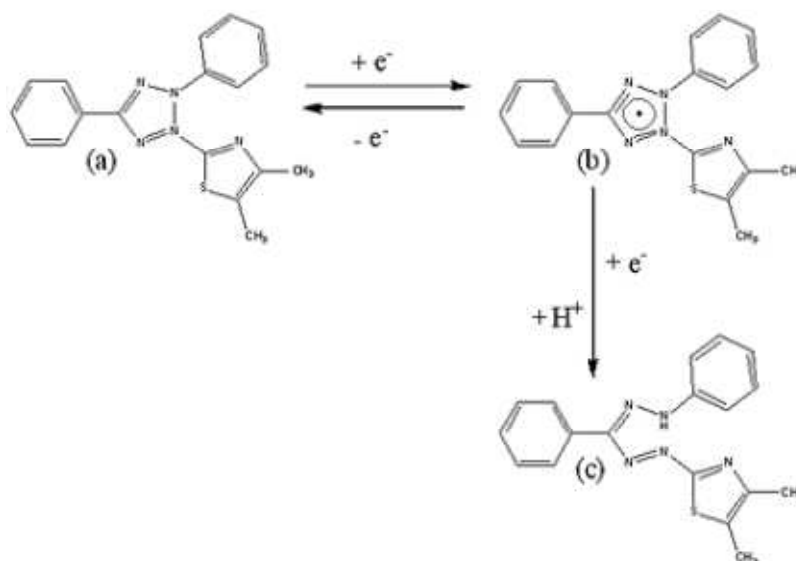
**Tabela 7** – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* na presença de drogas de referência

<b>MOLECULA</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>Glucantime®</b>	32100,65
<b>Anfotericina B®</b>	0,18

Tais resultados nos mostram uma eficácia muito superior dos derivados espiro-acridínicos em relação a droga de referência Glucantime®, cujo apresentou o IC<sub>50</sub> de 32100,65 µg/mL e, conseqüente, baixa atividade antipromastigota. Em relação a droga de referência Anfotericina B®, os derivados espiro-acridínicos apresentaram menor atividade antipromastigota, embora os valores de IC<sub>50</sub> tenham sido relativamente próximos. Portanto, os resultados encontram-se de acordo com o que é relatado na literatura, onde a Anfotericina B® caracteriza-se por desempenhar alta citotoxicidade sobre formas promastigotas de *Leishmania* sp. (DI GIORGIO, 2007; KUMAR, 2009).

### **5.3.2 Avaliação da atividade antipromastigota sobre *Leishmania (L.) infantum***

Os compostos sintetizados da série AMTAC foram testados frente *L. infantum* pelo método do MTT. Esse método baseia-se na atividade de enzimas desidrogenases citosólicas e mitocondriais, que são capazes de reduzir o MTT (coloração amarela) e formar um produto de coloração azul, insolúvel em água, o sal formazan (STOCKERT et al., 2012). Assim, a formação do sal formazan indicou a viabilidade da célula parasitária (Esquema 2).

**Esquema 2** – Reação de redução do MTT

Fonte: Adaptado de Wang e Wickliff (2011). (a) MTT; (b) Radical intermediário; (c) Formazan.

Por meio desse, realizou-se avaliação dos derivados acridínicos frente a formas promastigotas de *L. infantum* obtendo-se variações de  $IC_{50}$  entre 2,046 (AMTAC 01) e 6,790  $\mu\text{g/mL}$  (AMTAC 06) (Tabela 8).

**Tabela 8** – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* na presença dos derivados espiro-acridínicos

MOLÉCULA	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
AMTAC 01	2,046	5,4
AMTAC 06	6,790	16,5
AMTAC 07	4,109	10,4

Assim como na metodologia anterior, obtiveram-se resultados de  $IC_{50}$  das drogas de referência (Tabela 9) que demonstraram o mesmo padrão em relação aos compostos espiro-acridínicos. Os resultados, entretanto, foram variados de acordo com a cepa de *Leishmania*, apresentando-se o Glucantime® mais eficaz para formas promastigotas de *Leishmania infantum*, ao passo que a droga de referência Anfotericina B® apresentou-se mais eficaz para

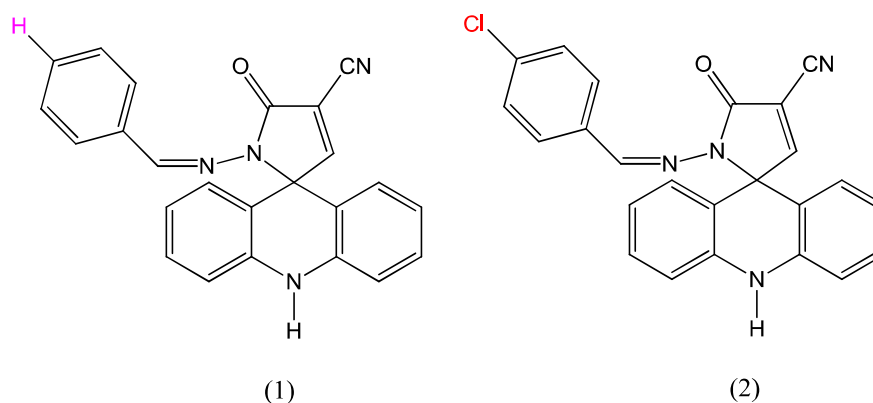
formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Entretanto, por se tratarem de metodologias diferentes, esses resultados não são totalmente conclusivos ao se tratar do quesito de espécie mais sensível para cada fármaco.

**Tabela 9** - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* na presença de drogas de referência

MOLÉCULA	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Glucantime®	25610
Anfotericina B®	0,90

Assim, ao se tratar dos resultados obtidos para os derivados espiro-acridínicos, o efeito lipofílico dos derivados testados aparenta ter sido um fator significativo em suas atividades, sendo o aumento da lipofilia inversamente proporcional à potência da molécula. Observamos que a melhor atividade foi desempenhada pelo derivado de menor lipofilia, o AMTAC 01 (log P = 4,62), em contraste com o AMTAC 06 (log P = 5,18), derivado de maior lipofilia e maior IC<sub>50</sub> (Figura 19).

**Figura 19** - Diferenças estruturais entre (1) AMTAC 01 e (2) AMTAC 06



Além disso, os efeitos eletrônicos atribuídos aos substituintes de cada derivado podem ter agido de forma antagônica a potência da droga. É possível observar-se no gráfico 1 que os efeitos eletrônicos e lipofílicos desempenhados pelo derivado com melhor atividade, AMTAC 01, são neutros em relação ao substituinte, divergindo do derivado AMTAC 06, molécula com substituinte com maiores efeitos eletrônicos e lipofílicos. Assim como os resultados obtidos para *L. amazonensis*, também são necessários estudos mais abrangentes envolvendo outros

substituintes para obtenção de resultados mais conclusivos. Entretanto, por meio desses resultados preliminares, é possível observar a diferença entre os alvos nas duas espécies de *Leishmania* sp. utilizadas.

Embora não encontrados estudos envolvendo o isolamento de formas de topoisomerase como alvo em *L. amazonensis*, os resultados divergentes de  $IC_{50}$  entre os dois gêneros de *Leishmania* nos sugere diferenças existentes entre ambos os gêneros a nível de alvo farmacológico, o que pode envolver os tipos e concentrações de topoisomerasas.

Adicionalmente, estudos previamente citados indicam a presença e isolamento de formas de topoisomerase II em *L. infantum*. Assim, tendo em vista as diferenças moleculares existentes entre esses alvos em parasitos que possuem cinetoplastos e humanos, podemos realizar um comparativo com os estudos de inibição de topoisomerase II $\alpha$  humana realizados por Gouveia (2016). Segundo o autor, todos os compostos sintetizados da série espiro-acridínica apresentaram atividade inibitória sobre essas enzimas, em especial os derivados AMTAC 06 e AMTAC 07, que desempenharam atividade comparável à droga controle, *m*-AMSA. Dentre esses, uma maior inibição foi atribuída ao derivado AMTAC 06 em virtude dos maiores efeitos eletrônicos e lipofílicos inerentes ao grupamento cloro.

Portanto, os resultados obtidos por Gouveia (2016) foram opostos aos resultados obtidos da ação dos derivados espiro-acridínicos frente a formas promastigotas de *L. infantum*. Esse contraste nos sugere que, sendo as topoisomerasas potenciais alvos para os compostos espiro-acridínicos em *Leishmania*, há de fato uma diferença nos alvos que influência na ação farmacológica das moléculas, resultando numa maior seletividade e/ou maior potência dessas.



## 6 CONCLUSÃO

Foram sintetizados três novos derivados espiro-acridínicos, os quais foram caracterizados físico-quimicamente, estruturalmente e tiveram suas atividades antipromastigotas avaliadas *in vitro*.

Seus rendimentos variaram entre 55,79% e 79,82%, indicando a viabilidade da rota sintética escolhida. A caracterização estrutural desses por meio de IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  auxiliaram na confirmação da estrutura química prevista, em especial os deslocamentos presentes em 69,33 (AMTAC 06) e 69,37 (AMTAC 07) ppm indicativos de ciclização espontânea no C-9 que caracterizam o núcleo espiro-acridínico, identificados por intermédio do RMN  $^{13}\text{C}$ .

Adicionalmente, avaliaram-se as atividades antipromastigota desses compostos frente a duas cepas distintas de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, por metodologias diferentes. A avaliação biológica desses compostos frente *L. amazonensis* forneceu  $\text{IC}_{50}$  entre 0,31 e 0,52  $\mu\text{g/mL}$ , sendo o AMTAC 06 o derivado a apresentar melhor potência devido à prevalência do efeito mesomérico positivo exercido pelo grupamento cloro. Em contraste, a atividade antipromastigota observada em *L. infantum* apresentou  $\text{IC}_{50}$  variando de 2,04 a 6,79  $\mu\text{g/mL}$ , no qual a molécula mais promissora foi o AMTAC 01, derivado não substituído, que, por esse fator, não causa alterações nos parâmetros lipofílicos e eletrônicos da molécula.

Os resultados também são indicativos da viabilidade do alvo topoisomerase pelas diferenças de potência apresentadas pelos compostos em *L. infantum* em relação aos estudos realizados por Gouveia (2016) em topoisomerase  $\text{II}\alpha$  humana, tornando esse um alvo seletivo.

Assim, conclui-se que os derivados espiro-acridínicos são eficazes contra formas promastigotas de duas espécies de *Leishmania* responsáveis por causar manifestações clínicas distintas, sendo necessário estudos mais aprofundados, envolvendo a introdução de novos substituintes, para melhor entendimento do mecanismo de ação desses compostos como estratégia para melhoria da seletividade e potência dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; DA SILVA, L. P. B. G.; AMORIM, C. A. D. C.; DE OLIVEIRA, T. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; DE LIMA, M. C. A.; JÚNIOR, L. B. D. C. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 13023-13042, 2015.
- ALMEIDA, S. M. V. LAFAYETTE, E. A.; SILVA, W. L.; SERAFIM, V. L.; MENEZES, T. M.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; LIMA, M. C. A. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467-475, 2016.
- ANDRADE FILHO, J.D.; GALATI, E.A.B.; FALCÃO, A. *L. Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 481-487, 2007.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and re-emerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, 1269–1281, 2000.
- BAKER, N. M.; RAJAN, R.; MONDRAGÓN, A. Structural studies of type I topoisomerases. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. 693-701, 2009.
- BALANCO, J. M. F. **Mimetismo apoptótico em Leishmania spp.: Papel na interação parasita/hospedeiro**. 2004. 119 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.
- BARREIRO, E. J. A.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 608 p. 2015.
- BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, p. 601-609, 2004.
- BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now?. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 139-167, 2007.

BONSE, S., SANTELLI-ROUVIER, C., BARBE, J., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi trypanothione* reductase by acridines: kinetic studies and structure activity relationships. **J. MedChem.**, v. 42, p. 5448-5454, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BROCCOLI, S. et al. Characterization of a *Leishmania donovani* gene encoding a protein that closely resembles a type IB topoisomerase. **Nucleic Acids Res**, v. 27, p. 2745–2752, 1999.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BRUNTON, L. L.; CHABNET, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012.

CAFFREY, C. R.; STEVERDING, D.; SWENERTON, R. K.; KELLY, B.; WALSH, D.; DEBNATH, A.; ZHOU, Y. M.; DOYLE, P. S.; FAFARMAN, A. T.; ZORN, J. A.; LAND, K. M.; BEAUCHENE, J.; SCHREIBER, K.; MOLL, H.; PONTE-SUCRE, A.; SCHIRMEISTER, T.; SARAVANAMUTHU, A.; FAIRLAMB, A. H.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H.; WEISMAN, J. L.; MAY, B. C. H. Bis-acridines as lead antiparasitic agents: structure-activity analysis of a discrete compound library *in vitro*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2164-2172, 2007.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e calazar. **Ciência e Cultura (SBPC)**, São Paulo, v. 1, p. 34-37, 2003.

CAROLE, D. G. et al. Synthesis and antileishmanial activities of 4, 5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 19, p. 5560-5568, 2005.

CHAKRABORTY, A. K.; MUJUMDER, H. K. An ATP-independent catenating enzyme from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 180, p. 279-285, 1991.

CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, Washington, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature review microbiology**, v.5, p. 873, 2007.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 175-181, 2011.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, J.; LI, M.; CAO, W.; CHEN, J. Synthesis and Characterization of Oxadisilole-Fused 9-Aminoacridines and 12-Aminobenzo[b]acridines. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 4170-4178, 2014.

CHEESMAN, S. J. Topoisomerases of Protozoan Parasites. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, 2000.

CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structure, Molecular Mechanisms, and Evolutionary Relationships in DNA Topoisomerases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, California, v. 33, p. 95-118, 2004.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brazileinsis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DAS, A.; DASGUPTA, A.; SENGUPTA, T.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 8, p.381-387, 2004.

DAS, B. B.; SEN, N.; DASGUPTA, S. B.; GANGULY, A.; DAS, R.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. **Indian J Med Res**, v. 123, p. 221-232, 2006.

DE SOUSA, J. M. A.; LAREAU, S. M.; PEARSON, R. D.; CARVALHO, E. M.; MANN, B. J.; JERONIMO, S. M. B. Characterization of *Leishmania chagasi* DNA Topoisomerase II: a Potencial Chemotherapeutic Target. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 35, p. 826-829, 2003.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

DELMAS, Florence et al. Synthesis and antileishmanial activity of (1, 3-benzothiazol-2-yl) amino-9-(10H)-acridinone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 685-690, 2004.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1703-1724, 2001.

DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing. **Nucleic Acids Research**, Nashville, v.37, n. 3, p. 738-748, 2009.

DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, M. A.; OSHEROFF, N. DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a "knotty" subject. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Tennessee, v. 37, n. 1, p. 2-10, 2009.

DI GIORGIO, C. et al. In vitro activities of 7-substituted 9-chloro and 9-amino-2-methoxyacridines and their bis- and tetra-acridine complexes against *Leishmania infantum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 174-180, 2003.

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

DIMITRI, N. R&D Incentives for Neglected Diseases. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276-276, 2012.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179-200, 2009.

FONTERRE, P.; GRIBALDO, S.; GADELLE, D.; SERRE, M. Origin and Evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**, Paris, v. 89, p. 427-446, 2007.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspective for old drugs. **Molecules**, v. 10, p. 238-245, 2009.

FUERTES, M. A.; PEREZ, J. M.; NGUEWA, P. A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C. Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 5, p. 433-439, 2008.

GAMAGE, S. A.; FIGGITT, D. P.; WOJCIK, S. J.; RALPH, R. K.; RANSIJN, A.; MAUEL, J.; YARDLEY, V.; SNOWDON, D.; CROFT, S. L. DENNY, W. A. Structure-Activity Relationships for the Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of 1'-Substituted 9-Anilinoacridines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 2634-2642, 1997.

GARCIA, L. P.; MAGALHÃES, L. C. G.; ÁUREA, A. P. et al. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Texto para discussão**, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Brasília, 2011.

GIRAULT, S.; GRELLIER, P.; BERECIBAR, A.; MAES, L.; MOURAY, E.; LEMIÈRE, P.; DEBREU, M. A.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C. Antimalarial, Antitrypanosomal, and Antileishmanial Activities and Cytotoxicity of Bis (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the Linker#. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2646-2654, 2000.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A. H.; ARMSTRONG, E. J., ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, v. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, 2004.

GOUVEIA, R. G. **Síntese, caracterização estrutural e avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos derivados espiro-acridínicos**. 2016. 131 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande. 2016.

GOTO, H; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.

HUSSAIN, H.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; GREEN, I. R.; GIBBONS, S. Fuitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 20, p. 10369-10428, 2014.

JORGE, P. M. **Indução de parada no ciclo celular e apoptose pelo ditelureto de difenila: Uma possível relação com inibição de enzimas topoisomerases.** 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

KALIRAJAN, R.; RAFICK, M. H. M.; SANKAR, S.; JUBIE, S. Docking Studies, Synthesis, Characterization and Evaluation of Their Antioxidant and Cytotoxic Activities of Some Novel Isoxazole-Substituted 9-Anilinoacridine Derivatives. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

KAYA, M.; YILDIRIR, Y.; ÇELIK, G. Synthesis, Characterization, and *In Vitro* Antimicrobial and Antifungal Activity of Novel Acridines. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 11, p. 724-728, 2015.

KETRON, A. C.; DENNY, W. A.; GRAVES, D. E.; OSHEROFF, N. Amsacrine as a Topoisomerase II Poison: Importance of Drug-DNA Interactions. **Biochemistry**, v. 51, p. 1730-1739, 2012.

KROGH, R. **Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie *Ipomoea pes-capre* (Convolvulaceae).** 2001. 173 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001.

KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: a versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**. v. 69, n. 1, p. 3-9, 2012.

KUMAR, D.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. *In Vitro* Susceptibility of Field Isolates of *Leishmania donovani* to Miltefosine and Amphotericin B: Correlation with Sodium Antimony Gluconate Susceptibility and Implications for Treatment in Areas of Endemicity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 835-838, 2009.

LEESON, P. Chemical beauty contest. **Nature**, v. 481, p. 455-456, 2012.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS-JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103-110, 2016.

MAUËL, J.; DENNY, W.; GAMAGE, S.; RANSIJN, A.; WOJCIK, S.; FIGGITT, D.; RALPH, R. 9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 991-996, 1993.

MAJUMDER, H. K. **Drug Targets in Kinetoplastid Parasites: Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 625. New York: Springer Science+Business Media and Landes Bioscience, 2008. 174 p.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Q J Med**, v. 107, p. 7–14, 2014.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 2014.

MOLYNEUX, H. D.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987.

MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011. 732 p.

MOURA, R. O. **Síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos, pirimidínicos e piridínicos acridínicos**. 2009. 238 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2009.

NASIM, A.; BRYCHCY, T. Genetic Effects of Acridine Compounds. **Mutation Research**, v. 65, p. 261-288, 1979.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 13. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nature Reviews Cancer**, Tennessee, v. 9, p. 327-337, 2009.

NURSING. **Leishmaniose – Todas as Informações, Causas, Diagnóstico e Tratamentos**. 2017. Disponível em: <<http://www.nursing.com.br/leishmaniose-todas-informacoes>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

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



PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. 1. ed. Tradução da 4<sup>o</sup> edição norte-americana. Cengage Learning, 2010.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. 1, p. 713-732.

POMMIER, Y. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology and Interfacial Inhibition. **Chemical Reviews**, Maryland, v. 109, n. 7, p. 2894-2902, 2009.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology Review**, Bethesda, v. 17, p. 421-433, 2010.

QUINNELL, R. J.; COURNTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and controlo f zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; Tempone, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

READY, P. D. Biology of Phlebotomie Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Rev. Entomol.**, v. 58, p. 227-250, 2013.

REES, D. C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. ABC transportes: the power to change. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 218-227, 2009.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D.. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: The effect of N-and O-substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SANTOS, F. L. A.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, K. E. R.; ROLIM, L. A.; GOMES, T. C. B. L.; FERRAZ, L. R. M.; LIMA, Á. A. N.; SOBRINHO, J.L. S.; ROLIM-NETO, P. J. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 1, p. 37-47, 2012.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Chapter Four-Recent Advances in the Chemistry of Acridines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 115, p. 287-353, 2015.

SINGH, A. K. **Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity**. 1. ed. Elsevier, 2016.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M., HOROBIN, R. W., VILLANUEVA, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 785-796, 2012.

TAVARES, L. C. QSAR: A Abordagem de Hansch. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TEREKHOVA, K.; GUNN, K. H.; MARKO, J. F.; MONDRAGÓN, A. Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. **Nucleic Acids Research**, Evanston, v. 40, n. 20, p. 10432-10440, 2012.

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

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFF, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 2147-2151, 2011.

WERBOVETZ, K. A.; LEHNERT, E. K.; MACDONALD, T. L.; PEARSON, R. D. Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania promastigotes in vitro*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 495-497, 1992.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms in Medicinal Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 3 ed. v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 2008.

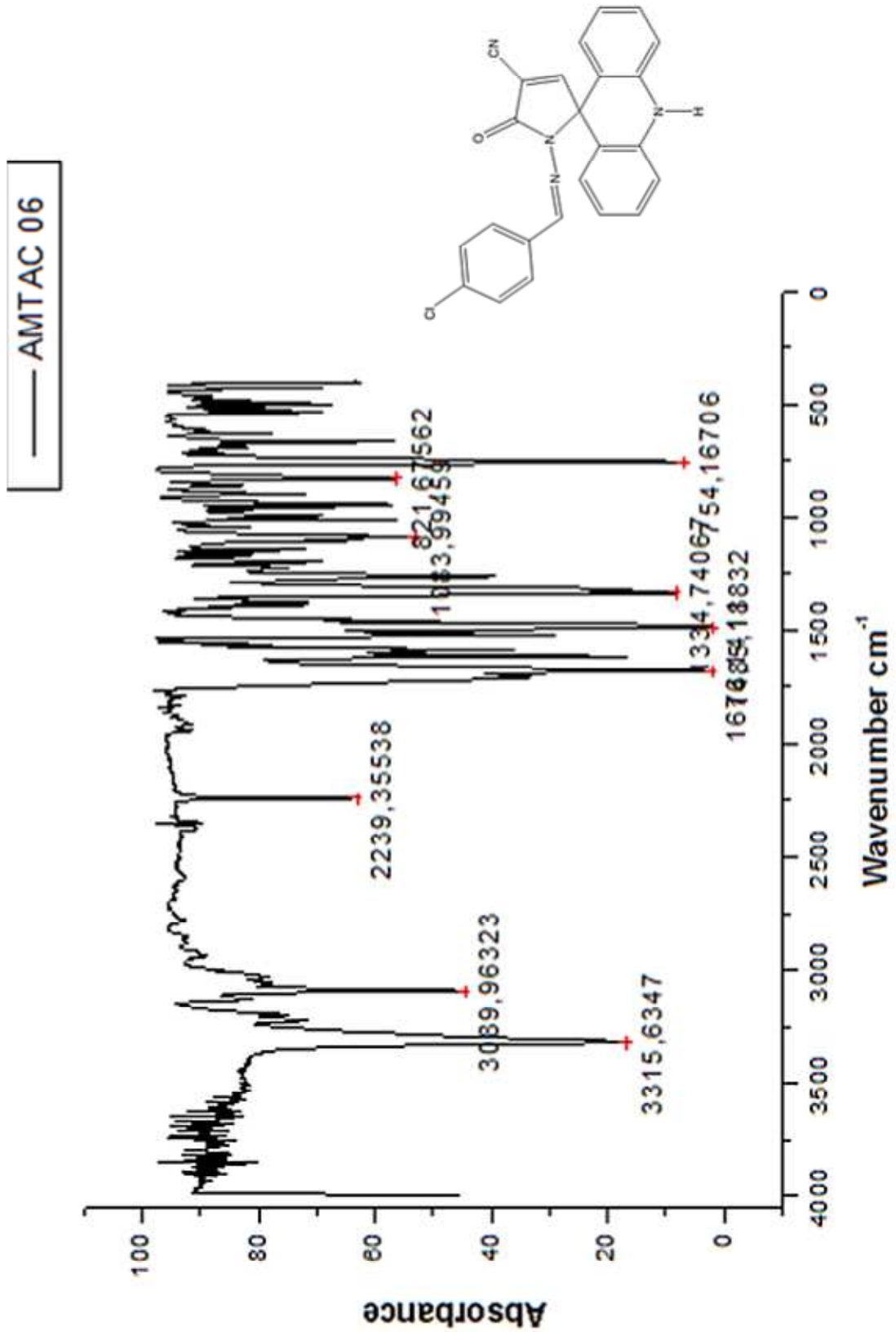
WHO. World Health Organization. 2013. *Leishmaniasis: Burden and distribution*. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> >. Acesso em: 02 de Jul. 2017.

WILSON, R. **Arthropod Vectors Of Human Diseases: Phlebotomine Sand Flies**. 2009. Disponível em: < [http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand\\_fly.html](http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html) >. Acesso em: 20 ago. 2017.

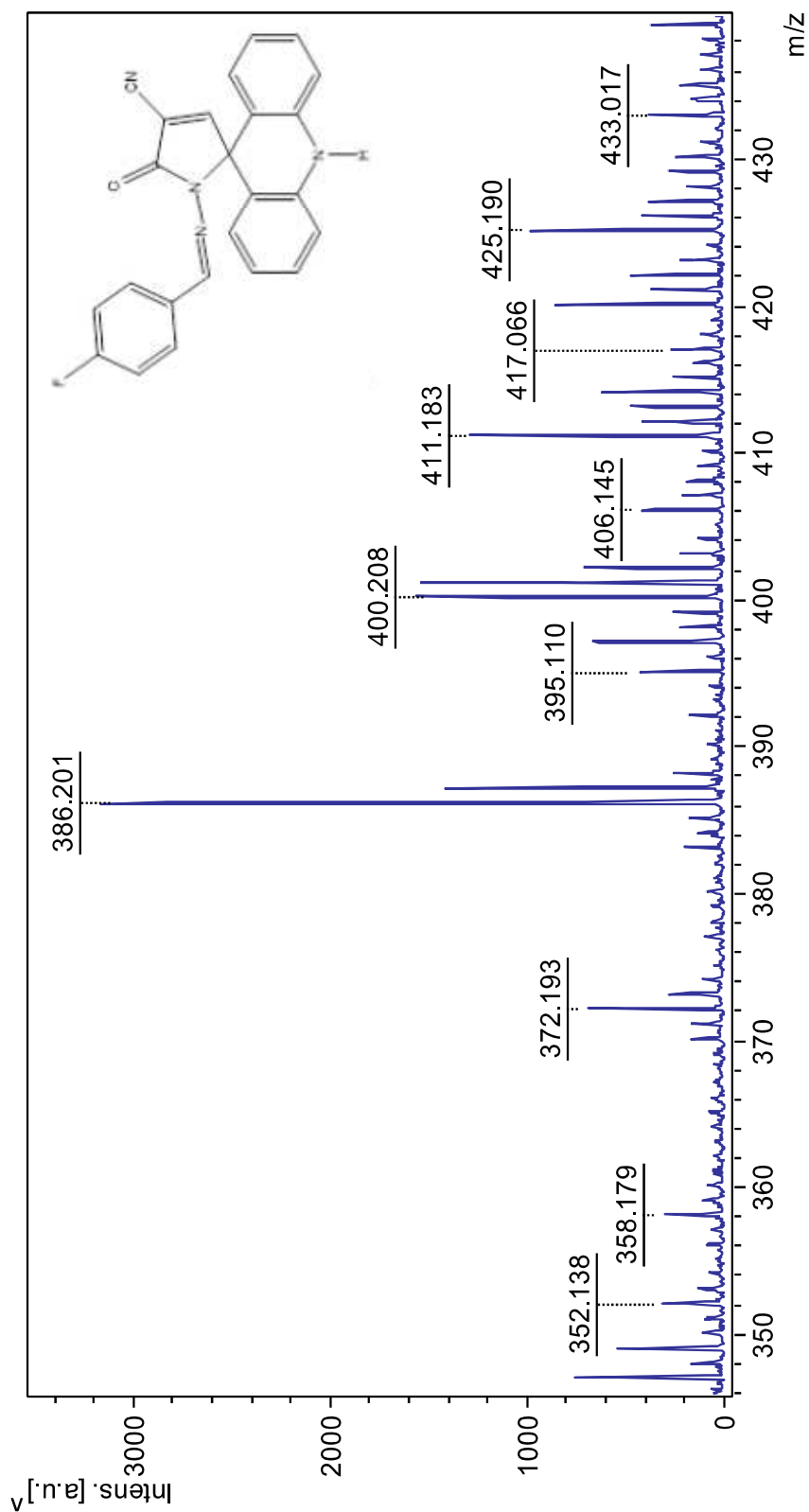
WONG, I. L. K; CHAN, K. F.; ZHAO, Y.; CHAN, T. H.; CHOW, L. M. Quinacrine and a novel apigenin dimer can synergistically increase the pentamidine susceptibility of the protozoan parasite *Leishmania*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, dkp130, 63, p. 1179–1190, 2009.

## APÊNDICES

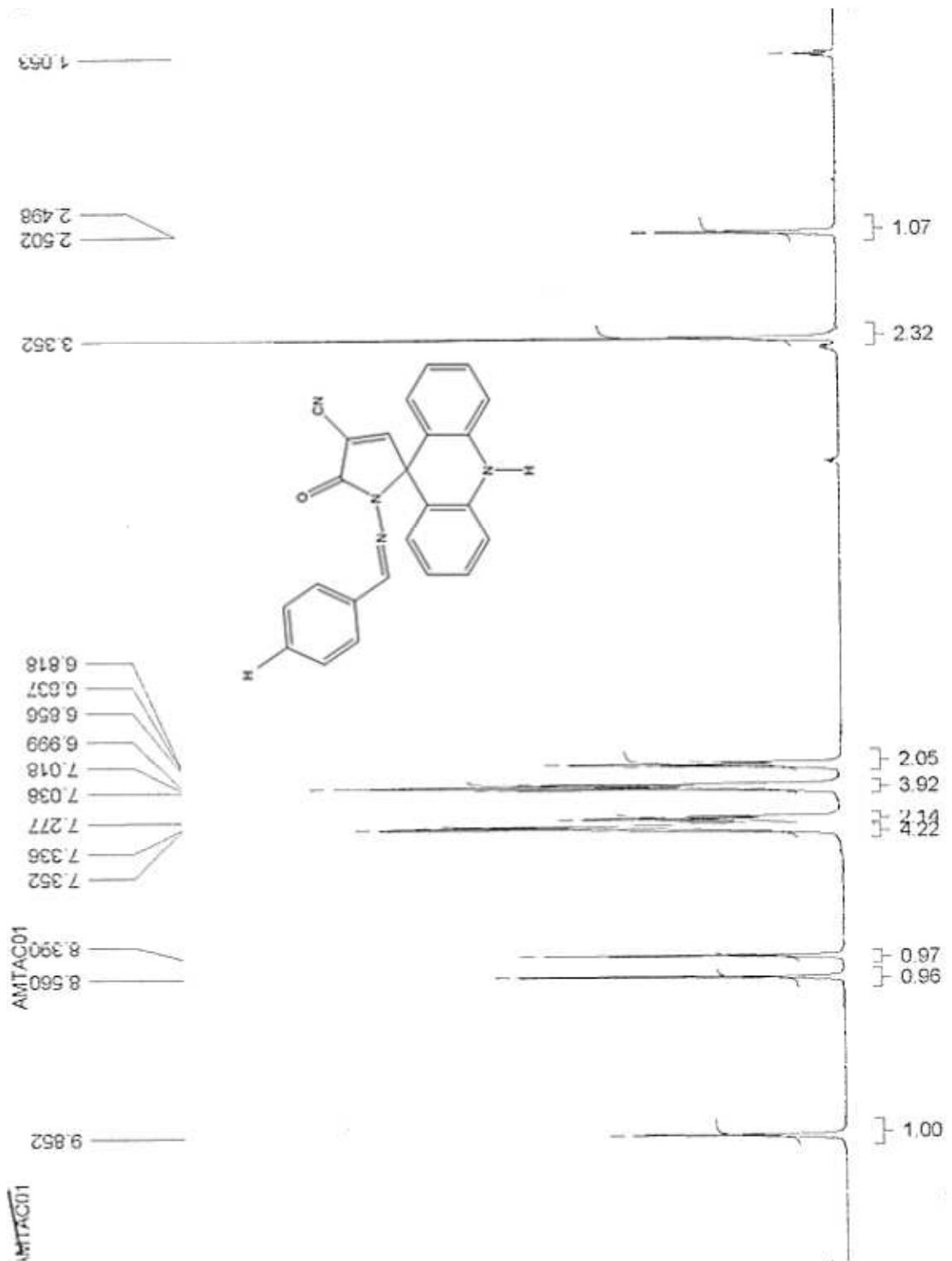
## Apêndice A – Espectro de infravermelho do AMTAC 06

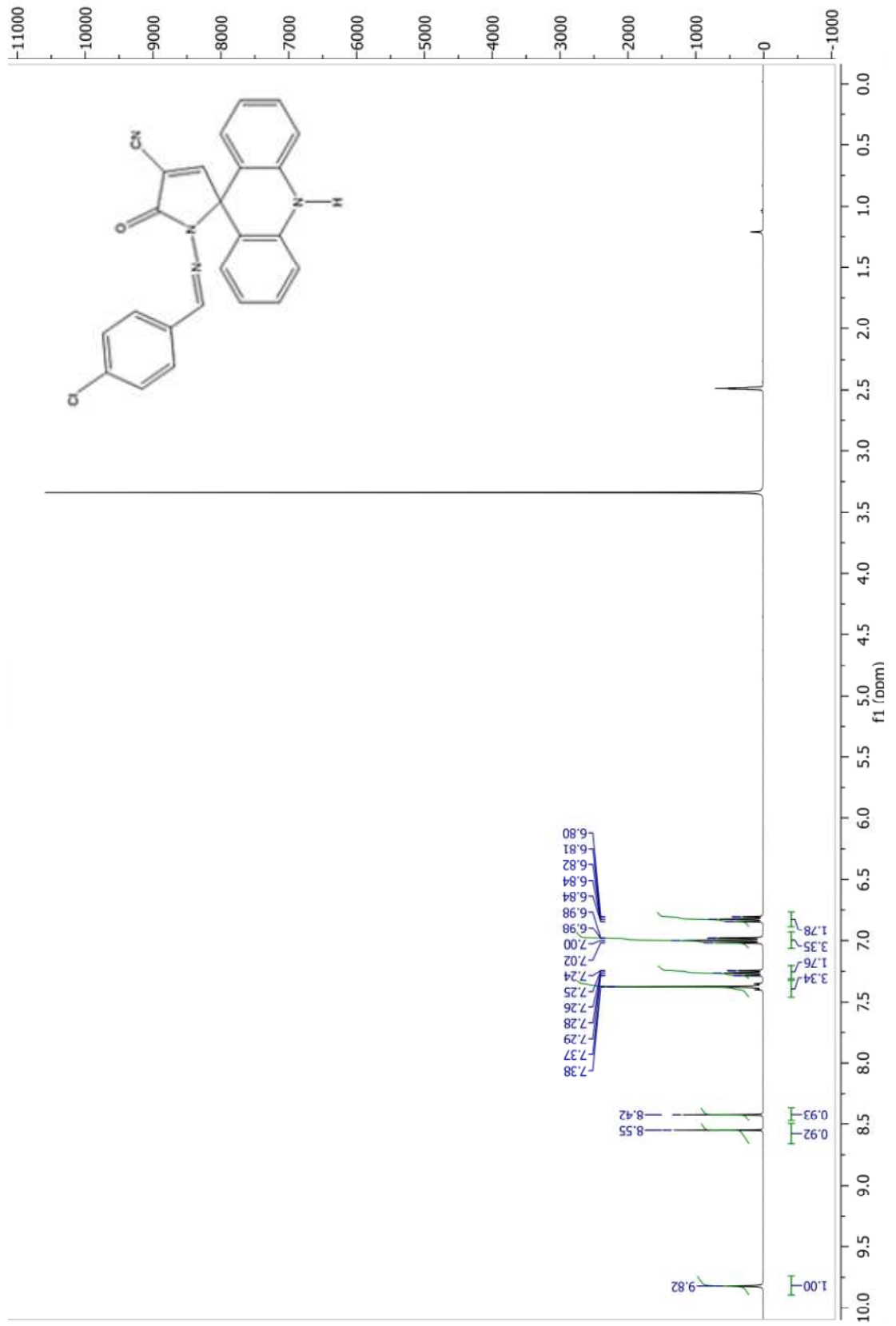


## Apêndice B – Espectro de massas do AMTAC 07



Apêndice C – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do AMTAC 01



Apêndice D – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do AMTAC 06

Apêndice E – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do AMTAC 07