

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Marcel Lucas de Almeida

**Síntese, caracterização e atividade biológica de novos
derivados da 3-(acridina-9-ilmetil)tiazolidina-2,4-diona**

Recife

2015

Marcel Lucas de Almeida

Síntese, caracterização e atividade biológica de novos derivados da 3-(acridina-9-ilmetil)tiazolidina-2,4-diona

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Co-orientadora: Profa. Dr. Marina Galdino da Rocha Pitta

Recife

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Almeida, Marcel Lucas de

Síntese, caracterização e atividade biológica de novos derivados e atividade biológica de novos derivados da 3-(acridina-9-imetil) tiazolidina-2,4-diona/ Marcel Lucas de Almeida – Recife: O Autor, 2015.

143 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Coorientador: Marina Galdino da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Química farmacêutica 2. Tiazóis 3. Câncer I. Pitta, Ivan da Rocha (orientador) II. Pitta, Marina Galdino da Rocha (coorientador) III. Título**

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 193

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dr. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dr. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Almeida, Marcel Lucas

Título: Síntese, caracterização e atividade biológica de novos derivados da 3-(acridina-9-ilmetil)tiazolidina-2,4-diona.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 19/02/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Liliane Guerra, meu pai Marcus Lucas e meu irmão Pedro por toda a dedicação que tiveram e tem comigo.

Aos meus avôs Lucas e José infelizmente já falecidos e minhas avós Lucióla e Meyber.

Aos meus tios e tias Margareth, Fernando, Luiz Carlos que sempre foram prestativos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ivan da Rocha e Pitta e Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG) terem me aceitado como seus alunos e me dado a oportunidade de realizar este estudo.

A Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de pós-graduação em inovação terapêutica pela oportunidade e por disponibilizar as instalações e estrutura necessárias para o trabalho.

A Capes pelo auxílio financeiro para que eu possa me dedicar aos estudos e pesquisas científicas.

A professora Maria do Carmo do departamento de antibióticos por ter me ensinado e ajudado bastante durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório do Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF) que passaram ou ainda se encontram nele, pelo apoio e auxílio.

Aos colegas do LINAT, como Valécia de Cássia Mendonça e Gabriela Souto Vieira pela colaboração nos testes biológicos, bem como os professores Moacyr Rêgo e Michelly Pereira.

Aos colegas do LPSF do departamento de antibióticos que também me auxiliaram bastante.

Aos meus colegas de turma 2013.1 do PPGIT.

Ao secretário do PPGIT Paulo Germano por tirar todas minhas dúvidas.

Ao técnico Hernando do NUPIT SG pela ajuda na elaboração dos espectros e na limpeza do laboratório.

A toda minha família que me apoiou, meus amigos e todos outras pessoas envolvidas que não foram citadas, mas que contribuíram para realização desta dissertação.

No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.

Ayrton Senna

RESUMO

Almeida, M. L. Síntese, caracterização e atividade biológica de novos derivados da 3-(acridina-9-ilmetil)thiazolidina-2,4-diona, 2015. Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Estima-se que até 2030 o câncer será responsável por até 12 milhões de óbitos. Tendo em vista a necessidade de novos tratamentos para o câncer, este trabalho tem como objetivo sintetizar, caracterizar estruturalmente e avaliar a atividade anticâncer de sete novos derivados tiazacridínicos (LPSF AA-56, LPSF AA-57, LPSF AA-59, LPSF AA-60, LPSF AA-61, LPSF AA-62, LPSF AA-63). Estes derivados provêm da hibridização molecular dos núcleos de thiazolidina e de acridina. As sínteses para obtenção destes compostos foram otimizadas para obtenção de um melhor rendimento. A síntese da thiazolidina-2,4-diona (TZD) foi feita por reação de ciclização. Uma posterior N-alquilação da TZD em presença de uma base e da 9-(bromo-metil)acridina, conduziu a formação do intermediário LPSF AA-1A. Os intermediários ésteres de Cope (IPs) foram obtidos a partir de uma reação de condensação Knoevenagel. A última etapa ocorreu por uma reação de adição de Michael através de reação entre a TZD N-alquilada com os ésteres de Cope, formando os derivados tiazacridínicos substituídos. A pureza e comprovação estrutural das moléculas sintetizadas foram obtidas através de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio. Ensaio de citotoxicidade dos derivados sintetizados foram realizados em células leucêmicas, fígado e próstata. Entre os compostos sintetizados, o LPSF AA-57 exibiu a atividade anti-cancerígena mais potente contra as linhagens celulares Jurkat ($6,63 \pm 2,65 \mu\text{M}$), HL-60 ($6,51 \mu\text{M}$), K562 ($3,97 \pm 1,36 \mu\text{M}$) e o LPSF AA-60 exibiu a atividade anti-cancerígena mais potente contra DU 145 ($7,22 \pm 3,12 \mu\text{M}$).

Palavras-chave: Acridina. Thiazolidina. Câncer. Química Medicinal.

ABSTRACT

Almeida, M. L. Synthesis, characterization and *in vitro* anticancer activity of novel 3-(acridin-9-ylmethyl) thiazolidine-2,4-dione derivatives, 2015. Master. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

It is estimated that cancer will be responsible for up to 12 million deaths by 2030. Given the need for new treatments for cancer this work aims to synthesize, characterize structurally and evaluate the anti-cancer activity of seven new thiazacridines derivatives (LPSF AA-56, LPSF AA-57, LPSF AA-59, LPSF AA-60, LPSF AA-61, LPSF AA-62, and LPSF AA-63). These derivatives derived of molecular hybridization from nucleus of thiazolidine and acridine. The syntheses for obtaining these compounds were optimized to obtain the best performance. Synthesis of thiazolidine-2,4-dione (TZD) was carried out by cyclization reaction. A further N-alkylation of the TZD in the presence of a base and 9-(bromomethyl)acridine, leading to formation of intermediate LPSF AA-1A. Intermediate esters of Cope (IPs) were obtained from a Knoevenagel condensation reaction. The last step was by a Michael addition, reaction between the N-alkylated TZD with ester of Cope, forming substituted thiazacridines derivatives. The purity and structural confirmation of the synthesized molecules were obtained from liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), infrared (IR) and Proton nuclear magnetic resonance (NMR). Assays of cytotoxicity of the synthesized products was conducted in leukemic cells, liver and prostate. Among the synthesized compounds, the LPSF AA-57 exhibited the most potent anti-cancer activity against cell lines Jurkat ($6,63 \pm 2,65 \mu\text{M}$), HL-60 ($6,51 \mu\text{M}$), K562 ($3,97 \pm 1,36 \mu\text{M}$) and the LPSF AA-60 exhibited the most potent anti-cancer activity against DU 145 ($7,22 \pm 3,12 \mu\text{M}$).

Keywords: Acridine. Thiazolidine. Cancer. Medicinal Chemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.	26
Figura 2. Acridina	29
Figura 3. Estrutura de alguns derivados acridínicos	30
Figura 4. Mepacrina	32
Figura 5. Derivados de 9-Anilinoacridina	34
Figura 6. Tiazolidina 2,4-diona	35
Figura 7. Alguns exemplos de derivados tiazolidínicos com potencial anticâncer.	36
Figura 8. Mecanismo de ação das TZDs.....	38
Figura 9. Derivados tiazolidínicos com função antigliceminante.....	39
Figura 10. Adição de Michael.....	62
Figura 11. Mecanismo de reação hipotético para obtenção dos derivados tiazacridínicos	63
Figura 12. Esquema teórico para formação dos IPs.	64
Figura 13. Mecanismo de reação hipotético para obtenção dos intermediários LPSF IPs.....	65
Figura 14. Cianacetato de etila e seus três centros reativos	66
Figura 15. Atividade citotóxica dos novos derivados Tiazacridínicos em linhagens celulares de câncer. Os compostos Tiazacridínicos foram testados em concentrações de 1, 10 e 100 uM durante 72 horas, por ensaio de MTT. Cells representam aqueles que não foram tratados com as Tiazacridinas. (A) Viabilidade celular das células de Jurkat. (B) Viabilidade celular de células DU145. (C) Viabilidade celular de células HL-60. (D) Viabilidade celular das células K562.	69
Figura 16. Espectro do RMN ¹ H do LPSF AA-56.....	86
Figura 17. Espectro Total do RMN ¹ H do LPSF AA-56	87
Figura 18. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-metil-tio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-56) (MM=442).....	88
Figura 19. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-metil-tio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-56) (MM=442)	89
Figura 20. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-56 (tR = 10 minutos)	90
Figura 21. Espectro de IV do LPSF AA-56. Deformação axial normal de C=O, 1734 cm ⁻¹ , 1680 cm ⁻¹ . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1606 cm ⁻¹ . Deformação axial de C-N, 1375 cm ⁻¹ . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 761 cm ⁻¹	91
Figura 22. Espectro do RMN ¹ H do LPSF AA-57.....	92
Figura 23. Espectro Total do RMN ¹ H do LPSF AA-57	93
Figura 24. Espectro de Massas por IES do 3-(acridin-9-ilmetil)-5-(3-trifluorometoxi)benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-57) (MM=480).....	94
Figura 25. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-(acridin-9-ilmetil)-5-(3-trifluorometoxi)benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-57) (MM= 480)	95
Figura 26. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-57 (tR =13 minutos)	96

Figura 27. Espectro de IV do LPSF AA- 57. Deformação axial normal de C=O, 1745 cm ⁻¹ , 1691 cm ⁻¹ . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1614 cm ⁻¹ . Deformação axial de C-N, 1375 cm ⁻¹ . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 750 cm ⁻¹ . Deformação angular de C=C, 673 cm ⁻¹	97
Figura 28. Espectro do RMN ¹ H do LPSF AA-59.....	98
Figura 29. Espectro Total do RMN ¹ H do LPSF AA-59.....	99
Figura 30. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59) (MM=480).....	100
Figura 31. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59) (MM=480).....	101
Figura 32. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-59 (tR =24 minutos).....	102
Figura 33. Espectro de IV do LPSF AA- 59. Deformação axial normal de C=O, 1737 cm ⁻¹ , 1685 cm ⁻¹ . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1600 cm ⁻¹ . Deformação axial de C-N, 1384 cm ⁻¹ . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 750 cm ⁻¹	103
Figura 34. Espectro do RMN ¹ H do LPSF AA-60.....	104
Figura 35. Espectro Total do RMN ¹ H do LPSF AA-60.....	105
Figura 36. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-60) (MM=496).....	106
Figura 37. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-60) (MM=496).....	107
Figura 38. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-60 (tR = 15 minutos).....	108
Figura 39. Espectro de IV do LPSF AA- 60. Deformação axial normal de C=O, 1732 cm ⁻¹ , 1687 cm ⁻¹ . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1622 cm ⁻¹ . Deformação axial de C-N, 1379 cm ⁻¹ . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 752 cm ⁻¹	109
Figura 40. Espectro do RMN ¹ H do LPSF AA-61.....	110
Figura 41. Espectro Total do RMN ¹ H do LPSF AA-61.....	111
Figura 42. Espectro de Massas por IES do 4-(3-acridin-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil)benzotriazina (LPSF AA-61) (MM=421).....	112
Figura 43. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 4-(3-acridin-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil)benzotriazina (LPSF AA-61) (MM=421).....	113
Figura 44. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-61 (tR = 22 minutos).....	114
Figura 45. Espectro de IV do LPSF AA- 61. Deformação axial normal de C=O, 1743 cm ⁻¹ , 1693 cm ⁻¹ . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1610 cm ⁻¹ . Deformação axial de C-N, 1377 cm ⁻¹ . Deformação axial de C≡N, 2200 cm ⁻¹	115
Figura 46. Espectro do RMN ¹ H do LPSF AA- 62.....	116
Figura 47. Espectro Total do RMN ¹ H do LPSF AA-62.....	117
Figura 48. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-il-metil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62) (MM=530).....	118
Figura 49. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-il-metil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62) (MM=530).....	119

Figura 50. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-62 (tR = 24 minutos)	120
Figura 51. Espectro de IV do LPSF AA- 62. Deformação axial normal de C=O, 1726 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1610 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1327 cm^{-1}	121
Figura 52. Espectro do RMN ^1H do LPSF AA- 63.....	122
Figura 53. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-63	123
Figura 54. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63) (MM=504)	124
Figura 55. . Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63) (MM=504)	125
Figura 56. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-63 (tR = 20 minutos)	126
Figura 57. Espectro de IV do LPSF AA- 63. Deformação axial normal de C=O, 1734 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1577 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1325 cm^{-1}	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ésteres de Cope sintetizados.....	46
Tabela 2. Tiazacridinas sintetizadas	48
Tabela 3. Valores de IC ₅₀ (concentração inibitória de 50%) realizado pelo método do MTT para as células Jurkat, HL-60, DU 145, HEPG2, RAJI e PBMC, obtidos por regressão não-linear através do programa Origin 8	68

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAR	receptor androstano – constitutivo, “constitutive androstane receptor”
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DU 145	Tecido da próstata
HEPG2	Tecido do fígado
HL60	O DNA genômico humano
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
MDR	Resistência multi-droga, “Multi-drug resistance”
MSD	Domínio de expansão de membrana, “membrane spanning domains”
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiozoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NaOH	Hidróxido de sódio
NBD	Domínio de ligação ao nucleotídeo, “nucleotide-binding domains”
NR	Receptor nuclear hormonal, “nuclear receptor”
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico, “Peripheral blood mononucleated cell”
P-gp	Para-glicoproteína
PPAR- γ	Receptor proliferador de peroxissomos ativados, “Peroxisome proliferator-activated receptor”
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
PXR	O receptor da pregnana X, “pregnane X receptor”
TR	Termo de Referência
TZD	Tiazolidina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1. Câncer- Desenvolvimento celular e epidemiologia.....	25
3.1.1. Epidemiologia.....	25
3.1.2. Multidroga resistência (MDR).....	26
3.2. Novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer.....	28
3.2.1. Derivados acridínicos.....	29
3.2.1.1. Funções biológicas dos derivados acridínicos.....	31
3.2.2. Tiazolidinas.....	35
4. METODOLOGIA.....	42
4.1. Materiais e métodos- Síntese química.....	43
4.1.1. Materiais, reagentes e solventes.....	43
4.1.2. Equipamentos.....	43
4.1.3. Síntese Química.....	43
4.1.3.1 Rota Geral de Síntese.....	44
4.1.3.2 Síntese da Tiazolidina-2,4-diona.....	45
4.1.3.3 Síntese dos LPSF/IPs (Ésteres de Cope):.....	45
4.1.3.4 Síntese do LPSF/AA1A (3-Acridina-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona).....	47
4.1.3.5 Síntese dos derivados finais LPSF/AAs (Tiazacridinas):.....	47
4.2. Materiais e métodos- Análises biológicas.....	49

4.2.1.	Inibição do crescimento celular – ensaio MTT.....	49
4.2.2.	Ensaio de seletividade.....	49
4.2.3.	Análise dos dados.....	50
5.	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	51
5.1.	Caracterização estrutural e propriedades físico-químicas dos derivados tiazacridínicos sintetizados.....	52
5.1.1.	3-acridina-9-ilmetil-5-(4-metiltio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-56).....	53
5.1.2.	3-(acridina-9-il-metil)-5-(3-trifluorometoxi)benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-57).....	54
5.1.3.	3-acridina-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59).....	55
5.1.4.	3-acridin-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-60).....	56
5.1.5.	4-(3-acridina-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil) benzonitrila (LPSF AA-61).....	57
5.1.6.	3-acridina-9-il-metil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62).....	58
5.1.7.	3-acridina-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63).....	59
5.2.	Rotas de síntese.....	60
5.3.	Mecanismos reacionais.....	61
5.3.1.	Reações de adição de Michael.....	61
5.3.2.	Reações de condensação de Knoevenagel.....	64
5.3.3.	Cianoacetato de etila.....	66
5.3.4.	Processo de purificação.....	66
5.4.	Discussão sobre as sínteses realizadas.....	67
5.5.	Atividade anticâncer.....	67
5.6.	Discussão da atividade biológica.....	70
6.	<i>CONCLUSÕES</i>	71
7.	<i>PERSPECTIVAS</i>	73

8. REFERÊNCIAS	75
9. APÊNDICE A: Espectros de RMN ¹ H, LC-MS e Infravermelho das Tiazacridinas.....	86
Composto 3-acridina-9-ilmetil-5-(4-metiltio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-56)	86
Composto 3-acridina-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59).....	98
Composto 3-acridina-9-ilmetil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-60)	104
Composto 4-(3-acridin-9-ilmetil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil) benzonitrila (LPSF AA-61)	110
Composto 3-acridina-9-ilmetil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62).....	116
Composto 3-acridina-9-ilmetil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63).....	122
10. APÊNDICE B: Patente depositada. Tiazacridinas utilizadas na terapia anticâncer.	128
11. APÊNDICE C: Artigo. Synthesis, characterization and <i>in vitro</i> anticancer activity of novel 3-(acridin-9-ilmethyl) thiazolidine-2,4-dione derivatives	129
12. APÊNDICE D: Carta de aprovação do comitê de ética.....	143

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer requer em geral múltiplas etapas, estas que costumam levar muitos anos de vida. Sendo assim, alguns tipos de câncer poderiam ser evitados se as pessoas eliminassem e/ou evitassem a exposição aos fatores de risco como tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares (como nitritos para conservar alimentos, alcatrão da fumaça do carvão do churrasco e alimentos muito gordurosos) e sexuais, medicamentos e radiações (principalmente a solar). Se o potencial de malignidade ou o câncer for detectado antes de as células tornarem-se malignas ou em sua fase inicial de desenvolvimento, as chances e condições favoráveis para seu tratamento e conseqüentemente a cura serão muito maiores (Ministério da Saúde, 2014). A Química Medicinal fornece as ferramentas para a descoberta de novos tratamentos para o câncer.

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a Química Medicinal envolve a invenção, a descoberta, o desenho, a identificação e a preparação de fármacos, além do estudo e da interpretação de seu modelo de ação ao nível molecular (da Silva, 2013).

O Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) visa a busca de novos fármacos inovadores para tratamento de câncer. Entre as classes pesquisadas pelo LPSF contra o câncer, encontra-se as tiazacridinas, com derivados depositados em patente (Apêndice B), que tem em sua molécula, núcleos tiazolidínicos e acridínicos, fundidos num processo de hibridização molecular.

Esta hibridização é um processo em que duas moléculas bioativas diferentes se unem para formar uma nova molécula. Esta nova substância híbrida poderá apresentar a atividade de somente uma delas ou de ambas as moléculas (Junior *et al.*, 2007).

A importância deste trabalho se dá por conta da necessidade de se encontrar novas drogas anticâncer que tenham boa eficácia, segurança e poucos efeitos colaterais, pois as existentes apresentam muitos efeitos danosos para o homem. Como as tiazolidinas-2,4-dionas (TZDs) tem sido grandemente pesquisadas devido ao seu envolvimento profundo na regulação de diversos processos fisiológicos, como a proliferação celular, a angiogênese, a inflamação, o metabolismo da glucose, bem como uma forte associação com a inibição da ativação de células T e doenças inflamatórias (Junior *et al.*, 2013).

Enquanto as acridinas tem propriedades anticancerígenas conhecidas e usadas na clínica desde os anos 70. Sendo sua atividade atribuída principalmente à planaridade destas estruturas aromáticas, que pode intercalar no interior da estrutura de cadeia dupla de DNA, interferindo assim com a maquinaria celular, tendo diversos alvos biológicos conhecidos (Belmont *et al.*, 2007). Daí o interesse de se estudar estas moléculas, que híbridas poderão ter potencializadas seus efeitos.

Assim, os resultados promissores de atividade anticâncer da série das tiazacridinas, previamente obtidos no LPSF, têm impulsionado a busca de novas moléculas análogas, como as apresentadas neste trabalho. Sendo assim, segue-se nesta linha de estudo para descobrir e desenvolver novos medicamentos para os casos de câncer que não tem métodos adequados para tratamento de modo eficiente (Barros *et al.*, 2013).

Este trabalho apresenta como objetivos centrais o planejamento, o desenho, a síntese e a otimização reacional de sete novos derivados tiazacridínicos. Em seguida, determinadas suas propriedades físicas, bem como sua caracterização estrutural e por fim realizados ensaios de seletividade e avaliados a atividade anticâncer em linhagens de células leucêmicas, de próstata e fígado.

2. *OBJETIVOS*

2.1. Objetivo Geral

Sintetizar, caracterizar estruturalmente e avaliar a atividade anticâncer de sete novos derivados tiazacridínicos.

2.2. Objetivos Específicos

- *Sintetizar sete novos derivados tiazacridínicos das séries LPSF/AA: 3-Acridina-9-ilmetil-5-tiazolidina-2,4-diona;
- *Elucidar e caracterizar os novos compostos sintetizados por métodos de análises estruturais de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa;
- *Determinar as propriedades físico-químicas dos derivados tiazacridínicos sintetizados;
- *Realizar ensaios de seletividade em células polimorfonucleares de indivíduos saudáveis;
- *Avaliar a citotoxicidade dos compostos sintetizados LPSF/AAs nas seguintes linhagens de células tumorais: Jurkat (leucemia aguda de células T); HL-60 (leucemia aguda promielocítica); DU 145 (câncer de próstata); HEPG2 (câncer de fígado); RAJI (Linfoma de Burkitt); K562 (leucemia mielóide crônica).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Câncer- Desenvolvimento celular e epidemiologia

O câncer é caracterizado por uma proliferação descontrolada de células anaplásicas que tendem a invadir tecidos vizinhos e metastizar para outros tecidos e órgãos (Zong *et al.*, 2012).

Graças às recentes descobertas de novos alvos biológicos do câncer e pela possibilidade de desenvolver novos agentes anticâncer com mais alta eficácia e seletividade, bem como menor citotoxicidade, a procura de novos agentes inovadores é de extrema importância (Raza *et al.*, 2012).

As células cancerígenas diferem das células normais em seu modo de comunicação com as vizinhas devido a aberrações em sua rede de sinalização. A maioria das vias de transdução de sinais são mediadas por proteínas quinases que regulam cada fase da função celular (Belmont *et al.*, 2007).

Os fármacos que tem como alvo o DNA, normalmente são agentes anticâncer com bons resultados na clínica. Estes causam danos ao DNA por intercalação e podem levar a uma subsequente apoptose celular, levando a um significativo aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer. Todavia, o principal inconveniente é que os agentes usados nestes alvos frequentemente encontram resistência a esta terapêutica. Nesse contexto, intensos esforços vem sendo feitos visando a descoberta de novas alternativas terapêuticas cujo alvos são o DNA e suas enzimas regulatórias (Lang *et al.*, 2013).

3.1.1. Epidemiologia

O câncer vem se tornando uma das principais causas de morte no mundo. Estimativas para 2030, diz que no mundo haverá 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes. Principalmente por conta do envelhecimento da população, redução na mortalidade infantil e aumento da exposição da população a agentes carcinogênicos (estimativas Brasil, 2014).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, diz que ocorrerão aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. Que são divididos nos seguintes casos: câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil) será o predominante, seguido então pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil), segundo estimativas do Ministério da Saúde (Estimativa 2014), (Figura 1).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos	%	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%	Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%	Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%	Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%	Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%	Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

Sobre os principais fatores de risco que podem aumentar a chance de uma pessoa desenvolver câncer de próstata são a idade, acima de 50 anos; Raça, é mais frequente em homens de descendência africana; Obesidade, entre outros (INCA, 2014).

3.1.2. Multidroga resistência (MDR)

É um tipo de resistência adquirida em células cancerígenas e microrganismos para uma variedade de drogas quimioterapêuticas que são habitualmente, estruturalmente e mecanisticamente não relacionados (Mayur *et al.*, 2009). Multidroga resistência (MDR) pode ser definido como um fenômeno pelo qual células cancerosas que foram expostas a somente um tipo de droga, desenvolvem resistência cruzada a outros tipos de drogas que são

estruturalmente e funcionalmente muito diferentes. MDR é denominado 'intrínseco' quando é resistente a quimioterapia desde o início ou 'adquirida' quando a doença se torna insensível ao tratamento após reincidência (Palmeira *et al.*, 2012).

São quatro os principais mecanismos que pode-se destacar sobre como MDR atua no organismo que são: i.) aumento na atividade das bombas de drogas (ex. ABC ou transportadores alternativos); ii.) modulação das vias de morte celular (predominantemente progressão apoptótica); iii.) alterações e reparações das moléculas droga-alvo; e iv.) a aceleração de modificações da droga por enzimas metabolizadoras, como glutathione S-transferase (GST), citocromo P450, UDP-glucuronosiltransferases e outras (Breier *et al.*, 2013). Outros mecanismos existentes são: redução da absorção de drogas devido a alterações nos receptores/carregadores de superfície, aumento da capacidade de reparo ao DNA, anormalidades cromossômicas em células cancerosas leva a superexpressão de genes anti-apoptóticos (Kapse-Mistry *et al.*, 2014).

Uma das principais causas de MDR apontadas seriam alterações nos transportadores da membrana e sua superexpressão em células cancerígenas. Estas proteínas transportadoras expõem uma ampla faixa de substratos para fora da célula e resulta em menores acumulações intracelulares de drogas anticâncer (Zhang *et al.*, 2014).

Um dos principais transportadores, são da superfamília ABC, que consiste de 48 proteínas transmembrana, que usam ATP como fonte de energia, pois atuam contra o gradiente de concentração na bicamada lipídica e que incluem a bomba chamada P-glicoproteína (P-gp), bem como proteínas irmãs tal qual a multi-droga resistente proteína 1 (MRP1) (Hedditch *et al.*, 2014). A superfamília de transportadores ABC é uma das maiores conhecidas. A vasta maioria dos seus membros são responsáveis pelo transporte de diversa gama de substratos, incluindo lipídios, aminoácidos, açúcares, sais biliares, peptídeos, esteróides, íons, drogas e outros xenobióticos (Deng *et al.*, 2014). A P-gp (subfamília B, membro 1: ABCB1, MDR1), é codificado por duas diferentes isoformas do gene (MDR1 e MDR3); a classe 1 tem sido implicada em resistência a drogas, enquanto a função da isoforma classe 3 é ainda desconhecida (Ferreira *et al.*, 2014).

P-glicoproteína é como dito, uma glicoproteína fosforilada com 170-kDa codificada pelo gene MDR1. Estruturalmente, P-gp contém 12 hélices transmembrana organizada em dois domínios de expansão de membrana (membrane spanning domains, MSDs), cada contendo seis hélices transmembrana e dois domínios de ligação a nucleotídeo (nucleotide-binding domains, NBDs) responsáveis por ligação de ATP (Zinzi *et al.*, 2014).

Assim, inibidores destes P-gps e irmãos, são ditos como um possível combate a MDR, sendo atualmente estudadas a estratégia farmacológica clássica para atingir este objetivo que envolve a coadministração de inibidores da bomba de P-gp e agentes citotóxicos (Nobili *et al.*, 2011).

3.2. Novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer

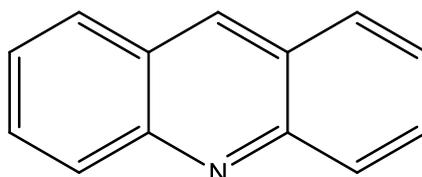
Hoje, o tratamento com drogas anticâncer é em geral dividido em quatro classes diferentes: Quimioterapia, um grande grupo de drogas citotóxicas que interferem na divisão celular e síntese de DNA; Terapia hormonal, são drogas que interferem nos sinais de crescimento através dos receptores hormonais nas células cancerosas; Terapia ao alvo ou terapia biológica, que consiste de um novo grupo de anticorpos e pequenas moléculas quinase inibitórias que atuam em proteínas alvo específicas envolvidas nas vias de sinalização de crescimento das células cancerosas; Imunoterapia, que visa a indução ou aumento das respostas imunes anticâncer. Há também outras alternativas terapêuticas para o tratamento de câncer, como transplante de medula óssea e radioterapia, que são radiações aplicadas de forma localizada que visam destruir os tumores e cirurgia é a mais antiga e usada modalidade para tratar tumores sólidos, pela remoção do tecido com uma margem de segurança adequada (INCA, 2014 ; Lesterhuis *et al.*, 2011).

Os fármacos derivados de acridinas compõem uma importante classe de agentes quimioterápicos. Estes compostos são agentes intercalantes de DNA e são ativos contra uma variedade de enfermidades como o câncer, viroses, malária e infecção bacteriana (Lang *et al.*, 2013). Neste contexto, a busca de novos derivados promissores de acridinas mostra-se essencial.

3.2.1. Derivados acridínicos

As acridinas são uma das mais importantes classes de compostos heterocíclicos contendo nitrogênio (Figura 2).

Figura 2. Acridina



Fonte: Autor, 2014.

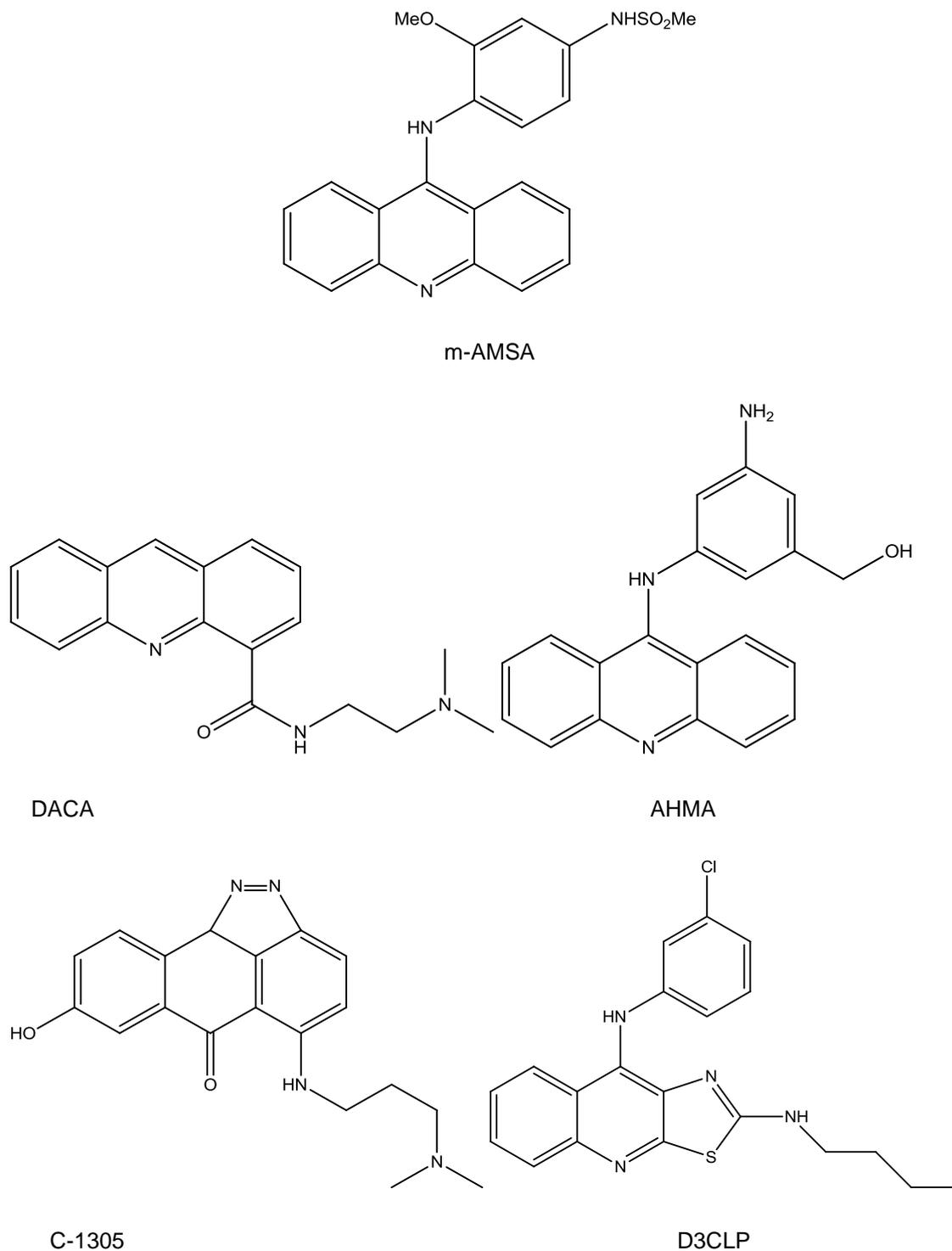
Sua síntese e aplicação tem sido amplamente estudada desde a sua primeira formulação por Carl Grabe e Heinrich Caro em 1871 (Zhang *et al.*, 2014).

Um dos primeiros métodos de síntese de acridinas, foi o de Brenthsen. O qual é feito aquecendo difenilamina e ácido carboxílico junto com cloreto de zinco à cerca de 200-270 °C de temperatura (Su *et al.*, 2013).

Entre seus derivados, a amsacrina (m-AMSA) foi o primeiro usado em tratamento clínico para vários cânceres como inibidores da topoisomerase e muita atenção tem sido dada para modificações nesta estrutura, bem como inibição dos receptores de tirosinoquinase com o objetivo de melhorar ou aumentar sua atividade e biodisponibilidade (Li *et al.*, 2011). A m-AMSA como alvo da topoisomerase, age baseado na capacidade do fármaco para induzir nas proteínas associadas quebras da cadeia de ADN em células humanas tratadas (Ketron *et al.*, 2012). Uma variedade de análogos do m-AMSA tem sido desenvolvido, tais como o AHMA, D3CLP, C-1305 (Figura 3) (Li *et al.*, 2014). O AHMA mostrou ter boa atividade antitumoral em células leucêmicas e inibição da topoisomerase II (Su *et al.*, 1995). Já o D3CLP tem atividade

citotóxica por indução de caspases em células leucêmicas (K-562) (Sanchez *et al.*, 2011).

Figura 3. Estrutura de alguns derivados acridínicos



Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2014.

Os derivados de acridina podem interagir por diversas maneiras no organismo como no DNA nuclear em uma sequência-específica e com alvos biológicos chaves na proliferação celular, como as topoisomerases I e II (topo I e II) e telomerase (Paulikova *et al.*, 2012). Tem papel importante no combate a diversas doenças como agente antiviral, antiprion, antiprotozoário, antiinflamatório, antineoplásico e analgésico. Seus derivados, atebrin e quinacrina, foram amplamente usados como tratamento para malária durante a 2º guerra mundial (Muscia *et al.*, 2013).

A atividade biológica das acridinas são atribuídas a planaridade destas estruturas aromáticas, que podem intercalar na fita dupla do DNA, portanto interferindo com funções celulares (Lafayette *et al.*, 2013). Elas são também capazes de inibir enzimas topoisomerases I e II, provocar danos ao DNA, interromper reparação ao DNA e sua replicação e induzir morte celular (Janovec *et al.*, 2011).

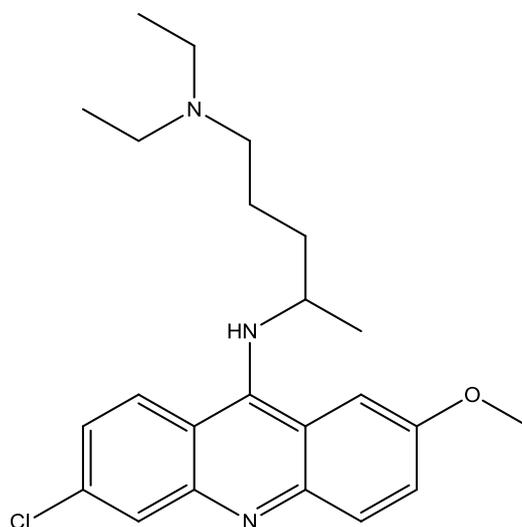
Amsacrina é a mais conhecida acridina e uma das primeiras, ela possui atividade citotóxica e ativa no tratamento de leucemias agudas e linfomas (Barros *et al.*, 2012). Vários estudos estão sendo feitos com base nelas (Li *et al.*, 2011). Entre os estudos, de longe, a maioria das modificações da m-AMSA foi focada na posição e natureza dos substituintes na porção 9-aminobenzeno e no anel acridínico. Uma variedade de derivados bis-acridínicos tem também sido desenvolvida para aumentar a afinidade de ligação ao DNA (Li *et al.*, 2014), (Azab *et al.*, 2013).

3.2.1.1. Funções biológicas dos derivados acridínicos

Derivados com função antimalárica:

A mepacrina ou quinacrina (Figura 4) foi usado como primeira linha no tratamento da malária durante a segunda Guerra Mundial, mas foi descontinuado principalmente por conta de relatada toxicidade (Joubert *et al.*, 2014).

Figura 4. Mepacrina



Fonte: Autor, 2014.

A quinacrina um derivado de 9-aminoacridina, é um fármaco anti-inflamatório utilizado para tratar a malária e artrite reumatóide, também foi identificado como um potencial agente anticâncer que inibe a NF- κ B (Jani *et al.*, 2010).

Derivados acridínicos sobre a expressão gênica:

Uma das principais causas do fato das células cancerígenas adquirirem resistência multidroga (MDR) em resposta a quimioterapia, é a indução do transportador dependente de ATP (ABC). Como exemplo a família ABC membro das glicoproteínas (Pgp; ABCB1; MDR1). A Pgp é uma proteína transmembrana que protege a célula de estresse xenobiótico, através da facilitação de extrusão de uma ampla faixa de substratos, inclusive drogas anticâncer tais como antraciclínicas, epipodofilotoxinas, *alcalóides da Vinca* e taxanos. Como consequência a indução de Pgp afeta a eficácia destes agentes pelo decréscimo intracelular nas células cancerígenas (Harmsen *et al.*, 2009).

Já a expressão do MDR1, bem como outras proteínas envolvidas em regulação da biodisponibilidade de drogas é regulada por receptores nucleares (NRs), uma família de fatores de transcrição ligante ativados (Chen, 2010).

O receptor da pregnana X (PXR) e o receptor androstano - constitutivo (CAR) são os principais receptores xenobióticos que regulam a expressão de genes envolvidos na depuração e metabolismo de drogas, incluindo aí as enzimas metabolizadoras (DMEs) e transportadores (Chen, 2010). Estes receptores tem sido especulado desempenhar um importante papel no câncer por MDR, por conta de sua elevada expressão por exemplo, nos cânceres de mama, próstata, intestino, colón e endométrio e seus papéis como principais reguladores transcricionais de um amplo espectro de genes que codificam as fases I e II das DMEs e transportadores de efluxo (Chen *et al.*, 2012).

O PXR, que pertence aos receptores nucleares hormonais (NR), está envolvida na indução e expressão dos citocromos P450 (P450s), particularmente a família CYP3A, enzimas de fase II como UDP-glucuronyltransferases (UGTs) e sulfotransferases (SULTs), proteínas multidroga resistentes (MRPs), proteína resistente a câncer de mama (BCRP) e a P-glicoproteína (P-gp, codificado por MDR1) (Niemira *et al.*, 2013).

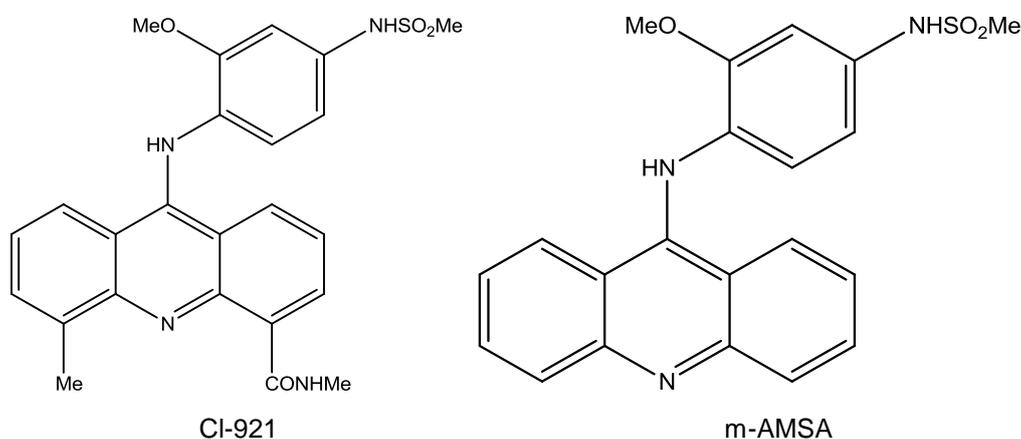
Já o receptor androstano - constitutivo (CAR), é expresso primeiramente no fígado e intestino. Seu nome vem por causa que ele forma um heterodímero com o receptor de retinóide X (RXR), que liga-se aos elementos de resposta ao ácido retinóico (RAREs) e transativa os genes alvo na ausência de ligante-estimulação (Tolson *et al.*, 2010).

Derivados acridínicos com ação antitumoral:

É provado existir uma boa correlação de força e tempo de ligação ao DNA com sua atividade biológica. Os derivados acridínicos acabam diminuindo a atividade de algumas enzimas cruciais para o DNA, como as topoisomerases, telomerases e kinases dependentes de ciclina (Cholewinski *et al.*, 2011).

Derivados de 9-Anilinoacridina tem sido extensivamente estudados como potente agente antitumoral, os quais são capazes de se ligarem ao DNA. Entre eles os derivados da amsacrina (m-AMSA), que foi a primeira 9-anilinoacridina empregada para o tratamento de leucemia e linfoma, e 4-methyl 5-methylcarboxamide (CI-921), são de particular interesse (Figura 5), (Su *et al.*, 1995). Estudos tem mostrado que derivados destas 9-Anilinoacridina, tem obtido superior atividade antileucêmica quando comparados a m-AMSA (Sedlacek *et al.*, 2012).

Figura 5. Derivados de 9-Anilinoacridina



Fonte: Adaptado de Su *et al.*, 1995.

Um típico agente intercalante do DNA são a 9-aminoacridina e seus derivados, que se ligam reversivelmente no DNA por intercalação, mas usualmente não interagem covalentemente com ele. A intercalação das acridinas é facilitada por ionização catiônica e uma suficiente planaridade molecular (Plsikova *et al.*, 2012).

Alvos biológicos das acridinas:

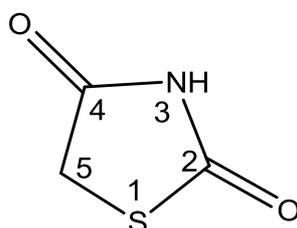
Topoisomerases são enzimas essenciais que atuam no DNA e que inicialmente induzem a clivagem do DNA, este processo é seguido pela

reorganização e reconecção de trechos danificados do DNA. Os resultados destes eventos são o relaxamento do DNA superhelicoidal, que é necessário durante a replicação ou transcrição. Tem sido mostrado que os intercaladores do DNA podem interferir significativamente com este processo fisiológico. O ligante que ocupa o local de ligação da topoisomerase pode suprir a associação das mesmas com DNA, portanto influenciando a atividade destas topoisomerases. Estes intercaladores podem inibir a atividade das topoisomerases ou formar complexos estabilizados ternários com DNA (Janovec *et al.*, 2011).

3.2.2. Tiazolidinas

As tiazolidinas (TZDs) possuem um anel heterocíclico de 5 membros contendo 3 átomos de carbono, um de nitrogênio e um de enxofre conhecido como tiazole, sendo de muito interesse em várias áreas da química medicinal (Figura 6). Já as tiazolidinas-2,4-diona tem dois grupos carbonilas nas posições 2 e 4 e seus núcleos são relatados na literatura como sendo responsáveis pela maioria das ações farmacológicas (Jain *et al.*, 2013).

Figura 6. Tiazolidina 2,4-diona

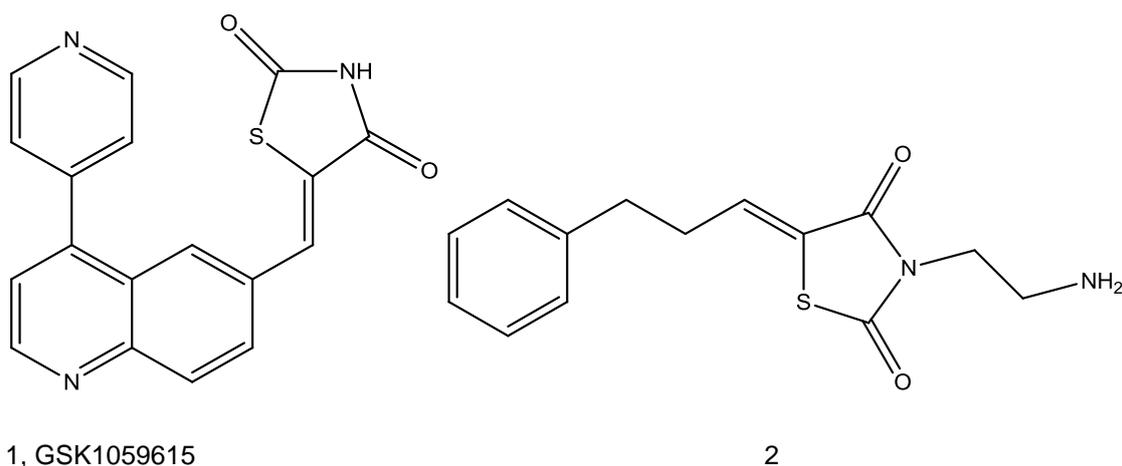


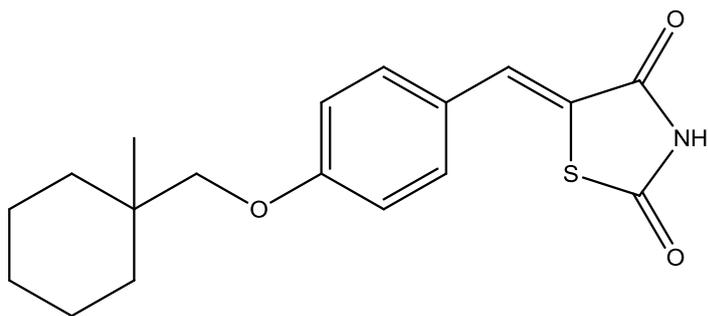
Fonte: Autor, 2014.

Pode-se dizer que as TZDs são uma nova classe de agentes anticâncer com ampla faixa de espectro de citotoxicidade contra muitos cânceres humanos. Como exemplos de potenciais novos agentes contendo TZD e 2-

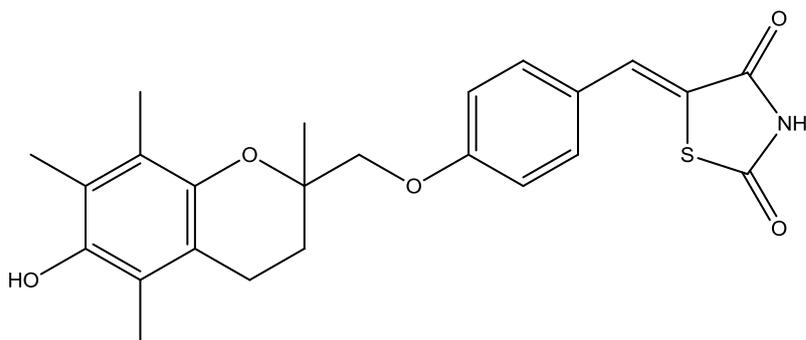
tioxo-4-tiazolidinona, temos (Figura 7) GSK1059615 (1) é um potente, ATP competitivo, inibidor da PI3K α . Os análogos da tiazolidina-2,4-diona (2) com atividade anticâncer em potencial, através da inibição das vias de sinalização Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt. Já os Δ 2CG (3) e Δ 2TG (4), são análogos benzilidenos das drogas anti-diabéticas troglitazona e ciglitazona que agem como supressores da proliferação celular das células cancerígenas, segundo os estudos feitos. Aplysinopsin (5), um derivado do indol (2-aminoimidazolidina-4-ona) é relatado como potente agente citotóxico contra linhagem de células Kb. Por fim, outro derivado projetado por Azizmohammadi *et al.* 2013, é o 2H-cromeno-derivado arylideneazolidinones (6) como novos potenciais agentes anticâncer, pois o 2H-cromeno mostrou potencial atividade anticâncer (Reddy *et al.*, 2012). Um derivado deste composto 6 apresentou boa atividade citotóxica em células alveolares epiteliais e leucêmicas. Outros derivados feitos por Azizmohammadi *et al.* 2013, também foram eficientes contra adenocarcinoma de mama. Sendo necessário para atividade citotóxica destes compostos o N do ciclopentano estar livre de radicais, exceto o H. Outro dado interessante é que testes feitos comparando a tiazolidina-2,4-diona e a rodanina esta mostrou maior atividade. E a hidantoína (2,4-Imidazolidinadiona) tendo maior atividade que as duas (Azizmohammadi *et al.*, 2013).

Figura 7. Alguns exemplos de derivados tiazolidínicos com potencial anticâncer.

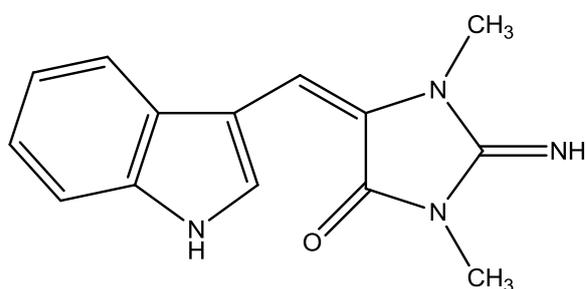




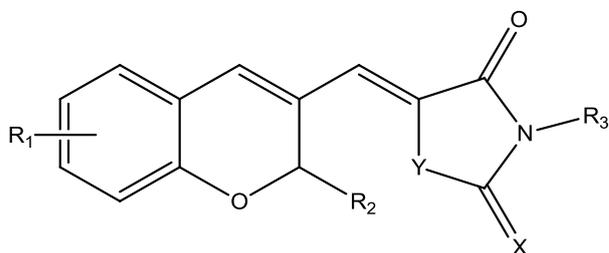
3, Δ 2CG



4, Δ 2TG



5, Aplysinopsin



6

Fonte: Adaptado de Azizmohammadi *et al.*, 2013.

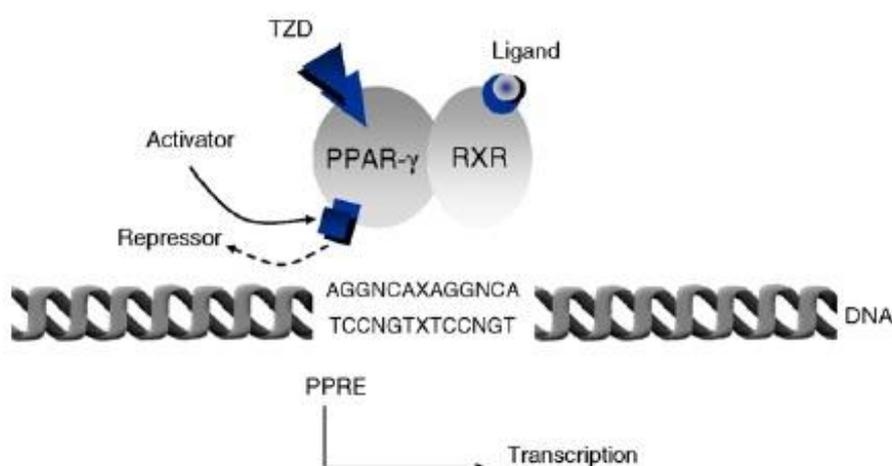
Entre outras aplicações das tiazolidinas, pode ser dito que elas tem várias aplicações na medicina como anti-hiperglicemiante, pelo aumento da

sensibilidade tecidual dos tecidos adipócitos a insulina, inibidor aldose redutase, anti-câncer, anti-microbiano, anti-artrítico, anti-inflamatório (Nazreen *et al.*, 2014).

Quanto as tiazolidinadionas, são uma classe de drogas sensibilizadoras de insulina conhecidas como glitazonas, em sua função como anti-hiperglicemiante, tem como alvo molecular o receptor nuclear chamado de proliferador gama de peroxissoma (PPAR- γ) é um receptor nuclear (NR) fortemente induzido durante adipogênese e expressada principalmente nos tecidos adiposos (Step *et al.*, 2014). Em resumo, após a ligação da TZD ao PPAR- γ , este complexo macromolecular formado de PPAR γ , TZD e receptor de ácido retinóico (RXR) é capaz de recrutar uma espécie de ativador que permite a transcrição do DNA responsável pelos elementos de resposta proliferador de peroxissomos (PPRE, Figura 8) (Elte e Blicklé, 2007).

A ativação do PPAR γ pelo seus ligantes induz apoptose por inibição da atividade do fator nuclear kappa β , o qual regula positivamente vários genes anti-apoptóticos, e suprimindo a expressão dos pró-apoptóticos (Rêgo *et al.*, 2014).

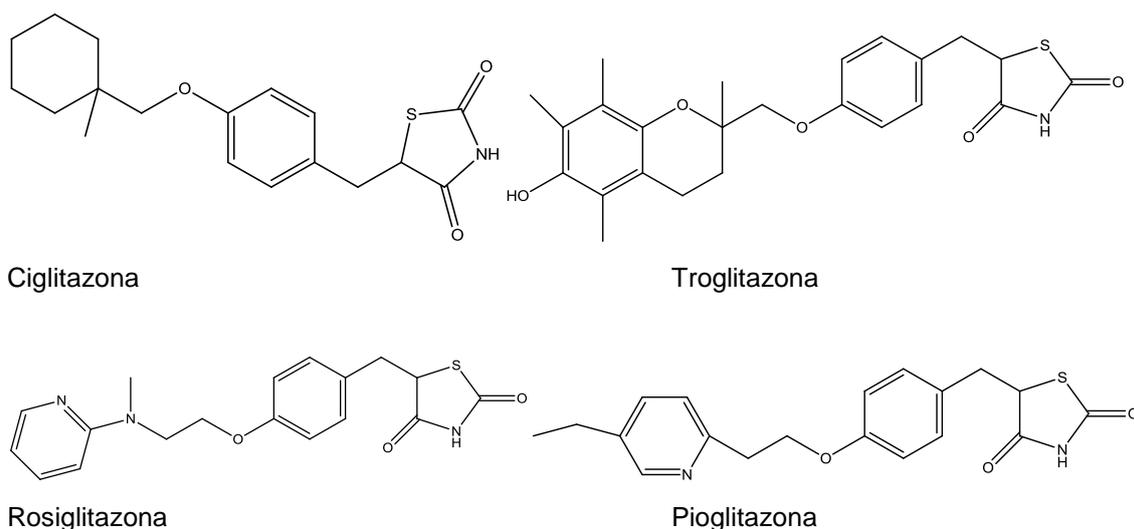
Figura 8. Mecanismo de ação das TZDs



Fonte: Elte *et al.*, 2007.

Entre estas TZDs, troglitazona foi a primeira aprovada pelo USFDA (United States Food and Drug Administration) no final dos anos 90 para o tratamento de diabetes mellitus não insulino-dependente seguido por pioglitazona e rosiglitazona (Kar *et al.*, 2014), como apresentadas na Figura 9 (Chinthala, 2013). Em que a rosiglitazona (Avandia[®]) e pioglitazona (Actos[®]) são utilizadas para o tratamento da diabetes do tipo 2, que representa de 90-95% de todos os casos de diabetes e provoca encargos econômicos e sociais significativos a nível mundial (Zhao *et al.*, 2014). Sendo estas utilizadas com algumas limitações por causa dos efeitos relacionados a ativação do PPAR- γ (Henry *et al.*, 2012). Já a troglitazona devido a riscos hepáticos foi retirada do mercado.

Figura 9. Derivados tiazolidínicos com função antiglicemínica



Fonte: Adaptado de Chinthala, 2013.

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia que surge como consequência de relativa ou absoluta deficiência de secreção de insulina ou resistência a ação delas ou a combinação de muitos fatores. A insulina é um hormônio necessário para manter os níveis normais de carboidratos, proteínas e gorduras em mamíferos (Kar *et al.*, 2014). Já a diabetes mellitus tipo 2 é uma desordem metabólica crônica que resulta de defeitos em ambas as ações e secreções de insulina (Kumar *et al.*, 2010). A

diminuição glicêmica observada com o tempo na diabetes tipo 2 é atribuída ao declínio progressivo nas funções das células β (Elte e Blicklé, 2007).

Hoje a DM é mais prevalente do que nunca, principalmente nos países em desenvolvimento. Mais do que 285 milhões de pessoas sofrem de DM e este número é esperado aumentar para 439 milhões de casos até 2030 (Wang *et al.*, 2014).

Os mecanismos pelos quais a TZD atua está ainda sendo investigada mas como já dito, claras evidências indicam que alguns destes efeitos são mediados pela ativação dos PPAR γ , membro da superfamília de receptores nucleares com seus fatores de transcrição ligante-dependentes sendo predominantemente expresso em adipócitos mas também em outras células normais ou transformadas (Galli *et al.*, 2010), como as células que compõem as lesões ateroscleróticas, tais como células endoteliais, monócitos/macrófagos e células do músculo liso vascular (VSMC) e também funções anticâncer (Johnson *et al.*, 2012). Assim, evidências indicaram que para além da sua atividade antidiabética, TZDs também exibem atividade anti-aterosclerótica, sendo sua atividade antiaterogênica sugerida através de estudos com modelos animais, bem como os ensaios clínicos envolvendo pacientes com diabetes tipo 2 (Silva *et al.*, 2013).

A ligação das TZDs ao PPAR γ leva a formação de heterodímeros com os receptores retinóides X (RXRs). Então seguido pela ligação a sequências específicas do DNA chamadas de elementos responsivos ao proliferador peroxissomo (PPREs), encontrado nos promotores dos genes PPAR γ , estimulando assim a sua transcrição (mecanismo chamado de transativação) (Cariou *et al.*, 2012). Este PPAR γ e suas isoformas, tem controlado negativamente as vias de transcrição que são críticas para a síntese de moléculas pró-inflamatórias, tais como as citocinas e as moléculas de adesão envolvidos na migração de neutrófilos para os focos inflamatórios (Santin *et al.*, 2013).

As TZDs agem também em muitos tumores humanos que incluem: mama, próstata, colón e bexiga (Liu *et al.*, 2012).

As TZDs também melhoram a vasodilatação dependente do endotélio, o que sugere que a ativação de PPAR γ aumenta a produção de Óxido nítrico (NO) e protege contra a lesão vascular (Wang *et al.*, 2006). Esta ativação também inibe 3 outros processos potenciais e críticos para a formação de lesão vascular, proliferação de células e da migração, que incluem vasodilatação periférica, diminuição da ativação simpática via melhoramento da sensibilidade à insulina, e/ou a regulação negativa do sistema renina-angiotensina (RAS) (Kelly *et al.*, 2007).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e métodos- Síntese química

4.1.1. Materiais, reagentes e solventes

Reagentes e solventes utilizados foram das marcas: Sigma/Aldich, Merck, Vetec. E os intermediários utilizados foram os seguintes: tolueno, álcool etílico, água destilada, morfolina, tiouréia, ácido monocloroacético, hidróxido de sódio, 9-bromo-metil-acridina; 4-(Trifluoromethoxy)benzaldehyde; 3-(Trifluoromethoxy)benzaldehyde; 4-(Methylthio)benzaldehyde; 2-(Trifluoromethoxy)benzaldehyde; 9-Anthracenecarboxaldehyde; 4-Formylbenzonitrile; 10-Chloro-9-anthraldehyde; 4-Bromo-2-methoxybenzaldehyde.

Para cromatografia em camada delgada foi utilizada placas Merck silicagel 60 F254 de 0,25 mm de espessura.

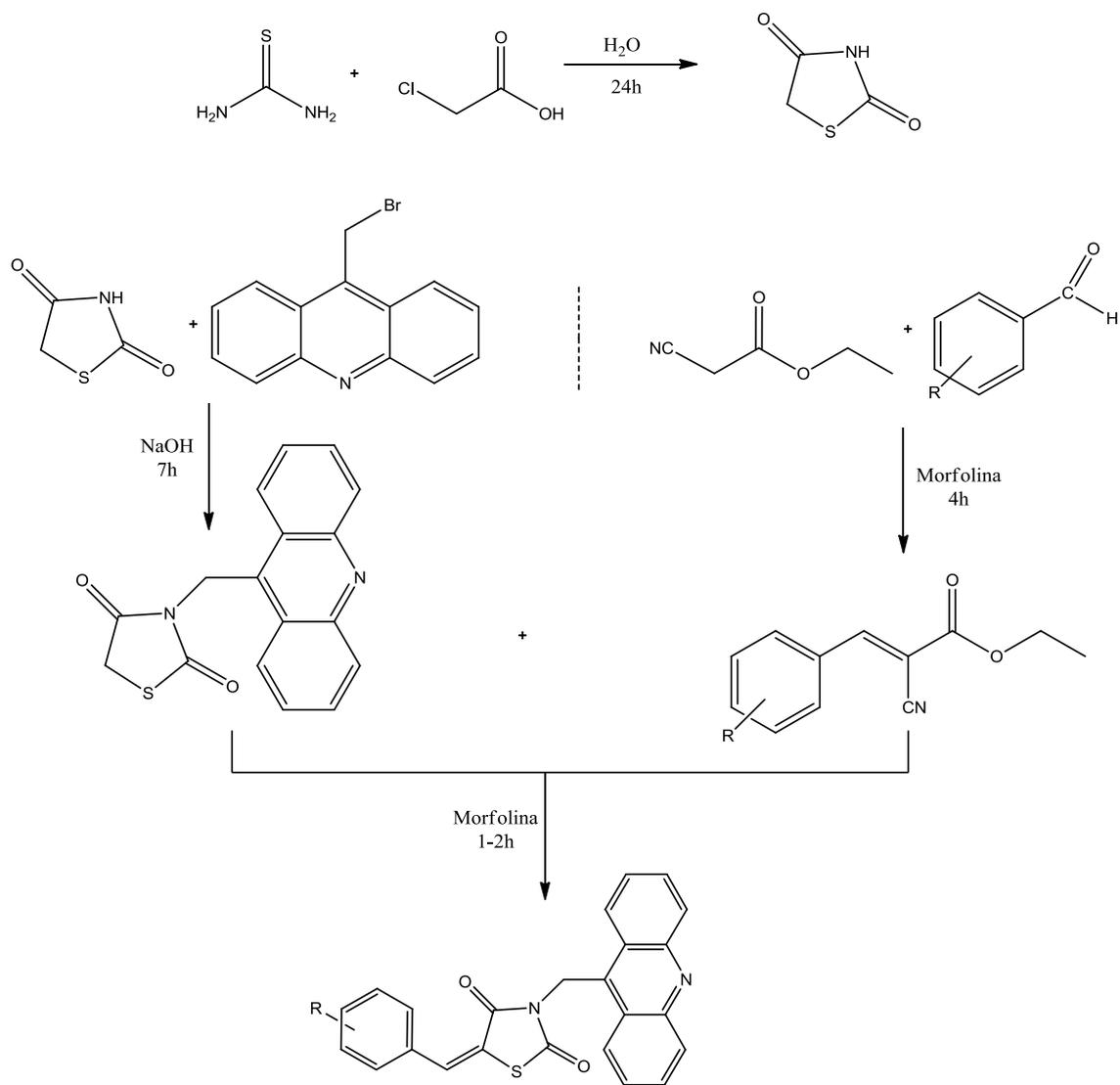
4.1.2. Equipamentos

Espectro de massa (MS): Bruker HCT Ultra, modelo G1948A; HPLC (Shimadzu corp.), modelo LC-20AD; Infravermelho (IR-Prestige-21, Shimadzu), modelo 01801; Ultravioleta (Baitton instruments, modelo Boit- LUB01); Ponto de fusão (Buchi, melting point M-565); RMN ¹H modelo Varian.

4.1.3. Síntese Química

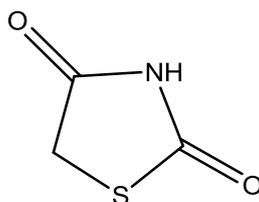
A produção dos derivados tiazacridínicos foi realizada em quatro etapas. A primeira foi a síntese da tiazolidina-2,4-diona, após isto ela foi N-alkilada na posição 3, em uma reação com a presença de 9-bromo-metilacridina, originando o intermediário 3-acridin-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/AA1A). Na terceira etapa, houve formação dos LPSF IPs (ésteres cianoacetato de etila), formados a partir de cianoacetato de etila com aldeídos aromáticos, por reação de Knoevenagel. Numa última etapa, os IPs reagiram com a AA-1A, formando os compostos finais (LPSF AAs), isto ocorreu por uma reação chamada de adição de Michael.

4.1.3.1 Rota Geral de Síntese



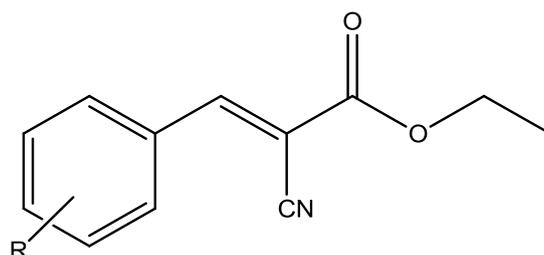
Fonte: Autor, 2015.

4.1.3.2 Síntese da Tiazolidina-2,4-diona

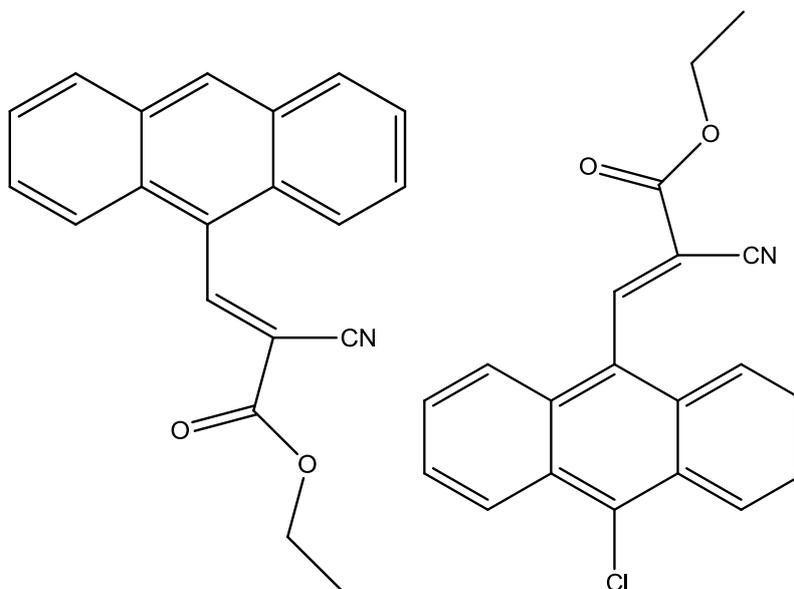


Num balão de fundo redondo com capacidade de 100 ml foi colocado a barra agitadora magnética com 5g de tiouréia (0,065mol) e 9,3g de ácido monocloroacético (1.5 molares) dissolvidos em 50 ml de água e aquecida à 90° C de temperatura por cerca de 36h em refluxo. Passados este tempo o produto foi levado para a geladeira, onde permaneceu por cerca de 48h para formação dos cristais e então filtrados.

4.1.3.3 Síntese dos LPSF/IPs (Ésteres de Cope):



IPs



IP-92

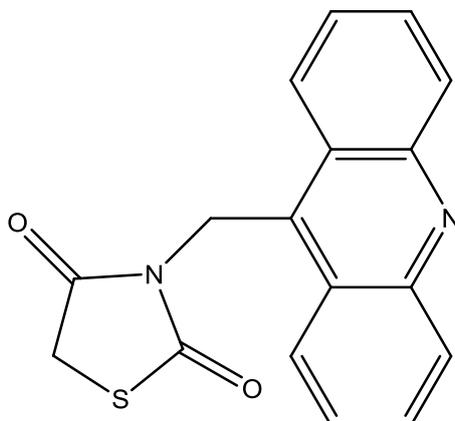
IP-94

Tabela 1. Ésteres de Cope sintetizados.

Código LPSF	Aldeído	Radical
IP-58	4-(Trifluoromethoxy)benzaldehyde	4-OCF ₃
IP- 86	3-(Trifluoromethoxy)benzaldehyde	3-OCF ₃
IP-90	4-(Methylthio)benzaldehyde	4-SCH ₃
IP-92	9-Anthracenecarboxaldehyde	9-C ₁₄ H ₉
IP-93	4-Formylbenzotrile	4-CN
IP-94	10-Chloro-9-anthraldehyde	10-Cl-9- C ₁₄ H ₉
IP-95	4-Bromo-2-methoxybenzaldehyde	4-Br, 2-OCH ₃

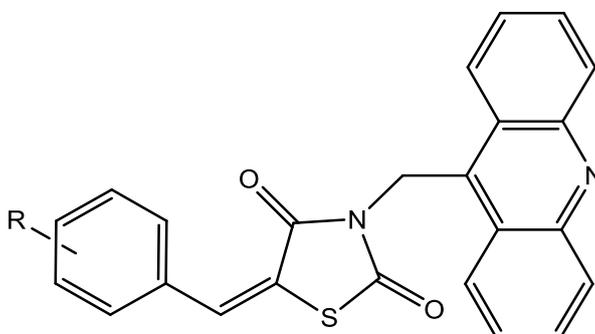
Em balões de fundo redondo (250ml) foram adicionados na seguinte ordem: tolueno e os reagentes aldeídos específicos (1Eq) para cada IP. Quando em agitação através de uma barra magnética é adicionado o cianoacetato de etila em concentrações de cerca de 1:1.2 equimolar. Por último é acrescentado gota à gota a morfolina e aquecido a cerca de 110°C de temperatura por cerca de 4 horas. Em alguns casos é necessário rotaevaporar o solvente e realizar o processo de recristalização com etanol antes da filtração.

4.1.3.4 Síntese do LPSF/AA1A (3-Acridina-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona)



Em balões de fundo redondo é adicionado a tiazolidina-2,4-diona com quantidades suficientes de etanol para sua solubilização. Em outro recipiente como um béquer, o NaOH é solubilizado com etanol, sendo necessário uma maceração prévia. Com balão já em agitação é então juntado com NaOH, e espera-se cerca de 20 minutos. Após passar este tempo é adicionado o 9-(bromo-metil)acridina neste balão. Então se aquece o balão até atingir cerca de 64°C de temperatura, com duração por volta de 7h de reação. Após resfriamento do balão com produto, o mesmo é filtrado ficando retido no papel filtro é lavado com etanol para eliminar impurezas.

4.1.3.5 Síntese dos derivados finais LPSF/AAs (Tiazacridinas):



AAs

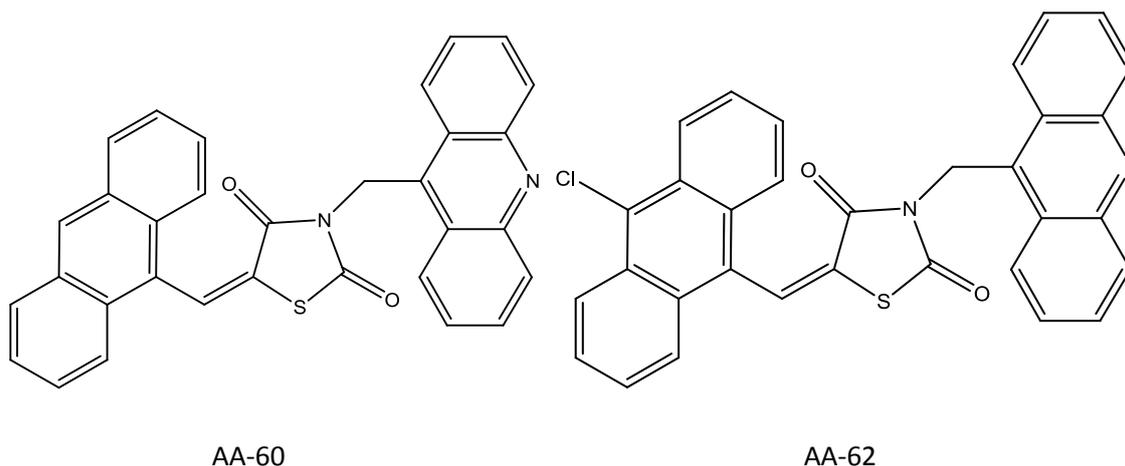


Tabela 2. Tiazacridinas sintetizadas

Código LPSF	Intermediário	Molécula
AA-56	IP-90	3-acridina-9-ilmetil-5-(4-metiltio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
AA-57	IP-86	3-(acridina-9-il-metil)-5-(3- trifluorometoxi-benzilideno)- tiazolidina-2,4-diona
AA-59	IP-58	3-acridina-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
AA-60	IP-92	3-acridina-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona
AA-61	IP-93	4-(3-acridina-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil)-benzonitrila
AA-62	IP-94	3-acridina-9-il-metil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona
AA-63	IP-95	3-acridina-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona

Em balões de fundo Redondo, coloca-se a AA-1A e acrescenta-se etanol até sua solubilização. Então quando em agitação, é adicionado o IP e se necessário maiores quantidade de etanol. Por último acrescenta-se gotas de morfolina como catalisador, aquece o sistema até atingir a temperatura de 60°C de temperatura. O tempo de reação varia entre 1h e 4h. Após o fim da reação

espera-se o produto atingir a temperatura ambiente e filtra-se o mesmo com os cristais retidos no papel filtro, sendo o líquido descartado.

4.2. Materiais e métodos- Análises biológicas

4.2.1. Inibição do crescimento celular – ensaio MTT

Os novos derivados foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e depois diluiu-se em meio de cultura para obter concentrações finais que variam de 1 a 100 μM . Para todos os experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^4 células / poço). Após 24 horas, os compostos foram adicionados a cada poço e incubou-se por 72 h. Amsacrina (Sigma-Aldrich, EUA) foi usada como um controle positivo, com ausência de composto como controle negativo e DMSO (0,1%), utilizado como veículo controle.

O crescimento das células tumorais foi quantificado pelo método com 3-(4,5-dimethyl-2-thiozoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich Co., USA). Depois de todo o tratamento, 20 μL de solução de MTT (0,5 mg / mL) foram adicionados a cada poço e incubou-se durante 3 h a 37 ° C. O formazano, o produto de redução de MTT foi dissolvido em 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e a absorbância foi medida utilizando um leitor de placa múltiplo (ELX 800, Biotek, EUA). O efeito dos compostos foi quantificado como percentagem de controle da absorbância do corante reduzido no grupo tratado com DMSO a 0,1% a 570 nm.

4.2.2. Ensaio de seletividade

O sangue heparinizado foi diluído em igual volume de tampão fosfato salino (PBS) de voluntários saudáveis, doadores não fumantes que não tinham tomado qualquer droga por pelo menos 15 dias antes da coleta da amostra (n = 15). As Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) foram isoladas por um método padrão de centrifugação por densidade sobre Ficoll-Paque Plus (1,077 g / mL, GE, Suécia) e em seguida a contagem de células foi realizada

com 0,4% (w / v) de azul de tripan (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade era > 98%. Todos os doadores assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa humana da UFPE (CEP / CCS / UFPE- 11006). As células foram colocadas em placas de 96 poços (10^6 células / poço). Após 24 h, os compostos (1 a 100 μ M) foram incubados durante 2 dias (48h), depois disto, os procedimentos foram realizados conforme o item 4.2.1.

4.2.3. Análise dos dados

O percentual da morte celular foi determinado de maneira relativa ao controle negativo e os dados foram analisados a partir da média de 3 experimentos. A determinação do IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi calculada pelo software estatístico Origin 8 apenas para os compostos que apresentaram capacidade de inibição.

5. *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

5.1. Caracterização estrutural e propriedades físico-químicas dos derivados tiazacridínicos sintetizados

As estruturas dos compostos sintetizados foram comprovados pelas técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), espectrofotometria de absorção no IV e espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (Apêndice A).

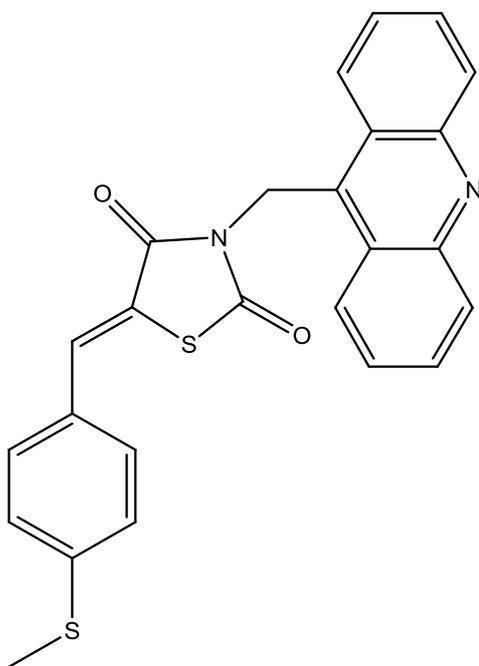
- Espectrometria de RMN ^1H : Utiliza-se o solvente DMSO para análise das tiazacridínicas. Com os principais picos de absorção encontrados sendo de alcanos, alcenos e anéis aromáticos.

Os picos dos sinais do espectro foram designados de s - singlete, quando é visualizado 1 pico para o(s) hidrogênio(s) de cada carbono da molécula analisada; d - dubleto, quando é visualizado 2 picos para o(s) hidrogênio(s) de cada carbono da molécula analisada; t - tripleto, quando é visualizado 3 picos para o(s) hidrogênio(s) de cada carbono da molécula analisada; m - multiplete, quando é visualizado vários picos para o(s) hidrogênio(s) de cada carbono da molécula analisada. Na faixa de 5,9 ppm de deslocamento, os produtos finais AAs é visto singlete do grupo CH_2 ligado ao átomo de nitrogênio da tiazolidina.

Para comprovar que a reação ocorreu, observa-se que no espectro do intermediário LPSF AA-1A aparece um singlete na faixa de 4,2 ppm representando 2 hidrogênios da posição 5 do anel da tiazolidina. Em que o mesmo não apareceu em nenhum dos espectros dos compostos finais, significando que a adição de Michael, a última etapa reacional ocorreu.

- Espectrofotometria de absorção no Infravermelho: As bandas observadas principais dos LPSF AAs foram de $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{N}$ e $\text{C}=\text{O}$. Sendo a absorção da $\text{C}=\text{C}$ encontrada na faixa de 1640 a 1680 cm^{-1} da região. A carbonila ($\text{C}=\text{O}$) é vista entre 1850 a 1540 cm^{-1} . Já o grupamento $\text{C}-\text{N}$ dos heteroaromáticos são vistos na região de 1600 a 1300 cm^{-1} . E na região de 900 a 650 cm^{-1} são vistas as deformações angulares de $\text{C}-\text{H}$ dos compostos aromáticos.

**5.1.1. 3-acridina-9-ilmetil-5-(4-metiltio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF AA-56)**



FM= C₂₅H₁₈N₂O₂S₂

PM= 442.08

PF= 247 °C

RF= 0.32 (n-hexano/acetato, 7:3)

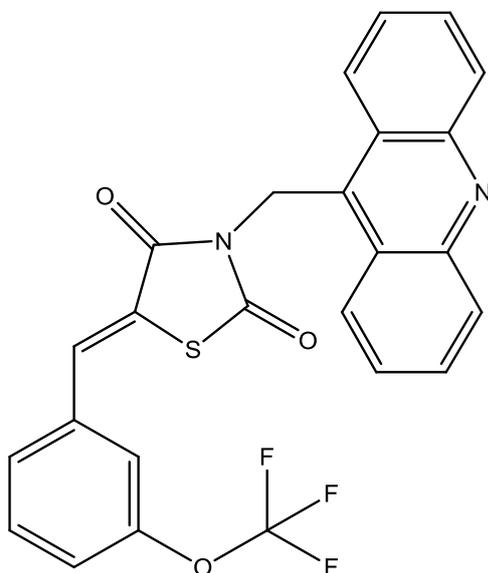
Cor= amarelo-claro

Rendimento= 57%

RMN¹H (400 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,46 (d, 2H, J= 8,8 Hz, -AcrH) (b), 8,18 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (a), 7,89 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (t, 2H, J=15,2 Hz, j= 8,4 Hz, AcrH) (d), 7,68 (t, 2H, J=15,2 Hz, j=7,6 Hz, AcrH) (c), 7,51 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH) (g), 7,37 (d, 2H, J=8,8 Hz, ArH) (i), 5,92 (s, 2H, -CH₂) (e), 1,23 (s, 3H, -CH₃) (h).

5.1.2. 3-(acridina-9-il-metil)-5-(3-trifluorometoxi)benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-57)



FM= C₂₅H₁₅F₃N₂O₃S

PM= 480.08

PF= 195.8 °C

RF= 0.45 (n-hexano/acetato, 7:3)

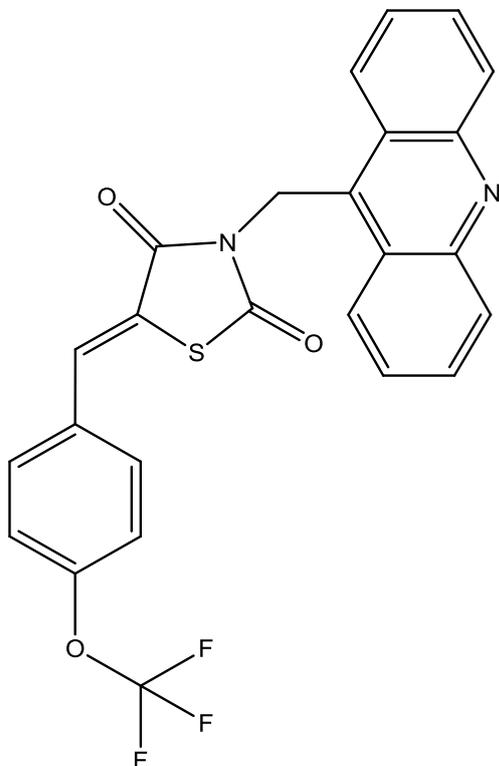
Cor= branca

Rendimento = 61.21 %

RMN¹H (400 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,45 (d, 2H, J=9,2 Hz, -AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=8,4 Hz, AcrH) (a), 7,97 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (m, 2H, J=15,2 Hz, j= 5,6 Hz, AcrH) (d), 7,66 (mm, 5H, J=56 Hz, j= 6 Hz, ArH e AcrH) (h,c,j,g), 7,48 (d, 1H, J=8,4 Hz, ArH) (i), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e).

5.1.3. 3-acridina-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59)



FM= C₂₅H₁₅F₃N₂O₃S

PM=480.07

PF= 236.6 °C

RF= 0.48 (n-hexano/acetato, 7:3)

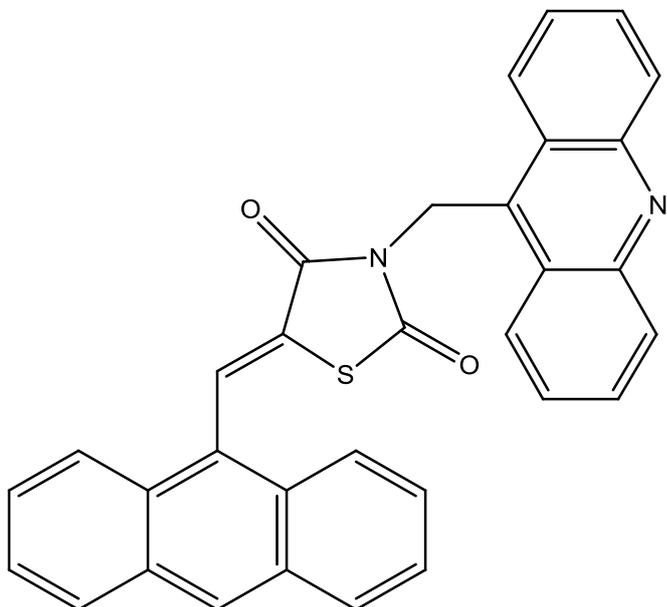
Cor= amarelo-claro

Rendimento= 73.5 %

RMN¹H (400 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,46 (d, 2H, J=8,8 Hz, -AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=8,4 Hz, AcrH) (a), 7,97 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (t, 2H, J=15,2 Hz, j= 8 Hz, AcrH) (d), 7,72 (d, 2H, J=8,8 Hz, ArH) (g), 7,68 (d, 2H, J=8 Hz, AcrH) (c), 7,51 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH) (i), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e).

**5.1.4. 3-acridin-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona
(LPSF AA-60)**



FM= C₃₂H₂₀N₂O₂S

PM= 496.12

PF= 226.4 °C

RF= 0.39 (n-hexano/acetato, 7:3)

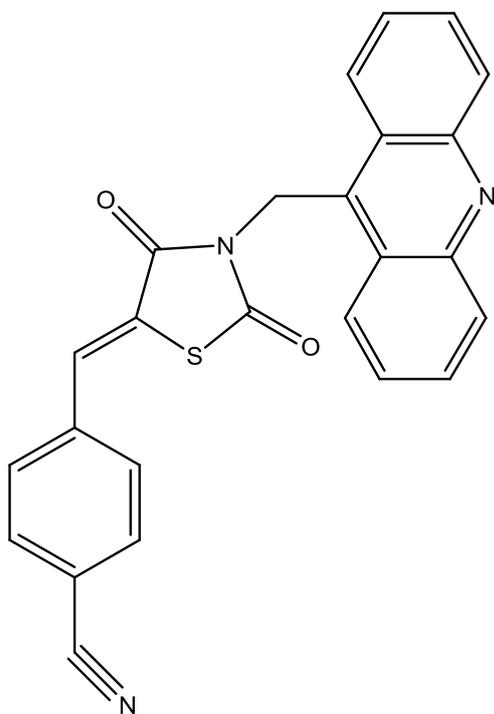
Cor= amarela

Rendimento= 40%

RMN¹H (400 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,34 (s, 1H, ArH) (k), 8,82 (s, 1H, =CH) (f), 8,75 (d, 2H, J = 5,6 Hz, ArH) (j), 8,56 (d, 2H, J=8,8 Hz, -AcrH) (b), 8,21 (t, 3H, J = 13,6 Hz, j = 8,4 Hz, ArH) (g), 8,16 (t, 3H, J=9,6 Hz, j = 6,8 Hz, AcrH) (a), 8,03 (d, 2H, J = 8,4Hz, ArH) (i), 7,96 (t, 2H, J = 9,6 Hz, j = 6 Hz, ArH) (h), 7,89 (t, 2H, J=15,6 Hz, j= 7,2 Hz, AcrH) (d), 7,74 (t, 2H, J=15,2 Hz, j = 7,2 Hz, AcrH) (c), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e).

5.1.5. 4-(3-acridina-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil) benzonitrila (LPSF AA-61)



FM= C₂₅H₁₅N₃O₂S

PM= 421.08

PF= 255.9°C

RF= 0.36 (n-hexano/acetato, 7:3)

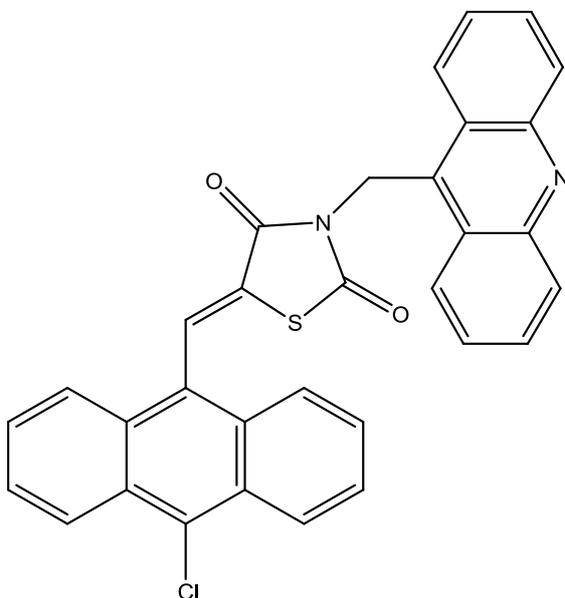
Cor= amarelo-claro

Rendimento= 77.75 %

RMN¹H (400 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,45 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (a), 7,99 (s, 1H, =CH) (f), 7,96 (d, 2H, J = 8Hz, ArH) (i), 7,86 (t, 2H, J=15,2 Hz, j = 8,4 Hz, AcrH) (d), 7,74 (d, 2H, J=8 Hz, ArH) (g), 7,69 (t, 2H, J=15,6 Hz, j = 8 Hz, AcrH) (c), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e).

5.1.6. 3-acridina-9-il-metil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62)



FM= C₃₂H₁₉ClN₂O₂S

PM= 530.08

PF= 173.6 °C

RF= 0,41 (n-hexano/acetato, 7:3)

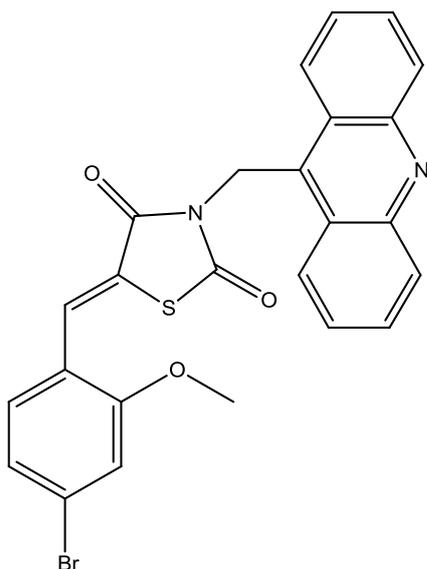
Cor= amarelo

Rendimento= 58.47 %

RMN¹H (400 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,31 (s, 1H, =CH) (f), 8,53 (m, 2H, J=30,8 Hz, j=9,2 Hz, AcrH) (b), 8,21 (d, 2H, J = 8,8 Hz, ArH) (i), 8,11 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (a), 8,05 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH) (j), 7,89 (t, 2H, J=15,2 Hz, j= 7,2 Hz, AcrH) (d), 7,8 (dd, 2H, J=20 Hz, j = 6,4 Hz, AcrH) (c), 7,73 (t, 2H, J=15,2 Hz, j=8 Hz, ArH) (g), 7,66 (t, 2H, J=15,6 Hz, j=8 Hz, ArH) (h), 5,95 (s, 2H, -CH₂) (e).

5.1.7. 3-acridina-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63)



FM= C₂₅H₁₇BrN₂O₃S

PM= 504.01

PF= 239.5 °C

RF= 0.47 (n-hexano/acetato, 7:3)

Cor= amarelo-claro

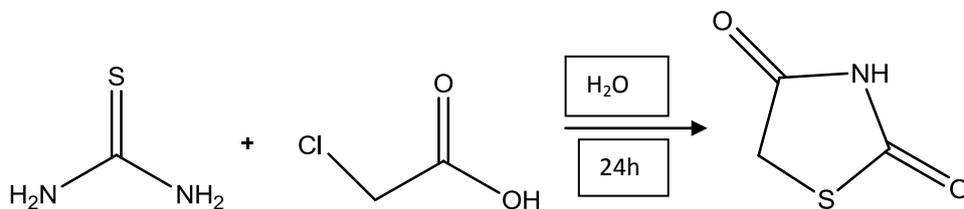
Rendimento= 64.86 %

RMN¹H (300 MHz, δ ppm, DMSO-d₆)

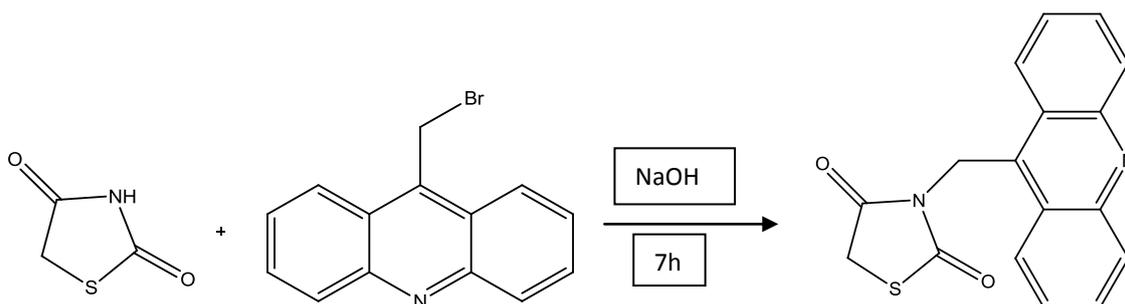
RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8,45 (d, 2H, J=9 Hz, AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=9 Hz, AcrH) (a), 7,95 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (dd, 2H, J = 15,3 Hz, j=6,6 Hz, ArH) (d), 7,69 (m, 2H, J=16,5 Hz, j= 6,3 Hz, AcrH) (c), 7,31 (m, 3H, J=32,1 Hz, j=8,1 Hz, ArH) (i,g,h), 5,91 (s, 2H, -CH₂) (e), 3,89 (s, 3H, O-CH₃).

5.2. Rotas de síntese

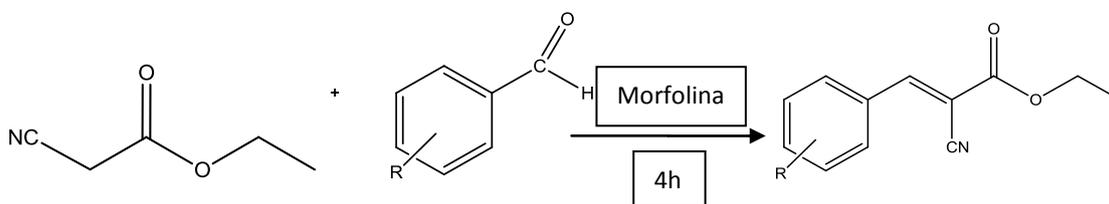
1ª Etapa: O ácido monocloroacético reage com tiouréia por ciclização formando a tiazolidina-2,4-diona



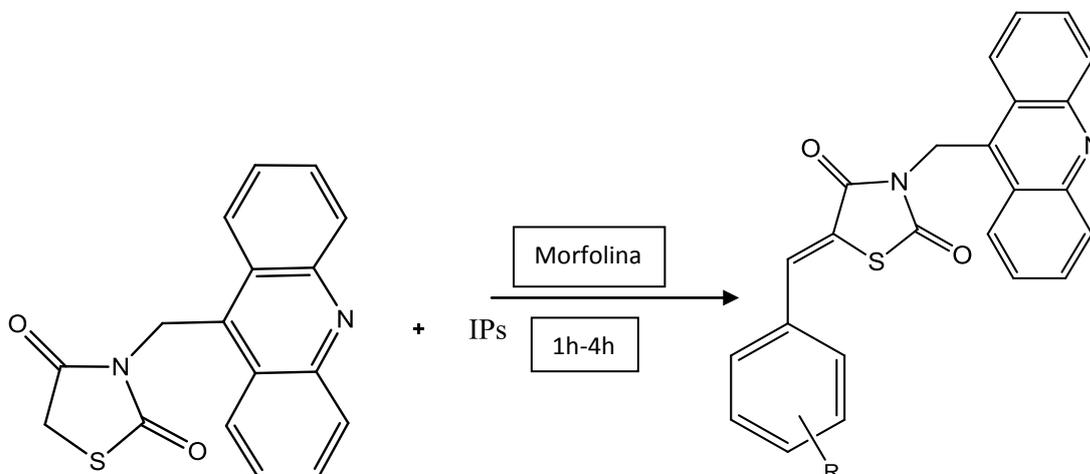
2ª Etapa: Tiazolidina-2,4-diona reage com 9-bromo-metil-acridina por N-alquilação formando a 3-Acridina-9-il-metil-tiazolidina-2,4-diona (AA-1A).



3ª Etapa: O éter cianoacetato de etila reage com os aldeídos por condensação de Knoevenagel formando os intermediários (IPs).



4ª Etapa: Os IPs reagem com a AA1A por adição de Michael formando os compostos finais AAs.

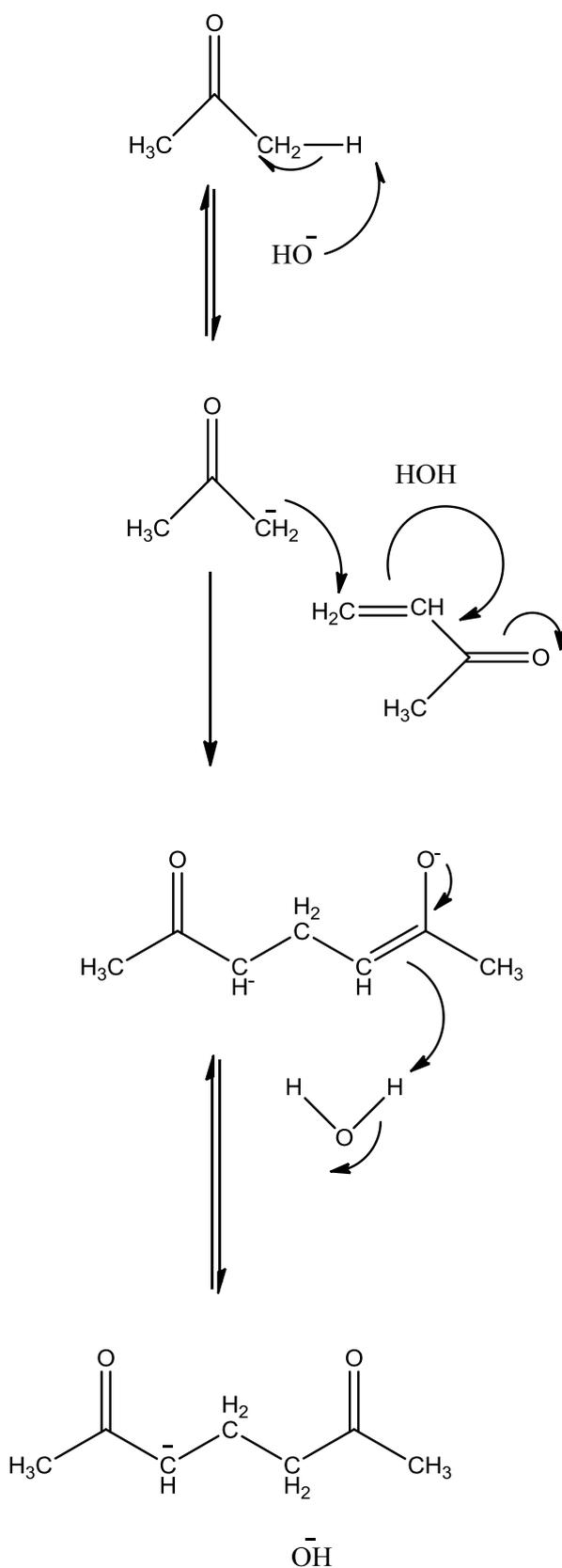


5.3. Mecanismos reacionais

5.3.1. Reações de adição de Michael

Efetivamente desenvolvida por Michael em 1887, em que ele adicionou malonatos a enonas catalisado por bases em solventes próticos e por regenerar a base no meio reacional, apenas quantidades catalíticas são necessárias (Mattos *et al.*, 1999). Uma das melhores ferramentas de ligação carbono-carbono. E suas melhores enantioseletividades do nucleófilo são alcançadas pelo uso de catalisadores orgânicos, como exemplos: derivados da prolina e pirrolidina, alcalóides de chinchona e tiouréia-amina (Gu *et al.*, 2007).

Figura 10. Adição de Michael.



Etapa 1: Uma reação ácido-base. Funções hidróxido como uma base e remoção do ácido α -hidrogênio dando o enolato reativo.

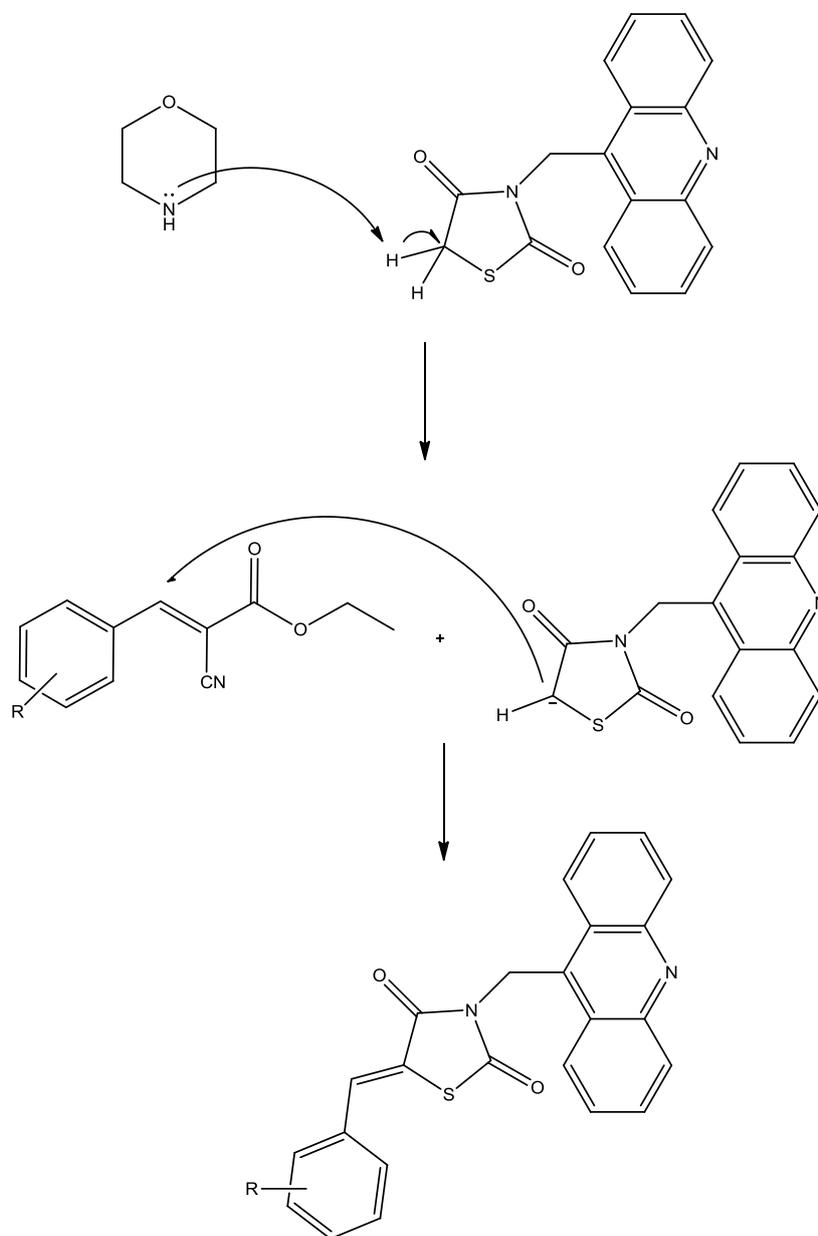
Etapa 2: O enolato nucleofílico ataca a cetona conjugada no alceno eletrofílico C, num processo de tipo adição nucleofílica com os elétrons sendo empurrados através do oxigênio eletronegativo, dando um intermediário enolato.

Etapa 3: Uma reação ácido-base. O enolato desprotona uma molécula de água e recria hidróxido e grupo carbonila mais favorável.

Na figura 11 é visto o mecanismo reacional hipotético desta reação de adição de Michael para obtenção dos derivados tiazolidínicos com a utilização da morfolina como catalisador.

A tiazolidina-2,4-diona comporta-se como ânion, facilitada pela presença dos grupamentos carbonílicos nas posições 2 e 4. Assim este carbânion na posição 5 da tiazolidina-2,4-diona N-alkilada ataca o carbono α do éster cianocinâmico da reação de Michael, formando os novos derivados tiazacridínicos substituídos.

Figura 11. Mecanismo de reação hipotético para obtenção dos derivados tiazacridínicos

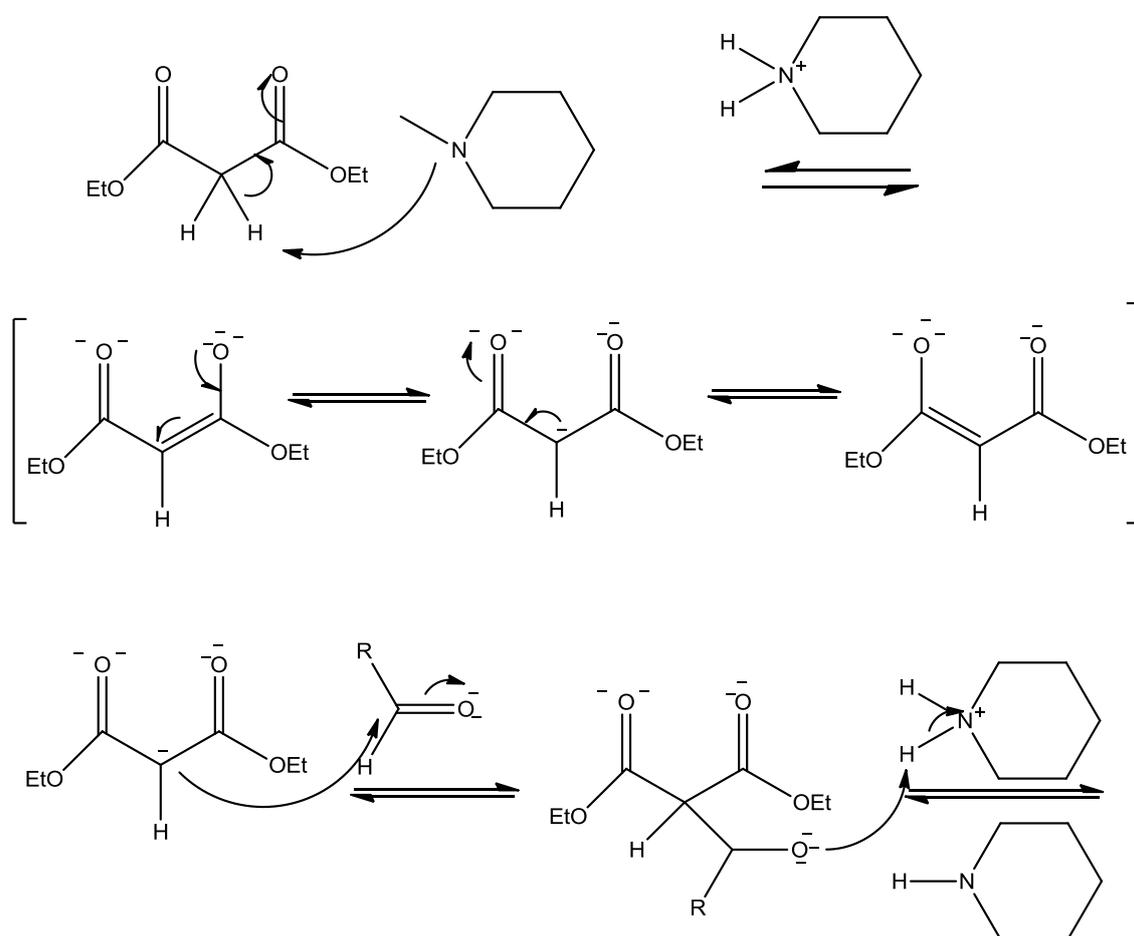


Fonte: Autor, 2014.

5.3.2. Reações de condensação de Knoevenagel

Caracteriza-se por ser uma reação de adição nucleofílica de um composto de hidrogênio ativo (grupo metileno) a um grupo carbonila, seguida por uma reação de desidratação em que uma molécula de água é eliminada. O produto é em geral um conjugado alfa, beta enona. Bem como formação de aduto com uma ligação dupla carbono-carbono (Cunha *et al.*, 2012).

Figura 12. Esquema teórico para formação dos IPs.

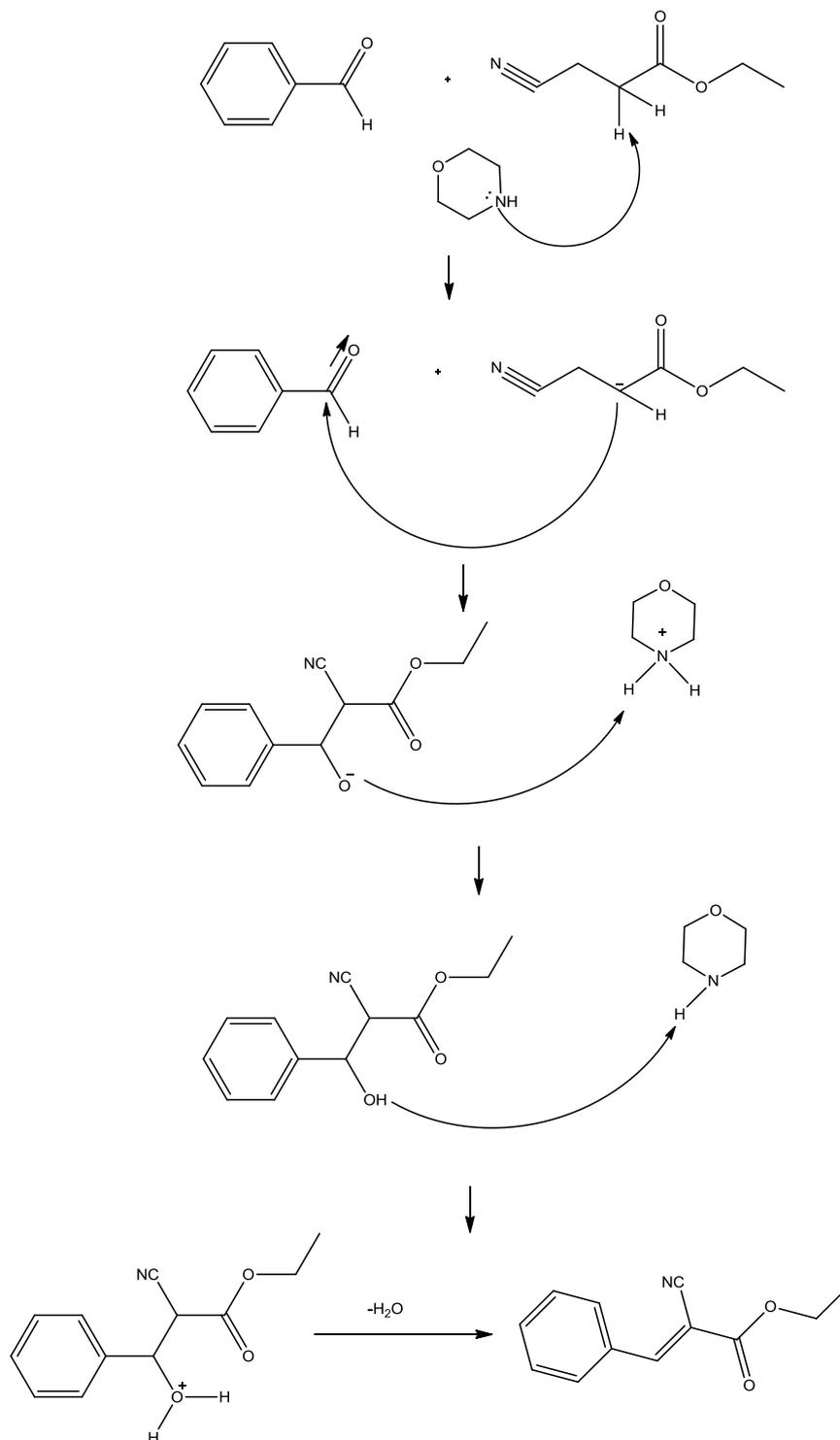


Fonte: Adaptado de Organic Chemistry Portal, 2014.

Numa primeira etapa ocorre que um intermediário enol é formado inicialmente. Em seguida este enol reage com o aldeído e o aldol resultante é submetido subsequentemente eliminação induzida pela base.

Os ésteres de cope (IPs) obtidos foram por esta condensação de Knoevenagel, entre os aldeídos aromáticos substituídos e cianoacetato de etila em presença da base morfolina (Figura 13).

Figura 13. Mecanismo de reação hipotético para obtenção dos intermediários LPSF IPs

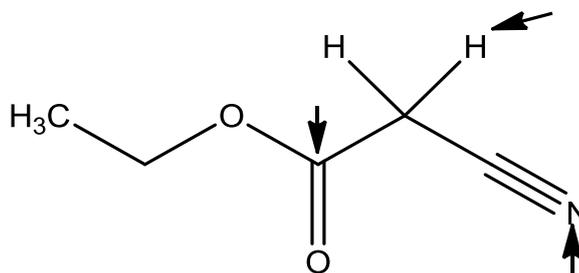


Fonte: Autor, 2014.

5.3.3. Cianacetato de etila

O cianoacetato de etila é encontrado na forma líquida e incolor, lacrimogêneo e irritante para o organismo. Possui fórmula molecular de $C_5H_7NO_2$, peso molecular de 113,11, ponto de fusão de $-22\text{ }^\circ\text{C}$ e ebulição de $206\text{ }^\circ\text{C}$, e densidade de 1.06 g/cm^3 . Pode ser solubilizado em etanol e soluções básicas (Hoelz, 2011) (Figura 14).

Figura 14. Cianacetato de etila e seus três centros reativos



Fonte: Adaptado de Hoelz, 2011.

O cianoacetato de etila possui 3 centros reativos: Grupo nitrila, carbonila da função éster e os átomos de hidrogênio do carbono vizinho a carbonila. Também, deve-se manusear com cuidado, pois ela é um agente irritante quando em contato com mucosas e os olhos. O perigo é que quando decompostos em geral por aquecimento, emite vapores de cianeto de hidrogênio bastante tóxicos (Zhu *et al.*, 2014).

5.3.4. Processo de purificação

Recristalização: Método de purificação de compostos orgânicos sólidos. Deve-se dissolver a quente, em um solvente ideal, que tenha boa solubilidade em temperaturas mais elevadas. Para uma boa purificação o produto deve esfriar lentamente.

5.4. Discussão sobre as sínteses realizadas

As reações das tiazolidinas são simples de se fazer além de ser econômica e limpa, pois não usa solvente e sim água. Ela tem também bons rendimentos entre 65-80%, mas por outro lado é um pouco demorada. Novos aldeídos foram escolhidos para fazer o intermediário da reação, os IPs, estas feitas em temperatura mais elevadas, cerca de 110 °C para poder facilitar a reação, através de maior choque entre as moléculas. Exceto o IP-86 que teve que utilizar um acessório, Dean-Stark, para diminuir a umidade com a remoção de água de dentro do balão (Choudhary *et al.*, 2002). Todos eles com rendimentos satisfatórios entre 55-75%.

Com relação ao outro intermediário AA-1A, teve bons rendimentos variando de 52-75%, mas deve-se tomar cuidado com a temperatura para não se elevar muito com risco de degradação, bem como a luz solar pode prejudicar a formação do produto final desejado (Doll e Frimmel, 2003). Já os compostos finais AAs também deve-se tomar os mesmos cuidados que a AA-1A, e a maioria teve bons rendimentos entre 57-77%, exceto a AA-60 cerca de 40%, isto por conta de o mesmo ter um radical volumoso (antraceno), o que dificulta a reação por impedimento estérico (Errede *et al.*, 1977).

5.5. Atividade anticâncer

Um bom medicamento contra o câncer é aquele que não cause danos no organismo do indivíduo, ou seja, tóxico para as células cancerígenas mas não prejudicial as células normais. Daí a necessidade de ensaios iniciais de citotoxicidade (Burger e Fiebig, 2014). Os ensaios de citotoxicidade dos derivados tiazacridínicos foram realizados *in vitro* no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) da Universidade Federal de Pernambuco e conduzido pelo Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto De Melo Rêgo.

Os compostos foram diluídos em DMSO e testados nas linhagens tumorais a seguir: Jurkat (leucemia aguda de células T); HL-60 (leucemia aguda promielocítica); DU 145 (câncer de próstata); HEPG2 (câncer de fígado); RAJI (Linfoma de Burkitt); K562 (leucemia mielóide crônica) e células normais PBMC (voluntários sadios). As AAs foram testadas nas concentrações de 1, 10 e 100 μM . Os resultados do teste de citotoxicidade e seletividade são vistos na tabela 3.

Tabela 3. Valores de IC_{50} (concentração inibitória de 50%) realizado pelo método do MTT para as células Jurkat, HL-60, DU 145, HEPG2, RAJI e PBMC, obtidos por regressão não-linear através do programa Origin 8

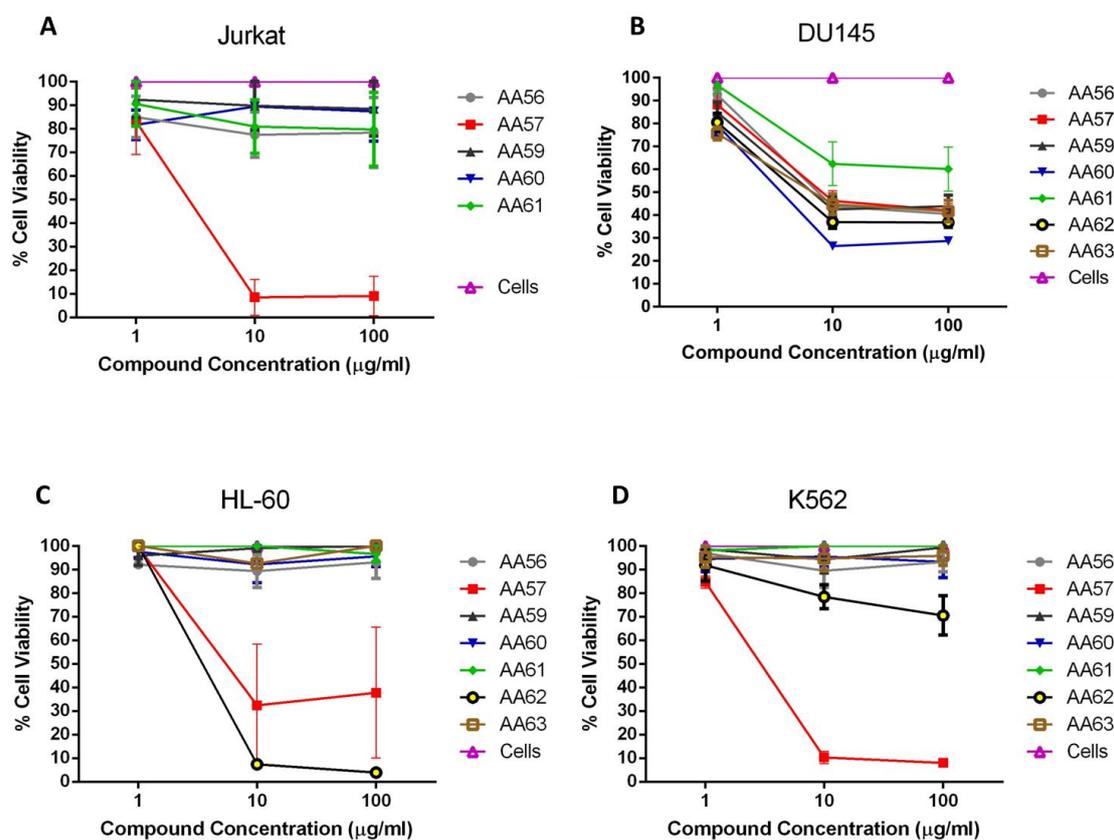
IC_{50} (μM)							
Compostos	Linhagens						
	Jurkat	HL-60	DU 145	HEPG2	RAJI	K562	PBMC
AA-56	>100	>100	19,64 \pm 5,39	>100	>100	>100	>100
AA-57	6,63 \pm 2,65	6,51*	20,80 \pm 9,42	>100	>100	3,97 \pm 1,36	>100
AA-59	>100	>100	13,90 \pm 4,10	>100	>100	>100	>100
AA-60	>100	>100	7,22 \pm 3,12	>100	>100	>100	>100
AA-61	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
AA-62	--	7,90*	12,52 \pm 1,08	>100	>100	>100	>100
AA-63	--	>100	21,57 \pm 7,93	>100	>100	>100	>100

*Apenas 1 experimento -- Citotoxicidade não foi avaliada ^a Os dados são apresentados como valores IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a partir de três experimentos independentes e medida pelo ensaio de MTT depois de 72 horas de incubação. ^b Amsacrina utilizada como controle positivo.

Todos os compostos apresentaram seletividade frente as células de indivíduos normais, com viabilidade superior a 100%.

De todos os compostos testados, o derivado tiazacridínico LPSF AA-57 apresentou melhor atividade anticâncer na maioria das linhagens tumorais testadas. Os valores capazes de inibir 50% do crescimento celular foram promissores, especialmente nas células de leucemias Jurkat ($6,63 \pm 2,65 \mu\text{M/ml}$) e K562 ($3,97 \pm 1,36$) (Figura 15A e 15D). Seis das sete moléculas mostraram potencial citotóxico de IC_{50} para a linhagem celular DU 145 (próstata), com destaque para AA-60 ($7,22 \pm 3,12$) (Figura 15B).

Figura 15. Atividade citotóxica dos novos derivados Tiazacridínicos em linhagens celulares de câncer. Os compostos Tiazacridínicos foram testados em concentrações de 1, 10 e 100 μM durante 72 horas, por ensaio de MTT. Cells representam aqueles que não foram tratados com as Tiazacridinas. (A) Viabilidade celular das células de Jurkat. (B) Viabilidade celular de células DU145. (C) Viabilidade celular de células HL-60. (D) Viabilidade celular das células K562.



O composto AA-61 não apresentou atividade anticâncer nas linhagens avaliadas (Tabela 3).

5.6. Discussão da atividade biológica

O LPSF AA-57, com radical 3-trifluormetoxi-benzilideno na posição *meta*, apresentou melhor atividade contra as diversas linhagens testadas, tais como Jurkat (leucemia aguda de células T), HL-60 (leucemia aguda promielocítica) e K562 (leucemia mielóide crônica). Esta AA-57 possui 3 moléculas de flúor, com uma diferença para o LPSF AA-59 que tem o mesmo radical, o 4-trifluorometoxi-benzilideno, só que na posição *para*. Assim, a importância maior está na conformação estrutural deste composto, pois é a única diferença entre os dois e a principal diferença para o composto de Barros *et al.* (2012) que também não apresentou atividade contra linhagem DU 145 (Barros *et al.*, 2012). A molécula de Barros *et al.* (2012) feita no LPSF é um derivado tiazacridínico, o número 12, com a presença de 1 flúor, mas com diferenças na sua conformação estrutural, em que sua acridina está na posição 5 e o radical na posição 3 da Tiazolidina-2,4-diona, ou seja, o contrário das moléculas aqui sintetizadas.

Destaca-se a LPSF AA-61 que não apresentou atividades nas linhagens testadas, sendo a diferença que ela possui um radical benzonitrila que provavelmente interferiu negativamente com a atividade citotóxica do composto. Por fim, a molécula LPSF AA-60 de radical antraceno que apresentou maior potencial contra a linhagem celular DU 145 (próstata). Entre outros trabalhos do grupo que também avaliaram derivados tiazacridínicos, como por exemplo um composto com dois núcleos acridínicos apresentou bom resultado (Pitta *et al.*, 2013). Assim estes promissores resultados estimulam e justificam a dissertação e a busca de novos derivados tiazacridínicos mais eficazes, seguros e confiáveis.

6. *CONCLUSÕES*

Neste trabalho foi realizada a síntese de sete novos compostos tiazacridínicos da série 3-(acridin-9-ilmetil)tiazolidina-2,4-diona, com o foco em se conseguir fármacos mais eficientes e com menos efeitos colaterais com relação as drogas existentes. As metodologias de síntese mostraram-se eficazes, pois os produtos apresentaram pureza e rendimentos satisfatórios, a maioria deles apresentaram rendimentos superior a 55%. Todas as estruturas foram confirmadas pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, Infravermelho e espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência.

Com estes compostos também foram realizados ensaios de seletividade em células polimorfonucleares de indivíduos saudáveis, sem toxicidade para elas. E ensaios de atividade biológica citotóxica *in vitro* com o derivado tiazacridínico LPSF AA-57 com o radical 3-trifluormetoxi-benzilideno apresentando melhor atividade anticâncer na maioria das linhagens tumorais testadas, sendo uma molécula promissora. Por fim, maioria das moléculas mostraram potencial citotóxico de IC₅₀ para a linhagem celular DU 145 (próstata), em especial a AA-60.

7. PERSPECTIVAS

- Testar atividade das Tiazacridinas em outras linhagens de células neoplásicas;
- Avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade citotóxica das Tiazacridinas nas células tumorais;
- Investigação dos alvos moleculares induzidos pelas Tiazacridinas;
- Realização de ensaio de atividade anticâncer em combinação com outros agentes quimioterápicos.

8. REFERÊNCIAS

Azab, H. A.; Hussein, B. H. M.; Azab, M. F.; Gomaa, M.; El-Falouji, A. I. Bis(acridine-9-carboxylate)-nitro-europium(III) dihydrate complex a new apoptotic agent through Flk-1 down regulation, caspase-3 activation and oligonucleosomes DNA fragmentation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p.223–234, 2013.

Azizmohammadi, M.; Khoobi, M.; Ramazani, A.; Emami, S.; Zarrin, A.; Firuzi, O.; Miri, R.; Shafiee, A. 2H-chromene derivatives bearing thiazolidine-2,4-dione, rhodanine or hydantoin moieties as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p.15-22, 2013.

Barros, F. W. A.; Bezerra, D. P.; Ferreira, P. M. P.; Cavalcanti, B. C.; Silva, T. G.; Pitta, M. G. R.; de Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Costa-Lotufo, L. V.; Moraes, M. O.; Burbano, R. R.; Guecheva, T. N.; Henriques, J. A. P.; Pessoa, C. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p.37-46, 2013.

Barros, F. W. A.; Silva, T. G.; Pitta, M. G. R.; Bezerra, D. P.; Lotufo, L. V. C.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; Moura, M. A. F. B.; Abreu, F. C. A.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Goulart, M. O. F. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3533–3539, 2012.

Belmont, P.; Bosson, J.; Godet, T.; and Tiano, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.7, p.139-169, 2007.

Breier, A.; Gibalova, L.; Seres, M.; Barancik, M.; and Sulova, Z. New Insight into P-Glycoprotein as a Drug Target. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 159-170, 2013.

Burger, A. M.; Fiebig, H. H. Preclinical Screening for New Anticancer Agents. Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, second edition, 2014.

Cariou, B.; Charbonnel, B.; and Staels, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.23, p. 205 - 215, 2012.

Chen, T. Overcoming drug resistance by regulating nuclear receptors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.62, p. 1257–1264, 2010.

Chen, Y.; Tang, Y.; Guo, C.; Wang, J.; Boral, D.; Nie, D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 1112-1126, 2012.

Chinthala, Y.; Domatti, A. K.; Sarfaraz, A.; Singh, S. P.; Arigari, N. K.; Gupta, N.; Satya, S. K. V. N.; Kumar, J. K.; Khan, F.; Tiwari, A. K.; Paramjit, G. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of some novel thiazolidinediones with triazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.70, p.308-314, 2013.

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

Choudhary, M. A.; Mazhar, M.; Ali, S.; Song, X.; Eng, G. Synthesis, characterization and biological activity of dimethyltin dicarboxylates containing germanium. **Metal Based Drugs**, v.8, n° 5, 2002.

Cunha, S.; e de Santana, L. L. B. Condensação De Knoevenagel De Aldeídos Aromáticos Com O Ácido De Meldrum Em Água: Uma Aula Experimental De Química Orgânica Verde. **Quimica Nova**, v.35,p.642-647, 2012.

Deng, J.; Shao, J.; Markowitz, J. S.; An, G. ABC Transporters in Multi-Drug Resistance and ADME-Tox of Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors. **Pharm Res**, DOI 10.1007/s11095-014-1389-0, 2014.

Doll, T. E.; Frimmel, F. H. Fate of pharmaceuticals—photodegradation by simulated solar UV-light. **Chemosphere**, v.52, p. 1757–1769, 2003.

Elte, J. W. F.; Blicklé, J. F. Thiazolidinediones for the treatment of type 2 diabetes. **European Journal of Internal Medicine**, v.18, p. 18-25, 2007.

Errede, L. A.; McBrady, J. J.; Oien, H. T. Acylantranils. 4. The Effect of Steric Hindrance on Selectivity in the Reaction of Amines with Acetylantranil. **J .Org. Chem.**,v.42, No. 4, 1977.

Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil, **Ministério da Saúde** (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2014.

Galli, A.; Ceni, E.; Mello, T.; Polvani, S.; Tarocchi, M.; Buccoliero, F.; Lisi, F.; Cioni, L.; Ottanelli, B.; Foresta, V.; Mastrobuoni, G.; Moneti, G.; Pieraccini, G.; Surrenti, C.; and Milani, S. Thiazolidinediones Inhibit Hepatocarcinogenesis in Hepatitis B Virus–Transgenic Mice by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor c–Independent Regulation of Nucleophosmin. **HEPATOLOGY**, v.52, p.493-505, 2010.

Gu, C.; Liu, L.; Sui, Y.; Zhao, J.; Wang, D.; and Chen, Y. Highly enantioselective Michael additions of α -cyanoacetate with chalcones catalyzed by bifunctional cinchona-derived thiourea organocatalyst. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p. 455–463, 2007.

Harmsen, S.; Meijerman, I.; Febus, C. L.; Maas-Bakker, R. F.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 66, p. 765–771, 2010.

Henry, R. R.; Erickson, D.; Ciaraldi, T. P. PPAR γ Agonists and the Future for Insulin Sensitizers: A report of a debate and presentations on the subject at the 72nd Scientific Sessions of the American Diabetes Association, Philadelphia, 8-12 June, 2012. **The British Journal of Diabetes & Vascular Disease**.

Hoelz, L. V. B. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. **Revista Virtual de Química**, v.03, nº 08, 2011.

Jain, V. S.; Vora, D. K.; Ramaa, C. S. Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p. 1599-1620, 2013.

Jani, T. S.; DeVecchio, J.; Mazumdar, T.; Agyeman, A.; Houghton, J. A. Inhibition of NF- κ B Signaling by Quinacrine Is Cytotoxic to Human Colon Carcinoma Cell Lines and Is Synergistic in Combination with Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) or Oxaliplatin. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p.19162-19172, 2010.

Johnson, J. A.; Cars tensen, B.; Witte, D.; Bowker, S. L.; Lipscombe, L.; Renehan, A. G. Diabetes and cancer (1): evaluating the temporal relationship between type 2 diabetes and cancer incidence. **Diabetologia**, v.55, p.1607–1618, 2012.

Junior, C. V.; Danuello, A.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v.14, p.1829-1852, 2007.

Junior, L. F. R.; Rêgo, M. J. B. M.; Cavalcanti, M. B.; Pereira, M. C.; Pitta, M. G. R.; Oliveira, P. S. S.; Gonçalves, S. M. C.; Duarte, A. L. B. P.; Lima, M. C. A.;

Kapse-Mistry, S.; Govender, T.; Srivastava, R.; and Yergeri, M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. **Frontiers in Pharmacology**, v.5, article 159, 2014.

Kar, K.; Krithika, U.; Mithuna; Basu, P.; Kumar, S. S.; Reji, A.; Kumar, B. R. P. Design, synthesis and glucose uptake activity of some novel glitazones. **Bioorganic Chemistry**, v. 56, p. 27-33, 2014.

Kelly, A. S.; Bank, A. J. The cardiovascular effects of the thiazolidinediones: a review of the clinical data. **Journal of Diabetes and Its Complications**. v. 21, p. 326-334, 2007.

Ketron, A. C.; Denny, W. A.; Graves, D. E.; Osheroff, N. Amsacrine as a Topoisomerase II Poison: Importance of Drug-DNA Interactions. **Biochemistry**, v. 51, p.1730-1739, 2012.

Lafayette, E. A.; de Almeida, S. M. V.; Pitta, M. G. R.; Beltrão, E. I. C.; da Silva, T. G.; de Moura, R. O.; Pitta, I. R.; Júnior, L. B. C.; and de Lima, M. C. A. Synthesis, DNA Binding and Topoisomerase I Inhibition Activity of Thiazacridine and Imidazacridine Derivatives. **molecules**, v. 18, p. 15035-15050, 2013.

Lang, X.; Li, L.; Chen, Y.; Sun, Q.; Wua, Q.; Liu, F.; Tan, C.; Liu, H.; Gao, C.; Jiang, Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p. 4170-4177, 2013.

Lehmann J. M.; Moore L. B.; Smith-Over T. A.; Wilkison W. O.; Willson T. M.; Kliewer S. A. An antidiabetic Thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gama (PPAR gama). **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.12953-12956, 1995.

Lesterhuis, W. J.; Haanen, J. B. A. G.; and Punt, C. J. A. Cancer immunotherapy – revisited. **NATURE REVIEWS**, v.10, p.591-600, 2011.

Li, B.; Gao, C.; Sun, Q.; Li, L.; Tan, C-Y.; Liu, H-X.; Jiang, Y-Y. Novel synthetic acridine-based derivatives as topoisomerase I inhibitors. **Chinese Chemical Letters**, v.25, p. 1021-1024, 2014.

Liu, K.; Rao, W.; Parikh, H.; Li, Q.; Guo, T. L.; Grant, S.; Kellogg, G. E.; Zhang, S. 3,5-Disubstituted-thiazolidine-2,4-dione analogs as anticancer agents: Design, synthesis and biological characterization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 125-137, 2012.

Li, Y.; Tan, C.; Gao, C.; Zhang, C.; Luan, X.; Chen, X.; Liu, H.; Chen, Y.; Jiang, Y. Discovery of benzimidazole derivatives as novel multi-target EGFR, VEGFR-2 and PDGFR kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 4529-4535, 2011.

Mattos, M. C. Aspectos mecanísticos da adição de michael. **Química Nova**, v.22, 1999.

Mendonça, E. A. M.; Lira, M. C. B.; Rabello, M. M.; Cavalcanti, I. M. F.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Lima, M. C. A.; Pitta, M. G. R.; Hernandez, M. Z.; and Santos-Magalhães, N. S. Enhanced Antiproliferative Activity of the New Anticancer Candidate LPSF/ AC04 in Cyclodextrin Inclusion Complexes Encapsulated into Liposomes. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.13, 2012.

Muscia, G. C.; Buldain, G. Y.; Silva, E. A.; Design, synthesis and evaluation of acridine and fused-quinoline derivatives as potential *anti-tuberculosis* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.73, p.243-249, 2014.

Nazreen, S.; Alam, M. S.; Hamid, H.; Yar, M. S.; Dhulap, A.; Alam, P.; Pasha, M. A. Q.; Bano, S.; Alam, M. M.; Haider, S.; Kharbanda, C.; Ali, Y.; Pillai, K. K. Thiazolidine-2,4-diones derivatives as PPAR-c agonists: Synthesis, molecular docking, in vitro and in vivo antidiabetic activity with hepatotoxicity risk evaluation and effect on PPAR-c gene expression. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3034-3042, 2014.

Niemira, M.; Dastyh, J.; Mazerska, Z. Pregnane X receptor dependent up-regulation of CYP2C9 and CYP3A4 in tumor cells by antitumor acridine agents,

C-1748 and C-1305, selectively diminished under hypoxia. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, p.231-241, 2013.

Palmeira, A.; Sousa, E.; Vasconcelos, M. H.; and Pinto, M. M. Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1946-2025, 2012.

Paulíková, H.; Vantová, Z.; Hunáková, L.; Cizeková, L.; Carná, M.; Kozurková, M.; Sabolová, D.; Kristian, P.; Hamul'aková, S.; Imrich, J. DNA binding acridine-thiazolidinone agents affecting intracellular glutathione. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 7139–7148, 2012.

Pitta, M. G. R.; Souza, E. S.; Barros, F. W. A.; Filho, M. O. M.; Pessoa, C. O.; Hernandez, M. Z.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Med Chem Res**, v. 22, p. 2421–2429, 2013.

Pitta, I. R.; Pitta, M. G. R. Synthesis of a Novel Thiazolidinedione and Evaluation of Its Modulatory Effect on IFN- γ IL-6, IL-17A, and IL-22 Production in PBMCs from Rheumatoid Arthritis Patients. **BioMed Research International**, 2013.

Plsikova, J.; Janovec, L.; Koval, J.; Ungvarsky, J.; Mikes, J.; Jendzelovsky, R.; Fedorocko, P.; Imrich, J.; Kristian, P.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Kozurkova, M. 3,6-Bis(3-alkylguanidino)acridines as DNA-intercalating antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.57, p.283-295, 2012.

Raza, A.; Jacobson, B. A.; Benoit, A.; Patel, M. R.; Dixon, J. J.; Hiasa, H.; Ferguson, D. M.; Kratzke, R. A. Novel acridine-based agents with topoisomerase II inhibitor activity suppress mesothelioma cell proliferation and induce apoptosis. **Invest New Drugs**, v.30, p.1443–1448, 2012.

Reddy, B. V. S.; Divya, B.; Swain, M.; Rao, T. P.; Yadav, J. S.; Vardhan, M. V. P. S. V. A domino Knoevenagel hetero-Diels–Alder reaction for the synthesis of

polycyclic chromene derivatives and evaluation of their cytotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, p.1995–1999, 2012.

Rêgo, M. J. B. M.; Pitta, M. R. G.; Pereira, D. T. M.; da Silva, J. C.; Rabello, M. M.; Lima, M. C. A.; Hernandez, M. Z.; Pitta, I. R.; Galdino, S. L.; Pitta, M. G. R. Synthesis, in vitro anticancer activity and in silico study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. **MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH**, v.23, p.3220-3226, 2014.

Sánchez, I. G.; Solano, J. D.; Mejía, M. A. L.; Vázquez, S. O.; Sotres, R. R.; Morán, J.; Rocha, A. L.; Cerbón, M. A. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.2102-2108, 2011.

Santin, J. R.; Uchôa, F. D. T.; Lima, M. C. A.; Rabello, M. M.; Machado, I. D.; Hernandez, M. Z.; Amato, A. A.; Milton, F. A.; Webb, P.; Neves, F. A. R.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Farsky, S. H. P. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, p. 689-697, 2013.

Silva, A. K. S.; Torres, D. O. C.; Rocha, S. W. S.; Gomes, F. O. S.; Silva, B. S.; Donato, M. A. M.; Raposo, C.; Santos, A. C. O.; Lima, M. C. A.; Galdino, S. L.; Pitta, I. R.; Souza, J. R. B.; Peixoto, C. A. Effect of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice (LDLR $-/-$). **Cardiovascular Pathology**, v. 22, p.81-90, 2013.

Silva, T. F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. **Rev. Virtual Quim.**, v.5, p.921-933, 2013.

Sedlacek, O.; Hruby, M.; Studenovsky, M.; Vetvicka, D.; Svoboda, J.; Kankova, D.; Kovar, J.; Ulbrich, K. Polymer conjugates of acridine-type anticancer drugs

with pH-controlled activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p.4056-4063, 2012.

Step, S. E.; Lim, H-W.; Marinis, J. M.; Prokesch, A.; Steger, D. J.; You, S-H.; Won, K-J.; and Lazar, M. A. Anti-diabetic rosiglitazone remodels the adipocyte transcriptome by redistributing transcription to PPAR γ -driven enhancers. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 28, p. 1018 – 1028, 2014.

Su, T.; Chou, T.; Kim, J. Y.; Huang, J.; Ciszewska, G.; Ren, W. Y.; Otter, G. M.; Sirotnak, F. M.; and Watanabe, K. A. 9-Substituted Acridine Derivatives with Long Half-Life and Potent Antitumor Activity: Synthesis and Structure-Activity Relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p.3226-3235, 1995.

Tolson, A. H.; Wang. H.; Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 1238–1249, 2010.

Wang, T.; Wen-Jone Chen, W.; Wern-Cherng Cheng, W.; Lin, J.; Chen, M.; Lee, Y. Relation of Improvement in Endothelium-Dependent Flow-Mediated Vasodilation After *Rosiglitazone* to Changes in Asymmetric Dimethylarginine, Endothelin-1, and C-Reactive Protein in Nondiabetic Patients With the Metabolic Syndrome. **The American Journal of Cardiology**, v. 98 p.1057-1062, 2006.

Wanga, Z.; Liu, Z.; Lee, W.; Kim, S-N.; Yoon, G.; Cheon, S. H. Design, synthesis and docking study of 5-(substituted benzylidene)thiazolidine-2,4-dione derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3337-3340, 2014.

Zhang, J.; Chen, Y.; Chen, X.; Zheng, X.; Cao, W.; Chen, J.; Zhang, M. Synthesis and characterization of oxadisilole-fused acridines, dioxatrisilole-fused acridines and benzo[b]acridines. **Tetrahedron**, v.70, p. 5820-5827, 2014.

Zhang, J.; Sun, T.; Liang, L.; Wu, T.; and Wang, Q. Drug promiscuity of P-glycoprotein and its mechanism of interaction with paclitaxel and doxorubicin. **The Royal Society of Chemistry**, v.10, p. 438-445, 2014.

Zhao, D.; Shi, Z.; Warriner, A. H.; Qiao, P.; Hong, H.; Wang, Y.; Feng, X. Molecular Mechanism of Thiazolidinedione-Mediated Inhibitory Effects on Osteoclastogenesis. **PLOS ONE**, v.9, 2014.

Zhu, W.; Zhang, D.; Yang, N.; Liu, H. Copper-mediated C–H(sp²)/C–H(sp³) coupling of benzoic acid derivatives with ethyl cyanoacetate: an expedient route to an isoquinolinone scaffold. **The Royal Society of Chemistry**, v. 50, p. 10634-10636, 2014.

Zinzi, L.; Capparelli, E.; Cantore, M.; Contino, M.; Leopoldo, M.; and Colabufo, N. A. Small and innovative molecules as new strategy to revert MDR. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 1-12, 2014.

Zonga, A.; Caob, H.; Wanga, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p.1395-1410, 2012.

9. APÊNDICE A: Espectros de RMN ^1H , LC-MS e Infravermelho das Tiazacridinas

Composto 3-acridina-9-ilmetil-5-(4-metiltio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-56)

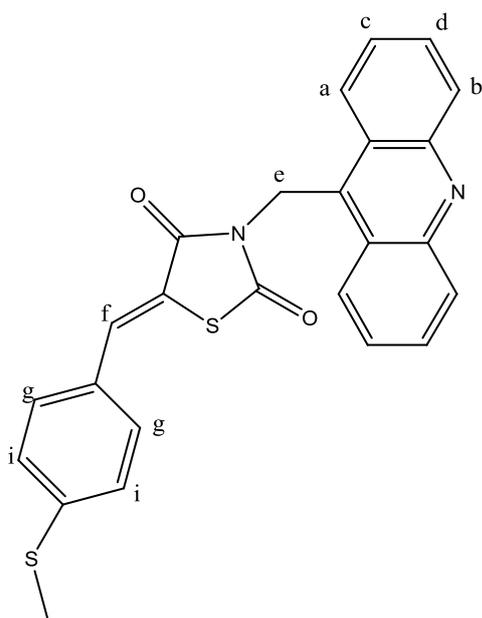


Figura 16. Espectro do RMN ^1H do LPSF AA-56

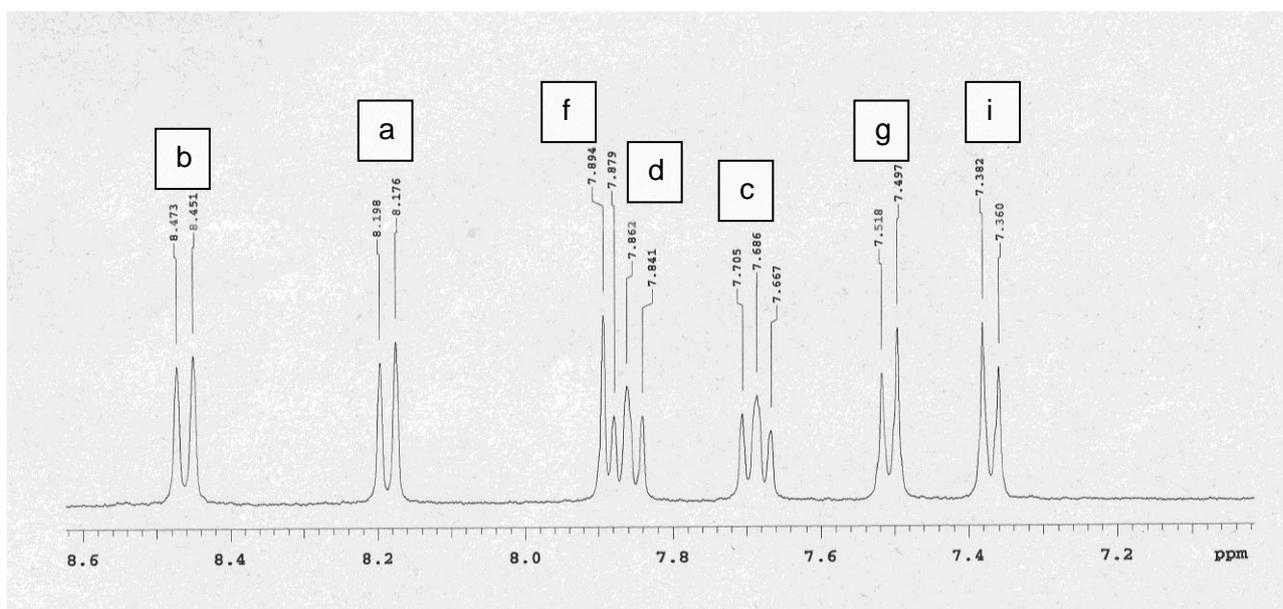


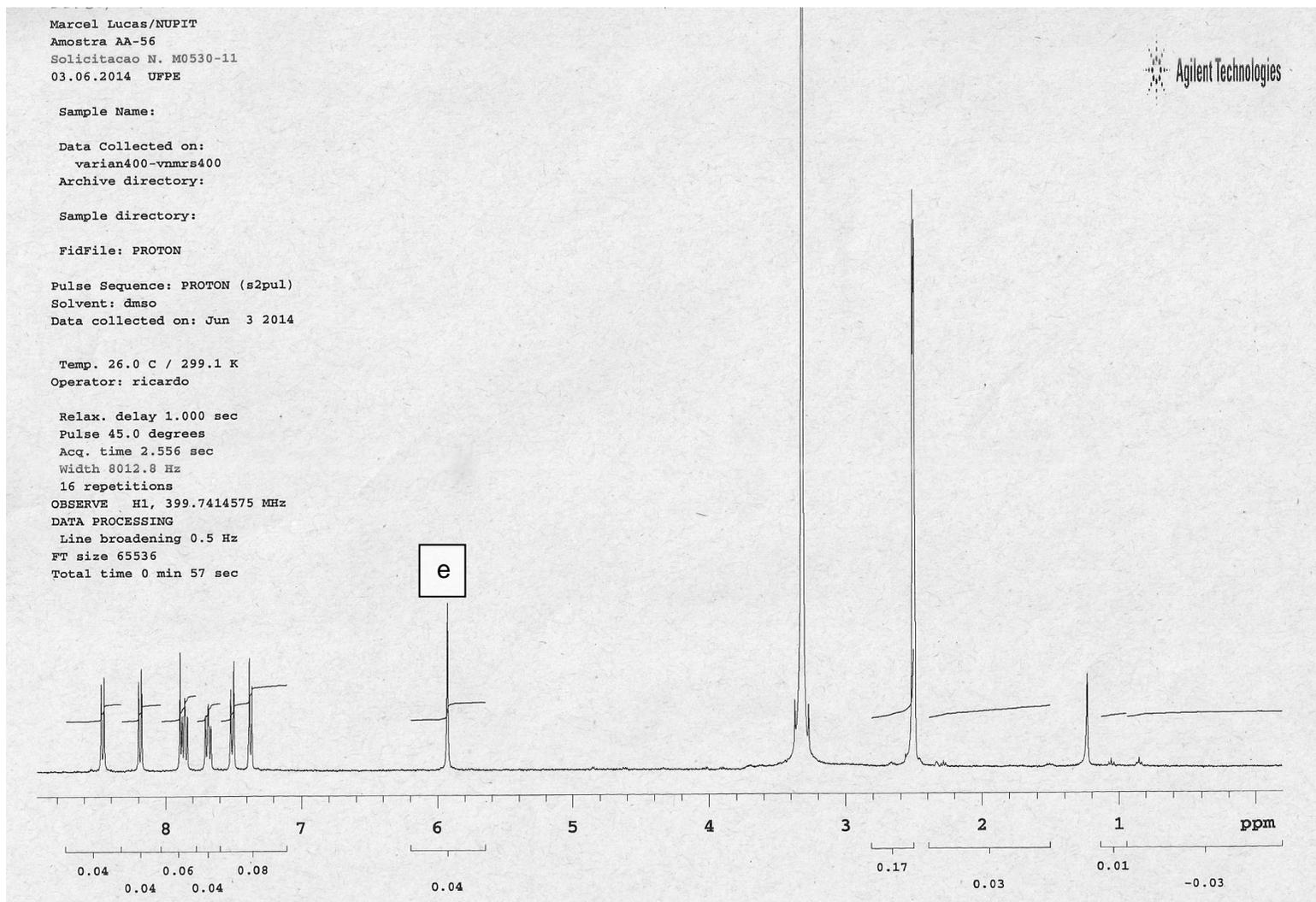
Figura 17. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-56

Figura 18 Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-metiltio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-56) (MM=442)

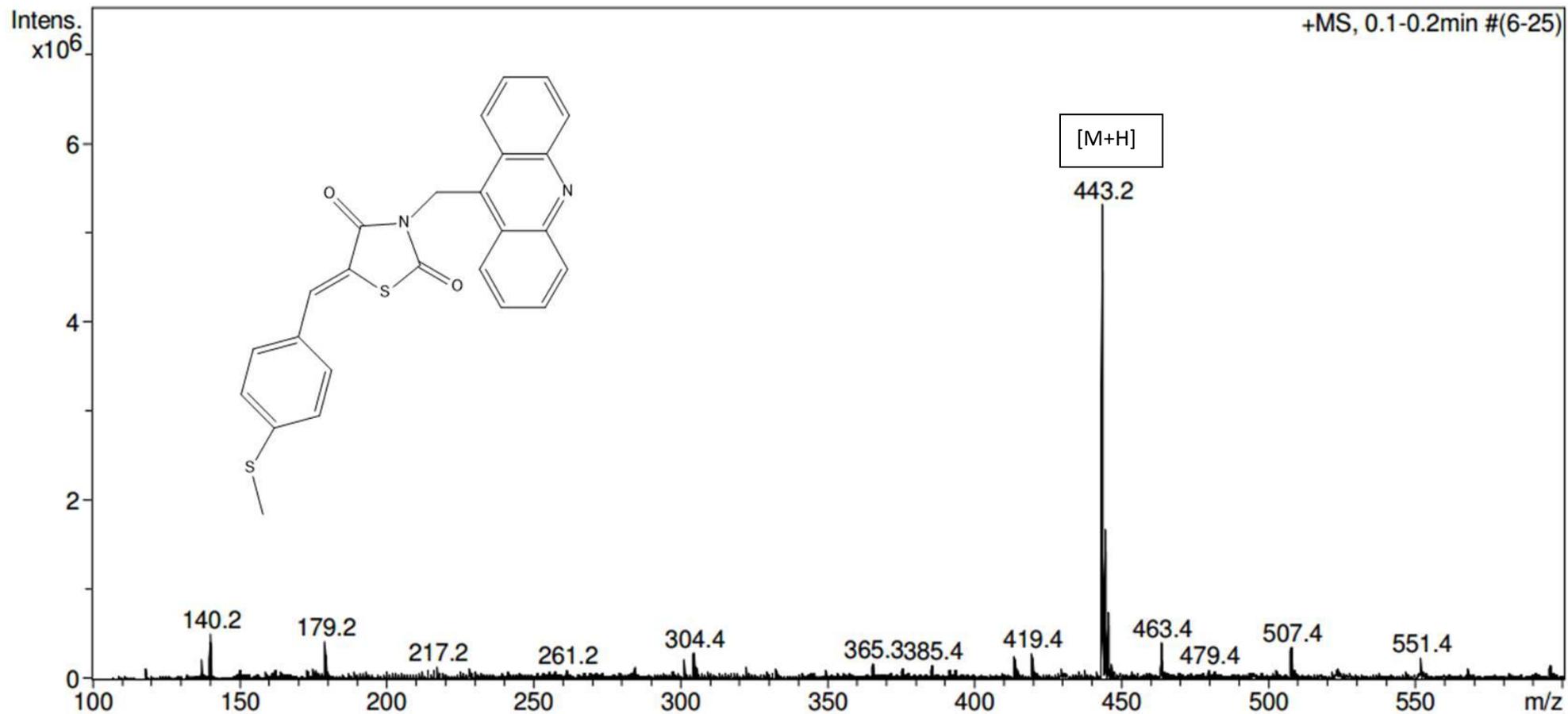


Figura 19 Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-metiltio-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-56) (MM=442)

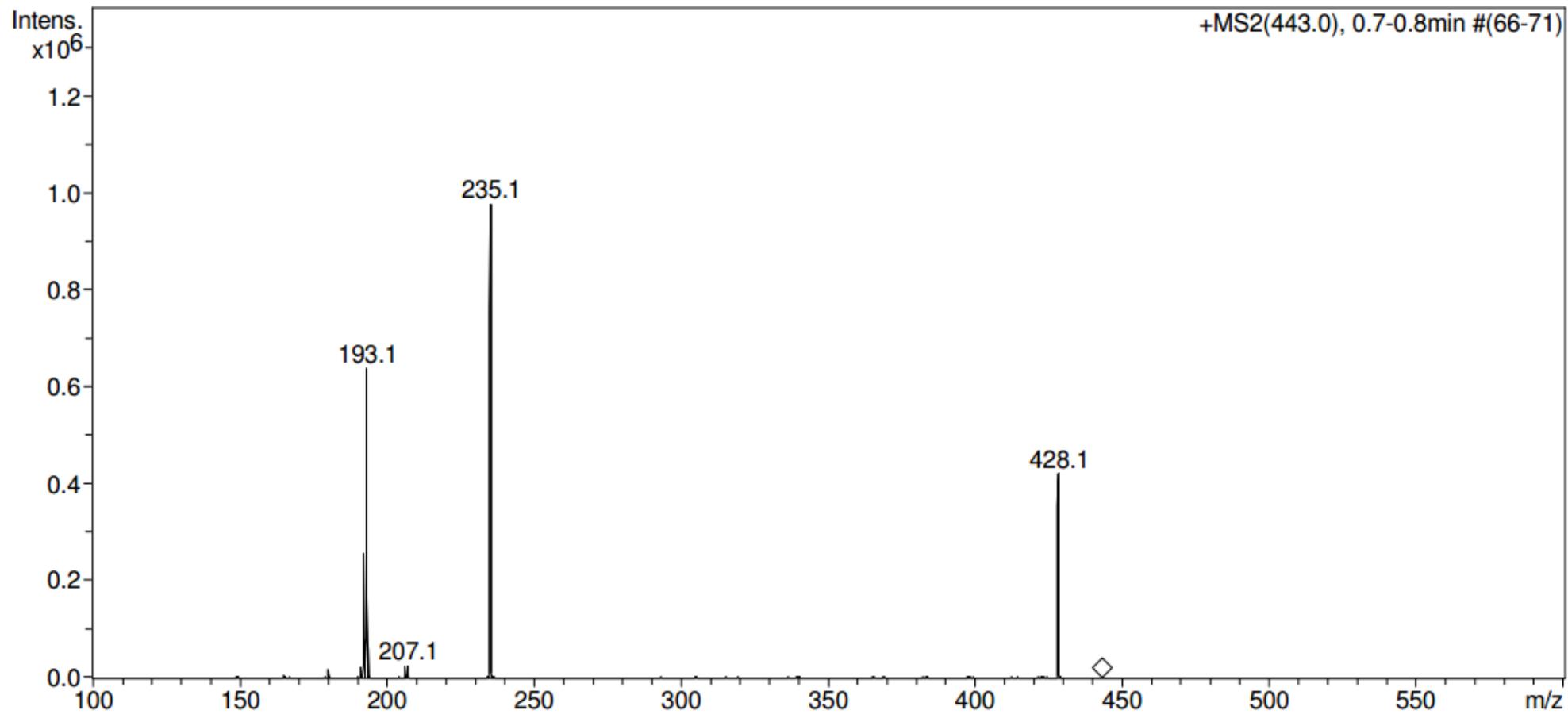


Figura 20 Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-56 (tR = 10 minutos)

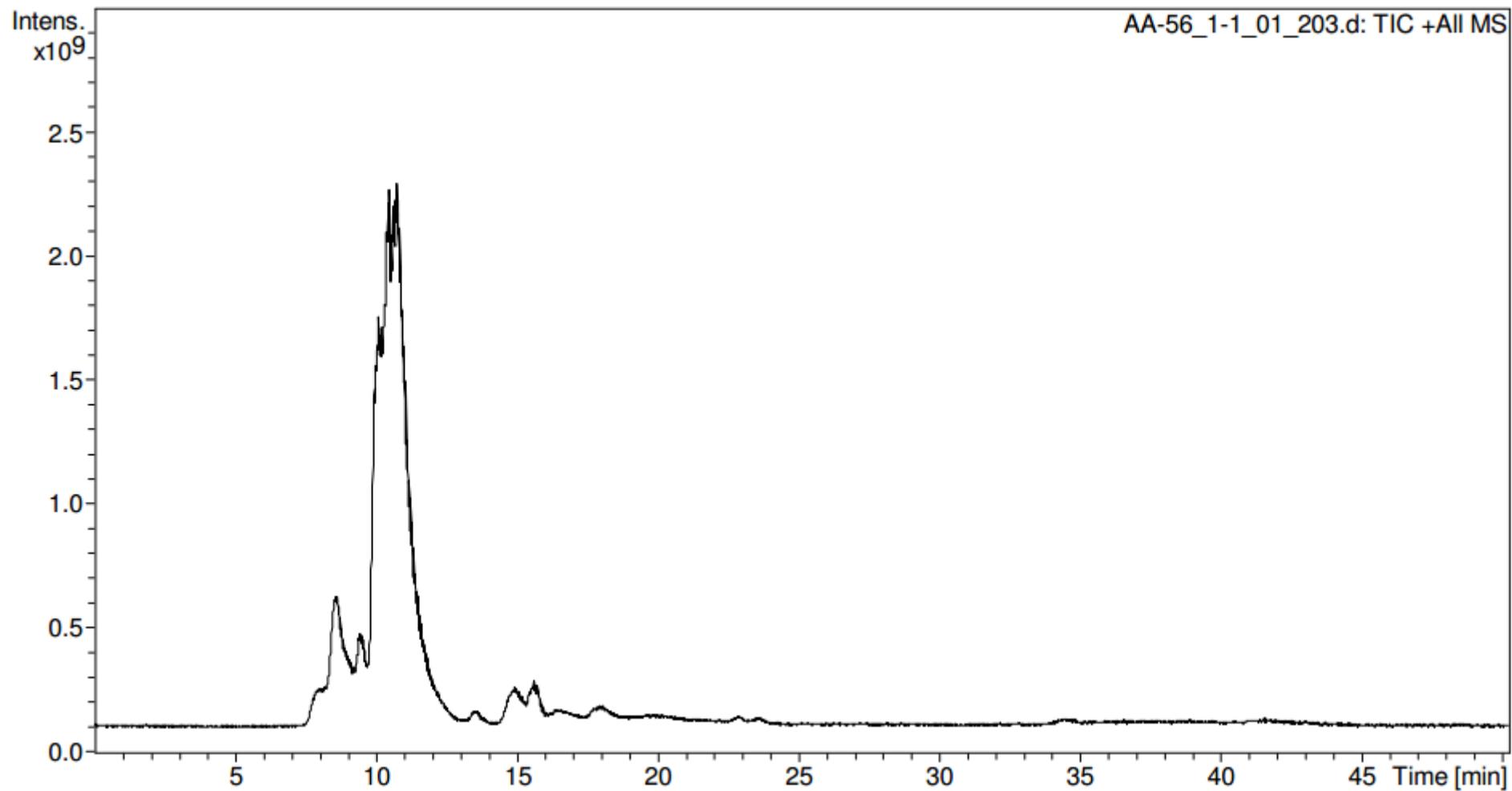
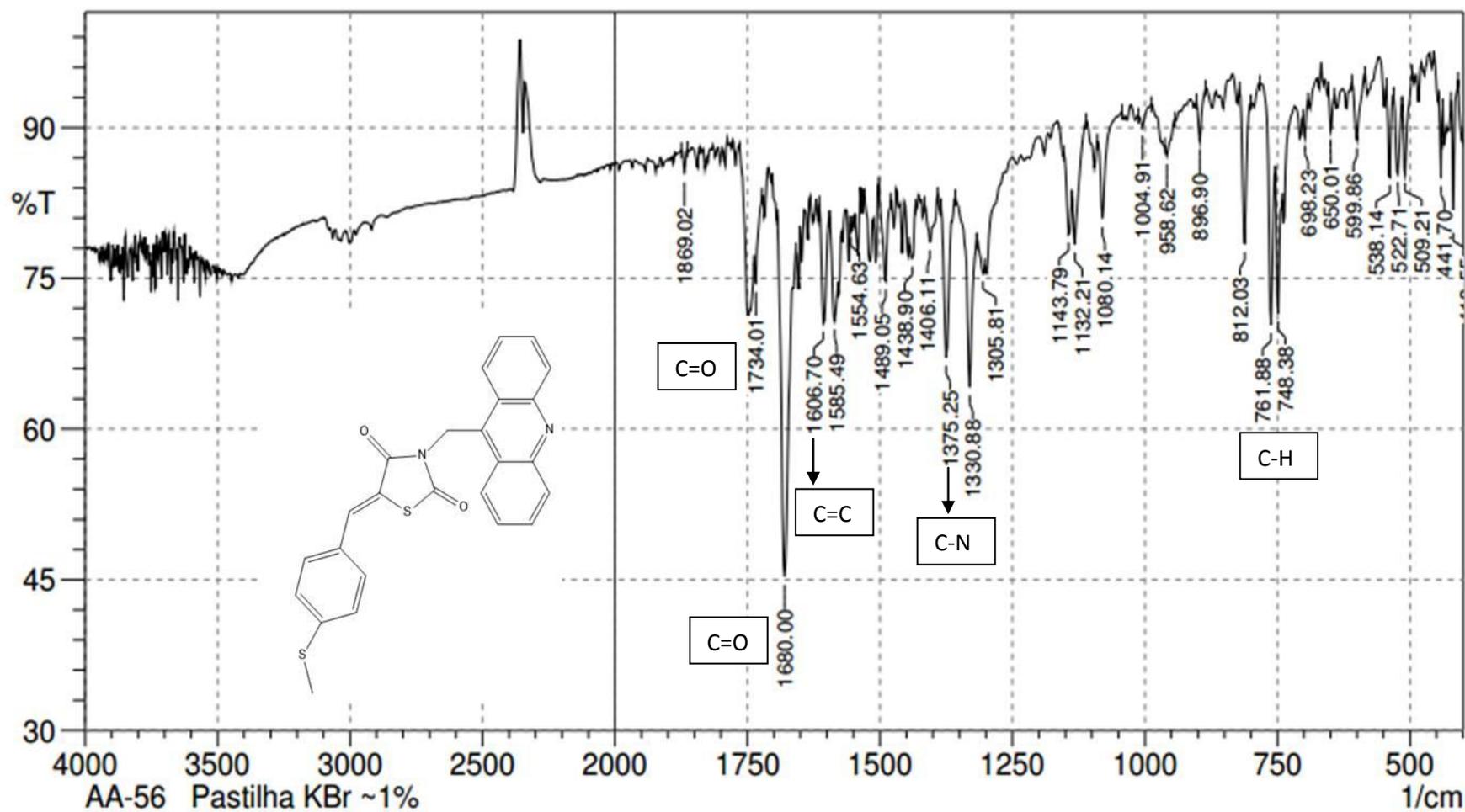


Figura 21. Espectro de IV do LPSF AA- 56. Deformação axial normal de C=O, 1734 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1606 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1375 cm^{-1} . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 761 cm^{-1} .



Composto 3-(acridina-9-il-metil)-5-(3-trifluorometoxi)benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-57)

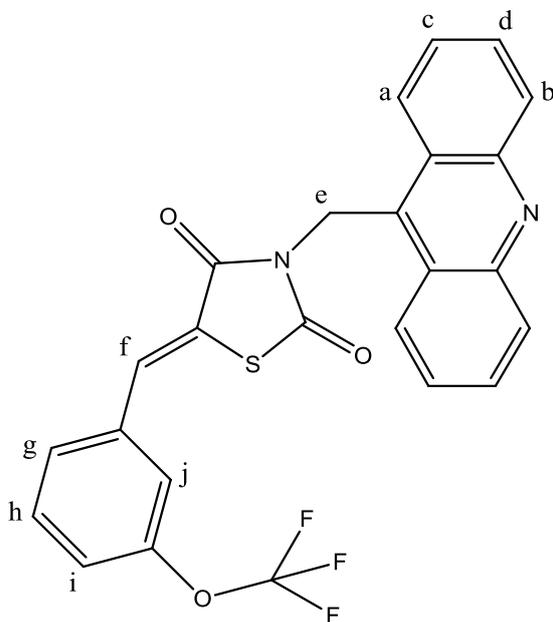


Figura 22. Espectro do RMN ¹H do LPSF AA-57

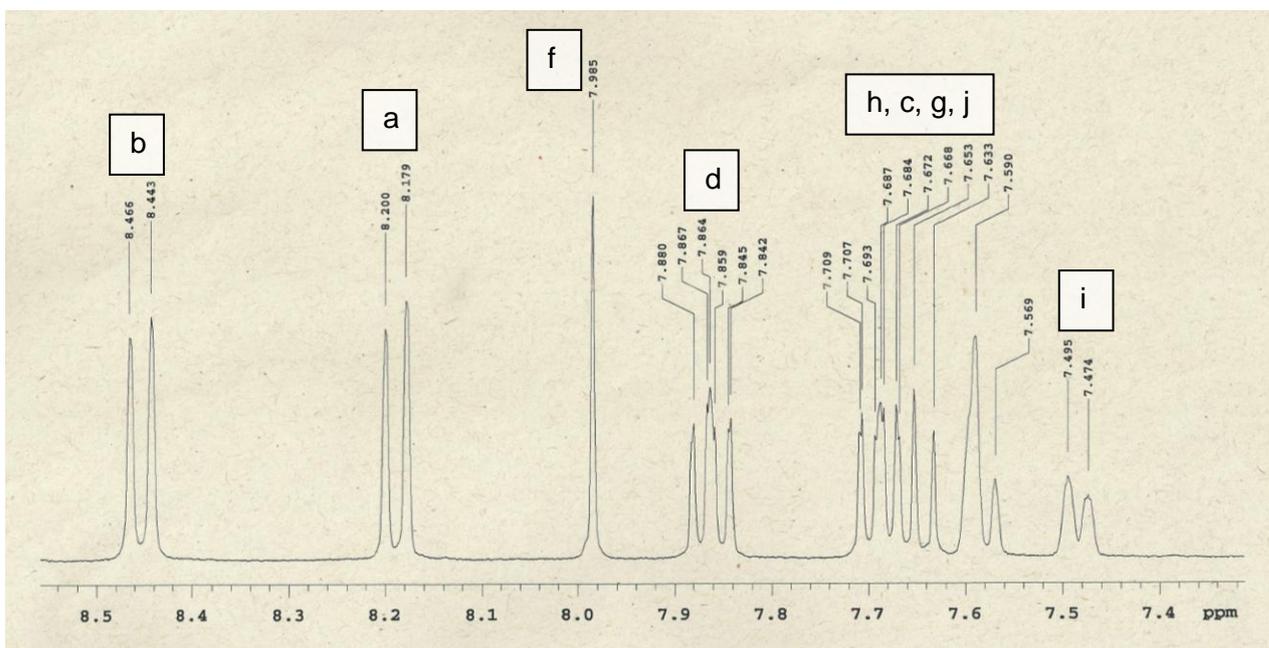


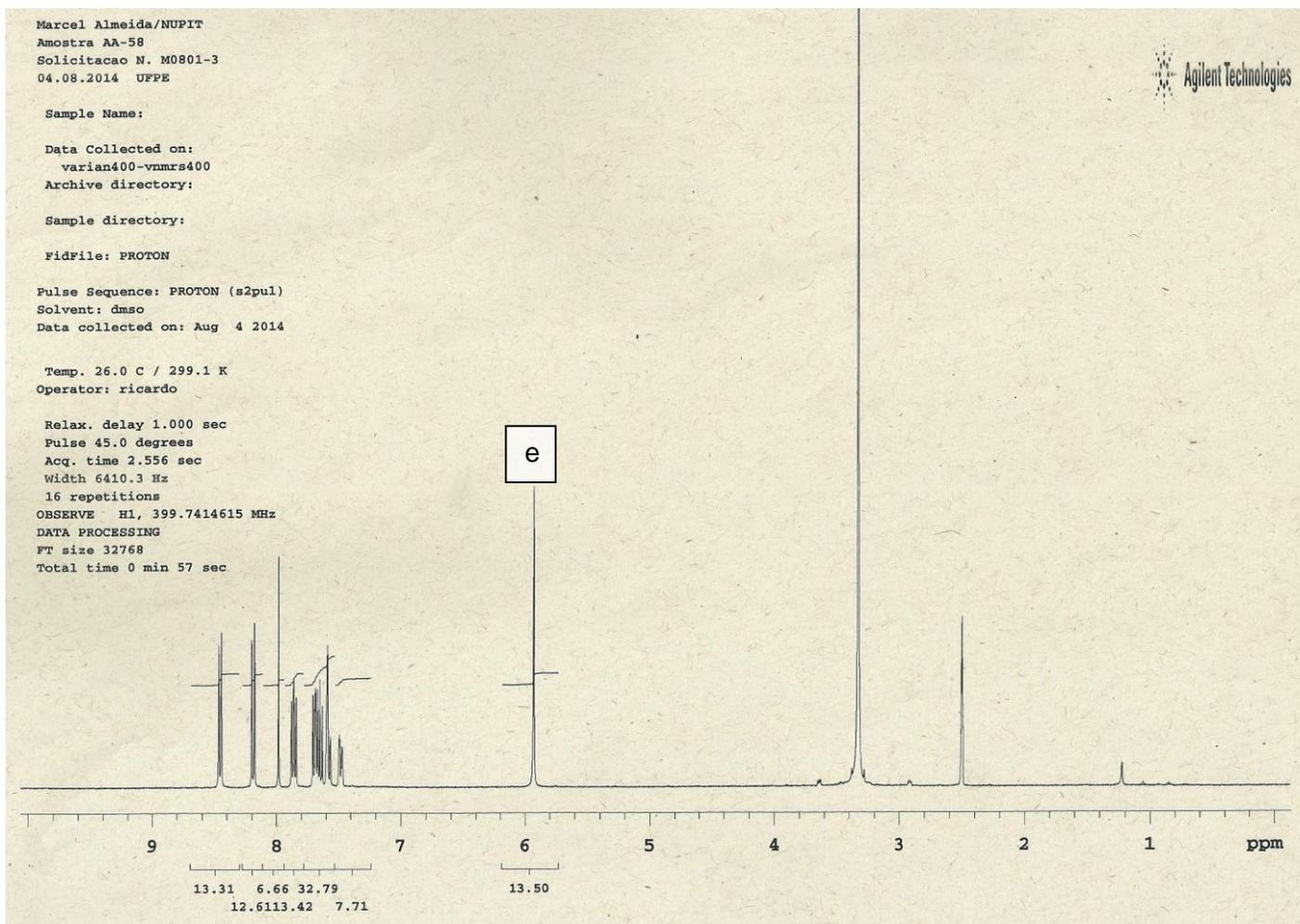
Figura 23. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-57

Figura 24. Espectro de Massas por IES do 3-(acridin-9-il-metil)-5-(3-trifluorometoxi)benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-57) (MM=480)

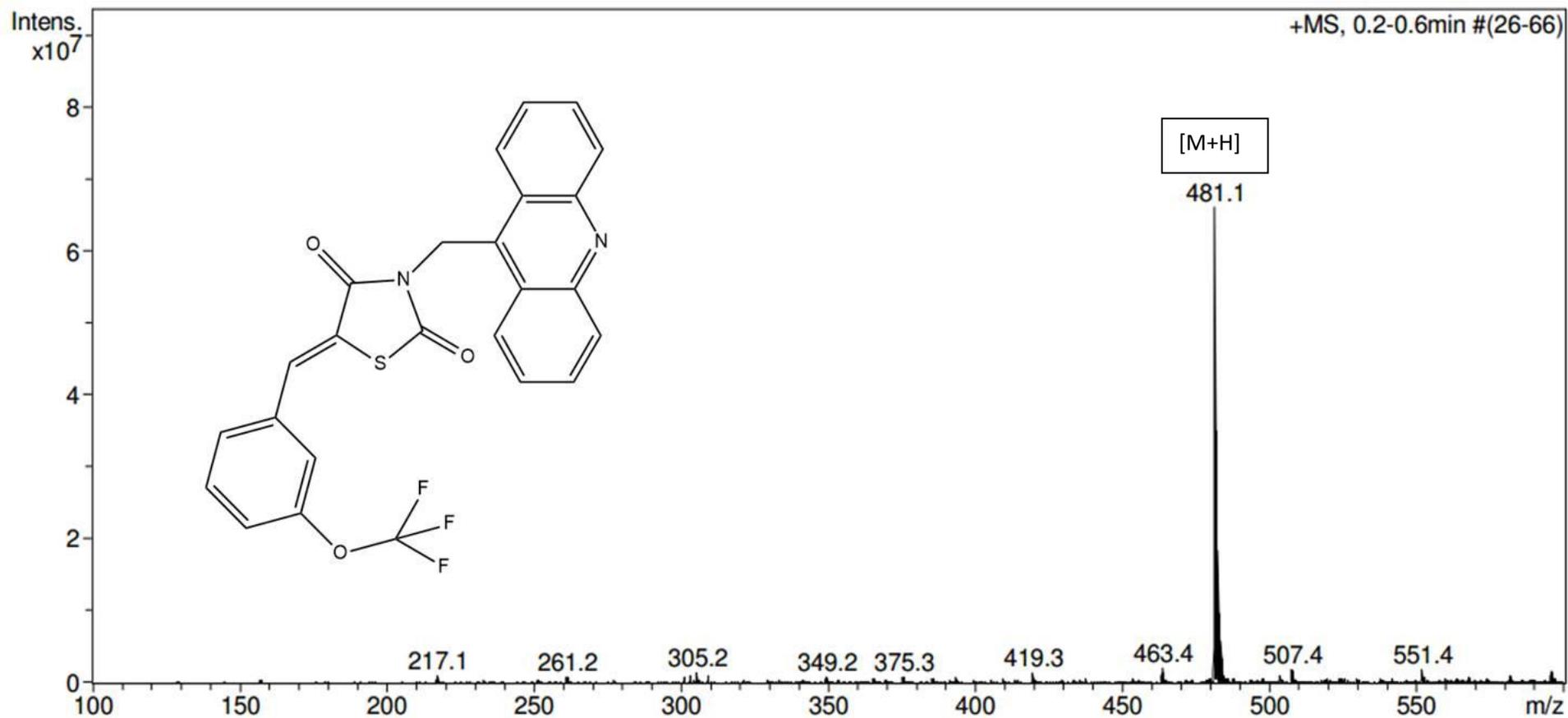


Figura 25. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-(acridin-9-il-metil)-5-(3-trifluorometoxi)benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-57) (MM= 480)

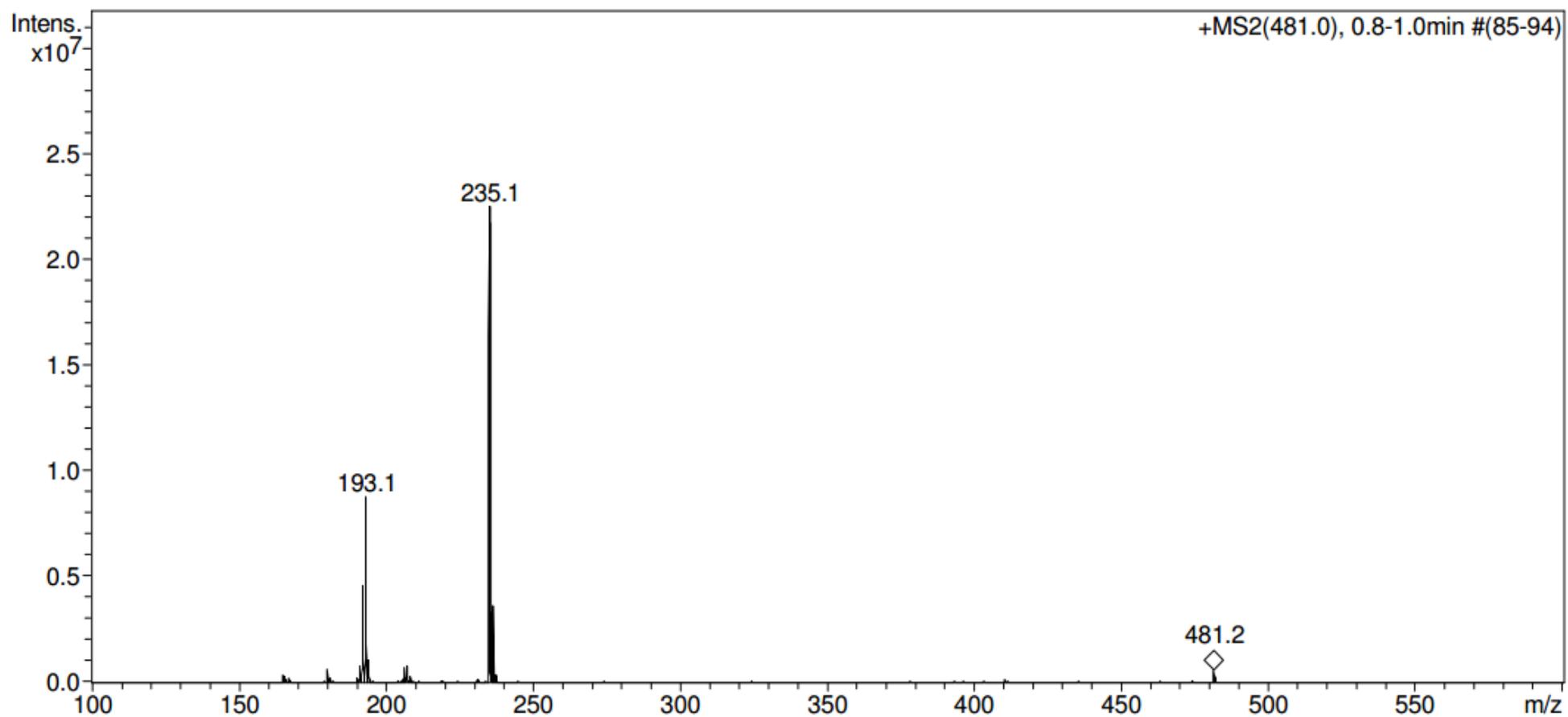


Figura 26. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-57 (tR =13 minutos)

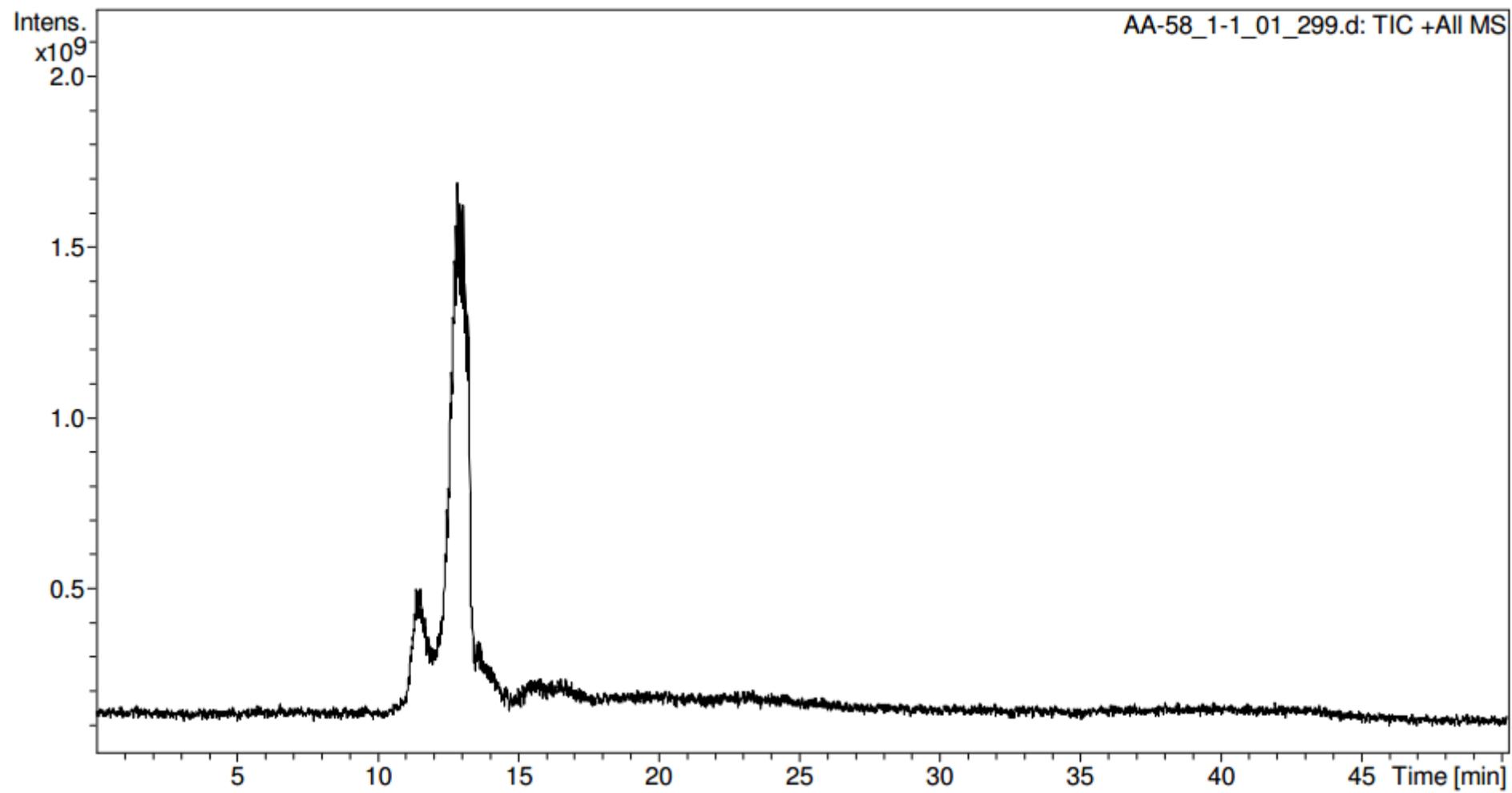
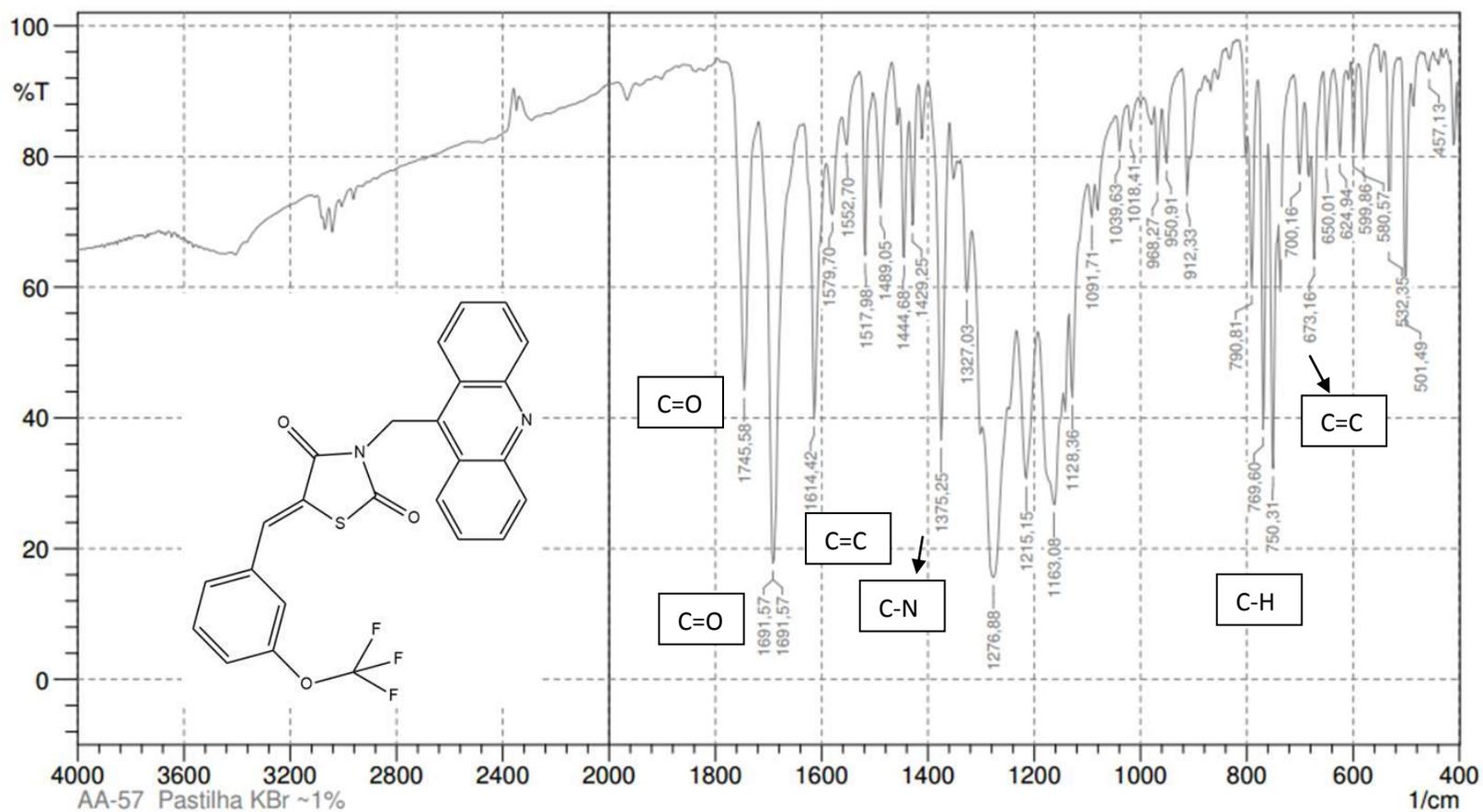


Figura 27. Espectro de IV do LPSF AA- 57. Deformação axial normal de C=O, 1745 cm^{-1} , 1691 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1614 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1375 cm^{-1} . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 750 cm^{-1} . Deformação angular de C=C, 673 cm^{-1}



Composto 3-acridina-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59)

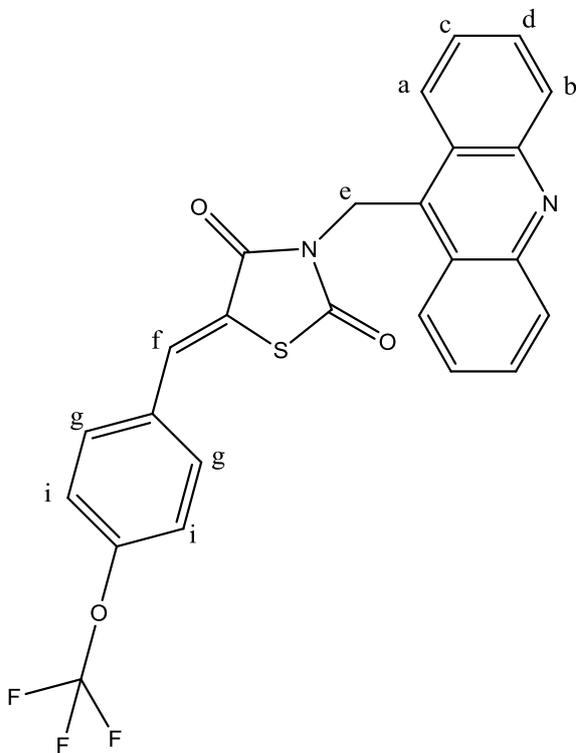


Figura 28. Espectro do RMN ^1H do LPSF AA-59

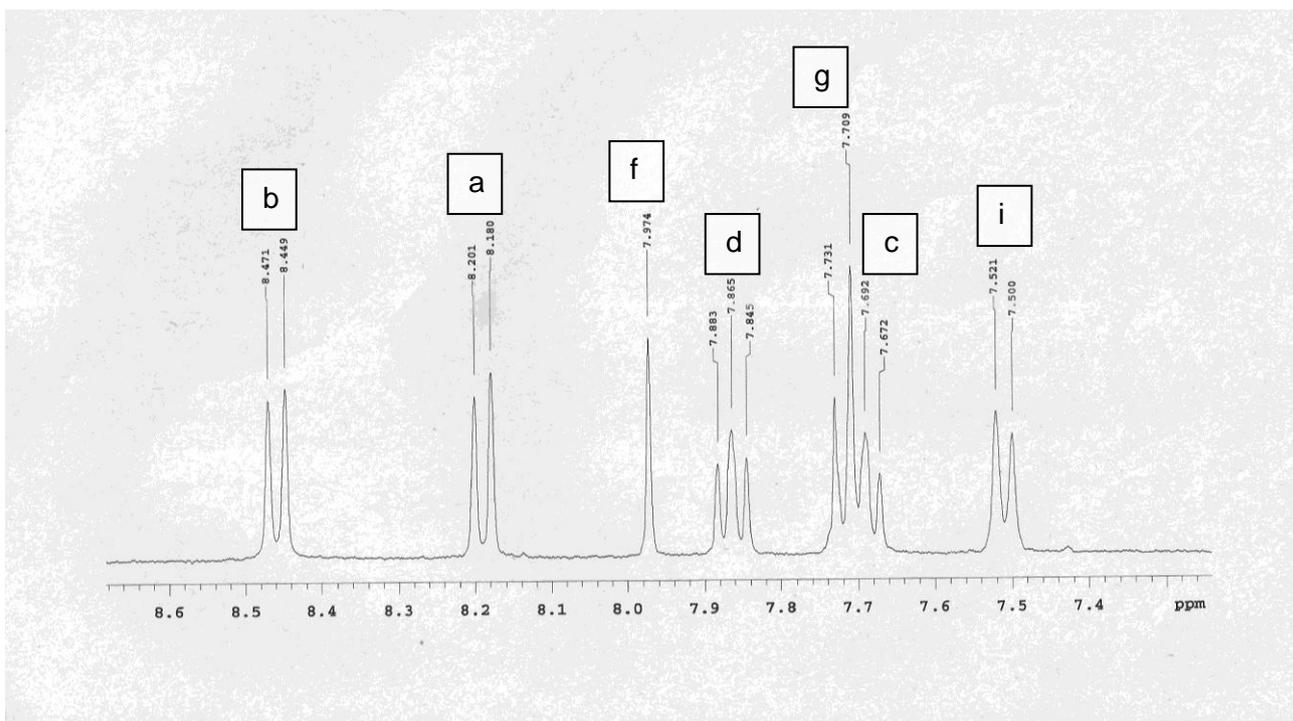


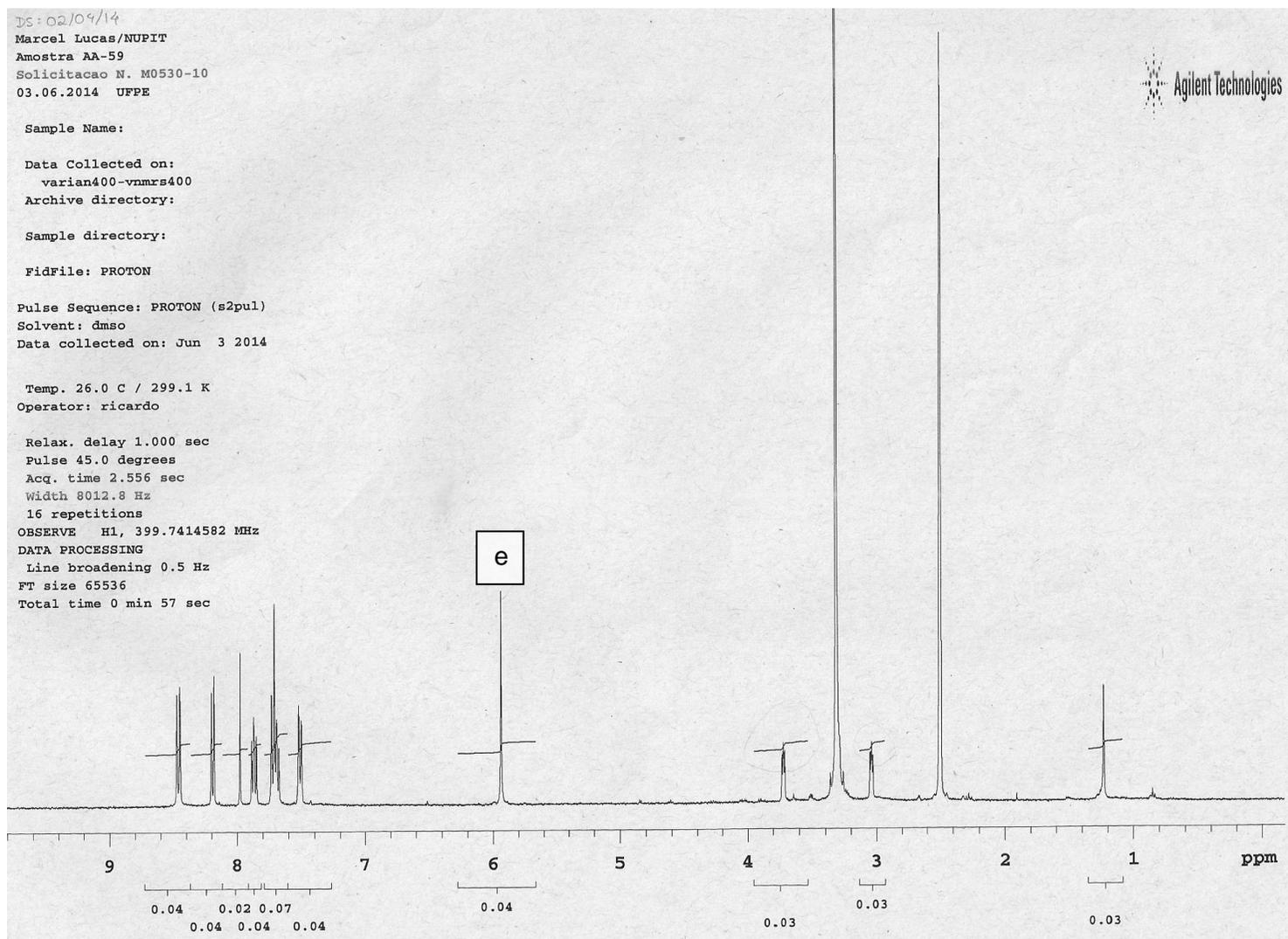
Figura 29. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-59

Figura 30. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59) (MM=480)

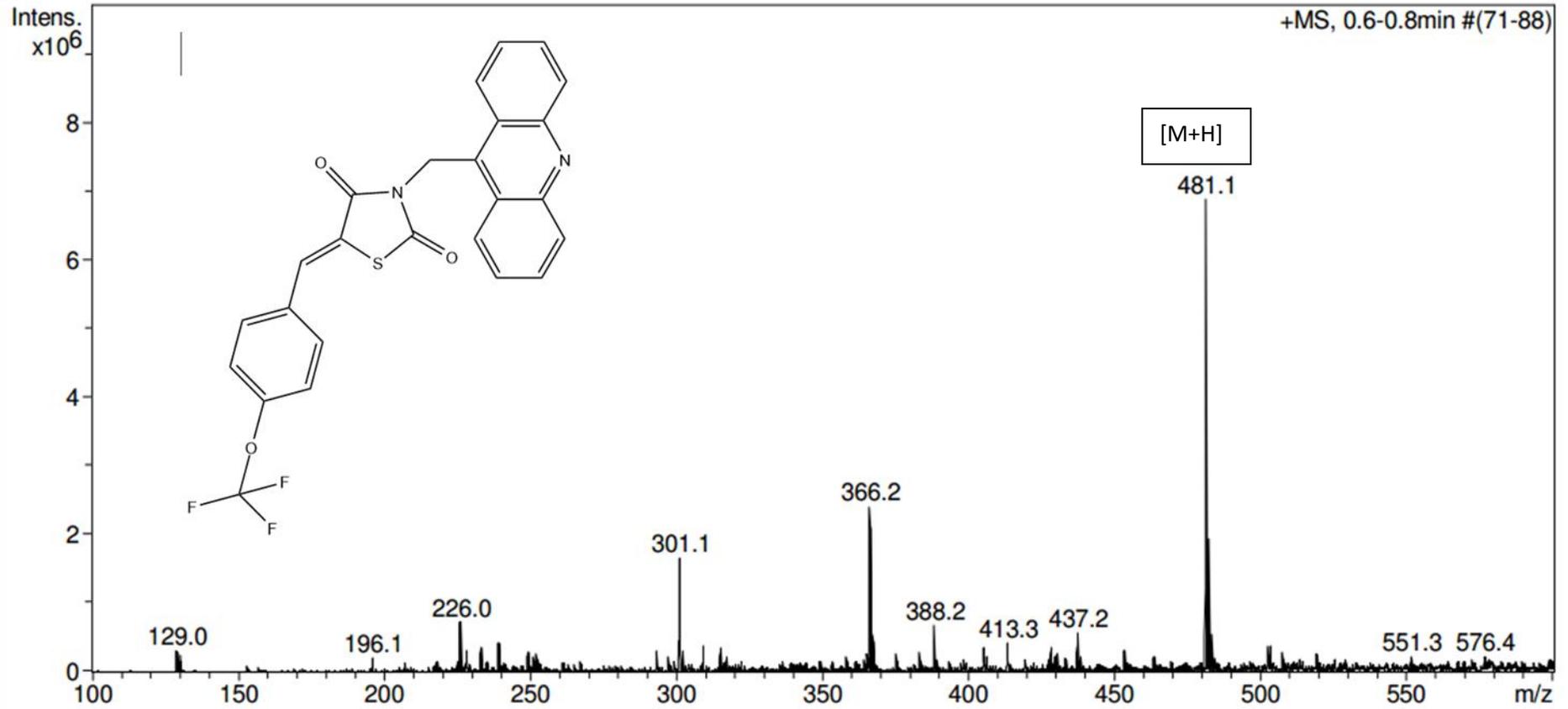


Figura 31. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-ilmetil-5-(4-trifluorometoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-59) (MM=480)

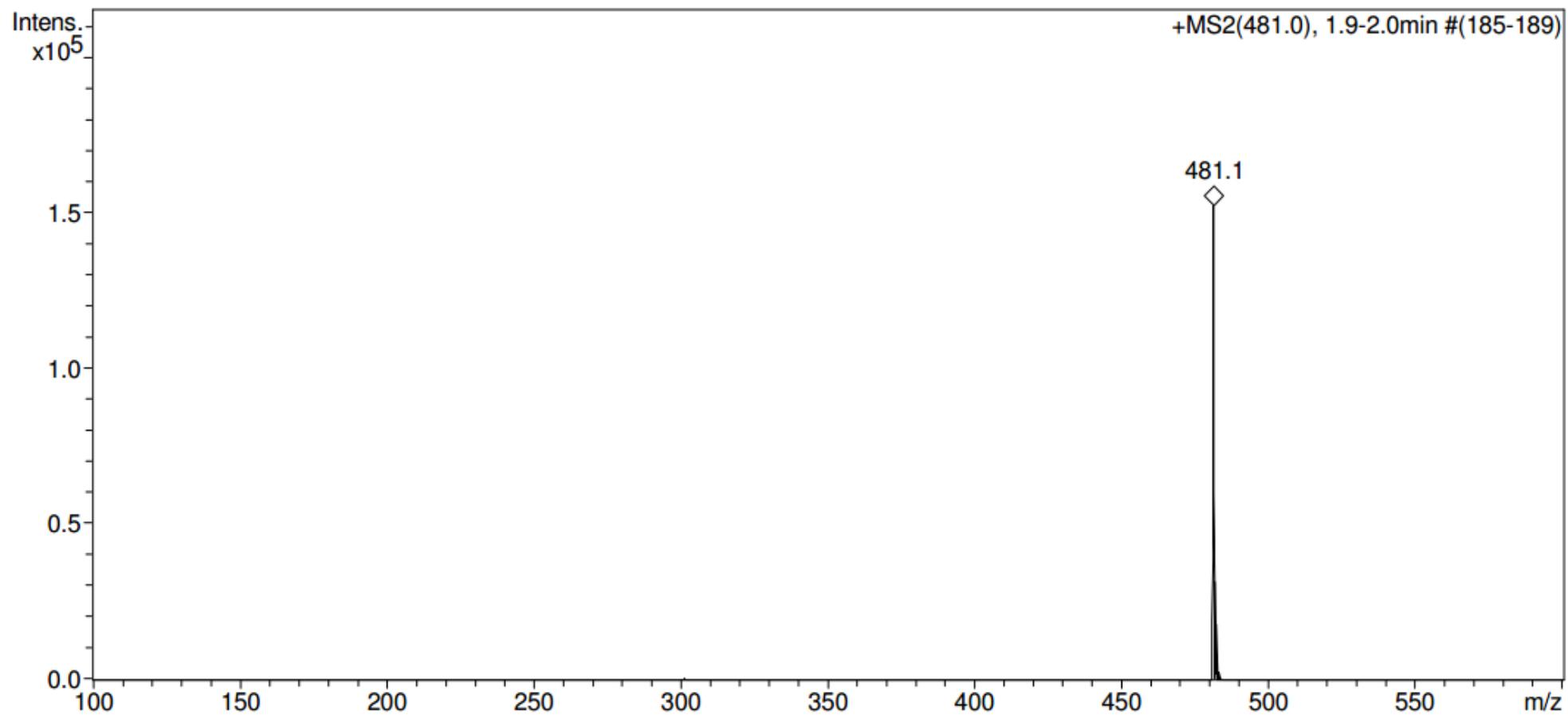


Figura 32. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-59 (tR =24 minutos)

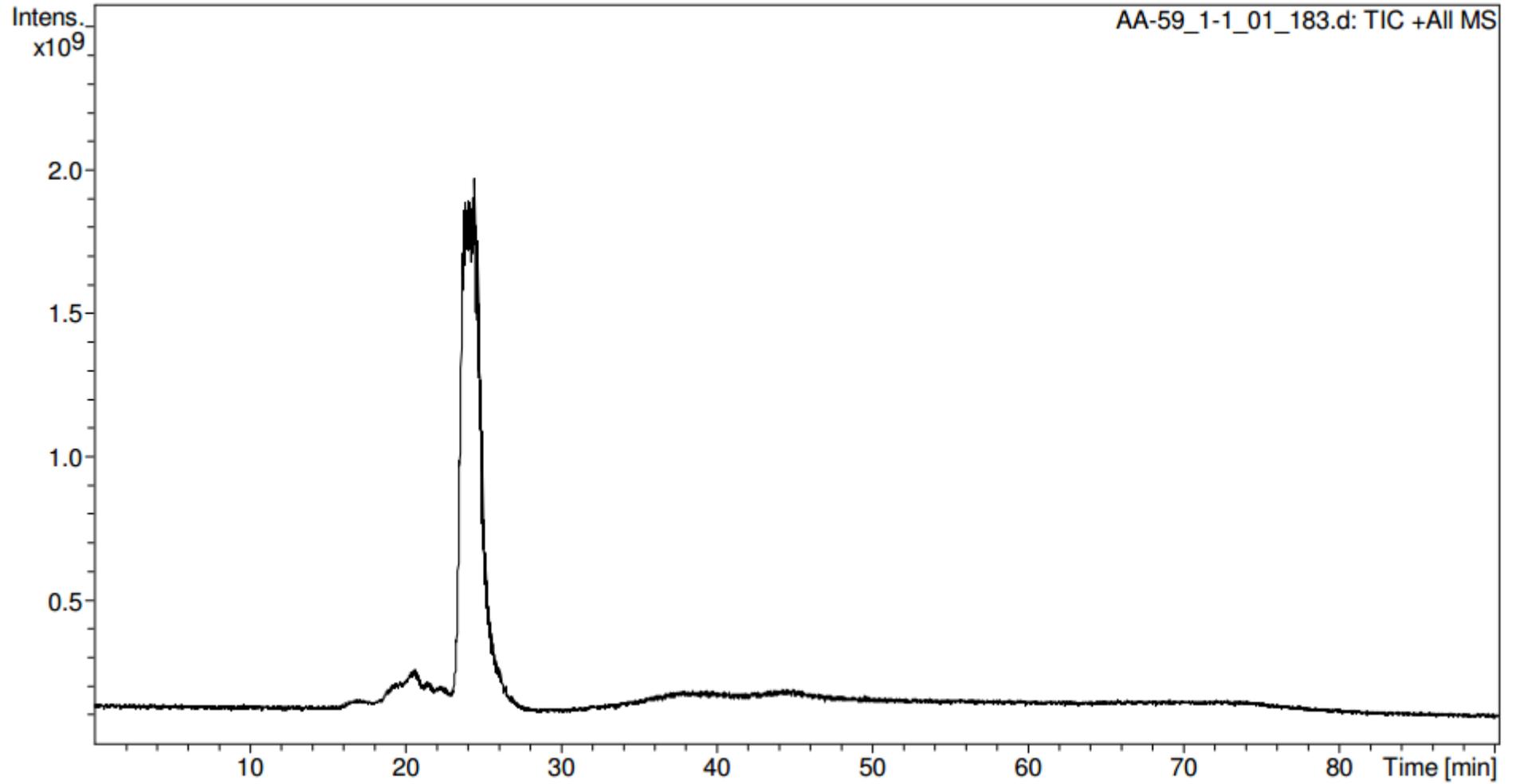
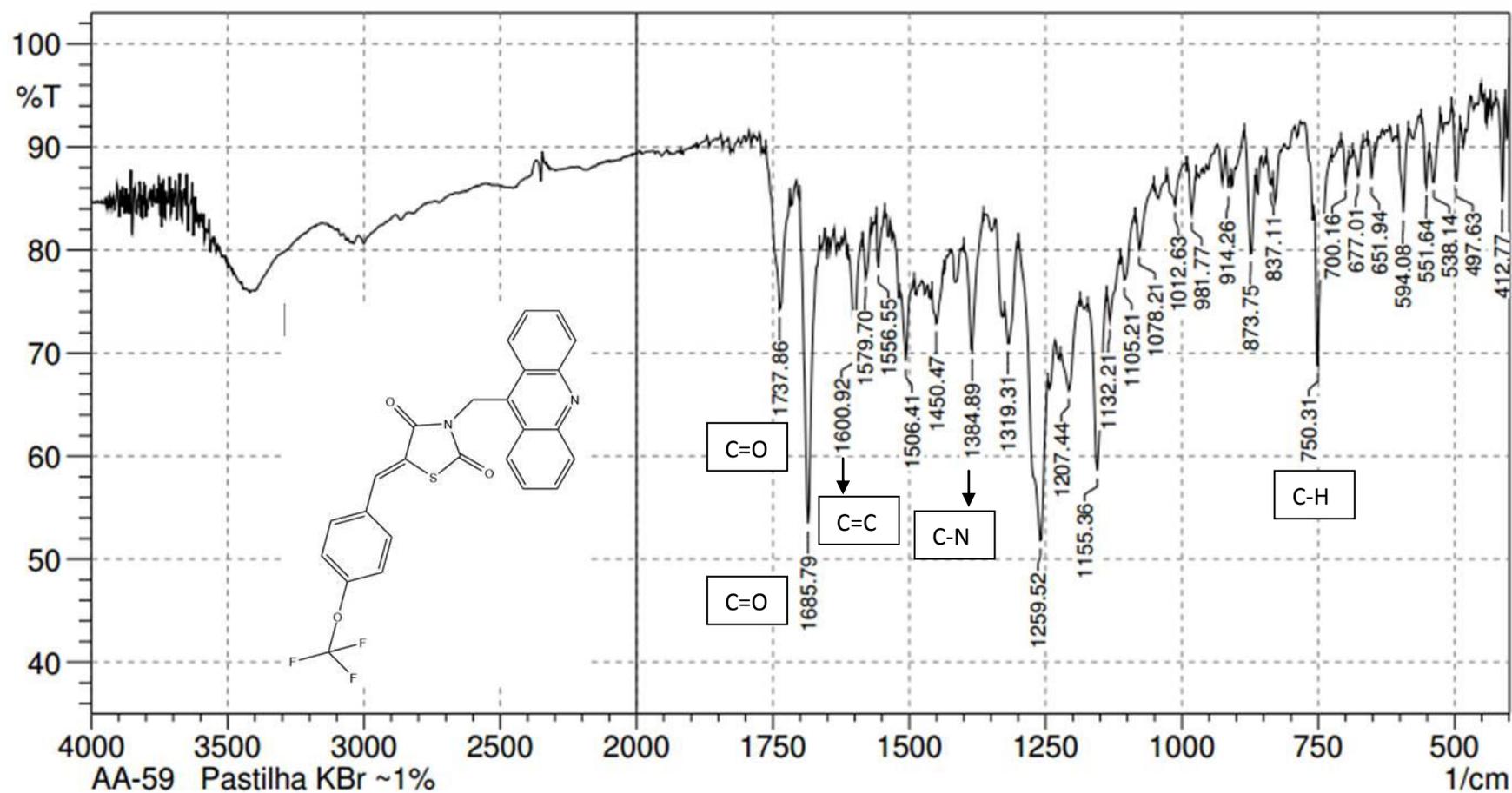


Figura 33. Espectro de IV do LPSF AA- 59. Deformação axial normal de C=O, 1737 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1600 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1384 cm^{-1} . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 750 cm^{-1} .



Composto 3-acridina-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-60)

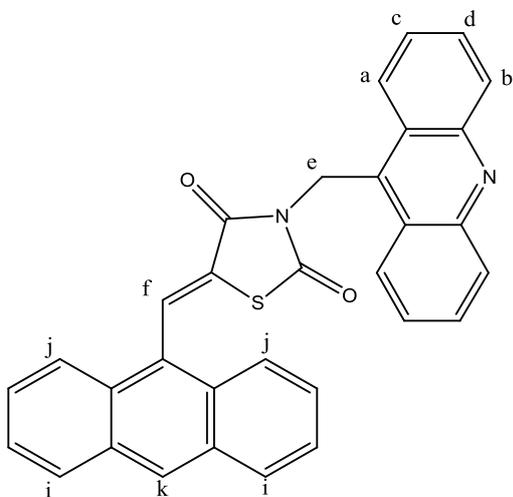


Figura 34. Espectro do RMN ^1H do LPSF AA-60

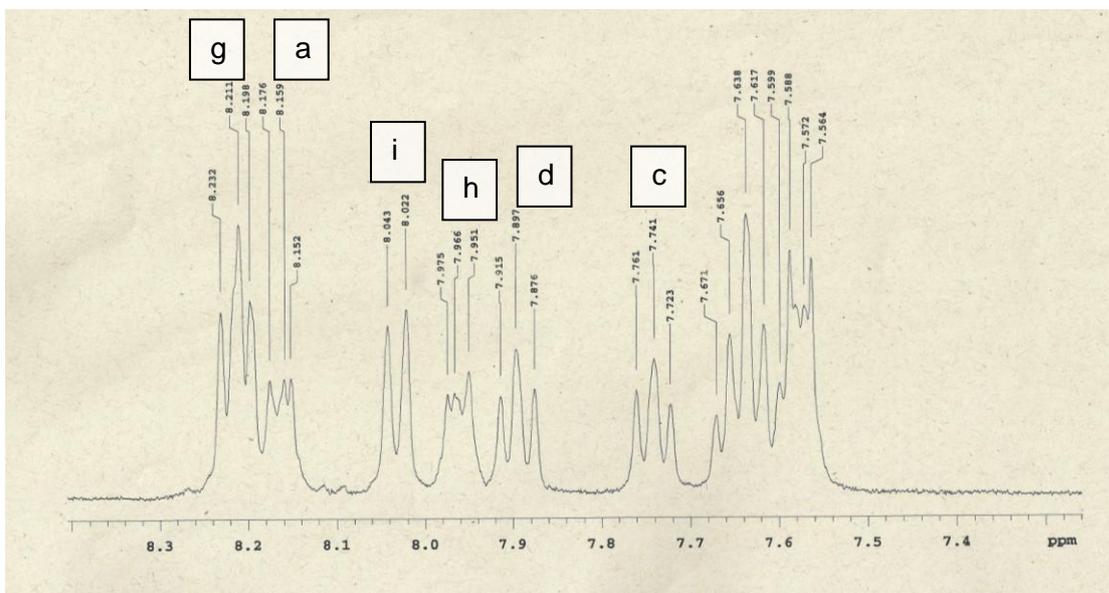
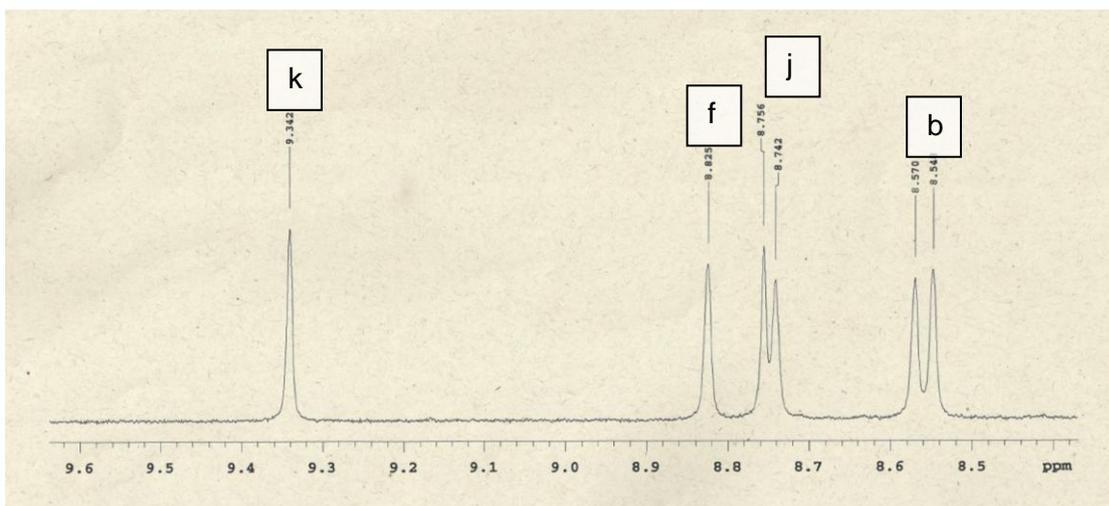


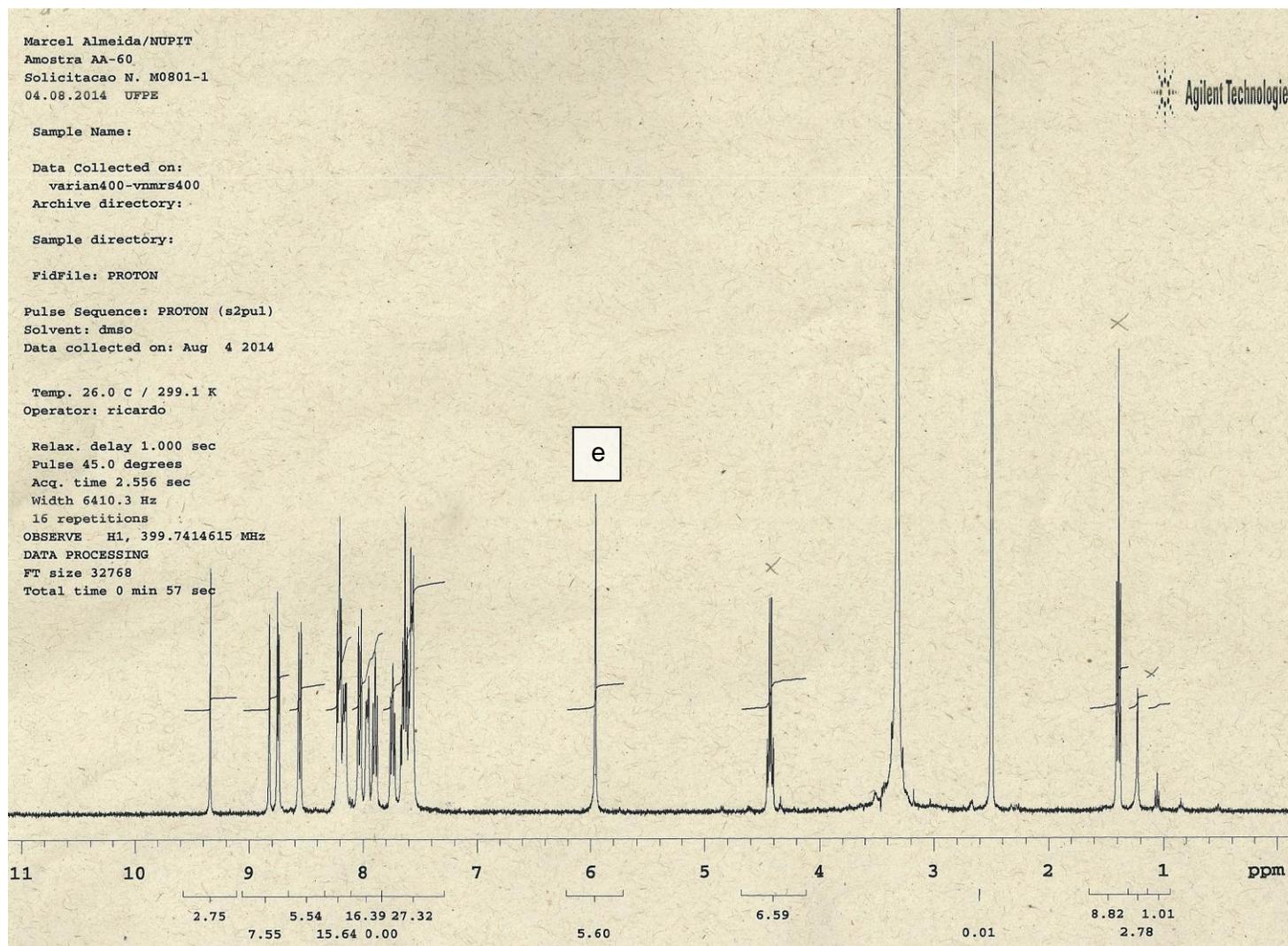
Figura 35. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-60

Figura 36. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-60) (MM=496)

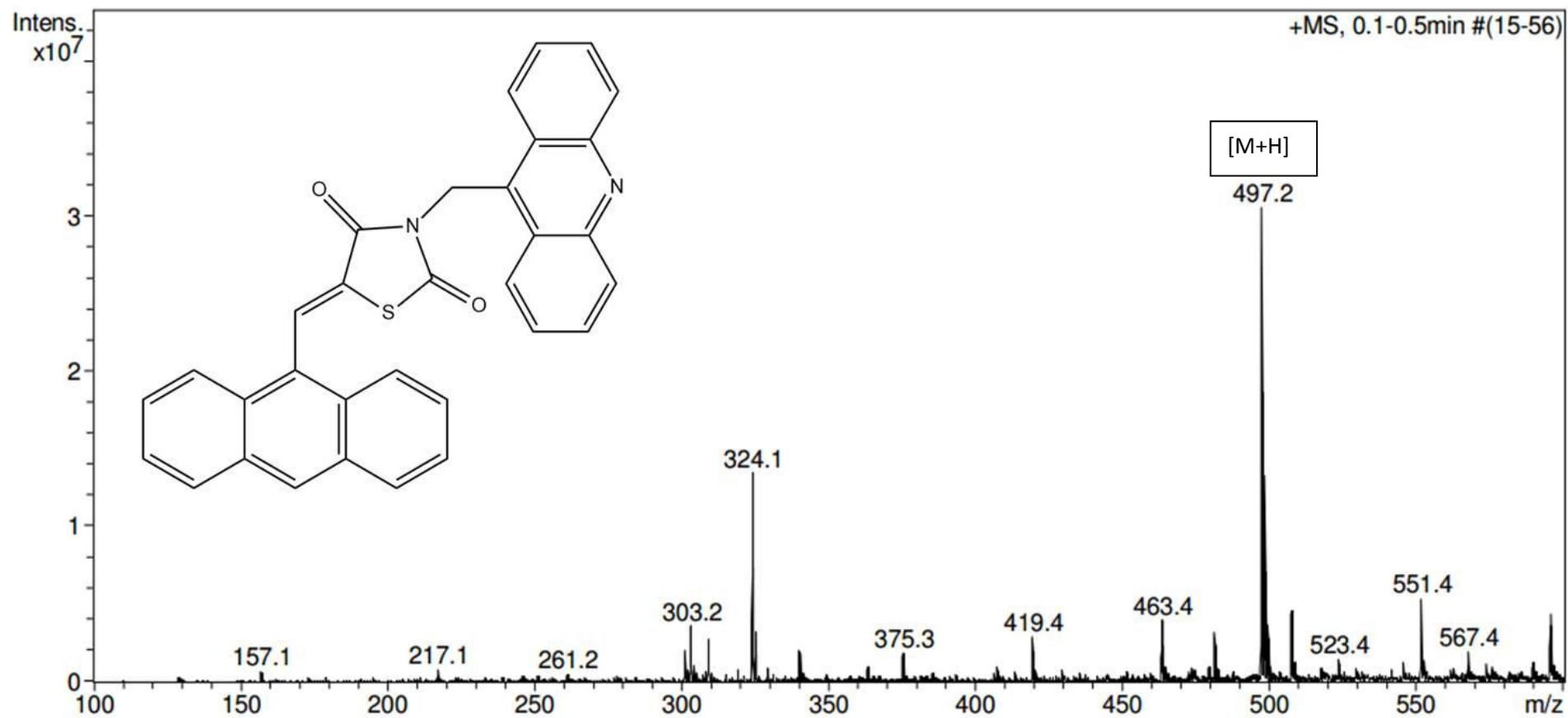


Figura 37. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-il-metil-5-(antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-60) (MM=496)

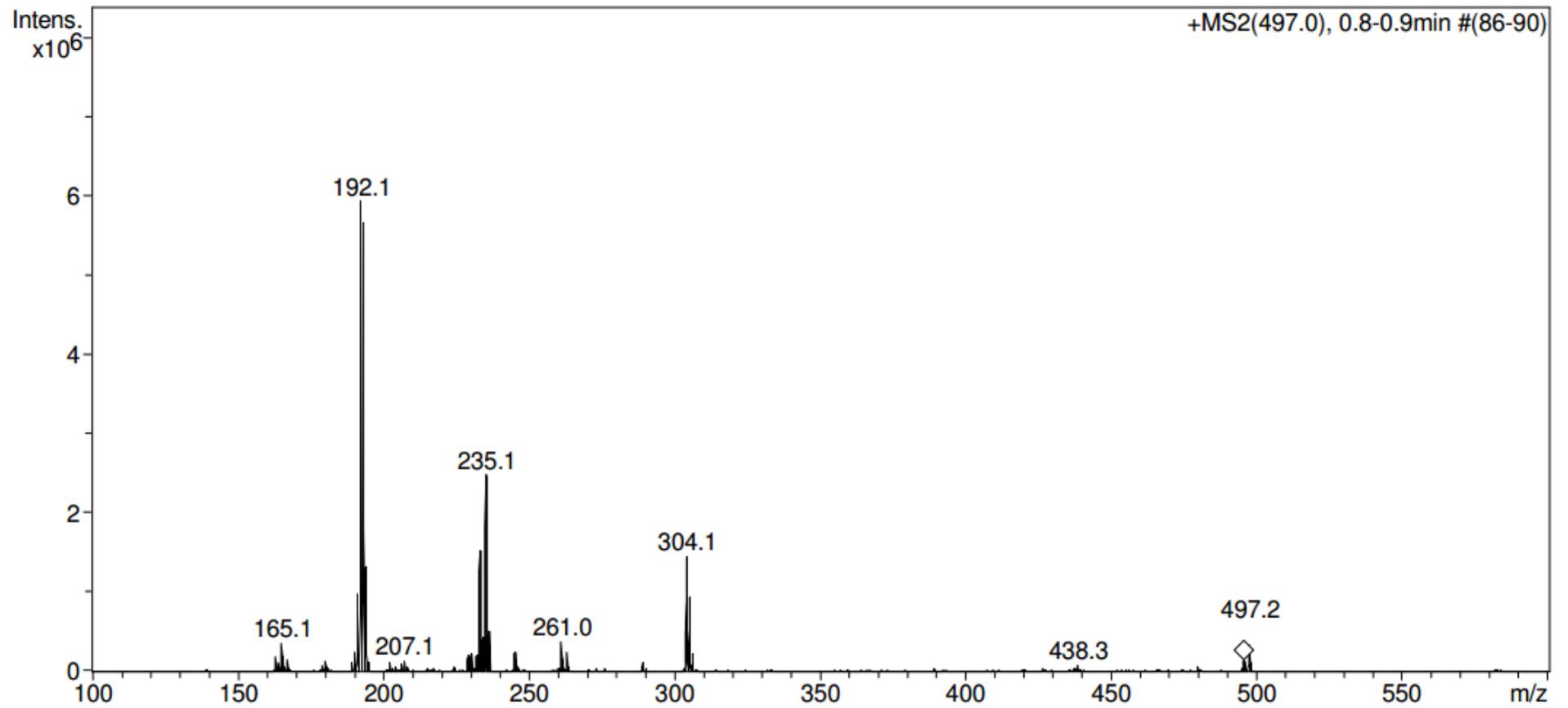


Figura 38. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-60 (tR = 15 minutos)

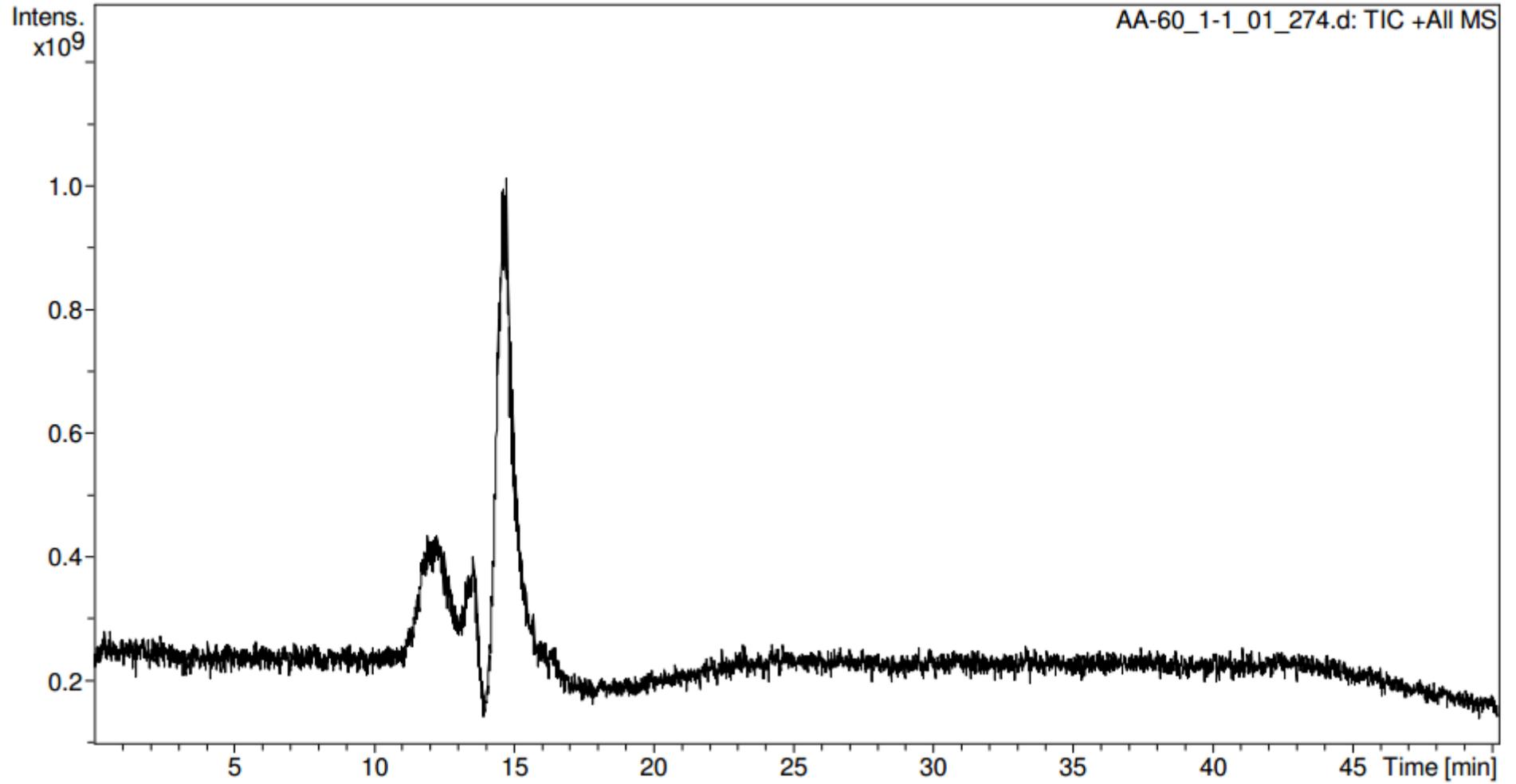
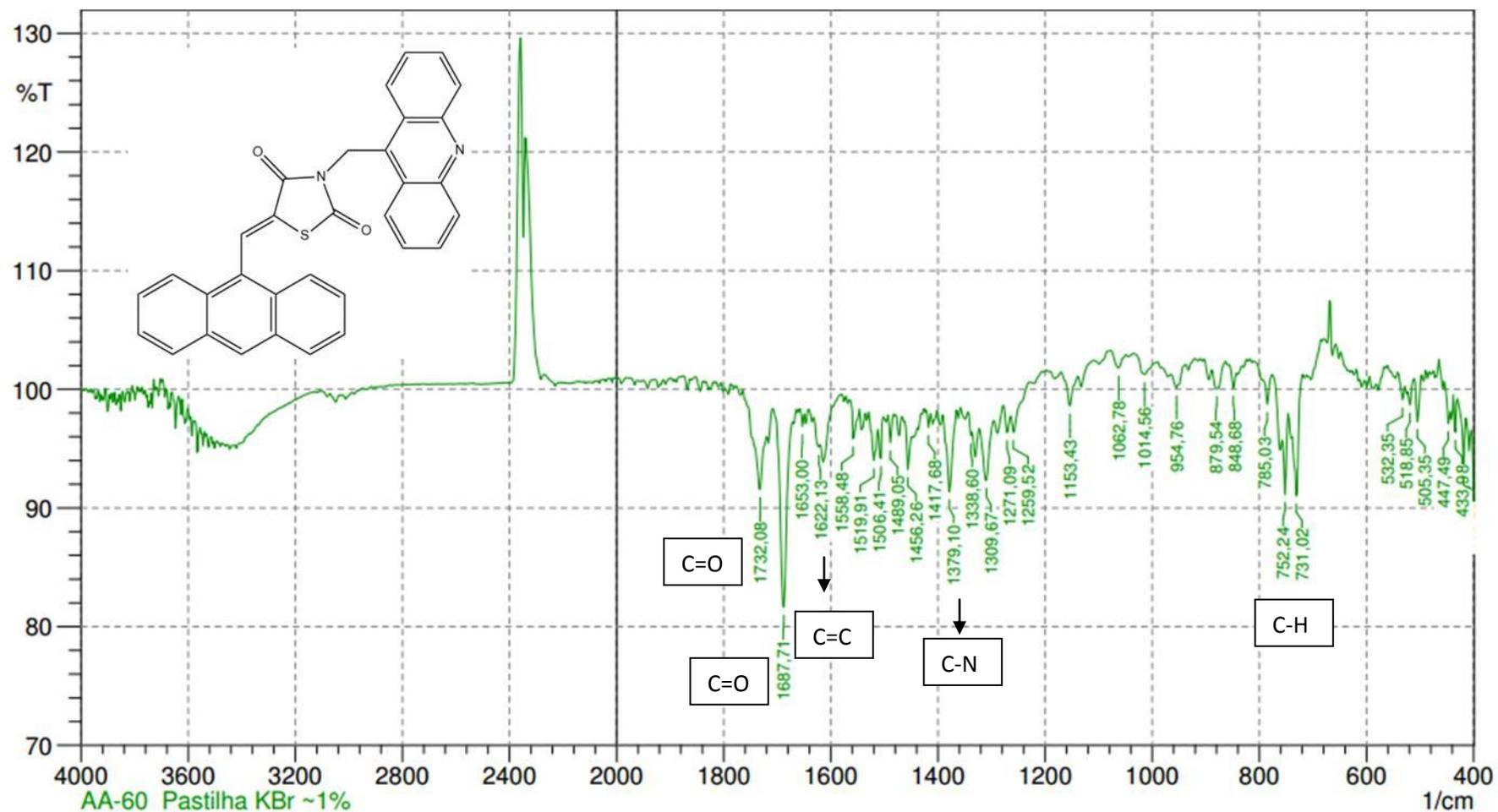


Figura 39. Espectro de IV do LPSF AA- 60. Deformação axial normal de C=O, 1732 cm^{-1} , 1687 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1622 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1379 cm^{-1} . Deformação angular fora do plano de C-H de aromático, 752 cm^{-1} .



Composto 4-(3-acridin-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil) benzonitrila (LPSF AA-61)

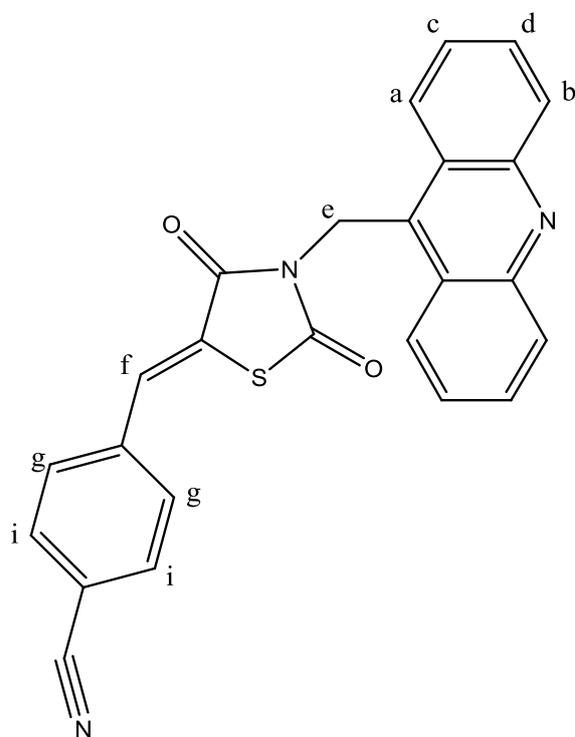


Figura 40. Espectro do RMN ¹H do LPSF AA-61

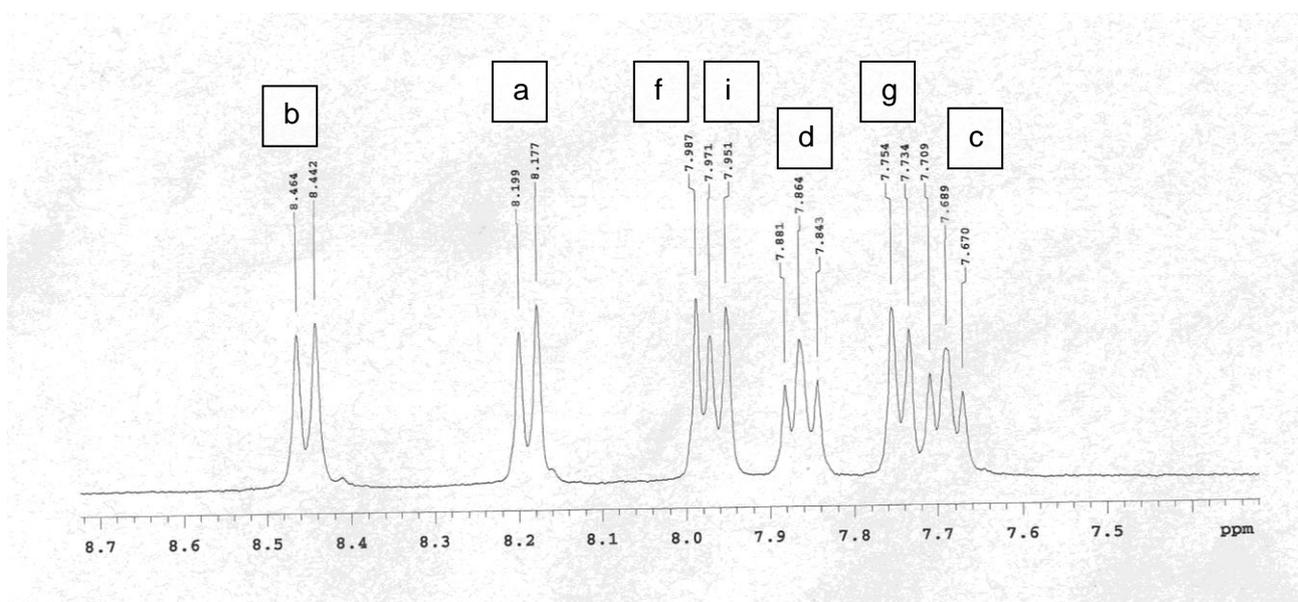


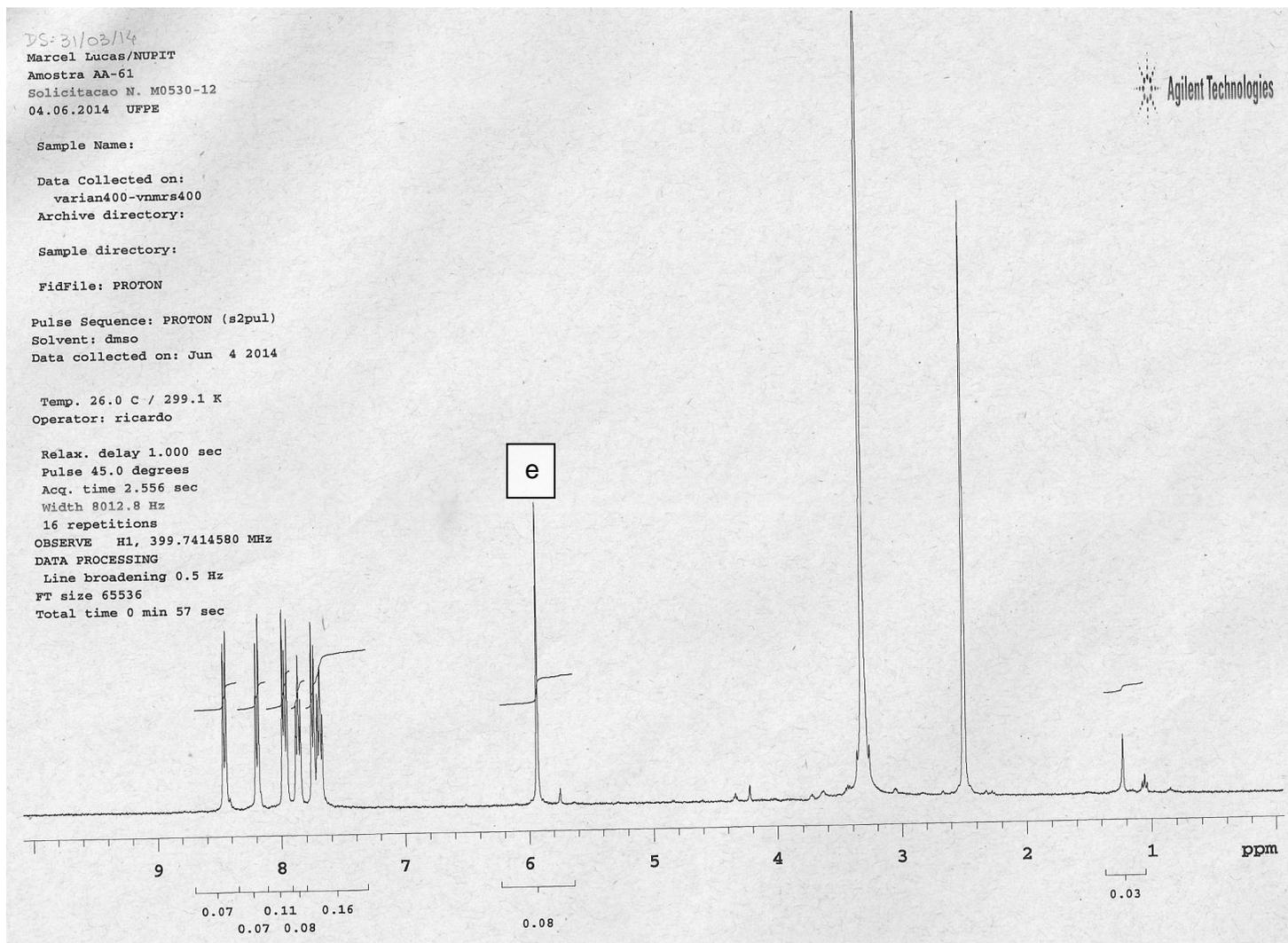
Figura 41. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-61

Figura 42. Espectro de Massas por IES do 4-(3-acridin-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil)benzonitrila (LPSF AA-61) (MM=421)

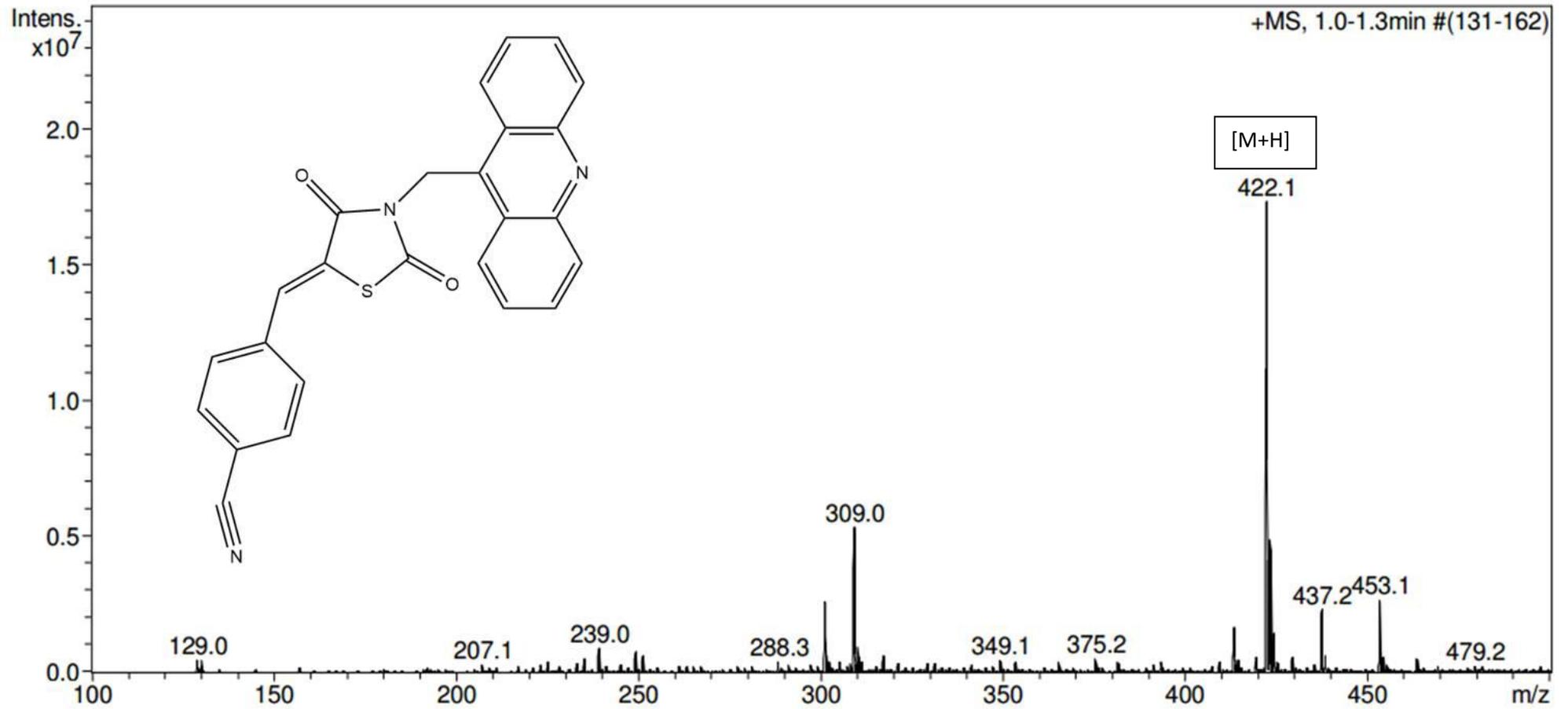


Figura 43. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 4-(3-acridin-9-il-metil-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ilidenometil)benzonnitrila (LPSF AA-61) (MM=421)

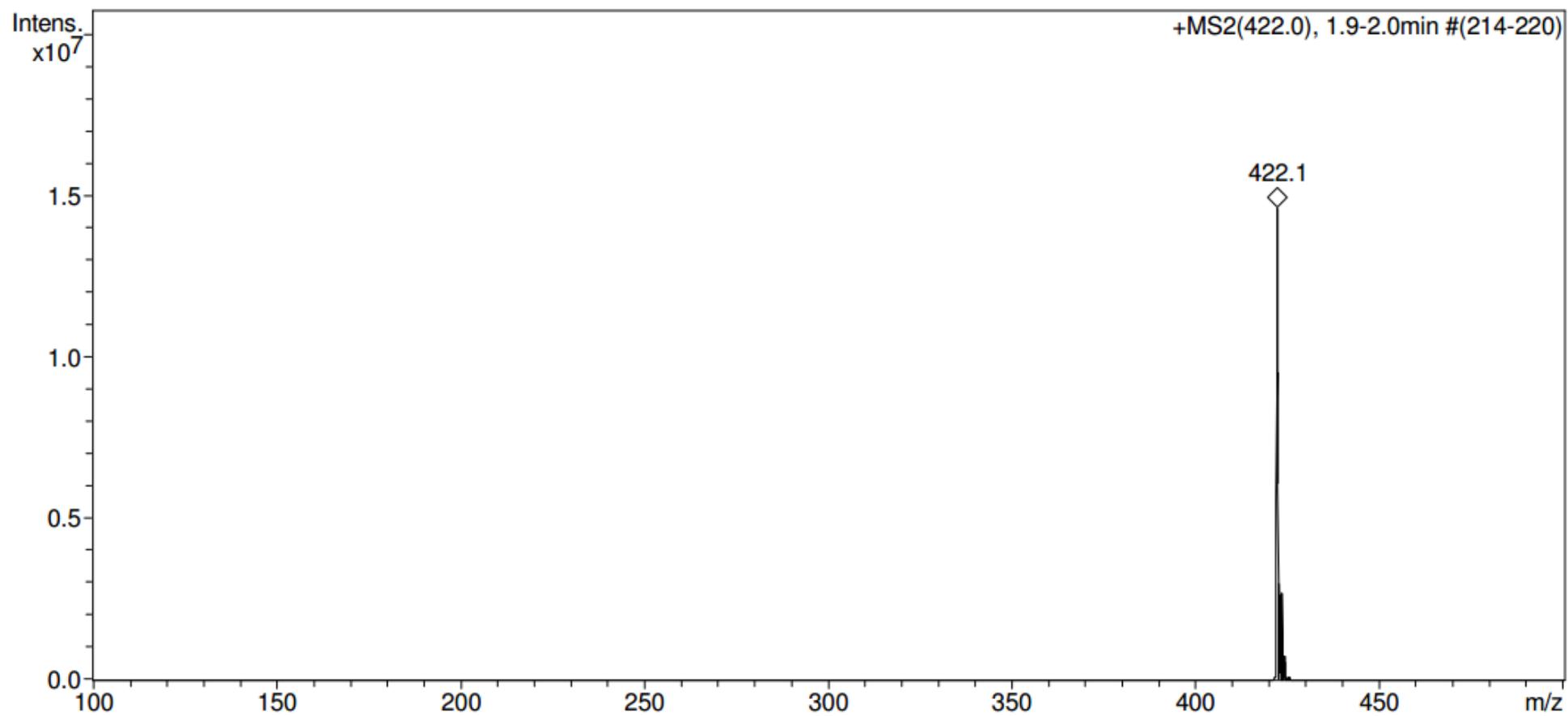


Figura 44. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-61 (tR = 22 minutos)

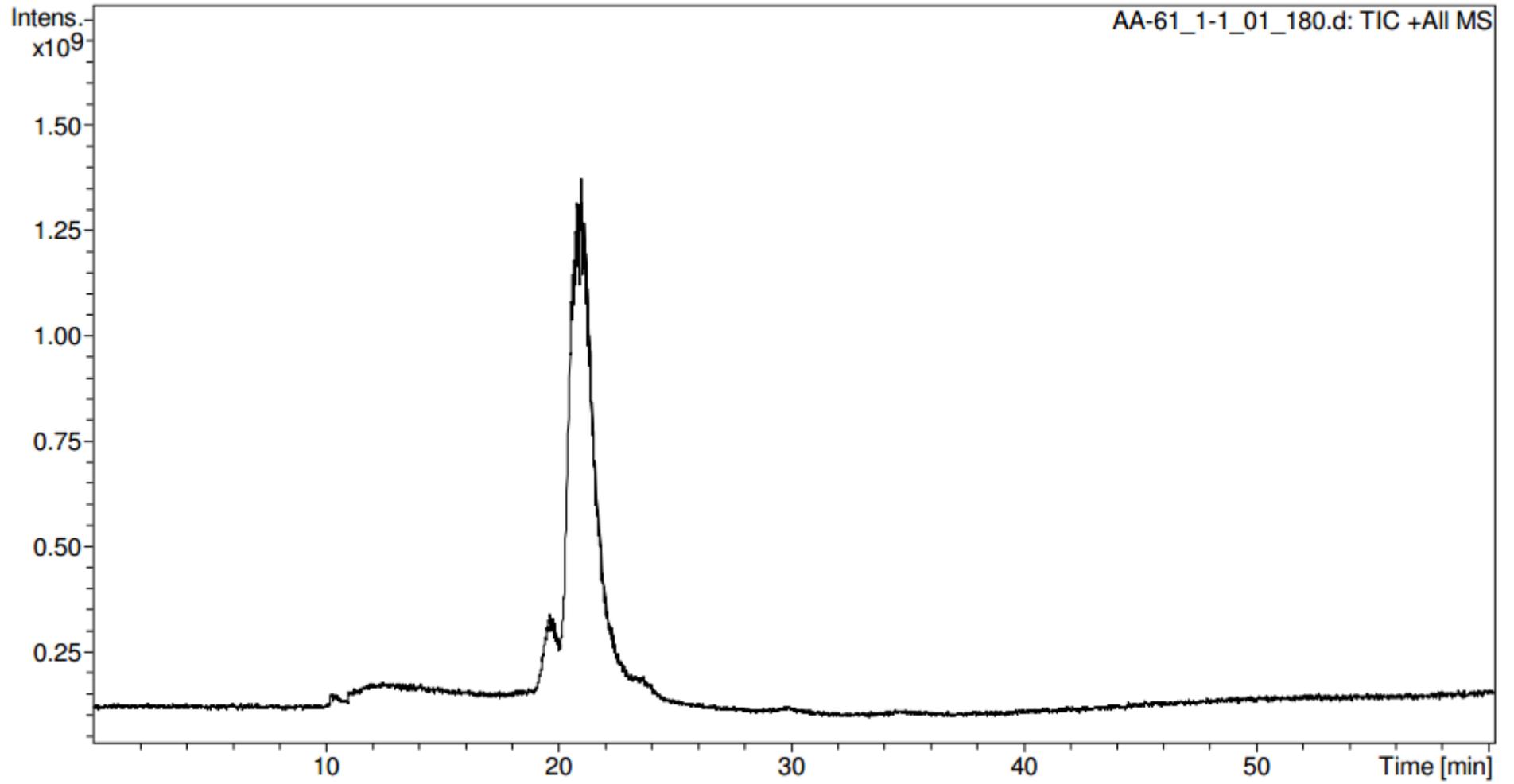
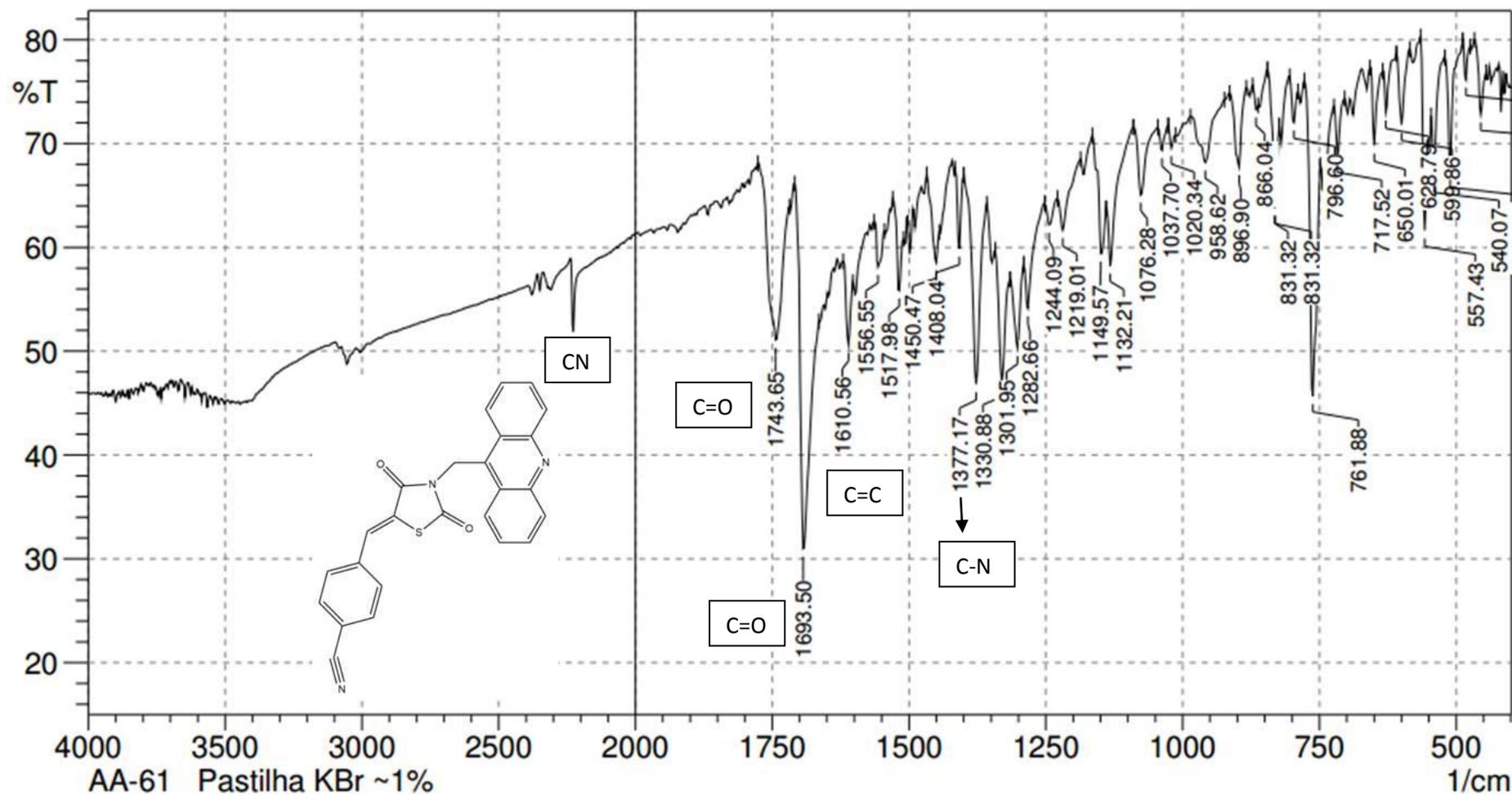


Figura 45. Espectro de IV do LPSF AA- 61. Deformação axial normal de C=O, 1743 cm^{-1} , 1693 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1610 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1377 cm^{-1} . Deformação axial de $\text{C}\equiv\text{N}$, 2200 cm^{-1}



Composto 3-acridina-9-il-metil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62)

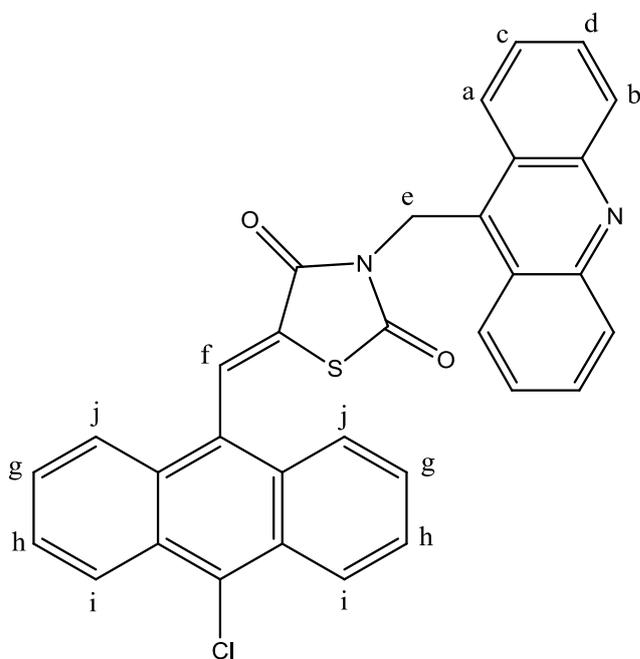


Figura 46. Espectro do RMN ^1H do LPSF AA- 62

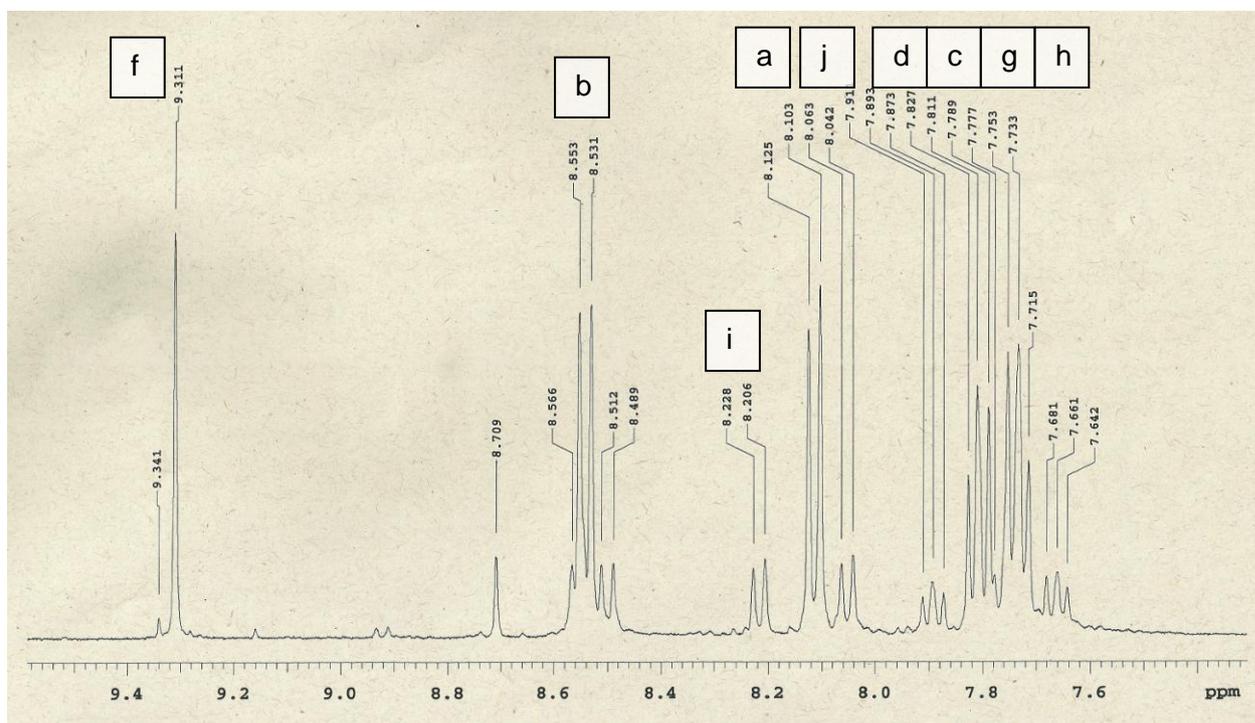


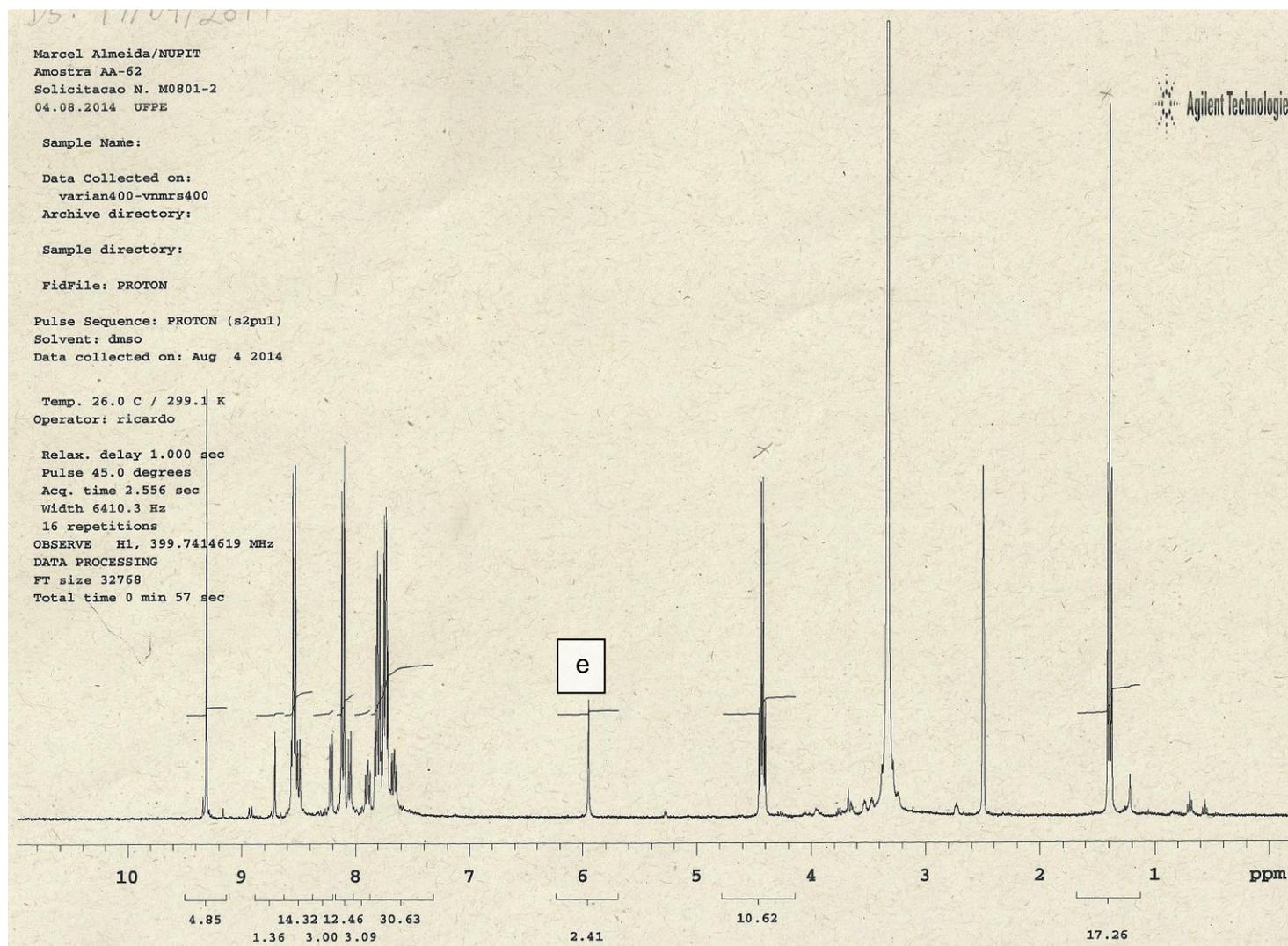
Figura 47. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-62

Figura 48. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-il-metil-5-(10-cloro-antracen-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62) (MM=530)

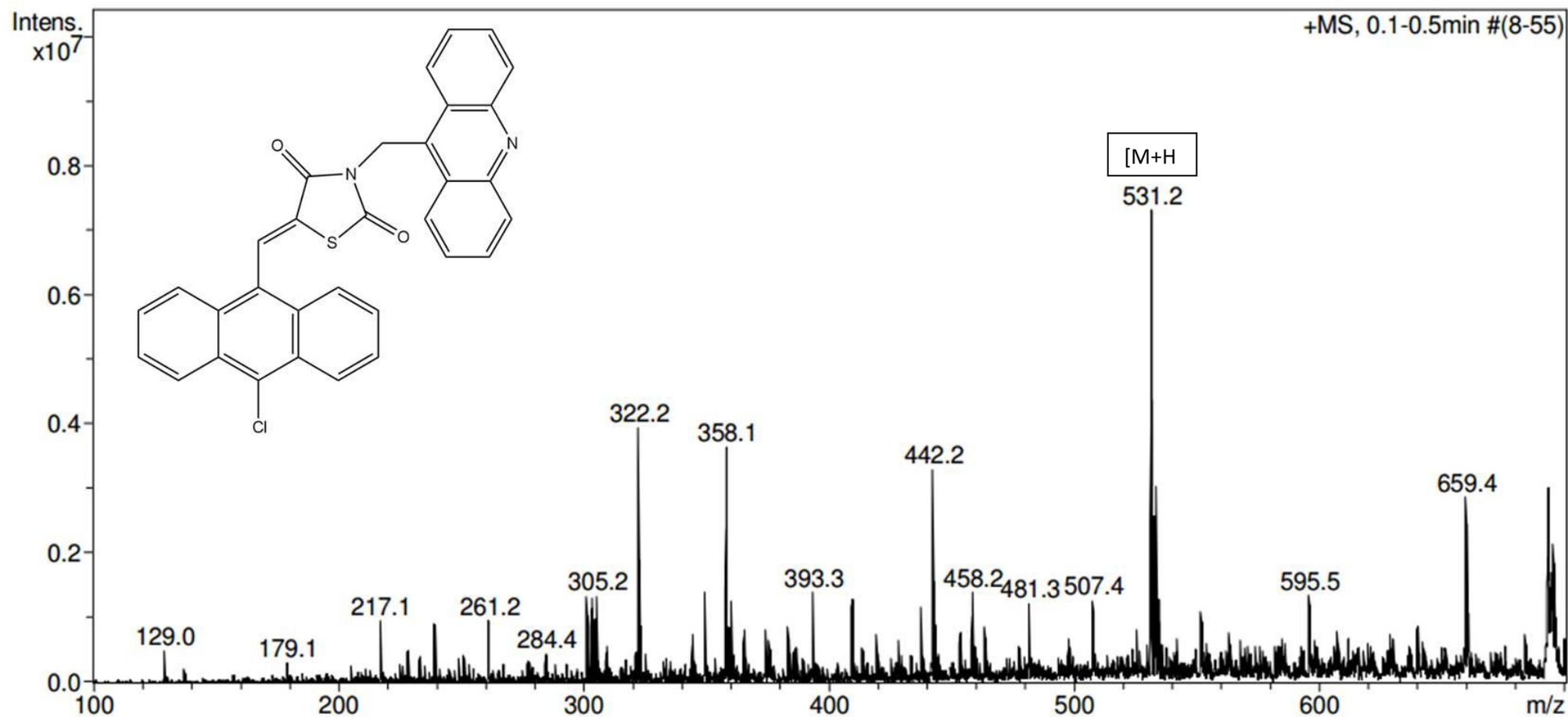


Figura 49. Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-il-metil-5-(10-cloro-antracén-9-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-62) (MM=530)

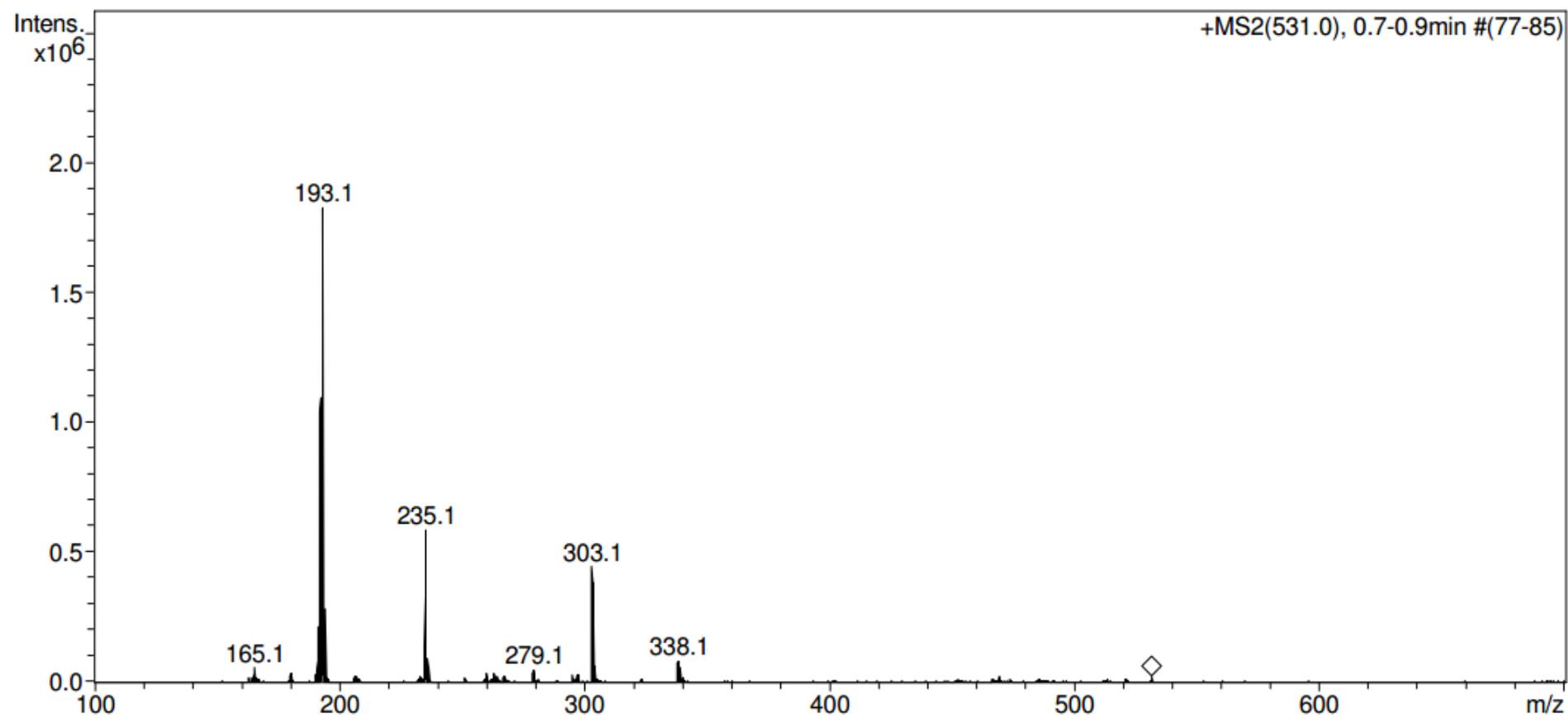


Figura 50. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-62 (tR = 24 minutos)

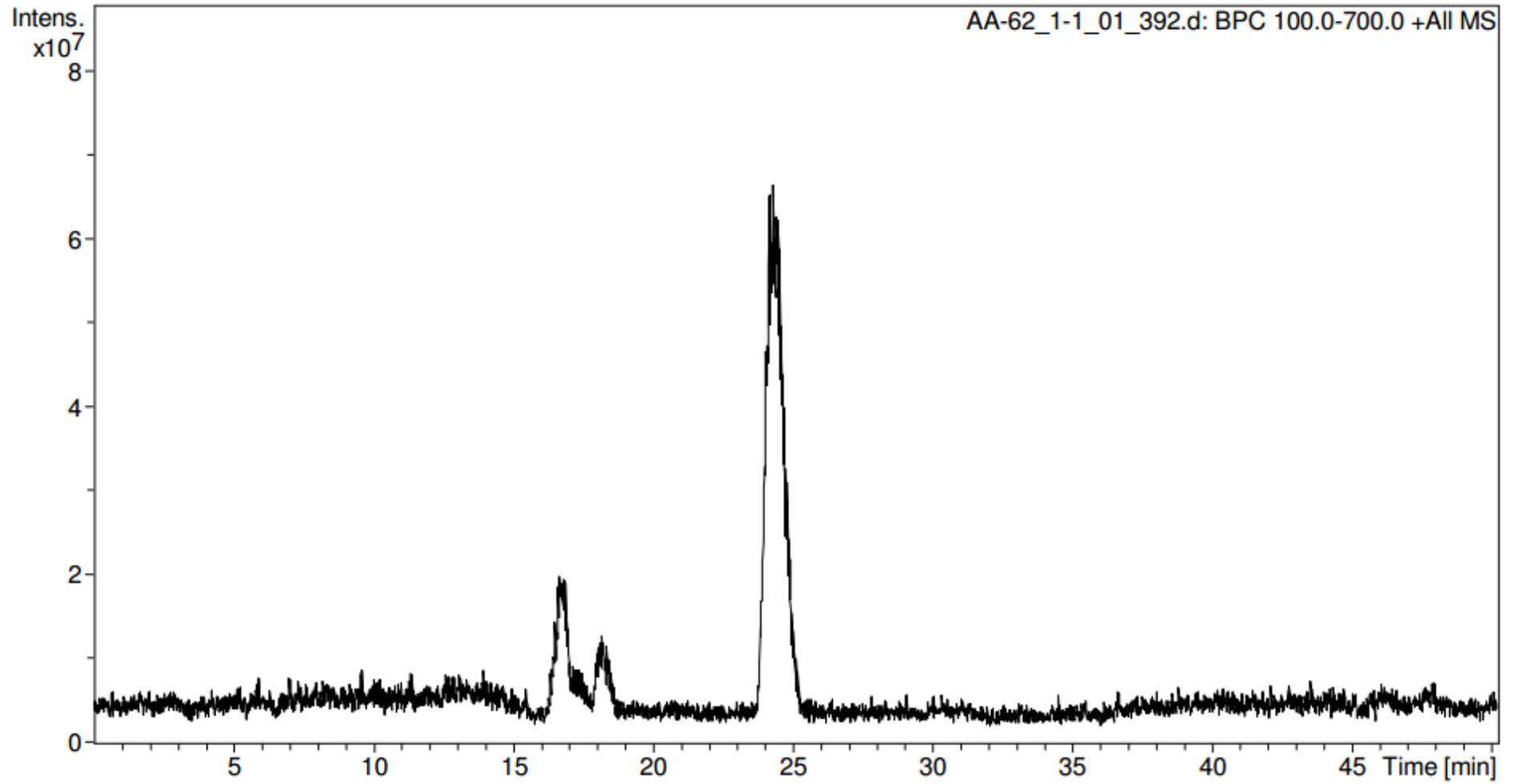
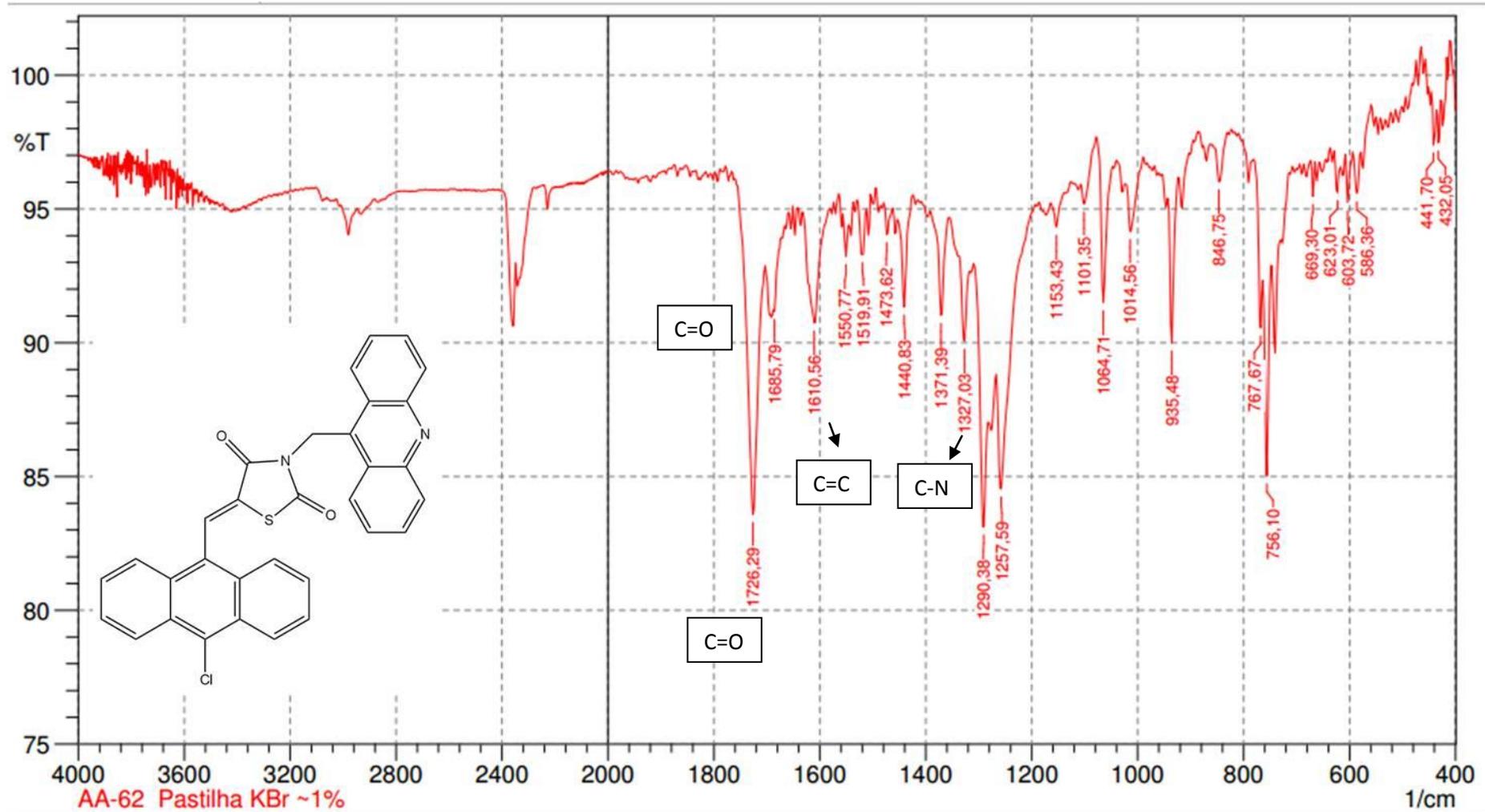


Figura 51. Espectro de IV do LPSF AA- 62. Deformação axial normal de C=O, 1726 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1610 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1327 cm^{-1} .



Composto 3-acridina-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63)

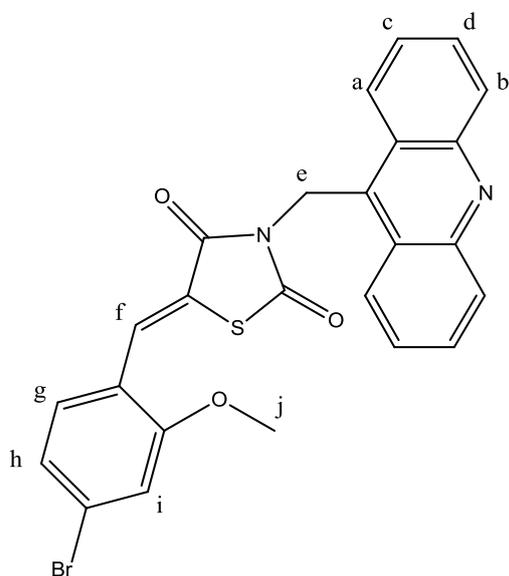


Figura 52. Espectro do RMN ^1H do LPSF AA- 63

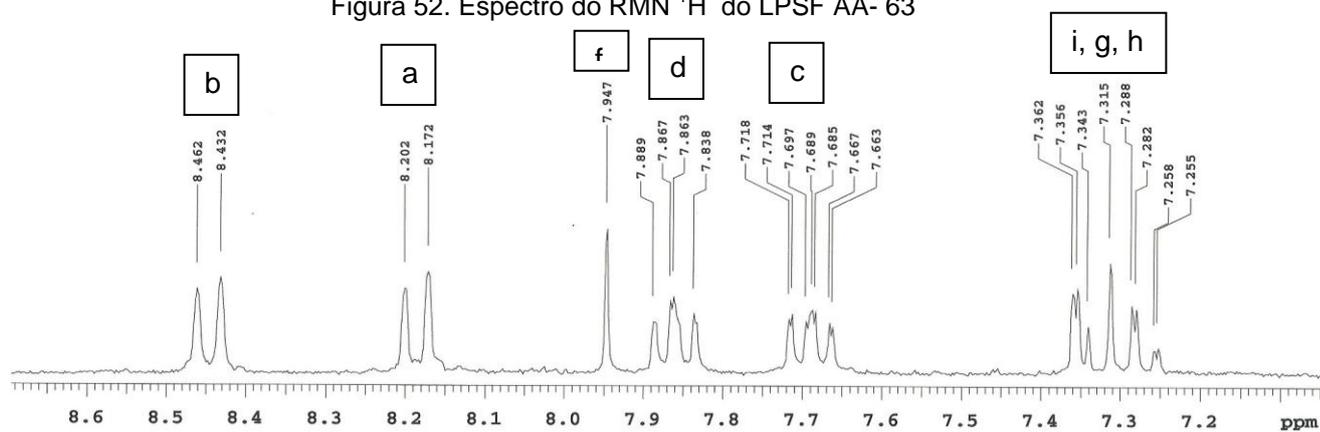


Figura 53. Espectro Total do RMN ^1H do LPSF AA-63

Marcel / Marina Pitta
Amostra AA-63
Solicitacao N. N0106-1
07.01.2015 UFPE

Sample Name:
p5mmASW_calib
Data Collected on:
Agilent300-vnmrs300
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data/RMN_2013/agosto
Sample directory:
p5mmASW_calib_20131010_01
FidFile: N0106_1.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Jan 7 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.704 sec
Width 4807.7 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 299.9456659 MHz
DATA PROCESSING
FT size 16384
Total time 1 min 27 sec

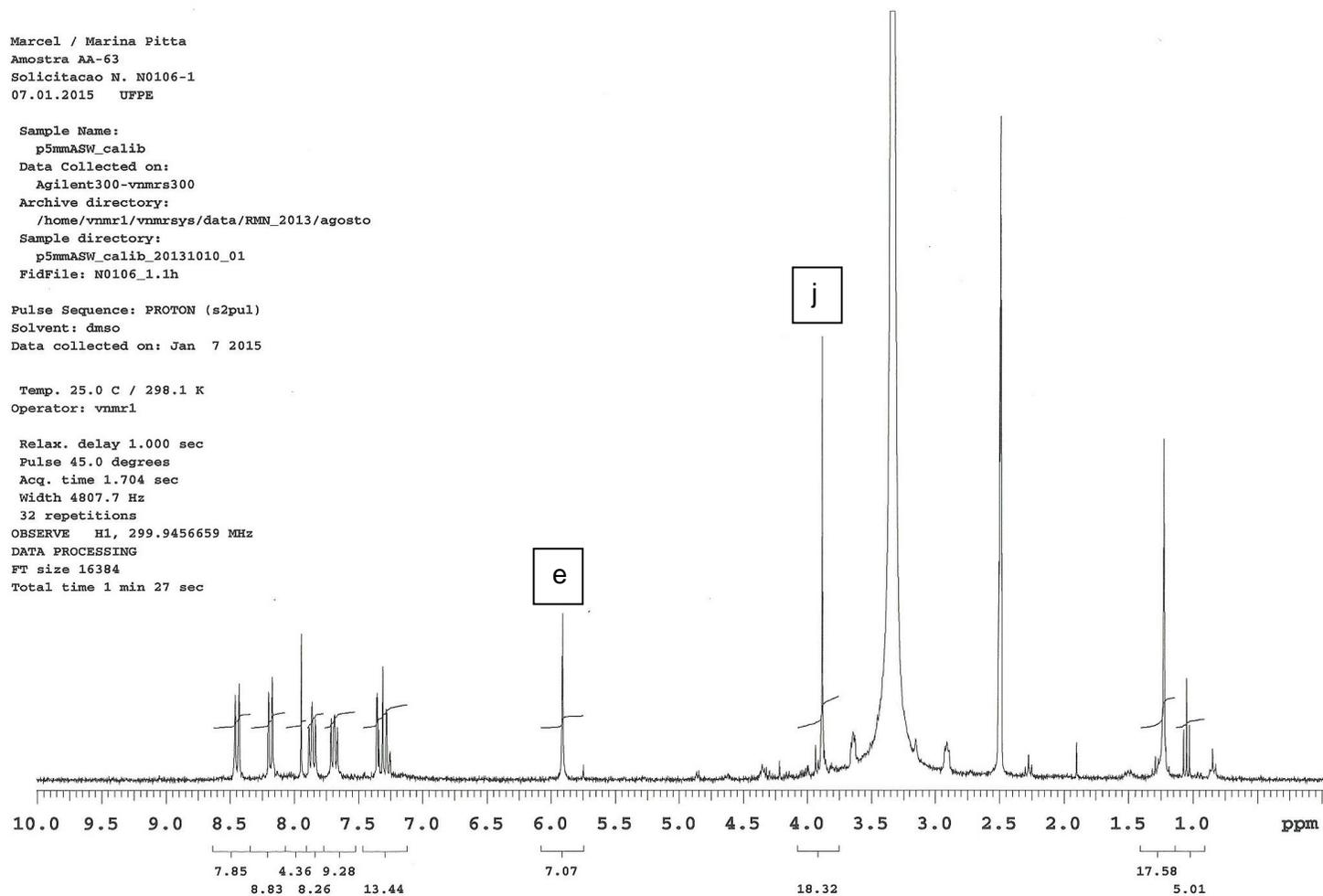


Figura 54. Espectro de Massas por IES do 3-acridin-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63) (MM=504)

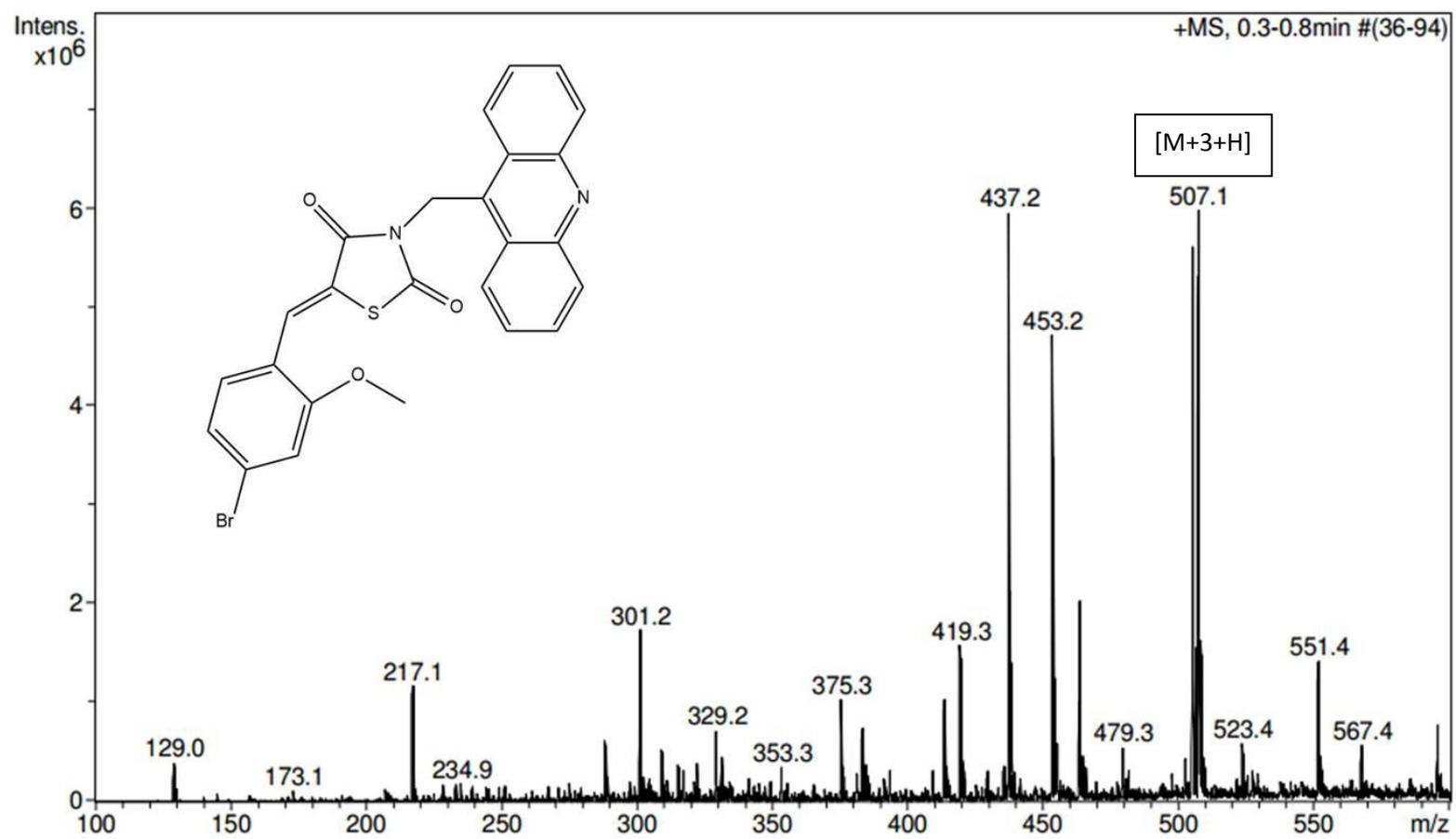


Figura 55. . Espectro de Massas +MS2 por IES (modo positivo) do 3-acridin-9-il-metil-5-(4-bromo-2-metoxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF AA-63) (MM=504)

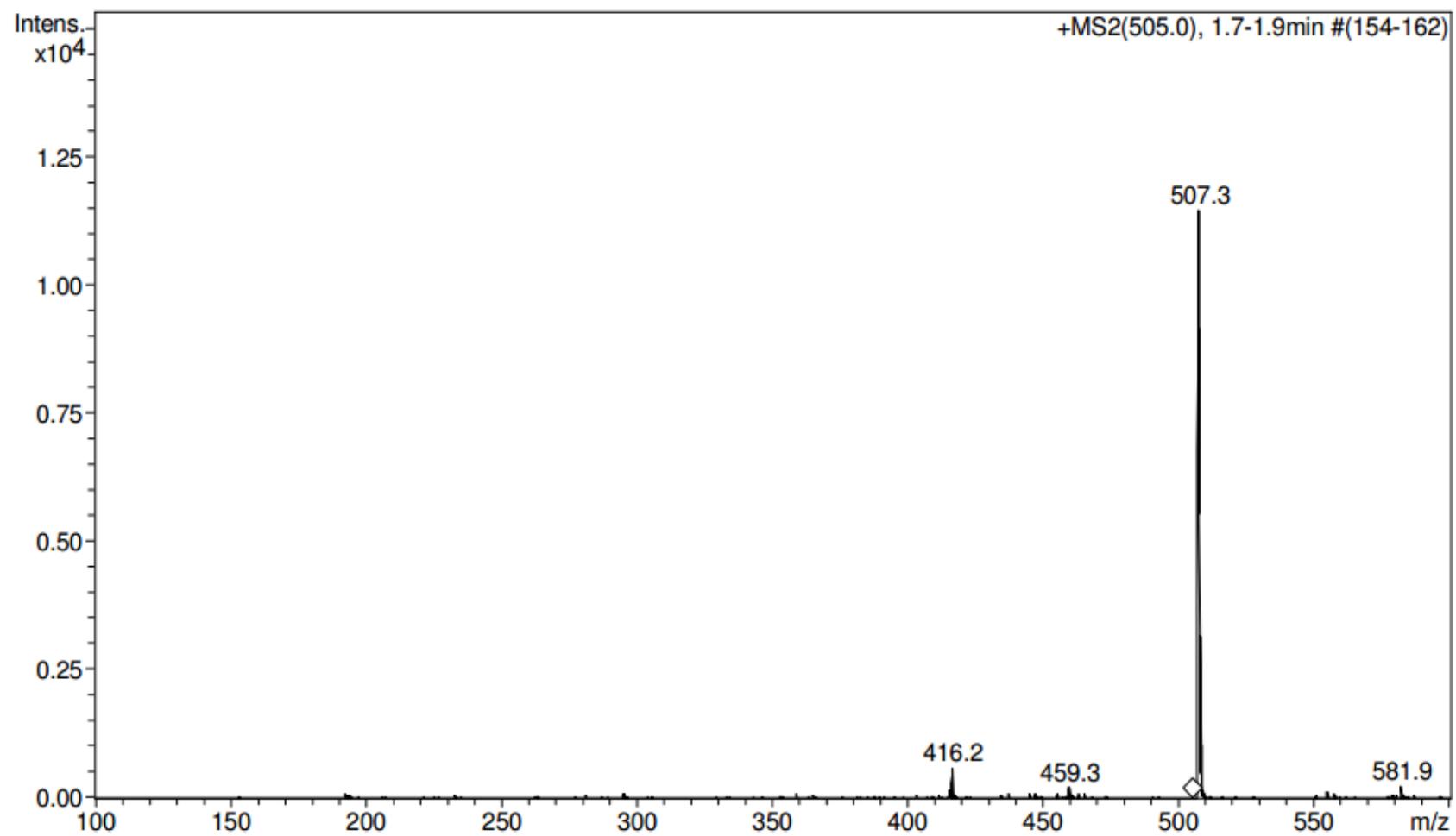


Figura 56. Espectro de LC-MS por IES em modo positivo do LPSF AA-63 (tR = 20 minutos)

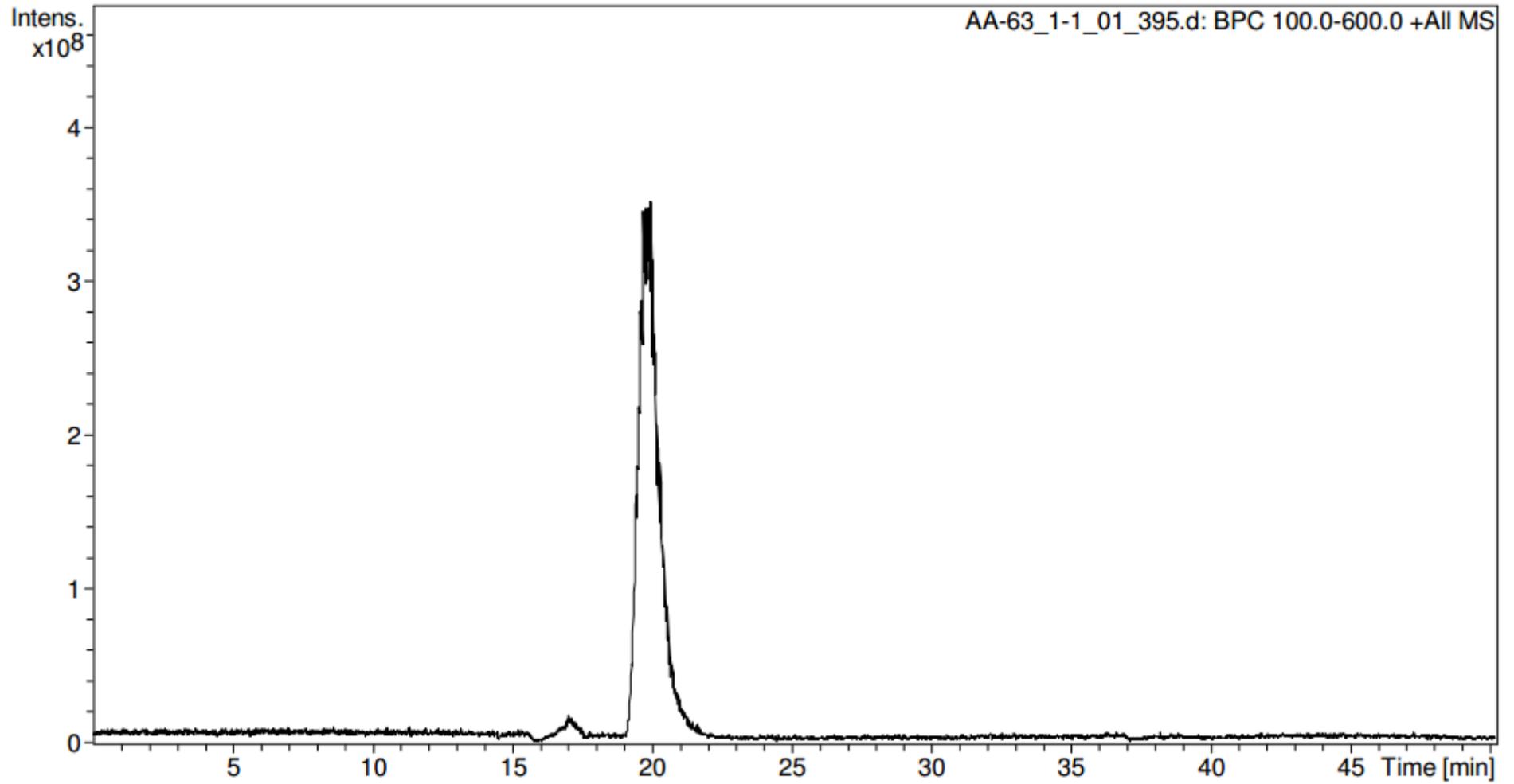
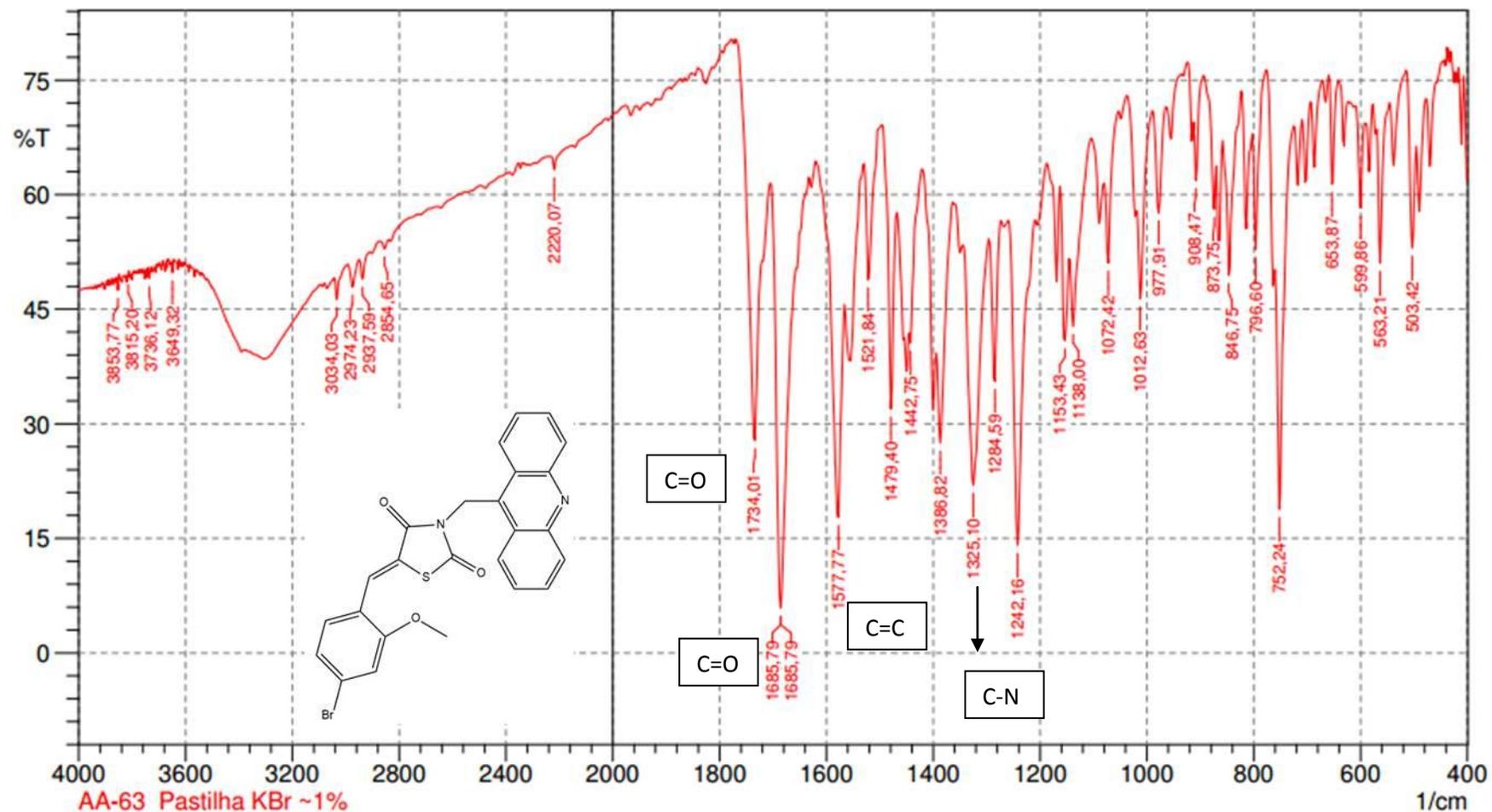


Figura 57. Espectro de IV do LPSF AA- 63. Deformação axial normal de C=O, 1734 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} . Deformação axial das ligações C=C do anel, 1577 cm^{-1} . Deformação axial de C-N, 1325 cm^{-1} .



10. APÊNDICE B: Patente depositada. Tiazacridinas utilizadas na terapia anticâncer.

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2013/053034 A3

(43) Data de Publicação Internacional
18 de Abril de 2013 (18.04.2013)

WIPO | PCT

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C07D 277/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2012/000421

(22) Data do Depósito Internacional :
24 de Outubro de 2012 (24.10.2012)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
PI1106333-5
10 de Outubro de 2011 (10.10.2011) BR

(71) Requerentes (para todos os Estados designados, exceto US) : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE** [BR/BR]; Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP-50670-901 Recife - PE (BR). **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC** [BR/BR]; Av. da Universidade 2853, Benfica, Fortaleza, CE, CEP:60020-181 (BR).

(72) Inventores; e

(71) Requerentes (para US unicamente) : **LINS GALDINO. Suely** [BR/BR]; AV. Boa Viagem, 5554 - Apto. 202, Boa Viagem - Recife - PE, CEP: 51030-000 (BR). **DA ROCHA PITTA, Ivan** [BR/BR]; Avenida Boa Viagem 5554, Apto 202, Boa Viagem, CEP: 51.030-000 Recife - PE (BR). **DO CARMO ALVES DE LIMA. Maria** [BR/BR]; Rua Beta, 55, Sucupira - Jaboatão Dos Guararapes -, Pernambuco, CEP: 54280-550 (BR). **GALDINO DA ROCHA PITTA, Marina**; AV. Boa Viagem, 5554 - Apto. 202, Boa Viagem - Recife - PE, CEP: 51030-000 (BR). **ARAUJO BARROS, Francisco Washington** [BR/BR]; Rua Gustavo Sampaio, 372, Parque Araxá - Fortaleza - Ceará, CEP: 60450-635 (BR). **DO Ó**

PESSOA, Cláudia [BR/BR]; Rua Eduardo Garcia, 888 - APTO. 901, Aldeota - Fortaleza - Ceará, CEP: 60150-100 (BR). **DE MORAES FILHO, Manoel Odorico** [BR/BR]; Rua República Do Líbano, 881/500, Meireles - Fortaleza - Ceará, CEP: 60160-140 (BR). **DA ROCHA PITTA, Maira Galdino** [BR/BR]; Av. Boa Viagem, 5554 - Apto. 202, Boa Viagem - Recife - Pe, CEP: 51030-000 (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- a data de depósito do pedido internacional cai dentro do prazo de dois meses a contar da data de expiração do período de prioridade (Regra 26bis.3)

(Continua na página seguinte)

(54) Title : THIAZACRIDINES USED IN ANTI-CANCER THERAPY

(54) Título : TIAZACRIDINAS UTILIZADAS NA TERAPIA ANTICÂNCER

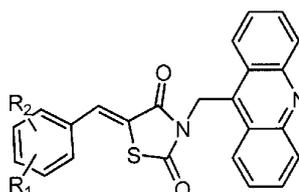


Figura 4

(57) Abstract : The present invention relates to 3-acridinyl-methyl-thiazolidine-2,4-dione-derived compounds, also denominated thiazacridines, and to the related processes for chemically synthesizing same, and also to the therapeutic use thereof for treating cancer.

(57) Resumo : A presente invenção é relativa a compostos derivados da 3-acridinilmetil-tiazolidina- 2,4-diona, também denominados tiazacridinas, bem como aos respectivos processos para sua síntese química, bem como seu uso terapêutico no tratamento do câncer.

WO 2013/053034 A3

11. APÊNDICE C: Artigo. Synthesis, characterization and *in vitro* anticancer activity of novel 3-(acridin-9-ilmethyl) thiazolidine-2,4-dione derivatives

Synthesis, characterization and *in vitro* anticancer activity of novel 3-(acridin-9-ilmethyl) thiazolidine-2,4-dione derivatives

Marcel Lucas de Almeida², Valécia de Cassia Mendonça da Costa¹, Michelly Cristiny Pereira¹, Moacyr de Jesus Barreto de Melo Rego¹, Marina Galdino da Rocha Pitta², Ivan da Rocha Pitta^{2*}

1- Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Suely Galdino (NUPIT-SG), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901 Recife, Brazil.

2- Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF, Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – GPIT, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil.

* Address correspondence to Dr Ivan da Rocha Pitta, UFPE, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901 Recife, Brazil; e-mail: irpitta@gmail.com

Abstract

It is estimated that by 2030 cancer will be responsible for up to 12-million deaths. A series of seven new 3-acridin-9-ylmethyl-thiazolidine-2,4-dione derivatives were synthesized. All the compounds were evaluated for their cell antiproliferation activity with the 3-(4,5-dimethyl-2-thiozoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT assay. The cytotoxic effects of the synthesized compounds were tested against several tumoral cell lines, namely Jurkat (acute T-cell leukemia); HL-60 (acute promyelocytic leukemia); DU 145 (prostate cancer); HEPG2 (liver cancer); RAJI

(Burkitt's lymphoma); K562 (chronic myelogenous leukemia) and normal cells PBMC (healthy volunteers). Among the synthesized compounds, 3-(acridin-9-ylmethyl)-5-(3-(trifluoromethoxy) benzylidene) thiazolidine-2,4-dione exhibited the most potent anticancer activity against Jurkat (IC_{50} $6,63 \pm 2,65 \mu\text{M}$), HL-60 (IC_{50} $6,51 \mu\text{M}$), K562 (IC_{50} $3,97 \pm 1,36 \mu\text{M}$) and 3-(acridin-9-ylmethyl)-5-(anthracen-9-ylmethylene)thiazolidine-2,4-dione exhibited the most potent anticancer activity against prostate carcinoma cells (IC_{50} $7,22 \pm 3,12 \mu\text{M}$). The results indicate that these derivatives show great potential for use in the treatment of prostate carcinoma and leukemias. New studies *in vitro* and *in vivo* will be needed to clarify the mechanisms of action of these compounds.

Keywords Acridine. Thiazolidine. Cancer. Medicinal Chemistry.

Introduction

As a result to recent discoveries of new biological targets and the possibility of developing new anticancer agents with high efficacy and selectivity as well as lower cytotoxicity, the demand for innovative new agents is of the utmost importance (Raza et al, 2012).

Our group has investigated the thiazacridines as potential alternatives for the cancer treatment (Pitta *et al.*, 2012; Barros *et al.* 2012). The thiazacridines has in its molecule, thiazolidinediones and acridines cores fused into molecular hybridization process.

As thiazolidines-2,4-diones (TZDs) have been widely investigated due to its involvement in the regulation of diverse physiological processes such as cell proliferation, angiogenesis, inflammation, metabolism of glucose, as well as a strong association with inhibition of T-cell activation and inflammatory diseases (Junior *et al*, 2013). In turn, acridines is known by their anticancer properties and they are used in clinics since the 70s for leukemia treatment (Cholewiński G., *et al*, 2011). The biological activity of acridines is primarily attributable to the aromatic planarity of these structures, which can intercalate inside the double-stranded structure of DNA, thereby

interfering with the cellular machinery, and several known biological target (Belmont *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2013; Lafayette *et al.*, 2013).

The antitumor effects of acridines are associated not only with their interaction to DNA, but also to proteins, especially those involved on cell proliferation as topoisomerases and telomerases (Paulikova *et al.*, 2012; Cholewinski *et al.*, 2011).

The aim of this study was the synthesis of novel thiazacridine derivatives and evaluate the antiproliferative effect against diferente histotype cancer cell lines.

Material and Methods:

The structures of compounds synthesized were confirmed by spectroscopic techniques such as nuclear magnetic resonance (^1H NMR) model Varian 300 e 400 MHz, using solvent DMSO- d_6 for analysis of thiazacridines. The peaks of the signals were designated s - singlet; d - doublet; t - triplet; m - multiplet. Melting points were determinated in a capillary tube using Buchi, melting point M-565. Infrared spectra (IR) were recorded on a Prestige-21, Shimadzu model 01801. Mass Spectra (MS) were recorded using Bruker HCT Ultra, model G1948A. Coupled to high performance liquid chromatography model Shimadzu LC-20AD and were performed by electrospray ionization in positive or negative mode. The base peak of the MS spectrum is set to 100 (in percentage), and the height of the others peaks are measured relative to the base peak.

Synthesis of thiazacridines derivatives:

Synthesis 3-(acridin-9-ylmethyl)thiazolidine-2,4-dione (3)

Thiazolidine-2,4-dione, compound **1**, (1.5 eq) and sodium hydroxide, previously solubilized in ethanol, were stirred for 10 min at room temperature (25 °C). 9 Bromomethylacridine, compound **2**, (1.0 eq) was added, and the mixture was stirred at 62 °C for 7 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered and washed with water. The product obtained was a yellow solid. Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$. Melting point (m.p.): 196–197 °C. Yield: 51 %. IR (KBr, cm^{-1}): 2889 (–CH₂–), 1750 (C=O), 1694 (C=O), 750 (C–H). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Acr–H, 4 pos.), 8.17 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Acr–H, 1 pos.), 7.83–7.88 (m, 2H, Acr–H, 3

pos.), 7.65–7.70 (m, 2H, Acr–H, 2 pos.), 5.75 (s, 2H, N–CH₂), 4.23 (s, 2H, S–CH₂). MS *m/z* (%): (M+H)⁺309.1 (100), calculated 308; +MS2 309.1 (56), 235 (100), 192 (98).

General preparation of 3-acridin-9-ylmethyl-5-arylidenthiazolidine-2,4-dione (9a–g)

3-acridin-9-ylmethyl thiazolidine-2,4-dione, compound **5**, (1.0 eq) and either ethyl 3-(anthracen-9-yl)-2-cyanoacrylate, ethyl 3-(10-chloroanthracen-9-yl)-2-cyanoacrylate or one of the phenyl-substituted ethyl 2-cyano-3-phenylacrylate, compounds **8a–g**, were refluxed in ethanol in the presence of morpholine and heated at 60 °C for 1–4 h. After this period, the mixture was filtered and washed with water and ethanol (Pitta *et al.*, 2012).

3-(acridin-9-ylmethyl)-5-(4-(methylthio)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (9a)

yellow solid. C₂₅H₁₈N₂O₂S₂. m.p.: 247 °C. Yield: 57 %. IR (KBr, cm⁻¹): 1734 (C=O), 1680 (C=O), 1606 (C=C), 1375 (C-N). H¹ NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,46 (d, 2H, J= 8,8 Hz, -AcrH) (b), 8,18 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (a), 7,89 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (t, 2H, J=15,2 Hz, j= 8,4 Hz, AcrH) (d), 7,68 (t, 2H, J=15,2 Hz, j=7,6 Hz, AcrH) (c), 7,51 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH) (g), 7,37 (d, 2H, J=8,8 Hz, ArH) (i), 5,92 (s, 2H, -CH₂) (e), 1,23 (s, 3H, -CH₃) (h). MS *m/z* (%): (M+H)⁺ 443.2 (100), (M+2+H)⁺ 444.2 (31), calculated 442; +MS2 193.1 (65.3), 235.1 (100), 428.1 (43).

3-(acridin-9-ylmethyl)-5-(3-(trifluoromethoxy)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (9b)

white solid. C₂₅H₁₅F₃N₂O₃S. m.p.: 195.8 °C. Yield: 61 %. IR (KBr, cm⁻¹): 1745 (C=O), 1691 (C=O), 1614 (C=C), 1375 (C-N), 673 (C=C). H¹ NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,45 (d, 2H, J=9,2 Hz, -AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=8,4 Hz, AcrH) (a), 7,97 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (mm, 2H, J=15,2 Hz, j= 5,6 Hz, AcrH) (d), 7,66 (mm, 5H, J=56 Hz, j= 6 Hz, ArH e AcrH) (h,c,j,g), 7,48 (d, 1H, J=8,4 Hz, ArH) (i), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e). MS *m/z* (%): (M+H)⁺ 481 (100), calculated 480; +MS2 235 (100), 193 (39).

3-(acridin-9-ylmethyl)-5-(4-(trifluoromethoxy)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione (9c)

yellow solid. C₂₅H₁₅F₃N₂O₃S. m.p.: 236.6 °C. Yield: 73.5 %. IR (KBr, cm⁻¹): 1737 (C=O), 1685 (C=O), 1600 (C=C), 1384 (C-N). H¹ NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,46 (d, 2H, J=8,8 Hz, -AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=8,4 Hz, AcrH) (a), 7,97 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (t, 2H, J=15,2 Hz, j= 8 Hz, AcrH) (d), 7,72 (d, 2H, J=8,8 Hz, ArH) (g), 7,68 (d, 2H, J=8 Hz, AcrH) (c), 7,51 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH) (i), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e). MS *m/z* (%): (M+H)⁺ 481 (100), 366 (35), calculated 480; +MS2 481 (100).

3-(acridin-9-ylmethyl)-5-(anthracen-9-ylmethylene)thiazolidine-2,4-dione (9d)

yellow solid. C₃₂H₂₀N₂O₂S. m.p.: 226.4 °C. Yield: 40 %. IR (KBr, cm⁻¹): 1732 (C=O), 1687 (C=O), 1622 (C=C), 1379 (C-N). H¹ NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,34 (s, 1H, ArH) (k), 8,82 (s, 1H, =CH) (f), 8,75 (d, 2H, J = 5,6 Hz, ArH) (j), 8,56 (d, 2H, J=8,8 Hz, -AcrH) (b), 8,21 (t, 3H, J = 13,6 Hz, j = 8,4 Hz, ArH) (g), 8,16 (t, 3H, J=9,6 Hz, j = 6,8 Hz, AcrH) (a), 8,03 (d, 2H, J = 8,4Hz, ArH) (i), 7,96 (t, 2H, J = 9,6 Hz, j = 6 Hz, ArH) (h), 7,89 (t, 2H, J=15,6 Hz, j= 7,2 Hz, AcrH) (d), 7,74 (t, 2H, J=15,2 Hz, j = 7,2 Hz, AcrH) (c), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e). MS *m/z* (%):(M+H)⁺ 497 (100), 324(44), calculated 496; +MS2 235 (42), 193 (95), 192 (100).

4-((3-(acridin-9-ylmethyl)-2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)benzonitrile (9e)

yellow solid. C₂₅H₁₅N₃O₂S. m.p.: 256 °C. Yield: 77 %. IR (KBr, cm⁻¹): 1743 (C=O), 1693 (C=O), 1610 (C=C), 1377 (C-N), 2200 (CN). H¹ NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,45 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (a), 7,99 (s, 1H, =CH) (f), 7,96 (d, 2H, J = 8Hz, ArH) (i), 7,86 (t, 2H, J=15,2 Hz, j= 8,4 Hz, AcrH) (d), 7,74 (d, 2H, J=8 Hz, ArH) (g), 7,69 (t, 2H, J=15,6 Hz, j = 8 Hz, AcrH) (c), 5,93 (s, 2H, -CH₂) (e). MS *m/z* (%):(M+H)⁺ 422 (100), 309 (31), calculated 421; +MS2 422 (100).

3-(acridin-9-ylmethyl)-5-((10-chloroanthracen-9-yl)methylene)thiazolidine-2,4-dione (9f)

yellow solid. C₃₂H₁₉ClN₂O₂S. m.p.: 173.6 °C. Yield: 58 %. IR (KBr, cm⁻¹): 1726 (C=O), 1685 (C=O), 1610 (C=C), 1327 (C-N). H¹NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,31 (s, 1H, =CH) (f), 8,53 (m, 2H, J=30,8 Hz, j=9,2 Hz, AcrH) (b), 8,21 (d, 2H, J = 8,8 Hz, ArH) (i), 8,11 (d, 2H, J=8,8 Hz, AcrH) (a), 8,05 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH) (j), 7,89 (t, 2H, J=15,2 Hz, j= 7,2 Hz, AcrH) (d), 7,8 (dd, 2H, J=20 Hz, j = 6,4 Hz, AcrH) (c), 7,73 (t, 2H, J=15,2 Hz, j=8 Hz, ArH) (g), 7,66 (t, 2H, J=15,6 Hz, j=8 Hz, ArH) (h), 5,95 (s, 2H, -CH₂) (e). MS *m/z* (%): (M+H)⁺ 531 (100), 533 (41), 442.2 (45), 358 (50), 322.2 (54), calculated 530; +MS2 235 (32), 193 (100), 192 (60).

3-(acridin-9-ylmethyl)-5-(4-bromo-2-methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione (9g)

yellow solid. C₂₅H₁₇BrN₂O₃S. m.p.: 239.5 °C. Yield: 64 %. IR (KBr, cm⁻¹): 1734 (C=O), 1685 (C=O), 1577 (C=C), 1325 (C-N). H¹NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8,45 (d, 2H, J=9 Hz, AcrH) (b), 8,19 (d, 2H, J=9 Hz, AcrH) (a), 7,95 (s, 1H, =CH) (f), 7,86 (dd, 2H, J = 15,3 Hz, j=6,6 Hz, ArH) (d), 7,69 (m, 2H, J=16,5 Hz, j= 6,3 Hz, AcrH) (c), 7,31 (m, 3H, J=32,1 Hz, j=8,1 Hz, ArH) (i,g,h), 5,91 (s, 2H, -CH₂) (e), 3,89 (s, 3H, O-CH₃). MS *m/z* (%): (M+3+H)⁺ 507 (100), 505 (94), 453.2 (79), 437.2 (99), calculated 504; +MS2 507 (100).

Cell lines: The hematopoietic tumor cells Jukart (acute T cell leukemia), RAJI (Burkitt's lymphoma cells), HL60 (acute promyelocytic leucemia), K562 (chronic myelogenous leukemia) and solid tumors DU-145 (prostate cancer) and Hep G2 (hepatocellular carcinoma) were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Corporation) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml fungizon, and 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Life Technologies) in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Cell proliferation assay: Cell viability was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Molecular Probes, Invitrogen) assay following the manufacturer's instructions. Briefly, cells (1 x 10⁴/well) were seeded in 96-well plates and were treated with varying concentrations of the thiazacridines derivatives over a 72-hour time. We used the chemotherapeutic Amsacrine as positive

control for analysis of toxicity. At the end of incubation, the absorbance was read at 570 nm.

Selectivity Assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals were obtained from heparinized blood and were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Cells were only used when viability was >98%. Briefly, cells (1×10^6 /well) were seeded in 96-well plates and were treated with varying concentrations of the thiazacridines derivatives over a 48-hour time. After cell viability were evaluated as described above. All subjects gave their written consent to participate. The study was approved by the ethics committee (CEP / CCS / UFPE- 11006) of the UFPE.

Statistical analysis

The Student's t-test and one-way ANOVA were used for statistical analysis (Prism software), considering a significance level of 5%. Values are expressed as the mean \pm SD of three or more replicate experiments.

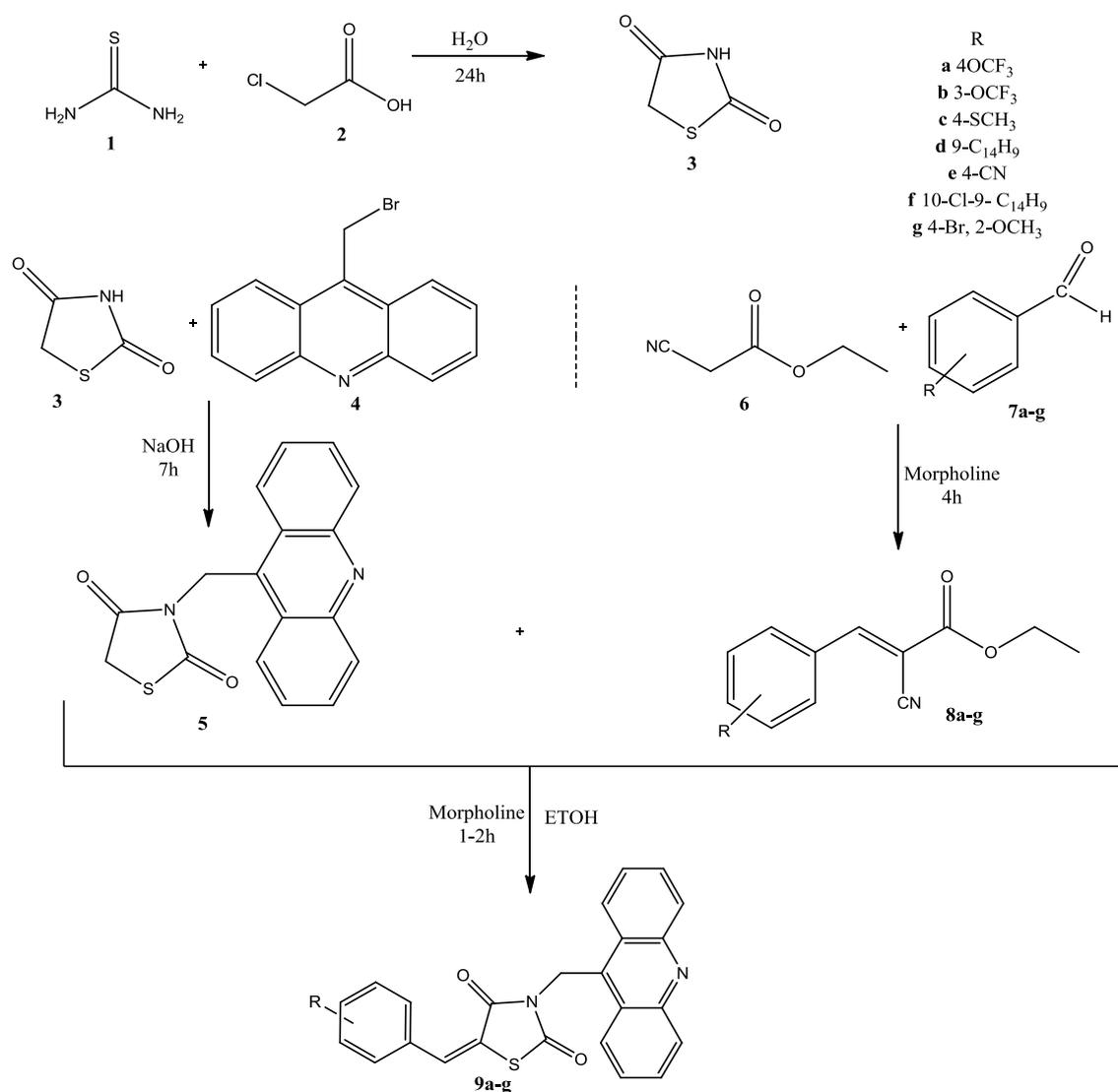
Results

Chemistry

The output of thiazacridines derivatives was performed in four steps summarized in Scheme 1. The first was the synthesis of thiazolidine-2,4-dione (**3**) with thiourea (**1**) and monochloroacetic acid (**2**) in water as solvent, after that it was N-alkylated at position 3 in a reaction in the presence of 9-(Bromomethyl)acridine (**4**), yielding intermediate 3-acridin-9-ylmethyl thiazolidine-2,4-dione (LPSF / AA-1A) (**5**). In the third step, the formation of LPSF IPs (ethyl cyanoacetate esters) (**8a-g**), formed from ethyl cyanoacetate (**6**) with aromatic aldehydes (**7a-g**) by Knoevenagel reaction (Cunha *et al.*, 2012). In a last step, the IPs (**8**) reacted with AA-1A (**5**), forming the final compounds LPSF AAs (**9a-g**), held by a call Michael addition reaction, carried out in the presence of morpholine and ethanol as a solvent (Gu *et al.*, 2007; Mattos *et al.*, 1999). To

demonstrate that the reaction occurred, it is observed that the intermediate LPSF AA-1A singlet spectrum of ^1H NMR appears at 4.2 ppm represents two hydrogens of the position 5 of the thiazolidine ring. It does not appear in any of the spectra of the final compounds, meaning that the Michael addition, the last reaction step has occurred. And in the range of 5.9 ppm displacement, the final products AAs, is seen singlet CH_2 group bonded to the nitrogen atom of the thiazolidine.

Scheme 1. Synthesis of thiazacridine derivatives



Biological Activity

The cytotoxicity of thiazacridine derivatives was evaluated against peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals and against tumor cell lines of different histotypes. Thiazacridine compounds were tested at concentrations of 1, 10 and 100 μM during 72 hours. The drug concentrations that inhibited cell growth by 50% compared to cells not treated (IC_{50}) are summarized in table 1. All molecules exhibited good selectivity on PBMCs (IC_{50} greater than 100 μM) cells, different from Amsacrine drug. In all assays we found high toxicity of Amsacrine on control cells (data not shown).

The results indicated that the precursor LPSF/AA-57 (3-(acridin-9-il-metil)-5-(3-trifluorometoxi-benzylideno)-thiazolidine-2,4-dione) showed the best anticancer activity against the most of tumor cells tested (Figure 2), possessing IC_{50} values in the range of 3.97 to 20.80 μM in chronic myelogenous leukemia and prostate cancer cells, respectively (Table 1). On the other hand, the LPSF/AA-61 compound did not show anticancer activity in any of cell lines, with greater than 100 μM the concentration that inhibited cell growth by 50%. (Table 1).

All thiazacridines synthesized, with the exception of LPSF/AA61, exhibited high cytotoxicity against prostate cancer cells (DU 145) (Figure 1B), possessing IC_{50} values smaller than 25 μM (Table 1).

Discussion:

The thiazacridine derivatives (TZDs) synthesized by coupling acridine and a thiazolidine nucleus has been studied by our group and has shown great potential for anticancer therapy (Barros, F.W.A, et al., 2012; Pitta, M.G.R., et al., 2012). We synthesized novel seven TZDs and we evaluate the cytotoxicity in different tumor cell lines.

The LPSF/AA-57 (3-(acridin-9-il-metil)-5-(3-trifluoromethoxy-benzylideno)-thiazolidine-2,4-dione) derivative exhibited potent inhibitory activity against different leukemias cells, including acute T cell leukemia (Jurkat), acute promyelocytic leukemia (HL60) and chronic myelogenous leukemia (K562). The 3-trifluoromethoxy-benzylidene group at *meta* position could contribute to the biological activity in leukemia cells and in prostate carcinoma cells. Interestingly, the LPSF/AA-59 that has the same 3-trifluoromethoxy-benzylidene group, but at *para* position, exhibited

anticancer activity only in prostate carcinoma cells, indicating that the position of the substituent is determinant for biological properties in each tumor cell type.

The acridine ring is well-known to their ability to intercalate into DNA due to the planarity of the aromatic structure, thus inhibiting with cellular process (Belmont P. et al., 2007). Amsacrine is the best-known acridine and it has been used since 1976 in acute leukemia and lymphomas treatment but is ineffective in solid tumors (Cholewiński G., et al, 2011). In contrast, in our study we found that the most of TZDs were significantly active against solid prostate carcinoma. Barros F. et al (2012) synthesized seven hybrid 5-acridin-9-ylmethylene-3-benzyl-thiazolidine-2,4-diones and found that only the (5Z)-5-(Acridin-9-ylmethylene)-3-(4-chloro-benzyl)-1,3-thiazolidine-2,4-dione derivative had good cytotoxicity activity against prostate cancer cell DU-145. Unlike our TZDs derivatives, this molecule displays the acridine ring at 5-position and the substituent at 3-position. Additionally, the chloro-benzyl group acting as electronegative substituent may influence the biological activity in DU-145 cells.

Interestingly, the LPSF/AA-59 (3-acridin-9-ylmethyl-5-(4-trifluoromethoxy-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione), LPSF/AA-60 (3-acridin-9-yl-methyl-5-(anthracen-9-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione) and LPSF/AA-62 were active only in prostate carcinoma cells, showing no activity in leukemia and hepatic carcinoma cells. It is noteworthy that the nature and the position of the substituent on the TZD core are determinants for biological properties. It could be suggested that the cytotoxicity of prostate carcinoma cells tested with these TZDs increase in the presence of 3-trifluoromethoxy- benzylidene group (AA-59), or anthracene group (AA-60) or 10-chloro-anthracene group (AA-62).

The LPSF/AA-61 (4-(3-acridin-9-yl-methyl-2,4-dioxo-tiazolidin-5-ylidene)-benzylidene)-benzylidene) compound did not show anticancer activity in cell lines tested. Probably the benzylidene substituent negatively interferes with biological cytotoxicity of this compound.

The tumoral suppressor activity of different TZDs has been attributed to its capacity of intercalation or external binding to DNA, and inhibition to human topoisomerase I (Lafayette E. et al., 2013). Most acridine derivatives interact with DNA due to the planarity of the aromatic structures (planar polycyclic system), inhibiting cellular functions (Ghosh, R. et al., 2010). Generally, acridines interfere with DNA synthesis, topoisomerase I and II activity, telomerase activity and protein-kinases, and

they can consequently induce cell death by apoptosis (Belmont P., et al., 2007; Demeunynck M. et al, 2004; Denny WA, 2002). Thiazolidinediones are peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonists. A number of investigators have shown that PPAR γ was expressed in a variety of tumor cells, and the activation of PPAR γ by ligands led to either inhibition of cell proliferation or induction of apoptosis (Grommes et al, 2004; Theocharis et al, 2004). The commercially available thiazolidinediones are hypoglycemic agents for treatment of type 2 diabetes, acting via PPAR γ (Nazreen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012).

The synthetic strategy linking the acridine ring with thiazolidine nucleus can lead to more effective treatment since they have different targets for important cellular processes in cancer cell. As the successful treatment of cancer remains a challenging goal, research into novel, selective, and less toxic chemotherapeutic agents is always important.

Conclusion

Seven novel thiazacridine derivatives were synthesized showing good yield (over 55%) and they were chemically characterized. All compounds are shown to be nontoxic for human normal cells. The most of them showed excellent anticancer activity in prostate carcinoma cells. The 3-(acridin-9-il-metil)-5-(3-trifluoromethoxy-benzylideno)- thiazolidine-2,4-dione) derivative exhibited potent inhibitory activity against different leukemias cells.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), National Institute for Science and Tecnology in Pharmaceutical Inovation (INCT_if) and CAPES for student's fellowships.

Tables and Figures:

Table 1: The Thiazacridine derivatives concentrations that inhibited cell growth by 50% (IC₅₀) on cancer cell lines and PBMCs.

IC ₅₀ (μM) ^a							
Compounds	Jukart	HL-60	DU-145	HepG2	Raji	PBMC	K562
AA56 (a)	>100	>100	19,64±5,39	>100	>100	>100	>100
AA57 (b)	6,63±2,65	6,50*	20,80±9,42	--	>100	>100	3,97±1,36
AA59 (c)	>100	>100	13,90±4,10	>100	>100	>100	>100
AA60 (d)	>100	>100	7,22±3,12	>100	>100	>100	>100
AA61 (e)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
AA62 (f)	--	7,90*	12,52±1,08	>100	--	>100	>100
AA63 (g)	--	>100	21,57±7,93	>100	--	>100	>100

. -- Cytotoxicity was not evaluated. * Only 1 experiment was evaluated.

^a Data are presented as IC₅₀ values (μg/mL) from three independent experiments and measured by the MTT assay after 72 hours of incubation. ^b

Amsacrine was used as a positive control.

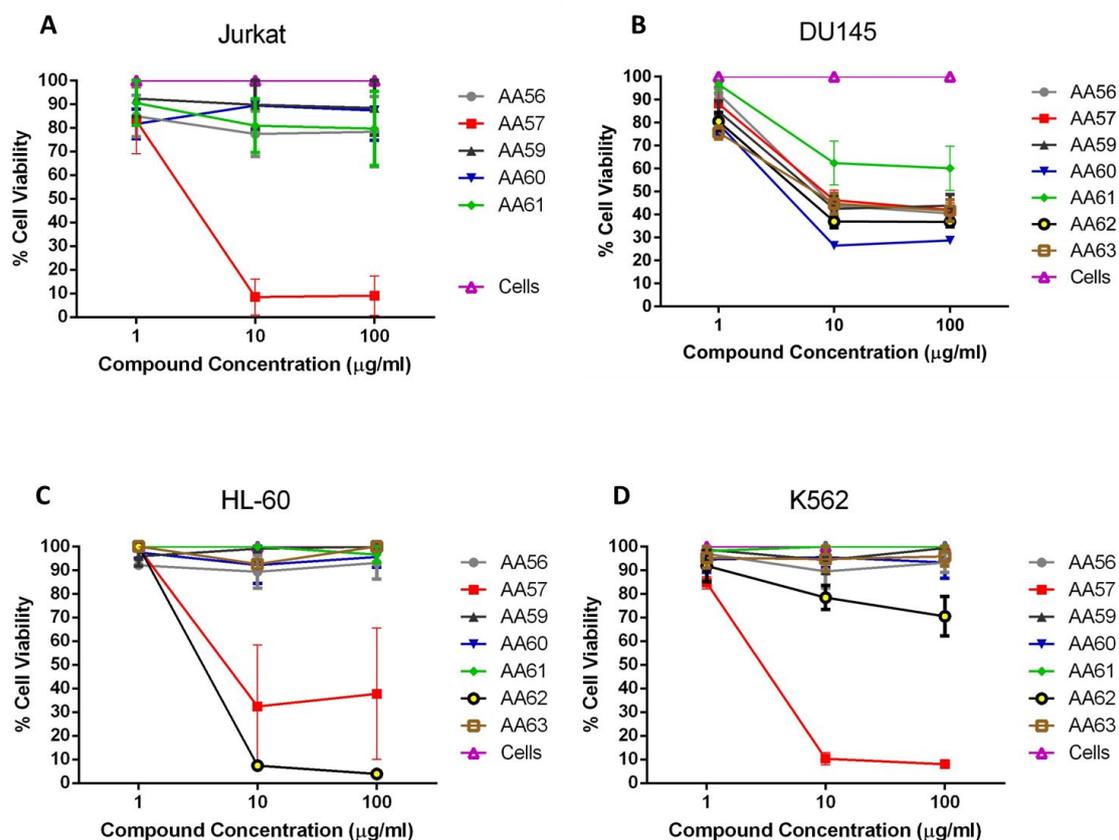


Figure 2: Cytotoxic activity of new Thiazacridine derivatives on cancer cell lines. Thiazacridine compounds were tested at concentrations of 1, 10 and 100 μM during 72 hours, by MTT assay. Cells represent those who were not treated with Thiazacridines. (A) Cell viability of Jurkat cells. (B) Cell viability of DU145 cells. (C) Cell viability of HL-60 cells. (D) Cell viability of K562 cells.

References

Barros, F.W.A.; Silva, T.G.; Pitta, M.G.R.; Bezerra, D.P.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Pessoa, C.; Moura, M.A.F.B.; Abreu, F.C.; Lima, M.C.A.; *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 3533–3539.

Belmont P, Andrez J-Ch, Allan ChSM: New methodology for acridine synthesis using a rhodium-catalyzed benzannulation. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45, 2783–2786.

Belmont, P.; Bosson, J.; Godet, T.; Tiano, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? *Anticancer Agents Med. Chem.* 2007, 7, 139.

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

- Demeunynck M: Antitumor acridines. **Expert Opin Ther Pat**, 2004, 14, 55-70.
- Denny WA: Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Curr Med Chem**, 2002, 9, 1655–1665.
- Gao, C.; Liu, F.; Luan, X.; Tan, C.; Liu, H.; Xie, Y.; Jin, Y.; Jiang, Y. Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10*H*)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents. **Bioorg. Med. Chem.** 2010, 18, 7507–7514.
- Ghosh, R.; Bhowik, S.; Bagchi, A.; Das, D.; Ghosh, S. Chemotherapeutic potential of 9-phenylacridine: Biophysical studies on its binding to DNA. **Eur. Biophys. J.** 2010, 39, 1243–1249.
- Gu, C.; Liu, L.; Sui, Y.; Zhao, J.; Wanga, D.; and Chen, Y. Highly enantioselective Michael additions of α -cyanoacetate with chalcones catalyzed by bifunctional cinchona-derived thiourea organocatalyst. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.18, p. 455–463, 2007.
- Janovec, L.; Kozurkova, M.; Sabolova, D.; Ungvarsky, J.; Paulikova, H.; Plsikova, J.; Vantosa, Z.; Imrich, J. Cytotoxic 3,6-is((imidazolidinone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorg. Med. Chem.** 2011, 19, 1790–1801.
- Junior, C. V.; Danuello, A.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v.14, p.1829-1852, 2007.
- Lafayette EA, Vitalino de Almeida SM, Pitta MG, Carneiro Beltrão EI, da Silva TG, Olímpio de Moura R, Pitta Ida R, de Carvalho LB Jr, de Lima Mdo C. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. *Molecules*. 2013 Dec 6;18(12):15035-50.
- Lang, X.; Li, L.; Chen, Y.; Sun, Q.; Wua, Q.; Liu, F.; Tan, C.; Liu, H.; Gao, C.; Jiang, Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.21, p. 4170–4177, 2013.
- Mattos, M. C. Aspectos mecanísticos da adição de michael. **Química Nova**, v.22, 1999.
- Paulíková, H.; Vantová, Z.; Hunáková, L.; Cizeková, L.; Carná, M.; Kozurková, M.; Sabolová, D.; Kristian, P.; Hamul'aková, S.; Imrich, J. DNA binding acridine-thiazolidinone agents affecting intracellular glutathione. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 7139–7148, 2012.
- Pitta, M.G.R.; Souza, E.S.; Barros, F.W.A.; Moraes, M.O.; Pessoa, C.O.; Hernandez, M.Z.; Lima, M.C.A.; Galdino, S.L.; Pitta, I.R. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Med. Chem. Res.** 2012, 21, 3326–3334.
- Raza, A.; Jacobson, B. A.; Benoit, A.; Patel, M. R.; Dixon, J. J.; Hiasa, H.; Ferguson, D. M.; Kratzke, R. A. Novel acridine-based agents with topoisomerase II inhibitor activity suppress mesothelioma cell proliferation and induce apoptosis. **Invest New Drugs**, v.30, p.1443–1448, 2012.

12. APÊNDICE D: Carta de aprovação do comitê de ética

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS AGENTES TIAZACRIDÍNICOS

Pesquisador: Maira Galdino da Rocha Pitta

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

CAAE: 01172912.3.0000.5208

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 11006

Data da Relatoria: 26/04/2012

Apresentação do Projeto:

A presente proposta tem como preocupação a busca de novas alternativas terapêuticas para tratamento do câncer, uma doença que representa um grave problema de saúde pública em todas as nações do mundo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a atividade anticâncer de novos derivados tiazacridínicos, bem como a preocupação a busca de novas alternativas terapêuticas para tratamento do câncer, uma doença que representa um grave problema de saúde pública em todas as nações do mundo. A incidência do câncer tem aumentado devido à crescente exposição da população a fatores de risco e ao aumento da expectativa de vida. Nesse contexto, como estratégia de combate ao câncer, a comunidade científica aposta em pesquisa básica e aplicada voltadas para a descoberta e desenvolvimento de novos farmoquímicos com propriedades anticâncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão adequados, entretanto, os benefícios devem ser modificados e que sejam ligados diretamente aos pesquisados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa tem uma elaboração adequada e está bem orientada pela pesquisadora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão anexados:

- 1) Folha de Rosto
- 2) Documento do CNPq como apoio financeiro
- 3) Curriculum vitae dos pesquisadores
- 4) TCLE para alfabetizados e analfabetos

Recomendações:

As recomendações foram aceitas e adequadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado considera aprovado o protocolo em questão. Projeto foi avaliado, aprovado e liberado para o início da coleta de dados. A APROVAÇÃO definitiva do projeto será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE.