

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**REAÇÕES MULTICOMPONENTES COMO ESTRATÉGIA SINTÉTICA
PARA OBTENÇÃO DE HETEROCICLOS BIOATIVOS**

MARINA BRANDÃO DA FONSECA

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**REAÇÕES MULTICOMPONENTES COMO ESTRATÉGIA SINTÉTICA
PARA OBTENÇÃO DE HETEROCICLOS BIOATIVOS**

MARINA BRANDÃO DA FONSECA

Sob a Orientação do Professor

Dr. Cedric Stephan Garbin

E Coorientação dos Professores

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Profa. Dra. Rosane Nora Castro

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora** em
Química, no Programa de Pós-
Graduação em Química, área de
concentração em Química.

Seropédica, RJ

Novembro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F676r Fonseca, Marina Brandão da, 1995-
Reações multicomponentes como estratégia sintética
para obtenção de heterociclos bioativos / Marina
Brandão da Fonseca. - Seropédica, 2024.
373 f.: il.

Orientador: Cedric Stephan Graebin.
Coorientador: Adriano Defini Andricopulo.
Coorientadora: Rosane Nora Castro.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química,
2024.

1. Química Orgânica. 2. Química medicinal. 3. Reações
multicomponentes. I. Graebin, Cedric Stephan, 1981-,
orient. II. Andricopulo, Adriano Defini, 1971-,
coorient. III. Castro, Rosane Nora, 1965-, coorient.
IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Química. V. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARINA BRANDÃO DA FONSECA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 14/11/2024

Documento assinado digitalmente
 **CEDRIC STEPHAN GRAEBIN**
Data: 07/01/2025 10:42:09-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Cedric Stephan Graebin Dr. UFRRJ (Orientador)

Documento assinado digitalmente
 **CLAUDIO EDUARDO RODRIGUES DOS SANTOS**
Data: 26/12/2024 13:15:27-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Claudio Eduardo Rodrigues dos Santos Dr. UFRRJ

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO HILLMANN WANDERLIND**
Data: 19/11/2024 18:19:37-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Eduardo Hillmann Wanderlind Dr. UFRRJ

Documento assinado digitalmente
 **ROBERTA KATLEN FUSCO MARRA**
Data: 22/12/2024 14:48:07-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Roberta Katlen Fusco Marra Dr^a. UFRJ

Documento assinado digitalmente
 **SABRINA BAPTISTA FERREIRA**
Data: 30/11/2024 14:16:16-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Sabrina Baptista Ferreira Dr^a. UFRJ

*À Deus pelo sustento e amor, à
minha família pelo apoio
incondicional e à minha avó Nadyr
por me guiar sempre.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi iniciado e após uma semana foi paralisado devido a pandemia de COVID-19. Uma paralisação que eu esperava durar 1 mês, se tornou 1 ano e 10 meses sem poder entrar no laboratório, e mesmo depois de muito tempo de medo e insegurança, o trabalho foi iniciado e concluído, portanto, primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado o sustento e a força necessários, me fortalecendo mesmo nos piores dias.

À minha família, em especial à minha mãe Lúcia, por sempre me apoiar e nunca me desamparar. Mesmo nos piores momentos sempre me apoiou e nunca me deixou só. A toda a família Brandão, por serem parte do que eu sou e, especialmente, ao Theo e à Helena, por serem um sopro de alegria na nossa família, me dando forças para continuar.

Ao meu orientador Cedric Graebin pelos anos de orientação. Ao meu coorientador Adriano Andricopulo pelos anos de colaboração. À minha coorientadora Rosane Nora, por ter me aceitado como aluna e por ter sido meu suporte nos momentos mais críticos. Aos professores Arthur Kümmerle e Marco Edilson Freire, por estarem sempre dispostos a me ajudar, ouvir e orientar. A todos os professores e técnicos do PPGQ-UFRJ, por terem sido sempre solícitos comigo durante tantos anos.

A todos os atuais e antigos membros do LaDMol-QM, pela amizade, risadas, choros e momentos difíceis, por se tornarem minha segunda família. Aos meus ICs, especialmente ao Marcos e ao Luiz, por se tornarem meus amigos e sempre me auxiliarem. Aos meus amigos de jornada Nathália, Larissa e Lucas, por dividirem comigo as alegrias e tristezas e, por diversas vezes, terem me mantido de pé.

Ao Afonso Santini, por realizar os testes para Chagas e sempre se mostrar aberto a colaborações. Ao Matheus Souza, por realizar os testes para câncer. À professora Ana Martinez, pelos ensaios para Alzheimer.

Aos meus amigos, os que fiz ao longo do caminho e os que carrego comigo por toda a vida, sobretudo à Vanessa e ao Hudson, que, mesmo distantes fisicamente, sempre me apoiaram. À Ketolly e ao Gabriel, por terem aparecido na minha vida no momento mais mágico da minha jornada e se tornarem parte da minha base. Ao João, pelos anos de apoio, carinho e paciência, e por ser um dos meus maiores incentivadores. A toda a família Cancela, por terem sido minha segunda família durante vários anos.

A todos que me receberam na *University of Dundee*, por terem me apresentado uma nova realidade e por serem tão pacientes comigo, especialmente à Kate, por ser uma *team leader* maravilhosa, na qual sempre vou me inspirar. À Priscila, ao David e ao Dina, pelo apoio, me ensinando e me dando suporte para aprimorar meus conhecimentos. Ao Yaroslav, pela amizade, tanto em Dundee quanto à distância, e por todo apoio e carinho.

Ao meu namorado Krenar, por me mostrar um mundo completamente novo, cheio de amor, carinho e cuidado. Por me apoiar e me dar forças nessa jornada, sempre confiando em mim e na minha capacidade, e por me fazer sonhar com um futuro melhor.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, seja de forma pessoal ou profissional.

Aos órgãos de fomento pela viabilização desse trabalho (CAPES, CNPq, FAPERJ e FAPESP). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

DA FONSECA, Marina Brandão. **REAÇÕES MULTICOMPONENTES COMO ESTRATÉGIA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DE HETEROCICLOS BIOATIVOS.** 2024. 373 p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Reações multicomponentes (RMCs) são um conjunto de reações químicas que têm como conceito geral a obtenção de um único produto final, com alto grau de diversidade química, partindo de três ou mais reagentes. Diversas reações multicomponentes são conhecidas e dentre as principais tem-se a de Hantzsch e de Biginelli. A reação de Hantzsch foi desenvolvida originalmente para a síntese de diidropiridinas, entretanto, após modificações, elas também passaram a ser utilizadas para a síntese de acridinonas. A reação de Biginelli originalmente descreve a síntese de diidropirimidinonas, porém, com a mudança de reagentes, ela também pode ser realizada para a síntese de quinazolinonas. O presente trabalho mostra o uso das duas reações multicomponente para a síntese de uma diversificada gama de heterociclos. Ao todo, dezessete acridinonas e sete acridinodionas foram sintetizadas através da metodologia modificada da reação de Hantzsch, utilizando diversos reagentes (demonstrando a versatilidade da reação) sendo oito delas inéditas na literatura e seis somente relatadas na literatura em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. A reação de Biginelli foi empregada na síntese de onze quinazolinonas, sendo duas inéditas na literatura, e quatro xantenodionas, confirmadas como subproduto da reação de Biginelli. Quinze acridinonas foram avaliadas frente a alvos relacionados a doença de Alzheimer (colinesterases e atividade antioxidante), sendo que doze possuem inibição frente a AChE na faixa de 4-10 μM ; oito possuem atividades inibitórias na faixa de 0-5 μM para BChE; e apenas duas acridinonas apresentaram perfis de atividade antioxidante menores que o padrão Trolox®, enquanto a permeabilidade em barreira hematoencefálica foi satisfatória para oito acridinonas. As quinazolinonas foram avaliadas quanto a seu potencial citotóxico e a atividade tripanocida. Os resultados indicaram uma atividade tripanocida promissora para as quatro moléculas que contém o grupo 4-bromofenil, enquanto a atividade citotóxica não foi satisfatória. Sete acridinodionas e duas acridinonas foram avaliadas por métodos *in silico* quanto as suas potencial interação com a Tubulina, os resultados permitiram mapear as interações que ocorrem quando se utiliza a lausona como reagente da reação, além de demonstrar a modificação de posicionamento no sítio da Colchicina ao aumentar o tamanho da acridinonas. Contudo, o conjunto de resultados mostraram-se promissores do ponto de vista da química exploratória, obtendo-se trinta e nove moléculas através de reações multicomponentes. O uso de reações multicomponentes se mostrou um método rápido, efetivo e versátil como estratégia de síntese para novas moléculas bioativas, colaborando para trabalhos futuros.

Palavras chaves: Acridinonas; Quinazolinonas; Xantenodionas; Acridinodionas.

ABSTRACT

DA FONSECA, Marina Brandão. **MULTICOMPONENT REACTIONS AS A SYNTHETIC STRATEGY FOR THE OBTENTION OF BIOACTIVE HETEROCYCLES**. 2024. 373 p. Thesis (Doctorate in Chemistry). Chemistry Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Multicomponent reactions (MCRs) are a group of chemical reactions whose general concept involves obtaining a single final product, with a high degree of chemical diversity, starting from three or more reagents. Several multicomponent reactions are well-known, with the Hantzsch and Biginelli reactions being among the most prominent. The Hantzsch reaction was originally developed for the synthesis of dihydropyridines; however, after modifications, it has also been used for the synthesis of acridinones. The Biginelli reaction initially described the synthesis of dihydropyrimidinones, but with changes in the reagents, it can also be employed for the synthesis of quinazolinones. This study demonstrates the use of both multicomponent reactions for the synthesis of a diverse range of heterocycles. In total, seventeen acridinones and seven acridinediones were synthesized through a modified Hantzsch reaction methodology, using various reagents (highlighting the versatility of the reaction). Among these, eight acridinones were novel and six were previously reported only in studies from the research group. The Biginelli reaction was used to synthesize eleven quinazolinones, two of which were novel, and four xanthenediones, confirmed as byproducts of the Biginelli reaction. Fifteen acridinones were evaluated against targets related to Alzheimer's disease (cholinesterases and antioxidant activity). Twelve showed acetylcholinesterase (AChE) inhibition in the range of 4–10 μM ; eight exhibited butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity in the range of 0–5 μM ; and only two acridinones displayed antioxidant activity lower than the standard Trolox®, while eight acridinones demonstrated satisfactory blood-brain barrier permeability. The quinazolinones were assessed for their cytotoxic potential and trypanocidal activity. The results indicated promising trypanocidal activity for four molecules containing the 4-bromophenyl group, although their cytotoxic activity was not satisfactory. Seven acridinediones and two acridinones were evaluated *in silico* for their potential interaction with tubulin. The results mapped the interactions occurring when lawsone was used as a reagent, in addition to demonstrating changes in the binding position within the colchicine site as the acridinone size increased. Overall, the results were promising from an exploratory chemistry perspective, yielding thirty-nine molecules through multicomponent reactions. The use of multicomponent reactions proved to be a rapid, effective, and versatile synthetic strategy for new bioactive molecules, contributing to future research endeavors.

Keywords: Acridinones; Quinazolinones; Xanthenediones; Acridinediones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conceito geral das reações multicomponentes, onde GF significa grupo funcional.....	1
Figura 2: Número de publicações com o termo “ <i>multicomponent reaction</i> ” por ano.....	2
Figura 3: Fármacos que podem ser obtidos por RMCs, sendo os destacados com * obtidos em larga escala por RMC.....	3
Figura 4: Produtos modificados de reações de Hantzsch.....	7
Figura 5: Derivados de DHPMs.....	11
Figura 6: Compostos bioativos obtidos por reação de Biginelli.....	14
Figura 7: Número projetado de pessoas na população dos EUA com demência de Alzheimer, 2020 a 2060.....	20
Figura 8: Principais patologia da doença de Alzheimer.....	21
Figura 9: Sistema colinérgico.....	22
Figura 10: Fármacos aprovados para o tratamento de Alzheimer.....	23
Figura 11: Estruturas da Tacrina, acridina, acridinonas, tetrahydroacridinona e tetrahydroacridinona inibidora de Tubulina.....	24
Figura 12: Planejamento estrutural das acridinonas.....	28
Figura 13: Estrutura das acridinonas planejadas.....	29
Figura 14: Espectro de RMN ¹ H 500 MHz (DMSO-d ₆) para molécula 7	34
Figura 15: Espectro de RMN ¹³ C 500 MHz (DMSO-d ₆) para molécula 7	36
Figura 16: Comparação dos sinais referentes a 1,3-ciclohexanodiona.....	37
Figura 17: Espectro de RMN 2D HSQC 500 MHz (DMSO-d ₆) para molécula 9	38
Figura 18: Espectro de RMN ¹³ C 500 MHz (DMSO-d ₆) expandido para molécula 12	39
Figura 19: Expansão do espectro ¹ H RMN para a molécula 12	40
Figura 20: Espectro no IV para molécula 1	41
Figura 21: Reação ocorrida no ensaio de Ellman.....	43
Figura 22: Resíduos de aminoácidos que envolvem a região PAS e CAS nas enzimas acetilcolinesterase (A) e butirilcolinesterase (B).....	50
Figura 23: Comparação das moléculas 5 , 11 e 14 . A) Enantiômeros R das moléculas 5 (ciano), 11 (amarelo) e 14 (laranja). B) Enantiômeros S das moléculas 5 (rosa escuro), 11 (rosa claro) e 14 (lilás).....	52

Figura 24: Comparação das moléculas 1 , 12 e 13 . A) Enantiômeros R das moléculas 1 (rosa), 12 (lilás) e 13 (verde). B) Enantiômeros S das moléculas 1 (verde), 12 (laranja) e 13 (lilás).....	52
Figura 25: Mapa de interação 2D para a molécula 13 . A) Enantiômero R (esquerda) e S (direita) em acetilcolinesterase. B) Enantiômero R (esquerda) e S (direita) em butirilcolinesterase.....	53
Figura 26: Projeção do número de casos e mortalidade de câncer até 2050 no mundo.....	88
Figura 27: Atuais tratamentos para a doença de Chagas e quinazolinonas propostas por Harrison e Bollini com atividade anti-chagásica.....	89
Figura 28: Ciclo de vida do parasita.....	90
Figura 29: Estruturas do Monastrol e seus análogos.....	91
Figura 30: Planejamento estrutural das quinazolinonas.....	92
Figura 31: Quinazolinonas propostas.....	94
Figura 32: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 21	96
Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 21	97
Figura 34: Espectro de IV para molécula 21	99
Figura 35: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (CDCl_3) para molécula 29	101
Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (CDCl_3) para molécula 29	102
Figura 37: Comparação dos espectros de infravermelho das moléculas 21 (A) e 19 (B).....	104
Figura 38: Competição dos mecanismos de Biginelli e Hantzsch.....	105
Figura 39: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 17.2	108
Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 17.2	109
Figura 41: Reações envolvidas nos ensaios de citotoxicidade frente a formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> (A) e frente a células LLC-MK2 (B).....	111
Figura 42: Sítios de ligação da Tubulina, sendo os destacados em vermelhos os estabilizantes e em preto os desestabilizantes (A); mecanismo de polimerização (B); mecanismo das moléculas que interagem no sítio da Colchicina (C).....	142
Figura 43: Compostos citotóxicos devido a modulação da Tubulina através do sítio da Colchicina.....	143
Figura 44: Estrutura das moléculas obtidas anteriormente.....	144
Figura 45: Tautômeros da Lausona.....	147
Figura 46: Planejamento estrutural das acridionodionas.....	148
Figura 47: Planejamento estrutural para síntese das acridinonas.....	149
Figura 48: Estrutura das acridinodionas planejadas.....	152

Figura 49: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 44	153
Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 44	155
Figura 51: Diferença dos anéis pretendidos e obtidos.....	156
Figura 52: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 39	157
Figura 53: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 43	159
Figura 54: Ciclo catalítico proposto para a reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura.....	162
Figura 55: Ciclo catalítico proposto para a reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig.....	164
Figura 56: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) do intermediário 49	165
Figura 57: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) do intermediário 49	166
Figura 58: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 48	169
Figura 59: Estrutura da Podofilotoxina e seu análogo, NV4.....	170
Figura 60: Melhores poses para a acridinodiona 40 R (azul) e S (laranja) com o grupo trimetoxifenil fixado e o anel acridinodiona invertidos.....	171
Figura 61: Interações do anel naftaleno-1,4-diona para a molécula 41 no enantiômero R (à esquerda) e no enantiômero S (à direita)	172
Figura 62: Posicionamento da acridinona 47 (rosa) em comparação com a LDQMC-014 (verde), sendo os enantiômeros R à esquerda e os S à direita.....	173
Figura 63: Mapa de interação para os enantiômeros R (à esquerda) e S (à direita) da molécula 49	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento das reações.....	30
Tabela 2: Resultados de inibição, LE e LLE para as acridinonas frente a acetil e butirilcolinesterase.....	44
Tabela 3: Resultados da atividade antioxidante das acridinonas.....	55
Tabela 4: Resultados do ensaio de penetração no sistema nervoso central.....	57
Tabela 5: Resultados da avaliação da atividade anti-chagásica das quinazolinonas.....	111
Tabela 6: Resultados da avaliação da atividade antiproliferativa das quinazolinonas.....	115
Tabela 7: Resultados obtidos em trabalhos anteriores.....	144
Tabela 8: Acridinodionas sintetizadas.....	160
Tabela 9: Deslocamento químicos para os intermediários 47 e 48	163
Tabela 10: Deslocamento químicos para os produtos 47 e 49	167
Tabela 11: <i>Scores</i> das acridinodionas.....	172
Tabela 12: <i>Scores</i> das acridinonas 47 e 49	174

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquemas das Reações Multicomponentes.....	5
Esquema 2: Esquema geral de reações de Hantzsch.....	6
Esquema 3: Proposta de mecanismo para reações clássicas de Hantzsch.....	8
Esquema 4: Reação de Hantzsch realizada por Tratat e colaboradores.....	9
Esquema 5: Esquema de intermediários simplificado proposto por Tratat e colaboradores.....	9
Esquema 6: Esquema geral da reação de Biginelli.....	10
Esquema 7: Esquema geral de obtenção de Tetrahidropirimidinonas de acordo com Folkers e Johnson.....	12
Esquema 8: Mecanismos propostos por Sweet e Fissekis (A) e Kappe (B).....	13
Esquema 9: Esquema de reação para as acridinonas.....	28
Esquema 10: Esquema de intermediários geral proposto para a síntese das acridinonas.....	32
Esquema 11: Esquema geral de obtenção das quinazolinonas.....	93
Esquema 12: Proposta de esquema de intermediários para as quinazolinonas.....	104
Esquema 13: Vias de competição das reações realizadas.....	106
Esquema 14: Esquema de intermediários para obtenção da xantenodionas.....	107
Esquema 15: Esquema das reações de Hantzsch clássica (A), Hantzsch modificada (B), Suzuki-Miyaura (C) e Buchwald-Hartwig (D). Fonte: Elaborada pela autora.....	146
Esquema 16: Esquema de reação para as acridinodionas.....	151
Esquema 17: Esquema de intermediários proposto para as acridinodionas.....	158
Esquema 18: Esquema de síntese dos intermediários através da reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura (A) e de Buchwald-Hartwig (B).....	161
Esquema 19: Esquema de reação para as acridinonas.....	166

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	– Dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano
ACh	– Acetilcolina
AChE	– Acetilcolinesterase
ACR	– Acridinona
BBB	– <i>Blood brain barrier</i>
BChE	– Butirilcolinesterase
CAS	– Tríade catalítica
CCD	– Cromatografia de camada delgada
CDC	– <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
ChEs	– Enzimas Colinesterase
CHILogD	– LogD calculado
CI ₅₀	– Concentração Inibitória média
clogP	– LogP calculado
cm	– Centímetro
DA	– Doença de Alzheimer
DEPT-Q	– <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DHP	– Diidropiridina
DHPM	– Diidropirimidinonas
DMSO-d ₆	– Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DTNB	– 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
Eg5	– Proteína motora cinesina-5
EtOH	– Etanol
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
HMG-CoA	– 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
HSQC	– <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
iAChE	– Inibidores de acetilcolinesterase
IV	– Infravermelho

IQM-CSIC – Instituto de Química Medicinal do Conselho Superior de Investigações Científicas

LaDMol-QM – Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal

LE – Eficiência do ligante

LLE – Eficiência do ligante lipofílico

LogD – Coeficiente de distribuição

LogP – Coeficiente de partição octanol/água

ORAC – Capacidade de Absorção de Radicais Livres de Oxigênio

PAMPA – Ensaio de permeabilidade em membrana artificial

PAS – Região aniônica periférica

Pe – Permeabilidade

ppm – Parte por milhão

PSA – Área de superfície polar

QNZ – Quinazolinona

RH – Reação de Hantzsch

RMC – Reações multicomponentes

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – *Root mean square deviation*

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

TMS - Tetrametilsilano

TNB – Ácido 2-nitro-4-tiobenzóico

tPSA – Área de superfície polar

UV – Ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

1D – 1 Dimensão

2D – 2 Dimensão

Å – Angstrom

Δ – Deslocamento químico

μM – Micromolar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Reações Multicomponentes.....	1
1.1.1. Reação de Hantzsch.....	5
1.1.2. Reação de Biginelli.....	10
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE TETRAHIDROACRIDINONAS OBTIDAS POR REAÇÃO MULTICOMPONENTE DE HANTZSCH.....	16
Resumo.....	17
Abstract	18
1. Introdução.....	19
1.1. Demência e doença de Alzheimer.....	19
1.2. Acridinonas	24
1.3. Ferramentas computacionais e métricas úteis no desenvolvimentos de fármacos.....	25
1.4. Justificativa.....	26
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Resultados e Discussão.....	27
3.1. Síntese e caracterização das acridinonas.....	27
3.2. Avaliação anticolinesterase.....	43
3.3. Avaliação <i>in silico</i> das Acridinonas.....	48
3.4. Ensaio ORAC – perfil antioxidante.....	54
3.5. Ensaio PAMPA – perfil de penetração no sistema nervoso central.....	55
4. Materiais e Métodos.....	59
4.1. Síntese das Acridinonas.....	59
4.1.1. Protocolo 1.....	59
4.1.2. Protocolo 2.....	60
4.1.3. Caracterização das moléculas.....	60
4.2. Ensaio biológicos.....	71
4.2.1. Ensaio de inibição da acetilcolinesterase – AChE.....	71
4.2.2. Ensaio de inibição da butirilcolinesterase – BChE.....	71
4.2.3. Cálculo de LE e LEE.....	72
4.2.4. Obtenção dos valores de tPSA.....	72
4.2.5. Ancoramento molecular.....	72
4.2.6. Ensaio de atividade antioxidante.....	73
4.2.7. Ensaio de penetração no Sistema Nervoso Central (SCN) – barreira hematoencefálica (BBB).....	74
5. Conclusão.....	76
6. Referências Bibliográficas.....	77

CAPÍTULO II - SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE QUINAZOLINONAS OBTIDAS ATRAVÉS DE REAÇÃO MULTICOMPONENTE DE BIGINELLI.....84

Resumo.....	85
Abstract	86
1. Introdução.....	87
1.1. Quinazolinonas.....	87
1.2. Câncer.....	87
1.3. Doença de Chagas.....	88
1.4. Trabalhos prévios do grupo de pesquisa.....	90
1.5. Justificativa.....	91
2. Objetivos	92
2.1. Objetivo geral.....	92
2.2. Objetivos específicos.....	92
3. Resultados e Discussão.....	93
3.1. Síntese e caracterização das moléculas.....	93
3.2. Avaliação da atividade anti-chagásica.....	110
3.3. Avaliação da atividade antiproliferativa.....	114
4. Materiais e Métodos	116
4.1. Síntese das moléculas.....	116
4.1.1. Protocolo 1.....	117
4.1.2. Protocolo 2.....	117
4.1.3. Protocolo 3.....	117
4.2. Caracterização das moléculas.....	118
4.3. Ensaio de atividade anti-chagásica.....	126
4.3.1. Cultivo de células LLC-MK2.....	126
4.3.2. Cultivo de <i>T. Cruzi</i> na forma amastigota.....	126
4.3.3. Solução estoque das misturas.....	127
4.3.4. Atividade tripanocida contra <i>T. cruzi</i>	127
4.3.5. Citotoxicidade frente a células LLC-MK2.....	127
4.3.6. Tratamento estatístico dos dados.....	128
4.4. Ensaio de atividade antiproliferativa.....	128
4.4.1. Linhagens celulares	129
4.4.2. Preparação das soluções dos compostos.....	129
4.4.3. Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	130
5. Conclusão	131
6. Referências Bibliográficas.....	132

CAPÍTULO III - SÍNTESE E AVALIAÇÃO IN SILICO DE HETEROCICLOS OBTIDOS ATRAVÉS DE REAÇÃO MULTICOMPONENTE DE HANTZSCH PLANEJADOS COMO INIBIDORES DE TUBULINA.....138

Resumo.....	139
Abstract	140
1. Introdução.....	141
1.1. Câncer.....	141
1.2. Tubulina	141
1.3. Trabalhos prévios do grupo de pesquisa.....	143

1.4. Reação de Hantzsch.....	145
1.5. Reações de acoplamento.....	145
1.6. Lausona.....	146
1.7. <i>Docking</i> molecular.....	147
1.8. Justificativa.....	147
2. Objetivos	149
2.1. Objetivo geral.....	149
2.2. Objetivos específicos.....	149
3. Resultados e Discussão.....	151
3.1. Síntese e caracterização das moléculas.....	151
3.1.1. Síntese e caracterização das acridinodionas.....	151
3.1.2. Síntese e caracterização das acridinonas.....	160
3.2. Avaliação in silico no sítio da Colchicina da proteína Tubulina.....	169
4. Materiais e Métodos.....	175
4.1. Síntese das moléculas.....	175
4.1.1. Protocolo da síntese das acridinodionas.....	175
4.1.2. Protocolo da reação de Suzuki-Miyaura.....	176
4.1.3. Protocolo da reação de Buchwald-Hartwig.....	176
4.1.4. Protocolo da síntese das acridinonas.....	176
4.1.5. Caracterização dos produtos.....	177
4.2. Ancoramento molecular.....	185
5. Conclusão.....	187
6. Referências Bibliográficas.....	188
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	191
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	192
ANEXOS.....	198
Anexo 1: Espectro de RMN ¹ H da molécula 1 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	199
Anexo 2: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 1 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	200
Anexo 3: Espectro de RMN ¹ H da molécula 2 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	201
Anexo 4: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 2 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	202
Anexo 5: Espectro de RMN ¹ H da molécula 3 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	203
Anexo 6: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 3 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	204
Anexo 7: Espectro de RMN HSQC da molécula 3 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	205
Anexo 8: Espectro de RMN ¹ H da molécula 4 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	206
Anexo 9: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 4 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	207
Anexo 10: Espectro de RMN ¹ H da molécula 5 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	208
Anexo 11: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 5 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	209
Anexo 12: Espectro de RMN ¹ H da molécula 6 em DMSO-d ₆ a 500 MHz.....	210

Anexo 13: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	211
Anexo 14: Espectro de RMN COSY da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	212
Anexo 15: Espectro de RMN HSQC da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	213
Anexo 16: Espectro de RMN HMBC da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	214
Anexo 17: Espectro de massas da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	215
Anexo 18: Espectro de RMN ^1H da molécula 7 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	216
Anexo 19: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 7 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	217
Anexo 20: Espectro de RMN ^1H da molécula 8 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	218
Anexo 21: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 8 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	219
Anexo 22: Espectro de RMN ^1H da molécula 9 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	220
Anexo 23: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 9 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	221
Anexo 24: Espectro de RMN HSQC da molécula 9 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	222
Anexo 25: Espectro de RMN ^1H da molécula 10 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	223
Anexo 26: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 10 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	224
Anexo 27: Espectro de RMN ^1H da molécula 11 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	225
Anexo 28: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 11 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	226
Anexo 29: Espectro de RMN ^1H da molécula 12 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	227
Anexo 30: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 12 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	228
Anexo 31: Espectro de RMN ^1H da molécula 13 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	229
Anexo 32: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 13 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	230
Anexo 33: Espectro de RMN HSQC da molécula 13 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	231
Anexo 34: Espectro de RMN ^1H da molécula 14 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	232
Anexo 35: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 14 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	233
Anexo 36: Espectro de RMN ^1H da molécula 15 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	234
Anexo 37: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 15 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	235
Anexo 38: Espectro de RMN ^1H da molécula 16 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	236
Anexo 39: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 16 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	237
Anexo 40: Espectro de RMN HSQC da molécula 16 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	238
Anexo 41: Espectro de IV das moléculas 1 e 2	239
Anexo 42: Espectro de IV das moléculas 3 e 4	240

Anexo 43: Espectro de IV das moléculas 5 e 6	241
Anexo 44: Espectro de IV das moléculas 7 e 8	242
Anexo 45: Espectro de IV das moléculas 9 e 10	243
Anexo 46: Espectro de IV das moléculas 11 e 13	244
Anexo 47: Espectro de IV das moléculas 14 e 15	245
Anexo 48: Espectro de IV da molécula 16	246
Anexo 49: Moléculas obtidas e caracterizada do capítulo I e atividades relacionadas a cada uma.....	247
Anexo 50: Tabela com as interações principais das acridinonas em acetilcolinesterase.....	252
Anexo 51: Tabela com as interações principais das acridinonas em butirilcolinesterase.....	254
Anexo 52: Espectro de RMN ^1H da molécula 17.1 em CDCl_3 a 500 MHz.....	257
Anexo 53 Espectro de RMN ^{13}C da molécula 17.1 em CDCl_3 126 MHz.....	258
Anexo 54: Espectro de RMN ^1H da molécula 17.2 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	259
Anexo 55: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 17.2 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	260
Anexo 56: Espectro de RMN ^1H da molécula 18 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	261
Anexo 57: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 18 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	262
Anexo 58: Espectro de RMN ^1H da molécula 19 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	263
Anexo 59: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 19 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	264
Anexo 60: Espectro de RMN ^1H da molécula 20 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	265
Anexo 61: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 20 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	266
Anexo 62: Espectro de RMN ^1H da molécula 21 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	267
Anexo 63: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 21 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	268
Anexo 64: Espectro de RMN ^1H da molécula 22 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	269
Anexo 65: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 22 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	270
Anexo 66: Espectro de RMN ^1H da molécula 23 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	271
Anexo 67: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 23 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	272
Anexo 68: Espectro de RMN ^1H da molécula 25 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	273
Anexo 69: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 25 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	274
Anexo 70: Espectro de RMN ^1H da molécula 26 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	275
Anexo 71: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 26 em DMSO-d_6 a 126 MHz.....	276
Anexo 72: Espectro de RMN ^1H da molécula 27 em DMSO-d_6 a 500 MHz.....	277

Anexo 73: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 27 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	278
Anexo 74: Espectro de RMN ^1H da molécula 28 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	279
Anexo 75: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 28 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	280
Anexo 76: Espectro de RMN ^1H da molécula 29 em CDCl_3 a 500 MHz.....	281
Anexo 77: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 29 em CDCl_3 a 126 MHz.....	282
Anexo 78: Espectro de RMN ^1H da molécula 31 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	283
Anexo 79: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 31 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	284
Anexo 80: Espectro de R.MN ^1H da molécula 34 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	285
Anexo 81: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 34 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	286
Anexo 82: Espectro de RMN ^1H da molécula 35 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	287
Anexo 83: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 35 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	288
Anexo 84: Espectro de IV das moléculas 17.1 e 18	289
Anexo 85: Espectro de IV das moléculas 19 e 20	290
Anexo 86: Espectro de IV das moléculas 21 e 22	291
Anexo 87: Espectro de IV das moléculas 23 e 25	292
Anexo 88: Espectro de IV das moléculas 26 e 27	293
Anexo 89: Espectro de IV das moléculas 28 e 29	294
Anexo 90: Espectro de IV das moléculas 31 e 34	295
Anexo 91: Espectro de IV da molécula 35	296
Anexo 92: Moléculas obtidas e caracterizada do capítulo II e atividades relacionadas a cada uma.....	297
Anexo 93: Gráficos de porcentagem de viabilidade em função de diversas concentrações (200, 80, 32 e 12.5 μM) frente a formas amastigotas.....	302
Anexo 94: Gráficos de porcentagem de viabilidade em função de diversas concentrações (200, 80, 32 e 12.5 μM) frente a células LLC-MK2.....	303
Anexo 95: Espectro de RMN ^1H da molécula 37 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	304
Anexo 96: Espectro de RMN ^1H da molécula 38 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	305
Anexo 97: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 38 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	306
Anexo 98: Espectro de RMN HSQC da molécula 38 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	307
Anexo 99: Espectro de RMN ^1H da molécula 39 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	308
Anexo 100: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 39 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	309

Anexo 101: Espectro de RMN HSQC da molécula 39 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	310
Anexo 102: Espectro de RMN ¹ H da molécula 40 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	311
Anexo 103: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 40 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	312
Anexo 104: Espectro de RMN HSQC da molécula 40 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	313
Anexo 105: Espectro de RMN ¹ H da molécula 41 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	314
Anexo 106: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 41 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	315
Anexo 107: Espectro de RMN ¹ H da molécula 42 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	316
Anexo 108: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 42 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	317
Anexo 109: Espectro de RMN ¹ H da molécula 43 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	318
Anexo 110: Espectro de RMN ¹ H da molécula 44 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	319
Anexo 111: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 44 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	320
Anexo 112: Espectro de RMN ¹ H da molécula 45 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	321
Anexo 113: Espectro de RMN ¹ H da molécula 46 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	322
Anexo 114: Espectro de RMN ¹³ C da molécula 46 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	323
Anexo 115: Espectro de RMN HSQC da molécula 46 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	324
Anexo 116: Espectro de RMN ¹ H do intermediário 47 em DMSO-d6 a 400 MHz.....	325
Anexo 117: Espectro de RMN ¹³ C do intermediário 47 em DMSO-d6 a 101 MHz.....	326
Anexo 118: Espectro de RMN HSQC do intermediário 47 em DMSO-d6 a 400 MHz.....	327
Anexo 119: Cromatograma obtido por LC-MS para o intermediário 47	328
Anexo 120: Espectro de RMN ¹ H do intermediário 48 em DMSO-d6 a 400 MHz.....	329
Anexo 121: Espectro de RMN ¹³ C do intermediário 48 em DMSO-d6 a 101 MHz.....	330
Anexo 122: Espectro de RMN HSQC do intermediário 48 em DMSO-d6 a 400 MHz.....	331
Anexo 123: Cromatograma obtido por LC-MS para o intermediário 48	332
Anexo 124: Espectro de RMN ¹ H do intermediário 49 em DMSO-d6 a 400 MHz.....	333
Anexo 125: Espectro de RMN ¹³ C do intermediário 49 em DMSO-d6 a 101 MHz.....	334
Anexo 126: Espectro de RMN HSQC do intermediário 49 em DMSO-d6 a 400 MHz.....	335
Anexo 127: Cromatograma obtido por LC-MS para o intermediário 49	336
Anexo 128: Espectro de RMN ¹ H da molécula final 47 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	337
Anexo 129: Espectro de RMN ¹³ C da molécula final 47 em DMSO-d6 a 126 MHz.....	338
Anexo 130: Espectro de RMN HSQC da molécula final 47 em DMSO-d6 a 500 MHz.....	339

Anexo 131: Espectro de RMN ^1H da molécula final 48 em DMSO- d_6 a 500 MHz.....	340
Anexo 132: Espectro de RMN ^{13}C da molécula final 48 em DMSO- d_6 a 126 MHz.....	341
Anexo 133: Espectro de RMN ^1H da molécula final 49 em DMSO- d_6 a 500 MHz.....	342
Anexo 134: Espectro de RMN ^{13}C da molécula final 49 em DMSO- d_6 a 126 MHz.....	343
Anexo 135: Espectro de RMN HSQC da molécula final 49 em DMSO- d_6 a 500 MHz.....	344
Anexo 136: Tabela com as interações das moléculas do capítulo III e a proteína Tubulina.....	345

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Reações Multicomponentes

Reações multicomponentes (RMCs) são um conjunto de reações químicas que têm como conceito geral a obtenção de um único produto final, com alto grau de diversidade química, a partir de três ou mais reagentes (figura 1). Essas reações ocorrem de maneira *one-pot*, podendo os seus componentes (reagentes) serem adicionados simultaneamente ou em cascata. As RMCs possuem diversas vantagens, dentre elas destacam-se: 1) compatibilidade com uma ampla gama de grupos funcionais; 2) menor número de etapas e purificações, cruciais para uma síntese rápida e extremamente importante durante emergências de saúde pública, além do fato de que menos etapas de purificações geram um menor uso de solventes e reagentes, levando a uma diminuição da quantidade de resíduos, e tornando-se uma maneira mais sustentável de síntese, reduzindo os impactos ambientais, conforme os princípios da química verde; 3) economia atômica, uma vez que a maioria ou todos os átomos presentes nos reagentes são mantidos no produto, também indo de encontro com o conceito de química verde; 4) sustentabilidade química ao minimizar a produção de resíduos; 5) flexibilidade na estratégia sintética (BIGGS-HOUCK; YOUNAI; SHAW, 2010; CIOC; RUIJTER; ORRU, 2014; DÖMLING; WANG; WANG, 2012; ZARGANES-TZITZIKAS; CHANDGUDE; DÖMLING, 2015; HAYASHI, 2021; LANGER, 2024).

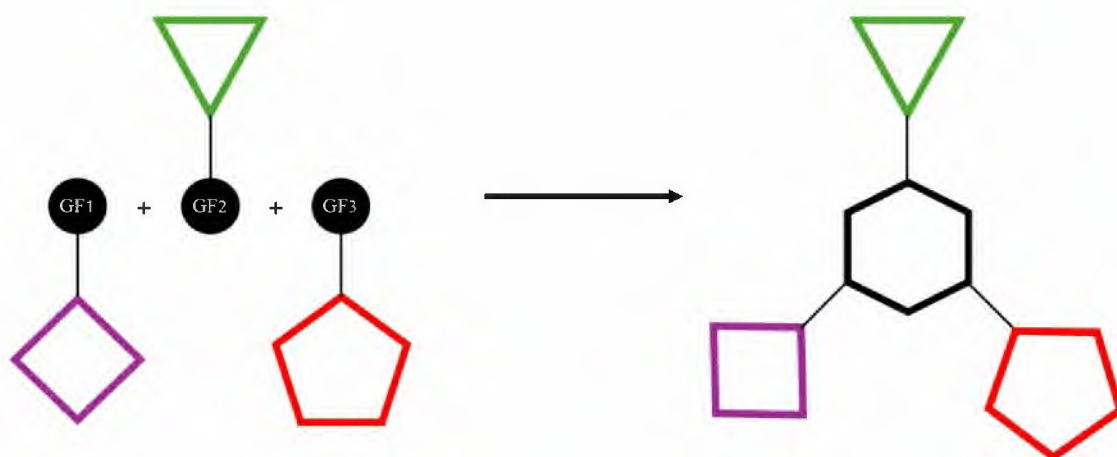


Figura 1: Conceito geral das reações multicomponentes, onde GF significa grupo funcional.

Fonte: ZHU; WANG; WANG, 2014 – modificada.

Devido às vantagens de reações RMCs, essas reações vêm sendo muito utilizadas com o passar dos anos, com uma crescente significativa a partir dos anos 2000 (figura 2). De acordo com a plataforma SCOPUS, a primeira publicação envolvendo o termo “*multicomponent*

reaction” é datada do ano de 1951, desde então, mais de 20700 publicações possuem esse termo em seu título, resumo ou palavras-chave. (SCOPUS, 2024).

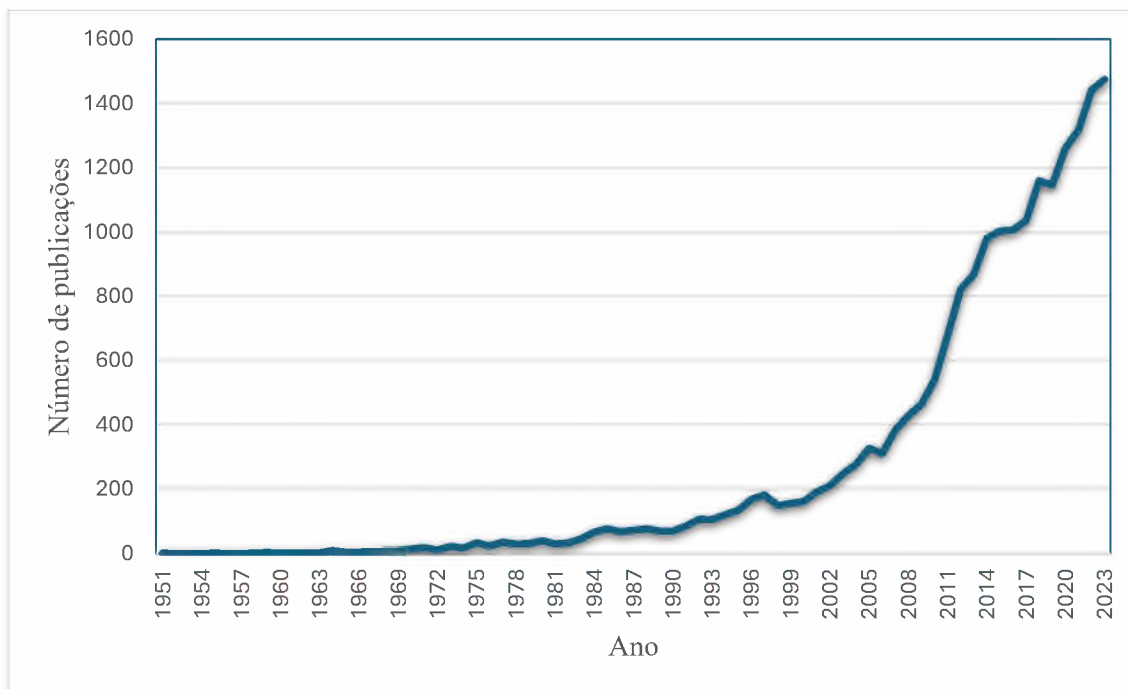


Figura 2: Número de publicações com o termo “*multicomponent reaction*” por ano. Fonte: SCOPUS, 2024 – modificada.

A versatilidade das reações multicomponentes faz com que elas sejam úteis para diversas finalidades, incluindo para: síntese de compostos bioativos (SLOBBE; RUIJTER; ORRU, 2012; ZARGANES-TZITZIKAS; DÖMLING, 2014); síntese de heterociclos (ZELEKE; DAMENA, 2024); síntese de compostos macrocíclicos (FOTOPOULOU; FRAGKIADAKIS; NEOCHORITIS, 2023); síntese de produtos naturais e seus similares (LARGHI et al., 2024; RUIZ-SERRANO; MENÉNDEZ, 2023); aplicação da química de polímeros (KUMAR et al., 2023), entre outras.

Dentro da química medicinal, as RMCs têm uma significativa importância. A rica configuração tridimensional dos produtos gerados, além do menor número de etapas e a efetividade, permitem uma rápida obtenção de bibliotecas de compostos bioativos com alta complexidade, devido a diversidade estrutural e os possíveis centros assimétricos (BUSKES et al., 2023). Metodologias assimétricas, usando ou não catálise (organocatálise ou metais de transição), para produção de produtos enantiosseletivos também foram desenvolvidas, aumentando a aplicabilidade das RMCs na indústria farmacêutica (CARVALHO; AMARANTE; DE CASTRO, 2023; SAKTHIVEL et al., 2023). Todas essas vantagens facilitam a síntese de ingredientes farmacêuticos ativos e o desenvolvimento e otimização de

novos fármacos, reduzindo custos e acelerando a descoberta de terapias inovadoras (BUSKES et al., 2023; CORES et al., 2022).

Alguns fármacos comercializados atualmente podem ser obtidos através de RMCs, cujas algumas estruturas são exemplificadas na figura 3. O primeiro fármaco obtido através de RMCs, foi o Nifedipino, um bloqueador dos canais de cálcio indicado para o tratamento de angina e hipertensão. Uma segunda e terceira geração de diidropiridinas bloqueadores de canais de cálcio foram desenvolvidas, incluído o Besilato de Anlodipino (Norvasc®). Outros fármacos aprovados que podem ser sintetizados via RMCs são: Clopidogrel (Plavix®) - agente antiplaquetário; Praziquantel - anti-helmíntico; Lacosamida - medicamento antiepiléptico; Levetiracetam - medicamento antiepiléptico; Atorvastatina cálcica - Inibidor da HMG-CoA redutase usado para reduzir os níveis de lipídios; Olanzapina - medicamento antipsicótico; entre outros. Apesar de ser possível obter o Anlodipino, o Praziquantel e a Atorvastatina através de RMCs, sua síntese industrial não utiliza essas reações (GRAEBIN et al., 2019).

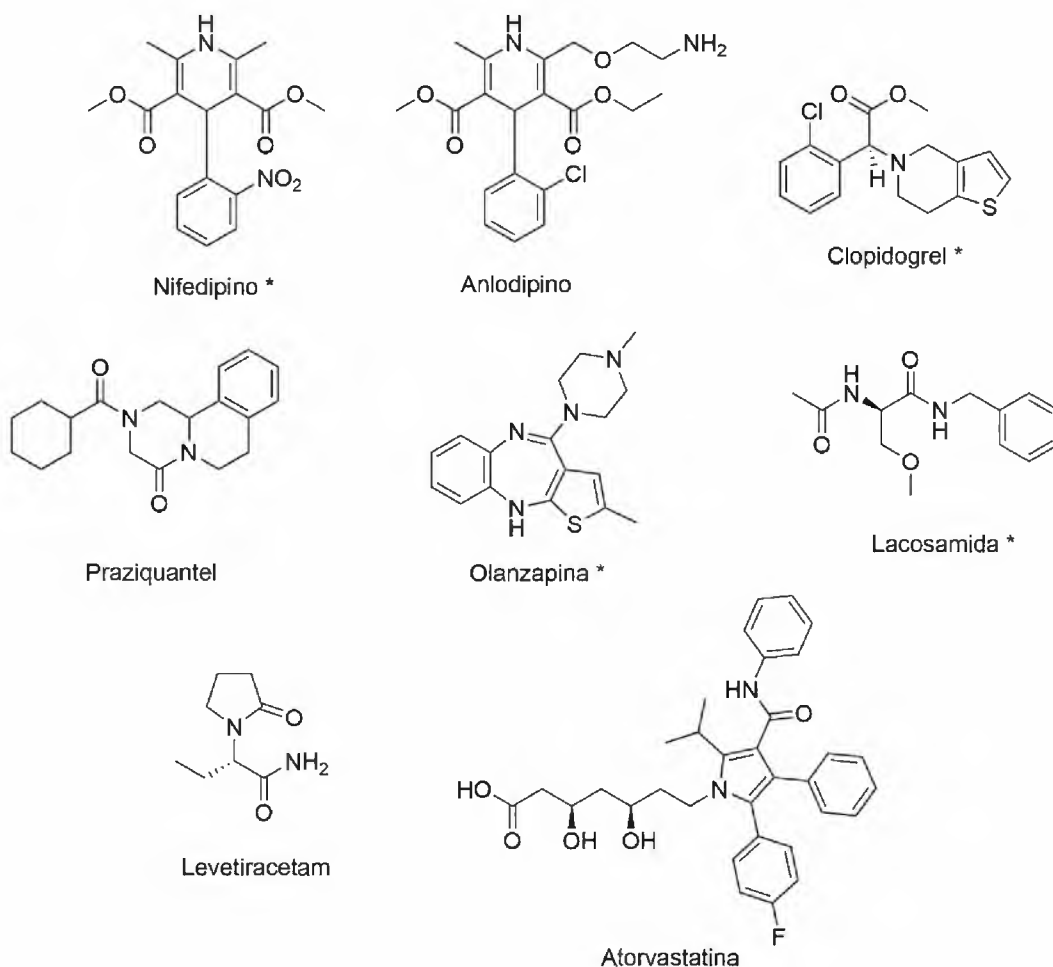


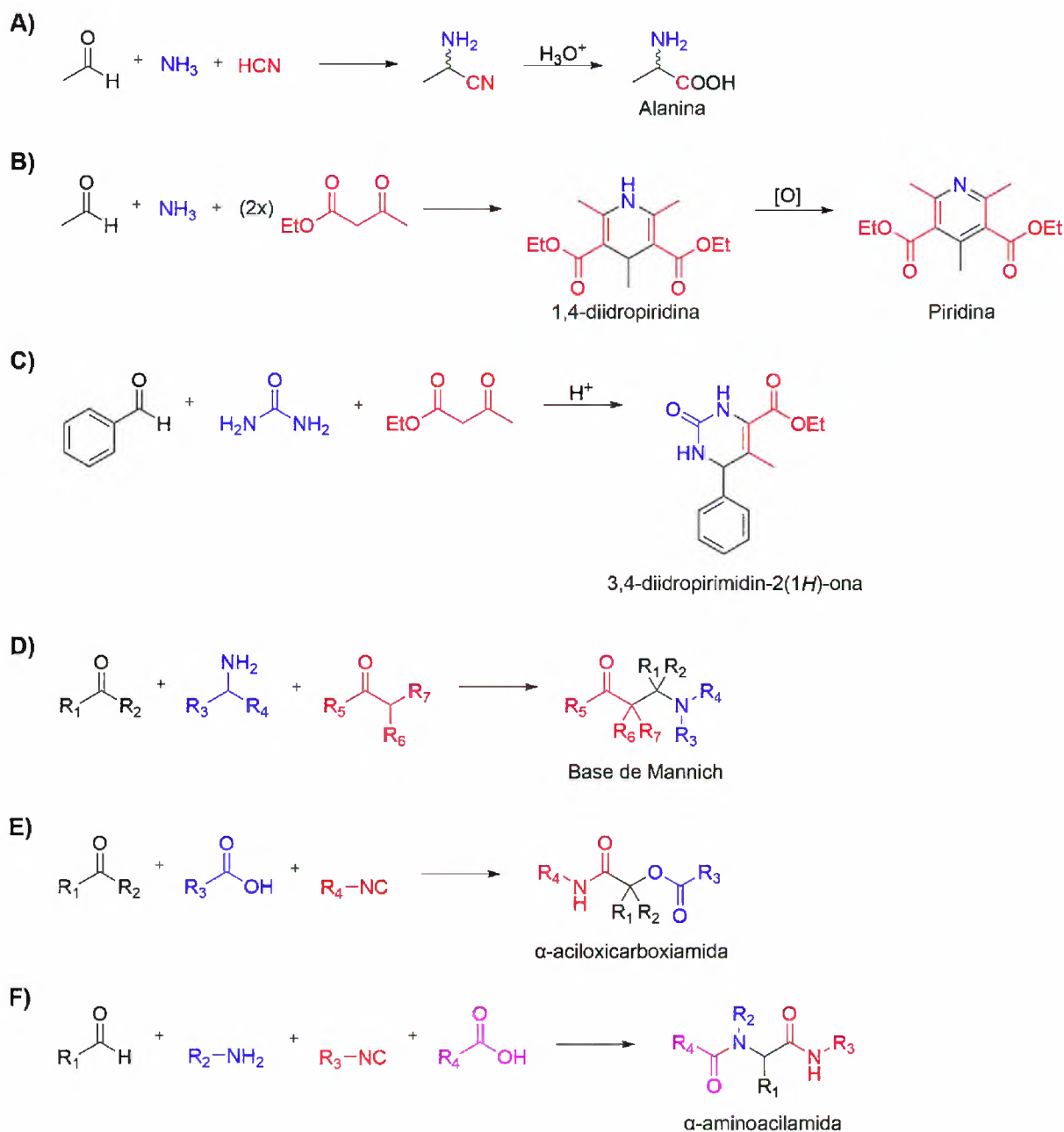
Figura 3: Fármacos que podem ser obtidos por RMCs, sendo os destacados com * obtidos em larga escala por RMC. Fonte: Elaborado pela autora.

Diversas reações multicomponentes já foram descritas, mas algumas destacam-se, dentre elas temos:

- 1) Reação de Strecker (esquema 1A), descrita em 1850. Envolve acetaldeído, amônia e ácido cianídrico gerando uma aminonitrila que posteriormente pode sofrer hidrólise produzindo a alanina (aminoácido).
- 2) Reação de Hantzsch (esquema 1B), descrita em 1882. Envolve a condensação de acetoacetato de etila (2 equivalentes), acetaldeído e amônia para obtenção de uma 1,4-diidropiridina que oxida em contato com o ar gerando uma piridina.
- 3) Reação de Biginelli (esquema 1C), descrita em 1893. Envolve acetoacetato de etila, benzaldeído e ureia para a obtenção de uma 3,4-diidropirimidin-2(1*H*)-ona.
- 4) Reação de Mannich (esquema 1D), descrita em 1917. Envolve um aldeído ou cetona, uma amina primária ou secundária ou amônia e um composto carbonílico não enolizável para a obtenção de uma β -cetoamina alquilada (base de Mannich).
- 5) Reação de Passerini (esquema 1E), descrita em 1921. Envolve um ácido carboxílico, um composto carbonílico e uma isonitrila para a obtenção de uma α -aciloxicarboxiamida.
- 6) Reação de Ugi (esquema 1F), descrita em 1959. Primeira reação tetracomponente, envolve um ácido carboxílico, uma amina, um aldeído e uma isonitrila gerando uma α -aminoacilamida.

Todas essas reações multicomponentes destacadas têm papéis fundamentais dentro da química orgânica e medicinal (ROGERIO et al., 2016; ZHU; WANG; WANG, 2014).

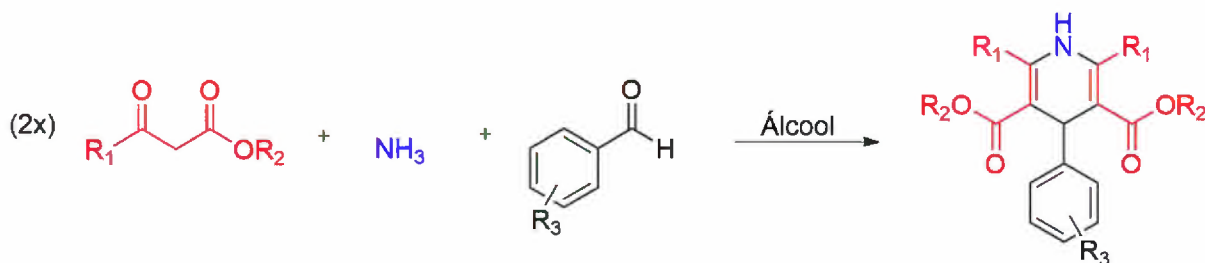
No presente trabalho duas reações multicomponentes foram utilizadas para a obtenção dos compostos, são elas a reação de Hantzsch e a reação de Biginelli. As duas reações terão suas características gerais, particularidades, aplicações e mecanismos expostos nos itens **1.1.1.** e **1.1.2.**



Esquema 1: Esquemas das Reações Multicomponentes. Fonte: ROGERIO et al., 2016 – modificada.

1.1.1. Reação de Hantzsch

Em 1882, Arthur Rudolf Hantzsch, descreveu pela primeira vez a síntese de 1,4-diidropiridinas, cuja síntese original (esquema 1b) reportava a utilização de dois equivalentes de acetoacetato de etila, amônia e acetaldeído, em refluxo de etanol. Entretanto, diversas outras diidropiridinas (DHP) foram reportadas por Hantzsch, tendo como esquema geral a utilização de um β -cetoester, um aldeído e amônia em refluxo de álcool (esquema 2) (HANTZSCH, 1882).



Esquema 2: Esquema geral de reações de Hantzsch. Fonte: Elaborada pela autora.

A reação de Hantzsch (RH) original passou por diversas melhorias e modificações com o passar dos anos. Na literatura é possível encontrar variações da reação original, dentre elas tem-se o uso de catalisadores (ácidos de Lewis, bases, biocatalisadores, organocatalisadores e líquidos iônicos); aquecimento convencional ou irradiação de micro-ondas; uso de diversos solventes ou a ausência de solvente (*green conditions*); síntese enantiosseletivas através do uso de catálise quiral; além de modificações nos componentes da reação (ABDELLA et al., 2020; ANTONYRAJ; KANNAN, 2008; BAGHBANIAN et al., 2010; FAIZAN et al., 2023; GRAEBIN et al., 2019; LEE, 2005; PAJUSTE et al., 2011; PALAKSHI REDDY; RAJESH; VIJAYAKUMAR, 2015; RAFIEE et al., 2009; SHEN et al., 2010; WANG et al., 2011).

Originalmente, a RH possui dois equivalentes do composto β -dicarbonilado sendo utilizado para a obtenção de uma DHP simétrica. Contudo, ao buscar-se obter compostos assimétricos variados, uma série de metodologias, utilizando dois diferentes β -dicarbonilados ou uma amina e um β -dicarbonilado, foram relatadas, obtendo-se assim DHPs assimétricas e heterociclos diversos (figura 4) (GRAEBIN et al., 2019; SAINI, 2008; SAUSINS; DUBURS, 1992; WAN; LIU, 2012).

As DHPs possuem diversas propriedades biológicas, como atividade antitumoral, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antituberculose, antibacteriana, entre outras. Entretanto, o maior destaque é para a atividade anti-hipertensiva das mesmas devido a sua capacidade de serem antagonistas dos canais de cálcio. Os fármacos aprovados que atuam como antagonistas dos canais de cálcio são o Nifedipino e seus análogos (CAROSATI et al., 2012; GRAEBIN et al., 2019; RUCINS et al., 2020; SAINI; KUMAR; SANDHU, 2008; SONALI ANANTHA et al., 2021).

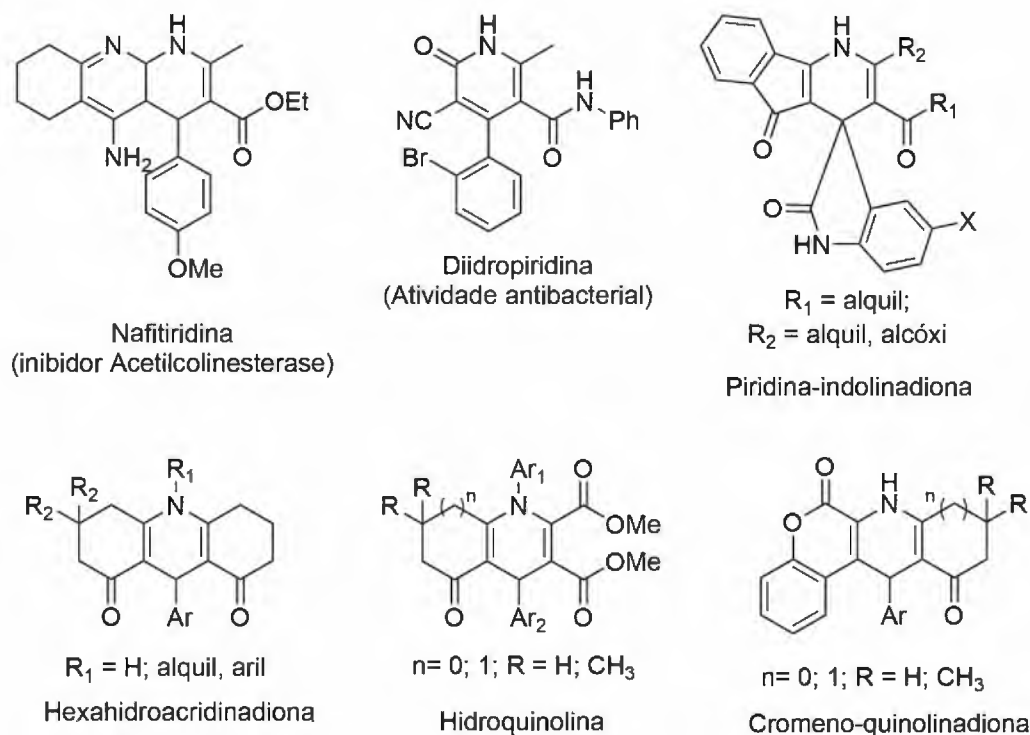
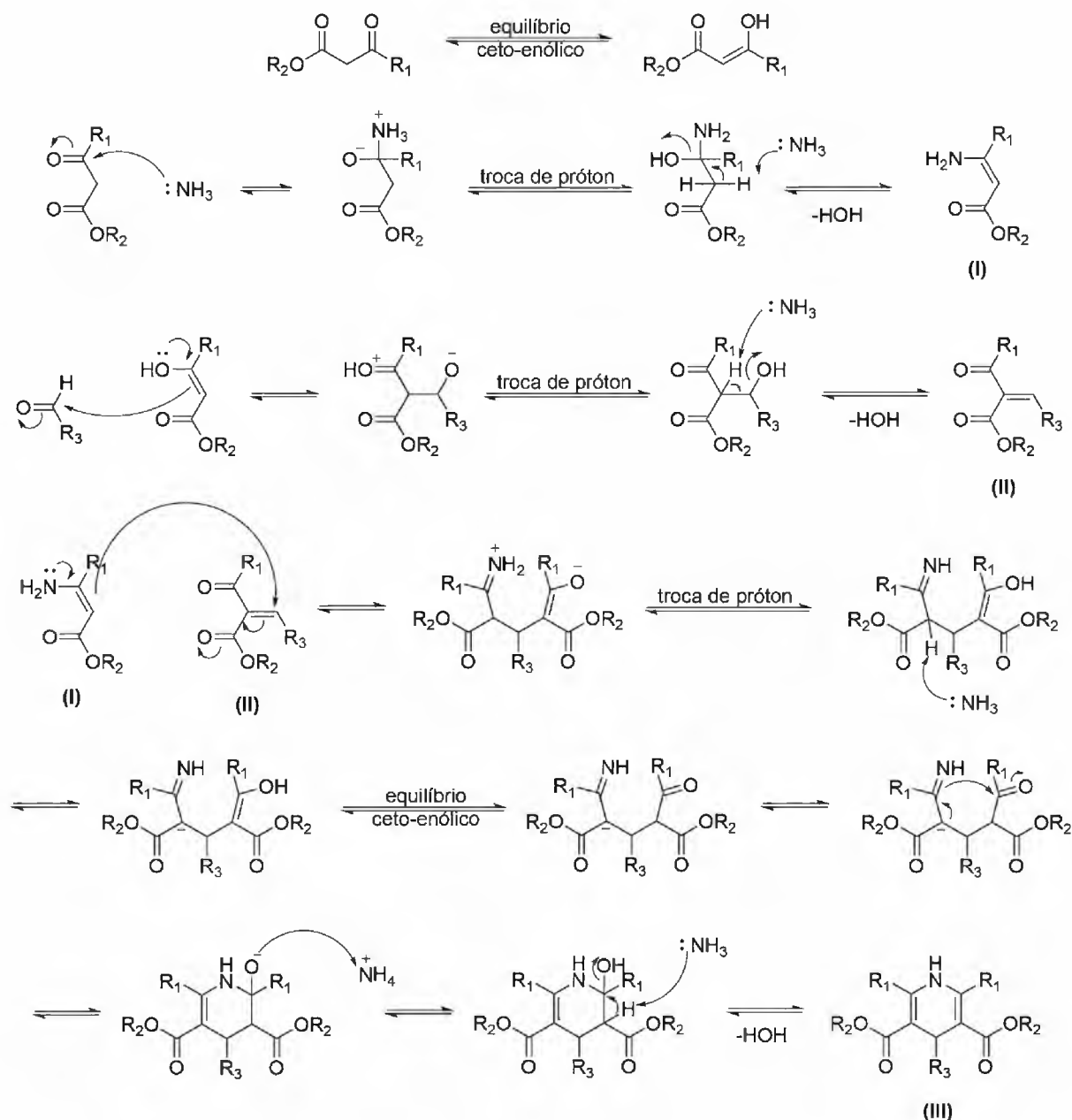


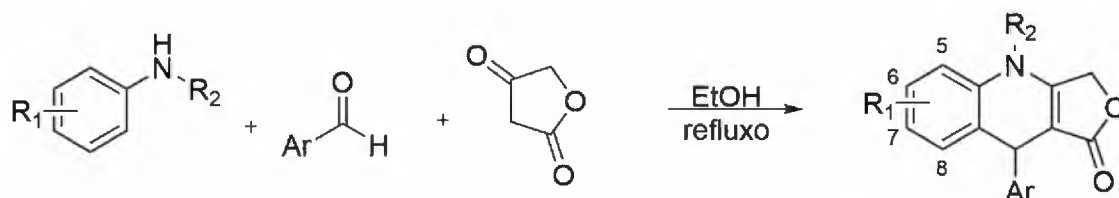
Figura 4: Produtos modificados de reações de Hantzsch. Fonte: Elaborado pela autora.

O mecanismo geral proposto para reações clássicas de Hantzsch tem como primeira etapa a reação entre a amônia e um equivalente do composto carbonilado para a formação de uma enamina (**I**). Posteriormente, o segundo equivalente do β -cetoéster reage com o aldeído através de uma condensação de Knoevenagel, produzindo assim um composto carbonílico α,β -insaturado (**II**). Os dois intermediários formados, realizam uma adição de Michael, seguida de uma condensação intramolecular, formando a diidropiridina desejada (**III**) (esquema 3) (KURTI, 2005; ROGERIO et al., 2016).



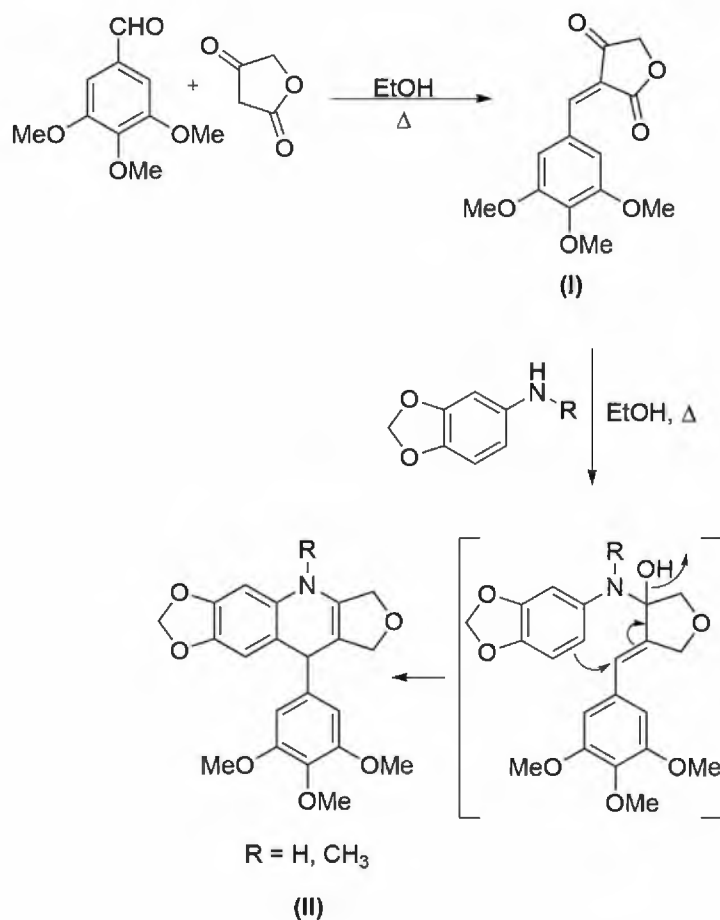
Esquema 3: Proposta de mecanismo para reações clássicas de Hantzsch. Fonte: KURTI, 2005; ROGERIO et al., 2016 – modificada.

Tratrat e colaboradores (2002), relataram uma modificação para a obtenção de diidroquinolinonas análogas da Podofilotoxina (produto natural com conhecida atividade citotóxica e antimitótica). A reação modificada envolve a condensação de uma amina aromática (primária ou secundária), um aldeído e um dicarbonilado cíclico e obteve produtos com rendimentos entre 45 e 94% (esquema 4) (TRATRAT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002).



Esquema 4: Reação de Hantzsch realizada por Tratratt e colaboradores. Fonte: TRATRATT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002 – modificada.

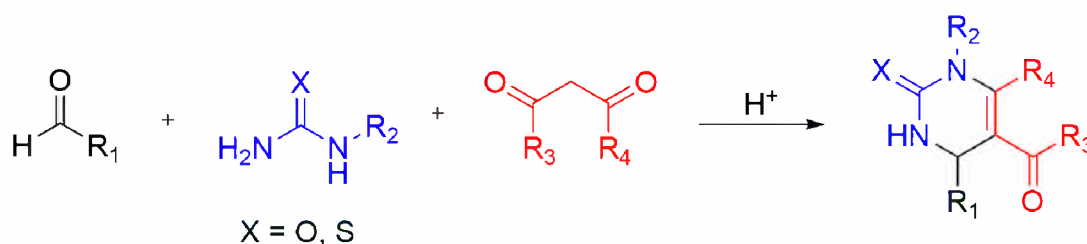
Quando descreveram a síntese dos derivados de Podofilotoxina, Tratratt e colaboradores, propuseram um esquema de intermediários simplificado para a síntese de Hantzsch modificada. No esquema de intermediários proposto por eles, a primeira etapa ocorre com a presença de ácido clorídrico levando a formação de uma benzilideno 2,4-funandiona (**I**), que posteriormente reage com a anilina em refluxo de etanol para a formação do produto desejado (**II**) (esquema 5) (TRATRATT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002).



Esquema 5: Esquema de intermediários simplificado proposto por Tratratt e colaboradores. Fonte: TRATRATT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002.

1.1.2. Reação de Biginelli

Em 1893, Pietro Biginelli descreveu a síntese de diidropirimidinonas (DHPMs) através de uma condensação tricomponente *one-pot*. Essa reação, originalmente, envolve acetoacetato de etila, que pode ser substituído por compostos β -dicarbonílicos; benzaldeído, que pode ser substituído por aldeídos alifáticos ou aromáticos; e ureia, que pode ser substituída por derivados alquilados, simétricos ou assimétricos da ureia. O meio reacional envolve uma catálise ácida (HCl) e refluxo de etanol (esquema 6) (KAPPE, 2000a, 2000b).



Esquema 6: Esquema geral da reação de Biginelli. Fonte: Elaborada pela autora.

Diversas modificações nas condições reacionais para reações de Biginelli foram relatadas na literatura com o passar dos anos. Dentre as modificações, pode-se destacar o uso de catálise homogênea, heterogênea e uso de catalisadores variados, incluindo diversos ácidos de Lewis; catalisadores metálicos, bimetálicos e lantanídeos; líquidos iônicos; nanocatalisadores; organocatalisadores; sais inorgânicos; além de catalisadores quirais para síntese assimétrica (AFSHARI; VARMA; SAGHANEZHAD, 2023; CHOPDA; DAVE, 2020; EL BADAUI et al., 2005; KAMAT; REDDY; KUMAR, 2023; KOLOSOV et al., 2009; SHAKYA; KURMI; PATEL, 2023; SHI et al., 2004; SYAMALA, 2005). Modificações envolvendo o uso de micro-ondas, sonicadores, reatores selados e metodologias utilizando síntese em fase sólida também foram relatados, assim como uso de diversos solvente, incluindo líquidos iônicos, acetonitrila e água ou até mesmo a não utilização de solventes (FAIZAN et al., 2023; ROGERIO et al., 2016).

As modificações nos componentes da reação e das condições reacionais tornaram possível uma expansão no número de DHPMs, e algumas outras classes de heterociclos, sintetizados através da reação de Biginelli. Alguns desses derivados se encontram na figura 5 (WAN; LIU, 2010). Destaca-se as quinazolinonas, que são uma das classes de heterociclos obtida no presente trabalho.

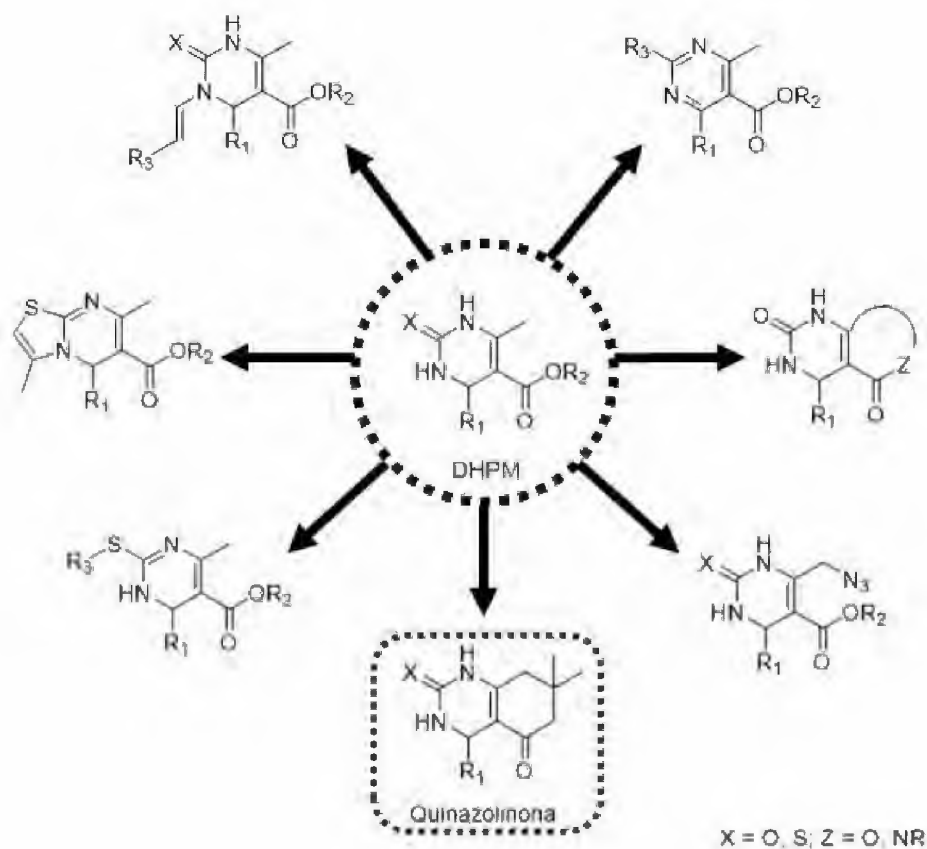
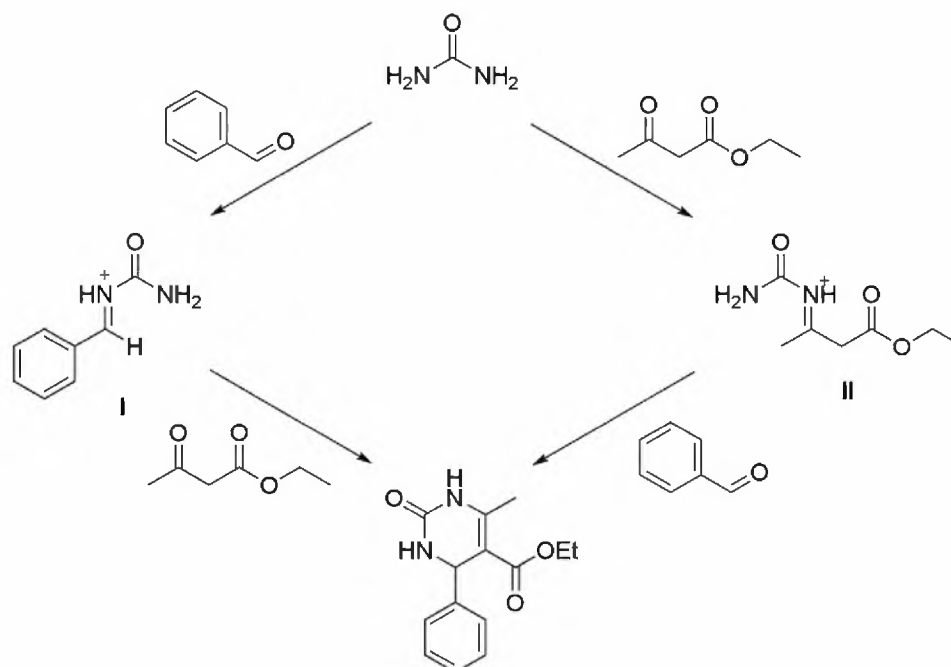


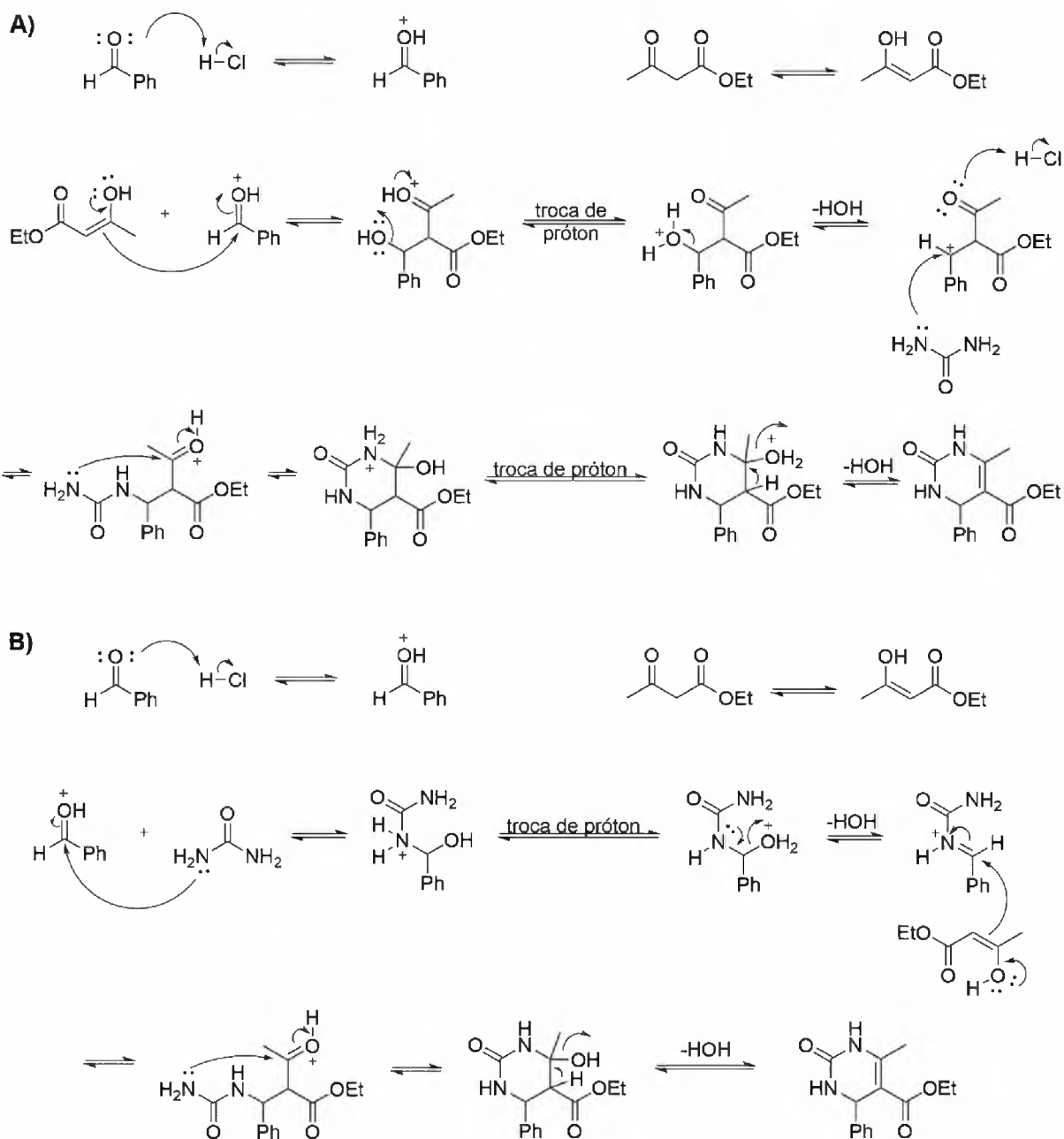
Figura 5: Derivados de DHPMs. Fonte WAN; LIU, 2010 – modificada.

O mecanismo da reação de Biginelli foi alvo de debate por diversos anos. A precursora proposta mecanística para a reação de Biginelli foi proposta em 1933 por Folkers e Johnson, onde os autores concluíram que a primeira etapa da reação ocorre entre a ureia e o aldeído, gerando um intermediário **I**, ou entre a ureia e o acetoacetato de etila, formando o intermediário **II**. Em seguida, o intermediário **I** ou **II** reage com os respectivos terceiros componentes da reação, ciclizando, para formar a pirimidinona desejada (esquema 7) (FOLKERS; JOHNSON, 1933).



Esquema 7: Esquema geral de obtenção de tetrahidropirimidinonas de acordo com Folkers e Johnson. Fonte: Elaborado pela autora.

Sweet e Fissekis propuseram uma sugestão de mecanismo em 1973 que ficou conhecida como “mecanismo Knoevenagel”, que tinha como primeira etapa uma condensação de Knoevenagel entre o benzaldeído e o acetoacetato de etila, levando a formação de um carbocátion estável que reage com a ureia para a obtenção da pirimidinona desejada (esquema 8a). Posteriormente, em 1997, Kappe propôs uma terceira opção, e mais aceita atualmente, onde o benzaldeído e a ureia reagiriam em uma primeira etapa, levando a formação de um intermediário íon imínio. O intermediário então realiza uma condensação de Knoevenagel com o acetoacetato de etila produzindo a produto desejado (esquema 8b) (GRAEBIN et al., 2019; KAPPE, 1997; SWEET; FISSEKIS, 1973).



Esquema 8: Mecanismos propostos por Sweet e Fissekis (A) e Kappe (B). Fonte: Elaborado pela autora.

A proposta de Kappe foi corroborada por Souza e colabores (2009) devido a caracterização da formação do íon imínio através de espectrometria de massas de alta resolução. Entretanto, Vitória e colaboradores (2015) demonstraram através de ressonância magnética nuclear, que ao se utilizar derivados cumarínicos como o β -cetoéster da reação, há a formação de intermediários provenientes da reação de condensação de Knoevenagel, sugerindo, portanto, o mecanismo de Sweet e Fissekis como mais aceitável. Mecanismos alternativos dependentes do catalisador utilizado também podem ser encontrados na literatura, sendo necessário

considerar o meio reacional e a variação dos componentes quando necessário fazer uma proposta de esquema de intermediários (CHANDRAVARKAR; ANEEJA; ANILKUMAR, 2024; DE SOUZA et al., 2009; VITÓRIO et al., 2015).

Diversos produtos de reações de Biginelli possuem diferentes perfis de bioatividade, tornando as DHPMs um esqueleto privilegiado para a química medicinal. Devido a atividade antimitótica, dois compostos obtidos através desse tipo de reação ganharam destaque, são eles o Monastrol e a Enastrona. Também são relatados produtos de reações de Biginelli com atividades anti-inflamatória, anti-HIV, antituberculose, antifúngica, antibacteriana, anticonvulsivante, antimalárica, antioxidante, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores de transcriptase reversa, entre outras (FAIZAN et al., 2023; SARVAIYA et al., 2024). Alguns exemplos de compostos bioativos obtidos por reação de Biginelli se encontram na figura 6.

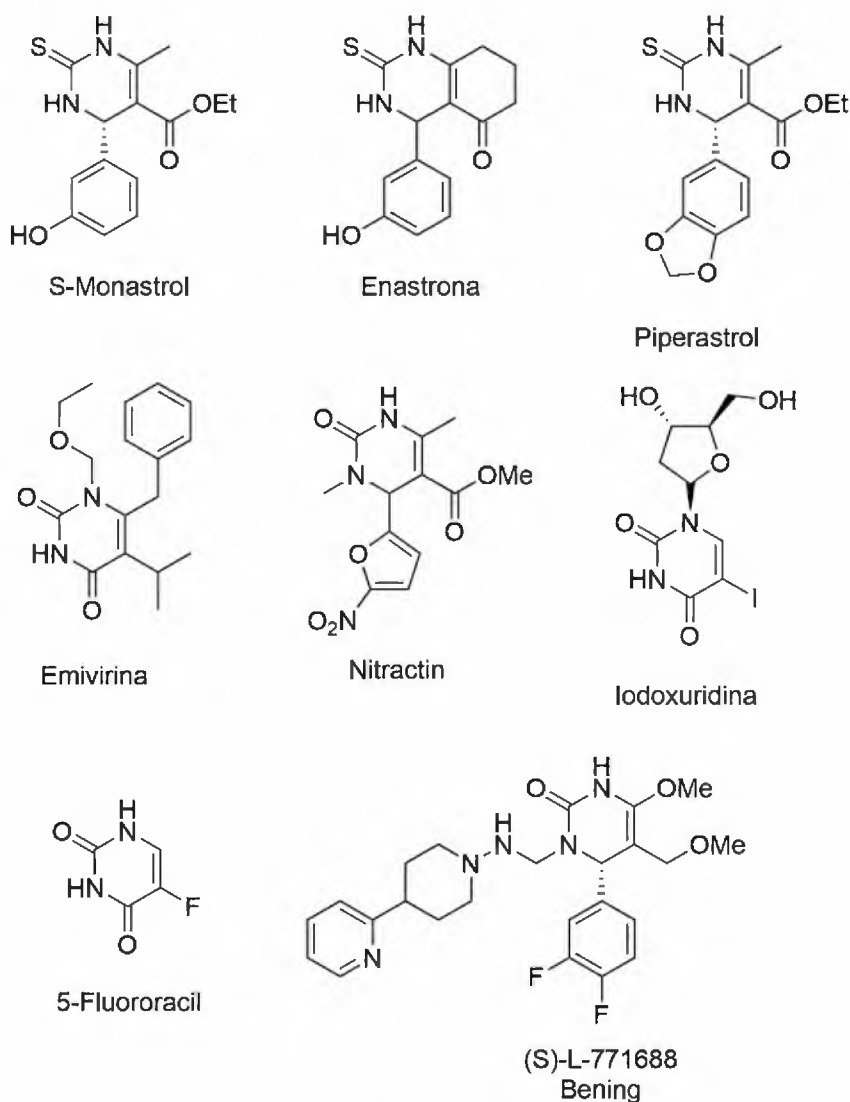


Figura 6: Compostos bioativos obtidos por reação de Biginelli. Fonte: SARVAIYA et al., 2024 – modificada.

Tendo em vista as diferentes aplicações das reações multicomponentes, aliadas ao fato de serem reações versáteis e com menor número de etapas e purificações, o presente trabalho buscou utilizar reações de Hantzsch e de Biginelli para obtenção de diversas moléculas. Tem-se como pretensão mostrar a versatilidade das reações multicomponentes na síntese de heterociclos e explorar novas atividades farmacológicas para os produtos obtidos. O trabalho está dividido em três capítulos. O primeiro mostra a síntese de uma coleção de acridinonas através da reação de Hantzsch, cujo potencial anticolinesterase e antioxidante foram avaliados, visando uma possível atividade para doença de Alzheimer. O segundo mostra a síntese de uma coleção de quinazolinonas através da reação de Biginelli, sendo avaliadas quanto a uma possível atividade anti-chagásica e antiproliferativa. O terceiro capítulo mostra uma coleção de acridinonas e acridinodionas sintetizadas, também, através da reação multicomponente de Hantzsch, buscando explorar a interação com a proteína Tubulina por métodos *in silico*.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE TETRAHIDROACRIDINONAS OBTIDAS POR REAÇÃO MULTICOMPONENTE DE HANTZSCH

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa que afeta mais de 1,2 milhão de brasileiros e não possui cura, apenas tratamento que minimize os sintomas da doença. Três dos fármacos atualmente disponíveis para a doença, atuam como inibidores de colinesterase. As acridinonas (ACR) são uma classe de compostos que possuem um anel acridina (tricíclico) com um grupo cetona (carbonila) ligado. Elas podem ser obtidas através da reação multicomponente de Hantzsch e possuem atividades biológicas variadas, entre elas destacam-se as atividades antiparasitária, anticolinesterásica e anticâncer. Devido a similaridades estruturais entre a Tacrina (primeiro inibidor de colinesterase utilizado no tratamento de Alzheimer) e as acridinonas, uma investigação exploratória de atividade anticolinesterásica e antioxidante de acridinonas, previamente descritas como inibidores de Tubulina, foi realizada. Quinze acridinonas foram sintetizadas e caracterizadas, sendo que as seis das acridinonas sintetizadas só foram descritas previamente na literatura pelo próprio grupo de pesquisa da autora. A avaliação da inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase mostrou que 12 ACRs possuem inibição frente a AChE na faixa de 4-10 μ M, sendo a molécula 7-fenil-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[c]acridin-8(9H)-ona a que possui a melhor inibição, enquanto para butirilcolinesterase 8 ACRs possuem atividades inibitórias na faixa de 0-5 μ M, e a molécula 7-(3,4,5-trimetoxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[c]acridin-8(9H)-ona demonstrou a melhor inibição. A avaliação *in silico* das moléculas mostrou os resíduos de aminoácidos que mais fazem interações com a série de acridinonas, sendo o Trp⁸⁶ o mais frequente em AChE e o Trp²³¹ e a Phe³²⁹ mais frequentes em BChE, entretanto, para uma melhor correlação com os resultados *in vitro*, uma separação dos enantiômeros e uma avaliação *in vitro* deles isoladamente faz-se necessária futuramente. O ensaio para determinação da atividade antioxidante demonstrou que as acridinonas que possuem hidroxilas fenólicas apresentam as melhores atividades (moléculas 7-(4-hidroxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[c]acridin-8(9H)-ona e 7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[c]acridin-8(9H)-ona), enquanto, das 15 testadas apenas as duas moléculas, que utilizam como reagentes e 3,4-metilenodioxoanilina, apresentam resultados menores que o padrão Trolox®. Ao avaliar a permeabilidade das moléculas na barreira hematoencefálica, oito moléculas demonstraram boa permeabilidade, conseguindo atravessar a barreira, enquanto duas demonstraram permeabilidade regular. Analisando o conjunto de resultados obtidos cinco acridinonas destacam-se como as mais promissoras e escolhidas para avançarem para ensaios futuros de neurotoxicidade e neuro proteção.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase; Butirilcolinesterase; Antioxidante.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a degenerative disorder affecting over 1.2 million Brazilians. While it has no cure, treatments exist to alleviate its symptoms. Three of the currently available drugs for the disease function as cholinesterase inhibitors. Acridinones (ACRs) are a class of compounds featuring an acridine (tricyclic) ring with a ketone (carbonyl) group attached. These compounds can be synthesized through the multicomponent Hantzsch reaction and exhibit diverse biological activities, including antiparasitic, anticholinesterase, and anticancer properties. Due to structural similarities between tacrine—the first cholinesterase inhibitor used to treat Alzheimer's—and acridinones, an exploratory investigation of the anticholinesterase and antioxidant activities of acridinones, previously described as tubulin inhibitors, was undertaken. Fifteen acridinones were synthesized and characterized, with six of them previously reported in the literature exclusively by the author's research group. The evaluation of enzyme inhibition revealed that twelve ACRs inhibited acetylcholinesterase (AChE) within the range of 4–10 μM , with the molecule 7-phenyl-7,10,11,12-tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one exhibiting the best inhibition. For butyrylcholinesterase (BChE), eight ACRs demonstrated inhibitory activity in the range of 0–5 μM , with 7-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-7,10,11,12-tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one showing the best results. *In silico* evaluation identified the most frequent amino acid residues interacting with the acridinone series: Trp86 for AChE, and Trp231 and Phe329 for BChE. However, for better correlation with *in vitro* results, future studies should involve the separation of enantiomers and their individual *in vitro* evaluation. The antioxidant activity assay showed that acridinones containing phenolic hydroxyl groups demonstrated the best activity, with 7-(4-hydroxyphenyl)-7,10,11,12-tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one and 7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7,10,11,12-tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one being the most active. Of the fifteen tested molecules, only two, synthesized using 3,4-methylenedioxyaniline as a reagent, exhibited antioxidant activity lower than the Trolox® standard. Regarding blood-brain barrier permeability, eight molecules showed good permeability, successfully crossing the barrier, while two demonstrated moderate permeability. Based on the results, five acridinones emerged as the most promising candidates for further neurotoxicity and neuroprotection assays.

Keywords: Acetylcholinesterase; Butyrylcholinesterase; Antioxidant.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Demência e doença de Alzheimer

Demência é o nome dado a um conjunto de sintomas que tem em comum o fato de afetarem o cérebro, tendo impacto direto na memória, comportamento, emoção e pensamento. A Demência ocasiona a morte das células nervosas, tornando falha a comunicação entre as células, impactando assim nas funções corporais. Essa doença pode afetar áreas distintas no cérebro, gerando assim sintomas variados. O tipo mais comum de demência é a doença de Alzheimer, porém outros tipos também são conhecidos, como a demência vascular, demência fronto-temporal e demência dos corpos de Lewy (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2024a).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*), estima-se que mais de 55 milhões de pessoas sofriam de demência em 2019 e o número de casos esperados para 2050 é de 139 milhões, sendo mais comum em países de baixa e média renda. A estimativa é que ocorram 10 milhões de casos a cada ano, sendo a sétima principal causa de morte no mundo e uma das causas principais de incapacidade. A população mais afetada pela doença possui mais de 65 anos, porém pode ocorrer em pessoas mais jovens (demência de início precoce) em cerca de 9% dos casos. Alguns fatores ocasionam um aumento no risco de desenvolver demência, como: tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, hipertensão, diabetes e sedentarismo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024; LONG; BENOIST; WEIDNER, 2023).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença degenerativa e progressiva, que foi primeiramente descrita por Alois Alzheimer em 1906 e representa 50 a 75% de todos os casos de demência. No cérebro de uma pessoa com DA, ocorre a morte de células nervosas em uma região específica do cérebro responsável pelo armazenamento de memórias (principalmente lobo temporal e hipocampo), fazendo com que haja um encolhimento do cérebro nessas regiões, levando a uma redução na capacidade de lembrar, falar, pensar e tomar decisões. Os primeiros sintomas da doença são lapsos de memória, dificuldades em encontrar as melhores palavras e mudanças de humor, porém com a progressão da doença, o esquecimento de eventos e nomes recentes podem ocorrer, assim como mudanças de personalidade e humor sem motivos, podendo inclusive perder o senso de comportamento adequado e adotar um comportamento perturbador (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2024b).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, cerca de 1,2 milhões de pessoas são afetadas pela DA no Brasil, com um acréscimo de 100 mil novos casos por ano. O tratamento multidisciplinar e integrado para a doença é oferecido no Sistema Único de Saúde (SUS) de forma gratuita, porém, na rede privada pode gerar um impacto financeiro elevado, principalmente quando o paciente requer cuidadores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024; AGENCIA GOV, 2024; MINISTERIO DA SAUDE, 2024).

De acordo com o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention* – EUA) o Alzheimer representou a sétima maior causa de mortalidade nos Estados Unidos em 2022, tendo um total de 120.122 mortes no mesmo ano. Uma estimativa feita por Rajan e colaboradores e sumarizada pela Alzheimer’s Association indica que o número de casos da doença nos Estados Unidos pode chegar a mais que o dobro em 2060, (figura 7) tal fato deve-se ao envelhecimento da população. Tais números reforçam a necessidade de novas terapias para o tratamento da doença (RAJAN et al., 2021; CDC, 2024; ALZHEIMER’S ASSOCIATION, 2024).

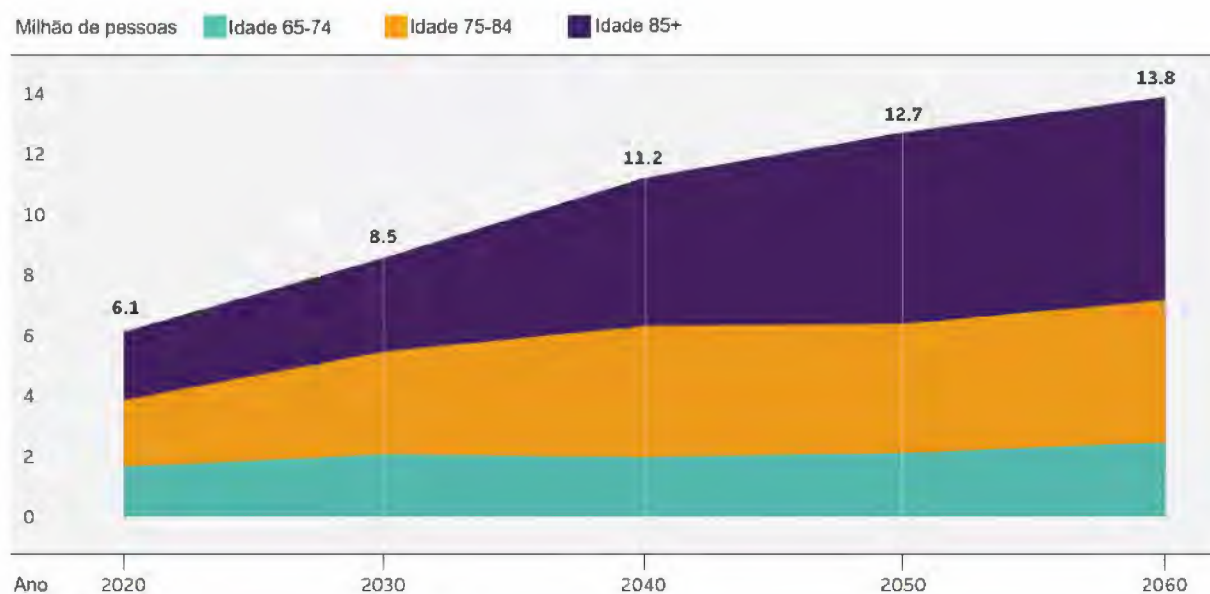


Figura 7: Número projetado de pessoas na população dos EUA com demência de Alzheimer, 2020 a 2060. Fonte: ALZHEIMER’S ASSOCIATION, 2024 – modificada.

A DA é uma doença multifatorial, o que significa que sua causa é relacionada a diversos mecanismos, que individualmente não representam uma hipótese válida para todas as condições observadas em pacientes portadores da doença. Dentre os mecanismos, destacam-se deposição de placas β amiloide; emaranhados neurofibrilares (hiperfosforização da proteína Tau);

neuroinflamação crônica; disfunção sináptica; estresse oxidativo; e disfunção colinérgica (figura 8). Entender esses mecanismos auxilia no desenvolvimento de novos tratamentos, portanto, no presente trabalho dois mecanismos serão destacados: estresse oxidativo e disfunção colinérgica (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018).

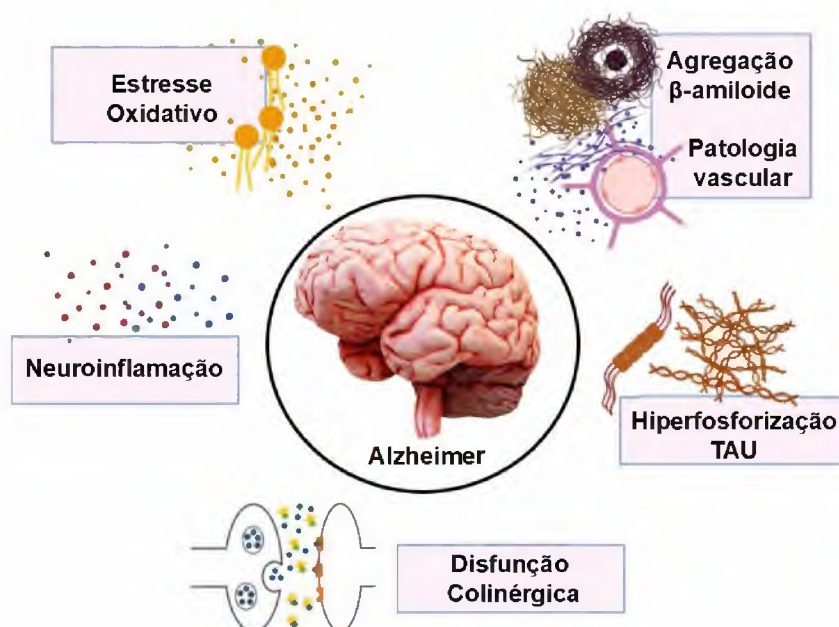


Figura 8: Principais patologia da doença de Alzheimer. Fonte: LAU; RAMER; TREMBLAY, 2023 – modificada.

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive oxygen species*) são subprodutos instáveis, que contém oxigênio, e são provenientes do metabolismo que ocorrem naturalmente dentro das células. Essas espécies, também conhecidas como radicais de oxigênio, são necessárias no corpo humano, entretanto, um acúmulo delas pode causar danos ao DNA, RNA e proteínas, e pode causar a morte celular. O estresse oxidativo é uma condição que ocorre quando a produção de ROS supera a capacidade antioxidante do organismo, acumulando ROS no organismo. Na DA há um acúmulo de ROS devido ao estresse oxidativo, o que gera danos mitocondriais, além de estar relacionadas a outras hipóteses da doença como: agregação de placas β amiloide e hiperfosforização da proteína Tau. Portanto, uma possível via para mitigar, em parte, o avanço da DA seria a administração de fármacos antioxidantes, capazes de eliminar as ROS do organismo (CHOI; KIM; PARK, 2024; RATAN et al., 2023; TÖNNIES; TRUSHINA, 2017).

O sistema colinérgico (figura 9) é um sistema neural que tem a acetilcolina (ACh) como um neurotransmissor e é expressa em partes do cérebro diretamente relacionadas a cognição e memória. A disfunção colinérgica é o mecanismo caracterizado pela disfunção do sistema colinérgico, onde não há um equilíbrio entre a geração e degradação da ACh (1). A ACh é produzida através da ação da colina acetiltransferase, e posteriormente é liberada podendo seguir dois caminhos: se ligar ao receptor colinérgico ou ser degradada por enzimas colinesterases (ChEs) (acetilcolinesterase majoritariamente e butirilcolinesterase), gerando assim colina (2) e íon acetato (3). A diminuição da quantidade de ACh no cérebro é uma característica da DA, que, por ser um neurotransmissor, impacta na memória e cognição. Tal fato impulsionou a busca e desenvolvimento de fármacos que atuassem como inibidores de acetilcolinesterase (iAChE), gerando assim um aumento de ACh. Uma vez que há uma diminuição da hidrólise da acetilcolina, há uma diminuição dos sintomas da DA (BHOLE; CHIKHALE; RATHI, 2024; SUN et al., 2024).

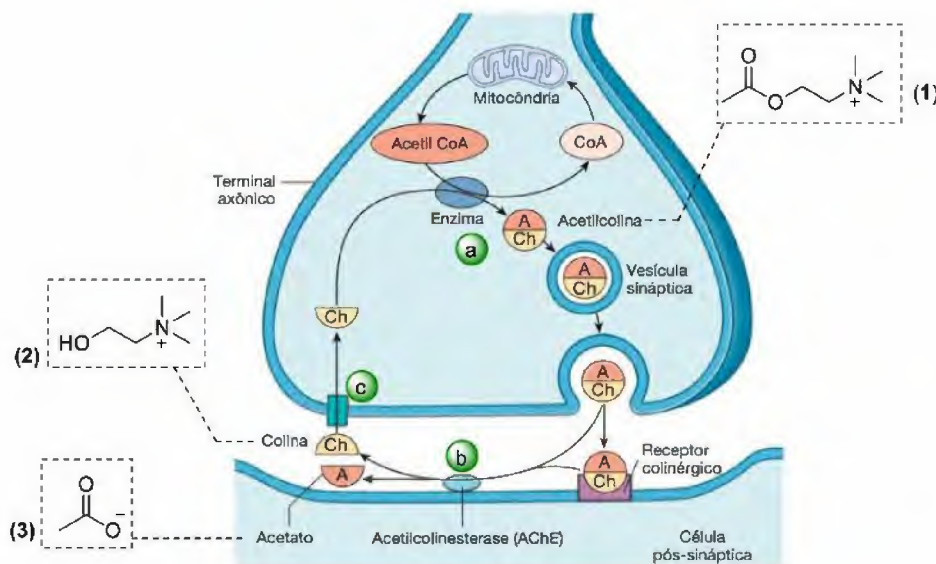


Figura 9: Sistema colinérgico. Fonte: NADUR, 2020.

Até o presente momento, não existe um tratamento que leve a cura para a doença de Alzheimer, os atuais tratamentos farmacológicos são utilizados somente para minimizar os sintomas, gerando uma melhor qualidade de vida para o paciente. Dentre os quatro fármacos aprovados, no Brasil, para o tratamento da doença, três são inibidores de ChEs, são eles: donepezila, galantamina e rivastigmina (figura 10). Esses fármacos são inibidores da acetilcolinesterase utilizados em estágios leves a moderados da doença, porém, o tratamento a

longo prazo pode perder sua eficácia devido a menor produção de ACh durante a progressão da doença. O quarto fármaco aprovado é a Memantina (figura 10), que é um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (ARNMDA). Esse fármaco atua evitando danos cerebrais devido a regulação da atividade do glutamato (principal neurotransmissor excitatório do cérebro, cuja toxicidade pode levar a morte de células nervosas) (CHOI; TANZI, 2020).

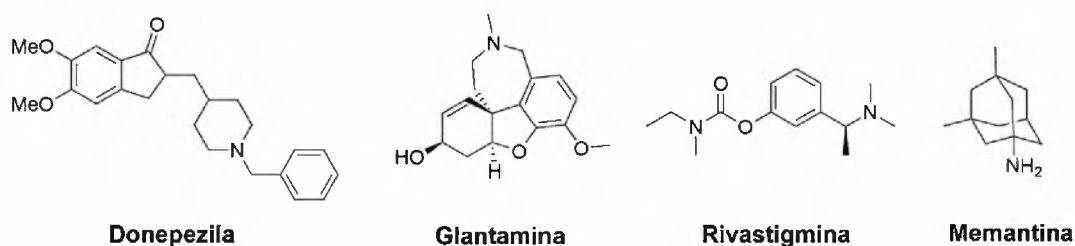


Figura 10: Fármacos aprovados para o tratamento de Alzheimer. Fonte: Elaborada pela autora.

Nos Estados Unidos, dois outros medicamentos são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em casos de Alzheimer, são eles o Aducanumab e o Lecanemab; entretanto, o uso dos dois no Brasil ainda não foi aprovado. Ambos os fármacos são anticorpos monoclonais que apresentam como mecanismo de ação a redução de placas β amiloide. O Aducanumab foi aprovado em 2021 e o Lecanemab em 2023, entretanto, a Biogen® (fabricante do Aducanumab) anunciou que a partir de novembro de 2024 a fabricação e comercialização do Aducanumab serão descontinuadas para priorizar o Lecanemab (FDA, 2024a; FDA, 2024b; AJMC, 2024).

O primeiro fármaco desenvolvido e aprovado para o tratamento de Alzheimer foi a Tacrina (figura 11), atuando como inibidor reversível de acetilcolinesterase, aumentando assim os níveis de acetilcolina no cérebro, além de ser um bloqueador dos canais de sódio e potássio. Esse fármaco foi aprovado nos Estados Unidos em 1993 e no Brasil em 1994, entretanto, devido a sua hepatotoxicidade e indução ao estresse oxidativo, além da disponibilidade de inibidores da acetilcolinesterase mais eficazes, seu uso no tratamento de Alzheimer foi descontinuado em 2013 (KHALESEH; HAGHI-AMINJAN; SAMADI, 2024; TSOPELAS; MARIN, 2001). Contudo, análogos da Tacrina ainda hoje são pesquisados, buscando-se uma atividade inibitória em acetilcolinesterase aliada a menor toxicidade (SUN et al., 2024).

1.2. Acridinonas

Acridinonas (ACRs) (figura 11) são uma classe de compostos que possuem um anel acridina (figura 11) com um grupo cetona (carbonila) ligado. As tetrahydroacridinonas (figura 11) são uma variação das acridinonas que podem ser obtidas através da reação multicomponente de Hantzsch proposta por Tratratt e colaboradores. As atividades biológicas relacionadas as acridinonas são variadas, entre elas destacam-se as atividades antiparasitária, anticolinesterásica e anticâncer (DELMAS et al., 2004; THI DUONG et al., 2024; TRATRATT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002; VALDÉS, 2011; VARAKUMAR et al., 2022; VERONES et al., 2013).

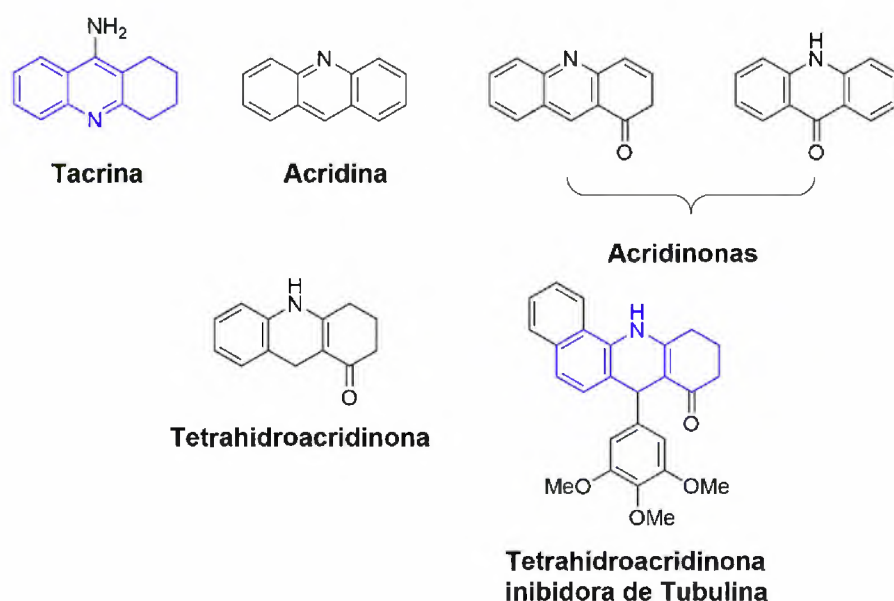


Figura 11: Estruturas da Tacrina, acridina, acridinonas, tetrahydroacridinona e tetrahydroacridinona inibidora de Tubulina. Fonte: Elaborada pela autora.

Em trabalhos prévios da autora, uma série de acridinonas foram sintetizadas e avaliadas frente a atividade modulatória de Tubulina (um alvo molecular clinicamente validado para o câncer) (MAGALHAES et al., 2016). Os anéis fusionados das acridinonas avaliadas possuem uma similaridade estrutural com a Tacrina, como visto na figura 11. Tal similaridade, motivou um interesse em sintetizar novamente algumas das acridinonas testadas em Tubulina, incluindo algumas novas, e testá-las quanto uma possível atividade anticolinesterásica e antioxidante, explorando dois mecanismos validados para o tratamento de Alzheimer. Essa pesquisa justifica-

se como uma investigação exploratória de uma nova abordagem terapêutica das acridinonas sintetizadas pela autora.

1.3. Ferramentas computacionais e métricas úteis no desenvolvimentos de fármacos

O desenvolvimento de um fármaco requer consecutivas tomadas de decisões. Aliar a melhor potência e os melhores parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos em uma única molécula é raramente possível, portanto, a escolha pelas melhores moléculas podem ser um desafio. Tendo em vista esse fato, alguns parâmetros quantitativos e qualitativos ajudam a avaliar fatores como eficácia, segurança e viabilidade, para que assim possa ser escolhido o melhor candidato a ensaios pré-clínicos. Esses parâmetros são chamados de métricas e são amplamente utilizados nas etapas de “*hit-validation*” e “*lead-optimization*”. Dentre as métricas envolvidas no desenvolvimento de fármacos temos os descritores envolvidos na regra de Lipinski (peso moléculas, logP – lipofilicidade e o número de doadores e aceptores de hidrogênio presentes na molécula); os descritores relacionados diretamente a lipofilicidade (cLogP, LogD e CHILogD); PSA (área de superfície polar); tPSA (área de superfície polar topológica); fração de sp³ (número de átomos de carbono com hibridização sp³); LE (eficiência do ligante); LLE (eficiência do ligante lipofílico), entre outros. Esses valores podem ser obtidos através de softwares especializados para química e os valores considerados como “recomendados” podem ser encontrados em plataformas como a RGDscience e na literatura (RGDscience, 2024; LEESON et al., 2021; SHULTZ, 2014; VUKOVIC; HUGGINS, 2018).

A química computacional possui diversas ferramentas para auxiliar o desenvolvimento de fármacos. Uma dessas estratégias é o *docking* molecular (também chamado de ancoramento molecular). Essa ferramenta visa prever a afinidade de uma molécula e seu alvo biológico através de cálculos quânticos ou de mecânica molecular. A utilização desse método pode gerar uma redução de até 50% dos custos e do tempo necessário para o desenvolvimento de um fármaco, sendo um valioso aliado no entendimento de sistemas biológicos complexos. Entretanto, como desvantagens temos as falhas que podem ocorrer durante a parametrização, levando a resultados errados (AGU et al., 2023; STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Contudo, é possível destacar que as ferramentas computacionais disponíveis são estratégias valiosas no desenvolvimento de fármacos, portanto, foram utilizadas no presente trabalho para enriquecer os resultados e auxiliar nas discussões.

1.4. Justificativa

A limitação dos atuais tratamentos para a doença de Alzheimer, aliadas a projeção crescente do número de casos da doença nos próximos anos, torna necessário a busca por novos tratamentos para a doença. Com base na Tacrina e buscando explorar uma nova atividade para acridinonas previamente avaliadas como citotóxicas, o presente trabalho foi planejado.

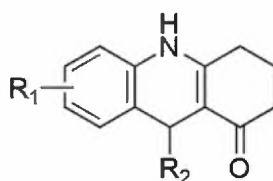
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar uma coleção de 16 tetrahydroacridinonas obtidas a partir de reação multicomponente de Hantzsch e avaliar uma possível atividade farmacológica frente a alvos relacionados a doenças neurodegenerativas (Alzheimer).

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar 16 acridinonas utilizando a reação multicomponente de Hantzsch.



R₁ = α -naftaleno ou 3,4-dioxol.

R₂ = fenil; 3-metoxifenil; 4-metoxifenil; 4-hidroxi-3-metoxifenil; 3,4-dimetoxifenil; 3-hidroxifenil; 4-hidroxifenil; 4-bromofenil; 3,4-benzodioxol; 3-nitrofenil; 4-carboxifenil; 4-fluorfenil; 3-tiofeno; 3,4,5-trimetoxifenil

- Caracterizar todas as moléculas sintetizadas utilizando métodos espectroscópicos (ressonância magnética nuclear 1D e 2D e infravermelho).
- Avaliar o perfil de inibição das acridinonas (*in vitro*) frente as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

- Avaliar a interação entre as acridinonas e as enzimas propostas através de métodos *in silico* (ancoramento molecular).
- Avaliar o perfil o antioxidante das acridinonas, através do ensaio ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Livres de Oxigênio).
- Avaliar a penetração no sistema nervoso central (barreira hematoencefálica) das acridinonas através de ensaio de permeabilidade em membrana artificial (PAMPA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese e caracterização das acridinonas

Dezesseis acridinonas foram planejadas para essa coleção (produtos **1-16**). Doze das acridinonas (**1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16**) tiveram suas sínteses e avaliação quanto atividade anticâncer publicada pelo grupo de pesquisa (MAGALHAES et al., 2016). Entretanto, nenhuma possui relatada avaliação em relação a atividade inibitória frente as enzimas acetil e butirilcolinesterase. As moléculas **1, 7 e 10** tiveram sua síntese a avaliação da atividade antimicrobial descrita previamente por Nadaraj e colaboradores (NADARAJ; THAMARAI SELVI; MOHAN, 2009). Outras acridinonas tiveram metodologias de sínteses publicadas previamente, mas sem atividade biológica relacionada. Buscando-se explorar potenciais atividades farmacológicas, e devida à similaridade entre o anel acridinona e a Tacrina (potente agente não seletivo inibidor de AChE e BChE, e primeira terapia aprovada para Alzheimer), as acridinonas sintetizadas foram testadas frente a alvos farmacológicos relacionados a doenças degenerativas (Alzheimer).

O planejamento estrutural das moléculas (figura 12) se baseou em trabalhos anteriores. Previamente, no grupo de pesquisa, utilizou-se como aminas para reações de Hantzsch a α -naftilamina e a 3,4-metilenodioxoanilina, buscando similaridades estruturais com a Podofilotoxina. Uma vez que foram estabelecidos protocolos de reação com uso dessas aminas, que vão de encontro a química verde, por não utilizar catalisadores e ser feita de maneira *one-pot*, as mesmas aminas foram utilizadas no presente trabalho. A escolha dos aldeídos foi realizada a fim de explorar os tamanhos dos sítios de interação e também as possíveis interações.

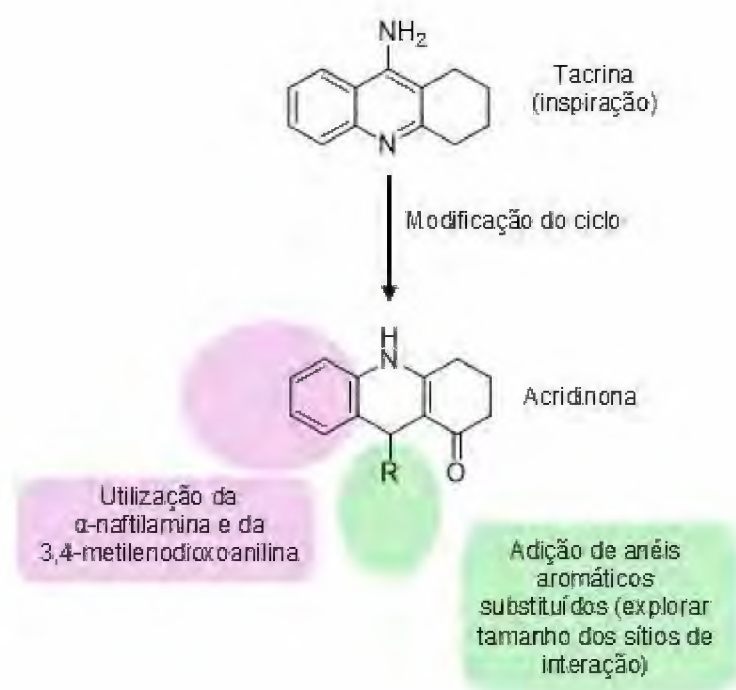
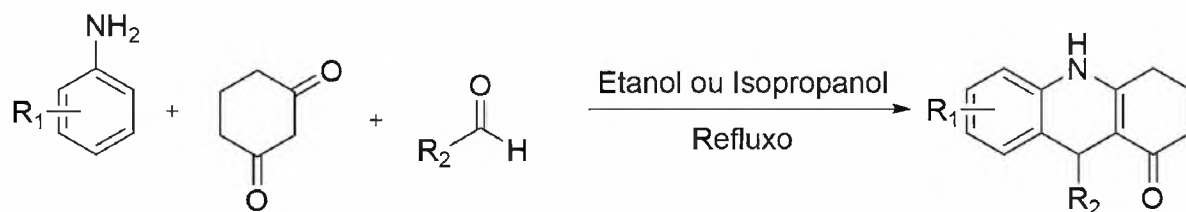


Figura 12: Planejamento estrutural das acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.

As reações aconteceram seguindo o esquema 9. A reação foi realizada baseando-se na metodologia Hantzsch modificada descrita por Tratat e colaboradores, tendo como reagentes uma amina (α -naftilamina ou 3,4-metilenodioxoanilina), 1,3-ciclohexanodiona (dicarbonilado) e um aldeído aromático (TRATRAT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002). Uma discussão mais aprofundada a respeito da reação, além de mecanismos e propriedades encontra-se na introdução geral. A estrutura de todas as acridinonas planejadas encontram-se na figura 13.



Esquema 9: Esquema de reação para as acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.

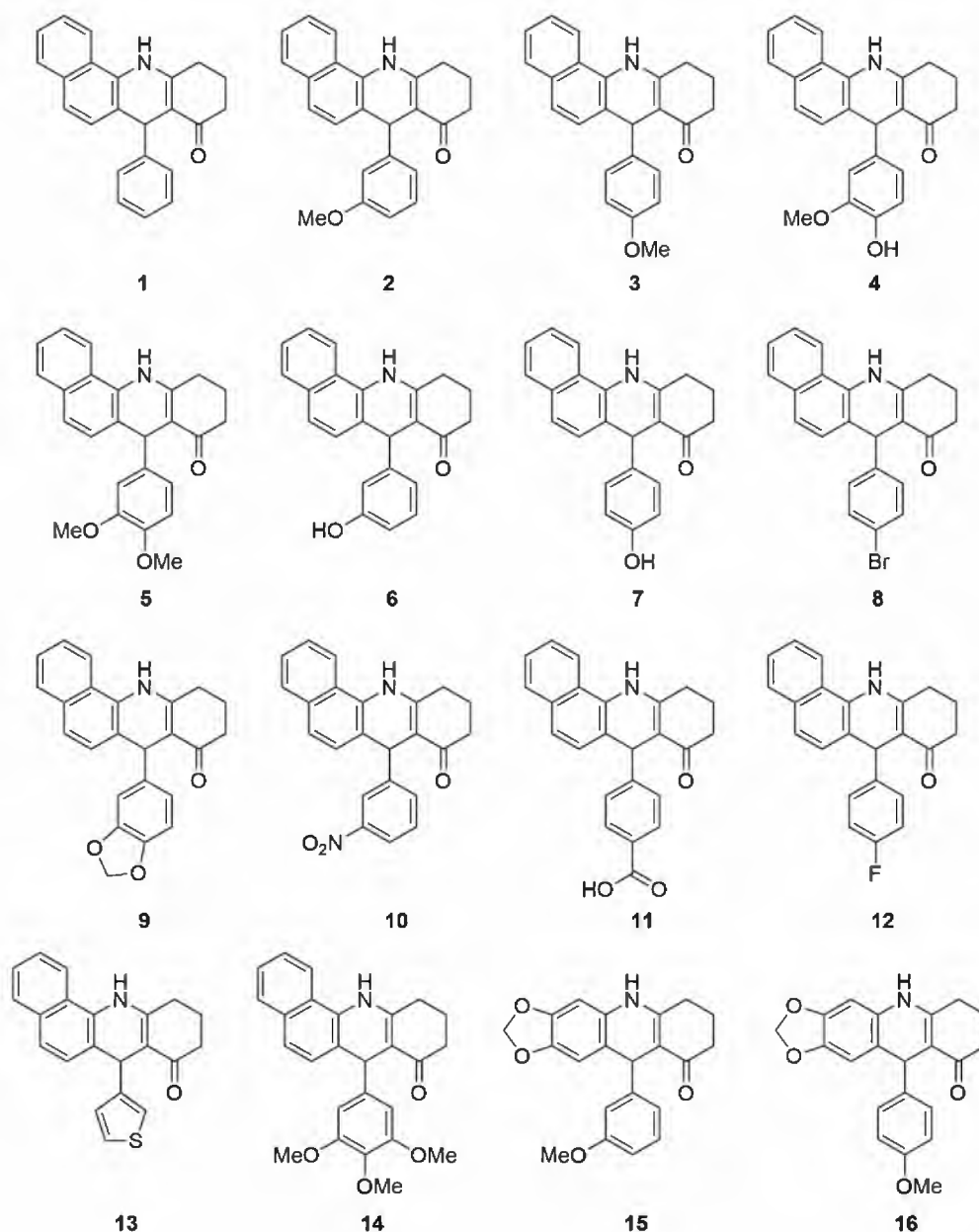


Figura 13: Estruturas das acridinonas planejadas. Fonte: Elaborada pela autora.

A metodologia empregada inicialmente (protocolo 1) foi estabelecida em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada analítica (CCD). Ao final de 24 horas a CCD mostrou que as reações que conduziram aos produtos **1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **10**, **11**, **13**, **14**, **15** e **16**, que estavam precipitadas, possuíam a presença de um produto, fluorescente em $\lambda=365\text{nm}$, e de um reagente, a α -naftilamina, que foi adicionada em excesso na reação e sinais bem fracos de intermediários. A ausência dos outros dois reagentes indicaram que essas reações estavam completas, portanto, elas foram recristalizadas, em etanol, para isolar o produto desejado de forma pura.

As reações que conduziram aos produtos **3**, **6**, **8**, **9** e **12**, através do protocolo 1, não precipitaram ao final das 24h, e a CCD indicava a formação de diversos produtos, além da presença da α -naftilamina. Tal fato pode ter sido causado pela solubilidade dos reagentes e produtos em isopropanol. Buscando-se uma alternativa sintética mais favorável para tais reações, um protocolo, que já foi empregado em trabalhos anteriores do grupo, foi aplicado (protocolo 2). No segundo protocolo 2 utilizou-se 3 mL de etanol como solvente, buscando alterar a solubilidade dos reagentes e produtos, e as proporções dos reagentes foram: 1 equivalentes de amina (retirando o excesso de amina), 1 equivalente do dicarbonilado e 1 equivalente de aldeído. As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada. Após as 24h, as reações que conduziram aos produtos **6** e **9**, foram obtidas na forma de um precipitado, as análises por CCD indicaram a presença de apenas um produto, sendo o **6** não fluorescente em $\lambda=365\text{nm}$ e o **9** fluorescente em $\lambda=365\text{nm}$. Os precipitados foram recolhidos e recristalizados para que a determinação estrutural fosse realizada. Entretanto, os produtos **3**, **8** e **12** não precipitaram, sendo observados vários manchas na CCD, porém com consumo completo dos reagentes, tal fato fez com que fosse escolhido a cromatografia flash usando gel de sílica para isolamento e purificação.

A cromatografia flash foi realizada e a detecção das substâncias foi observada por CCD em dois comprimentos de onda: 254 e 365nm. Uma pastilha de sílica com o produto de cada reação foi preparada, e a escolha da fase móvel da reação ocorreu aliando-se a melhor solubilidade e a melhor separação. Ao final da purificação dos compostos, os rendimentos foram calculados, descritos na tabela 1.

Tabela 1: Rendimento das reações.

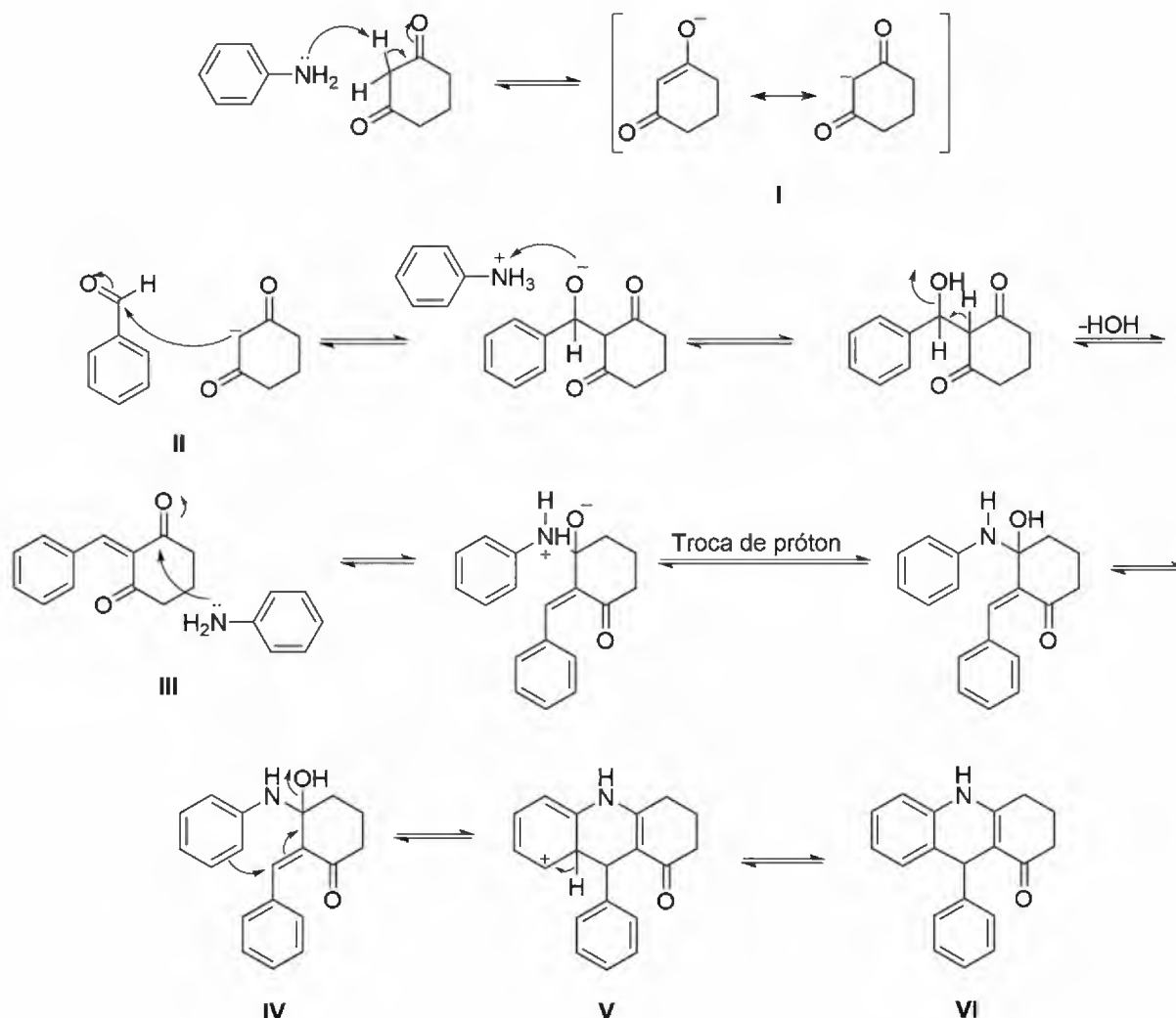
Molécula	Rendimento	Molécula	Rendimento
1	21%	2	33%
3	4%	4	27%
5	46%	6*	-
7	41%	8	4%
9	30%	10	40%
11	5%	12	3%
13	33%	14	41%
15	78%	16	60%

* Reação não obteve o produto desejado.

Os rendimentos para as reações foram variados, e alguns não satisfatórios, entretanto, uma vez que necessário, pode-se buscar otimizações. Os rendimentos das reações para obtenção

dos produtos **15** e **16** foram os maiores observados, e isso pode estar associado ao fato de a amina utilizada ser a 3,4-metilenodioxianilina. A 3,4-metilenodioxianilina (pka aproximado 4.6) é ligeiramente mais básica do que a α -naftilamina (pka aproximado 4.2). Diversos fatores estruturais e eletrônicos influenciam a disponibilidade do par de elétrons no átomo de nitrogênio para realizar um ataque nucleofílico. O primeiro fator a ser considerado é a ressonância, a deslocalização do par de elétrons livres presente no nitrogênio é maior na α -naftilamina. Tal fato ocorre porque o anel naftalênico possui uma conjugação maior do que o um anel benzênico ligado a um anel 1,3-dioxolano (3,4-metilenodioxianilina), portanto, conferindo uma menor basicidade a α -naftilamina. O segundo fator é o efeito indutivo, apesar da presença do anel 1,3-dioxolano, o efeito retirador por indução desse grupo não é tão forte quanto a presença de um anel naftaleno. Somando os dois fatores, podemos concluir que a 3,4-metilenodioxianilina é ligeiramente mais básica que a α -naftilamina, e que essa basicidade maior pode estar relacionada ao maior rendimento.

A basicidade da amina interfere diretamente na reação, pois a amina atua em duas etapas distintas do mecanismo. No esquema 10 apresenta-se o mecanismo geral proposto para as reações, onde em meio básico, a anilina (ou outra base) remove um próton do carbono alfa (o H α) no tautômero carbonilado. Forma-se um ânion com dois contribuidores de ressonância, chamado de enolato (**I**). A estrutura de ressonância que mais contribui para o híbrido de ressonância dessa espécie é a que possui a carga negativa no oxigênio. Posteriormente uma condensação de Knoevenagel (**II**) ocorre entre o carbânion e o aldeído, levando a formação de um intermediário que sofre um ataque nucleofílico da amina (adição de Michael) (**III**). O produto da adição de Michael é o intermediário **IV** que passa por uma etapa de ciclização através de um ataque eletrofílico ao carbono β à carbonila, levando ao intermediário **V**, que restabelece a aromaticidade para obtenção do produto desejado (**VI**).



Esquema 10: Esquema de intermediários geral proposto para a síntese das acridinonas. Fonte: Elaborado pela autora.

As reações obtidas pelo protocolo 1 quando se utilizou a α -naftilamina forneceu os produtos **1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **10**, **11**, **13** e **14**, com rendimentos menores quando comparado aos rendimentos utilizando a 3,4-metilenodioxoanilina, porém suficientes para as análises espectroscópicas e para os ensaios. Um dos fatores responsáveis por menores esses rendimentos foi a perda de massa devido a recristalização. Além da recristalização, a presença de subprodutos, em pequena quantidade, verificados por CCD, indicou que não houve uma total conversão dos reagentes no produto desejado. O produto **11** foi o que apresentou o menor rendimento (5%) com esse protocolo, tal fato deve-se a presença do ácido carboxílico como reagente, que pode competir com o dicarbonilado na primeira etapa da reação ácido-base, e interferir na condensação de Knoevenagel e na adição de Michael, levando a um menor

rendimento. Para a reação que conduziu ao produto **1**, a utilização do benzaldeído, de forma pura, como reagente é um fator determinante para o rendimento, uma vez que a sua oxidação gera o ácido benzoico, diminuindo assim a quantidade de aldeído presente na reação. O benzaldeído utilizado para obtenção do produto **1** não teve sua pureza analisada, portanto a possível presença de ácido benzoico é uma hipótese que pode ter acarretado em um menor rendimento. A presença de grupos doadores e retiradores de elétrons no aldeído parece não ter uma interferência significativa no rendimento, entretanto, é necessário destacar que apenas 4 reações resultaram produtos com rendimentos acima de 40%, sendo eles: a **10** (com grupo nitro retirador na posição meta); **5** (com dois grupos metoxila doadores nas posições meta e para); **7** (grupo hidroxila doador hidroxila na posição para); e **14** (com 3 grupos metoxilas doadores nas duas posições meta e na posição para).

A reação para preparar o produto **9**, apesar de ter sido realizada utilizando o protocolo 2, obteve rendimentos similares as reações obtidas pelo protocolo 1, sendo importante destacar que a recristalização reduziu a massa obtida, mas garantiu a pureza do produto necessária para os testes.

A reação de formação do produto **6**, gerou um precipitado, entretanto, as análises espectroscópicas juntamente com o espectro de massas (anexos 12-17, páginas 210 à 215) indicam que a reação não levou ao produto desejado. A caracterização da molécula obtida não foi conclusiva, entretanto, as análises espectroscópicas indicam características do produto desejado e do intermediário **III** (de acordo com o esquema 10 – esquema de intermediários). Tal produto pode ser um dos intermediários da reação, que nesse caso, se formou de maneira estável e majoritária, entretanto nenhum relato similar foi descrito na literatura, sendo um caso a ser investigado futuramente. Devido à ausência do produto desejado, essa molécula foi retirada das etapas de avaliação seguintes.

As reações que conduziram a formação de **3**, **8** e **12** obtiveram rendimentos baixos (4%, 4% e 3%, respectivamente). As reações não obtiveram precipitados, sendo necessário a utilização de cromatografia flash (coluna) para o isolamento, partindo do meio reacional bruto, o que gerou uma menor massa. As análises das CCDs para essas reações indicaram a presença de vários intermediários, com fatores de retenções próximos, tal fato dificultou o isolamento do produto desejado, e uma vez que se buscou apenas as frações puras, um menor rendimento foi obtido.

A caracterização das acridinonas foi realizada através de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional (^1H e ^{13}C) e, em alguns casos bidimensional (HSQC), além da espectroscopia na região do infravermelho (IV).

Devido as semelhanças estruturais das acridinonas, apenas uma foi escolhida para ter seu RMN discutido, de forma representativa para a série. A figura 14 mostra o espectro de hidrogênio para a molécula **7**, enquanto a figura 15 mostra o espectro de carbono da mesma molécula. Importante destacar que para todas as moléculas a análise de carbono realizada foi DEPT-Q (*distortionless enhancement by polarization transfer*), que tem como característica os sinais referentes a CH_3 e CH estarem inferior a linha de base, enquanto CH_2 e C estão superiores a linha de base. Ambos os espectros foram realizados com dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como solvente. Os espectros referentes a todas as acridinonas encontram-se nos anexos 1 a 40 (páginas 199 à 238) e as atribuições dos sinais pode ser encontrada no tópico materiais e métodos.

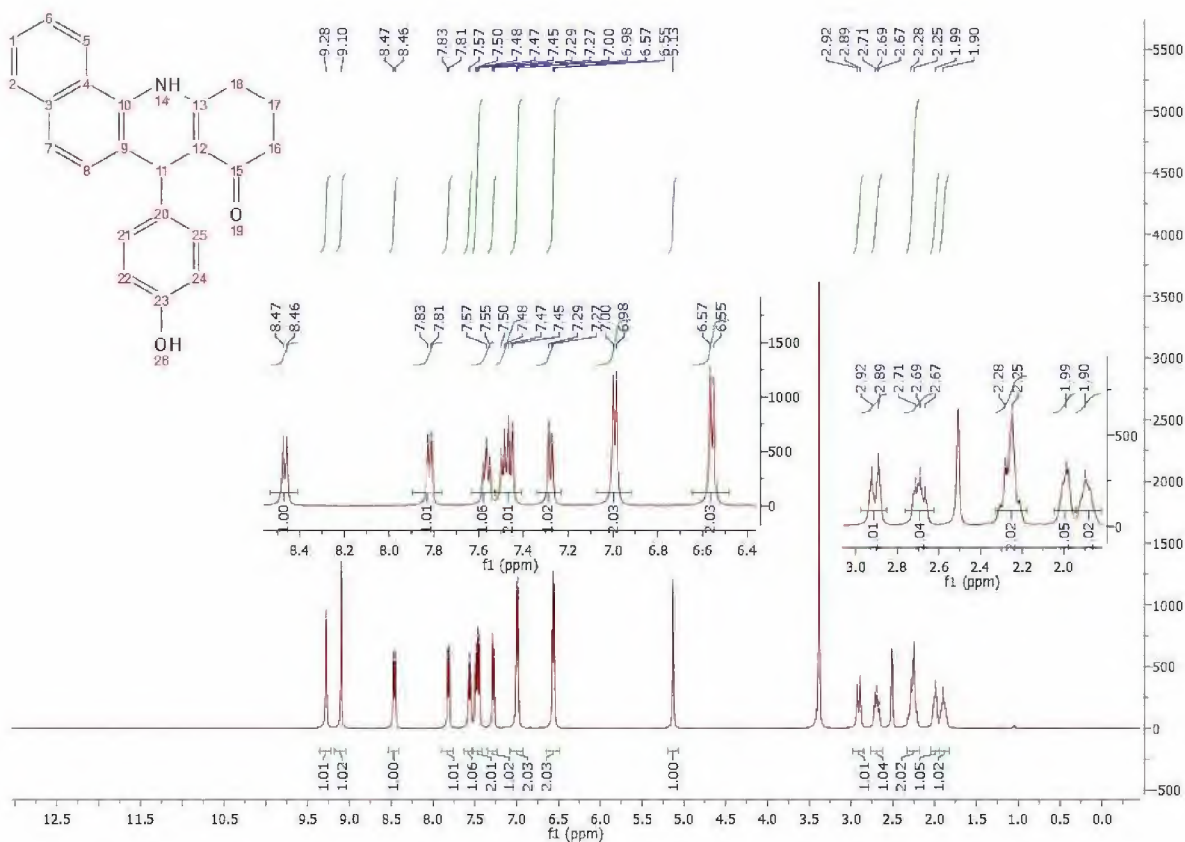


Figura 14: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO-d_6) para molécula **7**. Fonte: Elaborada pela autora.

Para a caracterização da molécula **7** o simpleto em δ_H 5,13 ppm foi o mais significativo do espectro, uma vez que esse sinal não está presente nos reagentes (α -naftilamina, 1,3-ciclohexanodiona e 4-hidroxibenzaldeído). Esse sinal é referente ao hidrogênio metínico ligado ao carbono 11 e indicando que houve a ciclização para formar o produto.

No intervalo com deslocamentos entre 1,90 e 2,92 ppm foi possível observar 4 multipletos e 1 duplete, referentes a 6 hidrogênios dos três metilenos alifáticos (CH₂ 16, 17 e 18). Os dois multipletos em δ_H 1,90 e δ_H 1,99 ppm são referentes aos hidrogênios ligados ao carbono 17, e aparecem com deslocamentos diferentes devido ao ambiente químico distinto atribuído a posições pseudo-equatorial e pseudo-axial do cicloexano. O multipletto em δ_H 2,25-2,28 ppm é referente ao hidrogênio 16, que estão em campo magnético baixo (são mais desprotegidos) devido ao efeito anisotrópico da carbonila. Já o multipletto em δ_H 2,69 ppm e o duplete em δ_H 2,89-2,92 ppm são referentes aos hidrogênios ligados ao carbono 18, que também possuem posições pseudo-equatorial e pseudo-axial que leva a uma diferença no ambiente químico, além da desproteção que ocorre pela proximidade com a dupla ligação.

Os dupletos (δ_H 6,57-6,55 e δ_H 7,00-6,98 ppm) com integração para 2 hidrogênios cada, são referentes aos 4 hidrogênios do anel aromáticos (21, 22, 24 e 25) presentes no anel 4-hidroxifenil, indicando um sistema *para*-substituído do tipo AA'BB'. O duplete em δ_H 6,57-6,55 ppm refere-se aos hidrogênios ligados aos carbonos 22 e 24, que são protegidos graças ao efeito doador da hidroxila em *orto*. Enquanto, o duplete em campo mais baixo é referente aos hidrogênios ligados aos carbonos 21 e 25, uma vez que o efeito doador da hidroxila gera uma proteção pouco efetiva na posição meta.

Os sinais entre 7,27 e 8,47 ppm são referentes aos hidrogênios do sistema naftaleno (1, 2, 5, 6, 7 e 8) e são comuns para todas as acridinonas que possuem a α -naftilamina como reagente. Os simpletos em δ_H 9,10 e 9,28 ppm são referentes ao hidrogênio da hidroxila (26) e ao hidrogênio ligado ao nitrogênio (14), respectivamente, que por estarem ligados a heteroátomos mais eletronegativos são mais desprotegidos.

O espectro de carbono (figura 15) para a molécula **7** tem o sinal mais representativo com deslocamento químico 39,50 ppm, sendo referente ao carbono assimétrico 11. Esse sinal indica que houve a ciclização e não está presente nos reagentes (α -naftilamina, 1,3-ciclohexanodiona e 4-hidroxibenzaldeído).

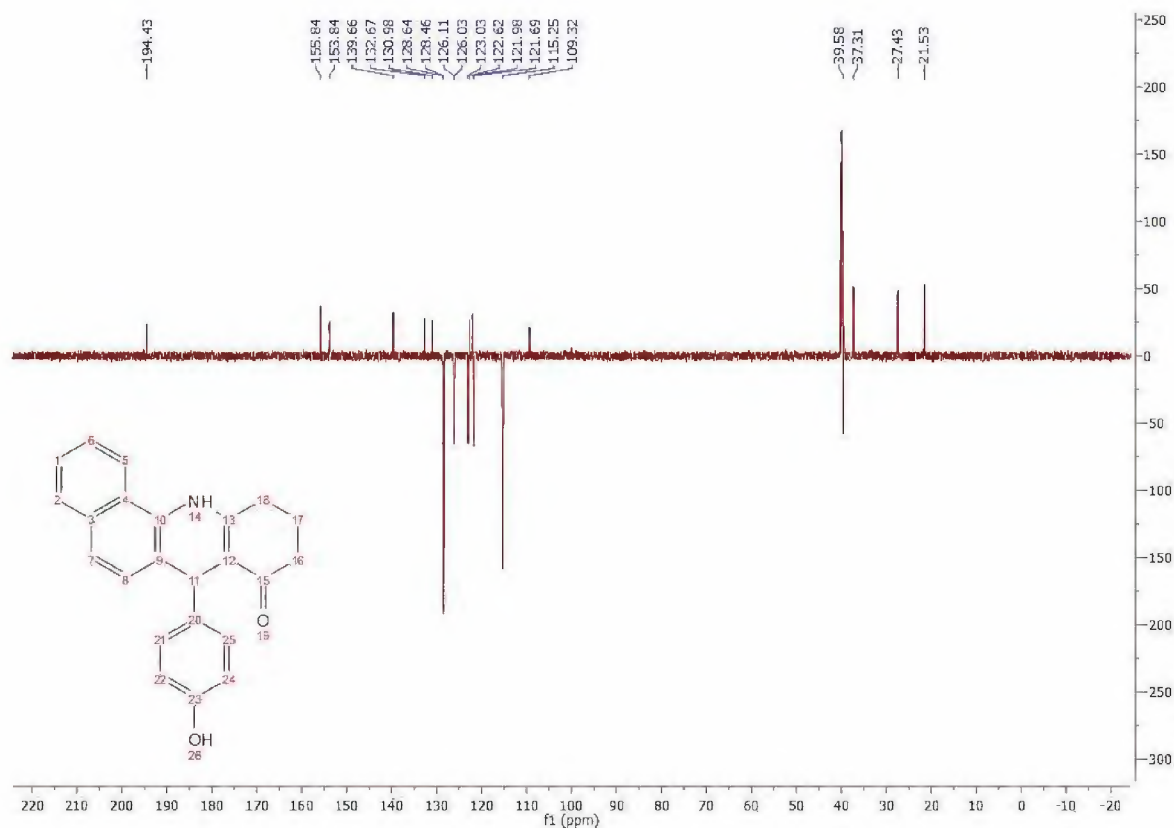


Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula 7. Fonte: Elaborada pela autora.

Os três sinais com menores deslocamentos do espectro (δ_{C} 21,5; 27,4; 37,3 ppm) são referentes aos três carbonos metilênicos alifáticos (16, 17 e 18), sendo o sinal δ_{C} 21,5 ppm referente ao carbono 17; o sinal δ_{C} 27,5 ppm referente ao carbono 18; e o sinal δ_{C} 37,3 ppm referente ao carbono 16.

O espectro mostra que temos 7 sinais referentes a carbonos metínicos, com deslocamentos químicos entre 115,2 e 128,6 ppm. Os sinais δ_{C} 115,2 e δ_{C} 128,4 são referentes a dois carbonos cada um, pois são provenientes do anel 4-hidroxifenil. Sendo os carbonos 22 e 24 responsáveis pelo sinal com menor deslocamento químico e os carbonos 21 e 25 responsáveis pelo sinal com maior deslocamento químico. Os outros sinais são referentes aos carbonos metínicos provenientes do anel naftaleno.

Os carbonos quaternários são responsáveis pelos sinais acima da linha de base com deslocamentos químicos entre 109,3 e 194,4 ppm. Dentro desse intervalo de deslocamento estão inclusos os sinais de todos os carbonos quaternários provenientes do anel naftaleno, além dos

carbonos quaternários 12 e 13 e o carbono carbonílico 15, que possui o maior deslocamento químico (194,4 ppm).

A 1,3-ciclohexanodiona gera sinais específicos no espectro de hidrogênio que aparecem em todas as acridinonas, porém, para os compostos que utilizam como amina a α -naftilamina, o sinal referente aos hidrogênios ligados ao carbono 3, aparece de maneira separada, sendo cada multiplete referente a um hidrogênio, enquanto quando utiliza-se 3,4-metilenodioxianilina, esse sinal aparece em um sinal único. A figura 16 exemplifica esse efeito, utilizando a molécula **3** e a molécula **16** (que possuem o mesmo aldeído) como exemplo. Tal fato deve-se a influência do ciclo 1,3-dioxolano que impede distorção do sinal, não gerando assim um posicionamento pseudo-axial e pseudo-equatorial.

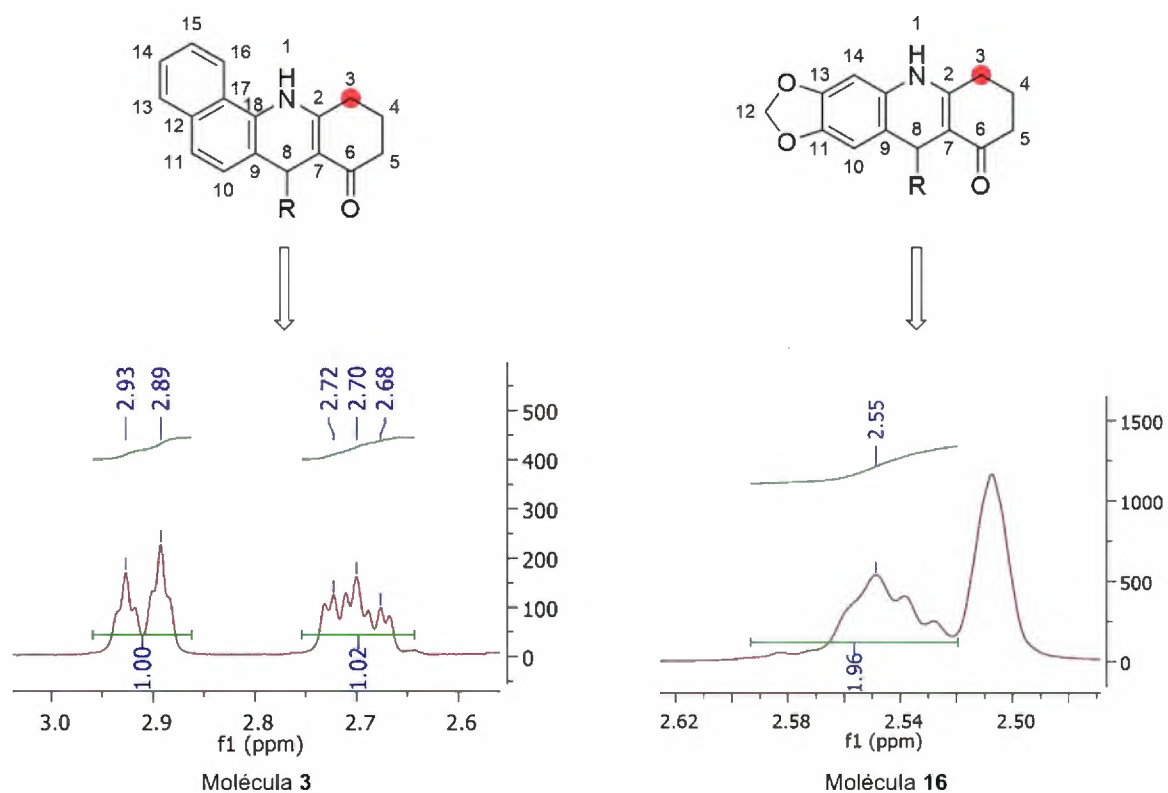


Figura 16: Comparação dos sinais referentes a 1,3-ciclohexanodiona. Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos que possuem o anel tetrahydrobenzoacridinona possuem sinais característicos com valores de deslocamentos químicos com pouca variação. Alguns sinais são de difíceis atribuições, sendo sua atribuição auxiliada por valores teóricos esperados para as moléculas. Quando avaliados os dois compostos que possuem o anel

tetrahidrodioxoloacridinona (molécula **15** e **16**), é possível observar, também, a presença de sinais similares, tendo dois destaques. O primeiro é que o sinal referente ao hidrogênio ligado ao centro assimétrico aparece na forma de um duplete, devido à proximidade com o anel 1,3-dioxolano, gerando um desdobramento no sinal. O segundo é que o sinal referente ao hidrogênio do CH₂ do anel dioxolano, também aparece na forma de um duplete, devido ao ambiente químico distinto dos dois hidrogênios.

O sinal mais representativo do espectro é o que indica a ciclização, sendo referente ao centro assimétrico, seu deslocamento químico padrão é em aproximadamente 40 ppm no espectro de carbono. O solvente utilizado (DMSO-d₆) possui o sinal referente ao solvente também em 40 ppm. Essa similaridade no deslocamento químico faz com que, em alguns casos, esse sinal não apareça no espectro de carbono. Quando esse fato ocorre, o espectro 2D HSQC auxilia na confirmação do sinal, mostrando a correlação entre o hidrogênio (H8; δ_H 5,16 ppm) e um carbono (C8; δ_C aproximado 40 ppm), como mostra a figura 17, referente a molécula **9**.

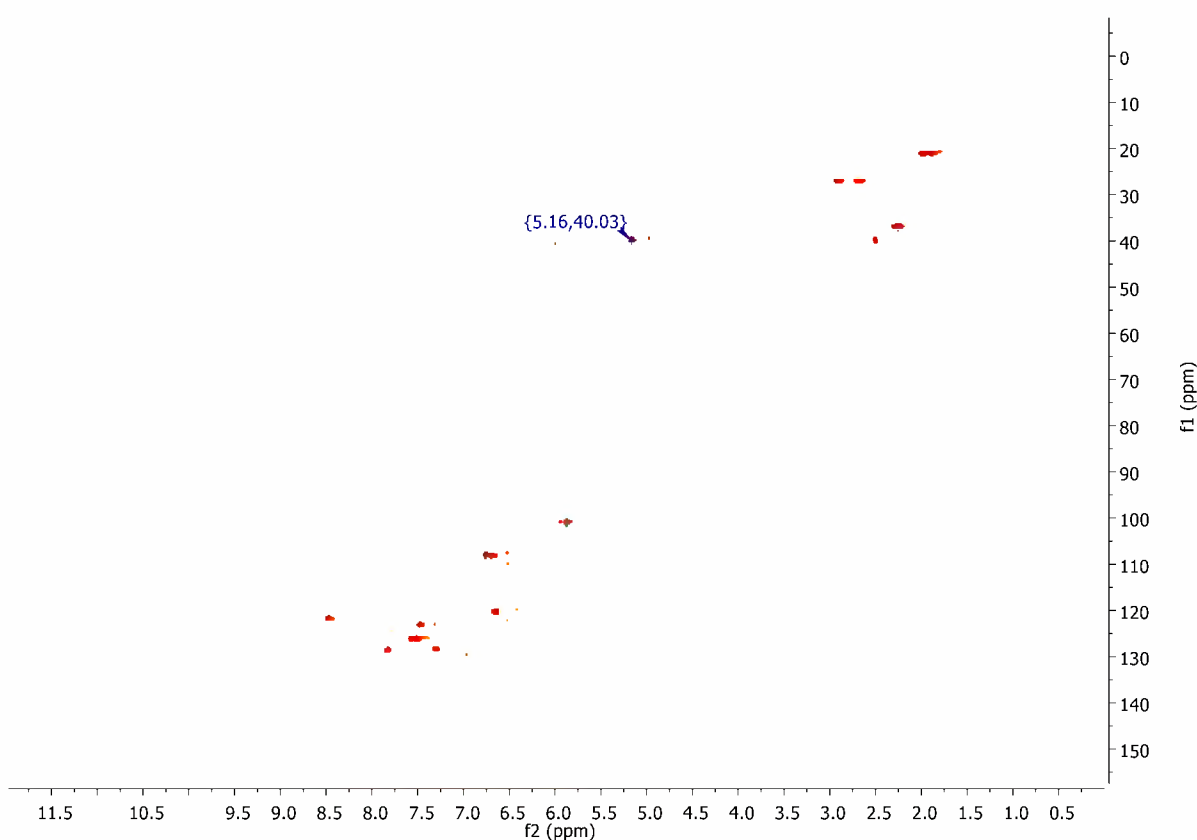


Figura 17: Espectro de RMN 2D HSQC 500 MHz (DMSO-d₆) para molécula **9**. Fonte:
Elaborada pela autora.

O segundo destaque é para a molécula **12**, que possui um anel aromático substituído na posição *para* com o flúor. O flúor possui um núcleo com spin 1/2, assim como o hidrogênio, o que permite o acoplamento spin-spin entre átomos de flúor e átomos vizinhos, causando um desdobramento nos sinais de RMN dos núcleos vizinhos. Esse efeito de desdobramento é sinalizado em preto para ser observado mais claramente no espectro de carbono da molécula **12** (figura 18). Os sinais mais desdobrados são justamente referentes ao carbono que possui o flúor diretamente ligado, os dois sinais se encontram com deslocamento químico em 159 e 161 ppm; porém os sinais referentes aos carbonos na posição beta e gama ao flúor também possuem um desdobramento devido a essa proximidade, sendo os sinais δ_C 129,2 e δ_C 129,3 ppm referentes aos carbonos gama em relação ao flúor (por isso um desdobramento menor) e os sinais δ_C 115,1 e δ_C 115,3 ppm referentes aos carbonos beta em relação ao flúor (gerando um desdobramento maior, devido à proximidade).

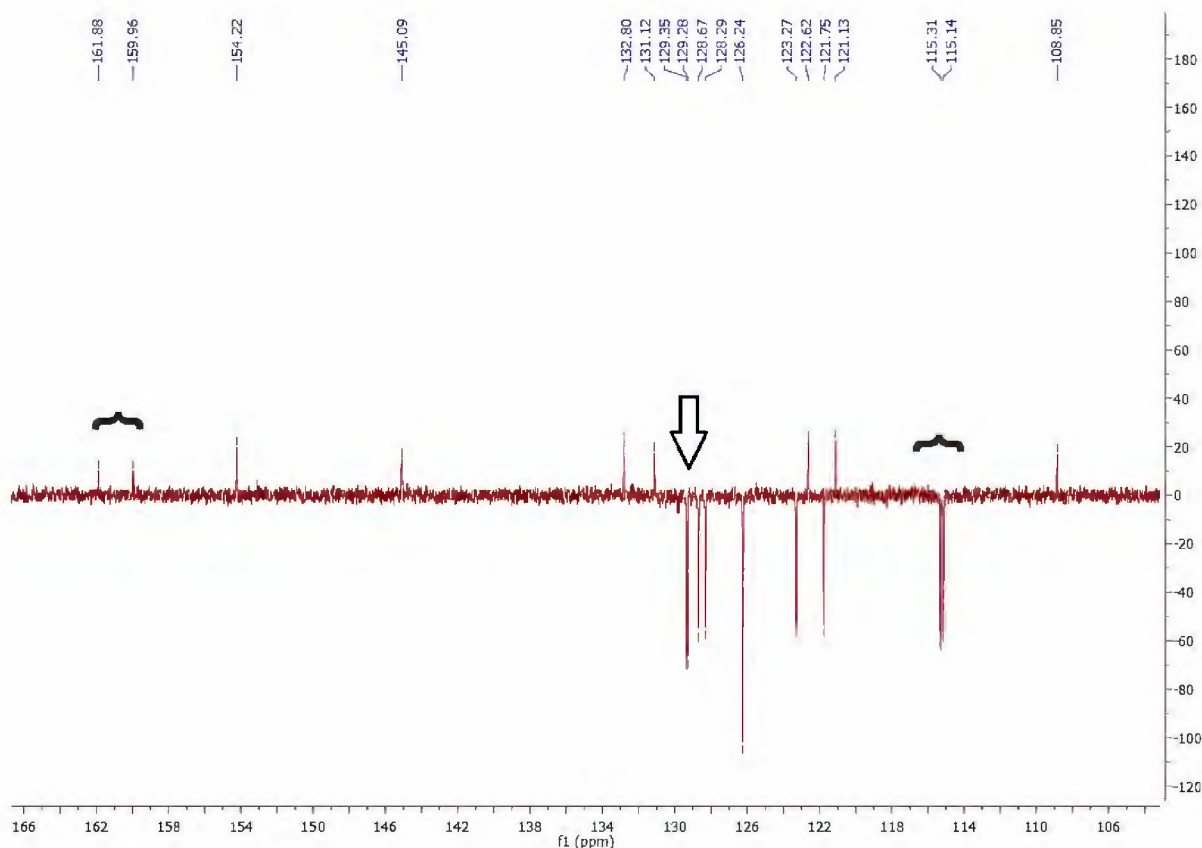


Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) expandido para molécula **12**. Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro de hidrogênio também possui um desdobramento visualizado para os hidrogênios conectados ao carbono beta e gama em relação ao flúor, sendo possível ver um tripleto (δ_H 6,98 a 7,01 ppm referente aos hidrogênios conectados ao carbono beta em relação ao flúor) e um multipletto (δ_H 7,22 a 7,24 ppm referente aos hidrogênios conectados ao carbono gama em relação ao flúor), quando o esperado era dois dupletto (padrão AA'BB') (figura 19).

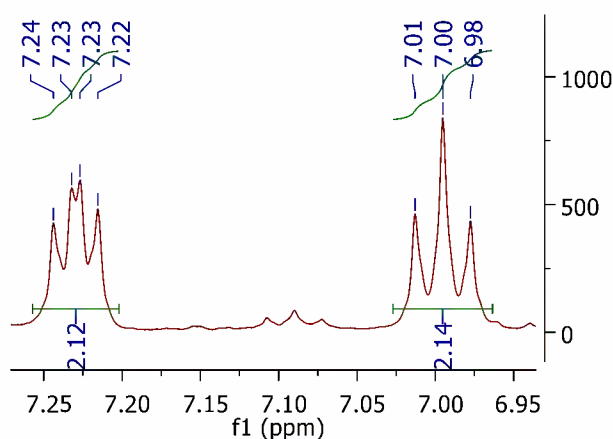


Figura 19: Expansão do espectro 1H RMN para a molécula **12**. Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros no infravermelho foram utilizados para complementar o entendimento a respeito das estruturas das acridinonas e confirmação adicional dos grupos funcionais presentes, por esse motivo o espectro obtido para a molécula **1** (figura 20), foi escolhido para ser representativo para a série (com as bandas mais representativas destacadas por letras), e algumas particularidades dos outros compostos serão exemplificadas. Todos os espectros de infravermelho podem ser vistos nos anexos 41 a 48 (páginas 239 à 246).

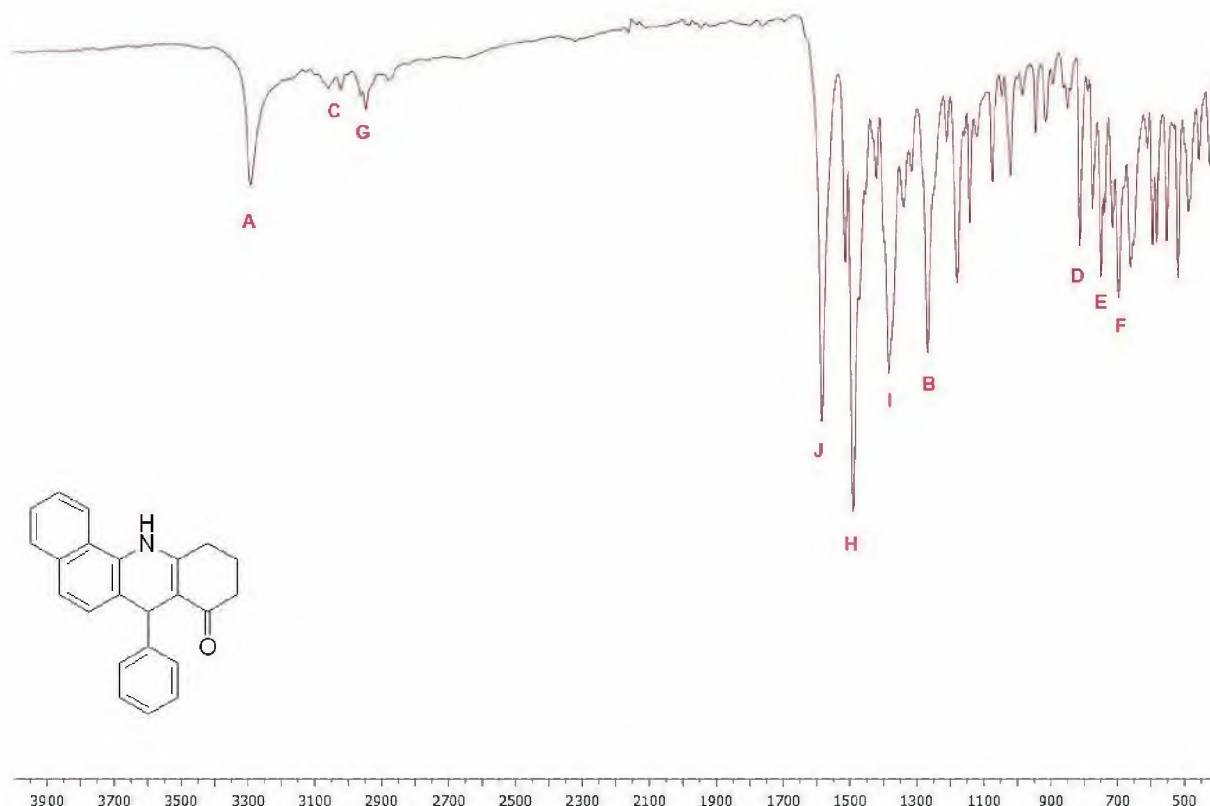


Figura 20: Espectro no IV para molécula **1**. Fonte: Elaborada pela autora.

As bandas referentes a presença do N-H são características em todos os espectros. A banda em 3300 cm^{-1} (**A**) é característica da deformação axial de N-H. Por ser uma amina secundária conjugada, sua banda de deformação angular é mais dificilmente observada no espectro e pode-se estar sobreposta por outras bandas por ser de intensidade fraca. As vibrações de deformação axial de C-N nas aminas secundárias aparecem na região de absorção $1350\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$ (**B**).

As bandas referentes as regiões aromáticas também são bem características. As bandas de deformação axial de C-H de aromáticos ocorre na faixa $3010\text{-}3040\text{ cm}^{-1}$, sendo geralmente bandas fracas e encobertas (**C**). Na faixa entre $2000\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ é comum o aparecimento de bandas fracas de combinação e de harmônicas que pode auxiliar no padrão de substituição do anel, porém a presença de dois sistemas aromático, como no caso da acridinona **1**, dificulta essa visualização. Três bandas distintas ajudam na confirmação dos sistemas aromáticos. A banda em aproximadamente 810 cm^{-1} (**D**) é característica da deformação angular em anéis naftaleno,

enquanto as bandas em aproximadamente 755 cm^{-1} (**E**) e 695 cm^{-1} (**F**) são referentes a deformação angular no anel aromático monossustituído.

A deformação axial simétrica e assimétrica para os metilenos presentes na molécula ocorrem na região abaixo de 3000 cm^{-1} (**G**), na faixa entre $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$. A deformação angular simétrica no plano gera uma banda característica que no caso da molécula **1** aparece em 1480 cm^{-1} (**H**), enquanto as bandas de deformação angular assimétrica no plano aparecem na região de 720 cm^{-1} . As absorções de deformação angular simétrica e assimétrica fora do plano pode ser visualizada em aproximadamente 1380 cm^{-1} (**I**).

A vibração de deformação axial de carbonilas gera uma banda característica. A banda referente a deformação axial na cicloexanona é esperada na região de 1700 cm^{-1} , porém, no caso das acridinonas, por estarem conjugadas a frequência diminui gerando uma banda em 1580 cm^{-1} (**J**).

Alguns padrões presentes nas outras acridinonas da série também podem ser destacados. Para as acridinonas **2**, **3**, **4**, **5**, **9**, **14**, **15** e **16**, a presença de um éter gera bandas características. A primeira é devido a deformação axial assimétrica de C-O-C e aparece entre $1200\text{-}1275\text{ cm}^{-1}$, enquanto a deformação axial simétrica de C-O-C gera uma banda mais fraca entre $1012\text{-}1075\text{ cm}^{-1}$. A deformação axial de C-H de metilas também está presente na região entre $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$. Para as acridinonas **4** e **7**, não é possível observar a banda de deformação axial de O-H na faixa de $3550\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$, gerada pela presença de hidroxila livre, entretanto, uma banda larga, pouco intensa e com menor frequência (aproximadamente 3000 cm^{-1}) se sobrepõe aos sinais de estiramento de CH aromático e de metileno, indicando ligações de hidrogênio intermolecular. A deformação axial de C-O e a deformação angular no plano de O-H podem acoplar, simultaneamente, com a vibração de deformação axial do C-C adjacente e com a vibração de deformação angular simétrica fora do plano de C-H. A deformação axial de C-O leva então à formação de uma banda forte entre $1000\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$, enquanto a deformação angular de O-H pode levar a formação de uma banda na faixa de $1260\text{-}1410\text{ cm}^{-1}$. Ácidos carboxílicos, como na molécula **11**, também apresentam banda de deformação axial de O-H em aproximadamente 3000 cm^{-1} com sobreposição das bandas de deformação axial de C-H, além uma banda devido a vibrações de deformação axial de C=O na faixa de $1680\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$. A presença de halogênios, como nas moléculas **8** e **12**, também geram bandas específicas provenientes das vibrações de deformação axial da ligação carbono-halogênio. Os compostos bromados possuem bandas na região entre $690\text{-}515\text{ cm}^{-1}$ e os anéis benzênico monofluorados leva a formação de uma banda

característica em aproximadamente 1230 cm^{-1} . Anéis heteroaromáticos, como o tiofeno presente na molécula **13**, possuem uma banda de deformação axial de C-H na faixa de $3003\text{--}3077\text{ cm}^{-1}$, enquanto as bandas provenientes de deformação axial de C-S são de baixa intensidade e com pouco valor no auxílio de determinação de estruturas. As deformações axiais, simétricas e assimétricas, no grupo NO_2 , presente no composto **10**, provoca duas bandas, uma entre $1499\text{--}1661\text{ cm}^{-1}$ (deformação assimétrica) e outra entre $1259\text{--}1389\text{ cm}^{-1}$ (deformação simétrica). Já a vibração de deformação axial de C-N produz uma banda em aproximadamente 870 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

3.2. Avaliação anticolinesterase

Os ensaios de inibição foram realizados através do método de Ellman para avaliar a atividade inibitória das acridinonas frente as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. A AChE e a BChE são as enzimas responsáveis pela hidrólise da acetiltiocolina ($\text{R} = \text{CH}_3$) e butiriltiocolina [$\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$], respectivamente, para produzir a tiocolina (figura 21). A produção de tiocolina representa a atividade enzimática efetiva. Posteriormente, o reagente cromógeno DTNB [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)] reage com os grupos tiol livres da tiocolina, produzindo um composto de cor amarela (TNB – ácido 2-nitro-4-tiobenzóico) e ácido 2-nitro-3-mercaptotiobenzóico. O TNB é monitorado e pode ser quantificado espectrofotometricamente pela absorção à 412 nm , sendo diretamente proporcional à hidrólise da acetiltiocolina ou butiriltiocolina (WOREK; EYER; THIERMANN, 2012).

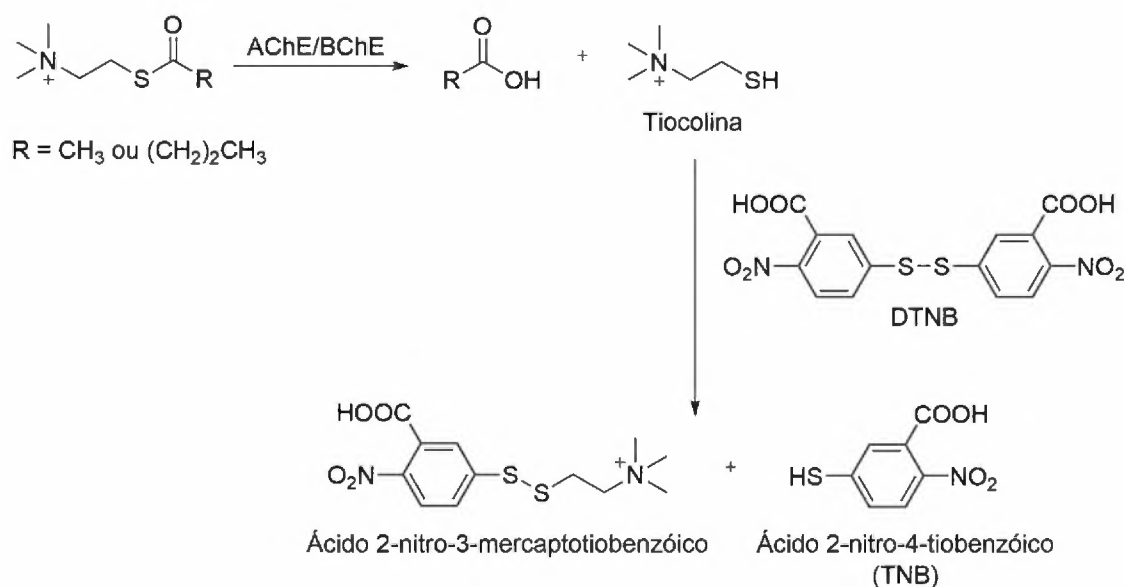


Figura 21: Reação ocorrida no ensaio de Ellman. Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores de CI_{50} para as acridinonas, assim como a seletividade encontram-se na tabela 2. No caso da seletividade, considera-se seletivo para uma enzima quando a inibição é menor que $10\mu M$, na representação “A” representa uma seletividade para AChE, “B” representa uma seletividade para BChE e “M” representa uma inibição mista (valor de inibição menor que $10\mu M$ para as duas enzimas).

Tabela 2: Resultados de inibição, LE e LLE para as acridinonas frente a acetil e butirilcolinesterase.

ACR	CI_{50} (μM)		Seletividade	LE	LLE	LE	LLE
	AChE	BChE		AChE	AChE	BChE	BChE
1	$4,01\pm 0,57$	>10	A	0,295	0,0008	-	-
2	$9,22\pm 0,41$	>10 (44%)	A	0,255	-0,28	-	-
3	$5,06\pm 0,53$	$3,12\pm 0,05$	M	0,27	-0,02	0,28	0,19
4	$7,33\pm 0,60$	>10	A	0,25	0,56	-	-
5	>10 (43%)	$1,75\pm 0,12$	B	-	-	0,28	0,70
7	$9,33\pm 0,61$	$4,94\pm 0,20$	M	0,265	0,30	0,28	0,58
8	$5,21\pm 0,68$	$3,61\pm 0,43$	M	0,28	-0,975	0,29	-0,82
9	$7,30\pm 0,19$	$3,74\pm 0,32$	M	0,25	-0,22	0,265	0,066
10	$6,41\pm 0,25$	$1,97\pm 0,09$	M	0,25	0,05	0,28	0,57
11	>10 (43%)	>10	-	-	-	-	-
12	$8,13\pm 0,53$	>10	A	0,27	-0,45	-	-
13	$7,96\pm 0,39$	$2,44\pm 0,36$	M	0,29	0,06	0,32	0,57
14	>10 (44%)	$0,99\pm 0,12$	B	-	-	0,265	1,31
15	$8,86\pm 0,25$	>10	A	0,27	0,82	-	-
16	$8,46\pm 0,64$	>10	A	0,27	0,84	-	-

Duas métricas são valiosas para química medicinal, são elas: LE (*ligand efficiency*) e LLE (*lipophilicity ligand efficiency*). LE é uma medida que expressa a energia de ligação entre um candidato a fármaco e seu sítio de ligação, considerando a sua potência e tamanho (através da quantidade de átomos pesados). Seu cálculo segue a equação abaixo, onde AP significa o número de átomos pesados (todos os átomos presentes na molécula excluindo-se os hidrogênios). Compostos maiores podem levar a um maior número de interações, porém, essas

interações nem sempre refletem em eficiência. Como a LE não diferencia interações polares e não polares, e é importante entendermos se a adição de novos átomos ou grupos funcionais em uma molécula estão levando a um aumento de interações específicas, uma segunda métrica foi introduzida: LLE (HEVENER et al., 2018; SHULTZ, 2014).

$$LE = \frac{[1,37 * (-\log CI_{50})]}{AP}$$

A LLE é uma medida que avalia a energia de ligação, mas levando em consideração a lipofilicidade. Interações hidrofóbicas são pouco específicas e podem levar a efeitos *off-target* em etapas futuras do desenvolvimento de um fármaco, por isso uma métrica que leve em consideração a lipofilicidade é valiosa. Seu cálculo é através da equação abaixo onde o valor de clogP pode ser obtido por software como ChemDraw® (HEVENER et al., 2018; SHULTZ, 2014).

$$LLE = (-\log CI_{50}) - clogP$$

As duas métricas auxiliam na avaliação de um *hit*, uma vez que compostos com interações mais eficientes têm maior probabilidade de avançar nas etapas de desenvolvimento de fármacos (HEVENER et al., 2018; SHULTZ, 2014). Os valores de LE e LLE em relação as duas enzimas, encontram-se na tabela 2, sendo desconsiderados os valores quando o valor de inibição é maior que 10µM.

O valor de LE estabelecido como ideal para um composto “*drug-like*” seria acima de 0,3 kcal/mol/átomo pesado. Valores de LE abaixo de 0.3 podem indicar que a interação do composto com o sítio de interação não é tão eficiente, sugerindo que o número de átomos pesados está alto, ou que sua afinidade é relativamente baixa. Em termos práticos, significa que uma molécula com peso molecular igual a 500 e 38 átomos pesados, precisaria ter uma afinidade, ou potência de 0,01 µM para ser considerada “*drug-like*” (HOPKINS et al., 2014; SCOTT; WARING, 2018).

O valor de LLE estabelecido como ideal para um candidato a fármaco é aproximadamente 5, porém, considerando moléculas *lead-like*, em estágios mais iniciais no desenvolvimento de fármaco, o valor estabelecido é 3. Um valor de LLE elevado indica que a molécula é eficiente em termos de atividade biológica sem ser excessivamente lipofílica, o que é desejável para boas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Enquanto valores próximos a 0 indicam que o composto tem maior afinidade com octanol do que com água,

significando uma alta lipofilicidade e dependência de interações hidrofóbicas inespecíficas para a potência, o que podem acarretar efeitos *cjff-target* e toxicidade (HOPKINS et al., 2014; SCOTT; WARING, 2018).

Apesar dos valores obtidos para a inibição enzimática em ambas as enzimas estarem dentro da mesma ordem de grandeza, alguns resultados podem ser destacados. Os resultados *in vitro* mostram que molécula **1**, possui a melhor atividade em AChE ($CI_{50} = 4,01 \pm 0,57\mu M$) e uma seletividade para essa enzima. Os resultados mostram que a inserção de substituintes no anel aromático proveniente do aldeído leve a uma menor atividade em AChE, entretanto, em alguns casos uma melhor atividade em BChE. Tal fato está dentro do esperado uma vez o sítio de ligação para a butirilcolinesterase é maior que o da acetilcolinesterase, permitindo assim a inserção de grupos variados no anel fenílico quando se busca a atividade em BChE.

Ao analisar as moléculas com metoxilas (moléculas **2** e **3**) e hidroxila (molécula **7**) como substituintes no anel aromático proveniente do aldeído, é possível destacar que a substituição na posição 4 do anel (moléculas **3** e **7**) favorecem o perfil de inibição frente as duas enzimas, levando a inibição mista. Já a substituição na posição 3 do anel aromático (molécula **2**), gera uma menor atividade em acetilcolinesterase, mas uma seletividade frente à essa enzima. Além disso, os resultados sugerem que o substituinte metoxila é preferível uma vez que a inibição nas duas enzimas é maior para a molécula **3** quando comparada com a molécula **7**. Quando a substituição ocorre nas duas posições, 3-metoxila e 4-hidroxila (molécula **4**) e 3,4 dimetoxila (molécula **5**), é possível destacar que a dupla substituição, sendo uma hidroxila na posição 4 (molécula **4**) gera uma melhora na atividade em AChE quando comparado com as moléculas **2** e **7** (monossubstituídas na posição 4), e uma seletividade frente a essa enzima, assim como é visto para a molécula **2** (com substituinte apenas na posição 3). Já quando a metoxila é inserida nas duas posições (molécula **5**), uma melhor atividade em BChE é observada, e uma seletividade para essa enzima. A molécula **14**, que possui metoxilas nas posições 2, 3 e 4, também possui o mesmo perfil da acridinona **5**, com o melhor valor de inibição da butirilcolinesterase ($CI_{50} = 0,99 \pm 0,12\mu M$), reforçando o dado que o sítio de ligação dessa enzima seja maior e permita inserção de grupos mais volumosos.

A acridinona **9**, apesar de ser substituída nas posições 3 e 4 do anel aromático, possui um ciclo metilenodioxo, o que promoveu uma perda de atividade e de seletividade para a butirilcolinesterase, e conferiu a essa molécula uma atividade em acetilcolinesterase equipotente a encontrada na molécula **4** (4-hidroxi-3-metoxi substituída). A inserção de

substituintes retiradores de elétrons (bromo, flúor ou carboxila – moléculas **8**, **12** e **11** respectivamente) na posição 4 do anel aromático geraram efeitos diversos. A molécula **11**, com a carboxila na posição 4, perdeu a atividade inibitória frente as duas enzimas. A inserção de flúor na posição 4 (acridinona **12**) mostrou-se mais ativa em acetil se comparada com a ACR **7** (4-hidroxifenil) e menos ativa que a molécula **3** (4-metoxifenil), entretanto, essa substituição gerou uma seletividade frente a acetilcolinesterase como vista anteriormente nas moléculas com substituintes na posição 3. A acridinona **8**, que possui o bromo como substituinte na posição 4, demonstrou ser equipotente a molécula **3** (que possui metoxila na posição 4), frente as duas enzimas, indicando que a metoxila pode ser substituída pelo bromo.

Ao utilizar-se 3-nitrofenil como substituinte (molécula **10**), obteve-se uma inibição mista, apesar de ser substituído na posição 3, com a inibição em BChE ($CI_{50} = 1,97 \pm 0,09\mu M$) maior que em AChE ($CI_{50} = 6,41 \pm 0,25\mu M$), sendo a terceira melhor inibição em BChE, abaixo apenas das moléculas **5** e **14**. Ao utilizar-se um heterociclo de 5 membros (3-tiofeno – molécula **13**), obteve-se uma seletividade mista, mas, assim como na molécula **10**, com melhores valores para BChE (CI_{50} em AChE = $7,96 \pm 0,39\mu M$; CI_{50} em BChE = $2,44 \pm 0,36\mu M$), tal fato pode ser devido a presença do enxofre, que possibilita a interações específicas nos sítios de ligações, sendo uma possível justificativa para os resultados em AChE da molécula **13** serem melhores que o da molécula **12**, que possui o flúor (pequeno e de tamanho similar ao hidrogênio) como substituinte. Essa teoria será explorada na avaliação *in silico*. Os valores similares à molécula **10** indicam que a substituição por esse heterociclo seja tolerado e possa ser utilizada estrategicamente para evitar toxicidade relacionada a grupos nitro.

Quando a amina utilizada é a 3,4-metilenodioxianilina (acridinonas **15** e **16**), há uma melhora da atividade inibitória frente a acetilcolinesterase quando o substituinte do anel aromático, proveniente do aldeído, é o 3-metoxifenil (comparando acridinonas **2** e **15**) mantendo a seletividade frente a acetilcolinesterase. Entretanto, quando o substituinte do anel aromático, proveniente do aldeído, é o 4-metoxifenil, comparando as acridinonas **3** e **16**, há uma piora na atividade frente a acetilcolinesterase e a perda de inibição frente a butirilcolinesterase. Tal fato demonstra que a utilização da 3,4-metilenodioxianilina é tolerável apenas quando se busca seletividade em acetilcolinesterase e permite futuras investigações.

Os valores encontrados de inibição para as moléculas analisadas são considerados promissores. A inibição encontrada é muitas vezes equipotente ao perfil de inibição da rivastigmina (IC_{50} AChE=9.94 μm ; IC_{50} BChE=2.86 μm), e mesmo que seja pior quando

comparado com a inspiração Tacrina (IC_{50} AChE=0.25 μ m; IC_{50} BChE=0.05 μ m), ainda são compostos promissores por pertencerem a uma primeira etapa de avaliação, serem passíveis de otimizações e serem comparáveis com outros compostos da literatura (ZHOU et al., 2018).

Tendo em vista os valores estabelecidos como ideias para LE e LLE em etapas iniciais do desenvolvimento de um fármaco (0,3 e 3, respectivamente), é possível chegar a algumas conclusões a respeito das moléculas testadas. Quando analisamos os valores obtidos de LE, para ambas as enzimas, vemos que apenas uma molécula possui valores maiores que 0,3 kcal/mol, a molécula **13**, e somente para BChE (LE AChE = 0,29kcal/mol; LE BChE = 0,32kcal/mol). Excluindo-se a molécula **13**, apenas a molécula **1** possui um valor de LE em AChE próximo a 0,3kcal/mol (0,295kcal/mol), enquanto em BChE temos apenas a acridinona **8** (LE BChE = 0,29kcal/mol). Tais resultados mostram que a melhor molécula em relação a eficiência de interação é a acridinonas **13**, pois tem os melhores valores em ambas as enzimas. As outras acridinonas possuem valores pouco atrativos. Tal fato deve-se ao número extenso de átomos que não refletem em uma maior potência.

Quando analisamos os valores de LLE, em ambas as enzimas, vemos que todos os valores estão bem abaixo do considerado ideal, sendo alguns valores menores até do que 0. O melhor valor de LLE foi em BChE para a molécula **14** (LLE BChE = 1,31). Os valores, bem abaixo do ideal, reforçam que a lipofilicidade das acridinonas é elevada, levando a uma potência baseadas em interações não específicas.

Os resultados de LE e LLE para ambas as enzimas mostram que apesar da atividade inibitória das acridinonas, as moléculas precisam passar por etapas de otimização para diminuir o número de átomos pesados e a lipofilicidade para que assim possam progredir para etapas além da atual de química exploratória.

Uma tabela com estruturas e todas as atividades avaliadas para as moléculas pode ser encontrada no anexo 49 (página 247).

3.3. Avaliação *in silico* das Acridinonas

De modo a compreender os resultados de atividade inibitória, frente as duas enzimas, encontradas na avaliação *in vitro* e expandir o entendimento a respeito das possíveis interações entre a enzima e as moléculas, um estudo *in silico* foi realizado. O ancoramento molecular foi realizado utilizando um modelo cristalográfico disponíveis no *Protein data bank* (ID: 7XN1

para AChE e 1P0I para BChE), ambos para enzimas humanas, sendo o modelo para AChE co-cristalizado com a Tacrina, e utilizando o programa GOLD. O sítio de interação utilizado para AChE foi o mesmo ao qual a Tacrina estava co-cristalizada com um raio de 6Å (DILEEP et al., 2022; NACHON et al., 2013); para BChE utilizou-se como referência o trabalho de Hamulakova e colaboradores que estabeleceu como ponto de partida para o sítio de interação o ponto com as coordenadas $x=138,7$; $y=116,3$; $z=41,0$, também com um raio de 6Å (HAMULAKOVA et al., 2012; NICOLET et al., 2003).

A validação para AChE foi realizada através de redocking da Tacrina. A acetilcolinesterase foi validada (RMSD, *root mean square deviation*, médio de 20 rodadas de 0,862). O RMSD é importante pois avalia a posição dos átomos do ligante pós-docking em comparação com o ligante co-cristalizado, sendo ideal valores menores que 2 Å. A função de pontuação CHEMPLP foi a melhor função de pontuação, além de ter apresentado uma boa sobreposição com a Tacrina co-cristalizada. Desta forma, a função CHEMPLP foi escolhida para os procedimentos subsequentes de atracamento molecular em acetilcolinesterase. Em BChE foi utilizada a Tacrina como ligante (por 20 rodadas) para definir a melhor função de pontuação, sendo escolhida a CHEMPLP (*score* médio = 45.05) para a avaliação da acridinonas.

As duas enzimas possuem similaridades que precisam ser destacadas. Ambas possuem uma região aniônica periférica (PAS) e uma tríade catalítica (CAS). O PAS atua como uma fenda até a região do CAS, e no CAS é onde ocorre a hidrólise do neurotransmissor. As dimensões dessas regiões são distintas nas duas enzimas, enquanto na AChE a fenda possui aproximadamente 20Å de profundidade e cerca de 5Å de largura na parte mais estreita, a BChE é mais amplo, com uma fenda com cerca de 20Å de profundidade, e aproximadamente 8-10Å de largura. Tal fato é o que confere mais especificidade para hidrólise que ocorre na AChE. A figura 22 mostra os resíduos de aminoácidos que formam a região PAS e CAS nas enzimas. O conhecimento dessas regiões auxilia no entendimento das interações primordiais que ocorrem entre as moléculas e as enzimas levando a atividade inibitória (CHALUPOVA et al., 2019; POURSHOJAEI et al., 2019; ROSENBERRY et al., 2017).

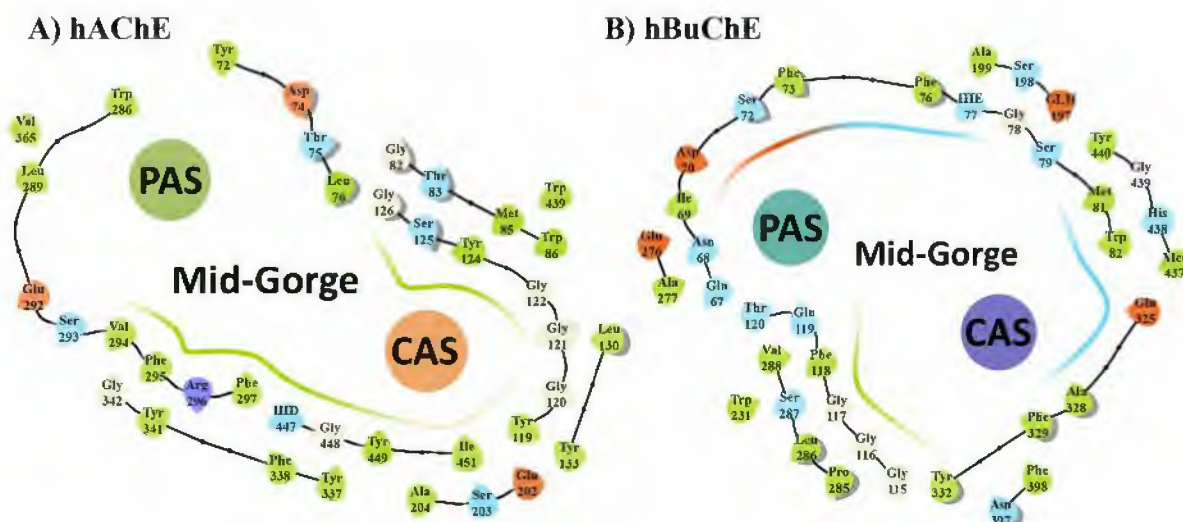


Figura 22: Resíduos de aminoácidos que envolvem a região PAS e CAS nas enzimas acetilcolinesterase (A) e butirilcolinesterase (B). Fonte: Pourshojaei et al., 2019.

As acridinonas são obtidas na forma de mistura racêmica. Enantiômeros podem apresentar propriedades biológicas distintas. O isômero mais potente é chamado eutômero, já o isômero que apresenta menor atividade é denominado distômero. O distômero pode ser inativo, menos ativo ou, em alguns casos, até antagonista ou tóxico (H. BROOKS; C. GUIDA; G. DANIEL, 2011; ZHANG et al., 2005). Como as interações variam de acordo com o enantiômero, o ancoramento molecular foi realizado tendo como ligantes a própria Tacrina e os dois enantiômeros de cada uma das 15 acridinonas obtidas, por 20 rodadas. Importante destacar que a presença de um distômero inativo ou antagonista pode levar a uma correlação falha em relação a atividade *in vitro*, sendo mais acurada a comparação com uma avaliação *in vitro* dos enantiômeros isolados. Devido a caráter exploratório do trabalho, a separação dos enantiômeros não foi realizada e a ferramenta de ancoramento molecular foi utilizada apenas para tentar compreender as interações principais que ocorrem entre as acridinonas e as enzimas, justificando assim alguns padrões.

O ancoramento molecular gerou 20 confôrmeros com posicionamento variados dentro do sítio de ligação, gerando interações com resíduos de aminoácidos presentes no CAS, no PAS e com resíduos que não fazem parte do sítio de ligação. Entretanto, ao delimitar-se o melhor confôrmero de cada enantiômeros, em cada molécula, as interações foram analisadas e chegou-se à conclusão de que, para ambas as enzimas, algumas interações são mais recorrentes, indicando quais são os resíduos de aminoácidos primordiais para a atividade inibitória das

acridinonas. As principais interações de cada enantiômero, para cada molécula, em cada enzima, além do *score*, se encontram nos anexos 50 e 51 (páginas 252 à 256).

Para a acetilcolinesterase o resíduo de aminoácido que mais participa de interações (com menos de 6Å de distância) é o Trp⁸⁶. Esse resíduo de aminoácido presente no CAS está presente nas interações de todas as moléculas testadas, realizando interações do tipo ligações de hidrogênio convencionais, empilhamento π - π e π -alquil. Destaca-se também o Tyr³³⁷; Tyr¹²⁴ e o Tyr³⁴¹, que também estão muito presentes nas interações, sendo responsáveis interações do tipo ligações de hidrogênio convencionais, empilhamento π - π e π -alquil, além de interações: π -sigma, π -doadores de ligação de hidrogênio e π -enxofre para o Tyr³³⁷; e interações π -par de elétron livre e π -doadores de ligação de hidrogênio para Tyr¹²⁴.

Para a butirilcolinesterase os dois resíduos de aminoácido que estão presente nas interações (com menos de 6Å de distância) de todas as moléculas testadas são o Trp²³¹ e a Phe³²⁹ sendo ambos responsáveis por interações dos tipos empilhamento π - π e π -alquil. Outros resíduos frequentes são Ala³²⁸, Leu²⁸⁶ e Trp⁸².

O ancoramento molecular ajuda a explicar o fato de três moléculas apresentaram atividades inibitórias para AChE maiores que 10 μ M, são elas as moléculas **5**, **11** e **14**. Para os enantiômeros R dessas moléculas, o posicionamento dentro do sítio de ligação é o mesmo, como visto na figura 23A. Para os enantiômeros S, a molécula **14** possui um posicionamento distinto, como visto na figura 23B. Destaca-se que para as moléculas **5** e **11**, há uma ausência de ligações de hidrogênio para ambos os enantiômeros testados, enquanto para a molécula **14**, apenas o enantiômero S possui ligações de hidrogênio. A ausência das ligações de hidrogênios, que são as mais específicas, nos enantiômeros R das 3 moléculas, e nos enantiômeros S das moléculas **5** e **11** justificam a menor concentração inibitória para essas moléculas.

A similaridade no tamanho do hidrogênio e do flúor abre o questionamento do motivo que leva a molécula **1** e a **12** terem atividades tão distintas frente a acetilcolinesterase, enquanto o enxofre, presente na molécula **13**, apesar de ser grande, consegue ter uma inibição melhor do que a observada para a molécula **12**. Ao analisar os enantiômeros S (figura 24B) das moléculas **1**, **12** e **13**, vemos que todos possuem o mesmo posicionamento, porém, ao analisarmos os enantiômeros R (figura 24A) é possível ver que a moléculas **1** e **13** possuem o mesmo posicionamento, o que leva a interações similares, enquanto a **12** tem um posicionamento bem diferente, justificando assim interações distintas e uma menor atividade inibitória.

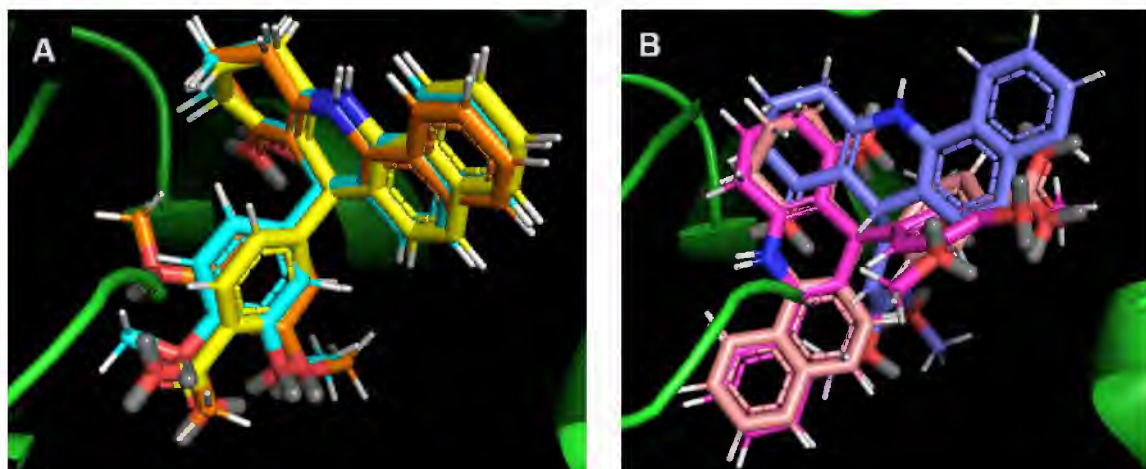


Figura 23: Comparação das moléculas **5**, **11** e **14**. **A**) Enantiômeros R das moléculas **5** (ciano), **11** (amarelo) e **14** (laranja). **B**) Enantiômeros S das moléculas **5** (rosa escuro), **11** (rosa claro) e **14** (lilás). Fonte: Elaborado pela autora.

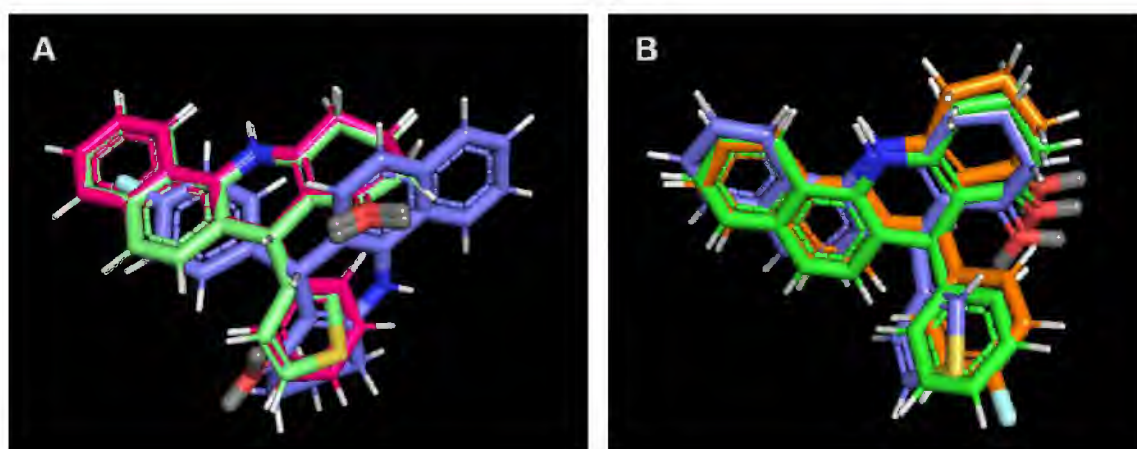


Figura 24: Comparação das moléculas **1**, **12** e **13**. **A**) Enantiômeros R das moléculas **1** (rosa), **12** (lilás) e **13** (verde). **B**) Enantiômeros S das moléculas **1** (verde), **12** (laranja) e **13** (lilás).

Fonte: Elaborado pela autora.

O mapa de interação 2D da molécula **13** exemplifica uma interação particular envolvendo o enxofre que justifica a sua atividade inibitória *in vitro*, apesar do seu tamanho. Na figura 25 vemos que tanto para acetilcolinesterase (figura 25A) quanto para butirilcolinesterase (figura 25B) o enxofre é essencial para uma interação do tipo π -enxofre, que ocorre para os dois enantiômeros na primeira enzima e no enantiômero R da segunda enzima.

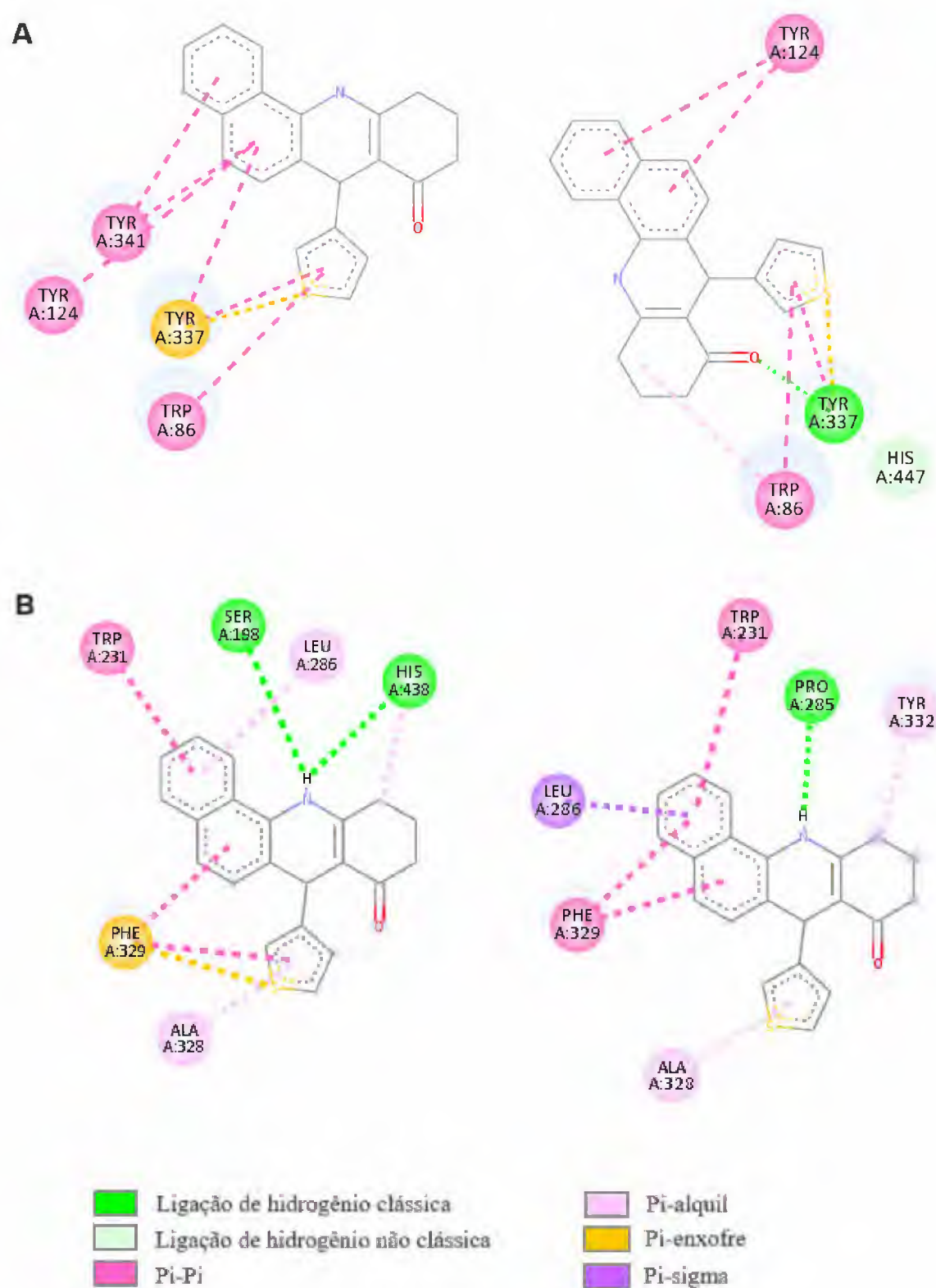


Figura 25: Mapa de interação 2D para a molécula **13**. **A**) Enantiômero R (esquerda) e S (direita) em acetilcolinesterase. **B**) Enantiômero R (esquerda) e S (direita) em butirilcolinesterase. Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados na avaliação *in silico* identificou as principais interações que ocorrem para a série de acridinonas sintetizadas, entretanto, uma correlação direta com os resultados *in vitro* é impossível de ser feita devido à ausência de resultados *in vitro* com os enantiômeros isolados. Portanto, uma perspectiva para o presente trabalho é isolar os enantiômeros dos compostos e assim poder utilizar o ancoramento molecular de modo mais efetivo.

3.4. Ensaio ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) – perfil antioxidante

Uma vez que a atividade antioxidante é conhecidamente valiosa no desenvolvimento de fármacos para doenças degenerativas, a ação antioxidante das acridinonas sintetizadas foi determinada. Para tal determinação utilizou-se o ensaio ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), que se baseia na inibição da oxidação induzida por radicais peróxido, gerados pela decomposição térmica de azocompostos como o dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH). O Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), um derivado hidrossolúvel da vitamina E, é utilizado como padrão de referência. Durante o ensaio, o sinal de fluorescência da fluoresceína é quantificado. Quando há uma presença de ROS (espécies reativas de oxigênio), há uma rápida oxidação da fluoresceína, gerando um decaimento na fluorescência. A adição de moléculas antioxidantes provoca uma estabilização do sinal de fluorescência devido a interrupção no processo de oxidação. Comparando o efeito observado com o efeito causado pelo Trolox®, podemos determinar a capacidade antioxidante dos novos compostos. A capacidade antioxidante dos compostos é expressa em unidades equivalentes de Trolox® em uma concentração fixa (CARDOSO; BRITES; BRITO, 2010; VAN ASPEREN et al., 1997). Foi medida a fluorescência em função do tempo e com concentrações fixas dos compostos (10; 5; 2,5 e 1 μM). A medida de fluorescência é realizada com um aparelho FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Offenburg, Alemanha). Os valores obtidos para atividade antioxidante, em relação a equivalentes de Trolox®, encontra-se na tabela 3.

Tabela 3: Resultados da atividade antioxidante das acridinonas.

Molécula	Ativ.	Molécula	Ativ.	Molécula	Ativ.
Antioxidante		Antioxidante		Antioxidante	
1	1,68±0,21	2	1,87±0,33	3	1,85±0,14
4	2,91±0,41	5	2,39±0,17	7	3,20±0,04
8	1,28±0,09	9	1,60±0,20	10	1,26±0,15
11	1,94±0,01	12	1,70±0,08	13	1,48±0,10
14	1,21±0,13	15	0,95±0,07	16	0,97±0,09

Uma vez que o Trolox® é utilizado como padrão, os resultados considerados favoráveis devem possuir um valor de atividade antioxidante maior que 1, ou seja, maior que atividade do padrão Trolox®. Dentre as acridinonas, apenas 2 apresentaram resultados menores que 1 no ensaio ORAC. Essas duas acridinonas (**15** e **16**) são justamente as duas que possuem o anel 1,3-dioxolano, o que indica que, ao buscar-se atividades antioxidantes, a utilização da 3,4-metilenodioxianilina não é favorável. As outras acridinonas apresentaram resultados variados sendo a molécula **7** o composto com a melhor atividade antioxidante, seguida da molécula **4**. Destaca-se que os melhores resultados são justamente para as acridinonas que possuem grupos hidroxilas na posição 4. Tal fato está de acordo com o esperado uma vez que hidroxilas fenólicas podem doar um átomo de hidrogênio ao radical livre, neutralizando-o. A ressonância do anel aromático permite a estabilização dos radicais livres, reduzindo sua reatividade, diminuindo seu potencial de causar dano celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Com exceção das acridinonas **15** e **16**, todas as outras acridinonas apresentam uma atividade antioxidante promissora, o que permite futuras investigações das moléculas em relação a essa atividade.

3.5. Ensaio PAMPA – perfil de penetração no sistema nervoso central

A barreira hematoencefálica (BBB – *Blood brain barrier*) é uma estrutura complexa de células endoteliais presente no cérebro, que atua como uma interface entre o sangue e o sistema nervoso central. Essa barreira tem a função de proteção do sistema nervoso central, pois atua no controle das trocas entre os compartimentos sanguíneo e cerebral, filtrando substâncias

possivelmente prejudiciais. As vias de transporte transmembrana são limitadas, a maioria dos compostos que têm como alvo o SNC atravessam a barreira por difusão passiva, entretanto, uma vez que a BBB é extremamente seletiva, a sua presença gera um obstáculo no desenvolvimento de fármacos que atuem no SNC (CARDOSO; BRITES; BRITO, 2010; VAN ASPEREN et al., 1997).

O ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela (PAMPA) é uma técnica de alto rendimento desenvolvida para prever a permeabilidade passiva através de membranas biológicas. Para explorar a capacidade dos compostos de penetrar no cérebro, utilizamos o método PAMPA-BBB descrito por Di et al. (DI et al., 2003), que emprega uma membrana lipídica cerebral suína. As permeabilidades *in vitro* (*Pe*) de medicamentos comerciais através do extrato de membrana lipídica, juntamente com as acridinonas, foram determinadas e descritas na tabela 4.

Duas métricas são importantes de serem consideradas quando avaliamos a permeabilidade, são elas: clogP e tPSA. O clogP é o valor calculado para o coeficiente de partição octanol-água e representa a lipofilicidade de uma molécula. Quanto maior o clogP, mais lipofílica é a molécula. A tPSA (*topological polar surface area*) é a soma da superfície sobre os átomos polares presentes na molécula, considerando uma imagem bidimensionais. Essa superfície polar pode gerar ligações de hidrogênio e influenciarem diretamente a permeabilidade, por isso, quanto maior o valor de tPSA, maior a polaridade da molécula e, portanto, ocorre uma menor permeabilidade. Os valores dessas duas métricas são indicados, para cada molécula, na tabela 4 (RGDSCIENCE, 2024; ARNOTT; PLANEY, 2012).

Uma validação do ensaio foi realizada comparando os valores de permeabilidade, relatados na literatura, para medicamentos comerciais com os dados experimentais obtidos empregando esta metodologia. Uma boa correlação entre os valores experimentais e descritos foi obtida e a equação da reta para essa correlação (demonstrada abaixo). A partir dessa equação e seguindo o padrão estabelecido na literatura para previsão de permeabilidade em BBB (CRIVORI et al., 2000), foi possível classificar os compostos como SNC+ quando apresentam uma permeabilidade maior que $4.48 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$.

$$Pe \text{ (experimental)} = 1.4631 \text{ (bibliografia)} - 1.3714 \text{ (} R^2 = 0.979 \text{)}$$

Tabela 4: Resultados do ensaio de penetração no sistema nervoso central.

Composto	Valor de referência^a	Pe (10^{-6} cm.s⁻¹)^b	Predição	cLogP	tPSA
Atenolol	0.8	0.2 ± 0.1		-0.1086	84.58
Cafeína	1.3	0.9 ± 0.1		-0.0403	56.22
Desipramina	12	14.6 ± 0.6		4.468	15.27
Enoxacin	0.9	0.2 ± 0.1		-1.5963	85.24
Hidrocortisona	1.9	1.1 ± 0.8		1.8872	94.83
Ofloxacin	0.8	0.4 ± 0.3		-0.5078	73.32
Piroxicam	2.5	0.5 ± 0.1		1.888	99.07
Promazina	8.8	12.7 ± 1.3		4.599	6.48
Testosterona	17	21.8 ± 4.0		3.409	37.3
Verapamil	16	24.6 ± 1.5		4.466	63.95
1		-	-	5.396	29.1
2		-	-	5.315	38.33
3		12.3 ± 1.3	SNC+	5.315	38.33
4		0.4 ± 0.4	SNC-	4.5782	58.56
5		6.4 ± 0.4	SNC+	5.054	47.56
7		7.1 ± 3.0	SNC+	4.729	49.33
8		14.2 ± 7.6	SNC+	6.259	29.1
9		-	-	5.361	47.56
10		5.9 ± 6.5	SNC+	5.139	80.91
11		0.3 ± 0.1	SNC-	5.139	66.4
12		2.3 ± 2.1	SNC+ / SNC-	5.539	29.1
13		5.5 ± 0.1	SNC+	5.042	29.1
14		2.9 ± 0.8	SNC+ / SNC-	4.6961	56.79
15		7.7 ± 0.1	SNC+	4.2348	56.79
16		6.2 ± 0.5	SNC+	4.2348	56.79

^aFonte: DI et al., 2003. ^bResultados são a média $\pm$ desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Considerando fármacos que atuam no sistema nervoso central, e precisam ultrapassar a barreira hematoencefálica, condições mais específicas são necessárias. Devido as características estruturais da barreira, moléculas menores e mais lipofílicas são ideais para conseguir atingir o sistema nervoso central, entretanto, uma lipofilicidade excessiva pode aumentar a afinidade com transportadores de efluxo. Considerando esses fatores e a necessidade de uma lipofilicidade equilibrada, é possível determinar valores teóricos indicados para clogP e tPSA de moléculas planejadas para atravessar a barreira hematoencefálica, esses valores são: $\text{clogP} > 3$ e $\text{tPSA} < 75\text{\AA}$ (ARNOTT; PLANEY, 2012; WAGER et al., 2010).

Os valores de clogP para todas as acridinonas avaliadas foram maiores que 3, sendo que 10 das 15 acridinonas avaliadas possuem valores de clogP maiores de 5. Tal fato corrobora a alta lipofilicidade das moléculas devido a presença do anel acridinona. A lipofilicidade alta também auxilia na permeabilidade. Os valores obtidos de tPSA foram $< 75\text{\AA}$, como o ideal, para 14 das 15 acridinonas testadas, sendo mais alto que $75\text{\AA}$ apenas para a molécula **10**, devido a presença do grupo nitro.

As moléculas **1**, **2** e **9** precipitam nas condições experimentais empregadas, portanto, não foi possível determinar a permeabilidade. Com base nesses resultados, podemos considerar que as acridinonas **3**, **5**, **7**, **8**, **10**, **13**, **15** e **16**, são as que possuem a permeabilidade maior que $4.48 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$, portanto, são as acridinonas capazes de atravessar a BBB por permeação passiva e as mais promissoras em relação a esse ensaio. Apesar do valor de tPSA superior a $75\text{\AA}$ na molécula **10**, ainda sim a molécula possui uma permeabilidade na barreira hematoencefálica. As acridinonas **12** e **14** tiveram uma permeabilidade média, sendo considerada SNC+ / SNC-, o que significa que parte da concentração inicial atravessa a BBB e parte não atravessa. Enquanto as acridinonas **4** e **11** não ultrapassam a barreira, as tornando pouco promissoras. Esses resultados reforçam que as ferramentas computacionais visam auxiliar o desenvolvimento de fármacos, entretanto, é necessário analisá-las em conjunto e associando com os resultados de ensaios *in vitro* para tomada de decisão.

Os resultados gerais das avaliações *in vitro* e *in silico* das acridinonas apresentados podem ser considerados interessantes. Pelo conjunto de resultados, as moléculas **3**, **5**, **7**, **12** e **13**, foram selecionadas para posteriores ensaios de citotoxicidade e proteção neural. Apesar de resultados promissores, a acridinona **14** foi descartada pelo seu perfil citotóxico já comprovado previamente (MAGALHAES et al., 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese das Acridinonas

Todas as acridinonas foram sintetizadas no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As aminas aromáticas utilizadas nas sínteses foram: α -naftilamina (CAS: 134-32-7) e 3,4-metilenodioxianilina (CAS: 14268-66-7). O dicarbonilado utilizado nas sínteses foi a 1,3-ciclohexanodiona (CAS: 504-02-9). Os aldeídos utilizados nas sínteses foram: benzaldeído (CAS: 100-52-7); 3-metoxibenzaldeído (CAS: 591-31-1); 4-metoxibenzaldeído (CAS: 123-11-5); vanilina (CAS: 121-33-5); 3,4-dimetoxibenzaldeído (CAS: 120-14-9); 3-hidroxibenzaldeído (CAS: 100-83-4); 4-hidroxibenzaldeído (CAS: 123-08-0); 4-bromobenzaldeído (CAS: 1122-91-4); 3-nitrobenzaldeído (CAS: 99-61-6); 4-fluorbenzaldeído (CAS: 459-57-4); 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (CAS: 86-81-7); piperonal (CAS: 120-57-0); ácido 4-formilbenzóico (CAS: 619-66-9); 3-tiofenocarboxaldeído (CAS: 498-62-4).

Os solventes utilizados, etanol absoluto, metanol, isopropanol, diclorometano, acetato de etila, n-hexano e dimetilsulfóxido deuterado, foram fornecidos pela Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

As reações foram acompanhadas através da cromatografia em camada delgada analítica (CCD), com placas de sílica gel Merck 60 F254 de 0,25 mm de espessura (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), utilizando como eluente mistura de hexano e acetato de etila (75%) e analisando na câmara de luz UV (254 ou 366 nm) CN-15LC (Vilber Lourmat, Collégien, França).

A purificação dos compostos realizada por cromatografia em coluna flash utilizou cromatografia líquida de adsorção em coluna, no equipamento Isolera da Biotage®, modelo ISO-4SV (IQ-UFRRJ). Para a confecção da pastilha, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). E como fase móvel, foram utilizadas as misturas solventes de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto.

4.1.1. Protocolo 1

Em um tubo reacional adiciona-se 1 mmol da 1,3-ciclohexanodiona, 1 mmol do aldeído, 2 mmol de uma amina primária aromática, 3 mL de solvente (isopropanol) e um agitador magnético. A reação é levada a uma chapa de aquecimento e agitação, com a temperatura e

agitação controladas (refluxo, 82°C) por 24h. A formação do produto é confirmada por cromatografia de camada delgada. O isolamento e purificação ocorrem através da filtração a vácuo do precipitado formado, seguida de recristalização em etanol, para obtenção do produto puro a ser caracterizado.

4.1.2. Protocolo 2

Em um tubo reacional adiciona-se 1 mmol da 1,3-ciclohexanodiona, 1 mmol do aldeído, 1 mmol de uma amina primária aromática, 3 mL de solvente (etanol) e um agitador magnético. A reação é levada a uma chapa de aquecimento e agitação, com a temperatura e agitação controladas (refluxo, 75°C) por 24h. A formação do produto é confirmada por cromatografia de camada delgada. O isolamento e purificação ocorrem através cromatografia em coluna flash utilizando o equipamento isolera (Biotage®). A pastilha para a coluna é formada pelo produto cru da reação e sílica gel. As fases móveis para as colunas podem ser misturas de diclorometano e metanol ou mistura de hexano e acetato de etila, de forma gradiente. As frações puras do produto desejado são evaporadas e o produto puro é caracterizado.

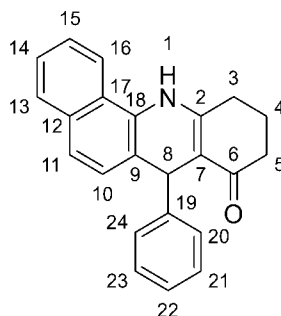
4.1.3. Caracterização das moléculas

Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C), além de análises 2D (HSQC), realizadas em um espectrômetro da marca Brüker de 500MHz (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C), modelo Ultrashield Plus da Central Analítica Multiusuário- PPGQ – UFRRJ, usando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) como solvente e tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm).

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados em um aparelho da marca MS Tecnopon, modelo PFM II. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Brüker, modelo FT-IR Vertex 70, pela técnica de ATR na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Ambos os equipamentos pertencentes ao Instituto de Química da UFRRJ.

As atribuições dos carbonos e hidrogênios obtidos no espectro de RMN de carbono e hidrogênio, assim como o rendimento e pontos de fusão das moléculas, são descritos a seguir.

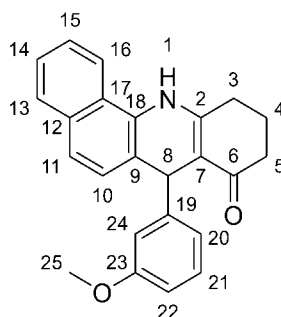
- **Composto 1** – 7-fenil-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido branco obtido com 21% de rendimento e ponto de fusão de 240-245°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.35 (H1 – s, 1H), 8.49-8.47 (H16 – d, 1H, *J* = 8.48 Hz), 7.83-7.81 (H11 – d, 1H, *J* = 7.82 Hz), 7.59-7.58-7.56 (H14 – t, 1H, *J* = 7.58 Hz), 7.51-7.49-7.47-7.46 (H13 e H15 – m, 2H), 7.32-7.30 (H10 – d, 1H, *J* = 7.31 Hz), 7.23-7.22 (H21 e H23 – d, 2H), 7.19-7.17-7.16 (H20 e H24 – t, 2H), 7.07-7.05-7.04 (H22 – t, 1H, *J* = 7.05 Hz), 5.25 (H8 – s, 1H), 2.95-2.91 (H3 – m, 1H), 2.74-2.71-2.69 (H3 – m, 1H), 2.30-2.25 (H5 – m, 2H), 2.00-1.99 (H4 – m, 1H), 1.90 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.4 (C6 – C; sp²), 154.2 (C2 – C; sp²), 148.8 (C19 – C; sp²), 132.7 (C18 – C; sp²), 131.1 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.6 (C21 e C23 – CH; sp²), 128.3 (C15 – CH; sp²), 127.5 (C20 e C24 – CH; sp²), 126.2 (C11 – CH; sp²), 126.2 (C22 – CH; sp²), 126.1 (C13 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 121.3 (C9 – C; sp²), 108.8 (C7 – C; sp²), 40.5 (C8 – CH; sp³), 37.2 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

- **Composto 2** – 7-(3-metoxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido branco obtido com 33% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 229-233°C.

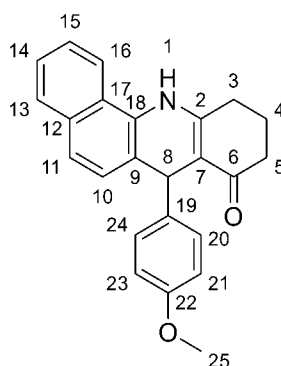


¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.34 (H1 – s, 1H), 8.48-8.46 (H16 – d, 1H, *J* = 8.47 Hz), 7.83-7.82 (H11 – d, 1H, *J* = 7.83 Hz), 7.59-7.57-7.56 (H14 – t, 1H, *J* = 7.57 Hz), 7.51-7.49-7.48-7.46 (H13 e H15 – m, 2H), 7.35-7.33 (H10 – d, 1H, *J* = 7.34 Hz), 7.10-7.09-7.07 (H21 – t, 1H, *J* = 7.09 Hz), 6.79 (H24 e H20 – sl, 2H), 6.65-6.63 (H22 – d, 1H, *J* = 6.64 Hz), 5.21 (H8

– s, 1H), 3.66 (H25 – s, 3H), 2.95-2.91 (H4 – m, 1H), 2.74-2.71-2.68 (H3 –, 1H), 2.30-2.26-2.23 (H5 – m, 2H), 1.99 (H4 – m, 1H), 1.91 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.4 (C6 – C; sp²), 159.5 (C23 – C; sp²), 154.2 (C2 – C; sp²), 150.3 (C19 – C; sp²), 132.7 (C18 – C; sp²), 131.0 (C12 – C; sp²), 129.6 (C21 – CH; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.3 (C15 – CH; sp²), 126.2 (C11 – CH; sp²), 126.1 (C13 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 121.2 (C9 – C; sp²), 119.9 (C20 – CH; sp²), 113.8 (C22 – CH; sp²), 110.9 (C24 – CH; sp²), 108.7 (C7 – C; sp²), 55.2 (C25 – CH₃; sp³), 40.4 (C8 – CH; sp³), 37.2 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

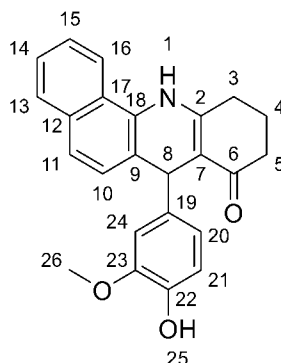
- **Composto 3** – 7-(4-metoxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido branco obtido com 4% de rendimento e ponto de fusão de 204-209°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.31 (H1 – s, 1H), 8.48-8.46 (H16 – d, 1H, *J* = 8.47 Hz), 7.83-7.82 (H11 – d, 1H, *J* = 7.82 Hz), 7.59-7.57-7.56 (H14 – t, 1H, *J* = 7.57 Hz), 7.51-7.49-7.47-7.45 (H13 e H15 – m, 2H), 7.29-7.28 (H10 – d, 1H, *J* = 7.28 Hz), 7.12-7.10 (H20 e H24 – d, 2H, *J* = 7.11 Hz), 6.74-6.72 (H21 e H23 – d, 2H, *J* = 6.73 Hz), 5.18 (H8 – s, 1H), 3.64 (H25 – s, 3H), 2.93-2.89 (H3 – m, 1H), 2.72-2.70-2.68 (H3 – m, 1H), 2.29-2.24 (H5 – m, 2H), 2.01-1.99-1.98 (H4 – m, 1H), 1.90-1.89-1.87 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.4 (C6 – C; sp²), 157.8 (C22 – C; sp²), 153.9 (C2 – C; sp²), 141.3 (C19 – C; sp²), 132.7 (C18 – C; sp²), 131.0 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.5 (C20 e C24 – CH; sp²), 128.4 (C15 – CH; sp²), 126.1 (C11 – CH; sp²), 126.1 (C13 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C9 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 113.9 (C21 e C23 – CH; sp²), 109.1 (C7 – C; sp²), 55.3 (C25 – CH₃; sp³), 37.2 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

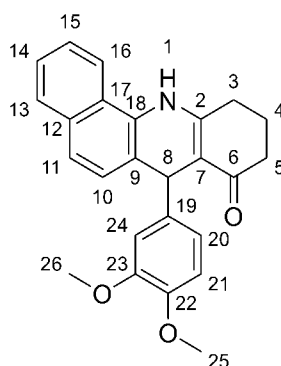
- **Composto 4** – 7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido preto obtido com 27% de rendimento e ponto de fusão de 226-230°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.30 (H1 – s, 1H), 8.67 (H25 – s, 1H), 8.46-8.45 (H16 – d, 1H, *J* = 8.46 Hz), 7.83-7.81 (H11 – d, 1H, *J* = 7.82 Hz), 7.58-7.56-7.55 (H14 – t, 1H, *J* = 7.56 Hz), 7.50-7.48-7.48-7.46 (H13 e H15 – dd, 2H), 7.37-7.35 (H10 – d, 1H, *J* = 7.36 Hz), 6.88 (H24 – s, 1H), 6.56-6.55 (H21 – d, 1H, *J* = 6.56 Hz), 6.51-6.50 (H20 – d, 1H, *J* = 6.51 Hz), 5.13 (H8 – s, 1H), 3.69 (H26 – s, 3H), 2.94-2.91 (H3 – m, 1H), 2.72-2.67 (H3 – m, 1H), 2.29-2.26 (H5 – m, 2H), 2.00 (H4 – m, 1H), 1.92-1.91 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.5 (C6 – C; sp²), 153.9 (C2 – C; sp²), 147.4 (C23 – C; sp²), 145.0 (C22 – C; sp²), 140.2 (C19 – C; sp²), 132.7 (C18 – C; sp²), 130.9 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.4 (C15 – CH; sp²), 126.1 (C11 – CH; sp²), 126.0 (C13 – CH; sp²), 123.0 (C10 – CH; sp²), 122.5 (C17 – C; sp²), 121.9 (C9 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 119.7 (C20 – CH; sp²), 115.6 (C21 – CH; sp²), 112.0 (C24 – CH; sp²), 109.1 (C7 – C; sp²), 56.0 (C26 – CH₃; sp³), 37.3 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.6 (C4 – CH₂; sp³).

- **Composto 5** – 7-(3,4-dimetoxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido branco obtido com 46% de rendimento e ponto de fusão de 233-238°C.

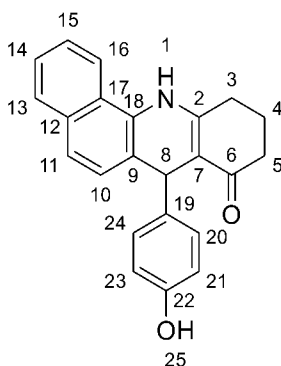


¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.32 (H1 – s, 1H), 8.47-8.46 (H16 – d, 1H, *J* = 8.46 Hz), 7.83-7.82 (H11 – d, 1H, *J* = 7.82 Hz), 7.57 (H14 – sl, 1H), 7.48 (H13 e H15 – sl, 2H), 7.37

(H10 – sl, 1H), 6.93 (H24 – s, 1H), 6.74-6.72 (H21 – d, 1H, , $J = 6.73$ Hz), 6.63 (H20 – sl, 1H), 5.18 (H8 – s, 1H), 3.68 (H26 – s, 3H), 3.62 (H25 – s, 3H), 2.94-2.91 (H3 – m, 1H), 2.73-2.71 (H3 – m, 1H), 2.27 (H3 – sl, 1H), 2.01-1.91 (H4 – m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 194.5 (C6 – C; sp²), 154.0 (C2 – C; sp²), 148.7 (C22 – C; sp²), 147.4 (C23 – C; sp²), 141.7 (C19 – C; sp²), 132.7 (C18 – C; sp²), 130.9 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.3 (C15 – CH; sp²), 126.1 (C11 – CH; sp²), 126.0 (C13 – CH; sp²), 123.0 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 121.0 (C9 – C; sp²), 119.3 (C20 – CH; sp²), 112.3 (C21 – CH; sp²), 111.7 (C24 – CH; sp²), 108.9 (C7 – C; sp²), 55.9 (CH₃; sp³), 55.8 (C4 – CH₃; sp³), 37.3 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.6 (C4 – CH₂; sp³).

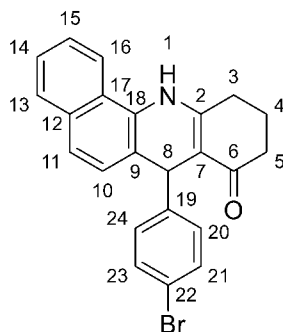
- **Composto 7** – 7-(4-hidroxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido branco obtido com 41% de rendimento e ponto de fusão de 248-253°C.



^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.28 (H1 – s, 1H), 9.10 (H25 – s, 1H), 8.47-8.46 (H16 – d, 1H, $J = 8.47$ Hz), 7.83-7.81 (H11 – d, 1H, $J = 7.82$ Hz), 7.58-7.57-7.55 (H14 – t, 1H, $J = 7.57$ Hz), 7.50-7.48-7.47-7.45 (H13 e H15 – m, 2H), 7.29-7.27 (H10 – d, 1H, $J = 7.28$ Hz), 7.00-6.98 (H20 e H24 – d, 2H, $J = 6.99$ Hz), 6.57-6.55 (H21 e H23 – d, 2H, $J = 6.56$ Hz), 5.13 (H8 – s, 1H), 2.92-2.89 (H3 – m, 1H), 2.71-2.69-2.67 (H3 – m, 1H), 2.28-2.25 (H5 – m, 2H), 1.99 (H4 – m, 1H), 1.90 (H4 – m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 194.4 (C6 – C; sp²), 155.8 (C22 – C; sp²), 153.8 (C2 – C; sp²), 139.6 (C19 – C; sp²), 132.6 (C18 – C; sp²), 130.9 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.4 (C15 C20 e C24 – CH; sp²), 126.1 (C11 – CH; sp²), 126.0 (C13 – CH; sp²), 123.0 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.9 (C9 – C; sp²), 121.6 (C16 – CH; sp²), 115.2 (C21 e C23 – CH; sp²), 109.3 (C7 – C; sp²), 39.5 (C8 – CH; sp³), 37.3 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

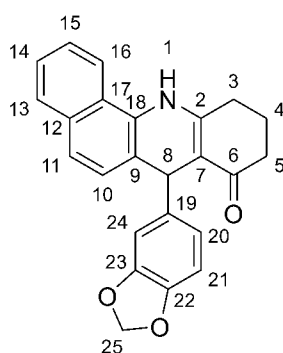
- **Composto 8** – 7-(4-bromofenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido amarelado obtido com 4% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 235-340°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.37 (H1 – s, 1H), 8.49-8.47 (H16 – d, 1H, *J* = 8.48 Hz), 7.84-7.83 (H11 – d, 1H, *J* = 7.81 Hz), 7.60-7.59-7.57 (H14 – t, 1H, *J* = 7.58 Hz), 7.52-7.51-7.49-7.47 (H13 e H15 – m, 2H), 7.38-7.36 (H10 – d, 2H, *J* = 7.37 Hz), 7.29-7.28 (H21 e H23 – d, 2H, *J* = 7.29 Hz), 7.18-7.16 (H20 e H24 – d, 2H, *J* = 7.17 Hz), 5.25 (H8 – s, 1H), 2.93-2.89 (H3 – m, 1H), 2.73-2.68 (H3 – m, 1H), 2.25 (H5 – m, 2H), 1.99 (H4 – m, 1H), 1.90 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.4 (C6 – C; sp²), 154.3 (C2 – C; sp²), 148.2 (C19 – C; sp²), 132.8 (C18 – C; sp²), 131.4 (C21 e C23 – CH; sp²), 131.1 (C12 – C; sp²), 129.9 (C20 e C24 – CH; sp²), 128.7 (C14 – CH; sp²), 128.2 (C15 – CH; sp²), 126.3 (C11 – CH; sp²), 126.3 (C13 – CH; sp²), 123.3 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 120.7 (C9 – C; sp²), 119.3 (C22 – C; sp²), 108.5 (C7 – C; sp²), 37.1 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.4 (C4 – CH₂; sp³).

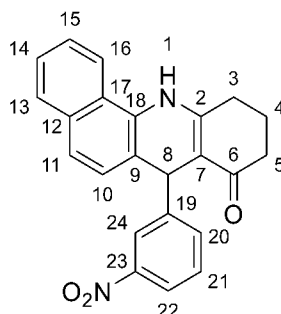
- **Composto 9** – 7-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido branco obtido com 30% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 253-258°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.33 (H1 – s, 1H), 8.48-8.46 (H16 – d, 1H, *J* = 8.47 Hz), 7.84-7.82 (H11 – d, 1H, *J* = 7.83 Hz), 7.59-7.57-7.56 (H14 – t, 1H, *J* = 7.57 Hz), 7.51-7.50-7.48-7.46 (H13 e H15 – m, 2H), 7.32-7.31 (H10 – d, 1H, *J* = 7.31 Hz), 6.77 (H24 – s, 1H), 6.71-6.70 (H20 – d, 1H, *J* = 6.71 Hz), 6.66-6.64 (H21 – d, 1H, *J* = 6.65 Hz), 5.89-5.87 (H25 – d, 2H, *J* = 5.88 Hz), 5.17 (H8 – s, 1H), 2.94-2.90 (H3 – m, 1H), 2.72-2.67 (H3 – m, 1H), 2.29-2.26 (H5 – m, 2H), 1.99 (H4 – m, 1H), 1.91 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.4 (C6 – C; sp²), 154.0 (C2 – C; sp²), 147.5 (C23 – C; sp²), 145.6 (C22 – C; sp²), 143.2 (C19 – C; sp²), 132.7 (C18 – C; sp²), 130.9 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.3 (C15 – CH; sp²), 126.1 (C11 e C13 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 121.4 (C9 – C; sp²), 120.3 (C21 – CH; sp²), 109.0 (C7 – C; sp²), 108.3 (C21 – CH; sp²), 108.1 (C24 – CH; sp²), 101.0 (C25 – CH₂; sp³), 37.2 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

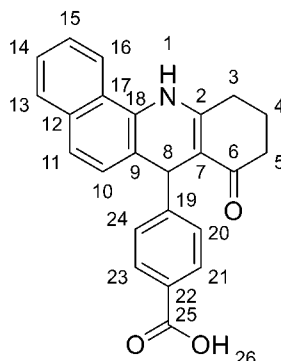
- **Composto 10** – 7-(3-nitrofenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido amarelo obtido com 40% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 288-293°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.49 (H1 – s, 1H), 8.52-8.50 (H16 – d, 1H, *J* = 8.51 Hz), 8.07 (H24 – s, 1H), 7.96-7.95 (H22 – d, 1H, *J* = 7.96 Hz), 7.85-7.84 (H11 – d, 1H, *J* = 7.84 Hz), 7.69-7.68 (H20 – d, 1H, *J* = 7.69 Hz), 7.62-7.60-7.59 (H14 – t, 1H, *J* = 7.60 Hz), 7.54-7.51-7.49 (H21, H14 e H15 – m, 3H), 7.36-7.34 (H10 – d, 1H, *J* = 7.35 Hz), 5.47 (H8 – s, 1H), 2.96-2.93 (H3 – m, 1H), 2.76-2.74-2.72 (H3 – m, 1H), 2.32-2.26-2.23 (H5 – m, 2H), 2.00 (H4 – m, 1H), 1.90 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.5 (C6 – C; sp²), 154.8 (C2 – C; sp²), 150.8 (C19 – C; sp²), 148.1 (C23 – C; sp²), 134.6 (C21 – CH; sp²), 132.9 (C18 – C; sp²), 131.2 (C12 – C; sp²), 130.2 (C20 – CH; sp²), 128.7 (C14 – CH; sp²), 128.1 (C15 – CH; sp²), 126.5 (C11 – CH; sp²), 126.4 (C13 – CH; sp²), 123.6 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 122.0 (C22 – CH; sp²), 121.8 (C16 – CH; sp²), 121.4 (C24 – CH; sp²), 120.0 (C9 – C; sp²), 108.1 (C7 – C; sp²), 40.4 (C8 – CH; sp³), 37.1 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

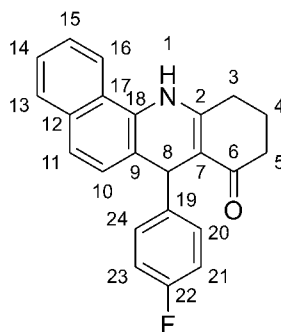
- **Composto 11** – ácido 4-(8-oxo-7,8,9,10,11,12-hexahidrobenzo[*c*]acridin-7-il)benzóico. Sólido marrom obtido com 5% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 282-287°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.77 (H26 – s, 1H), 9.39 (H1 – s, 1H), 8.50-8.49 (H16 – d, 1H, *J* = 8.49 Hz), 7.84-7.82-7.78-7.76 (H11, H21 e H23 – m, 3H), 7.60-7.59-7.57 (H14 – t, 1H, *J* = 7.59 Hz), 7.51-7.49-7.47 (H13 e H15 – m, 2H), 7.35-7.34-7.31-7.29 (H10, H20 e H24 – m, 3H), 5.33 (H8 – s, 1H), 2.95-2.91 (H5 – m, 1H), 2.72 (H5 – sl, 1H), 2.30-2.25 (H3 – m, 2H), 1.99-1.92 (H4 – m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.4 (C6 – C; sp²), 167.6 (C25 – C; sp²), 154.4 (C2 – C; sp²), 153.5 (C19 – C; sp²), 132.8 (C18 – C; sp²), 131.1 (C12 – C; sp²), 129.8 (C21 e C23 – CH; sp²), 128.8 (C22 – C; sp²), 128.7 (C14 – CH; sp²), 128.2 (C15 – CH; sp²), 127.8 (C20 e C24 – CH; sp²), 126.3 (C13 – CH; sp²), 123.3 (C11 – CH; sp²), 123.3 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 120.5 (C9 – C; sp²), 108.3 (C7 – C; sp²), 40.7 (C8 – CH; sp³), 37.1 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.4 (C4 – CH₂; sp³).

- **Composto 12** – 7-(4-fluorfenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido marrom obtido com 3% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 244-248°C.

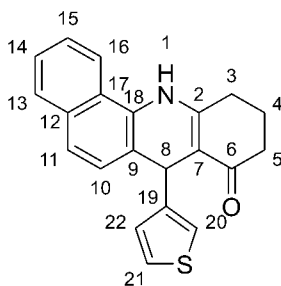


¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.36 (H1 – s, 1H), 8.49-8.48 (H16 – d, 1H, *J* = 8.49 Hz), 7.84-7.82 (H11 – d, 1H, *J* = 7.83 Hz), 7.60-7.58-7.57 (H14 – t, 1H, *J* = 7.58 Hz), 7.52-7.50-

7.49-7.47 (H13 e H15 – m, 2H), 7.31-7.29 (H10 – d, 1H, $J = 7.30$ Hz), 7.24-7.23-7.23-7.22 (H20 e H24 – dd, 2H), 7.01-7.00-6.98 (H21 e H23 – t, 2H, $J = 7.00$ Hz), 5.27 (H8 – s, 1H), 2.93-2.90 (H3 – m, 1H), 2.74-2.69 (H3 – m, 1H), 2.30-2.25 (H5 – m, 2H), 1.99 (H4 – m, 1H), 1.90 (H4 – m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 194.4 (C6 – C; sp²), 161.8-159.9 (C22 – C; sp²), 154.2 (C2 – C; sp²), 145.0 (C19 – C; sp²), 132.8 (C18 – C; sp²), 131.1 (C12 – C; sp²), 129.3-129.2 (C20 e C24 – CH; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.2 (C15 – CH; sp²), 126.2 (C11 e C13 – CH; sp²), 123.2 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 121.1 (C9 – C; sp²), 115.3-115.1 (C21 e C23 – CH; sp²), 108.8 (C7 – C; sp²), 37.2 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

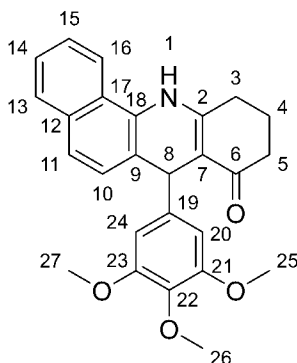
- **Composto 13** – 7-(tiofen-3-il)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido bege obtido com 33% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 227-232°C.



^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.38 (H1 – s, 1H), 8.48-8.46 (H16 – d, 1H, $J = 8.47$ Hz), 7.86-7.84 (H11 – d, 1H, $J = 7.85$ Hz), 7.58-7.57-7.55 (H14 – t, 1H, $J = 7.57$ Hz), 7.53-7.51-7.50 (H13 e H15 – t, 2H), 7.43-7.42 (H10 – d, 1H, $J = 7.42$ Hz), 7.29-7.29-7.28 (H21 – t, 1H, $J = 7.29$ Hz), 6.94-6.93 (H20 e H22 – m, 2H), 5.34 (H8 – s, 1H), 2.93-2.90 (H3 – m, 1H), 2.71-2.65 (H3 – m, 1H), 2.31-2.30-2.29 (H5 – m, 2H), 1.99 (H4 – m, 1H), 1.94 (H4 – m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 194.4 (C6 – C; sp²), 154.4 (C2 – C; sp²), 149.0 (C19 – C; sp²), 132.8 (C18 – C; sp²), 131.3 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.3 (C15 – CH; sp²), 127.7 (C21 – CH; sp²), 126.2 (C11 – CH; sp²), 126.1 (C13 – CH; sp²), 126.1 (C20 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.5 (C17 – C; sp²), 121.6 (C16 – CH; sp²), 120.9 (C9 – C; sp²), 120.2 (C22 – CH; sp²), 108.3 (C7 – C; sp²), 37.2 (C5 – CH₂; sp³), 35.6 (C8 – CH; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.4 (C4 – CH₂; sp³).

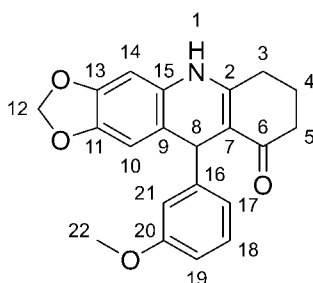
- **Composto 14** – 7-(3,4,5-trimetoxifenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-ona. Sólido branco obtido com 41% de rendimento e ponto de fusão de 280-285°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.36 (H1 – s, 1H), 8.47-8.45 (H16 – d, 1H, *J* = 8.46 Hz), 7.84-7.82 (H11 – d, 1H, *J* = 7.83 Hz), 7.58-7.57-7.55 (H14 – t, 1H, *J* = 7.57 Hz), 7.48-7.47 (H10, H13 e H15 – m, 3H), 6.56 (H20 e H24 – s, 2H), 5.20 (H8 – s, 1H), 3.68 (H25 e H27 – s, 6H), 3.55 (H26 – s, 3H), 2.99-2.96 (H3 – m, 1H), 2.76-2.74-2.71 (H3 – m, 1H), 2.30 (H5 – sl, 2H), 2.03-1.96 (H4 – m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.5 (C6 – C; sp²), 154.4 (C2 – C; sp²), 153.0 (C21 e C23 – C; sp²), 144.5 (C22 – C; sp²), 132.7 (C18 – C; sp²), 130.8 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.3 (C15 – CH; sp²), 126.1 (C11 e C13 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 121.4 (C9 – C; sp²), 108.4 (C7 – C; sp²), 104.6 (C20 e C24 – CH; sp²), 60.2 (C26 – CH₃; sp³), 56.1 (C25 e C27 – CH₃; sp³), 40.5 (C8 – CH; sp³), 37.3 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.7 (C4 – CH₂; sp³).

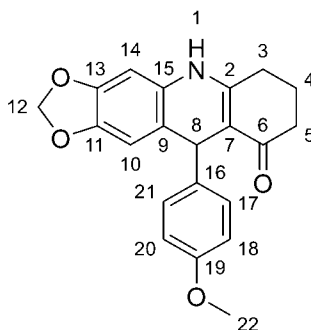
- **Composto 15** – 10-(3-metoxifenil)-6,7,8,10-tetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-*b*]acridin-9(5*H*)-ona. Sólido preto obtido com 78% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 242-248°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.31 (H1 – s, 1H), 7.05 (H17 e H18 – sl, 2H), 6.73 (H14, H19 e H21 – sl, 3H), 6.52 (H10 – s, 1H), 5.92-5.86 (H12 – d, 2H, *J* = 5.89 Hz), 4.96 (H8 – s, 1H), 3.66 (H22 – s, 3H), 2.55-2.51 (H3 – m, 2H), 2.17 (H5 – s, 2H), 1.91-1.81 (H4 – d, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.7 (C6 – C; sp²), 159.5 (C20 – C; sp²), 153.8 (C2 – C; sp²), 150.7 (C11 – C; sp²), 146.4 (C13 – C; sp²), 143.4 (C15 – C; sp²), 130.7 (C16 – C; sp²), 129.5 (C18 – CH; sp²), 119.6 (C17 – CH; sp²), 118.6 (C9 – C; sp²), 113.6 (C19 – CH; sp²), 110.7 (C21 – CH; sp²), 109.2 (C14 – CH; sp²), 106.8 (C7 – C; sp²), 101.2 (C12 – CH₂; sp³), 97.0 (C10 – CH; sp²), 55.2 (C4 – CH₃; sp³), 39.8 (C8 – CH; sp³), 37.1 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

- **Composto 16** – 10-(4-metoxifenil)-6,7,8,10-tetrahidro-[1,3]dioxolo[4,5-*b*]acridin-9(5H)-ona. Sólido preto obtido com 60% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 245-260°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.32 (H1 – s, 1H), 7.06-7.05 (H17 e H21 – d, 2H, *J* = 7.05 Hz), 6.74-6.72 (H18 e H20 – d, 2H, *J* = 6.73 Hz), 6.70 (H14 – s, 1H), 6.51 (H10 – s, 1H), 5.92-5.86 (H12 – d, 2H), 4.95 (H8 – s, 1H), 3.66 (H22 – s, 3H), 2.55 (H3 – m, 2H), 2.21-2.17 (H5 – m, 2H), 1.91-1.80 (H4 – m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.6 (C6 – C; sp²), 157.6 (C19 – C; sp²), 153.5 (C2 – C; sp²), 146.2 (C13 – C; sp²), 143.3 (C11 – C; sp²), 141.6 (C16 – C; sp²), 130.7 (C15 – C; sp²), 128.2 (C17 e C21 – CH; sp²), 119.1 (C9 – C; sp²), 113.8 (C18 e C20 – CH; sp²), 109.2 (C14 – CH; sp²), 107.2 (C7 – C; sp²), 101.2 (C12 – CH₂; sp²), 96.9 (C10 – CH; sp²), 55.3 (C22 – CH; sp³), 39.0 (C8 – CH; sp³), 37.1 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

4.2. Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados no laboratório de Química Medicinal e Biológica Translacional no Instituto de Química Medicinal do Conselho Superior de Investigações Científicas (IQM-CSIC) em Madrid, Espanha, sob supervisão da Professora Ana Martinez.

4.2.1. Ensaio de inibição da acetilcolinesterase – AChE

O método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) foi seguido. A solução do ensaio consistiu em tampão fosfato 0,1 M pH 8, 400 μ M de 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, reagente de Ellman), 0,05 unidade/ml de AChE (Sigma Chemical Co., colinesterase, acetil humana recombinante) e 800 μ M de iodeto de acetiltiocolina como substrato da reação enzimática. Os compostos testados foram adicionados à solução do ensaio e pré-incubados com a enzima por 5 minutos a 30° C. Após esse período, o substrato foi adicionado. As mudanças na absorbância a 412 nm foram registradas por 5 minutos com um espectrofotômetro UV/Vis Microplate e cuvette, Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation. As taxas de reação foram comparadas e o percentual de inibição devido à presença dos compostos testados foi calculado. O CI_{50} é definido como a concentração de cada composto que reduz em 50% a atividade enzimática em relação àquela sem inibidores.

4.2.2. Ensaio de inibição da butirilcolinesterase – BChE

O método de Ellman (ELLMAN et al., 1961) foi seguido. A solução do ensaio consistiu em tampão fosfato 0,1 M pH 8, 400 μ M de 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, reagente de Ellman), 0,024 unidade/ml de BChE (Sigma Chemical Co., colinesterase, butiril de soro de cavalo) e 500 μ M de iodeto de butiriltiocolina como substrato da reação enzimática. Os compostos testados foram adicionados à solução do ensaio e pré-incubados com a enzima por 5 minutos a 30° C. Após esse período, o substrato foi adicionado. As mudanças na absorbância a 412 nm foram registradas por 5 minutos com um espectrofotômetro UV/Vis Microplate e cuvette, Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation. As taxas de reação foram comparadas e o percentual de inibição devido à presença dos compostos testados foi calculado. O CI_{50} é definido como a concentração de cada composto que reduz em 50% a atividade enzimática em relação àquela sem inibidores.

4.2.3. Cálculo de LE e LLE

Para o cálculo de LE foi utilizada a fórmula abaixo, onde AP significa o número de átomos pesados (todos os átomos presentes na molécula excluindo-se os hidrogênios) e a CI_{50} foi utilizada individualmente para cada enzima.

$$LE = \frac{[1,37 * (-\log CI_{50})]}{AP}$$

Para os cálculos de LLE foi utilizada a fórmula abaixo, onde o valor de clogP foi obtida através do software *ChemDraw®* da *PerkinElmer Informatics, Inc.*, versão 22.0.0.22; e a CI_{50} foi utilizada individualmente para cada enzima.

$$LLE = (-\log CI_{50}) - clogP$$

4.2.4. Obtenção dos valores de tPSA

Os valores de tPSA foram obtidos através do software *ChemDraw®* da *PerkinElmer Informatics, Inc.*, versão 22.0.0.22.

4.2.5. Ancoramento molecular

As moléculas foram desenhadas, utilizando o programa *ChemDraw®* da *PerkinElmer Informatics, Inc.*, versão 22.0.0.22. As estruturas tridimensionais (3D) dos compostos foram geradas no programa Vega ZZ, versão 3.2.3 e minimizadas utilizando o campo de força AM1BCC. As cargas parciais foram calculadas pelo método Gasteiger. Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e as enzimas, foram utilizadas as enzimas com modelos disponíveis no Protein Data Bank (PDB). Para AChE, foi utilizado o modelo de acetilcolinesterase humana de código 7XN1 e resolução de 2,85 Å (DILEEP et al., 2022). Para BChE foi utilizado o modelo de butirilcolinesterase humana de código 1P0I e resolução 2,00 Å (NICOLET et al., 2003).

O programa utilizado para realizar o estudo de *docking* foi o GOLD, 2024.1.0 (Build 401958), da CCDC. O sítio de interação utilizado para AChE foi o mesmo ao qual a Tacrina estava co-cristalizada com um raio de 6Å (DILEEP et al., 2022; NACHON et al., 2013); para BChE utilizou-se como referência o trabalho de Hamulakova e colaboradores que estabeleceu como ponto de partida para o sítio de interação o ponto com as coordenadas x=138,7; y=116,3; z=41,0, também com um raio de 6Å (HAMULAKOVA et al., 2012; NICOLET et al., 2003). A validação para AChE foi realizada através de redocking da Tacrina. A acetilcolinesterase foi validada (RMSD médio de 20 rodadas de 0,862), tendo a função de pontuação CHEMPLP como

a melhor função de pontuação, além de ter apresentado uma boa sobreposição com a Tacrina co-cristalizada. Desta forma, a função CHEMPLP foi escolhida para os procedimentos subsequentes de ancoramento molecular em acetilcolinesterase. Em BChE foi utilizada a Tacrina como ligante (por 20 rodadas) para definir a melhor função de pontuação, sendo escolhida a CHEMPLP (*score* médio = 45.05) para a avaliação da acridinonas. No programa GOLD as pontuações obtidas são apresentadas como valores adimensionais, os quais mensuram a aptidão do ligante em interagir com o centro da proteína, de modo que, maiores valores de pontuação representam as melhores conformações e orientações do ligante no biorreceptor.

As imagens geradas foram obtidas através do software *Discovery Studio Visualizer*, versão 24.1.0.23298, da *Dassault Systèmes Biovia Corp*, ou do software PyMOL Molecular Graphics System, versão 4.60 (build 31.0.101.5333) da Schrödinger Inc, LLC.

4.2.6. Ensaio de atividade antioxidante

A atividade antioxidante é determinada pelo método ORAC-FL descrito por Ou et al. (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001) parcialmente adaptado por BMG LABTECH (GANSKE; DELL, 2006). Utilizamos o leitor de placas FLUOstar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemanha) com filtro de excitação a 485 nm e de emissão a 520 nm. 2,2'-Azobis-(amidinopropano) diidrocloreto (AAPH), (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) e fluoresceína (FL) fornecidos pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). A reação é realizada em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4) com um volume final de reação de 200 µL. O antioxidante (25 µL) e a fluoresceína (150 µL; 10 nM) são colocados em placas pretas de 96 poços. A mistura é pré-incubada por 30 minutos a 37 °C e, em seguida, é rapidamente adicionada, com uma pipeta multicanal, uma solução de AAPH (25 µL, 240 mM). A microplaca é colocada rapidamente no leitor e a fluorescência é medida a cada 90 segundos durante 90 minutos. A placa de 96 poços é agitada automaticamente antes de cada leitura. Os compostos são testados em 4 diferentes concentrações (10-1 µM). Também é feito um branco (FL + AAPH em tampão fosfato) e, como composto de referência, são colocadas quatro concentrações de Trolox (10-1 µM). Todas as reações são realizadas em duplicata, e pelo menos três ensaios diferentes por composto. Os dados são exportados para uma planilha Excel (Microsoft), onde a fluorescência é representada em função do tempo e, posteriormente, a área sob a curva é calculada seguindo a fórmula abaixo:

$$AUC = \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_i}{f_0} + \dots + \frac{f_{34}}{f_0} + \frac{f_{35}}{f_0}$$

Onde: AUC = área sob a curva; f_0 = fluorescência medida no tempo 0; f_i = fluorescência medida no tempo t.

Os valores líquidos de AUC de cada composto são determinados subtraindo-se o valor AUC do composto pelo valor AUC do branco (FL + AAPH em tampão fosfato).

Os equivalentes relativos de Trolox são calculados seguindo a fórmula abaixo:

$$\frac{(AUC_{amostra} - AUC_{branco})}{(AUC_{trolox} - AUC_{branco})} * \frac{[trolox]}{[amostra]}$$

Outra forma de obter os equivalentes de Trolox é pela representação dos valores líquidos de AUC em função das concentrações dos antioxidantes, obtendo-se as equações de regressão correspondentes a cada composto. Para calcular os equivalentes de Trolox, aplica-se a seguinte fórmula:

$$Equivalente\ de\ trolox = \frac{Inclinação\ da\ reta\ de\ regressão_{amostra}}{Inclinação\ da\ reta\ de\ regressão_{trolox}}$$

4.2.7. Ensaio de penetração no Sistema Nervoso Central (SCN) – barreira hematoencefálica (BBB)

A previsão da penetração no cérebro foi avaliada usando um ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela *in vitro* (PAMPA). Para o ensaio, dez medicamentos comerciais (solução salina tamponada com fosfato em pH 7,4 (PBS), etanol e dodecano) foram adquiridos (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Merck, Aldrich e Fluka), além do lipídio polar cerebral suíno (PBL) (código do catálogo 141101) (Avanti Polar Lipids). A placa doadora utilizada foi uma placa de filtração de 96 poços (Multiscreen® IP Sterile Plate, membrana PDVF, tamanho do poro de 0,45 µm, código do catálogo MAIPS4510) e a placa aceitadora utilizada foi uma placa de 96 poços indentada (Multiscreen®, código do catálogo MAMCS9610), ambas da Millipore. Unidades de membrana de filtro PDVF (diâmetro de 30 mm, tamanho do poro de 0,45 µm) da Symta® foram usadas para filtrar as amostras. Um leitor de placa UV de 96 poços (Thermoscientific, Multiskan Spectrum) foi usado para as medições de UV.

Compostos de teste [(3-7 mg de cafeína, enoxacina, hidroclotisona, desipramina, ofloxacina, piroxicam, testosterona), (15 mg de promazina) e 23 mg de verapamil e atenolol]

foram dissolvidos em EtOH (1000 μL). Foram retirados 100 microlitros dessa solução estoque de composto e adicionados 1400 μL de EtOH e 3500 μL de tampão PBS pH=7,4 para alcançar 30% de concentração de EtOH no experimento. Essas soluções foram filtradas. A microplaca aceitadora de 96 poços foi preenchida com 180 μL de PBS/EtOH (70/30). A placa doadora de 96 poços foi revestida com 4 μL de lipídio cerebral suíno em dodecano (20 mg mL^{-1}) e, após 5 minutos, foram adicionados 180 μL de cada solução de composto. Foram dissolvidos 1-2 mg de cada acridinona, para ser determinado sua capacidade de passar pela barreira hematoencefálica em 1500 μL de EtOH e 3500 μL de tampão PBS pH=7,4, filtrados e, em seguida, adicionados à placa doadora de 96 poços.

A placa doadora foi cuidadosamente colocada sobre a placa aceitadora para formar um "sanduíche", que foi deixado sem perturbações por 2h e 30 min a 25 °C. Durante esse tempo, os compostos difundiram da placa doadora através da membrana lipídica cerebral para a placa aceitadora. Após a incubação, a placa doadora foi removida. O leitor de placa UV determinou a concentração dos compostos e medicamentos comerciais nos poços aceitadores e doadores. Cada amostra foi analisada em três a cinco comprimentos de onda, em 3 poços e em duas execuções independentes. Os resultados são apresentados como média [desvio padrão (DP)] e a média das duas execuções é relatada. Dez compostos de controle de qualidade (mencionados anteriormente) com permeabilidade BBB conhecida foram incluídos em cada experimento para validar o conjunto de análise.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho idealizou mostrar como a reação multicomponente de Hantzsch é um método rápido e eficaz para a síntese de tetrahydroacridinonas. Dezesesseis acridinonas foram planejadas, entretanto, apenas quinze foram sintetizadas de forma efetiva, comprovando a versatilidade desta reação quando se utiliza diferentes aldeídos e aminas, e a sua efetividade. Todas as quinze foram caracterizadas por RMN e IV, sendo que as acridinonas **2**, **11**, **13**, **14**, **15** e **16** já foram descritas previamente em trabalhos da autora.

A avaliação da inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase foi realizada de forma efetiva, levando a resultados satisfatórios. Das 15 acridinonas avaliadas, doze possuem inibição frente a AChE na faixa de 4-10 μM , sendo a molécula **1** a que possui a melhor inibição ($4,01 \pm 0,57 \mu\text{M}$), enquanto para butirilcolinesterase oito acridinonas possuem atividades inibitórias na faixa de 0-5 μM , e a molécula **14** demonstrou a melhor inibição ($0,99 \pm 0,12 \mu\text{M}$). Os resultados de LE e LLE para ambas as enzimas mostram que apesar da atividade inibitória das acridinonas, as moléculas precisam passar por etapas de otimização para que assim possam progredir para etapas além da atual de química exploratória. A avaliação *in silico* das moléculas mostrou os resíduos de aminoácidos que mais fazem interações com a série de acridinonas, sendo o Trp⁸⁶ o mais frequente em AChE e o Trp²³¹ e a Phe³²⁹ mais frequentes em BChE, entretanto, para uma melhor correlação com os resultados *in vitro*, uma separação dos enantiômeros e uma avaliação *in vitro* deles isolados faz-se necessária em trabalhos futuros.

O ensaio para determinação da atividade antioxidante demonstrou que as acridinonas que possuem hidroxilas fenólicas apresentam as melhores atividades (molécula **7** e **4**), entretanto, das quinze testadas apenas as acridinonas **15** e **16** apresentam resultados menores que o padrão Trolox®. Ao avaliar a permeabilidade das moléculas na barreira hematoencefálica, oito acridinonas demonstraram boa permeabilidade, conseguindo atravessar a barreira, enquanto duas acridinonas demonstraram permeabilidade regular. Analisando o conjunto de resultados obtidos as acridinonas **3**, **5**, **7**, **12** e **13** destacam-se como as mais promissoras, portanto, uma perspectiva do presente trabalho é avaliar tais moléculas quanto sua neurotoxicidade e neuro proteção.

Contudo, é possível concluir que do ponto de vista da química exploratória, o presente trabalho obteve resultados promissores e que colabora para futuras pesquisas envolvendo atividades anticolinesterase e antioxidante de tetrahydroacridinonas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA GOV. Alzheimer: condição afeta 1,2 milhão de pessoas no Brasil. 2024. Disponível em: <https://agenciagov.ebc.com.br/noticias/202310/alzheimer-condicao-afeta-1-2-milhao-de-pessoas-no-brasil>. Acesso em: agosto de 2024.

AJMC. Biogen abandons Aducanumab, pivots focus to Lecanemab for Alzheimer disease. 2024. Disponível em: <https://www.ajmc.com/view/biogen-abandons-aducanumab-pivots-focus-to-lecanemab-for-alzheimer-disease>. Acesso em: agosto de 2024.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. 2024. Disponível em: <https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures.pdf>. Acesso em: setembro de 2024.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. About Alzheimer's & Dementia. 2024a. Disponível em: <https://www.alzint.org/about/>. Acesso em: agosto de 2024.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. Alzheimer's disease. 2024b. Disponível em: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/types-of-dementia/alzheimers-disease/>. Acesso em: agosto de 2024.

AGU, P. C. et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13398, 17 ago. 2023.

ARNOTT, J. A.; PLANEY, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 863–875, 19 out. 2012.

BHOLE, R. P.; CHIKHALE, R. V.; RATHI, K. M. Current biomarkers and treatment strategies in Alzheimer disease: An overview and future perspectives. **IBRO Neuroscience Reports**, v. 16, p. 8–42, jun. 2024.

CARDOSO, F. L.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. **Brain Research Reviews**, v. 64, n. 2, p. 328–363, set. 2010.

CDC. Alzheimer disease. 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/alzheimers.htm>. Acesso em: setembro de 2024.

CHALUPOVA, K. et al. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 168, p. 491–514, abr. 2019.

CHOI, E.-H.; KIM, M.-H.; PARK, S.-J. Targeting Mitochondrial Dysfunction and Reactive Oxygen Species for Neurodegenerative Disease Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 14, p. 7952, 21 jul. 2024.

CHOI, S. H.; TANZI, R. E. Alzheimer's Disease: Causes, Mechanisms, and Steps Toward Prevention. Em: **The Oxford Handbook of the Neurobiology of Learning and Memory**. [s.l.] Oxford University Press, 2020.

CRIVORI, P. et al. Predicting Blood–Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. **J. Med. Chem.**, v. 43, n. 11, p. 2204–2216, 16 abr. 2000.

DELMAS, F. 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, ago. 2004.

DI, L. et al. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 223–232, mar. 2003.

DILEEP, K. V. et al. Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with tacrine: Implications for drug discovery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 210, p. 172–181, jun. 2022.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

FDA. FDA converts novel Alzheimer's disease treatment to traditional approval. 2024a. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-converts-novel-alzheimers-disease-treatment-traditional-approval>. Acesso em: agosto de 2024.

FDA. FDA grants accelerated approval for Alzheimer's drug. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug>. Acesso em: agosto de 2024.

GANSKE, F.; DELL, E. J. **ORAC Assay on the FLUOstar OPTIMA to Determine Antioxidant Capacity**. BMG LABTECH, 2006.

H. BROOKS, W.; C. GUIDA, W.; G. DANIEL, K. The Significance of Chirality in Drug Design and Development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 760–770, 1 abr. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HAMULAKOVA, S. et al. Synthesis, design and biological evaluation of novel highly potent tacrine congeners for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 23–31, set. 2012.

HEVENER, K. E. et al. Hit-to-Lead: Hit Validation and Assessment. Em: [s.l.: s.n.]. p. 265–309.

HOPKINS, A. L. et al. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 105–121, 31 fev. 2014.

KHALESEH, F.; HAGHI-AMINJAN, H.; SAMADI, M. Tacrine. Em: **Encyclopedia of Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 913–916.

LAU, V.; RAMER, L.; TREMBLAY, M.-È. An aging, pathology burden, and glial senescence build-up hypothesis for late onset Alzheimer's disease. **Nature Communications**, v. 14, n. 1670, 25 mar. 2023.

LEESON, P. D. et al. Target-Based Evaluation of “Drug-Like” Properties and Ligand Efficiencies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 7210–7230, 10 jun. 2021.

LONG, S.; BENOIST, C.; WEIDNER, W. **World Alzheimer Report 2023: Reducing dementia risk: never too early, never too late.** [s.l: s.n.].

MAGALHAES, L. G. et al. Discovery of a series of acridinones as mechanism-based tubulin assembly inhibitors with anticancer activity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–17, 2016.

MINISTERIO DA SAUDE. Doença de Alzheimer. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/alzheimer>. Acesso em: agosto de 2024.

NACHON, F. et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 453, n. 3, p. 393–399, 1 ago. 2013.

NADARAJ, V.; THAMARAI SELVI, S.; MOHAN, S. Microwave-induced synthesis and antimicrobial activities of 7,10,11,12-tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 976–980, mar. 2009.

NADUR, N. F. Síntese e avaliação farmacológica de novas 3-(1,2,3-triazol) cumarinas planejadas para o tratamento da Doença de Alzheimer. 2020. Dissertação (Mestrado). UFRRJ, Seropédica.

NICOLET, Y. et al. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41141–41147, out. 2003.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 1 out. 2001.

POURSHOJAEI, Y. et al. Phenoxyethyl Piperidine/Morpholine Derivatives as PAS and CAS Inhibitors of Cholinesterases: Insights for Future Drug Design. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 2019.

RAJAN, K. et al. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020–2060). **Alzheimer's & Dementia**, p. 1–10, 5 abr. 2021.

RAJASEKHAR, K.; GOVINDARAJU, T. Current progress, challenges and future prospects of diagnostic and therapeutic interventions in Alzheimer's disease. **RSC Advances**, v. 8, n. 42, p. 23780–23804, 2018.

RATAN, Y. et al. An Insight into Cellular and Molecular Mechanisms Underlying the Pathogenesis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, p. 1398, 8 maio 2023.

RGDSCIENCE. Molecular descriptors & ligand efficiency metrics table. 2024. Disponível em: <https://www.rgdscience.com/index.php/molecular-descriptors-ligand-efficiency-metrics/>. Acesso em: setembro de 2024.

ROSENBERRY, T. et al. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2098, 29 nov. 2017.

SCOTT, J. S.; WARING, M. J. Practical application of ligand efficiency metrics in lead optimisation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 3006–3015, jul. 2018.

SHULTZ, M. D. Improving the Plausibility of Success with Inefficient Metrics. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 1, p. 2–5, 9 jan. 2014.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2000.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. Em: [s.l: s.n.]. p. 273–343.

SUN, T. et al. New insights into butyrylcholinesterase: Pharmaceutical applications, selective inhibitors and multitarget-directed ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 275, p. 116569, set. 2024.

THI DUONG, T.-L. et al. Rapid identification of natural acetylcholinesterase inhibitors from *Glycosmis parviflora* stem utilizing dereplication, in vitro and in silico approach. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 105811, jun. 2024.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 19 abr. 2017.

TRATRAT, C.; GIORGI-RENAULT, S.; HUSSON, H.-P. A Multicomponent Reaction for the One-Pot Synthesis of 4-Aza-2,3-didehydropodophyllotoxin and Derivatives. **Organic Letters**, v. 4, n. 19, p. 3187–3189, 1 set. 2002.

TSOPELAS, N. D.; MARIN, D. B. Cholinergic Treatments of Alzheimer's Disease. Em: **Functional Neurobiology of Aging**. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 475–486.

VALDÉS, A. F.-C. Acridine and Acridinones: Old and New Structures with Antimalarial Activity. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 11–20, 9 mar. 2011.

VAN ASPEREN, J. et al. The Functional Role of P-Glycoprotein in the Blood–Brain Barrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 8, p. 881–884, ago. 1997.

VARAKUMAR, P. et al. Acridine as an Anti-Tumour Agent: A Critical Review. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 193, 26 dez. 2022.

VERONES, V. et al. Synthesis, antiproliferative activity and tubulin targeting effect of acridinone and dioxophenothiazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 39–47, jan. 2013.

VUKOVIC, S.; HUGGINS, D. J. Quantitative metrics for drug–target ligandability. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 6, p. 1258–1266, jun. 2018.

WAGER, T. T. et al. Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 6, p. 435–449, 16 jun. 2010.

WOREK, F.; EYER, P.; THIERMANN, H. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for *in vitro* research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, n. 3–4, p. 282–291, 13 mar. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Acesso em: agosto de 2024.

ZHANG, Y. et al. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 8, p. 571–577, abr. 2005.

ZHOU, B. et al. New 2-Aryl-9-methyl- β carbolinium salts as Potential Acetylcholinesterase Inhibitor agents: Synthesis, Bioactivity and Structure–Activity Relationship. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1559, jan. 2018.

CAPÍTULO II

SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE QUINAZOLINONAS OBTIDAS ATRAVÉS DE REAÇÃO MULTICOMPONENTE DE BIGINELLI

RESUMO

As quinazolinonas são uma classe de compostos heterociclos que possuem diversas aplicações medicinais relatadas, como antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatória, antiviral e anticonvulsivante. As quinazolinonas podem ser obtidas através da reação multicomponente de Biginelli, utilizando como reagentes uma ureia, um aldeído e um composto dicarbonílico. Previamente, no grupo de pesquisa, uma série de diidropirimidinonas foi sintetizada utilizando a reação multicomponente de Biginelli, tendo como protótipo o Monastrol, conhecido agente antiproliferativo, e foram avaliadas quanto à sua atividade contra cepas de *Plasmodium falciparum*. Quinazolinonas também já demonstraram atividade anti-Chagas, conforme descrito na literatura. Tendo como base o Monastrol e as diidropirimidinonas previamente sintetizadas, uma série de vinte quinazolinonas foi proposta. Onze delas foram obtidas de maneira satisfatória (rendimentos de 11% a 67%), cinco não foram obtidas, e em quatro casos houve a obtenção de uma xantenodiona (rendimentos de 7% a 74%), que foi confirmada como um subproduto possível da reação de Biginelli. A avaliação do percentual de inibição de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* foi realizada para dez quinazolinonas, assim como a seletividade frente a células LLC-MK2. A quinazolinona 4-(4-bromofenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1H,3H)-diona demonstrou uma inibição razoável (54,3% de inibição de amastigotas a 100µM), enquanto as quinazolinonas 4-(4-bromofenil)-7,7-dimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1H)-ona e 4-(4-bromo fenil)-1,7,7-trimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1H)-ona apresentaram as melhores atividades (95.3 e 95.2% de inibição de amastigotas a 100µM, respectivamente), sendo que a quinazolinona 4-(4-bromofenil)-1,7,7-trimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1H)-ona também demonstrou uma importante seletividade. Destaca-se que a inibição frente às formas amastigotas foi melhor para os compostos que possuem o substituinte 4-bromofenil. A atividade antiproliferativa foi avaliada frente às linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231) e próstata (DU-145) para oito moléculas. Os resultados mostram que apenas as quinazolinonas 4-(3-hidroxifenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1H,3H)-diona e 4-(4-bromofenil)-7,7-dimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1H)-ona apresentam citotoxicidade frente à linhagem MDA-MB-231 (40,26 µM e 53,30 µM, respectivamente) enquanto, frente à linhagem celular DU-145, somente a molécula 4-(3-hidroxifenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1H,3H)-diona se mostrou pouco citotóxica (42,37 µM). Os valores de CI_{50} das moléculas 4-(3-hidroxifenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1H,3H)-diona e 4-(4-bromofenil)-7,7-dimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1H)-ona são muito superiores aos padrões positivos (Doxorrubicina e Colchicina), indicando que as moléculas testadas não possuem um bom perfil citotóxico frente a essas linhagens. Contudo, o presente trabalho possui uma contribuição tanto para a química orgânica quanto para a química medicinal do ponto de vista da química exploratória, gerando diversas perspectivas para trabalhos futuros.

Palavras-chave: xantenodionas; *Trypanosoma cruzi*; câncer.

ABSTRACT

Quinazolinones are a class of heterocyclic compounds with various reported medicinal applications, such as antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory, antiviral, and anticonvulsant activities. These compounds can be synthesized through the multicomponent Biginelli reaction, using urea, an aldehyde, and a dicarbonyl compound as reagents. Previously, in the research group, a series of dihydropyrimidinones was synthesized using the Biginelli reaction, with Monastrol—a known antiproliferative agent—as a prototype. These compounds were evaluated for their activity against *Plasmodium falciparum* strains. Quinazolinones have also demonstrated anti-Chagas activity, as described in the literature. Based on Monastrol and previously synthesized dihydropyrimidinones, a series of twenty quinazolinones was proposed. Eleven were successfully obtained with yields ranging from 11% to 67%, five were not synthesized, and in four cases, xanthenediones were obtained as byproducts (yields from 7% to 74%), confirmed as a possible outcome of the Biginelli reaction. The inhibition percentage of *Trypanosoma cruzi* amastigote forms was evaluated for ten quinazolinones, along with selectivity against LLC-MK2 cells. The quinazolinone 4-(4-bromophenyl)-7,7-dimethyl-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1H,3H)-dione demonstrated moderate inhibition (54.3% inhibition of amastigotes at 100 μ M). In contrast, 4-(4-bromophenyl)-7,7-dimethyl-2-thioxo-2,3,4,6,7,8-hexahydroquinazolin-5(1H)-one and 4-(4-bromophenyl)-1,7,7-trimethyl-2-thioxo-2,3,4,6,7,8-hexahydroquinazolin-5(1H)-one exhibited the highest activities (95.3% and 95.2% inhibition of amastigotes at 100 μ M, respectively), with the latter also demonstrating significant selectivity. Notably, inhibition against amastigote forms was more pronounced in compounds containing the 4-bromophenyl substituent. Antiproliferative activity was evaluated against breast cancer (MDA-MB-231) and prostate cancer (DU-145) cell lines for eight molecules. The results indicated that only 4-(3-hydroxyphenyl)-7,7-dimethyl-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1H,3H)-dione and 4-(4-bromophenyl)-7,7-dimethyl-2-thioxo-2,3,4,6,7,8-hexahydroquinazolin-5(1H)-one exhibited cytotoxicity against the MDA-MB-231 line (IC₅₀ values of 40.26 μ M and 53.30 μ M, respectively). Against the DU-145 line, only 4-(3-hydroxyphenyl)-7,7-dimethyl-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1H,3H)-dione showed weak cytotoxicity (IC₅₀ of 42.37 μ M). The IC₅₀ values of these molecules were significantly higher than those of the positive controls (doxorubicin and colchicine), indicating that the tested molecules do not exhibit strong cytotoxic profiles against these cancer lines. This study contributes to both organic and medicinal chemistry from an exploratory chemistry perspective, providing various avenues for future research.

Keywords: Xanthenediones; *Trypanosoma cruzi*; Cancer.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Quinazolinonas

As quinazolinonas (QNZ) são uma classe de compostos heterociclos. Elas são caracterizadas pela presença de dois anéis fundidos, onde um dos anéis possui a presença de nitrogênio. A presença de uma carbonila também é característica das quinazolinonas, podendo essa carbonila estar presente no anel nitrogenado ou no segundo anel. As quinazolinonas podem ser obtidas através da reação multicomponente de Biginelli e são uma classe de heterociclos que possuem diversas aplicações medicinais relacionadas, como: antimicrobica, anticâncer, anti-inflamatória, antiviral, anticonvulsiva, entre outras (HE et al., 2014; JAFARI et al., 2016; NOURI et al., 2024).

1.2. Câncer

O câncer é o nome dado pra doenças cujo crescimento celular é desordenado e anômalo, podendo formar um emaranhado de células (tumores) e migrarem para outros órgãos e tecidos próximos (metástase). De acordo com a célula anômala, o câncer é classificado. Devido aos diversos tipos de células que temos no nosso corpo, mais de 100 diferentes tipos de cânceres são conhecidos. Fatores internos e externos podem ser a causa de um câncer, entre elas destacam-se predisposições genéticas, tabagismo e exposição excessiva ao sol. A doença é conhecidamente uma das maiores causas de mortalidade no Brasil e no mundo, tendo quase 20 milhões de casos relatados em 2022 e sendo a causa da morte de 9.743.832 pessoas em todo mundo no mesmo ano. As estimativas de incidência e mortalidade mostram uma crescente, como mostrado na figura 26, chegando a cerca de mais de 35 milhões de novos casos em 2050 e mais de 18 milhões de mortes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024a; MINISTERIO DA SAÚDE, 2024b; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2024a; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2024b).

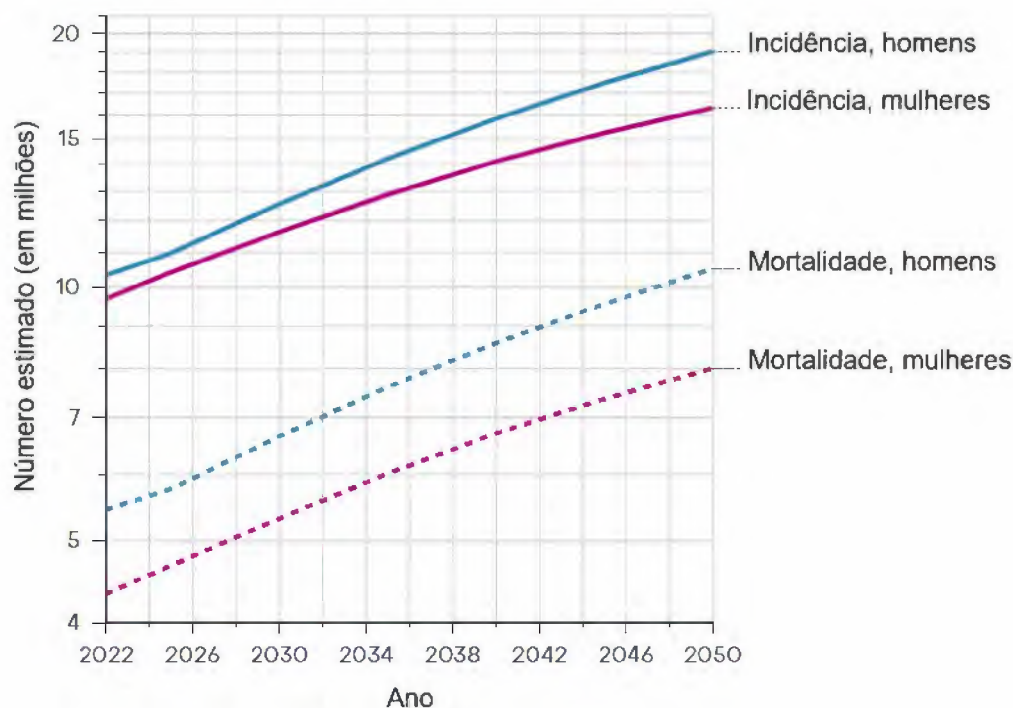


Figura 26: Projeção do número de casos e mortalidade de câncer até 2050 no mundo. Fonte: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2024b – modificada.

1.3. Doença de Chagas

Dentre todas as atividades relatadas para as quinazolinonas, uma que merece destaque é a atividade anti-chagas. Quinazolinonas com estruturas variadas já foram reportadas com atividade frente a *Trypanossoma Cruzi* (figura 27), entretanto, ainda é um esqueleto pouco explorado para tal finalidade (BOLLINI et al., 2019; HARRISON et al., 2020).

A doença de chagas, ou tripanossomíase americana, é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanossoma Cruzi*, que são transmitidos para humanos através de insetos triatomíneos (barbeiro). Essa doença afeta cerca de 7 milhões de pessoas no mundo, sendo endêmica da América Latina, e quando não tratada pode levar a morte. Atualmente, dois tratamentos estão disponíveis para o tratamento da doença, são eles o benznidazol e nifurtimox (figura 27). Ambos os tratamentos são eficazes no início da infecção, porém sua efetividade diminui com o tempo de infecção e são contraindicados para grávidas ou pessoas com insuficiência renal ou hepática. Além disso, reações adversas são relatadas em cerca de 40% dos pacientes tratados pelos medicamentos descritos e há casos de cepas resistentes aos tratamentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024). O desenvolvimento de novos tratamentos para a doença tem diversos desafios. A variedade de cepas do parasita, aliada ao

seu complexo ciclo de vida e aos constantes casos de cepas resistentes são algumas das dificuldades para o desenvolvimento de novos tratamentos. Contudo, dificuldades relacionadas a ausência de financiamento para pesquisa, baixa eficácia de candidatos a fármacos, (principalmente na fase crônica da doença) e o fato que muitos candidatos só possuem bons resultados em modelos pré-clínicos também são relatadas (PINAZO et al., 2024). Essas dificuldades fazem com que seja justificado a busca por novas linhas de tratamento para a doença de Chagas.

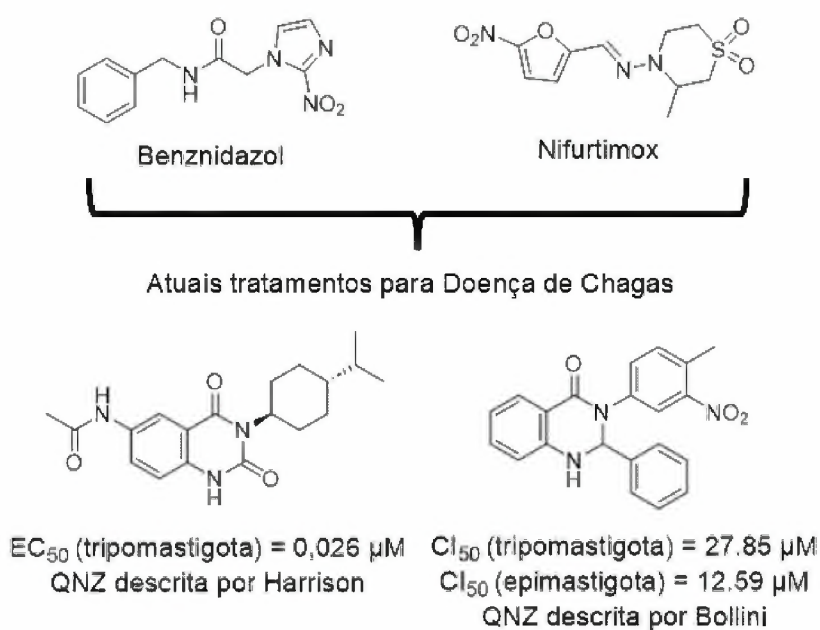


Figura 27: Atuais tratamentos para a doença de Chagas e quinazolinonas propostas por Harrison e Bollini com atividade anti-chagas. Fonte: Elaborada pela autora.

O ciclo de vida do *trypanossoma cruzi* envolve duas etapas, uma no inseto vetor e outra no hospedeiro (figura 28). Na etapa 1 o inseto se alimenta de sangue do hospedeiro e deposita tripomastigotas metacíclicos através das suas fezes. A forma tripomastigota entra no hospedeiro devido as fissuras causadas pela “mordida” do inseto e uma vez dentro do hospedeiro ele se transforma na forma amastigota (2). A forma amastigota se multiplica (3) e se transforma em tripomastigota novamente (4) que podem fazer infectar outra célula e voltar ao estágio de amastigota. Um inseto que se alimenta de sangue de um paciente infectado ingere as formas tripomastigotas presentes (5) que posteriormente se transformam em epimastigotas no intestino do inseto, que é a forma replicativa (6). A multiplicação ocorre (7), levando a formação da forma tripomastigota metacíclica (8) que pode ser transferida a um novo hospedeiro,

reiniciando assim o ciclo. Ensaios com amastigotas são relevantes para avaliar a atividade de compostos em um cenário de infecção crônica, por isso essa forma foi escolhida para a realização dos ensaios (CDC, 2024).

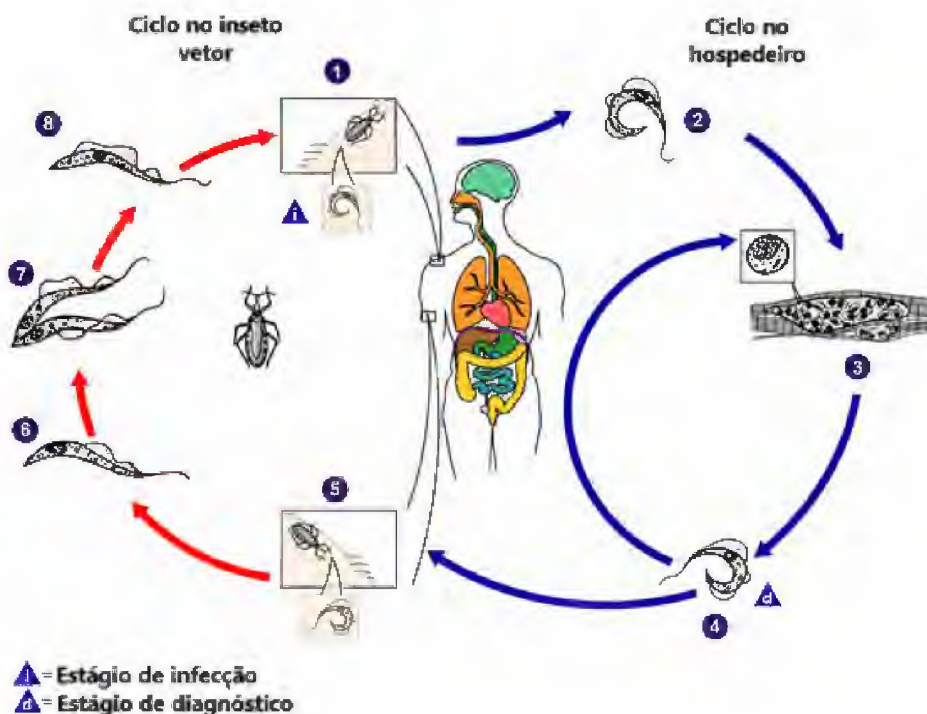


Figura 28: Ciclo de vida do parasita. Fonte: CDC, 2024 – modificada.

1.4. Trabalhos prévios do grupo de pesquisa

O Monastrol é uma DHPM conhecido como inibidor da proteína motora cinesina-5 (Eg5). Essa proteína é essencial na formação e manutenção do fuso mitótico durante a divisão celular, podendo atuar, portanto, como antiproliferativo e antiangiogênico. Entretanto, a atividade inibitória do Monastrol frente a Eg5 é pouco atrativa ($CI_{50} = 30 \mu M$), porém fez com que a busca por análogos de Monastrol mais potentes fosse intensificada. Com isso, compostos como a Enastrona e Dimetilenastrona (figura 29), duas quinazolinonas, foram sintetizadas a fim de avaliar suas atividades como agentes antiproliferativos. Apesar da potência desses dois compostos ser maior do que a do Monastrol, houve uma ineficácia nos ensaios *in vivo* (NIKAM et al., 2024). Devido aos resultados do Monastrol e seus análogos como agentes antiproliferativos, pode-se considerar que quinazolinonas são um esqueleto privilegiado quando se trata da busca por agentes anticâncer.

Previamente, no grupo de pesquisa, uma série de diidropirimidinonas (DHPMs) foram sintetizadas utilizando a reação multicomponente de Biginelli, tendo como protótipo o Monastrol, e foram avaliadas quanto a sua atividade antimalárica (figura 29). Além das DHPMs, algumas quinazolinonas também tiveram sua atividade contra cepas de *Plamodium falciparum* avaliadas (ROGERIO et al., 2018, 2020).

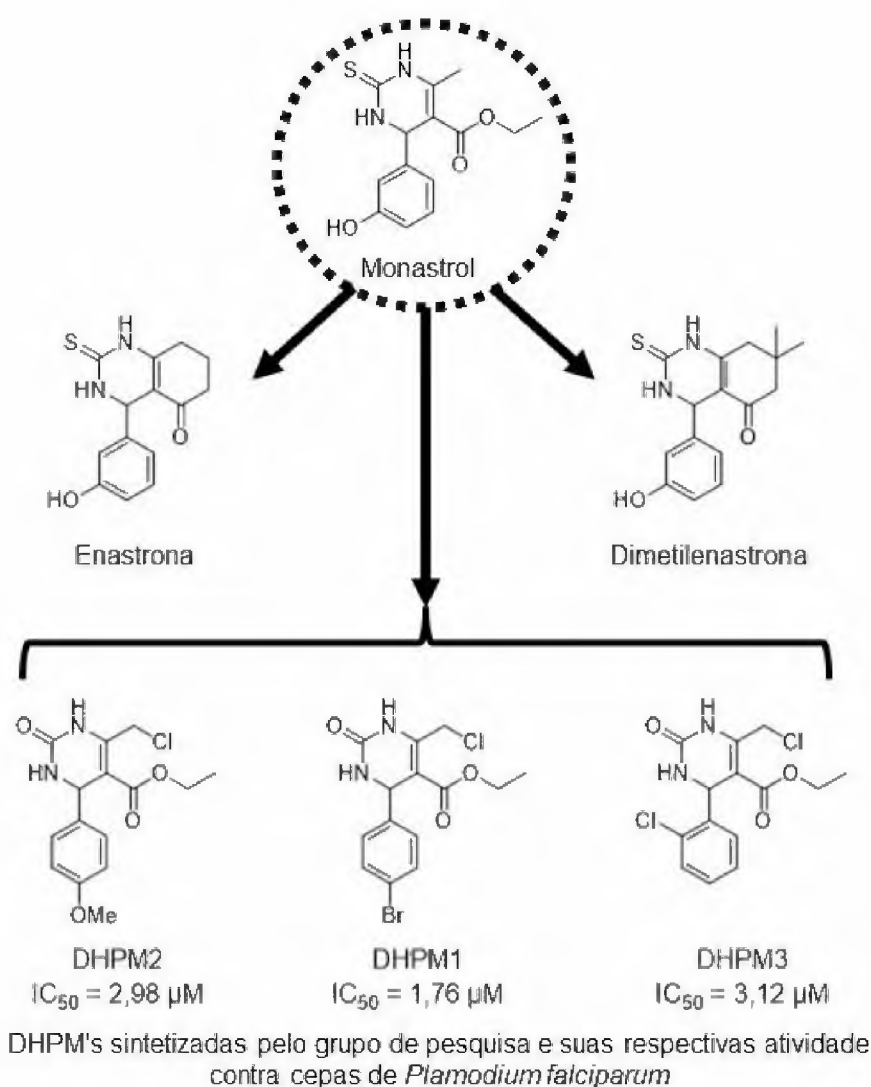


Figura 29: Estruturas do Monastrol e seus análogos. Fonte: Elaborado pela autora.

1.5. Justificativa

Devido as atividades farmacológicas relatadas para quinazolinonas e a necessidade de novos tratamentos para doenças como câncer e chagas, justifica-se o trabalho de química

exploratória de quinazolinonas para esses alvos. O presente trabalho utilizou como inspiração a estrutura do Monastrol e seus derivados, além das diidropirimidinonas sintetizadas previamente pelo grupo para a síntese de uma coleção de quinazolinonas (QNZ), onde utilizou-se diferentes ureias, afim de diversificar as as estruturas das quinazolinonas obtidas. O planejamento estrutural encontra-se na figura 30.

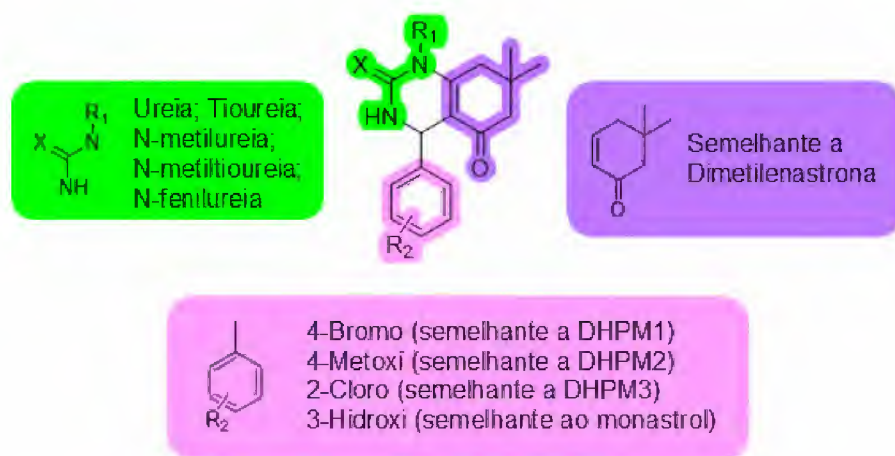


Figura 30: Planejamento estrutural das quinazolinonas. Fonte: Elaborada pela autora.

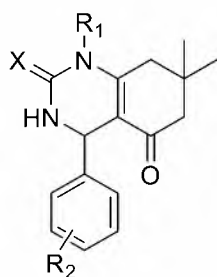
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar uma família de quinazolinonas obtidas a partir de reação multicomponente de Biginelli. Avaliar uma possível atividade farmacológica frente ao câncer e a doenças de Chagas.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a síntese correspondente as 20 quinazolinonas propostas utilizando a reação multicomponente de Biginelli.



X = S ou O

R₁ = H ou metil

R₂ = 4-OMe; 4-Br; 2-Cl; 3-OH

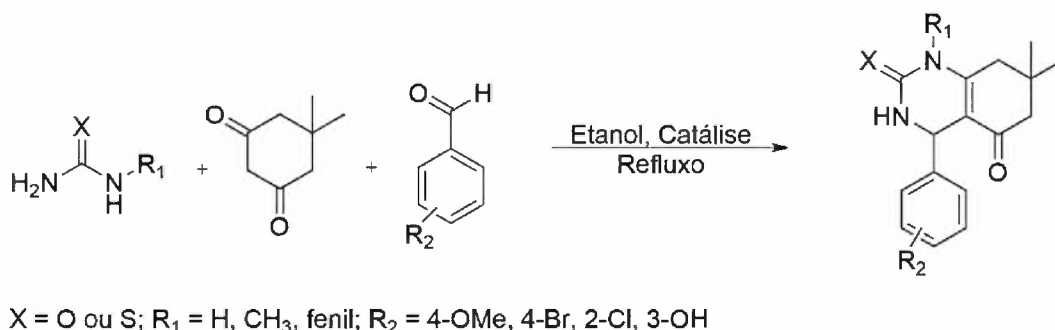
- Caracterizar todas as moléculas sintetizadas utilizando métodos espectroscópicos (ressonância magnética nuclear e infravermelho).
- Avaliar a atividade antiproliferativa das quinazolinonas obtidas frente a linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231) e câncer de próstata (DU-145).
- Avaliar a atividade anti-chagásica das quinazolinonas frente a formas amastigotas de *Trypanosoma Cruzi* e sua seletividade (utilizando células saudáveis LLC-MK2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese e caracterização das moléculas

Vinte quinazolinonas foram planejadas para essa série, dentre elas sete inéditas na literatura (28, 29, 31, 32, 34, 35, 36). As outras 13 possuem diversas metodologias de obtenção relatadas, principalmente envolvendo catálise (AFSHARI; CARABINEIRO; GORJIZADEH, 2023; BALALI; SAFAEI-GHOMI; MASHHADI, 2024; KOOHESTANI; SADJADI; HERAVI, 2021; KOUSER et al., 2022; SAFAEI-GHOMI et al., 2022; YAHYAZADEH et al., 2022). Dentre as atividades biológicas previamente atribuídas as quinazolinonas propostas, destacam-se a atividade como antagonista de cálcio, atividade antimicrobica, analgésica e anti-inflamatória e citotóxica, principalmente atuando como inibidores da cinesina Eg5 (EL-GAZZAR; HAFEZ; ABBAS, 2009; GUIDO et al., 2015; KIDWAI et al., 2010; MÜLLER et al., 2006; RAFIAN-BOROUJENI; REZAEINASAB; BAHRAMI, 2022; RAMOS et al., 2013; SETHIYA et al., 2022; THABIT et al., 2022; WAZALWAR; BANPURKAR; PERDIH, 2023; YARIM et al., 2011).

As reações ocorreram de acordo com o esquema 11, tendo como reagentes uma ureia, 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (dimedona), um aldeído aromático e etanol como solvente. Todas as quinazolinonas pretendidas se encontram na figura 31.



Esquema 11: Esquema geral de obtenção das quinazolinonas. Fonte: Elaborado pela autora.

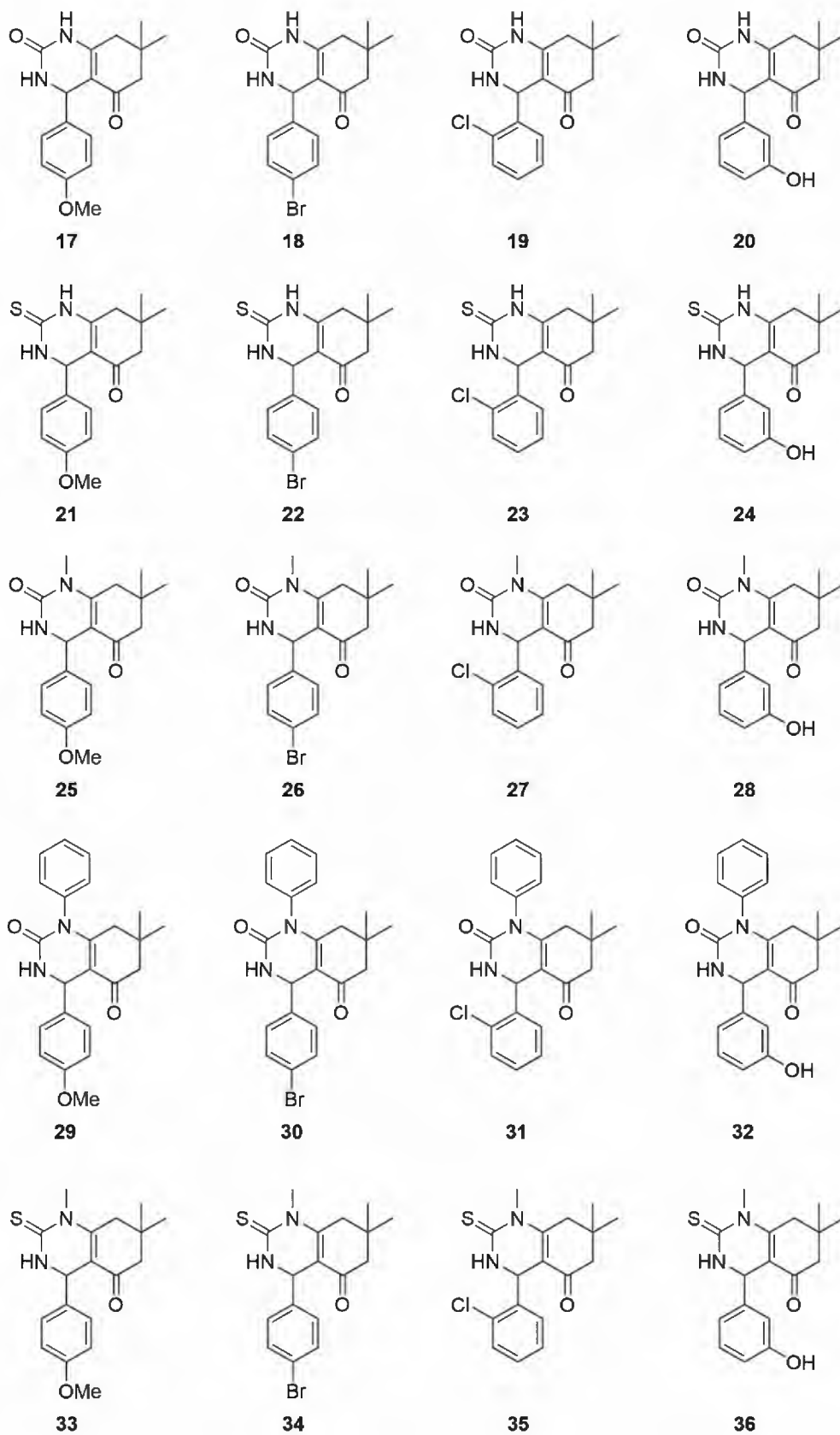


Figura 31: Quinazolinonas propostas. Fonte: Elaborada pela autora.

Todas as reações foram realizadas, primeiramente, através do protocolo 1. A metodologia empregada no protocolo 1 foi baseada no trabalho de Yarim e colaboradores (YARIM et al., 2003) e em trabalhos prévios do grupo de pesquisa. Utilizou-se 1,5 equivalente da ureia, 1 equivalente da 5,5,-dimetil-1,3-ciclohexanidiona e 1 equivalente do aldeído, além de 2 mL de etanol, ácido clorídrico concentrado (3 gotas) e um agitador magnético. A reação é mantida em refluxo e com agitação por 24 horas, e foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada analítica. Esse protocolo foi escolhido devido ao fato de utilizar um catalisador de baixo custo, além de, utilizar como solvente o etanol, um solvente com baixa toxicidade ao meio ambiente, e, também, pelo fato da não utilização de cromatografia por coluna, diminuindo a geração de resíduos e o impacto ambiental atrelado a síntese.

Após o tempo reacional de 24 horas, as reações que conduziram aos produtos **17, 18, 19, 20, 22 e 35** apresentaram um precipitado que foi recolhido por filtração e recristalizados em etanol. As reações que conduziram aos produtos **21, 23, 25, 27, 28, 29, 30 e 34** não apresentaram precipitado após as 24 horas de reação, portanto, foram deixadas no freezer por 5 dias, e houve a formação de precipitado, que foi recolhido por filtração à vácuo. Os precipitados recolhidos dessas reações foram recristalizados em etanol. As reações de formação dos produtos **24, 26, 31, 32, 33 e 36** não apresentaram precipitados mesmo após 5 dias a baixa temperatura, portanto, foram vertidos em água destilada, onde houve a formação de um precipitado, que foi recolhido por filtração, seguida de uma recristalização em éter dietílico. As moléculas **24, 32 e 36** não obtiveram precipitado após a recristalização, e devido ao apelo ambiental que justifica a não utilização de colunas cromatográficas, essas moléculas não foram caracterizadas. Todas as outras foram caracterizadas através de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional (hidrogênio e carbono) e infravermelho (IV). Os espectros referentes aos RMN de todas as quinazolinonas encontram-se nos anexos 52 a 83 (páginas 257 à 288) e as atribuições dos sinais pode ser encontrada no tópico materiais e métodos, os espectros no IV de todas as moléculas encontram-se nos anexos 84 a 91 (páginas 289 à 296).

Após caracterização, as moléculas **18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 34 e 35** tiveram suas estruturas esperadas confirmadas pelos métodos espectroscópicos e seus rendimentos variaram de 11% a 61%. Quando comparados com os rendimentos da literatura por metodologias similares, as reações apresentaram pouca variação, porém, sínteses envolvendo catalisadores diversos, inclusive de alto custo, por diversas vezes possuem maiores rendimentos. Entretanto, os rendimentos obtidos são considerados satisfatórios devido a metodologia aplicada. Devido as semelhanças estruturais das moléculas, apenas uma foi

escolhida para ter seu RMN e IV discutidos, molécula **21**, de forma representativa para a série. A figura 32 mostra o espectro de hidrogênio para a quinazolinonas **21**, enquanto a figura 33 mostra o espectro de carbono da mesma molécula, ambos realizados em DMSO, e serão discutidos em sequência.

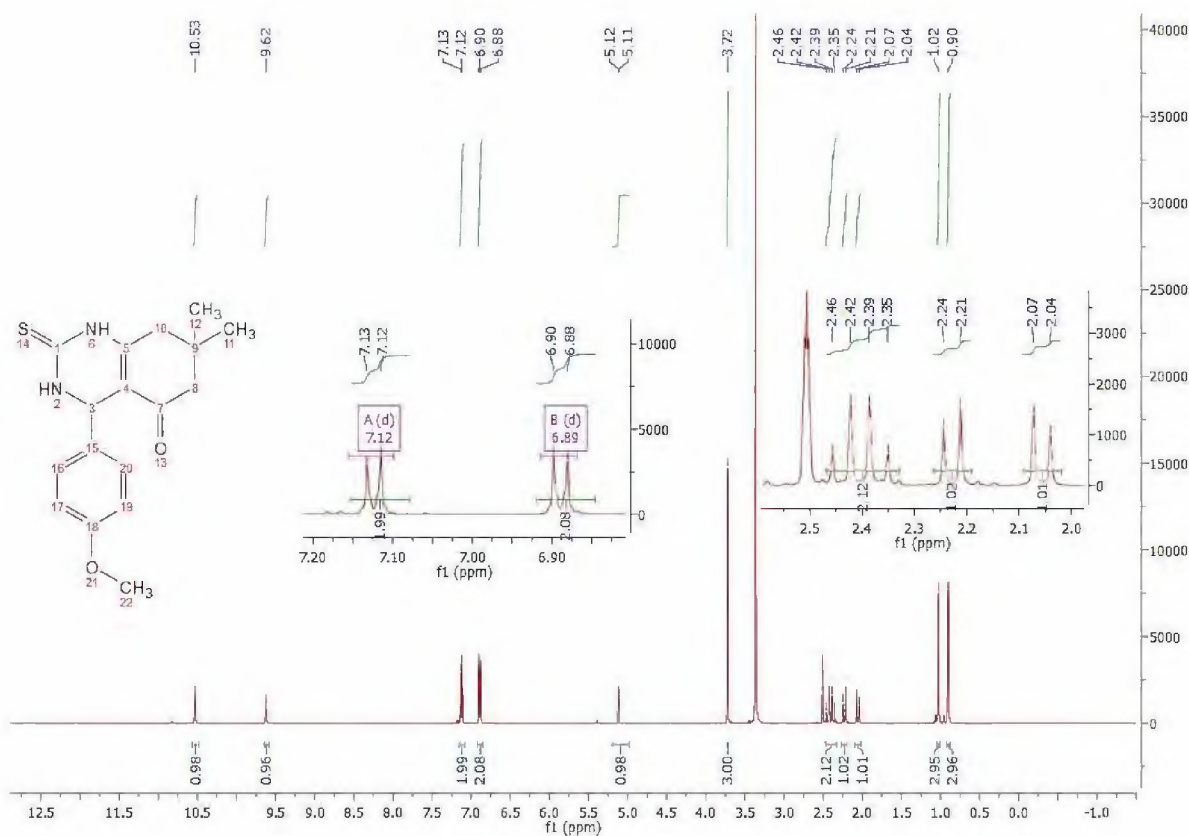


Figura 32: Espectro de RMN ¹H 500 MHz (DMSO-d₆) para molécula **21**. Fonte: Elaborada pela autora.

Os dois singletos em δ_H 0.90 e 1.02 ppm são referentes aos hidrogênios das duas metilas em 11 e 12. Os dois dupletos (δ_H 2.04-2.07 e δ_H 2.21-2.24 ppm) são referentes aos hidrogênios 8, que saem com deslocamentos distintos devido ao efeito anisotrópico da carbonila e das posições pseudo-axial e pseudo-equatorial. O quadrupletto (δ_H 2.35-2.46 ppm) é referente aos hidrogênios 10, a multiplicidade é devido à proximidade com a metila 12. O singletto em δ_H 3.72 ppm é referente a metoxila 22 e aparece em campo mais baixo justamente pela proximidade com o oxigênio.

O duplete em δ_H 5.11-5.12 ppm é o mais representativo do espectro, pois ele é referente ao hidrogênio 3, e não está presente nos reagentes e indica a formação do produto da reação multicomponente.

Os dois dupletos em δ_H 6.98-6.90 e δ_H 7.12-7.13 ppm são referentes aos 4 hidrogênios aromáticos, indicando um sistema *para*-substituído do tipo AA'BB'. Os sinais mais blindados são referentes aos hidrogênios 17 e 19, devido à proximidade com a metoxila, já os sinais menos blindados são referentes aos hidrogênios 16 e 20. Os simpletos em δ_H 9.62 e 10.53 ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos nitrogênios 2 e 6 (provenientes da tioureia) respectivamente.

O espectro de carbono (figura 33) para a molécula **21** tem o sinal mais representativo com deslocamento químico 52.0 ppm, sendo referente ao carbono assimétrico 3. Esse sinal indica que houve a ciclização e não está presente nos reagentes (tioureia, 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona e 4-metoxibenzaldeído).

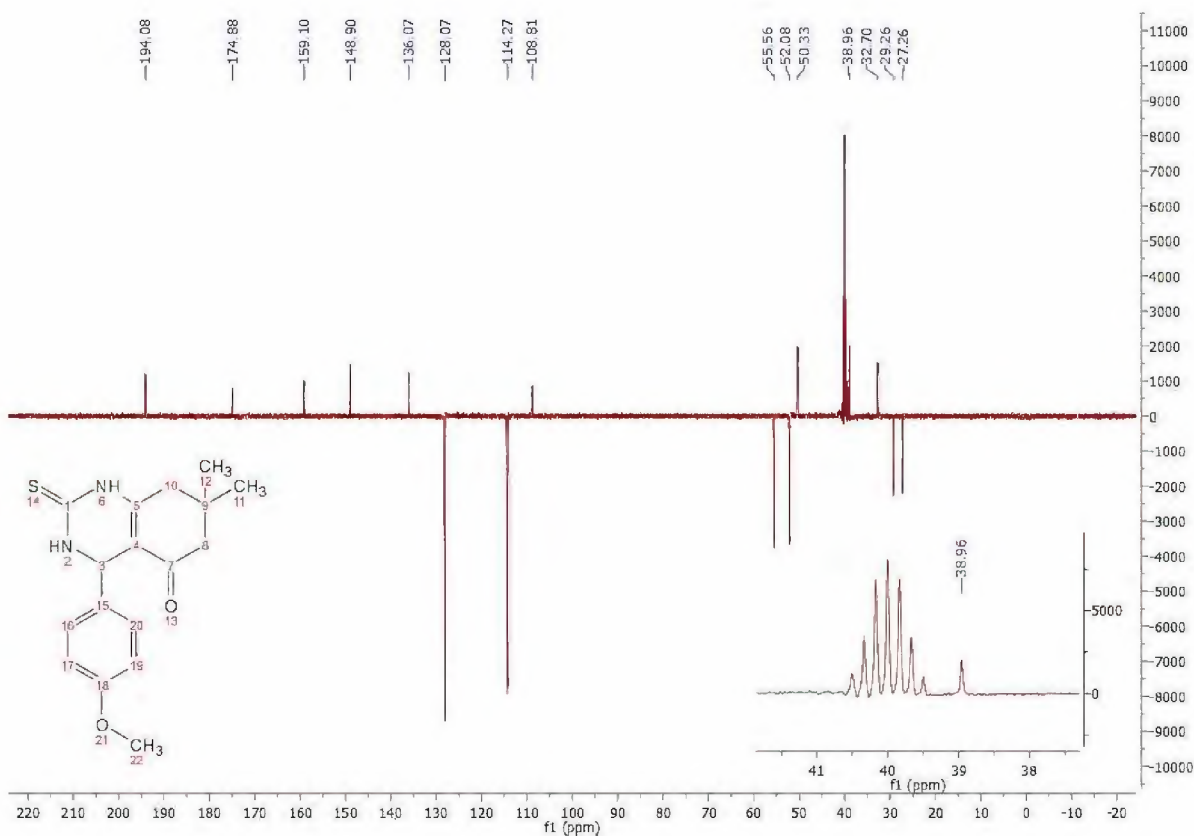


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula **21**. Fonte: Elaborada pela autora.

Os dois sinais com os menores deslocamentos do espectro (δ_C 27.2 e 29.2 ppm) são referentes aos carbonos das metilas 11 e 12. O carbono quaternário 9 é representado pelo sinal δ_C 32.7 ppm. Os carbonos metilênicos (10 e 8) possuem sinais característicos, sendo o sinal δ_C 38.9 ppm referente ao carbono 10 e o sinal δ_C 50.3 ppm referente ao carbono 8. O sinal δ_C 55.5 ppm é referente ao carbono 22, e tem um deslocamento mais alto devido a estar ligado ao oxigênio.

Os dois sinais referentes a carbonos metínicos (δ_C 114.2 e 128.0 ppm) são referentes a dois carbonos cada um, pois são provenientes do anel 4-metoxifenil. Sendo os carbonos 17 e 19 responsáveis pelo sinal com menor deslocamento químico e os carbonos 16 e 20 responsáveis pelo sinal com maior deslocamento químico, novamente reforçando a presença do sistema *para*-substituído do tipo AA'BB'.

Os carbonos quaternários são responsáveis pelos sinais acima da linha de base com deslocamentos químicos entre 108.8 e 194,0 ppm. O sinal referente ao carbono 4 é o de menor deslocamento químico (δ_C 108.8 ppm), seguido do sinal referente ao carbono 15 (δ_C 128.0 ppm), 5 (δ_C 148.9 ppm) e 18 (δ_C 159.1 ppm). O carbono 1 possui um deslocamento químico mais alto devido a dupla ligação com o enxofre (δ_C 174.8 ppm) e o carbono carbonílico 7, possui o maior deslocamento químico do espectro (δ_C 194.0 ppm).

Os deslocamentos químicos obtidos para as quinazolinonas são semelhantes, a depender da ureia utilizada. Tal fato permite uma elucidação das moléculas de modo mais fácil.

Os espectros de infravermelho foram utilizados para complementar o entendimento a respeito das estruturas das quinazolinonas obtidas de forma satisfatória, por esse motivo o espectro obtido para a molécula **21** (figura 34), foi escolhido para ser representativo para a série (com as bandas mais representativas destacadas por letras), e algumas particularidades dos outros compostos serão exemplificadas. Todos os espectros de infravermelho podem ser vistos nos anexos 84 a 91 (páginas 289 à 296).

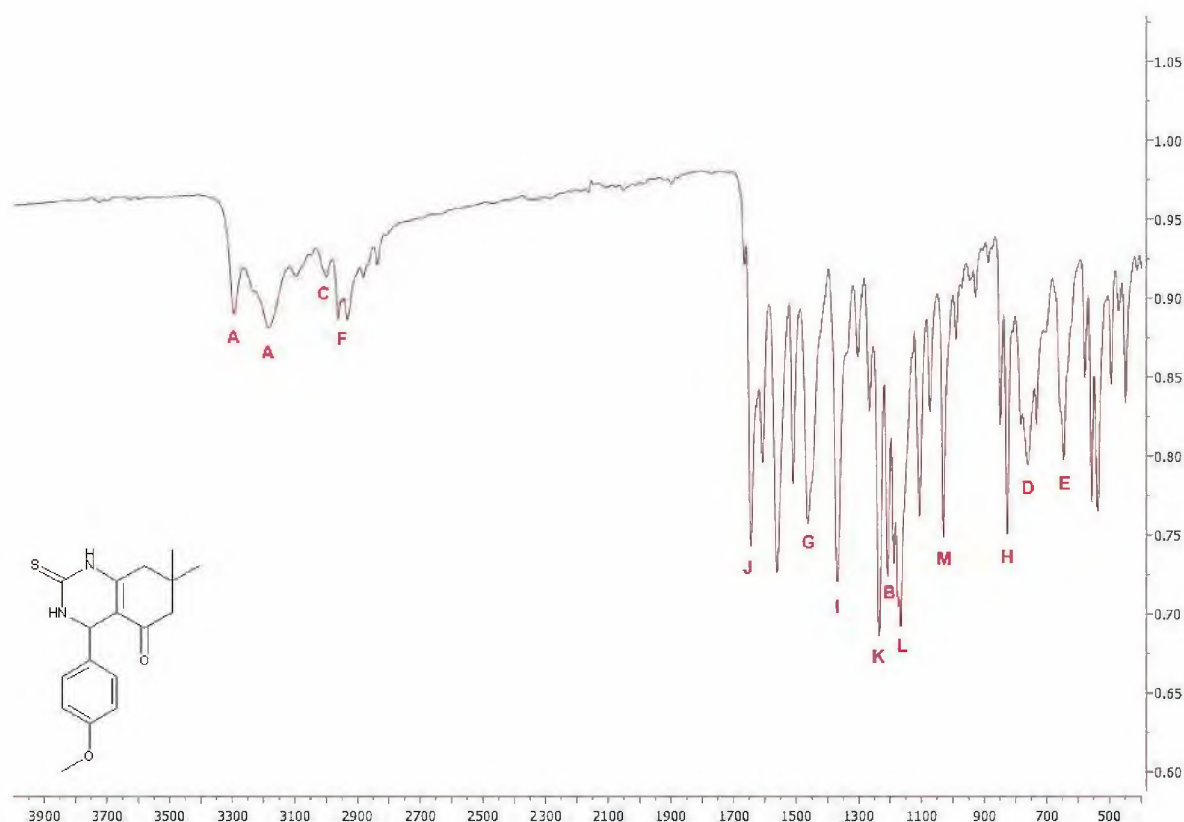


Figura 34: Espectro de IV para molécula **21**. Fonte: Elaborada pela autora.

As bandas referentes a presença do N-H são características em todos os espectros. As bandas aparecem na região entre 3280-3300 cm⁻¹ (**A**) é característica da deformação axial de N-H. Por ser uma amina secundária conjugada, sua banda de deformação angular é mais dificilmente observada no espectro e pode-se estar sobreposta por outras bandas por ser de intensidade fraca, mas espera-se que esteja na faixa de 1490-1580 cm⁻¹. As vibrações de deformação axial de C-N nas aminas secundárias aparecem na região de absorção 1240 cm⁻¹ (**B**).

As bandas referentes as regiões aromáticas também são bem características, a banda de deformação axial de C-H de aromáticos ocorre na faixa 3010-3040 cm⁻¹ (**C**). As bandas em aproximadamente 755 cm⁻¹ (**D**) e 650 cm⁻¹ (**E**) são referentes a deformação angular no anel aromático monossustituído.

As deformações axiais simétricas e assimétricas para C-H presentes na molécula ocorrem na região abaixo de 3000 cm⁻¹ (**F**), na faixa entre 2925-2970 cm⁻¹. A deformação angular simétrica no plano gera uma banda característica em 1465 cm⁻¹ (**G**), enquanto a banda

de deformação angular assimétrica no plano aparece na região de 750 cm^{-1} (**H**). As absorções de deformação angular simétrica e assimétrica fora do plano pode ser visualizada em aproximadamente 1380 cm^{-1} (**I**).

A vibração de deformação axial de carbonilas gera uma banda característica. A banda referente a deformação axial da carbonila na cicloexanona é esperada na região de 1700 cm^{-1} , porém, por estarem conjugadas a frequência diminui gerando uma banda em 1650 cm^{-1} (**J**). No caso da molécula **21** a presença da tiocarbonila gera uma absorção na região de 1240 cm^{-1} (**K**) referente a deformação axial, como o grupo C=S está ligado a nitrogênios, além da banda de deformação axial, várias outras bandas na ampla região de 1563 a 700 cm^{-1} podem aparecer, e são atribuídas a interações entre as deformações axiais de C=S e de C-N.

A presença da metoxila gera bandas características. A primeira é devido a deformação axial assimétrica de C-O-C e aparece em 1175 cm^{-1} (**L**), enquanto a deformação axial simétrica de C-O-C gera uma banda mais fraca em 1040 cm^{-1} (**M**).

Para as moléculas **20** e **28** não é possível observar a banda de deformação axial de O-H na faixa de 3550 - 3650 cm^{-1} , gerada pela presença de hidroxila livre, entretanto, o alargamento das bandas na região de 3000 - 3100 cm^{-1} indica a ligações de hidrogênio intermolecular. A deformação axial de C-O e a deformação angular no plano de O-H podem acoplar, simultaneamente, com a vibração de deformação axial do C-C adjacente e com a vibração de deformação angular simétrica fora do plano de C-H. A deformação axial de C-O leva então à formação de uma banda forte entre 1000 - 1260 cm^{-1} , enquanto a deformação angular de O-H pode levar a formação de uma banda na faixa de 1260 - 1410 cm^{-1} . A presença de halogênios também gera bandas específicas provenientes das vibrações de deformação axial da ligação carbono-halogênio. Os compostos bromados (moléculas **18**, **22**, **26** e **34**) possuem banda na região entre 690 - 515 cm^{-1} e os compostos clorados (moléculas **19**, **23**, **27** e **35**) possuem banda na região entre 1096 - 1100 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

A caracterização das moléculas **30** e **33** indicaram a obtenção de diversos produto, e uma vez que a idealização do trabalho visava uma síntese com menor geração de resíduos, a cromatografia em coluna foi descartada como método de purificação e essas moléculas foram excluídas. A caracterização das moléculas **17**, **25**, **29**, e **31** demonstrou que a quinazolinona pretendida não foi obtida, em contrapartida uma xantenodiona (dímero da dimedona) foi obtida e os rendimentos de acordo com o produto, calculados. Uma CCD comparativa foi realizada, que comprovou que as moléculas **17**, **25** e **29** possuem o mesmo fator de retenção, indicando

que a ureia utilizada realmente não está presente no produto. O espectro de hidrogênio (figura 35) e de carbono (figura 36) da xantenodiona **29** foi utilizado a fim de exemplificar o produto obtido na síntese dessas moléculas. Todos os espectros de RMN se encontram nos anexos 52 a 83 (páginas 257 à 288).

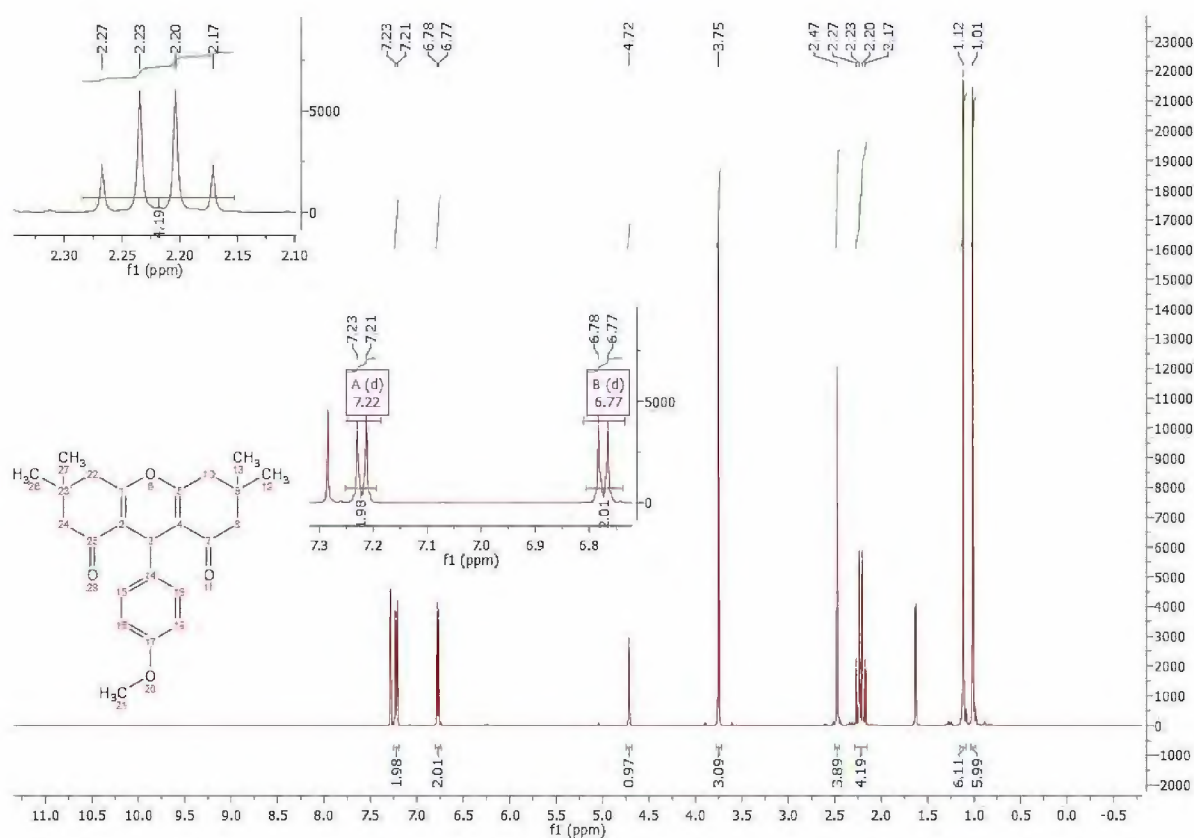


Figura 35: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (CDCl_3) para molécula **29**. Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros da xantenodiona **29** foram obtidos utilizando clorofórmio deuterado como solvente. Esperava-se que o produto obtido possuísse duas metilas provenientes da 5,5 dimetilciloexanodiona (cada um integrando para 3 hidrogênios), entretanto, ao integrar os sinais em δ_{H} 1.01 e 1.12 ppm vemos que cada um desses simpletos integraram para 6 hidrogênios e seriam referentes as metilas 12, 13, 26 e 27. Tal fato é a primeira evidência que a reação não ocorreu de acordo como esperado, ocorrendo a formação de uma xantenodiona. A obtenção da xantenodiona também é evidenciada pelo quadrupeto (δ_{H} 2.17-2.27 ppm) e o simpleto (δ_{H} 2.47 ppm) que integram cada um para 4 hidrogênios e são referentes aos hidrogênios provenientes dos CH_2 8, 10, 22 e 24. O simpleto em δ_{H} 3.75 ppm e os dupletos em δ_{H} 6.77-6.78 e δ_{H} 7.21-

7.23 ppm são referentes aos prótons provenientes do 4-metoxibenzaldeído, sendo o sinal em δ_H 3.75 ppm referente aos hidrogênios da metoxila (21) e os dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos, com padrão de anel aromático *para*-substituído. O simpleto em δ_H 4.72 ppm é referente ao hidrogênio 3 e é o mais representativo do espectro, pois não está presente nos reagentes e indica que houve uma ciclização.

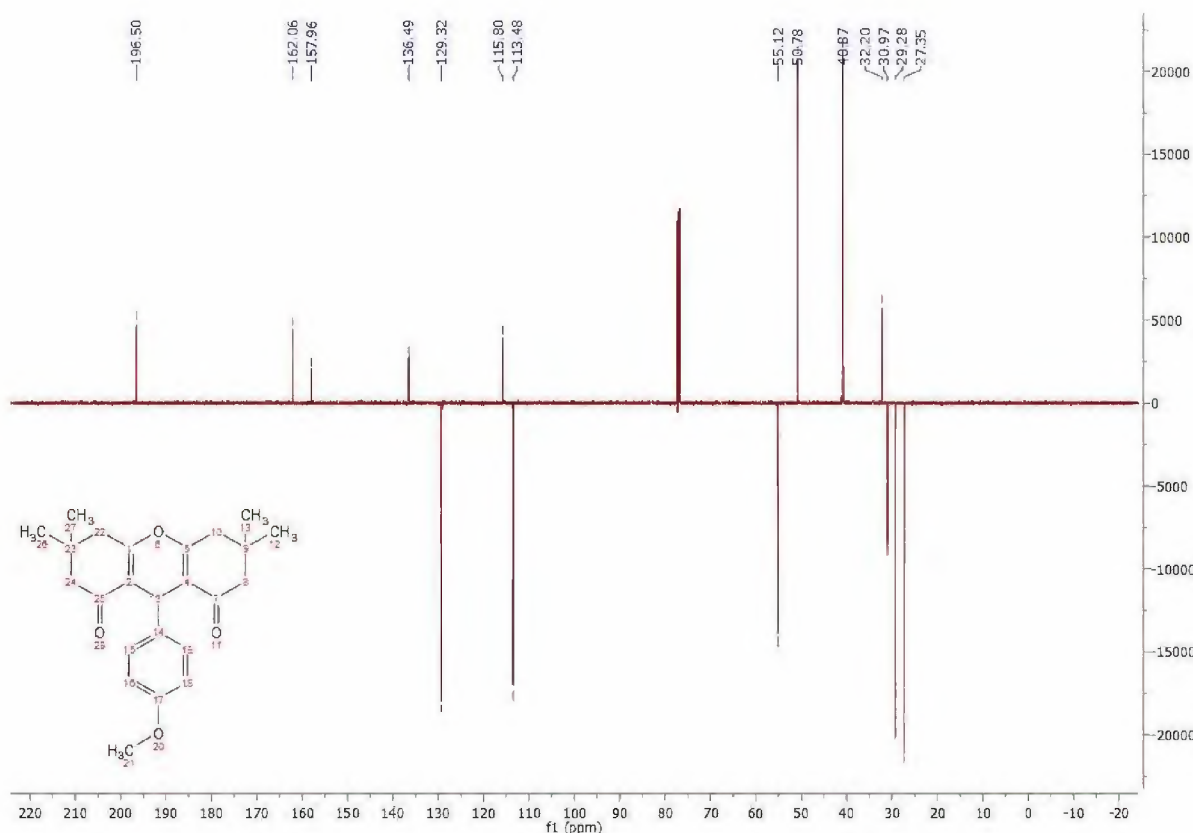


Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz ($CDCl_3$) para molécula **29**. Fonte: Elaborada pela autora.

As evidências da presença da xantenodiona também são visualizadas no espectro de carbono (figura 36). Os sinais com menores deslocamentos químicos do espectro (δ_C 27.3 e 29.2 ppm) são referentes as metilas 12, 13, 26 e 27. O sinal em δ_C 30.9 ppm é referente ao carbono 3, e indica a ciclização, enquanto o sinal em δ_C 32.2 ppm é referente aos 2 carbonos quaternários alifático 9 e 23. Os carbonos metilênicos equivalente, 10-22 e 8-24, são representados pelos sinais em δ_C 40.8 e δ_C 50.7 ppm, respectivamente. O carbono 21, proveniente da metoxila tem seu respectivo sinal com deslocamento químico em δ_C 55.1 ppm. O padrão de substituição também fica evidente no espectro de carbono, tendo apenas dois sinais

de carbonos metínicos em δ_C 113.4 ppm (referente aos carbonos 16 e 18) e δ_C 129.3 ppm (referente aos carbonos 15 e 15). Os 5 sinais carbonos quaternários, δ_C 115.8, 136.4, 157.9, 162.0 e 196.5 ppm possuem clara diferença no tamanho, isso se deve ao fato que os sinais em δ_C 115.8, 162.0 e 196.5 ppm são referentes a 2 carbonos cada um (carbonos 2-4; 1-5; 7-25, respectivamente), enquanto os sinais em δ_C 136.4 e 157.9 ppm são referentes a um carbono cada um, carbonos provenientes do anel 4-metoxifenil (carbonos 17 e 14, respectivamente).

A ausência de sinais referente a um segundo anel, e de uma segunda carbonila, esperados para a molécula **29**, confirmam a presença da xantenodiona. Apesar, do espectro da molécula **29** ter sido realizado em clorofórmio, não sendo possível portanto a obtenção de sinais referentes a prótons que estejam ligados a nitrogênios, outras moléculas tiveram suas caracterizações feitas utilizando DMSO-*d*₆ como solvente, e não foi constatada a presença de NH na molécula. Tal evidência nos mostra que a ureia utilizada nas reações, que levaram as moléculas **17**, **25**, **29** e **31**, não estão presentes no produto.

Os espectros de infravermelho das xantenodionas possuem um ponto a ser destacado, sendo mais uma evidência clara da não obtenção da quinazolinonas. A figura 37 mostra a região de absorção entre 3900 e 2400 cm⁻¹ para a molécula **21** (A) e para molécula **29** (B). Como é possível observar, as bandas referentes a presença do N-H estão presentes na molécula **21**, na região entre 3280-3300 cm⁻¹, enquanto na molécula **29** não temos a presença dessas bandas características da deformação axial de N-H. Tal fato evidencia a ausência de N-H na molécula **29**, corroborando a ausência da ureia utilizada na estrutura do produto. Os espectros completos das moléculas **17**, **25**, **29** e **31** podem ser vistos nos anexos 52, 53, 68, 69, 76, 77, 78 e 79 (páginas 257-258; 273-274; 281 à 284).

A proposta de esquema de intermediários mais aceita para a obtenção das quinazolinonas (esquema 12) tem como primeira etapa a reação entre a ureia e o aldeído utilizado levando a formação do intermediário **I**. Posteriormente, o intermediário **I** realiza uma condensação de Knoevenagel com a dimedona, que está em equilíbrio ceto-enólico, para gerar a quinazolinona desejada.

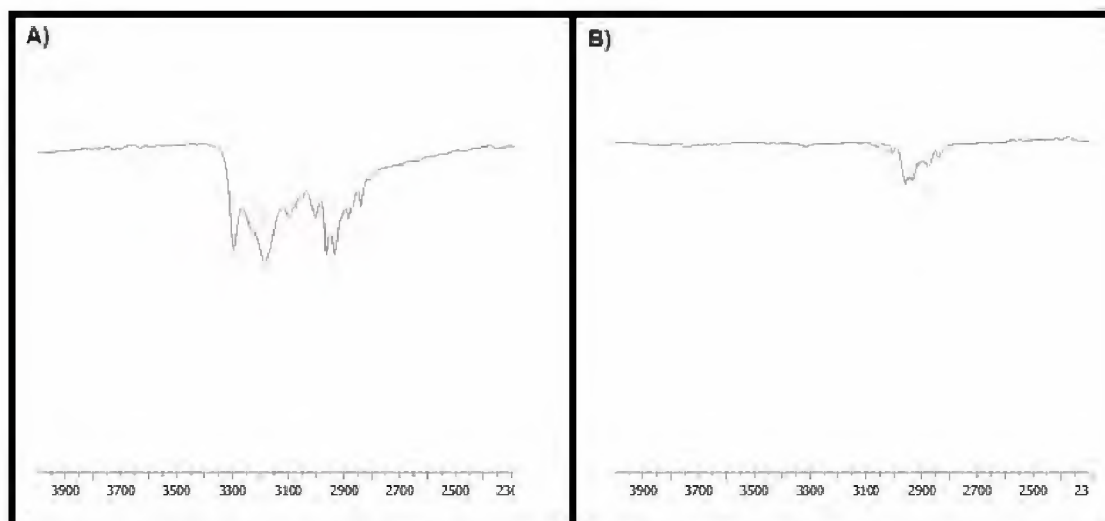
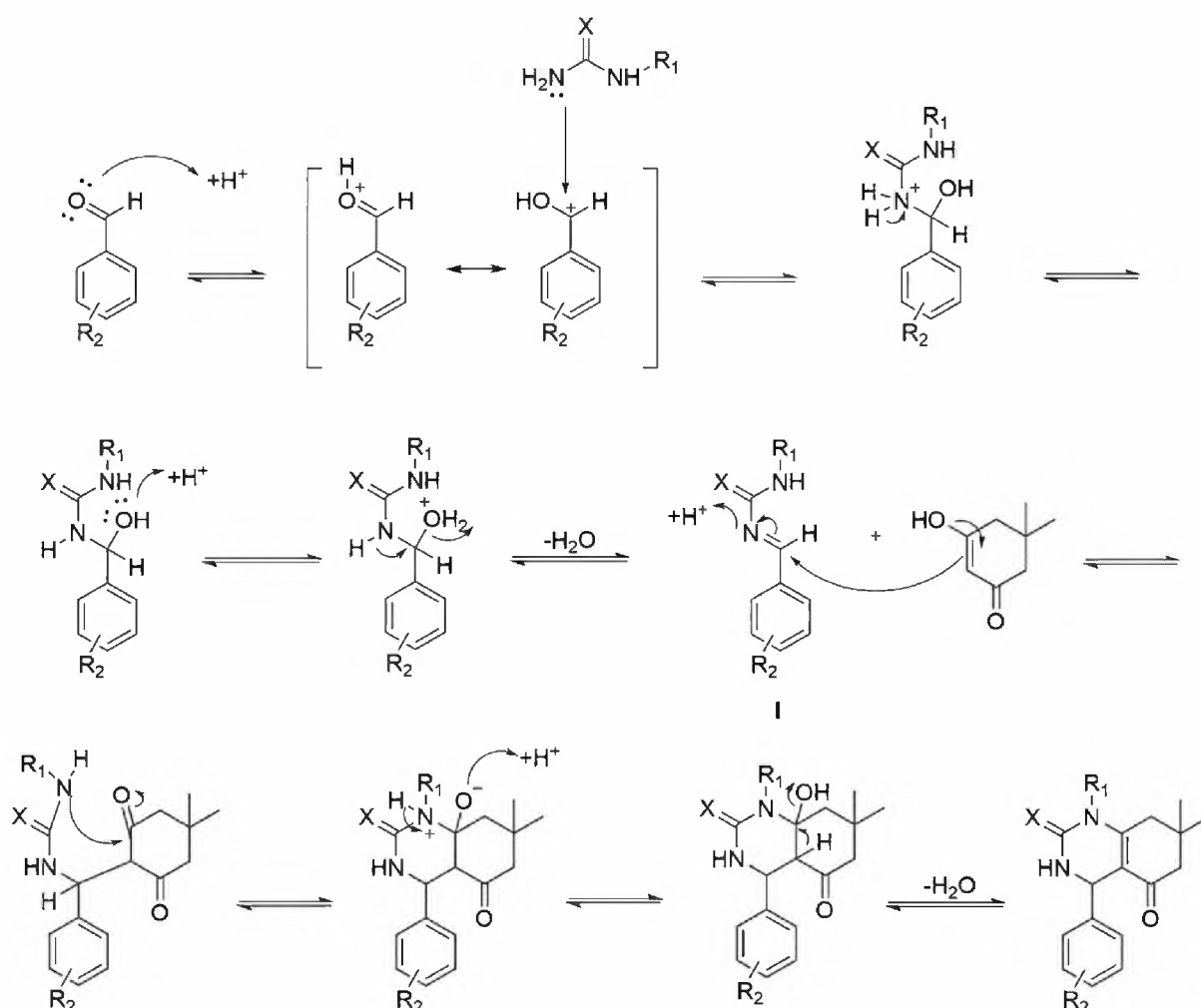


Figura 37: Comparação dos espectros de infravermelho das moléculas **21** (A) e **19** (B). Fonte:
Elaborada pela autora.



Esquema 12: Proposta de esquema de intermediários para as quinazolinonas. Fonte:
Elaborada pela autora.

Entretanto, segundo destaque dado por Costanzo e colaboradores, ao se comparar os mecanismos da clássicos das reações de Biginelli e Hantzsch, é possível notar que a etapa de Knoevenagel presente na reação de Hantzsch está presente em uma das propostas de mecanismo de Biginelli (mecanismo de Sweet e Fissekis – esquema 8A). A etapa seguinte das duas reações é similar e, portanto, uma competição entre as duas pode ocorrer. Considerando a competição entre as duas reações multicomponentes e a proposta de mecanismo de Kappe como a mais aceitável, é possível concluir que a reação de Hantzsch gera o produto termodinâmico, enquanto a reação de Biginelli gera o produto cinético (figura 38), levando ao entendimento que determinadas condições (temperatura, características dos reagentes e força do catalisador) pode favorecer uma das duas reações (COSTANZO; NARDI; OLIVERIO, 2020).

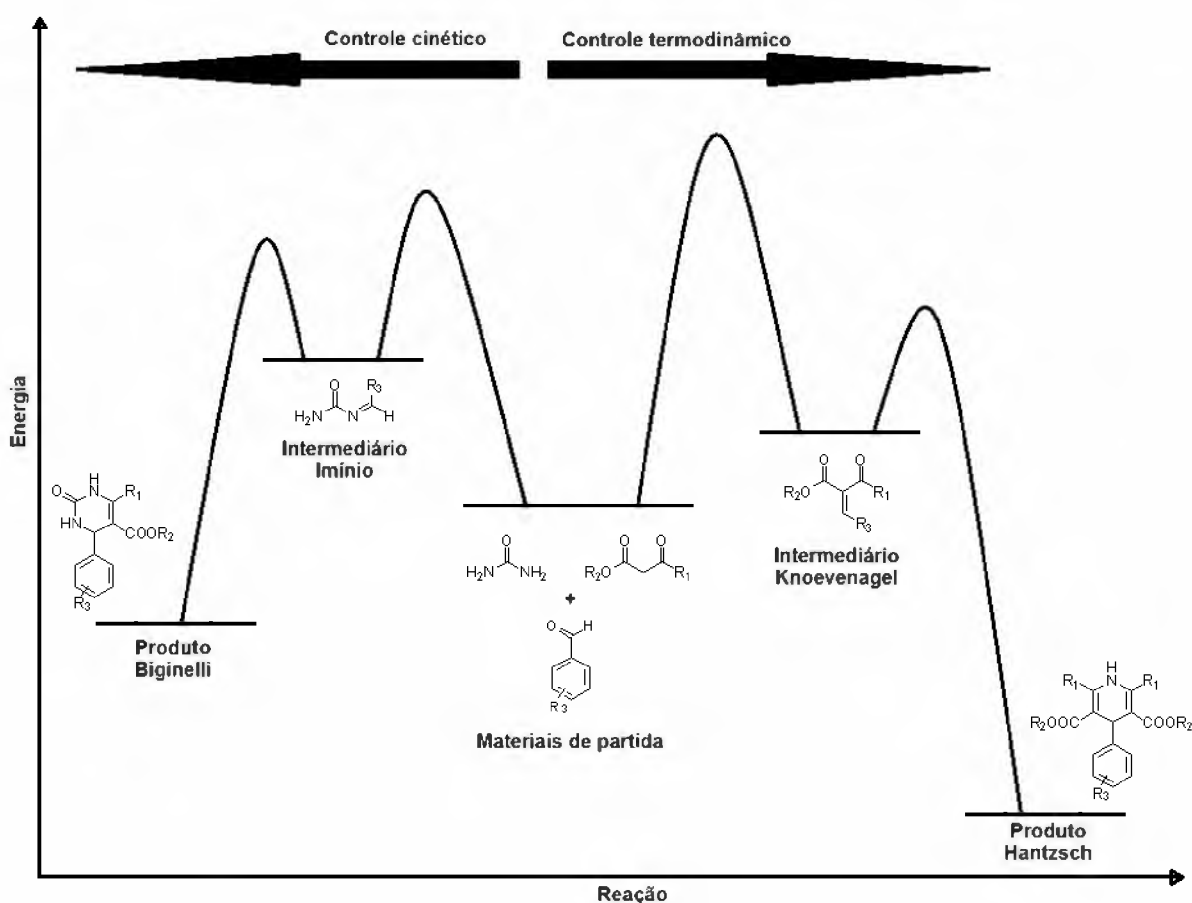
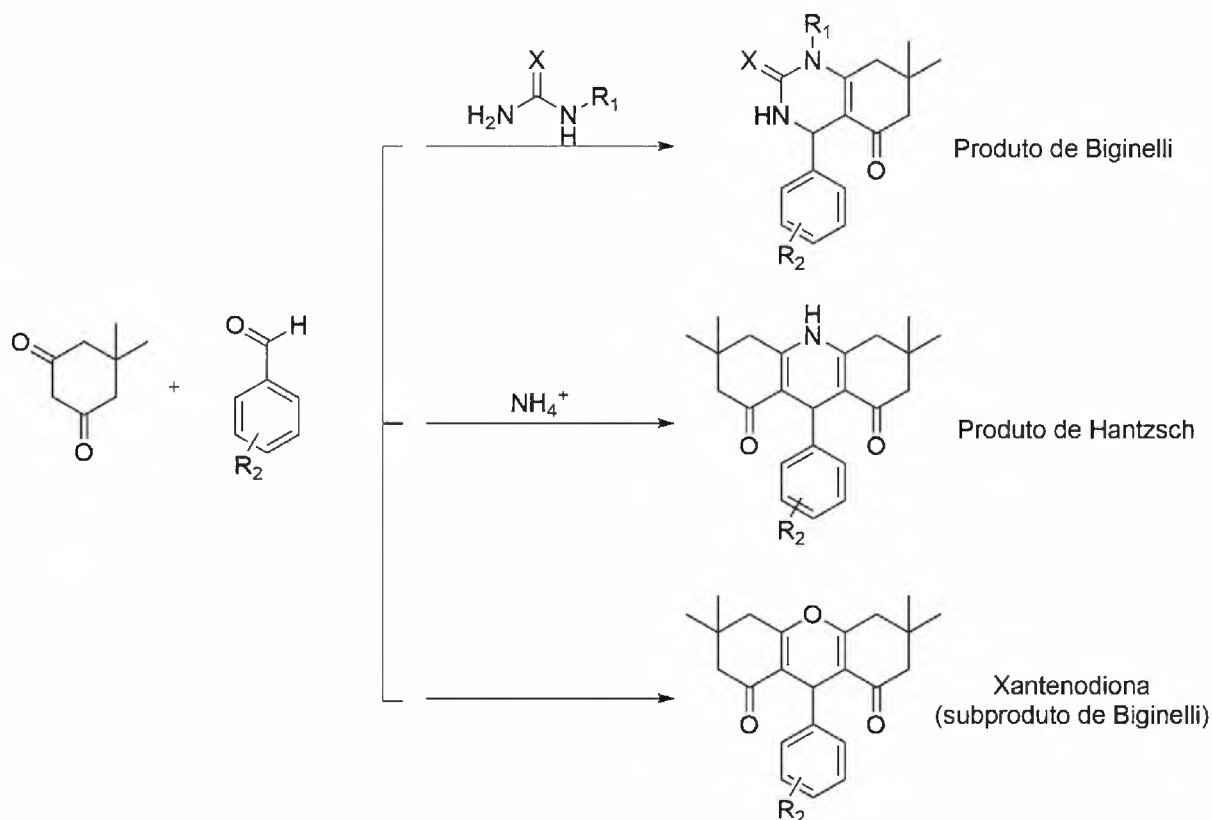


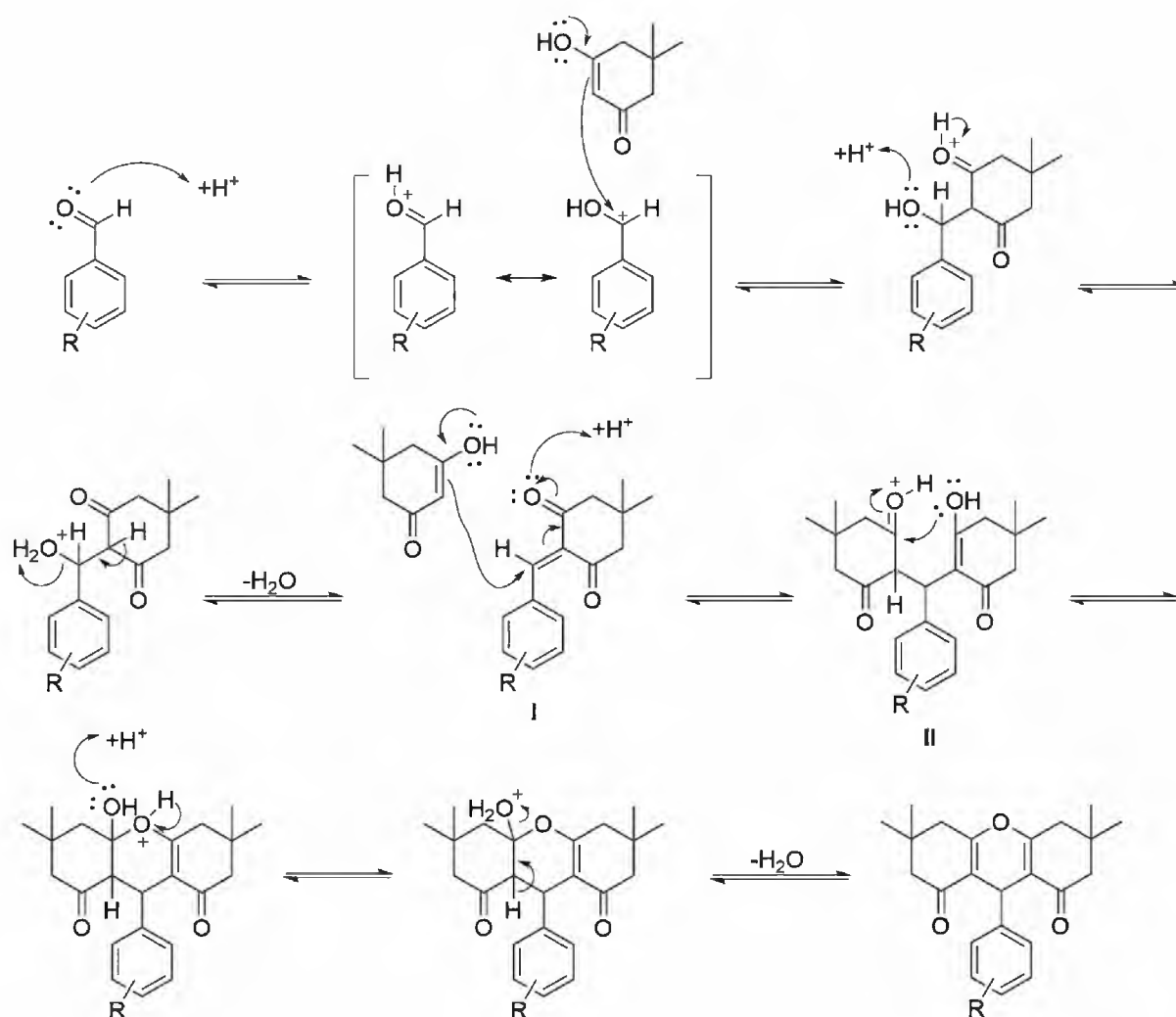
Figura 38: Competição dos mecanismos de Biginelli e Hantzsch. Fonte: COSTANZO; NARDI; OLIVERIO, 2020 – modificada.

Contudo, apesar da competição que pode ocorrer entre reações de Hantzsch e Biginelli, o produto obtido para as moléculas **17**, **25**, **29** e **31**, surpreendentemente, não segue nenhum dos

dois caminhos clássicos, sugerindo uma terceira via de competição, a obtenção de xantenodionas (esquema 13). De acordo com Tonkikh e colaboradores, as xantenodionas são um subproduto da reação de Biginelli e podem ser obtidos de forma majoritária ou minoritária a depender das condições reacionais (TONKIKH; STRAKOV; PETROVA, 2004)



O esquema de intermediários proposto para a obtenção de xantenodionas já foi previamente relatado nos trabalhos de Hataminejad, Jadhav e Pavithra. A proposta sugere que na primeira etapa ocorra uma reação de Knoevenagel entre o aldeído e 1 equivalente da dimedona, que está em equilíbrio ceto-enólico, levando a formação do intermediário **I**. O segundo equivalente de dimedona realiza então uma adição de Michael com o intermediário **I** gerando o intermediário **II**. Por fim, a ciclização ocorre, seguida de uma desidratação, levando a formação da xantenodiona desejada (esquema 14) (HATAMINEJAD; EZABADI, 2022; JADHAV; PATIL; PATIL, 2024; PAVITHRA; ETHIRAJ, 2022).



Esquema 14: Esquema de intermediários para obtenção da xantenodionas. Fonte: HATAMINEJAD; EZABADI, 2022 – modificada.

Com o intuito de confirmar que as xantenodionas são um subproduto da reação de Biginelli a reação para o produto **17** foi repetida e acompanhada por CCD. Após o tempo de 24 horas um foi possível notar pela CCD a presença de duas manchas, com diferentes polaridades. Uma coluna cromatográfica foi realizada para isolamento dos dois produtos, utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (gradiente). Os dois produtos foram recuperados e a caracterização comprovou a presença da xantenodiona (produto **17.1**) como produto majoritário e mais apolar, enquanto o segundo produto, mais polar, era a quinazolinonas desejada (produto **17.2**).

Os espectros de próton (figura 39) e carbono (figura 40) mostram claramente a presença da quinazolinonas desejada, apesar de pequenas impurezas, uma vez que temos a integração

dos hidrogênios alifáticos equivalentes ao esperado para a quinazolinona, além da presença dos sinais em δ_H 7.7 e 9.4 ppm referentes aos hidrogênios ligados a nitrogênios (provenientes da ureia). O sinal mais importante no espectro de carbono, que confirma a presença da quinazolinona, é o carbono quaternário em δ_C 152.5 ppm que é referente ao carbono carbonílico proveniente da ureia.

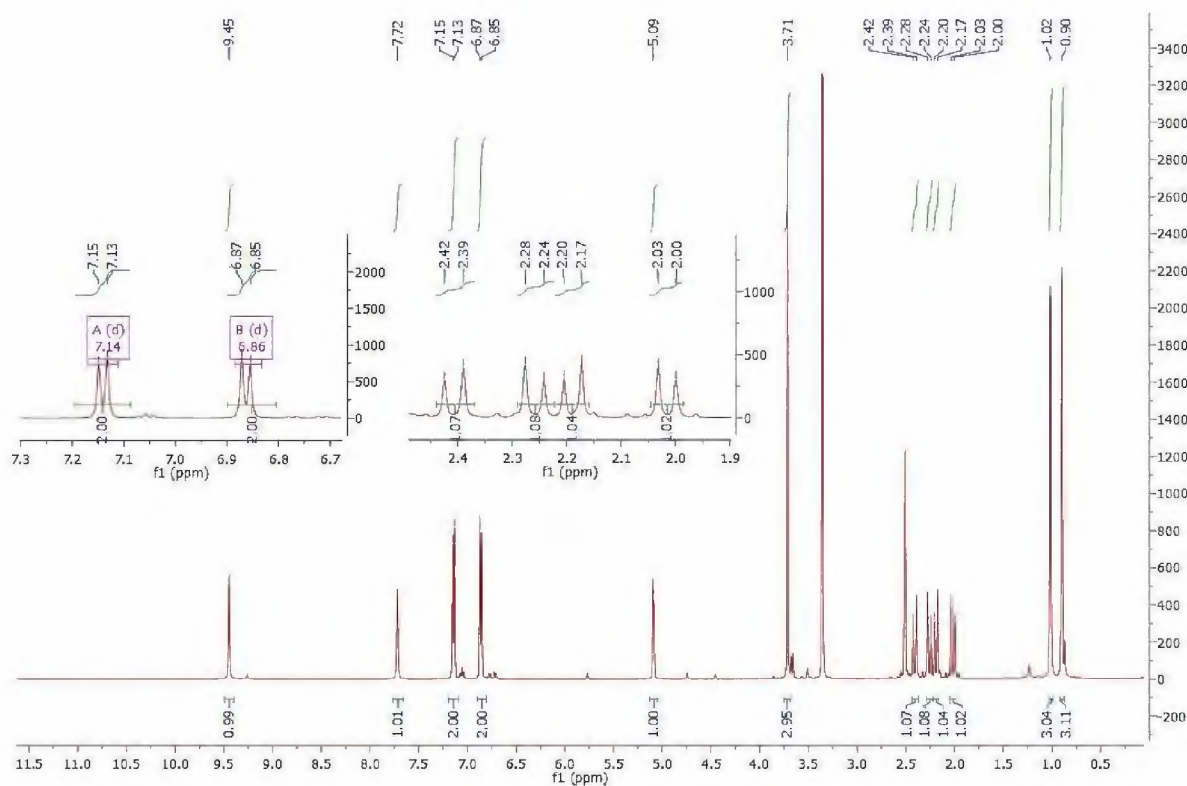


Figura 39: Espectro de RMN 1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula **17.2**. Fonte: Elaborada pela autora.

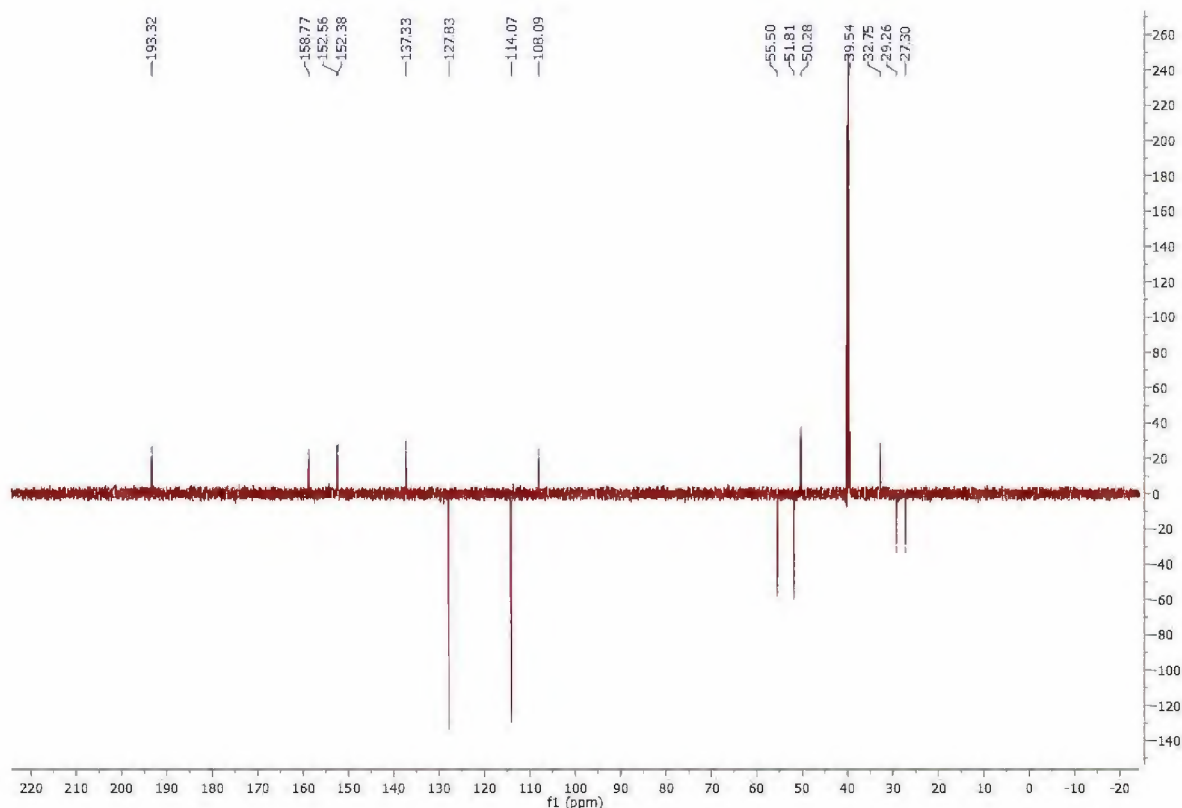


Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula **17.2**. Fonte: Elaborada pela autora.

A idealização do trabalho visava uma síntese com menor geração de resíduos, onde a utilização de cromatografia em coluna foi descartada como método de purificação. Levando-se em conta que, quando utilizou-se o protocolo 1, para as reações **17**, **25**, **29** e **31** as xantenodiona foram obtidas, enquanto para as reações **24**, **32** e **36** não se obteve precipitado e para as reações **30** e **33** a caracterização não indicou a presença do produto desejado, almejando-se a síntese efetiva das quinazolinonas propostas através de um protocolo que não tem a utilização de purificação por coluna cromatográfica, devido ao apelo ambiental envolvido na menor geração de resíduos, dois novos protocolos foram utilizados para as reações **17**, **24**, **25**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33** e **36**. O protocolo 2 foi baseado nos trabalhos de Akhter e colaboradores, Sun e colaboradores e Pasha e colaboradores, utilizando como catalisador 20 mol% de cloreto de zinco (AKHTER et al., 2015; PASHA. M. A.; SWAMY; JAYASHANKARA, 2005; SUN et al., 2004). Enquanto o protocolo 3 foi baseado no trabalho de Gomaa e colaboradores e utilizou como catalisador 0,25 mmol de I_2 como catalisador (GOMAA; SAYED; MASOUD, 2013). As reações **24**, **30**, **32**, **33** e **36** não obtiveram precipitados e foram excluídas. Para as reações **17**, **25**, **29** e **31** houve

a formação de precipitados, porém, ao serem comparados com os precipitados obtidos pelo protocolo 1, indicaram a presença das xantenodionas de forma majoritária ou única em todas as reações, indicando que esses protocolos não foram eficazes na obtenção das quinazolinonas desejadas. Contudo, é possível concluir que apesar da não obtenção das quinazolinonas para essas reações, um produto não esperado, porém caracterizado, foi obtido e abre uma nova vertente para trabalhos futuros utilizando xantenodionas, uma vez que para as xantenodionas sintetizadas já foram atribuídas diversas propriedades farmacológicas como anticâncer, antitubercular e antimicrobial (BHAT et al., 2021; MULAKAYALA et al., 2012; RAHIMIFARD et al., 2016).

Um resumo de todas as moléculas obtidas e caracterizadas, bem como os valores de atividades relacionada, pode ser encontrado no anexo 92 (páginas 297).

3.2. Avaliação da atividade anti-chagásica

A avaliação da atividade anti-chagásica foi realizada apenas para as moléculas **17.2, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 27, 28 e 34**. O ensaio realizado tem como objetivo medir a citotoxicidade dos compostos frente a formas amastigotas de *T. cruzi* e frente a células LLC-MK2 para determinar a seletividade dos compostos.

O ensaio frente a formas amastigotas de *T. cruzi* utiliza um método colorimétrico buscando avaliar a atividade das quinazolinonas em relação a capacidade de inibir ou matar o parasita. O CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo) é um reagente amarelo utilizado no ensaio. A enzima β -galactosidase é expressa pelo *T. cruzi* transfectado e quando ativa realiza a hidrólise do CPRG gerando como produtos galactose e vermelho de clorofenol (coloração vermelha), que pode ser detectado espectrofotometricamente. Parasitas mortos ou com viabilidade celular comprometidos possui uma menor atividade da β -galactosidase, interferindo diretamente na coloração produzida (figura 41A) (BUCKNER et al., 1996; CAL et al., 2016).

A avaliação da citotoxicidade frente a células LLC-MK2 também ocorre por métodos colorimétricos. As células LLC-MK2 são uma linhagem celular derivada de rim de macaco-Rhesus. Para esse ensaio utiliza-se como reagente o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), de coloração amarela, que, quando em contato com células metabolicamente ativas é reduzido a formazan (coloração roxa). Essa redução só é possível pois células viáveis possuem enzimas oxidoreduases dependentes de NAD(P)H que reduzem o

MTT à formazan. A quantidade de formazan formada, gera uma coloração mais intensa, e é diretamente proporcional à viabilidade celular, refletindo o número de células viáveis (figura 41B) (MERCK, 2024a).

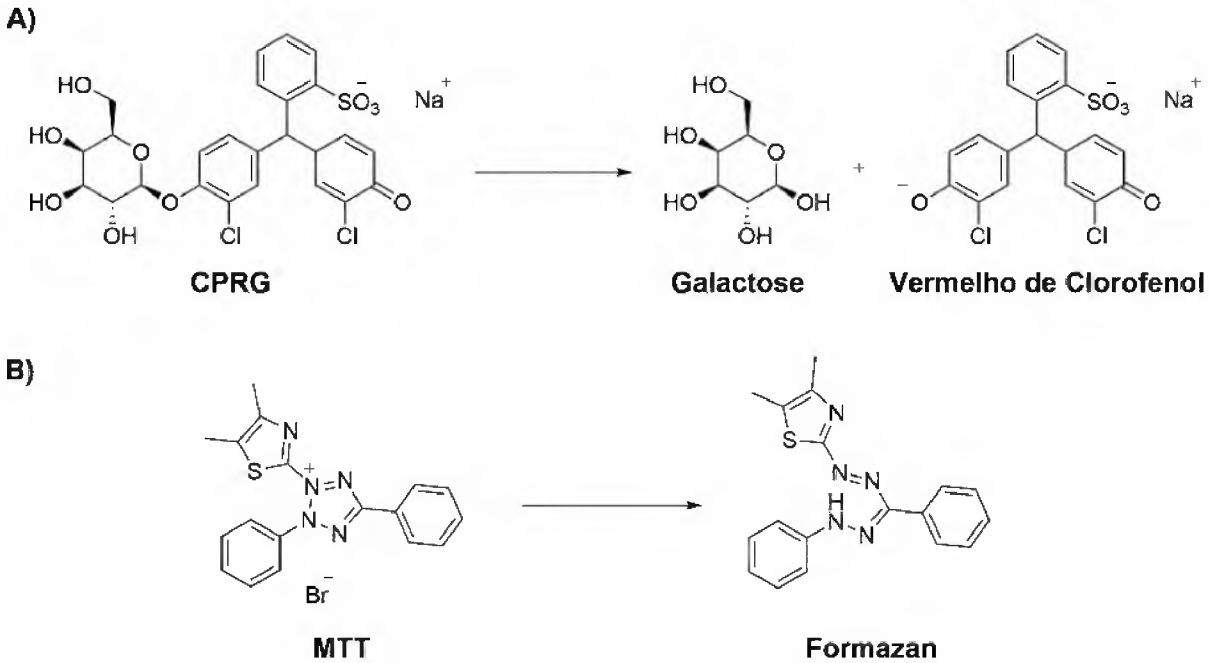
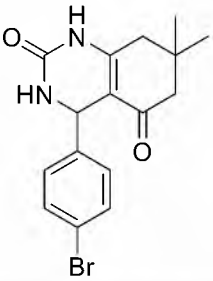
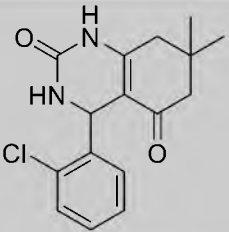
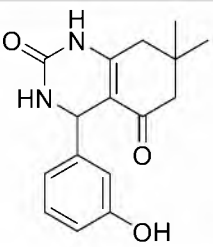
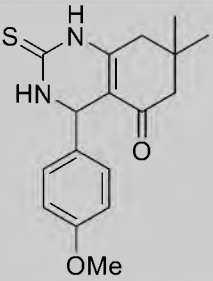
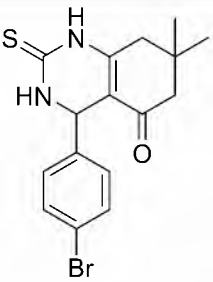
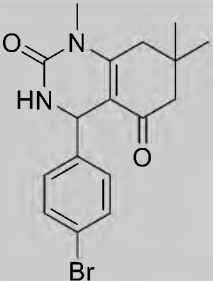


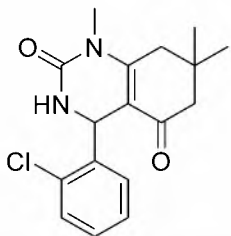
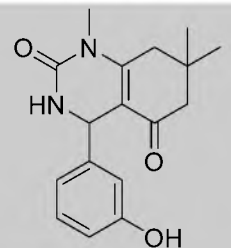
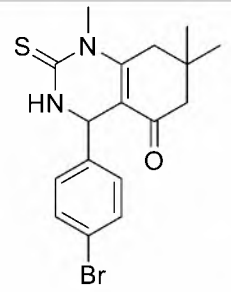
Figura 41: Reações envolvidas nos ensaios de citotoxicidade frente a formas amastigotas de *T. cruzi* (A) e frente a células LLC-MK2 (B). Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados das avaliações biológicas encontram-se sumarizados na tabela 5. Os gráficos de porcentagem de viabilidade em função de diversas concentrações (200, 80, 32 e 12.5 µM) frente a formas amastigotas e células LLC-MK2 se encontram nos anexos 93 e 94 (páginas 302 e 303), respectivamente.

Tabela 5: Resultados da avaliação da atividade anti-chagásica das quinazolinonas.

Molécula	Estrutura	% Inibição amastigota	% Inibição LLC-MK2
		(100µM)	(200µM)
17.2		12.1	-

18		54.3	-
19		13.7	9.1
20		12.3	-
21		12.9	11.4
22		95.3	46.7
26		34.6	-

27		15.9	18.8
28		5.1	11.1
34		95.2	-

O percentual médio de inibição, indica a porcentagem de inibição frente as formas amastigotas do *T. Cruzi*. Inibições maiores indicam uma menor viabilidade celular após a utilização dos compostos. As moléculas **17.2**, **19**, **20**, **21**, **26**, **27** e **28** possuem uma baixa inibição, isso indica que os compostos com os substituintes 4-metoxifenil, 2-clorofenil e 3-hidroxifenil não possuem uma atividade promissora frente a formas amastigotas de *T. cruzi*.

A moléculas **18** possui uma inibição razoável, enquanto as moléculas **22** e **34** possuem uma atividade inibitória mais promissora. Destaca-se que a inibição frente a formas amastigotas foram melhores para os compostos que possuem o substituinte 4-bromofenil, o que indica que o bromo na posição 4 é essencial para a atividade. Considerando as moléculas **18**, **22**, **26** e **34**, que possuem o substituinte 4-bromofenil, as maiores inibições são encontradas nas moléculas **22** e **34**, com valores muito próximos. Comparando-se as moléculas **18** e **22**, é possível determinar a importância do enxofre, proveniente da tioureia, como substituinte, uma vez que apenas a sua presença gerou uma maior inibição. Tal fato é corroborado quando comparadas as moléculas **26** e **34**, onde apenas a inserção do enxofre gerou um aumento considerável no percentual de inibição, o que sugere que o enxofre realiza interações fundamentais para a atividade da quinazolinona.

A inserção de metila, proveniente da ureia utilizada, parece ser tolerada em moléculas que possuem o 4-bromo como substituinte, uma vez que, ao compararmos as moléculas **18** e **26** vemos que a inserção da metila gerou uma diminuição no percentual de inibição, enquanto, ao compararmos as moléculas **22** e **34** vemos que a inserção da metila não ocasionou uma mudança considerável no percentual de inibição.

Para determinar a seletividade das quinazolinonas, as moléculas foram avaliadas também frente a fibroblastos saudáveis (linhagem LLC-MK2). Para as moléculas **17.2**, **18**, **20**, **26** e **34**, não foram observados diminuição da viabilidade celular. As moléculas **19**, **21**, **27** e **28** possuem um percentual de inibição baixo, indicando que elas conseguem ultrapassar a membrana celular e gerar algum dano celular à células saudáveis. Já a molécula **22** apresentou um percentual de inibição de 46,7% a 200µM, o que indica que o composto não é seletivo, e está comprometendo a viabilidade celular das células saudáveis e das células do parasita.

Os resultados de percentual de inibição indicam que as moléculas **22** e **34** apresentam os melhores resultados para a porcentagem de inibição de amastigota, inibindo mais de 95%, sendo a diferença estrutural entre as duas apenas a inserção do grupo metila (molécula **34**). Contudo, ao analisarmos os resultados de inibição de células LLC-MK2, é possível observar que a molécula **22** possui uma inibição frente a células saudáveis, o que não é um perfil desejável, enquanto a molécula **34** é seletiva. Tal fato, nos leva a definir que a presença da metila na molécula **34** confere uma maior seletividade a molécula, sendo, portanto, a melhor molécula avaliada.

Do ponto de vista da química exploratória, os resultados são promissores, uma vez que abrem uma vertente para possíveis trabalhos futuros explorando quinazolinonas que possuem como constituintes a N-metilourea e o 4-bromofenil.

3.3. Avaliação da atividade antiproliferativa

Dentre as moléculas obtidas, 8 tiveram o seu perfil citotóxico avaliado frente a linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) e próstata (DU-145), são elas moléculas **17.2**, **19**, **20**, **21**, **22**, **26**, **27** e **28**.

Os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50% da atividade) por meio de ensaios de proliferação celular estão apresentados na tabela 6. Estas medidas quantitativas estão relacionadas à potência de uma determinada substância na inibição/toxicidade *in vitro* da função biológica em 50%. Os métodos *in vitro* são rápidos e permitem diferentes tipos de análises

simultâneas associadas com a redução do número de animais utilizados para a pesquisa nas fases iniciais do desenvolvimento de novos fármacos. A triagem em 11 concentrações permitiu a identificação do perfil de atividade dos compostos em célula tumoral de mama (MDA-MB-231) e de próstata (DU-145).

Tabela 6: Resultados da avaliação da atividade antiproliferativa das quinazolinonas.

Composto	CI ₅₀ ± DP (μM)	
	MDA-MB-231	DU-145
17.2	ppt	ppt
19	> 100	> 100
20	40,26 ± 4,60	42,37 ± 5,32
21	> 100	> 100
22	53,30 ± 6,27	> 100
26	> 100	> 100
27	> 100	> 100
28	> 100	> 100
Doxorrubicina	0,125 ± 0,046	0,042 ± 0,012
Colchicina	0,008 ± 0,001	0,014 ± 0,001

A avaliação da viabilidade celular frente a células cancerígenas ocorre através de um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade das desidrogenases mitocondriais das células viáveis reduzirem um corante azul não fluorescente chamado resazurina (fenoxazin-3-ona) na resorufina (coloração rosa). A proporção de células viáveis é diretamente relacionada com a intensidade da coloração observada e pode ser quantificada usando um fluorímetro com leitor de microplaca (MERCK, 2024b).

A molécula **17.2** apresentou baixa solubilidade em DMSO e por isto não foi incluído na tabela 6. As moléculas **20** e **22** foram as únicas a apresentarem citotoxicidade frente a linhagem MDA-MB-231, sendo os valores de CI₅₀ maiores que 10μM e muito superiores aos valores de CI₅₀ para os padrões positivos Doxorrubicina (CI₅₀ = 0,008 ± 0,001μM) e Colchicina (CI₅₀ = 0,125 ± 0,046μM). A ausência de resultados não permite a correlação estrutura e atividade, apenas sendo possível inferir que as moléculas não possuem um bom perfil citotóxico frente a essa linhagem.

A avaliação frente a linhagem celular DU-145 indicou que apenas a molécula **20** se mostrou pouco citotóxica, com um valor de $CI_{50} > 40\mu M$, o que representa um valor muito superior aos valores de CI_{50} dos padrões positivos Doxorubicina ($CI_{50} = 0,014 \pm 0,001\mu M$) e Colchicina ($CI_{50} = 0,042 \pm 0,012\mu M$). Devido ao fato de todos os valores de CI_{50} serem maiores que $10\mu M$, nenhuma quinazolinona foi selecionada para avaliação em fibroblastos humano saudáveis (HFF-1) para determinação da seletividade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese das moléculas

Todas as sínteses foram sintetizadas no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As ureias utilizadas nas sínteses foram: ureia (CAS: 57-13-6); tioureia (CAS: 62-56-6); N-metilureia (CAS: 598-50-5); N-metiltioureia (CAS: 598-52-7); N-fenilureia (CAS: 64-10-8). O dicarbonilado utilizado foi a 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (CAS: 126-81-8). Os aldeídos utilizados foram: 4-metoxibenzaldeído (CAS: 126-81-8); 4-bromobenzaldeído (CAS: 1122-91-4); 2-clorobenzaldeído (CAS: 89-98-5); 3-hidroxibenzaldeído (CAS: 100-83-4). Os catalisadores utilizados foram: ácido clorídrico concentrado (CAS: 7647-01-0); coreto de zinco (CAS: 7646-85-7); iodo (CAS: 7553-56-2).

Os solventes utilizados, etanol absoluto, acetato de etila, n-hexano, dimetilsulfóxido deuterado e clorofórmio deuterado foram fornecidos pela Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

As reações foram acompanhadas através da cromatografia em camada delgada analítica (CCD), com placas de sílica gel Merck 60 F254 de 0,25 mm de espessura (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), utilizando como eluente mistura de hexano e acetato de etila (75%) e analisando na câmara de luz UV (254 ou 366 nm) CN-15LC (Vilber Lourmat, Collégien, France).

O isolamento do composto **17** foi realizado por cromatografia em coluna. Para a confecção da pastilha, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). E como fase móvel, foram utilizados n-hexano e acetato de etila de forma gradiente.

4.1.1. Protocolo 1

Em um tubo reacional adiciona-se 1 mmol da 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona, 1 mmol do aldeído, 1.5 mmol da ureia, 1 mL de solvente (etanol), 3 gotas de HCl e um agitador magnético. A reação é levada a uma chapa de aquecimento e agitação, com a temperatura e agitação controladas (refluxo – 75°C) por 24h. A formação do produto é confirmada por cromatografia de camada delgada. O isolamento e purificação ocorrem através da filtração a vácuo do precipitado formado, seguida de recristalização em etanol, para obtenção do produto puro a ser caracterizado.

4.1.2. Protocolo 2

Em um tubo reacional adiciona-se 1 mmol da 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona, 1 mmol do aldeído, 1.5 mmol da ureia, 1 mL de solvente (etanol), 20 mol% de ZnCl_2 e um agitador magnético. A reação é levada a uma chapa de aquecimento e agitação, com a temperatura e agitação controladas (refluxo – 75°C) por 24h. A reação é acompanhada por cromatografia de camada delgada. O isolamento e purificação ocorrem quando há a formação de precipitado, através da filtração a vácuo do precipitado, seguida de recristalização em etanol, para obtenção do produto puro a ser caracterizado.

4.1.3. Protocolo 3

Em um tubo reacional adiciona-se 2 mmol da 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona, 1 mmol do aldeído, 2 mmol da ureia, 16 gotas de solvente (etanol), 0,25 mmol de I_2 e um agitador magnético. A reação é levada a uma chapa de aquecimento e agitação, com a temperatura e agitação controladas (refluxo – 75°C) por 3-6h. A reação é acompanhada por cromatografia de camada delgada. A mistura reacional foi tratada com solução aquosa de tiosulfato de sódio (CAS: 10102-17-7), extraída com acetato de etila. A camada de acetato de etila foi lavada com solução diluída de tiosulfato de sódio, seguida de água destilada e teve sua secagem realizada através do uso de sulfato de sódio anidro (CAS: 7757-82-6). A solução resultante teve seu solvente evaporado dando origem a um produto sólido recristalizado em etanol, para obtenção do produto a ser caracterizado.

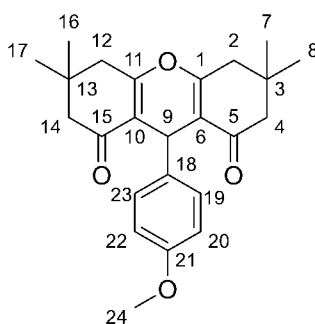
4.2. Caracterização das moléculas

Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C), realizadas em um espectrômetro da marca Brüker de 500MHz (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C), modelo Ultrashield Plus da Central Analítica Multiusuário – PPGQ – UFRRJ, usando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) ou clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm).

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados em um aparelho da marca MS Tecnopon, modelo PFM II. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Brüker, modelo FT-IR Vertex 70, pela técnica de ATR na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Ambos os equipamentos pertencentes ao Instituto de Química da UFRRJ.

As atribuições dos carbonos e hidrogênios obtidos no espectro de RMN de carbono e hidrogênio, assim como o rendimento e pontos de fusão das moléculas, são descritos a seguir.

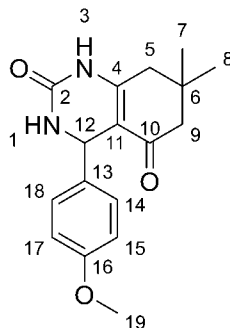
- **Composto 17.1** – 9-(4-metoxifenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,5,6,7,9-hexahidro-1H-xanteno-1,8(2H)-diona. Sólido branco obtido com 74% de rendimento e ponto de fusão de 243-248°C.



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.23-7.21 (H19 e H23 – d, 2H, $J = 7.22$ Hz), 6.78-6.77 (H20 e H22 – d, 2H, $J = 6.78$ Hz), 4.72 (H9 – s, 1H), 3.76 (H24 – s, 3H), 2.47 (H4 e H14 – s, 4H), 2.27-2.24-2.21-2.17 (H2 e H12 – q, 4H), 1.12 (H8 e H17 – s, 6H), 1.02 (H7 e H16 – s, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 196.5 (C5 e C15 – C; sp 2), 162.0 (C1 e C11 – C; sp 2), 157.9 (C21 – C; sp 2), 136.4 (C18 – C; sp 2), 129.3 (C19 e C23 – CH; sp 2), 115.81 (C6 e C10 – C; sp 2), 113.48 (C20 e C22 – CH; sp 2), 55.12 (C24 – CH $_3$; sp 3), 50.7 (C4 e C14 – CH $_2$; sp 3), 40.8 (C2 e C12 – CH $_2$; sp 3), 32.2 (C3 e C13 – C; sp 3), 30.9 (C9 – CH; sp 3), 29.2 (C8 e C17 – CH $_3$; sp 3), 27.3 (C7 e C16 – CH $_3$; sp 3).

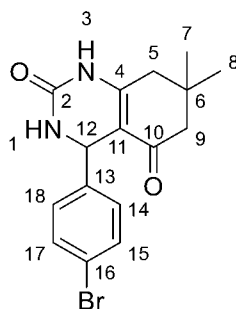
- **Composto 17.2** – 4-(4-metoxifenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1*H*,3*H*)-diona. Sólido branco obtido com 11% de rendimento e ponto de fusão de 280-285°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.45 (H3 – s, 1H), 7.72 (H1 – s, 1H), 7.15-7.13 (H14 e H18 – d, 2H, *J* = 7.14 Hz), 6.87-6.85 (H15 e H17 – d, 2H, *J* = 6.86 Hz), 5.09 (H12 – s, 1H), 3.71 (H19 – s, 3H), 2.42-2.39 (H9 – d, 1H), 2.28-2.24 (H9 – d, 1H), 2.20-2.17 (H5 – d, 1H), 2.03-2.00 (H5 – d, 1H), 1.02 (H8 – s, 3H), 0.90 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.3 (C10 – C; sp²), 158.7 (C16 – C; sp²), 152.5 (C2 – C; sp²), 152.3 (C4 – C; sp²), 137.3 (C13 – C; sp²), 127.8 (C14 e C18 – C; sp²), 114.0 (C15 e C17 – C; sp²), 108.0 (C11 – C; sp²), 55.5 (C19 – CH₃; sp³), 51.8 (C12 – CH; sp³), 50.2 (C9 – CH₂; sp³), 39.5 (C5 – CH₂; sp³), 32.7 (C6 – C; sp³), 29.2 (C8 – CH₃; sp³), 27.3 (C7 – CH₃; sp³).

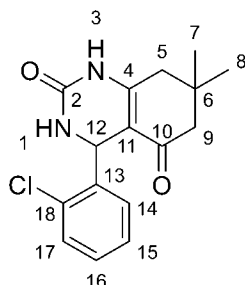
- **Composto 18** – 4-(4-bromofenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1*H*,3*H*)-diona. Sólido branco obtido com 61% de rendimento e ponto de fusão de maior que 300°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.53 (H3 – s, 1H), 7.80 (H1 – s, 1H), 7.52-7.51 (H15 e H17 – d, 2H, *J* = 7.52 Hz), 7.20-7.19 (H14 e H18 – d, 2H, *J* = 7.19 Hz), 5.15 (H12 – s, 1H), 2.43-2.39 (H9 – d, 1H), 2.28-2.25-2.21-2.18 (H5 e H9 – dd, 2H), 2.04-2.01 (H5 – d, 1H), 1.01 (H8 – s, 3H), 0.88 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.3 (C10 – C; sp²), 153.0 (C2 – C; sp²), 152.2 (C4 – C; sp²), 144.4 (C13 – C; sp²), 131.6 (C15 e C17 – CH; sp²), 128.9 (C14 e C18 – CH; sp²), 120.6 (C16 – C; sp²), 107.4 (C11 – C; sp²), 52.0 (C12 – CH; sp³), 50.2 (C9 – CH₂; sp³), 39.5 (C5 – CH₂; sp³), 32.7 (C6 – C; sp³), 29.1 (C8 – CH₃; sp³), 27.3 (C7 – CH₃; sp³).

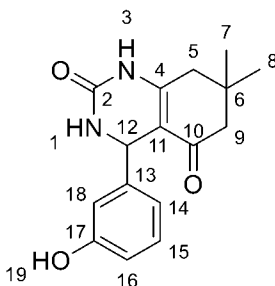
- **Composto 19** – 4-(2-clorofenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1*H*,3*H*)-diona. Sólido branco obtido com 54% de rendimento e ponto de fusão de 285-290°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.54 (H3 – s, 1H), 7.71 (H1 – s, 1H), 7.40-7.38 (H17 – d, 1H, *J* = 7.39 Hz), 7.32-7.30-7.29-7.28-7.27-7.26-7.24 (H14, H15 e H16 – m, 3H), 5.57 (H12 – s, 1H), 2.46-2.42 (H9 – d, 1H), 2.35-2.31 (H9 – d, 1H), 2.19-2.16 (H5 – d, 1H), 2.01-1.97 (H5 – d, 1H), 1.03 (H8 – s, 3H), 0.96 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.1 (C10 – C; sp²), 153.5 (C2 – C; sp²), 151.5 (C4 – C; sp²), 141.6 (C13 – C; sp²), 132.3 (C18 – C; sp²), 130.0 (C17 – CH; sp²), 129.8 (C15 – CH; sp²), 129.4 (C14 – CH; sp²), 127.8 (C16 – CH; sp²), 106.2 (C11 – C; sp²), 51.0 (C12 – CH; sp³), 50.2 (C9 – CH₂; sp³), 39.6 (C5 – CH₂; sp³), 32.7 (C6 – C; sp³), 29.1 (C8 – CH₃; sp³), 27.5 (C7 – CH₃; sp³).

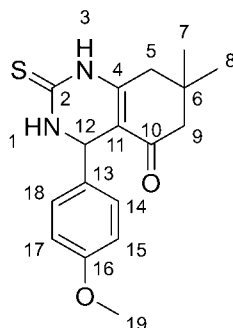
- **Composto 20** – 4-(3-hidroxifenil)-7,7-dimetil-4,6,7,8-tetrahydroquinazolino-2,5(1*H*,3*H*)-diona. Sólido branco obtido com 30% de rendimento e ponto de fusão (degradação) de 292-297°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.44 (H3 – s, 1H), 9.36 (H19 – s, 1H), 7.71 (H1 – s, 1H), 7.10-7.08-7.06 (H15 – t, 1H), 6.68-6.67 (H16 e H18 – m, 2H), 6.61- 6.59 (H14 – dd, 1H), 5.06 (H12 – d, 1H), 2.42-2.39 (H9 – d, 1H), 2.27-2.24 (H9 – d, 1H), 2.21-2.18 (H5 – d, 1H), 2.05-2.02 (H5 – d, 1H), 1.02 (H8 – s, 3H), 0.90 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.3 (C10 – C; sp²), 157.7 (C19 – C; sp²), 152.7 (C2 – C; sp²), 152.4 (C4 – C; sp²), 146.5 (C13 – C; sp²), 129.6 (C15 – CH; sp²), 117.2 (C14 – CH; sp²), 114.4 (C16 – CH; sp²), 113.6 (C18 – CH; sp²), 107.9 (C11 – C; sp²), 52.2 (C12 – CH; sp³), 50.3 (C9 – CH₂; sp³), 39.6 (C5 – CH₂; sp³), 32.7 (C6 – C; sp³), 29.2 (C8 – CH₃; sp³), 27.3 (C7 – CH₃; sp³).

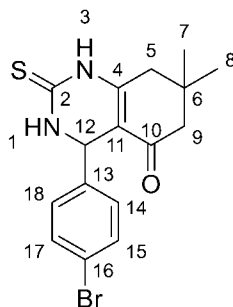
- **Composto 21** – 4-(4-metoxifenil)-7,7-dimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1*H*)-ona. Sólido amarelo claro obtido com 22% de rendimento e ponto de fusão de 273-278°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.53 (H3 – s, 1H), 9.62 (H1 – s, 1H), 7.13-7.12 (H14 e H18 – d, 2H, *J* = 7.12 Hz), 6.90-6.88 (H15 e H17 – d, 2H, *J* = 6.89 Hz), 5.12-5.11 (H12 – d, 1H), 3.72 (H19 – s, 3H), 2.46-2.42-2.39-2.35 (H9 – q, 2H), 2.24-2.21 (H5 – d, 1H), 2.07-2.04 (H5 – d, 1H), 1.02 (H8 – s, 3H), 0.90 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.0 (C10 – C; sp²), 174.8 (C2 – C; sp²), 159.1 (C4 – C; sp²), 148.9 (C16 – C; sp²), 136.0 (C13 – C; sp²), 128.0 (C15 e C17 – CH; sp²), 114.2 (C15 e C17 – CH; sp²), 108.8 (C11 – C; sp²), 55.5 (C19 – CH₃; sp³), 52.0 (C12 – CH; sp³), 50.3 (C9 – CH₂; sp³), 38.9 (C5 – CH₂; sp³), 32.7 (C6 – C; sp³), 29.2 (C8 – CH₃; sp³), 27.2 (C7 – CH₃; sp³).

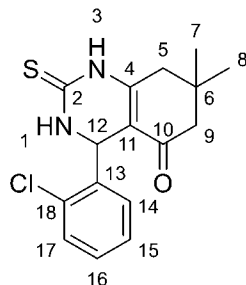
- **Composto 22** – 4-(4-bromofenil)-7,7-dimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1*H*)-ona. Sólido marrom obtido com 22% de rendimento e ponto de fusão de 280-285°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.65 (H3 – s, 1H), 9.71 (H1 – s, 1H), 7.56-7.55 (H15 e H17 – d, 2H, *J* = 7.55 Hz), 7.17-7.15 (H14 e H18 – d, 2H, *J* = 7.16 Hz), 5.17-5.16 (H12 – d, 1H), 2.46-2.43 (H9 – d, 1H), 2.38-2.35 (H9 – d, 1H), 2.25-2.22 (H5 – d, 1H), 2.08-2.05 (H5 – d, 1H), 1.02 (H8 – s, 3H), 0.88 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.1 (C10 – C; sp²), 175.0 (C2 – C; sp²), 149.3 (C4 – C; sp²), 143.1 (C13 – C; sp²), 131.9 (C15 e C17 – CH; sp²), 129.1 (C14 e C18 – CH; sp²), 121.1 (C16 – C; sp²), 108.1 (C11 – C; sp²), 52.1 (C12 – CH; sp³), 50.2 (C9 – CH₂; sp³), 38.9 (C5 – CH₂; sp³), 32.7 (C6 – C; sp³), 29.1 (C8 – CH₃; sp³), 27.2 (C7 – CH₃; sp³).

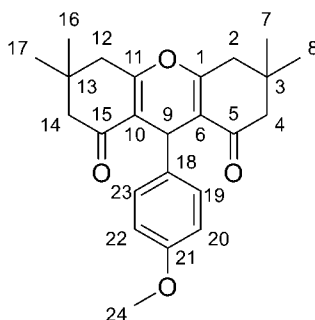
- **Composto 23** – 4-(2-clorofenil)-7,7-dimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1*H*)-ona. Sólido branco obtido com 40% de rendimento e ponto de fusão de 252-257°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.02 (H3 – s, 1H), 7.54-7.53-7.52 (H17 – m, 1H), 7.34-7.33-7.32 (H14 e H16 – t, 2H), 7.15-7.14-7.13 (H15 – m, 1H), 5.64 (H12 – s, 1H), 2.62 (H9 – s, 2H), 2.38-2.35 (H5 – d, 1H), 2.24-2.21 (H5 – d, 1H), 1.09 (H8 – s, 3H), 1.06 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.5 (C10 – C; sp²), 165.7 (C2 – C; sp²), 154.4 (C4 – C; sp²), 139.4 (C13 – C; sp²), 132.2 (C18 – C; sp²), 130.5 (C17 – CH; sp²), 129.9 (C14 – CH; sp²), 128.4 (C16 – CH; sp²), 127.2 (C15 – CH; sp²), 106.8 (C11 – C; sp²), 50.2 (C9 – CH₂; sp³), 41.1 (C5 – CH₂; sp³), 38.8 (C12 – CH; sp³), 32.5 (C6 – C; sp³), 29.0 (C8 – CH₃; sp³), 27.6 (C7 – CH₃; sp³).

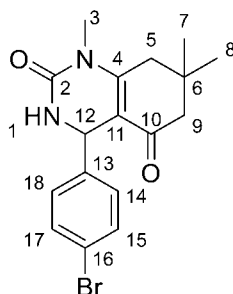
- **Composto 25** – 9-(4-metoxifenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,5,6,7,9-hexahidro-1*H*-xanteno-1,8(2*H*)-diona. Sólido branco obtido com 7% de rendimento e ponto de fusão de 244-249°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.07-7.06 (H19 e H23 – d, 2H, *J* = 7.07 Hz), 6.78-6.76 (H20 e H22 – d, 2H, *J* = 6.77 Hz), 4.46 (H9 – s, 1H), 3.68 (H24 – s, 3H), 2.27-2.24 (H2 e H12 – d, 2H), 2.09-2.06 (H2 e H12 – d, 2H), 1.03 (H8 e H17 – s, 6H), 0.90 (H7 e H16 – s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 196.5 (C5 e C15 – C; sp²), 163.1 (C1 e C11 – C; sp²), 129.4 (C19 e C23 – CH; sp²), 115.0 (C6 e C10 – C; sp²), 113.6 (C20 e C22 – CH; sp²), 55.3 (C24 – CH₃; sp³), 50.5 (C4 e C14 – CH₂; sp³), 32.3 (C3 e C13 – C; sp³), 30.7 (C9 – CH; sp³), 29.1 (C8 e C17 – CH₃; sp³), 26.9 (C7 e C16 – CH₃; sp³).

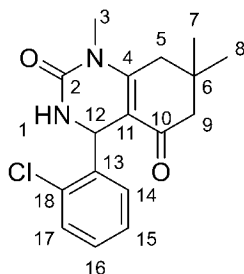
- **Composto 26** – 4-(4-bromofenil)-1,7,7-trimetil-4,6,7,8-tetrahidroquinazolino-2,5(1*H*,3*H*)-diona. Sólido bege obtido com 67% de rendimento e ponto de fusão de 185-192°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.06 (H1 – s, 1H), 7.51-7.50 (H15 e H17 – d, 2H, *J* = 7.51 Hz), 7.18-7.16 (H14 e H18 – d, 2H, *J* = 7.17 Hz), 5.17 (H12 – s, 1H), 3.14 (H3 – s, 3H), 2.70-2.65 (H9 – d, 1H), 2.55 (H9 – s, 1H), 2.19-2.16 (H5 – d, 1H), 2.11-2.08 (H5 – d, 1H), 1.05 (H8 – s, 3H), 0.94 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.8 (C10 – C; sp²), 154.6 (C2 – C; sp²), 152.9 (C4 – C; sp²), 143.9 (C13 – C; sp²), 131.7 (C15 e C17 – CH; sp²), 128.7 (C14 e C18 – CH; sp²), 120.6 (C16 – C; sp²), 109.6 (C11 – C; sp²), 50.3 (C12 – CH; sp³), 49.3 (C9 – CH₂; sp³), 39.2 (C5 – CH₂; sp³), 32.6 (C6 – C; sp³), 29.8 (C3 – CH₃; sp³), 28.9 (C8 – CH₃; sp³), 27.9 (C7 – CH₃; sp³).

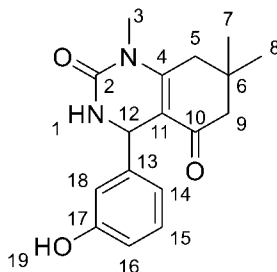
- **Composto 27** – 4-(2-clorofenil)-1,7,7-trimetil-4,6,7,8-tetrahidroquinazolino-2,5(1*H*,3*H*)-diona. Sólido branco obtido com 53% de rendimento e ponto de fusão de 227-232°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.94 (H1 – d, 1H), 7.40-7.39 (H17 – m, 1H), 7.28-7.27-7.26 (H14, H15 e H16 – m, 3H), 5.58 (H12 – d, 1H), 3.19 (H3 – s, 3H), 2.76-2.73 (H9 – d, 1H), 2.61-2.57 (H9 – d, 1H), 2.16-2.13 (H5 – d, 1H), 2.06-2.03 (H5 – d, 1H), 1.07 (H8 – s, 3H), 1.01 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.4 (C10 – C; sp²), 155.1 (C2 – C; sp²), 152.1 (C4 – C; sp²), 141.2 (C13 – C; sp²), 132.4 (C18 – C; sp²), 130.0 (C17 – CH; sp²), 129.5 (C15 – CH; sp²), 129.5 (C14 – CH; sp²), 127.9 (C16 – CH; sp²), 108.3 (C11 – C; sp²), 49.5 (C12 – CH; sp³), 49.3 (C9 – CH₂; sp³), 39.4 (C5 – CH₂; sp³), 32.6 (C6 – C; sp³), 29.7 (C3 – CH₃; sp³), 28.8 (C8 – CH₃; sp³), 28.1 (C7 – CH₃; sp³).

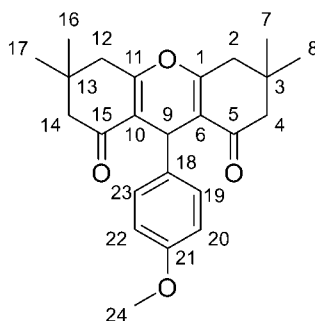
- **Composto 28** – 4-(3-hidroxifenil)-1,7,7-trimetil-4,6,7,8-tetrahidroquinazolino-2,5(1*H*,3*H*)-diona. Sólido branco obtido com 13% de rendimento e ponto de fusão de 225-230°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.37 (H19 – s, 1H), 7.98 (H1 – s, 1H), 7.09-7.07-7.06 (H15 – t, 1H, *J* = 7.07 Hz), 6.64 (H14 e H16 – sl, 2H), 6.60-6.59 (H18 – d, 1H, *J* = 6.60 Hz), 5.10 (H12 – s, 1H), 3.13 (H3 – s, 3H), 2.67-2.64 (H9 – d, 1H), 2.54 (H9 – s, 1H), 2.19-2.16 (H5 – d, 1H), 2.12-2.08 (H5 – d, 1H), 1.05 (H8 – s, 3H), 0.96 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.8 (C10 – C; sp²), 157.7 (C17 – C; sp²), 154.2 (C2 – C; sp²), 153.3 (C4 – C; sp²), 146.0 (C13 – C; sp²), 129.7 (C15 – CH; sp²), 116.9 (C14 – CH; sp²), 114.4 (C16 – CH; sp²), 113.4 (C18 – CH; sp²), 110.2 (C11 – C; sp²), 50.4 (C12 – CH; sp³), 49.4 (C9 – CH₂; sp³), 39.2 (C5 – CH₂; sp³), 32.6 (C6 – C; sp³), 29.8 (C3 – CH₃; sp³), 28.9 (C8 – CH₃; sp³), 27.9 (C7 – CH₃; sp³).

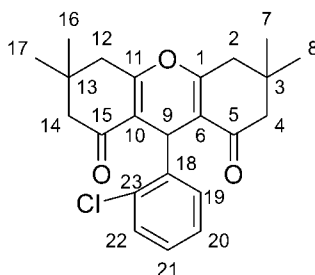
- **Composto 29** – 9-(4-metoxifenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,5,6,7,9-hexahidro-1*H*-xanteno-1,8(2*H*)-diona. Sólido branco obtido com 52% de rendimento e ponto de fusão de 241-246°C.



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.23-7.21 (H19 e H23 – d, 2H, *J* = 7.22 Hz), 6.78-6.77 (H20 e H22 – d, 2H, *J* = 6.77 Hz), 4.72 (H9 – s, 1H), 3.75 (H24 – s, 3H), 2.47 (H4 e H14 – s, 4H), 2.27-2.23-2.20-2.17 (H2 e H12 – q, 4H), 1.12 (H8 e H17 – s, 6H), 1.01 (H7 e H16 – s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 196.5 (C5 e C15 – C; sp²), 162.0 (C1 e C11 – C; sp²), 157.9 (C21 – C; sp²), 136.4 (C18 – C; sp²), 129.3 (C19 e C23 – CH; sp²), 115.8 (C6 e C10 – C; sp²), 113.4 (C20 e C22 – CH; sp²), 55.1 (C24 – CH₃; sp³), 50.7 (C4 e C14 – CH₂; sp³), 40.8 (C2 e C12 – CH₂; sp³), 32.2 (C3 e C13 – C; sp³), 30.9 (C9 – CH; sp³), 29.2 (C8 e C17 – CH₃; sp³), 27.3 (C7 e C16 – CH₃; sp³).

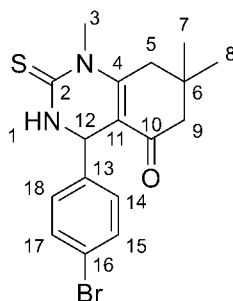
- **Composto 31** – 9-(2-clorofenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,5,6,7,9-hexahidro-1*H*-xanteno-1,8(2*H*)-diona. Sólido branco obtido com 11% de rendimento e ponto de fusão de 220-225°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.27-7.26-7.24-7.23-7.21-7.20 (H19, H21 e H22 – m, 3H), 7.14-7.12-7.11 (H20 – td, 1H), 4.81 (H9 – s, 1H), 2.61-2.57 (H4 e H14 – d, 2H), 2.48-2.45 (H4 e H14 – d, 2H), 2.27-2.24 (H2 e H12 – d, 2H), 2.06-2.02 (H2 e H12 – d, 2H), 1.04 (H8 e H17 – s, 6H), 0.91 (H7 e H16 – s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 196.3 (C20 e C22 – C; sp²), 163.7 (C1 e C11 – C; sp²), 133.3 (C23 – C; sp²), 129.9 (C22 – CH; sp²), 128.2 (C21 – CH; sp²), 126.9 (C20 – CH; sp²), 113.5 (C6 e C10 – C; sp²), 50.4 (C4 e C14 – CH₂; sp³), 40.1 (C2 e C12 – CH₂; sp³), 32.1 (C3 e C13 – C; sp³), 29.1 (C8 e C17 – CH₃; sp³), 26.8 (C7 e C16 – CH₃; sp³).

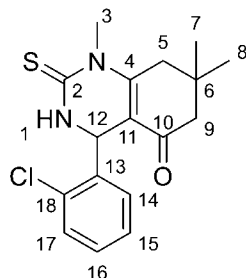
- **Composto 34** – 4-(4-bromofenil)-1,7,7-trimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1*H*)-ona. Sólido branco obtido com 19% de rendimento e ponto de fusão de 224-229°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.90 (H1 – s, 1H), 7.54-7.52 (H15 e H17 – d, 2H, *J* = 7.53 Hz), 7.15-7.13 (H14 e H18 – d, 2H, *J* = 7.14 Hz), 5.20 (H12 – s, 1H), 3.54 (H3 – s, 3H), 2.81-2.78 (H9 – d, 1H), 2.57-2.53 (H9 – d, 1H), 2.20 (H5 – s, 2H), 1.04 (H8 – s, 3H), 0.98 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.9 (C10 – C; sp²), 178.6 (C2 – C; sp²), 151.6 (C4 – C; sp²), 142.3 (C13 – C; sp²), 131.9 (C15 e C17 – CH; sp²), 128.7 (C14 e C18 – CH; sp²), 121.1 (C16 – C; sp²), 111.6 (C11 – C; sp²), 49.9 (C12 – CH; sp³), 49.3 (C9 – CH₂; sp³), 39.4 (C5 – CH₂; sp³), 36.1 (C3 – CH₃; sp³), 32.9 (C6 – C; sp³), 28.4 (C8 – CH₃; sp³), 28.2 (C7 – CH₃; sp³).

- **Composto 35** – 4-(2-clorofenil)-1,7,7-trimetil-2-tioxo-2,3,4,6,7,8-hexahidroquinazolin-5(1H)-ona. Sólido branco obtido com 22% de rendimento e ponto de fusão de 261-266°C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.01 (H1 – s, 1H), 7.53 (H17 – s, 1H), 7.33 (H14 e H16 – s, 2H), 7.14 (H15 – s, 1H), 5.64 (H12 – s, 1H), 2.62 (H9 – s, 2H), 2.38-2.35 (H5 – d, 1H), 2.24-2.21 (H5 – d, 1H), 1.09 (H8 – s, 3H), 1.06 (H7 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.5 (C10 – C; sp²), 165.7 (C2 – C; sp²), 154.3 (C4 – C; sp²), 139.4 (C13 – C; sp²), 132.2 (C18 – C; sp²), 130.5 (C17 – CH; sp²), 129.9 (C14 – CH; sp²), 128.4 (C16 – CH; sp²), 127.2 (C15 – CH; sp²), 106.8 (C11 – C; sp³), 50.2 (C9 – CH₂; sp³), 41.1 (C5 – CH₂; sp³), 38.8 (C3 – CH₃; sp³), 32.5 (C6 – C; sp³), 29.0 (C8 – CH₃; sp³), 27.6 (C7 – CH₃; sp³).

4.3. Ensaio de atividade anti-chagásica

A avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* foi realizada apenas para as moléculas **17.2, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 27, 28 e 34**. Os ensaios foram realizados pelo doutorando Afonso Santine M. M. Velez, no Instituto de Veterinária – UFRRJ, no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, sob a supervisão da Professora Débora Decoté-Ricardo de Lima.

4.3.1. Cultivo de células LLC-MK2

As células LLC-MK2 (ATCC) são fibroblastos que apresentam morfologia epitelial e foram isoladas do rim de macacos rhesus (*Macaca mulata*). As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) completo, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), em estufa a 37°C com controle de umidade e sob atmosfera a 5% de CO₂. O inóculo foi obtido pelo tratamento da monocamada de células com solução aquosa de 0,25% m/v de tripsina e 1 mM de ácido etileno-diamino acético (EDTA) por 5 min. Passagens na proporção de 1:6 do volume do inóculo foram realizadas a cada 4-5 dias.

4.3.2. Cultivo de *T. Cruzi* na forma amastigota

Células LLC-MK2 com 50% de confluência em garrafas de cultura de 175 cm² de área de cultivo (T-175) foram infectadas com 5×10^7 formas amastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 LacZ, transfectada com plasmídeo de *Escherichia coli* para a expressão

citoplasmática da enzima beta-galactosidase (β Gal). Foi utilizado meio DMEM com 2% SFB. Após 24h, o meio foi removido e a monocamada de células lavada com tampão fosfato-salino (pH 7,2) (PBS). Meio DMEM com 2% SFB foi adicionado à cultura e renovado a cada 2 dias. Formas amastigotas foram recolhidas do sobrenadante entre o 5º e 10º dias após a infecção, e separadas de células não aderidas por centrifugação diferencial.

4.3.3. Solução estoque das misturas

As soluções estoques dos compostos utilizados nos ensaios biológicos, foram obtidos pela solubilização destes em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 30 e 50 mM. As concentrações utilizadas nos ensaios foram obtidas por meio da diluição seriada das soluções estoque preparadas para cada mistura. As diluições foram realizadas no próprio meio de cultura do experimento, de forma que a concentração máxima de DMSO presente nas culturas de células não ultrapassasse 0,3% v/v.

4.3.4. Atividade tripanocida contra *T. cruzi*

Em uma placa de 96 poços transparente, foi adicionada uma suspensão de 2×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2% SFB. As células foram incubadas a 37°C (5% CO₂) por 3 h e em seguida lavadas com PBS para remoção de células não aderidas. Uma suspensão contendo 5×10^5 formas amastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 LacZ, que expressa a enzima β -galactosidase, foi adicionada às células, seguindo-se incubação a 37°C (5% CO₂) por 20 h para estabelecimento da infecção. Os parasitos não internalizados foram removidos por três lavagens sucessivas com PBS, seguindo-se tratamento com diluições seriadas dos compostos em concentrações decrescentes (50-0,51 μ M) em triplicatas, pré-diluídos em DMEM + 2% SFB. Controles não tratado, veículo (0,3% v/v DMSO) e branco (sem adição de parasitos) foram incluídos no experimento. Benzonidazol foi utilizado em diluição seriada como controle positivo. Adicionaram-se então 30 μ L de solução 0,5 mM do substrato vermelho de clorofenol β -galactopiranosídeo (CPRG) em PBS com 0,9% v/v Igepal CA-630. Após incubação por 1,5 h a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm com auxílio de um leitor de placas.

4.3.5. Citotoxicidade frente a células LLC-MK2

Em uma placa de 96 poços transparente, foi adicionada uma suspensão de 2×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2% SFB. As células foram incubadas a 37°C (5% CO₂) por 20 h e em seguida lavadas com PBS para remoção de células não aderidas. As células foram

tratadas com diluições seriadas dos compostos em concentrações decrescentes (100-1 µM) em triplicatas, pré-diluídos em DMEM + 2% SFB. Controles não tratado, veículo (0,3% v/v DMSO) e branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento. Após incubação por 48 h o sobrenadante foi removido e a monocamada de células lavada com PBS, renovando-se o meio de cultura em seguida. Adicionaram-se então 20 µL de solução 3,0 mM de sal de MTT, seguindo-se incubação por mais 1,5h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazan de MTT dissolvidos pela adição de 100 µL/poço de DMSO. Após incubação por 1,5h para dissolução dos cristais de MTT ao abrigo da luz e 37°C, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm com auxílio de um leitor de placas.

4.3.6. Tratamento estatístico dos dados

Os dados de absorbância foram convertidos em valores de viabilidade relativa à média do controle veículo, descontados da média do controle branco, conforme a fórmula abaixo:

$$V(\%) = \frac{Abs - M_B}{M_V - M_B}$$

$$V(\%) = \text{Viabilidade em \%}$$

$$Abs = \text{Leitura de absorbância em determinado poço}$$

$$M_B = \text{Média da absorbância da triplicata do } \mathbf{Controle Branco}$$

$$M_V = \text{Média da absorbância da triplicata do } \mathbf{Controle Veículo}$$

Os valores de percentuais foram inseridos no software GraphPad Prism 7, onde foram realizados os cálculos estatísticos e gerados os gráficos apresentados. Para os cálculos da concentração inibitória do crescimento em 50% (CI₅₀) foi utilizado o modelo padrão do software de regressão não linear para valor de concentração de inibidor *versus* resposta normalizada com inclinação variável. Os resultados para os valores de CI₅₀ foram obtidos pela média de ao menos 3 experimentos independentes. Para os testes de significância estatística foi utilizada a análise de variância simples *one-way* ANOVA.

4.4. Ensaio de atividade antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada apenas para as quinazolinonas **17.2**, **19**, **20**, **21**, **22**, **26**, **27** e **28**. Os ensaios foram realizados pelo Dr. Matheus da Silva Souza, sob supervisão do professor Dr. Adriano Defini Andricopulo, no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (USP – São Carlos).

4.4.1. Linhagens celulares

Para avaliar os compostos foram utilizadas as seguintes linhagens de células:

- (i) Célula tumoral epitelial de mama humana (MDA-MB-231 // ATCC HTB-26TM);
- (ii) Célula tumoral epitelial de próstata humana (DU-145 // ATCC HTB-81TM).

As linhagens **i** foi mantida em DMEM (Dulbecco's modified eagle medium – Cultilab®, Campinas, SP, BRA) e a linhagem **ii** em meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – Cultilab®, Campinas, SP, BRA). Ambos foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™, Waltham, MA, USA) e penicilina (200 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e L-glutamina (2 mM) (Sigma-Aldrich®). As células em cultura foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até atingir 75–90% de confluência. Com o intuito de garantir que as células empregadas nos ensaios estivessem em condições semelhantes, inicialmente foi estabelecido um estoque de células por meio do congelamento nos seus respectivos números de passagem. O congelamento foi feito através da adição de 3x10⁶ células em uma solução de SFB contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta suspensão celular foi acondicionada em criotubos em freezer a –80°C por 24h, o qual garantiu a redução gradual de temperatura. Após o congelamento, as células foram armazenadas em dewar com nitrogênio líquido (-196°C). Todos os procedimentos envolvendo a manipulação de células foram realizados em condições de assepsia. Os materiais foram manipulados em fluxo laminar previamente exposto à luz ultravioleta por 15min e desinfetado com etanol 70%. Para a realização dos ensaios, as células foram descongeladas em banho térmico a 37°C e cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² (Corning®, Corning, NY, USA). Uma vez alcançada a confluência da monocamada celular, as células foram sub-cultivadas e, quando necessário, congeladas e/ou plaqueadas.

4.4.2. Preparação das soluções dos compostos

As soluções-estoque dos compostos foram preparadas a 20 mM em 100% de DMSO; e armazenadas a -80°C. Soluções de uso a 10 mM foram preparadas e armazenadas a -20°C. As soluções intermediárias foram preparadas no dia dos ensaios nos respectivos meios de cultura de acordo com a linhagem celular, a partir das soluções de uso, de modo a se obter uma concentração de composto desejada e, ao mesmo tempo, de DMSO (com a finalidade de que não ultrapassasse 1% no primeiro poço da placa). Este acompanhamento do solvente foi necessário para que a viabilidade celular na sua presença ficasse dentro do que é considerado seguro (> 90%) e não comprometesse a análise dos dados e o cálculo do CI₅₀ real dos

compostos-teste. As concentrações utilizadas nos ensaios foram escolhidas a partir de estudos pilotos (dados não apresentados).

4.4.3. Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

O ensaio da resazurina também é conhecido como *AlamarBlue* e se baseia na capacidade das desidrogenases mitocondriais das células viáveis reduzirem o corante azul não fluorescente chamado resazurina (fenoxazin-3-ona) na rosa resorufina. A proporção de células viáveis pode ser quantificada usando um fluorímetro com leitor de microplaca equipado com um conjunto de filtros de excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. Para este ensaio foram adicionadas 4×10^3 (DU, MDA) células/100 μ L de meio de cultura/poço em placas estéreis de 96 (TPP™, Trasadingen, Suíça). As placas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, 11 concentrações dos controles e dos compostos-teste foram adicionadas em diluição seriada com uma pipeta multicanal. Após incubação por 72h, o meio foi descartado e substituído por 120 μ L/poço de uma mistura (5:1, v/v) composta pelo respectivo meio de cultivo (sem fenol e sem SFB) e resazurina (0,15 mg/ml) em solução salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline*, 1x PBS). Em seguida, as placas foram novamente colocadas na estufa. O período de incubação necessário para gerar um sinal de fluorescência suficiente acima do background é geralmente cerca de 1 a 4h, dependendo da atividade metabólica das células, da densidade de células por poço e outras condições tais como o tipo de meio de cultura. Após o período, elas foram analisadas em fluorímetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), em $\lambda_{\text{emissão}}$ de 588 nm. A viabilidade das células tratadas foi expressa como porcentagem relativa com relação às células incubadas somente com meio de cultura e o veículo utilizado para solubilizar os compostos (controle negativo, DMSO). Colchicina e Doxorubicina foram utilizadas como controles positivos.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho vinte quinazolinonas foram propostas, sendo onze delas obtidas de maneira satisfatória e rendimentos variados (11% a 67%), cinco não obtidas e quatro que tiveram a obtenção de uma xantenodiona confirmada (rendimentos na faixa de 7% a 74%). Dentre as onze quinazolinonas obtidas, a **28** e a **34** são inéditas na literatura. As quatro xantenodionas obtidas, apesar de não serem inéditas na literatura foram caracterizadas, e foram confirmadas como um subproduto possível da reação e sua obtenção leva a perspectivas para trabalhos futuros buscando-se a avaliação biológica das mesmas.

Os ensaios biológicos para todas as moléculas obtidas não foram possíveis de serem realizados até submissão do presente trabalho, sendo uma perspectiva futura. A avaliação da atividade anti-chagásica das quinazolinonas **17.2**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **26**, **27**, **28** e **34** mostrou que a molécula **18** possui uma inibição razoável, enquanto as quinazolinonas **22** e **34** possuem uma atividade inibitória promissora, sendo as melhores dentro da série. Destaca-se que a inibição frente a formas amastigotas foram melhores para os compostos que possuem o substituinte 4-bromofenil, sendo que a quinazolinonas **34** possui a maior seletividade, sendo, portanto, a melhor molécula avaliada. Os resultados são promissores para possíveis trabalhos futuros explorando composto que contenham o grupo 4-bromofenil.

A avaliação da atividade antiproliferativa das quinazolinonas **17.2**, **19**, **20**, **21**, **22**, **26**, **27** e **28** mostrou que as quinazolinonas **20** e **22** foram as únicas a apresentarem citotoxicidade frente à linhagem MDA-MB-231. Enquanto, frente à linhagem celular DU-145 apenas a molécula **20** se mostrou pouco citotóxica. Entretanto, os valores foram muito superiores aos padrões positivos (Doxorrubicina e Colchicina). A quinazolinonas **20** mostrou uma ausência de seletividade ao inibir as duas linhagens com mesma potência. A ausência de resultados não permite a correlação estrutura e atividade, apenas sendo possível inferir que as moléculas não possuem um bom perfil citotóxico frente a essas linhagens.

Contudo, é possível concluir que o presente trabalho possui uma contribuição tanto para química orgânica, quando para química medicinal do ponto de vista de química exploratória, gerando diversas perspectivas para trabalhos futuros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHARI, M.; CARABINEIRO, S. A. C.; GORJIZADEH, M. Sulfonated Silica Coated CoFe₂O₄ Magnetic Nanoparticles for the Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-One and Octahydroquinazoline Derivatives. **Catalysts**, v. 13, n. 6, p. 989, 9 jun. 2023.

AKHTER, K. et al. A Green Approach to Synthesize Dihydropyrimidinone Derivatives by Using Anhydrous ZnCl₂ Catalyst Under Refluxing Condition in Heptane-Toluene Medium via Biginelli Reaction. **Asian Journal of Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 2624–2626, 2015.

BALALI, Z.; SAFAEI-GHOMI, J.; MASHHADI, E. Synthesis of 3,4-dihydropyrimidines and octahydroquinazolinones by SBA-15 supported schiff-base iron (III) complex as durable and reusable catalyst under ultrasound irradiation. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 14810, 27 jun. 2024.

BHAT, M. A. et al. ChCl: Gly (DESs) Promote Environmentally Benign Synthesis of Xanthene Derivatives and Their Antitubercular Activity. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3667, 16 jun. 2021.

BOLLINI, M. et al. Synthesis, 2D-QSAR Studies and Biological Evaluation of Quinazoline Derivatives as Potent Anti-Trypanosoma cruzi Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 265–276, 12 abr. 2019.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, nov. 1996.

CAL, M. et al. Assessing anti-T. cruzi candidates in vitro for sterile cidal activity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 165–170, dez. 2016.

CCD. Chagas Disease: What U.S. Clinicians Need to Know. 2024. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/cme/chagas/lesson_1/3.html. Acesso em: setembro de 2024.

COSTANZO, P.; NARDI, M.; OLIVERIO, M. Similarity and Competition between Biginelli and Hantzsch Reactions: an Opportunity for Modern Medicinal Chemistry. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2020, n. 26, p. 3954–3964, 15 jul. 2020.

EL-GAZZAR, A.-R. B. A.; HAFEZ, H. N.; ABBAS, H.-A. S. S- and C-nucleosidoquinazoline as new nucleoside analogs with potential analgesic and anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4249–4258, out. 2009.

GOMAA, M. A.-M.; SAYED, A.-W. R.; MASOUD, R. A. One-pot multi-component synthesis of tetrahydroquinazolinones via Biginelli condensation using molecular iodine as a catalyst. **European Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 459–461, 31 dez. 2013.

GUIDO, B. C. et al. Impact of kinesin Eg5 inhibition by 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives on various breast cancer cell features. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 283, 14 dez. 2015.

HARRISON, J. R. et al. Discovery and Optimization of a Compound Series Active against *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 3066–3089, 26 mar. 2020.

HATAMINEJAD, E.; EZABADI, A. Design and exploration of caffeine-based Brönsted acidic ionic liquid (CaffBAIL) for the synthesis of DHPMs, xanthenediones, and acridinediones. **Research on Chemical Intermediates**, v. 48, n. 6, p. 2535–2556, 9 jun. 2022.

HE, L. et al. Recent advances in 4(3H)-quinazolinone syntheses. **RSC Adv.**, v. 4, n. 24, p. 12065–12077, 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Cancer today. 2024a. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_populations=0&types=1>. Acesso em: setembro de 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Cancer tomorrow. 2024b. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/tomorrow/en/dataviz/trends?types=0_1&sexes=1_2&mode=cancer&group_populations=0&multiple_populations=0&multiple_cancers=1&cancers=39&populations=900>. Acesso em: setembro de 2024.

JADHAV, S. D.; PATIL, B. M.; PATIL, S. S. An eco-friendly approach to synthesize arylmethylene bis(3-hydroxy-5,5'-dimethyl-2-cyclohexene-1-ones) and 1,8-dioxo-octahydroxanthenes. **Research on Chemical Intermediates**, v. 50, n. 6, p. 2519–2531, 9 jun. 2024.

JAFARI, E. et al. Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2016.

KIDWAI, M. et al. Synthesis of 2-Oxo/Thioxooctahydroquinazolin-5-one Derivatives and Their Evaluation as Anticancer Agents. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 10, p. 1320–1323, 2010.

KOOHESTANI, F.; SADJADI, S.; HERAVI, M. Composite of bentonite and cyclodextrin as an efficient catalyst for promoting chemical transformations in aqueous media. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5102, 3 mar. 2021.

KOUSER, M. et al. Transformation of Waste Toner Powder into Valuable Fe_2O_3 Nanoparticles for the Preparation of Recyclable $\text{Co(II)-NH}_2\text{-SiO}_2\text{@Fe}_2\text{O}_3$ and Its Applications in the Synthesis of Polyhydroquinoline and Quinazoline Derivatives. **ACS Omega**, v. 7, n. 51, p. 47619–47633, 27 dez. 2022.

MERCK. Protocolo do ensaio de MTT para viabilidade e proliferação celular. 2024a. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt?srltid=AfmBOorntE10acFgrbUwIQQKp2rXTcFMmaWTrcuoMnUpzkiBnUv3psUD>. Acesso em: setembro de 2024.

MERCK. Ensaios de proliferação e viabilidade celular. 2024b. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/imaging-analysis-and-live-cell-imaging/cell-viability-and-proliferation?gad_source=1&gclid=CjwKCAjwooq3BhB3EiwAYqYoEgF4XVujltatIPzkDPAyioLlIOVKKLmrrygXDrPdvSOjur5ue6xyxVRoC7SoQAvD_BwE. Acesso em: setembro de 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer. 2024a. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer#:~:text=C%C3%A2ncer%20\(ou%20tumor%20maligno\)%20%C3%A9,origem%20do%20tumor%20\(met%C3%A1stases\)>](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer#:~:text=C%C3%A2ncer%20(ou%20tumor%20maligno)%20%C3%A9,origem%20do%20tumor%20(met%C3%A1stases)>)>. Acesso em: setembro de 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Causas do câncer. 2024b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer/causas>>. Acesso setembro de 2024.

MULAKAYALA, N. et al. Catalysis by molecular iodine: A rapid synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes and their evaluation as potential anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 6, p. 2186–2191, mar. 2012.

MÜLLER, C. et al. Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of Monastrol analogues against human glioblastoma cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 157–164, 28 nov. 2006.

NIKAM, D. et al. Unveiling the impact: A decade review on dihydropyrimidinones (DHPMs) to combat breast cancer. **Journal of Molecular Structure**, v. 1308, p. 138134, jul. 2024.

NOURI, M. et al. Synthesis and Assessment of the Cytotoxic Effects of Some Novel Biginelli 3,4-Dihydropyrimidine-2-(1H) One Derivatives Containing 2-Mercapto-3-Phenyl-4(3H)-Quinazolinone. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 44, n. 3, p. 1781–1792, 15 mar. 2024.

PASHA, M. A.; SWAMY, N. R.; JAYASHANKARA, V. P. One pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/-thiones catalysed by zinc chloride: An improved procedure for the Biginelli reaction using microwaves under solvent free condition. **Indianjournalofchemistry**, v. 44, n. 4, p. 823–826, 2005.

PAVITHRA, D.; ETHIRAJ, K. R. Facile Synthesis of Xanthenesdiones and Acridinediones through TEMPO/CuCl₂ Catalyzed Aerobic Oxidation of Benzyl Alcohols and Cyclization with Cyclohexane-1,3-Dicarbonyl Compounds. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 42, n. 4, p. 1078–1090, 21 abr. 2022.

PINAZO, M. J. et al. Challenges and advancements in the development of vaccines and therapies against Chagas disease. **The Lancet Microbe**, p. 100972, set. 2024.

RAFIAN-BOROUJENI, M.; REZAEINASAB, R.; BAHRAMI, N. One-pot Synthesis, Cytotoxic Evaluation and Molecular Docking of 3,4,7,8-tetrahydroquinazoline-2,5-(1H,6H)-dione Derivatives on EGFR. **International Pharmacy acta**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 19 jun. 2022.

RAHIMIFARD, M. et al. One-pot solvent-free synthesis of 1,8-dioxo-octahydroxanthene derivatives using sulfonic acid-functionalized LUS-1 and their antimicrobial activities. **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 4, p. 3847–3861, 4 abr. 2016.

RAMOS, L. M. et al. The Biginelli Reaction with an Imidazolium–Tagged Recyclable Iron Catalyst: Kinetics, Mechanism, and Antitumoral Activity. **Chemistry – A European Journal**, v. 19, n. 13, p. 4156–4168, 25 mar. 2013.

ROGERIO, K. R. et al. Synthesis and molecular modelling studies of pyrimidinones and pyrrolo[3,4-d]-pyrimidinodiones as new antiplasmodial compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 8, 18 jun. 2018.

ROGERIO, K. R. et al. Novel Quinoliny-pyrrolo[3,4-d]pyrimidine-2,5-dione Derivatives Against Chloroquine-resistant Plasmodium falciparum. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 99–110, 19 fev. 2020.

SAFAEI-GHOMI, J. et al. Preparation of quinazolinones using biosynthesized silver nanoparticles. **RSC Advances**, v. 12, n. 20, p. 12471–12476, 2022.

SETHIYA, A. et al. Highly efficient and diversity-oriented solvent-free synthesis of biologically active fused heterocycles using glycerol-based sulfonic acid. **Research on Chemical Intermediates**, v. 48, n. 11, p. 4711–4727, 14 nov. 2022.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SUN, Q. et al. A Highly Efficient Solvent-Free Synthesis of Dihydropyrimidinones Catalyzed by Zinc Chloride. **Synthesis**, n. 7, p. 1047–1051, 2004.

THABIT, M. G. et al. Insights into modulating the Monastrol scaffold: Development of new pyrimidinones as Eg5 inhibitors with anticancer activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 355, n. 10, 31 out. 2022.

TONKIKH, N. N.; STRAKOV, A.; PETROVA, M. V. Multicomponent Synthesis of 2,5-Dioxo- and 4-Aryl-5-oxo-2-thioxo-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroquinazolines. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 40, n. 1, p. 43–46, jan. 2004.

WAZALWAR, S. S.; BANPURKAR, A. R.; PERDIH, F. Synthesis, crystal structure and molecular docking study of new Monastrol analogues as inhibitors of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **Journal of Molecular Structure**, v. 1274, p. 134508, fev. 2023.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2024. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Acesso em: setembro de 2024.

YAHYAZADEH, A. et al. A New Procedure for the Preparation of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one and Octahydroquinazolinone Derivatives catalyzed by SCMNP@CA-EASO₃H under Solvent-free Conditions. **Letters in Organic Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 867–883, out. 2022.

YARIM, M. et al. Synthesis and in vitro calcium antagonist activity of 4-aryl-7,7-dimethyl-1,7,7-trimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroquinazoline-2,5-dione derivatives. **II Farmaco**, v. 58, n. 1, p. 17–24, jan. 2003.

YARIM, M. et al. Synthesis, Enantioseparation and Pharmacological Activity of 4-Aryl-7,7-dimethyl-5-oxo-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroquinazoline-2-thiones. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 01, p. 27–33, 26 dez. 2011.

CAPÍTULO III

SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE HETEROCICLOS OBTIDOS ATRAVÉS DE REAÇÃO MULTICOMPONENTE DE HANTZSCH PLANEJADOS COMO INIBIDORES DE TUBULINA

RESUMO

O câncer é o conjunto de mais de 100 doenças que atinge milhares de pessoas no Brasil e no mundo. A Tubulina é uma proteína globular presente na forma de heterodímeros (α e β) que desempenha funções críticas dentro da célula, portanto se tornou um alvo no tratamento de diversos tipos de câncer. A Tubulina possui diversos sítios ativos sendo o sítio da Colchicina um dos mais explorados. Diversos compostos possuem atividade inibitória da polimerização de Tubulina devido a interação no sítio ativo da Colchicina, entre eles temos a Podofilotoxina, a Colchicina e o composto LDQMC-014, sintetizado previamente no grupo de pesquisa através da reação multicomponente de Hantzsch. A fim de explorar a versatilidade da reação de Hantzsch, dez acridinodionas foram planejadas utilizando a lausona como dicarbonilado, além de três acridinonas utilizando aldeídos obtidos através de reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig e Suzuki-Miyaura. Posteriormente, as moléculas foram avaliadas (*in silico*) quanto a interação com a Tubulina através de metodologia de ancoramento molecular. Dentre as dez acridinodionas planejadas, cinco tiveram suas estruturas confirmadas, sendo quatro moléculas inéditas na literatura, duas foram obtidas de forma oxidada (inéditas na literatura) e três possuem indicação da presença do produto desejado, entretanto com diversas impurezas. Os aldeídos intermediários sintetizados por reação de acoplamento foram obtidos de maneira efetiva, sendo um deles inédito na literatura, enquanto apenas duas das acridinonas subsequentes foram obtidas de forma pura, também inéditas, enquanto uma delas necessita de purificações adicionais. O ancoramento molecular foi realizado de maneira efetiva, sendo possível a identificação dos resíduos de aminoácidos principais nas interações com o anel da lausona e com o anel tri substituído, além de comprovar que a adição de um anel aromático afastando o anel acridinona do anel 3,4,5-trimetoxifenil não favorece as interações no bolsão hidrofóbico do sítio da Colchicina. Contudo, os resultados se mostram promissores, uma vez que diversas moléculas apresentam *scores* satisfatórios, demonstrando a necessidade de testes *in vitro* futuros. O presente trabalho corrobora a versatilidade da reação multicomponente de Hantzsch para síntese de heterociclos com atividade inibitória de Tubulina.

Palavras chaves: Acridinodionas; acridinonas; ancoramento molecular.

ABSTRACT

Cancer encompasses over 100 diseases affecting millions of people in Brazil and worldwide. Tubulin, a globular protein existing as α and β heterodimers, performs critical cellular functions and has thus become a key target for treating various cancers. Among tubulin's active sites, the colchicine binding site is one of the most extensively studied. Several compounds, such as podophyllotoxin, colchicine, and LDQMC-014 (previously synthesized by the research group through the Hantzsch multicomponent reaction), inhibit tubulin polymerization by interacting with this active site. To further explore the versatility of the Hantzsch reaction, ten acridinodiones were designed using lawsone as the dicarbonyl compound, alongside three acridinones synthesized with aldehydes obtained via Buchwald-Hartwig and Suzuki-Miyaura coupling reactions. These molecules were subsequently evaluated *in silico* for their interaction with tubulin through molecular docking studies. Among the ten designed acridinodiones, five had their structures confirmed, with four being novel compounds. Two molecules were obtained in their oxidized forms (also novel), while three showed evidence of the desired product but contained impurities. The intermediate aldehydes synthesized through coupling reactions were effectively obtained, including one novel compound. Of the subsequent acridinones, two were isolated in pure form (both novel), while one requires additional purification. Molecular docking studies were successfully conducted, identifying key amino acid residues involved in interactions with the lawsone ring and the trisubstituted ring. The results confirmed that adding an aromatic ring that distances the acridinone ring from the 3,4,5-trimethoxyphenyl ring does not enhance interactions within the colchicine binding site's hydrophobic pocket. Nevertheless, the findings are promising, as several molecules exhibited satisfactory docking scores, justifying the need for future *in vitro* testing. This study underscores the versatility of the Hantzsch multicomponent reaction for synthesizing heterocycles with potential tubulin-inhibitory activity.

Keywords: Acridinodiones; Acridinones; Molecular docking.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é um conjunto de diversas doenças que possui um crescimento anômalo de células. É a segunda maior causa de morte no mundo, gerando cerca de 9.6 milhões de mortes por ano. Diversos tratamentos estão disponíveis para os diversos tipos da doença, entretanto novas terapias são necessárias aliando mais efetividade, menor preço e baixa incidência de efeitos colaterais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024a).

1.2. Tubulina

Um dos alvos moleculares validados para o tratamento do câncer é a Tubulina. A Tubulina é uma proteína globular presente nas células eucarióticas. A proteína é composta por dois heterodímeros (α e β) que sofrem um processo dinâmico de polimerização e despolimerização para a formação de microtúbulos (protofilamentos empacotados na forma de cilindros ocos). Os microtúbulos possuem funções essenciais na divisão celular, uma vez que esse protofilamentos são responsáveis pela formação de fibras do fuso mitótico. Uma vez que haja a interrupção na dinâmica de polimerização da Tubulina, há uma ruptura das fibras do fuso mitótico, interrompendo a mitose na fase G₂/M, e é devido a esse papel fundamental que a Tubulina é considerada um alvo para agentes quimioterápicos (MAKRIYANNIS; BIEGEL, 2003; WADE, 2009).

A Tubulina possui 6 sítios de ligação distintos, são eles: *taxane*, *vinca*, *laulimalide*/*peloruside*, *maytansine*, *pironetin* e *conchicine* (figura 42A). Quando uma molécula interage com a Tubulina, a depender do sítio de ligação que ela se liga, são classificados como agentes estabilizantes ou desestabilizantes. Sendo os estabilizantes responsáveis pela supressão da dinâmica de despolimerização dos microtúbulos e os desestabilizantes responsáveis pela supressão da dinâmica de polimerização (figura 42B). (SHUAI et al., 2021; STEINMETZ; PROTA, 2018).

O sítio da Colchicina está localizado entre dímeros e quando uma molécula interage nesse sítio o empacotamento dos heterodímeros não é alinhada, impedindo assim a formação do microtúbulo (figura 42C), portanto, moléculas que interagem com o sítio da Colchicina são conhecidas como agentes desestabilizantes. Estudos sugerem que esse sítio possui um bolsão

hidrofóbico, responsável pelas interações indispensáveis para o mecanismo de ação (GUO et al., 2019; LU et al., 2012).

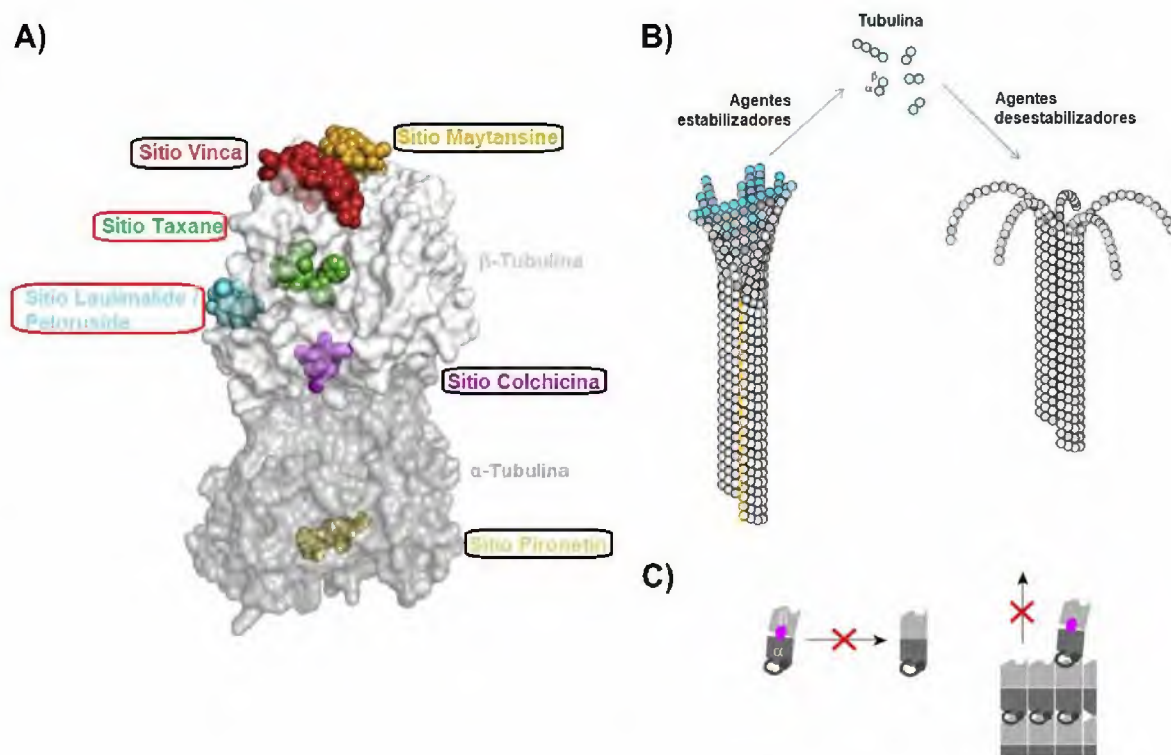


Figura 42: Sítios de ligação da Tubulina, sendo os destacados em vermelhos os estabilizantes e em preto os desestabilizantes (A); mecanismo de polimerização (B); mecanismo das moléculas que interagem no sítio da Colchicina (C). Fonte: STEINMETZ; PROTA, 2018 – modificada.

Duas moléculas que comprovadamente se ligam no sítio da Colchicina é a própria Colchicina e a Podofilotoxina (figura 43). Ambas as moléculas são extraídas de plantas e representam dois dos mais famosos e potentes inibidores de Tubulina que se ligam no sítio da Colchicina, entretanto, nenhum dos dois são utilizados como quimioterápicos devido a sua toxicidade, contudo, a Colchicina é utilizada para o tratamento de gota. Todavia, os derivados da Podofilotoxina, etoposídeo e teniposídeo (figura 43), são fármacos muito utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, enquanto derivados da Colchicina como a combretastatina, que tem como um dos seus análogos mais conhecidos a CA-4P (figura 43), possuem atividade citotóxica frente a células cancerígenas, porém não chegaram a serem aprovados como fármacos (ARNST et al., 2019; DUMONTET; JORDAN, 2010; NEMTSOVA et al., 2024).

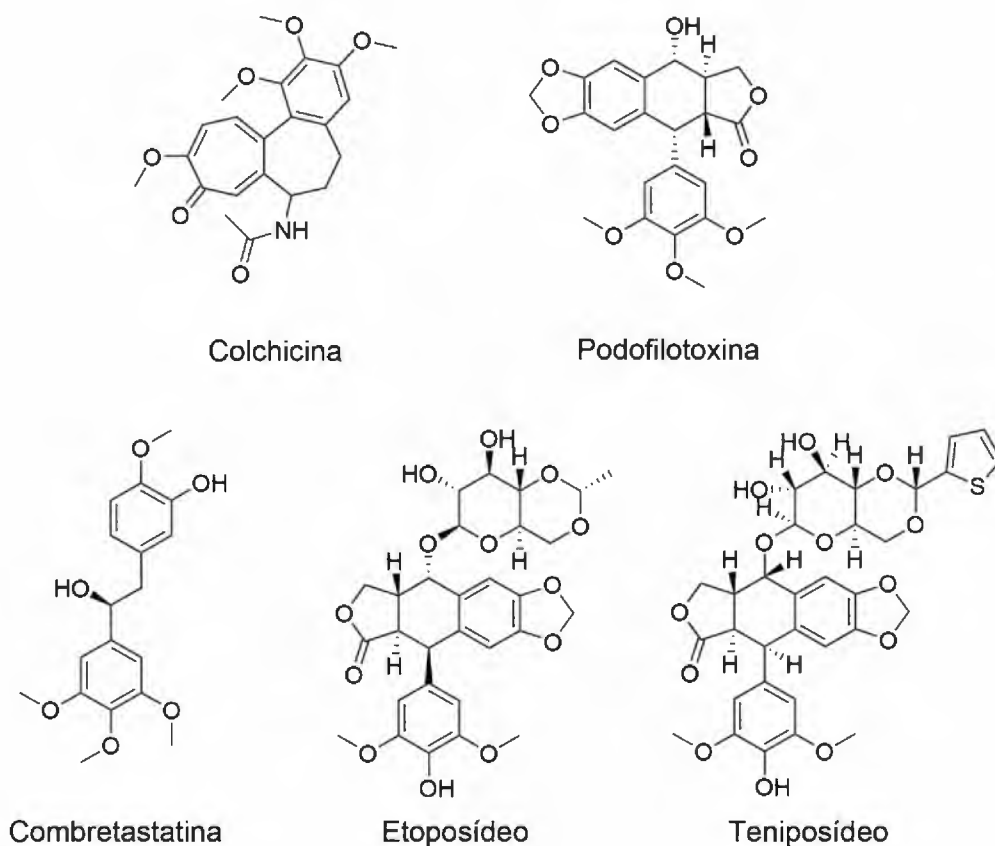


Figura 43: Compostos citotóxicos devido a modulação da Tubulina através do sítio da Colchicina. Fonte: Elaborada pela autora.

Como é possível notar, uma semelhança estrutural entre as moléculas descritas acima é a presença do anel trimetoxifenil ou 4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil, sendo que a conversão de metoxilas na posição 4 à hidroxilas fenólicas pode ocorrer naturalmente durante o metabolismo de fase I, catalisados pelo citocromo P450 (SCHNIDER, 2021). A maioria dos inibidores de Tubulina que atuam no sítio da Colchicina são planejados para possuir o anel trimetoxifenil justamente por ser um farmacóforo na interação com a enzima, porém, diversos trabalhos são relatados buscando-se mudanças estruturais que beneficiem a atividade inibitória de Tubulina. Importante salientar que o anel trimetixifenil possui suas interações ocorrendo no bolsão hidrofóbico, sendo uma área que pode ser explorada (SAPRA et al., 2013; WU et al., 2024).

1.3. Trabalhos prévios do grupo de pesquisa

Tendo como protótipo a Podofilotoxina, uma série de acridinonas foram obtidas previamente no grupo de pesquisa, na forma de mistura racêmicas, almejando-se atividade modulatória de Tubulina. A molécula de maior destaque foi a molécula **LDQMC-014** que

possuía justamente o anel trimetoxifenil (figura 44) (MAGALHAES et al., 2016). Trabalhos posteriores de separação e avaliação dos enantiômeros isolados indicaram uma atividade 10 vezes maior para o enantiômero *S* em comparação com a mistura racêmica quanto a citotoxicidade em células tumorais e 2 vezes mais potentes quanto a inibição da polimerização da Tubulina (tabela 7). Entretanto, apesar dos valores obtidos para a solubilidade serem considerados adequados, maiores que 100 μM (tabela 7), os compostos ainda necessitam passar por otimizações para o desenvolvimento de fármacos administrados por via oral (MAGALHÃES, 2019).

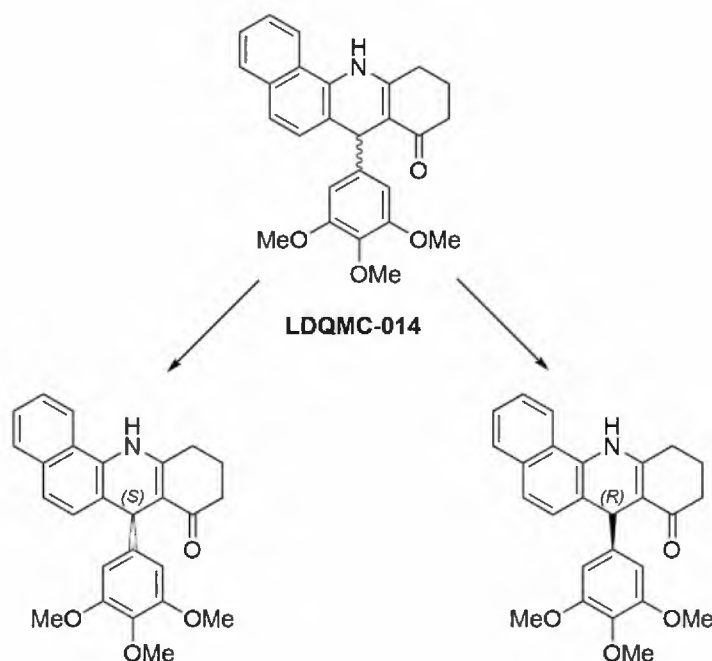


Figura 44: Estrutura das moléculas obtidas anteriormente. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7: Resultados obtidos em trabalhos anteriores.

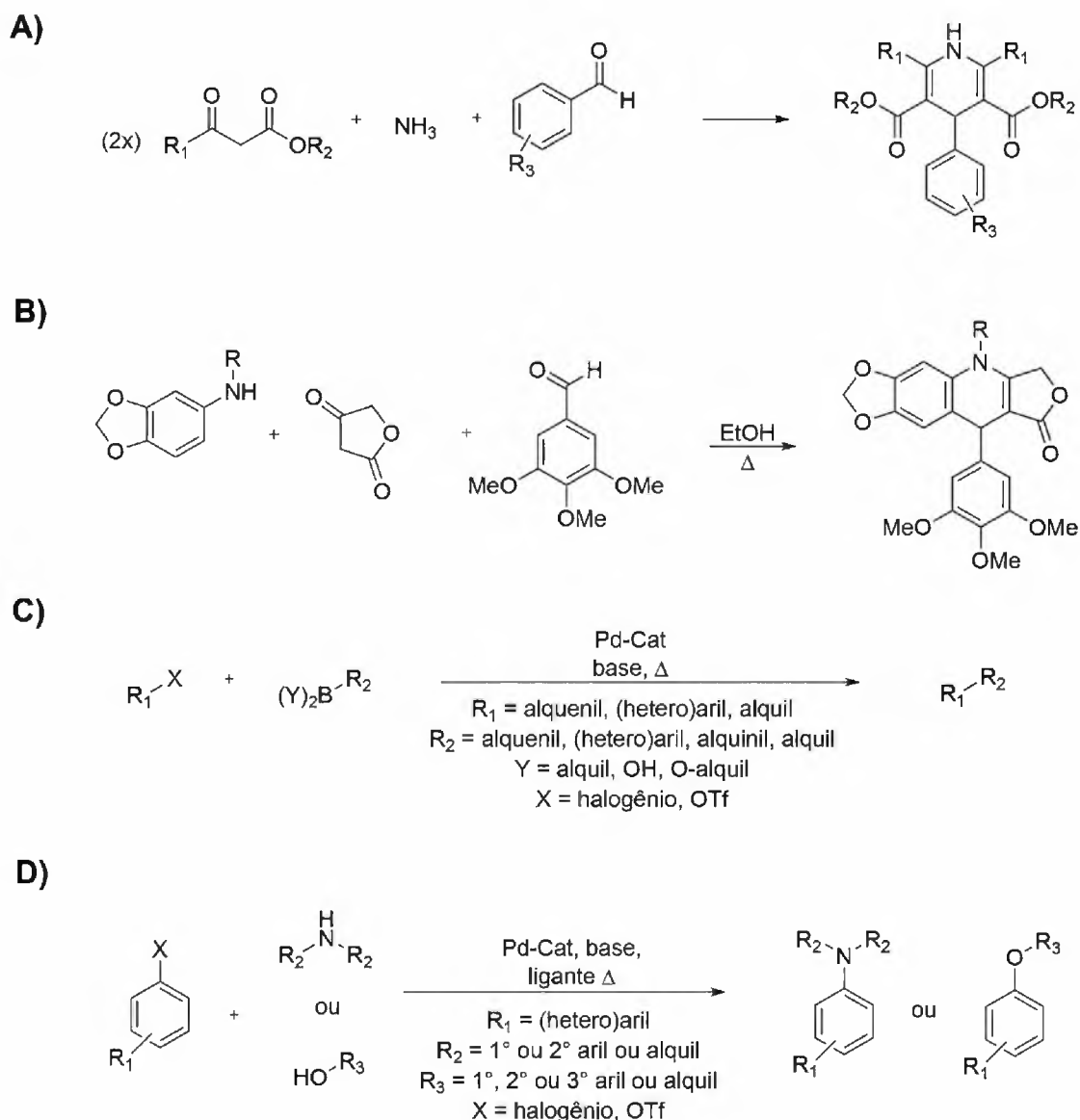
Composto	CI ₅₀ (μM)		Solubilidade aquosa (μM)
	Citotoxicidade (MDA-MB-231)	Polimerização de Tubulina	
LDQMC-014	0,12 $\pm$ 0,02	1,35 $\pm$ 0,06	79
LDQMC-014 (S)	0,013 $\pm$ 0,003	0,78 $\pm$ 0,03	219
LDQMC-014 (R)	6 $\pm$ 2	Inativo	219

1.4. Reação de Hantzsch

A reação multicomponente de Hantzsch é um tipo de reação que pode ser utilizada para a obtenção de diidropiridinas (esquema 15A), quando utilizada sua metodologia clássica, ou para obtenção de análogos da Podofilotoxina, quando utilizada a metodologia modificada descrita por Tratrat e colaboradores (esquema 15B). Devido a sua versatilidade, aliada a economia atômica nos produtos e a purificação simplificada, essa reação é uma estratégia valiosa na síntese de heterociclos variados (GRAEBIN et al., 2019; TRATRAT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002).

1.5. Reações de acoplamento

Dentre as principais reações utilizadas em química orgânica, inclusive na síntese de moléculas bioativas, temos as reações de acoplamento catalisada por metais como paládio. Duas das reações de acoplamento mais conhecidas são as reações de Suzuki-Miyaura e Buchwald-Hartwig. A reação de Suzuki-Miyaura (esquema 15C) utiliza um organoborato e um (pseudo) haleto de arila para a formação de uma ligações C-C. Já a reação de Buchwald-Hartwig (esquema 15D) busca a formação de uma ligação C-N ou C-O, para obtenção de aril aminas ou éteres, tendo como reagentes de partida um (*pseudo*) haleto de arila, e uma amina primária ou secundária, ou álcool. Atualmente, diversas metodologias são reladas na literatura para as duas reações, tendo suas aplicações expandidas uma vez que a utilização de diversos reagentes e metais como catalisadores foram implementadas (FARHANG et al., 2022; HERAVI et al., 2021; JACOBY et al., 2024; SEN; YAMADA, 2024; TAKALE; KONG; THAKORE, 2022).



Esquema 15: Esquema das reações de Hantzsch clássica (A), Hantzsch modificada (B), Suzuki-Miyaura (C) e Buchwald-Hartwig (D). Fonte: Elaborada pela autora.

1.6. Lausona

A 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, também conhecida como lausona, é uma molécula orgânica que pode ser extraída da planta *Lawsonia inermis* e está presente na forma de 3 tautômeros (figura 45). O seu uso é tradicionalmente associado a coloração de cabelo e pele, entretanto, devido sua estrutura privilegiada, também é utilizada como reagente em diversas sínteses orgânicas. Propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobianas e antifúngica já foram relatadas para a lausona, entretanto, a atividade antitumoral relatada foi o que

impulsionou a sua utilização no presente trabalho (ANGULO-ELIZARI et al., 2024; NAIR et al., 2024).

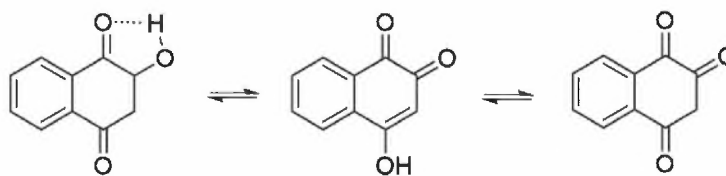


Figura 45: Tautômeros da Lausona. Fonte: Elaborado pela autora.

1.7. *Docking* molecular

O *docking* molecular (ou ancoramento molecular) é uma estratégia computacional importante que visa prever interações entre moléculas e seus alvos biológicos. Essas previsões são realizadas através de cálculos baseados em métodos de mecânica molecular. Essa ferramenta computacional vêm sendo um artifício valioso para avaliação de grandes bibliotecas de compostos afim de minimizar o tempo e o custo do desenvolvimento de fármacos (PÉREZ-PEÑA et al., 2023; STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021; WERMUTH, 2008).

1.8. Justificativa

O número crescente de casos de câncer, assim como a mortalidade associada a doença, torna necessária a busca por novas formas de tratamento que aliem a baixa incidência de efeitos colaterais e o baixo preço. Tendo como inspiração os trabalhos prévios do grupo de pesquisa envolvendo a síntese de tetrahydroacridinonas que são inibidoras da polimerização de Tubulina, justifica-se a exploração de novas acridinonas que possam ter um perfil citotóxico satisfatório. O planejamento do trabalho, portanto, é dividido em dois.

Para o planejamento estrutural das acridinodionas (figura 46), buscou-se mesclar características estruturas do composto **LDQMC-014** (figura 44), descrito anteriormente pelo grupo, com características estruturais de compostos com comprovada atividade antitumoral. A lausona foi escolhida para estar presente em todas as moléculas pretendidas devido a relatada atividade anticâncer que ela possui. O grupo trimetoxifenil foi escolhido por ser o farmacóforo da interação com a Tubulina no sítio da Colchicina, e como o anel 4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil pode ser um possível metabólito desse farmacóforo, ele também foi utilizado. Dentre as anilinas utilizadas temos a mesma utilizada no composto **LDQMC-014**, duas que são similares a

estrutura presente na Podofilotoxina (figura 43) e outras duas que possui anéis metoxilados similares a Colchicina e Combrestatina (figura 43).

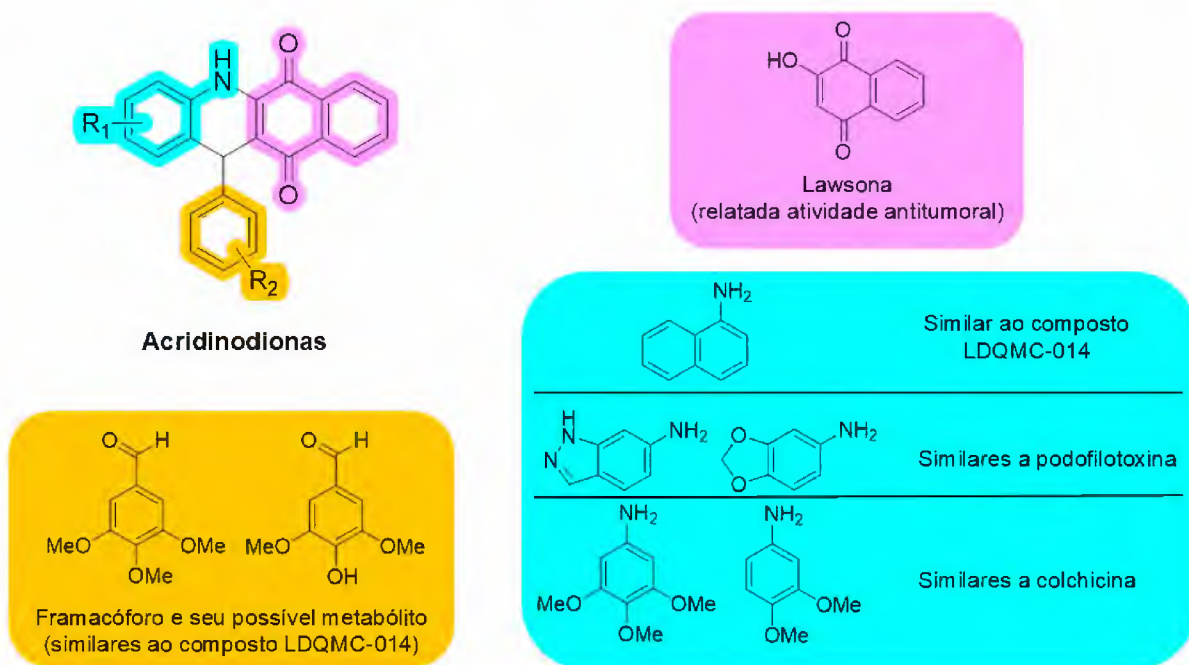


Figura 46: Planejamento estrutural das acridinodionas. Fonte: Elaborada pela autora.

O planejamento estrutural das acridinonas (figura 47) baseia-se no fato que o sítio da Colchicina na proteína Tubulina possui um bolsão hidrofóbico ao qual o grupo trimetoxi se liga, buscando-se explorar o tamanho desse bolsão, três nova acridinonas, baseadas na molécula **LDQMC-014** (figura 44), foram idealizadas, adicionando-se um grupo fenil entre o anel acridinona e a anel trimetoxifenil. Dessa forma, será possível analisar se o sítio da Colchicina permite essas modificações, o que abre uma nova abordagem para trabalhos futuros. Para realizar a adição do grupo fenil, utilizou-se reações de acoplamento (Suzuki-Miyaura e Buchwald-Hartwig) para produção do aldeídos necessários.

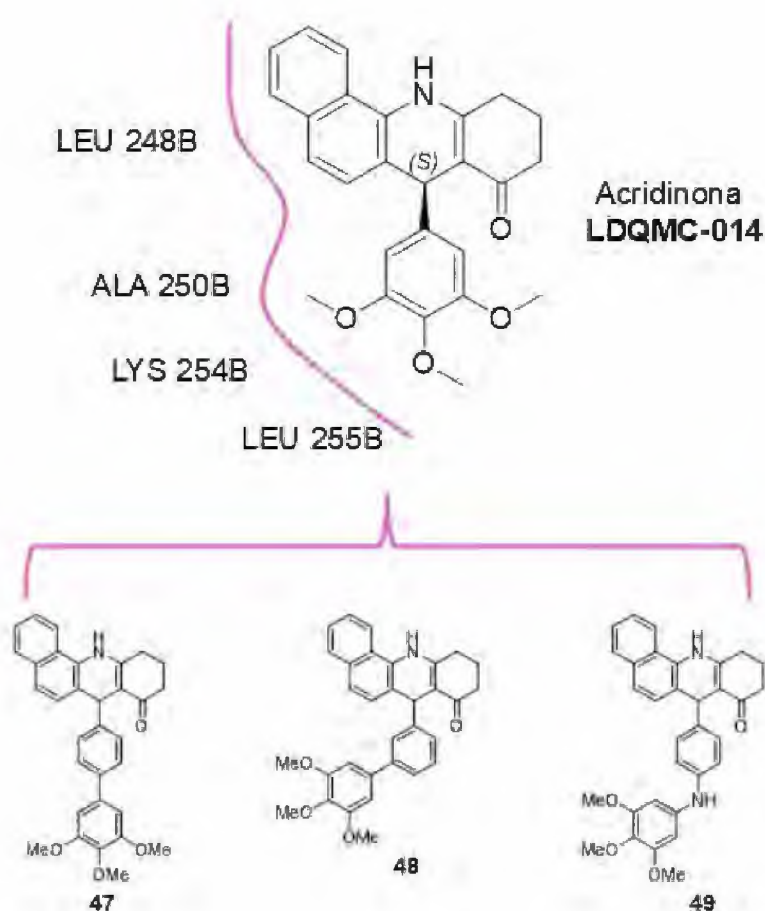


Figura 47: Planejamento estrutural para síntese das acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.

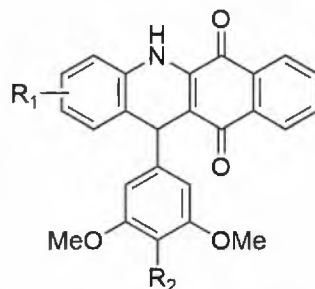
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar uma coleção de heterociclo utilizando metodologia modificada da reação multicomponente de Hantzsch, além de utilizar reações de acoplamento de Buchwald-Hartwig e Suzuki-Miyaura para obtenção de aldeídos a serem empregados na reação multicomponente, seguida de avaliação *in silico* da interação com a Tubulina através de ancoramento molecular.

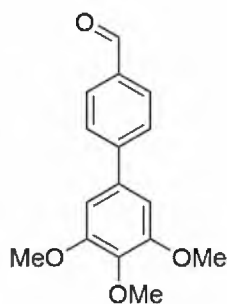
2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar dez acridinodionas utilizando reação multicomponente de Hantzsch (modificada) e tendo como um dos reagentes a lausona.

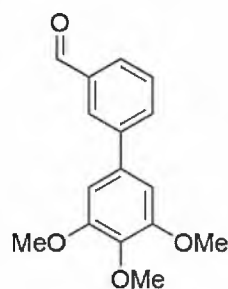


$R_1 = \alpha$ -naftaleno; 3,4-dioxol; 4,5-diidro-1-pirazol; 3,4-dimetoxi; 3,4,5-trimetoxi.
 $R_2 =$ metoxi ou hidroxil

- Sintetizar dois intermediários carbaldeído bifenílico através de reação de acoplamento Suzuki-Miyaura.

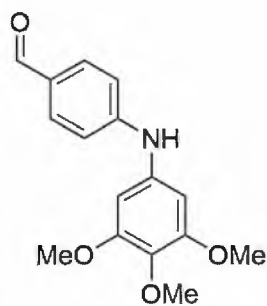


Intermediário 47



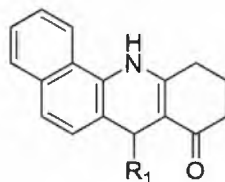
Intermediário 48

- Sintetizar um intermediário fenilaminobenzaldeído através de reação de acoplamento Buchwald-Hartwig.



Intermediário 49

- Sintetizar três acridinonas utilizando os intermediários obtidos através das reações de Buchwald-Hartwig e Suzuki-Miyaura.



$R_1 =$ 3,4,5-trimetoxi-[1,1-bifenil]-4-il; 3,4,5-trimetoxi-[1,1-bifenil]-3-il;
 4-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)fenil

- Caracterizar todas as moléculas sintetizadas utilizando métodos espectroscópicos (ressonância magnética nuclear 1D e 2D e LC-MS).
- Avaliar a potencial interação das moléculas sintetizadas com a proteína Tubulina através de ancoramento molecular.

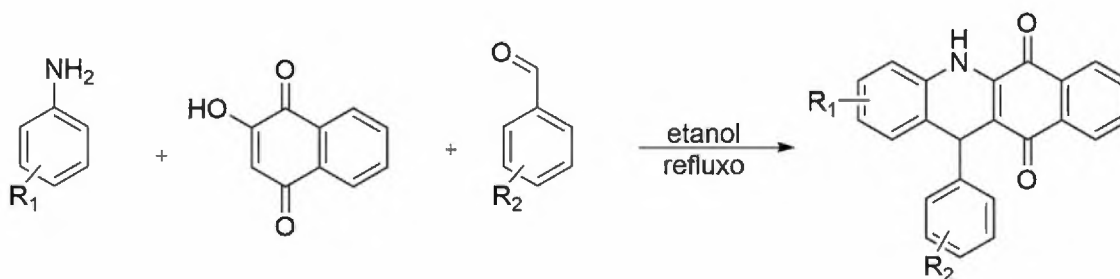
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese e caracterização das moléculas

Para o presente trabalho faz-se necessário uma subdivisão para as moléculas planejadas. Ao todo, treze heterociclos foram planejados, sendo dez acridinodiona (sendo nove inéditas na literatura) e três acridinonas (inéditas na literatura). Os resultados e discussão serão expostos separando as moléculas por tipo de produto desejado.

3.1.1. Síntese e caracterização das acridinodionas

Dentre as 10 acridinodionas planejadas, apenas uma (molécula **40**) foi previamente descrita na literatura, por Yang e colaboradores, tendo a atividade anticâncer associada (YANG; ZHANG; WU, 2015). As reações têm como base a metodologia descrita por Tratrát e colaboradores para reações multicomponentes de Hantzsch modificada (esquema 16), tendo variações na anilina e no aldeído utilizados, porém mantendo-se a lausona como dicarbonilado em todos os produtos (TRATRAT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002). Uma discussão mais aprofundada a respeito da reação, além de mecanismos e propriedades encontra-se na introdução geral. A estrutura de todas as acridinodionas planejadas encontram-se na figura 48.



Esquema 16: Esquema de reação para as acridinodionas. Fonte: Elaborada pela autora.

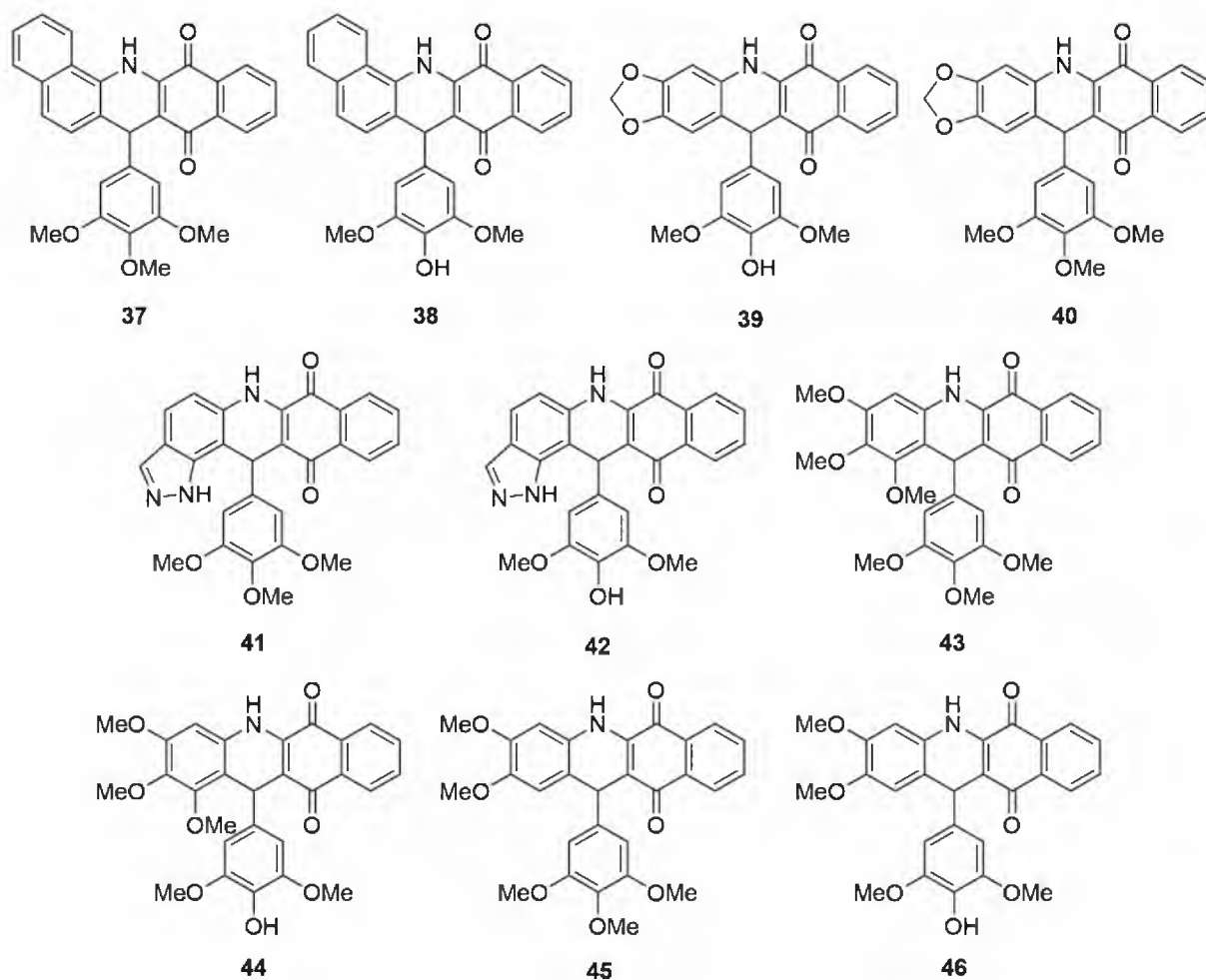


Figura 48: Estrutura das acridinodionas planejas. Fonte: Elaborada pela autora.

As reações foram iniciadas seguido o protocolo 1 e acompanhadas por CCD. Ao final do período de 24 horas foi possível observar um precipitado em todas as reações, sendo, portanto, recolhidos por filtração em seguida. Para os produtos **41**, **42** e **44** a CCD indicou a presença de um produto principal com a presença apenas da anilina correspondente, para esses compostos uma recristalização foi realizada para obtenção do composto na sua forma pura. Para os compostos **37**, **38**, **39**, **40**, **43**, **45** e **46**, a presença de diferentes produtos com fatores de retenção muito próximos foi observada, sendo a recristalização ineficiente para purificação dos produtos. Decidiu-se então, realizar a purificação por cromatografia líquida flash (usando o equipamento Isolera da Biotage®). Todas as moléculas foram submetidas a análises espectroscópicas (ressonância magnética nuclear) para a confirmação de suas estruturas. Os espectros referentes a todas as moléculas encontram-se nos anexos 95 a 115 (páginas 304 à 324) e as atribuições dos sinais pode ser encontrada no tópico materiais e métodos.

Os produtos **40**, **41**, **42**, **44** e **46** foram obtidos da maneira pretendida. Os rendimentos variaram de 3% a 85%, sendo os rendimentos mais baixos referentes as sínteses que tiveram sua purificação realizada através de cromatografia em coluna flash. O produto **40**, que obteve rendimento de 3% na metodologia empregada, é o único que possui a síntese relatada previamente, por Yang e colaboradores. Na literatura o rendimento relatado é de 83%, contudo, o procedimento adotado por Yang envolve a utilização de L-prolina como catalisador (YANG; ZHANG; WU, 2015). Uma vez que o presente trabalho buscou uma síntese facilitada e sem o uso de catalisadores devido ao apelo ambiental, seu menor rendimento é considerado aceitável.

O espectro da molécula **44** foi escolhido para ser discutido de forma representativa. O espectro de hidrogênio para a molécula **44** se encontra na figura 49 e o espectro de carbono pode ser visto na figura 50. Importante destacar que para todas as moléculas a análise de carbono realizada foi DEPT-Q (*distortionless enhancement by polarization transfer*), que tem como característica os sinais referentes a CH₃ e CH estarem inferior a linha de base, enquanto CH₂ e C estão superiores a linha de base. Ambos os espectros foram realizados com dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) como solvente.

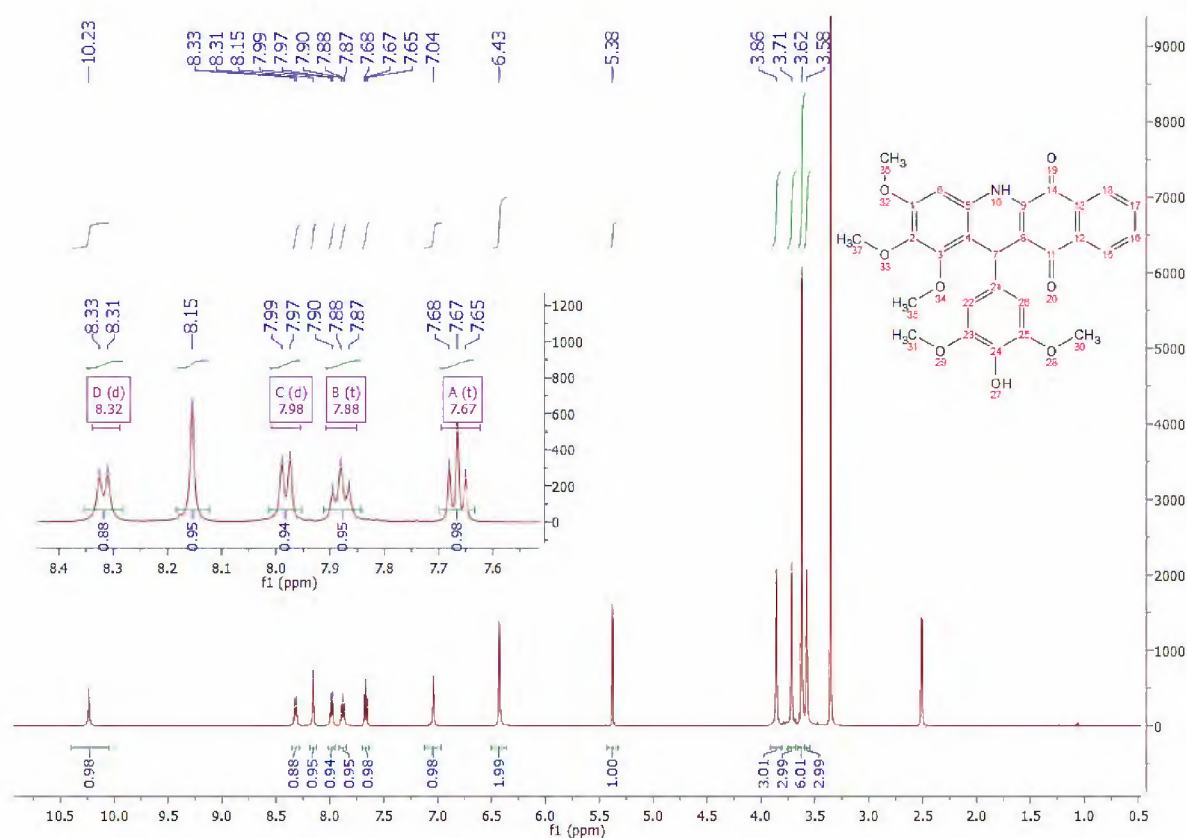


Figura 49: Espectro de RMN ¹H 500 MHz (DMSO-d₆) para molécula **44**. Fonte: Elaborada pela autora.

Para a caracterização da molécula **44** o simpleto em δ_H 5,38 ppm é o mais significativo do espectro é referente ao hidrogênio metínico ligado ao carbono 7, pois indica que houve a ciclização do produto. Os sinais entre 3,58 e 3,86 ppm são referentes aos hidrogênios das metoxilas, sendo o sinal em δ_H 3,58 ppm referente aos 3 hidrogênios ligados ao carbono 37, o sinal em δ_H 3,71 ppm referente aos 3 hidrogênios ligados ao carbono 35 e o sinal em δ_H 3,86 ppm referente aos 3 hidrogênios ligados ao carbono 36. Enquanto o sinal referente aos 6 hidrogênios equivalentes ligados aos carbonos das metoxilas 30 e 31 aparecem como um simpleto em δ_H 3,62 ppm. O sinal em δ_H 6,43 ppm é referente aos hidrogênios 22 e 26, que possuem o mesmo ambiente químico, sem nenhum hidrogênio vizinho, aparecendo assim como simpletos. O simpleto em δ_H 7,04 ppm é referente ao hidrogênio 6, que está *orto* ao nitrogênio.

Os sinais dos anéis aromáticos provenientes da lausona se encontram na faixa de deslocamento químico entre 7,65 e 8,33 ppm e possuem multiplicidade compatível com o esperado. O tripleto em δ_H 7,65-7,68 é referente ao hidrogênio 17 e o tripleto em δ_H 7,87-7,90 é referente ao hidrogênio 16. Os dois dupletos em δ_H 7,97-7,99 e δ_H 8,31-8,33 são referentes aos hidrogênios 15 e 18, respectivamente.

Os dois simpletos em campo mais baixo no espectro são referentes aos hidrogênios 27 e 10. Sendo o sinal em δ_H 8,15 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila 27, que devido à proximidade com o oxigênio (mais eletronegativo) está mais desblindado, entretanto, devido a possíveis troca com a água, o deslocamento químico desse sinal pode sofrer variações. Já o sinal em δ_H 10,23 ppm referente ao hidrogênio 10 que por estar ligado ao nitrogênio (mais eletronegativo) também está mais desblindado.

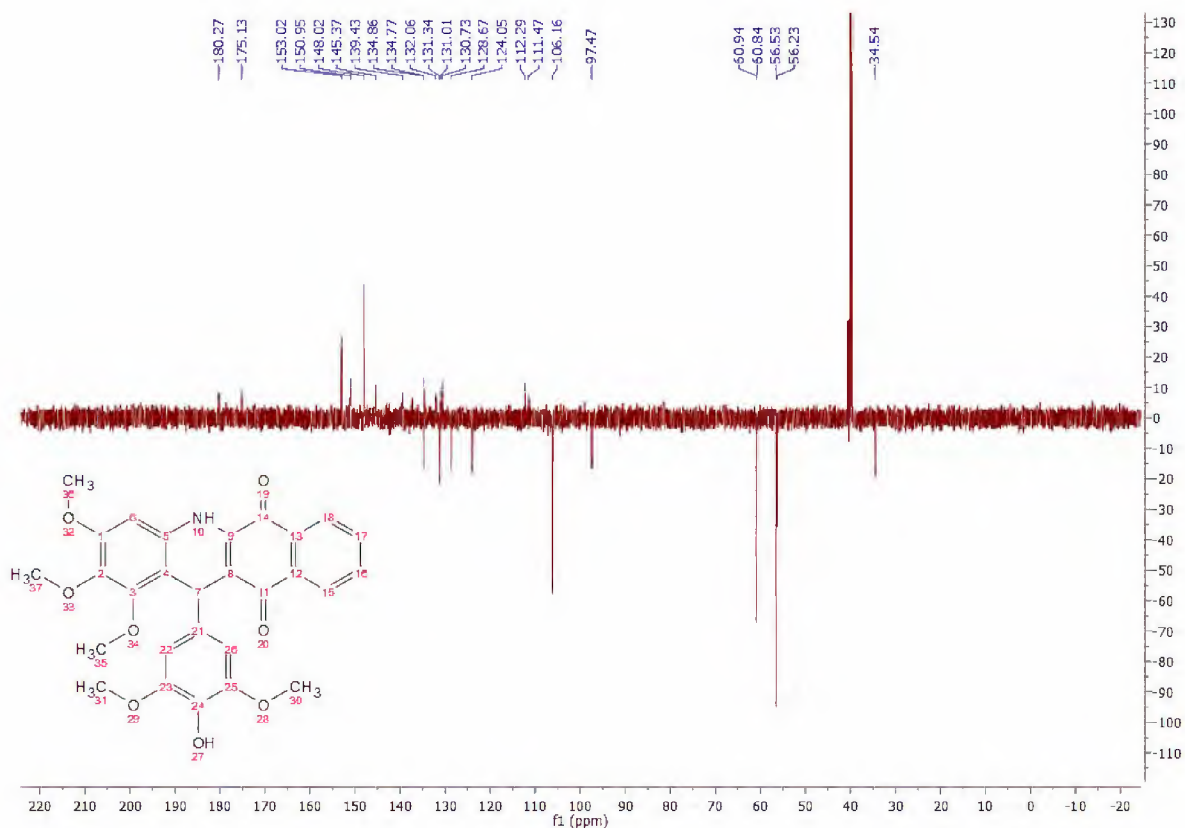


Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula **44**. Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro de carbono tem como seu sinal mais representativo, aquele que indica que houve a ciclização, em δ_{C} 35,5 ppm. Esse sinal é referente ao carbono metínico 7. Os sinais referentes aos carbonos das metoxilas então na faixa de deslocamento químico entre 56,2 e 60,9 ppm, sendo o sinal δ_{C} 56,2 ppm referente ao carbono 37, o sinal δ_{C} 56,5 ppm referente aos carbonos equivalentes 30 e 31, o sinal δ_{C} 60,8 ppm referente ao carbono 36 e o sinal δ_{C} 60,9 ppm referente ao carbono 35. Os sinais referentes aos carbonos 36 e 37 possuem um deslocamento químico maior pois estão na posição *meta* ao grupo amino, onde o efeito da ressonância faz com que fiquem mais desblindados. Posições *para* são mais blindadas, por isso o sinal referente a metoxila 37 tem menor deslocamento químico.

O espectro possui 6 sinais de carbonos metínicos, sendo um deles equivalente a dois carbonos. O sinal em δ_{C} 97,4 ppm referente ao carbono 6, cuja blindagem é devido a presença dos grupos amino e metoxila na posição *orto* a ele, juntamente com a metoxila na posição *para* a ele. O sinal δ_{C} 106,1 ppm referente aos dois carbonos metínicos equivalentes 22 e 26, que tem o seu deslocamento influenciado pela proximidade com a metoxilas. Os sinais em δ_{C} 124,0,

128,6, 131,3 e 134,8 ppm são referentes aos carbonos metínicos proveniente da lausona, representando, respectivamente, os carbonos 15, 18, 16 e 17.

Ao todo o espectro de carbono possui 14 sinais de carbonos quaternários, sendo um deles referente a dois carbonos equivalentes. Os sinais em δ_C 111,4 e 112,2 ppm aparecem com menor deslocamento químico pois são referentes aos carbonos 4 e 8, respectivamente. Os 2 sinais posteriores, δ_C 130,7 e 131,0 ppm, tem deslocamento próximos pois possuem ambiente químicos similares, sendo referentes aos carbonos 12 e 13 respectivamente. Os sinais em δ_C 132,0; 134,7 e 148,0 ppm são referentes aos carbonos quaternários provenientes do aldeído, sendo o mais blindado referente ao carbono 27, ligado a carbonila; seguido do sinal referente ao carbono 21, posicionado *para* a hidroxila e *meta* a duas carbonila; e tendo um único sinal referente aos carbonos 23 e 25, ambos equivalentes, ligados a metoxilas. Os sinais em δ_C 137,3; 139,4; 145,3; 150,9 e 153,0 ppm são representantes dos carbonos 5, 9, 3, 2 e 1, respectivamente. Os três mais desblindados são característicos de carbonos sp^2 ligados a metoxilas, enquanto os dois mais blindados estão diretamente ligados ao nitrogênio. Os sinais de campo mais baixo do espectro inteiro são os referentes as carbonilas, sendo o sinal em δ_C 180,3 ppm referente a carbonila meta ao grupo amino (carbono 11) e o sinal em δ_C 175,1 ppm referente a carbonila orto ao grupo amino (carbono 14), sofrendo, portanto, influência desse grupo.

Para as reações **38** e **39** o produto obtido se mostrou diferente do esperado. O anel central diidropiridina era o esperado, entretanto um anel central piridina foi obtido (figura 51). Dois sinais característicos dos anéis diidropiridina aparecem no espectro de próton obtido por RMN. Um deles é o simpleto em aproximadamente δ_H 5.00-6.00 ppm, referente ao centro assimétrico formado e outro é referente ao hidrogênio que está ligado ao nitrogênio e possui deslocamento químico na faixa de 9.50 a 10.50 ppm. Ambos os sinais não estão presentes nos espectros de próton das moléculas **38** e **39**, como pode ser visto na figura 52, destacado em lilás, que mostra o espectro de hidrogênio da molécula **39**, evidenciando a presença de um anel piridina central.

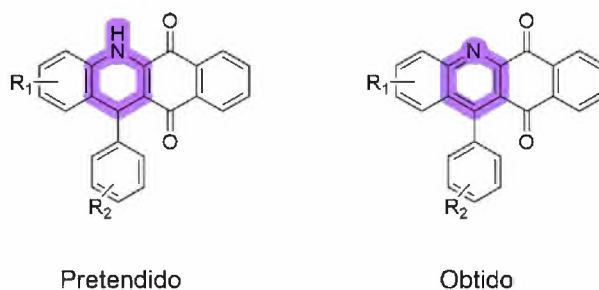


Figura 51: Diferença dos anéis pretendidos e obtidos. Fonte: Elaborado pela autora.

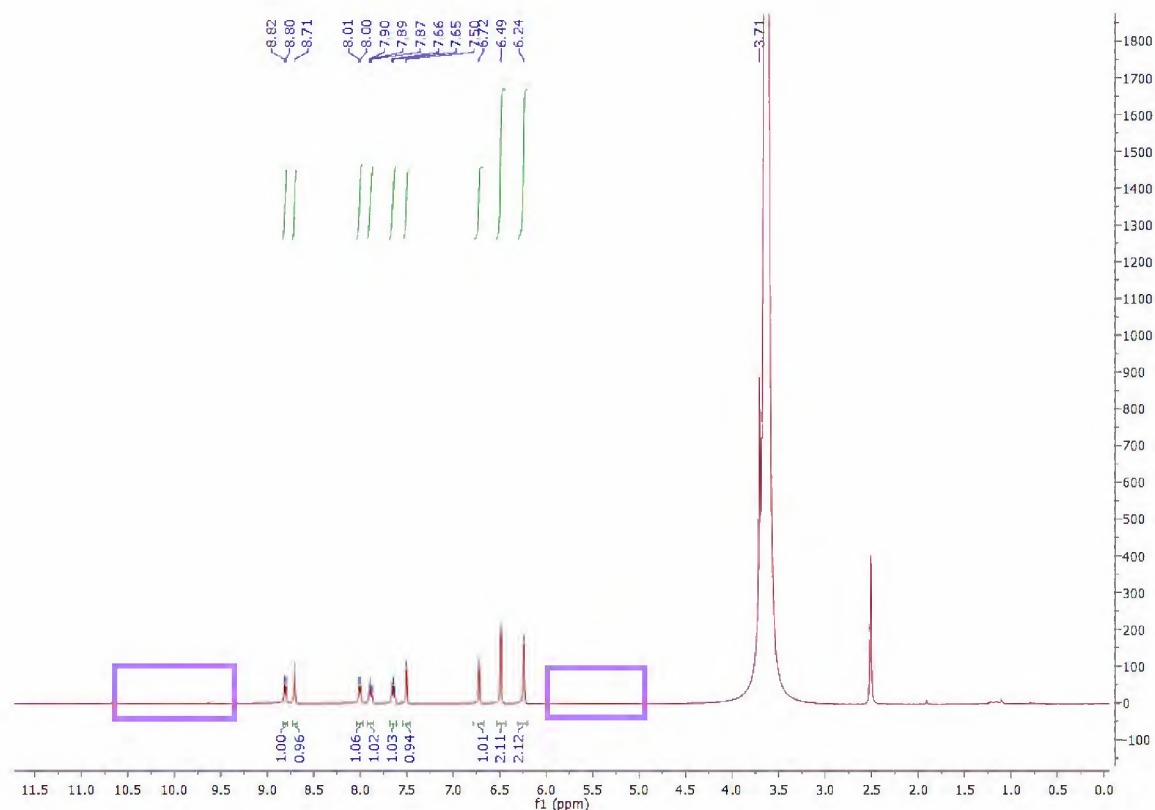
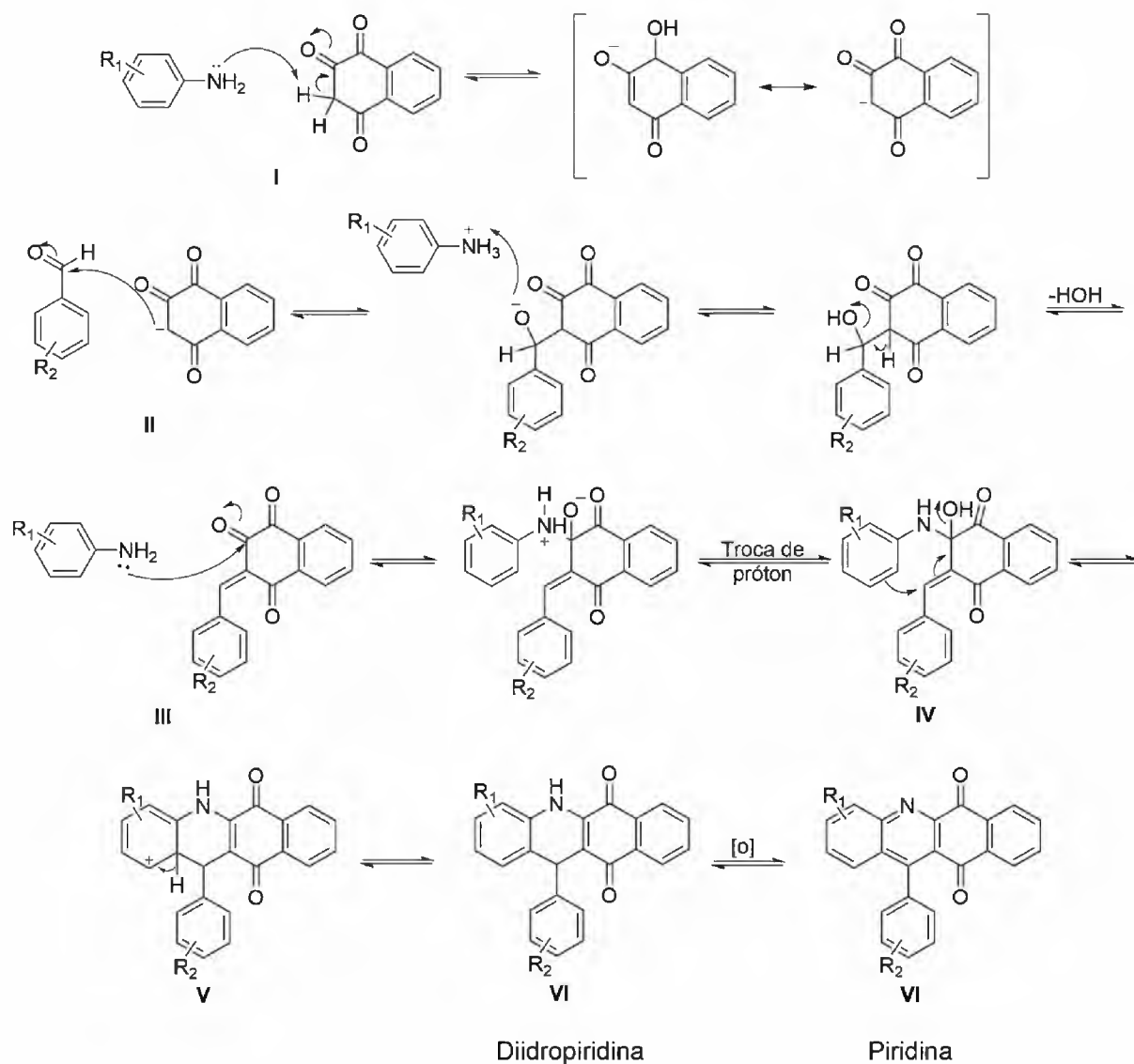


Figura 52: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula **39**. Fonte: Elaborada pela autora.

A oxidação de anéis diidropiridina é passível de acontecer, em diversos casos, apenas pelo contato com o ar, como exposto no trabalho original de Hantzsch (HANTZSCH, 1882). O mecanismo para obtenção das acridinodionas, oxidadas ou não, só diferem na última etapa. Um esquema de intermediários proposto para as acridinodionas pode ser visto no esquema 17, onde em meio básico, a anilina remove um próton do carbono alfa (o H_α) no tautômero carbonilado (**I**) formando o enolato, seguida uma condensação de Knoevenagel (**II**) e uma adição de Michael (**III**). O produto da adição de Michael então passa por uma etapa de ciclização (**IV**) e um restabelecimento a aromaticidade (**V**) para obtenção da diidropiridina, que quando oxidada gera a piridina.



Esquema 17: Esquema de intermediários proposto para as acridinodionas. Fonte: Elaborado pela autora.

O rendimento das reações **38** e **39** foram de 3 e 5%, respectivamente. Entretanto, os dois produtos são inéditos na literatura, fazendo com que o baixo rendimento seja considerado aceitável. A obtenção do produto oxidado, apesar de inesperado, pode colaborar muito para o presente trabalho, uma vez que a mudança do anel diidropiridina para piridina ocorre naturalmente durante o metabolismo de moléculas previamente analisadas (MAGALHÃES, 2019). Dessa forma, é possível utilizar os produtos oxidados tanto nas análises *in silico* quanto em posteriores testes *in vitro*.

Para as moléculas **37**, **43** e **45**, os espectros de RMN indicam a presença de diversas impurezas, como pode ser visto na figura 53 que mostra o espectro de hidrogênio para molécula

43, e também nos anexos 95, 109 e 112 (espectros da molécula **37**, **43** e **45**; páginas 304, 318 e 321). Contudo, para as três moléculas, os espectros de hidrogênio possuem um sinal com deslocamento químico entre 5.48 e 5.77 ppm, esse simpleto é característico das moléculas pretendidas e indicam que o produto desejado está presente, sendo necessário novas purificações. Devido ao fator de retenção muito próximo entre os produtos e suas impurezas, a purificação por cromatografia flash foi um desafio, entretanto, novas metodologias de purificação são possíveis de serem realizadas futuramente, uma vez que há indicação da formação dos produtos.

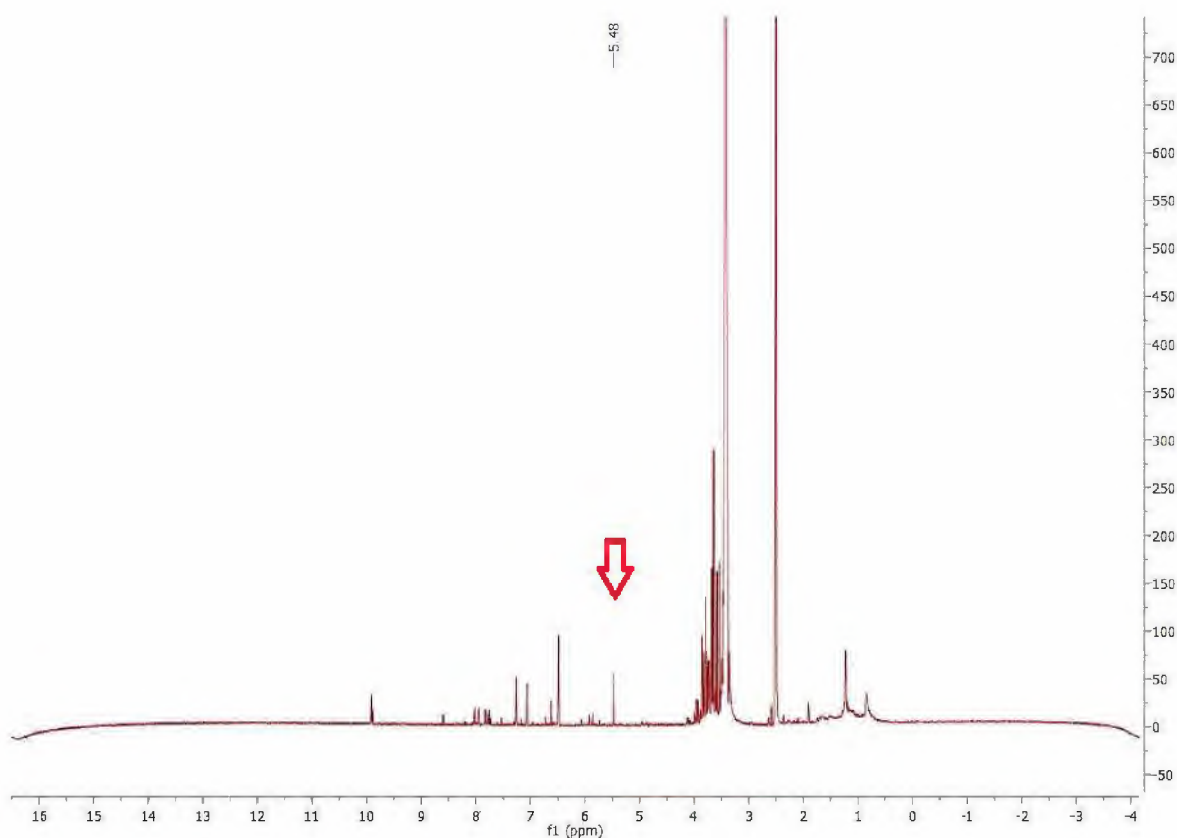


Figura 53: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula **43**. Fonte: Elaborada pela autora.

Contudo, é possível concluir que das 10 acridinodionas planejadas, cinco foram obtidas da forma planejada, duas foram obtidas da forma oxidada e três possuem indicação da presença do produto desejado, porém faz-se necessária nova purificação. Na tabela 8 encontram-se as estruturas das moléculas que tiveram confirmação de obtenção por RMN. Importante destacar que apenas a molécula **40** possui relato na literatura, sendo as outras, inclusive as duas obtidas na forma de piridina, inéditas na literatura. Tal fato corrobora a versatilidade da reação de

Hantzsch, podendo ser utilizada com dicarbonilados variados como a lausona, sendo reprodutível e efetiva para sínteses de heterociclos diversos.

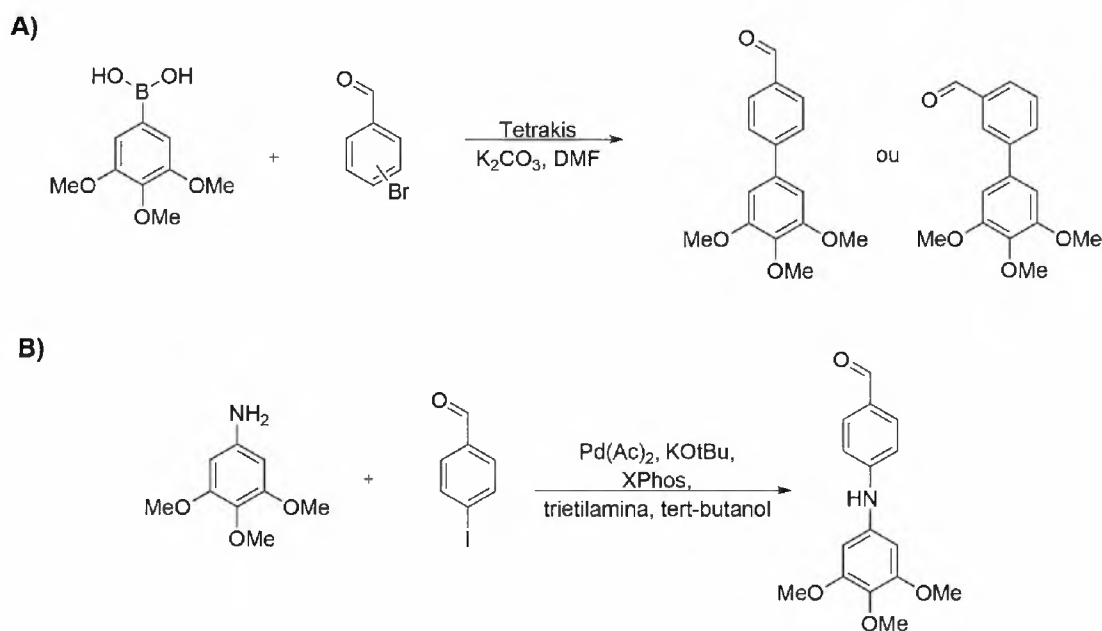
Tabela 8: Acridinodionas sintetizadas.

Molécula	Estrutura	Molécula	Estrutura
38		39	
40		41	
42		44	
46			

3.1.2. Síntese e caracterização das acridinonas

Para as moléculas idealizadas, foi necessário a síntese de um intermediário através de reação de acoplamento catalisada por paládio. Para as moléculas **47** e **48** foi realizada uma síntese de acoplamento de Suzuki-Miyaura utilizando como reagentes o ácido 3,4,5-

trimetoxibenzenoborônico e um bromobenzaldeído (esquema 18A). Para a molécula **49** foi realizada uma síntese de acoplamento de Buchwald-Hartwig utilizando como reagentes 3,4,5-trimetoxianilina e iodobenzaldeído (esquema 18B). Após a síntese, as moléculas tiveram suas estruturas confirmadas por RMN (1D e 2D) e LC-MS, os espectros podem ser visualizados nos anexos 116 a 127 (páginas 325 à 336).



Esquema 18: Esquema de síntese dos intermediários através da reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura (**A**) e de Buchwald-Hartwig (**B**). Fonte: Elaborada pela autora.

As sínteses dos intermediários **47** e **48** seguiram a metodologia de Suzuki-Miyaura, que tem o ciclo catalítico descrito na figura 54. A primeira etapa é uma adição oxidativa, onde o paládio 0 é oxidado a paládio II ao reagir com o brometo de arila, rompendo a ligação Ar-Br e formando um intermediário com o paládio ligado ao anel aromático e ao brometo (Ar-Pd-Br). A segunda etapa é uma transmetalração, onde o uso da base é fundamental, pois ela é responsável pela ativação do ácido borônico, que posteriormente, transfere seu anel aromático para o centro de paládio. A terceira e última etapa é a eliminação redutiva, onde há a formação da ligação C-C desejada e uma regeneração do paládio 0.

A tabela 9 mostra os deslocamentos químicos encontrados nos espectros de hidrogênio e carbono para os intermediários **47** e **48**. Os deslocamentos químicos são equivalentes ao esperado para as duas moléculas. Os cromatogramas obtidos por de LC-MS também confirmam

a obtenção dos produtos desejados, com pureza elevada, uma vez que o pico do íon molecular é obtido para as duas moléculas ($[M+1] = 273$).

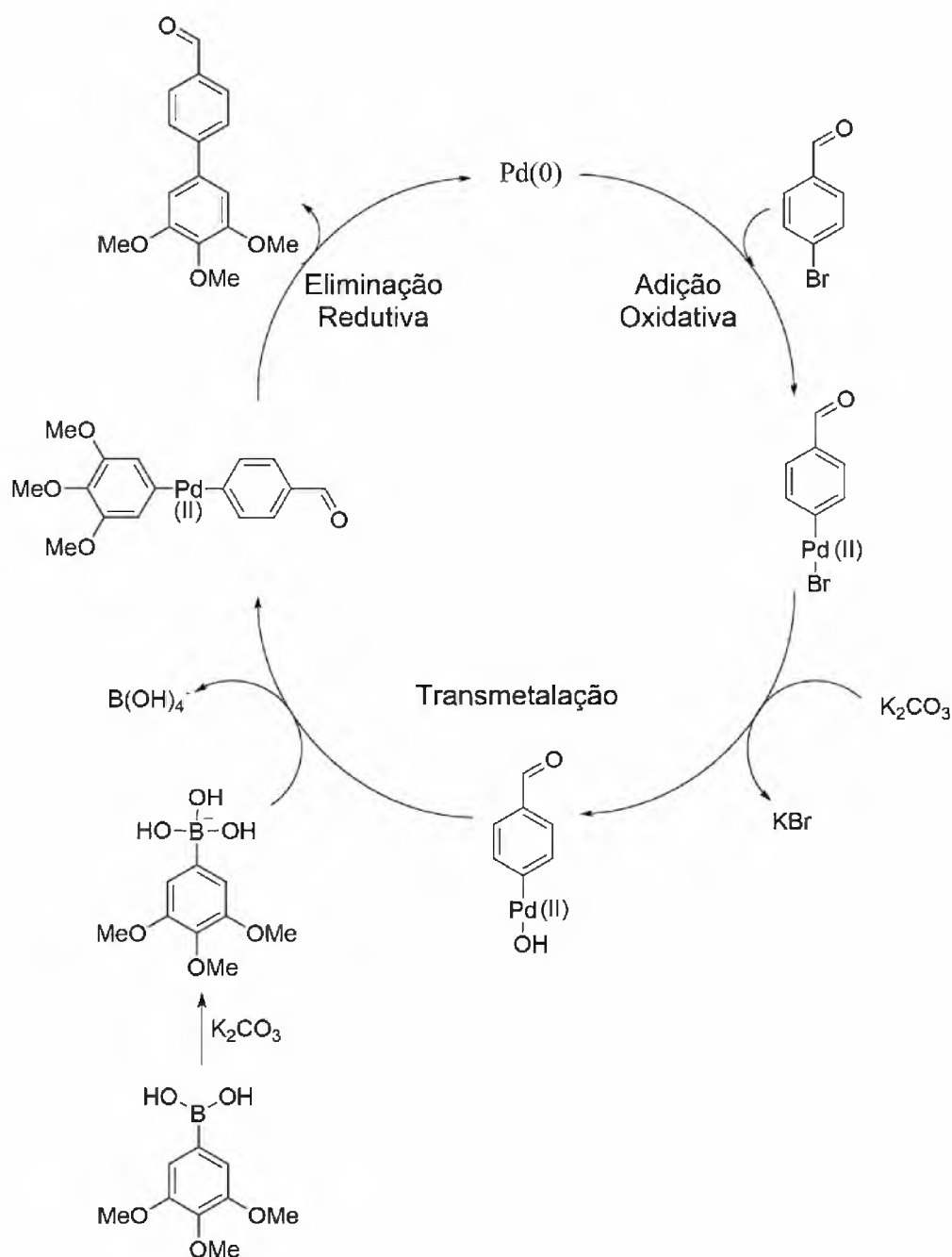
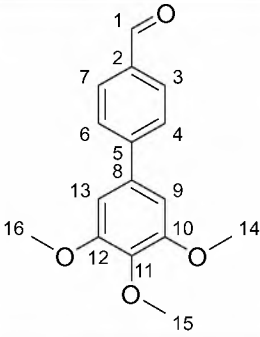
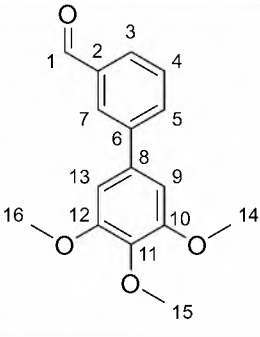


Figura 54: Ciclo catalítico proposto para a reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9: Deslocamento químicos para os intermediários 47 e 48, respectivamente.

				
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	10.06	193.2	10.11	193.7
2	-	135.4	-	138.0
3	7.94-8.00	130.4	8.07-8.04	133.3
4	7.94-8.00	127.9	7.71-7.67	130.1
5	-	146.4	7.90-7.88	128.2
6	7.94-8.00	127.9	-	141.6
7	7.94-8.00	130.4	8.23-8.22	128.7
8	-	134.9	-	135.1
9	7.04	105.1	7.01	104.8
10	-	153.8	-	153.8
11	-	138.4	-	137.2
12	-	153.8	-	153.8
13	7.04	105.1	7.01	104.8
14	3.89	56.5	3.89	56.5
15	3.72	60.5	3.71	60.5
16	3.89	56.5	3.89	56.5

A síntese do intermediário **49** seguiu a metodologia de Buchwald-Hartwig, que tem o ciclo catalítico descrito na figura 55. A primeira etapa é uma adição oxidativa, onde o paládio 0 é oxidado a paládio II ao reagir com o iodeto de arila, rompendo a ligação Ar-I e formando um intermediário com o paládio ligado ao anel aromático e ao iodo. A utilização do iodeto de arila foi estratégica uma vez que a ligação Ar-I é mais fraca, favorecendo seu rompimento e, portanto, a fazendo o processo de oxidação mais rápido. Posteriormente, a transmetalração ocorre, onde primeiro há uma coordenação com a anilina utilizada, coordenando-a com o

paládio, seguida de uma substituição do iodeto, intermediada pelo terc-butoxido de potássio, formando um intermediário (Ar-NH-Pd-Ar). A terceira e última etapa é a eliminação redutiva, onde há a formação da ligação N-C desejada e uma regeneração do paládio 0.

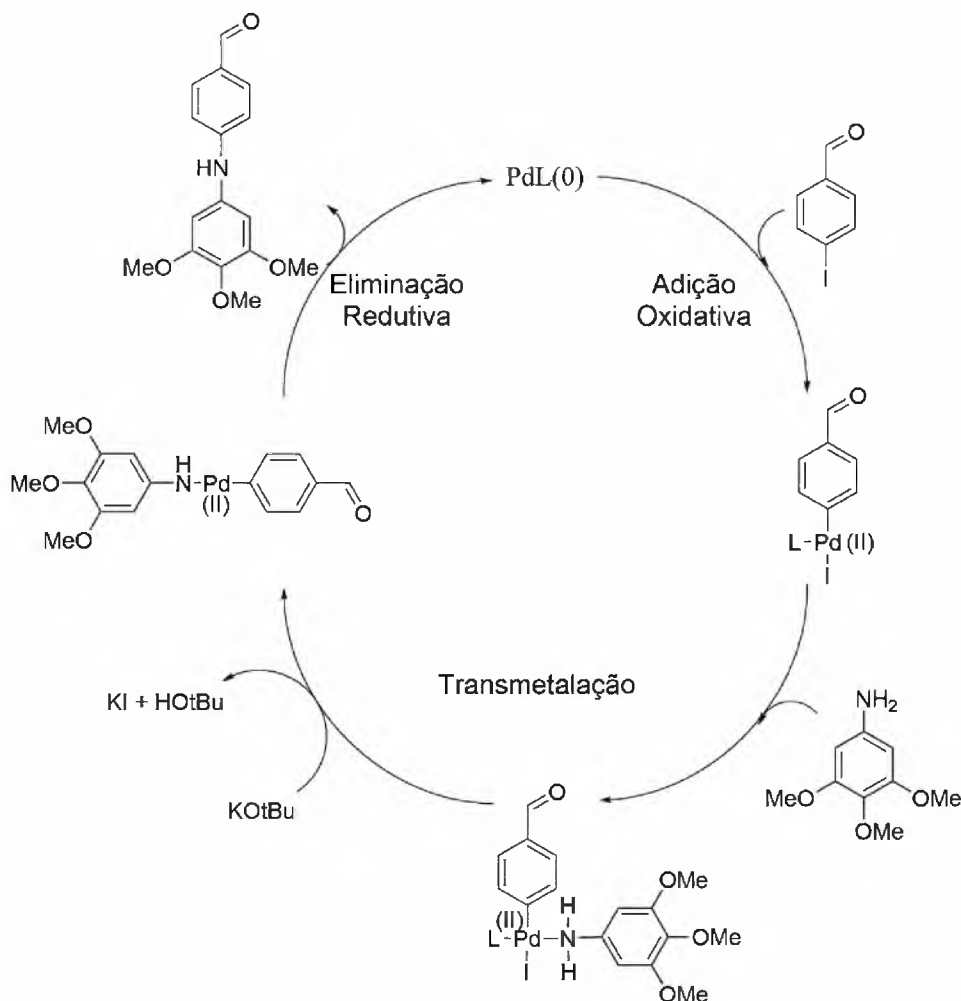


Figura 55: Ciclo catalítico proposto para a reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig.

Fonte: Elaborada pela autora.

O intermediário **49** foi obtido e as figuras 56 e 57 mostram seus espectros de hidrogênio e carbono, respectivamente, ambos realizados com DMSO-d_6 como solvente. Os sinais nos dois espectros são similares aos obtidos para a molécula **47**, descritos na tabela 9. Onde os sinais relativos aos hidrogênios e carbono das metoxilas se encontram no campo mais alto, seguido pelos sinais aromáticos e tendo em campo mais baixo a presença dos sinais referente ao carbono e hidrogênio do aldeído (δ_{C} 190.5 ppm no ^{13}C NMR e δ_{H} 9.72 ppm no ^1H NMR). Destaca-se que no espectro de hidrogênio, um sinal em δ_{H} 8.86 ppm aparece, sendo justamente o sinal que

mostra a presença do NH (10). Os dupletos com padrão AA'BB' representando os hidrogênios aromáticos 1, 2, 4 e 5 também estão presentes confirmando a substituição na posição *para*. Em geral, os sinais seguem o esperado, confirmando a estrutura da molécula, assim como o cromatograma obtido por de LC-MS, que possui o pico do íon molecular característico ($[M+1] = 288$).

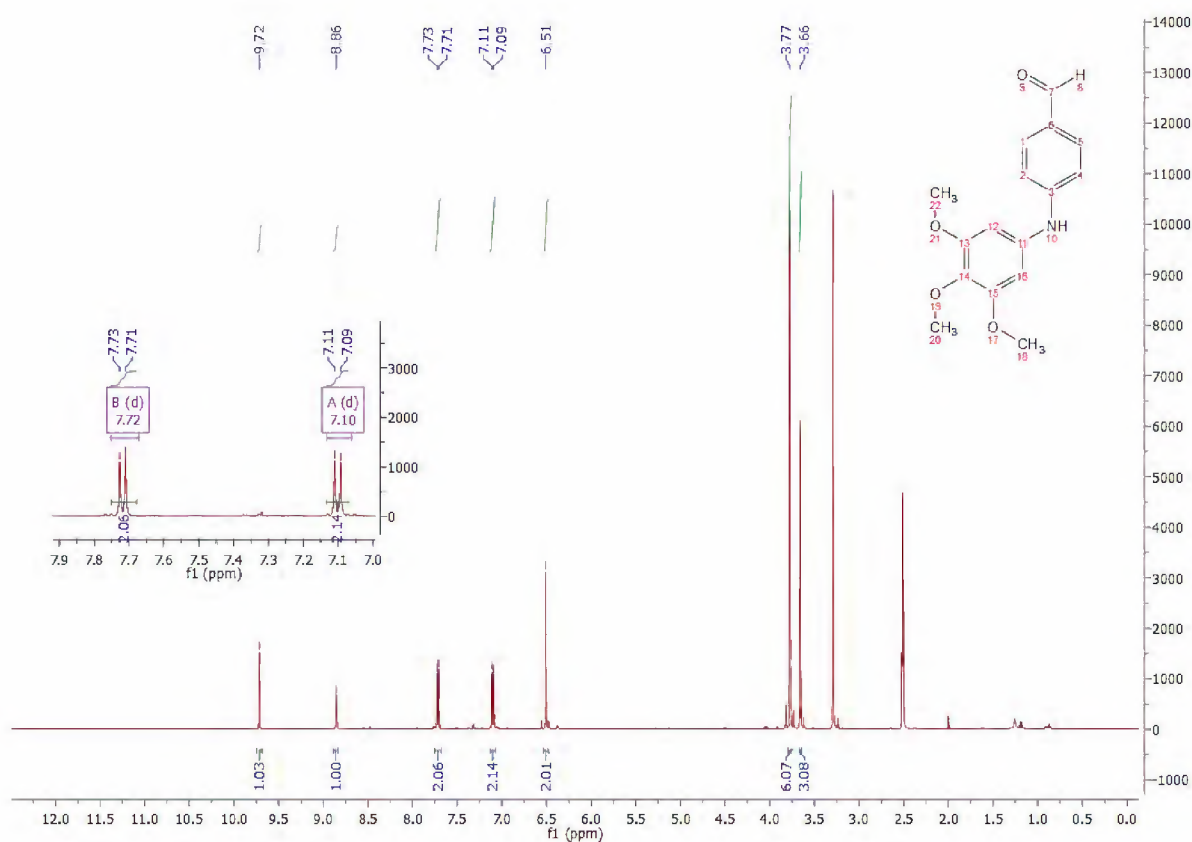


Figura 56: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO-d_6) do intermediário **49**. Fonte: Elaborada pela autora.

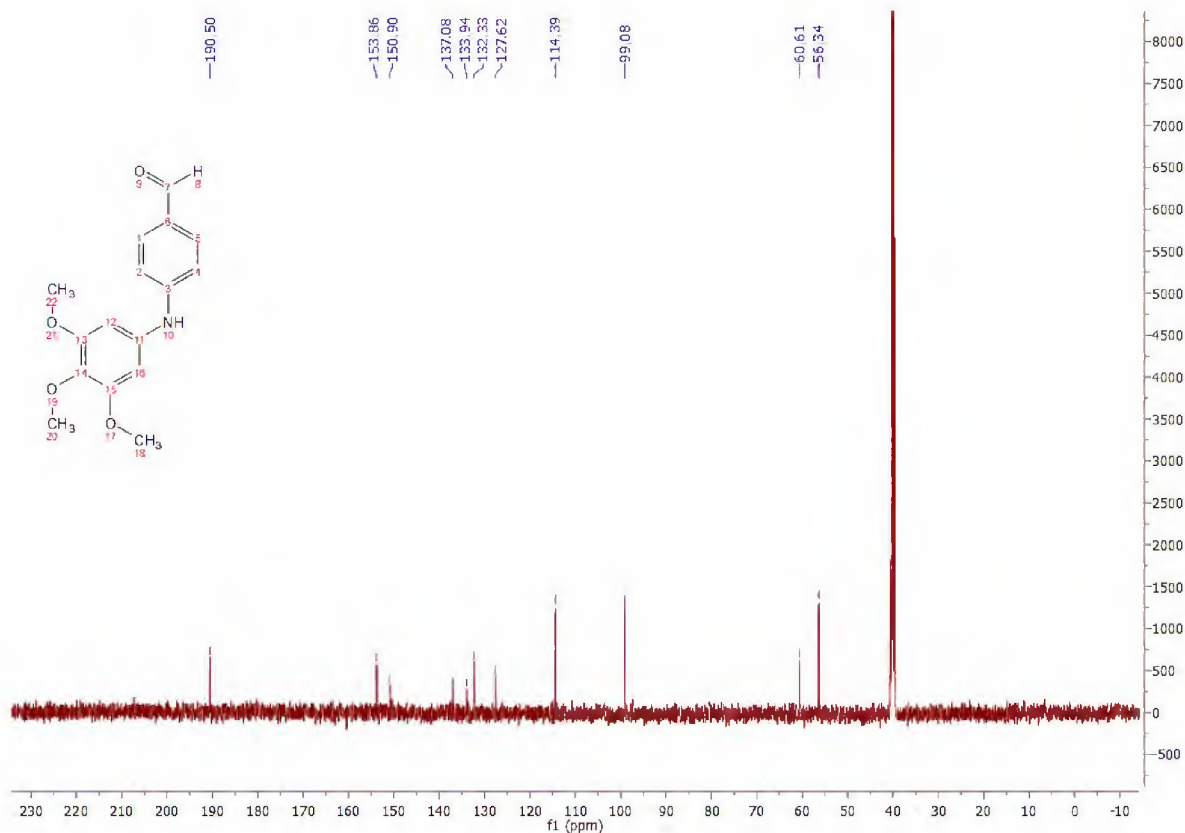
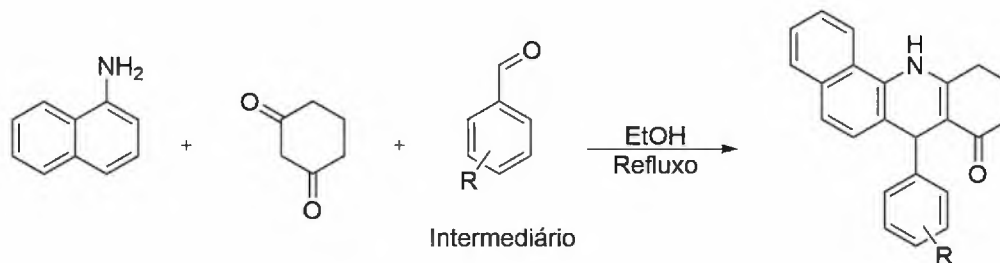


Figura 57: Espectro de RMN ^{13}C 500 MHz (DMSO-d_6) do intermediário **49**. Fonte: Elaborada pela autora.

Uma vez que os intermediários desejados foram obtidos, uma reação de Hantzsch modificada foi realizada para a obtenção da acridinona desejada. O protocolo seguiu o esquema 19. A síntese ocorreu de acordo com a metodologia descrita por Tratat e colabores, com modificações estabelecidas no grupo de pesquisa (TRATRAT; GIORGI-RENAULT; HUSSON, 2002). Após a síntese, os produtos foram isolados e purificados e passaram por métodos espectroscópicos (RMN de próton e carbono) para a confirmação de suas estruturas. Os espectros obtidos se encontram nos anexos 128 a 135 (páginas 337 à 344).

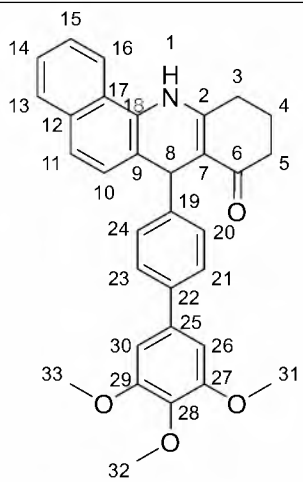
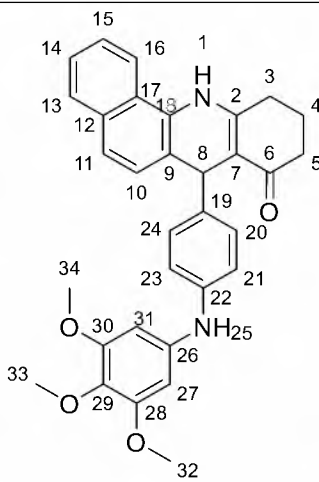


Esquema 19: Esquema de reação para as acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.

O mecanismo para a síntese das acridinonas segue o mesmo princípio descrito no capítulo I (esquema 10 – capítulo I) do presente trabalho, tendo como primeira etapa a abstração do próton alfa (o H α) no tautômero carbonilado, através da amina utilizada, para a formação de um enolato; seguida de uma reação de condensação de Knoevenagel entre o carbânion e o aldeído, seguidos de uma adição de Michael e uma ciclização para obtenção do produto desejado.

O espectro de RMN para as moléculas **47** e **49** indicam a obtenção da acridinona pretendida de forma pura. A tabela 10 mostra a atribuição dos sinais obtidos no espectro de hidrogênio e carbono para essas moléculas. Os sinais são de acordo com o esperado, e similares, tendo o sinal mais representativo referente ao centro assimétrico das moléculas (molécula **47**: δ_H 5.28 e δ_C 40.2 ppm; molécula **49**: δ_H 5.15 e δ_C 39.5 ppm), o que indica a obtenção dos produtos desejados.

Tabela 10: Deslocamentos químicos para os produtos 47 e 49, respectivamente.

				
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	9.37	-	9.31	-
2	-	154.2	-	154.0
3	2.96-2.71	27.4	2.94-2.67	27.4
4	2.01-1.92	21.5	2.02-1.90	21.5
5	2.32-2.23	37.2	2.30-2.23	37.3
6	-	194.4	-	194.6
7	-	108.8	-	109.1
8	5.28	40.2	5.15	
9	-	121.3	-	121.8

10	7.35-7.33	123.1	7.32-7.31	123.1
11	7.84-7.83	126.1	7.84-7.82	126.0
12	-	131.1	-	130.9
13	7.52-7.48	126.2	7.51-7.47	126.1
14	7.60-7.57	128.6	7.58-7.56	128.6
15	7.52-7.48	128.3	7.51-7.47	128.4
16	8.50-8.48	121.7	8.47-8.46	121.6
17	-	122.6	-	122.6
18	-	132.8	-	132.6
19	-	148.0	-	140.2
20	7.46-7.44	127.9	7.07-7.05	128.3
21	7.30-7.28	127.2	6.90-6.88	116.6
22	-	138.6	-	141.9
23	7.30-7.28	127.2	6.90-6.88	116.6
24	7.46-7.44	127.9	7.07-7.05	128.3
25	-	136.6	7.92	-
26	6.78	104.5	-	140.0
27	-	153.5	6.27	94.7
28	-	137.3	-	153.7
29	-	153.5	-	131.2
30	6.78	104.5	-	153.7
31	3.79	56.3	6.27	94.7
32	3.65	60.4	3.67	56.0
33	3.79	56.3	3.56	60.5
34	-	-	3.67	56.0

Os espectros obtidos para o produto **48** indicou que o produto está presente, devido a presença de diversos sinais característicos da molécula, entre eles o sinal referente ao centro assimétrico da molécula em δ_H 5.33 ppm no espectro de hidrogênio (figura 58). Contudo, a presença de impurezas pôde ser constatada, uma vez que as integrações na área dos alifáticos, dos aromático e das metoxilas, indicam mais hidrogênios do que o esperado.

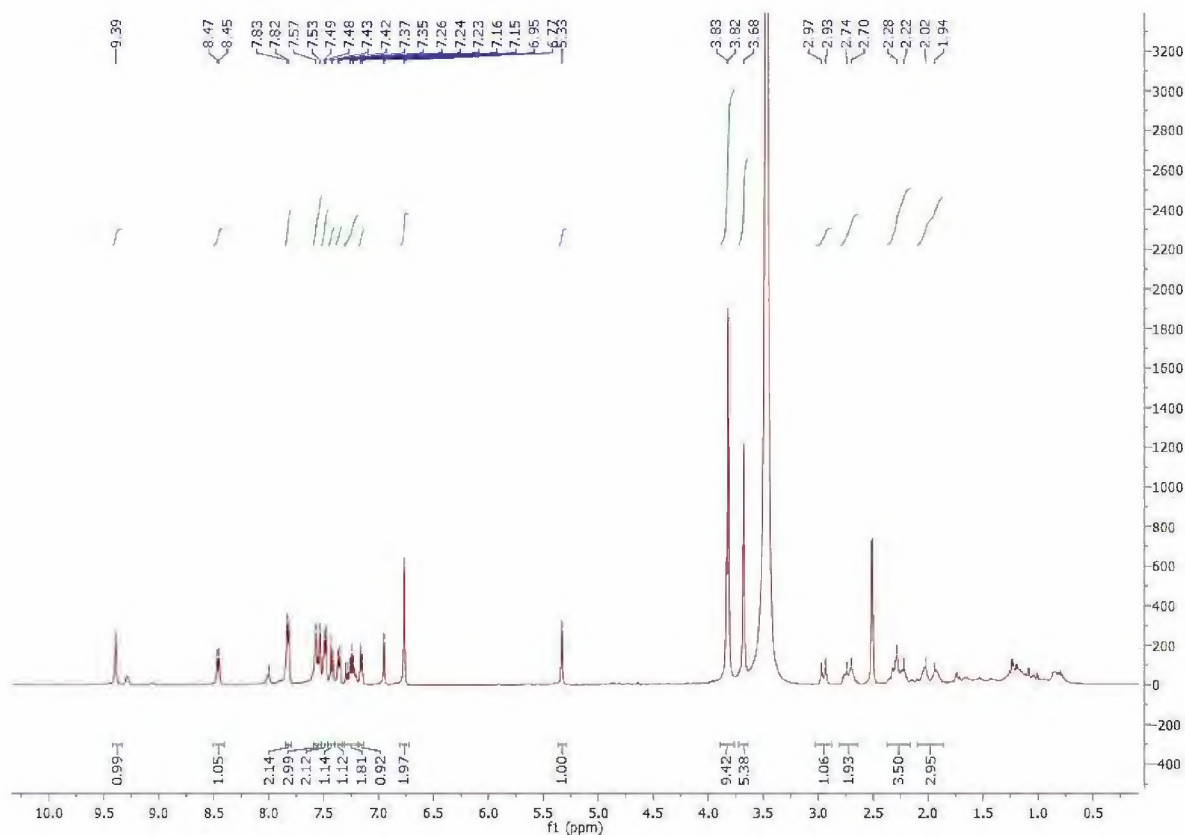


Figura 58: Espectro de RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) para molécula **48**. Fonte: Elaborada pela autora.

É possível concluir que a utilização das reações de acoplamento de Suzuki-Miyaura e de Buchwald-Hartwig, foram efetivas para a obtenção dos intermediários desejados, abrindo uma nova possibilidade para síntese de aldeídos que podem ser utilizados em reações de Hantzsch. Além disso, a reação modificada de Hantzsch se mostrou, mais uma vez, versátil, sendo os produtos desejados obtidos, ainda que para a molécula **48** o produto desejado não esteja puro o suficiente, a síntese se mostrou efetiva, sendo necessário apenas melhorias no isolamento.

3.2. Avaliação in silico no sítio da Colchicina da proteína Tubulina.

Todas as 9 moléculas que tiveram suas estruturas confirmadas, tiveram suas interações com a Tubulina, no sítio da Colchicina, avaliadas através do ancoramento molecular. O ancoramento molecular foi realizado utilizando um modelo cristalográfico disponíveis no *Protein data bank* (ID: 5JCB) e utilizando o programa GOLD. O sítio de interação utilizado foi

o mesmo ao qual um análogo da Podofilotoxina (NV4) (figura 59) estava co-cristalizada com um raio de interação de 6Å (ZHAO et al., 2017). A validação foi realizada através de redocking do NV4, validado após 10 rodadas (RMSD médio de 10 rodadas = 0,852), tendo a função de pontuação CHEMPLP como a melhor função de pontuação, além de ter apresentado uma boa sobreposição com o NV4 co-cristalizado. Desta forma, a função CHEMPLP foi escolhida para os procedimentos subsequentes de atracamento molecular.

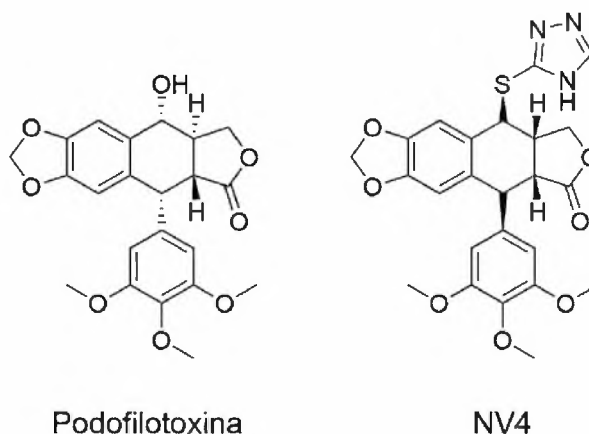


Figura 59: Estrutura da Podofilotoxina e seu análogo, NV4. Fonte: Elaborada pela autora.

As moléculas **40**, **41**, **42**, **44**, **46**, **47** e **49** foram obtidas na forma de mistura racêmica. Uma vez que enantiômeros podem apresentar interações, e consequentemente propriedades biológicas distintas, cada uma desses enantiômeros tiveram suas interações avaliadas separadamente. As moléculas **38** e **39** não possuem centro assimétrico, portanto não possuem análises isoladas de enantiômeros. O ancoramento molecular foi realizado por 20 rodadas e tendo como ligantes: o NV4; os dois enantiômeros de cada uma das 7 moléculas obtidas na forma de mistura racêmica; as duas moléculas obtidas na forma oxidada; além dos enantiômeros da molécula **LDQMC-014** (figura 44) que foi sintetizada e testada em trabalhos anteriores. Uma tabela com todas as interações que ocorrem e os scores das moléculas sintetizadas, do NV4 e do composto **LDQMC-014** encontra-se no anexo 136 (página 345).

As acridinodionas (**38**, **38**, **40**, **41**, **42**, **44** e **46**) possuem como similaridades estruturais a presença da estrutura da lausona e o anel aromático 3,4,5-substituído (trimetoxi ou 4-hidroxi-3,5-dimetoxi). Com o ancoramento molecular foi possível observar que o anel tri substituído fica fixo no sítio em todas as acridinodionas, uma vez que ele é o farmacóforo, enquanto o anel acridinodiona é invertido, a depender do isômero presente (figura 60). Os resultados foram

analisados e três resíduos de aminoácidos estão presentes em todas as estruturas analisadas, fazendo interações hidrofóbicas com o anel tri substituído, sendo possível assim estabelecer os principais resíduos da interação com o sítio. São eles: B: Leu²⁵⁵, B: Ala³¹⁶ e B: Ala³⁵⁴, onde B representa que o resíduo faz parte da estrutura da β -Tubulina.

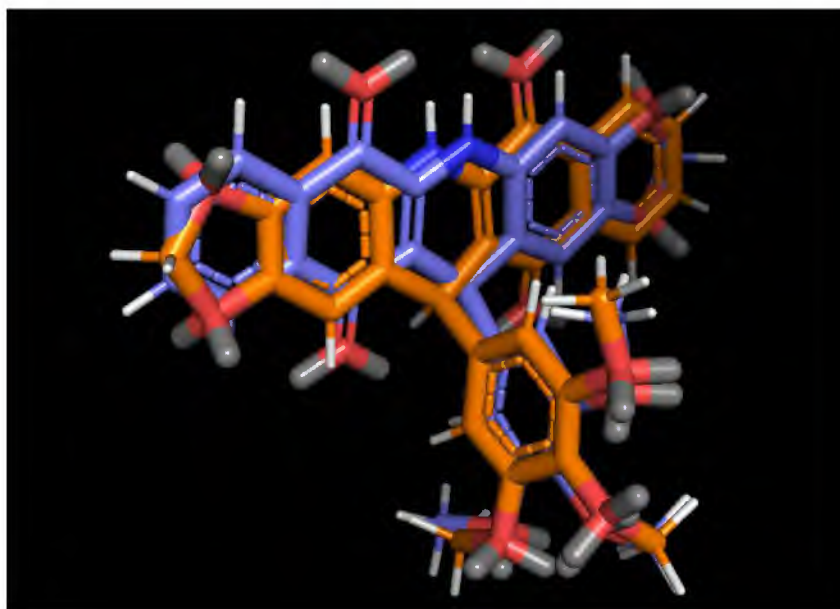


Figura 60: Melhores poses para a acridinodiona **40** R (azul) e S (laranja) com o grupo trimetoxifenil fixado e o anel acridinodiona invertido. Fonte: Elaborado pela autora.

Uma vez que o anel tri substituído fica fixo, o anel naftaleno-1,4-diona, proveniente da lausona, fica em posicionamentos invertidos de acordo com o enantiômero observado, sendo que, para as moléculas **38** e **39** que não possui centro assimétrico, o posicionamento do anel naftaleno-1,4-diona é o mesmo encontrado nos enantiômeros S das outras moléculas. Devido ao posicionamento similar, alguns resíduos de aminoácidos que fazem interações com o anel naftaleno-1,4-diona são comuns a todas as acridinodionas. Para os enantiômeros R, as interações comuns ocorrem com a B: Leu²⁴⁸ (interação hidrofóbica), B: Lys²⁵⁴ (interação π -alquil) e A: Ala¹⁸⁰ (interação carbono-hidrogênio). Enquanto para os enantiômeros S e para as moléculas **38** e **39**, as interações comuns ocorrem com a A: Ala¹⁸⁰ (interação carbono-hidrogênio), A: Val¹⁸¹ (interação π -amina stack), B: Met²⁵⁹ (interação π -enxofre), B: Ala³¹⁶ (interação π -alquil) e B: Lys³⁵² (interação π -alquil) (figura 61), onde B representa os resíduos que fazem parte da estrutura da β -Tubulina e A representa os resíduos que fazem parte da estrutura da α -Tubulina.

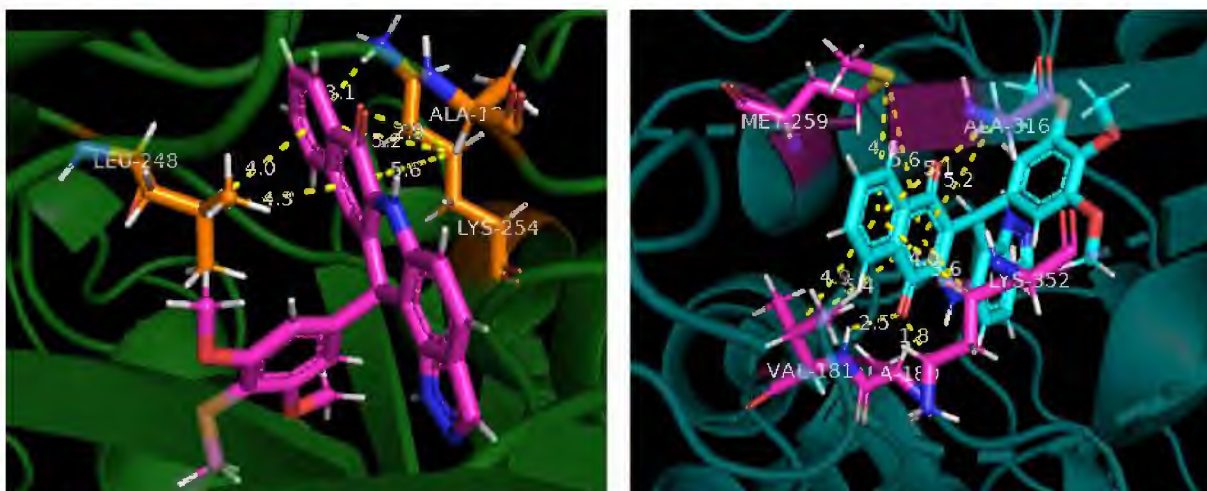


Figura 61: Interações do anel naftaleno-1,4-diona para a molécula **41** no enantiômero R (à esquerda) e no enantiômero S (à direita). Fonte: Elaborada pela autora.

Os *scores* (função de pontuação) para as acridinodionas se encontra na tabela 11. Tendo em vista que o composto **LDQMC-014** teve sua atividade *in vitro* avaliada separadamente para os dois enantiômeros, sendo apenas o enantiômero S ativo como inibidor de Tubulina, e sabendo o *score* de cada enantiômero desse composto (R = 60.4 e S = 83.69), é possível realizar uma estimativa que o *score* ideal deve maior que 60.40. Uma vez que esse valor ideal foi estabelecido, pode-se concluir que as moléculas com as atividades mais promissoras são as moléculas **38**, **40** (R), **40** (S), **41** (R), **42** (R) e **44** (S) que possuem *scores* maior que 70.00, sendo as moléculas **41** (S) e **42** (S) consideradas intermediárias pois possuem *scores* acima 60.00.

Tabela 11: Scores das acridinodionas.

Molécula	Score	Molécula	Score	Molécula	Score	Molécula	Score
38	81.79	39	49.64	40 (R)	81.78	40 (S)	77.59
41 (R)	78.15	41 (S)	68.42	42 (R)	76.55	42 (S)	62.11
44 (R)	46.28	44 (S)	70.49	46 (R)	48.39	46 (S)	57.68

O ancoramento molecular das moléculas **47** e **49** foi realizado a fim de entender se a adição de mais um anel aromático exploraria o bolsão hidrofóbico. Contudo, ao avaliar o posicionamento dos enantiômeros das duas moléculas em comparação com o posicionamento da **LDQMC-014** (figura 62), é possível concluir as moléculas **47** e **49** seguem posicionamentos

similares, porém a adição do anel aromático entre o anel acridinona e o anel trimetoxifenil gerou uma mudança no posicionamento em relação ao **LDQMC-014**, afastando o anel trimetoxi do bolsão hidrofóbico, gerando interações com diferentes resíduos de aminoácidos.

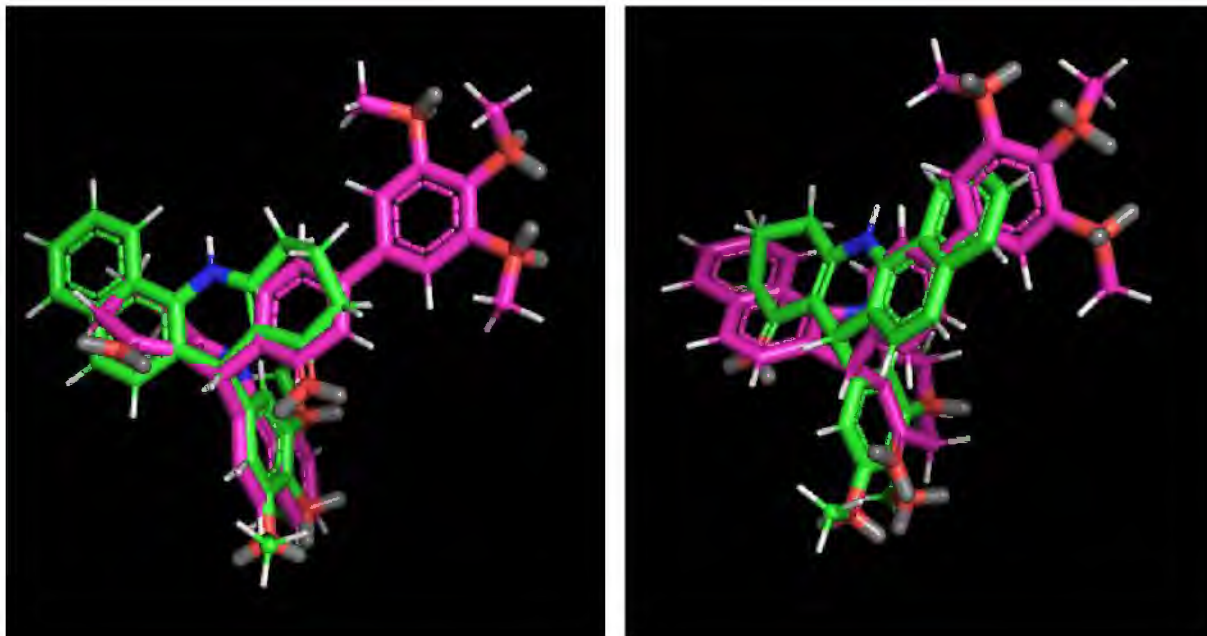


Figura 62: Posicionamento da acridinona **47** (rosa) em comparação com a **LDQMC-014** (verde), sendo os enantiômeros R à esquerda e os S à direita. Fonte: Elaborado pela autora.

Os resíduos de aminoácidos que participam das interações em ambos os enantiômeros das moléculas **47** e **49** são B: Ala³¹⁶, B: Ala²⁵⁰, B: Ala³⁵⁴, B: Leu²⁴⁸ e B: Lys³⁵², onde B representa os resíduos que fazem parte da estrutura da β -Tubulina. Entretanto, a maioria das interações que ocorrem com o anel trimetoxifenil, para os dois enantiômeros de ambas as moléculas, ocorrem com resíduos de aminoácidos presentes na α -Tubulina (figura 63). Tal fato mostra uma clara mudança no posicionamento do anel, indicando que o bolsão hidrofóbico, ao qual o composto **LDQMC-014** interage, não pode ser explorado quando há adição de um anel aromático entre o anel acridinona e o anel trimetoxi.

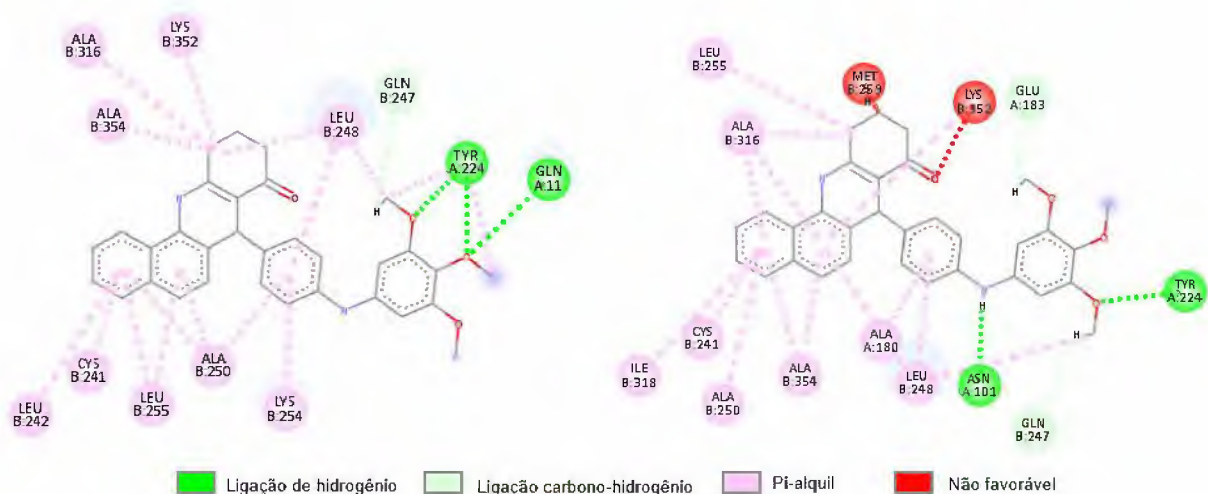


Figura 63: Mapa de interação para os enantiômeros R (à esquerda) e S (à direita) da molécula **49**. Fonte: Elaborada pela autora.

Entretanto, apesar do posicionamento das moléculas **47** e **49** ser diferente do composto **LDQMC-014**, modificando também as interações, os *scores* obtidos para os enantiômeros das duas moléculas (tabela 12) apresentam valores maiores de 60.00, sendo a molécula **49** a mais promissora pois possui o *score* do enantiômero R maior que 80.00 e o *score* do enantiômero S maior que 60.00.

Tabela 12: Scores das acridinonas 47 e 49.

Molécula 47				Molécula 49			
(R)	60.41	(S)	64.69	(R)	84.38	(S)	68.01

Contudo, é possível concluir que a avaliação da atividade inibitória de Tubulina através de ancoramento molecular foi realizada de forma satisfatória, mostrando que diversas moléculas são promissoras e candidatas para os ensaios *in vitro*. Os ensaios *in vitro* são necessários para confirmar que as moléculas realmente são inibidoras de Tubulina. Porém, os resultados abrem a perspectivas de novos trabalhos envolvendo síntese e avaliação *in silico* de acridinodionas e acridinonas inibidoras de polimerização de Tubulina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese das moléculas

Todas as acridinodionas e as acridinonas foram sintetizadas no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LadMol-QM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os intermediários das acridinonas foram sintetizadas na School of Life Science da Universidade de Dundee, Escócia-UK.

Os reagentes e solventes utilizados na síntese de todos os produtos do presente trabalho foram fornecidos pela Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

As reações foram acompanhadas através da cromatografia em camada delgada analítica (CCD), com placas de sílica gel Merck 60 F254 de 0,25 mm de espessura (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), utilizando como eluente mistura de hexano e acetato de etila (75%) e analisando na câmara de luz UV (254 ou 366 nm) CN-15LC (Vilber Lourmat, Collégien, France).

A purificação das acridinodionas e das acridinonas finais realizadas por cromatografia em coluna flash utilizou cromatografia líquida de adsorção em coluna, no equipamento Isolera da Biotage®, modelo ISO-4SV (IQ-UFRRJ). A purificação dos intermediários das acridinonas foram realizadas no equipamento CombiFlash da Teledyne®, modelo NextGen 300+ (JBCN-University of Dundee). Para a confecção das pastilhas, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). Como fase móvel, foram utilizadas as misturas solventes de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto. As colunas utilizadas foram de acordo com a especificação de cada fabricante.

4.1.1. Protocolo da síntese das acridinodionas

Em um tubo reacional adiciona-se 1 mmol da lausona, 1 mmol do aldeído, 1 mmol de uma amina aromática, 3 mL de solvente (etanol) e um agitador magnético. A reação é levada a uma chapa de aquecimento e agitação, com a temperatura e agitação controladas (refluxo – 75°C) por 24h. A formação do produto é confirmada por cromatografia de camada delgada. Em caso de formação precipitado, uma filtração a vácuo é realizada seguida de cromatografia flash para purificação e isolamento do produto. Na ausência de precipitado, a cromatografia flash é realizada diretamente com o meio reacional utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila.

4.1.2. Protocolo da reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura

Em um balão adiciona-se 1 mmol do ácido 3,4,5-trimetoxibenzenoborônico, 1,5 mmol de carbonato de potássio, 0,005 mmol de tetrakis(trifenilfosfina)paládio, 0,5 mmol do bromobenzaldeído equivalente e um agitador magnético. O balão é então selado seguido da troca de atmosfera por N₂. Posteriormente, adiciona-se 2 mL de tetrahidrofurano (seco). A reação é aquecida a 100°C, sob agitação por 4 horas. Após o tempo de reação, a reação é resfriada e adiciona-se gotas de ácido clorídrico (1M) até não formar mais bolhas. O solvente é removido em rotavaporador seguido de purificação utilizando cromatografia flash utilizando como fase móvel heptano:acetato de etila.

4.1.3. Protocolo da reação de Buchwald-Hartwig

Um tubo reacional foi preparado para reação por 1h a 100°C no forno. Posteriormente o tubo é selado seguido da troca de atmosfera por N₂. Adiciona-se ao tubo 3,4,5-trimetoxianilina (1 eq.), terc-butoxido de potássio (1.4 eq.), 4-iodobenzaldeído (1 eq.), trietilamina (0.15 eq.), acetato de paládio (0.05 eq.), xphos (0.1 eq.) e um agitador magnético. Uma segunda troca de atmosfera por N₂ é realizada. Com o fluxo de nitrogênio conectado no tubo adiciona-se tert-butanol (6 mL). A reação é aquecida a 90°C, sob agitação por 24 horas. Após o tempo de reação, a reação é filtrada com uso de celite e lavada com acetato de etila. O solvente é removido em rotavaporador seguido de purificação utilizando cromatografia flash utilizando como fase móvel heptano:acetato de etila.

4.1.4. Protocolo da síntese das acridinonas

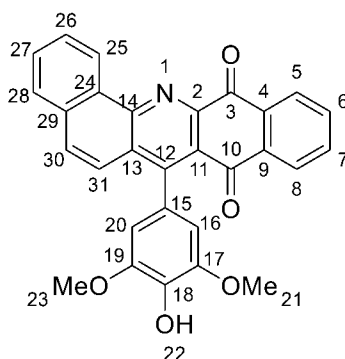
Em um tubo reacional adiciona-se 1 mmol da 1,3-ciclohexanodiona, 1 mmol do aldeído (intermediário sintetizado previamente), 2 mmol da α -naftilamina, 3 mL de solvente (etanol) e um agitador magnético. A reação é levada a uma chapa de aquecimento e agitação, com a temperatura e agitação controladas (refluxo – 75°C) por 24h. A formação do produto é confirmada por cromatografia de camada delgada. Em caso de formação precipitado, uma filtração a vácuo é realizada seguida de cromatografia flash para purificação e isolamento do produto. Na ausência de precipitado, a cromatografia flash é realizada diretamente com o meio reacional utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila.

4.1.5. Caracterização dos produtos

Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C), além de análises 2D (HSQC), realizadas em um espectrômetro da marca Bruker de 500MHz (500 MHz para ^1H e 126 MHz para ^{13}C) e 400MHz (400 MHz para ^1H e 101 MHz para ^{13}C), modelo Ultrashield Plus da Central Analítica Multiusuário- PPGQ – UFRRJ e da Drug Discovery Unit da Universidade de Dundee. O dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) foi utilizado como solvente e tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm). O equipamento de LC-MS utilizado para confirmação dos intermediários é da marca Shimadzu 2020, com coluna Hyprsil Gold (1.9 μm 50x2.1mm), utilizando método ácido (água-acetonitrila 5% a 95% - gradiente).

As atribuições dos carbonos e hidrogênios obtidos no espectro de RMN de carbono e hidrogênio, assim como o rendimento, são descritos a seguir.

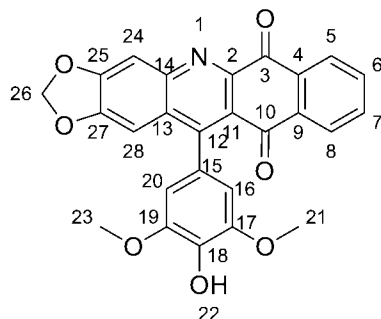
- **Composto 38** – 7-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)dibenzo[*b,h*]acridino-8,13-dione. Sólido obtido com 3% de rendimento.



^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.47-9.46 (H25 – d, 1H), 9.17-9.15 (H31 – d, 1H), 8.67 (H22 – s, 1H), 8.08-8.07-8.05-8.04-8.00-7.98-7.97-7.92-7.91-7.87 (H5, H6, H7, H26, H28, H30 – m, 8H), 7.73-7.71-7.70 (H27 – t, 1H, J = 7.70 Hz), 7.50-7.48 (H8 – d, 1H, J = 7.49 Hz), 6.61 (H16 e H20 – s, 2H), 3.74 (H21 e H23 – s, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 179.9 (C10 – C; sp 2), 179.7 (C3 – C; sp 2), 152.4 (C2 – C; sp 2), 150.9 (C14 – C; sp 2), 148.5 (C17 e C19 – C; sp 2), 147.4 (C15 – C; sp 2), 137.8 (C18 – C; sp 2), 136.0 (C7 – CH; sp 2), 135.7 (C29 – C; sp 2), 134.6 (C9 – C; sp 2), 132.5 (C4 – C; sp 2), 131.4 (C6 – CH; sp 2), 130.8 (C24 – C; sp 2), 130.5 (C26 – CH; sp 2), 129.1 (C27 – CH; sp 2), 128.5 (C30 – CH; sp 2), 128.5 (C28 – CH; sp 2), 128.3 (C8 – CH; sp 2), 127.2 (C12 – C; sp 2), 127.1 (C5 – CH; sp 2), 125.9 (C13 – C; sp 2), 125.7 (C31 – CH; sp 2), 124.5 (C11 – C; sp 2), 124.1 (C25 – CH; sp 2), 106.5 (C16 e C20 – CH; sp 2), 56.5 (C21 e C23 – CH $_3$; sp 3).

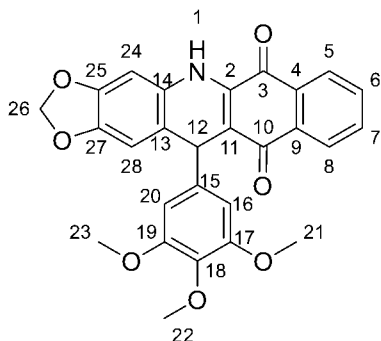
- **Composto 39** – 12-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)benzo[*b*][1,3]dioxolo[4,5-*i*]acridino-6,11-dione. Sólido obtido com 5% de rendimento.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.82-8.80 (H5 – d, 1H, *J* = 8.81 Hz), 8.71 (H22 – s, 1H), 8.01-8.00 (H8 – d, 1H, *J* = 8.01 Hz), 7.90-7.89-7.87 (H7 – t, 1H, *J* = 7.89 Hz), 7.66-7.65-7.63 (H6 – t, 1H, *J* = 7.65 Hz), 7.50 (H28 – s, 1H), 6.72 (H24 – s, 1H), 6.49 (H16 e H20 – s, 2H), 6.24 (H26 – s, 2H), 3.71 (H21 e H23 – s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 179.9 (C10 – C; sp²), 179.8 (C3 – C; sp²), 153.6 (C27 – C; sp²), 151.5 (C25 – C; sp²), 149.9 (C2 – C; sp²), 149.3 (C15 – C; sp²), 148.5 (C17 e C19 – C; sp²), 148.2 (C14 – C; sp²), 137.6 (C18 – C; sp²), 135.9 (C6 – CH; sp²), 135.4 (C4 – C; sp²), 132.0 (C9 – C; sp²), 131.1 (C7 – CH; sp²), 128.5 (C5 – CH; sp²), 127.5 (C12 – C; sp²), 126.5 (C8 – CH; sp²), 125.3 (C13 – C; sp²), 122.2 (C11 – C; sp²), 106.0 (C16 e C20 – CH; sp²), 105.8 (C24 – CH; sp²), 103.4 (C26 – CH₂; sp³), 102.5 (C28 – CH; sp²), 56.5 (C21 e C23 – CH₃; sp³).

- **Composto 40** – 12-(3,4,5-trimetoxifenil)-5,12-dihidrobenzo[*b*][1,3]dioxolo[4,5-*i*]acridino-6,11-dione. Sólido obtido com 3% de rendimento.

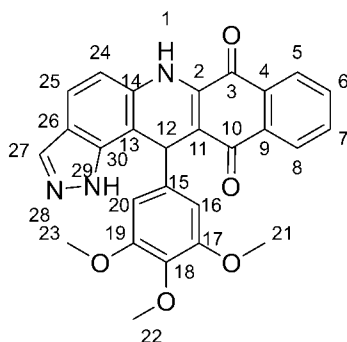


¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.92 (H1 – s, 1H), 8.05-8.04-8.03 (H5 – dd, 1H, *J* = 8.04 Hz), 7.92-7.90 (H8 – dd, 1H, *J* = 7.91 Hz), 7.83-7.82-7.80 (H7 – dt, 1H, *J* = 7.82 Hz), 7.77-

7.75-7.74 (H12 – dt, 1H, $J = 7.75$ Hz), 7.07 (H28 – s, 1H), 6.91 (H24 – s, 1H), 6.56 (H16 e H20 – s, 2H), 5.98 (H26 – s, 1H), 5.92 (H26 – s, 1H), 5.29 (H12 – s, 1H), 3.67 (H21 e H23 – s, 6H), 3.55 (H22 – s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.1 (C10 – C; sp²), 180.8 (C3 – C; sp²), 153.2 (C17 e C19 – C; sp²), 146.9 (C25 – C; sp²), 144.5 (C27 – C; sp²), 143.9 (C4 – C; sp²), 140.1 (C14 – C; sp²), 135.2 (C6 – CH; sp²), 133.0 (C18 – C; sp²), 133.0 (C7 – CH; sp²), 130.8 (C15 – C; sp²), 129.7 (C9 – C; sp²), 126.2 (C5 – CH; sp²), 125.8 (C8 – CH; sp²), 111.9 (C4 – C; sp²), 109.1 (C24 – CH; sp²), 105.8 (C13 – C; sp²), 104.9 (C16 e C20 – CH; sp²), 101.6 (C26 – CH₂; sp³), 98.7 (C28 – CH; sp²), 60.3 (C12 – CH₃; sp³), 56.2 (C21 e C23 – CH₃; sp³), 41.0 (C12 – CH; sp³).

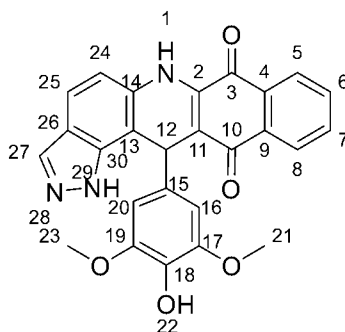
- **Composto 41** – 13-(3,4,5-trimetoxifenil)-6,13-dihidro-1*H*-benzo[*i*]pirazolo[3,4-*a*]acridino-7,12-dione. Sólido obtido com 55% de rendimento.



^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.19 (H29 – s, 1H), 10.47 (H1 – s, 1H), 8.47-8.46 (H27 – d, 1H, $J = 8.46$ Hz), 8.04-8.03-8.01 (H24 e H5 – m, 2H), 7.93-7.92-7.90 (H7 – t, 1H, $J = 7.92$ Hz), 7.71-7.70-7.68 (H6 e H8 – m, 2H), 7.43-7.41 (H24 – d, 1H, $J = 7.42$ Hz), 6.75 (H16 e H20 – s, 2H), 5.72 (H12 – s, 1H), 3.64 (H21 e H23 – s, 6H), 3.52 (H22 – s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.1 (C10 – C; sp²), 175.4 (C3 – C; sp²), 152.9 (C17 e C19 – C; sp²), 149.2 (C2 – C; sp²), 145.6 (C14 – C; sp²), 141.5 (C18 – C; sp²), 136.6 (C15 – C; sp²), 134.9 (C27 – CH; sp²), 134.7 (C7 – CH; sp²), 133.4 (C30 – C; sp²), 131.4 (C6 – CH; sp²), 131.1 (C9 – C; sp²), 130.7 (C4 – C; sp²), 128.7 (C8 – CH; sp²), 124.4 (C5 – CH; sp²), 121.4 (C26 – C; sp²), 120.3 (C25 – CH; sp²), 113.1 (C24 – CH; sp²), 111.0 (C13 – C; sp²), 105.8 (C16 e C20 – CH; sp²), 60.2 (C22 – CH₃; sp³), 56.2 (C21 e C23 – CH₃; sp³), 36.4 (C12 – CH; sp³).

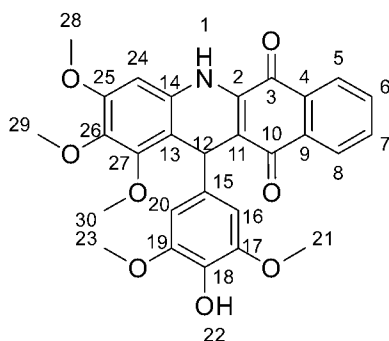
- **Composto 42** – 13-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6,13-dihidro-1*H*-benzo[*i*]pirazolo[3,4-*a*]acridino-7,12-dione. Sólido obtido com 82% de rendimento.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.15 (H29 – s, 1H), 10.43 (H1 – s, 1H), 8.46-8.45 46 (H27 – d, 1H, *J* = 8.46 Hz), 8.15 (H22 – s, 1H), 8.03-8.02-8.01 (H24 e H5 – m, 2H), 7.92-7.91-7.89 (H7 – t, 1H, *J* = 7.91 Hz), 7.70-7.69-7.68-7.66 (H6 e H8 – m, 2H), 7.42-7.40 (H24 – d, 1H, *J* = 7.41 Hz), 6.70 (H16 e H20 – s, 2H), 5.68 (H12 – s, 1H), 3.62 (H21 e H23 – s, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 180.2 (C10 – C; sp²), 175.4 (C3 – C; sp²), 148.0 (C17 e C19 – C; sp²), 145.4 (C14 – C; sp²), 136.1 (C15 – C; sp²), 134.9 (C18 – C; sp²), 134.9 (C27 – CH; sp²), 134.6 (C7 – CH; sp²), 133.3 (C30 – C; sp²), 131.4 (C6 – CH; sp²), 131.10 (C9 – C; sp²), 130.8 (C4 – C; sp²), 128.7 (C8 – CH; sp²), 124.3 (C5 – CH; sp²), 121.3 (C26 – C; sp²), 120.1 (C25 – CH; sp²), 113.0 (C24 – CH; sp²), 111.4 (C13 – C; sp²), 106.1 (C16 e C20 – CH; sp²), 56.5 (C21 e C23 – CH₃; sp³), 36.0 (C12 – CH; sp³).

- **Composto 44** – 12-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1,2,3-trimetoxi-5,12-dihidrobenczo[*b*]acridino-6,11-dione. Sólido obtido com 85% de rendimento.

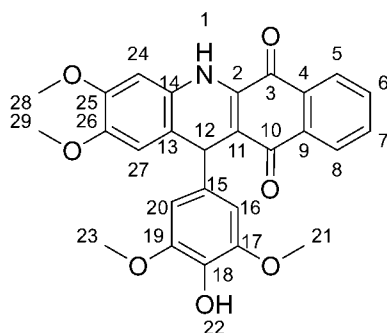


¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.23 (H1 – s, 1H), 8.33-8.31 (H5 – d, 1H, *J* = 8,32 Hz), 8.15 (H22 – s, 1H), 7.99-7.97 (H8 – d, 1H, *J* = 7,98 Hz), 7.90-7.88-7.87 (H7 – t, 1H, *J* = 7,98 Hz), 7.68-7.67-7.65 (H6 – t, 1H, *J* = 7,67 Hz), 7.04 (H24 – s, 1H), 6.43 (H16 e H20 – s, 2H),

5.38 (H12 – s, 1H), 3.86 (H28 – s, 3H), 3.71 (H30 – s, 3H), 3.62 (H21 e H23 – s, 6H), 3.58 (H29 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 180.3 (C10 – C; sp²), 175.1 (C3 – C; sp²), 153.0 (C25 – C; sp²), 150.9 (C26 – C; sp²), 148.0 (C17 e C19 – C; sp²), 145.3 (C27 – C; sp²), 139.4 (C2 – C; sp²), 137.3 (C12 – C; sp²), 134.8 (C6 – CH; sp²), 134.7 (C15 – C; sp²), 132.0 (C18 – C; sp²), 131.3 (C7 – CH; sp²), 131.0 (C4 – C; sp²), 130.7 (C9 – C; sp²), 128.6 (C5 – CH; sp²), 124.0 (C8 – CH; sp²), 112.2 (C11 – C; sp²), 111.4 (C13 – C; sp²), 106.1 (C16 e C20 – CH; sp²), 97.4 (C24 – CH; sp²), 60.9 (C30 – CH₃; sp³), 60.8 (C28 – CH₃; sp³), 56.5 (C21 e C23 – CH₃; sp³), 56.2 (C29 – CH₃; sp³), 34.5 (C12 – CH; sp³).

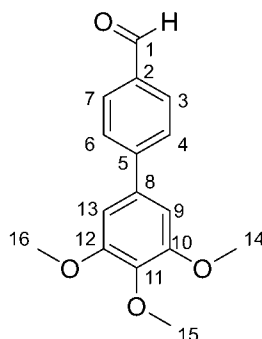
- **Composto 46** – 12-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2,3-dimetoxi-5,12-dihidrobenzo[*b*]acridino-6,11-dione. Sólido obtido com 3% de rendimento.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.86 (H1 – s, 1H), 8.20 (H22 – s, 1H), 8.05-8.04 (H5 – d, 1H, *J* = 8.05 Hz), 7.94-7.92 (H8 – d, 1H, *J* = 7.93 Hz), 7.84-7.83-7.82-7.81-7.80 (H7 – dt, 1H, *J* = 7.82 Hz), 7.77-7.76-7.75-7.74-7.73 (H6 – dt, 1H, *J* = 7.75 Hz), 7.17 (H24 – s, 1H), 6.89 (H27 – s, 1H), 6.51 (H16 e H20 – s, 2H), 5.29 (H12 – s, 1H), 3.74 (H29 – s, 3H), 3.69 (H28 – s, 3H), 3.66 (H21 e H23 – s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 181.0 (C10 – C; sp²), 181.0 (C3 – C; sp²), 148.4 (C25 – C; sp²), 148.2 (C17 e C19 – C; sp²), 146.4 (C26 – C; sp²), 140.0 (C2 – C; sp²), 138.4 (C14 – C; sp²), 135.2 (C7 – CH; sp²), 134.6 (C15 – C; sp²), 133.1 (C18 – C; sp²), 132.9 (C6 – CH; sp²), 130.8 (C9 – C; sp²), 128.9 (C4 – C; sp²), 126.2 (C8 – CH; sp²), 125.8 (C5 – CH; sp²), 116.9 (C13 – C; sp²), 112.7 (C27 – CH; sp²), 112.4 (C11 – C; sp²), 105.3 (C16 e C20 – CH; sp²), 101.9 (C24 – CH; sp²), 56.5 (C21 e C23 – CH₃; sp³), 56.2 (C28 – CH₃; sp³), 55.8 (C29 – CH₃; sp³).

- **Composto 47 intermediário** – 3',4',5'-trimetoxi-[1,1'-bifenil]-4-carbaldeído. Sólido obtido com 90% de rendimento.

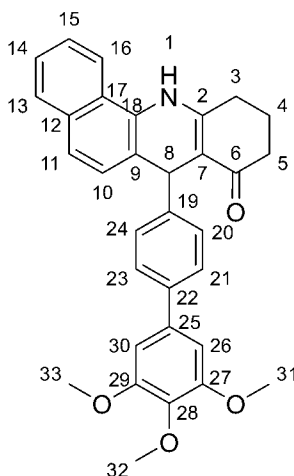


¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.06 (H1 – s, 1H), 8.00-7.98-7.96-7.94 (H3, H4, H6 e H7 – m, 4H), 7.04 (H9 e H13 – s, 2H), 3.89 (H14 e H16 – s, 6H), 3.72 (H15 – s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.2 (C1 – C; sp²), 153.8 (C10 e C12 – C; sp²), 146.4 (C5 – C; sp²), 138.4 (C11 – C; sp²), 135.4 (C2 – C; sp²), 134.9 (C8 – C; sp²), 130.4 (C3 e C7 – CH; sp²), 127.9 (C4 e C6 – CH; sp²), 105.1 (C9 e C13 – CH; sp²), 60.5 (C15 – CH₃; sp³), 56.5 (C14 e C16 – CH₃; sp³).

LCMS: tempo de retenção = 1.64 min; [M+1] = 273.

- **Composto 47 final** – 7-(3',4',5'-trimetoxi-[1,1'-bifenil]-4-il)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-one. Sólido obtido com 6% de rendimento.

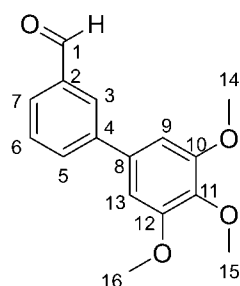


¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.37 (H1 – s, 1H), 8.50-8.48 (H16 – d, 1H, *J* = 8.49 Hz), 7.84-7.83 (H11 – d, 1H, *J* = 7.83 Hz), 7.60-7.59-7.57 (H14 – t, 1H, *J* = 7.59 Hz), 7.52-7.50-7.49-7.48 (H13 e H15 – m, 2H), 7.46-7.44 (H20 e H24 – d, 2H), 7.35-7.33 (H10 – d, 1H, *J* = 7.34 Hz), 7.30-7.28 (H21 e H23 – d, 2H, *J* = 7.29 Hz), 6.78 (H26 e H30 – s, 2H), 5.28 (H8 – s,

1H), 3.79 (H31 e H33 – s, 6H), 3.65 (H32 – s, 3H), 2.96-2.93 (H3 – m, 1H), 2.77-2.71 (H3 – m, 1H), 2.32-2.27-2.23 (H5 – m, 2H), 2.01 (H4 – m, 1H), 1.92 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.4 (C6 – C; sp²), 154.2 (C2 – C; sp²), 153.5 (C27 e C29 – C; sp²), 148.0 (C19 – C; sp²), 138.6 (C22 – C; sp²), 137.3 (C28 – C; sp²), 136.6 (C25 – C; sp²), 132.8 (C18 – C; sp²), 131.1 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.3 (C15 – CH; sp²), 127.9 (C20 e C24 – CH; sp²), 127.2 (C21 e C23 – CH; sp²), 126.2 (C13 – CH; sp²), 126.1 (C11 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.7 (C16 – CH; sp²), 121.3 (C9 – C; sp²), 108.8 (C7 – C; sp²), 104.5 (C26 e C30 – CH; sp²), 60.4 (C32 – CH₃; sp³), 56.3 (C31 e C33 – CH₃; sp³), 40.2 (C8 – CH; sp³), 37.2 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

- **Composto 48 intermediário** – 3',4',5'-trimetoxi-[1,1'-bifenil]-3-carbaldeído. Sólido obtido com 51% de rendimento.

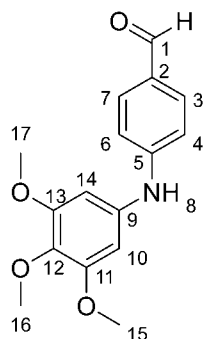


¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.11 (H1 – s, 1H), 8.23-8.22 (H3 – t, 1H, *J* = 8.23 Hz), 8.07-8.06-8.05-8.04 (H7 – td, 1H, *J* = 8.06 Hz), 7.90-7.88 (H5 – dt, 1H, *J* = 7.89 Hz), 7.71-7.69-7.67 (H6 – t, 1H, *J* = 7.69 Hz), 7.01 (H9 e H13 – s, 2H), 3.89 (H14 e H16 – s, 6H), 3.71 (H15 – s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 193.7 (C1 – C; sp²), 153.8 (C10 e C12 – C; sp²), 141.6 (C4 – C; sp²), 138.0 (C2 – C; sp²), 137.2 (C11 – C; sp²), 135.1 (C8 – C; sp²), 133.3 (C7 – CH; sp²), 130.1 (C6 – CH; sp²), 128.7 (C3 – CH; sp²), 128.2 (C5 – CH; sp²), 104.8 (C9 e C13 – CH; sp³), 60.5 (C15 – CH₃; sp³), 56.5 (C14 e C16 – CH₃; sp³).

LCMS: tempo de retenção = 1.64 min; [M+1] = 273.

- **Composto 49 intermediário** – 4-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)benzaldeído. Sólido obtido com 33% de rendimento.

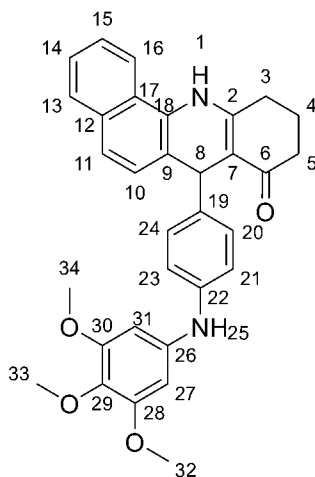


¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.72 (H1 – s, 1H), 8.86 (H8 – s, 1H), 7.73-7.71 (H4 e H6 – d, 2H, *J* = 7.72 Hz), 7.11-7.09 (H3 e H7 – d, 2H, *J* = 7.10 Hz), 6.51 (H10 e H14 – s, 2H), 3.77 (H15 e H17 – s, 6H), 3.66 (H16 – s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 190.5 (C1 – C; sp²), 153.8 (C11 e C13 – C; sp²), 150.9 (C5 – C; sp²), 137.0 (C9 – C; sp²), 133.9 (C12 – C; sp²), 132.3 (C4 e C6 – CH; sp²), 127.6 (C2 – C; sp²), 114.3 (C3 e C7 – CH; sp²), 99.0 (C10 e C14 – CH; sp²), 60.6 (C16 – CH₃; sp³), 56.3 (C15 e C17 – CH₃; sp³).

LCMS: tempo de retenção = 1.54 min; [M+1] = 288.

- **Composto 49 final** – 7-(4-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)fenil)-7,10,11,12-tetrahidrobenzo[*c*]acridin-8(9*H*)-one. Sólido obtido com 30% de rendimento.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.31 (H1 – s, 1H), 8.47-8.46 (H16 – d, 1H, *J* = 8.47 Hz), 7.92 (H25 – s; 1H), 7.84-7.82 (H11 – d, 1H, *J* = 7.83 Hz), 7.58-7.57-7.56 (H14 – t, 1H, *J* = 7.57 Hz), 7.51-7.49-7.47 (H13 e H15 – m, 2H), 7.32-7.31 (H10 – d, 1H, *J* = 7.31 Hz), 7.07-7.05 (H20 e H24 – d, 2H, *J* = 7.06 Hz), 6.90-6.88 (H21 e H23 – d, 2H, *J* = 6.89 Hz), 6.27 (H27 e

H31 – s, 2H), 5.15 (H8 – s, 1H), 3.67 (H32 e H34 – s, 6H), 3.56 (H33 – s, 3H), 2.94-2.90 (H3 – m, 1H), 2.73-2.70-2.67 (H3 – m, 1H), 2.30-2.26-2.23 (H5 – m, 2H), 2.02-1.99 (H4 – m, 1H), 1.92-1.90 (H4 – m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 194.6 (C6 – C; sp²), 154.0 (C2 – C; sp²), 153.7 (C28 e C30 – C; sp²), 141.9 (C22 – C; sp²), 140.2 (C19 – C; sp²), 140.0 (C26 – C; sp²), 132.6 (C18 – C; sp²), 131.2 (C29 – C; sp²), 130.9 (C12 – C; sp²), 128.6 (C14 – CH; sp²), 128.4 (C15 – CH; sp²), 128.3 (C20 e C24 – CH; sp²), 126.1 (C13 – CH; sp²), 126.0 (C11 – CH; sp²), 123.1 (C10 – CH; sp²), 122.6 (C17 – C; sp²), 121.8 (C9 – C; sp²), 121.6 (C16 – CH; sp²), 116.6 (C21 e C23 – CH; sp²), 109.1 (C7 – C; sp²), 94.7 (C27 e C31 – CH; sp²), 60.5 (C33 – CH₃; sp³), 56.0 (C32 e C34 – CH₃; sp³), 37.3 (C5 – CH₂; sp³), 27.4 (C3 – CH₂; sp³), 21.5 (C4 – CH₂; sp³).

4.2. Ancoramento molecular

As moléculas foram desenhadas, utilizando o programa *ChemDraw*® da *PerkinElmer Informatics, Inc.*, versão 22.0.0.22. As estruturas tridimensionais (3D) dos compostos foram geradas no programa *Vega ZZ*, versão 3.2.3 e minimizadas utilizando o campo de força AM1BCC. As cargas parciais foram calculadas pelo método Gasteiger. Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima, foi utilizada a enzima com modelo disponível no Protein Data Bank (PDB), código 5JCB e resolução de 2,30 Å (ZHAO et al., 2017).

O programa utilizado para realizar o estudo de *docking* foi o GOLD, 2024.1.0 (Build 401958), da CCDC. O sítio de interação utilizado foi o mesmo ao qual ao NV4 estava co-cristalizada com um raio de 6Å. A validação da proteína foi realizada através de redocking do NV4. A proteína foi validada (RMSD médio de 10 rodadas de 0,852), tendo a função de pontuação CHEMPLP como a melhor função de pontuação, além de ter apresentado uma boa sobreposição com o NV4 co-cristalizado. Desta forma, a função CHEMPLP foi escolhida para os procedimentos subsequentes de ancoramento molecular em Tubulina. No programa GOLD as pontuações obtidas são apresentadas como valores adimensionais, os quais mensuram a aptidão do ligante em interagir com o centro da proteína, de modo que, maiores valores de pontuação representam as melhores conformações e orientações do ligante no biorreceptor.

As imagens geradas foram obtidas através do software Discovery Studio Visualizer, versão 24.1.0.23298, da Dassault Systèmes Biovia Corp, ou do software PyMOL Molecular Graphics System, versão 4.60 (build 31.0.101.5333) da Schrödinger Inc, LLC.

5. CONCLUSÃO

A reação multicomponente de Hantzsch é apresentada como uma metodologia rápida e versátil para a obtenção de heterociclo variados. A fim de demonstrar a versatilidade da reação de Hantzsch dez acridinodionas e três acridinonas foram planejadas, sendo obtidas utilizando a metodologia modificada de Hantzsch.

As dez acridinodionas foram planejadas contendo a lausona a fim de explorar a utilização desse composto como dicarbonilado na reação de Hantzsch. Cinco das acridinodionas planejadas foram sintetizadas de forma eficaz (**40**, **41**, **42**, **44** e **46**) sendo que somente uma (**40**) possui relato prévio na literatura. Outras duas acridinodionas foram sintetizadas com o anel central oxidado (**38** e **39**), sendo inéditas na literatura, entretanto, uma vez que a oxidação das 1,4-diidropiridinas pode ocorrer de forma natural e o produto oxidado é um metabólito conhecido, a síntese dos produtos oxidado é considerada uma nova vertente para o trabalho. As três acridinodionas que não tiveram sua estrutura confirmada, possuem a indicação da presença do produto desejado, sendo necessário apenas otimizações na purificação. Contudo, é possível concluir que a utilização da lausona mostrou a versatilidade da reação de Hantzsch, abrindo novas vertentes para futuros trabalhos.

Três acridinonas foram planejadas, sendo necessário a síntese de um aldeído intermediário através de reações de acoplamento (Buchwald-Hartwig e Suzuki-Miyaura). A utilização da reação de Suzuki-Miyaura gerou a obtenção de 2 aldeídos intermediários de forma eficaz e a reação de Buchwald-Hartwig gerou a obtenção de 1 aldeído intermediário de forma eficaz, sendo esse aldeído inédito na literatura. A reação de Hantzsch utilizando esses aldeídos foi realizada, sendo apenas dois produtos obtidos de forma pura (**47** e **49**), os dois inéditos na literatura. O produto **48** tem indicações da formação do produto, porém a purificação não foi satisfatória. As sínteses se mostraram efetivas, gerando produtos inéditos, e demonstrando como aldeídos diversos podem ser utilizados na reação multicomponente de Hantzsch.

O ancoramento molecular foi realizado a fim de demonstrar a interação entre as moléculas sintetizadas e a proteína Tubulina. Os resultados demonstram os principais resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações, demonstram também que as acridinonas não tem interações no bolsão hidrofóbico desejado. Contudo, diversas moléculas possuem *scores* considerados promissores, abrindo perspectivas para ensaios *in vitro* que comprovem a atividade inibitória da proteína Tubulina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO-ELIZARI, E. et al. Unlocking the potential of 1,4-naphthoquinones: A comprehensive review of their anticancer properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 268, p. 116249, mar. 2024.

ARNST, K. E. et al. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 4, p. 1398–1426, 2019.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 790–803, 1 out. 2010.

FARHANG, M. et al. A retrospective-prospective review of Suzuki–Miyaura reaction: From cross-coupling reaction to pharmaceutical industry applications. **Polyhedron**, v. 227, p. 116124, nov. 2022.

GRAEBIN, C. S. et al. Multicomponent Reactions for the Synthesis of Bioactive Compounds: A Review. **Current Organic Synthesis**, v. 16, n. 6, p. 855–899, 26 nov. 2019.

GUO, H. et al. An overview of tubulin modulators deposited in protein data bank. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 7, p. 927–937, 7 jul. 2019.

HANTZSCH, A. Ueber die Synthese pyridinartiger Verbindungen aus Acetessigäther und Aldehydammoniak. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 215, n. 1, p. 1–82, 24 jan. 1882.

HERAVI, M. M. et al. Buchwald–Hartwig reaction: an update. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 152, n. 10, p. 1127–1171, 26 out. 2021.

JACOBY, S. A. et al. Suzuki-Miyaura and Buchwald-Hartwig Cross-Coupling Reactions Utilizing a Set of Complementary Imidazopyridine Monophosphine Ligands. **Chemistry Select**, v. 9, n. 10, 11 mar. 2024.

LU, Y. et al. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 11, p. 2943–2971, 20 nov. 2012.

MAGALHAES, L. G. et al. Discovery of a series of acridinones as mechanism-based tubulin assembly inhibitors with anticancer activity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–17, 2016.

MAGALHÃES, L. G. Planejamento e caracterização de moduladores da proteína Tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer. São Carlos: **Universidade de São Paulo**, 2 set. 2019.

MAKRIYANNIS, A.; BIEGEL, D. Drug Discovery Strategies and Methods. [s.l.] **CRC Press**, 2003.

NAIR, A. et al. Lawsone Unleashed: A Comprehensive Review on Chemistry, Biosynthesis, and Therapeutic Potentials. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 18, p. 3295–3313, jul. 2024.

NEMTSOVA, E. R. et al. Combretastatins A-4 and A-1 and their derivatives: Review. **Russian Journal of Biotherapy**, v. 23, n. 1, p. 10–18, 22 mar. 2024.

PÉREZ-PEÑA, H. et al. Computational Approaches to the Rational Design of Tubulin-Targeting Agents. **Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 285, 2 fev. 2023.

SAPRA, S. et al. Colchicine and its various physicochemical and biological aspects. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 2, p. 531–547, 13 fev. 2013.

SCHNIDER, P. (ED.). The Medicinal Chemist's Guide to Solving ADMET Challenges. Cambridge: **Royal Society of Chemistry**, 2021.

SEN, A.; YAMADA, Y. M. A. Latest Developments on Palladium- and Nickel-Catalyzed Cross-Couplings Using Aryl Chlorides: Suzuki–Miyaura and Buchwald–Hartwig Reactions. **Synthesis**, 13 jun. 2024.

SHUAI, W. et al. Recent Progress on Tubulin Inhibitors with Dual Targeting Capabilities for Cancer Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 12, p. 7963–7990, 24 jun. 2021.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273–343.

STEINMETZ, M. O.; PROTA, A. E. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 10, p. 776–792, 2018.

TAKALE, B. S.; KONG, F.-Y.; THAKORE, R. R. Recent Applications of Pd-Catalyzed Suzuki–Miyaura and Buchwald–Hartwig Couplings in Pharmaceutical Process Chemistry. **Organics**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 18 jan. 2022.

TRATRAT, C.; GIORGI-RENAULT, S.; HUSSON, H.-P. A Multicomponent Reaction for the One-Pot Synthesis of 4-Aza-2,3-didehydropodophyllotoxin and Derivatives. **Organic Letters**, v. 4, n. 19, p. 3187–3189, 1 set. 2002.

WADE, R. H. On and Around Microtubules: An Overview. **Molecular Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 177–191, 30 out. 2009.

WERMUTH, C. G. The practice of Medicinal Chemistry. 3a ed. [s.l.] **Academic Press**, 2008.

WHO. Cancer. 2024a. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_3. Acesso em: setembro de 2024.

WU, C. et al. Discovery and mechanistic insights into thieno[3,2-d]pyrimidine and heterocyclic fused pyrimidines inhibitors targeting tubulin for cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 276, p. 116649, out. 2024.

YANG, X.; ZHANG, C.; WU, L. L-Proline catalyzed three-component synthesis of par-naphthoquinone–4-aza-podophyllotoxin hybrids as potent antitumor agents. **RSC Advances**, v. 5, n. 24, p. 18945–18951, 2015.

ZHAO, W. et al. Structural Insights into the Inhibition of Tubulin by the Antitumor Agent 4β-(1,2,4-triazol-3-ylthio)-4-deoxypodophyllotoxin. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 746–752, 17 mar. 2017.

2. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho visou demonstrar a versatilidade das reações multicomponentes, principalmente da reação multicomponente de Hantzsch e de Biginelli, na síntese de heterociclos com propriedades bioativas.

O capítulo I apresentou a síntese de quinze moléculas através da metodologia modificada da reação multicomponente de Hantzsch seguida de uma avaliação *in vitro* e *in silico* das moléculas frente a alvos relacionados a doença de Alzheimer (colinesterases a atividade antioxidante). As moléculas, em sua maioria, demonstrar ser inibidoras de acetil e butirilcolinesterase, sendo possível demonstrar as principais interações que ocorrem entre as moléculas e as proteínas. Quando avaliadas a atividade antioxidante, apenas duas acridinonas apresentaram uma atividade menor do que o padrão, e, quando avaliadas a permeabilidade das moléculas em barreira hematoencefálica, 8 acridinonas demonstraram uma boa permeabilidade. O conjunto de resultados abre como perspectiva a avaliação das moléculas mais promissoras em ensaios de neurotoxicidade e neuro proteção.

O capítulo II apresentou a síntese de onze quinazolinonas e quatro xantenodionas através da reação multicomponente de Biginelli. As quinazolinonas foram avaliadas quanto a seu potencial citotóxico frente a linhagens celulares de câncer e quanto a seu potencial tripanocida. Os resultados dos ensaios indicam uma atividade tripanocida promissora para as moléculas que contém o grupo 4-bromofenil, enquanto a atividade citotóxica não foi satisfatória, tendo como perspectivas os ensaios para as moléculas ainda não avaliadas.

O terceiro capítulo apresentou a síntese de sete acridinodionas e duas acridinonas, ampliando o escopo do uso de reações de Hantzsch para síntese de compostos inibidores de Tubulina, sendo oito moléculas inéditas na literatura. A avaliação *in silico* das moléculas permitiu mapear as interações que ocorrem quando se utiliza a lausona como reagente da reação, além de demonstrar a modificação de posicionamento no sítio da Colchicina ao aumentar o tamanho da acridinonas. Entretanto, foi possível mapear diversas moléculas promissoras, tendo como uma perspectiva a avaliação *in vitro* das moléculas.

Contudo, o conjunto de resultados mostram-se promissores do ponto de vista de química exploratória, tendo trinta e nove moléculas sintetizadas através de reações multicomponentes. O uso de reações multicomponentes se mostrou um método rápido, efetivo e versátil como estratégia de síntese para novas moléculas bioativas, colaborando para trabalhos futuros.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABDELLA, A. M. et al. Synthesis of heterocyclic compounds via Michael and Hantzsch reactions. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1476–1523, 10 abr. 2020.

AFSHARI, M.; VARMA, R. S.; SAGHANEZHAD, S. J. Catalytic Applications of Heteropoly acid-Supported Nanomaterials in Synthetic Transformations and Environmental Remediation. **Comments on Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 129–176, 4 mar. 2023.

ANTONYRAJ, C. A.; KANNAN, S. Hantzsch pyridine synthesis using hydrotalcites or hydrotalcite-like materials as solid base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 338, n. 1–2, p. 121–129, abr. 2008.

BAGHBANIAN, S. M. et al. One-step, synthesis of Hantzsch esters and polyhydroquinoline derivatives using new organocatalyst. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 5, p. 563–567, maio 2010.

BIGGS-HOUCK, J. E.; YOUNAI, A.; SHAW, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 371–382, jun. 2010.

BUSKES, M. J. et al. Accelerating Drug Discovery: Synthesis of Complex Chemotypes via Multicomponent Reactions. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 4, p. 376–385, 13 abr. 2023.

CAROSATI, E. et al. 1,4-Dihydropyridine Scaffold in Medicinal Chemistry, The Story So Far And Perspectives (Part 2): Action in Other Targets and Antitargets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 25, p. 4306–4323, 1 set. 2012.

CARVALHO, M.; AMARANTE, G.; DE CASTRO, P. Recent Synthetic Developments of Asymmetric Multicomponent Transformations: Strecker, Mannich, Passerini and Ugi Reactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2023.

CHANDRAVARKAR, A.; ANEEJA, T.; ANILKUMAR, G. Advances in Biginelli reaction: A comprehensive review. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 5–28, 23 jan. 2024.

CHOPDA, L. V.; DAVE, P. N. Recent Advances in Homogeneous and Heterogeneous Catalyst in Biginelli Reaction from 2015-19: A Concise Review. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 19, p. 5552–5572, 22 maio 2020.

CIOC, R. C.; RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. Multicomponent reactions: advanced tools for sustainable organic synthesis. **Green Chem.**, v. 16, n. 6, p. 2958–2975, 2014.

CORES, Á. et al. Multicomponent Reactions for the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 8, p. 1009, 17 ago. 2022.

DE SOUZA, R. O. M. A. et al. The Three-Component Biginelli Reaction: A Combined Experimental and Theoretical Mechanistic Investigation. **Chemistry – A European Journal**, v. 15, n. 38, p. 9799–9804, 28 set. 2009.

DÖMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. Chemistry and Biology Of Multicomponent Reactions. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3083–3135, 13 jun. 2012.

EL BADAoui, H. et al. One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones Using ZnCl₂, CuCl₂, NiCl₂ and CoCl₂ Doped Hydroxyapatite. **Letters in Organic Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 561–565, 1 set. 2005.

FAIZAN, S. et al. A century-old one-pot multicomponent Biginelli reaction products still finds a niche in drug discoveries: Synthesis, mechanistic studies and diverse biological activities of dihydropyrimidines. **Journal of Molecular Structure**, v. 1291, p. 136020, nov. 2023.

FOLKERS, K.; JOHNSON, T. B. Researches on Pyrimidines. CXXXVI. The Mechanism of Formation of Tetrahydropyrimidines by the Biginelli Reaction ¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 55, n. 9, p. 3784–3791, 1 set. 1933.

FOTOPOULOU, E.; FRAGKIADAKIS, M.; NEOCHORITIS, C. G. Macrocyclization tactics: The MCR approach. **Tetrahedron Letters**, v. 120, p. 154453, abr. 2023.

GRAEBIN, C. S. et al. Multicomponent Reactions for the Synthesis of Bioactive Compounds: A Review. **Current Organic Synthesis**, v. 16, n. 6, p. 855–899, 26 nov. 2019.

HANTZSCH, A. Ueber die Synthese pyridinartiger Verbindungen aus Acetessigäther und Aldehydammoniak. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 215, n. 1, p. 1–82, 24 jan. 1882.

HAYASHI, Y. Time Economy in Total Synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 2021.

KAMAT, V.; REDDY, D. S.; KUMAR, A. Catalytic role in Biginelli reaction: Synthesis and biological property studies of 2-oxo/thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines. **Archiv der Pharmazie**, v. 356, n. 6, 10 jun. 2023.

KAPPE, C. O. A Reexamination of the Mechanism of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. Support for an *N*-Acyliminium Ion Intermediate ¹. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7201–7204, 1 out. 1997.

KAPPE, C. O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type — a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 1043–1052, dez. 2000a.

KAPPE, C. O. Recent Advances in the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. New Tricks from an Old Dog. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 879–888, 1 dez. 2000b.

KOLOSOF, M. A. et al. A chemical placebo: NaCl as an effective, cheapest, non-acidic and greener catalyst for Biginelli-type 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones (-thiones) synthesis. **Molecular Diversity**, v. 13, n. 1, p. 5–25, 11 fev. 2009.

KUMAR, S. et al. Passerini reaction: Synthesis and applications in polymer chemistry. **European Polymer Journal**, v. 190, p. 112004, maio 2023.

KURTI, L. C. B. **Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2005.

LANGER, P. Adventures in the Chemistry of Multicomponent and Domino Reactions. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 24, 24 jun. 2024.

LARGHI, E. L. et al. Relevant Developments in the Use of Three-Component Reactions for the Total Synthesis of Natural Products. The last 15 Years. **ChemistryOpen**, v. 13, n. 5, 22 maio 2024.

LEE, J. H. Synthesis of Hantzsch 1,4-dihydropyridines by fermenting bakers' yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 43, p. 7329–7330, out. 2005.

PAJUSTE, K. et al. Use of pyridinium ionic liquids as catalysts for the synthesis of 3,5-bis(dodecyloxycarbonyl)-1,4-dihydropyridine derivative. **Open Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 143–148, 1 fev. 2011.

PALAKSHI REDDY, B.; RAJESH, K.; VIJAYAKUMAR, V. Ionic liquid[tbmim]Cl₂/AlCl₃ under ultrasonic irradiation towards synthesis of 1,4-DHP's. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 138–141, jan. 2015.

RAFIEE, E. et al. Silica supported 12-tungstophosphoric acid catalysts for synthesis of 1,4-dihydropyridines under solvent-free conditions. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, n. 10, p. 3555–3562, ago. 2009.

ROGERIO, K. R. et al. Multicomponent reactions: A brief history and their versatility for the synthesis of biologically active molecules. **Revista Virtual de Quimica**, v. 8, n. 6, p. 1934–1962, 2016.

RUCINS, M. et al. Recent Approaches to Chiral 1,4-Dihydropyridines and their Fused Analogues. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1019, 4 set. 2020.

RUIZ-SERRANO, M.; MENÉNDEZ, J. C. Multicomponent Reactions for the Synthesis of Natural Products and Natural Product-Like Libraries. Em: **Drug Discovery and Design Using Natural Products**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023. p. 273–322.

SAINI, A.; KUMAR, S.; SANDHU, J. S. Hantzsch reaction: Recent advances in Hantzsch 1,4-dihydropyridines. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 2, p. 95–111, 2008.

SAKTHIVEL, K. et al. Recent progress in metal assisted multicomponent reactions in organic synthesis. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, 8 set. 2023.

SARVAIYA, B. H. et al. Medicinal perspective of a promising scaffold – dihydropyrimidinones: A review. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 17 jun. 2024.

SAUSINS, A. E.; DUBURS, G. Synthesis of 1,4-dihydropyridines in cyclocondensation reactions (review). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 28, n. 4, p. 363–391, abr. 1992.

SCOPUS. Analyze search results. 2024. Disponível em: <<https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sort=plf-f&src=s&sid=39a09af95641d0ff9db03463f81f0db4&sot=a&sdt=a&sl=38&s=TITLE-ABS-KEY%28multicomponent+reaction%29&origin=resultslst&count=10&analyzeResults=Analyze+results>>. Acesso em: agosto, 2024.

SHAKYA, R.; KURMI, B. DAS; PATEL, P. A comprehensive review on synthesis of dihydropyrimidione via Biginelli reaction catalyzed by reusable magnetic nanocatalyst (from 2020–till date). **Applied Organometallic Chemistry**, v. 37, n. 5, 23 maio 2023.

SHEN, L. et al. K₂CO₃-assisted one-pot sequential synthesis of 2-trifluoromethyl-6-difluoromethylpyridine-3,5-dicarboxylates under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 37, p. 4866–4869, set. 2010.

SHI, F. et al. Development of Ionic Liquids as Green Reaction Media and Catalysts. **Catalysis Surveys from Asia**, v. 8, n. 3, p. 179–186, set. 2004.

SLOBBE, P.; RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. Recent applications of multicomponent reactions in medicinal chemistry. **MedChemComm**, v. 3, n. 10, p. 1189, 2012.

ANANTHA, I. S. et al. Recent Progresses in the Multicomponent Synthesis of Dihydropyridines by Applying Sustainable Catalysts Under Green Conditions. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 22 dez. 2021.

SWEET, FREDERICK.; FISSEKIS, J. D. Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidinones and the mechanism of the Biginelli reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 26, p. 8741–8749, 1 dez. 1973.

SYAMALA, M. A decade of advances in three-component reactions. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 37, n. 2, p. 103–171, abr. 2005.

TRATRAT, C.; GIORGI-RENAULT, S.; HUSSON, H.-P. A Multicomponent Reaction for the One-Pot Synthesis of 4-Aza-2,3-didehydropodophyllotoxin and Derivatives. **Organic Letters**, v. 4, n. 19, p. 3187–3189, 1 set. 2002.

VITÓRIO, F. et al. Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 2323–2332, 2015.

WAN, J.-P.; LIU, Y. Synthesis of Dihydropyrimidinones and Thiones by Multicomponent Reactions: Strategies Beyond the Classical Biginelli Reaction. **Synthesis**, v. 2010, n. 23, p. 3943–3953, 7 dez. 2010.

WAN, J.-P.; LIU, Y. Recent advances in new multicomponent synthesis of structurally diversified 1,4-dihydropyridines. **RSC Advances**, v. 2, n. 26, p. 9763, 2012.

WANG, J.-L. et al. Candida antarctica lipase B-catalyzed the unprecedented three-component Hantzsch-type reaction of aldehyde with acetamide and 1,3-dicarbonyl compounds in non-aqueous solvent. **Tetrahedron**, v. 67, n. 14, p. 2689–2692, abr. 2011.

ZARGANES-TZITZIKAS, T.; CHANDGUDE, A. L.; DÖMLING, A. Multicomponent Reactions, Union of <scp>MCRs</scp> and Beyond. **The Chemical Record**, v. 15, n. 5, p. 981–996, 11 out. 2015.

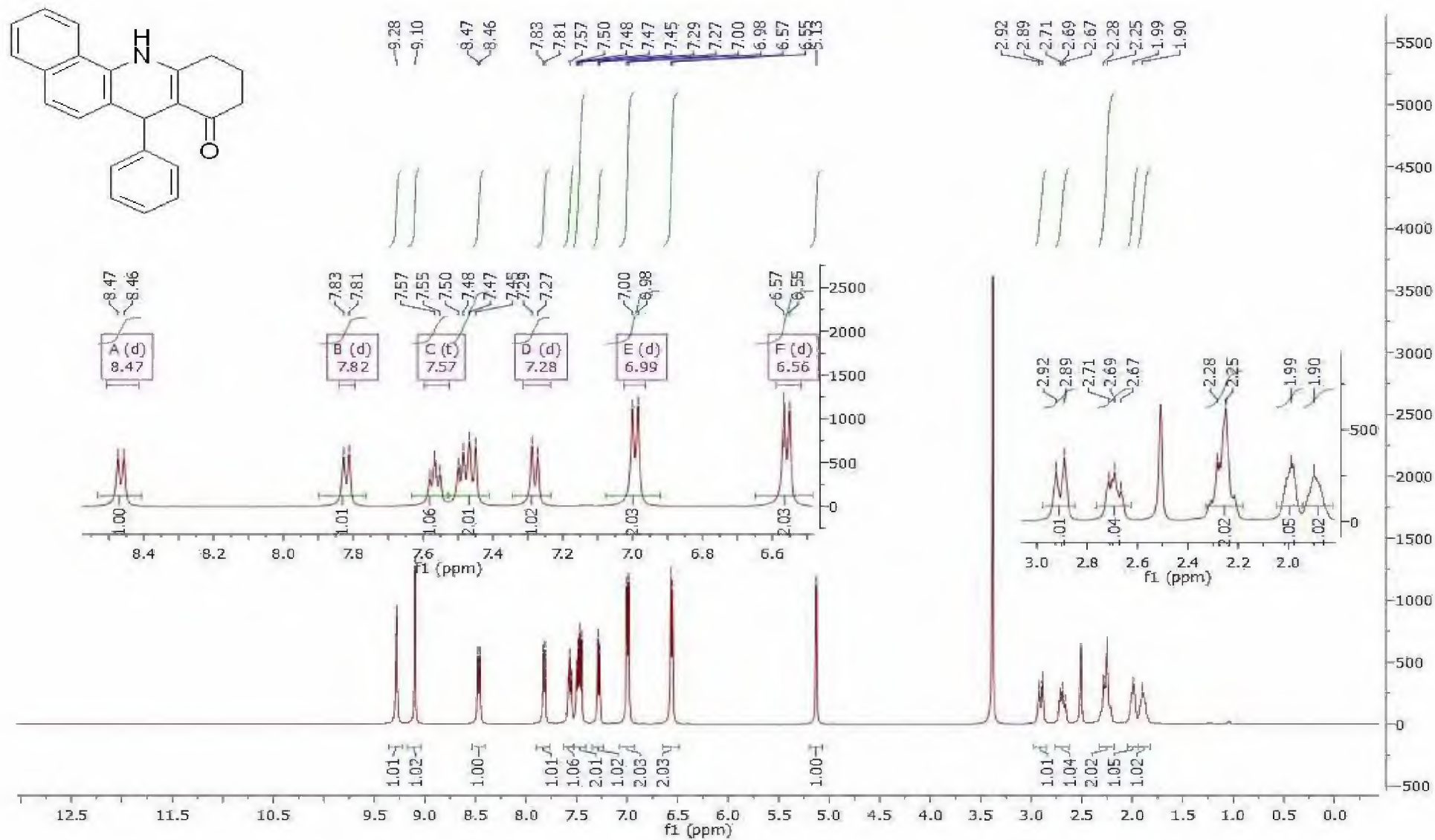
ZARGANES-TZITZIKAS, T.; DÖMLING, A. Modern multicomponent reactions for better drug syntheses. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 1, n. 7, p. 834–837, 2014.

ZELEKE, D.; DAMENA, T. Advance in green synthesis of pharmacological important heterocycles using multicomponent reactions and magnetic nanocatalysts (MNCs). **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101283, jan. 2024.

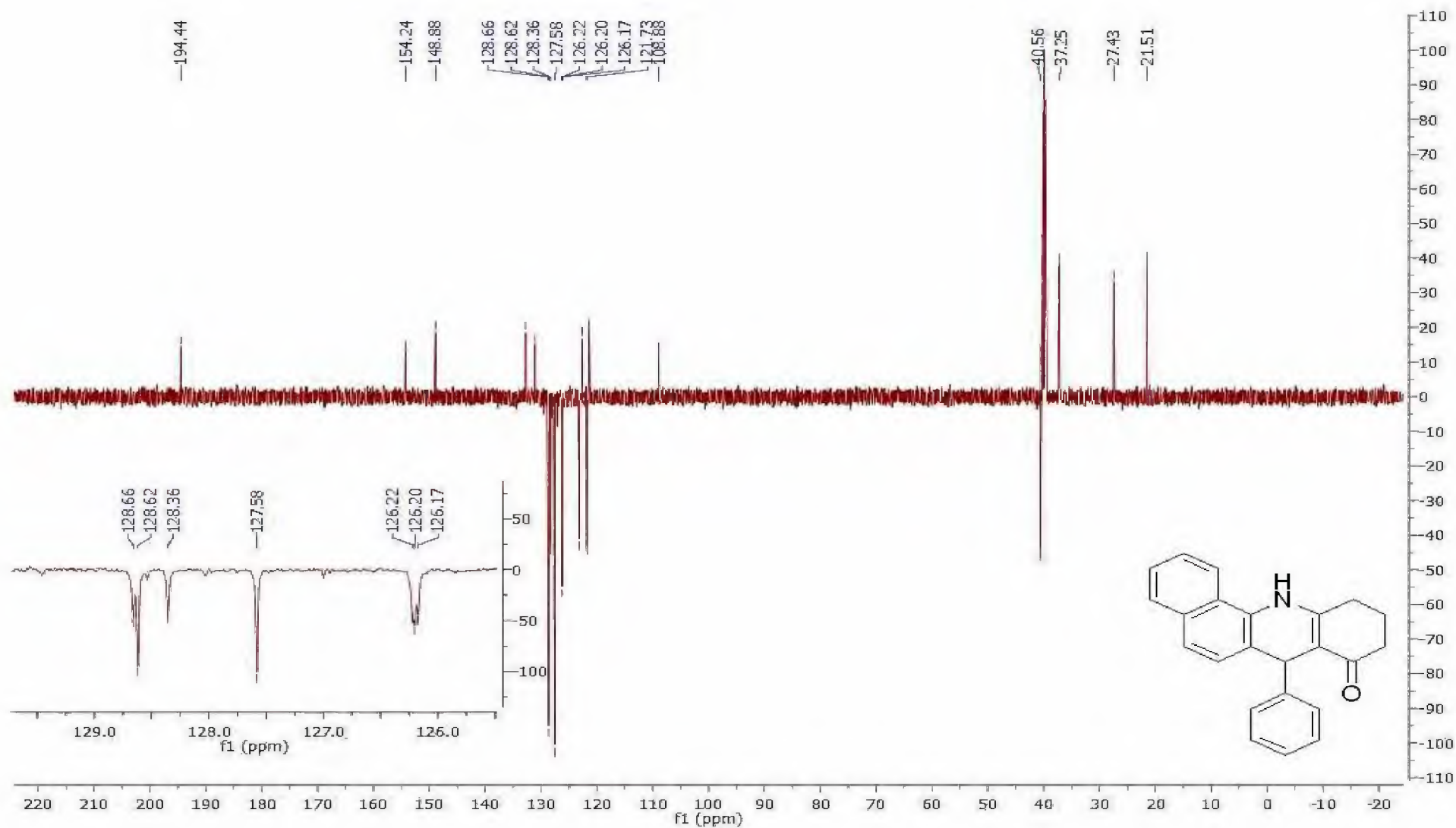
ZHU, J.; WANG, Q.; WANG, M. (EDS.). **Multicomponent Reactions in Organic Synthesis**. [s.l.] Wiley, 2014.

4. ANEXOS

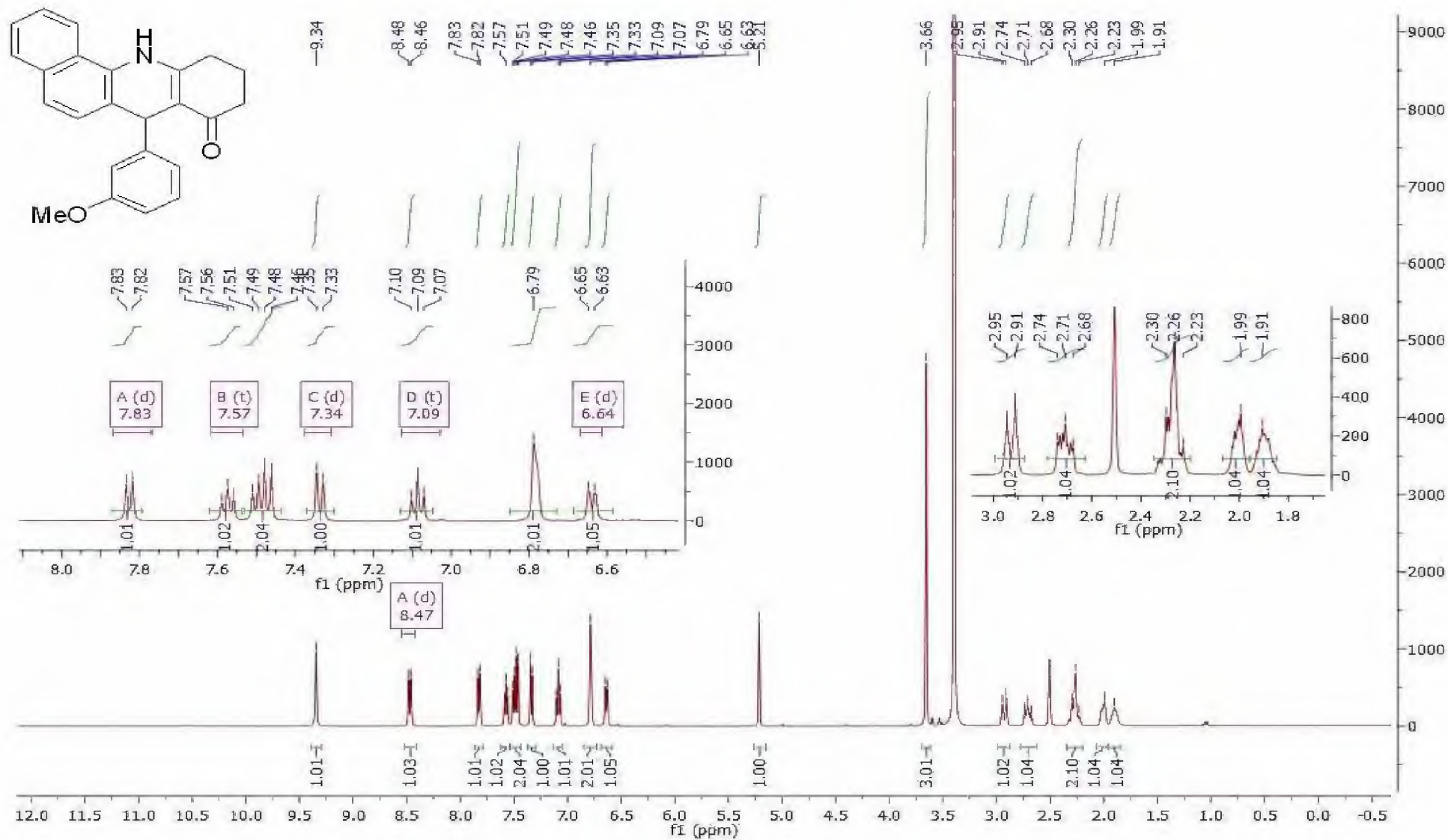
Anexo 1: Espectro de RMN ^1H da molécula 1 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



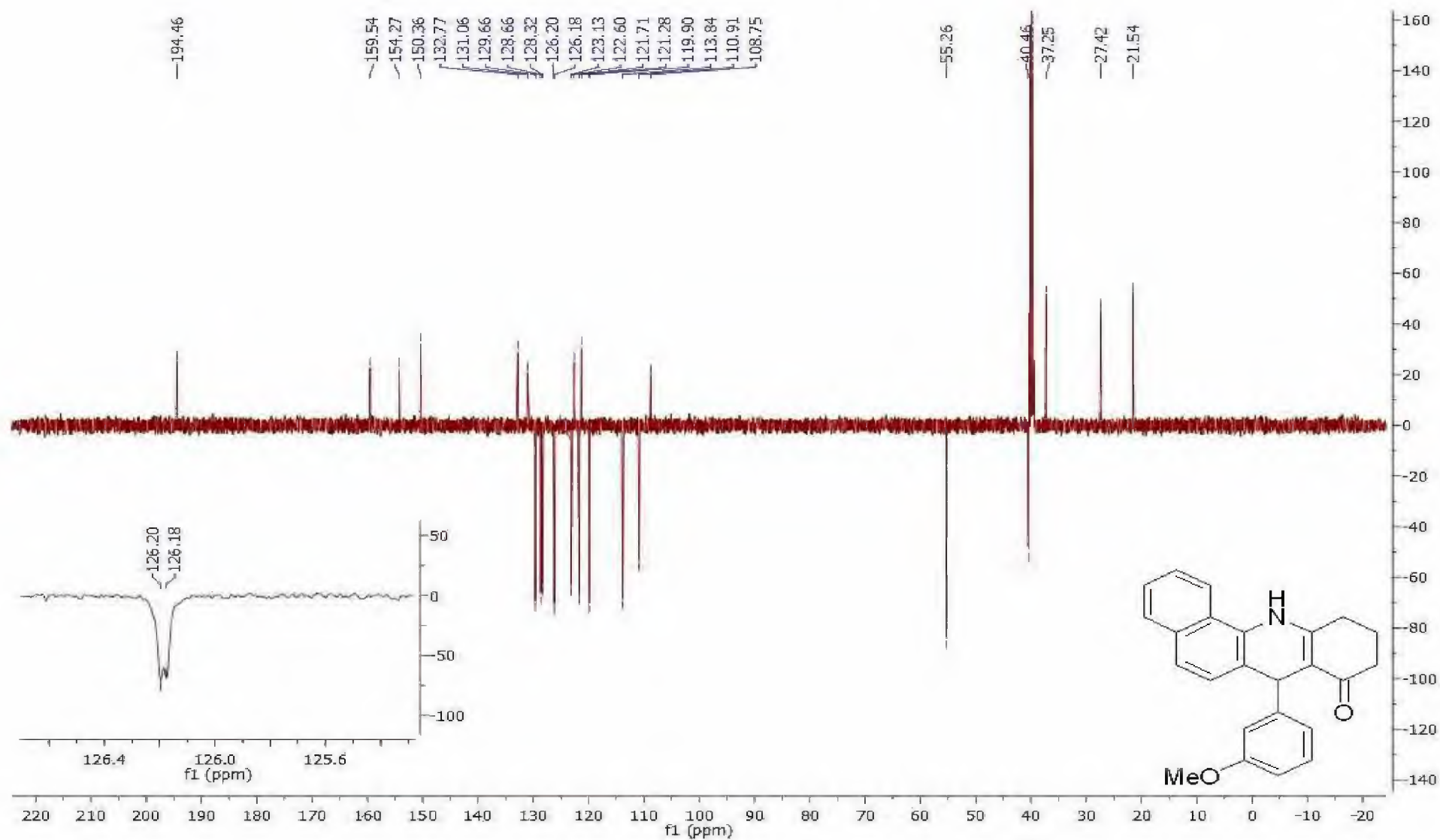
Anexo 2: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 1 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



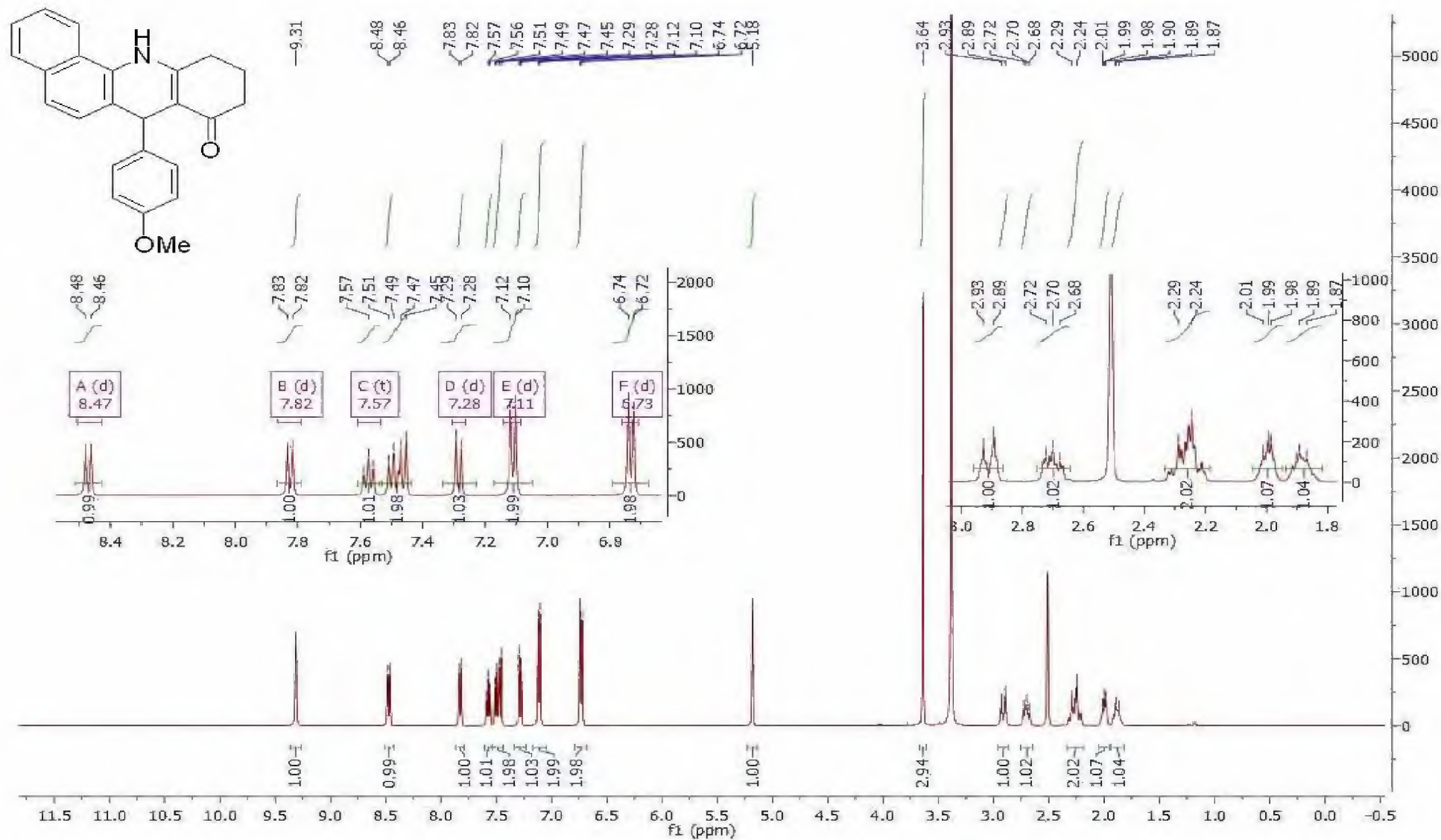
Anexo 3: Espectro de RMN ^1H da molécula 2 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



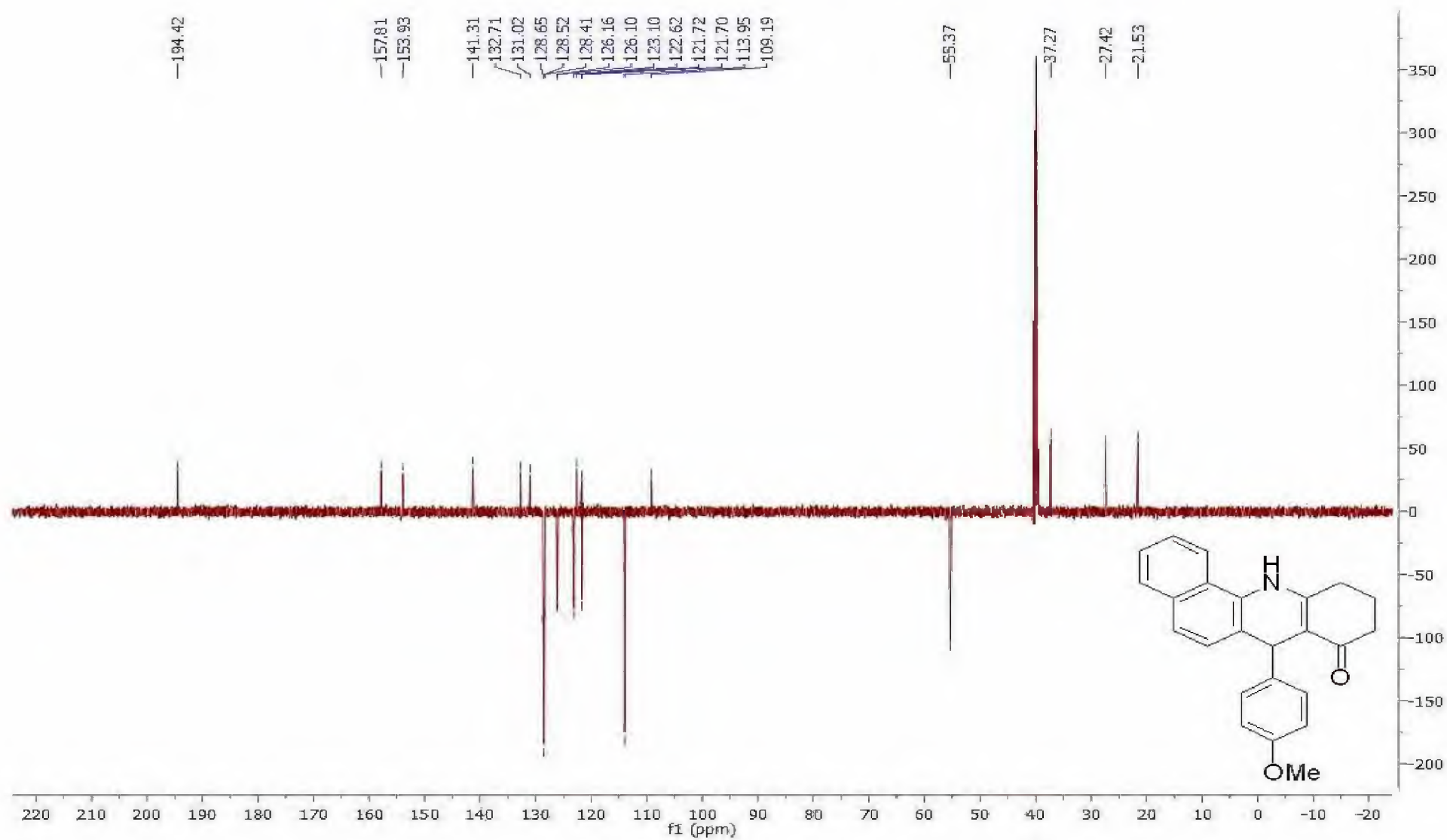
Anexo 4: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 2 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



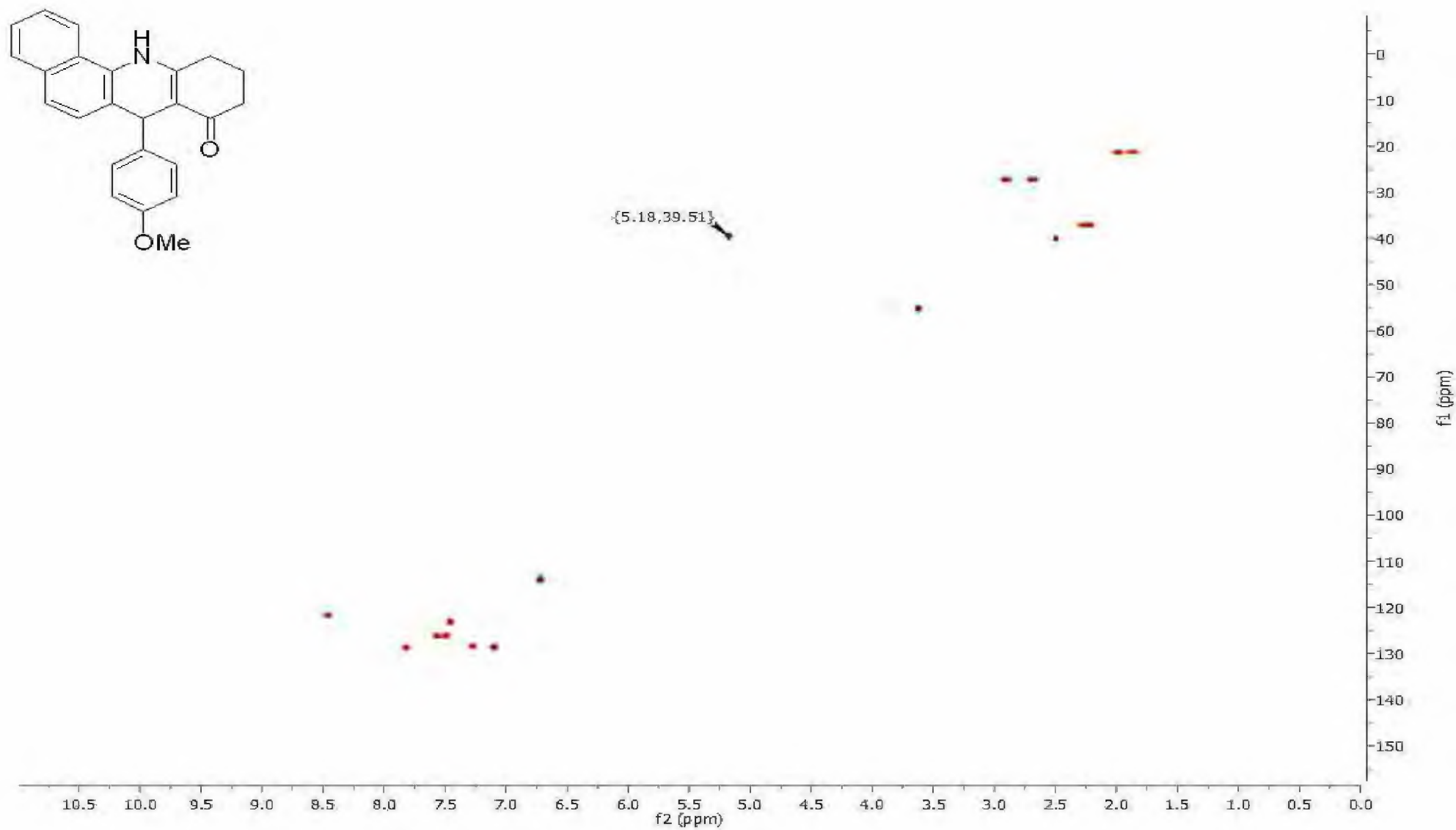
Anexo 5: Espectro de RMN ^1H da molécula 3 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



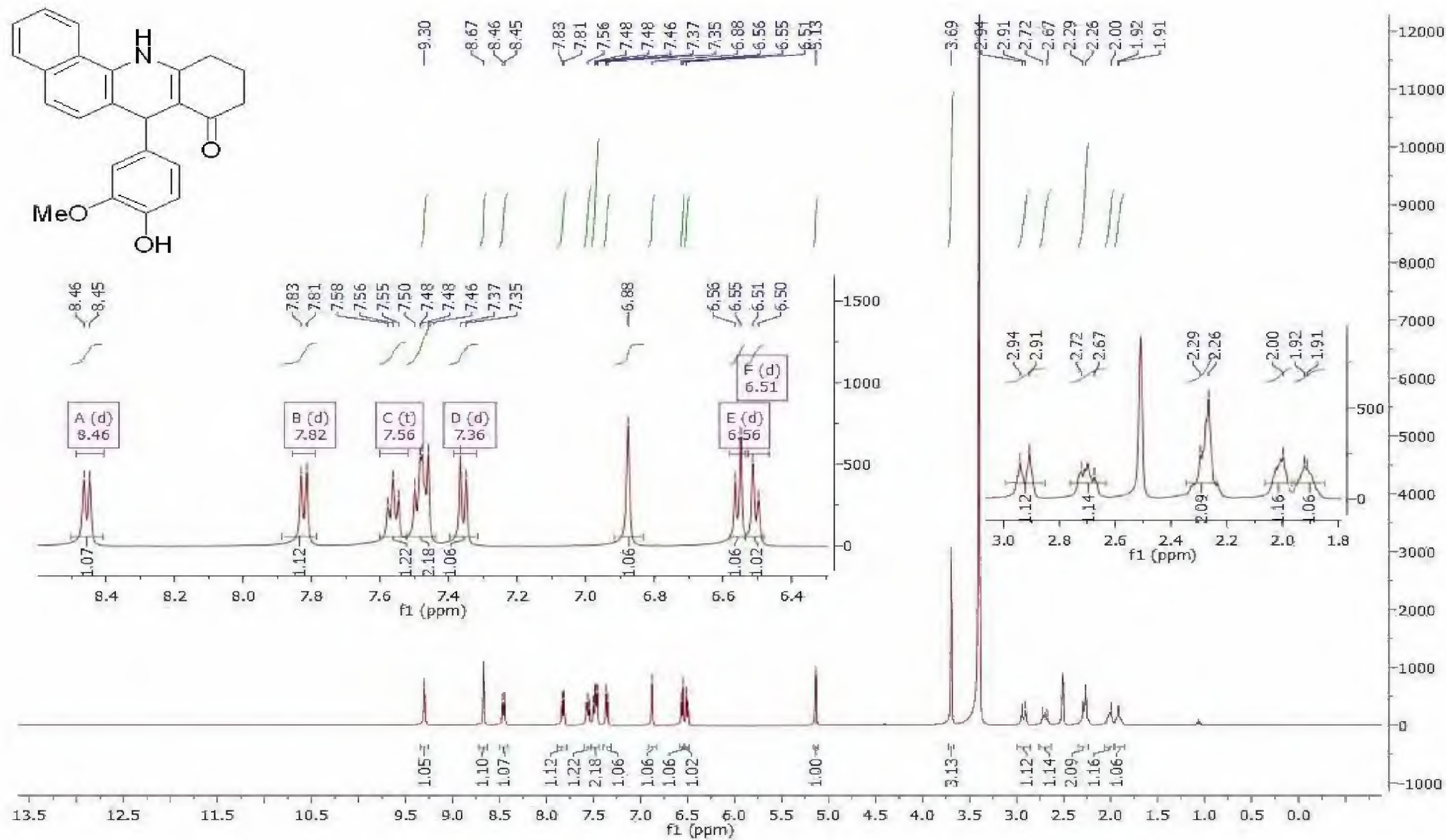
Anexo 6: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 3 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



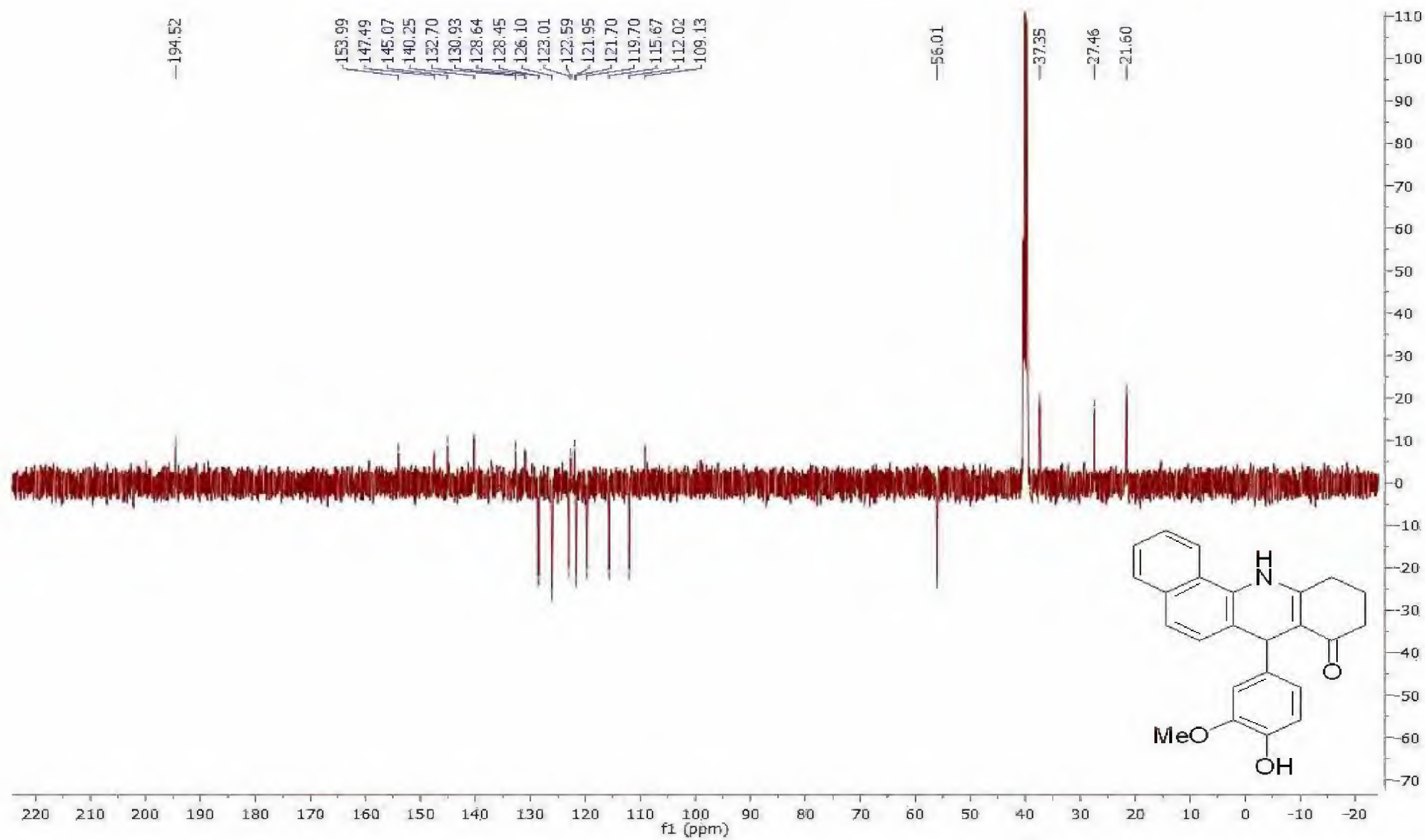
Anexo 7: Espectro de RMN HSQC da molécula 3 em DMSO-d6 a 500 MHz.



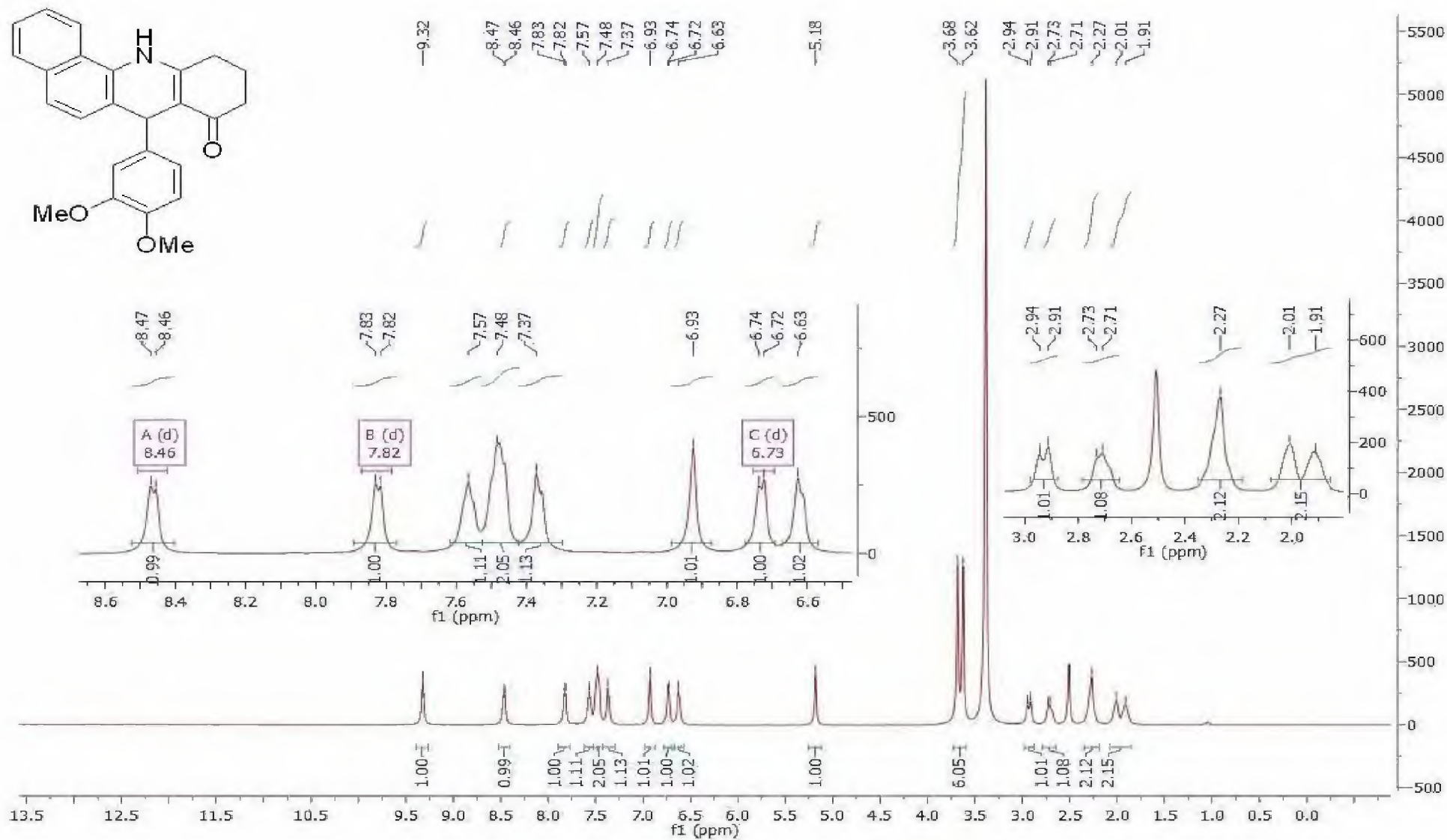
Anexo 8: Espectro de RMN ^1H da molécula 4 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



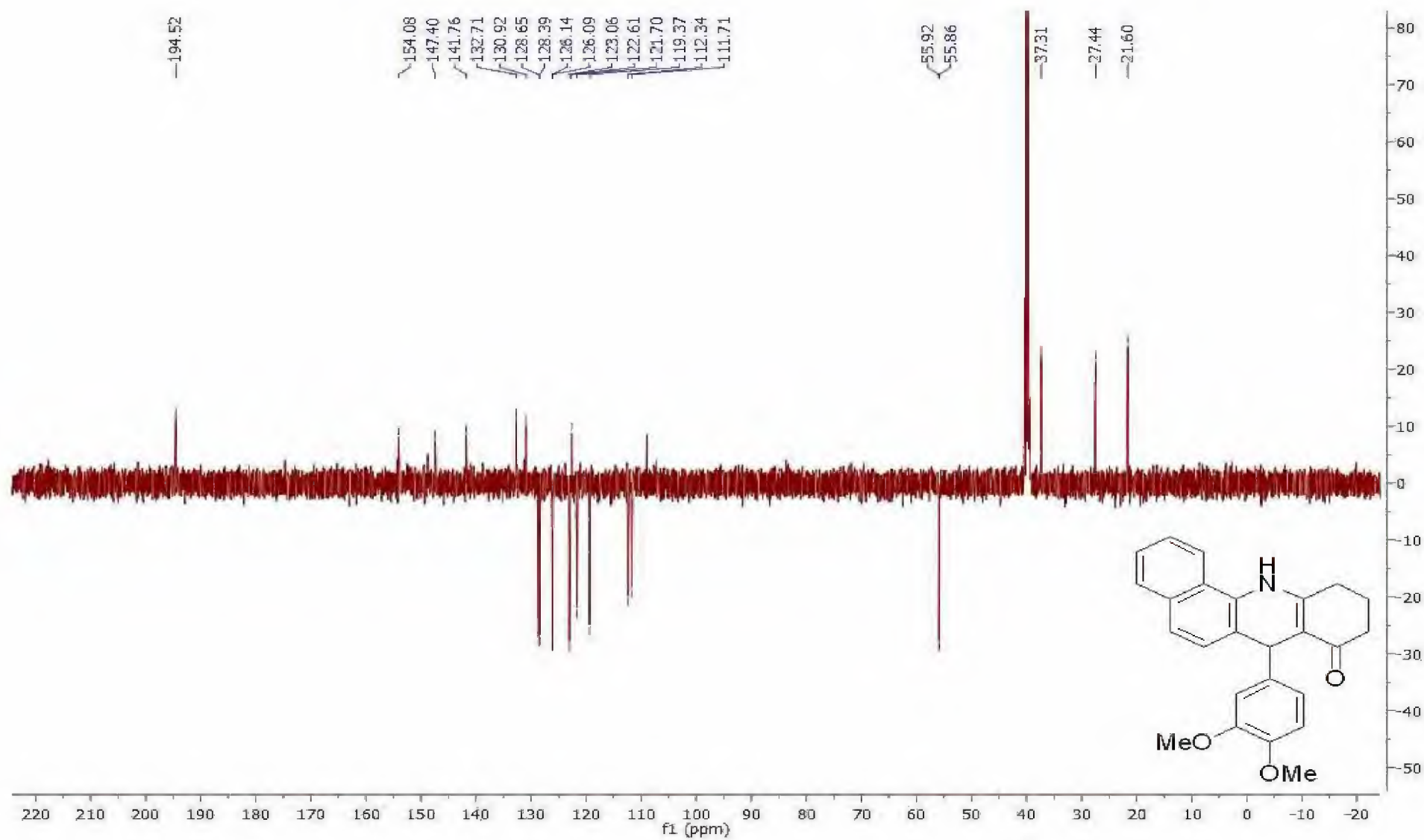
Anexo 9: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 4 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



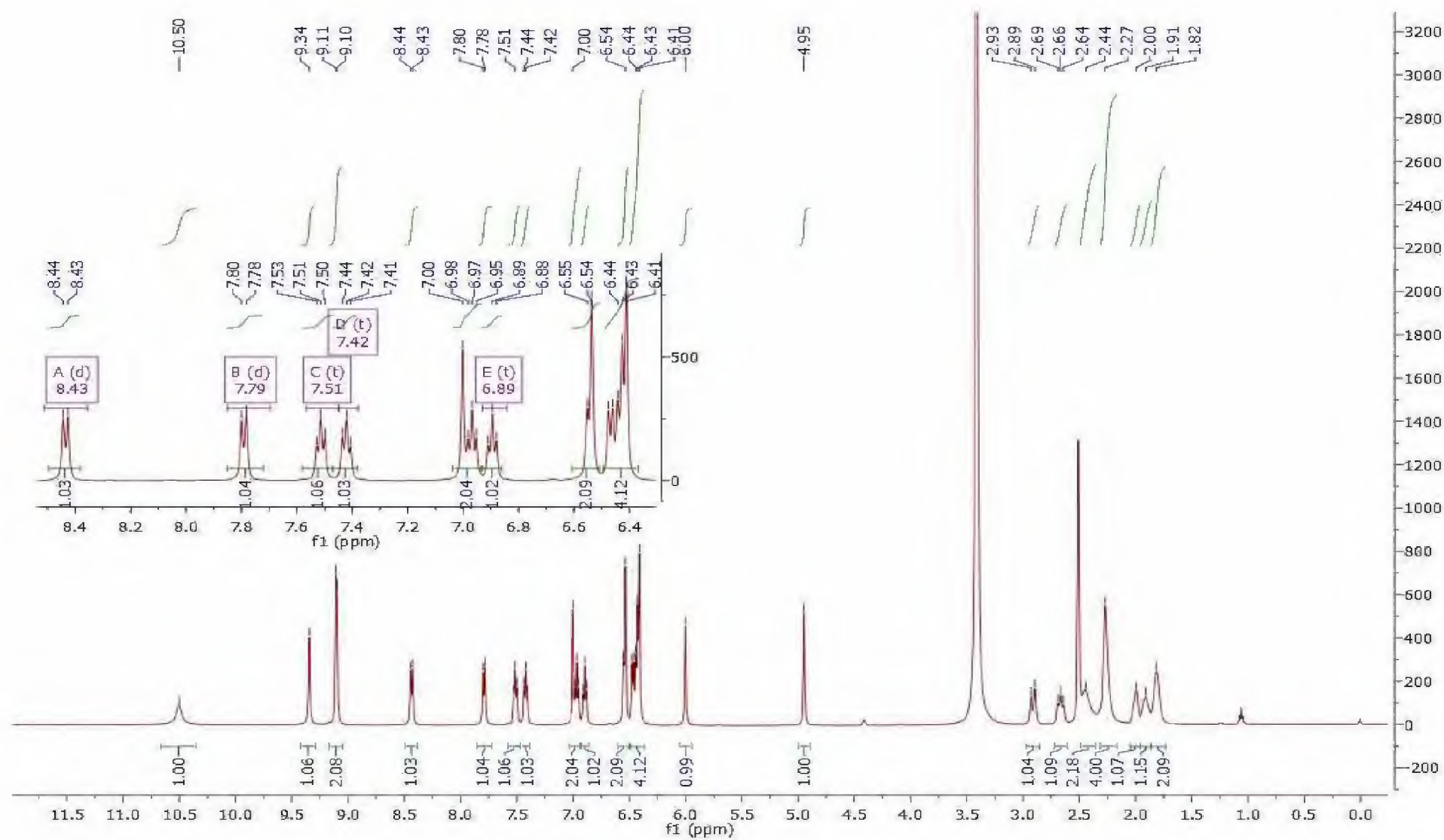
Anexo 10: Espectro de RMN ^1H da molécula 5 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



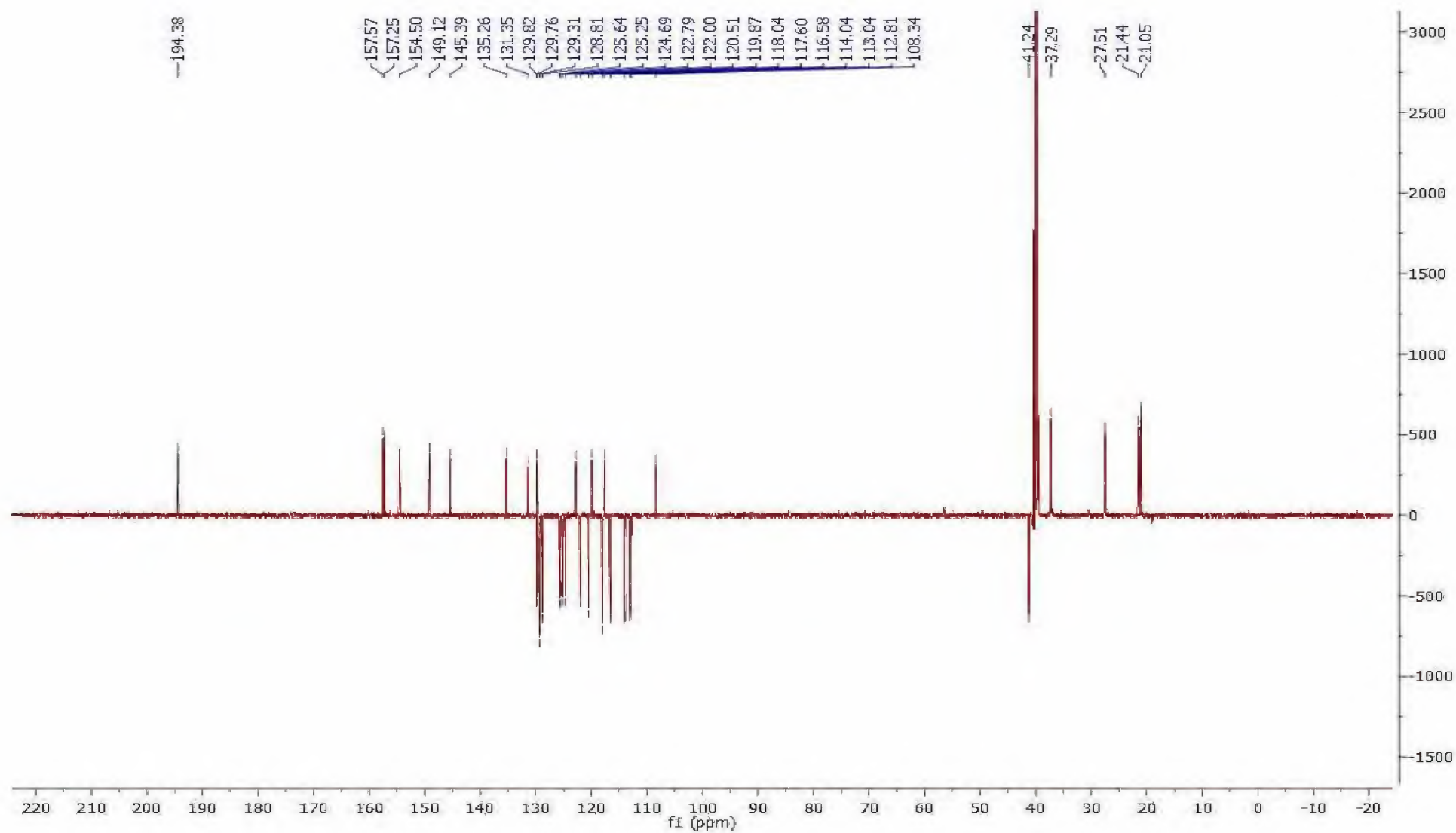
Anexo 11: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 5 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



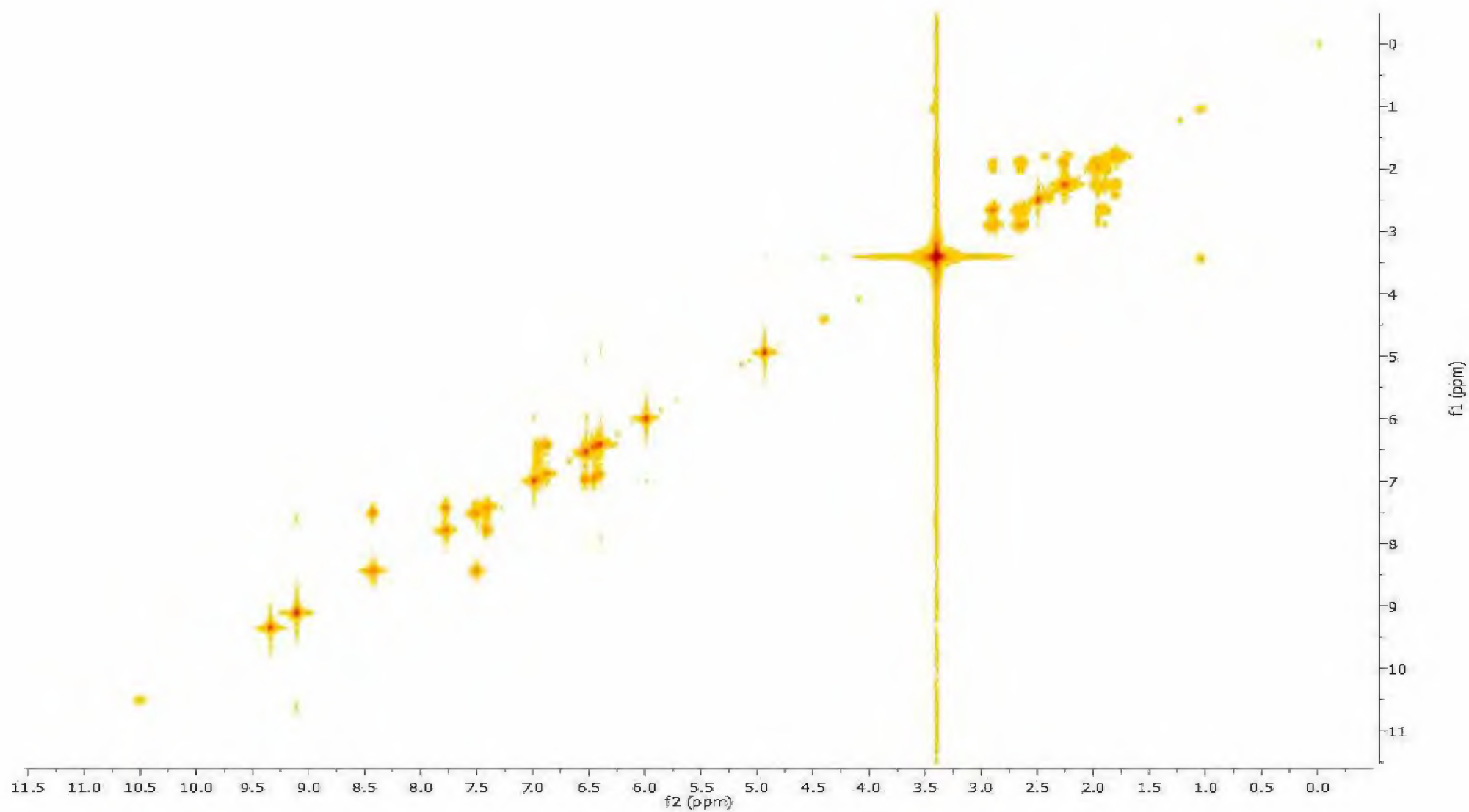
Anexo 12: Espectro de RMN ^1H da molécula 6 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



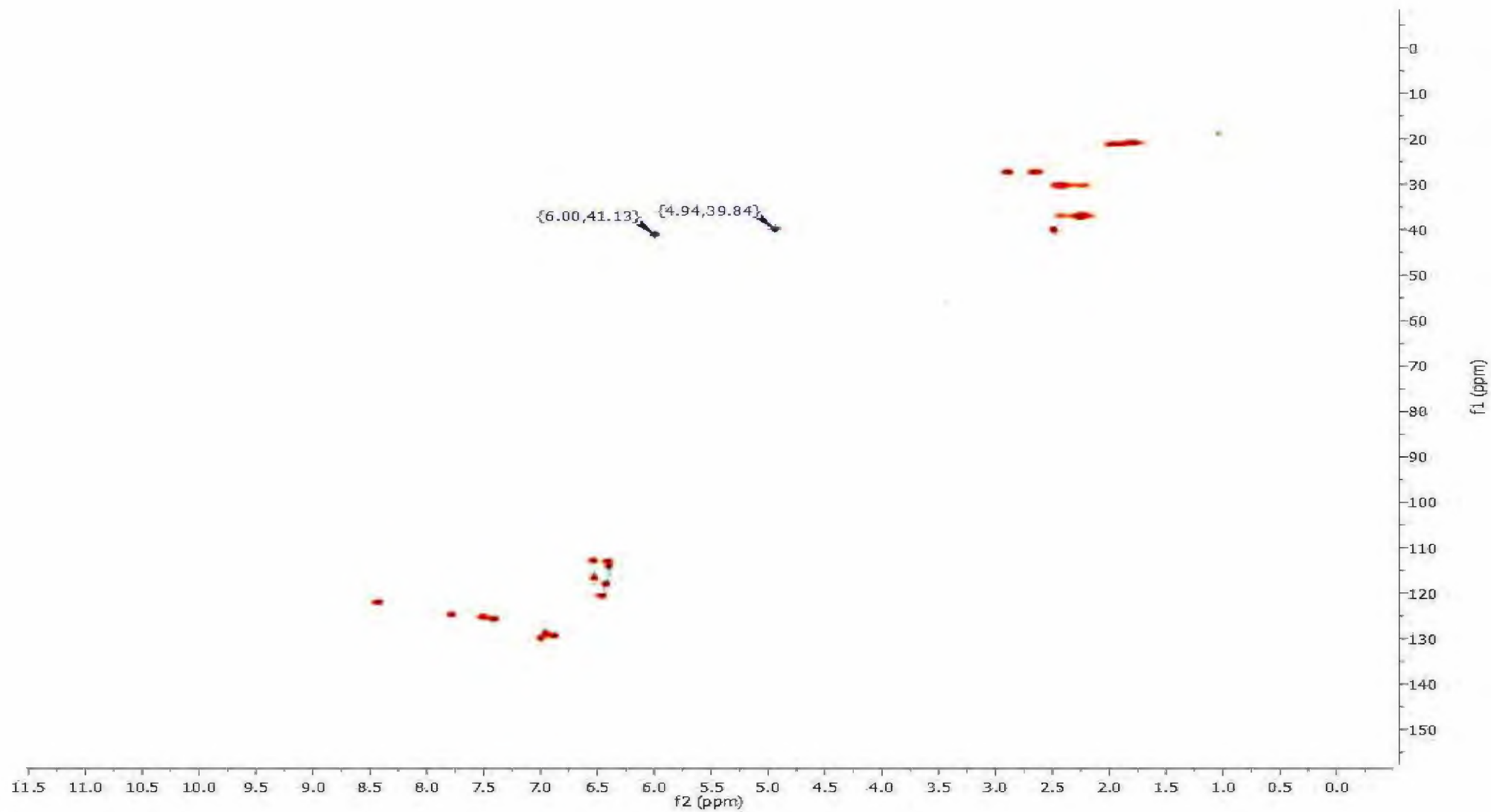
Anexo 13: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 6 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



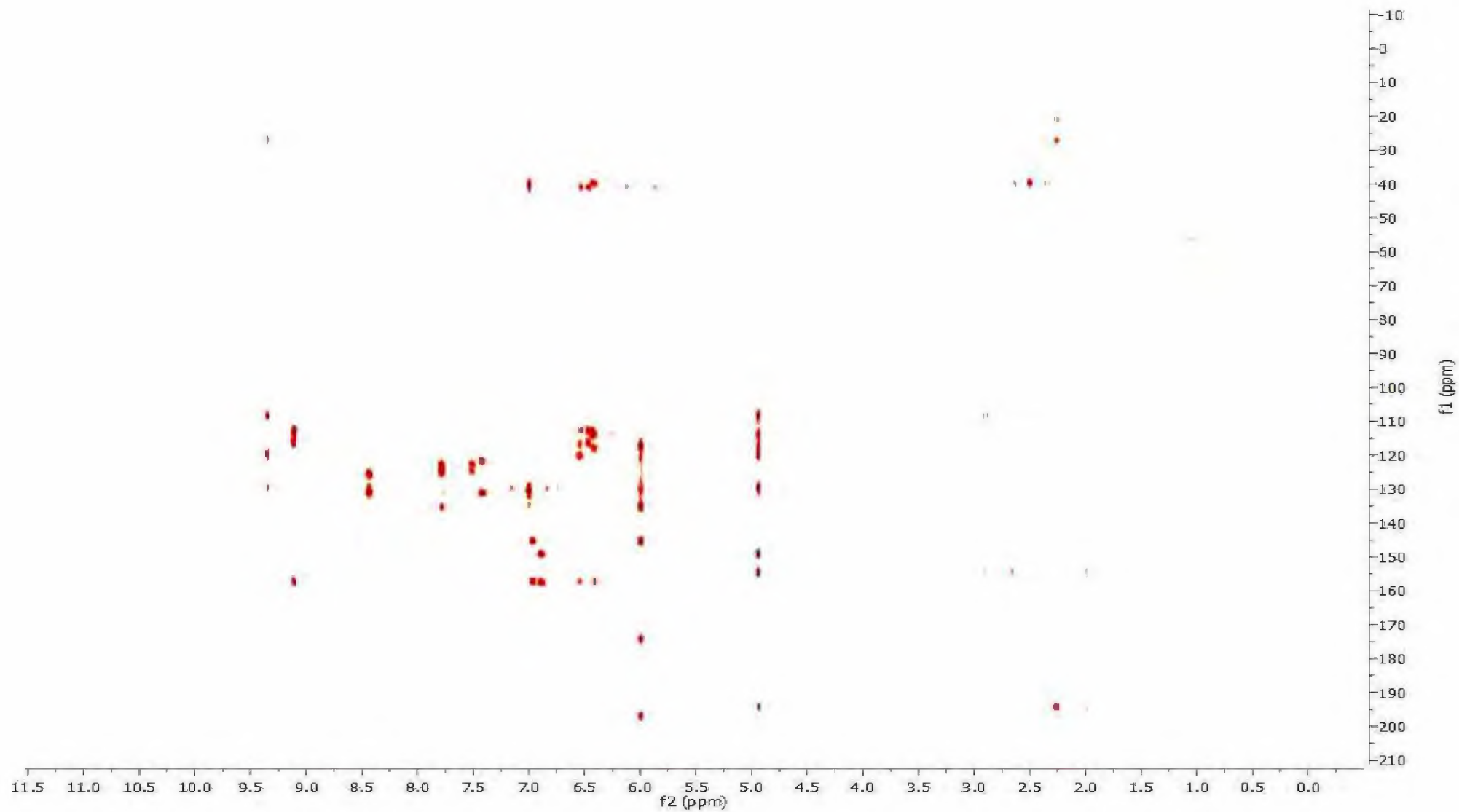
Anexo 14: Espectro de RMN COSY da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.



Anexo 15: Espectro de RMN HSQC da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.

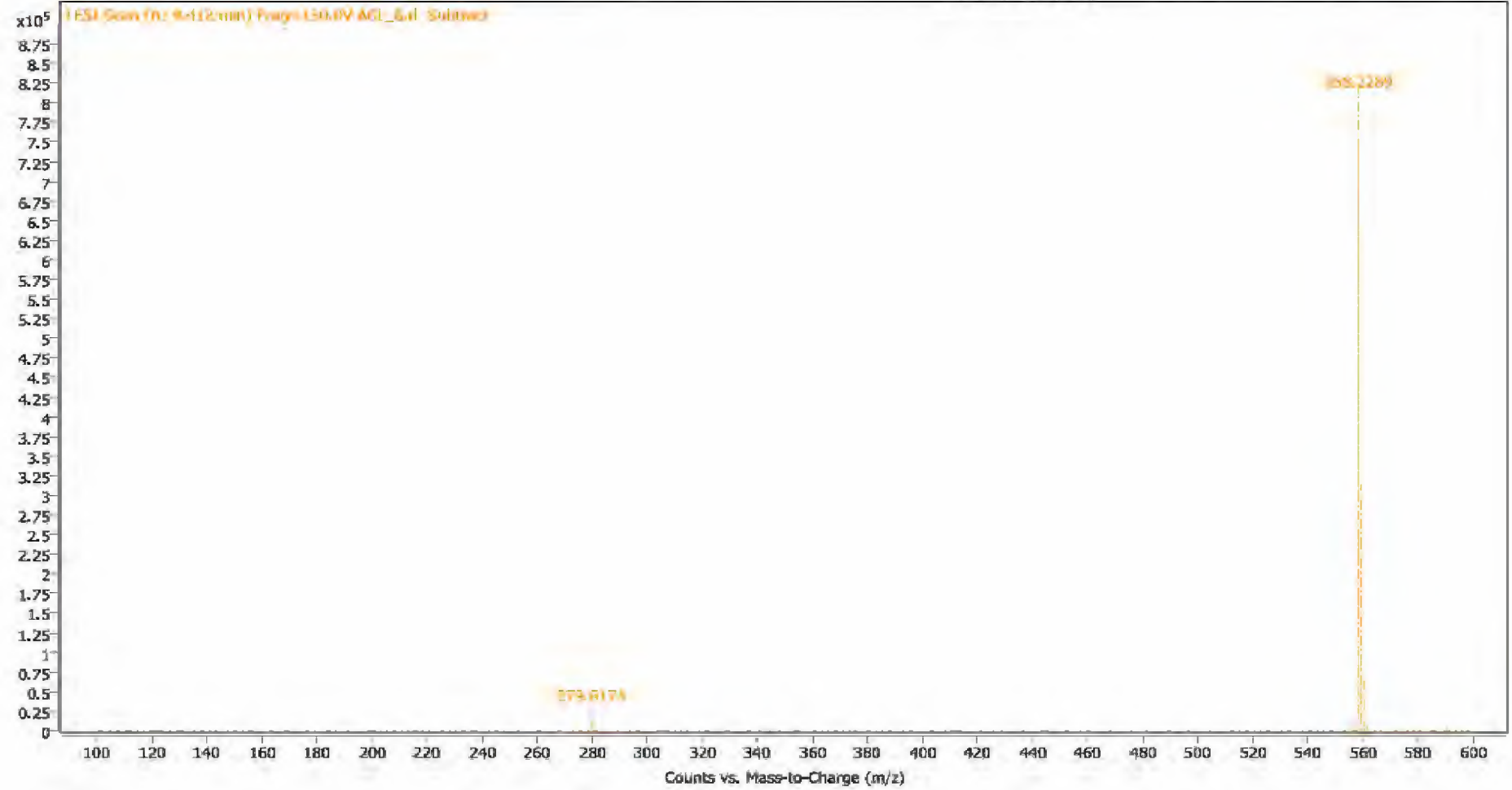


Anexo 16: Espectro de RMN HMBC da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.

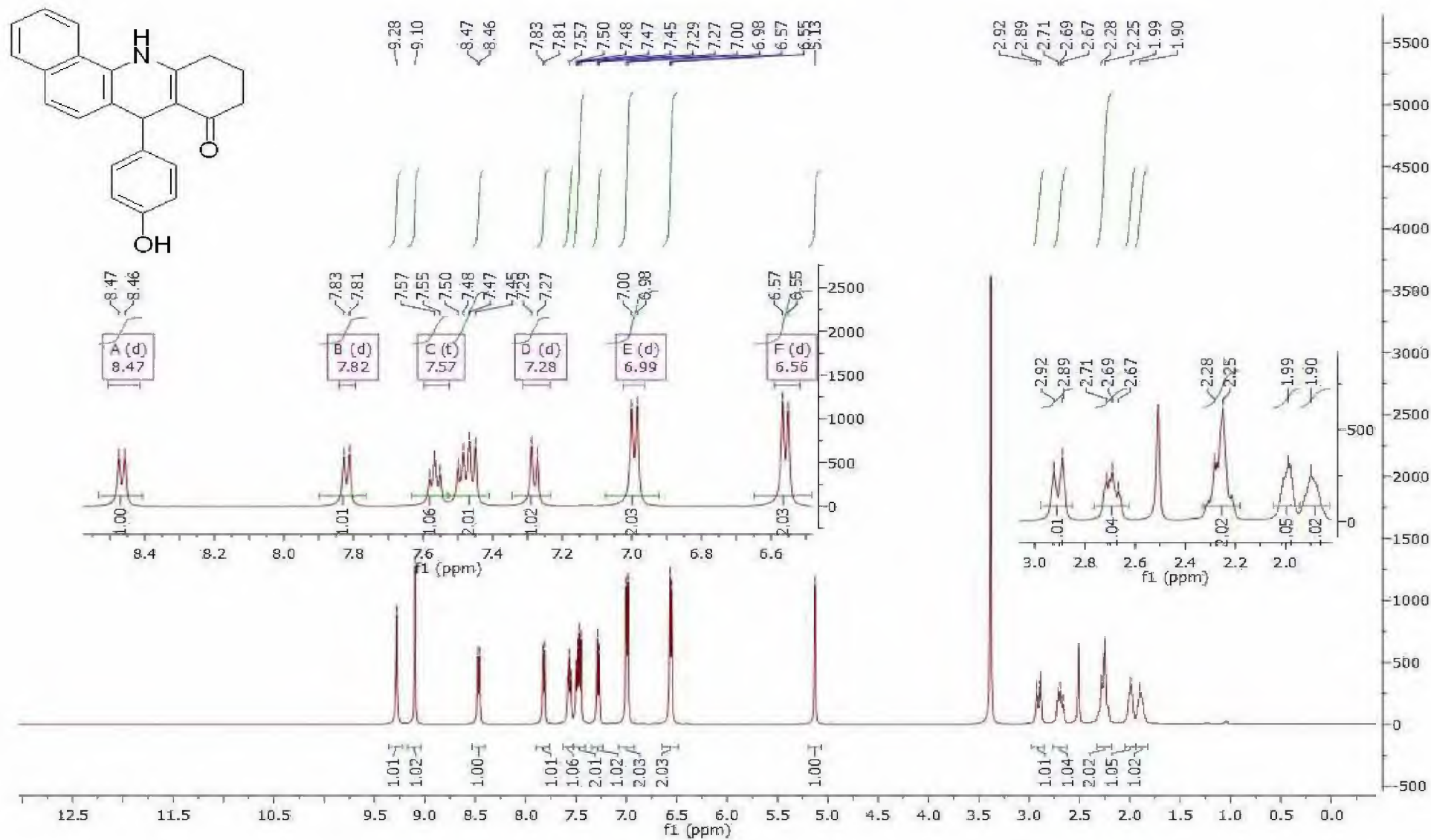


Anexo 17: Espectro de massas da molécula 6 em DMSO-d6 a 500 MHz.

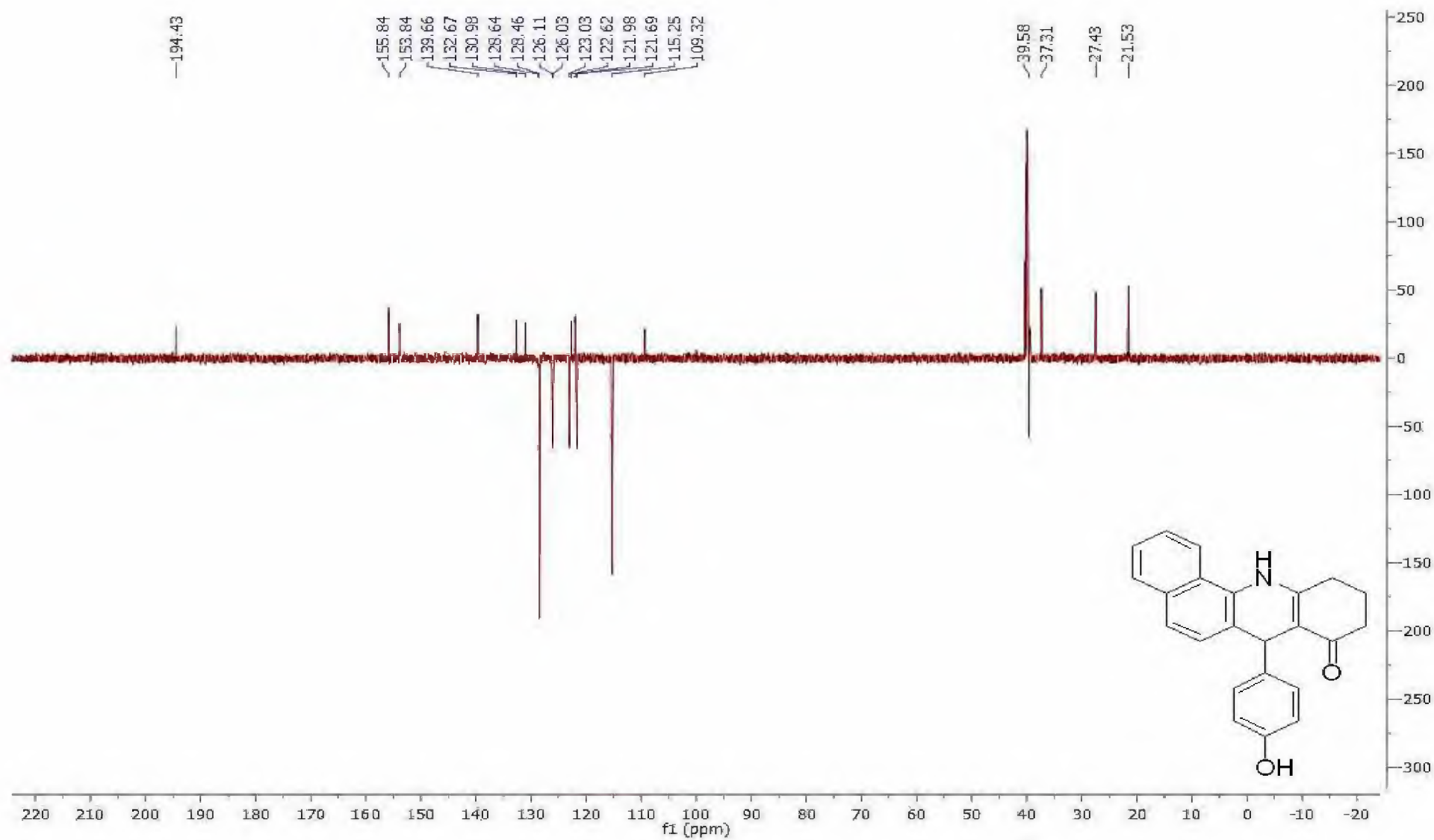
Name	6	Rack Pos.		Instrument	QTOF-6530	Operator	SYSTEM (SYSTEM)
Inj. Vol. (ul)	3	Plate Pos.		IRM Status	Some Ions missed		
Data File	6.d	Method (Acq)	MSONLY + 5_99 FQ.6 ACN_W.m	Comment	ZORBAX C18 2.1X50X1.8 (PN 727700_902) PRESSAO 323BAR	Acq. Time (Local)	8/26/2024 2:05:06 PM (UTC-03:00)



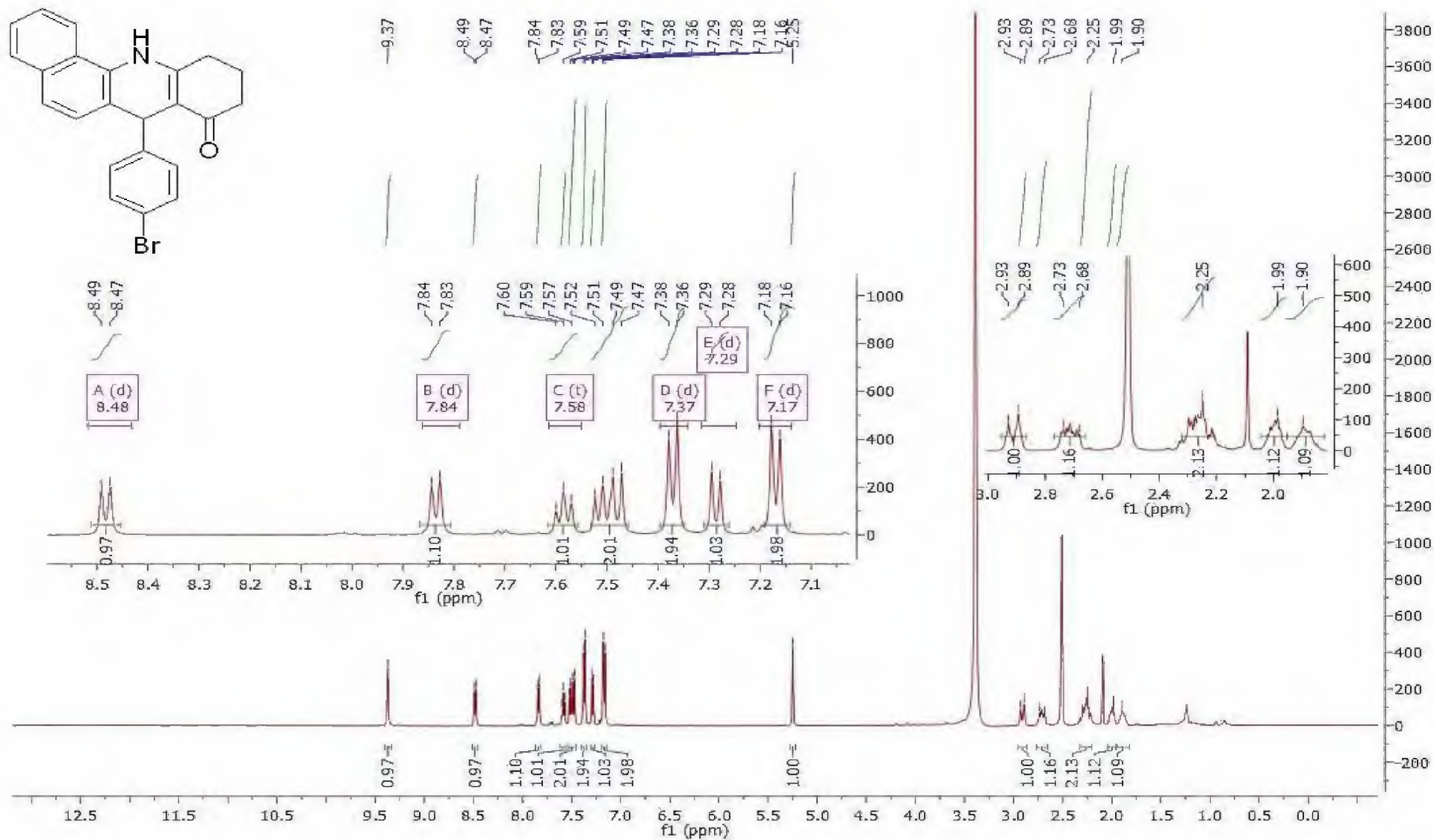
Anexo 18: Espectro de RMN ^1H da molécula 7 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



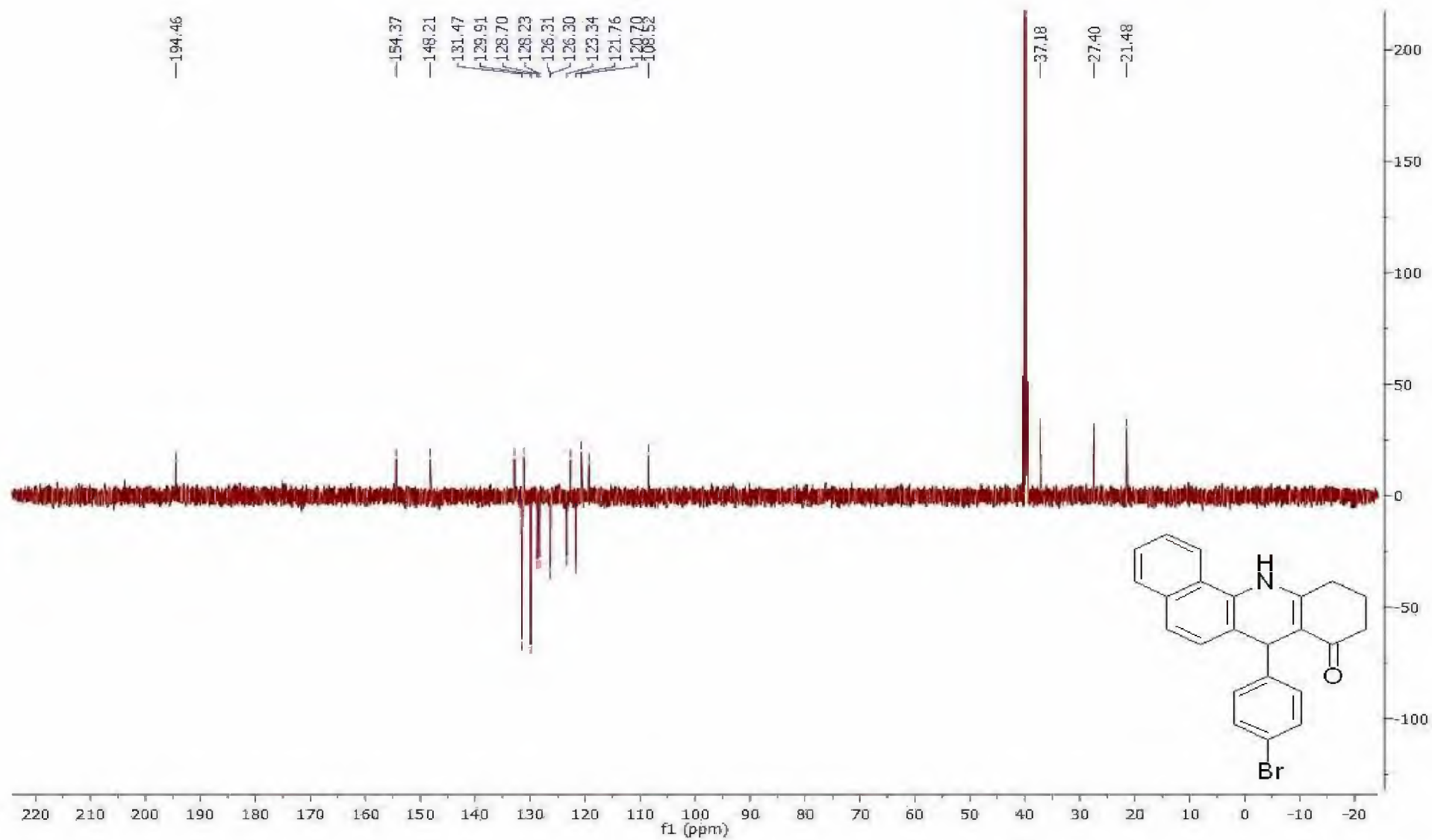
Anexo 19: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 7 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



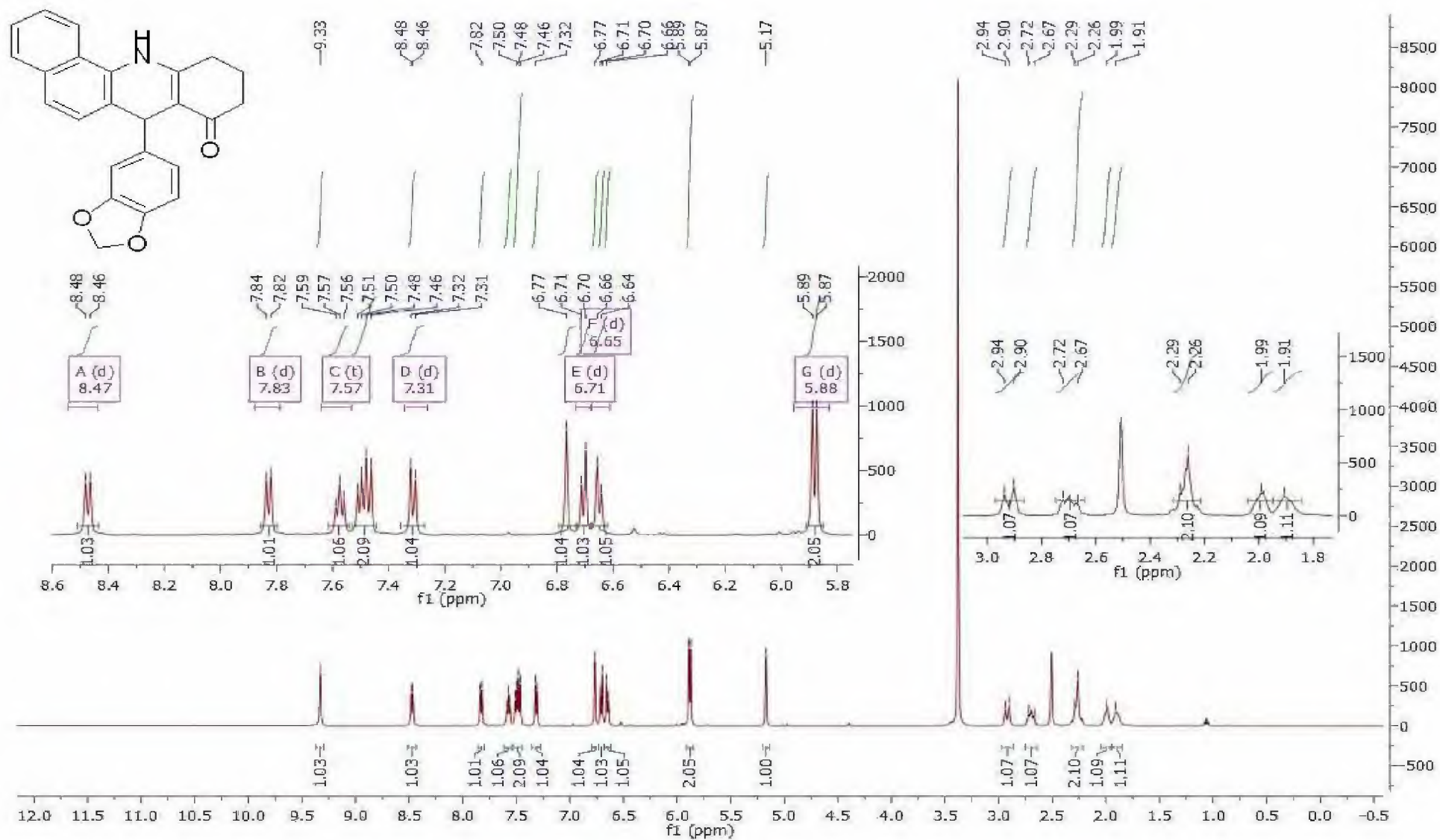
Anexo 20: Espectro de RMN ^1H da molécula 8 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



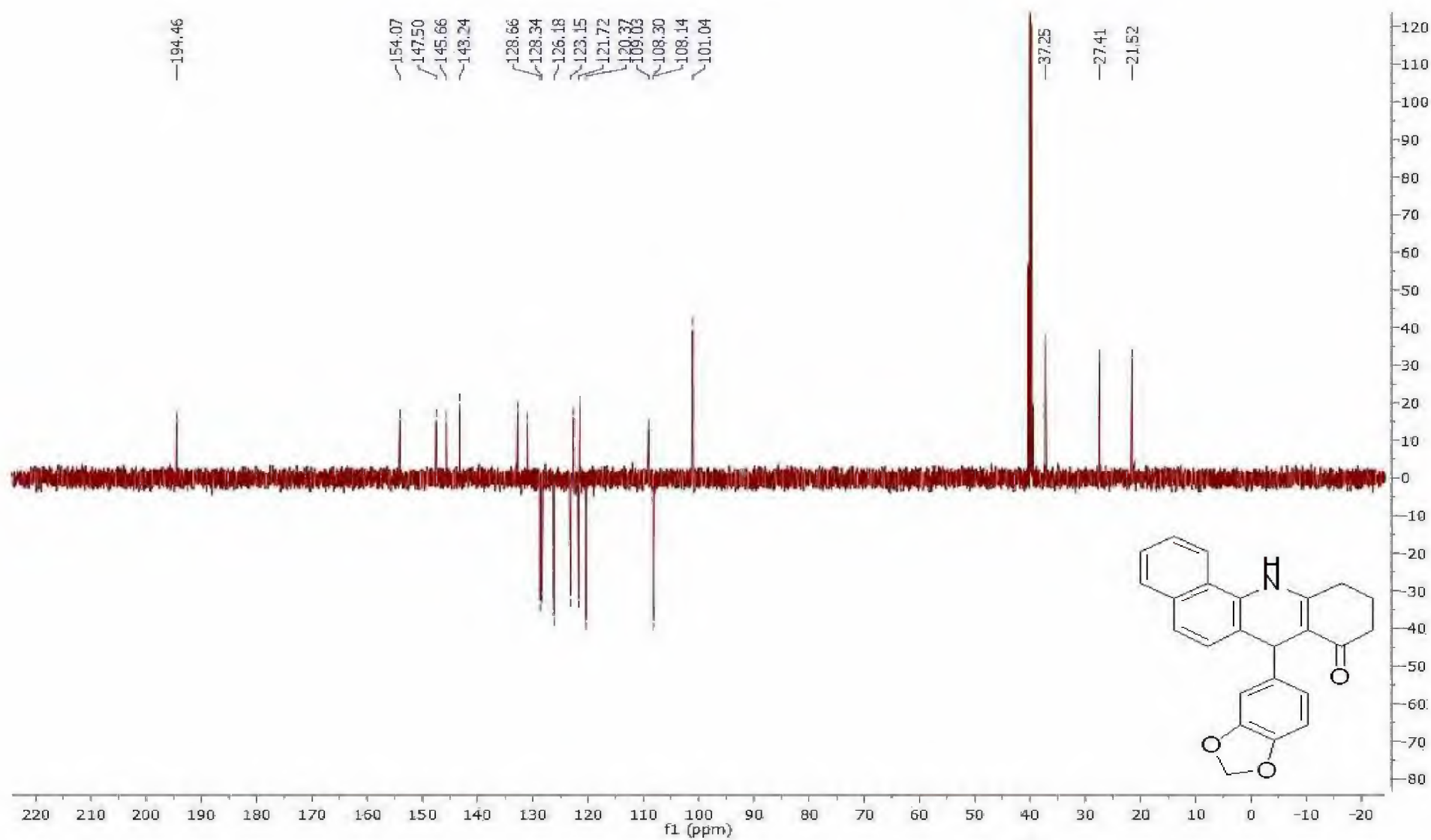
Anexo 21: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 8 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



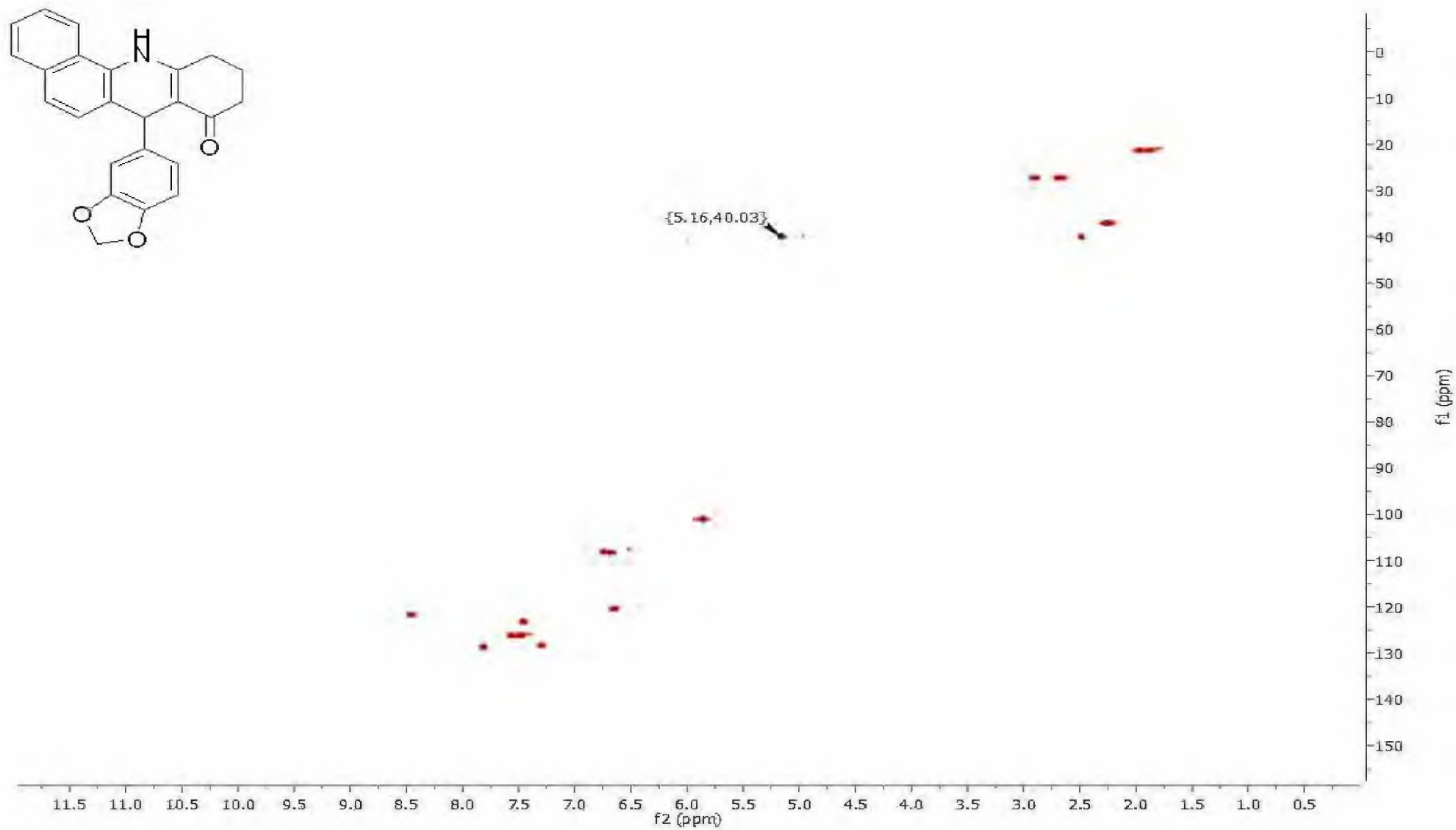
Anexo 22: Espectro de RMN ^1H da molécula 9 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



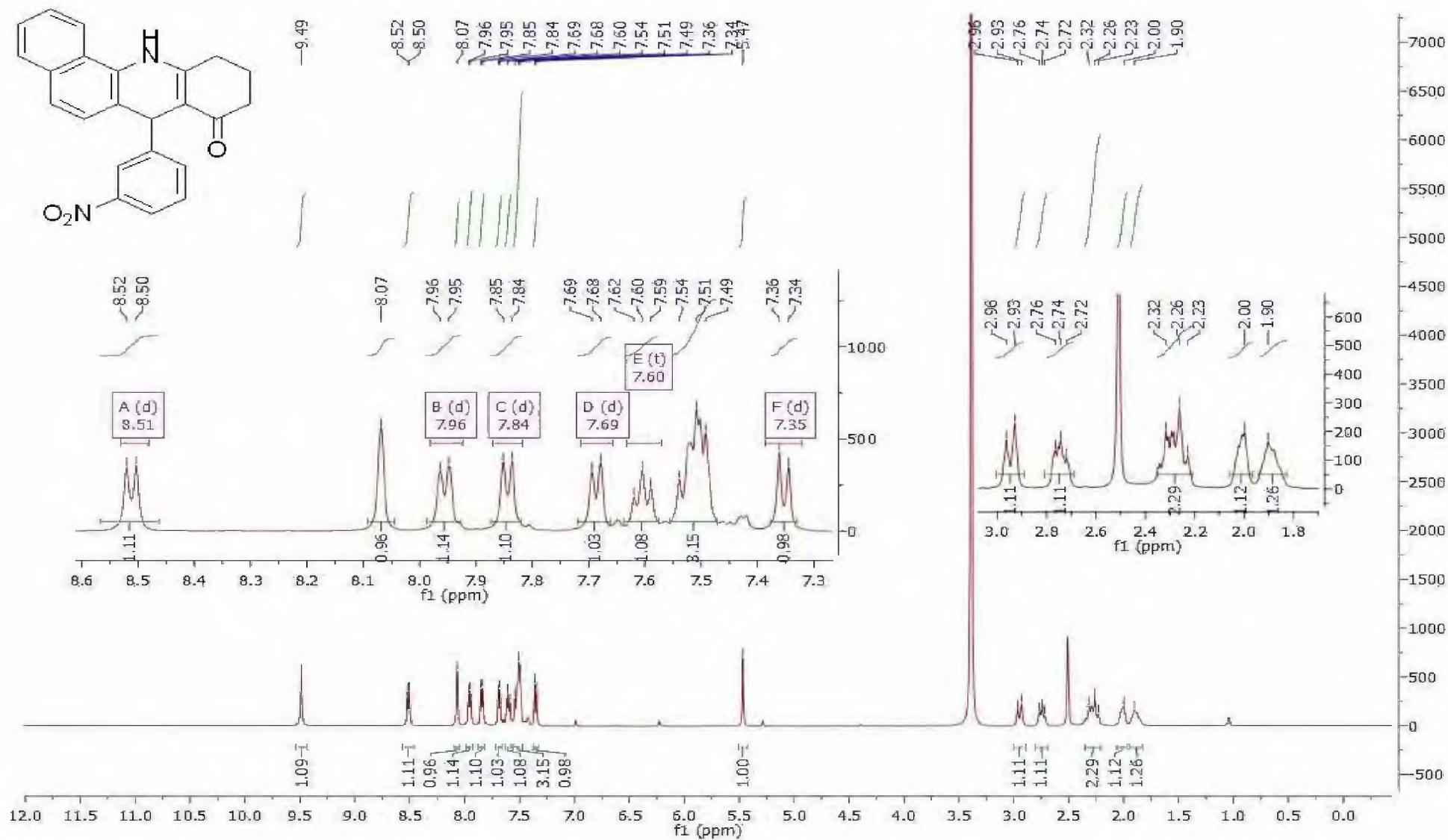
Anexo 23: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 9 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



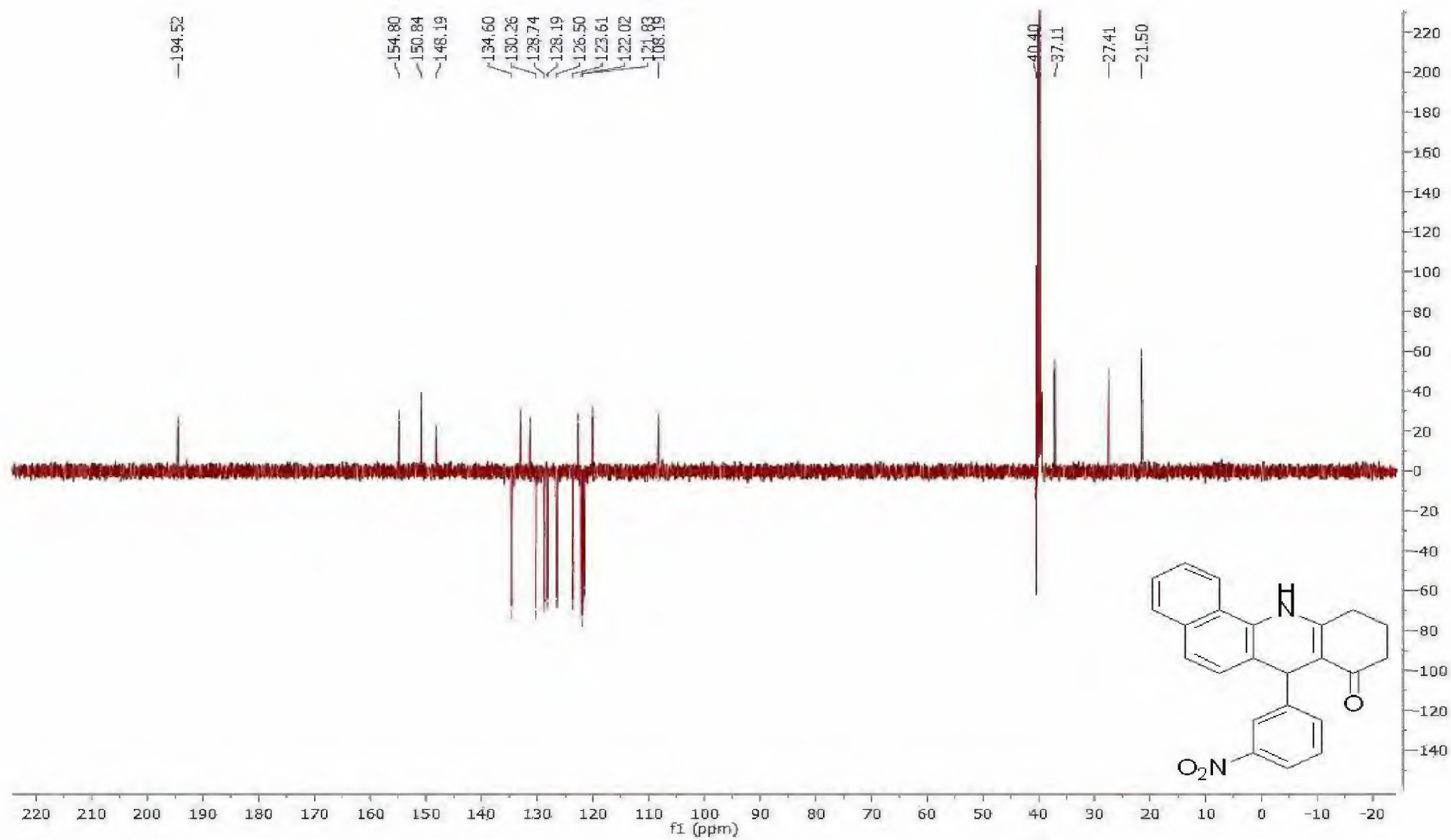
Anexo 24: Espectro de RMN HSQC da molécula 9 em DMSO-d6 a 500 MHz.



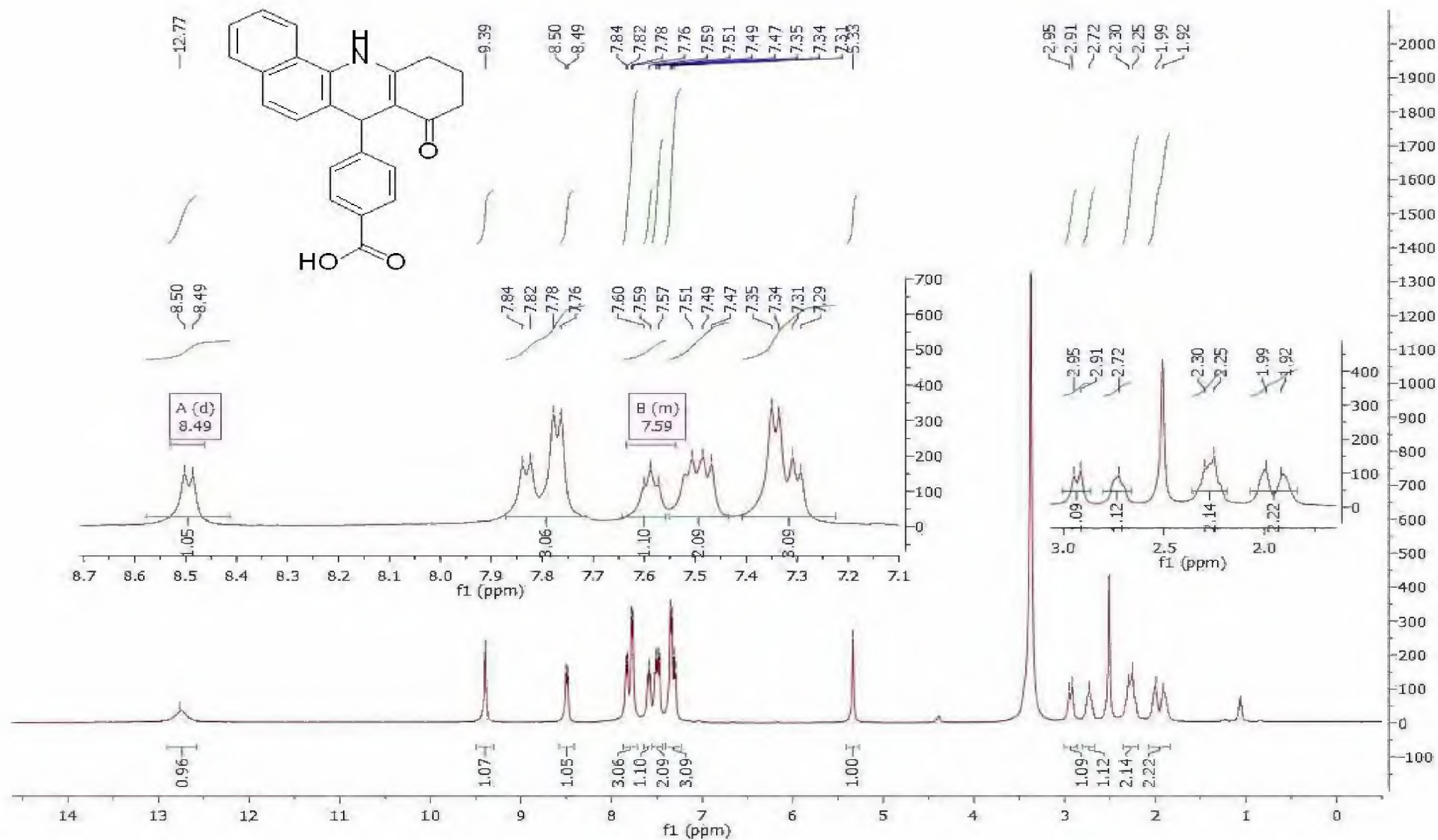
Anexo 25: Espectro de RMN ^1H da molécula 10 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



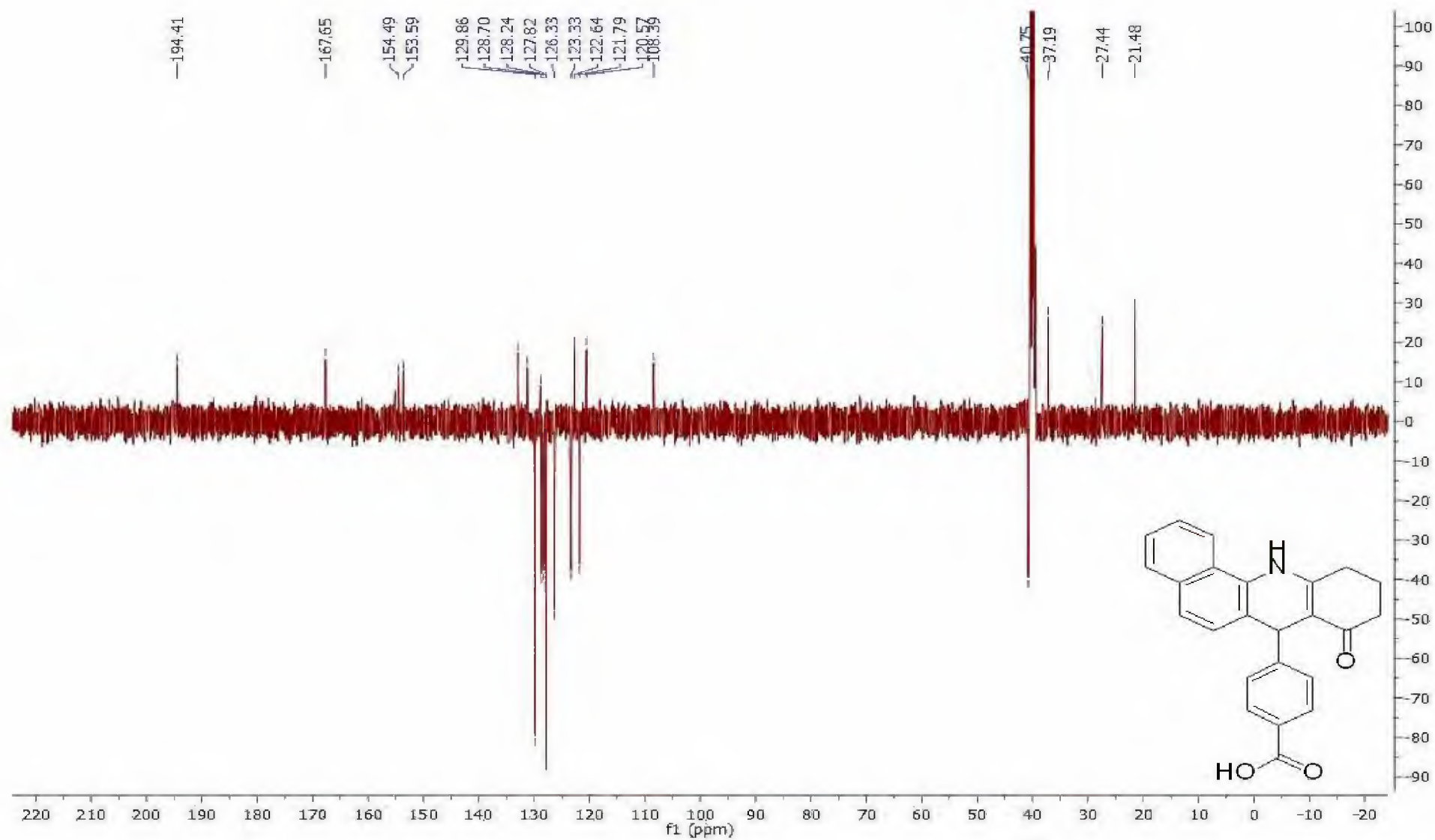
Anexo 26: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 10 em DMSO-d6 a 500 MHz.



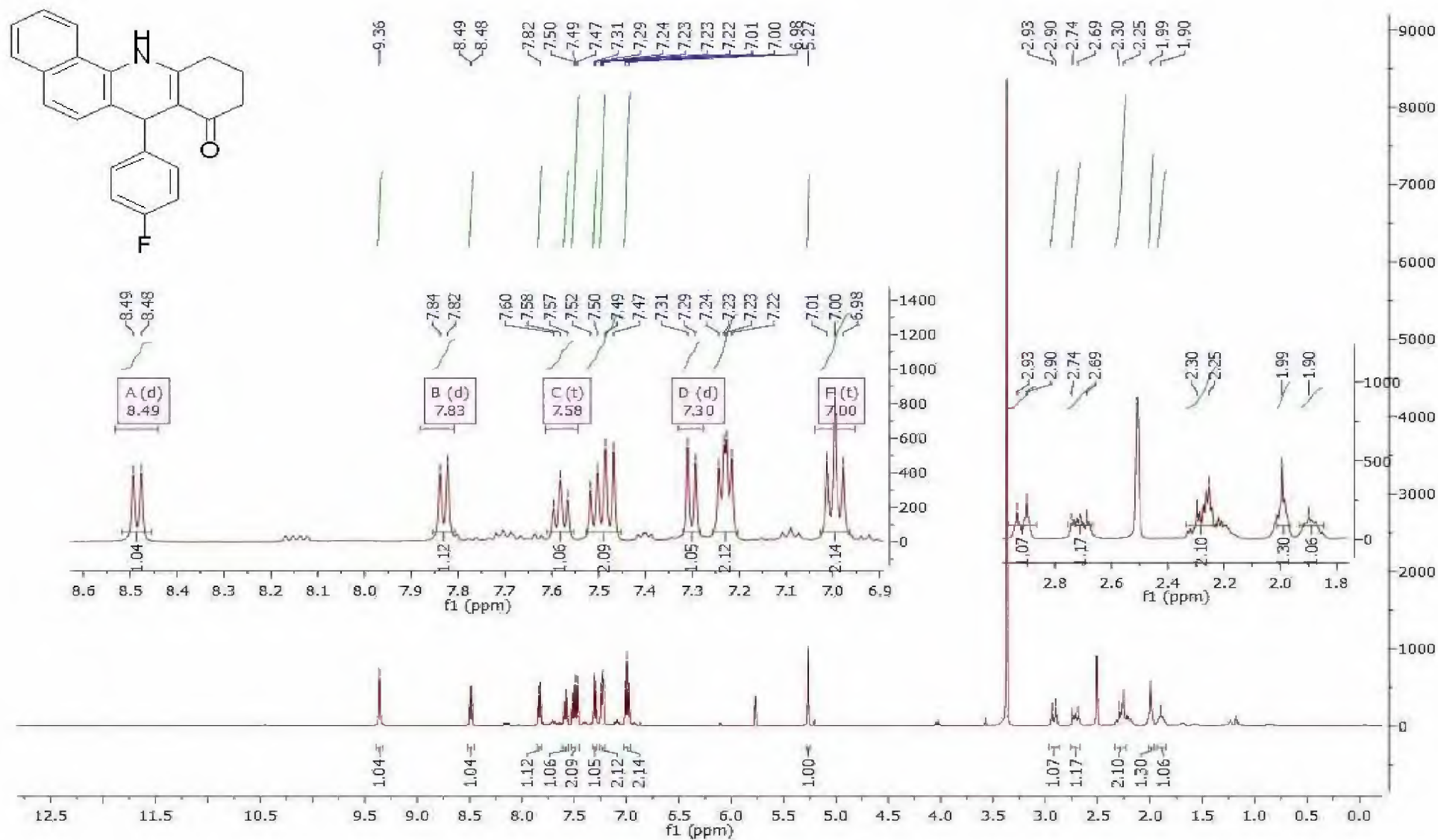
Anexo 27: Espectro de RMN ^1H da molécula 11 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



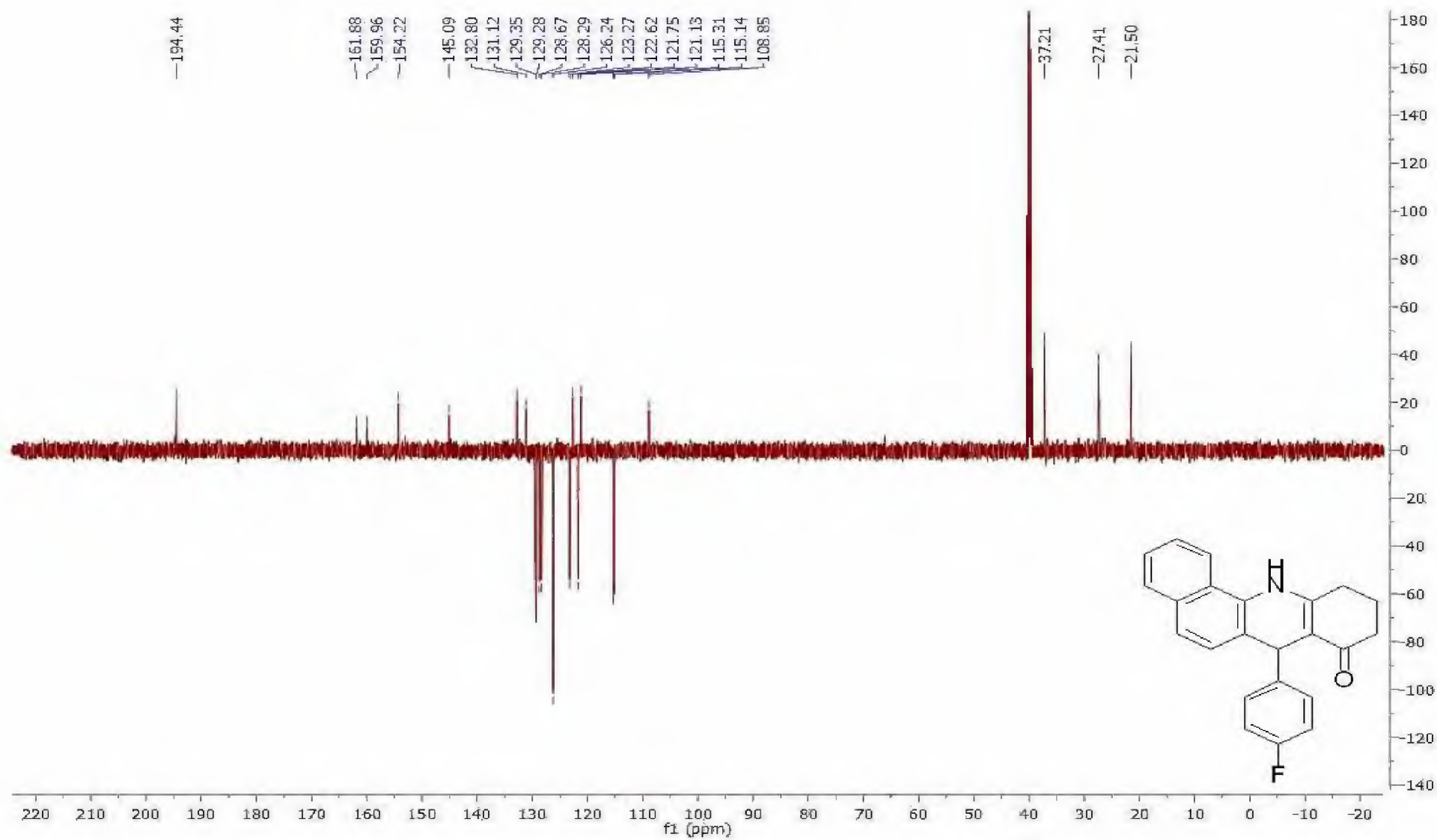
Anexo 28: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 11 em DMSO-d $_6$ a 500 MHz.



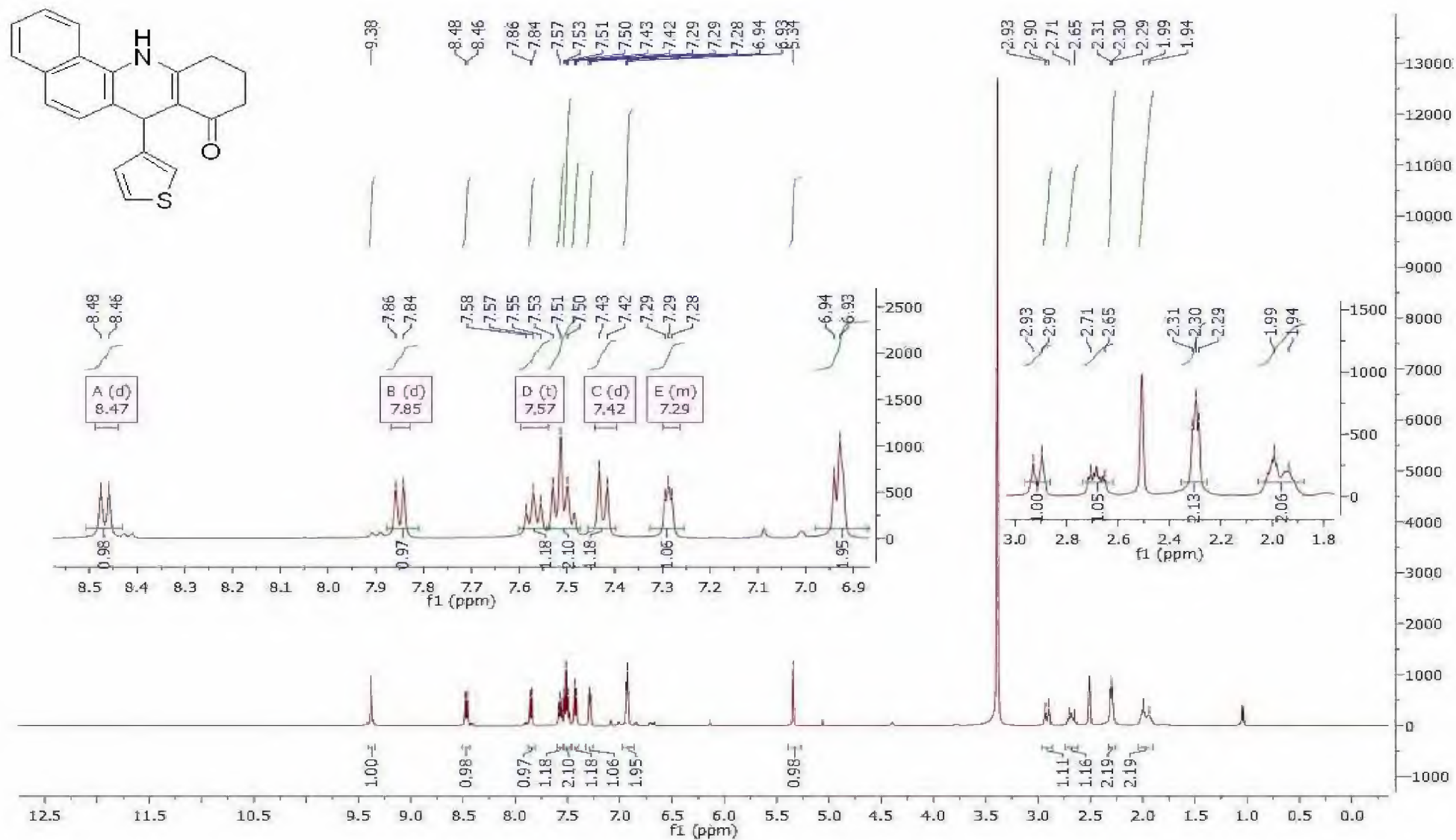
Anexo 29: Espectro de RMN ^1H da molécula 12 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



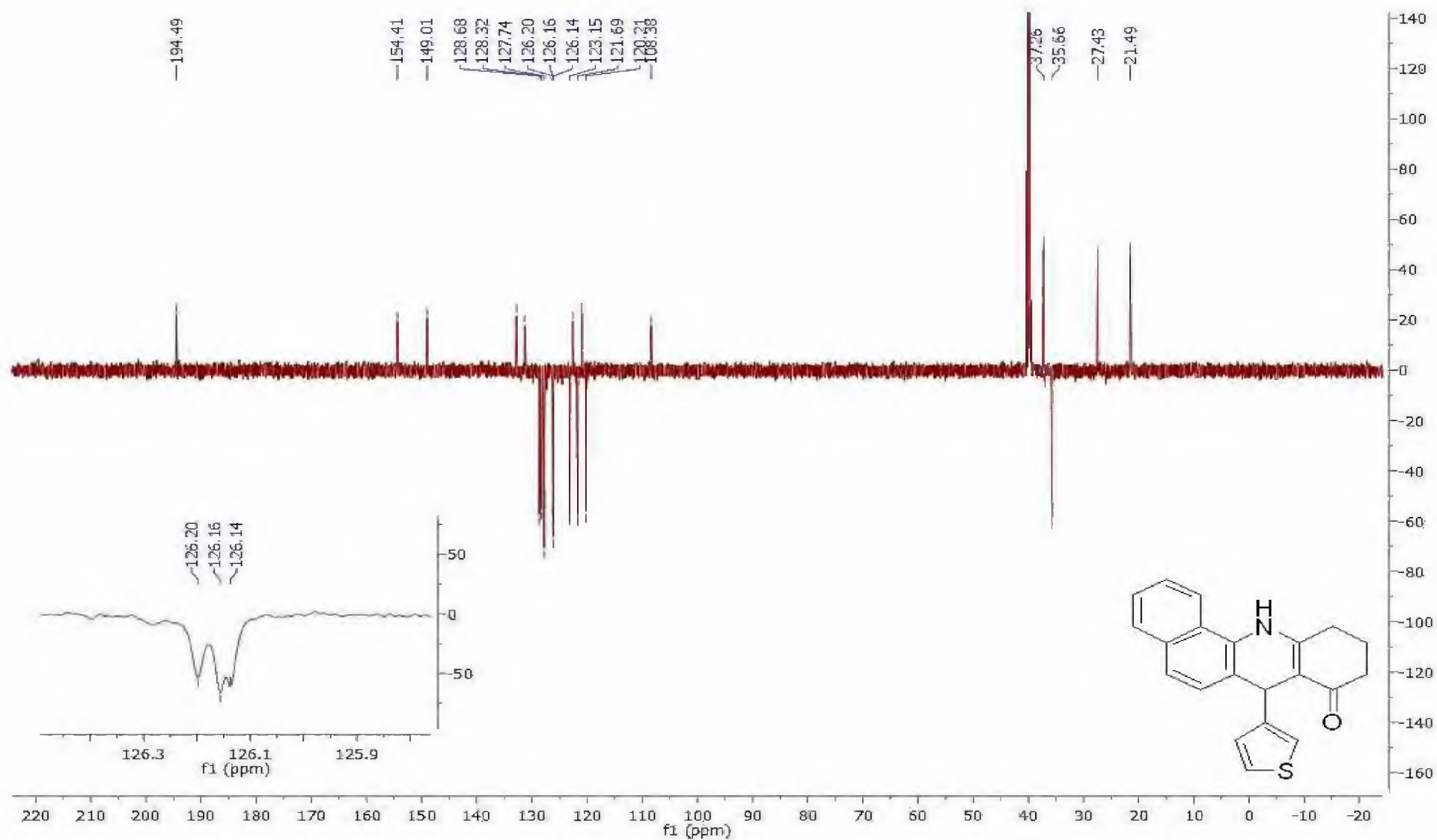
Anexo 30: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 12 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



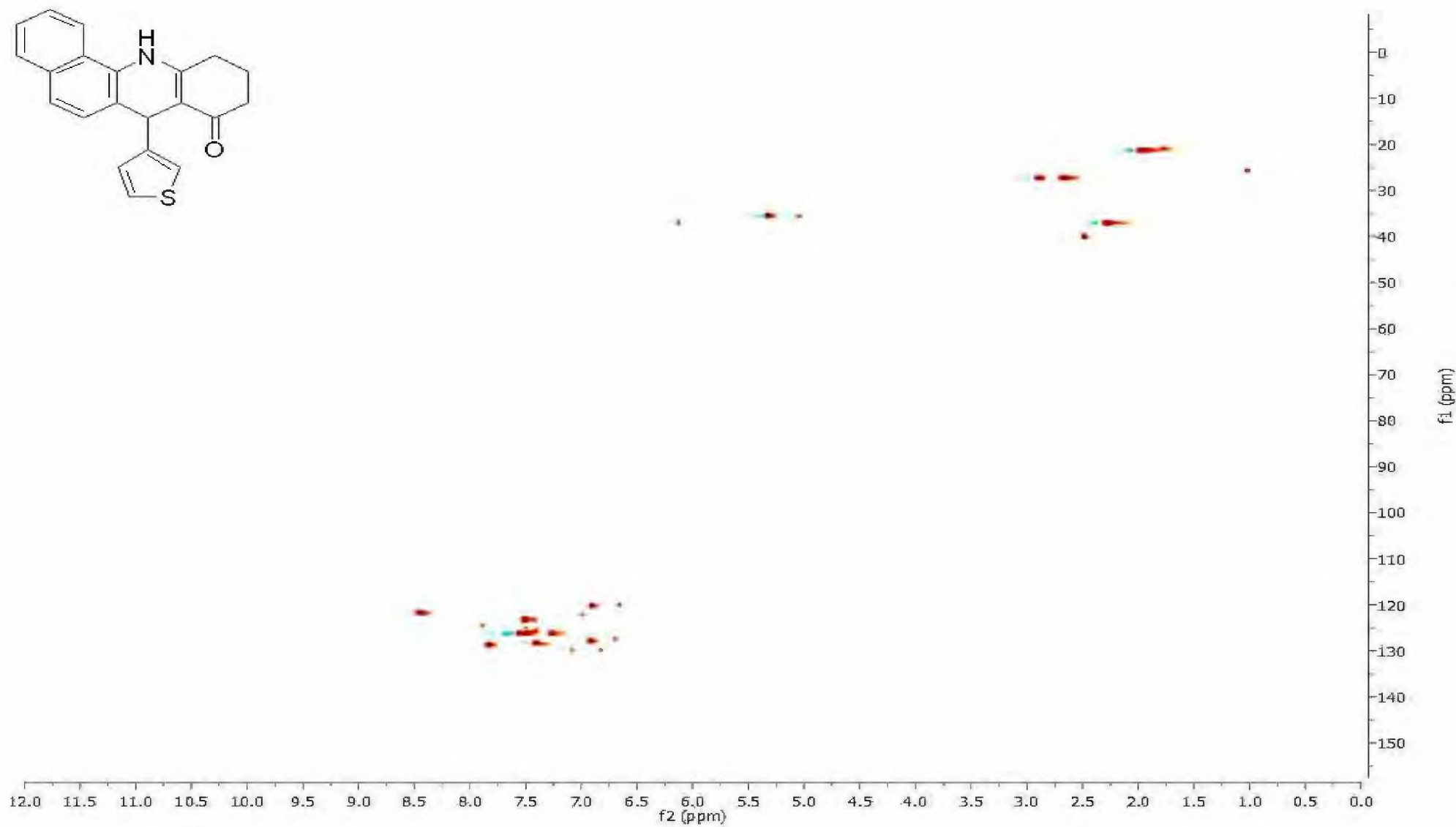
Anexo 31: Espectro de RMN ^1H da molécula 13 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



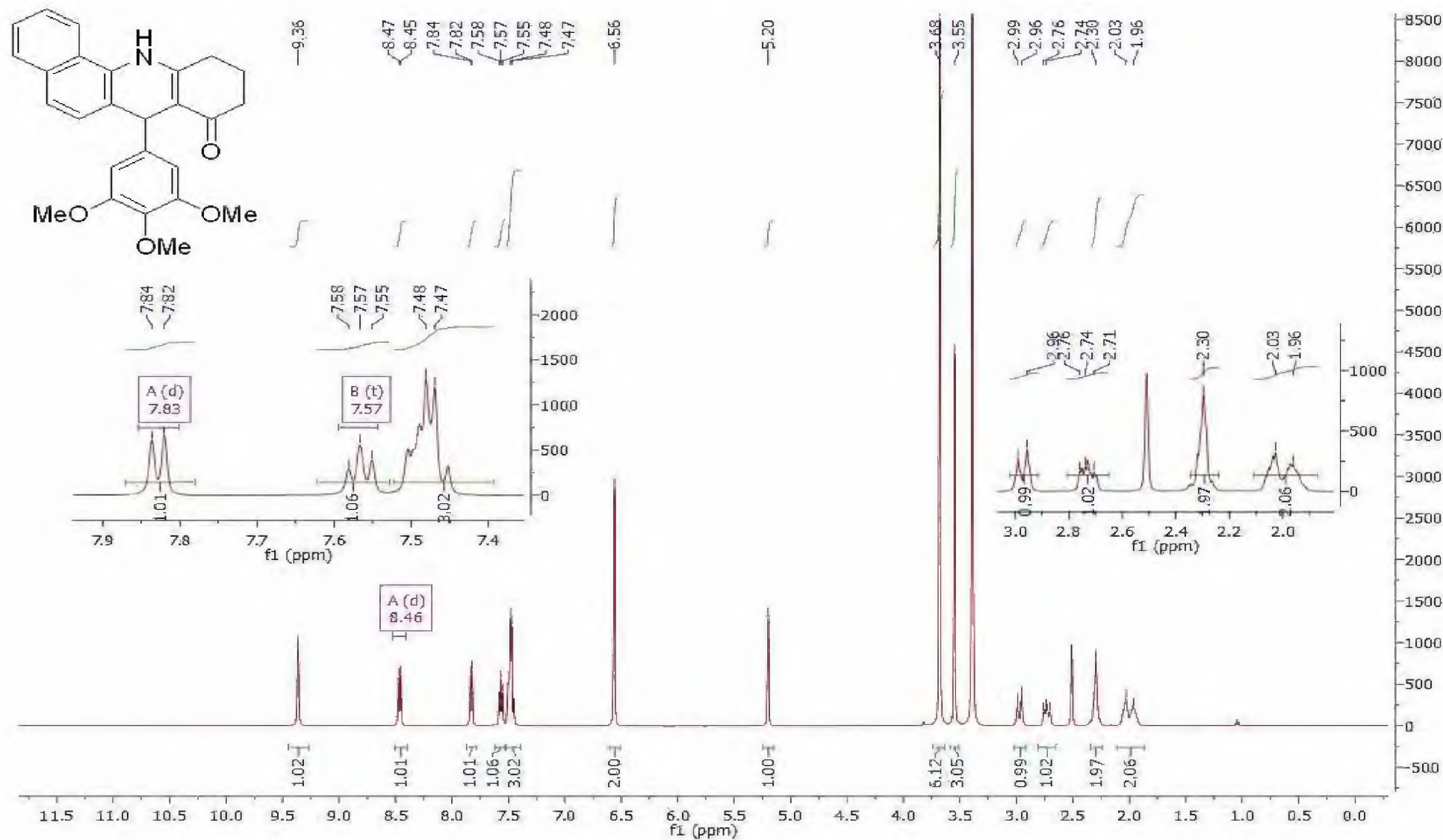
Anexo 32: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 13 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



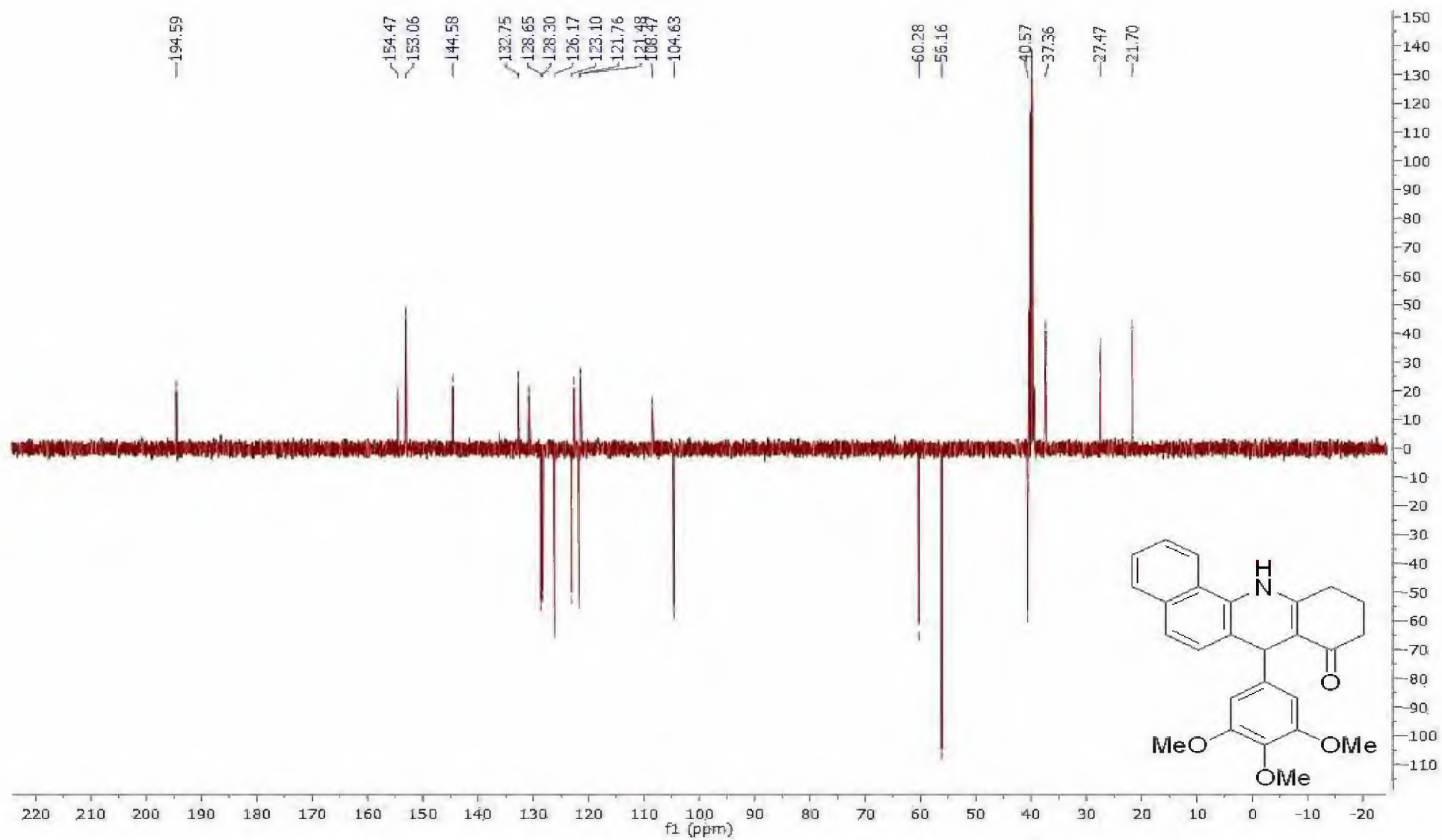
Anexo 33: Espectro de RMN HSQC da molécula 13 em DMSO-d6 a 500 MHz.



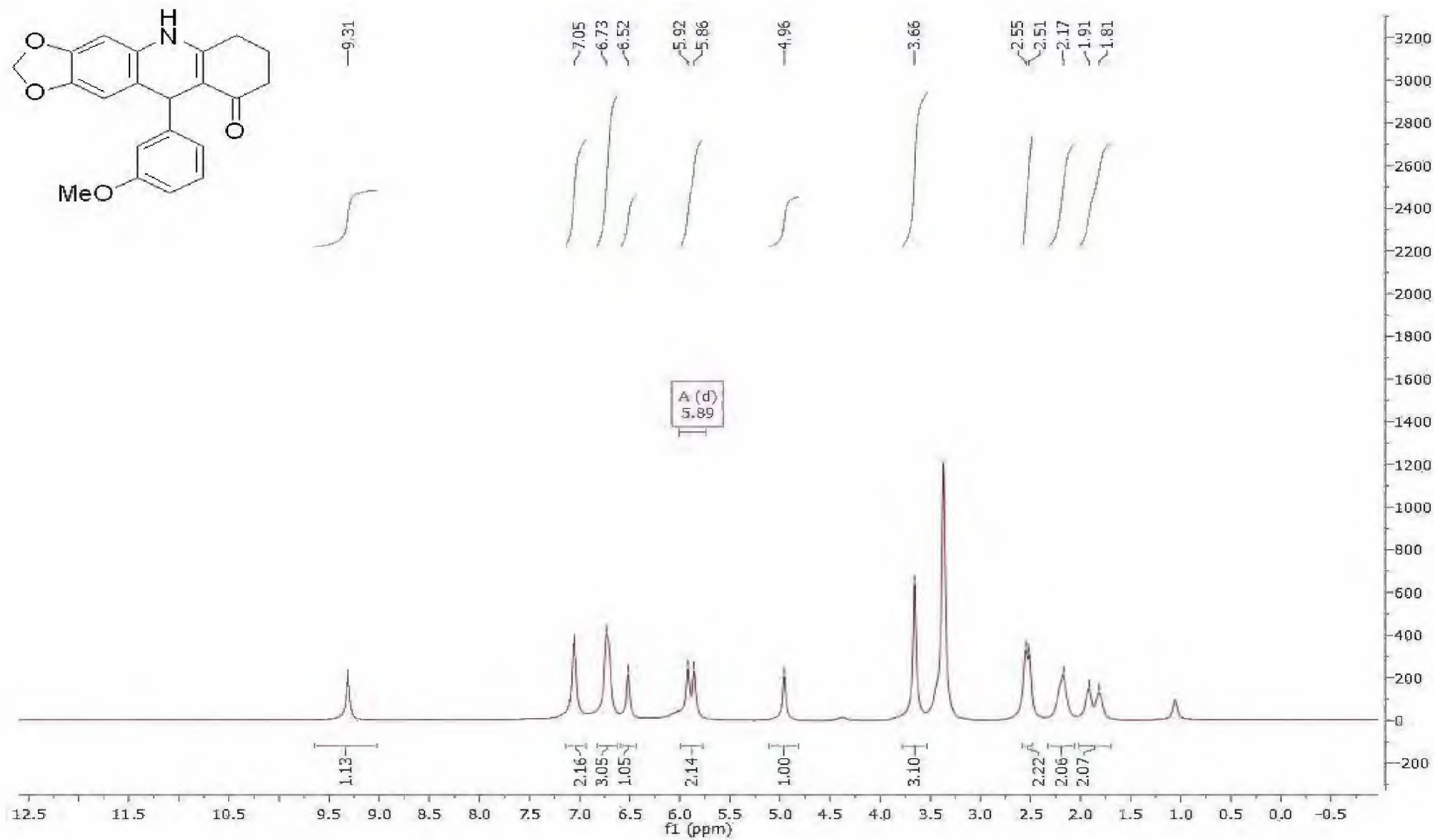
Anexo 34: Espectro de RMN ^1H da molécula 14 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



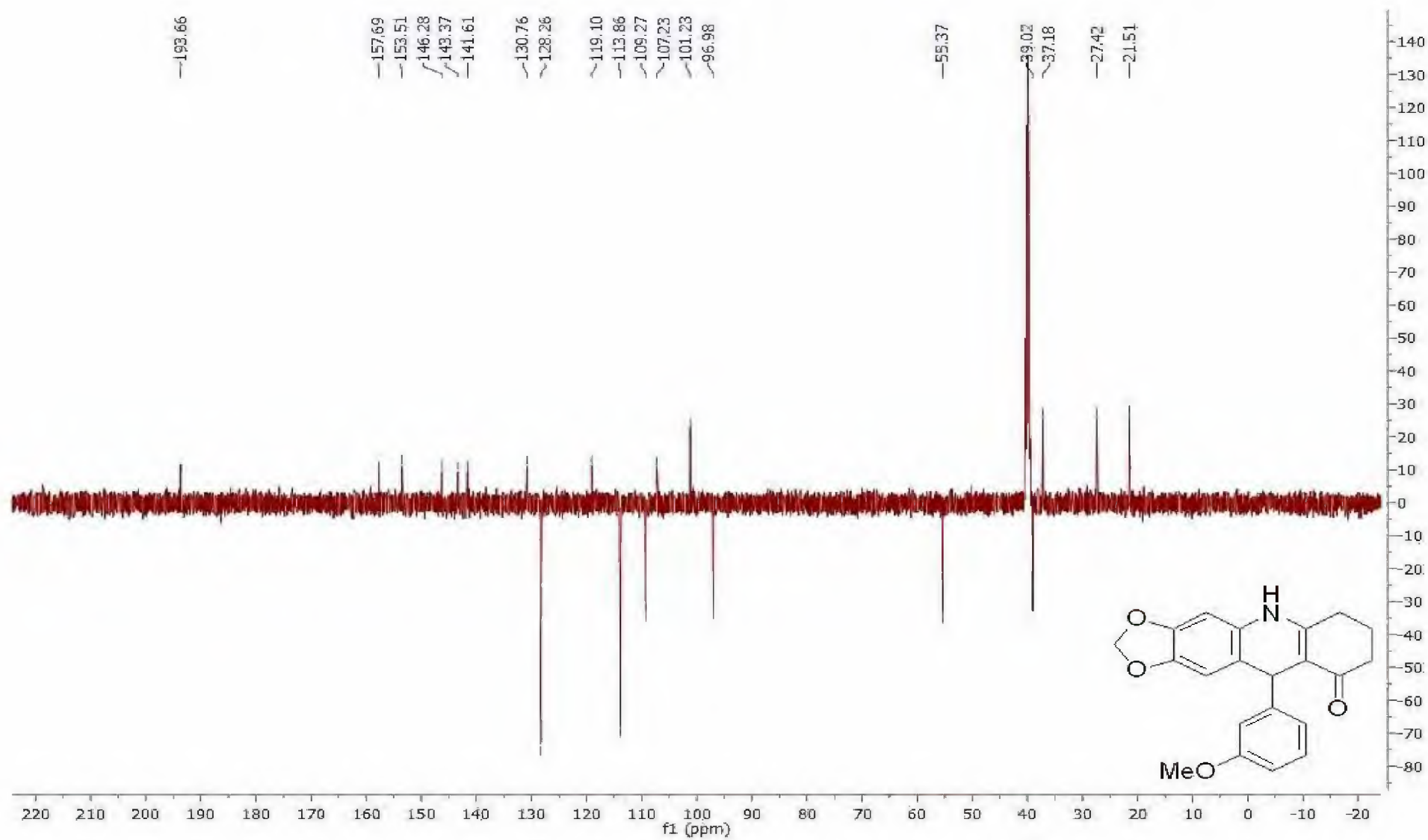
Anexo 35: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 14 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



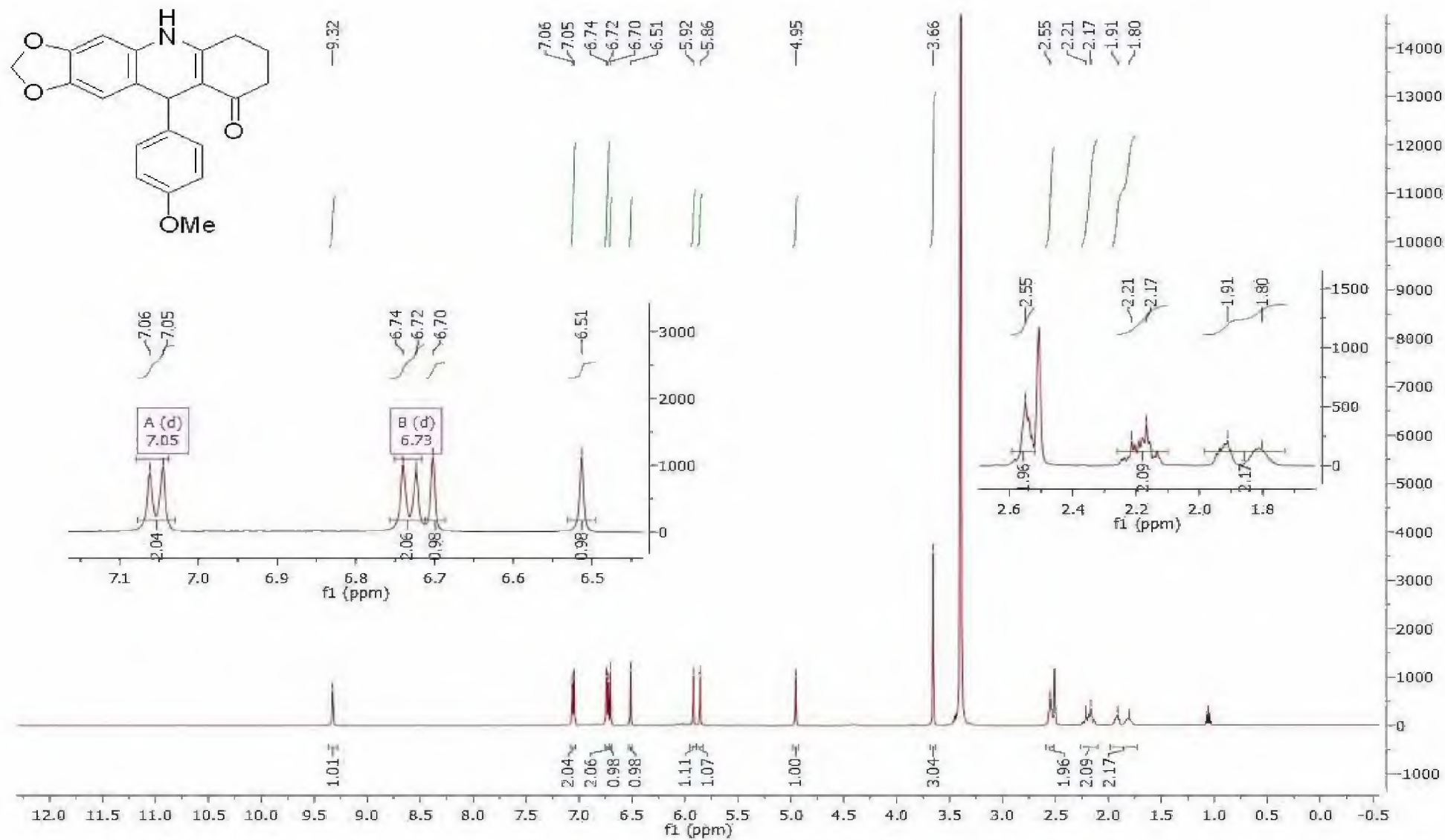
Anexo 36: Espectro de RMN ^1H da molécula 15 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



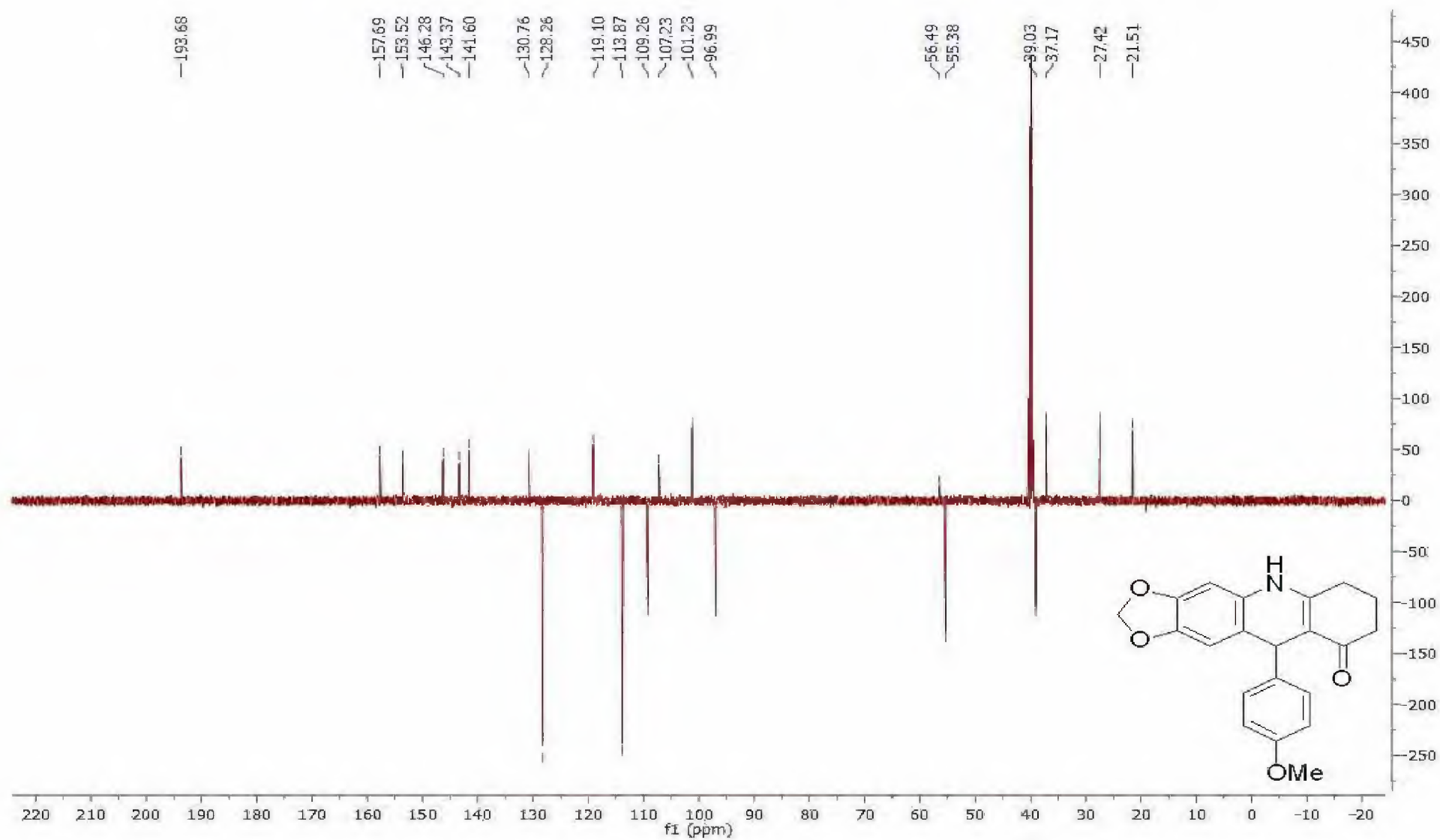
Anexo 37: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 15 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



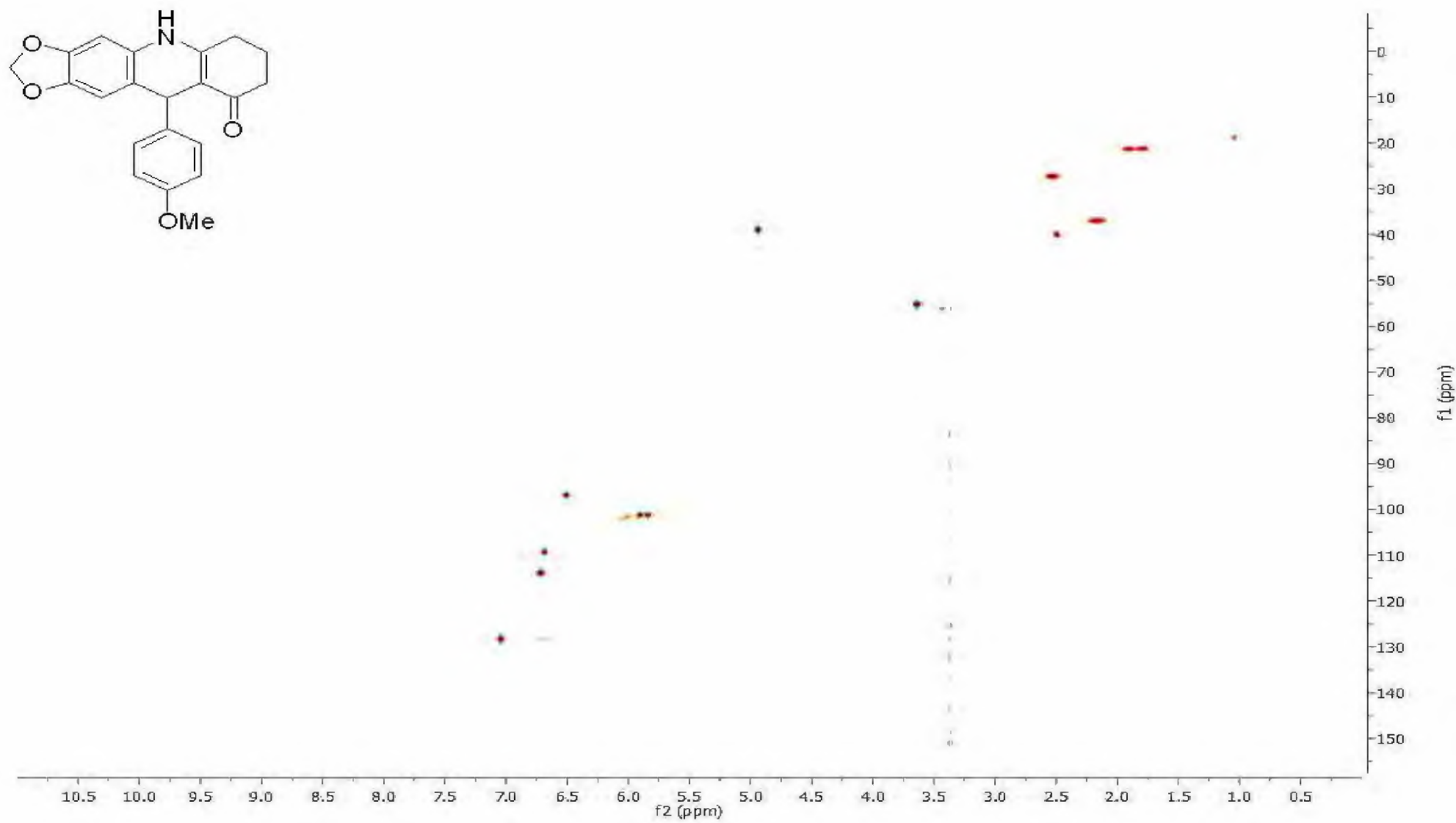
Anexo 38: Espectro de RMN ^1H da molécula 16 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



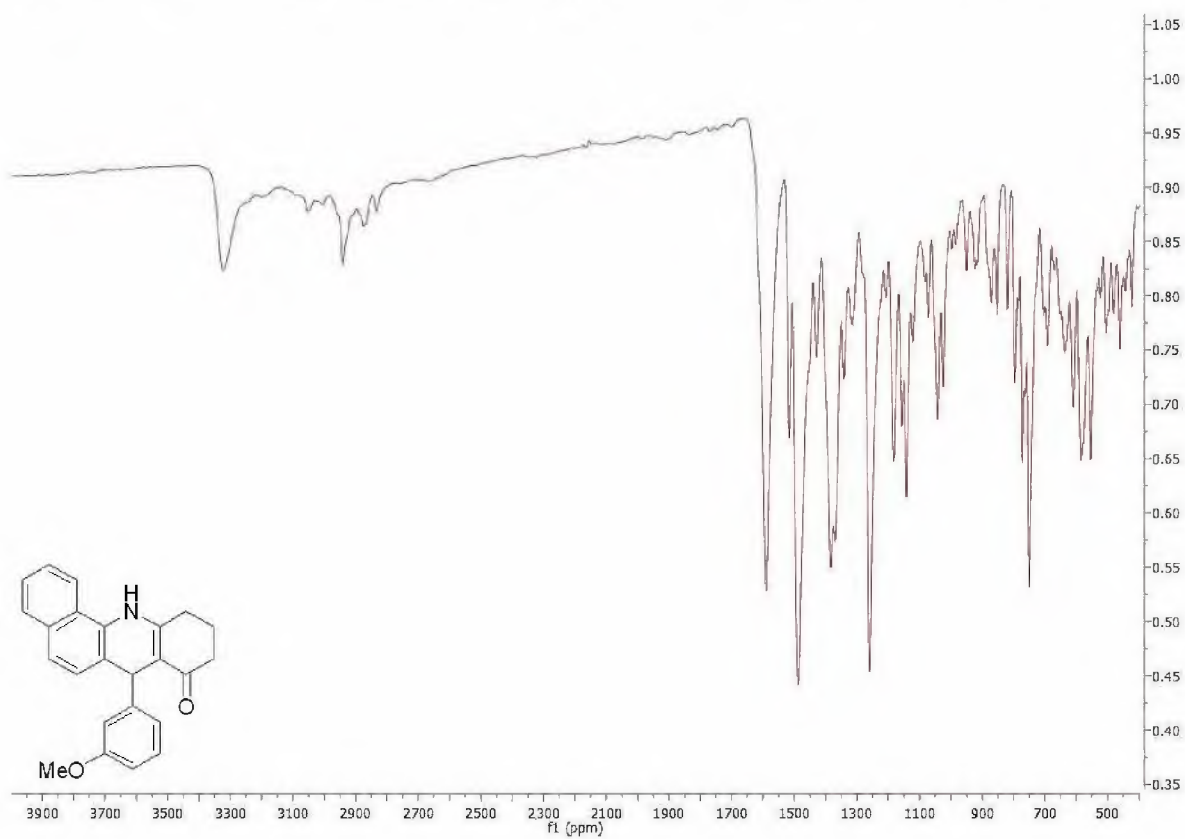
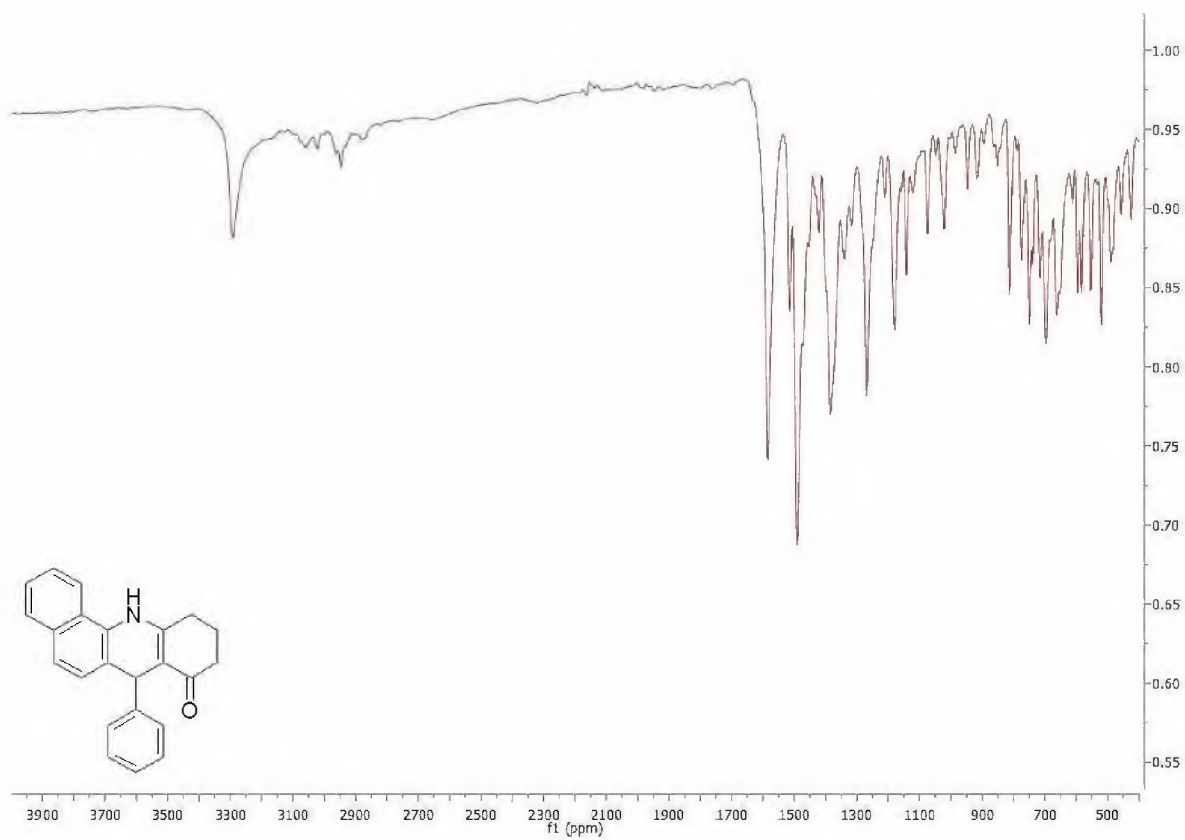
Anexo 39: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 16 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



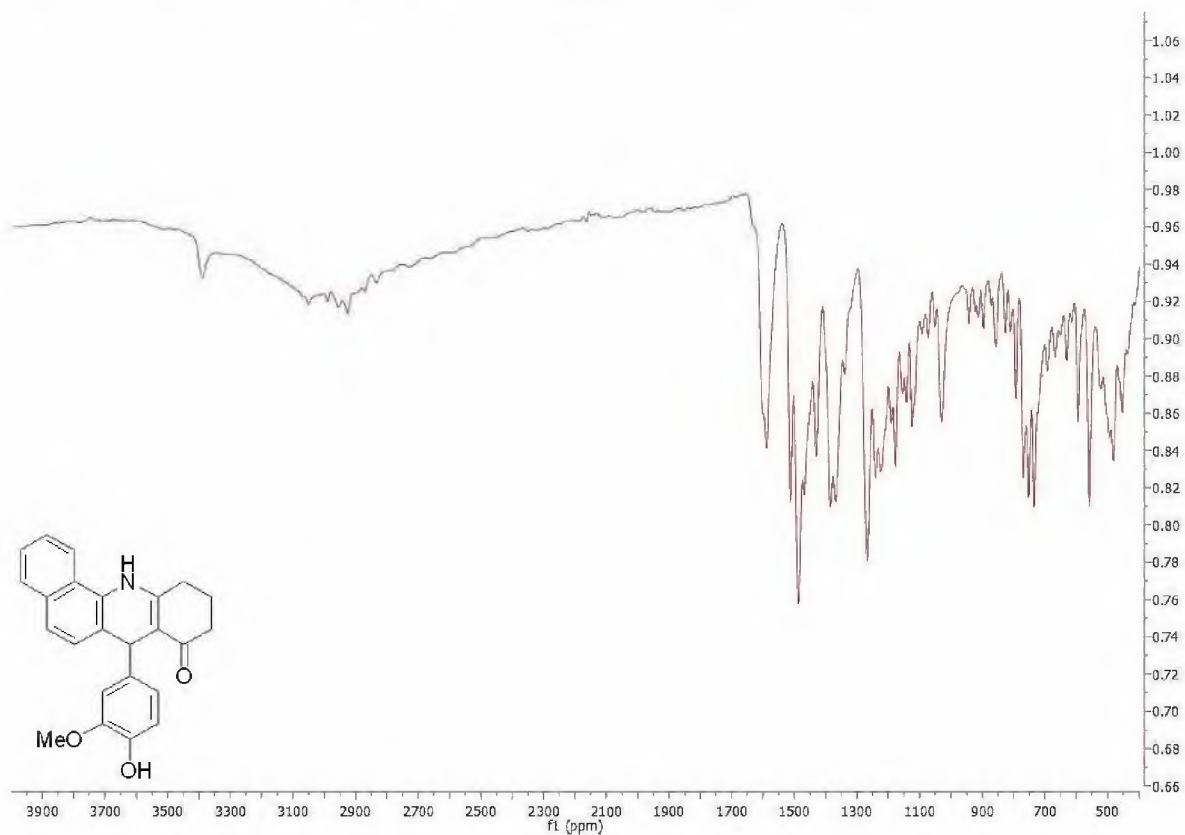
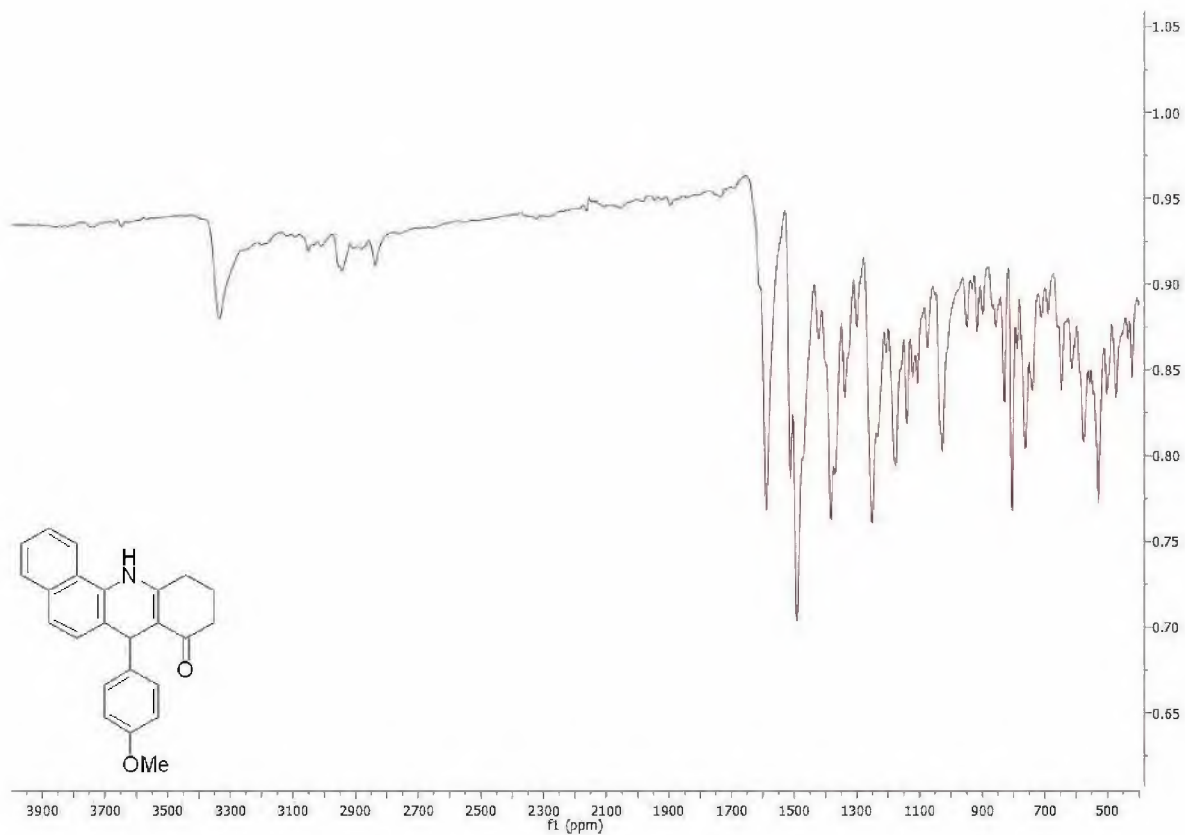
Anexo 40: Espectro de RMN HSQC da molécula 16 em DMSO-d6 a 500 MHz.



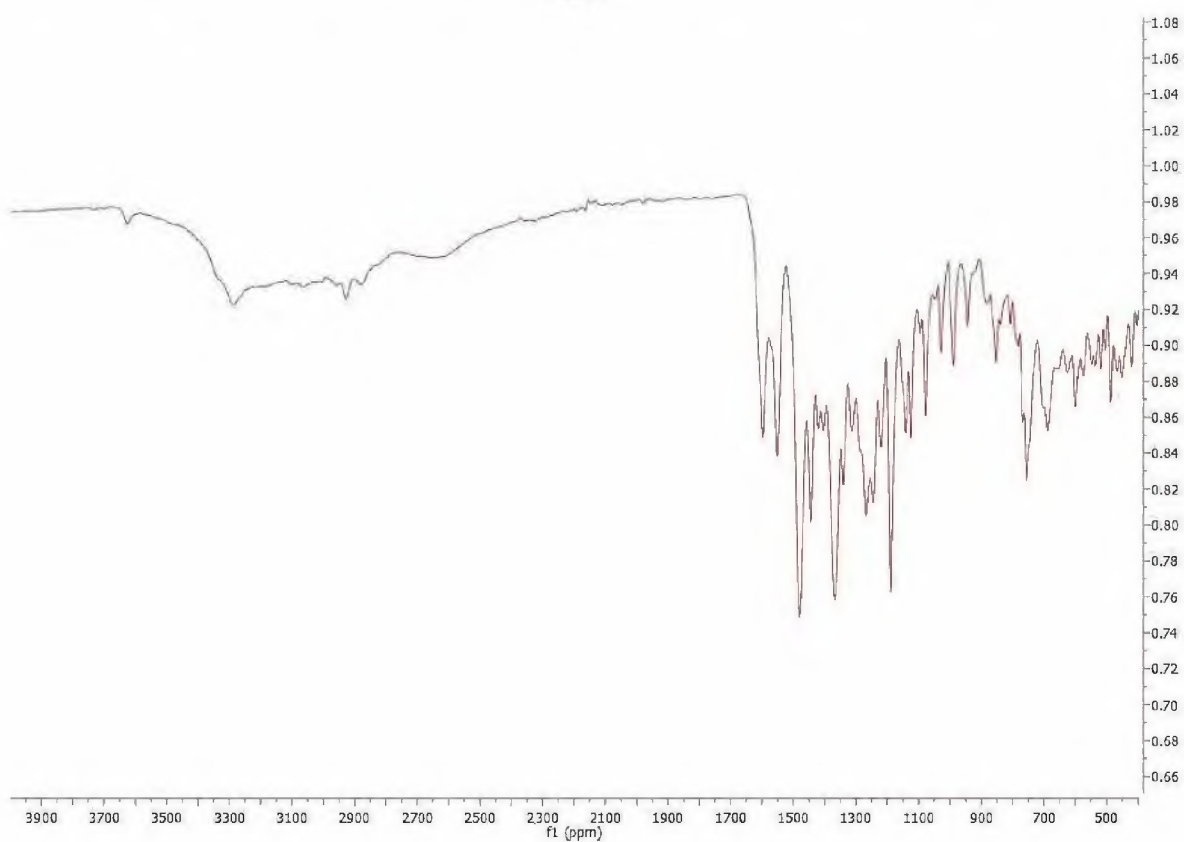
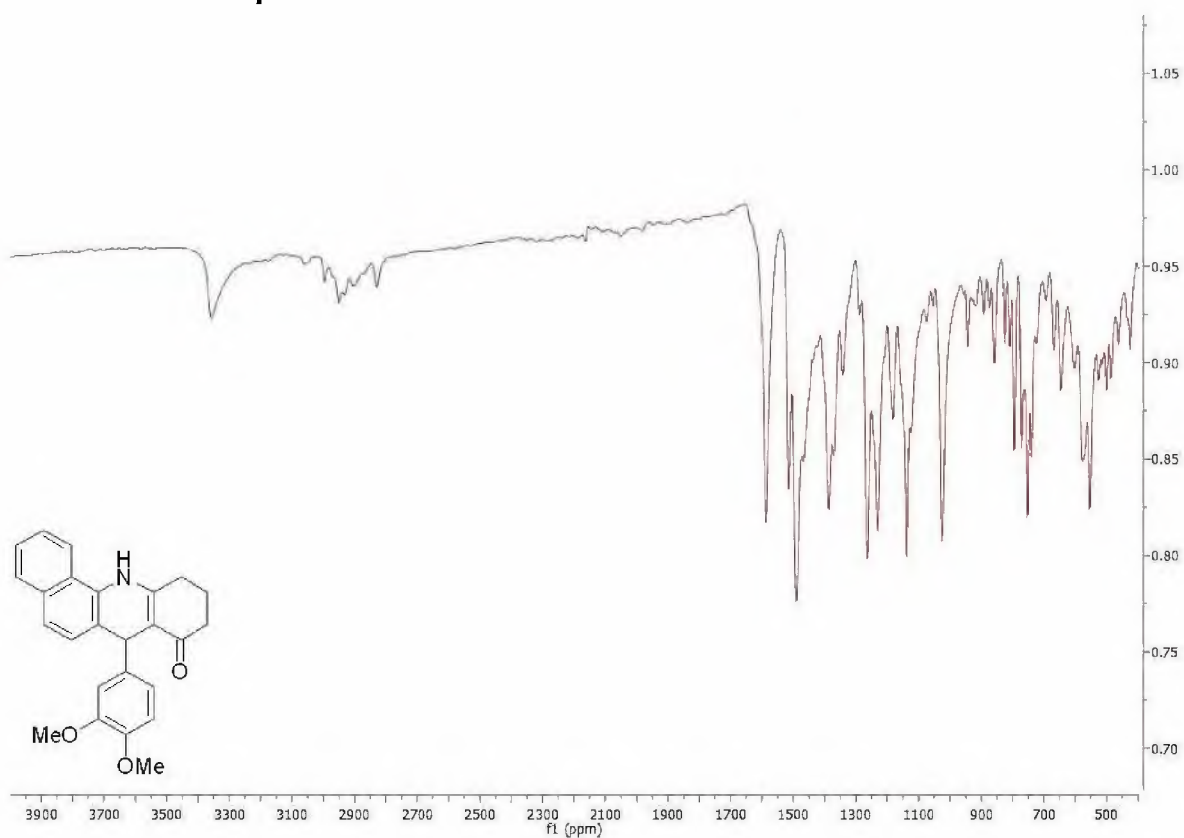
Anexo 41: Espectro de IV das moléculas 1 e 2.



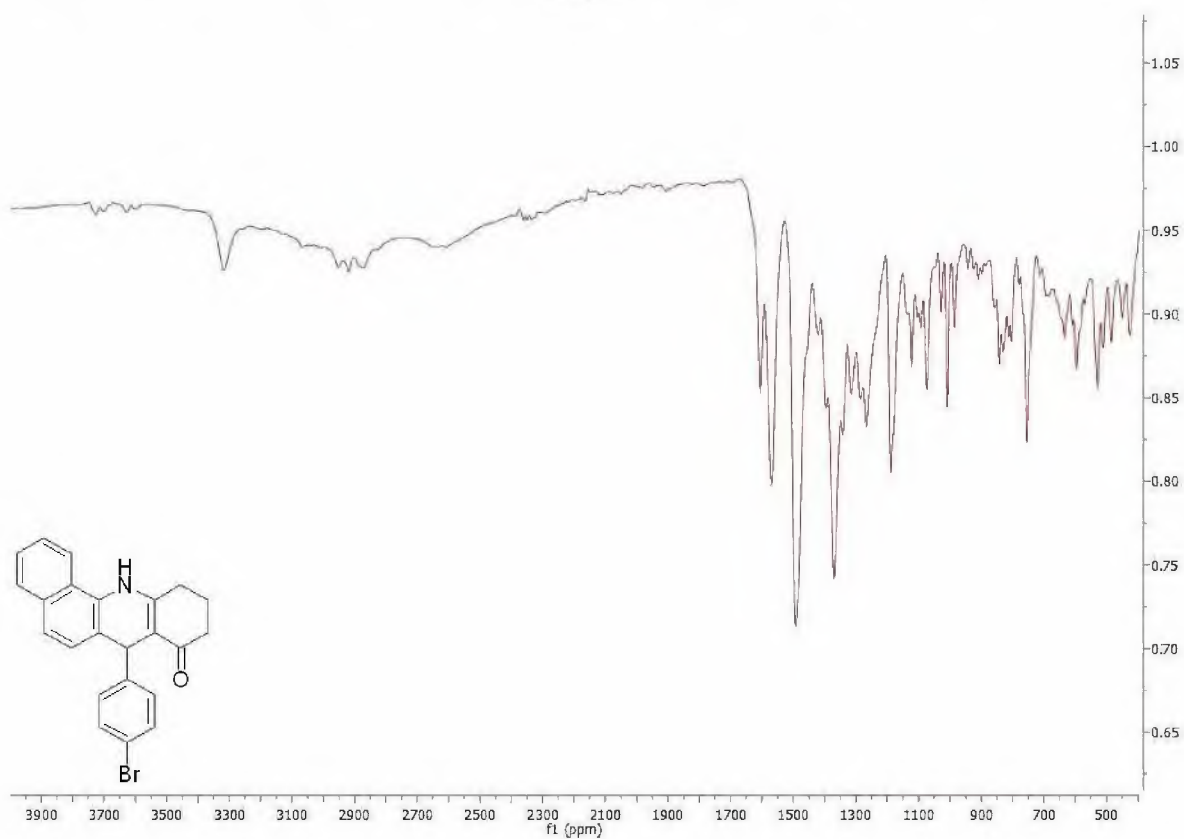
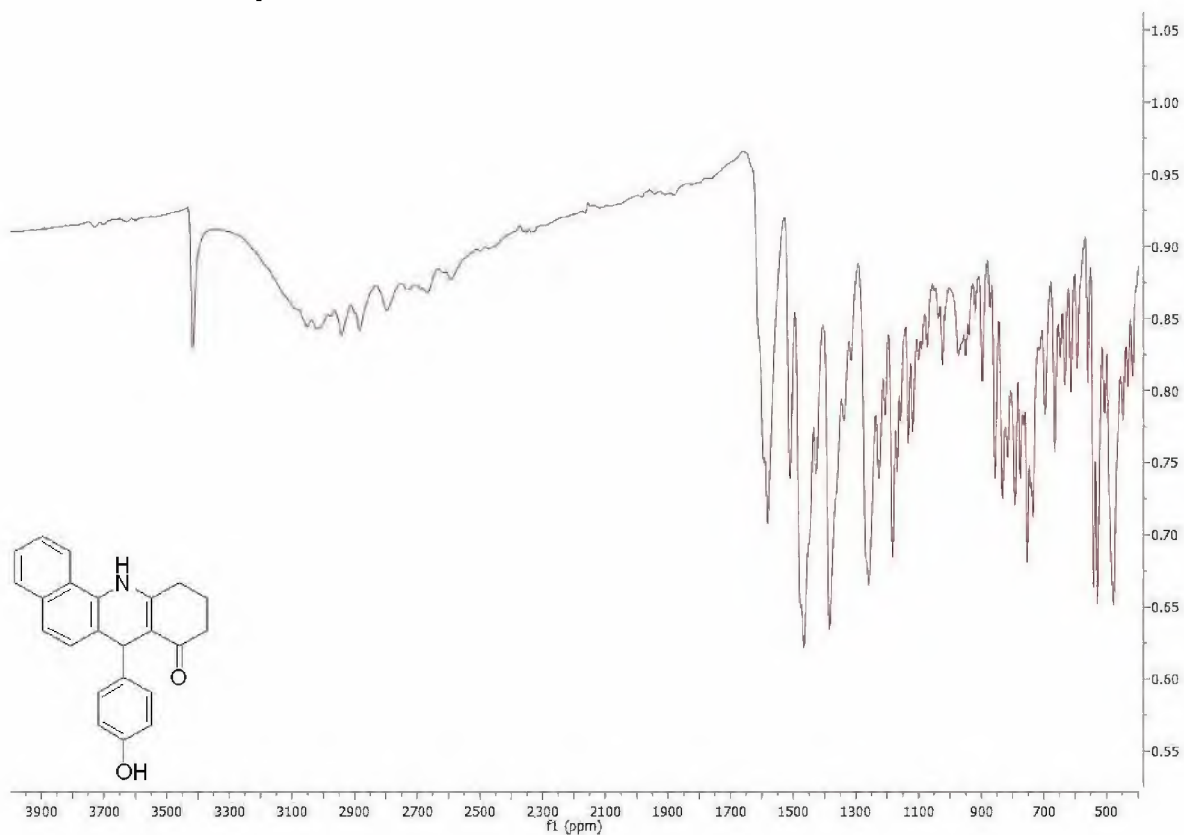
Anexo 42: Espectro de IV das moléculas 3 e 4.



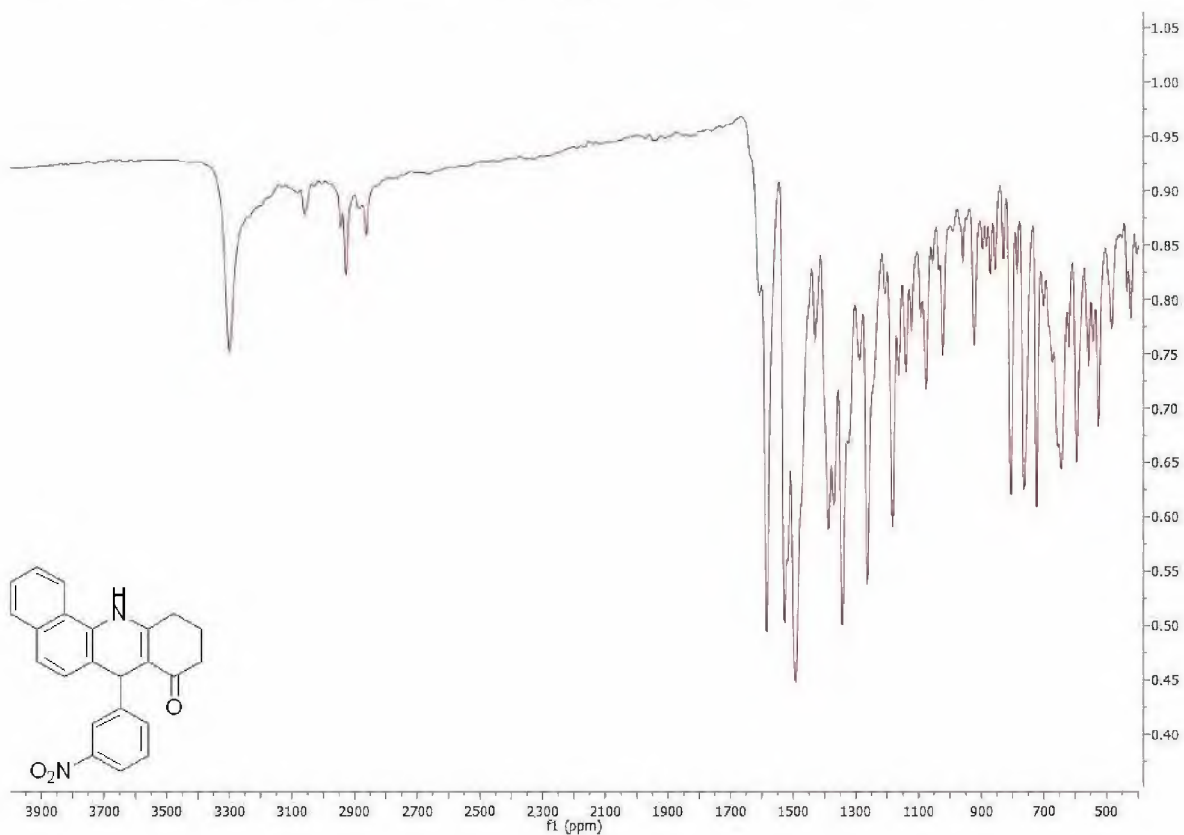
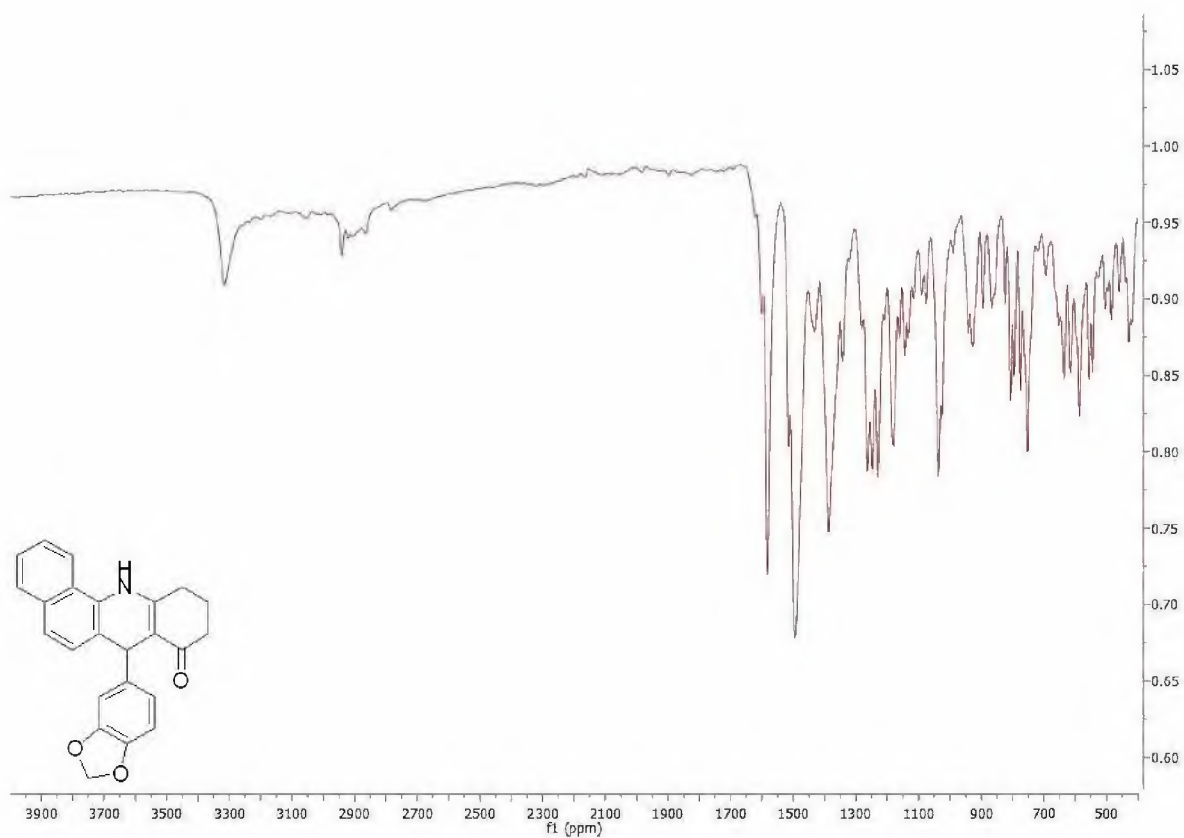
Anexo 43: Espectro de IV das moléculas 5 e 6.



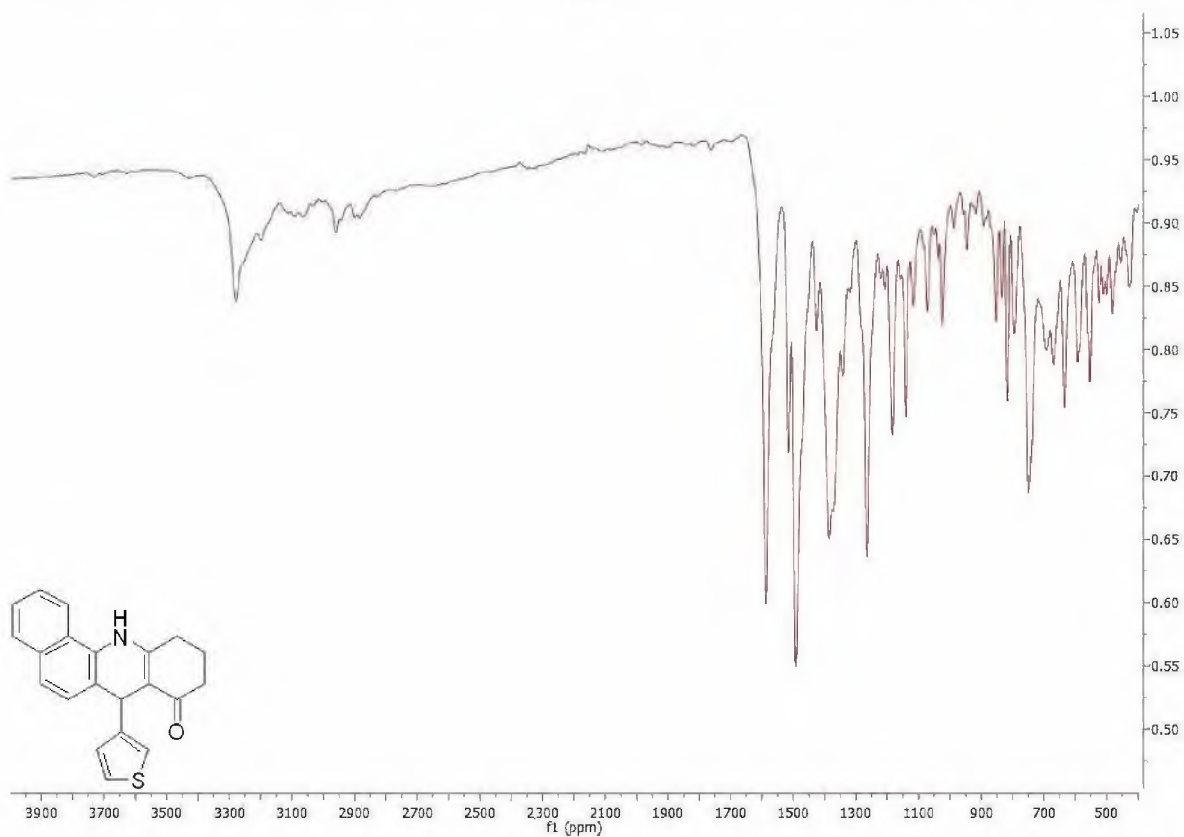
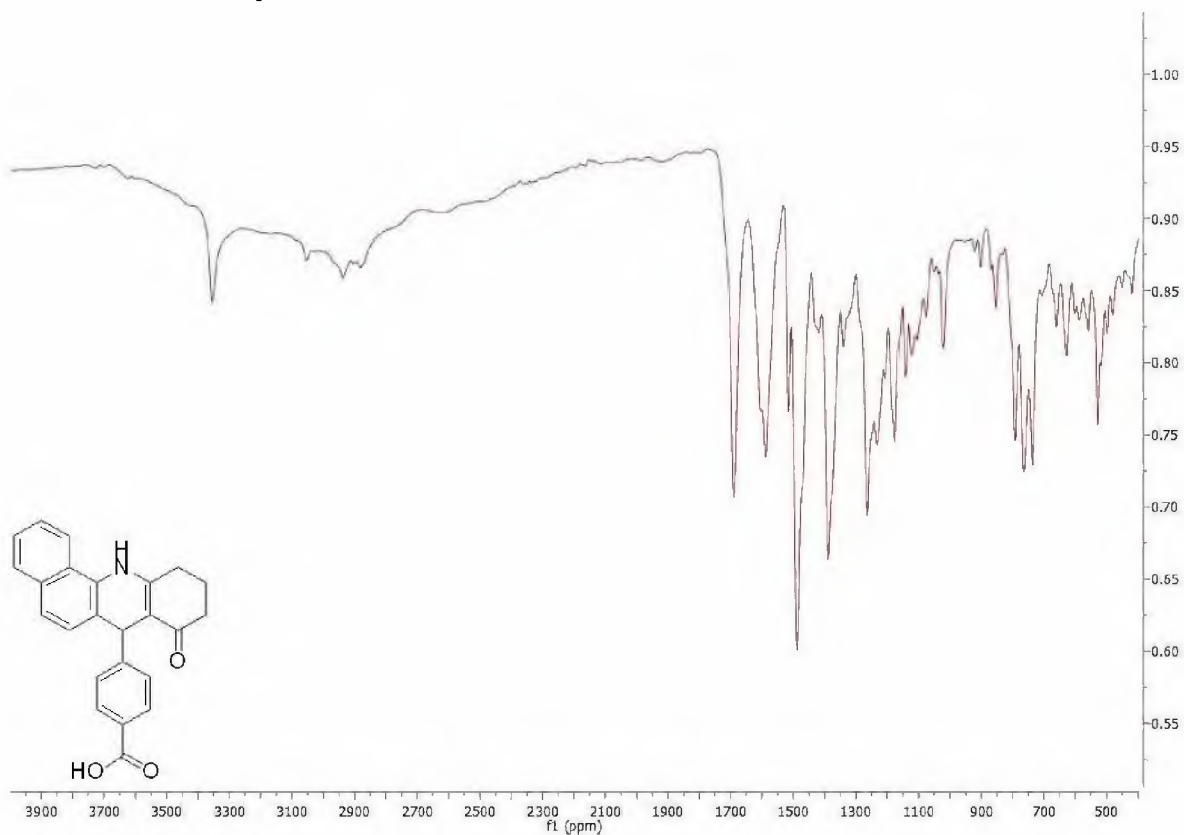
Anexo 44: Espectro de IV das moléculas 7 e 8.



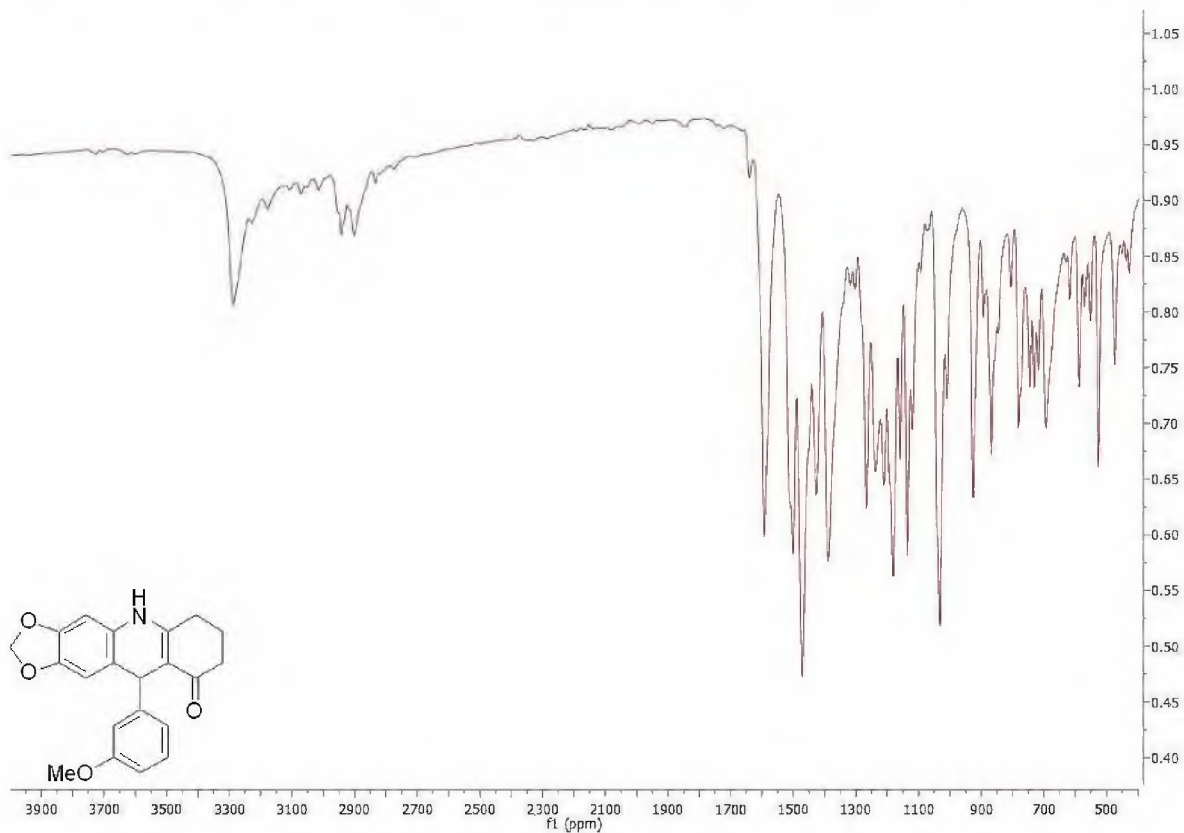
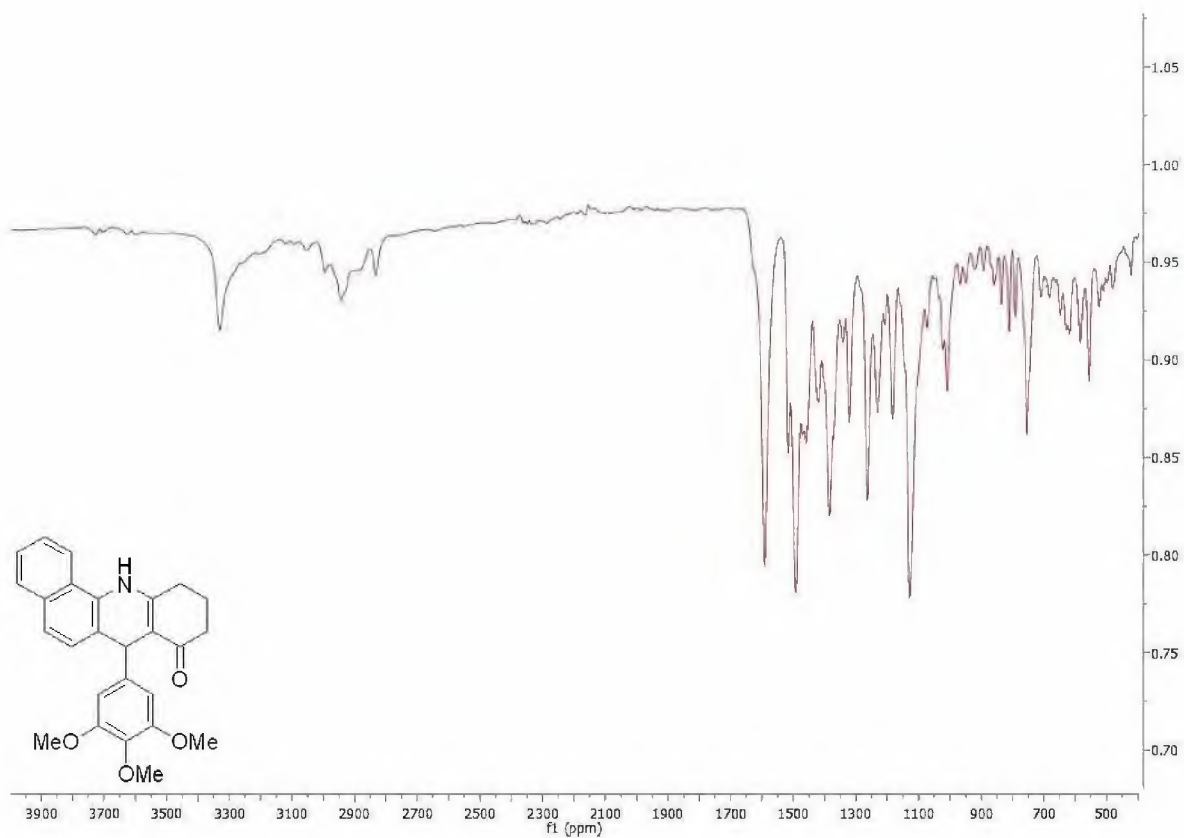
Anexo 45: Espectro de IV das moléculas 9 e 10.



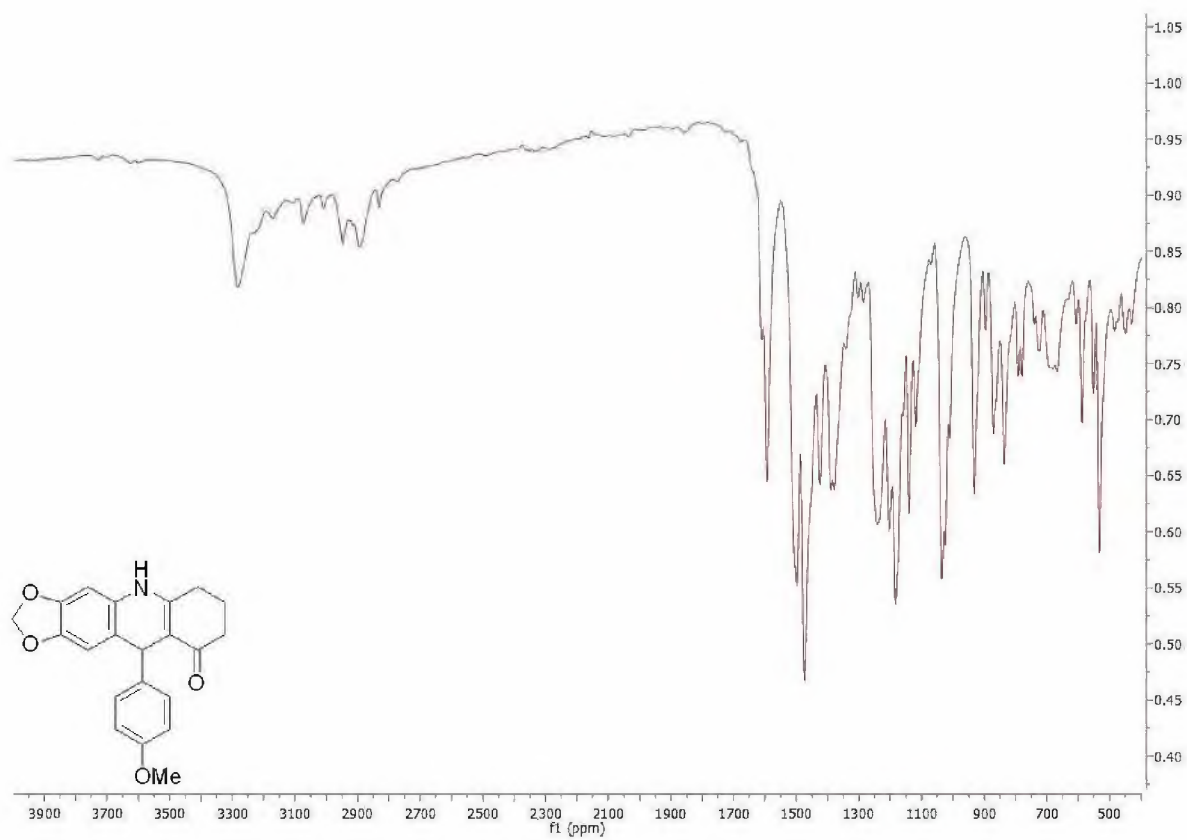
Anexo 46: Espectro de IV das moléculas 11 e 13.



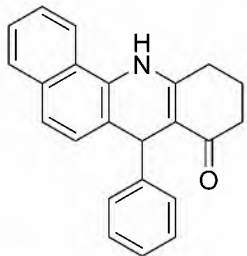
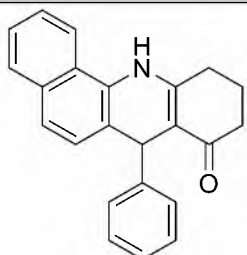
Anexo 47: Espectro de IV das moléculas 14 e 15.

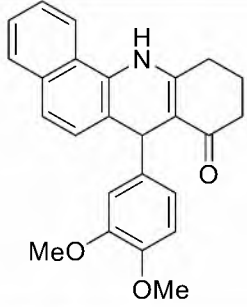
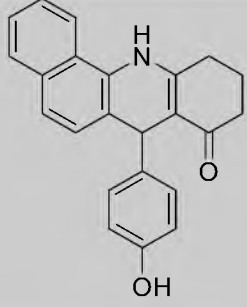


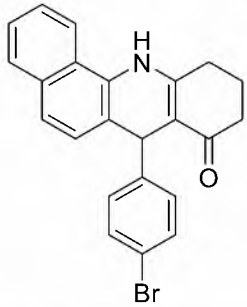
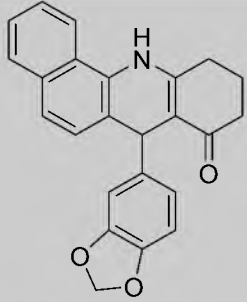
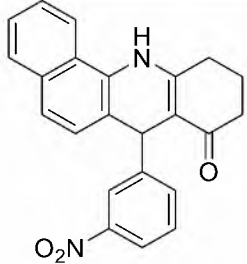
Anexo 48: Espectro de IV da molécula 16.

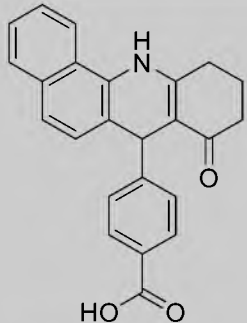
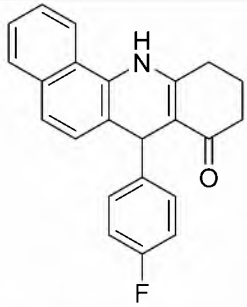


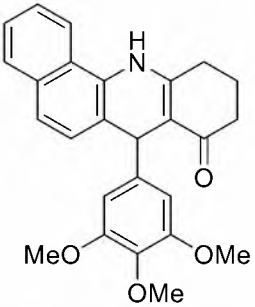
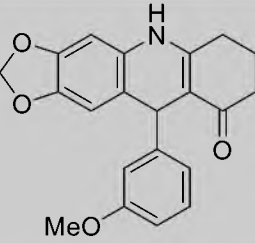
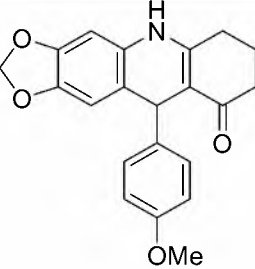
Anexo 49: Moléculas obtidas e caracterizada do capítulo I e atividades relacionadas a cada uma.

Molécula	Estrutura	CI ₅₀ (μM)		Permeabilidade	BBB	Atividade Antioxidante
		AChE	BChE			
1		4,01±0,57	>10	-	-	1,68±0,21
2		9,22±0,41	>10 (44%)	-	-	1,87±0,33
3		5,06±0,53	3,12±0,05	12,3±1,3	SNC+	1,85±0,14

4		7,33±0,50	>10	0,4±0,4	SNC-	2,91±0,41
5		>10 (43%)	1,75±0,12	6,4±0,4	SNC+	2,39±0,17
7		9,33±0,61	4,94±0,20	7,1±3,0	SNC+	3,20±0,04

8		5,21±0,68	3,61±0,43	14,2±7,6	SNC+	1,28±0,09
9		7,30±0,19	3,74±0,32	-	-	1,60±0,20
10		6,41±0,25	1,97±0,09	5,9±6,5	SNC+	1,26±0,15

11		>10 (43%)	>10	0,3±0,1	SNC-	1,94±0,01
12		8,13±0,53	>10	2,3±2,1	SNC+/SNC-	1,70±0,08
13		7,96±0,39	2,44±0,36	5,5±0,1	SNC+	1,48±0,10

14		>10 (44%)	0,99±0,12	2,9±0,8	SNC+/SNC-	1,21±0,13
15		8,86±0,25	>10	5,4±3,3	SNC+	0,95±0,07
16		8,46±0,64	>10	6,2±0,5	SNC+	0,97±0,09

Anexo 50: Tabela com as interações principais das acridinonas em acetilcolinesterase

Molécula	Enantiômero	Score	Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	
				Empilhamento π - π	π -alquil
1	R	68.46		TYR ³⁴¹ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷ ; TRP ⁸⁶	
	S	77.51	TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ¹²⁴	TRP ⁸⁶
2	R	71.03	TRP ⁸⁶	TYR ¹²⁴ ; TYR ³⁴¹ ; TYR ³³⁷	TYR ⁴⁴⁹ ; TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷
	S	68.78	TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷	TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷ ; TRP ⁸⁶	TYR ⁴⁴⁹ ; TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷
3	R	68.20	TYR ³⁴¹	TYR ¹²⁴ ; TYR ³⁴¹ ; TRP ⁸⁶	PHE ²⁹⁷ ; PHE ³³⁸ ; TRP ⁸⁶ ; TRP ⁴³⁹
	S	65.77	TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ¹²⁴	TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TRP ⁴³⁹ ; PRO ⁴⁴⁶ ; TYR ⁴⁴⁹
4	R	69.77	TYR ⁴⁴⁹ ; TRP ⁸⁶ ; GLY ⁸²	TYR ¹²⁴ ; TYR ³⁴¹ ; TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; HIS ⁴⁴⁷
	S	74.01	GLY ⁸² ; TRP ⁸⁶	TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷
5	R	69.45		TRP ⁸⁶ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³⁴¹	TYR ⁷² ; TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷
	S	64.28		TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TYR ¹²⁴ ; PHE ²⁹⁷ ; TYR ³³⁷ ; PHE ³³⁸ ; TYR ³⁴¹
7	R	67.88	TYR ⁴⁴⁹ ; TRP ⁸⁶ ; GLY ⁸²	TYR ¹²⁴ ; TYR ³⁴¹ ; TYR ³³⁷	
	S	69.02	GLY ⁸²	TYR ¹²⁴ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TYR ¹²⁴
8	R	67.41	TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³⁴¹ ; TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TRP ⁴³⁹ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³⁴¹
	S	65.23	TYR ¹²⁴	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³⁴¹
9	R	66.72	TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³⁴¹	TYR ⁷² ; TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; HIS ⁴⁴⁷

	S	70.54		TRP ⁸⁶ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷ ; TRP ⁴³⁹ ; TYR ⁴⁴⁹
10	R	69.66	TYR ⁴⁴⁹ ; TRP ⁸⁶ ; TRP ⁴³⁹	TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷	
	S	76.72	TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TYR ⁷² ; TYR ¹²⁴
11	R	67.22		TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TYR ⁷² ; TYR ¹²⁴
	S	57.30		TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷	
12	R	67.76	TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; TRP ⁴³⁹
	S	69.69	TRP ⁴³⁹	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷	
13	R	63.96		TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³⁴¹	
	S	70.20	TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶
14	R	64.40		TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TYR ⁷² ; TYR ¹²⁴ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; PHE ³³⁸ ; TYR ³⁴¹ ; TRP ⁴³⁹
	S	60.02	TRP ⁸⁶ ; TRP ⁴³⁹	TRP ⁸⁶ ; TRP ²⁸⁶ ; TYR ³³⁷ ; TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷ ; TRP ⁴³⁹ ; TYR ⁴⁴⁹
15	R	71.32	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴	TRP ⁸⁶	TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷
	S	71.84	TRP ⁸⁶ ; TYR ³³⁷	TYR ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TYR ⁴⁴⁹
16	R	66.01	TRP ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³⁴¹	TRP ⁸⁶ ; GLY ¹²⁰	TRP ⁸⁶ ; PRO ⁸⁸ ; TRP ⁴³⁹
	S	62.28	TYR ¹²⁴ ; SER ²⁰³ ; TRP ⁴³⁹	TYR ⁸⁶ ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷	TRP ⁸⁶ ; TYR ⁷² ; TYR ¹²⁴ ; TYR ³³⁷ ; TRP ⁴³⁹ ; PRO ⁴⁴⁶ ; TYR ⁴⁴⁹
Tacrina	-	62.72			

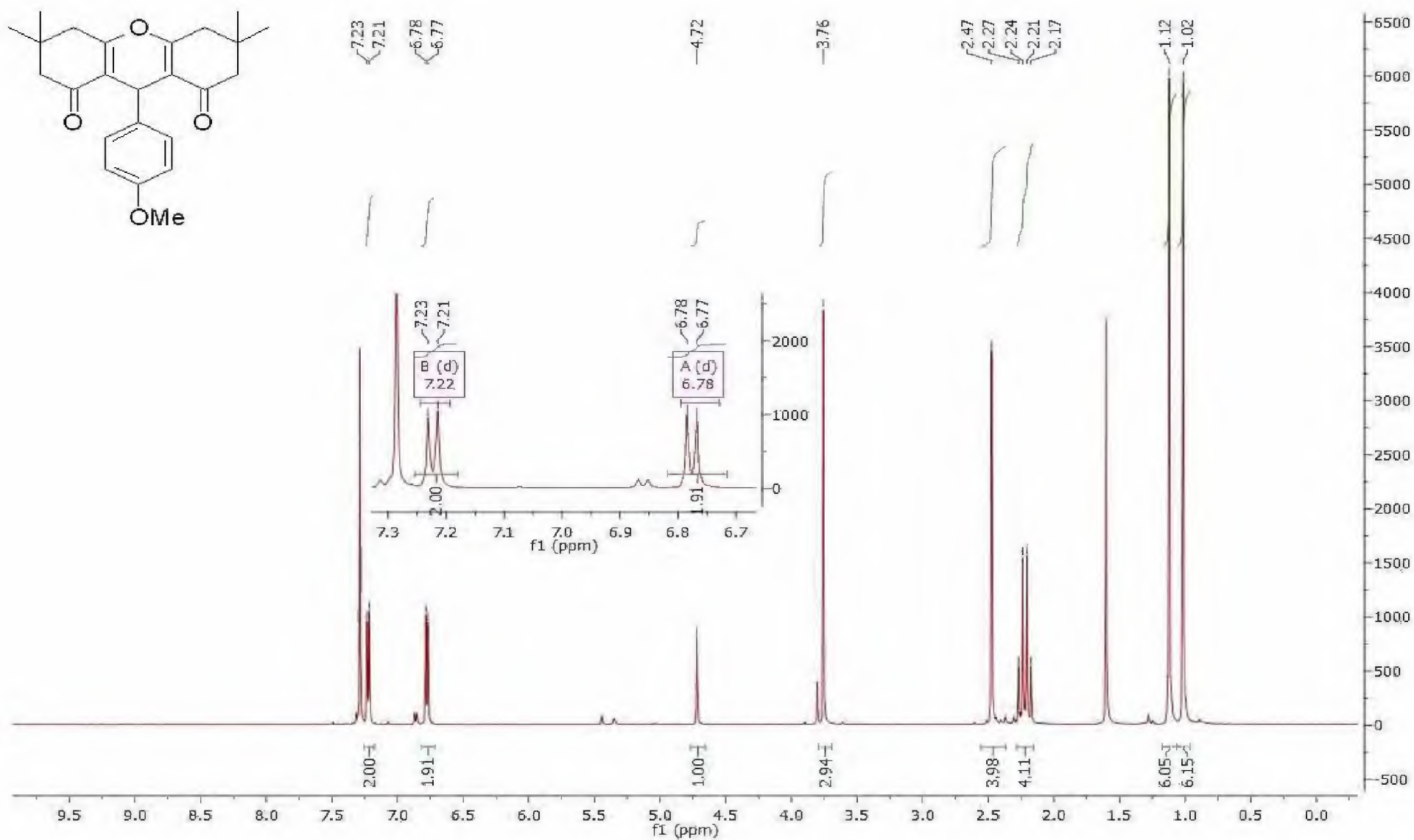
Anexo 51: Tabela com as interações principais das acridinonas em butirilcolinesterase

Molécula	Enantiômero	Score	Ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	
				Empilhamento π - π	π -alquil
1	R	72.19	SER ¹⁹⁸ ; HIS ⁴³⁸	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸
	S	63.68	PRO ²⁸⁵	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	ALA ³²⁸ ; TYR ³³²
2	R	74.27	SER ¹⁹⁸	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	TRP ⁸² ; ALA ³²⁸ ; LEU ²⁸⁶ ; TYR ⁴⁴⁰
	S	68.61	THR ¹²⁰	TRP ⁸² ; GLY ¹¹⁶ ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	TRP ⁸² ; LEU ²⁸⁶ ; HIS ⁴³⁸
3	R	65.53	TYR ¹²⁸	GLY ¹¹⁶ ; TRP ²³¹ ; PHE ²³⁹	LEU ¹²⁵ ; LEU ²⁸⁶
	S	67.31	THP ¹²⁰	TRP ⁸² ; GLY ¹¹⁶ ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	TRP ⁸² ; LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; TRP ⁴³⁰ ; MET ⁴³⁷
4	R	70.28	SER ¹⁹⁸ ; ALA ³²⁸	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	TRP ⁸² ; LEU ²⁸⁶ ; TYR ⁴⁴⁰
	S	69.21	PRO ²⁸⁵	TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹ ; HIS ⁴³⁸	TRP ⁸² ; LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; TYR ³³² ; HIS ⁴³⁸
5	R	71.71	THR ¹²⁰	TRP ²³¹	LEU ¹²⁵ ; TYR ¹²⁸ ; LEU ²⁸⁶ ; TYR ³³²
	S	69.81	PRO ²⁸⁵	TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	TRP ⁸² ; LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; TYR ³³² ; TRP ⁴³⁰ ; MET ⁴³⁷ ; HIS ⁴³⁸ ; TYR ⁴⁴⁰
7	R	65.18	SER ¹⁹⁸ ; ALA ³²⁸	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	HIS ⁴³⁸
	S	61.62		TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; TYR ³³²

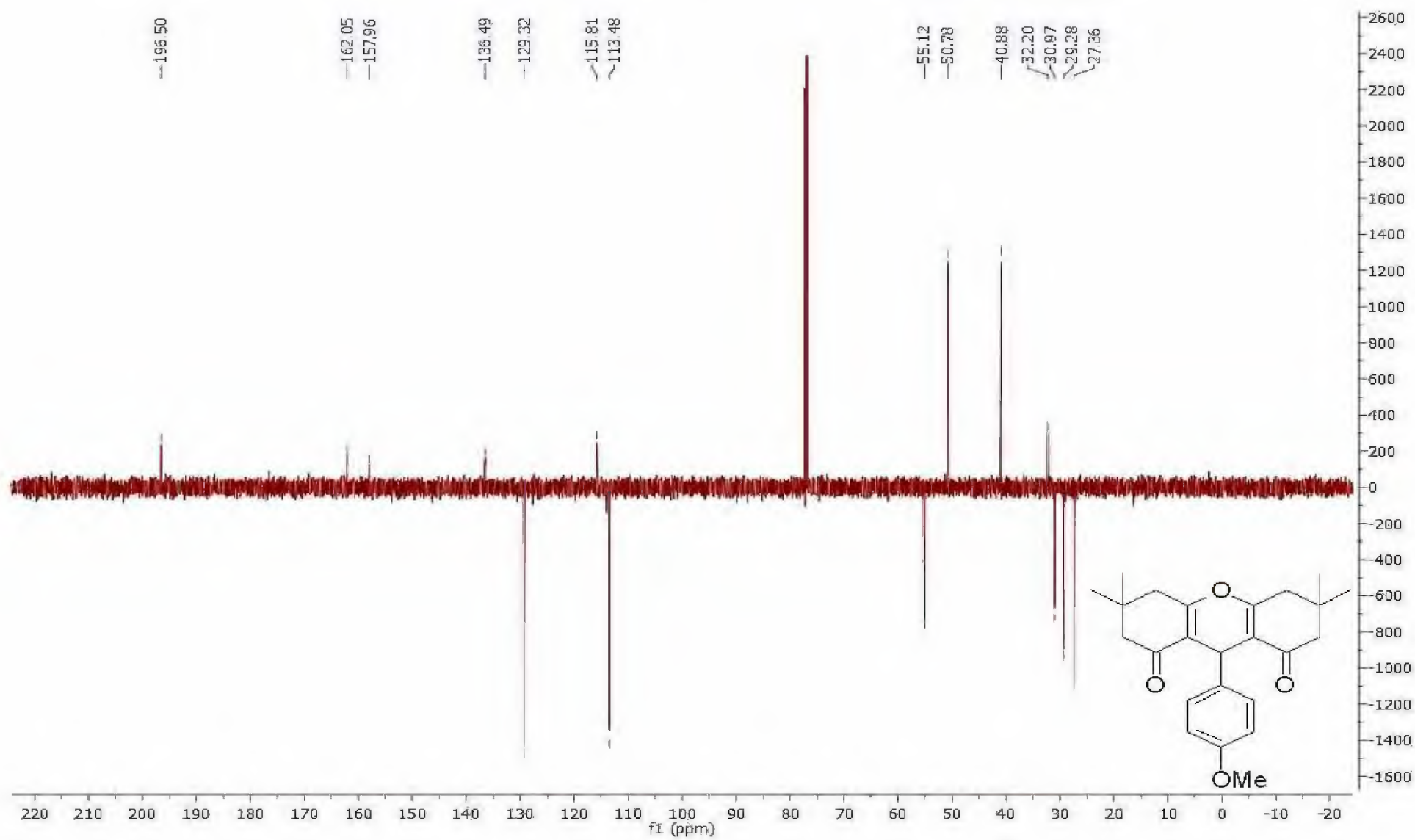
8	R	68.64	SER ¹⁹⁸	TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	ALA ³²⁸ ; TYR ³³² ; TRP ⁴³⁰ ; HIS ⁴³⁸
	S	65.16	PRO ²⁸⁵	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	ALA ³²⁸ ; TYR ³³² ; TRP ⁴³⁰ ; MET ⁴³⁷
9	R	69.41	THR ¹²⁰ ; TYR ¹²⁸	PHE ³²⁹	LEU ¹²⁵ ; LEU ²⁸⁶ ; TYR ³³²
	S	69.21	PRO ²⁸⁵	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	TRP ⁸² ; ALA ³²⁸ ; TYR ³³² ; TRP ⁴³⁰ ; MET ⁴³⁷
10	R	72.36	SER ¹⁹⁸	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	ALA ³²⁸ ; HIS ⁴³⁸
	S	67.37	TRP ⁸²	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	LEU ²⁸⁶
11	R	64.88	TYR ¹²⁸	GLY ¹¹⁵ ; TRP ²³¹	LEU ²⁸⁶ ; TYR ³³²
	S	66.08	ASP ⁷⁰ ; SER ¹⁹⁸	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	LEU ²⁸⁶ ; HIS ⁴³⁸
12	R	69.59	SER ¹⁹⁸	TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	ALA ³²⁸ ; HIS ⁴³⁸
	S	65.74	PRO ²⁸⁵	TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; TYR ³³²
13	R	70.27	SER ¹⁹⁸ ; HIS ⁴³⁸	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; HIS ⁴³⁸
	S	60.99	PRO ²⁸⁵	TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	ALA ³²⁸ ; TYR ³³²
14	R	71.75	THR ¹²⁰	GLY ¹¹⁶ ; TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹ ; TYR ³³²	PHE ³²⁹ ; TYR ³³²
	S	71.16		TRP ²³¹ ; PHE ³²⁹	TRP ⁸² ; LEU ²⁸⁶ ; VAL ²⁸⁸ ; ALA ³²⁸ ; TYR ³³² ; TRP ⁴³⁰ ; MET ⁴³⁷
15	R	60.21	SER ²⁸⁷	GLY ¹¹⁶ ; TYR ³³²	TRP ²³¹ ; LEU ²⁸⁶ ; VAL ²⁸⁸ ; ALA ³²⁸ ; PHE ³²⁹ ; HIS ⁴³⁸

	S	59.55	THR ¹²⁰ ; SER ¹⁹⁸	TRP ⁸² ; PHE ³²⁹ ; HIS ⁴³⁸	TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; PHE ³²⁹ ; PHE ³⁹⁸ ; HIS ⁴³⁸
16	R	57.99	GLY ¹¹⁷ ; SER ¹⁹⁸ ; SER ²⁸⁷	GLY ¹¹⁶ ; TYR ³³²	TRP ²³¹ ; LEU ²⁸⁶ ; VAL ²⁸⁸ ; ALA ³²⁸ ; TYR ³³²
	S	56.80	THR ¹²⁰ ; SER ¹⁹⁸	PHE ³²⁹ ; HIS ⁴³⁸	TRP ⁸² ; TRP ²³¹ ; LEU ²⁸⁶ ; ALA ³²⁸ ; PHE ³⁹⁸ ; MET ⁴³⁷ ; TYR ⁴⁴⁰
Tacrina	-	45.97			

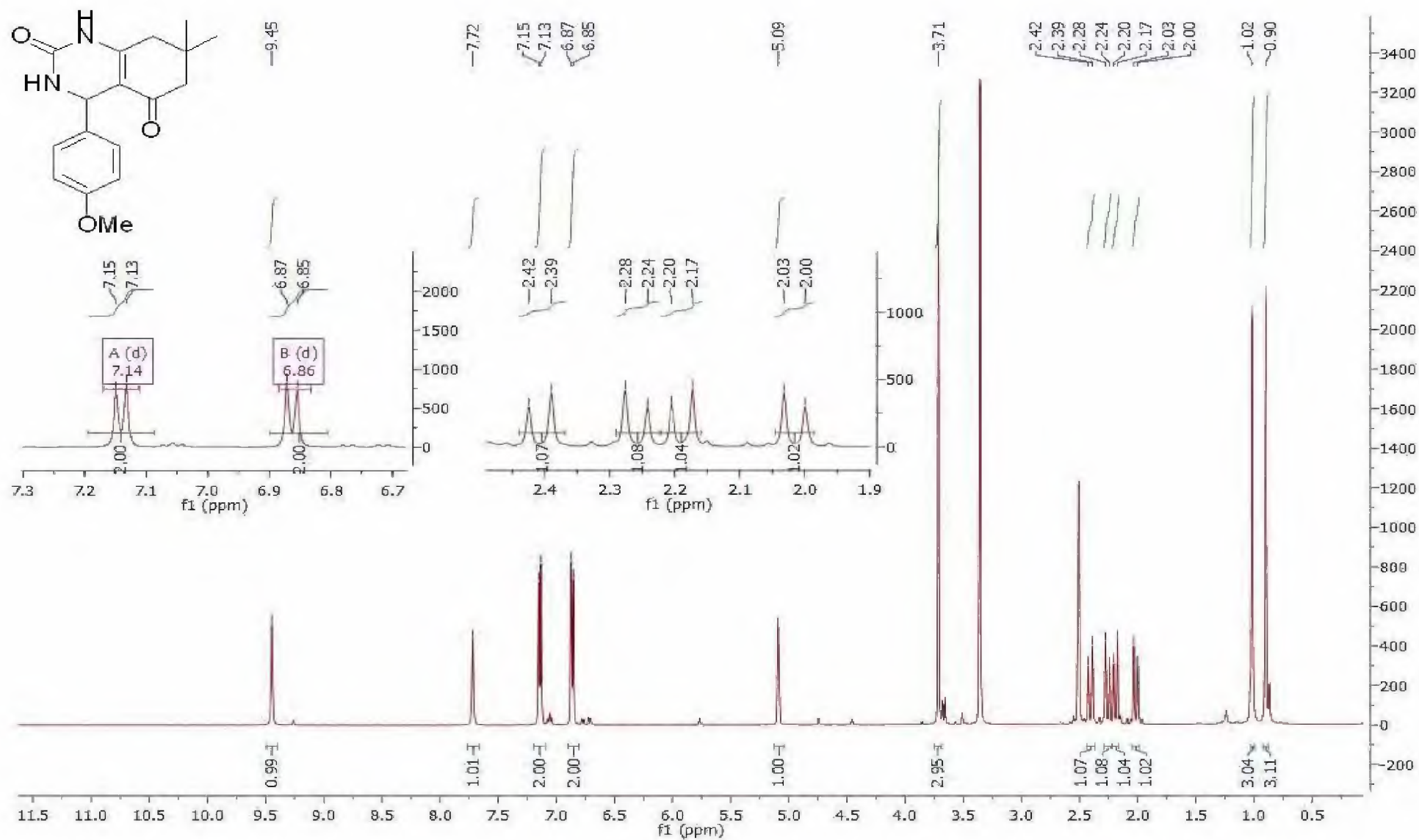
Anexo 52: Espectro de RMN ^1H da molécula 17.1 em CDCl_3 a 500 MHz.



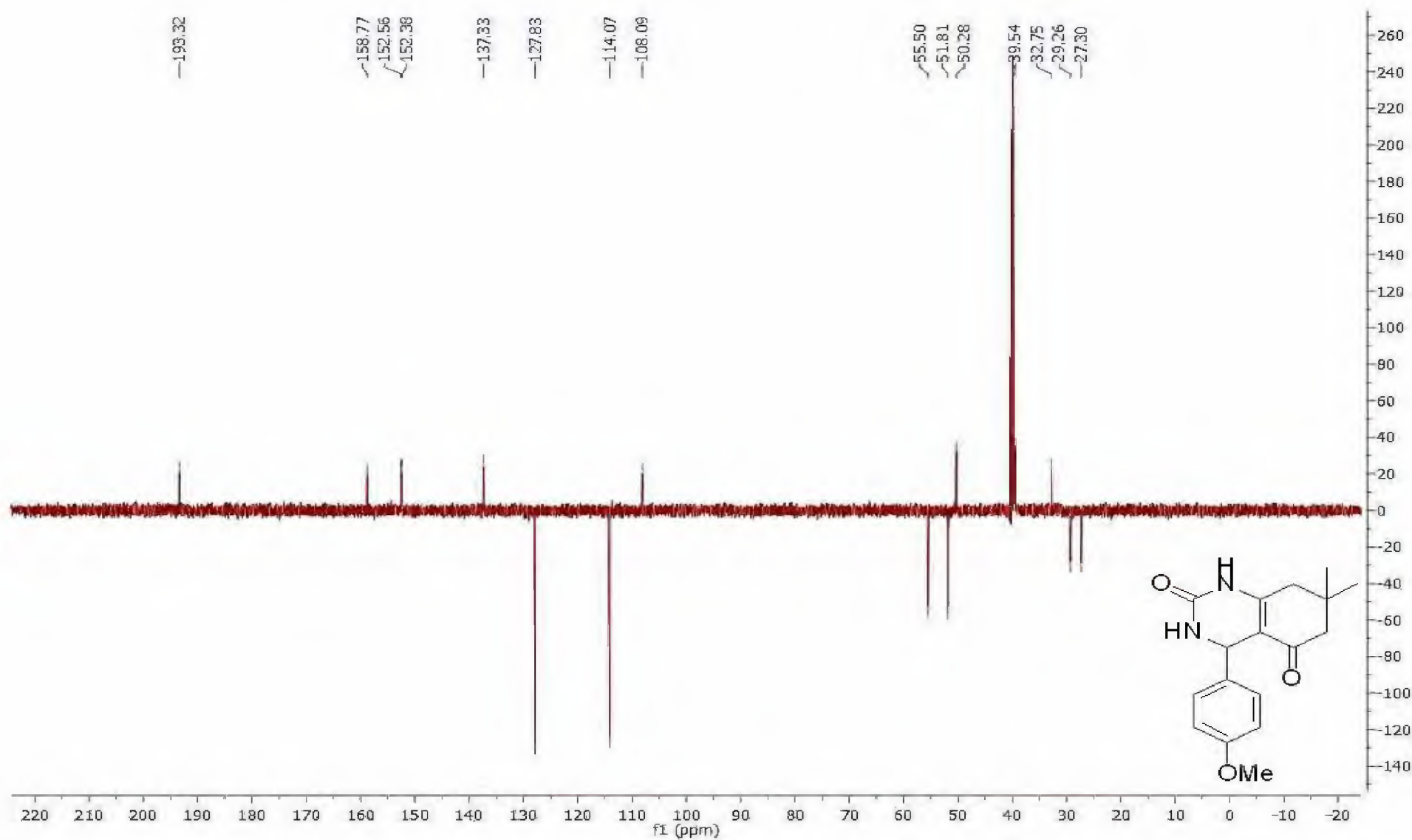
Anexo 53 Espectro de RMN ^{13}C da molécula 17.1 em CDCl_3 126 MHz.



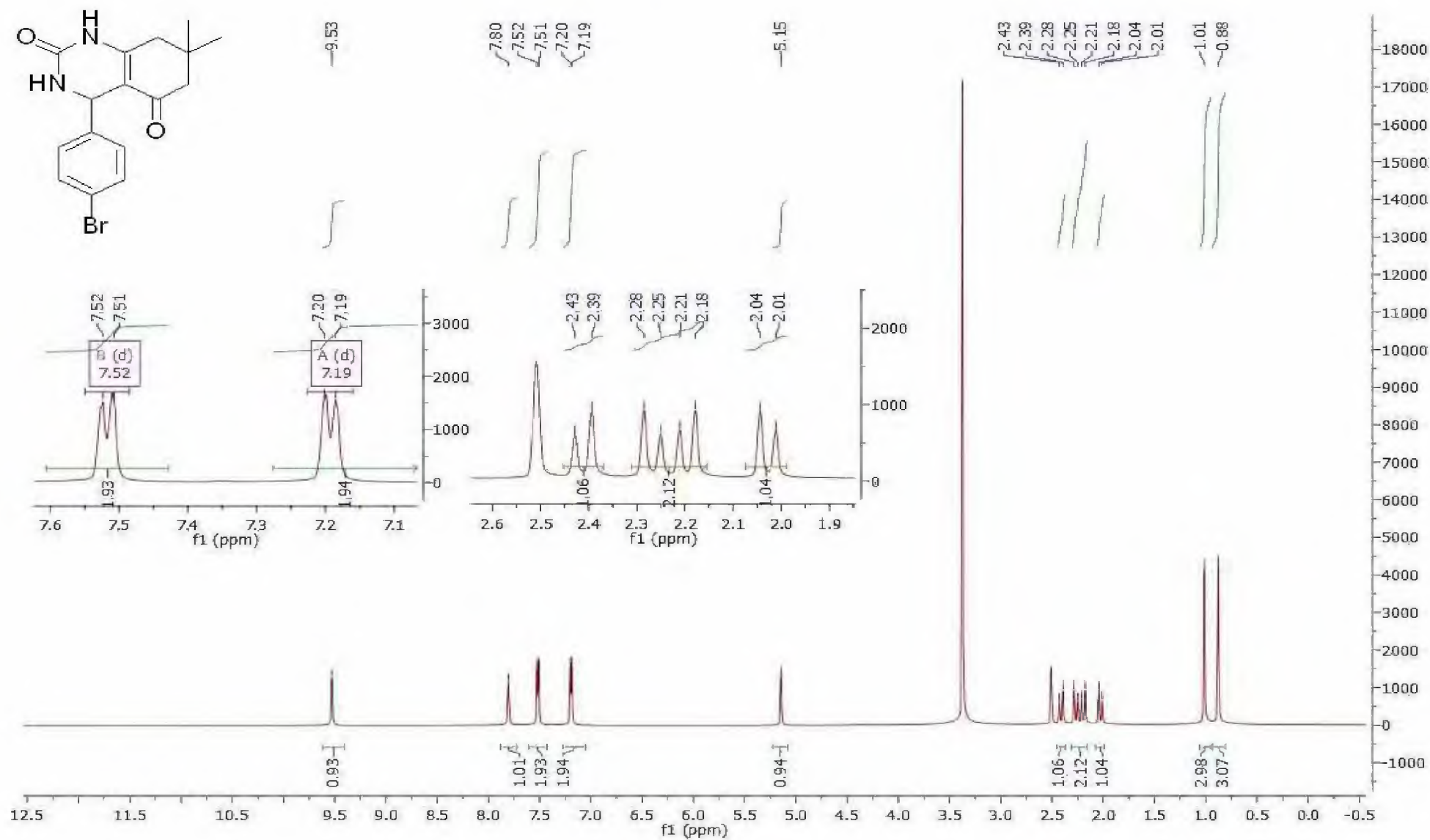
Anexo 54: Espectro de RMN ^1H da molécula 17.2 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



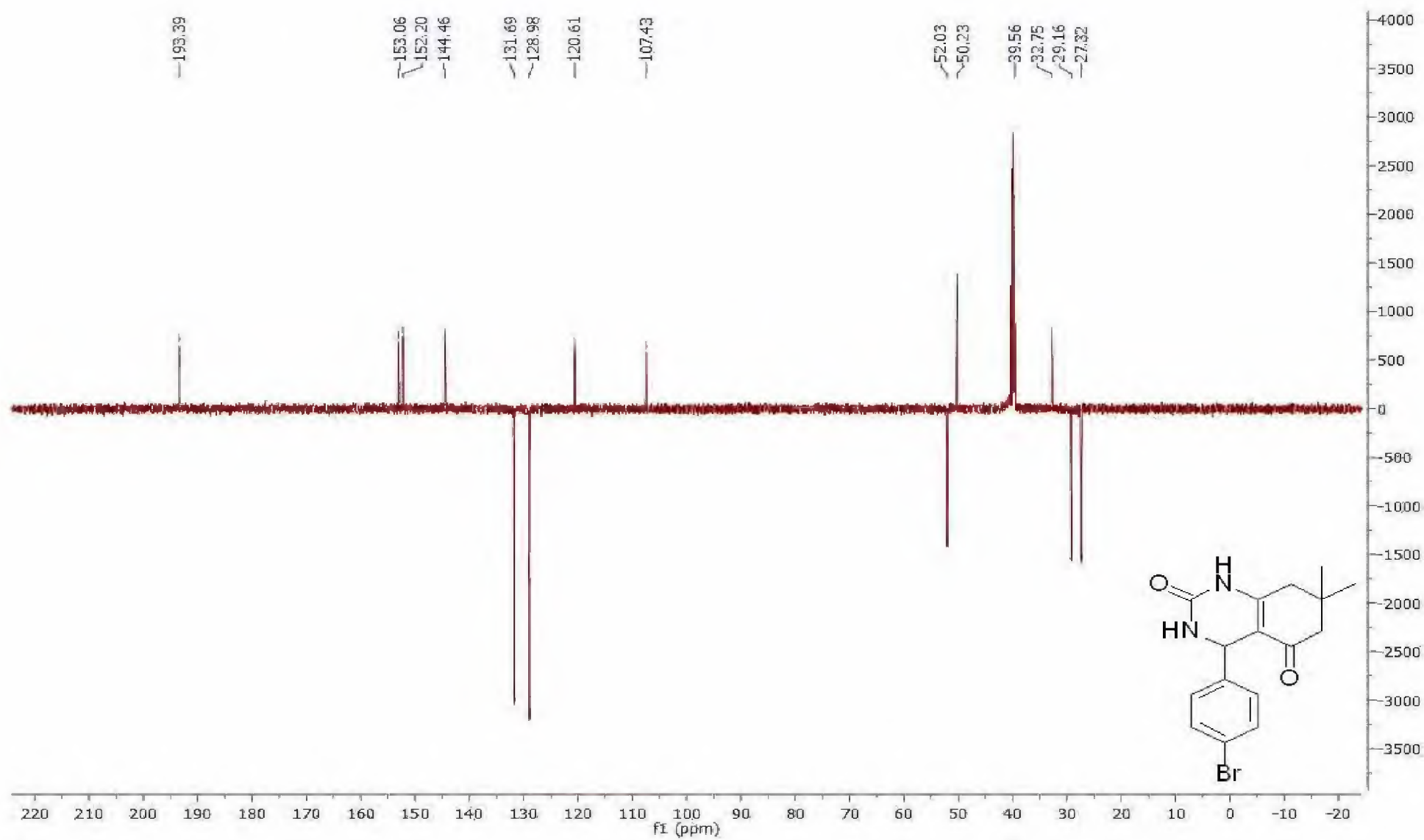
Anexo 55: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 17.2 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



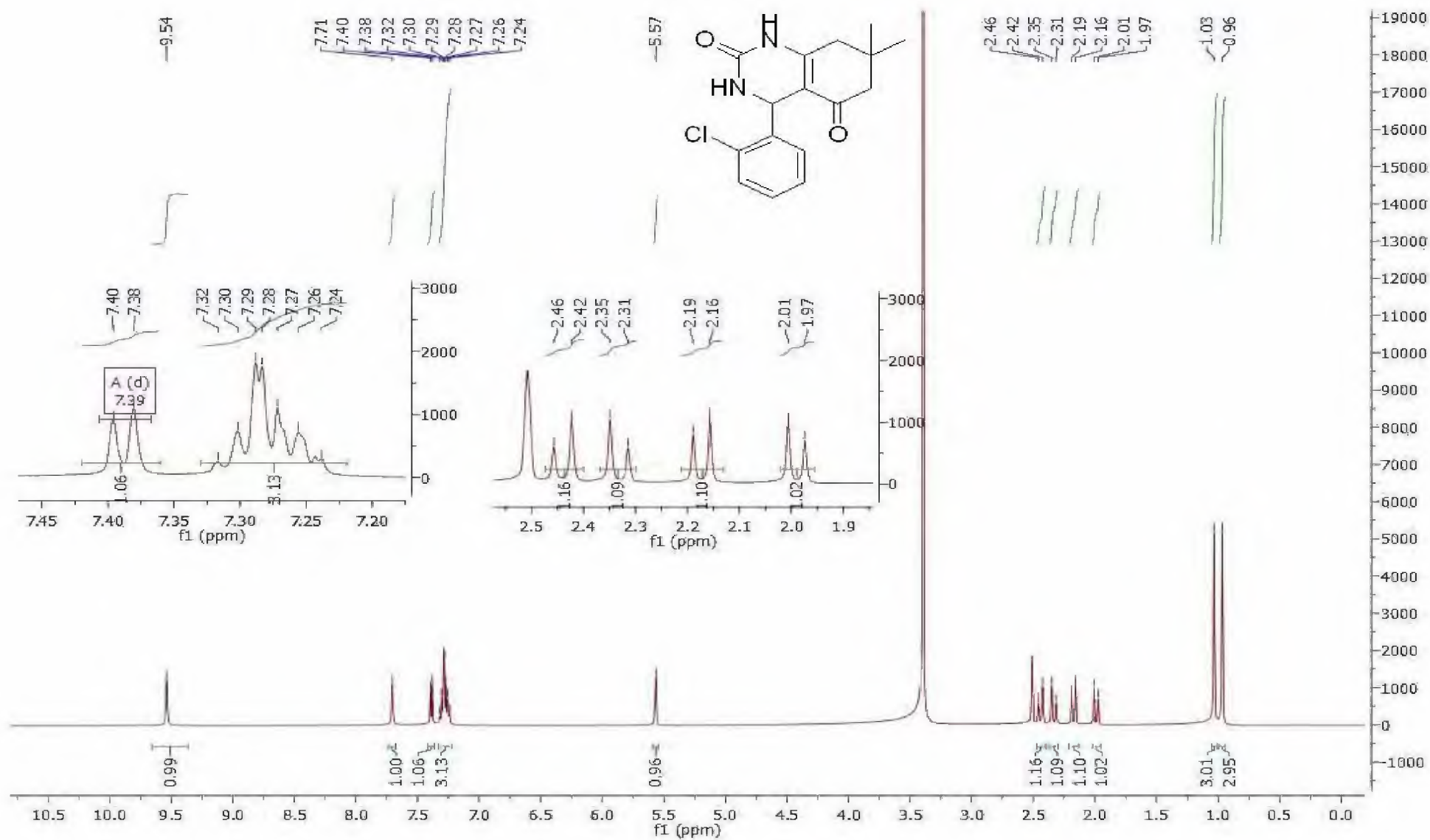
Anexo 56: Espectro de RMN ^1H da molécula 18 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



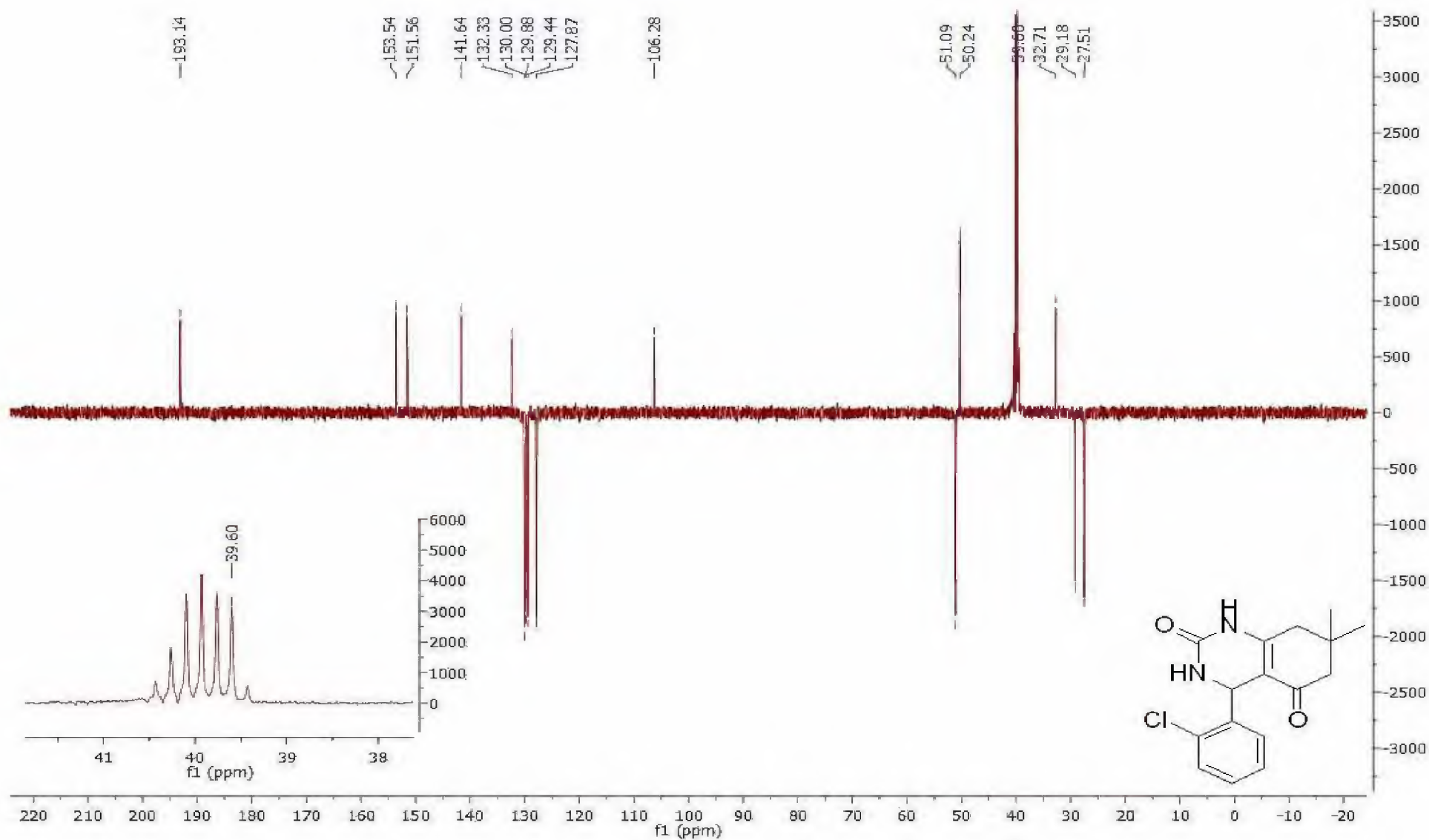
Anexo 57: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 18 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



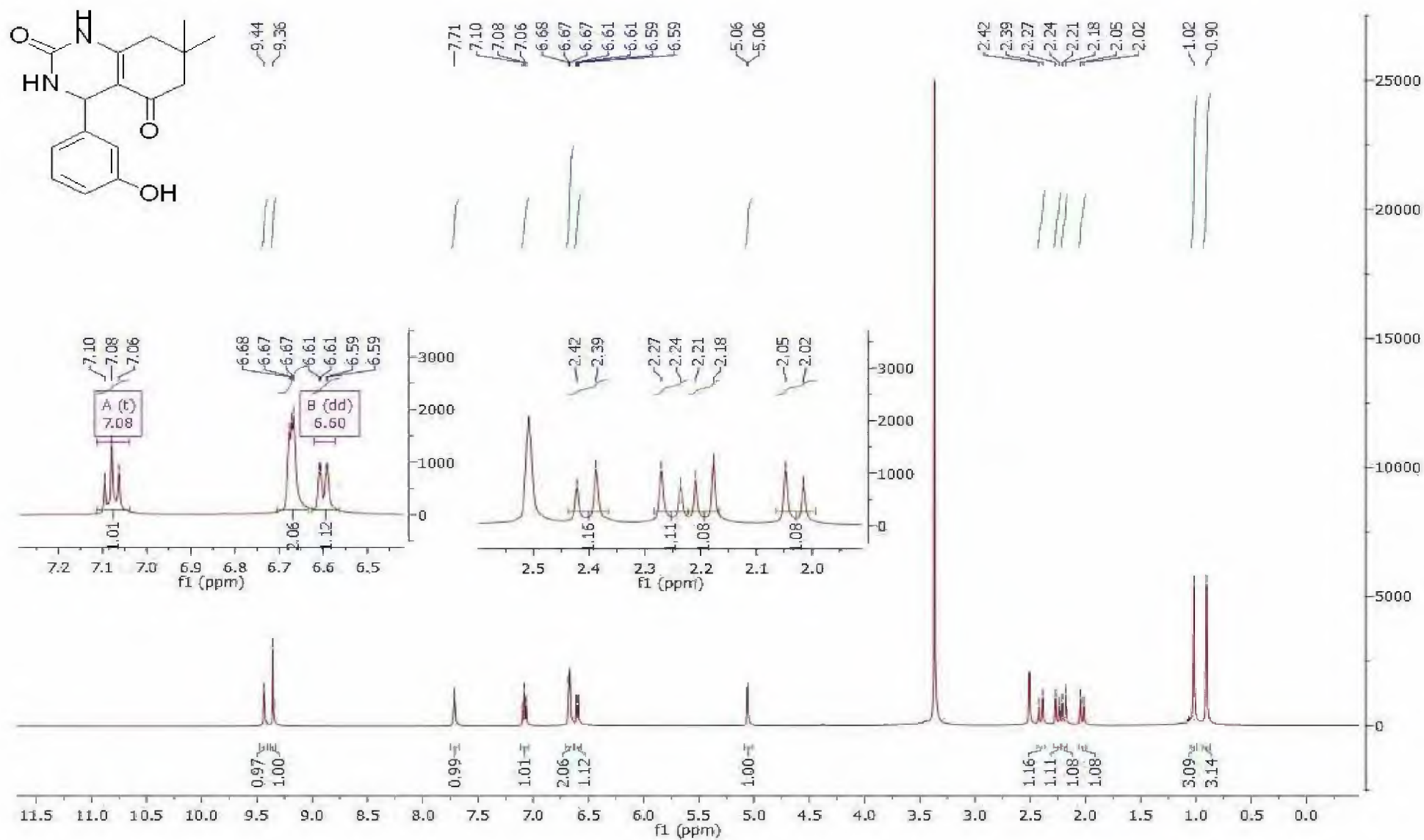
Anexo 58: Espectro de RMN ^1H da molécula 19 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



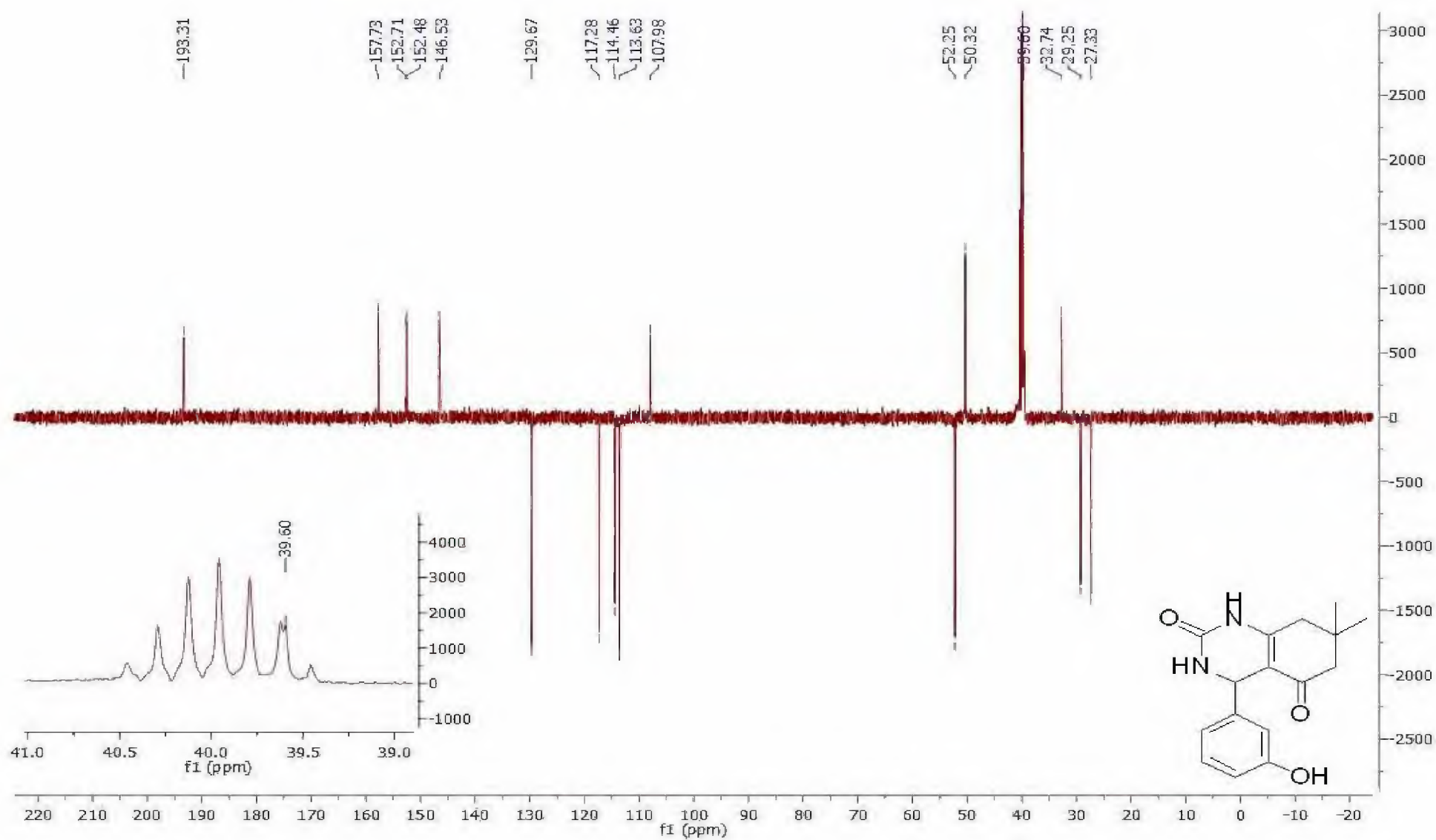
Anexo 59: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 19 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



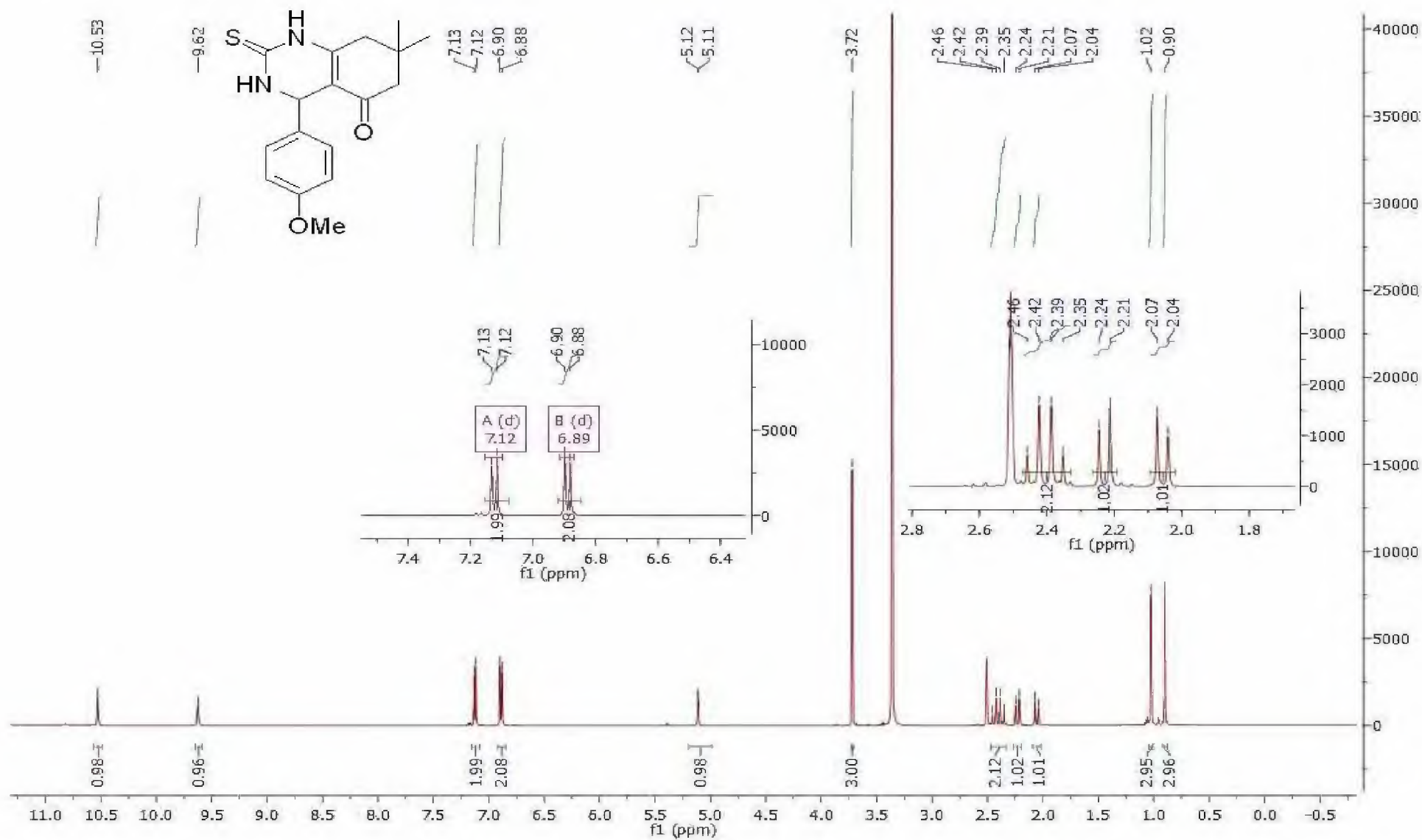
Anexo 60: Espectro de RMN ^1H da molécula 20 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



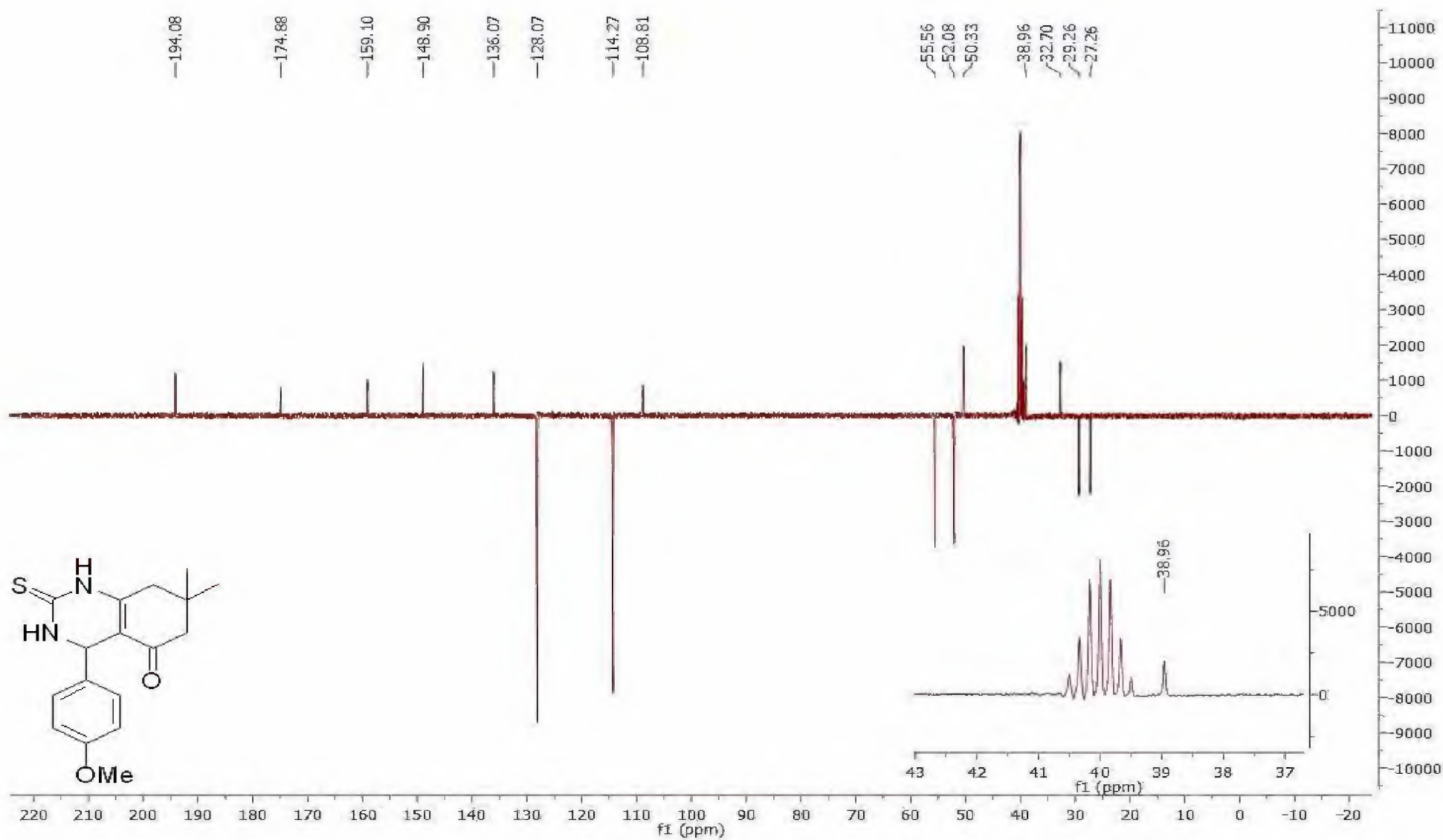
Anexo 61: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 20 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



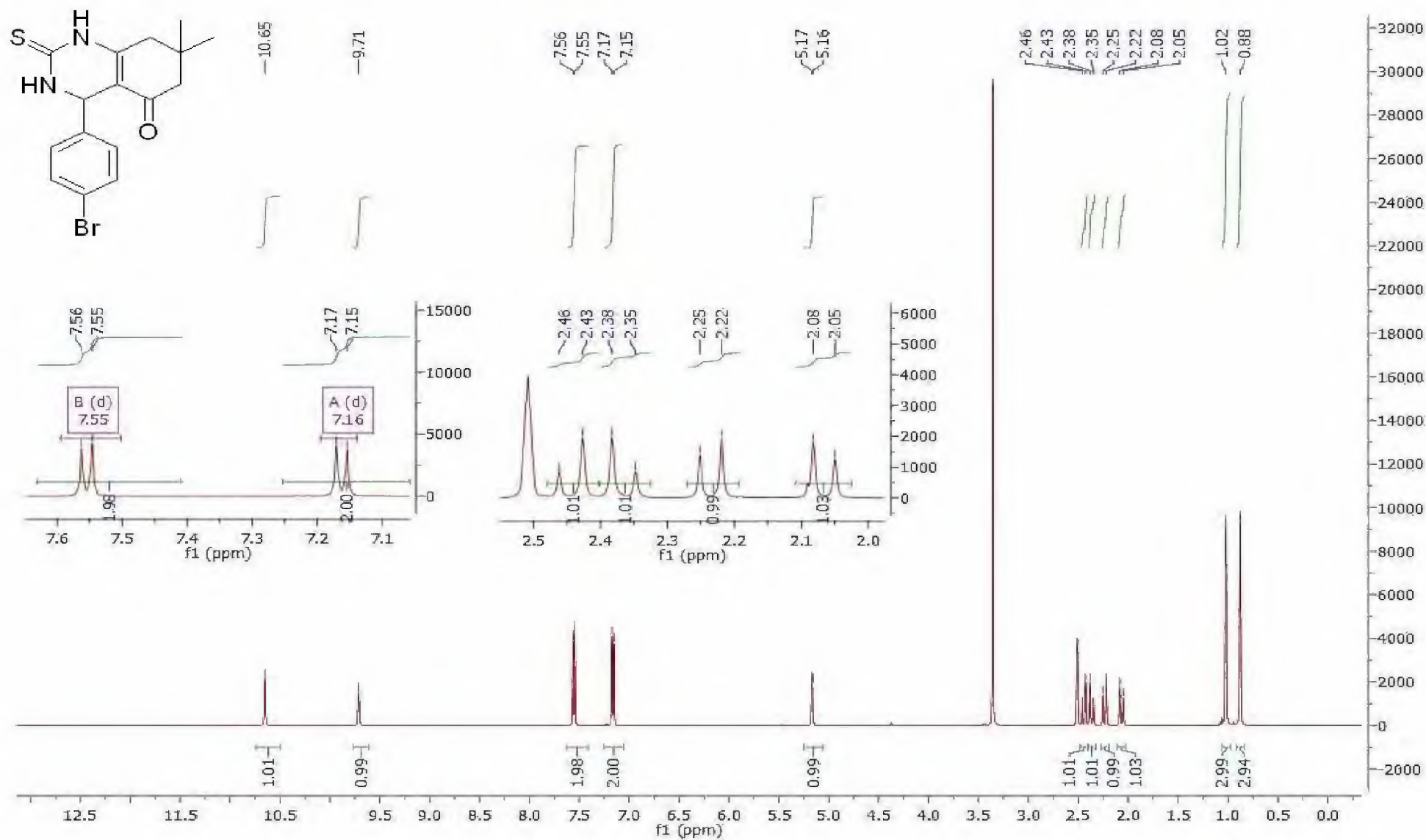
Anexo 62: Espectro de RMN ^1H da molécula 21 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



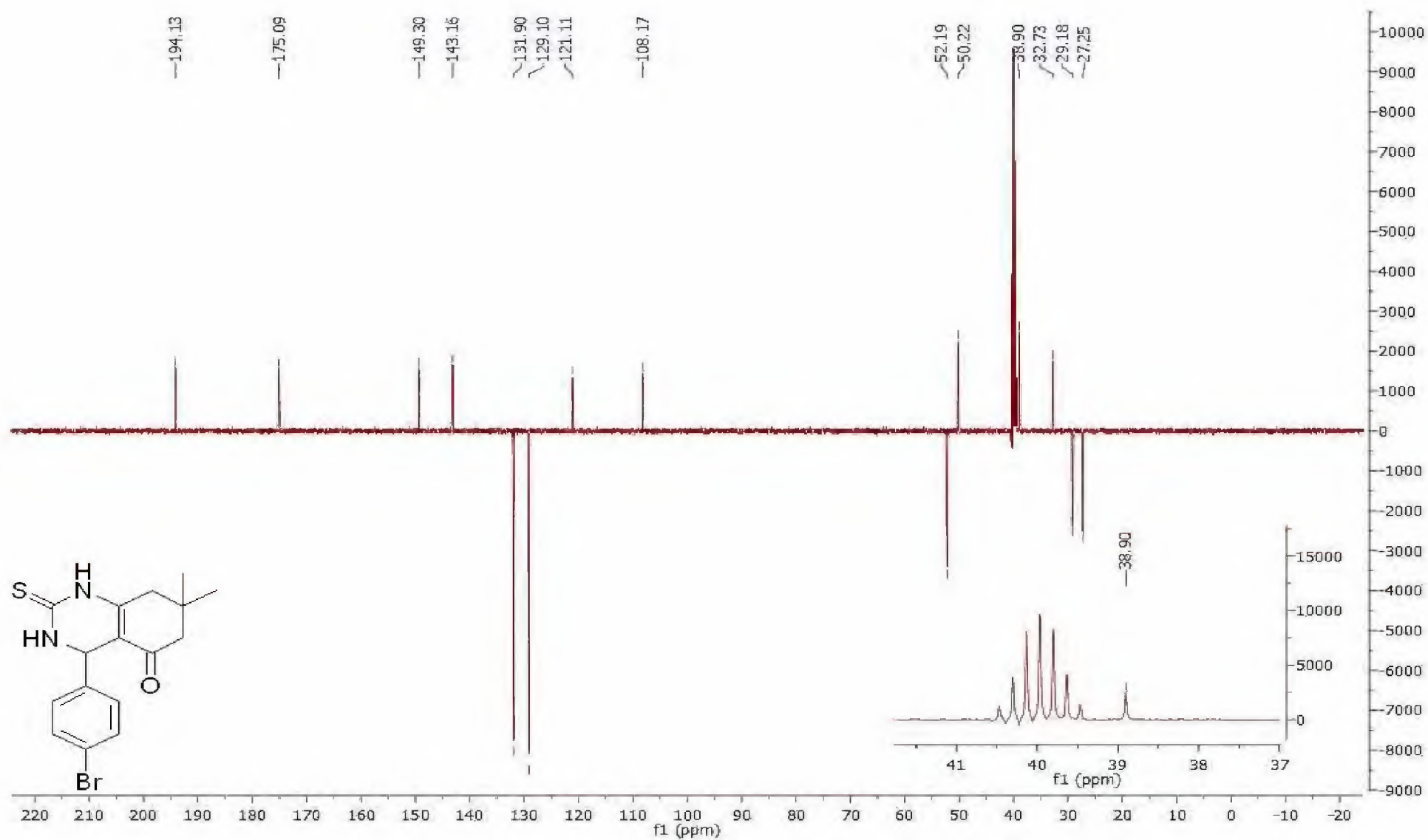
Anexo 63: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 21 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



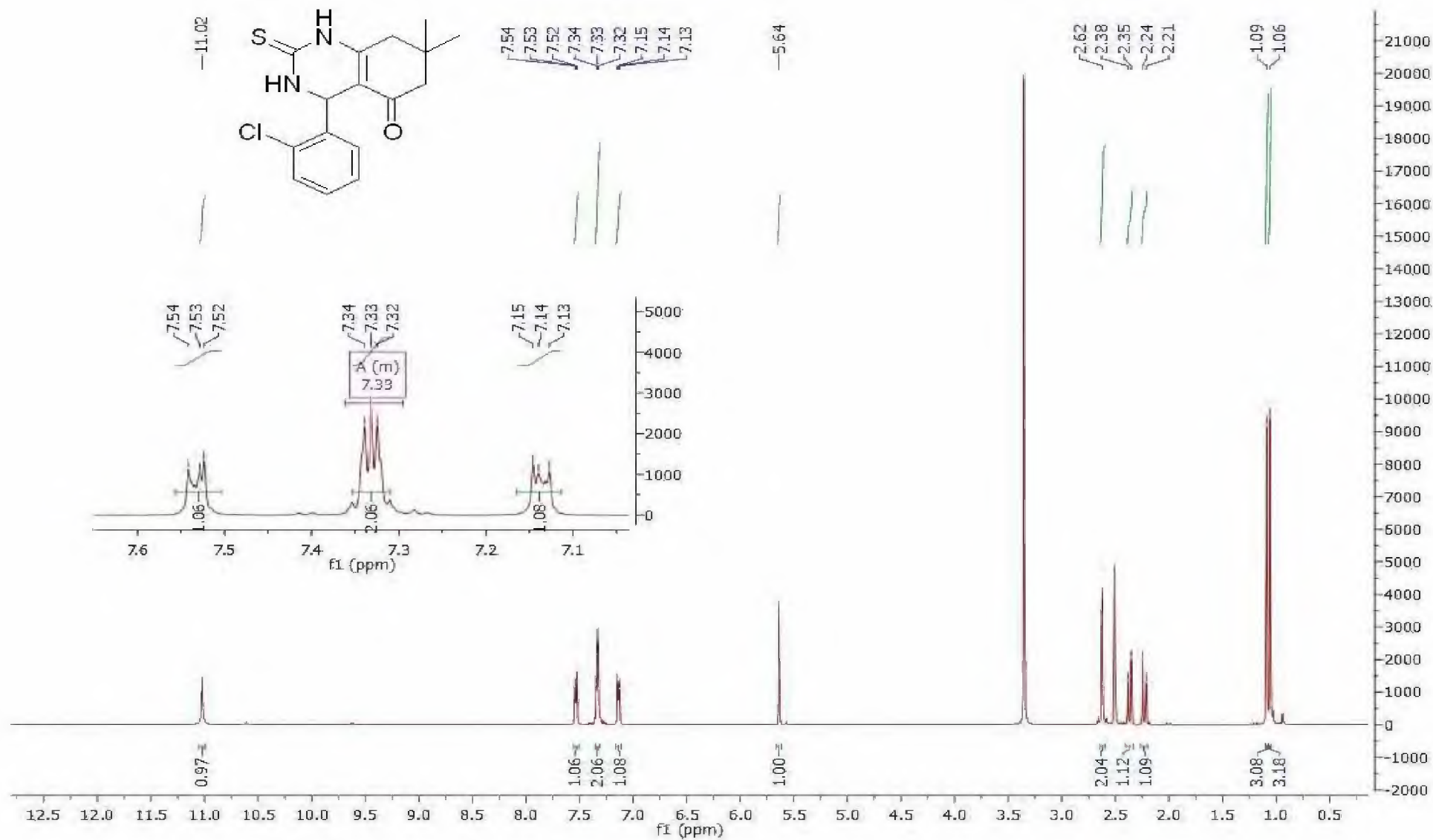
Anexo 64: Espectro de RMN ^1H da molécula 22 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



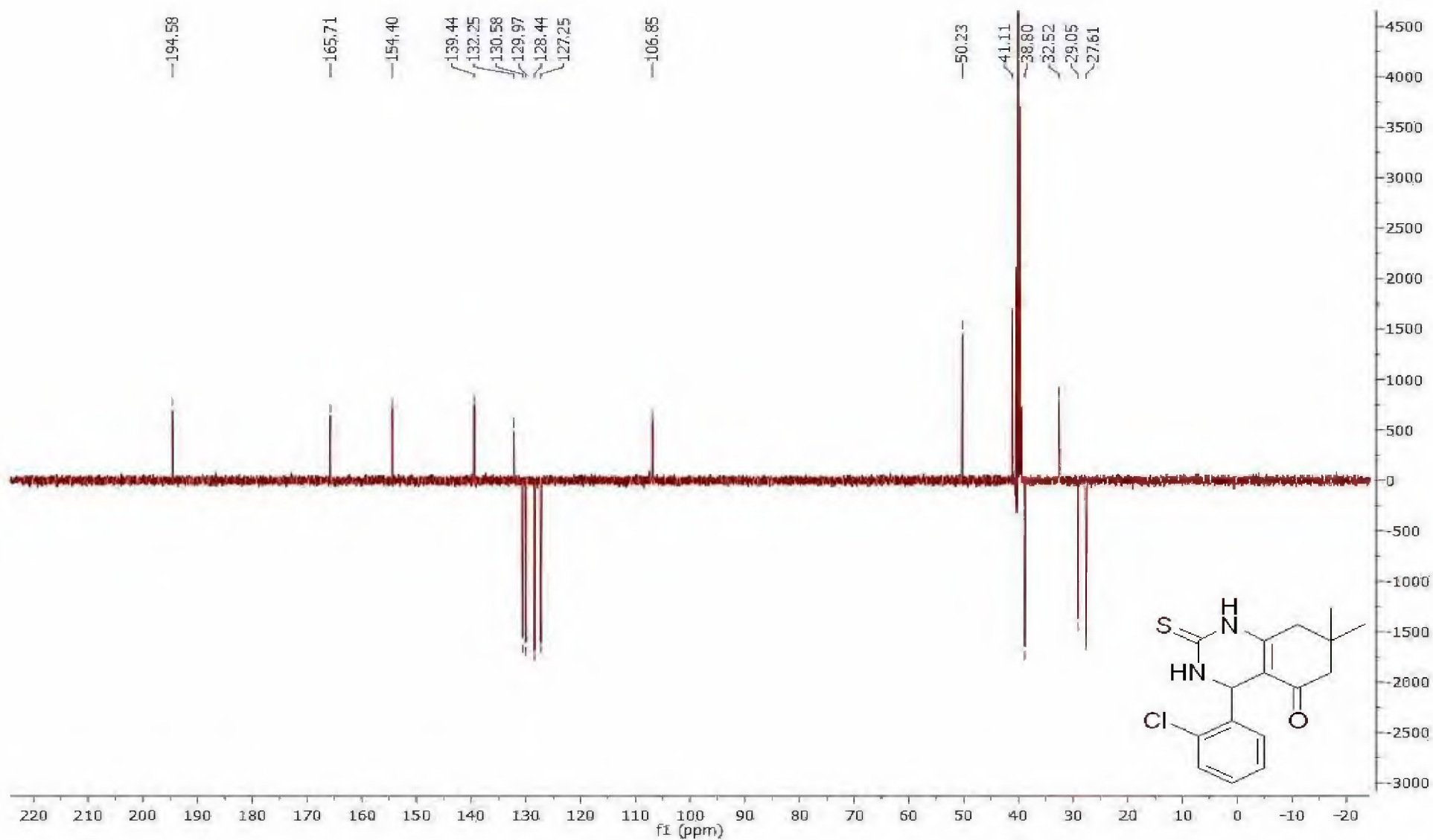
Anexo 65: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 22 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



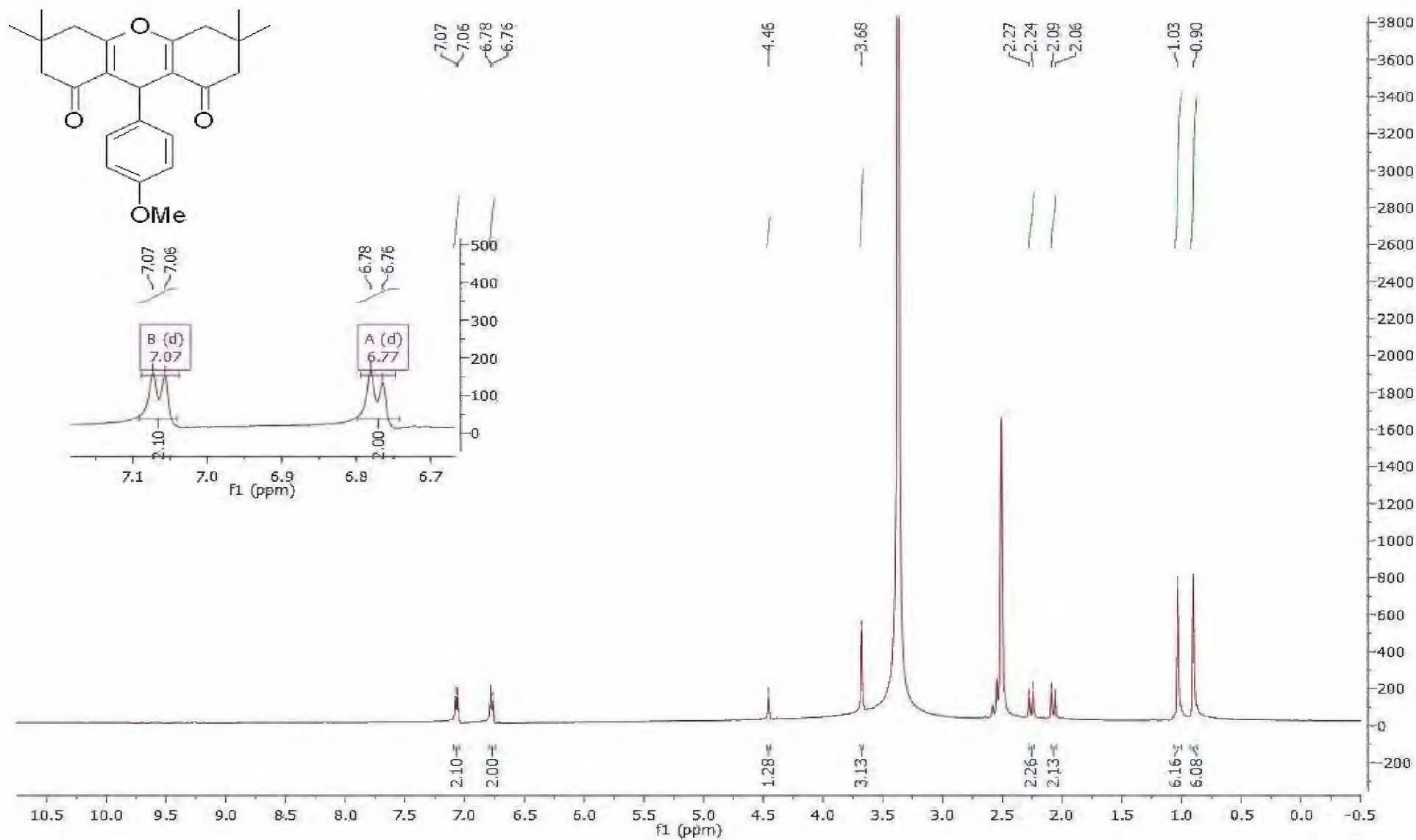
Anexo 66: Espectro de RMN ^1H da molécula 23 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



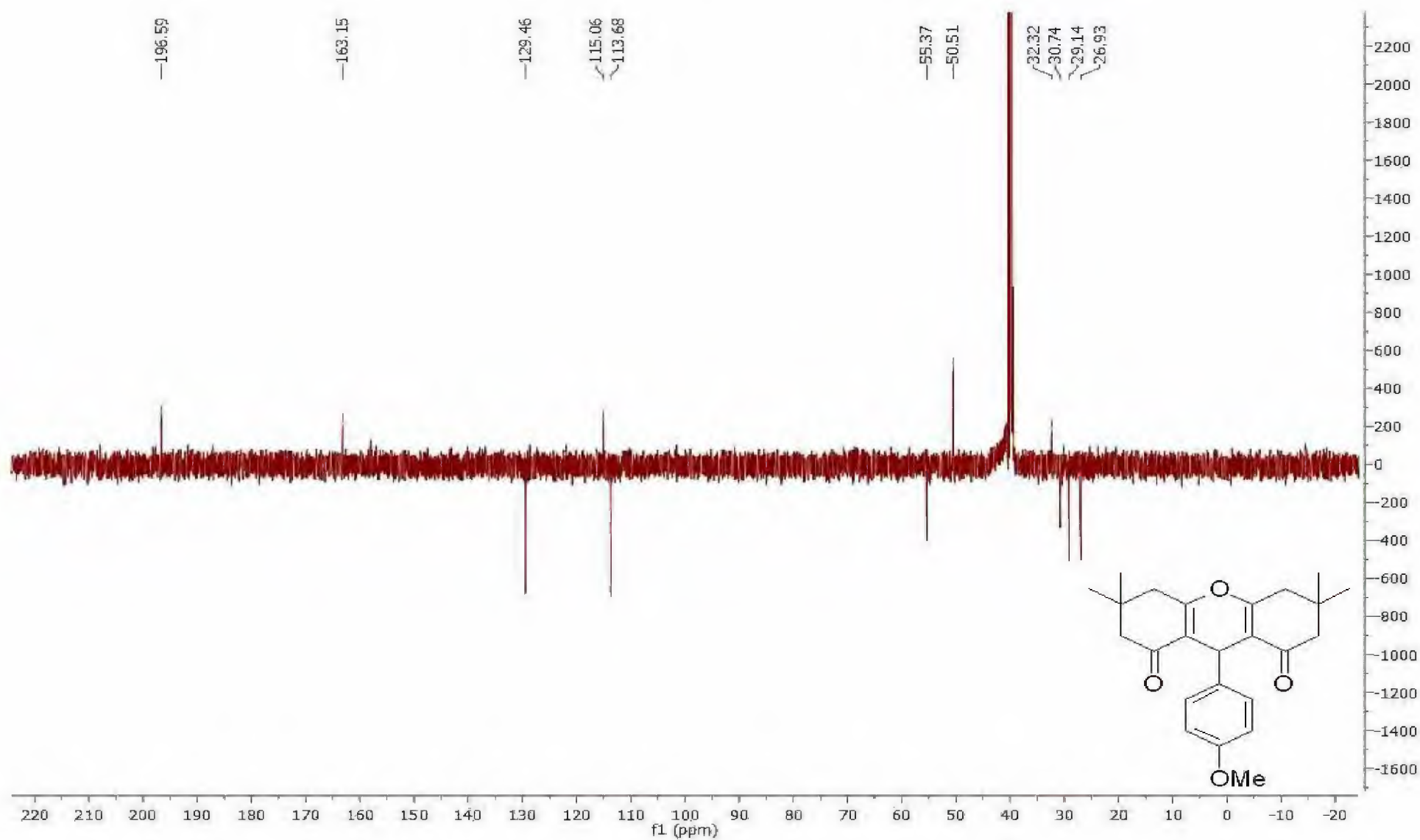
Anexo 67: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 23 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



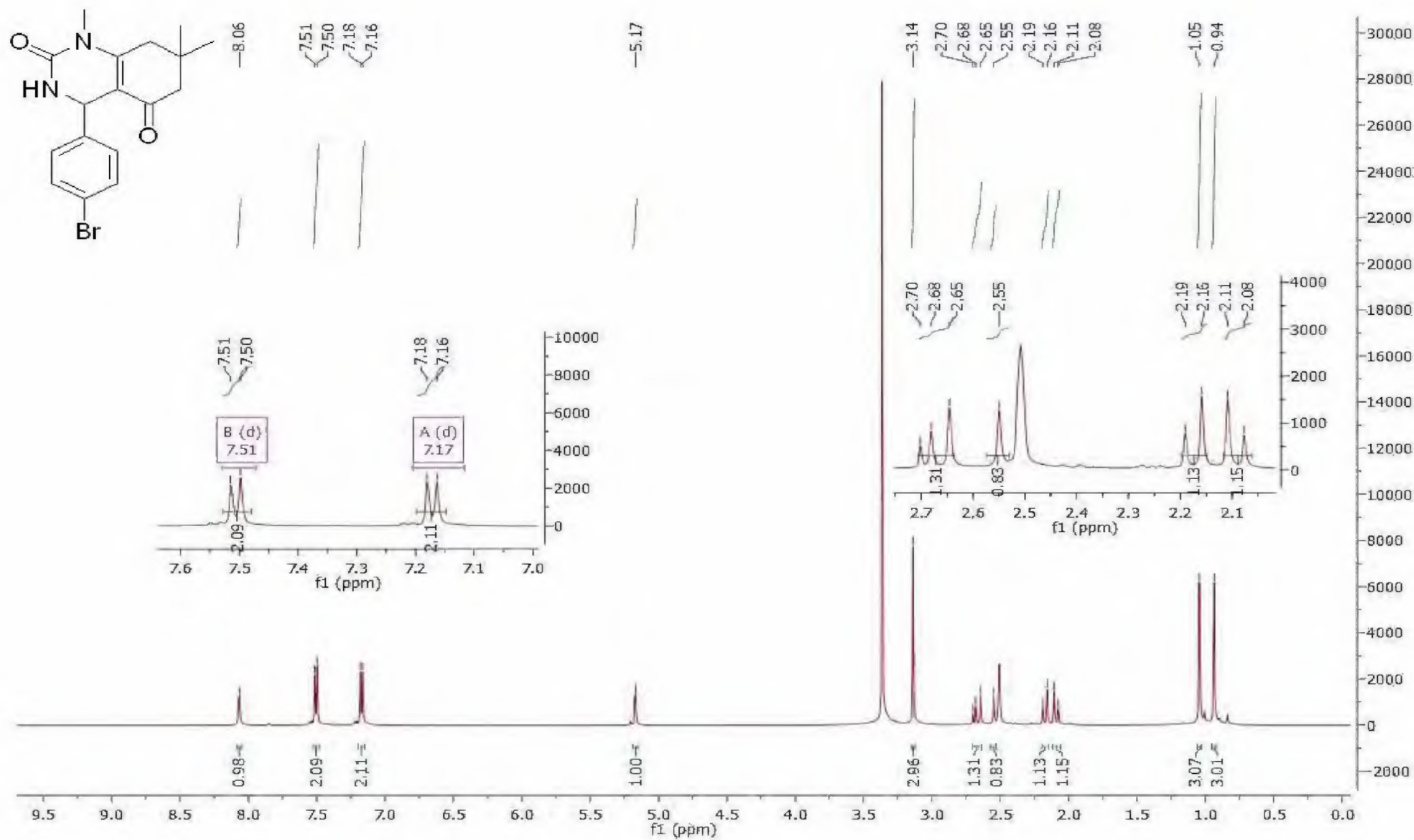
Anexo 68: Espectro de RMN ^1H da molécula 25 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



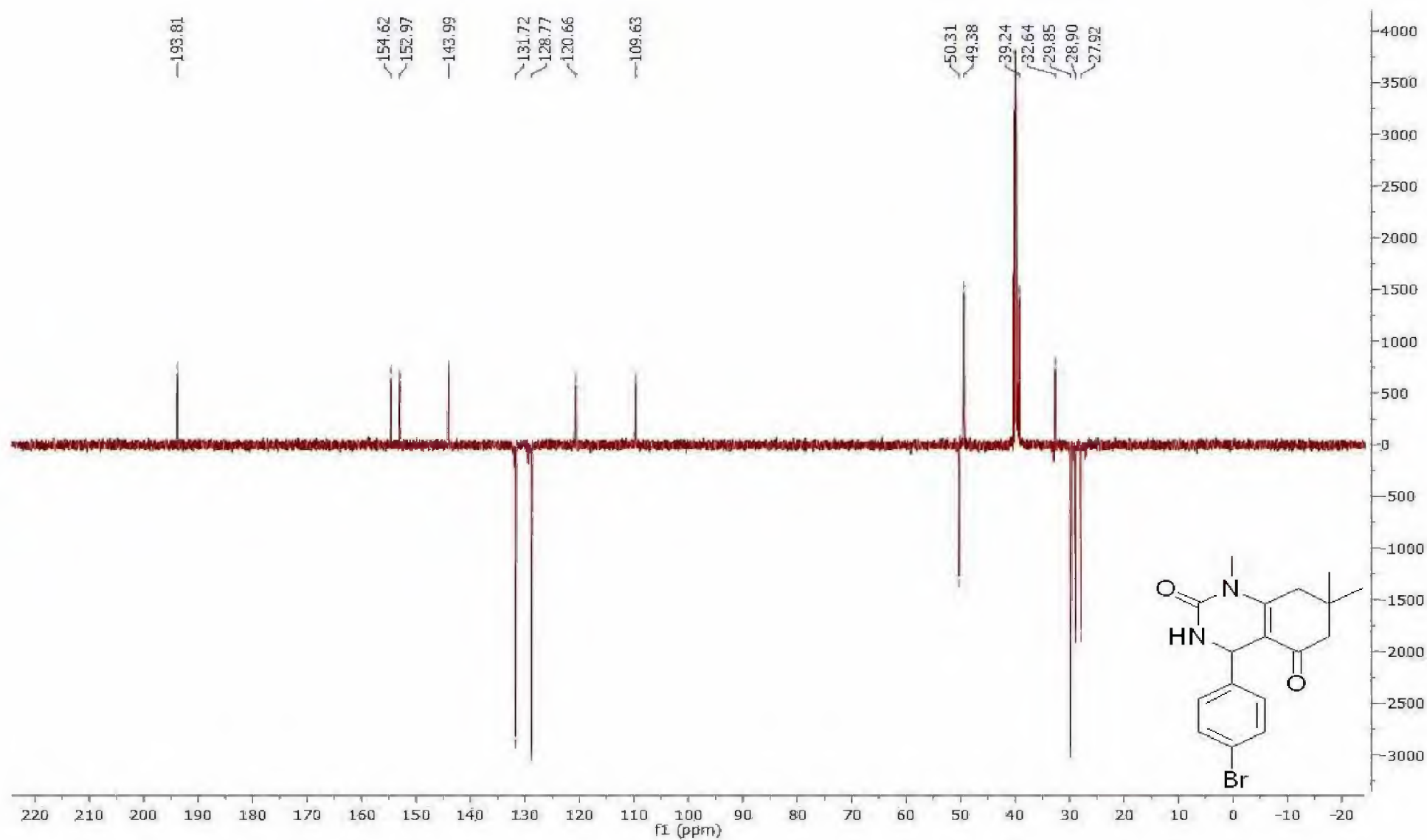
Anexo 69: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 25 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



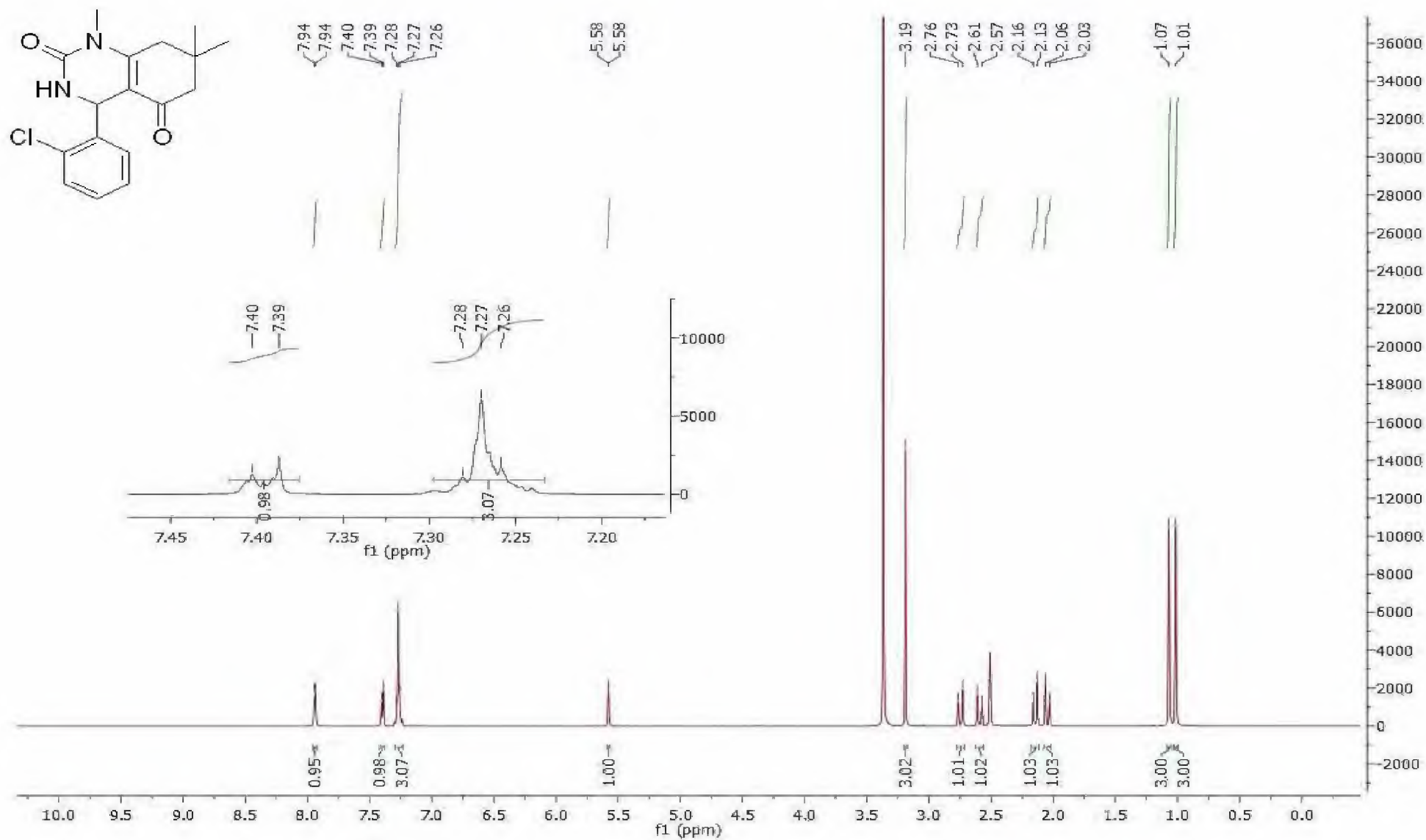
Anexo 70: Espectro de RMN ^1H da molécula 26 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



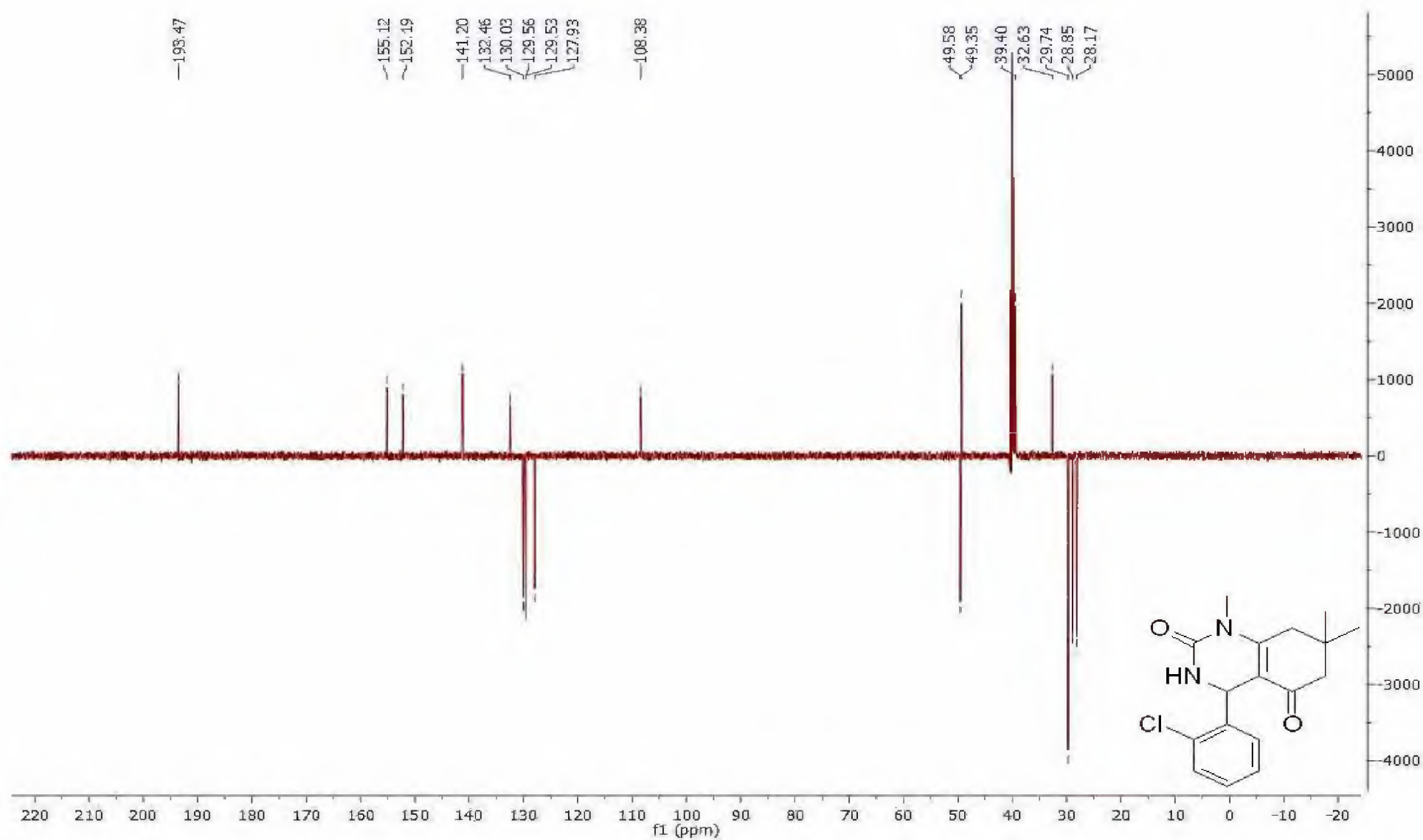
Anexo 71: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 26 em DMSO-d6 a 126 MHz.



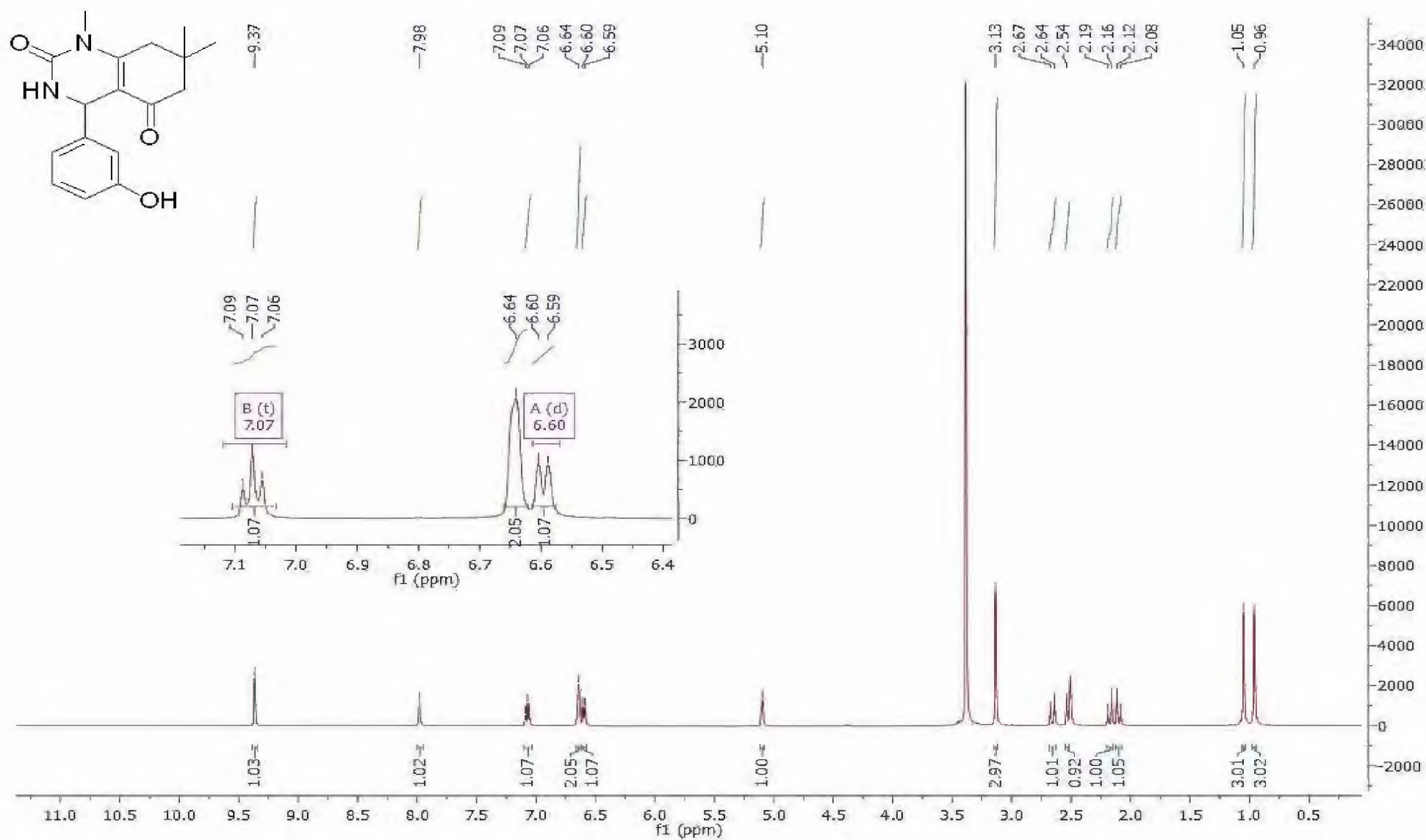
Anexo 72: Espectro de RMN ^1H da molécula 27 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



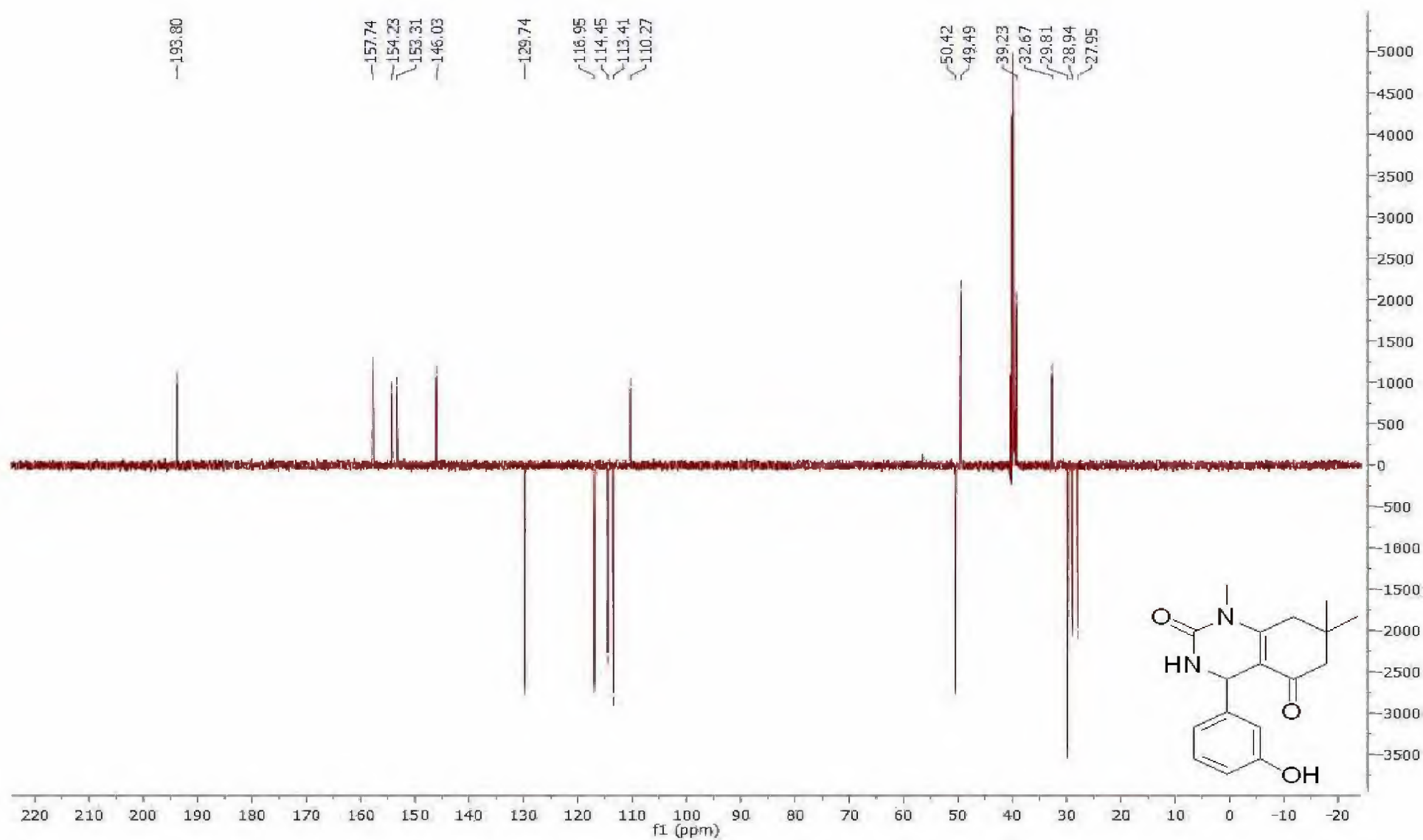
Anexo 73: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 27 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



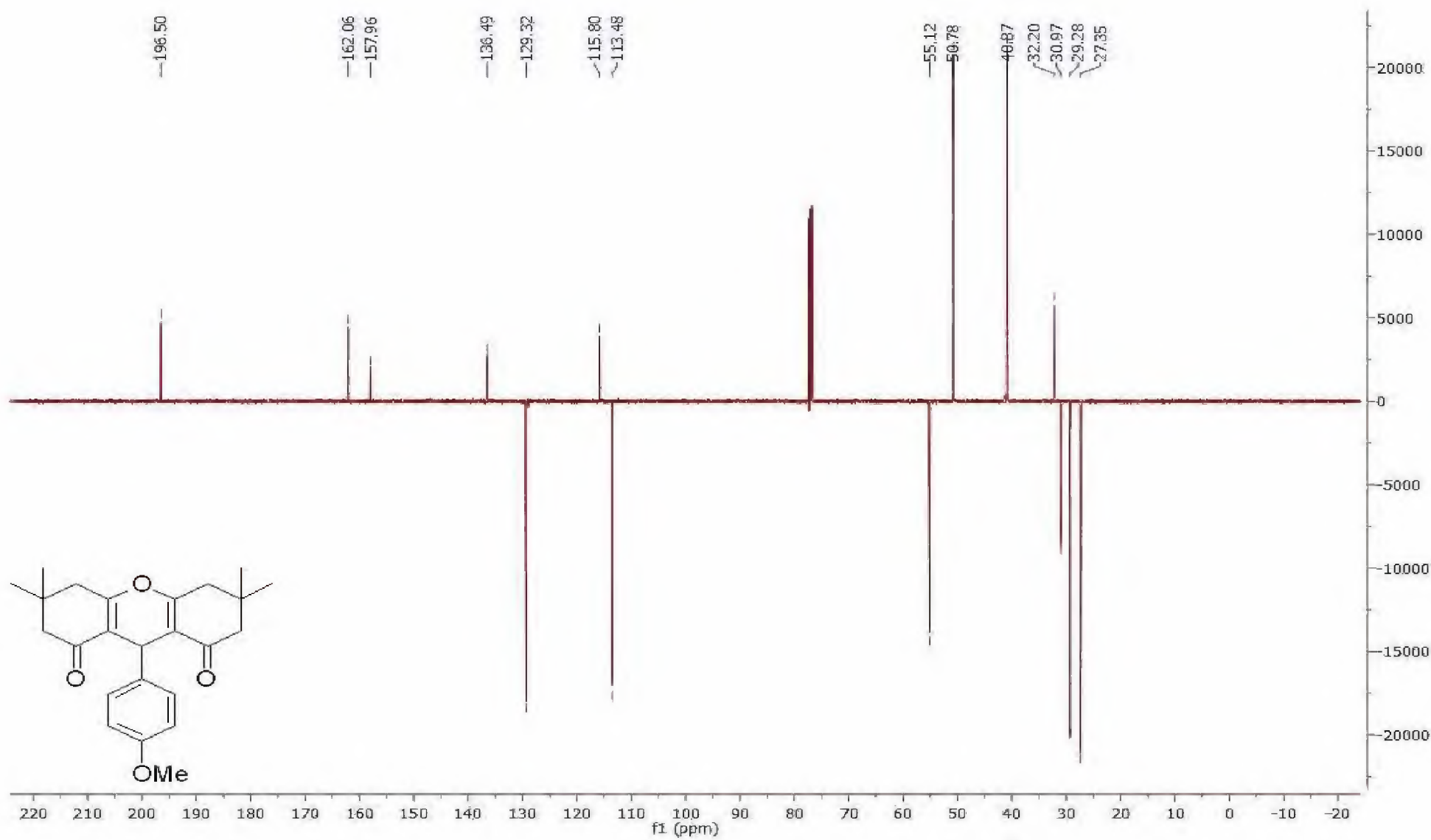
Anexo 74: Espectro de RMN ^1H da molécula 28 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



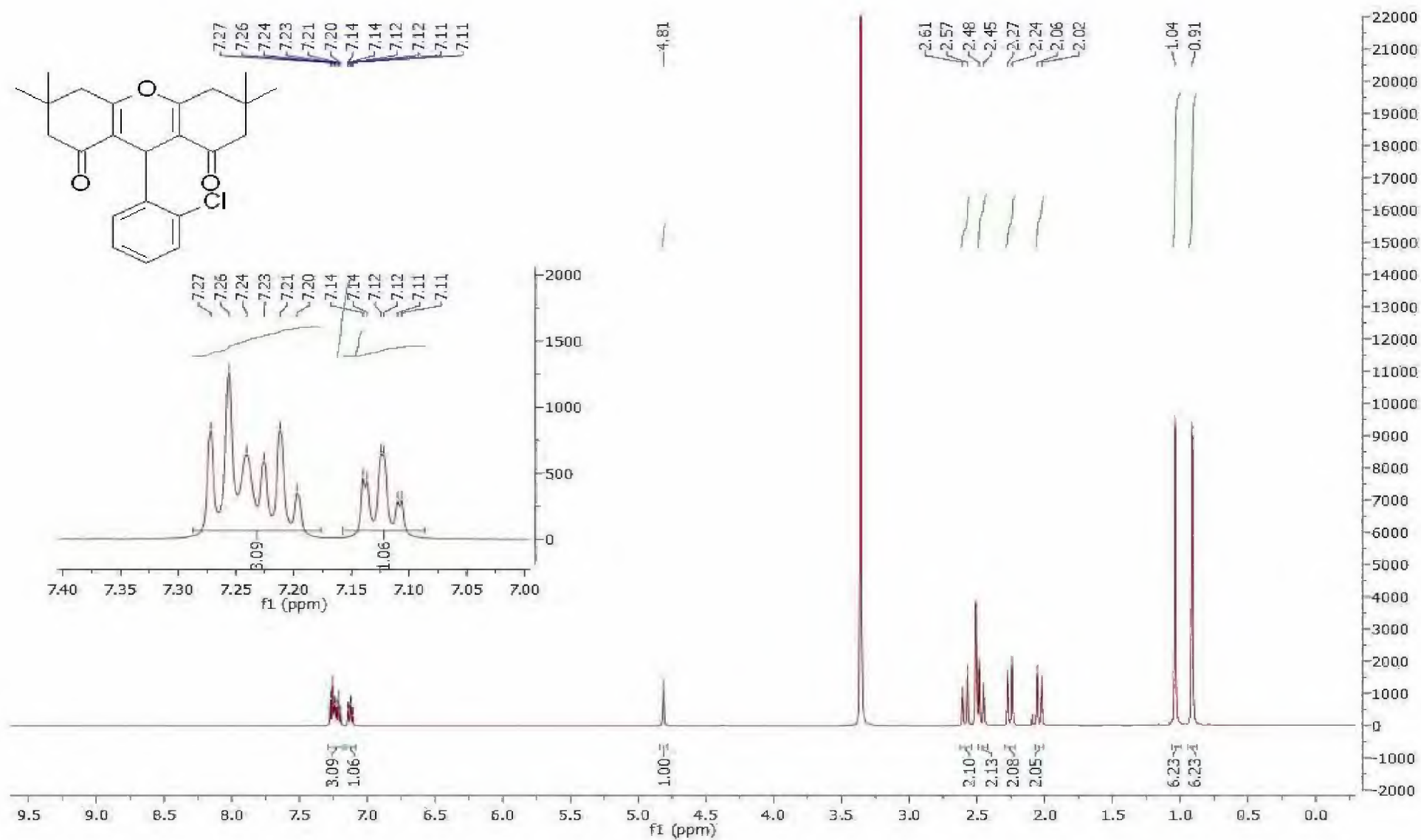
Anexo 75: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 28 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



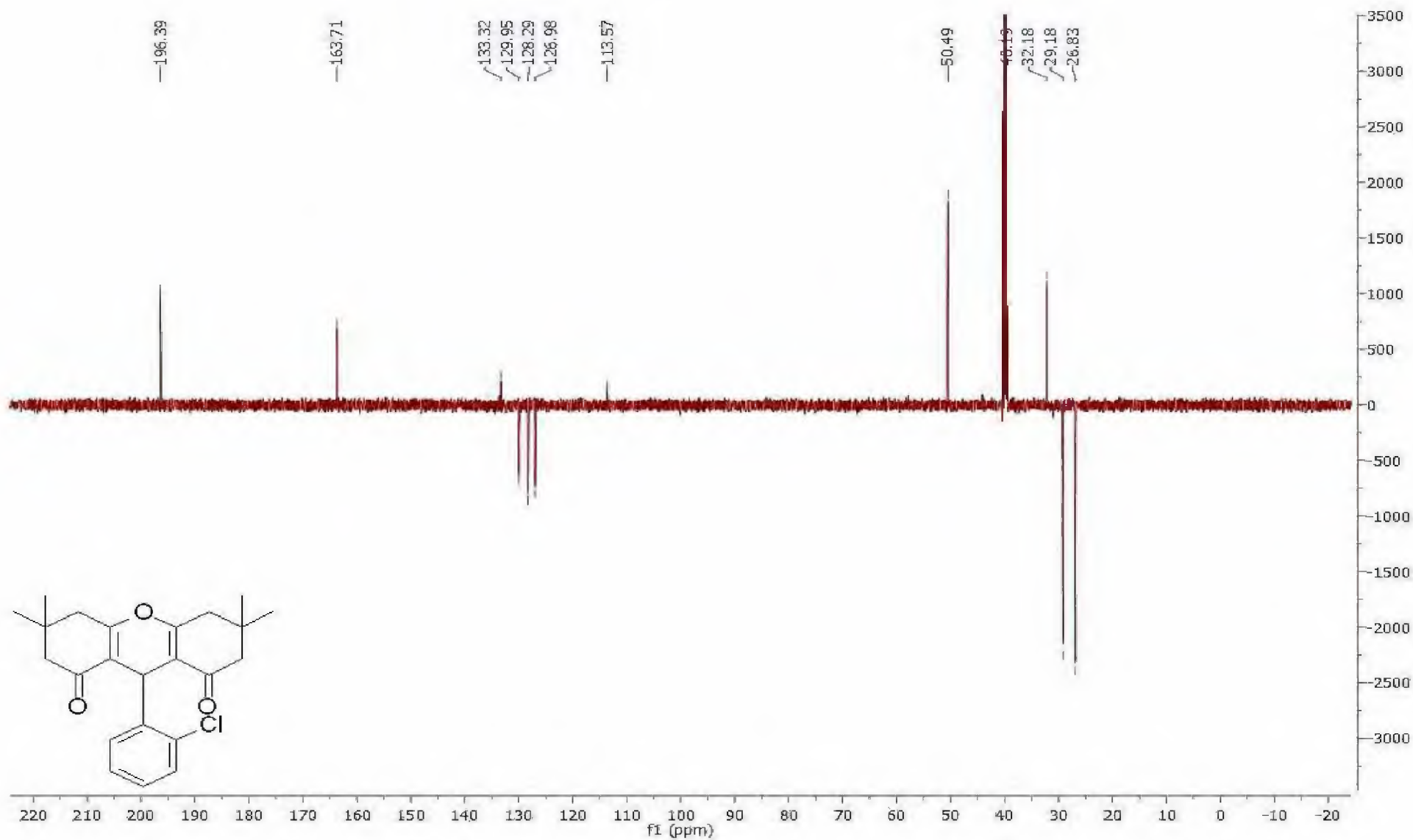
Anexo 77: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 29 em CDCl_3 a 126 MHz.



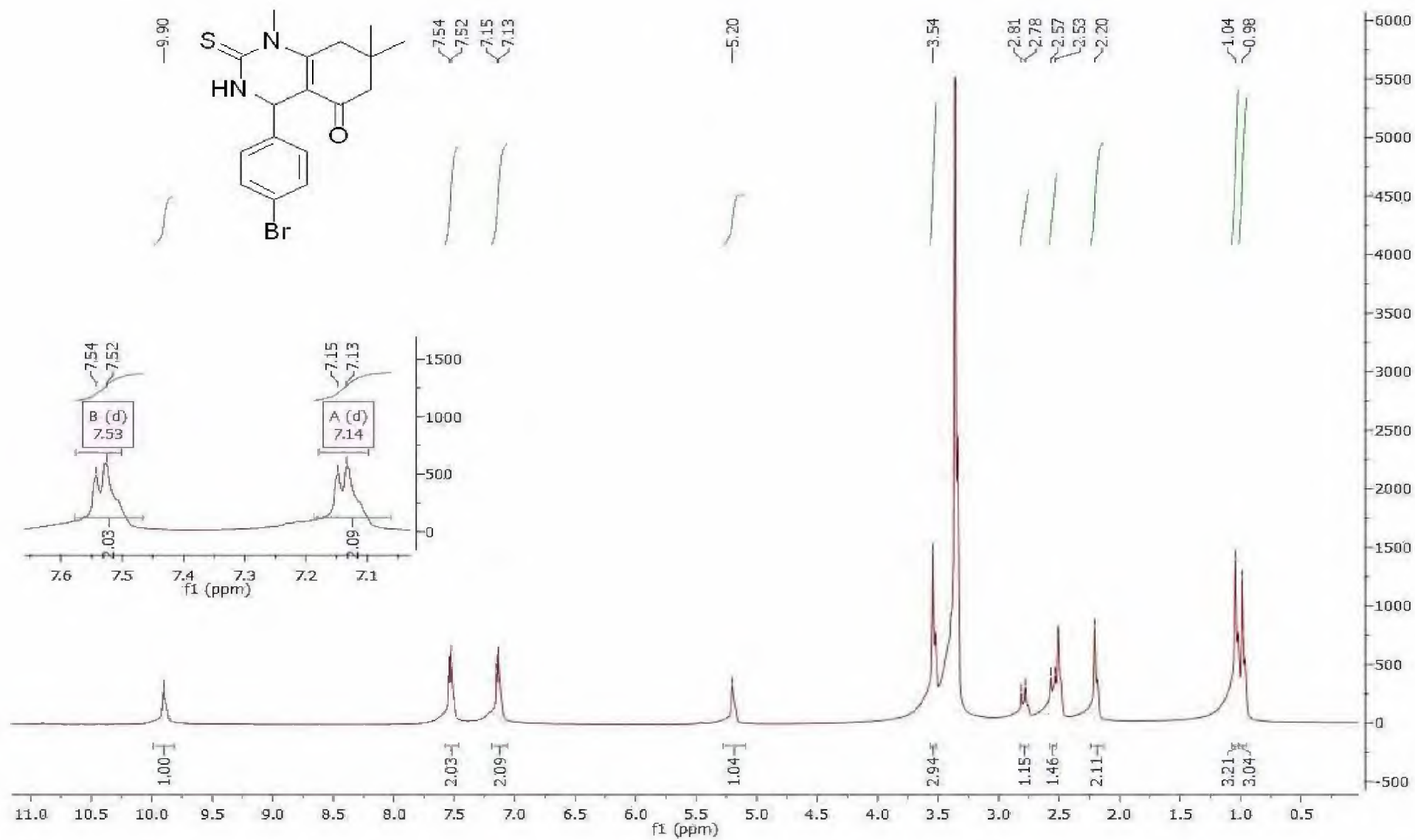
Anexo 78: Espectro de RMN ^1H da molécula 31 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



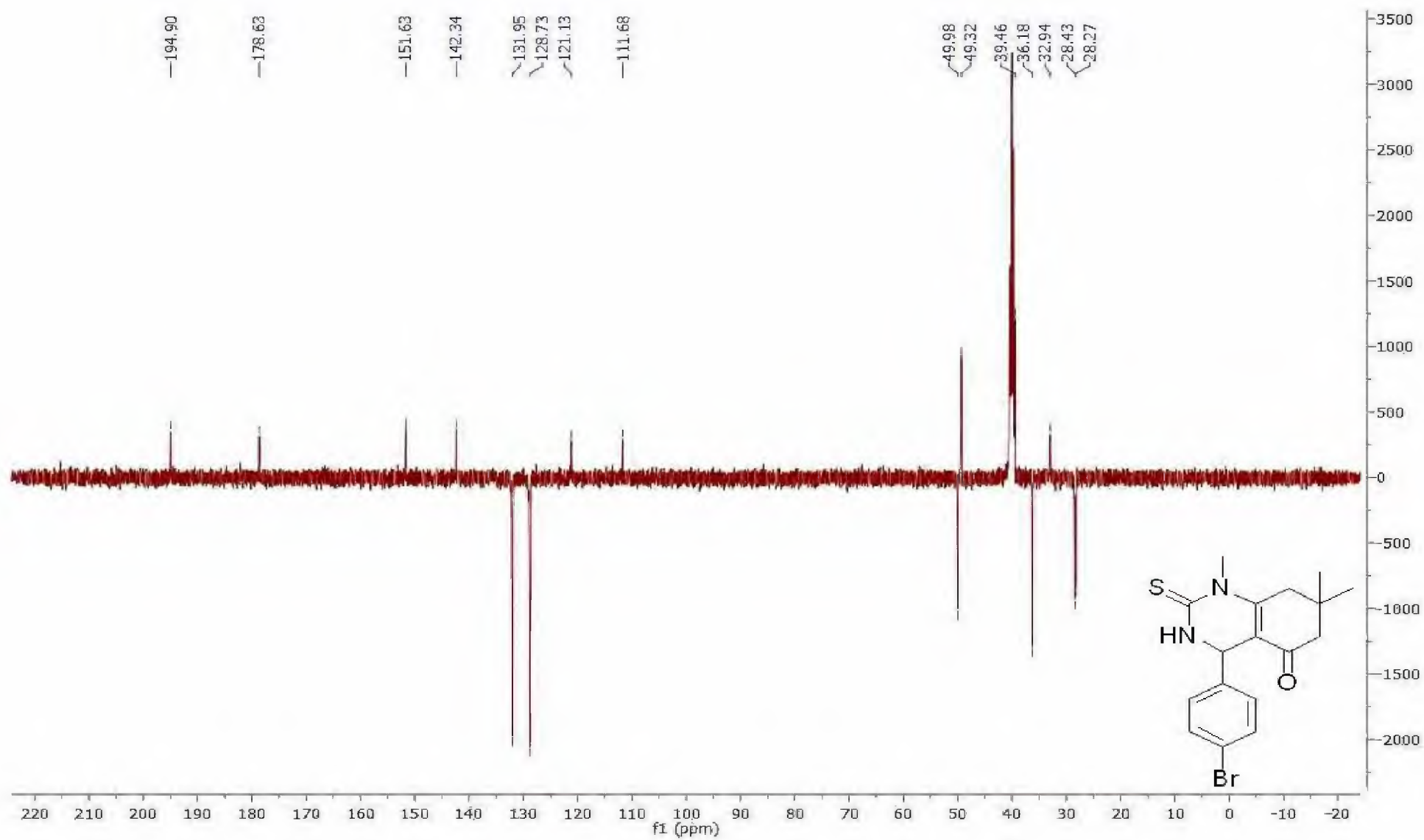
Anexo 79: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 31 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



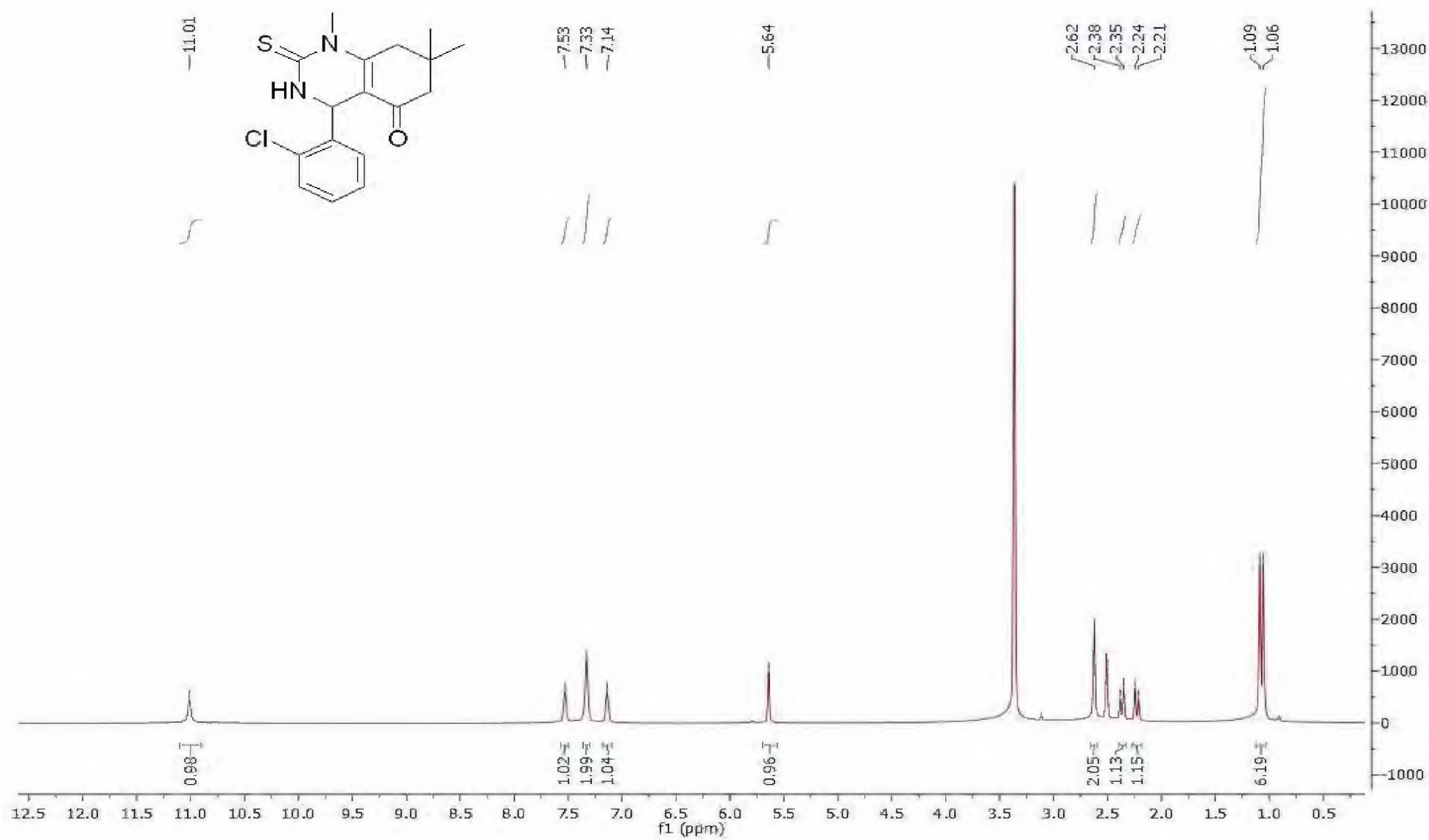
Anexo 80: Espectro de RMN ^1H da molécula 34 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



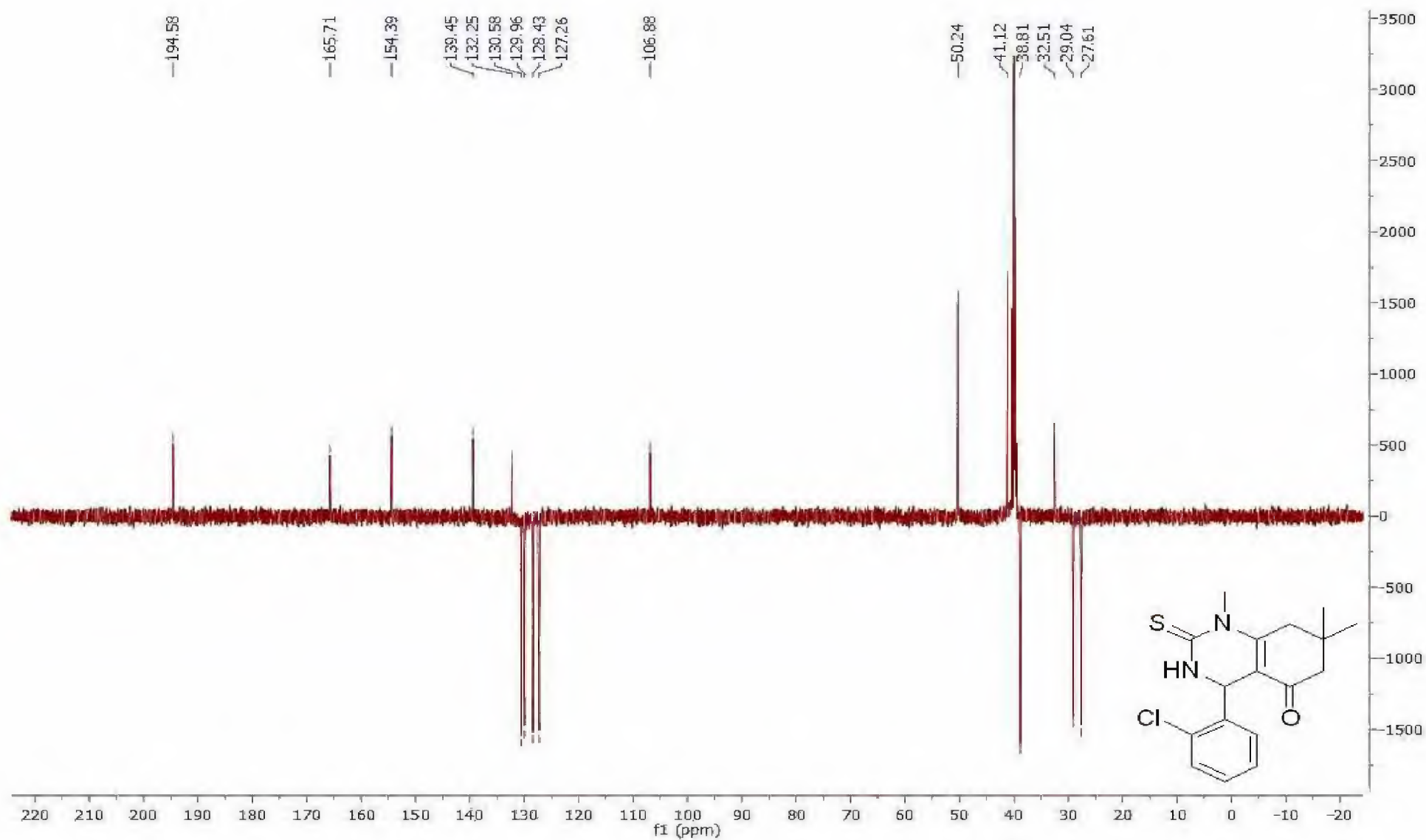
Anexo 81: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 34 em DMSO-d₆ a 126 MHz.



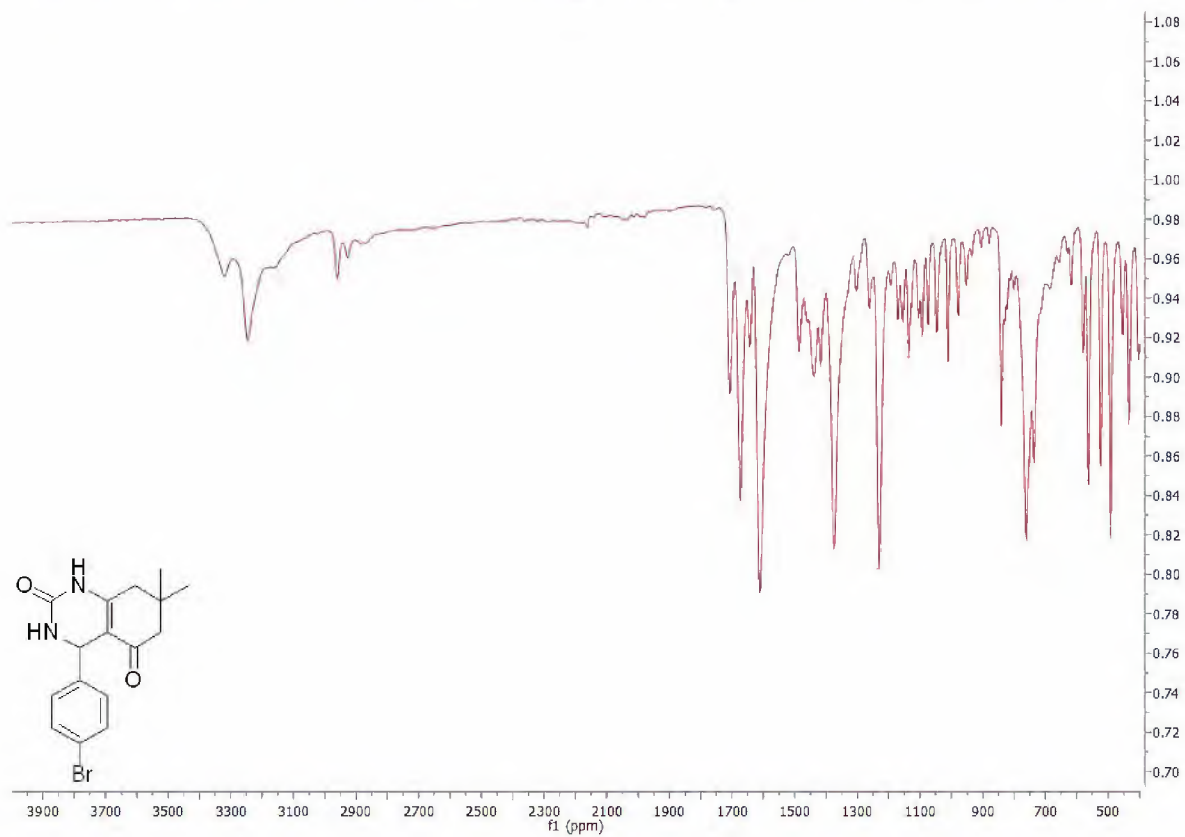
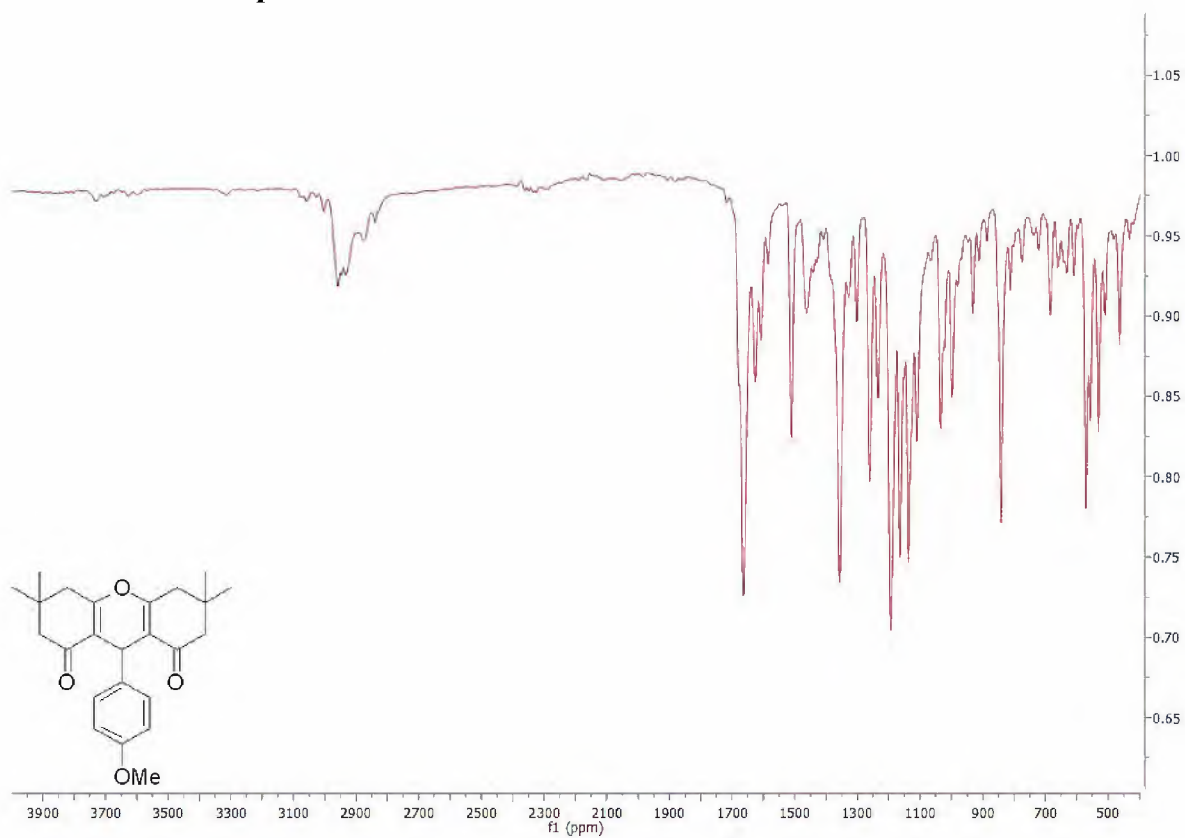
Anexo 82: Espectro de RMN ^1H da molécula 35 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



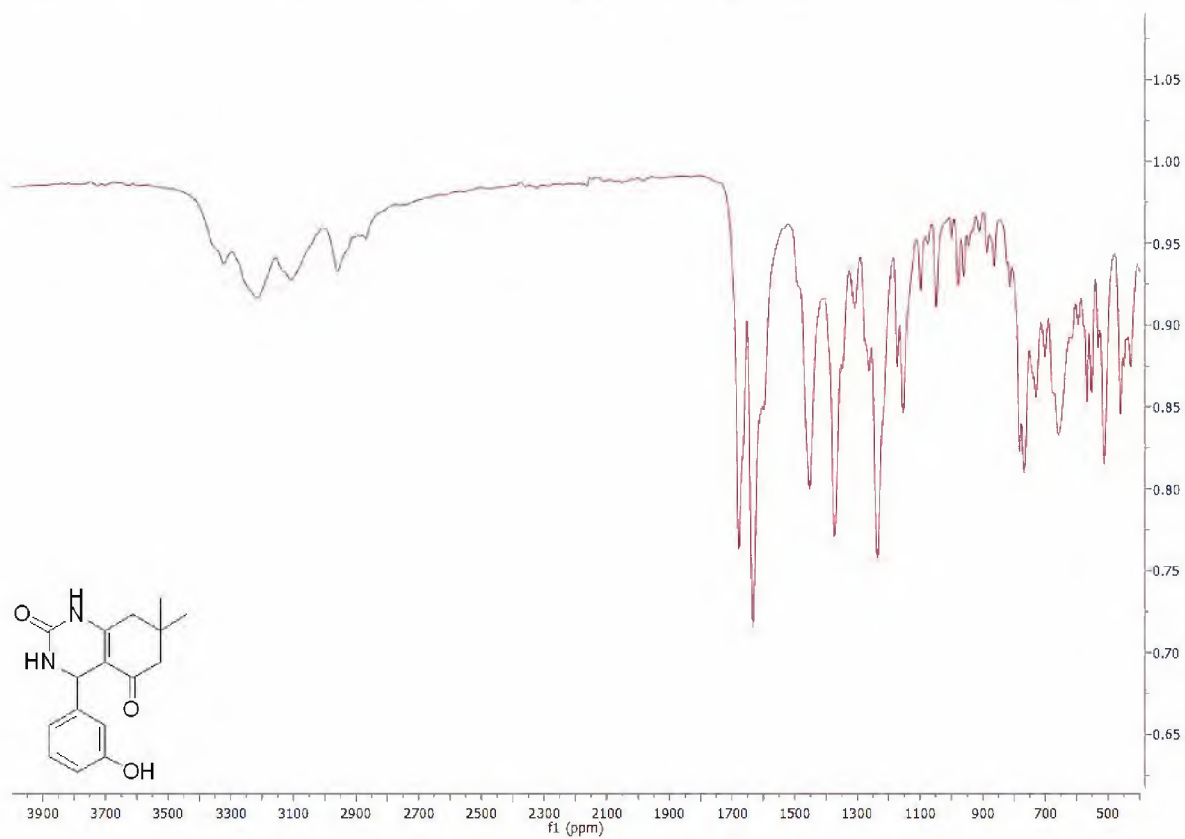
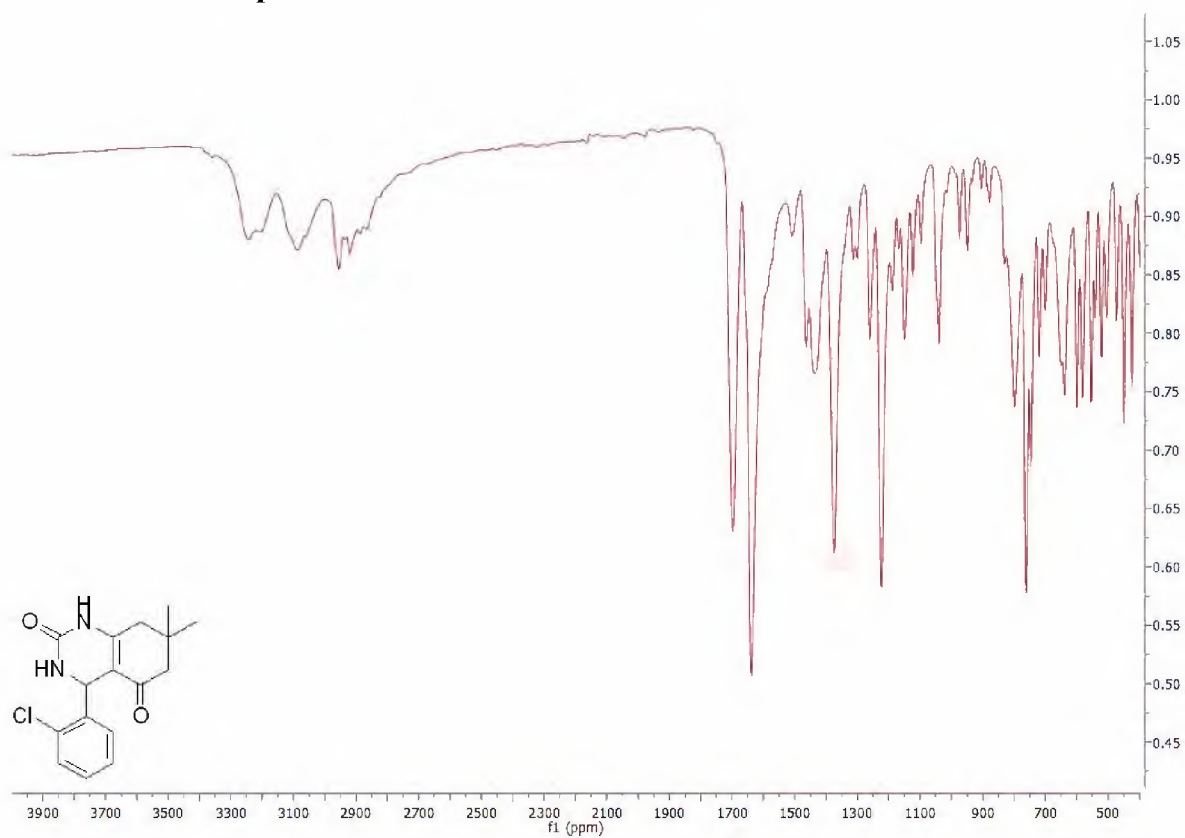
Anexo 83: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 35 em DMSO-d₆ a 126 MHz.



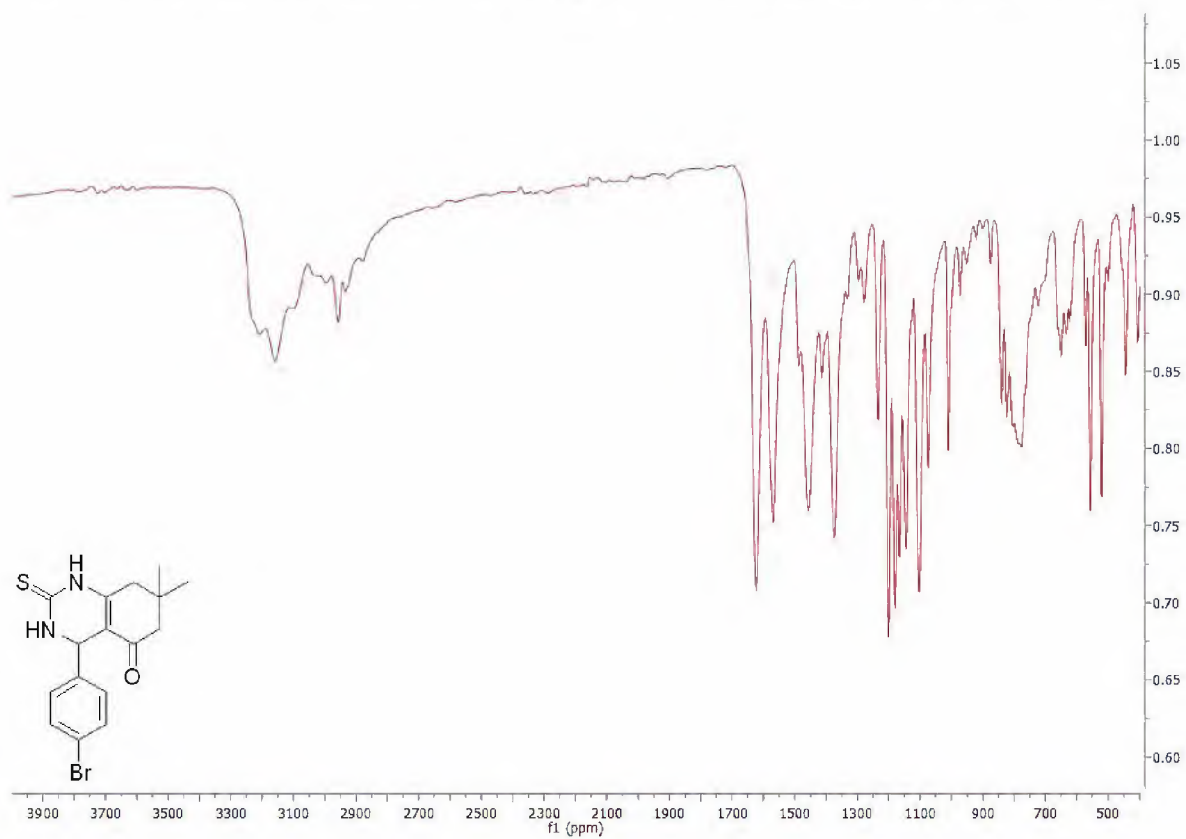
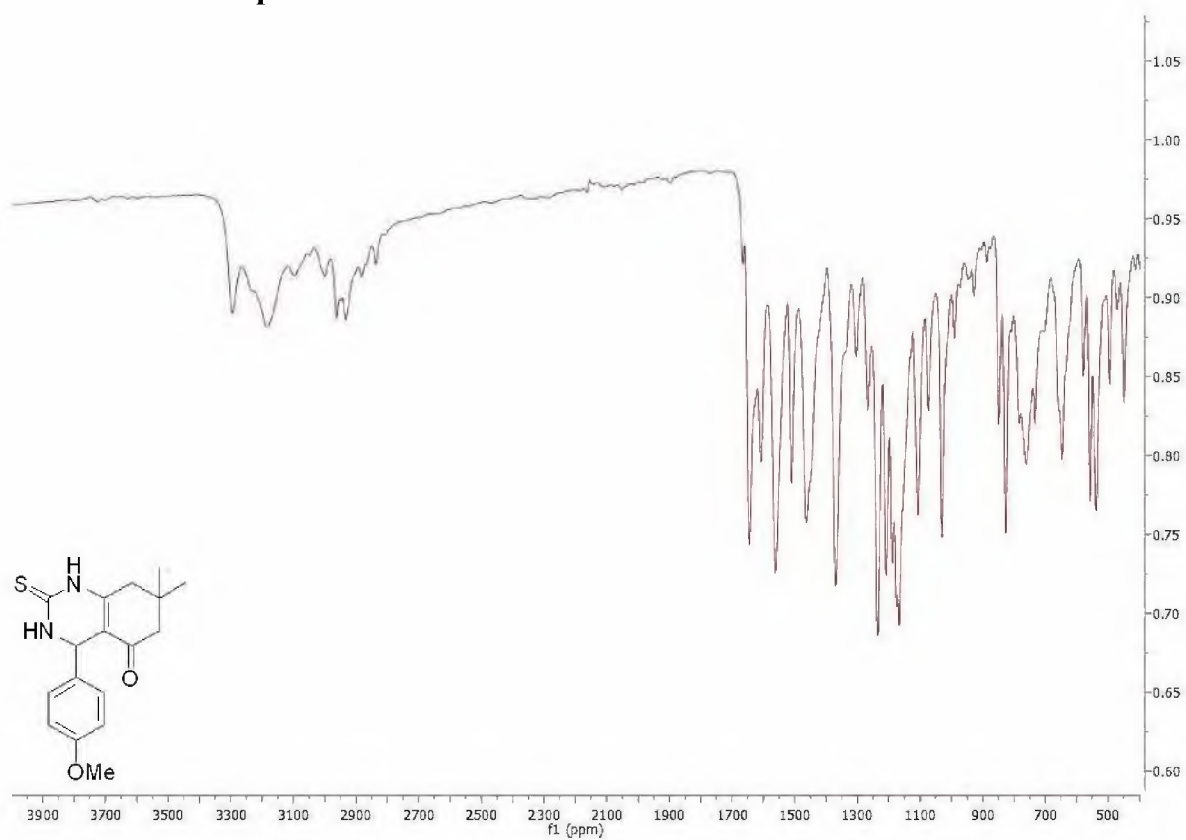
Anexo 84: Espectro de IV das moléculas 17.1 e 18.



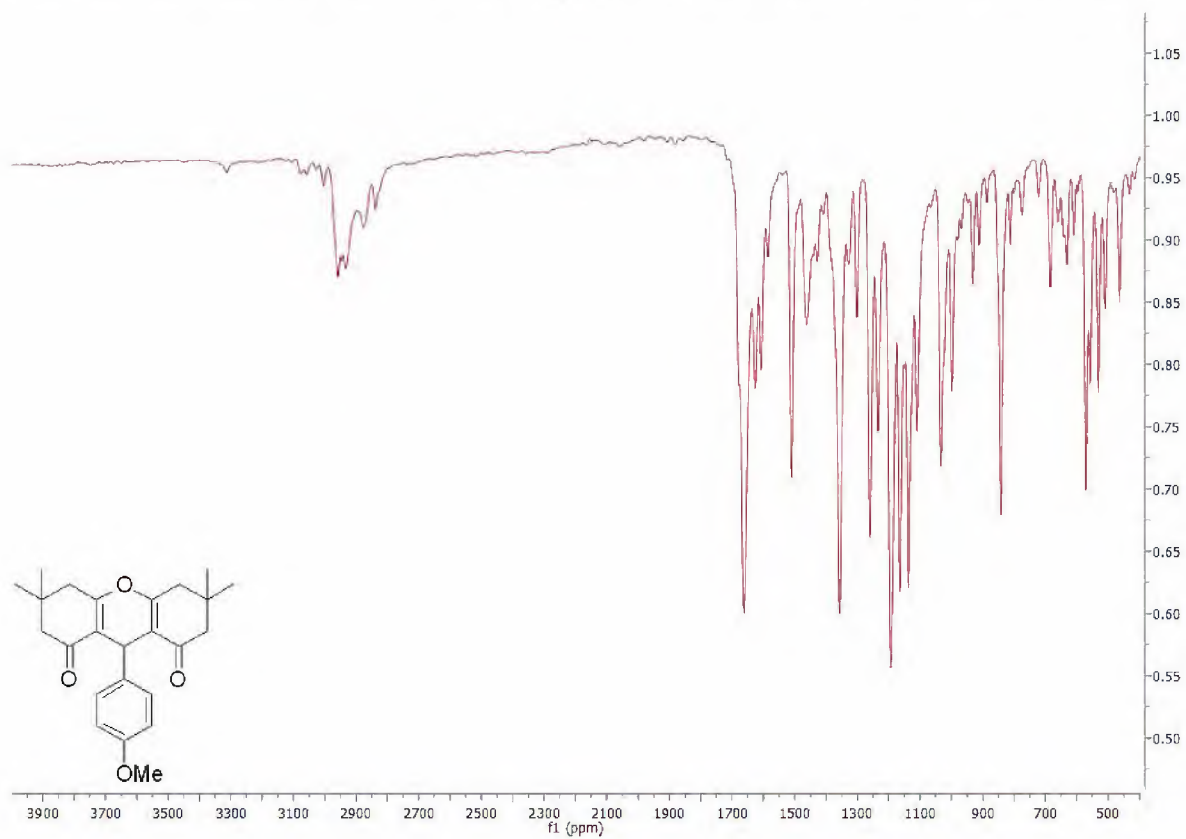
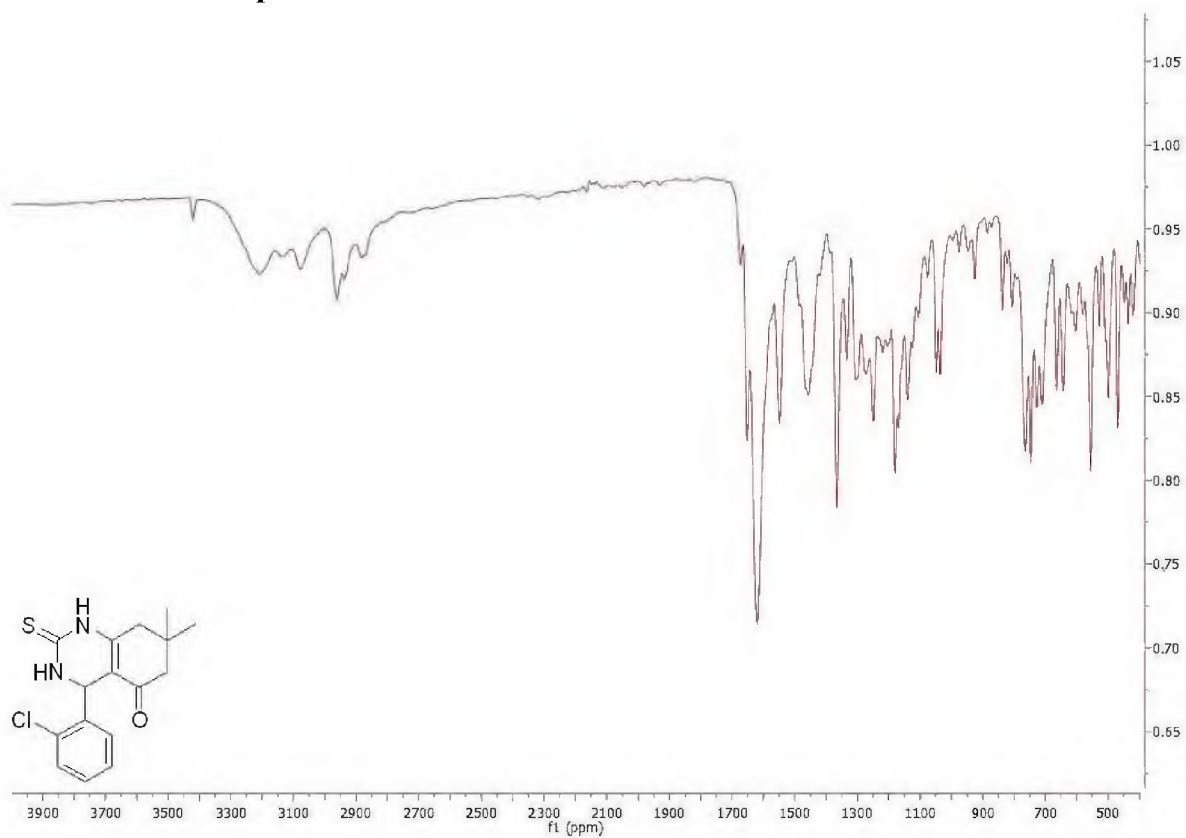
Anexo 85: Espectro de IV das moléculas 19 e 20.



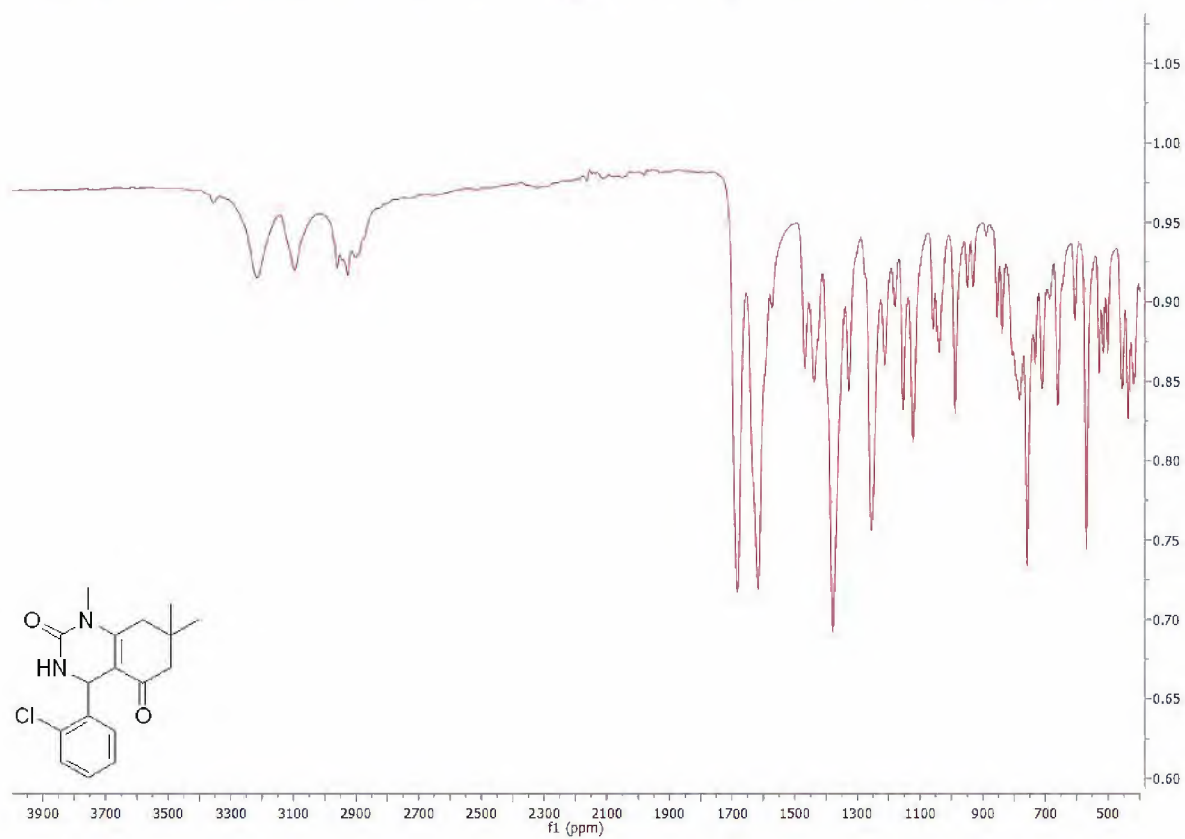
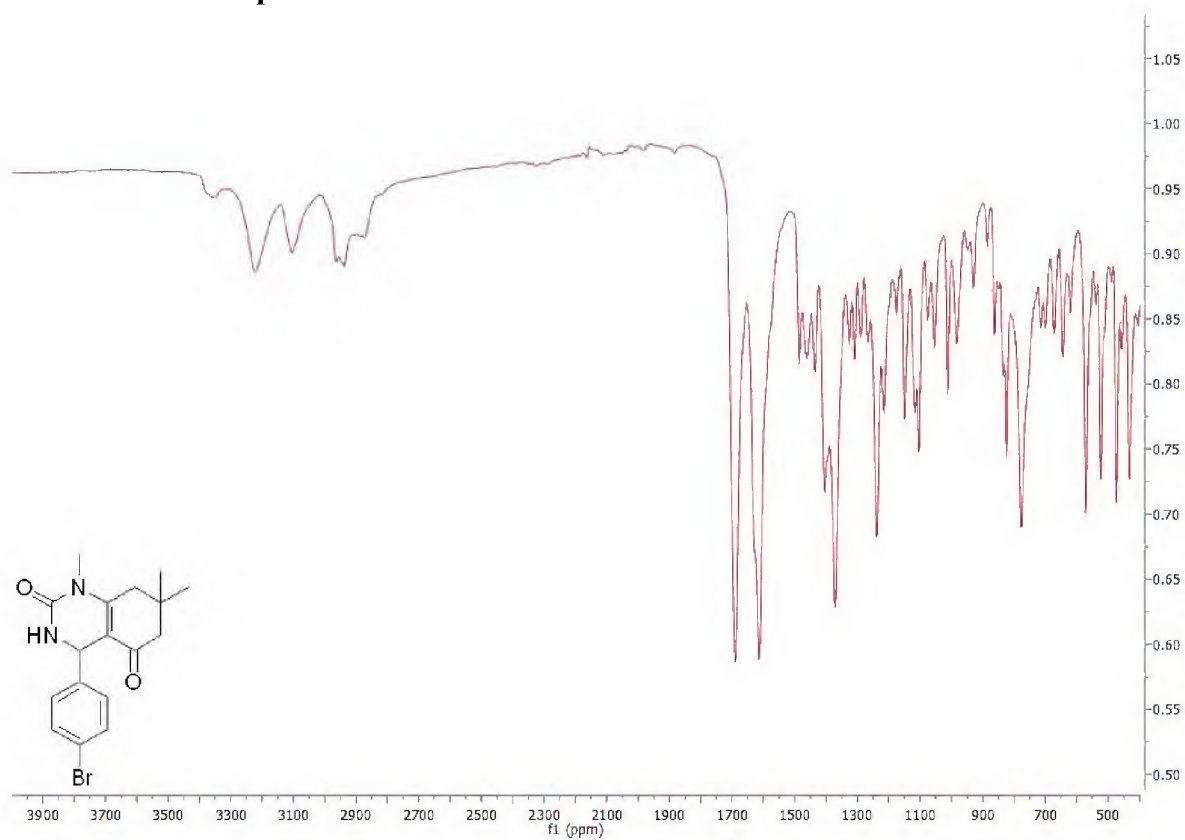
Anexo 86: Espectro de IV das moléculas 21 e 22.



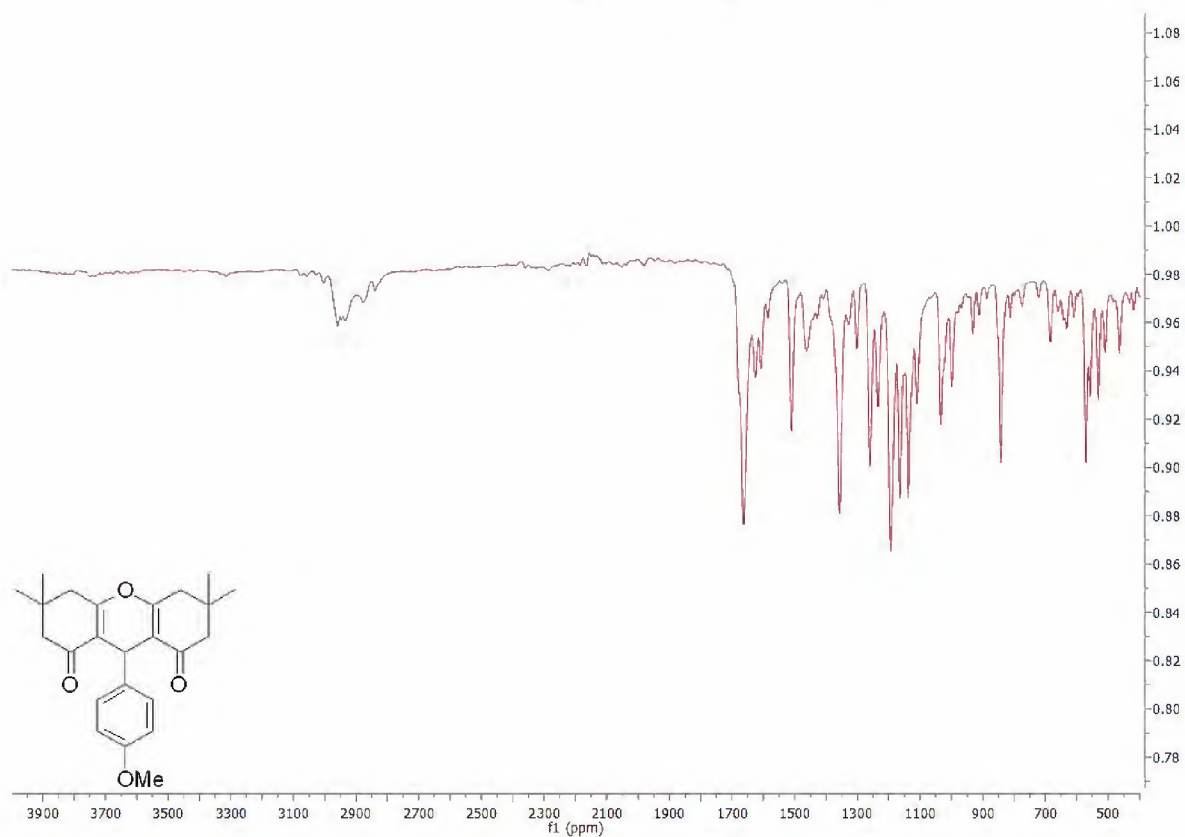
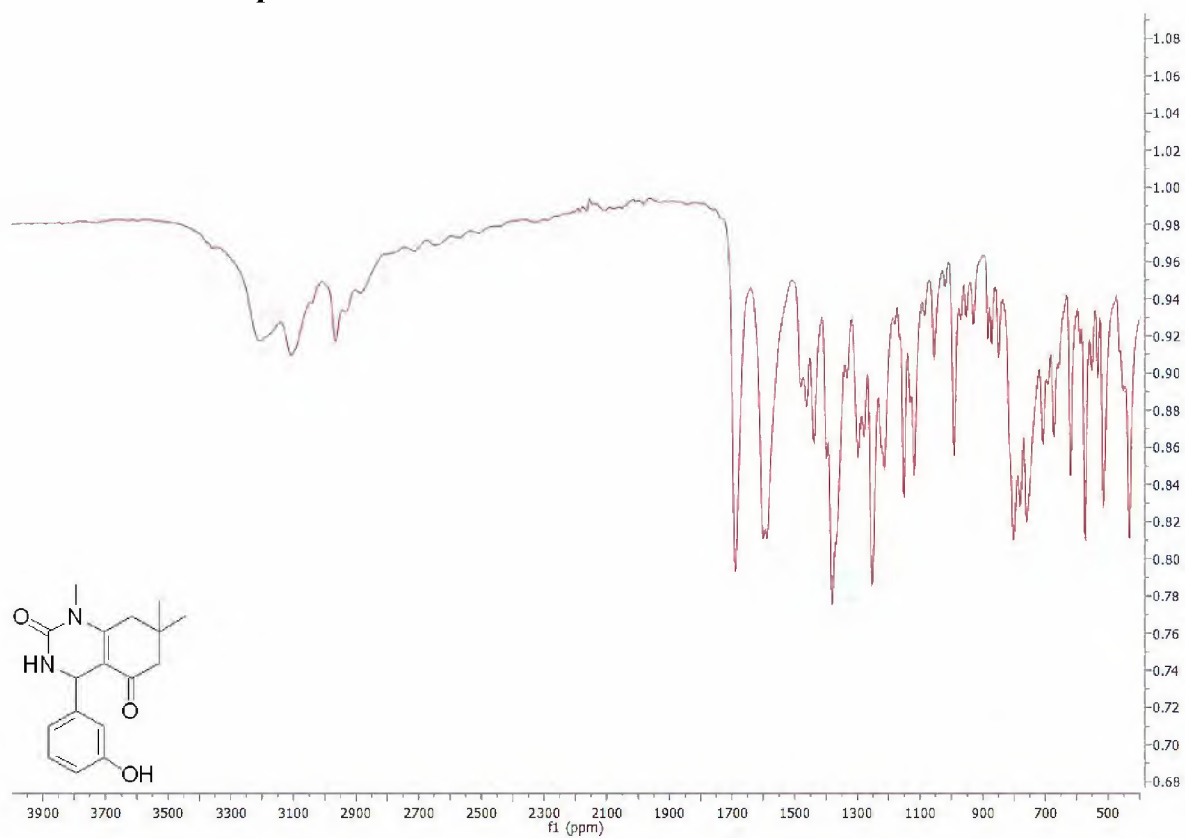
Anexo 87: Espectro de IV das moléculas 23 e 25.



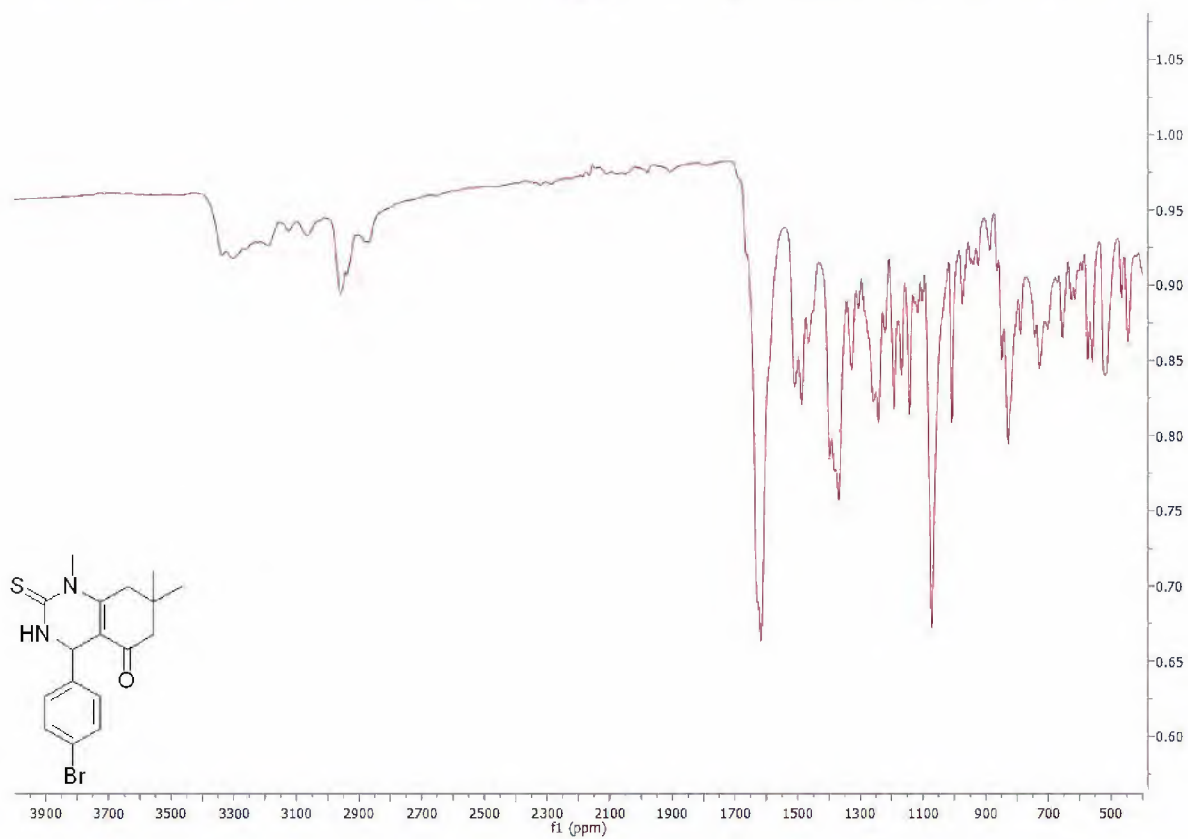
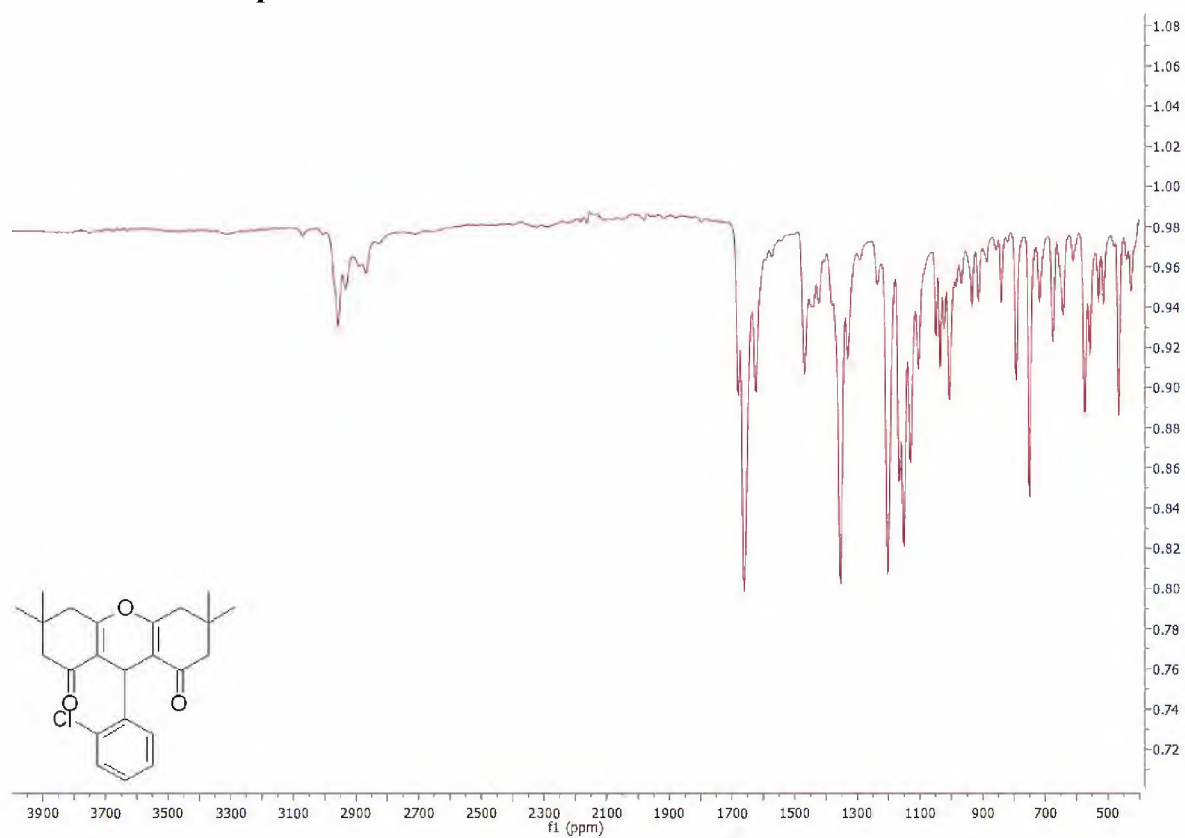
Anexo 88: Espectro de IV das moléculas 26 e 27.



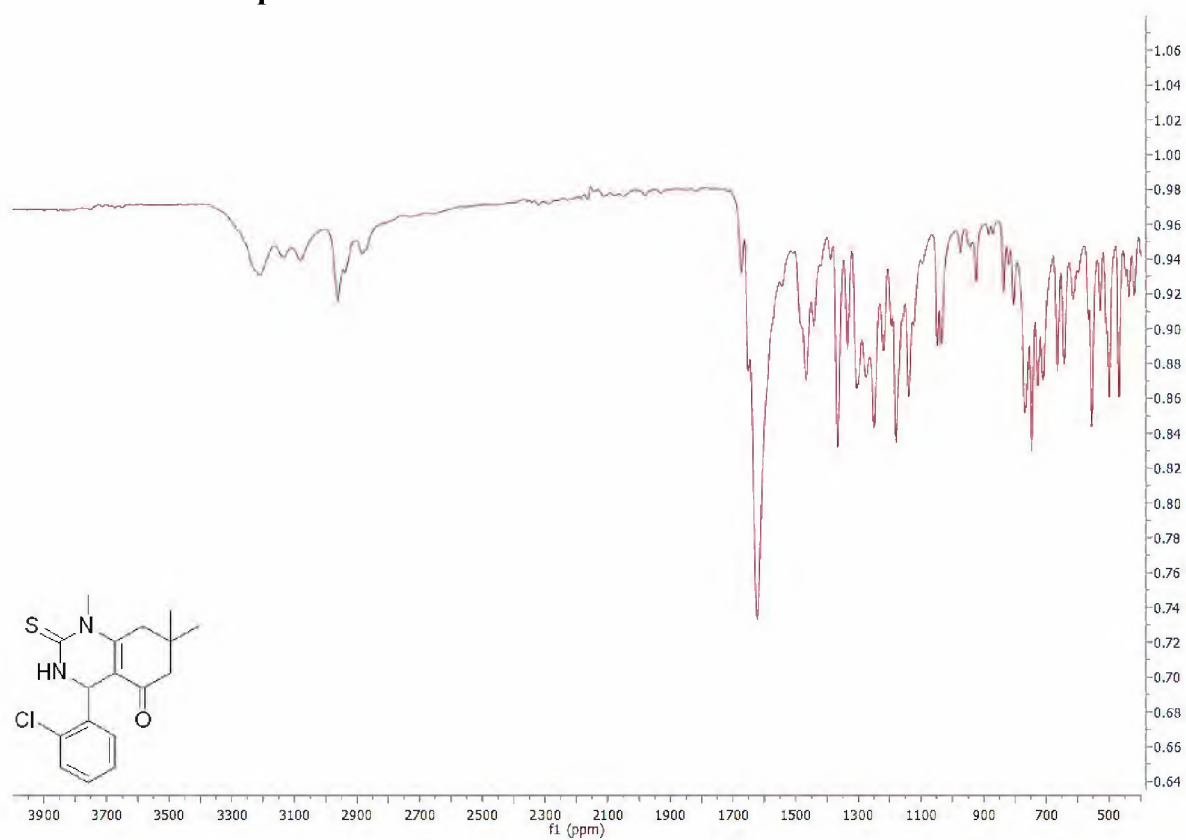
Anexo 89: Espectro de IV das moléculas 28 e 29.



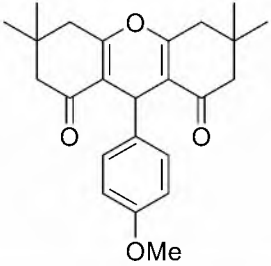
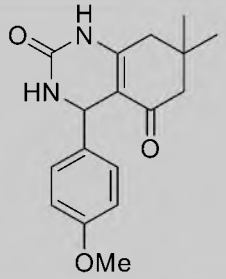
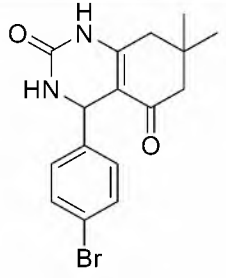
Anexo 90: Espectro de IV das moléculas 31 e 34.

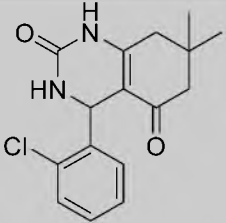
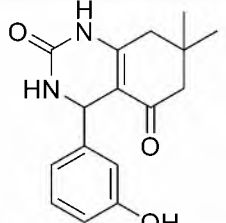
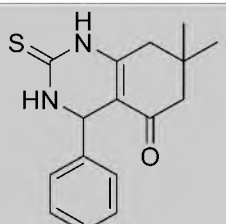
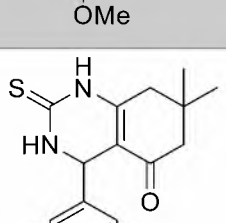


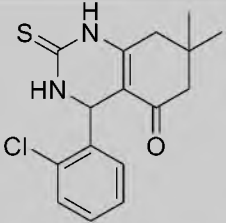
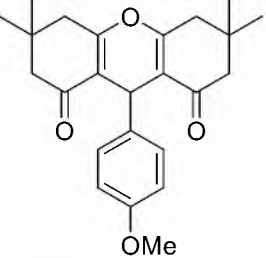
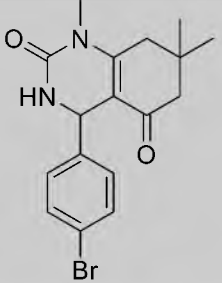
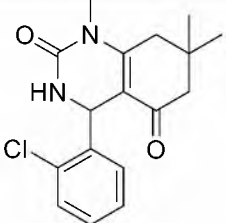
Anexo 91: Espectro de IV da molécula 35.

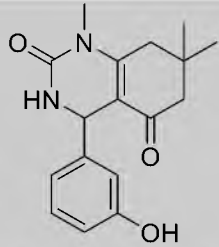
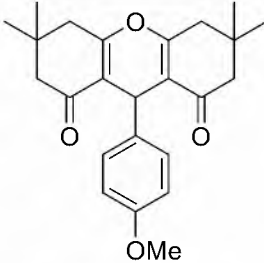
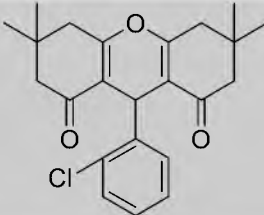
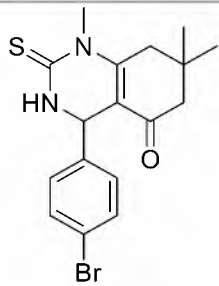


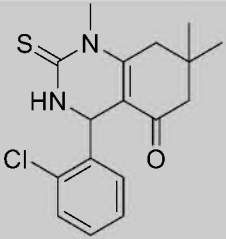
Anexo 92: Moléculas obtidas e caracterizada do capítulo II e atividades relacionadas a cada uma.

Molécula	Estrutura	% Inibição de amastigota a 100µM	% Inibição de célula LLCMK2 a 200µM	CI ₅₀ ± DP (µM)	
				MDA-MB-231	DU-145
17.1		NT	NT	NT	NT
17.2		12,1	-	ppt	ppt
18		54,3	-	NT	NT

19		13,7	9,1	>100	>100
20		12,3	-	40,26 ± 4,60	42,37 ± 5,32
21		12,9	11,4	>100	>100
22		95,3	46,7	53,30 ± 6,27	>100

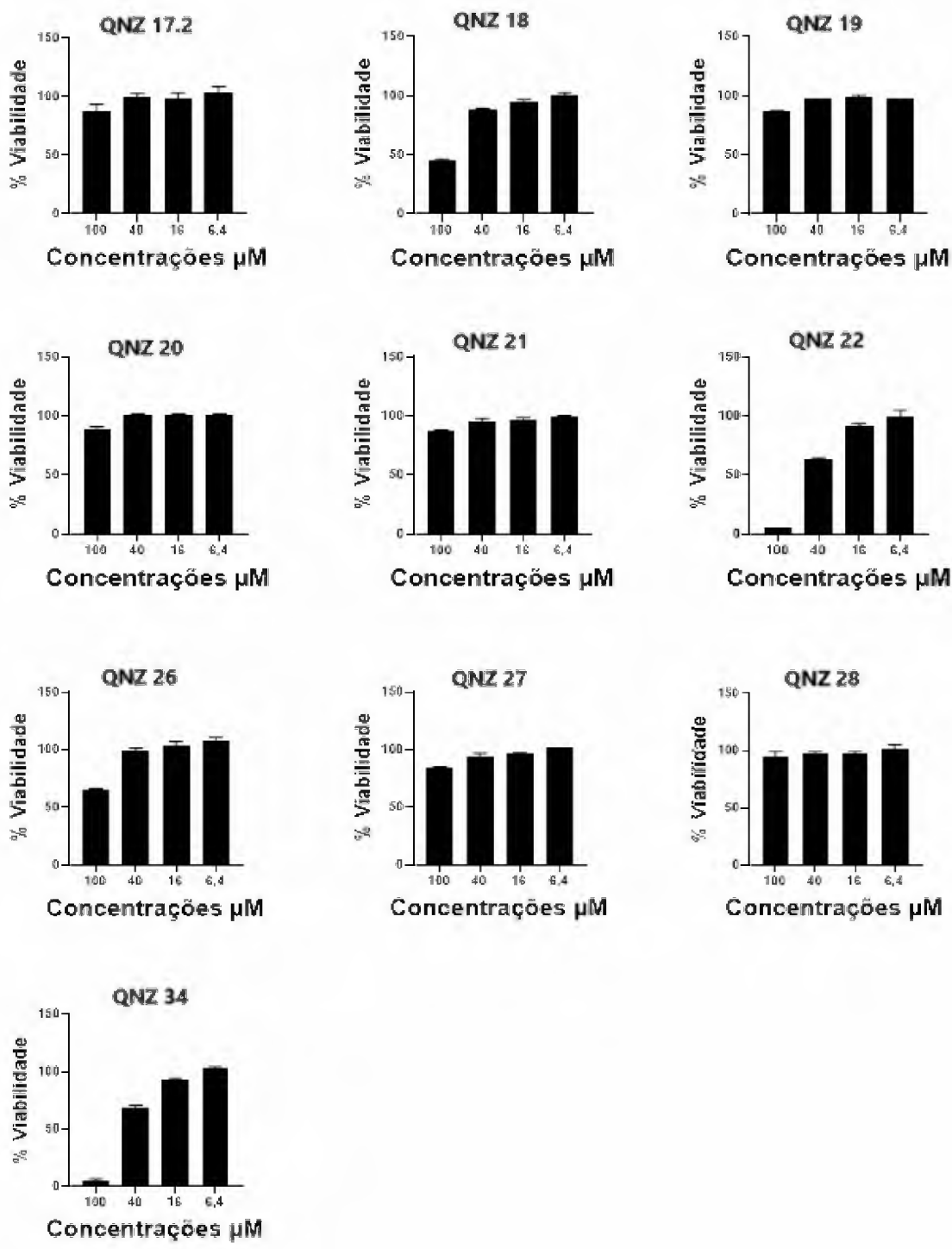
23		NT	NT	NT	NT
25		NT	NT	NT	NT
26		34,6	-	>100	>100
27		15,9	18,8	>100	>100

28		5,1	11,1	>100	>100
29		NT	NT	NT	NT
31		NT	NT	NT	NT
34		95,2	-	NT	NT

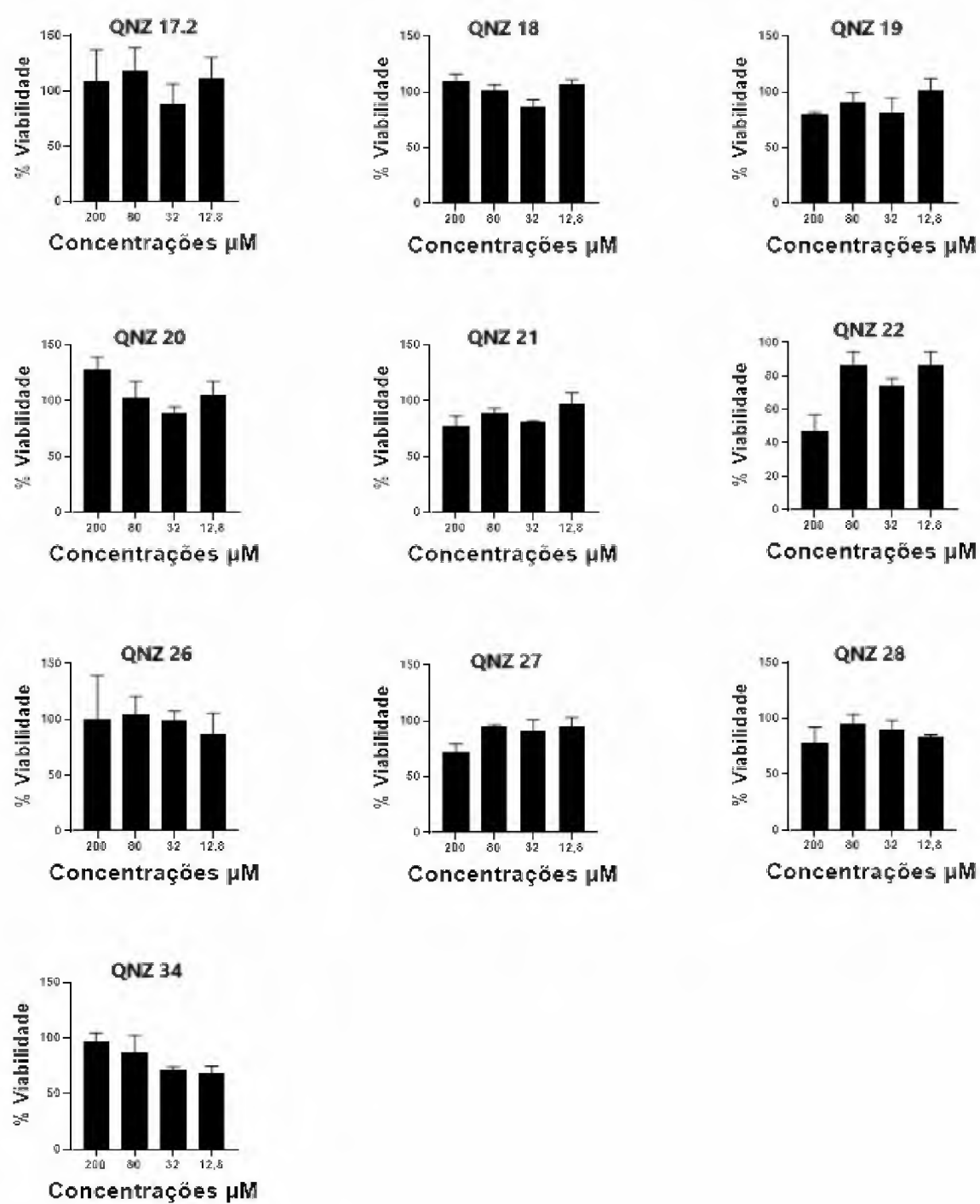
35		NT	NT	NT	NT
----	---	----	----	----	----

Nota: NT significa as moléculas que não foram testadas e – representa as moléculas que não possuíram inibição na concentração informada.

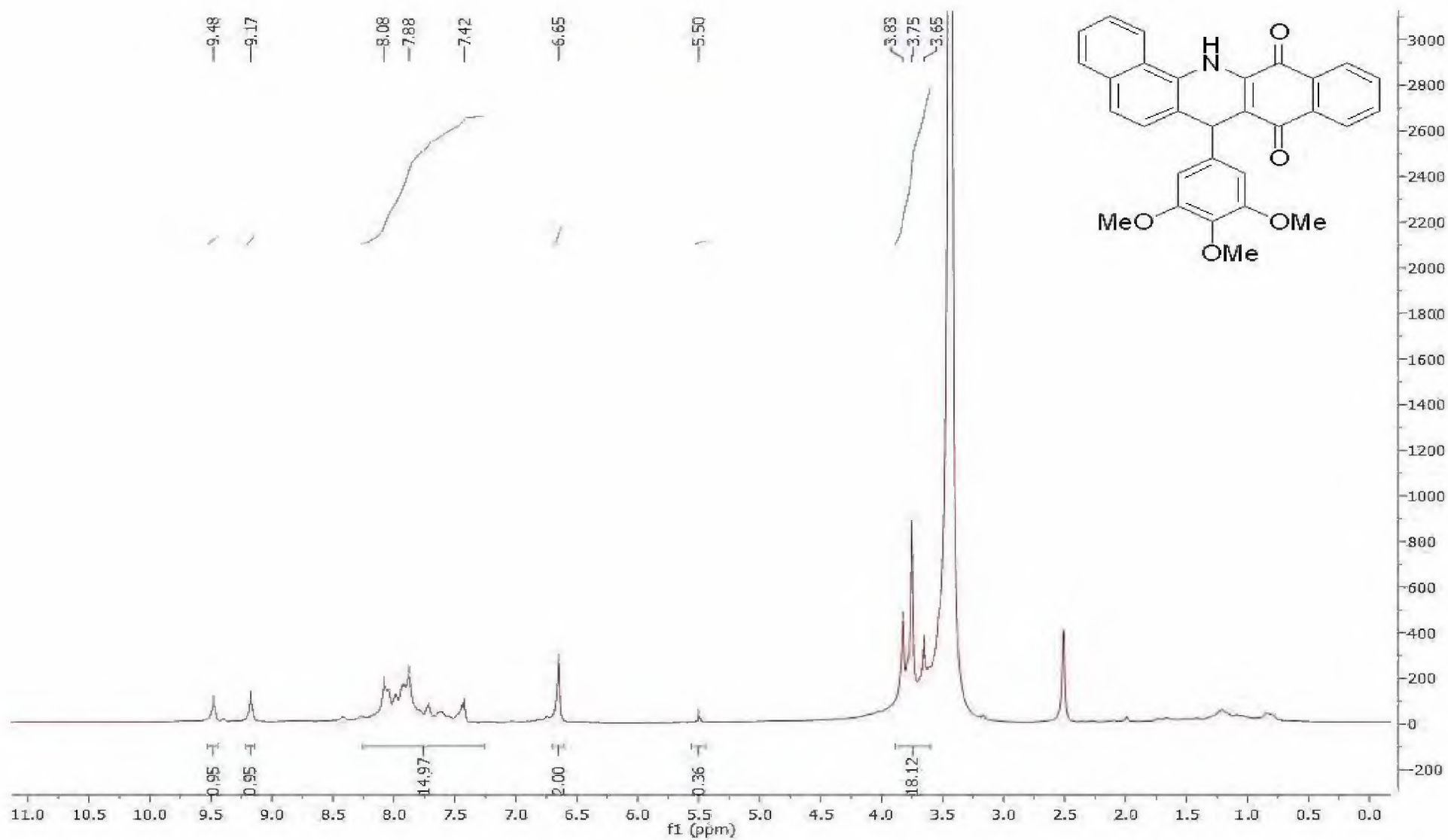
Anexo 93: Gráficos de porcentagem de viabilidade em função de diversas concentrações (200, 80, 32 e 12.5 µM) frente a formas amastigotas.



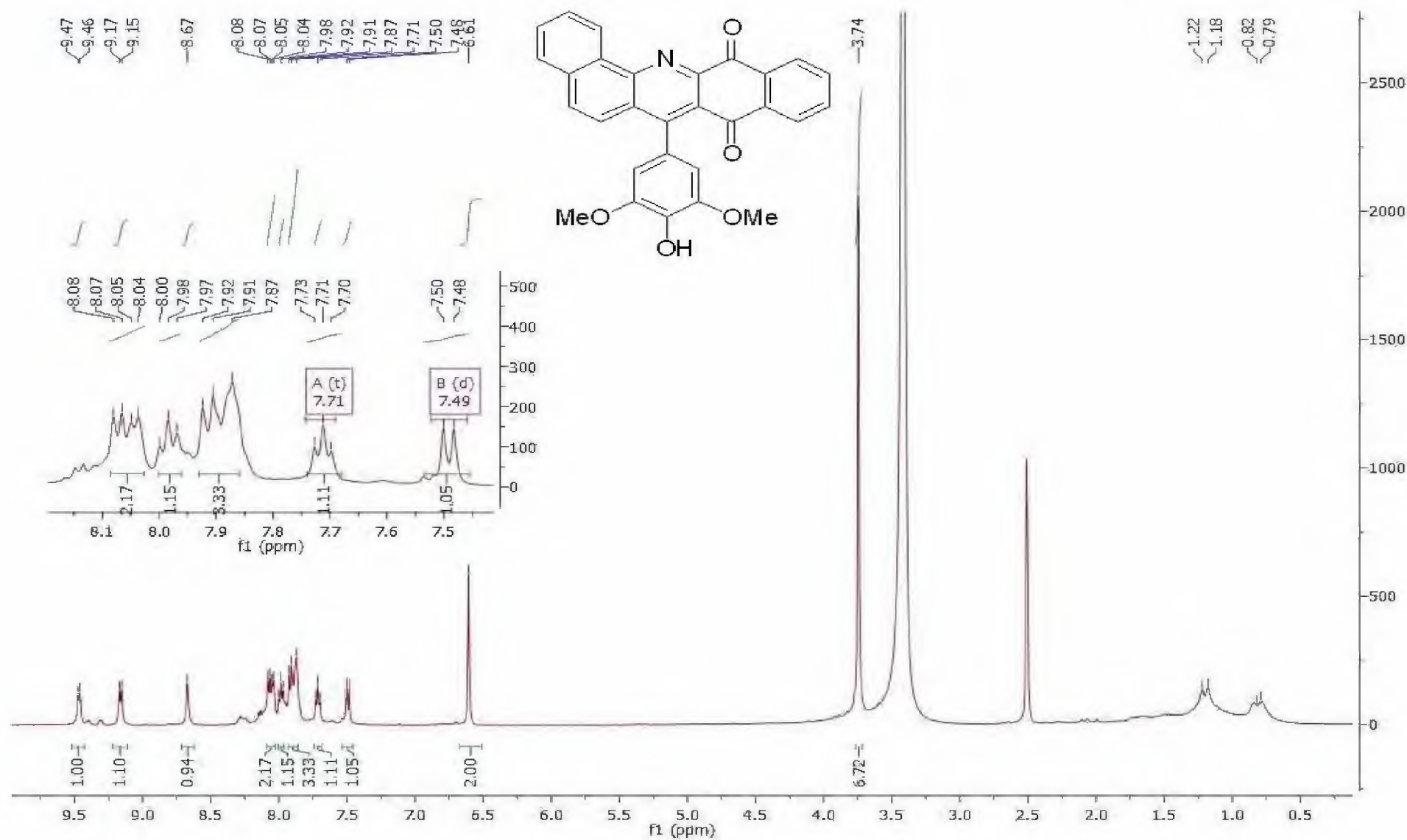
Anexo 94: Gráficos de porcentagem de viabilidade em função de diversas concentrações (200, 80, 32 e 12.5 µM) frente a células LLC-MK2.



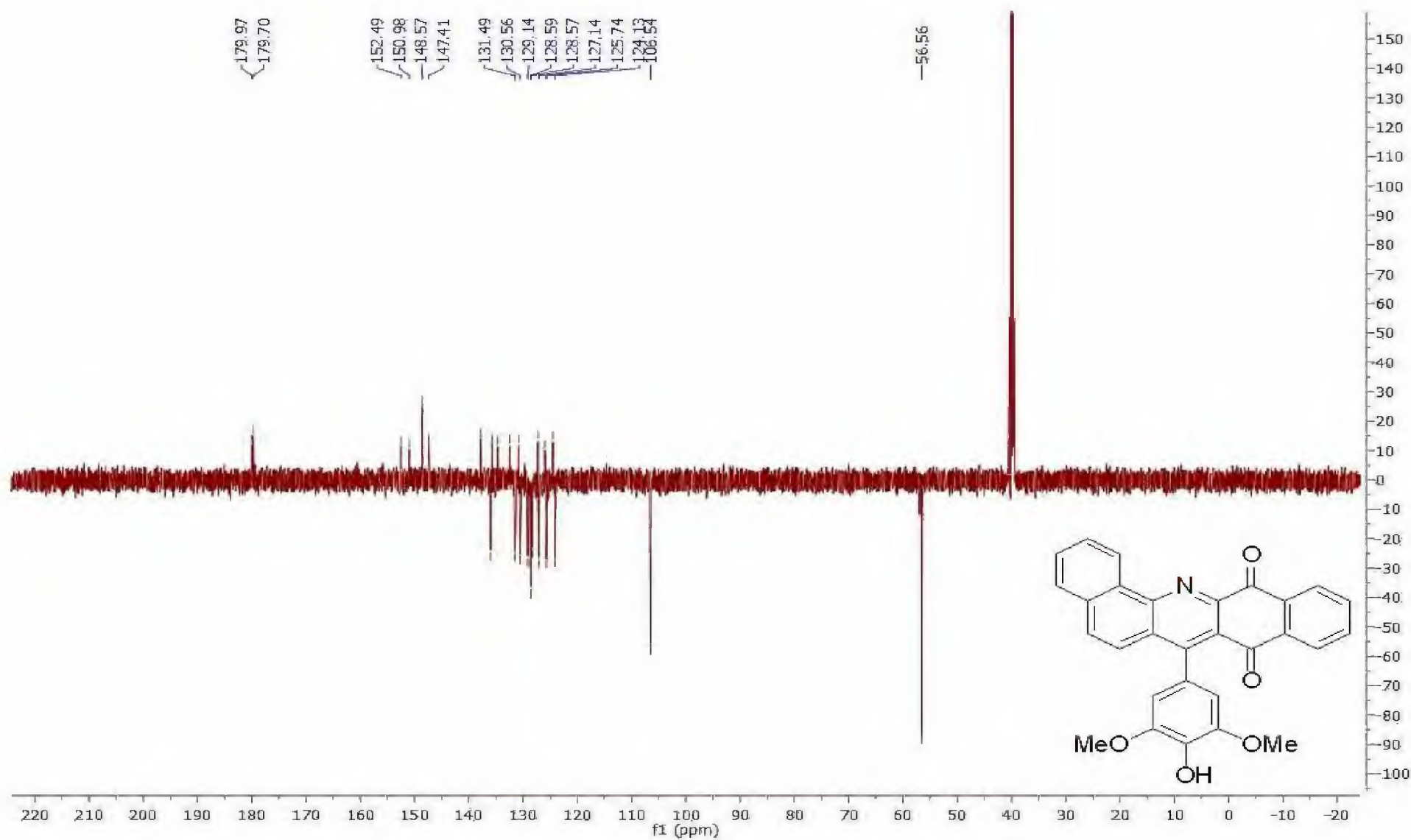
Anexo 95: Espectro de RMN ^1H da molécula 37 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



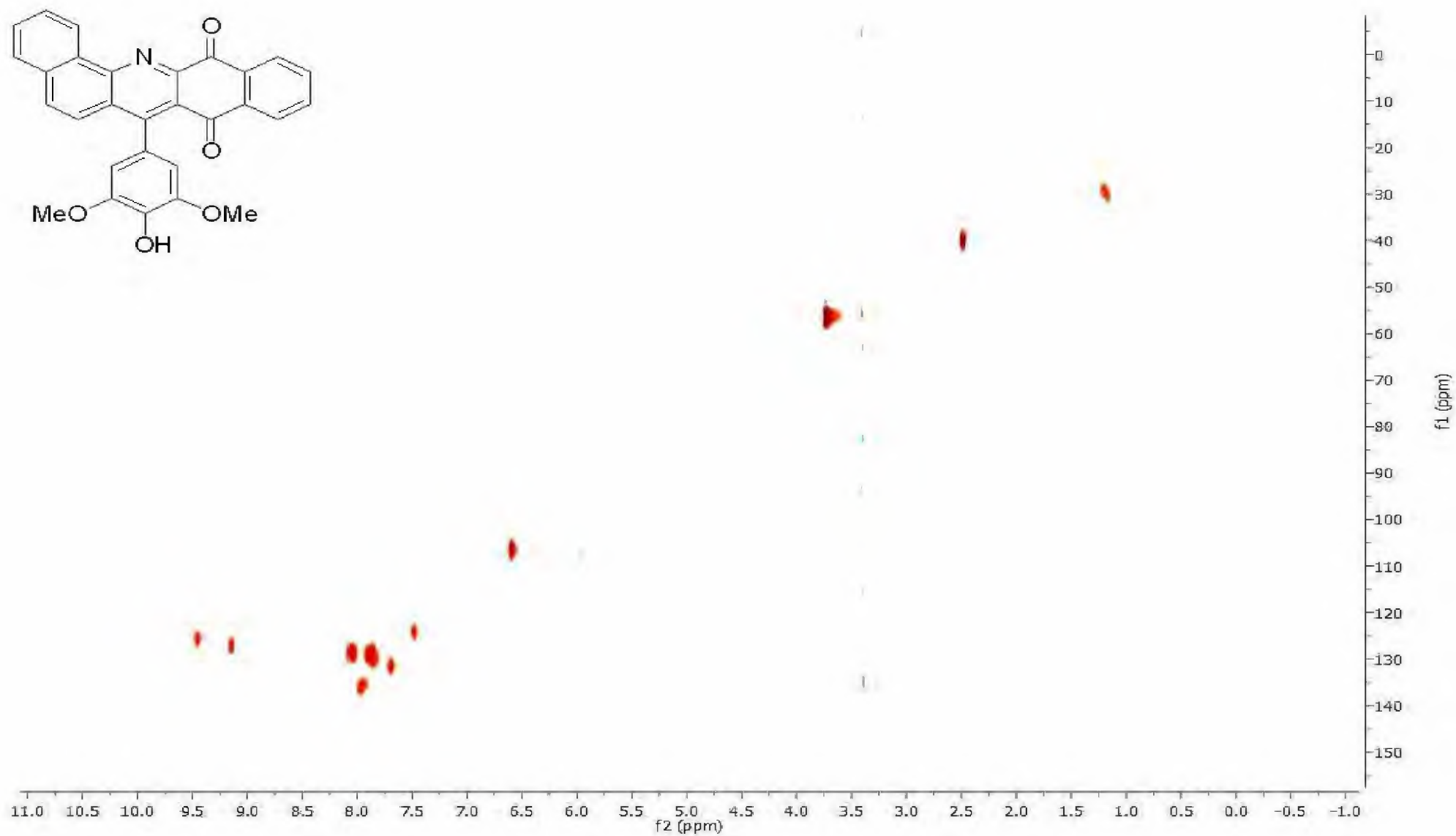
Anexo 96: Espectro de RMN ^1H da molécula 38 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



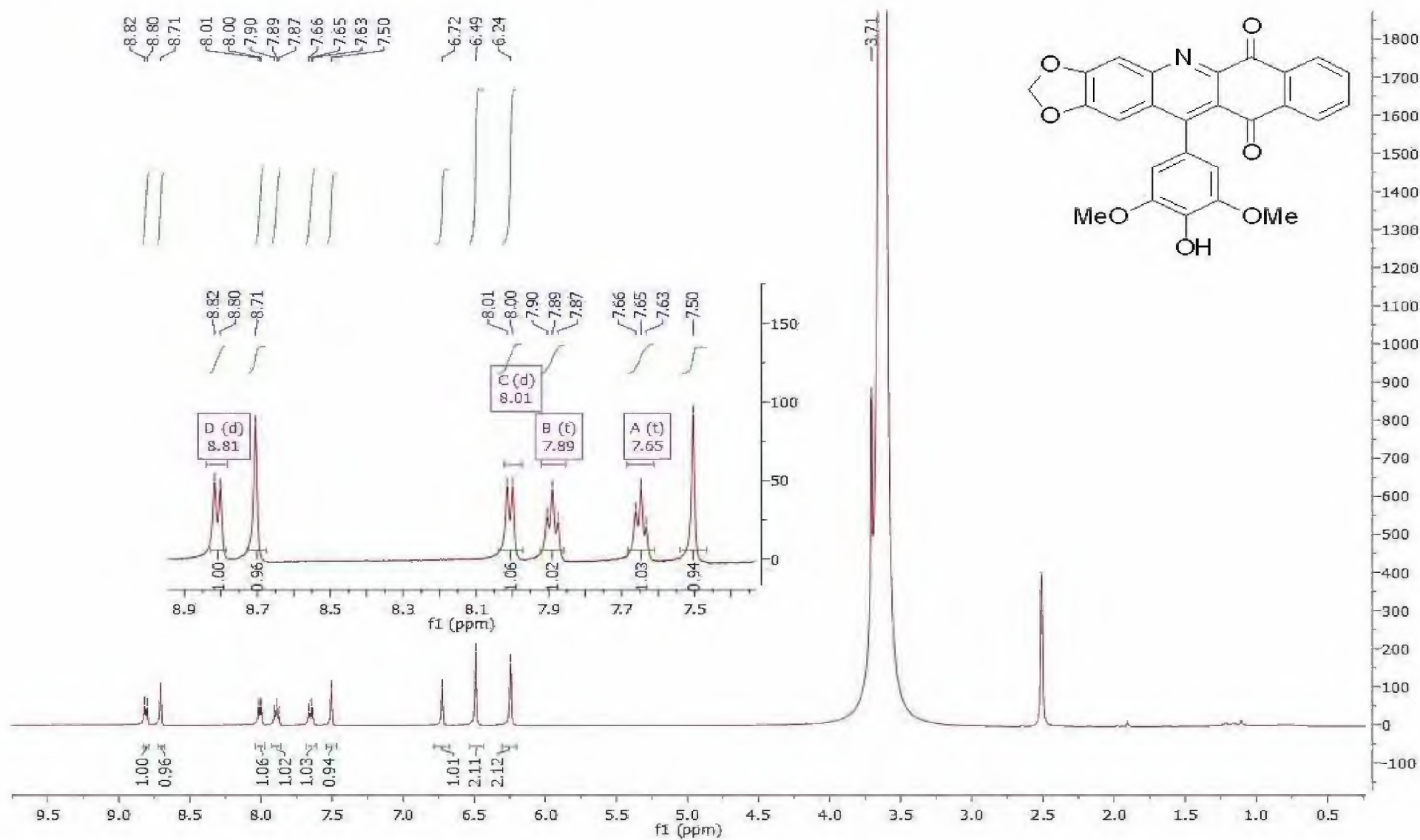
Anexo 97: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 38 em DMSO-d₆ a 126 MHz.



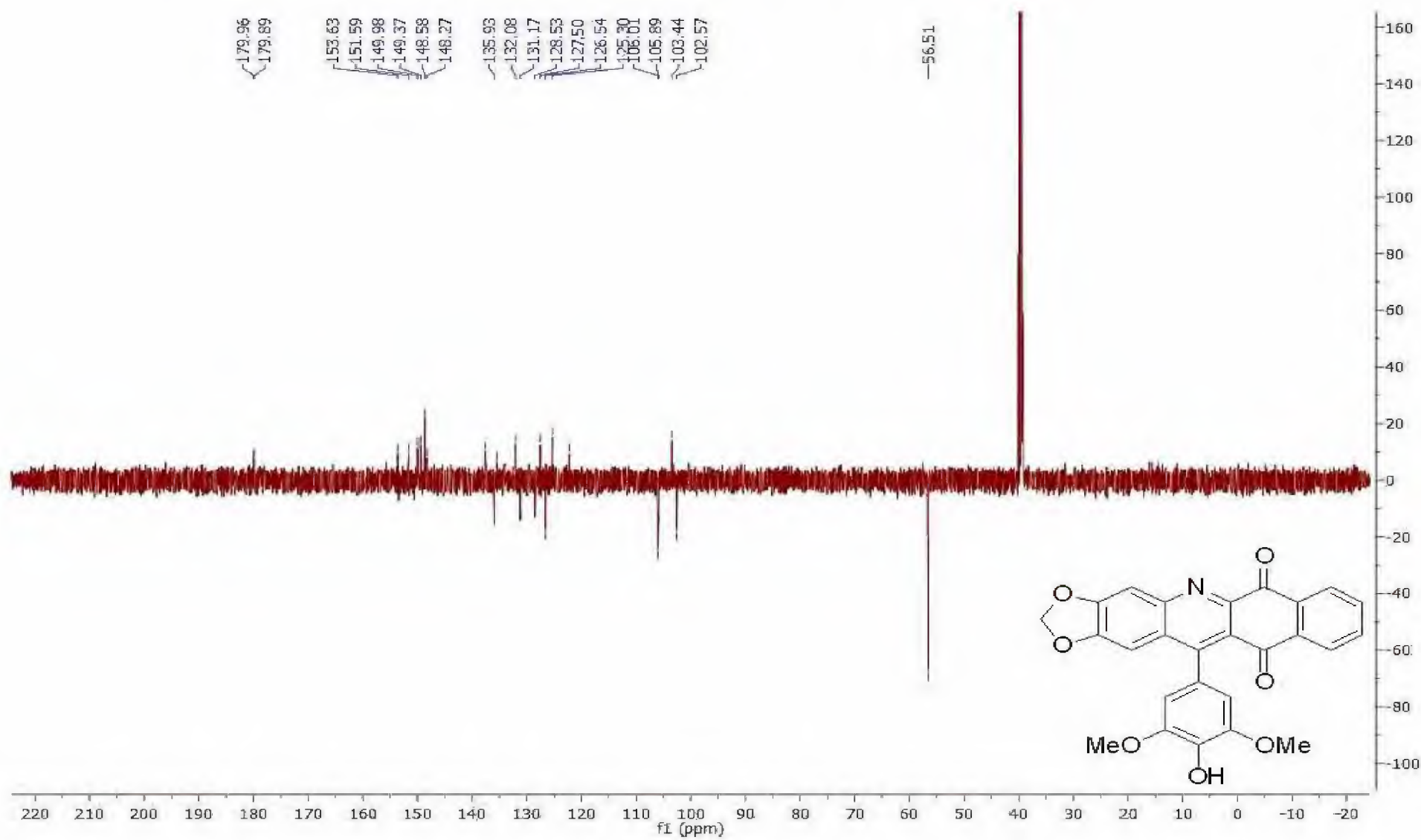
Anexo 98: Espectro de RMN HSQC da molécula 38 em DMSO-d6 a 500 MHz.



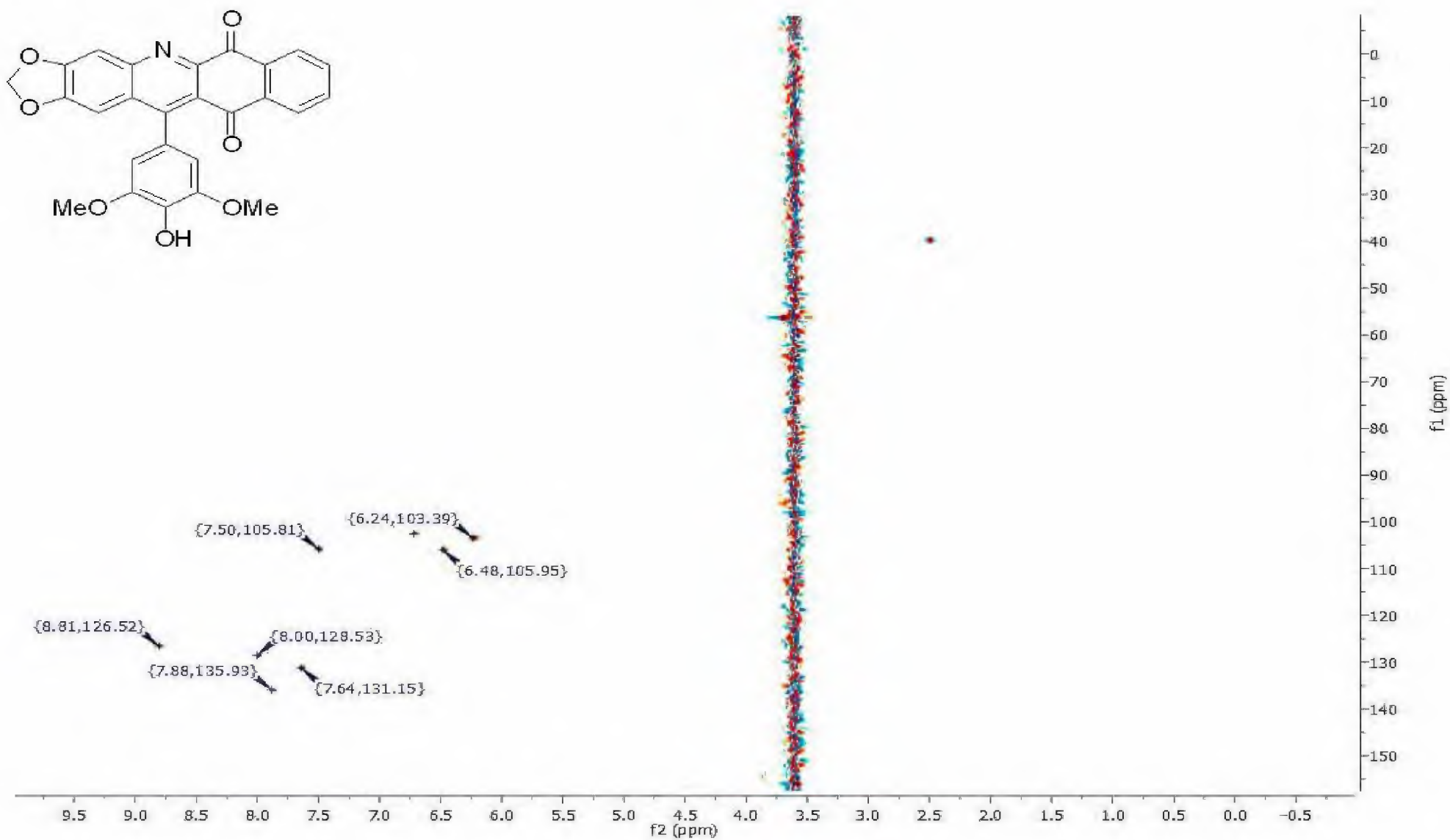
Anexo 99: Espectro de RMN ^1H da molécula 39 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



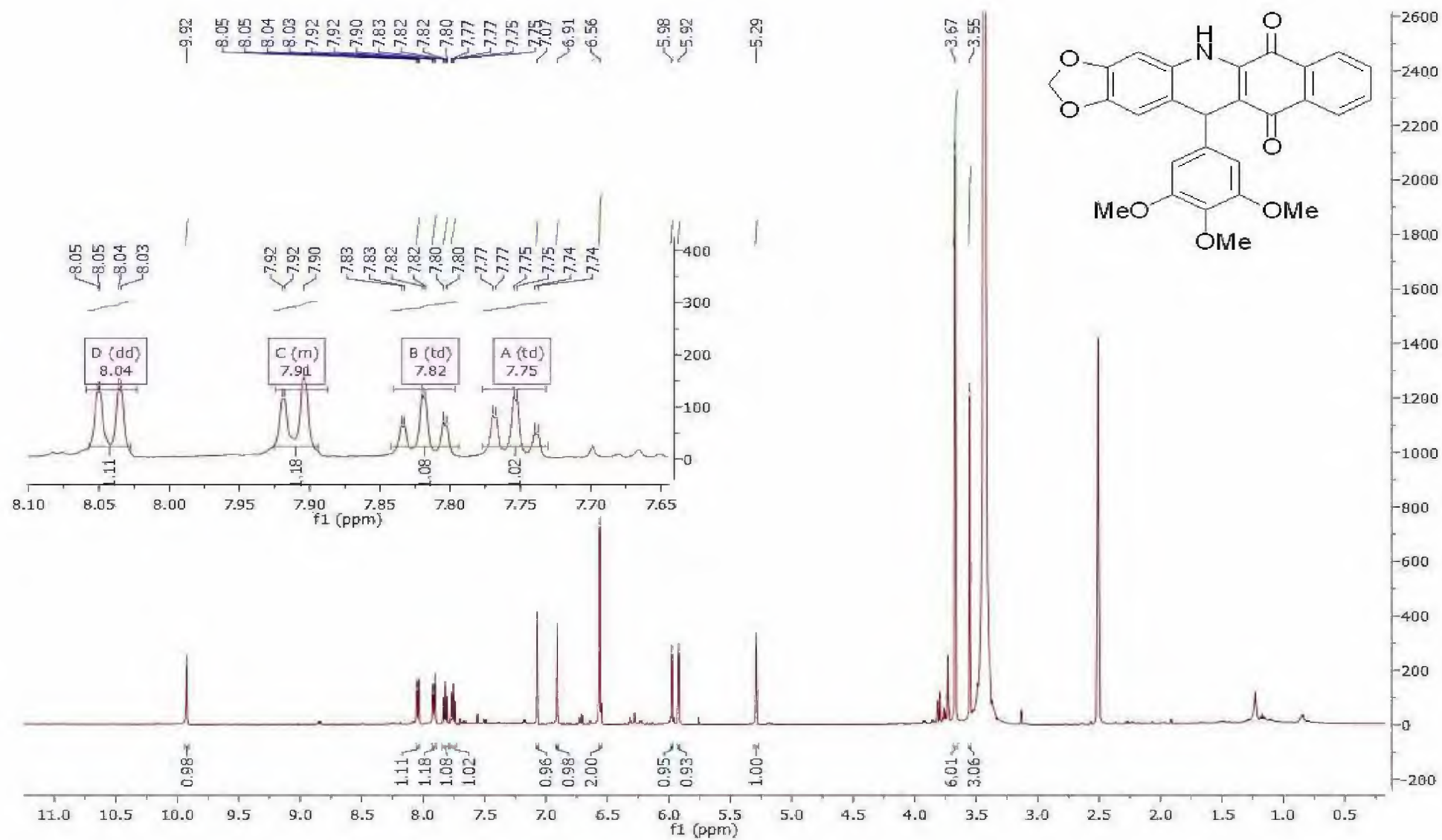
Anexo 100: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 39 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



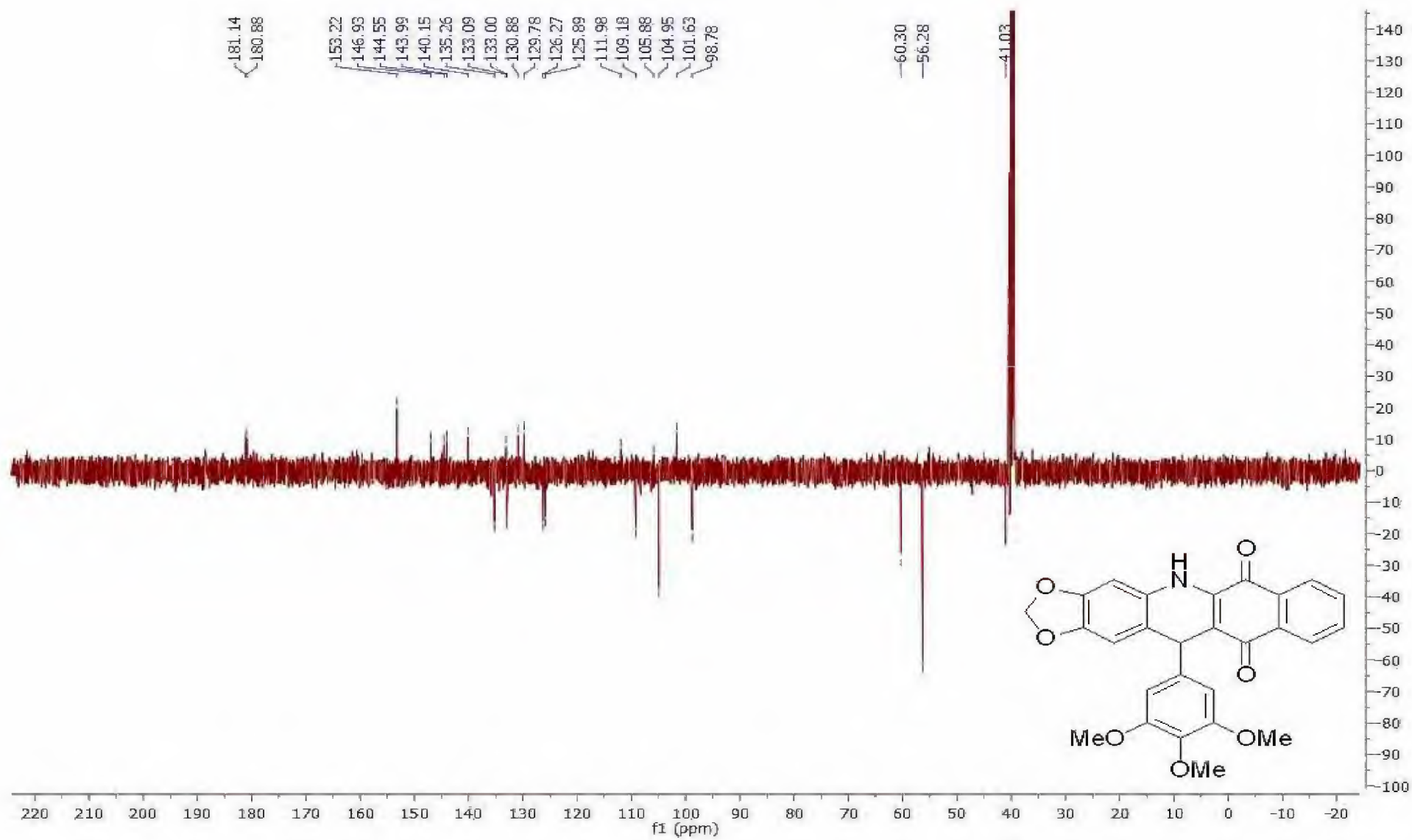
Anexo 101: Espectro de RMN HSQC da molécula 39 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



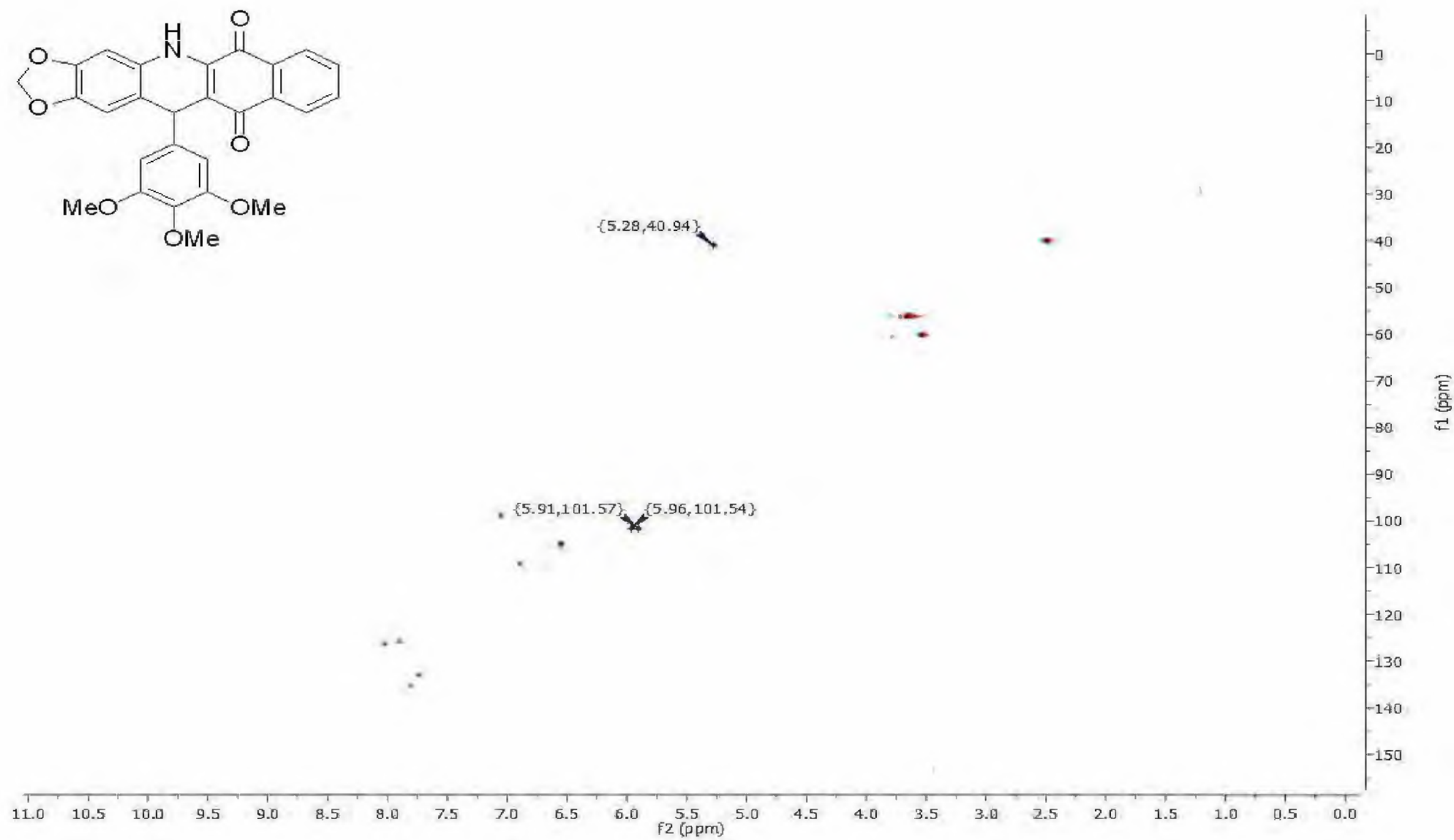
Anexo 102: Espectro de RMN ^1H da molécula 40 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



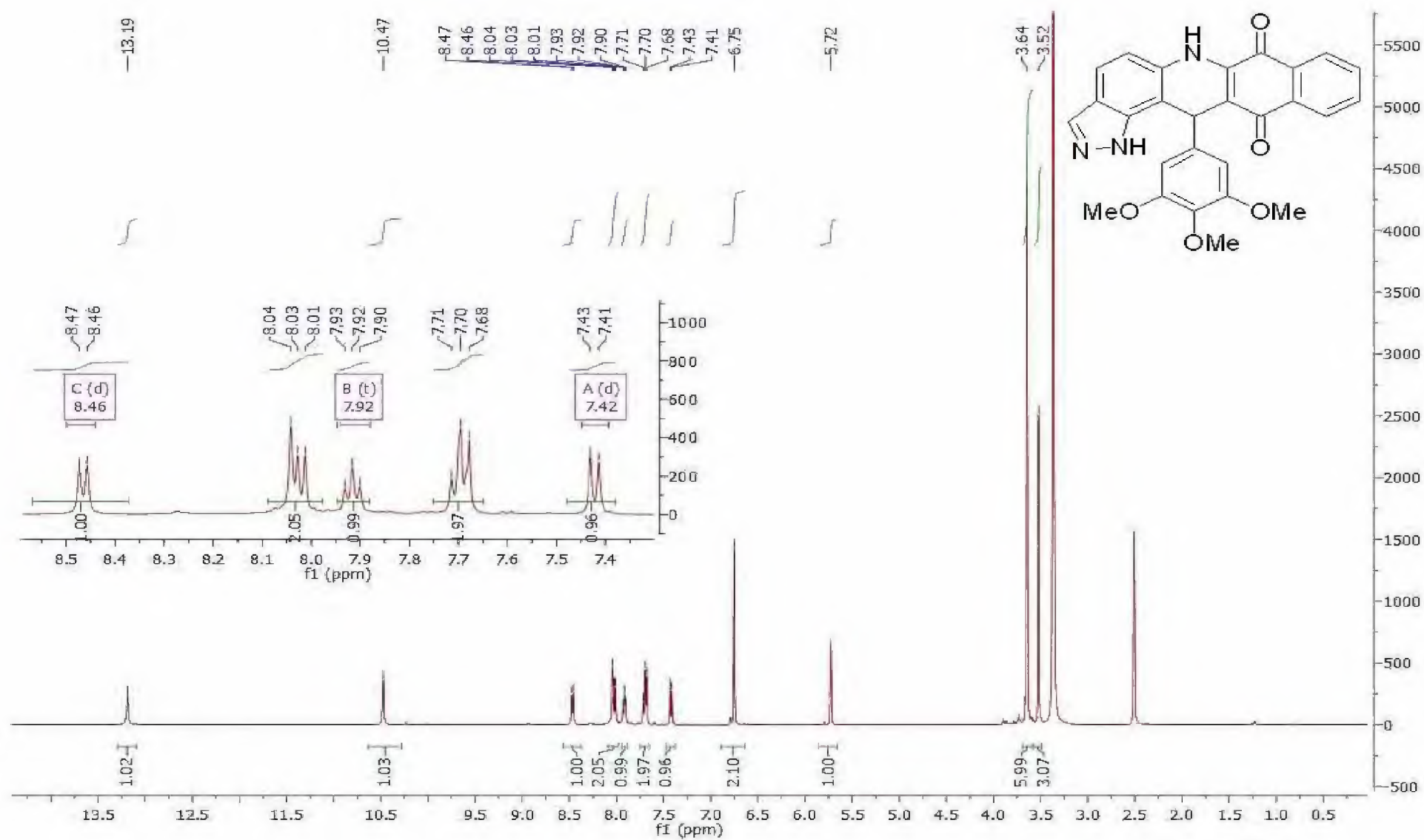
Anexo 103: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 40 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



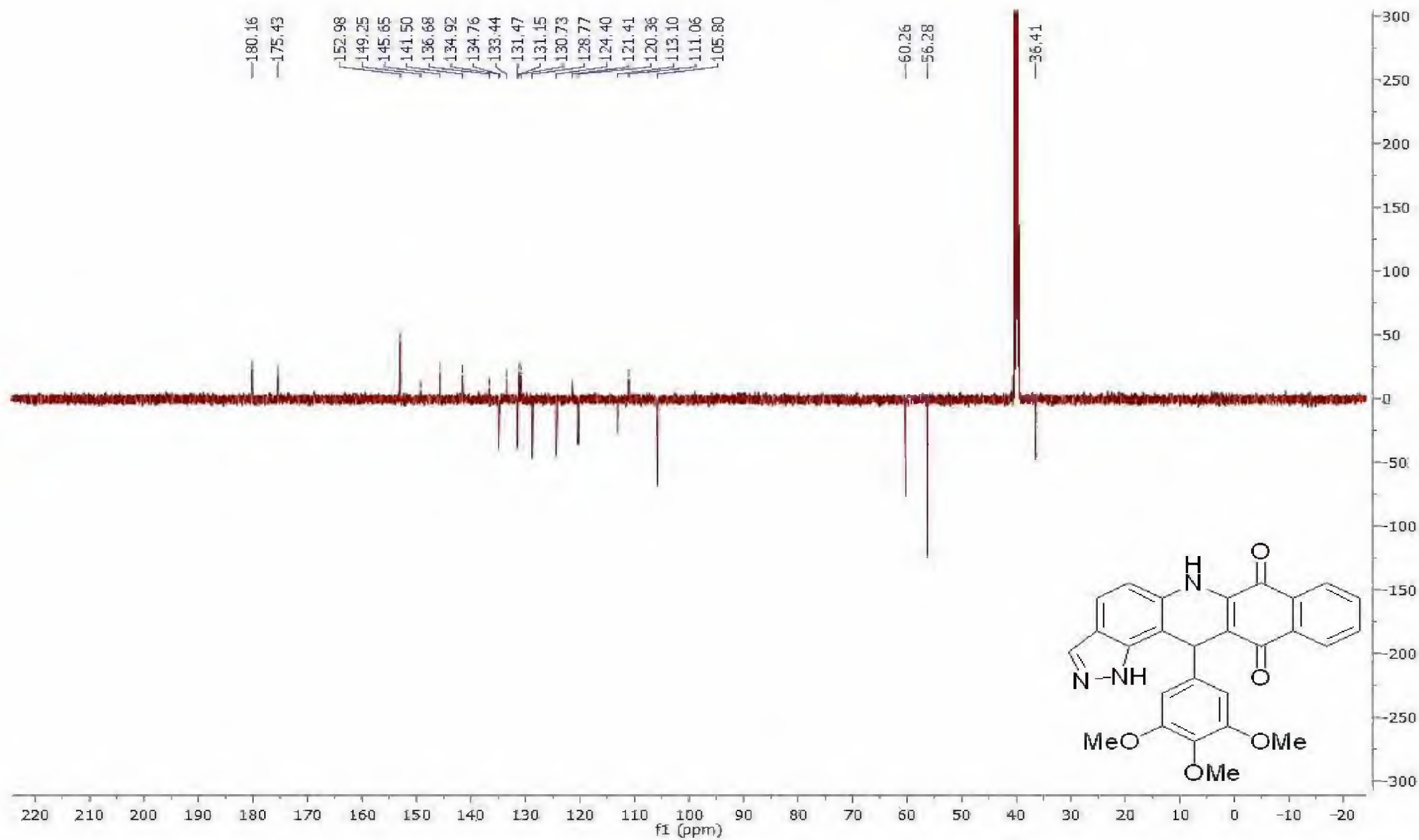
Anexo 104: Espectro de RMN HSQC da molécula 40 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



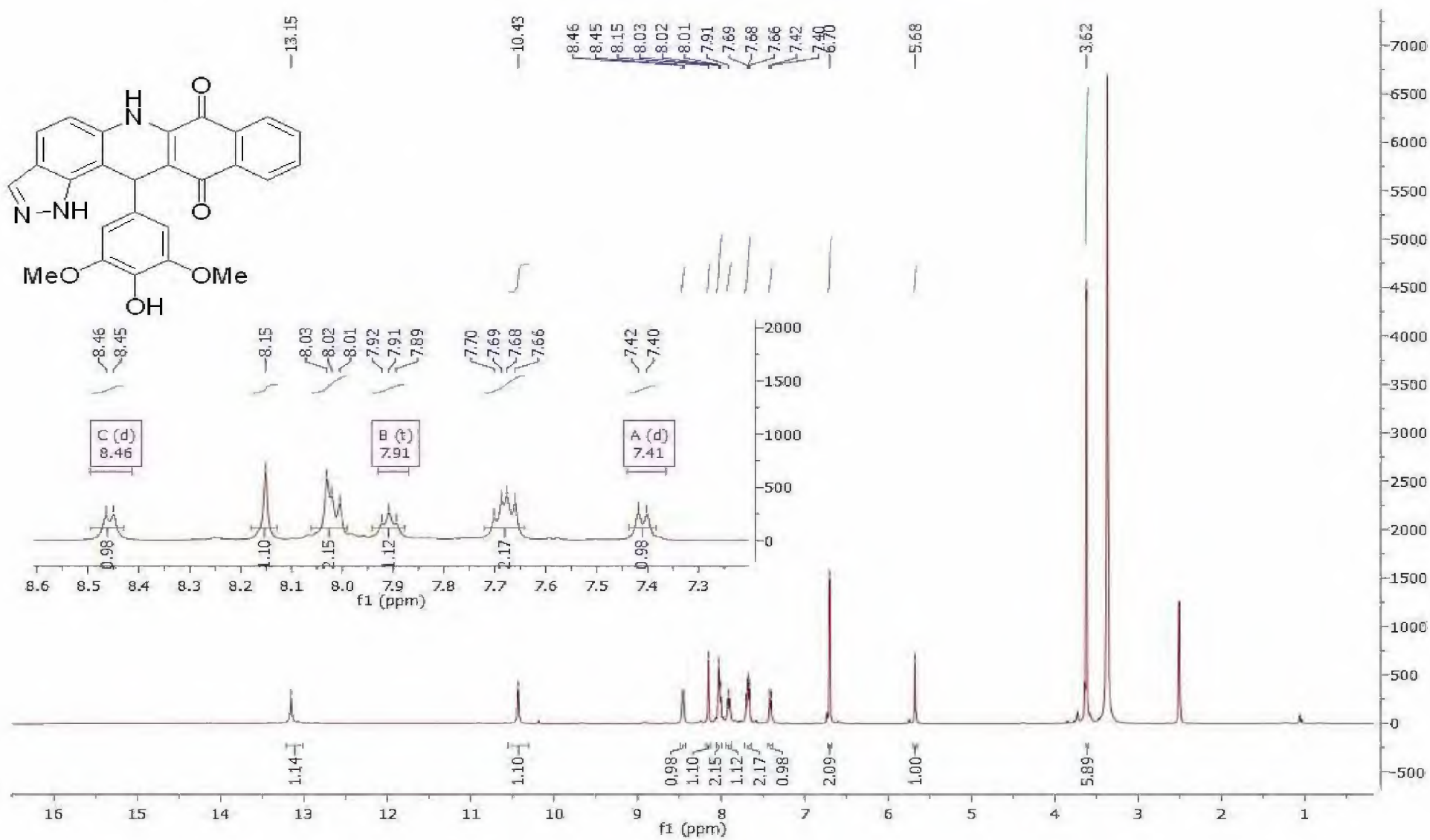
Anexo 105: Espectro de RMN ^1H da molécula 41 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



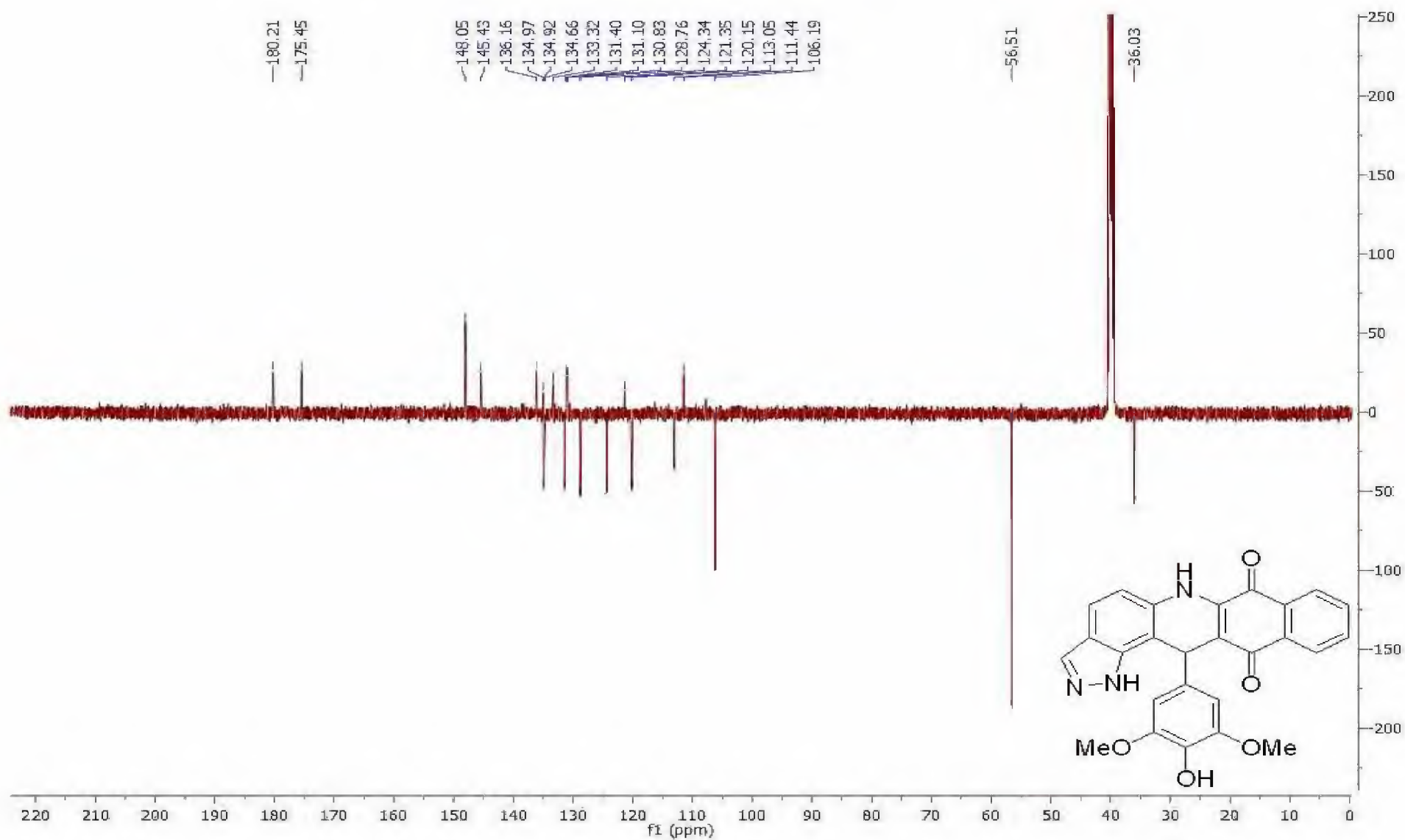
Anexo 106: Espectro de RMN ¹³C da molécula 41 em DMSO-d6 a 126 MHz.



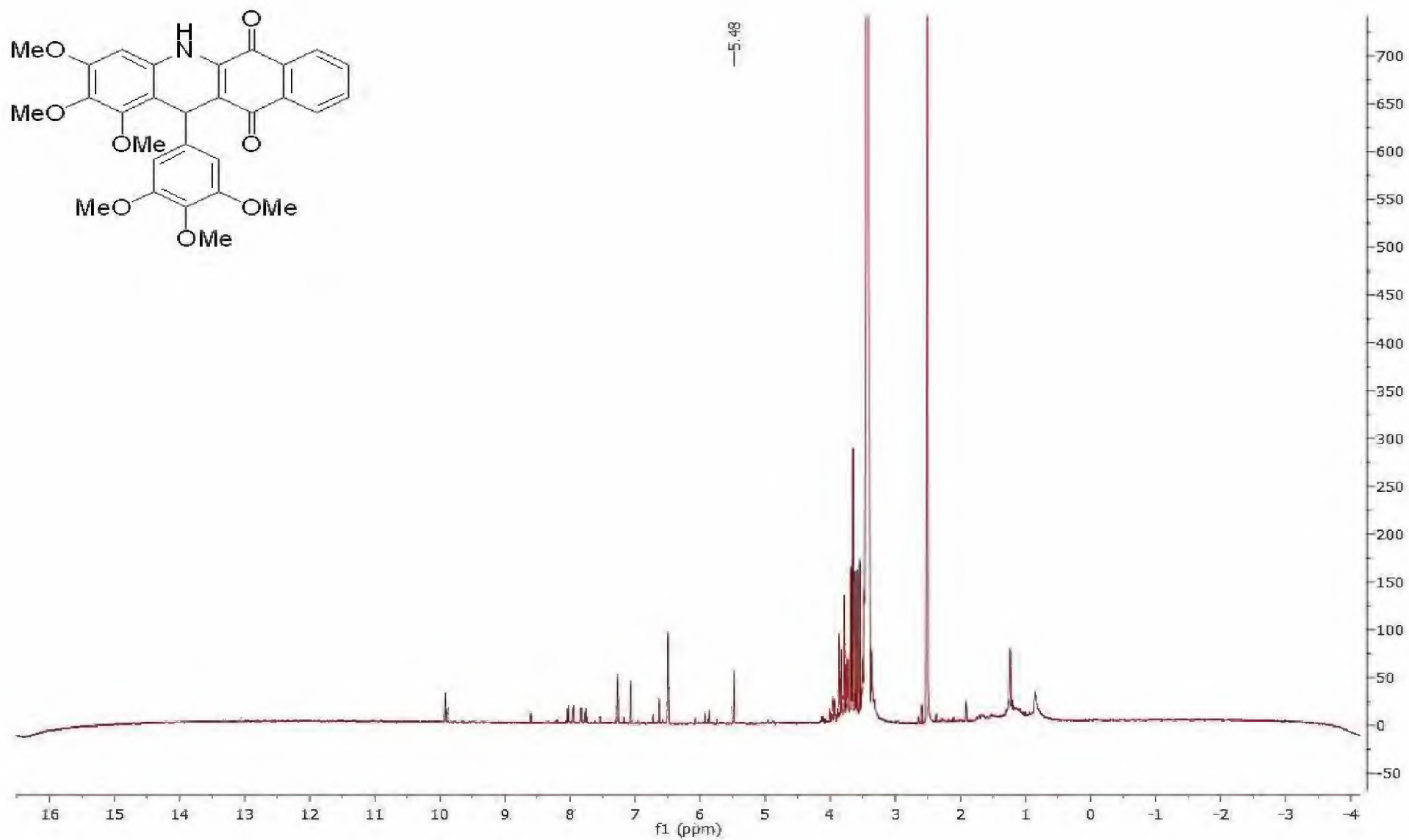
Anexo 107: Espectro de RMN ^1H da molécula 42 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



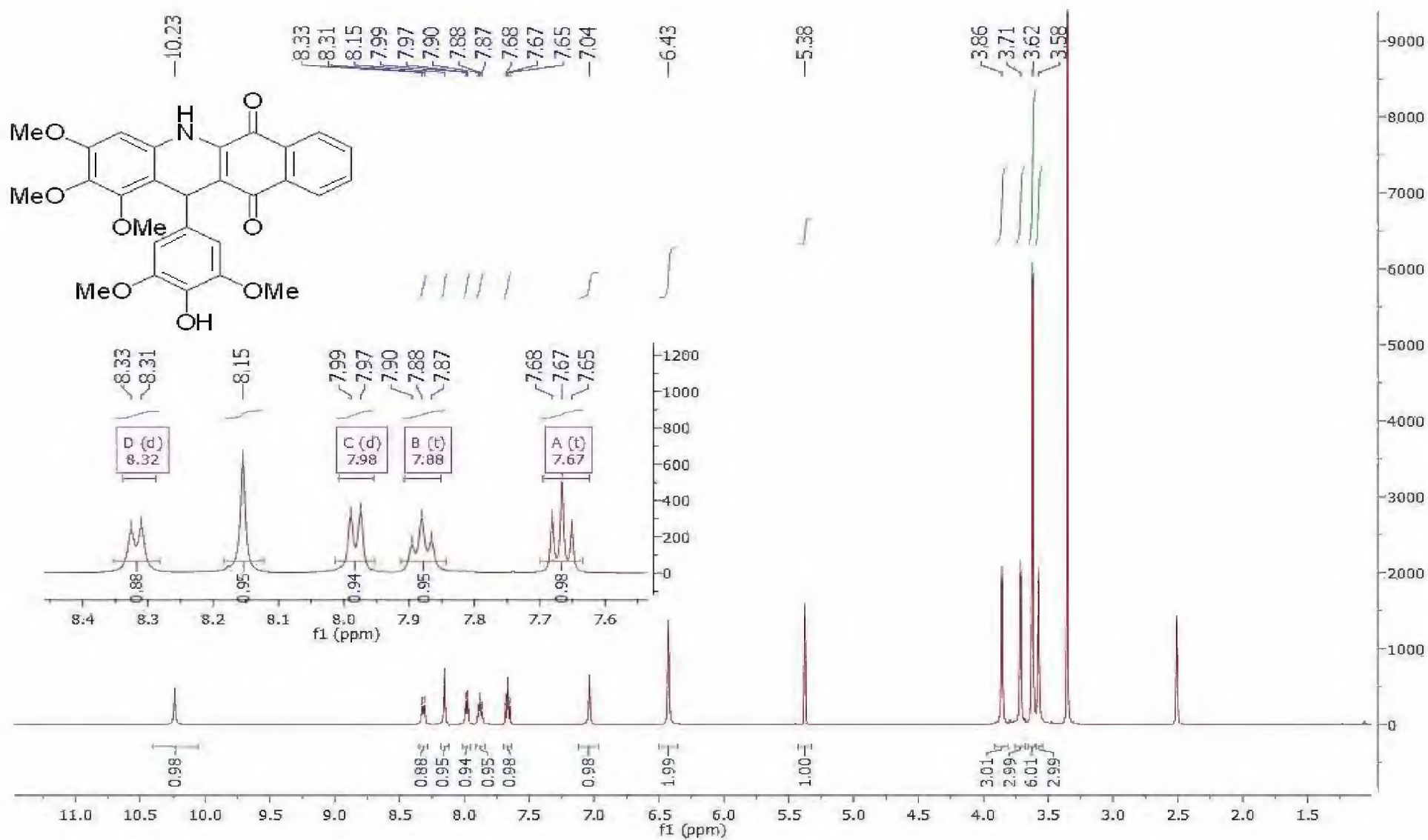
Anexo 108: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 42 em DMSO-d₆ a 126 MHz.



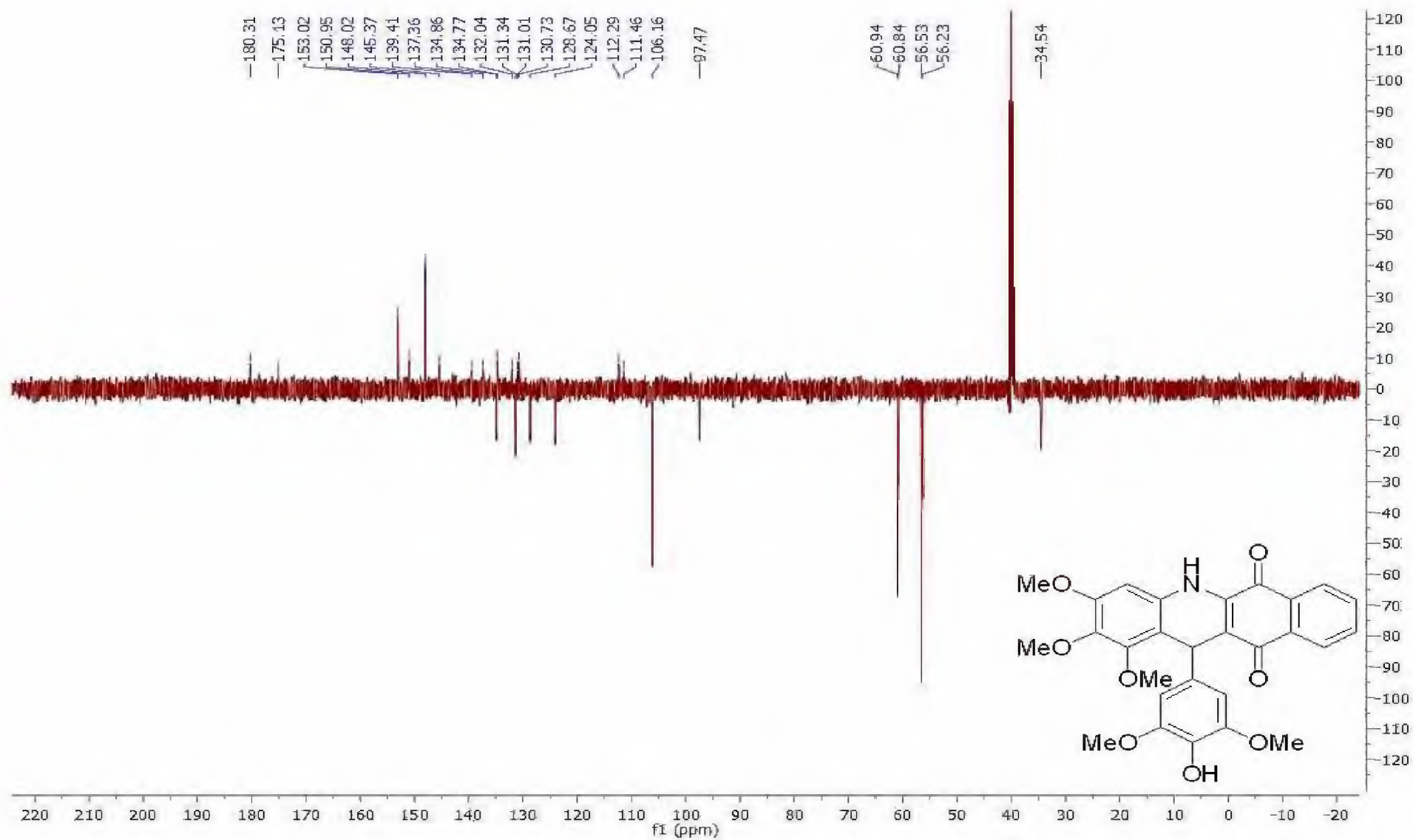
Anexo 109: Espectro de RMN ^1H da molécula 43 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



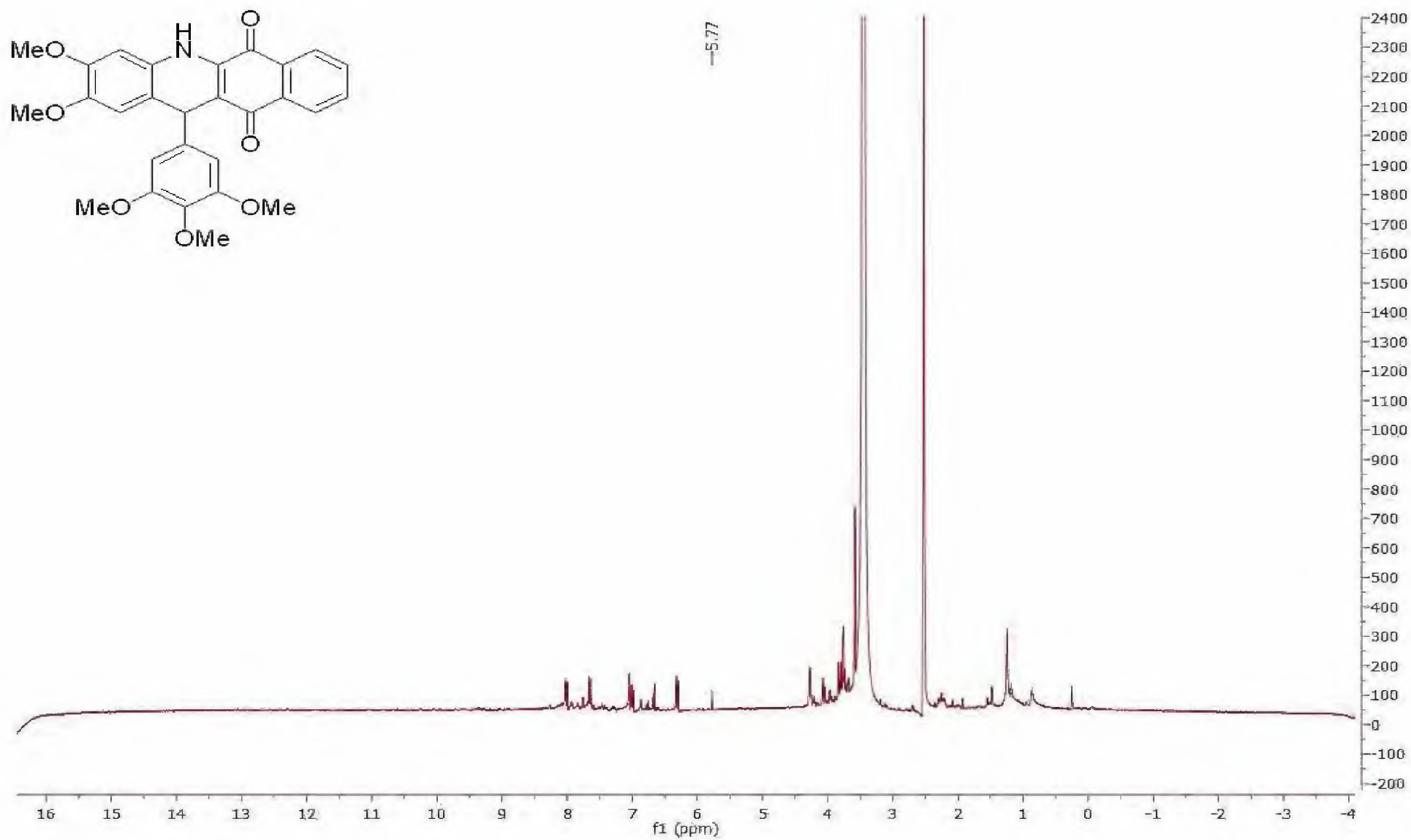
Anexo 110: Espectro de RMN ^1H da molécula 44 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



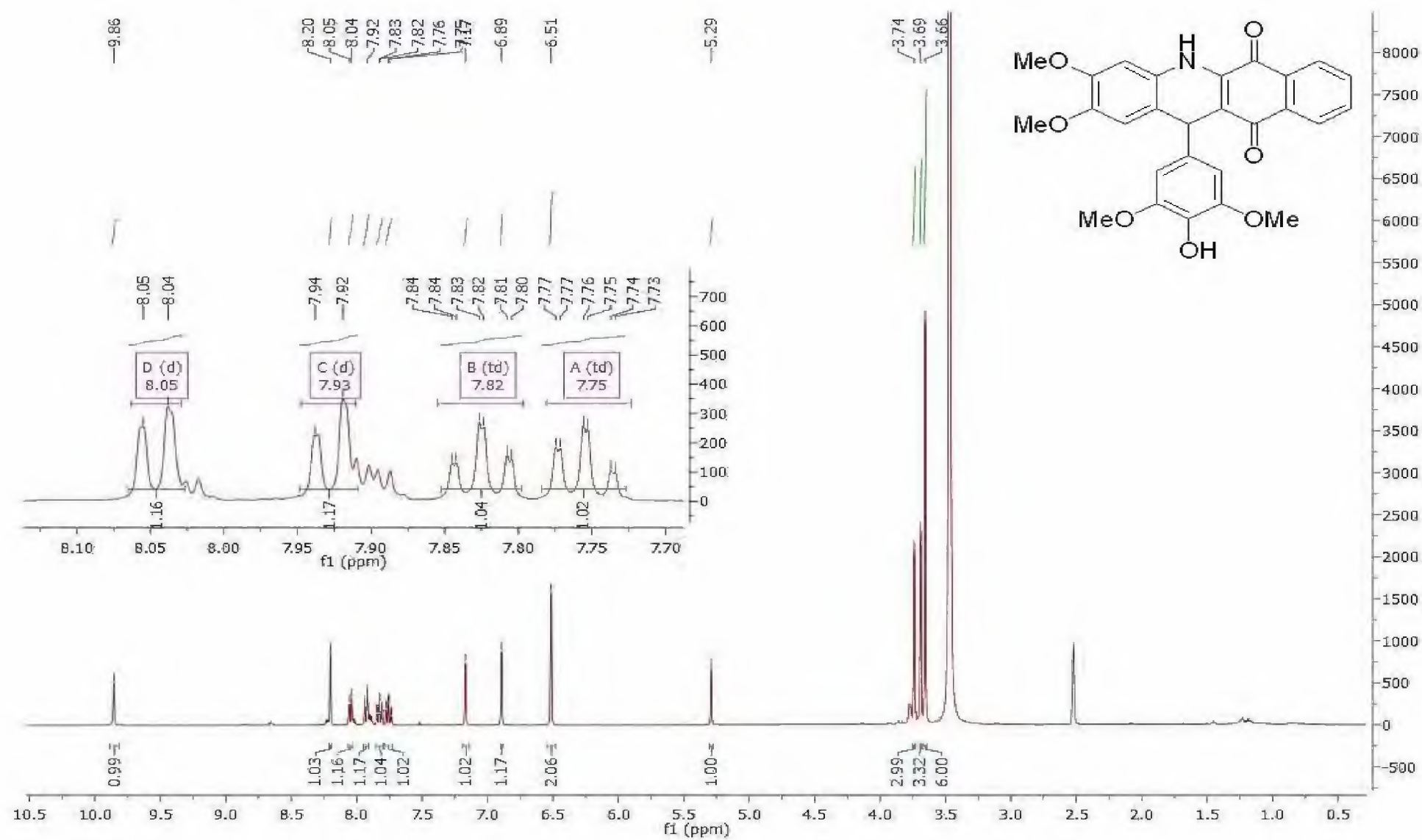
Anexo 111: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 44 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



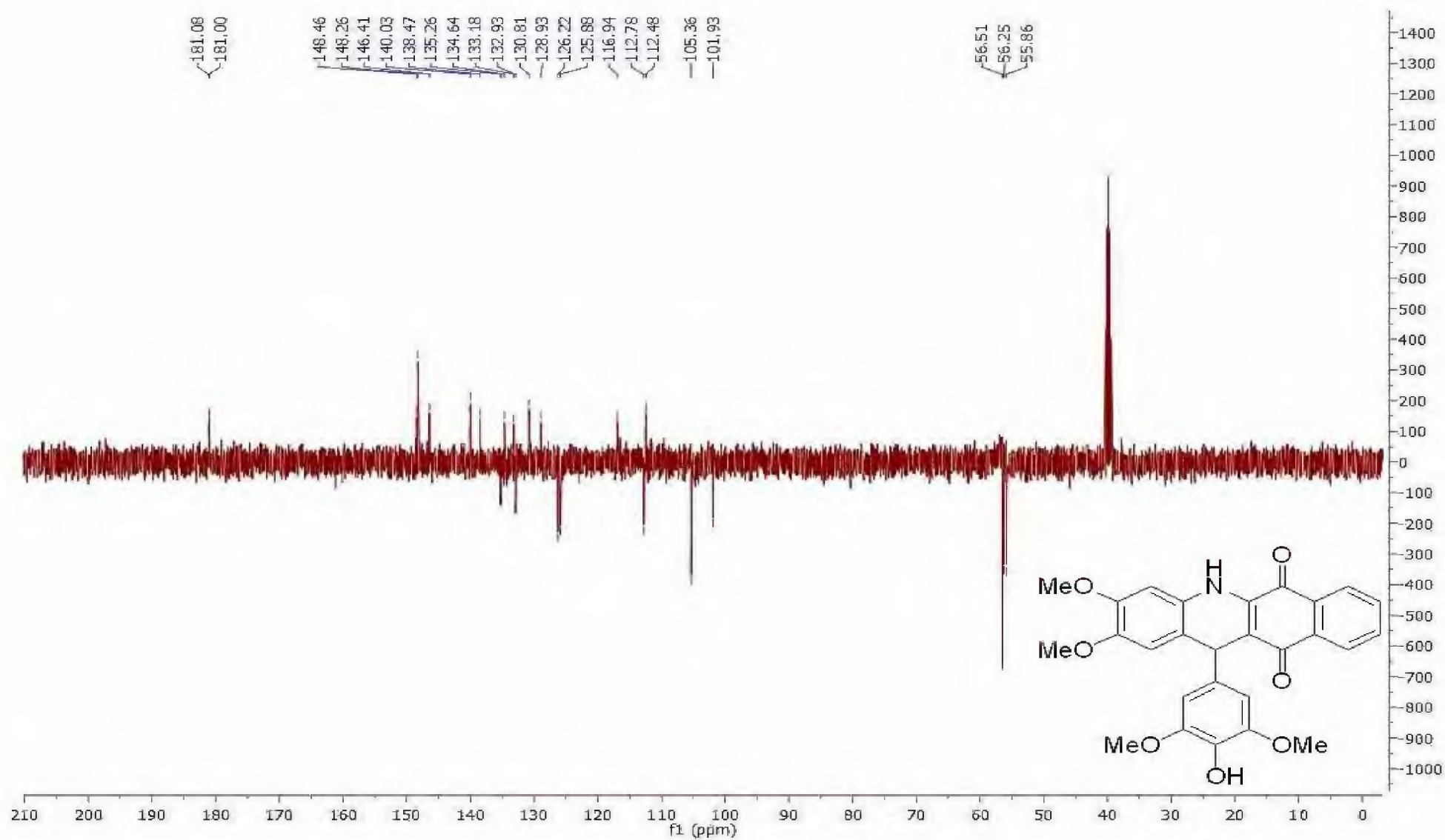
Anexo 112: Espectro de RMN ^1H da molécula 45 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



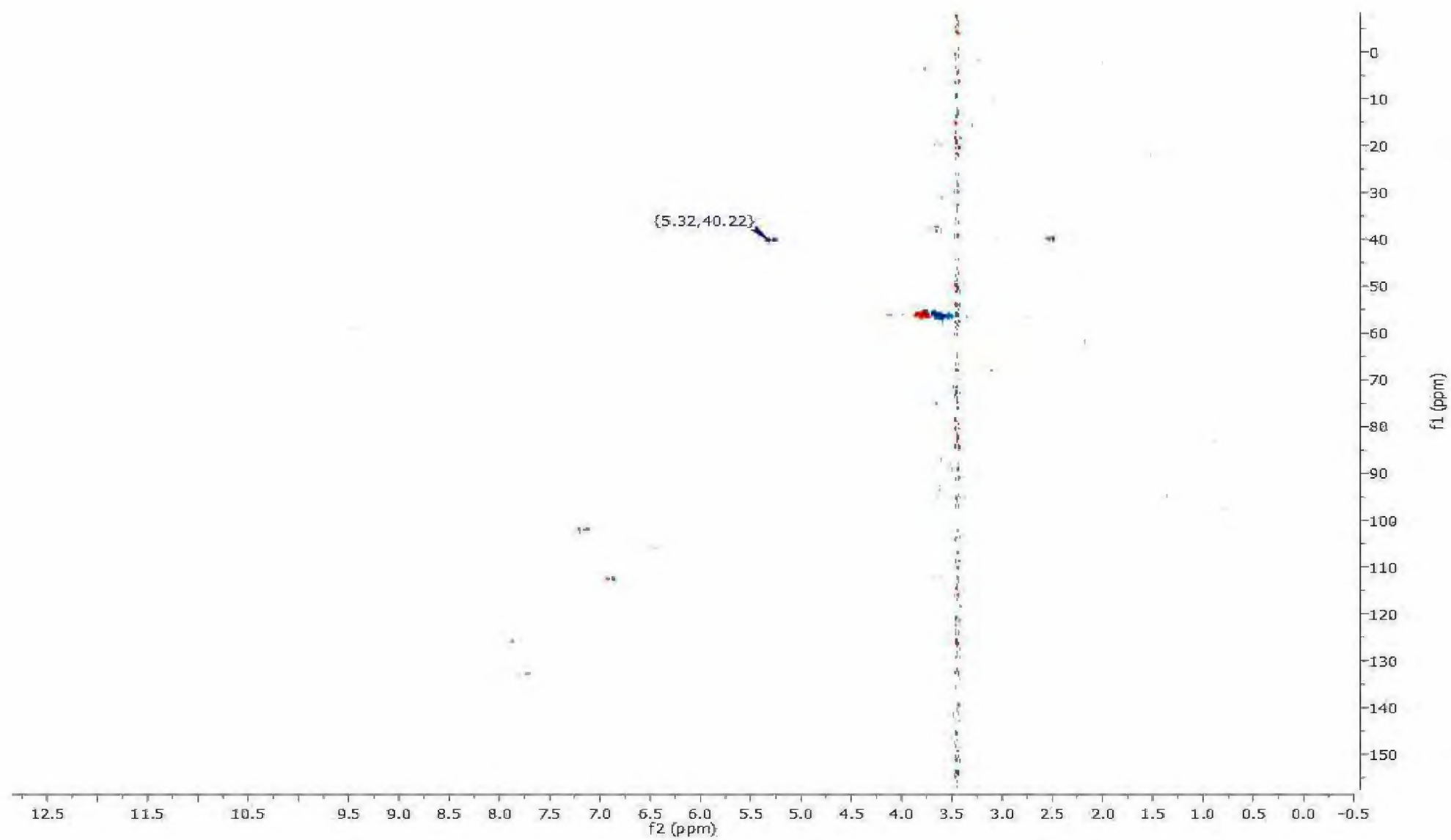
Anexo 113: Espectro de RMN ^1H da molécula 46 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



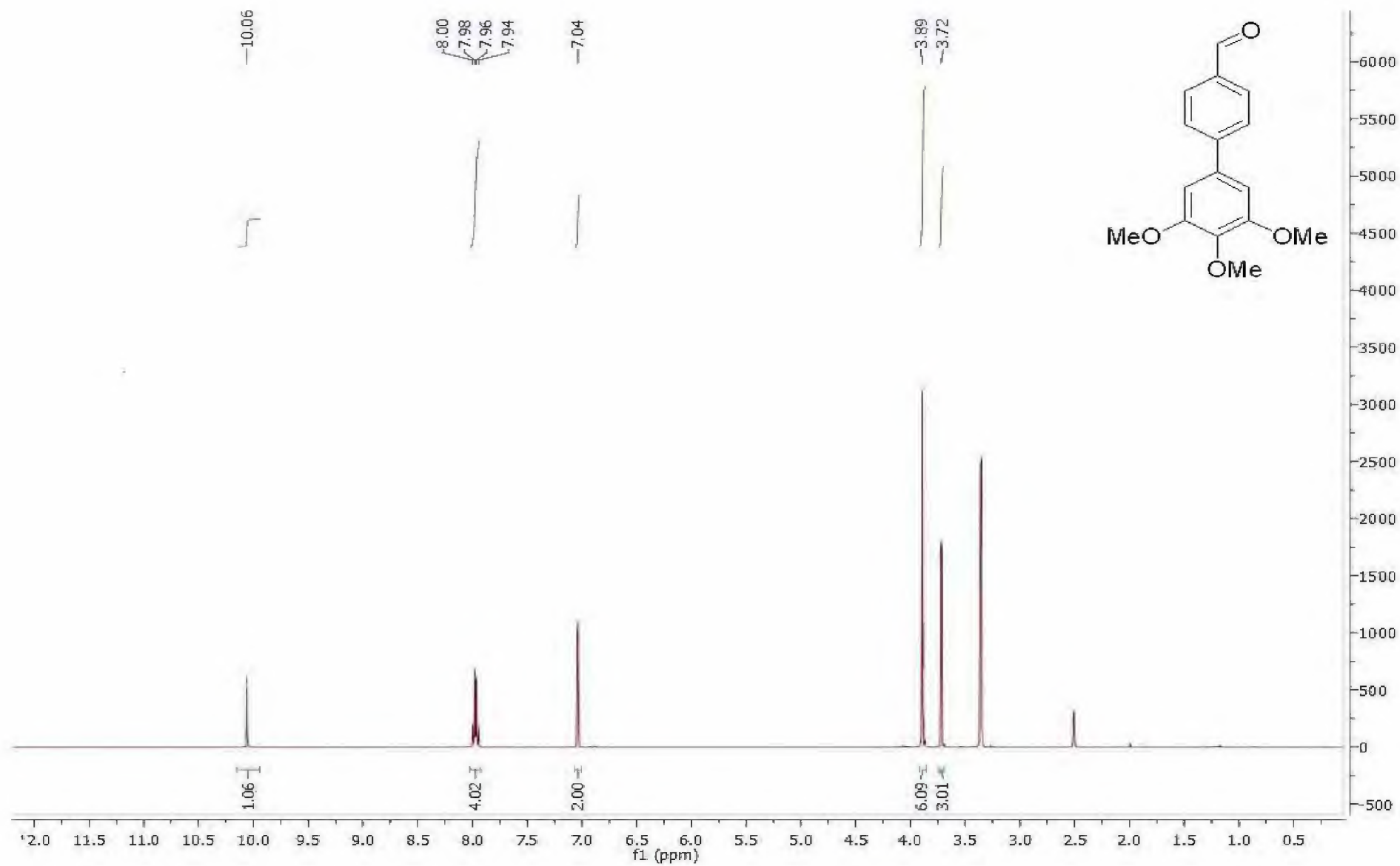
Anexo 114: Espectro de RMN ^{13}C da molécula 46 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



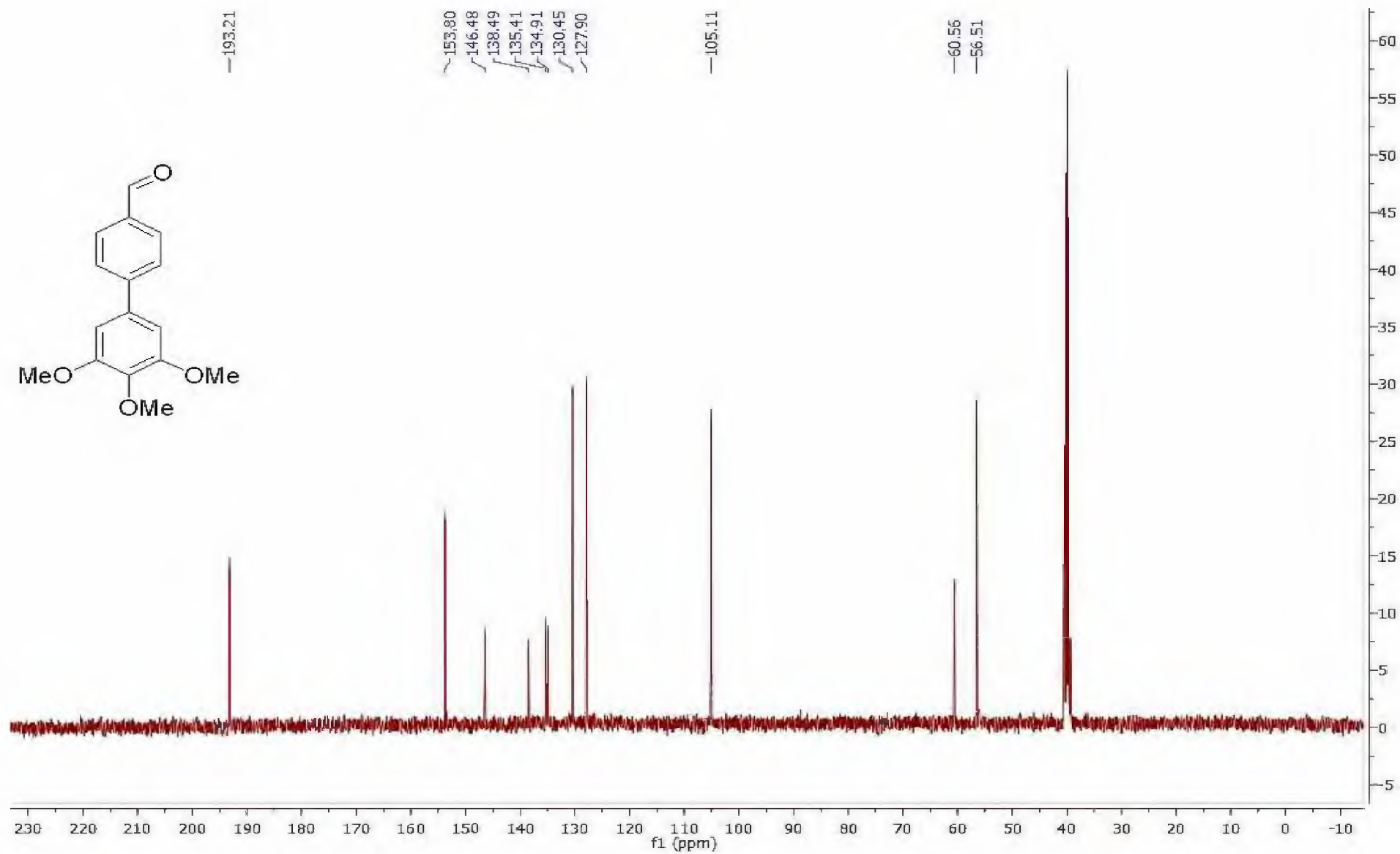
Anexo 115: Espectro de RMN HSQC da molécula 46 em DMSO-d₆ a 500 MHz.



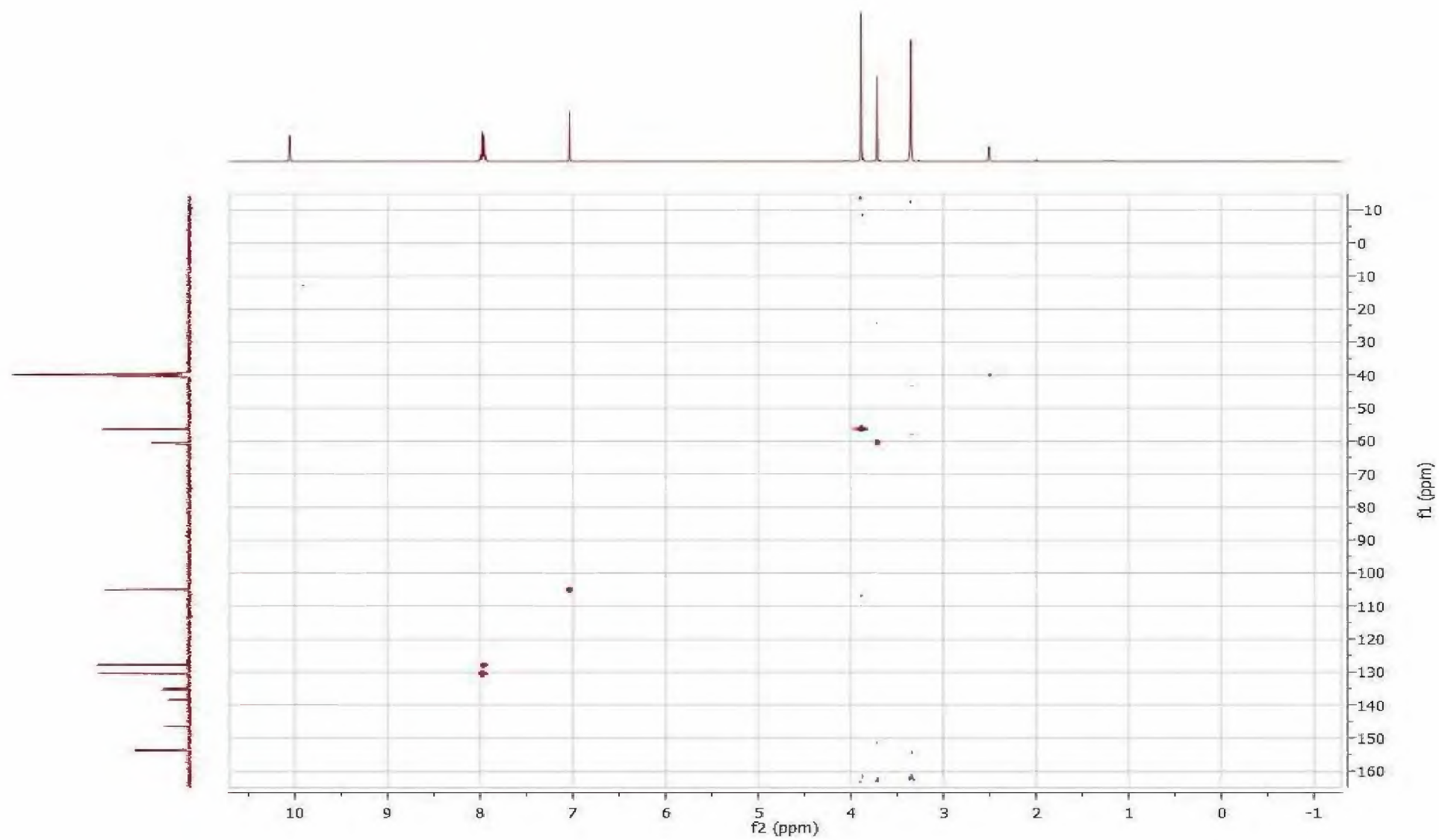
Anexo 116: Espectro de RMN ^1H do intermediário 47 em DMSO- d_6 a 400 MHz.



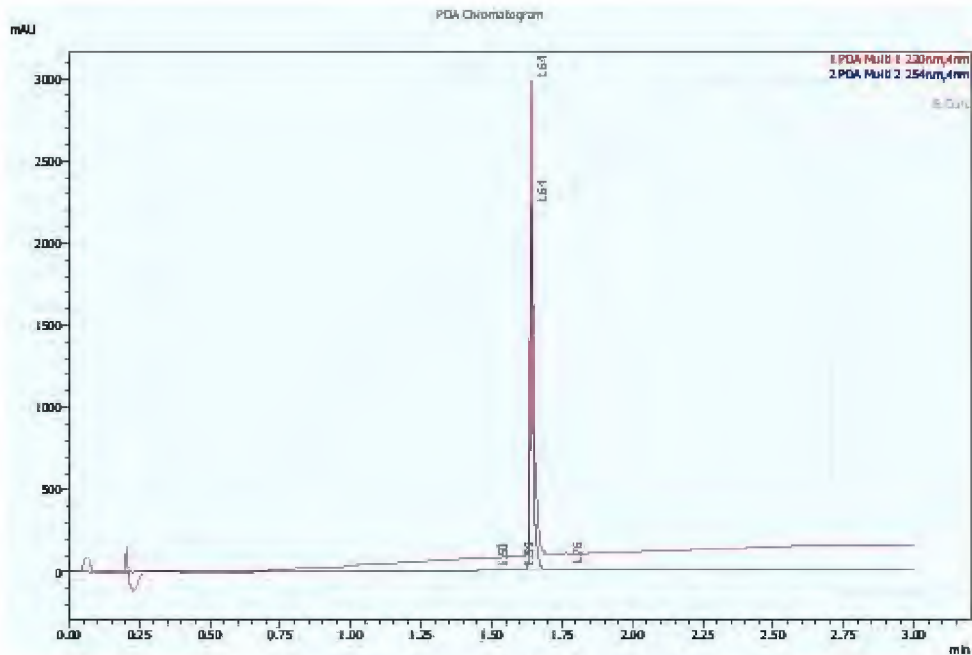
Anexo 117: Espectro de RMN ^{13}C do intermediário 47 em DMSO- d_6 a 101 MHz.



Anexo 118: Espectro de RMN HSQC do intermediário 47 em DMSO-d6 a 400 MHz.

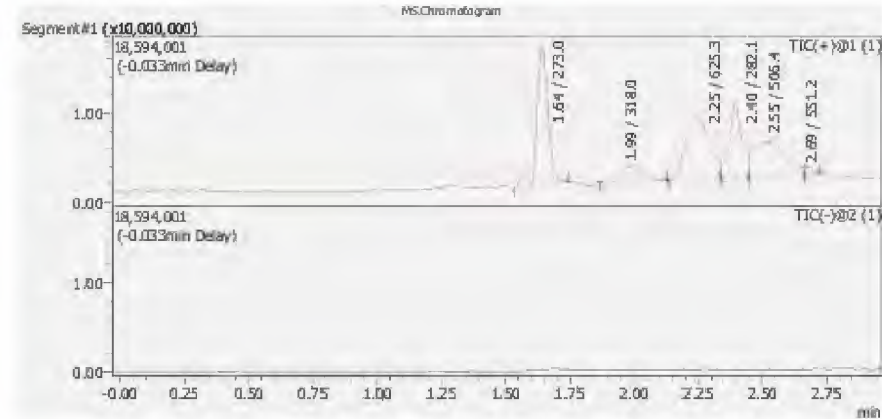


Anexo 119: Cromatograma obtido por LC-MS para o intermediário 47.



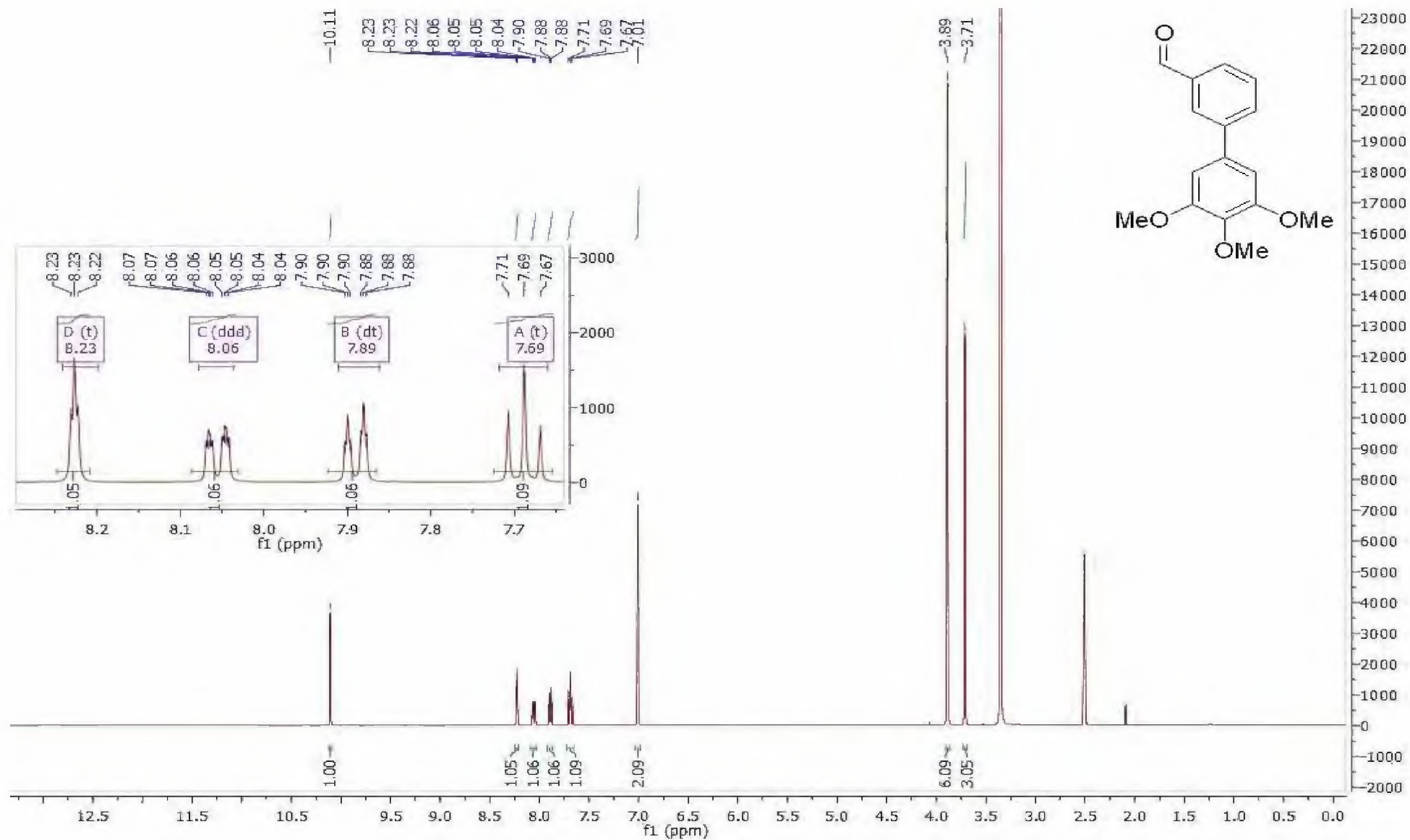
PK#	R.T.	Area	Height	Area%	Int. max	S/N
3	1.64	2849321	2873001	100.0	1091233	47.9

Peak	R.T.	Area	Height	Area%	UV max	S/N
1	1.99	927	1183	0.05	222,938/315,936	0.4
2	1.99	765	1200	0.04	222,938	0.5
3	1.64	1741031	2205543	99.69	332,923	770.8
4	1.76	4093	4072	0.33	223,938	1.4

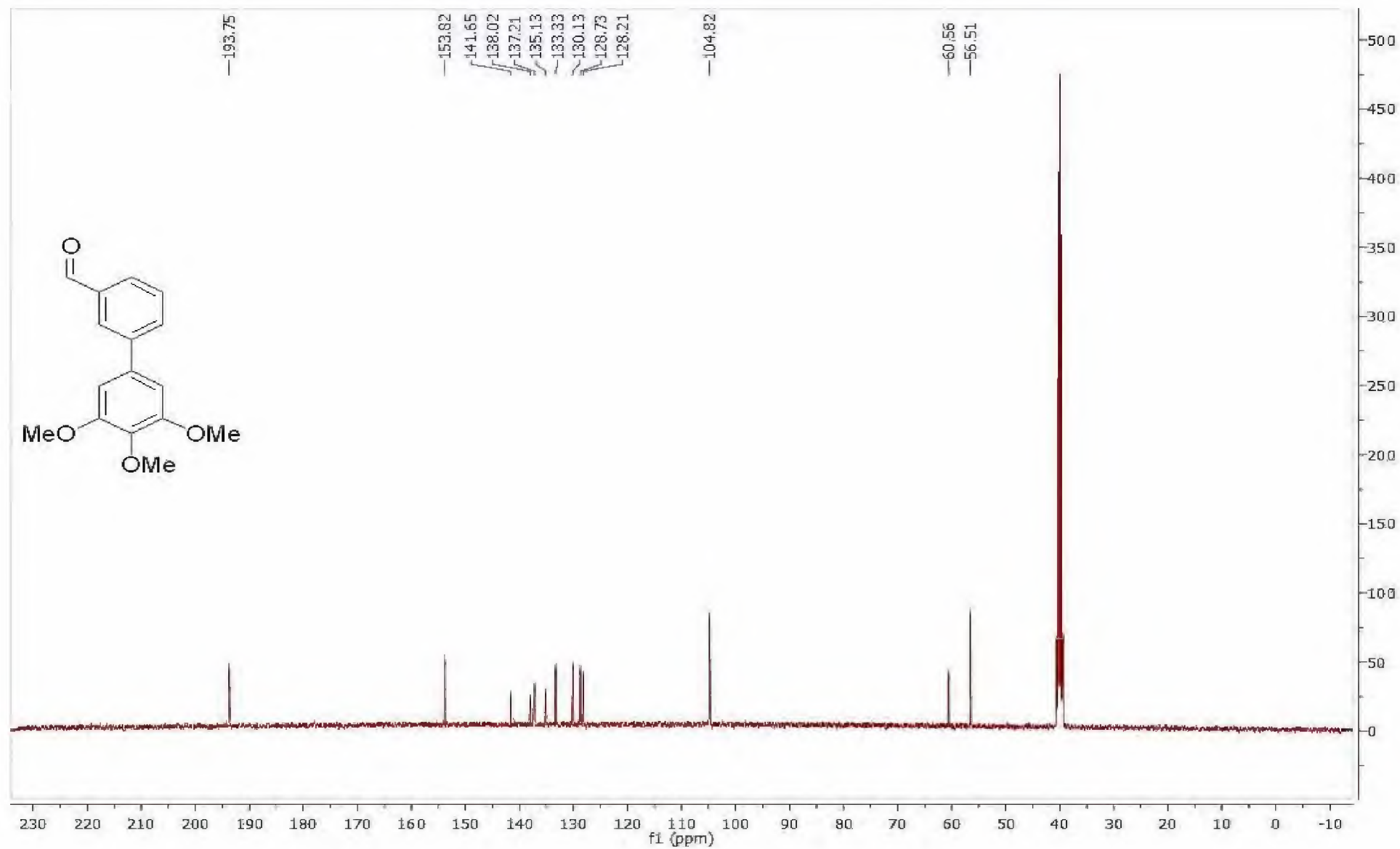


Rank	R.T.	Area	Sp. Rk. 1st	Area 2nd	Rk2	SP2
1	1.54	1802.056	4.373134	27.962	2.73	0
2	1.27	1053.31	6.78	27.962	2.73	0
3	1.27	1053.31	6.78	27.962	2.73	0
4	2.25	1524.120	17.1847	27.962	6.25	1
5	2.40	2866.662	27.3441	17.1847	27.962	2.73
6	2.25	3428.9647	17.1847	20.452	5.054	4
7	2.25	1832.613	10.6449	1.026	5.054	4

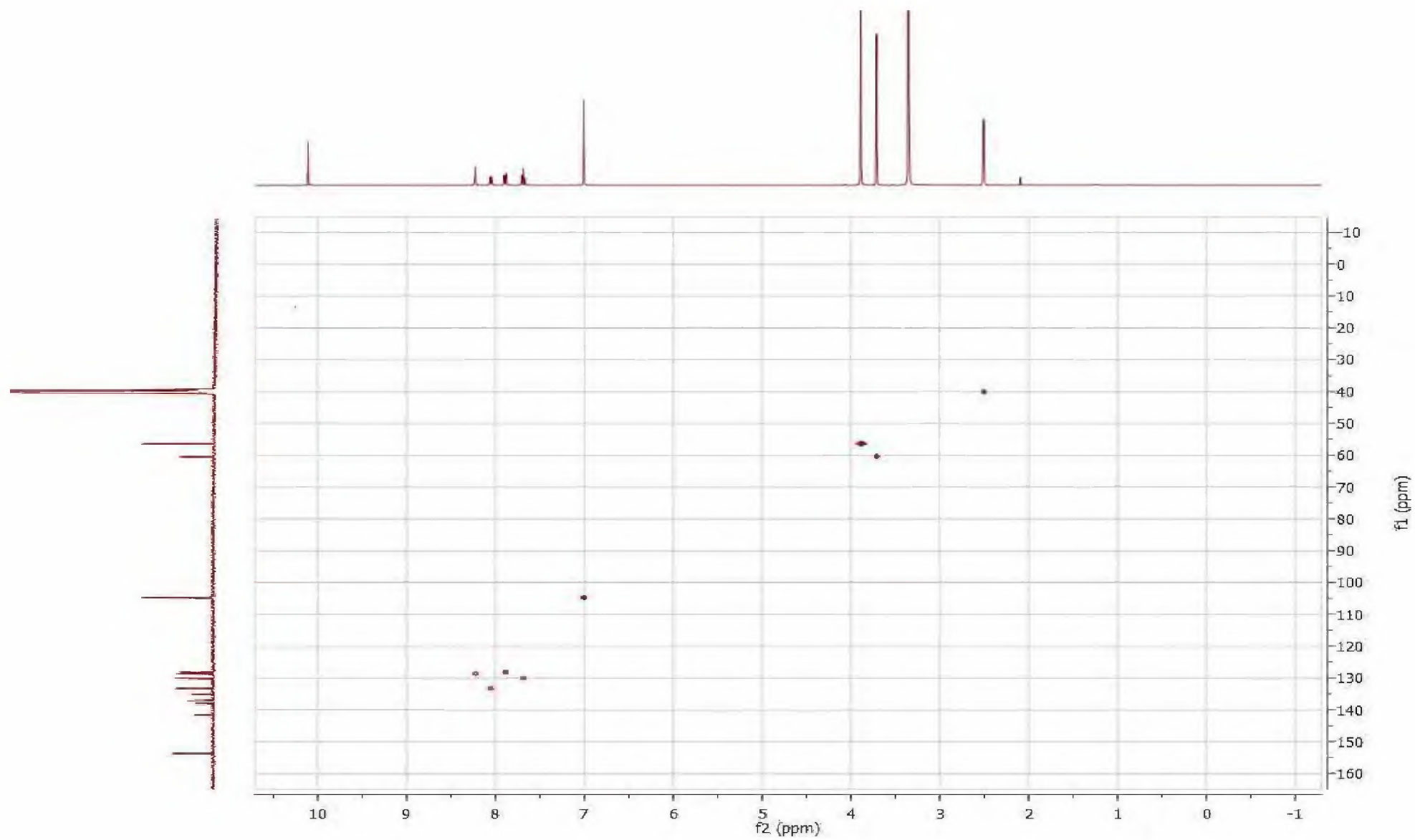
Anexo 120: Espectro de RMN ^1H do intermediário 48 em DMSO- d_6 a 400 MHz.



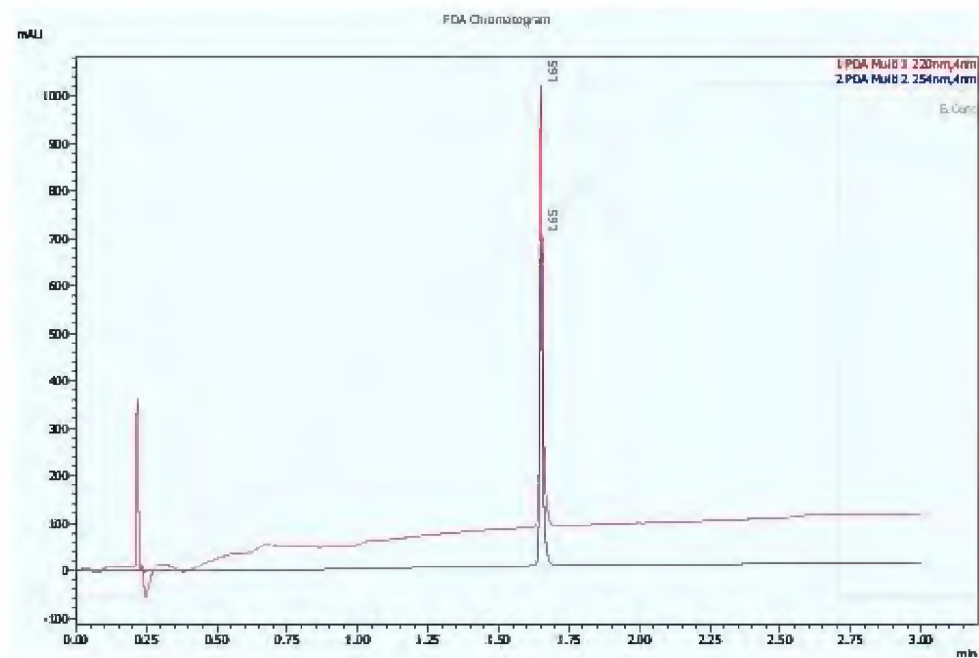
Anexo 121: Espectro de RMN ^{13}C do intermediário 48 em DMSO-d6 a 101 MHz.



Anexo 122: Espectro de RMN HSQC do intermediário 48 em DMSO-d6 a 400 MHz.



Anexo 123: Cromatograma obtido por LC-MS para o intermediário 48.

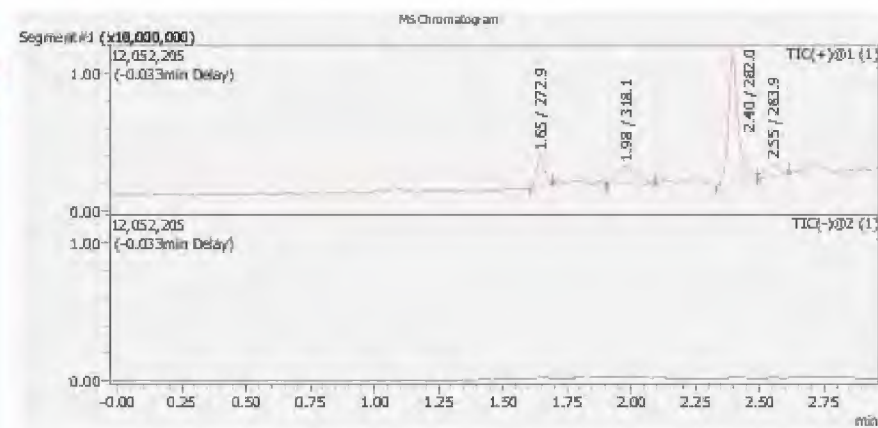


PDA Peak Table

Peak	RT	Area	Height	Area%	UV max	S/N
1	1.65	710.038	930.557	100.0	219.251/396	10.3

PDA Peak Table

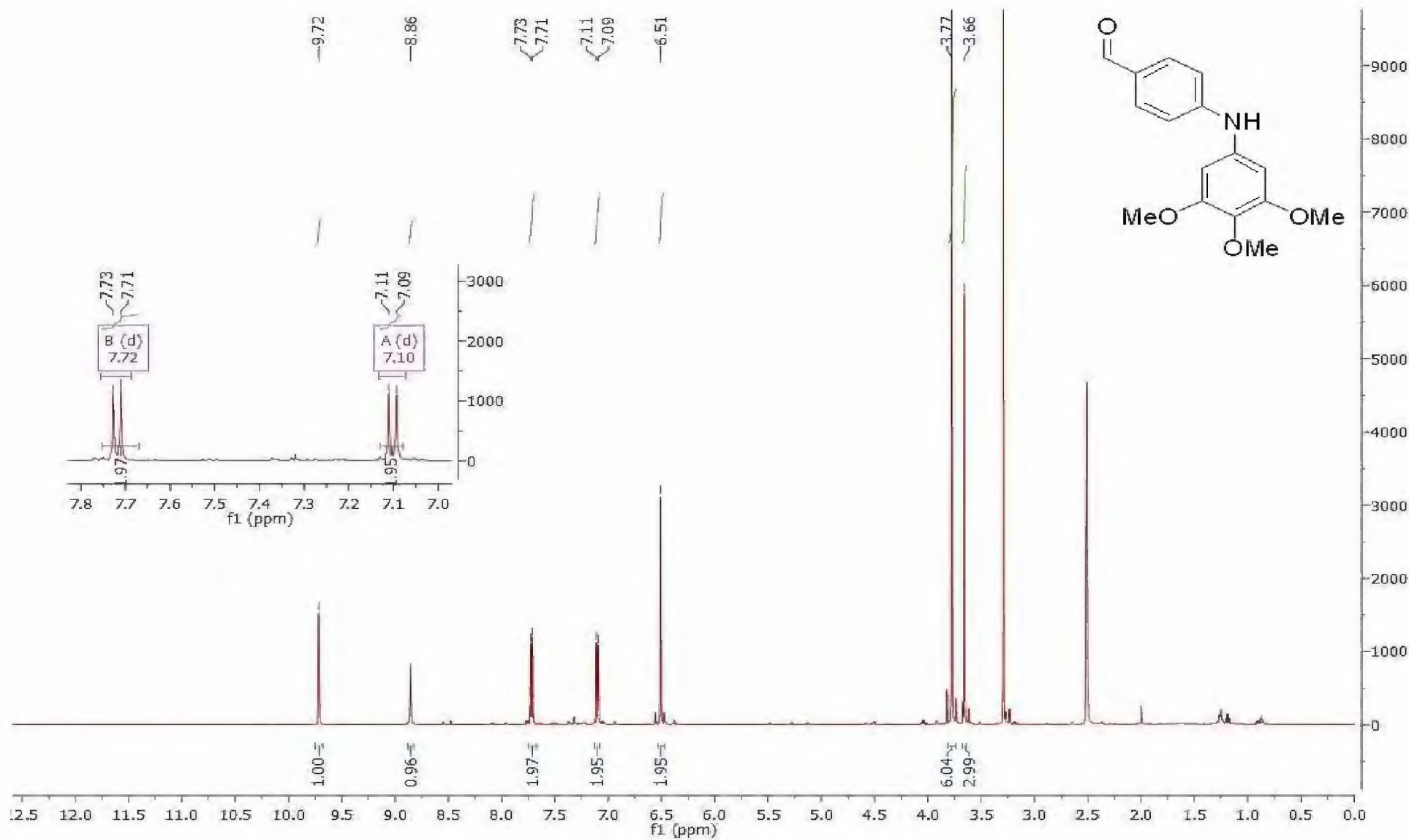
Peak	RT	Area	Height	Area%	UV max	S/N
1	1.65	54.045	693.742	100.00	219.251/396	313.3



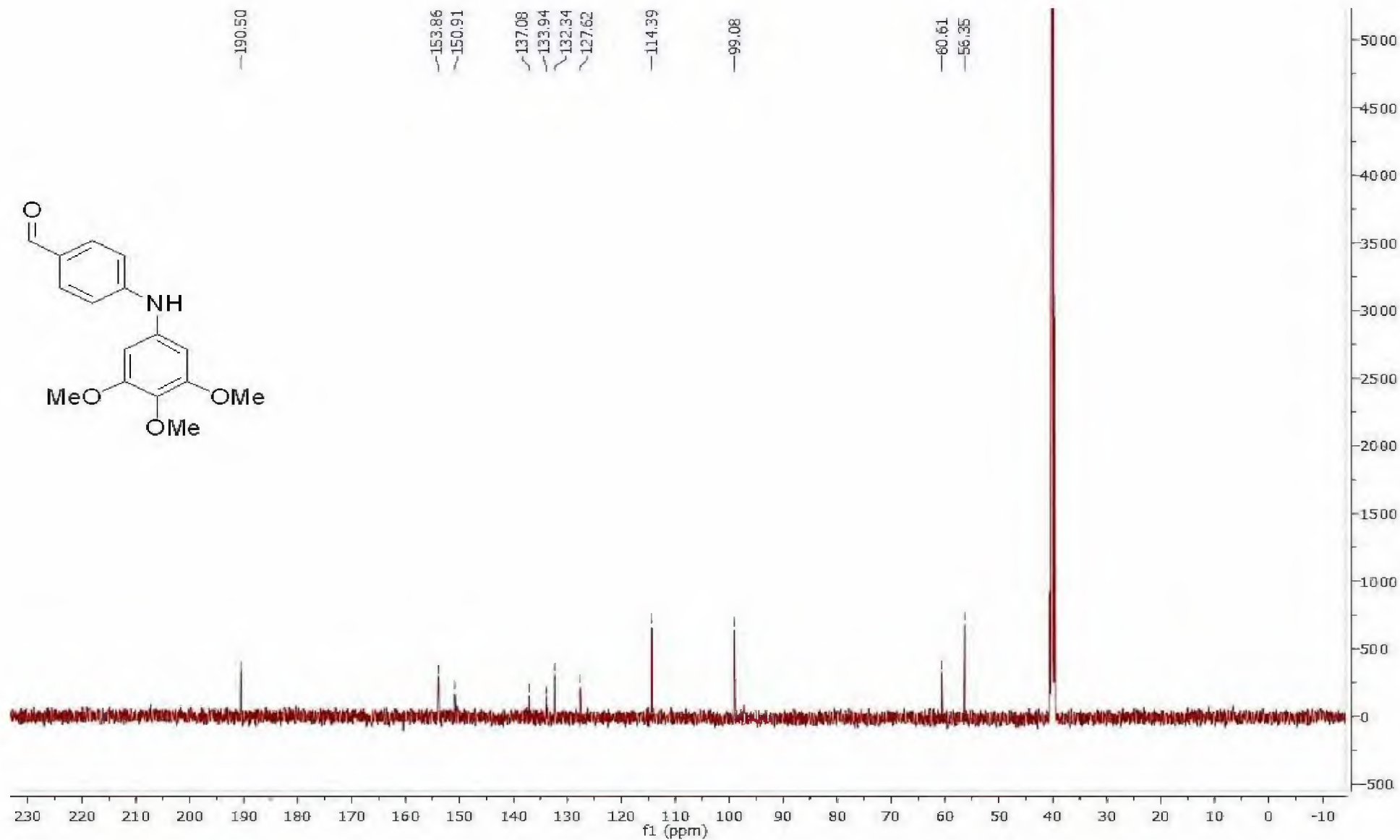
TIC(+)-y01

Peak	RT	Area	Ex. PK. Jct.	Area%	MW	S/N
1	1.65	4472207	2428237	14.088	272.9	-
2	1.98	2421527	359280	15.903	318.1	-
3	2.40	26034797	9029030	61.601	282.0	-
4	2.55	3314762	629027	8.407	283.9	-

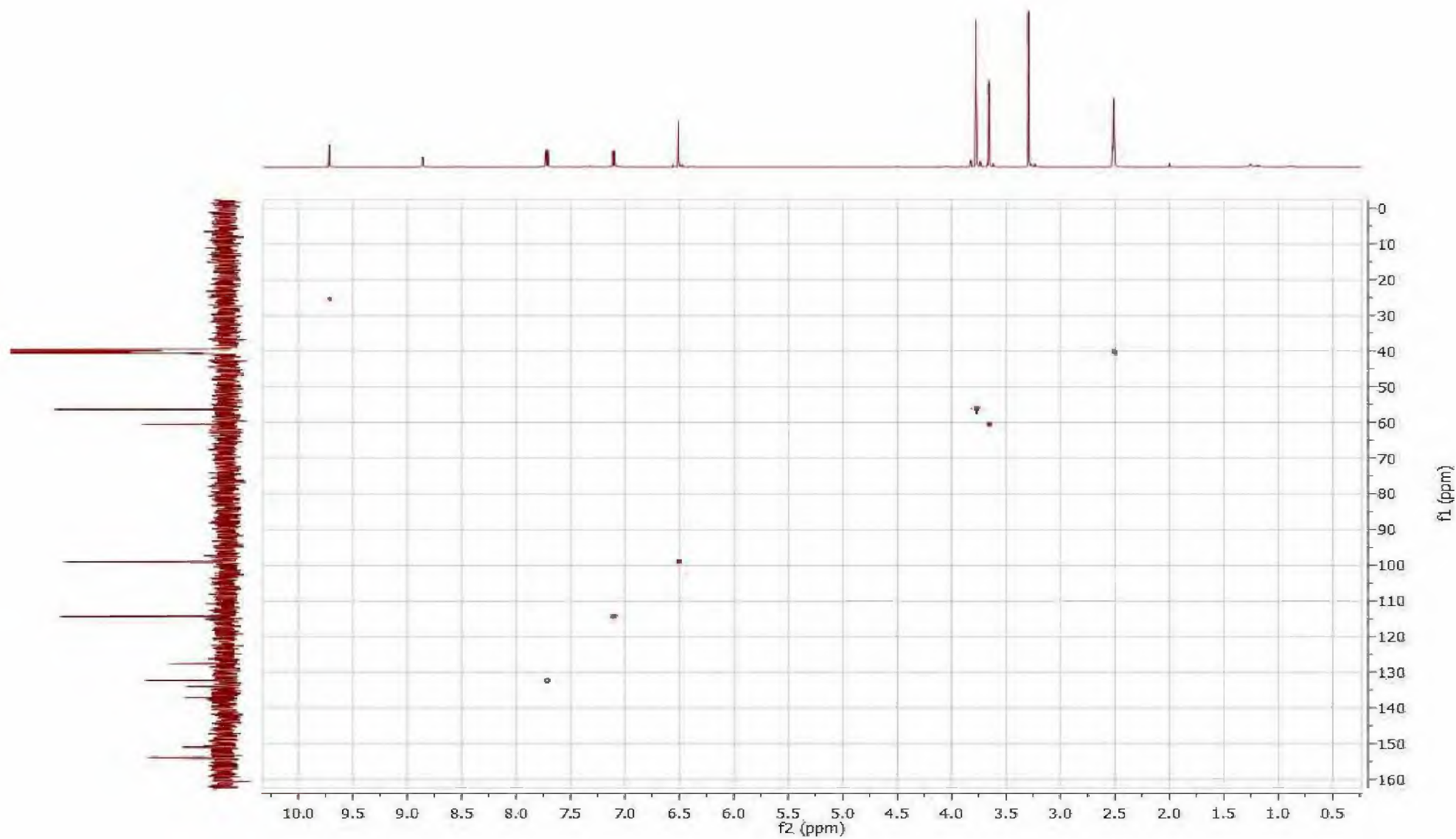
Anexo 124: Espectro de RMN ^1H do intermediário 49 em DMSO- d_6 a 400 MHz.



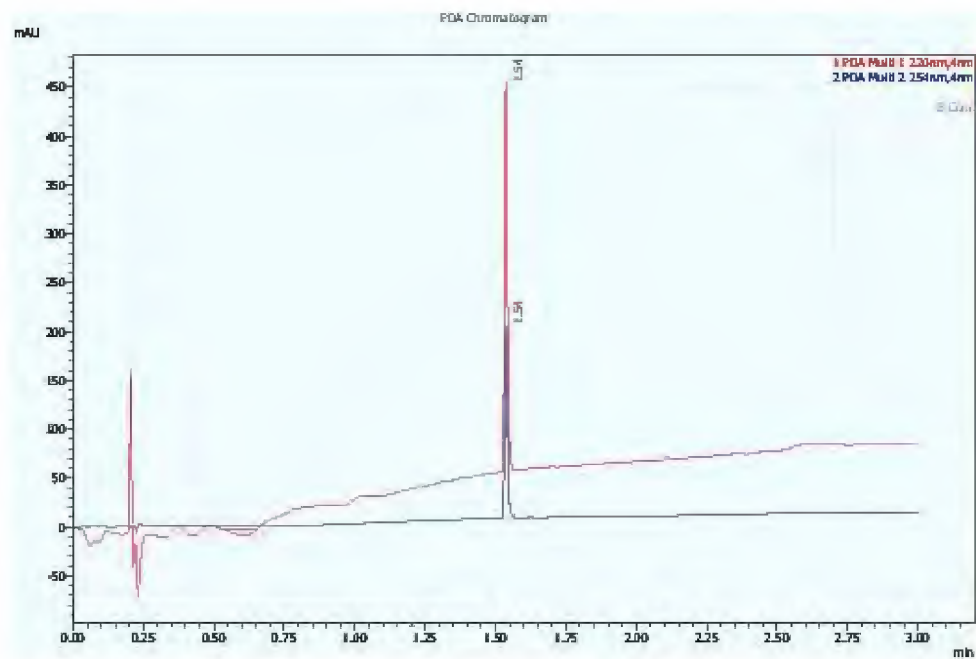
Anexo 125: Espectro de RMN ^{13}C do intermediário 49 em DMSO- d_6 a 101 MHz.



Anexo 126: Espectro de RMN HSQC do intermediário 49 em DMSO-d6 a 400 MHz.



Anexo 127: Cromatograma obtido por LC-MS para o intermediário 49.

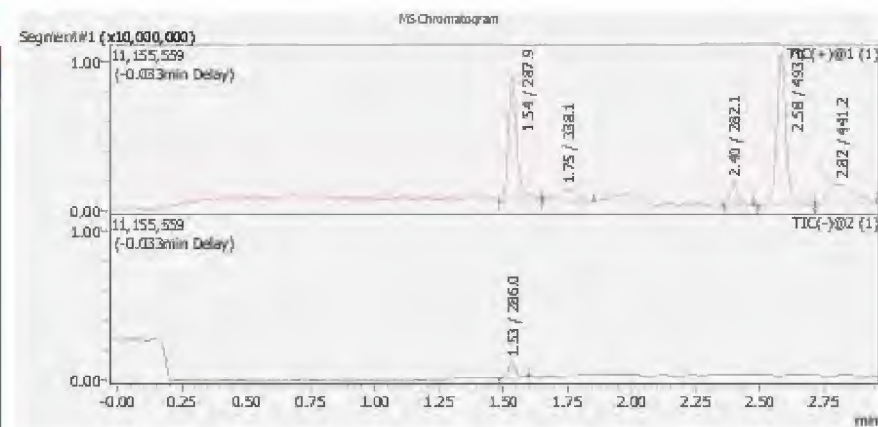


PDA Peak Table

PK#	R.T.	Area	Hght	Area%	UV max	S/N
1	1.54	275870	396851	100.0	390	7.7

PDA Peak Table

PK#	R.T.	Area	Hght	Area%	UV max	S/N
1	1.54	135938	194988	100.00	390	76.7



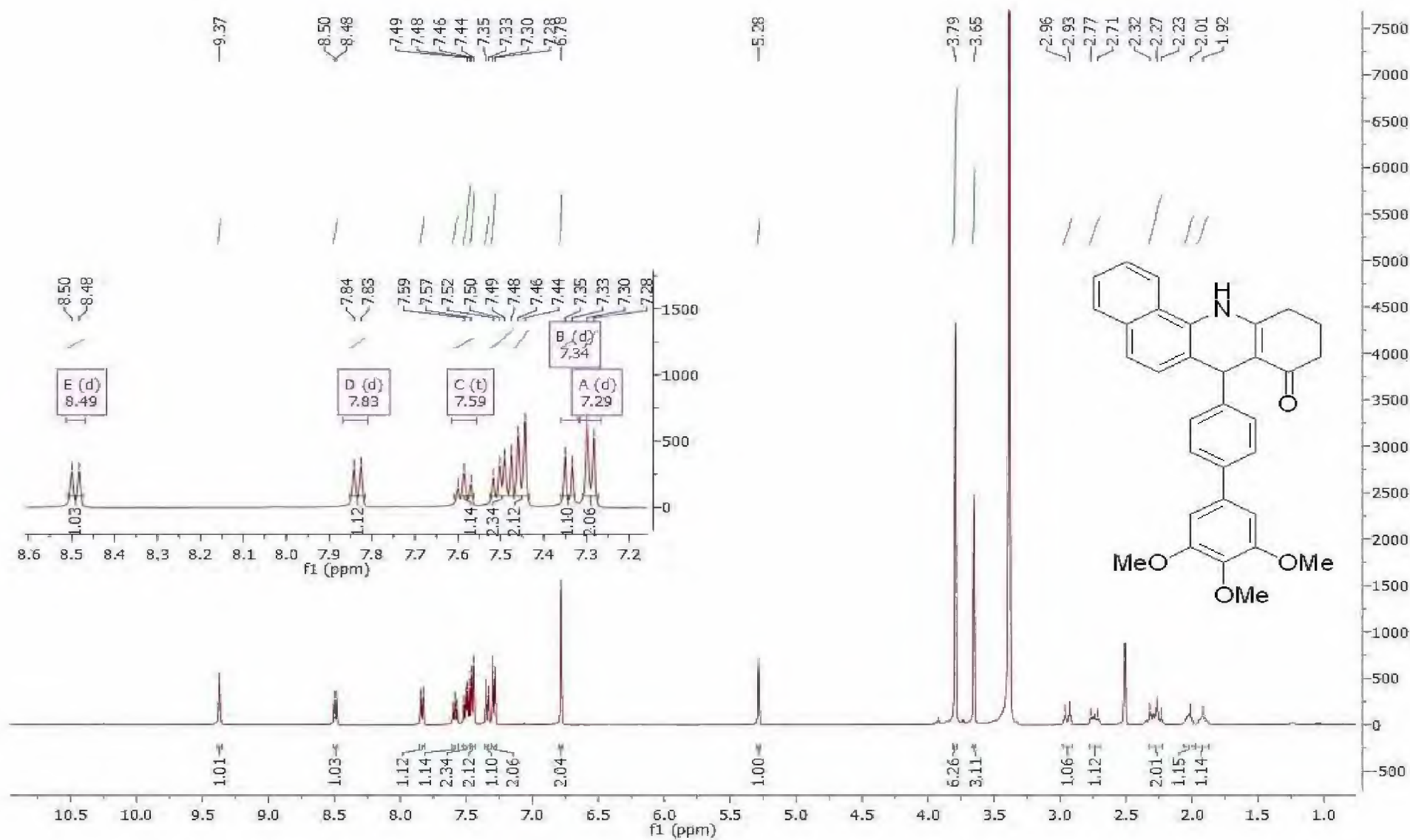
TIC(1-1)

PK#	R.T.	Area	Es. B. Int.	Area%	M/z	S/N
1	1.54	10529522	8539221	52.432	287.9	7
2	1.75	3866400	506084	6.421	388.1	7
3	2.40	3303801	1538152	5.986	282.1	7
4	2.58	24512632	9313107	48.707	493.3	7
5	2.82	9004806	279436	14.264	441.2	7

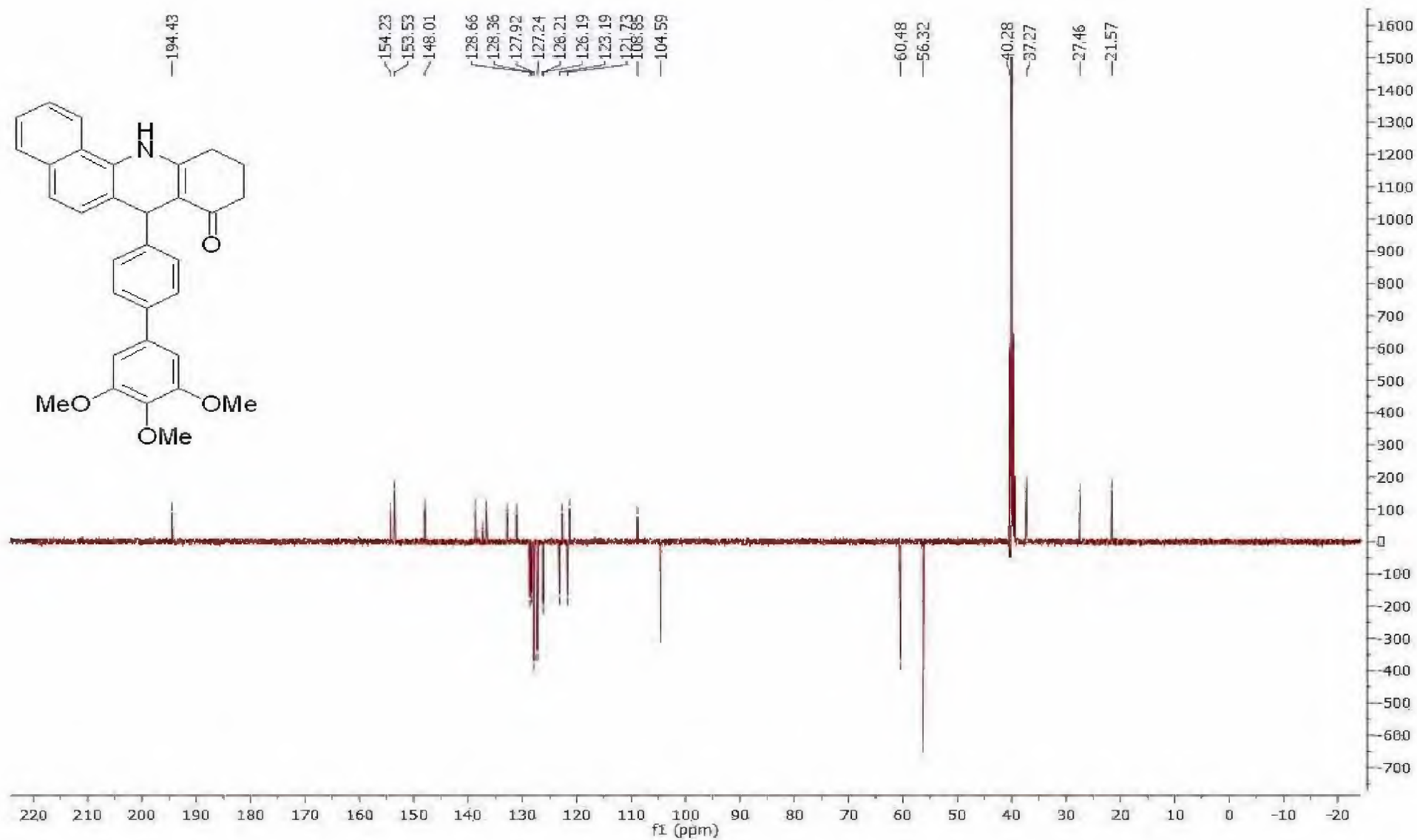
TIC(1-2)

PK#	R.T.	Area	Es. B. Int.	Area%	M/z	S/N
1	1.53	2019334	119563	100.000	286.0	7

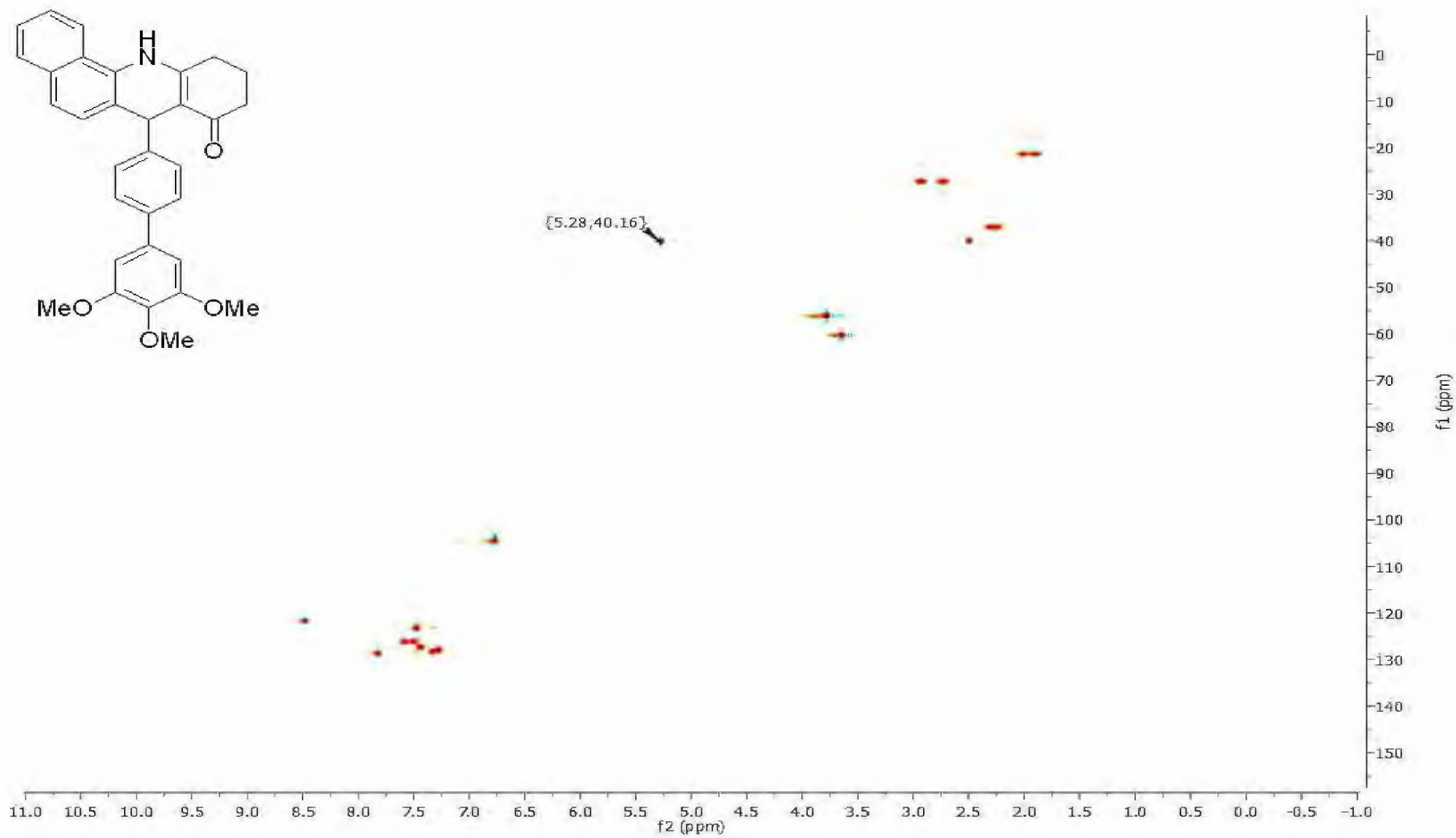
Anexo 128: Espectro de RMN ^1H da molécula final 47 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



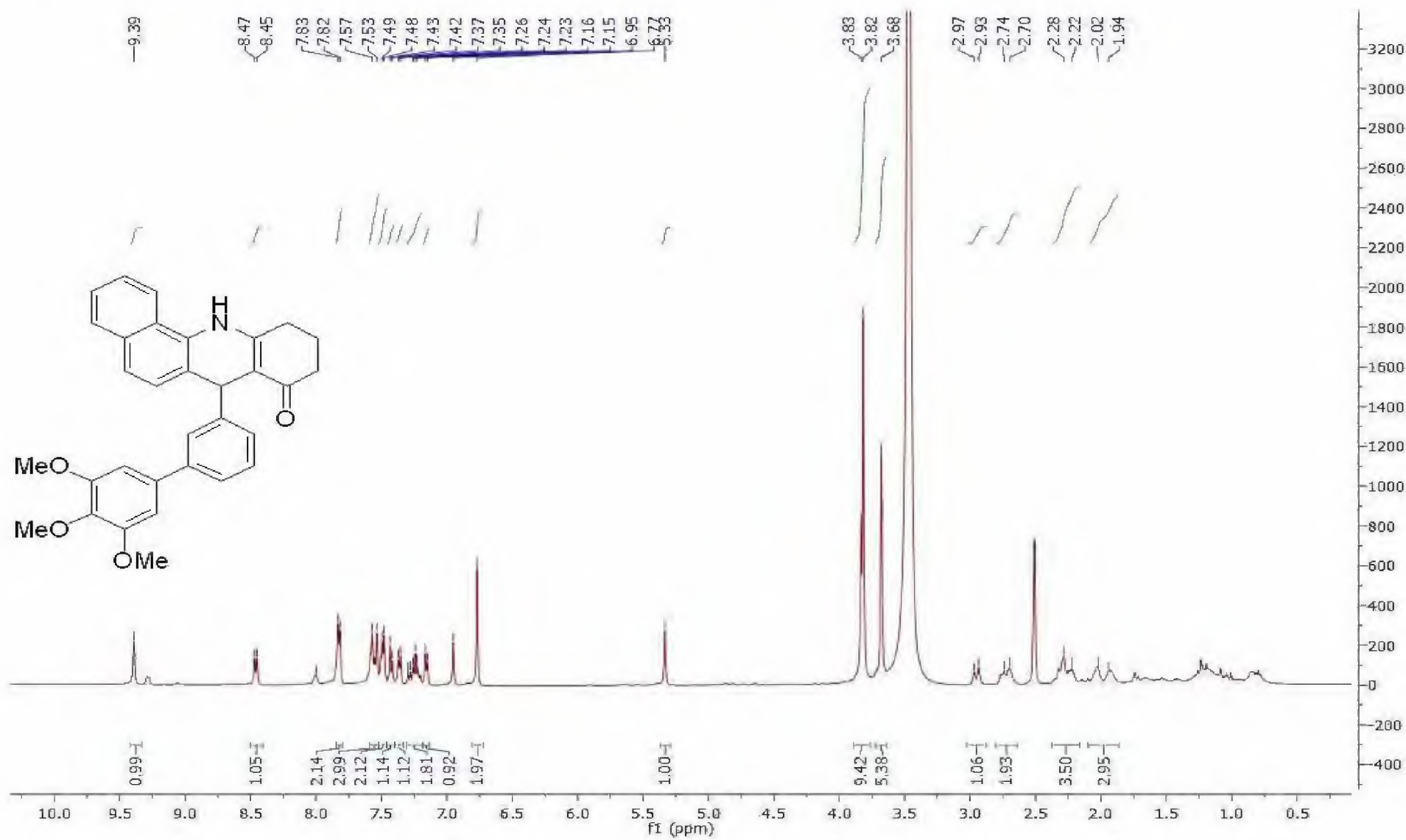
Anexo 129: Espectro de RMN ^{13}C da molécula final 47 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



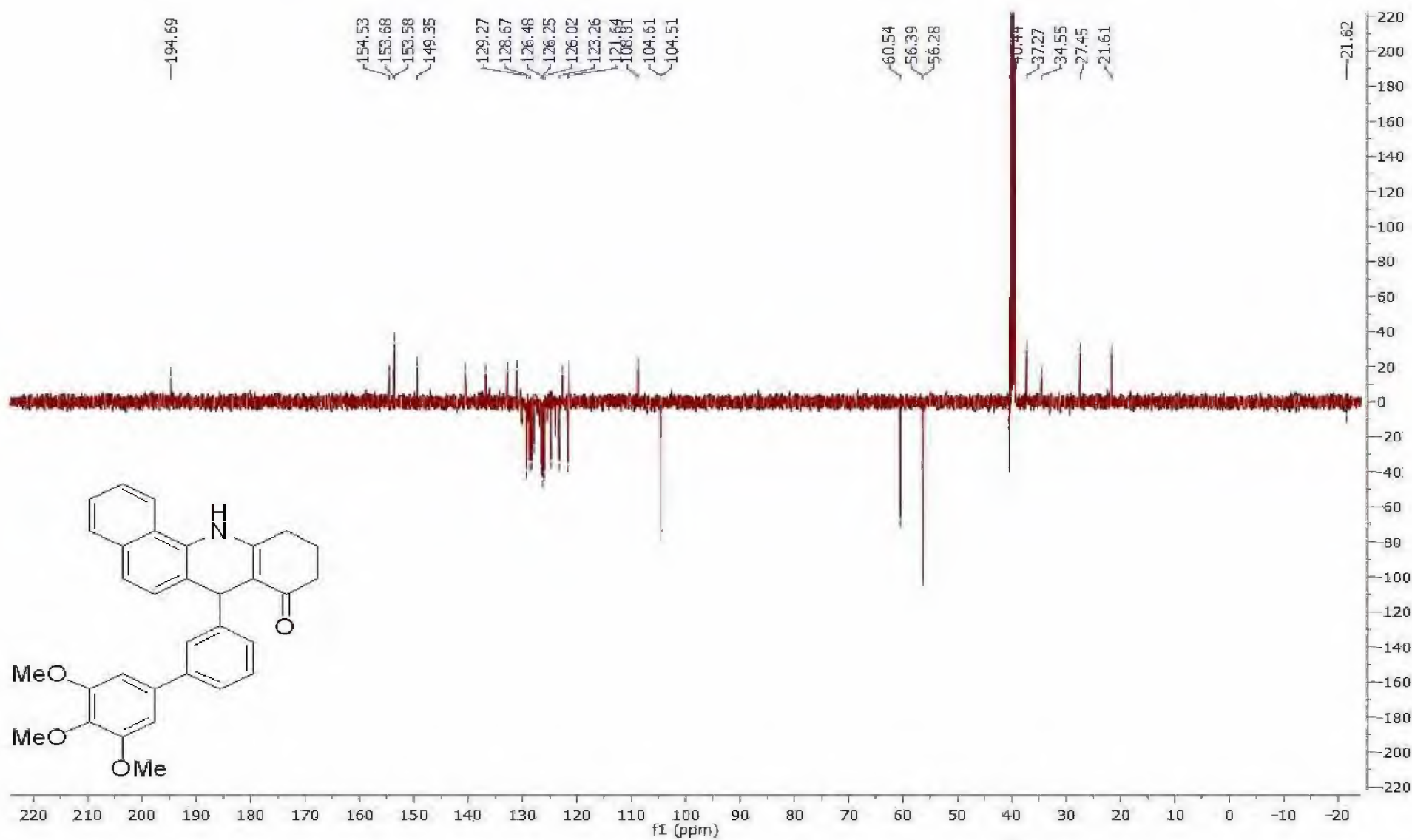
Anexo 130: Espectro de RMN HSQC da molécula final 47 em DMSO-d6 a 500 MHz.



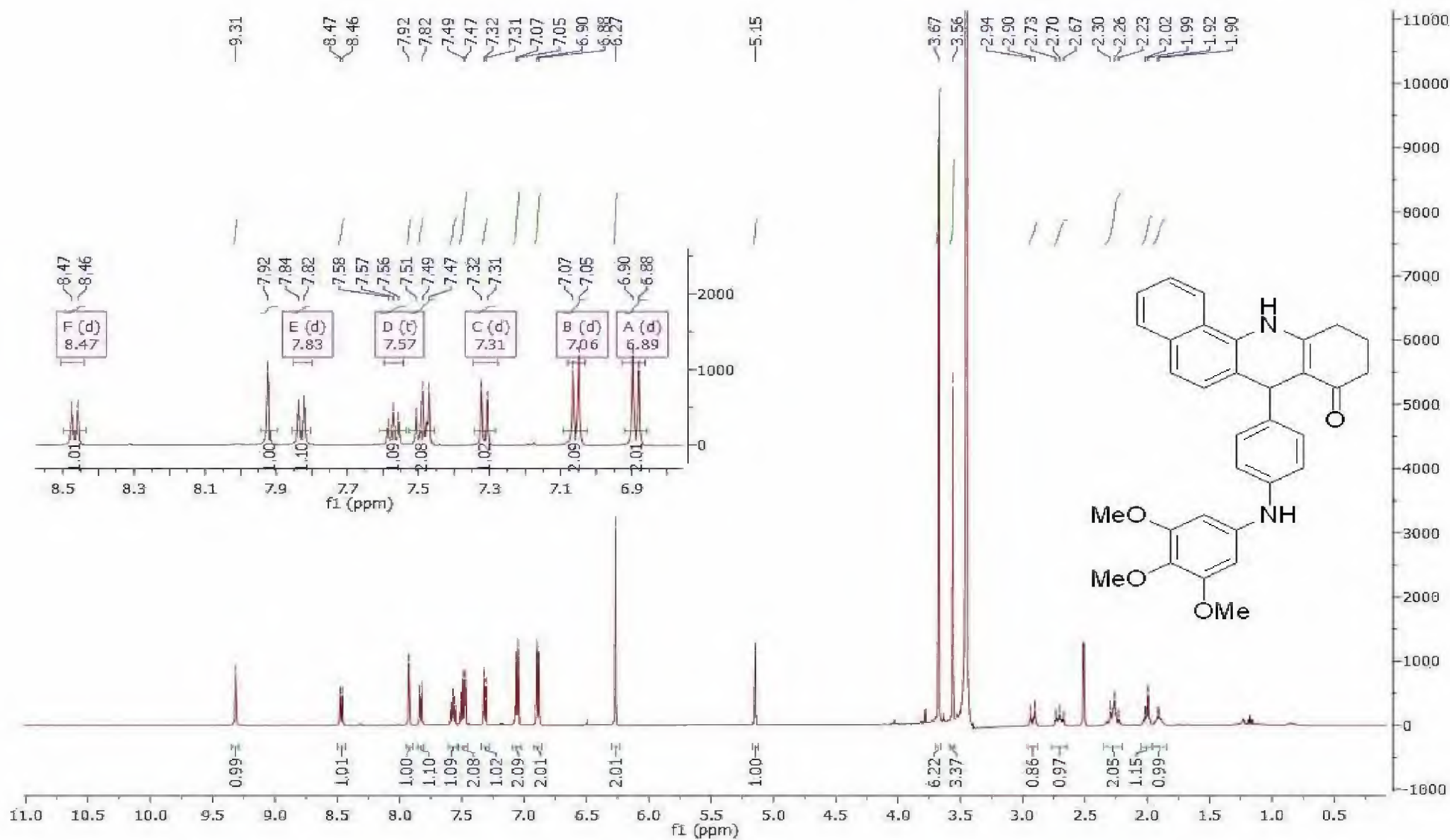
Anexo 131: Espectro de RMN ^1H da molécula final 48 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



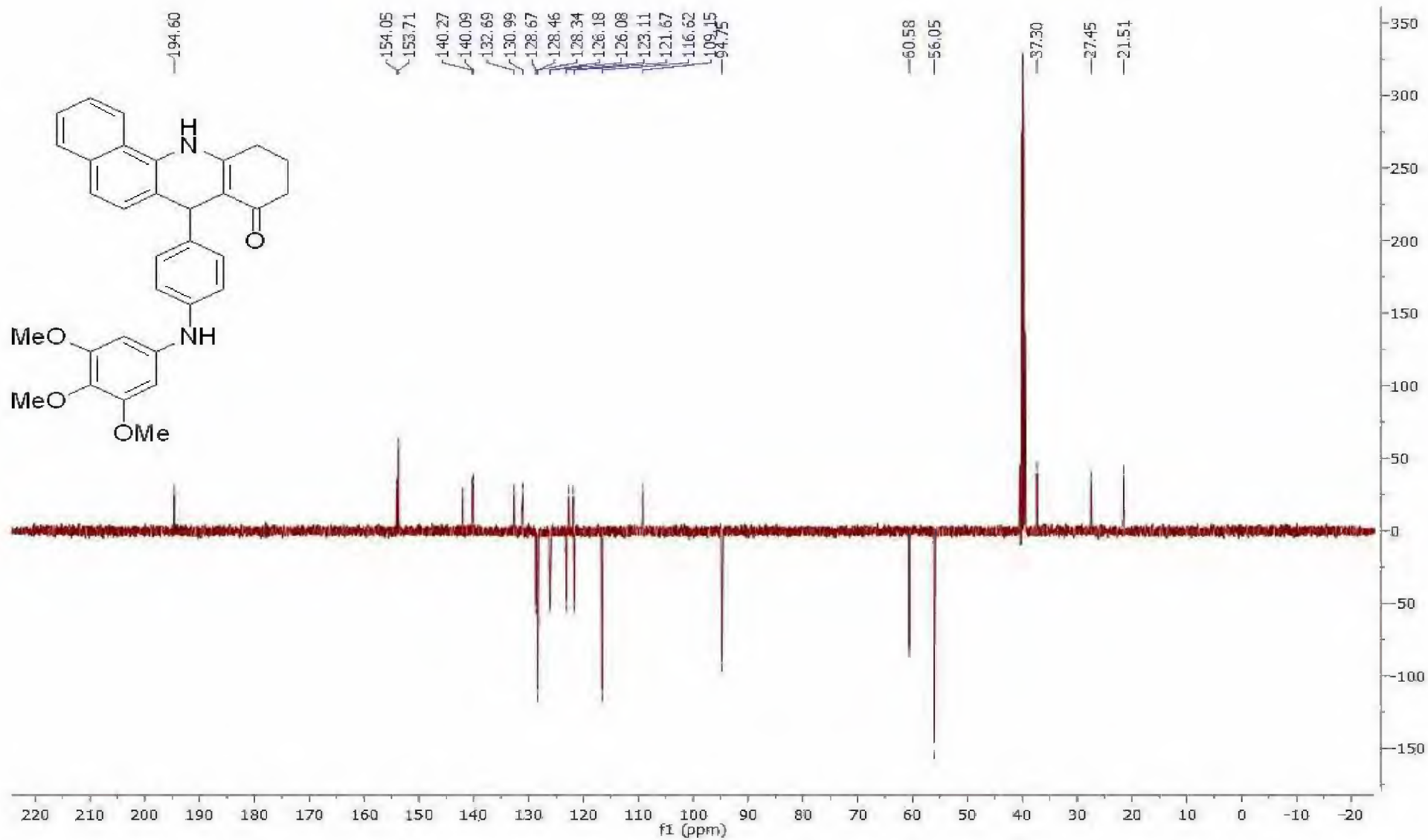
Anexo 132: Espectro de RMN ^{13}C da molécula final 48 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



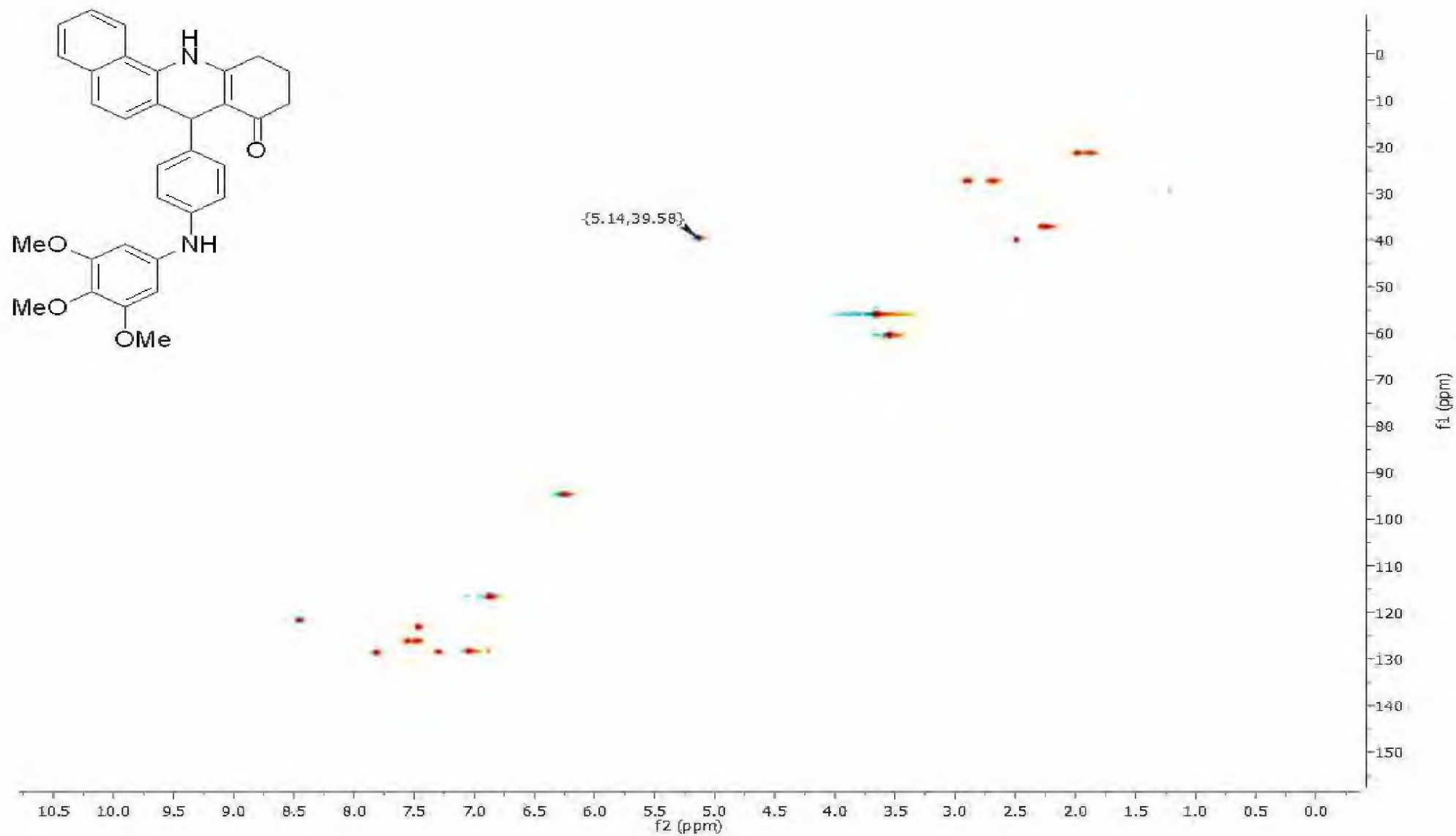
Anexo 133: Espectro de RMN ^1H da molécula final 49 em DMSO- d_6 a 500 MHz.



Anexo 134: Espectro de RMN ^{13}C da molécula final 49 em DMSO- d_6 a 126 MHz.



Anexo 135: Espectro de RMN HSQC da molécula final 49 em DMSO-d6 a 500 MHz.



Anexo 136: Tabela com as interações das moléculas do capítulo III e a proteína Tubulina.

Mol.	Enant.	Score	Interação					
			Ligação de hidrogênio	C-H	π -alquil	π -stack	π -S	Desfavorável
38	-	81.79	A:VAL181; B:CYS241	A:ALA180; B:LYS352; B:ALA317	B:LYS254; B:LEU248; B:ALA250; B:ALA354; B:CYS241; B:ALA316; B:LEU242; B:LEU255; B:LYS352; A:VAL181; A:ALA180	B:VAL315	B:MET259	
39	-	49.64	B:VAL181	B:ALA180; B:LYS352; B:ALA317; B:ALA250; B:ASP251	B:LYS254; B:LYS352; A:VAL181; B:MET259; B:ALA316; B:ALA354; B:LEU255; B:LEU242; B:CYS241; B:ALA250; B:LEU248		B:MET259	A:VAL181
40	R	81.78	A:THR179; B:CYS241	A:ALA180; B:ASN258; B:ASN350; B:VAL315; B:ALA250	B:LYS254; B:LEU248; B:ALA250; B:LEU255; B:ILE318; B:ILE378; B:CYS241; B:ALA354; B:ALA316; B:LYS352; A:VAL181		B:MET259; B:LYS254	
	S	77.59	A:VAL181; B:CYS241	A:ALA180; B:LYS252; B:ALA250	A:VAL181; B:LYS352; B:LYS254; B:LEU248; B:ALA250; B:ALA354; B:CYS241; B:ILE318; B:LEU255; B:ALA316	B:VAL315	B:MET259	A:VAL181
41	R	78.75	A:THR179; B:CYS241	A:ALA180; B:THR353	B:LYS254; A:ALA180; B:LYS352; A:VAL181; B:ALA250; B:ALA316; B:LEU255; B:CYS241;	B:VAL315	B:MET259	

					B:ILE318; B:ALA354; B:LEU248			
	S	68.42	A:VAL181; A:THR179; B:CYS241	A:ALA180; B:LYS352; B:ALA250	A:VAL181; A:ALA180; B:LYS352; B:LYS254; B:LEU248; B:ALA250; B:ALA354; B:ILE318; B:CYS241; B:ALA316; B:LEU255	B:VAL315	B:MET259	A:VAL181
42	R	76.55	B:ALA317; A:THR179	A:ALA180; B:THR353	B:LYS254; A:ALA180; A:VAL181; B:LYS352; B:ALA316; B:ALA354; B:LEU248; B:ALA250; B:ILE378; B:LEU255	B:VAL315	B:MET259	A:VAL181
	S	62.11	A:VAL181; A:THR179	B:THR353; B:LYS352; A:ALA180; B:ALA250	A:VAL181; B:LYS352; A:ALA180; B:LYS254; B:ALA250; B:LEU248; B:LEU255; B:CYS241; B:ALA354; B:ALA316	B:VAL315	B:MET259	A:VA181
44	R	46.28	A:THR179	A:ALA180; B:LYS254; B:ASN349; B:ASN350; B:VAL315; B:LEU255; B:ALA250	A:ALA180; B:LYS254; B:LYS352; A:VSL181; B:MET259; B:LEU255; B:ALA316; B:CYS241; B:ALA354; B:ALA250; B:LEU248		B:MET259	A:VAL181; B:LYS352
	S	70.49	A:THR179; A:ASN101; B:LYS254	A:ALA180; B:LYS352; A:SER178; B:ASN249; B:THR353	A:VAL181; B:LYS352; A:ALA180; B:LYS254; B:LEU248; B:ALA250; B:ALA354; B:CYS241; B:LEU255; B:ALA316	B:VAL315	B:MET259	A:VAL181; B:CYS241
46	R	48.39	B:ASN258; B:VAL315;	A:ALA180; B:ASN349;	B:LYS254; B:LEU248; B:ALA250; B:ALA354;	B:VAL315	B:MET259	A:VAL181; B:MET259

			B:ALA317; B:CYS241	B:THR314; B:THR353	B:CYS241; B:ALA316; B:LEU255; B:LYS352; B:ILE378; A:VAL181			
	S	57.68	A:VAL181; A:THR179; B:CYS241	B:LYS352; A:ALA180; A:SER178; B:ASN249; B:THR353	A:VAL181; B:LYS352; A:ALA180; B:LYS254; B:LEU248; B:ALA354; B:ALA250; B:CYS241; B:LEU255; B:ALA316	B:VAL315	B:MET259	
47	R	60.41	A:GLN11	B:LEU255; A:SER178; A:GLU183	A:ALA180; B:LYS254; B:LEU248; B:LEU255; B:LYS352; B:ALA316; B:CYS241; B:ALA354; B:ILE318; B:ALA250		B:LYS254	B:ASN249; B:ASN258
	S	64.69		B:ASN249; A:GLU183	B:ALA354; B:ALA316; B:LYS352; A:VAL181; B:MET259; B:ALA250; B:LYS254; A:ALA180; B:LEU248		B:LYS254	B:LYS352; B:MET259
49	R	84.38	A:TYR224; A:GLN11	B:GLN247	B:LEU242; B:CYS241; B:LEU255; B:ALA250; B:LYS254; A:TYR224; B:LEU248; B:LYS352; B:ALA316; B:ALA354			
	S	68.01	A:ASN101; A:TYR224	A:GLU183; B:GLN247	B:LEU255; B:ALA316; B:ILE318; B:CYS241; B:ALA250; B:ALA354; A:ALA180; B:LEU248; B:LYS352			B:MET259; B:LYS352
LDQMC-014	R	60.40	B:ASP251; B:CYS241	B:ALA250; B:ALA317	B:LYS352; A:VAL181; B:ALA316; B:ALA354; B:CYS241; B:ILE318; B:ILE378; B:LEU255;	B:VAL315	B:MET259	A:VAL181; B:MET159

					B:LEU242; B:LEU248; B:ALA250; B:LYS254			
	S	83.69	B:CYS241	B:ALA317	A:ALA180; B:LYS254; B:LEU248; B:ALA250; B:LEU255; B:LEU242; B:CYS241; B:ILE318; B:ALA316; B:ALA354; B:LYS352; A:VAL181			
NV4	-	81.24	B:ASP251; A:SER178	B:VAL238; B:LEU255; B:ALA250; B:ASN350; B:VAL315	B:LEU248; A:ALA180; A:VAL181; B:LYS352; B:ALA316	A:THR179; B:VAL315	B:MET259	