



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo de caracterização e avaliação das propriedades farmacológicas de compostos sintéticos derivados de oxazinas

MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO

Teresina – Piauí

2015

MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO

Estudo de caracterização e avaliação das propriedades farmacológicas de compostos sintéticos derivados de oxazinas

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina - Piauí

2015

MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO

Estudo de caracterização e avaliação das propriedades farmacológicas de compostos sintéticos derivados de oxazinas

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (Orientador)

Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí

Prof^ª. Dra Jéssica Pereira Costa (Co-Orientadora)

Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Arnobio Antônio da Silva Júnior

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior

Instituto Federal do Piauí - IFPI

Prof. Dr. Thiago Henrique Costa Marques

Instituto Federal do Piauí – IFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof.^a. Dr.^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

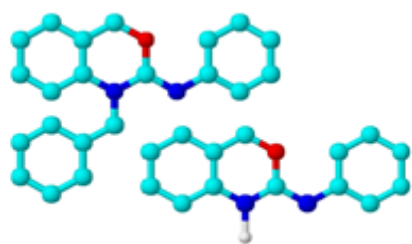
Prof.^a. Dr.^a. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

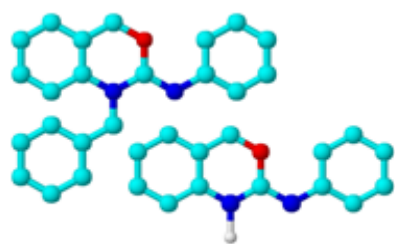
**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas



Dedicatória

*A meus pais,
Francisca Mendes e Euclides Neto,
pelo exemplo, incentivo e amor a mim dedicado.*



Agradecimiento

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas como diz um antigo provérbio “As palavras ensinam, mas os exemplos arrastam”. Obrigado por todos os ensinados e conselhos ao longo da minha formação acadêmica. Suas críticas me formaram e sua dedicação e amor me motivaram. Ao longo de uma jornada meus olhos e ouvidos mantiveram atentos aos seus ensinamentos. E quando, inúmeras vezes, busquei exaurir minhas dúvidas, ele teve paciência para ouvir e explicar, e quando faltou à paciência, sobreveio à vontade de me fazer entender. Mas quando até a vontade falhou, restou à dedicação e o amor.

*A família LAPNEX, pela contribuição de cada membro na minha formação acadêmica e pessoal. Em especial a **Ana Paula dos Santos Correia Lima e Silva, George Laylson da Silva Oliveira, Oskar Almeida Silva e Jéssica Pereira Costa**, pela orientação, companheirismo e ensinamentos.*

*A **Universidade Federal do Piauí**, ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** e aos **professores** que constroem juntos esse mestrado e contribuíram na minha formação.*

*Às agências de fomento à pesquisa **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo prezado apoio financeiro para a realização desta pesquisa.*

*Ao Prof. Dr. **Thiago Henrique Costa Marques**, ao Prof. Dr. **Arnobio Antônio da Silva Júnior** e ao Prof. Dr. **Joaquim Soares da Costa Júnior** por gentilmente aceitarem o convite para participar da minha banca de defesa e por suas valiosas contribuições. Ao prof. Dr. **Walter J. Peláez** pela contribuição ao meu trabalho.*

*Aos meus pais **Francisca da Silva Mendes de Brito e Euclides Coelho de Brito Neto**, exemplos de determinação, de dedicação e de amor. Por estarem sempre ao meu lado sem medir esforços.*

*Aos meus irmãos **Isaac Bruno Mendes de Brito e Rafael Mendes de Brito** por estarem comigo nessa longa jornada do conhecimento sendo meus amigos, companheiros e conselheiros.*

*Ao meu noivo **Paulo Adriano de Oliveira Souza** pela sua imensurável ajuda. Pelo carinho e amor a mim dedicado.*

*As minhas tias **Maria de Lourdes da Silva Mendes, Maria do Socorro da Silva Mendes e Maria dos Remédios da Silva Mendes**, por me acolherem como uma filha.*

*Aos meus amigos irmãos **Talita Mendes de Oliveira, Paula Benvindo Ferreira, Paolla Policarpo e Handerson Rodrigues Silva Lima** pela amizade e companheirismo que perdura em meio à distância com a mesma força e beleza que uma amizade verdadeira possui.*

*Agradeço a **Deus** pelo dom da vida. O grande autor dessa conquista. Foram muitos momentos de correria, cansaço, mas ao meu lado **Deus** colocou pessoas especiais que me ofereceram seus ombros para que neles pudesse me reerguer.*

*“Eu posso ir muito além de onde estou
Vou nas asas do Senhor
O Teu amor é o que me conduz
Posso voar e subir sem me cansar
Ir pra frente sem me fatigar
Vou com asas, como águia
Pois confio no Senhor!” Padre Fábio de Melo*

Agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

“Os sonhos não determinam o lugar que você vai estar, mas produzem a força necessária para o tirar do lugar em que está.”

Augusto Cury

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XVI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade esquistossomicida	26
3.2 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade antitumoral	27
3.3 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade antimicrobiana	28
3.4 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade antioxidante	29
Referências	30
4 CAPÍTULO I: Prospecção científica e tecnológica dos derivados de oxazina	37
Resumo	38
Introdução	38
Metodologia	39
Resultados e Discussão	41
Conclusão	43
Referências	44
5 CAPÍTULO II: Obtenção de novos compostos sintéticos derivados de oxazina	46
Resumo	47
Introdução	47
Material e Métodos	48
Resultados e Discussão	50
Conclusão	57
Referências	57
6 CAPÍTULO III: Derivados de oxazinas: Avaliação da atividade antitumoral, antimicrobiana e esquistossomicida	59
Resumo	60
Introdução	60
Material e Métodos	61
Resultados	64
Discussão	67
Conclusão	69

Referências	69
7 CAPÍTULO IV: Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> de dois derivados de oxazina	73
Resumo	74
Introdução	74
Material e Métodos	75
Resultados	79
Discussão	82
Conclusão	85
Referências	85
8 CAPÍTULO V: Processo de obtenção e aplicações farmacêuticas do derivado oxazina para tratamento da esquistossomose	88
Resumo	89
Reivindicações	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
PERSPECTIVAS	94
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS⁺	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATP	Adenosina trifosfato
AMRIGS	Associação Médica do Rio Grande do Sul
ANOVA	Análise de variância
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AAPH	2,2'-azobis [2 metilpropionamidina] diidrocloreto
A549	Linhagem de células característico de adenocarcinoma de pulmão
CHCl₃	Clorofórmio
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CE₅₀	Concentração efetiva contra o crescimento celular
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CTT	2,3,5-trifenil-tetrazólio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]
EPO	<i>European Patent Office</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
E.P.M	Erro padrão da média
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FVP	Pirólise a vácuo
GEINTEC	Gestão, Inovação e Tecnologia
HB-EGF	<i>Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor</i>
HEPES	N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
H₂O₂	Peróxido de oxigênio
HSC-2	Linhagem de células característico de carcinoma oral escamoso humano
HL-60	Linhagem de células característico de leucemia humana pró-mielocítica
HT-29	Linhagem de células característico de adenocarcinoma colorretal
HCl	Ácido clorídrico
HEP-2	Linhagem de células linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IC₅₀	Inibição do crescimento em 50%
IV	Infravermelho
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
INFIQC	Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Químicas
KOH	Hidróxido de Potássio
LiAlH₄	Hidrato de Alumínio e Lítio

LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MIP	Pirólise induzida por microondas
MCF-7	Linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de mama
MDA	Malonaldeído
MBC	Concentração bactericida mínima
MIC	Concentração inibitória mínima
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NINTEC	Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia
NCI-H292	Linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de pulmão
NaOH	Hidróxido de sódio
OH[•]	Radicais hidroxila
O₂[•]	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PZQ	Praziquantel
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PF	Ponto de fusão
PM	Peso molecular
RDA	Reações retro Diels-Alder
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TGA	Análise térmica por termogravimetria
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico
TEA	Trietanolamina
THF	Tetrahidrofurano
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
UFPI	Universidade Federal do Piauí
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
WP45	N-[(2Z,4aR,8aS)-1-benzil-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ilidene]aniline
WP2331	N-[(2Z,4aR,8aR)1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ilidene]aniline

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1	Possibilidades de modificações estruturais de compostos farmacológicos	21
Figura 2	Esquema da organização do trabalho de dissertação	22

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1	Danos ocasionados pelo estresse oxidativo	29
-----------------	---	----

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estruturas químicas da 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina	39
Figura 2	Esquematização da realização da busca de artigos e patentes	40
Figura 3	Distribuição das patentes de derivados de oxazina junto no INPI no Brasil	42

CAPÍTULO 2

Figura 1	Representação do teste de toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	50
Figura 2	Rota de síntese dos compostos WP45 e WP2331	51
Figura 3	Oxazinas e seus derivados	52
Figura 4	Análise por Infravermelho das substâncias WP45 e WP2331	53
Figura 5	Análise por RMN ¹ H das substâncias WP45 e WP2331	54
Figura 6	Análise por RMN ¹³ C das substâncias WP45 e WP2331	55
Figura 7	Análise por DSC das substâncias WP45 e WP2331	56

CAPÍTULO 4

Figura 1	Representação do método do Radical Hidroxila (OH [•])	76
Figura 2	Representação do método do Radical ABTS ^{•+}	77
Figura 3	Representação do método de inibição da hemólise em eritrócitos de <i>R. norvegicus</i> induzida por AAPH	78
Figura 4	Porcentagem de inibição do Radical Hidroxila (OH [•]) em presença das substâncias Trolox, WP45 e WP2331	80
Figura 5	Porcentagem de inibição do Radical ABTS ^{•+} em presença das substâncias Trolox, WP45 e WP2331	81
Figura 6	Percentual de inibição da hemólise induzida por AAPH em eritrócitos de <i>Rattus norvegicus</i>	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Resultados da prospecção científica realizada em banco de dados eletrônicos no período de 2005 a 2015	41
Tabela 2	Resultado da prospecção tecnológica de depósitos de patente nas bases INPI, EPO, USPTO e WIPO	42
Tabela 3	Patentes depositadas junto ao INPI de derivados de oxazina que se referem à atividade farmacológica	43

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Compostos obtidos por meio de síntese de derivado da oxazina	52
Tabela 2	Valor da CE ₅₀ na avaliação de toxicidade frente a <i>A. salina</i> com 24 e 48h	57

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Inibição do crescimento celular (%) e desvio padrão das células tumorais após tratamento com concentração única (25 µg/mL) dos derivados de oxazina, WP45 e WP2331 em três linhagens de células tumorais	64
Tabela 2	Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados oxazina em diferentes cepas bacterianas gram positivas	65
Tabela 3	Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados oxazina em diferentes cepas bacterianas gram negativas	65
Tabela 4	Avaliação da atividade esquistossomicida de derivados oxazina, WP45 e WP2331, sobre cultura de <i>S. mansoni</i> (machos e fêmeas)	66
Tabela 5	Avaliação da atividade esquistossomicida da WP2331 em diferentes concentrações em cultura de <i>S. mansoni</i> (machos e fêmeas)	67

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Inibição qualitativa da enzima AChE na presença da WP45 e da WP2331	81
-----------------	---	----

Estudo de caracterização e avaliação das propriedades farmacológicas de compostos sintéticos derivados de oxazinas. **MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO**. Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas. Defesa de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia, UFPI, 2015.

RESUMO

Oxazinas são compostos heterocíclicos que contém um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, que pode formar derivados 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina. O presente estudo, após a caracterização dos derivados de 1,3-oxazinas WP45 e WP2331, realizou a avaliação de estudos não-clínicos de atividades antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, estudo de toxicidade *in vitro* frente à *Artemia salina*, avaliação farmacológica *in vitro* antimicrobiana, esquistossomicida e antitumoral. A prospecção científica foi realizada em bases de periódicos como o *ScienceDirect*, *PubMed*, *Lilacs* e *SciELO* e a prospecção tecnológica em bases de dados eletrônicas como EPO, WIPO, USPTO e INPI, não encontrando nenhuma publicação dos compostos em estudo, WP45 e WP2331, porém foi encontrado registro de depósito de patente e artigos publicados referente a substância de origem, oxazina, sendo poucos relacionados a alguma atividade farmacológica, sugerindo a necessidade de um investimento científico e tecnológico, que com base nas propriedades atribuídas aos derivados de oxazina possam estimular o desenvolvimento de produtos derivados desta espécie. Os derivados WP45 e WP2331 foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, infravermelho e análise térmica por calorimetria. A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* sugere que, a WP45 e a WP2331, por meio da capacidade de remoção do radical ABTS^{•+} e do radical hidroxila, bem como pela inibição da enzima acetilcolinesterase e inibição da hemólise de eritrócitos induzido por AAPH, como fontes promissoras de compostos biologicamente ativos com propriedades antioxidantes. No teste antimicrobiano a substância WP2331 foi a mais ativa, conseguindo inibir o metabolismo bacteriano na menor concentração testada e quando avaliada quanto à atividade esquistossomicida pelo efeito *in vitro* sobre vermes adultos do *Schistosoma mansoni*. Portanto a WP2331 apresentou os melhores resultados nas atividades farmacológicas testadas. Os testes não-clínicos apontam os derivados de oxazinas WP45 e WP2331 como substâncias bioativas. As propriedades farmacológicas descritas para os derivados de oxazinas WP45 e WP2331 subsidiam e fomentam a hipótese para a pesquisa e desenvolvimento de produtos destas substâncias. Diante da atividade promissora contra o *Schistosoma mansoni* da WP2331, foi solicitado pedido de depósito de patente junto ao INPI.

Palavras-chave: Síntese. *Schistosoma mansoni*. Atividade Antioxidante. Atividade Antitumoral.

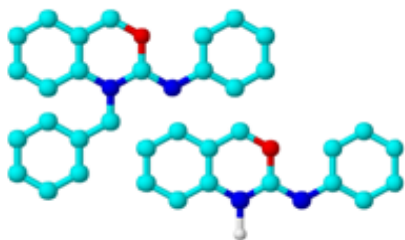
Characterization study and evaluation of the pharmacological properties of synthetic derivative compounds oxazines. MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO.

Advisor: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas. Master's defense. Post-grad program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Department of Pharmacy, UFPI, 2015.

ABSTRACT

Oxazines are heterocyclic compounds containing one atom of oxygen and one nitrogen atom, which can form derivatives 1,2-oxazine, 1,3-oxazine and 1,4-oxazine. In this study, the derivatives of 1,3-oxazines WP45 and WP2331 and were obtained biological activite characterized, by a set of nonclinical studies, such as antioxidant activity *in vitro* and *ex vivo*, *in vitro* toxicity study on aswellas *Artemia salina*, *in vitro* antimicrobial, and antitumoral activitys schistosomicidal. Scientific prospecting was carried out at ow scientific data such bases as ScienceDirect, PubMed, Lilacs and Scielo and technology foresight in electronic databases such as EPO, WIPO, USPTO and INPI. Patent filing registration and published articles concerning the origin of the substance, oxazine, and few related to some pharmacological activity, suggesting the need for a scientific and technological investment, based on the properties assigned for the oxazine derivatives. The derivatives WP45 and WP2331 were characterized by nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon, infrared spectroscopy and thermal analysis by calorimetry. Evaluation of antioxidant activity *in vitro* suggests that, WP45 and WP2331, by removing capacity of ABTS^{•+} radical and the hydroxyl radical, as well as by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase and inhibition of haemolysis of erythrocytes induced by AAPH, are promising sources of biologically active compounds with antioxidant properties. In the antimicrobial test WP2331 substance was the most active, managing to inhibit bacterial metabolism in the smallest concentration tested. The WP2331 was more effective when evaluated for activity schistosomicidal the *in vitro* effect on adult worms of *Schistosoma mansoni*. The WP2331 showed the best results in the tested pharmacological activities. Non-clinical testing point derivatives oxazines WP45 and WP2331 as bioactive substances. The pharmacological properties described for derivatives oxazines WP45 and WP2331 subsidize and encourage the hypothesis for the research and development of products of these substances. Facing the promising activity against *Schistosoma mansoni* WP2331 was requested patent application filing on the INPI.

Keywords: Synthesis. *Schistosoma mansoni*. Antioxidant activity. Antitumor activity.



Introdução

1 - INTRODUÇÃO

O número de fármacos inovadores nos últimos 10 anos vem caindo progressivamente. Em 2010, 21 novas entidades químicas foram aprovadas pela agência regulatória norte-americana, quatro a menos do que em 2009. O menor número de inovações ocorreu em 2004. De fato, os primeiros anos da década não foram muito promissores para as grandes indústrias, que viram despencar de 35, em 2000, para 19 novos fármacos no ano de 2004 (PINTO; BARREIRO, 2013).

O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos está intimamente relacionado à química medicinal. Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) a química medicinal envolve a invenção, descoberta, planejamento, identificação, preparação e interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos aplicados ao processo de P&D. Desta forma, fica claro a importância do estabelecimento de interfaces fundamentais entre as ciências químicas, biológicas, farmacêuticas, médicas, físicas e computacionais (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Nesse contexto surgem os compostos heterocíclicos, cuja importância é incontestável, particularmente no que se refere ao fato de inúmeros usos como medicamentos. Muitos destes compostos heterocíclicos são fármacos mundialmente consumidos que apresentam atividades farmacológicas diversificadas, como antihipertensiva (losartan); antiviral (ribavirina); antitumoral (carbamato de fluorouracila); antifúngica (fluconazol); anti-inflamatória e analgésica (dipirona); antiprotozoária (metronidazol) inibidora da β -lactamase (tazobactama sódica) e antimicrobiana (benzilpenicilina) (MELO et al., 2006).

Em comparação com processos biossintéticos da natureza que evoluíram ao longo de bilhões de anos, a síntese orgânica está em crescente mudança, tendo começado no início de 1800 (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Antes desta data, a natureza era a única fonte de produtos químicos orgânicos. Arquiteturas estruturais heterocíclicas ocorrem em muitos produtos naturais e fármacos sintéticos bioativos, e estas unidades estruturais servem como intermediários importantes na síntese orgânica (LU; CHEN; XIAO, 2012).

Contudo, existem diversas metodologias para a obtenção de compostos sintéticos heterocíclicos (**Figura 1**) que podem ser caracterizados por métodos convencionais ou métodos não convencionais. É relevante destacar que métodos convencionais são realizados com solventes orgânicos com tempos de reações geralmente muito longos e gerando resíduos (PELÁEZ et al., 2008).

Figura 1. Possibilidades de modificações estruturais de compostos farmacológicos



Fonte: Autoria própria, 2015.

Os métodos não convencionais surgiram no contexto da sustentabilidade. O protocolo denominado *Green Chemistry* corresponde aos doze preceitos de *eco-friendly*, o qual prevê um mínimo perigo como critério de desempenho na concepção de novos processos químicos mais limpos (PELÁEZ et al., 2012). Dentre estes estão à exploração de condições alternativas de reações e meios reacionais que não causem dano ao ambiente, eficaz para realizar as transformações químicas pretendidas com o mínimo de subprodutos ou resíduos e sem a utilização de solventes orgânicos voláteis convencionais, sempre que possível (VARMA, 2008).

Os doze princípios da *Green Chemistry* são: prevenção; economia atômica; sínteses com reagentes de menor toxicidade; desenvolvimento de compostos seguros; diminuição de solventes e auxiliares; eficiência energética; uso de matéria-prima renovável; redução do uso de derivados; catálise; desenvolvimento de compostos degradáveis; análise em tempo real para a prevenção da poluição e química segura para a prevenção de acidentes (FARIAS; FÁVARO, 2011).

Com isso, na busca de melhores condições de reação e abordagens mais verdes do que foi relatado anteriormente, há duas metodologias *eco-friendly* eficientes (sem solventes) para síntese por meio de uma reação de desidrogenação seletiva. A aplicação de pirólise induzida por microondas (MIP) e de pirólise a vácuo (FVP) são procedimentos para efetuar a desidrogenação seletiva sem quaisquer aditivos ou catalisadores. A desidrogenação são comuns em pirólise a alta temperatura, especialmente no passo final numa sequência que conduz à formação de um produto aromático ou estável (PEPINO et al., 2012).

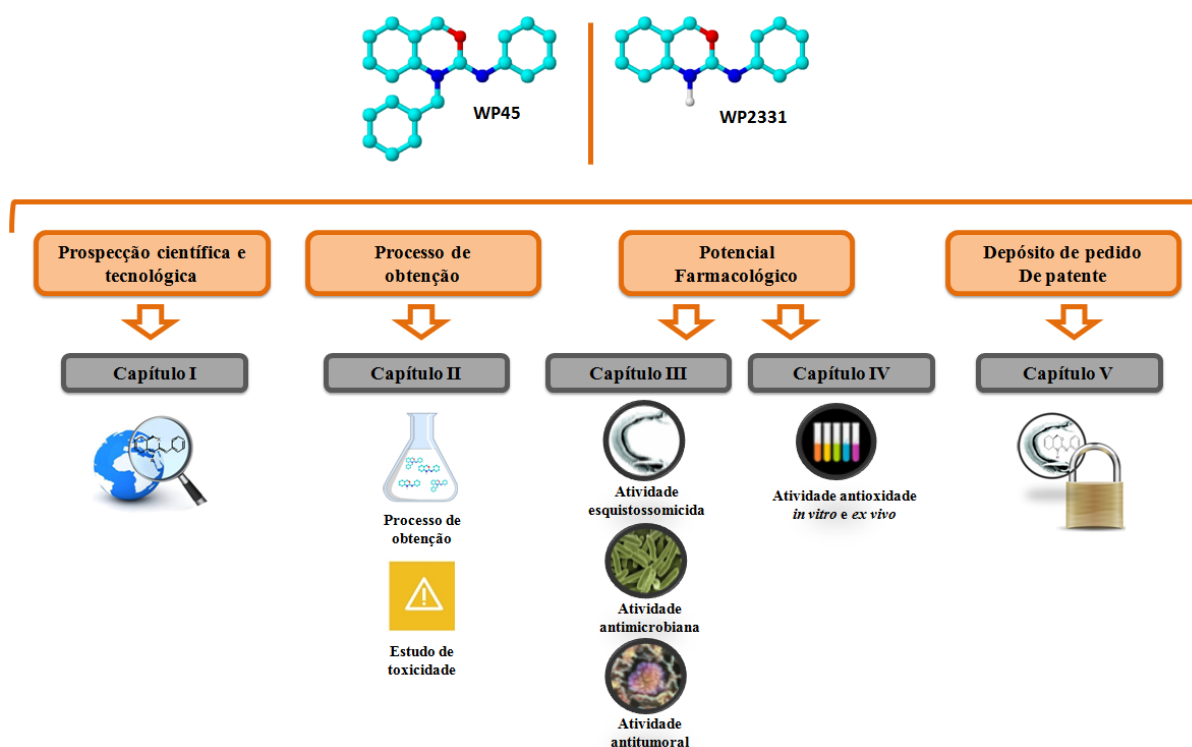
A abertura do anel heterocíclico no método de FVP utiliza com menor custo de energia para a dissociação térmica dos derivados do ciclo-hexeno-fundido. No entanto, pelo

menos, seis estruturas diferentes (ou seja, trans/cis, N-in/N-out, isômeros NH/SH) podem, em princípio, ser responsáveis pelos produtos obtidos. Isso pode ser decorrente de reações retro Diels-Alder (RDA) que ocorrem na FVP e envolvem a *splitting-off* de ciclopentadieno ou porções aromáticas, que são estáveis o suficiente para diminuir a energia de ativação da reação (PELÁEZ et al., 2012).

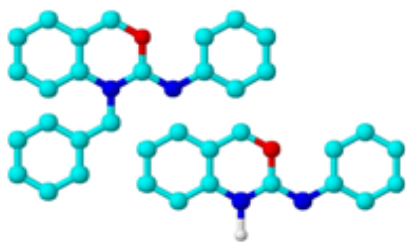
Os compostos heterociclos 1,3-oxazina demonstram diversas propriedades biológicas, dentre estas podemos citar a atividade antimicrobiana (BHAT; PAWAR, 2008; MATHEW et al., 2010; SAWANT; MHASKE; WADEKAR et al., 2012; BEENA, AKELESH, 2013; DIDWAGH, PISTE, 2013), anticoagulante (SAWANT et al., 2012), analgésico (HIROYUKI et al., 2008) e antitumoral (OUBERAI et al., 2006; NARITA et al., 2009).

Nesse contexto, estes compostos possuem uma significância biológica, com isso podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas entidades químicas para o tratamento de várias doenças (SINDHU et al., 2013), uma das principais justificativas para a realização desta dissertação de mestrado intitulada “**Estudo de caracterização e avaliação das propriedades farmacológicas de compostos sintéticos derivados de oxazinas**”, que consiste em avaliar o potencial farmacológico de compostos sintéticos derivados de oxazinas, WP45 e WP2331, com relação as atividades *in vitro* esquistossomicida, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante *in vitro* e *ex vivo* (Figura 2).

Figura 2. Esquema da organização do trabalho da dissertação.



Fonte: Autoria própria, 2015.



Objetivos

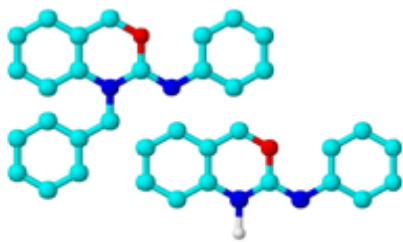
2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização das substâncias sintetizadas derivadas de oxazina, WP45 e WP2331, e testes não-clínicos para elucidar a possível atividade farmacológica antitumoral, antimicrobiana e esquistossomicida *in vitro*, bem como determinar seu potencial antioxidante *in vitro* e *ex vivo* e esclarecer seu provável mecanismo de ação.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma prospecção tecnológica e científica a fim de avaliar o potencial inovador do presente trabalho;
- Caracterização físico-química das substâncias sintetizadas utilizadas no presente estudo por métodos de análise por Espectroscopia de Infravermelho (IV), Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) e Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C);
- Investigar a toxicidade dos derivados de oxazina por meio do teste de *Artemia salina*;
- Avaliar o potencial antioxidante dos derivados de oxazina, WP45 e WP2331, *in vitro* contra o radical ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS $^{++}$) e a determinação dos níveis de radical hidroxila (OH•);
- Avaliar a atividade dos derivados de oxazina de inibição da enzima acetilcolinesterase;
- Investigar a ação farmacológica antitumoral, antimicrobiana e esquistossomicida dos derivados de oxazina;
- Investigar a ação antioxidante *ex vivo* dos derivados de oxazina pelo teste de hemólise em eritrócitos de *Rattus norvegicus*;
- Elaborar um pedido do registro de depósito de patente do derivado de oxazina junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia (NINTEC) da UFPI com possível atividade esquistossomicida.



*Revisão da
literatura*

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade esquistossomicida

A Esquistossomose é uma doença inflamatória crônica causada por parasitas do gênero *Schistosoma*. Essa patologia está associada com o sítio de infecções no hospedeiro, o tecido hepático, com isso pode acarretar anemia e desnutrição, o que prejudica o crescimento e desenvolvimento ponderal dos indivíduos infectados (STEINMANN et al., 2006; KING; DANGERFIELD-CHA, 2008).

No Brasil, é estimado que aproximadamente 7 milhões de pessoas estão infetadas e outras 25 milhões estão em risco eminente de infecção, sendo o principal helminto desse gênero infectante o *S. mansoni* (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2014; SCHOLTE et al., 2014).

O tratamento de escolha para a esquistossomose é o praziquantel (PZQ), porém o seu uso apresenta limitações, como baixa eficácia no tratamento da esquistossomose aguda, baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos (DONG et al., 2010; SANTOS et al., 2012). No entanto, devido à dependência de uma única droga e conseqüentemente ao seu uso generalizado deste 1980 a nível mundial, algumas espécies do gênero *Schistosoma* estão desenvolvendo tolerância e resistência contra o PZQ, o que resulta em baixas taxas de cura com conseqüente aumento de reinfecção (WANG; WANG; LIANG, 2012; HUYSE et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (2014) recomenda estratégias atuais para o controle da esquistossomose que consistem no controle da transmissão e no controle da morbidade, sendo que possuem limitações, como o elevado custo e o desenvolvimento de resistência às drogas utilizadas para o tratamento.

Nesse contexto, há uma contínua busca por novas alternativas de prevenção e tratamento para a esquistossomose dentre as quais os compostos oxazinas podem constituir uma importante fonte de pesquisa e são intensamente testados em estudos não clínicos por diversos grupos de pesquisa que visam à descoberta das atividades farmacológicas dessas novas substâncias (MANNECK et al., 2011).

Não há relatos na literatura sobre os derivados de oxazina relacionado à atividade farmacológica contra o *S. mansoni*, dessa forma caracterizam-se como uma alternativa promissora para o tratamento desta parasitose, sendo a mesma de fácil obtenção e a baixo custo, utilizando energia limpa e sem produção de resíduos, baseados nos preceitos da *Green Chemistry*.

3.2 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade antitumoral

O câncer é uma patologia derivada principalmente de mutações em células somáticas que podem acarretar pelo menos 100 versões de uma doença que pode desenvolver em praticamente qualquer tecido no corpo. Apesar de cada tipo de câncer ter atributos únicos, todos esses diferentes tumores evoluem de acordo com um esquema comum de progressão que inclui genética e incidente epigenético, além de uma rede complexa de interações entre as células e a matriz extracelular no tecido hospedeiro (MASOUDI-NEJAD et al., 2015).

Segundo a estimativa de incidência de câncer no Brasil divulgado pelo Instituto Nacional de Câncer - INCA (2014), 12 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano e os tipos de maior prevalência serão o câncer de pele do tipo não melanoma, tumores de próstata, câncer de mama feminina, cólon, reto e pulmão. Porém os desafios de acesso para o tratamento do câncer e sua qualidade e acessibilidade são compartilhados entre países de alta renda e as nações mais pobres, apesar de possuir diferentes pontos de partida em termos de infraestrutura e níveis de riqueza (CHALKIDOU et al., 2014). Dessa forma, faz-se necessário a busca constante por novos compostos que proporcionem maior acesso para a população a preços acessíveis.

Os compostos heterocíclicos sintéticos têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de fármacos e o tratamento de doenças, incluindo o câncer. Entre estes, as oxazinas são bem conhecidas por seu potencial efeito biológico na inibição de agentes de progressão tumoral (BASAPPA et al., 2010). Relatos importantes foram descritos sobre a ação de derivados de oxazinas na inibição da topoisomerase I e II e dos fatores de crescimento VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), HB-EGF (*Heparin Binding - Like Growth Factor*) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) (KALIRAJAN et al., 2012; FANG et al., 2014).

Além da inibição de agentes de progressão tumoral, os derivados oxazinas, principalmente os 1,3-oxazinas, estão relacionados com atividade de inibição de diferentes tipos de linhagens de células tumorais, como a HSC-2 (característico de carcinoma oral escamoso humano), HL-60 (característico de leucemia humana pró-mielocítica), HT-29 (característico de adenocarcinoma colorretal) e A549 (característico de adenocarcinoma de pulmão) (OUBERAI et al., 2006; NARITA et al., 2009; ZHOU et al., 2014). Dessa forma, o estudo realizado visa ampliar os conhecimentos sobre esse potencial efeito biológico.

3.3 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade antimicrobiana

Atualmente, a resistência microbiana aos agentes antibióticos de primeira linha é um problema de saúde pública, sendo uma alternativa o manejo antimicrobiano que consiste em uma série de comportamentos, sendo necessário avaliar os benefícios e riscos do tratamento, atuando na escolha do medicamento adequado e a administração do antibiótico no momento apropriado, com a frequência correta e pelo período adequado. Melhorar essa gestão de antimicrobianos requer alteração de um ou mais destes comportamentos. Porém intervenções para a mudança de comportamento tendem a ser complexas, que consiste muitas vezes na interação da técnica dos componentes (DAVEY et al., 2015).

Desta forma, os novas fármacos são necessárias para tratar pacientes infectados. Porém, um declínio da pesquisa antimicrobiana por grandes companhias farmacêuticas levou a uma queda curta de novos e melhores agentes para combater a atual ameaça da resistência aos medicamentos (SÁNCHEZ et al., 2014). Atualmente o foco de muitas pesquisas antimicrobianas consiste na identificação de novas classes químicas e novos alvos microbianos. Exemplo disso são alguns compostos heterocíclicos, como os derivados de oxazinas que foram relatados possuir uma vasta gama de atividade biológica, entre elas a atividade antibacteriana (SAWANT; MHASKE; WADEKAR, 2012).

Mathew e colaboradores (2010) constataram que os derivados de oxazinas obtidos por meio de síntese por condensação-ciclização obtiveram considerável atividade antimicrobiana contra quatro tipos de cepas bacterianas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) corroborando com o estudo feito por Manjula e colaboradores (2009), ao qual correlacionou a atividade antimicrobiana contra a cepa de *E. coli* a presença de anel aromático, de grupos metoxi e carboxilato na posição PARA como substituintes da molécula de oxazina e a atividade contra as demais cepas bacterianas a presença ativa de cloro, grupo nitrila e éster em sua estrutura.

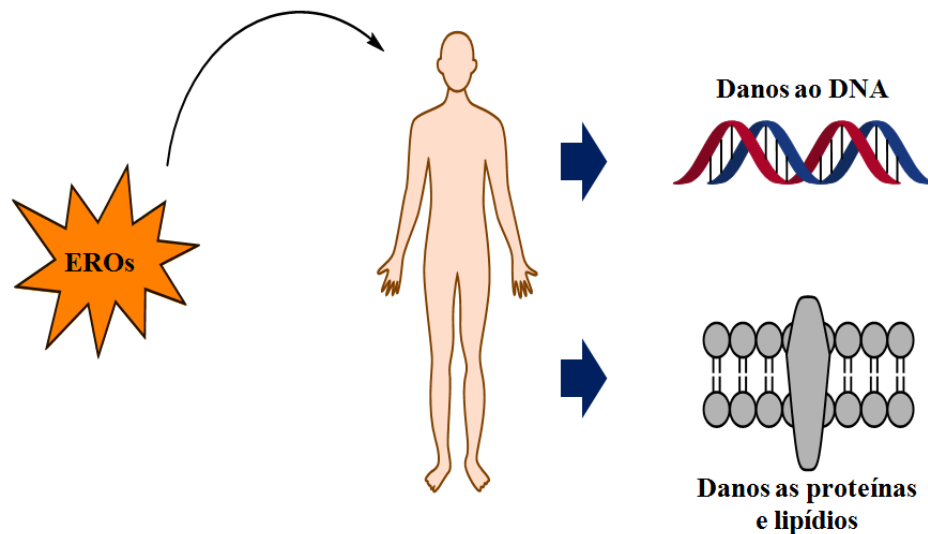
A presença de compostos halogenados, como o flúor, em substituição ao anel aromático de derivados oxazinas está fortemente relacionado a atividade antimicrobiana devido a presença de elétrons doadores. Essa atividade foi comprovada em testes feitos contra cepas de bactéria gram-positiva (*Bacillus megaterium*) e bactéria gram-negativa como (*Xanthomonas campestris*) (KONDA, 2015). Dessa forma, o estudo realizado com diferentes cepas de bactérias gram-positiva e gram-negativa visa ampliar os conhecimentos sobre esse potencial efeito biológico.

3.4 Potencial farmacológico das oxazinas e de seus derivados frente à atividade antioxidante

A formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) constitui um processo fisiológico ao qual possui funções biológicas importantes, como: possibilita a geração de ATP (adenosina trifosfato) por meio da cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. O seu mecanismo de geração ocorre nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma por meio da cadeia transportadora de elétrons (BARBOSA et al., 2010).

Várias patologias como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce são associados com o desequilíbrio da produção e eliminação de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), bem como outros radicais livres que são potencialmente capazes de produzir danos em várias macromoléculas biológicas como DNA, proteínas e lipídios (**Figura 1**) (KRYSTON et al., 2011; BHATTACHARYA et al., 2011; LIOCHEV, 2013; CHEN; BERTIN; FROLDI et al., 2013).

Figura 1. Danos ocasionados pelo estresse oxidativo



Fonte: Autoria própria, 2015.

Alguns mecanismos antioxidantes enzimáticas promovem a proteção das células humanas contra os efeitos nocivos desses radicais livres, porém estes mecanismos antioxidantes não são suficientes para combater o estresse oxidativo (JENSEN, 2003) sendo assim, é necessário suplemento antioxidantes para garantir o equilíbrio de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidos pelo metabolismo fisiopatológico (DIZDAROGLU et al., 2002; RAO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Estudos realizados com compostos sintéticos demonstraram capacidade antioxidante promissora. Entre esses grupos de substâncias, as oxazinas vêm desempenhando papel importante devido a sua versatilidade sintética, apresentando atividade como o efeito neuroprotetor contra a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células de feocromocitoma de rato, ação contra enzimas metabolizadoras de fármacos inflamatórios (ANSARI; KHODAGHOLI; AMINI et al., 2011; SUKHORUKOV et al., 2014) e atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (SCHEUNEMANN et al., 2007; SORGER et al., 2009) sendo essa atividade associada à capacidade de nitrogênio cíclicos de captar os radicais livres (VOVK et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ANSARI, N.; KHODAGHOLI, F.; AMINI, M. 2-Ethoxy-4,5-diphenyl-1,3-oxazine-6-one activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, n. 2, p. 84-90, 2011.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASAPPA; MURUGAN, S.; KAVITHA, C. V.; PURUSHOTHAMAN, A.; NEVIN, K. G.; SUGAHARA, K.; RANGAPPA, K. S. A small oxazine compound as an anti-tumor agent: A novel pyranoside mimetic that binds to VEGF, HB-EGF, and TNF- α . **Cancer Letters**, v. 297, p. 231-243, 2010.

BEENA, K. P.; AKELESH, T. Design, synthesis, characterization and evaluation of some 1,3-oxazine derivatives as potent antimicrobial agents. **Scholars Research Library**, v. 5, n. 4, p. 257-260, 2013.

BHAT, A. R.; PAWAR, P. D. Synthesis and biological evaluation of some [1, 4]-thiazine-2-one and [1-4]-oxazin-2-one derivatives. **Indian drugs**, v. 45, n. 12, p. 962-965, 2008.

BHATTACHARYA S.; AHMED, K. K. M.; CHAKRABORTY, S. Free Radicals Cardiovascular Diseases: An Update. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 1, p. 17-22, 2011.

CHALKIDOU, K.; MARQUEZ, P.; DHILLON, P.K.; TEERAWATTANANON, Y.; ANOTHASINTAWEE, T.; GADELHA, C.A.G.; SULLIVAN, R. Evidence-informed frameworks for cost-effective cancer care and prevention in low, middle, and high-income countries. **The Lancet Oncology**, v. 15, p. 119-131, 2014.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, p. 414-420, 2013.

DAVEY, P.; PEDEN, C.; CHARANI, E.; MARWICK, C.; MICHIE, S. Time for action-improving the design and reporting of behaviour change interventions for antimicrobial stewardship in hospitals: Early findings from a systematic review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, p. 203-212, 2015.

DIDWAGH, S. S.; PISTE, P. B. Novel one-pot synthesis and anti-microbial activity of 6-chloro-2,4-diphenyl-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazines derivatives. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 5, p. 2199-2203, 2013.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCI OGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1102-1115, 2002.

DONG, Y.; CHOLLET, J.; VARGAS, M.; MANSOUR, N. R.; BICKLE, Q.; ALNOUTI, Y.; HUANG, J.; KEISER, J.; VENNERSTROM, J. L. Praziquantel analogs with activity against juvenile *Schistosoma mansoni*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 2481-2484, 2010.

FANG, K.; DONG, G. Q.; GONG, H.; LIU, N.; LI, Z. G.; ZHU, S. P.; MIAO, Z. Y.; YAO, J. Z.; ZHANG, W. N.; SHENG, C. Q. Design, synthesis and biological evaluation of E-ring modified evodiamine derivatives as novel antitumor agents. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 978-982, 2014.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1089-1093, 2011.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HIROYUKI, K.; YASUHIDE, M.; YUJI, K.; KAZUYA, O.; MAKI, H. 2-Arylimino-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazines as a new class of cannabinoid receptor agonists, Part 3: Synthesis and activity of isosteric analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6444-6447, 2008.

HUYSE, T.; BROECK, F. V. D.; JOMBART, T.; WEBSTER, B. L.; DIAW, O.; VOLCKAERT, F. A. M.; BALLOUX, F.; ROLLINSON, D.; POLMAN, K. Regular treatments of praziquantel do not impact on the genetic make-up of *Schistosoma mansoni* in Northern Senegal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 100-105, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, v. 666-67, p. 387-92, 2003.

KALIRAJAN, R.; KULSHRESTHA, V.; SANKAR, S.; JUBIE, S. Docking studies, synthesis, characterization of some novel oxazine substituted 9-anilinoacridine derivatives and evaluation for their antioxidant and anticancer activities as topoisomerase II inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 217-224, 2012.

KING, C.H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. **Chronic Illness**, v. 4, p. 65-79, 2008.

KONDA, S.; RAPARTHI, S.; BHASKAR, K.; MUNAGANTI, R. K.; GUGULOTH, V.; NAGARAPU, L.; AKKEWAR, D. M. Synthesis and antimicrobial activity of novel benzoxazine sulfonamide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 1643-1646, 2015.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LU, L. Q.; CHEN, J. R.; XIAO, W. J. Development of Cascade Reactions for the Concise Construction of Diverse Heterocyclic Architectures. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 8, p. 1278-1293, 2012.

MANJULA, M. K.; RAI, K. M. L.; GAONKAR, S. L.; RAVEESHA, K. A.; SATISH, S. Synthesis of new series of 5,6-dihydro-4H-1,2-oxazines via hetero Diels-Alder reaction and evaluation of antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 280-288, 2009.

MANNECK, T.; BRAISSANT, O.; ELLIS, W.; KEISER, J. *Schistosoma mansoni*: Antischistosomal activity of the four optical isomers and the two racemates of mefloquine on schistosomula and adult worms *in vitro* and *in vivo*. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 260-269, 2011.

MASOUDI-NEJAD, A.; BIDKHORI, G.; ASHTIANI, S. H.; NAJAFI, A.; BOZORGMEHR, J. H.; WANG, E. Cancer systems biology and modeling: Microscopic scale and multiscale approaches. **Seminars in Cancer Biology**, v. 30, p. 60-69, 2015.

MATHEW, B. P.; KUMAR, A.; SHARMA, S.; SHUKLA, P. K.; NATH, M. An eco-friendly synthesis and antimicrobial activities of dihydro-2H-benzo- and naphtho-1,3-oxazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 1502-1507, 2010.

MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUSA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

NARITA, T.; SUGA, A.; KOBAYASHI, M.; HASHIMOTO, K.; SAKAGAMI, H.; MOTOHASHI, N.; KURIHARA, T.; WAKABAYASHI, H. Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzo[b]cyclohept[e] [1,4]oxazine and 2-aminotropone derivatives. **Anticancer Research**, v. 29, p. 1123-1130, 2009.

NASCIMENTO, G. L.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Severe forms of schistosomiasis: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2014.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES-JUNIOR, A. L.; SOUZA, A. A.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FREITAS, R. M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Schistosomiasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em 12 de julho de 2014.

OUBERAI, M.; ASCHE, C.; CARREZ, D.; CROISY, A.; DUMY, P.; DEMEUNYNCK, M. 3,4-Dihydro-1H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridines as a new family of cytotoxic drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 17, p. 4641-4643, 2006.

PELÁEZ, W. J.; SZAKONYI, Z.; FÜLÖP, F.; YRANZO, G. I. Flash vacuum pyrolysis (fvp) of some hexahydroquinazolin-4(1H)-ones. **Tetrahedron**, v. 64, p. 1049-1057, 2008.

PELÁEZ, W. J.; IRIARTE, A. G.; SZAKONYI, Z.; FÜLÖP, F.; ARGÜELLO, G. A. Theoretical and experimental study on the reaction route for the FVP of 2-thioxohexahydroquinazolinones. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 96, p. 181-187, 2012.

PEPINO, A. J.; PELÁEZ, W. J.; MOYANO, E. L.; ARGÜELLO, G. A. Highly efficient dehydrogenation of 5-benzyl-3-phenyl-2-thioxoimidazolidin-4-one: Microwave versus flash vacuum pyrolysis conditions. **European journal of organic chemistry**, p. 3424-3430, 2012.

PINTO, A. C.; BARREIRO, E. J. Desafios da indústria farmacêutica brasileira. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p.1557-1560, 2013.

RAO, P. S.; KALVA, S.; YERRAMILI, A.; MAMIDI, S. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 2-7, 2011.

SÁNCHEZ, J. I. S.; AVILA, J. M.; TERÁN, A. O.; VARGAS, F. D.; CORRAL, V. W.; CAMACHO, S. P. D.; PÁEZ, F. G.; BASTIDAS, P. B. Synthesis of 1h-benzoxazine-2,4-diones from heterocyclic anhydrides: evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1297-1301, 2014.

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

SAWANT, R.; BHANGALE, L.; WADEKAR, J.; GAIKWAD P. Substituent selection for design and synthesis of antimicrobial 1,3 oxazines: a Topliss modified approach. **Farmácia**, v. 60, p. 32-39, 2012.

SAWANT, R. L.; MHASKE, M. S.; WADEKAR, J. B. Synthesis and antimicrobial activity of Schiff bases of 1, 3-oxazines. **International Journal of PharmTech Research**, v. 4, n. 4, p. 1653-1659, 2012.

SCHEUNEMANN, M.; SORGER, D.; KOUZNETSOVA, E.; SABRI, O.; SCHLIEBS, R.; WENZEL, B.; STEINBACH, J. Sequential ring-opening of trans-1,4-cyclohexadiene dioxide for an expedient modular approach to 6,7-disubstituted (\pm)- hexahydro-benzo[1,4]oxazin-3-ones. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 31, p. 5497-5501, 2007.

SCHOLTE, R. G. C.; GOSONI, L.; MALONE, J. B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, p. 57-63, 2014.

SINDHU, T. J.; ARIKATT, S. D.; VINCENT, G.; CHANDRAN, M.; BHA, T. A. R.; KRISHNAKUMAR, K. Biological activities of oxazine and its derivatives: A review. **International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)**, v. 4, n. 11, p. 134-143, 2013.

SORGER, D.; SCHEUNEMANN, M.; VERCOUILLIE, J.; GROßMANN, U.; FISCHER, S.; HILLER, A.; WENZEL, B.; ROGHANI, A.; SCHLIEBS, R.; STEINBACH, J.; BRUST, P.; SABRI, O. Neuroimaging of the vesicular acetylcholine transporter by a novel 4-[¹⁸F]fluorobenzoyl derivative of 7-hydroxy-6-(4-phenyl-piperidin-1-yl)- octahydro-benzo[1,4]oxazines. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 36, p. 17-27, 2009.

SUKHORUKOV, A. YU.; NIRVANAPPA, A. C.; SWAMY, J.; IOFFE, S. L.; SWAMY, S. N.; BASAPPA; RANGAPPA, K. S. Synthesis and characterization of novel 1,2-oxazine-based small molecules that targets acetylcholinesterase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3618-3621, 2014.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 411-425, 2006.

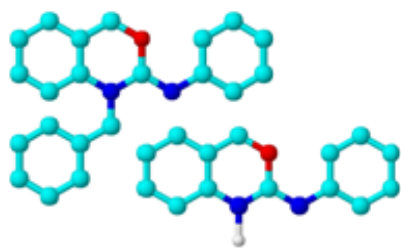
VARMA, R. S. Chemical activation by mechanochemical mixing, microwave and ultrasonic irradiation. **Green Chemistry**, v. 10, p. 1129-1130, 2008.

VIEGAS, J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOVK, A. I.; SHIVANYUK, A. M.; BUGAS, R. V.; MUZYCHKA, O. V.; MELNYK, A. K. Antioxidant and antiradical activities of resorcinarene tetranitroxides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 1314-1317, 2009.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y.S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1871-1877, 2012.

ZHOU, X. W.; MA, H. L.; ZHANG, X.; JING, S. Y.; MIAO, J. Y.; ZHAO, B. X.. Synthesis of 6-cinnamoyl-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ones and their effects on A549 lung cancer cell growth. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 79, p. 95-101, 2014.



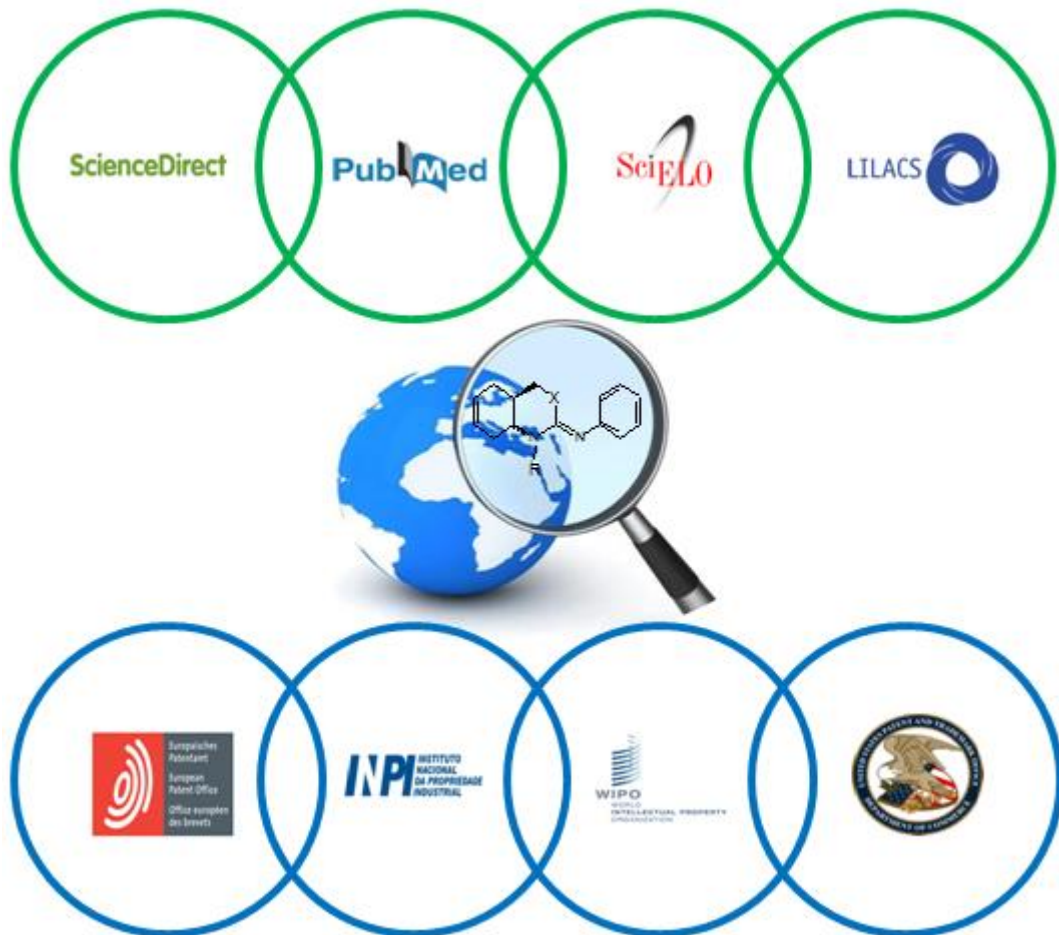
Capítulos

CAPÍTULO I

Prospecção científica e tecnológica dos derivados de oxazinas

(Artigo a ser submetido à Revista GEINTEC)

Qualis B5



PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DOS DERIVADOS DE OXAZINAS

RESUMO

Oxazinas são compostos heterocíclicos contendo um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, podendo formar derivados 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina. O objetivo desse estudo foi realizar uma prospecção científica e tecnológica dos derivados de oxazina (WP45 e WP2331) sobre suas atividades farmacológicas esquistosomicida, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante. A prospecção tecnológica foi realizada em bases eletrônicas de dados INPI, EPO, USPTO e WIPO e a prospecção científica foi realizada nas bases *ScienceDirect*, *PubMed*, *Lilacs* e *Scielo*. Não foi encontrada nenhuma publicação dos compostos em estudo, WP45 e WP2331 relacionada às atividades farmacológicas esquistosomicida, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante. Entretanto foi encontrado registro de depósito de patente e artigos publicados referente a substância de origem, oxazina, sendo poucos relacionados a atividade farmacológica. No Brasil há apenas 25 registros de depósito de patente referente aos derivados de oxazina, sendo que apenas 20% destas estão relacionadas a alguma atividade farmacológica, como antitumoral, antimicrobiana e tratamento para artrite. Desta forma, com base nas propriedades atribuídas aos derivados de oxazina possam estimular o desenvolvimento de produtos derivados desta molécula.

Palavras-chave: Registro de Patente. Atividade farmacológica. Bases eletrônicas.

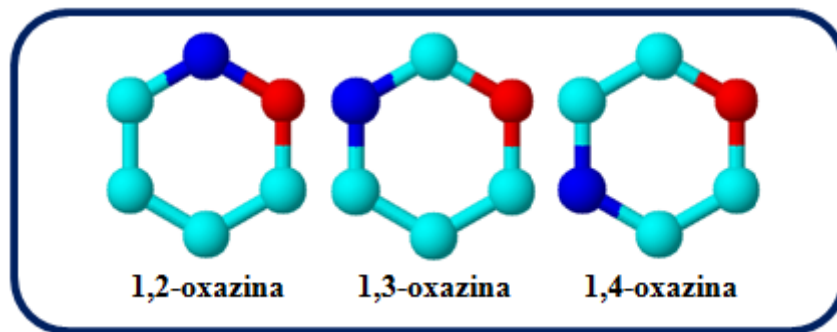
1 - INTRODUÇÃO

Os compostos sintéticos heterocíclicos podem ser obtidos por modificações estruturais na molécula precursora com simplificação molecular, incorporação de novos compostos ou ainda mantendo a estrutura precursora. Uma alternativa aos métodos convencionais de síntese é a FVP (*Flash Vacuum Pyrolysis*) que utiliza procedimentos para efetuar a desidrogenação seletiva na reação de síntese sem quaisquer aditivos ou catalisadores, desta forma realizando uma síntese sem produção de resíduos orgânicos (VARMA, 2008; PELÁEZ et al., 2008).

Um exemplo de compostos heterocíclicos são as oxazinas, que contém um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, que podem formar derivados 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina (**Figura 1**). O derivado 1,3-oxazina atrai atenção diferenciada por constituir uma classe importante de produtos naturais e não-naturais com vasta atividades farmacológicas, dentre elas, podemos citar atividade antirreumática, anti-isquêmica, citotóxica, anti-

osteoclástica e efeitos anti-hipertensivos (YUKAKO et al., 2009; VIKAS et al., 2012; DHANYA et al., 2013).

Figura 1. Estruturas químicas da 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina



Fonte: Autoria própria, 2015.

O efavirenz, um trifluorometil-1,3-oxazin-2-ona, é um inibidor da transcriptase reversa não-nucleósido inibidor que exibe uma atividade significativa contra cepas mutantes do HIV-1. Derivados de 1,3-oxazina, também são conhecidos por funcionar como agonistas do receptor de progesterona. Naphthoxazines possuem estimulante atividade antidepressiva e são utilizados no tratamento da doença de Parkinson (JOYCE et al., 2003; ZHANG et al., 2003; MILLAN et al., 2004).

Outros estudos demonstram que derivados de oxazinas apresentam atividade analgésica, antiinflamatória, antileucêmica, antimalárica, antipirético, anticonvulsivante e antimicrobiano (CASSADY et al., 2004; TURGUT; PELIT; KOYCU, 2007; SALWA et al., 2008; KALIRAJAN et al., 2009).

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi realizar uma prospecção científica e tecnológica dos derivados de oxazina (WP45 e WP2331) sobre suas atividades farmacológica esquistossomicida, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante.

2 - METODOLOGIA

A prospecção foi baseado na pesquisa de artigos científicos e pedidos de registro de patentes que versam sobre a oxazina e os seus derivados associado a ação esquistossomicida, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante realizada em fontes eletrônicas. Para tanto, a busca na literatura científica foi realizada utilizando as seguintes palavras-chave: oxazina, atividade esquistossomicida, atividade antitumoral, atividade antimicrobiana e suas associações nos

idiomas inglês e português. As bases de periódicos utilizadas foram o *ScienceDirect*, *PubMed*, *Lilacs* e *SciELO*. Na etapa subsequente, os artigos científicos foram selecionados a partir do resumo e texto completo que retratassem as atividades farmacológicas propostas no estudo. É relevante destacar que os artigos que apresentavam duplicidade foram excluídos. O recorte temporal de manuscritos científicos publicados foi compreendido entre junho de 2005 a junho de 2015.

Em relação às bases de dados tecnológicas foram utilizadas a *European Patent Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A pesquisa foi realizada em junho de 2015 e foram utilizados como palavras-chave os termos oxazina, *Schistosoma mansoni*, N-[(2Z,4aR,8aS)-1-benzil-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ilidene]aniline (WP45), N-[(2Z,4aR,8aR) 1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ilidene]aniline (WP2331) e a combinação destes termos em língua portuguesa e inglesa.

Figura 2. Esquematização da realização da busca de artigos e registros de patentes



Fonte: Autoria própria, 2015.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Artigos

Nas bases de dados científicos do *Science Direct*, *PubMed* e *Scielo* foram encontrados respectivamente 4703, 3200 e 3 artigos para o termo oxazina no título e/ou resumo. Quando foi associado o termo oxazina com a atividade esquistossomicida, não há nenhum artigo publicado nas quatro bases de dados, porém quando associado com a atividade antitumoral, verificou-se 5 artigos no *Science direct* e 11 artigos no *Pub med* e na associação com a atividade antimicrobiana, verificou-se 5 publicações no *Science direct*, 18 no *PubMed* e 1 no *Scielo*. A base *Lilacs* não conta com nenhum artigo publicado no período de 2005 a 2014 com os referidos termos de busca. A busca constatou a discrepância do número de publicações de novos compostos sintéticos e a correlação destes com uma atividade biológica. Os resultados da busca de artigos foram demonstrados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Resultados da prospecção científica realizada em banco de dados eletrônicos no período de 2005 a 2015

Palavras-chaves	ScienceDirect	PubMed	Lilacs	Scielo
Oxazina “oxazine”	4703	3200	-	3
Oxazina “oxazine” +	-	-	-	-
Atividade esquistossomicida “schistosomicidal activity”				
Oxazina “oxazine” +	5	11	-	-
Atividade antitumoral “antitumor activity”				
Oxazina “oxazine” +	5	18	-	1
Atividade antimicrobiana “antimicrobial activity”				

Fonte: Autoria própria, 2015.

3.2 Patentes

Para obter mais informações sobre o uso farmacológico de derivados de oxazina, foi realizada uma análise das informações disponíveis em depósitos de patentes. As patentes analisadas foram as que apresentaram o termo oxazina/oxazine no título, resumo, reivindicações e/ou descrição. Como demonstrado na **Tabela 2**, foram utilizados os depósitos de patentes nas bases de dados INPI, USPTO, WIPO e EPO para o desenvolvimento desta revisão e os resultados obtidos indicaram que uma mesma patente estava disponível em mais de um repositório de patente.

Diante disto, foi realizada uma nova busca associando ao termo oxazina/oxazine a atividade farmacológica esquistossomicida. Por último foi realizado uma busca com o nome

segundo a IUPAC dos dois compostos em estudo, denominados WP45 (N-[(2Z,4aR,8aS)-1-benzyl-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-3,1-benzoxazin-2-ylidene]aniline) e WP2331 (N-[(2Z,4aR,8aR)-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-3,1-benzoxazin-2-ylidene]aniline). Os resultados estão sumarizados na **Tabela 2**.

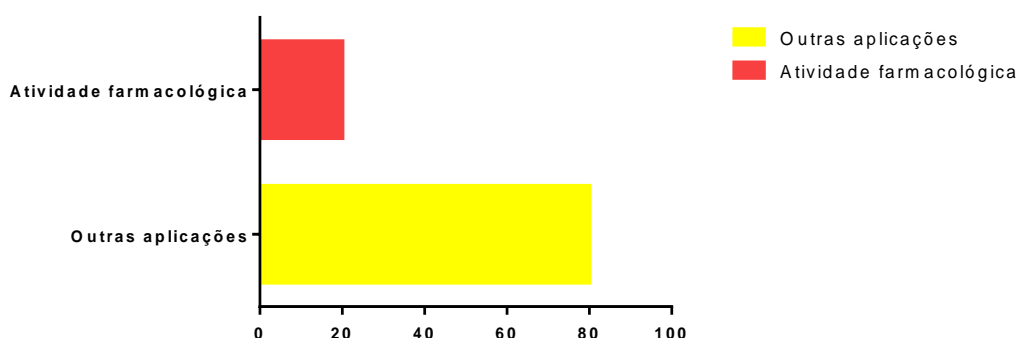
Tabela 2. Resultados da prospecção tecnológica de depósitos de patente nas bases INPI, EPO, USPTO e WIPO

Palavras-chave	INPI	EPO	USPTO	WIPO
Oxazina “oxazine”	25	2800	-	1369
Oxazina“oxazine” +	-	-	-	-
<i>Schistosoma mansoni</i>	-	-	-	-
WP45 (N-[(2Z,4aR,8aS)-1-benzyl-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-3,1-benzoxazin-2-ylidene]aniline)	-	-	-	-
WP2331 (N-[(2Z,4aR,8aR)-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-3,1-benzoxazin-2-ylidene]aniline)	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria, 2015.

A busca realizada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) constatou um número de 25 depósitos, sendo estas caracterizadas de 80% sobre outras aplicações industriais e apenas 20% se referem a atividades farmacológicas dos derivados de oxazinas (**Figura 3**). Os resultados de depósitos de patentes que associam o uso de derivados de oxazinas ao potencial farmacológico refere-se a atividade antimicrobiana (3 depósitos de patentes), anticancerígena (1 depósito de patente) e para o tratamento de artrite (1 depósito de patente) estão representados na **Tabela 3**.

Figura 3. Distribuição das patentes de derivados de oxazina no INPI no Brasil



Fonte: Autoria própria, 2015.

Tabela 3. Patentes depositadas junto ao INPI de derivados de oxazina que se referem à atividade farmacológica

Processo	Depósito	Título	Inovação
PI 0512998-2	22/06/2005	Derivados de [1,2]-oxazina-3,5-diona e di-idropirona substituídos com fenila	A presente invenção refere-se aos novos derivados de [1,2]-oxazina-3,5-diona e dihidropirona substituídos por fenila com seu uso como microbicidas e/ou composições praguicidas e/ou herbicidas.
PI 0312107-0	24/06/2003	Derivados de tiazina e de oxazina como inibidores de MMP-13 para o tratamento da artrite	Produtos medicinais contendo estes compostos que sejam úteis como inibidores específicos de metaloproteinase da matriz de tipo 13, para o tratamento de artrite e câncer.
PP 1101033-9	14/05/1997	Antimicrobianos de oxazolidinona de tiazina e oxazina substituídos	São agentes antimicrobianos úteis e eficazes contra diversos patógenos humanos e veterinários, incluindo estafilococos e enterococos resistentes bem como organismo anaeróbicos como espécies de Bacteroides spp. e Clostridia spp.
PP 1100727-3	09/05/1997	Composição farmacêutica para o tratamento do câncer	Refere-se a invenção de uma composição farmacêutica para o tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de compreender uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um composto selecionado a partir do grupo constituído base.
PI 9611400-2	17/10/1996	Agentes antimicrobianos de benzoxazina e composição farmacêutica compreendendo os mesmos	Composição farmacêutica contendo os compostos e o métodos para sua produção e o seu uso em tratamento de infecções bacterianas.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Existem lacunas que dificultam a holística do processo produção acadêmica, tecnológica e transferência de tecnologia para os processos produtivos. Uma dessas lacunas pode ser observada pela pouca produção tecnológica e depósitos de pedidos de patentes de produtos, processos, métodos, uso, ou aplicação farmacológica referente à derivados de oxazinas, apesar de todo potencial farmacológico cientificamente atribuído a seus derivados.

4 - CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados na presente revisão, é observado que as oxazinas possuem um largo espectro de atividades devido a sua versatilidade sintética que permite a geração de um grande número de derivados estruturalmente diversos. Portanto, é possível inferir que os derivados de oxazinas podem ser alvos de novas pesquisas com o objetivo de ampliação do seu potencial farmacoterapêutico.

Desta forma, há a necessidade de um investimento científico e tecnológico, que com base nas propriedades atribuídas aos derivados de oxazina que possam incentivar o desenvolvimento de produtos derivados desta espécie.

REFERÊNCIAS

CASSADY, J. M.; CHAN, K. K.; FLOSS, H. G.; LEISTNER, E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 1-26, 2004.

DHANYA, S.; UPADHYA SADHANA H.; SAVITHA; RAMA, M. Synthesis, characterization and QSAR studies of some new 1, 3-oxazines as potent antimicrobial agents. **Research Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 15-19, 2013.

JOYCE, J. N.; PRESGRAVES, S.; RENISH, L.; BORWEGE, S.; OSREDKAR, T.; HAGNER, D.; REPLOGLE, M.; PAZSOLDAN, M.; MILLAN, M. Neuroprotective effects of the novel D3/D2 receptor agonist and antiparkinson agent, S32504, *in vitro* against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and *in vivo* against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a comparison to ropinirole. **Journal Experimental Neurology**, v. 184, p. 393-407, 2003.

KALIRAJAN, R.; SIVAKUMAR, S. U.; JUBIE, S.; GOWRAMMA, B.; SURESH, B. Synthesis and biological evaluation of some heterocyclic derivatives of chalcones. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, p. 27-34, 2009.

MILLAN, M. J.; DI-CARA, B.; HILL, M.; JACKSON, M.; JOYCE, J. N.; BROTCHE, J.; MC-GUIRE, S.; CROSSMAN, A.; SMITH, L.; JENNER, P.; GOBERT, A.; PEGLION, J. L.; BROCCO, M. Novel naphthoxazine agonist at Dopamine D3/D2 receptors: I. cellular, electrophysiological, and neurochemical profile in comparison with Ropinirole. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p. 921-935, 2004.

PELÁEZ, W. J.; SZAKONYI, Z.; FÜLÖP, F.; YRANZO, G. I. Flash vacuum pyrolysis (fvp) of some hexahydroquinazolin-4(1H)-ones. **Tetrahedron**, v. 64, p. 1049-1057, 2008.

SALWA, F. M.; MOHAMED, M. Y.; ABD-EL-GALIL, E. A.; EMAN, R. K. Antimicrobial activities of some synthesized Pyridines, Oxazines and Thiazoles from 3-Aryl-1-(2-naphthyl)prop-2-en-1-ones. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 279-303, 2008.

TURGUT, Z.; PELIT, E.; KOYCU, A. Synthesis of new 1,3- disubstituted-2,3-dihydro-1H-naphth[1,2e][1,3] oxazines. **Molecules**, v. 12, p. 345-352, 2007.

VARMA, R. S. Chemical activation by mechanochemical mixing, microwave and ultrasonic irradiation. **Green Chemistry**, v. 10, p. 1129-1130, 2008.

VIKAS, V.; KULDEEP, S.; DEVINDER, K.; THOMAS, M. K.; JÖRG, S.; BALASUBRAMANIAN, N.; ASIF, K. Q.; ABID, H.; SUNDEEP. Synthesis, antimicrobial

and cytotoxicity study of 1,3-disubstituted-1H naphtho[1,2-e][1,3]oxazines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 195-202, 2012.

YUKAKO, T.; YUKO, A.; HIDEKI, K.; IKUO, K.; TAKAHIRO, O.; MASAO, K.; RYO, F.; HIROMICHI, N.; SHUNSAKU, O.; KIYOHARU, N.; YOSHITAKA, O. Preparation of novel (Z)-4-ylidenebenzo[b]furo[3,2-d][1,3]oxazines and their biological activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 3959-3967, 2009.

ZHANG, P.; TEREFENKO, E. A.; FENSOME, A.; WROBEL, J.; WINNEKER, R.; ZHANG, Z. Novel 6-aryl-1,4-dihydrobenzo[d][and oxazine-2- thiones as potent, selective, and orally active nonsteroidal progesterone receptor agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 1313-1316, 2003.

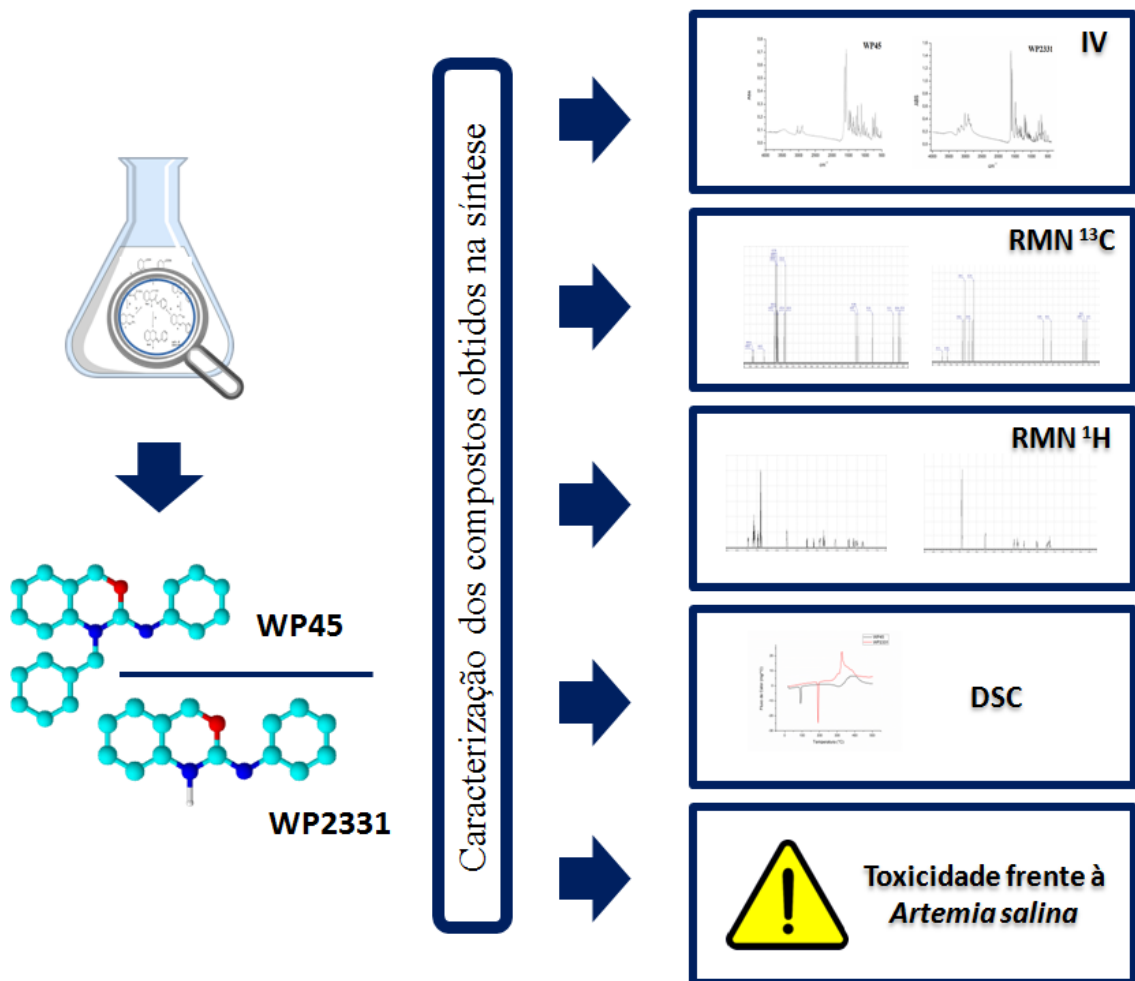
CAPÍTULO II

Obtenção de novos compostos sintéticos derivados de oxazina

(Artigo a ser submetido ao *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*)

Qualis A2

Fator de impacto: 3.564



OBTENÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE OXAZINAS

RESUMO

Oxazinas são compostos heterocíclicos contendo um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, podendo formar derivados 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina. Depois da obtenção dos derivados de 1,3-oxazinas, WP45 e WP2331, pelo método de pirólise a vácuo foi realizada a caracterização de forma há comprovar as estruturas dos dois compostos obtidos, realizou também o estudo de toxicidade *in vitro* frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Os derivados WP45 e WP2331 foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono e infravermelho, como também foi realizada a análise térmica por calorimetria diferencial. Após a análise pelos testes de caracterização, pode-se comprovar a estrutura dos dois derivados de oxazina, WP45 e WP2331. O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* demonstrou discreta toxicidade.

Palavras-chave: Toxicidade. Caracterização. *Artemia salina*.

1 - INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos são de grande importância, não só biologicamente, mas também industrialmente. Muitos derivados heterocíclicos têm uma vasta aplicação como aditivos e modificadores em uma ampla variedade de produtos na indústria, incluindo cosméticos, reprografia, armazenamento de informação, plásticos, solventes, antioxidantes e aceleradores de vulcanização. Além disso, a química de heterocíclico é um recurso inesgotável de novos compostos. Consequentemente, grandes esforços têm sido feitos para encontrar métodos sintéticos eficientes para ganhar acesso a compostos heterocíclicos (DRUZHININ; BALENKOVA; NENAJDENKO, 2007; MARTINS et al., 2008; MARTINS et al., 2009; KHAKSAR, 2015).

Neste contexto, a FVP consiste em submeter uma molécula à alta temperatura durante um curto período de tempo. Este processo permite a aquisição da cinética da reação, assim como produtos instáveis e pode ser adequado para fins de síntese ou para o estudo de mecanismo de reação. FVP é usado tanto como um procedimento sintético de etapa única como também complemento a uma síntese de várias etapas. Estas reações são geralmente consideradas limpas e sem solvente, de modo a permitir a exploração de espécies reativas, tais como, carbenos, nitrenos e radicais reações concertadas. Assim, FVP é uma técnica excelente para o estudo de reações intramoleculares, tais como a eliminação, ciclização e geração de

produtos que não podem ser preparados em solução em reações térmicas (LUCERO et al., 2012).

O presente estudo visa a caracterização dos derivados de 1,3-oxazina, WP45 e WP2331, por meio de RMN de ^{13}C e ^1H , análise por infravermelho e por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a realização de estudo de toxicidade *in vitro* frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Síntese dos derivados oxazinas

Os derivados oxazinas em estudo, denominados de WP45 e WP2331, foram sintetizados e cedidos pelo Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Químicas (INFIQC) da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba - Argentina.

Os referidos compostos foram obtidos por pirólise à vácuo a partir de um sequenciamento em cadeia do ácido 6-aminociclohex-3-ene-1-carboxílico tratado com etilcloroformiato em meio básico (NaOH) e logo após neutralizado com ácido clorídrico (HCl). Outra via da reação possível é partir de éster metil 6-aminociclohex-3-en-1-carboxilato tratado com clorofórmio (CHCl_3) e trietanolamina (TEA). As duas vias formam os derivados tioureas correspondentes tratadas com iodo metilo que originou tioéteres transformados em meio alcalino (KOH) nas correspondentes oxazinas (PELÁEZ et al., 2008).

Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho das hexahidroquinazolinonas e seus derivados, foram obtidos em fase sólida, pesando aproximadamente 1,5 mg de amostra juntamente com 150 mg de brometo de potássio previamente dessecado. Em seguida, esta mistura foi triturada em gral de ágata e posteriormente submetida à compressão em prensa hidráulica, obtendo-se as pastilhas para análise. Os espectros da matéria-prima (em pó, previamente dessecada) na região do infravermelho (refletância) foram registrados na faixa entre 4000 cm^{-1} e 650 cm^{-1} (MORAES, 2007).

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C)

Para a realização da análise de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram utilizados 10 mg de cada derivado de oxazina, WP45 e WP2331, dissoluções em 0,4 mL de solvente deuterado. Para a análise de RMN de ¹H foi utilizado uma faixa de absorção magnética dos prótons que varia de 0 a 14 ppm e para a análise no espectro de RMN de ¹³C foi utilizado uma faixa de absorção magnética que varia de 0 a 240 ppm (PELÁEZ et al., 2012).

Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A técnica termoanalítica por meio de DSC foi utilizada para caracterização das propriedades térmicas dos derivados de oxazinas no que se refere à determinação do ponto de ebulição, transição vítrea e calor específico. A programação do método foi utilizada quanto à faixa de temperatura de 20 °C a 500 °C, e com razão de aquecimento de 5 °C/min. Aproximadamente 1,5 a 3,0 mg da WP45 e da WP233 foram transferidos para cadinhos com tampas perfuradas (RODRIGUES et al., 2007).

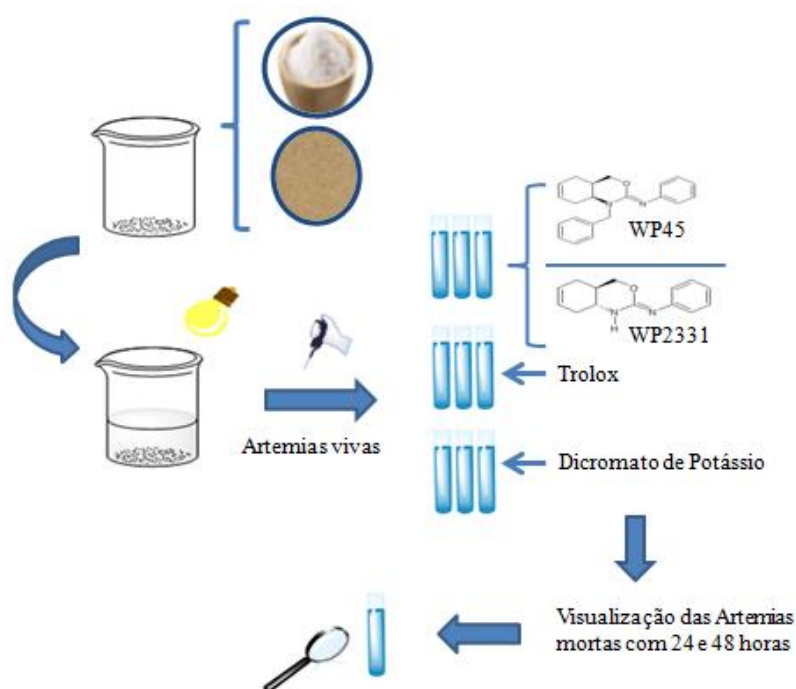
Estudo da toxicidade frente à *Artemia salina*

A metodologia descrita por Meyer e colaboradores (1982) foi utilizada, com algumas modificações (**Figura 1**). 60 mg de ovos de *A. salina* foram colocados em um béquer de 250 mL contendo água do mar artificial para eclodirem por 24 horas na presença de luz fluorescente. Após a eclosão, dez larvas de *A. salina* foram transferidas para tubos de ensaios contendo WP45 e tubos de ensaios contendo WP2331 na concentração de 100 µM. Um controle positivo para o teste (dicromato de potássio) e um padrão antioxidante (Trolox) foi realizado simultaneamente na mesma concentração. O experimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes. Foi realizada a contagem das larvas mortas com o auxílio de uma lupa após 24 e 48 horas. Os números de *A. salina* que morreram em determinadas concentrações foram determinadas como percentagem de toxicidade pela seguinte fórmula:

$$\text{Toxicidade (\%)} = \frac{N_{mm} - N_c}{N_0} \times 100;$$

em que, N_{mm} é o número médio de *A. salina* que morreram, N_0 é o número inicial de *A. salina* que sobreviveram em cada concentração e N_c representa a mortalidade no controle do teste.

Figura 1. Representação do teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*



Fonte: Autoria própria, 2015.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Processo de obtenção dos derivados oxazinas

A pirólise a vácuo consiste em um método baseado nos princípios da *Green Chemistry* que visa explorar condições alternativas de reação utilizando meios reacionais eficazes para realizar as transformações químicas pretendidas, minimizando a formação de subprodutos ou resíduos e reduzindo a utilização de solventes orgânicos voláteis convencionais por meio da utilização de altas temperaturas durante um curto período de tempo (10^{-2} s) (VARMA, 2008; LUCERO et al., 2012).

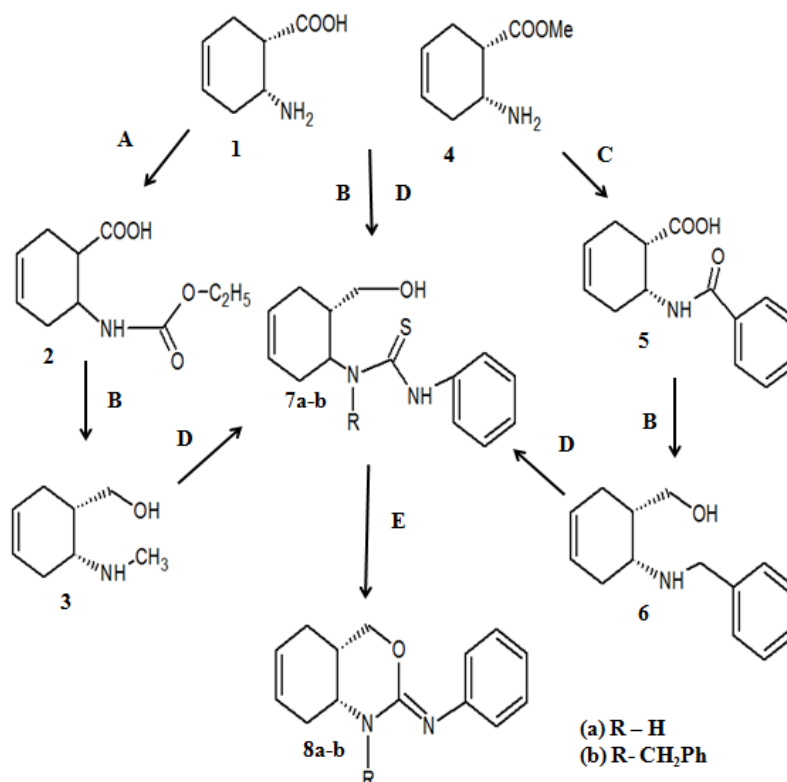
O processo de síntese dos dois derivados de oxazina denominados aqui de WP45 e WP2331 é descrito a seguir (**Figura 2**): O 6-aminociclohexa-3-encarboxílico ácido **1** foi tratado com etilcloroformiato em meio básico (NaOH) e logo após para neutralizar a solução, foi utilizado ácido clorídrico (HCl) formando o ácido 6-((etoxicarbonil)amino)ciclohexa-3-encarboxílico **2**. A redução deste derivado com hidrato de Alumínio e Lítio (LiAlH_4) em tetrahidrofurano (THF) dando lugar a formação de (6-(metilamino)ciclohexo-3-en-1-yl)metanol **3**.

Outra via de reação utilizada foi a partir de metil 6-aminociclohex-3-enecarboxilato **4** que se transforma em ácido 6-benzamidociclohex-3-enecarboxílico **5** com cloridrato de benzoíla em clorofórmio (CHCl_3) e trietanolamina (TEA). Este último composto se reduziu com hidrato de Alumínio e Lítio (LiAlH_4) para formar o (6-(benzilamino)ciclohex-3-en-1-yl)metanol **6**.

Com fenil isotiocianato os álcoois **3** e **6** se formaram os derivados de tiouréia correspondentes **7b**. Para quando se pretende obter as oxazinas correspondentes, o tratamento dos derivados de tiourea **7b** com iodo metilo originam tioéteres, que não purificados foram transformados em meio alcalino (KOH) em oxazina correspondente **9c**.

Para a obtenção das oxazinas sem substituir, **9a**, o tratamento direto do ácido 6-aminociclohex-3-ene-1-carboxílico **1** e o éster metil 6-aminociclohex-3-en-1-carboxilato **4** com hidruro de Alumínio e Lítio em tetrahidrofurano formando os amino álcoois correspondentes, que com posterior tratamento com fenil isotiocianato gera a tiouréia **7a**. Para obter o núcleo heterocíclico base de oxazina, se procede da mesma maneira que com as tiouréias substituídas, gerando os núcleos heterocíclicos sem substituição do **9a**.

Figura 2. Rota de síntese dos compostos WP45 e WP2331

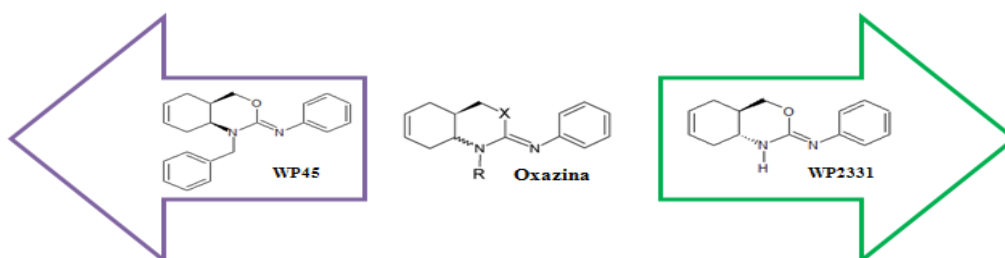


Legenda: 1) Cloroformiato de etilo/NaOH; 2) HCl. B: $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$. C: Cloreto de benzoílo/ CHCl_3/TEA . D: Fenilisotiocianato / Tolueno. E: 1) $\text{CH}_3\text{I}/\text{CH}_3\text{OH}$; 2) KOH/ MetOH.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Por meio deste método obtiveram-se dois compostos derivados de oxazinas denominados de WP45 e WP2331 (**Figura 3 e Tabela 1**), ao qual é o objeto de estudo.

Figura 3. Oxazinas e seus derivados



Fonte: Arquivo pessoal, 2015.

Tabela 1. Compostos obtidos por meio de síntese de derivado da oxazina

Nome do composto (IUPAC)	WP45 (N-[(2Z,4aR,8aS)-1-benzyl-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-3,1-benzoxazin-2-ylidene]aniline)	WP2331 (N-[(2Z,4aR,8aR)-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-2H-3,1-benzoxazin-2-ylidene]aniline)
X	O	O
R	C ₇ H ₇	H
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O
PM	318,41	228,29
PF	86-88 °C	190,15 °C
Pureza	97,3%	99,8%

Fonte: Autoria própria, 2015. **Legenda:** X – alogênio; R – radical; PM – peso molecular; PF – ponto de fusão.

Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

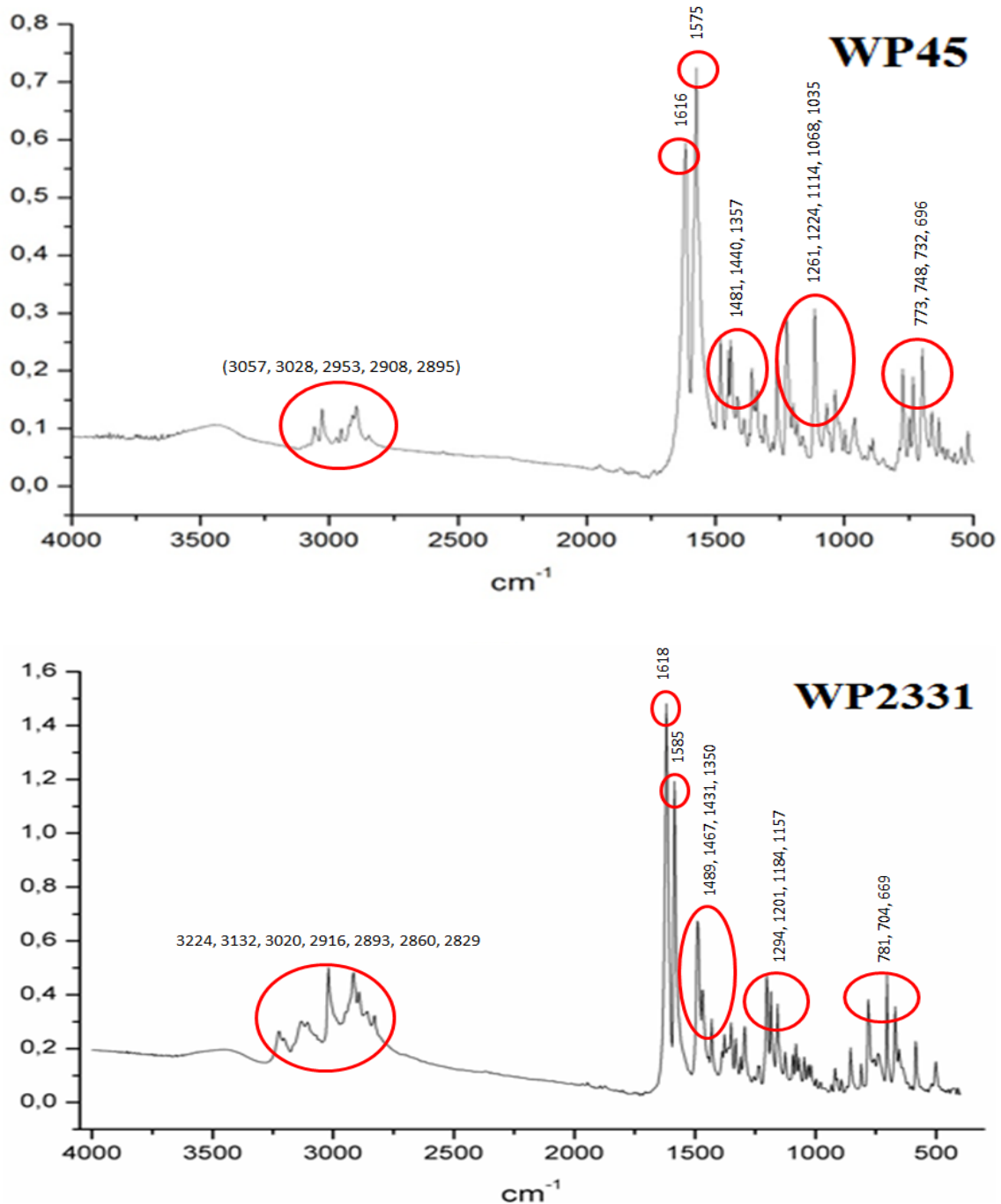
A análise por infravermelho resultou nos seguintes picos demonstrado na **Figura 4**. As bandas de absorção presente na região de 3224 cm⁻¹ observado no espectro da WP2331 corresponde ao estiramento de N-H, não demonstrado no espectro correspondente ao composto WP45. A presença dos picos entre 3057-2895 cm⁻¹ demonstrado no espectro da WP45 e os picos entre 3132-2829 cm⁻¹ para a WP2331 caracterizam a presença de estiramentos de hidrogênio de carbonos sp² e sp³.

Os picos 1616 e 1575 no espectro da WP45 e os picos 1618 e 1585 no espectro da WP2331 são característicos de ligação dupla entre carbonos (C=C) presentes em grupamentos aromáticos.

Já os picos na região entre $1481\text{-}1357\text{ cm}^{-1}$ (WP45) e $1489\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ (WP2331) correspondem ao dobramento de CH_2 e CH_3 .

Porém os picos entre $1261\text{-}1035\text{ cm}^{-1}$ (WP45) e $1294\text{-}1157\text{ cm}^{-1}$ (WP2331) correspondem a presença de ligação de carbono com oxigênio (C-O).

Figura 4. Análise por Infravermelho das substâncias WP45 e WP2331



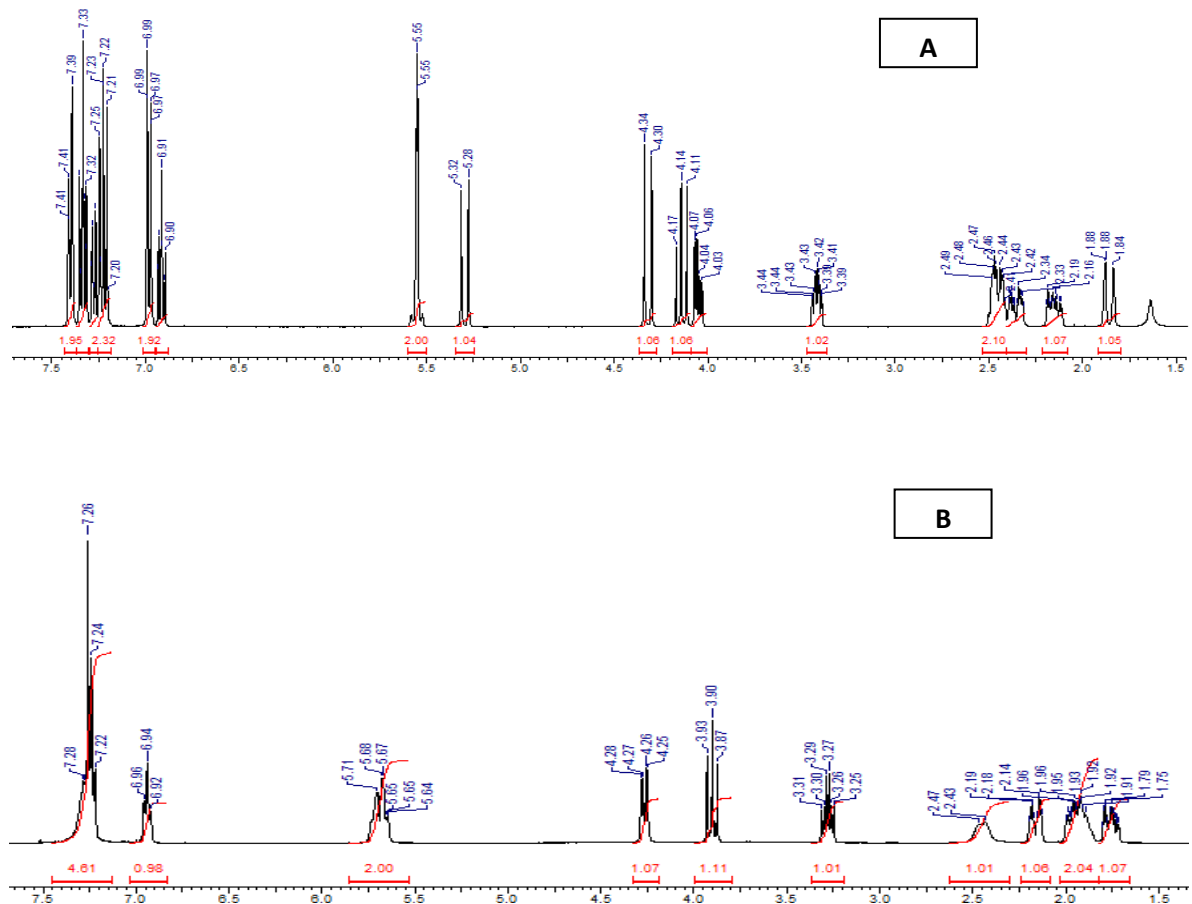
Fonte: Autoria própria, 2015.

Espectroscopia por RMN ^1H

A análise por RMN ^1H da WP45 resultou nos sinais: (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.86 (1H, d, $J = 17.6$ Hz), 2.12-2.19 (1H, m), 2.32-2.47 (3H, m), 3.43 (1H, m), 4.05 (1H, m), 4.14 (1H, t, $J = 11.3$ Hz), 4.33 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 5.30 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 5.55 (2H, s), 6.92 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 6.98 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.20-7.23 (3H, m), 7.33 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.40 (2H, d, $J = 7.1$ Hz).

Já a análise por RMN ^1H da WP2331 resultou nos sinais: (400 MHz, CDCl_3) δ (PPM): 1.76 (1H, tm, $J = 14.1$ Hz), 1.94 (2H, m), 2.17 (1H, PP, $J = 16.8$ Hz), 2.45 (1H, d, $J = 15.3$ Hz), 2.28 (1H, td, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz), 3.90 (1H, dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 10.9$ Hz), 4.27 (1H, dd, $J_1 = 10.3$ Hz, $J_2 = 4.3$ Hz), 5.69 (2H), 6.94 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.26 (5H, m).

Figura 5. Análise por RMN ^1H das substâncias WP45 e WP2331



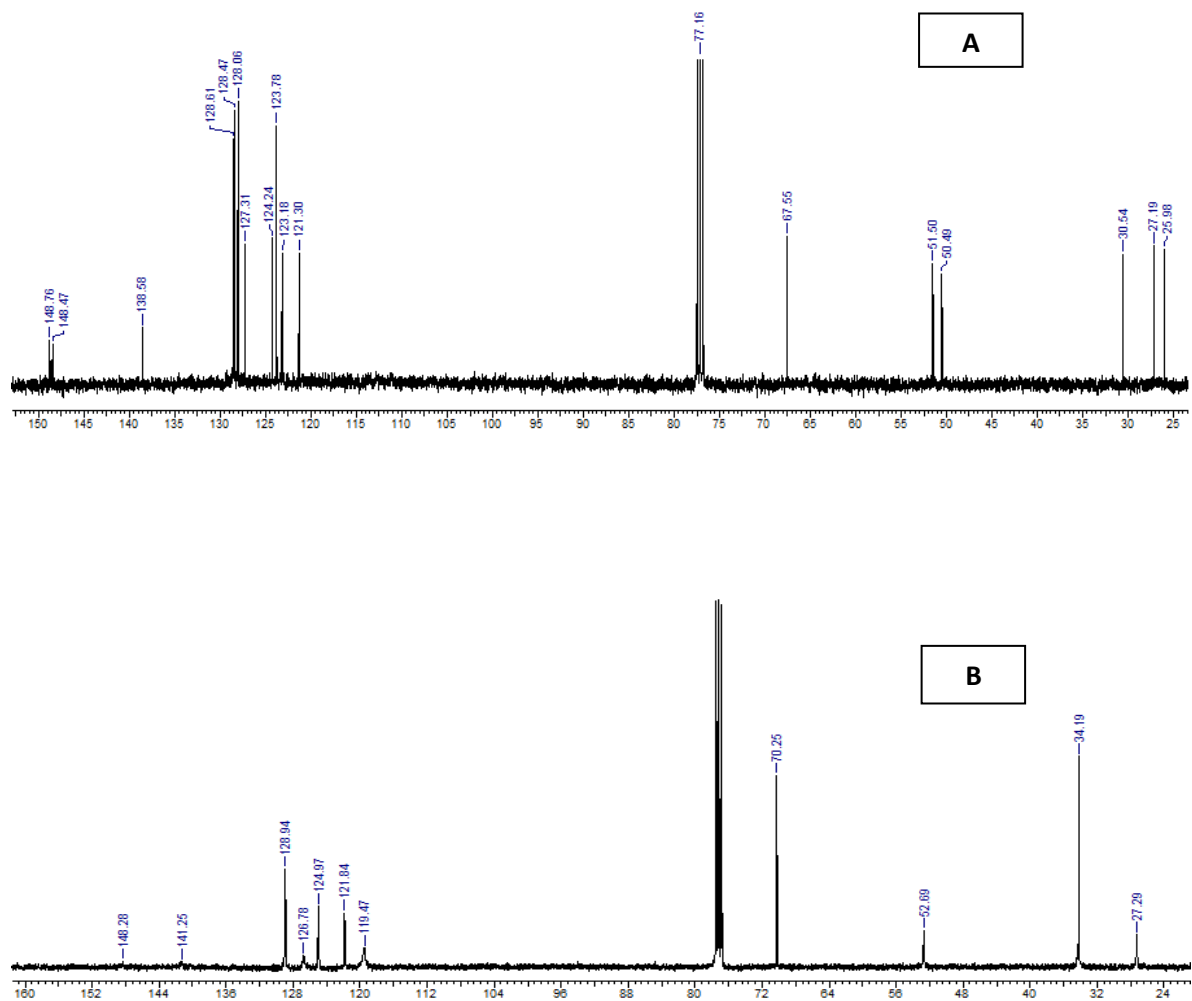
Legenda: A - RMN ^1H da WP45; B - RMN ^1H da WP2331

Fonte: Autoria própria, 2015.

Espectroscopia por RMN ^{13}C

A análise por RMN ^{13}C da WP45 e da WP2331 resultou nos sinais (100 MHz, CDCl_3) das disposições de carbono (**Figura 6**). Observa-se a semelhança entre as bandas dos espectros dos dois compostos (WP45 e WP2331), porém com diferença na região entre 120-130 no espectro da WP45 caracterizado pela presença do grupamento benzil (C_7H_7) em sua estrutura molecular.

Figura 6. Análise por RMN ^{13}C das substâncias WP45 e WP2331

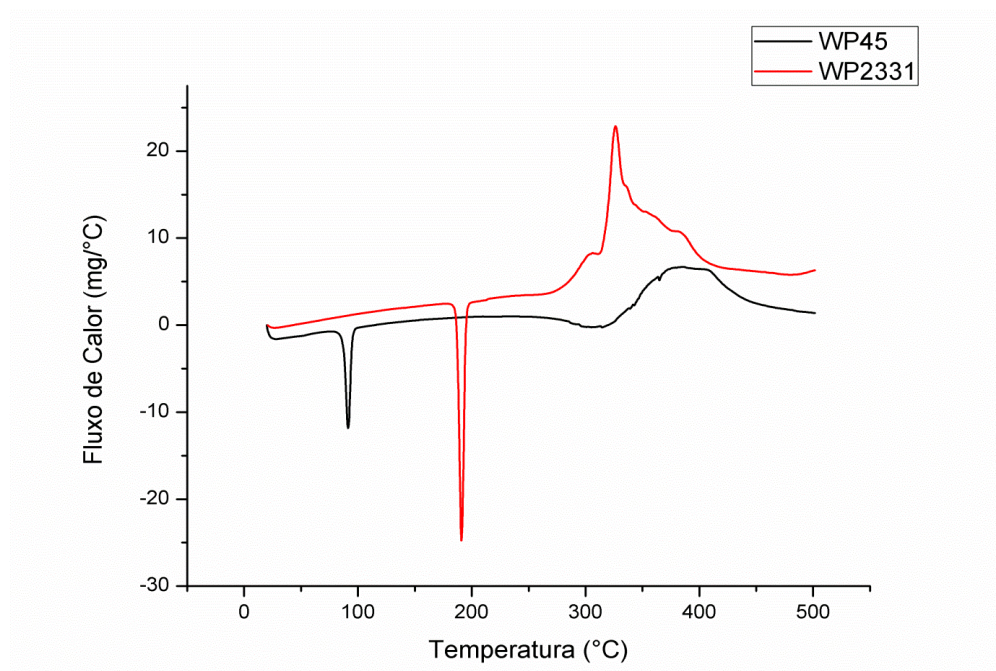


Legenda: A - RMN ^{13}C da WP45; B - RMN ^{13}C da WP2331

Fonte: Autoria própria, 2015.

Calorimetria diferencial exploratória

As curvas DSC (**Figura 7**) obtidas com a diferença da razão de aquecimento corresponde a um evento endotérmico, relacionado com a fusão e decomposição térmica dos dois compostos em estudo, WP45 e WP2331.

Figura 7. Análise por DSC das substâncias WP45 e WP2331

Fonte: Autoria própria, 2015.

Estudo da toxicidade frente à *Artemia salina*

Um entrave na maioria dos compostos candidatos a fármacos é a toxicidade, devido a isso, uma alternativa é o teste de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Este teste favorece a utilização em diversos estudos de maneira rápida e a baixo custo (LIMA et al., 2009; MANNETI et al., 2010; BEDNARCZUK et al., 2010). Desta forma, foi realizado o estudo da toxicidade frente a *A. salina* como avaliação preliminar de toxicidade para os dois derivados de oxazinas, WP45 e WP2331.

Os resultados da toxicidade em *A. salina* estão demonstrados na **Tabela 2**. Os valores referentes à CE_{50} nas primeiras 24h do teste de toxicidade, a WP2331 demonstrou uma menor toxicidade (CE_{50} 299,8) quando comparado a WP45 (CE_{50} 100,9) e ao padrão antioxidante Trolox[®] (CE_{50} 100,3). Após 48h do início do teste a WP2331 apresentou a menor CE_{50} (CE_{50} 0,12).

Tabela 2. Valor da CE_{50} na avaliação de toxicidade frente a *A. salina* com 24 e 48h

Substâncias	Trolox[®]	WP45	WP2331
24h	100.3	100.9	299.8
48h	72.67	19.92	0.12

Fonte: Autoria própria, 2015.

4 - CONCLUSÃO

Por meio do método de síntese por pirólise a vácuo a partir de uma molécula de oxazina, obteve-se dois novos compostos denominados de WP45 e WP2331, com descrição pela primeira vez na literatura. Foram caracterizadas pelos métodos de IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DSC e a partir daí desenhada sua estrutura química. No estudo de avaliação da toxicidade em *A. salina*, observou-se uma discreta toxicidade, porém a WP2331 demonstrou maior segurança quando comparada ao padrão antioxidante Trolox[®] e a WP45.

REFERÊNCIAS

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, p. 43-50, 2010.

DRUZHININ, S. V.; BALENKOVA, E. S.; NENAJDENKO, V. G. Recent advances in the chemistry of α,β -unsaturated trifluoromethylketones. **Tetrahedron**, v. 63, p. 7753-7808, 2007.

KHAKSAR, S. Fluorinated alcohols: A magic medium for the synthesis of heterocyclic compounds. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 172, p. 51-61, 2015.

LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, T. G.; SILVA, M. B. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta daninha**, v. 27, p. 7-11, 2009.

LUCERO, P. L.; PELÁEZ, W. J.; RIEDL, Z.; HAJÓS, G.; MOYANO, E. L.; YRANZO, G. I. Flash vacuum pyrolysis of azolylacroleins and azolybutadienes. **Tetrahedron**, v. 68, p. 1299-1305, 2012.

MARTINS, M. A. P.; FRIZZO, C. P.; MOREIRA, D. N.; BURIOL, L.; MACHADO, P. Solvent-Free Heterocyclic Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4140-4182, 2009.

MARTINS, M. A. P.; FRIZZO, C. P.; MOREIRA, D. N.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G. Ionic Liquids in Heterocyclic Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2015-2050, 2008.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 45, p. 31-34, 1982.

PELÁEZ, W. J.; IRIARTE, A. G.; SZAKONYI, Z.; FÜLÖP, F.; ARGÜELLO, G. A. Theoretical and experimental study on the reaction route for the FVP of 2-thioxohexahydroquinazolinones. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 96, p. 181-187, 2012.

PELÁEZ, W. J.; SZAKONYI, Z.; FÜLÖP, F.; YRANZO, G. I. Flash vacuum pyrolysis (FVP) of some hexahydroquinazolin-4(1H)-ones. **Tetrahedron**, v. 64, p. 1049-1057, 2008.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 43, n. 3, p. 386-395, 2007.

VARMA, R. S. Chemical activation by mechanochemical mixing, microwave and ultrasonic irradiation. **Green Chemistry**, v. 10, p. 1129-1130, 2008.

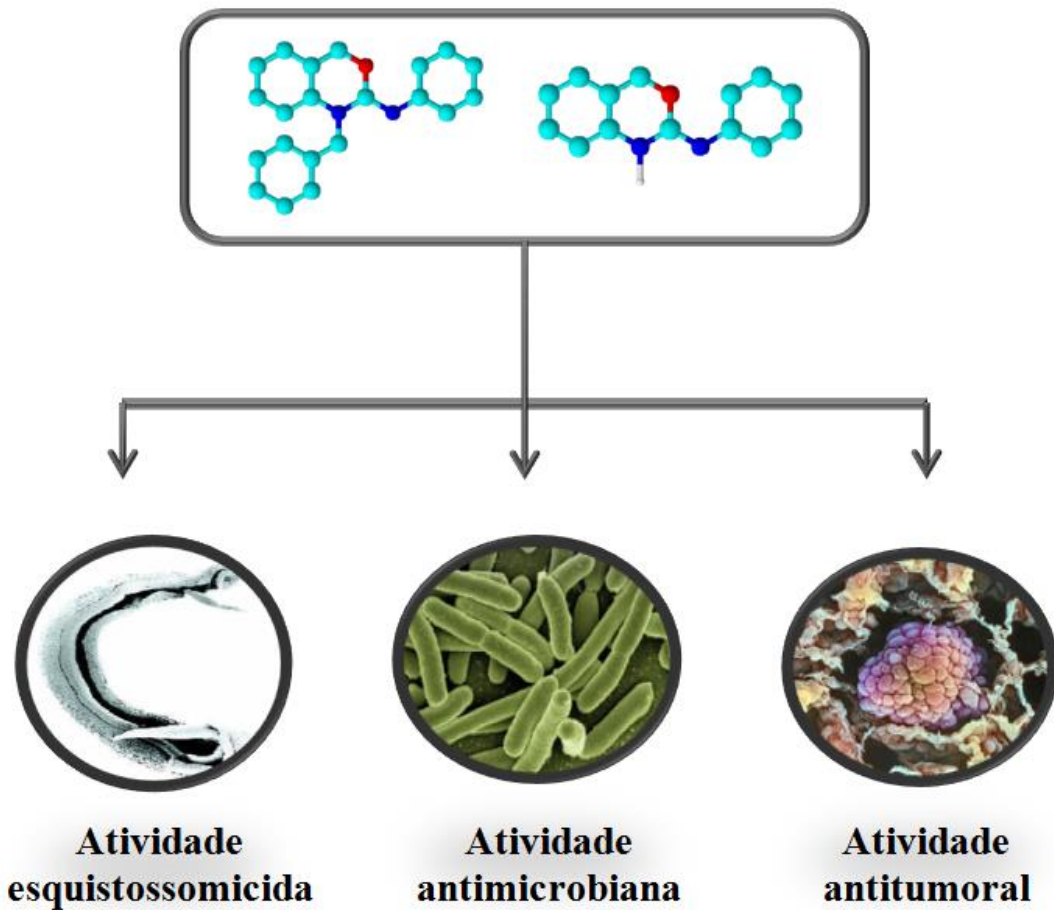
CAPÍTULO III

Derivados de oxazinas: avaliação da atividade antitumoral, antimicrobiana e esquistossomicida

(Artigo a ser submetido à Revista *Chemico Biological Interactions*)

Qualis A2

Fator de impacto: 2.577



DERIVADOS DE OXAZINAS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIMICROBIANA E ESQUISTOSSOMICIDA

RESUMO

Oxazinas são compostos heterocíclicos contendo um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, podendo formar derivados 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina. No presente estudo, realizou ensaios não-clínicos de avaliação farmacológica *in vitro* antimicrobiana, esquistossomicida e antitumoral. A WP45 e a WP2331 foram citotóxicas para as linhagens de células tumorais testadas. No teste antimicrobiano, a substância WP2331 foi a mais ativa, conseguindo inibir o metabolismo bacteriano na menor concentração testada. A WP2331 foi mais efetiva quando avaliada quanto à atividade esquistossomicida pelo efeito *in vitro* sobre vermes adultos do *Schistosoma mansoni*. A WP2331 apresentou os melhores resultados nas atividades farmacológicas testadas. Os testes não-clínicos apontam os derivados de oxazinas WP45 e WP2331 como substâncias bioativas. As propriedades farmacológicas descritas para os derivados de oxazinas WP45 e WP2331 subsidiam e fomentam a hipótese para a pesquisa e desenvolvimento de produtos destas substâncias.

Palavras-chave: Composto heterocíclico. Atividade farmacológica. Substância sintética.

1 - INTRODUÇÃO

As doenças crônicas como a esquistossomose e o câncer atingem uma grande parcela da população mundial, abrangendo um número de portadores dessas patologias de 207 milhões de pessoas para a esquistossomose e 12 milhões para o câncer. Pelo menos 280 mil pessoas morrem a cada ano de esquistossomose e outras 7 milhões de câncer. As morbidades sutis associados a essas patologias crônicas tem um impacto grave na saúde populacional (MORAES et al., 2012a; POPAT; MCQUEEN; FEELEY, 2013; TRAEBERT et al., 2013).

Outro grave impacto na saúde populacional são as infecções microbianas, devido à resistência a múltiplas drogas e micoses oportunistas tornando cada vez mais comum, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Isso decorre devido o rápido aparecimento e disseminação da multirresistência entre as bactérias, aumentando a necessidade da identificação e controle dos patógenos envolvidos. A resistência bacteriana é importante devido a sua elevada prevalência hospitalar, a sua relação com falhas nos tratamentos com antimicrobianos, aumento de morbimortalidade e aumento nos custos relacionados ao tratamento dos pacientes envolvidos (LICHTENFELS et al., 2010).

Desta forma, faz-se necessária a busca por novos compostos que possam constituir uma importante fonte de pesquisa, como a investigação dos heterociclos 1,3-oxazina demonstrou que estes compostos possuem propriedades biológicas variadas, como antibacteriano (SAWANT et al., 2012a; BHAT; PAWAR, 2008; BEENA, AKELESH, 2013; DIDWAGH, PISTE, 2013), anticoagulantes (SAWANT et al., 2012b), analgésico (HIROYUKI et al., 2008), antitumoral (OUBERAI et al., 2006; NARITA et al., 2009) e antimicrobiana (MATHEW et al., 2010). Possui uma significância biológica para esses compostos, que pode ser utilizado para o desenvolvimento de novas entidades químicas de várias doenças (SINDHU et al., 2013).

Portanto, fica evidente que grupos de pesquisas estão definindo perfis farmacológicos para os derivados de oxazinas e suas novas aplicações terapêuticas. Com isso, o presente estudo visa avaliar a atividade *in vitro* antimicrobiana, antitumoral e esquistossomicida de dois novos derivados de oxazinas, denominados de WP45 e WP2331, obtidos por meio de síntese com utilização do método de pirólise a vácuo.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Atividade Antitumoral

Linhagens de células tumorais

A atividade antitumoral *in vitro* de dois derivados de oxazinas, WP45 e WP2331, foi avaliada em três linhagens de células tumorais, HEP-2 (linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de cérvix), NCI-H292 (linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de pulmão) e MCF-7 (linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de mama), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 (meio Roswell Park Memorial Institute), suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) puro estéril obtendo-se a concentração de 25 µg/mL.

Determinação da inibição da concentração efetiva contra o crescimento celular (CE₅₀)

As células foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO, WP45 e WP2331, foram diluídas no meio RPMI 1640 para obter a concentração final (25 µg/mL) e adicionada em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), e

reincubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com dimetilsulfóxido (DMSO) puro em espectrofotômetro de placa a 595nm (BERRIDGE et al., 1996).

Atividade Antimicrobiana

Microorganismos

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ - Brasil). Os microrganismos utilizados foram: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella enterica* (ATCC 10708), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC)

O efeito antibacteriano foi avaliado por meio do método de microdiluição (SANTOS et al., 2012), como recomendado pelo Comitê Nacional pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (2003). Inicialmente, uma solução estoque de 1 mg/mL dos derivados de oxazinas (WP45 e WP2331) foi preparado usando uma solução aquosa em DMSO 20%. Após este procedimento 100 µL desta diluição foi transferida para uma microplaca contendo 100 µL de caldo de Muller-Hinton.

Em seguida, oito diluições em série foram realizadas resultando em concentrações entre de 500 µg/mL a 3,91 µg/mL da WP45 e da WP2331. O inóculo contendo 5×10^5 UFC/mL foi adicionado a cada poço. Foram reservados poços em microplaca para controle de esterilidade do caldo de Muller-Hinton pelo crescimento de bactérias e para a ação do controle de referência antimicrobiana (gentamicina). A gentamicina foi utilizada em uma concentração inicial de 1,6 mg/mL, em seguida foi diluída obtendo-se concentrações entre 0,8 µg/mL a 0,0125 µg/mL.

As microplacas foram incubadas sob condições de aerobiose durante 24 h a 37 °C, quando 10 µL de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (CTT) 2% foram adicionados a cada poço para a detecção da mudança de cor do CTT (incolor) para vermelho, refletindo o metabolismo bacteriano ativo. A MIC foi definida como a concentração mais baixa dos derivados de oxazinas (WP45 e WP2331) que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano. Para determinar a concentração mínima bactericida (MBC), alíquotas de 10 µL foram retiradas de

cada uma das cavidades contendo os compostos e transferidos para placas de Petri contendo agar Muller-Hinton. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. A aparência de colônias de bactérias para uma dada concentração indica que não era capaz de matar 99,9% ou mais de inoculo bacteriano utilizado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade Esquistossomicida

Parasitas

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* (linhagem BH) é mantido em caramujos *Biomphalaria glabrata* e hamsters *Mesocricetus auratus* no Instituto Adolf Lutz (São Paulo, Brasil), de acordo com os procedimentos padrões previamente descritos (MORAES et al., 2012a). Após 7 semanas, os adultos das espécimes de *S. mansoni* foram recuperados dos hamster previamente infectados com 150 cercárias, por perfusão em meio RPMI 1640 com heparina.

Determinação da atividade esquistossomicida

Para preparações e cultura de *S. mansoni*, os parasitas foram lavadas em meio RPMI 1640 mantido em pH 7,5 com 20 mM de tampão HEPES (*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico) suplementado com soro fetal bovino 10% e contendo 200 µg/mL de estreptomicina e 200 IU/mL de penicilina. Depois da lavagem, um par de parasitas adultos foi transferido para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços contendo o mesmo meio a 37 °C numa atmosfera de CO₂ 5%, como descrito anteriormente (MORAES et al., 2012b; VERAS et al., 2012). WP45 e WP2331 foram dissolvidas em DMSO 0,5% e testadas na concentração de 100 µg/mL. Para as substâncias que obtiveram atividade na concentração de 100 µM, foram testadas em concentrações inferiores (6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM).

Os ensaios controles foram realizados com a incubação dos parasitas em RPMI 1640 como grupo controle negativo e 3 µM de praziquantel no grupo controle positivo. Os parasitas foram mantidos por 120 h e monitorados a cada 24 h. O efeito da WP45, WP2331 e da droga padrão (Praziquantel) foi avaliada em microscópio com ênfase nas alterações de atividade motora, alterações morfológica e tegumentar e taxa de mortalidade (MORAES et al., 2012b; MORAES et al., 2013).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média) e a avaliação estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste. Os resultados da análise estatística entre os grupos avaliados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os valores de IC₅₀ e seus intervalos de confiança de 95% para os experimentos foram obtidos por meio de regressão não-linear utilizando GraphPad® Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

3. RESULTADOS

Atividade Antitumoral

A atividade antiproliferativa dos derivados de oxazinas foi realizada em três linhagens de células tumorais, NCI-H292, MCF-7 e HEP-2. No referido teste mensurou-se que os derivados oxazinas WP45 (IC₅₀% de 13,2 \pm 1,4%, 21,8 \pm 8,9% e 28,0 \pm 1,4%, respectivamente) e WP2331 (IC₅₀% de 18,4 \pm 0,4%, 28,4 \pm 4,9% e 19,3 \pm 3,1%, respectivamente) possuem atividade de inibição nas células tumorais (NCI-H, MCF-7 e HEP-2) analisadas conforme demonstrado na **Tabela 1**. As substâncias analisadas apresentaram atividade de inibição da concentração única do crescimento celular (IC₅₀) em concentração inferior ao controle positivo (doxorubicina).

Tabela 1. Inibição do crescimento celular (%) e desvio padrão das células tumorais após tratamento com concentração única (25 μ g/mL) dos derivados de oxazina, WP45 e WP2331 em três linhagens de células tumorais.

Amostra	Inibição NCI-H292 (%)	Inibição MCF-7 (%)	Inibição HEP-2 (%)
Dox	88,4 \pm 11,5	62,2 \pm 0,7	80,0 \pm 0,4
WP45	13,2 \pm 1,4	21,8 \pm 8,9	28,0 \pm 1,4
WP2331	18,4 \pm 0,4	28,4 \pm 4,9	19,3 \pm 3,1

Legenda: Dox – doxorubicina; HEP-2 – linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano; NCI-H292 – linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de pulmão; MCF-7 – linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de mama; WP45 e WP2331 – derivados de oxazinas.

Fonte: A autoria própria, 2015.

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos derivados oxazinas WP45 e WP2331 foi demonstrada nas **tabelas 2 e 3**, testadas em cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Os resultados dos testes antibacterianos com os compostos WP45 e WP2331 demonstraram atividade antibacteriana em concentrações que variam de 500 µg/mL a 3,91 µg/mL. É interessante realçar o amplo espectro de ação WP2331, composto que foi capaz de inibir as estirpes de *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. flexneri* (ATCC 12022) como uma menor concentração testada (3,91 µg/mL), para as estirpes de bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente (**Tabela 2 e Tabela 3**).

Tabela 2. Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados oxazina em diferentes cepas bacterianas gram-positivas

Amostra	<i>B. cereus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB
Gentamicina	0,4	0,4	0,4	0,4	0,025	0,025
WP45	500	500	*	*	250	500
WP2331	500	*	500	500	3,91	31,25

Legenda: MIC – Concentração Inibitória Mínima; MCB - Concentração Bactericida Mínima; (*) – sem atividade; WP45 e WP2331 – derivados de oxazinas.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Tabela 3. Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados oxazina em diferentes cepas bacterianas gram-negativas.

Amostra	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumonia</i>		<i>S. enterica</i>		<i>S. marcescens</i>		<i>S. flexneri</i>	
	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB
Gentamicina	0,025	0,4	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025	0,025	0,025	0,025
WP45	500	500	*	*	125	*	250	500	500	500
WP2331	62,5	125	*	*	500	*	500	*	3,91	125

Legenda: MIC – Concentração Inibitória Mínima; MCB - Concentração Bactericida Mínima; (*) – sem atividade; WP45 e WP2331 – derivados de oxazinas.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Atividade Esquistossomicida

Primeiramente foi realizada uma triagem para avaliar o efeito esquistossomicida das 2 amostras identificadas como WP (45 e 2331). A concentração final, em todas as amostras, foi de 100 µM. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 4**. A amostra que obteve resultado satisfatório (WP2331) apresentando 100% de mortalidade de um grupo e 100% de redução na atividade motora foi testada em 4 concentrações decrescentes ao valor inicial (50 µM; 25 µM;

12,5 μM e 6,25 μM) para avaliar se em menores concentrações manteve a atividade de redução motora com evolução para a morte dos *S. mansoni*.

Tabela 4. Avaliação da atividade esquistossomicida de derivados oxazina, WP45 e WP2331, sobre cultura de *S. mansoni* (machos e fêmeas).

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)		Redução na atividade motora (%)	
		Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Controle	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
DMSO 0,5%	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
Praziquantel 3 μM	24	100	100	100	100
	48	100	100	100	100
	72	100	100	100	100
Wp 45 100 μM	24	20	0	20	0
	48	50	0	100	0
	72	50	0	100	0
Wp 2331 100 μM	24	100	50	100	60
	48	100	50	100	70
	72	100	50	100	0

Legenda: DMSO – Dimetilsulfóxido; WP45 e WP2331 – derivados de oxazinas.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Como demonstrado na **Tabela 4**, na concentração de 100 μM a amostra WP2331 reduziu a atividade motora e causou a morte de todos os machos de *S. mansoni*. Desta forma, os resultados mostram claramente que os vermes machos foram mais susceptíveis que as fêmeas.

Levando-se em consideração esses aspectos, o composto WP2331 foi avaliado em diferentes concentrações, cujos resultados estão sumarizados nas **Tabelas 5**. Sendo observado que na concentração de 50 μM manteve-se essa atividade, não demonstradas em concentrações inferiores.

Tabela 5. Avaliação da atividade esquistossomicida da WP2331 em diferentes concentrações em cultura de *S. mansoni* (machos e fêmeas)

Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)		Redução na atividade motora (%)	
		Machos	Fêmea	Macho	Fêmea
Controle	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
DMSO 0,5%	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
Praziquantel 3 µM	24	100	100	100	100
	48	100	100	100	100
	72	100	100	100	100
Wp 2331					
100 µM	24	100	50	100	60
	48	100	50	100	70
	72	100	50	100	0
50 µM	24	100	0	100	0
	48	100	0	100	0
	72	100	40	100	40
25 µM	24	0	0	0	0
	48	0	0	20	0
	72	40	10	50	10
12,5 µM	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0
6,25 µM	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0

Legenda: DMSO – Dimetilsulfóxido; WP2331 – derivados de oxazinas.

Fonte: Autoria própria, 2015.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, a avaliação da atividade antitumoral dos dois derivados de oxazinas, WP45 e WP2331, foi realizada por meio de três linhagens de células tumorais, NCI-H292 (linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de cérvix), MCF-7 (linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma de mama) e HEP-2 (linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano) característico dos tipos de linhagens tumorais com maior incidência segundo relatório do Instituto Nacional do Câncer - INCA (2014).

Os resultados obtidos demonstram que na concentração testada (25 µg/mL) não houve inibição do crescimento das células tumorais pelas duas substâncias testadas, WP45 (13.2% ±

1.4, $21.8\% \pm 8.9$ e $28.0\% \pm 1.4$) e pela WP2331 ($18.4\% \pm 0.4$, $28.4\% \pm 4.9$ e $19.3\% \pm 3.1$) nas três linhagens de cepas tumorais em comparação ao padrão doxorubicina, demonstrada pela porcentagem de inibição. Para que uma substância seja considerada citotóxica faz-se necessário que a mesma iniba o crescimento das células tumorais em uma porcentagem acima de 75%, o que não se observou nesse estudo, apesar dos estudos realizados por Narita e colaboradores (2009) e Ouberaí e colaboradores (2006) que descreveram a atividade antitumoral com derivados 1,3-oxazinas em diferentes linhagens de células tumorais.

Para testar a atividade antibacteriana dos dois compostos, WP45 e WP2331, foram utilizadas estirpes com padrões diferentes de patogenicidade e susceptibilidade a agentes antimicrobianos disponíveis. Representando as bactérias gram-positivas foi avaliada contra cepas de *B. cereus*, *E. faecalis* e *S. aureus* e a representação das bactérias Gram-negativas foi avaliada contra cepas de *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. enterica*, *S. marcescens* e *S. flexneri*.

Os resultados sugerem que a WP2331 em uma menor concentração ($3,91 \mu\text{g/mL}$) inibiu o crescimento bacteriano de cepas gram-positiva (*S. aureus*) e gram-negativa (*S. flexneri*).

O *S. aureus* e a *S. flexneri* são importantes patógenos humanos, especialmente em ambientes hospitalares, nos quais causam infecções do trato urinário, pneumonia, meningite e sepse, entre outros. Algumas bactérias entéricas, como *Shigella sp.* estão sempre associados com doenças humanas, enquanto a *S. aureus*, que é comumente associados com infecções adquiridas na comunidade e o ambiente hospitalar. Algumas infecções por *S. aureus* podem se espalhar para diferentes tecidos e causar metástase. Episódios mais graves, como a bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite também podem ocorrer (HÖRNER et al., 2008).

Já nos ensaios antihelmínticos, considerando a taxa de mortalidade, foram observadas diferenças significativas entre os machos e fêmeas expostos as duas substâncias, sugerindo que o mecanismo de ação das substâncias podem estar relacionado ao gênero da espécie. Resultados similares foram obtidos com compostos preparados por métodos sintéticos, diaminas alquiladas e os álcoois aminados, submetidos à avaliação *in vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni*, o composto 3-F ($12,5\text{-}100\mu\text{M}$) resultou em 100% de mortalidade de vermes adultos apenas machos, ao passo que nenhuma mortalidade em vermes fêmeas foi observado, inferindo que para determinados compostos o mecanismo de ação antihelmíntico pode apresentar diferenças relacionadas ao gênero da espécie (FERNANDES et al., 2013). Na avaliação da atividade esquistossomicida dos dois derivados de oxazinas, WP45 e WP2331, revelou que apenas a WP2331 apresentou atividade esquistossomicida na concentração de 50

μM , caracterizado por redução de 100% da atividade motora e 100% de mortalidade dos parasitas machos nas primeiras 24 horas do teste.

As atividades antitumoral, antimicrobiana e esquistossomicida demonstrada nesse estudo corroboram com os estudos realizados por Sawant e colaboradores (2012a), que afirmam a ação nestas patologias relacionada com os compostos heterociclos nitrogenados, possuindo assim especial interesse, porque estes constituem uma importante classe de produtos naturais e sintéticos, muitos dos quais apresentam atividades biológicas úteis.

5. CONCLUSÃO

O derivado de oxazina WP45 demonstrou apenas atividade antimicrobiana e o derivado WP2331 demonstrou atividade antimicrobiana e esquistossomicida nas doses testadas. Em conformidade com as observações, os três referidos testes avaliados, a substância WP2331 obteve os melhores resultados.

Os testes da atividade antimicrobiana e também antihelmíntica dos compostos sintéticos WP45 e WP2331, demonstraram que os derivados das oxazinas, possuem um potencial de atividade biológica promissor, sendo importante realizar novas experiências e desenvolver novos estudos que possam elucidar os mecanismos de ação e a melhor aplicação destas substâncias, aprofundando as avaliações pré-clínicas, incrementando as avaliações clínicas e promovendo a prospecção de produtos derivados das oxazinas.

REFERÊNCIAS

BEENA, K. P.; AKELESH, T. Design, synthesis, characterization and evaluation of some 1,3-oxazine derivatives as potent antimicrobial agents. **Scholars Research Library**, v. 5, n. 4, p. 257-260, 2013.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BHAT, A. R.; PAWAR, P. D. Synthesis and biological evaluation of some [1, 4]-thiazine-2-one and [1-4]-oxazin-2-one derivatives. **Indian drugs**, v. 45, n. 12, p. 962-965, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: norma aprovada – 6ª ed., M7-A6, n. 23, p. 17, 2003.

DIDWAGH, S. S.; PISTE, P. B. Novel one-pot synthesis and anti-microbial activity of 6-chloro-2,4-diphenyl-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazines Derivatives. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 5, p. 2199-2203, 2013.

FERNANDES, F.S.; REZENDE JÚNIOR, C. O.; FERNANDES, T.S.; SILVEIRA, L.S.; REZENDE, C.A.M.; ALMEIDA, M.V DE.; DE PAULA, R. G.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A.A.; COURI, M.R.C. Anthelmintic effects of alkylated diamines and amino alcohols against *Schistosoma mansoni*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

HIROYUKI, K.; YASUHIDE, M.; YUJI, K.; KAZUYA, O.; MAKI, H. 2-Arylimino-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazines as a new class of cannabinoid receptor agonists, Part 3: Synthesis and activity of isosteric analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6444-6447, 2008.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; IGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

LICHTENFELS, E.; FRANKINI, A. D.; PALUDO, J.; D'AZEVEDO, P. A. Prevalência de resistência bacteriana nas infecções de ferida operatória causadas por estafilococos em cirurgia vascular periférica. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 54, n. 2, p. 141-146, 2010.

MATHEW, B. P.; KUMAR, A.; SATYASHEEL, S.; SHUKLA, P. K.; NATH, M. An eco-friendly synthesis and antimicrobial activities of dihydro-2H-benzo- and naphtho-1,3-oxazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 1502-1507, 2010.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; NAKANO, E. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 222-227, 2012a.

MORAES, J.; CARVALHO, A. A. L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A. A. C.; MARQUES, T. H. C.; ANDRADE, L. N.; FREITAS, R. M.; SOUSA, D. P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 12, p. 603-610, 2012b.

MORAES, J.; KEISER, J.; INGRAM, K.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; BITTENCOURT, C. R.; BEMQUERER, M. P.; LEITE, J. R.; KATO, M. J.; NAKANO, E. *In*

in vitro synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 301-309, 2013.

NARITA, T.; SUGA, A.; KOBAYASHI, M.; HASHIMOTO, K.; SAKAGAMI, H.; MOTOHASHI, N.; KURIHARA, T.; WAKABAYASHI, H. Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzo[b]cyclohept[e] [1,4]oxazine and 2-aminotropone derivatives. **Anticancer Research**, v. 29, p. 1123-1130, 2009.

OUBERAI, M.; ASCHE, C.; CARREZ, D.; CROISY, A.; DUMY, P.; DEMEUNYNCK, M. 3,4-Dihydro-1H-[1,3]oxazino[4,5-c]acridines as a new family of cytotoxic drugs, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 17, p. 4641-4643, 2006.

POPAT, K.; MCQUEEN, K.; FEELEY, T.W. The global burden of cancer. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 27, p. 399-408, 2013.

SANTOS, T.G.; REBELO, R.A.; DALMARCO, E.M.; GUEDES, A.; GASPER, A.L.; CRUZ, A.B.; SCHIMIT, A.P.; CRUZ, R.C.B.; STEINDEL, M.; NUNES, R.K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SAWANT, R.; BHANGALE, L.; WADEKAR, J.; GAIKWAD P. Substituent selection for design and synthesis of antimicrobial 1,3 oxazines: a Topliss modified approach. **Farmácia**, v. 60, p. 32-39, 2012a.

SAWANT, R. L.; MHASKE, M. S.; WADEKAR, J. B. Synthesis and antimicrobial activity of Schiff bases of 1, 3-oxazines. **International Journal of PharmTech Research**, v. 4, n. 4, p. 1653-1659, 2012b.

SINDHU, T. J.; ARIKKATT, S. D.; VINCENT, G.; CHANDRAN, M.; BHAT, A. R.; KRISHNAKUMAR, K. Biological activities of oxazine and its derivatives: A review. **International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)**, v. 4, n. 11, 2013.

TRAEBERT, J.; SCHNEIDER, I.J.C.; COLUSSI, C.F.; LACERDA, J.T. Burden of disease due to cancer in a Southern Brazilian state. **Cancer Epidemiology**, v. 37, p. 788-792, 2013.

VERAS, L.M.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R. MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

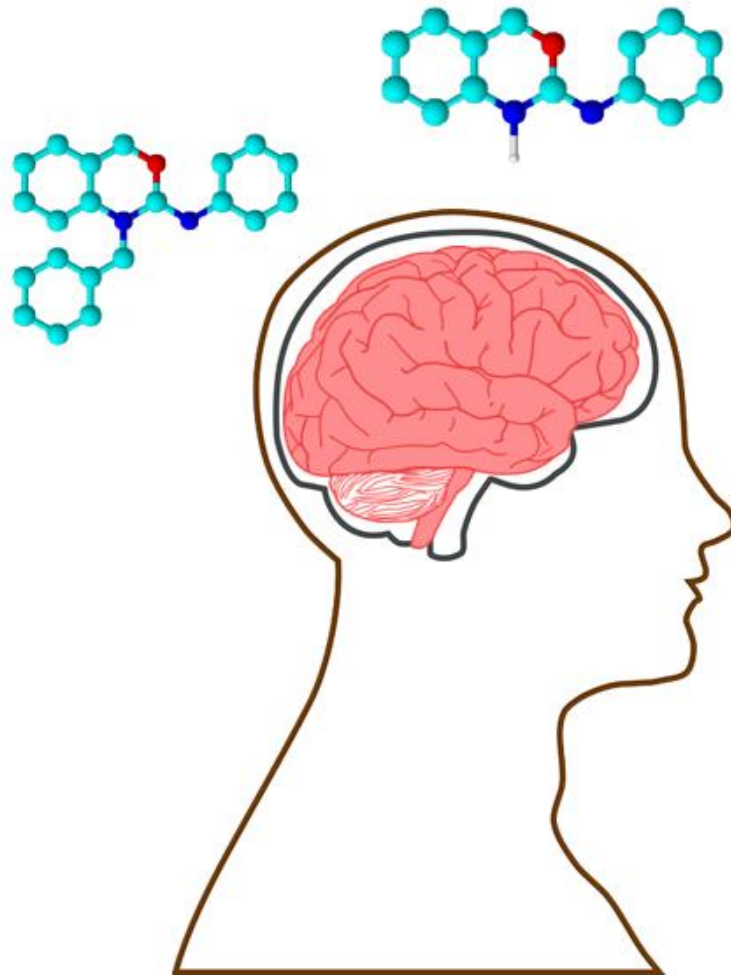
CAPÍTULO IV

Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo* de dois derivados de oxazina

(Artigo a ser submetido à Revista *Current Pharmaceutical Biotechnology*)

Qualis A2 para farmácia

Fator de impacto: 3.41



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *EX VIVO* DE DOIS DERIVADOS DE OXAZINAS

RESUMO

Oxazinas são compostos heterocíclicos contendo um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, podendo formar derivados 1,2-oxazina, 1,3-oxazina e 1,4-oxazina. O presente estudo, após obtenção dos derivados de 1,3-oxazinas WP45 e WP2331, realizou a avaliação de estudos não-clínicos de atividades antioxidante *in vitro* e *ex vivo*. A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* sugere que, a WP45 e a WP2331, por meio da capacidade de remoção do radical ABTS e do radical hidroxila, bem como pela inibição da enzima acetilcolinesterase e inibição da hemólise de eritrócitos induzido por AAPH, são fontes promissoras de compostos biologicamente ativos com propriedades antioxidantes. A WP2331 apresentou os melhores resultados nas atividades farmacológicas testadas. Os testes não-clínicos apontam os derivados de oxazinas WP45 e WP2331 como substâncias bioativas. As propriedades farmacológicas descritas para os derivados de oxazinas WP45 e WP2331 subsidiam e fomentam a hipótese para a pesquisa e desenvolvimento de produtos destas substâncias.

Palavras-chave: Radical hidroxila. Substâncias sintéticas. Acetilcolinesterase.

1 - INTRODUÇÃO

Os radicais livres possuem papel fundamental no organismo sendo responsáveis pela sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes, devido sua característica em facilitar a doação de seus elétrons para outras moléculas causando reações em cadeia (MACHADO et al., 2015). Porém alguns radicais livres, denominados Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), são prejudiciais ao organismo acarretando efeitos deletérios, como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares (OLIVEIRA et al., 2014; ALVES et al., 2010; AHMADI et al., 2010). Estes EROs como o superóxido ($O_2\bullet$), hidroxila ($OH\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são obtidos pela via de metabolização do oxigênio (ROHENKOHL; CARNIEL; COLPO, 2011).

Os processos fisiológicos responsáveis pelo mecanismo de defesa antioxidante que catalisam a redução de O_2 em água, controlam dessa forma a geração de radicais livres e impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (BARBOSA et al., 2010). Porém, em doenças nas quais o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia muitas vezes os

mecanismos de defesa não são suficiente, fazendo-se necessário procurar novos compostos antioxidantes como agentes terapêuticos (NOGUEIRA NETO et al., 2013).

Estudos realizados com compostos sintéticos demonstram capacidade antioxidante promissora. Entre esses grupos de substâncias as oxazinas vêm desempenhando papel importante devido a sua versatilidade sintética. O derivado 2-etoxi-4,5-difenil-1,3-oxazina-6-ona possui efeito neuroprotetor contra a morte celular induzida por H_2O_2 em células de feocromocitoma de rato (ANSARI; KHODAGHOLI; AMINI, 2011) e o derivado tetra-hidro-1,4-oxazina é conhecido por ser biologicamente ativo contra enzimas metabolizadoras de drogas inflamatórias (SUKHORUKOV et al., 2014).

Tendo por base a importância pela busca por novos compostos com atividade antioxidante, devido à associação desta com o potencial farmacológico de diversas doenças, este estudo visa à avaliação o potencial antioxidante dos compostos sintéticos derivados de oxazina denominados WP45 e WP2331. A capacidade antioxidante *in vitro* foi avaliada mediante a inibição da 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ($ABTS^{\bullet+}$), do radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase, bem como a capacidade antioxidante *ex vivo* por meio do efeito protetor inibindo a hemólise em eritrócitos de ratos mediante a indução por AAPH.

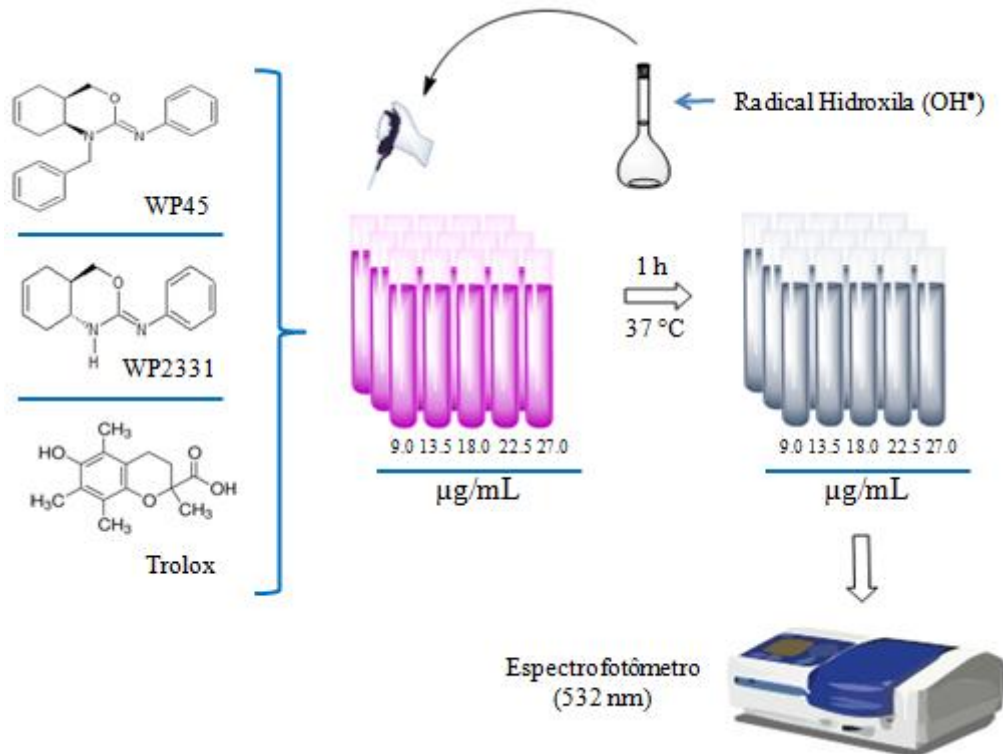
2 - MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra a produção do radical hidroxila (OH^{\bullet})

Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxila (OH^{\bullet}), gerado pela reação de Fenton, foi utilizada a metodologia descrita por Lopes e colaboradores (1999), com modificações. Várias concentrações da WP45 e da WP2331 (9.0, 13.5, 18.0, 22.5 e 27.0 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionado à mistura da reação de Fenton contendo 6 mM de $FeSO_4$, 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H_2O_2 e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). A reação foi realizada durante 15 minutos a temperatura ambiente e estacionada pela adição de ácido fosfórico a 4% seguido por 1% de ácido tiobarbitúrico (ATB) (em NaOH 50 mM). Em seguida, a mistura reacional foi aquecida durante 1 hora a 37 °C e então arrefecida a temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata e as leituras das absorbâncias mensuradas a 532 nm (**Figura 1**). Os resultados foram expressos em porcentagem como degradação da 2-desoxirribose. A concentração inibitória efetiva (CE_{50}) do composto necessário para inibir a degradação da 2-desoxirribose em 50% a 532 nm foi determinada. O

mesmo procedimento experimental para as substâncias em estudo também foi utilizada com o controle positivo Trolox nas mesmas concentrações.

Figura 1: Representação do método do Radical Hidroxila (OH^\bullet)



Fonte: Autoria própria, 2015.

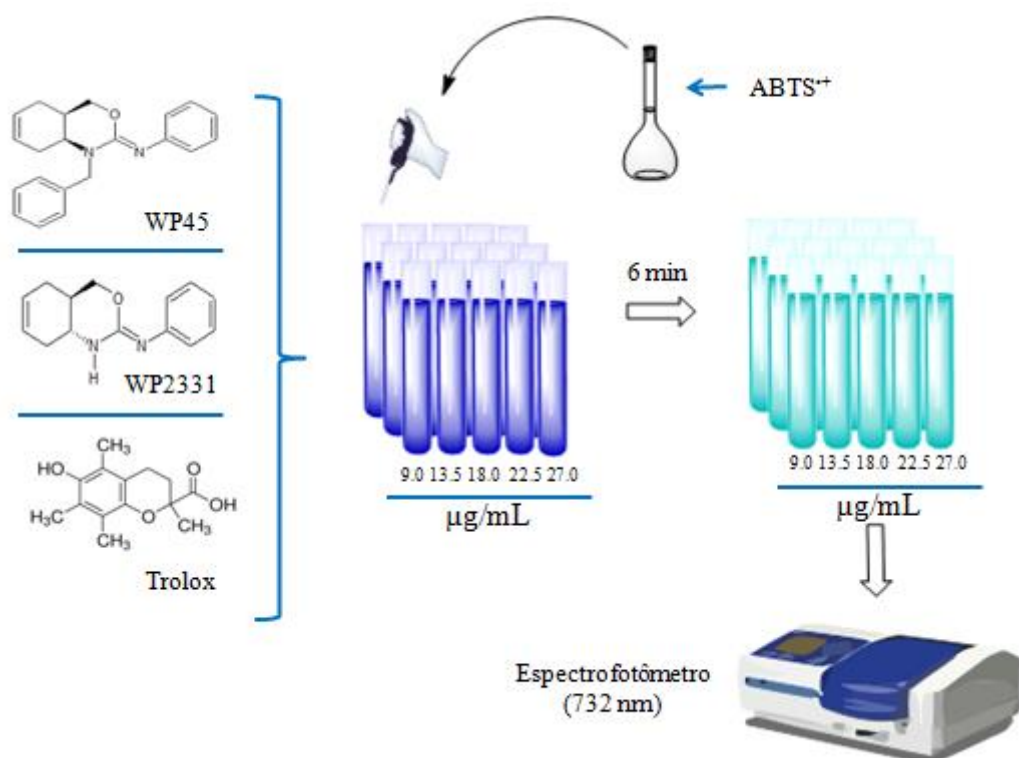
Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* pela inibição do Radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, foi utilizada a metodologia descrita por Re e colaboradores (1999). Inicialmente, o cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi formado a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ com 88 μL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída em etanol até obter uma solução com absorbância de $0,70 \pm 0,05$, a 734 nm. Em ambiente escuro e em temperatura ambiente foi transferida diferentes alíquotas da WP45 e da WP2331 (9.0, 13.5, 18.0, 22.5 e 27.0 $\mu\text{g/mL}$) para tubos de ensaio com 1960 μL do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Foi realizada a leitura da absorbância a temperatura ambiente no tempo de 6 minutos em um espectrofotômetro a 734 nm (**Figura 2**) e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pela seguinte equação:

% inibição do radical $ABTS^{++}$ = $\{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$

na qual, A_{controle} é a absorbância inicial da solução etanólica de $ABTS^{++}$ e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura contendo o radical $ABTS^{++}$ e as concentrações da WP45 e da WP2331. A concentração inibitória efetiva (CE_{50}) do composto necessária para reduzir a absorbância do radical $ABTS^{++}$ em 50% a 734 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental para a WP45 e a WP2331 também foi utilizado com o padrão de controle positivo Trolox.

Figura 2: Representação do método do Radical $ABTS^{++}$



Fonte: Autoria própria, 2015.

Teste de inibição qualitativo da enzima acetilcolinesterase (AChE)

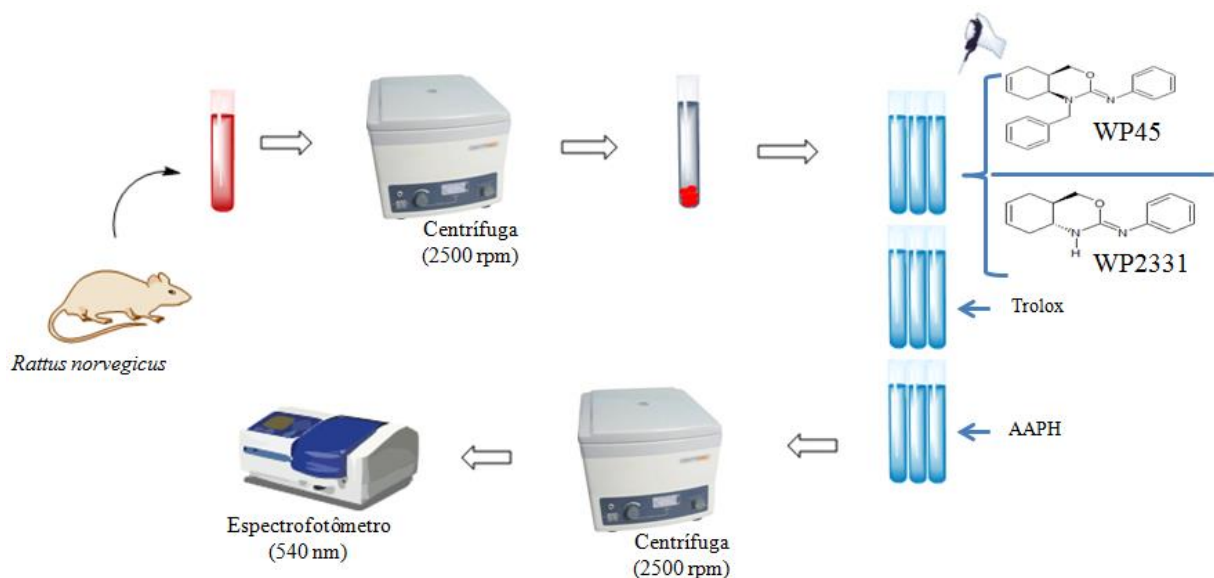
A atividade inibitória foi detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman e colaboradores (1961) adaptado por Rhee e colaboradores (2001). A WP45 e a WP2331 foi dissolvida em metanol e posteriormente aplicado em placa de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), e eluída em clorofórmio e metanol na proporção 9:1, sendo em seguida pulverizada com DTNB (ácido 5,5' - ditiobis - [2 - nitrobenzóico]) e Iodeto de acetiltiocolina em tampão Tris-HCl (pH 8). Após 5 minutos, pulverizou-se com a enzima acetilcolinesterase.

O teste teve como padrão positivo a cafeína, substância que possui atividade comprovada de inibição da enzima AChE.

Teste de inibição da hemólise em eritrócitos de *Rattus norvegicus* induzida por AAPH

Para avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da hemólise dos eritrócitos de rato (*R. norvegicus*), foi utilizada a metodologia descrita por Ugartondo e colaboradores (2009) com modificações e a suspensão de eritrócitos a 2% foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Girish e colaboradores (2012). A solução da WP45 e da WP2331 (100 µg/mL) foi utilizada e adicionada com 200 µL de suspensão de eritrócitos (2%) em PBS e adicionado 100 µL de AAPH (20 nM em PBS, pH 7,4). Simultaneamente, um controle foi feito para detectar a hemólise espontânea na ausência do agente oxidante ou da WP45 e da WP2331. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 30 minutos seguida pela centrifugação a 2500 rpm durante 5 minutos. Para 200 µL do sobrenadante obtido foi adicionado 800 µL de PBS para determinar a hemólise pela mensuração da absorbância a 540 nm (**Figura 3**).

Figura 3: Representação do método de inibição da hemólise em eritrócitos de *R. norvegicus* induzida por AAPH



Fonte: Autoria própria, 2015.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da hemólise pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, Acontrole corresponde a absorvância da hemólise da suspensão de eritrócitos a 2% induzido pelo AAPH (100% de hemólise) sem a WP45 e a WP2331 e Amistura reacional corresponde a absorvância contendo as concentrações da WP45 e da WP2331. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle padrão positivo Trolox nas mesmas concentrações.

Análises Estatísticas

Os resultados que obedeceram a uma distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de *Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste, os dados não paramétricos (porcentagens) foi utilizado o teste do qui-quadrado, por meio do programa GraphPad Prism[®] 6.0 para Windows. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p < 0,05$.

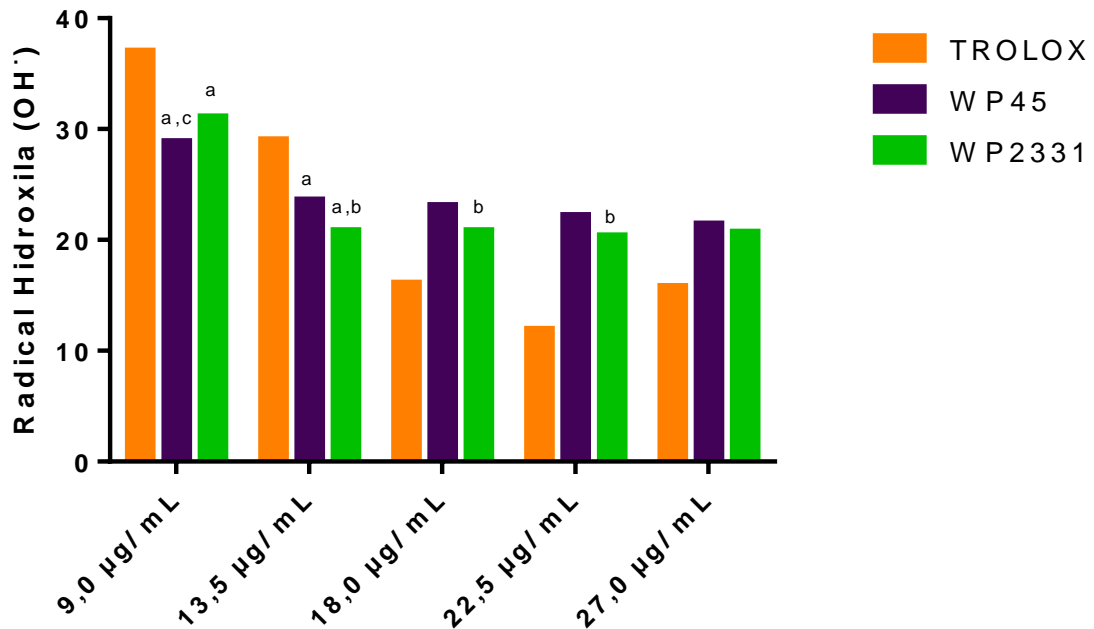
Os valores de IC₅₀ e seus intervalos de confiança de 95% para os experimentos foram obtidos por meio de regressão não-linear utilizando GraphPad Prism[®] versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

3 - RESULTADOS

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* contra a produção do radical hidroxila (OH•)

Os resultados do efeito da WP45 e da WP2331 sobre a inibição do Radical Hidroxila (OH•) estão demonstrados na **Figura 4**. A WP45 e a WP2331 conseguiram atuar na inibição da degradação da 2-dexorribose pela eliminação do radical hidroxila de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao sistema. Nas concentrações de 9.0, 13.5, 18.0, 22.5 e 27.0 µg/mL, os dois compostos apresentaram capacidade de $72.22 \pm 1.3\%$, $76.75 \pm 0.3\%$, $76.75 \pm 0.06\%$, $77.78 \pm 0.0\%$, $78.6 \pm 0.1\%$ e $69.14 \pm 0.3\%$, $79.22 \pm 0.1\%$, $79.22 \pm 0.1\%$, $79.42 \pm 0.2\%$, $79.63 \pm 0.1\%$, respectivamente. Nas mesmas condições experimentais o Trolox demonstrou capacidade antioxidante de $24.28 \pm 1.2\%$, $40.33 \pm 0.3\%$, $60.29 \pm 5.2\%$, $61.93 \pm 5.7\%$ e $81.9 \pm 1.8\%$, respectivamente. Diante dos resultados obtidos na inibição da degradação da 2-dexorribose, o valor da CE₅₀ foi de 0.48 µg/mL, 1.28 µg/mL e 15.21 µg/mL para a WP45, WP2331 e o Trolox, respectivamente.

Figura 4: Porcentagem de inibição do Radical hidroxila (OH^\bullet) em presença das substâncias Trolox, WP45 e WP2331.



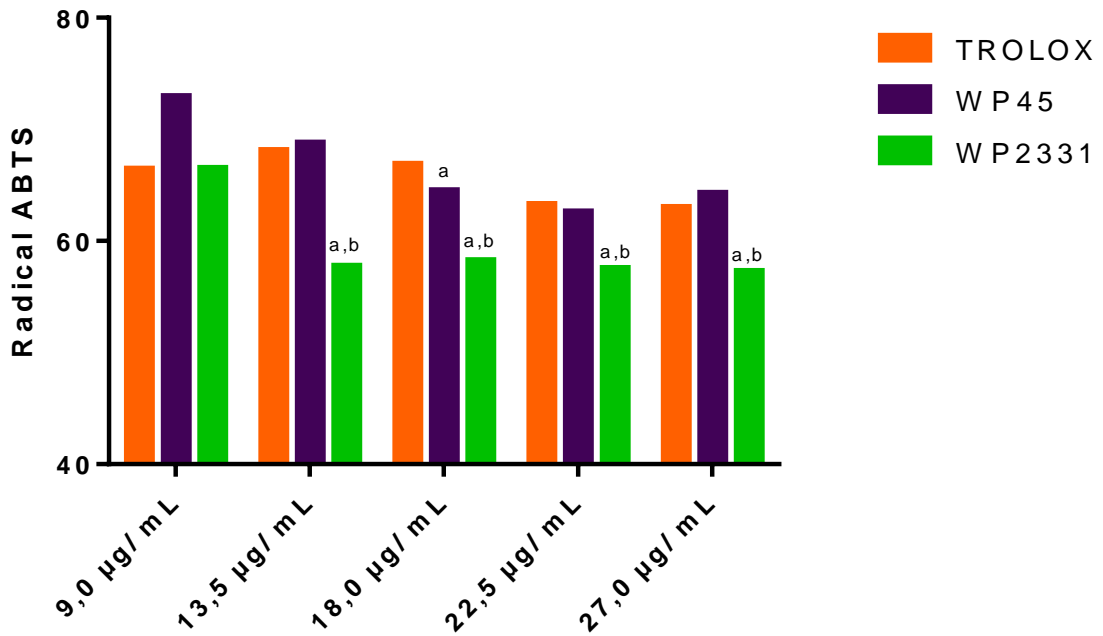
Fonte: Autoria própria, 2015.

Legenda:

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* pela inibição do Radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$

O resultado antioxidante correspondente ao sequestro do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ pela WP45 e pela WP2331 em diferentes concentrações está representado na **Figura 5**. Os valores da capacidade antioxidante do composto WP45 e do composto WP2331 nas concentrações de 9,0, 13,5, 18,0, 22,5 e 27,0 µg/mL foram respectivamente de $32,00 \pm 0,4\%$, $35,86 \pm 1,0\%$, $39,83 \pm 0,4\%$, $41,61 \pm 1,1\%$, $40,08 \pm 0,5\%$ e $37,97 \pm 3,5\%$, $46,14 \pm 3,7\%$, $45,68 \pm 2,3\%$, $46,36 \pm 1,2\%$, $46,58 \pm 0,2\%$, respectivamente, na qual reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração da solução do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (sistema). O Trolox, nas mesmas concentrações apresentou capacidade antioxidante de $38,06 \pm 1,0\%$, $36,48 \pm 0,5\%$, $37,66 \pm 0,3\%$, $40,98 \pm 0,6\%$, $41,26 \pm 0,6\%$. Diante dos resultados obtidos contra o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, o valor da CE_{50} foi de $66,52 \mu\text{g/mL}$, $36,00 \mu\text{g/mL}$ e $344,29 \mu\text{g/mL}$ para a WP45, WP2331 e Trolox, respectivamente.

Figura 5: Porcentagem de inibição do Radical ABTS⁺⁺ em presença das substâncias Trolox, WP45 e WP2331.



Fonte: Autoria própria, 2015.

Legenda:

Teste de inibição qualitativo da enzima acetilcolinesterase (AChE)

No teste de inibição da AChE pode-se verificar qualitativamente a inibição dessa enzima pelos dois derivados de oxazina, WP45 e WP2331, como demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Inibição qualitativa da AChE na presença da WP45 e da WP2331

SUBSTÂNCIA	SENSIBILIDADE
WP45	+
WP2331	+

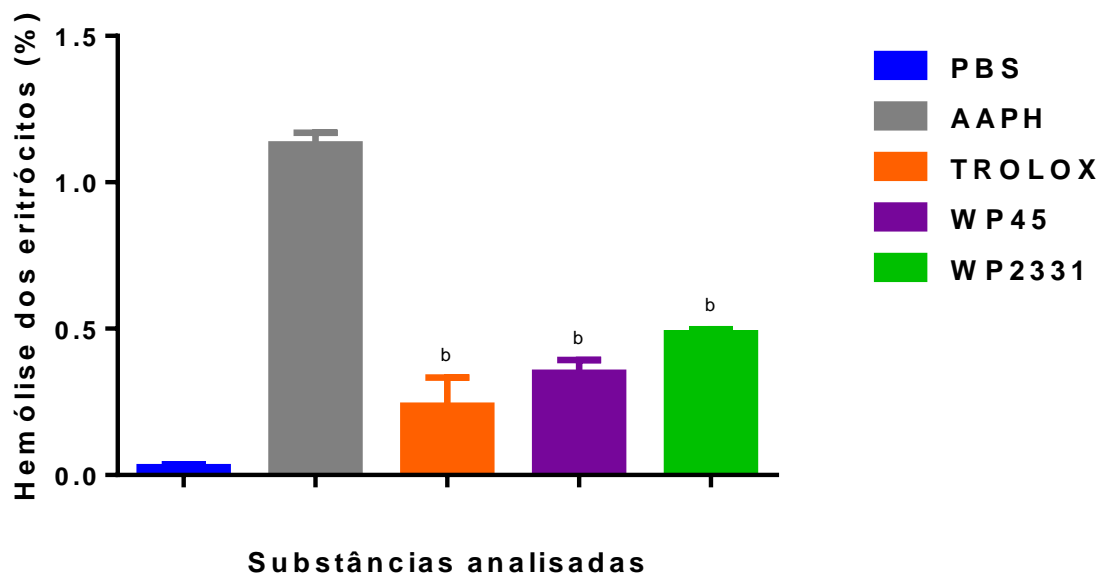
Legenda: (+): Presença de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Teste de inibição da hemólise em eritrócitos de *R. norvegicus* induzido por AAPH

O resultado antioxidante na concentração de 100 µg/mL da WP45 e da WP2331 pela inibição da hemólise induzido pelo AAPH (20 nM) em suspensão de eritrócitos foi apresentado na **Figura 6**. Os valores da capacidade antioxidante na concentração de 100 µg/mL foram de $69.0 \pm 2.2\%$ e $57,1 \pm 0.6\%$, respectivamente, no qual a WP45 e a WP2331 reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) a hemólise quando comparado com o AAPH (100% de hemólise). O Trolox na mesma concentração também reduziu a porcentagem de hemólise de forma significativa ($p < 0,05$) em comparação com o AAPH apresentando $79.0 \pm 4.9\%$ de inibição.

Figura 6: Percentual de inibição da hemólise induzida por AAPH em eritrócitos de *Rattus norvegicus*



Fonte: Autoria própria, 2015.

4 - DISCUSSÃO

A biologia dos radicais livres é uma área emergente que explora principalmente a formação e a eliminação de radicais livres, bem como seus danos em sistemas biológicos. É estabelecido que uma série de radicais centrados em oxigênios livres e outras EROs contribui para a patologia de muitos distúrbios, incluindo a aterosclerose, neurodegeneração, inflamação crônica (SILVA et al., 2005; ANI; VARADARAJ; NAIDU, 2006), câncer e

senescência fisiológica (DENG; CHENG; YANG, 2011), sendo assim, há um interesse crescente sobre os radicais livres e os processos antioxidantes devido a associação de radicais livres com a fisiopatologia de algumas doenças.

Desta forma, o presente estudo demonstrou a atividade antioxidante *in vitro* de dois derivados de oxazina, WP45 e WP2331, nas concentrações de 9.0 µg/mL, 13.5 µg/mL, 18.0 µg/mL, 22.5 µg/mL e 27.0 µg/mL por meio dos testes de inibição do radical OH•, inibição do Radical ABTS^{•+} e inibição da AChE e por meio da avaliação da atividade antioxidante *ex vivo* por meio do teste de inibição da hemólise induzida por AAPH em eritrócitos de ratos.

O radical OH• é um dos mais deletérios radicais livres, uma vez que sua meia-vida é muito curta e dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Este radical frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e pode ser gerado por meio da reação do H₂O₂ com metais de transição ou pela homólise da água por meio da exposição à radiação ionizante (ALVES et al., 2010).

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* da WP45 e da WP2331 contra a produção do radical hidroxila é demonstrada pela reação de Fenton, a qual produz degradação oxidativa da 2-desoxirribose produzindo o composto malonaldeído (MDA) que, quando aquecido com ácido tiobarbitúrico em um pH ácido forma um complexo que pode ser medido a 532 nm (ABAD et al., 2013). Sendo assim, quando um composto antioxidante é adicionado à mistura, este reage com o radical hidroxila acarretando uma diminuição da taxa de degradação da desoxirribose quantificado pela diminuição dos valores da absorbância.

A diminuição da taxa de degradação da desoxirribose no teste de inibição do radical hidroxila foi mais acentuada pelas substâncias WP45 (CE₅₀= 0.48 µg/mL) e pela WP2331 (CE₅₀= 1.28 µg/mL) quando comparado ao padrão antioxidante Trolox (CE₅₀= 15.21 µg/mL). É importante resaltar que, na menor concentração (9.0 µg/mL), a WP45 e a WP2331 obtiveram maior redução do radical que a maior concentração (27.0 µg/mL) para o padrão Trolox.

Outro método utilizado para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* da WP45 e da WP2331 foi obtido pela eliminação do radical ABTS^{•+}. Esse método é baseado na produção do radical ABTS^{•+}, coloração azul intenso, por meio da oxidação da solução de ABTS^{•+} pelo persulfato de potássio em que, a adição de um composto antioxidante é monitorada pela diminuição da absorbância da reação a 734 nm (NIKI, 2010).

Dessa forma, o presente estudo demonstrou que a WP45 (CE₅₀= 66.52 µg/mL) e a WP2331 (CE₅₀= 36.00 µg/mL) nas concentrações testadas foi um potente antioxidante pela remoção do radical ABTS^{•+}. A capacidade antioxidante destas duas substâncias foi proporcional com o aumento da concentração e quando os resultados são comparados com o

padrão Trolox, é observado que o composto nas mesmas concentrações do Trolox ($CE_{50}=344.29 \mu\text{g/mL}$) apresentou capacidade antioxidante maior.

O teste de inibição da enzima acetilcolinesterase demonstra de maneira qualitativa a reação de inibição da enzima, que em presença das substâncias WP45 e WP2331 conseguiram inibi-la, revelando visivelmente pela mudança da coloração amarela para branca revelada na placa cromatográfica. Estes dados corroboram com estudos feitos por Sukhorukov e colaboradores (2014) que sintetizaram 13 derivados de oxazinas que apresentaram atividade de inibição da enzima acetilcolinesterasa em todos os compostos sintetizados.

As atividades antioxidantes *in vitro*, demonstradas nos testes das substâncias derivadas de oxazina, foram exploradas para uma possível proteção *ex vivo* de biomoléculas, contra danos causados pelos radicais livres (REED, 2011).

Para a avaliação da atividade *ex vivo* da WP45 e da WP2331 foi utilizado eritrócitos de *R. norvegicus*. Os eritrócitos são considerados como os principais alvos para o ataque dos radicais livres, devido à presença de altas concentrações deste na membrana de ácidos graxos poli-insaturados e o transporte de O_2 redox relacionado com moléculas de hemoglobina, que são ativos promotores potentes de espécies reativas de oxigênio. Portanto, devido à sua susceptibilidade à oxidação, eritrócitos têm sido utilizados como um modelo celular para investigar o dano oxidativo em biomembranas (GIRISH; VASUDEVARAJU; RAO, 2012).

Para que ocorra a hemólise dos eritrócitos utiliza-se o AAPH ou o H_2O_2 como agente indutor de hemólise. Apesar de não ser um radical livre por não possuir um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, os dois compostos são espécies com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de $OH\cdot$ que possui ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 e o AAPH possuem vida longa e são capazes de atravessar as membranas celulares apresentando potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro (BARBOSA et al., 2010), um agravante quando se relaciona com eritrócitos.

Com a finalidade de firmar a possível ação antioxidante da WP45 e da WP2331, foi utilizado o teste *ex vivo* de inibição da hemólise dos eritrócitos de ratos por meio de agente oxidante que lisa os eritrócitos e resulta na liberação do pigmento de hemoglobina, em que pode ser quantificada a 540nm, demonstrando a medida de danos nas células (WANG et al., 2010; CHENG et al., 2013). Sendo assim, quando um composto antioxidante é adicionado, há

uma diminuição da taxa de liberação da hemoglobina, o que foi visto no presente estudo, corroborando com os resultados vistos na atividade antioxidante *in vitro*.

O princípio desta reação foi utilizado nesta avaliação antioxidante e de acordo com os resultados, a WP45 e a WP2331 conseguiram proteger os eritrócitos em comparação com os danos induzidos pelo AAPH que foi evidenciada pela diminuição da hemólise dos eritrócitos de ratos. Desta forma, ressalta que o modelo é útil para detectar a ação antioxidante de compostos e que a WP45 e a WP2331 possuem uma alta capacidade antioxidante observada no teste.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo pelos métodos *in vitro* e *ex vivo* demonstram que a WP45 e a WP2331 tem capacidade antioxidante, o que representa, uma triagem inicial para determinação do potencial farmacológico que pode tornar uma fonte promissora de compostos ativos com propriedades antioxidantes.

Novos estudos químicos, farmacológicos e biotecnológicos, devem ser realizados, para elucidar a viabilidade da utilização destas substâncias na produção de possíveis farmacoterápicos destinados ao combate dos radicais livres, uma vez que pode ser sugerido um potencial significativo de antioxidante por essas substâncias, porém o mecanismo de ação desse processo necessita ser elucidado utilizando outros testes.

REFERÊNCIAS

ABAD, L. V.; RELLEVE, L. V.; RACADIO, C. D. T.; ARANILLA, T. C.; ROSA, A. M. D. L. Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 79, p. 73-79, 2013.

AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODARRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI, A. Chemical composition, *in vitro* anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth. of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1137-1144, 2010.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANI, V.; VARADARAJ, M. C.; NAIDU, K. A. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). **European Food Research and Technology**, v. 224, p. 109-115, 2006.

ANSARI, N.; KHODAGHOLI, F.; AMINI, M. 2-Ethoxy-4,5-diphenyl-1,3-oxazine-6-one activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, n. 2, p. 84-90, 2011.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

CHENG, H.; FENG, S.; JIA, X.; LI, Q.; ZHOU, Y.; DING, C. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Epimedium acuminatum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 63-68, 2013.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.

ELLMAN, G. E.; COUTNEY, D.; ANDRES JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

GIRISH, T. K.; VASUDEVARAJU, P.; RAO, U. J. S. P. Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*Vigna mungo* L.) husk extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1690-1696, 2012.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; LIMA, M. H. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, p. 142-52, 1999.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; SOUSA, E. B. V.; COSTA, I. H. F.; MACHADO, K. C.; SOUSA, D. P.; SATYAL, P.; FREITAS, R. M. Spectroscopic studies on the *in vitro* antioxidant capacity of isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 225, p. 47-53, 2015.

NIKI, E.; Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NOGUEIRA NETO, J. D.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, P.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open Field test. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 1861-1870, 2013.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; ALENCAR, M. V. O. B.; JUNIOR, A. L. G.; ARAUJO, A. S.; CAVALCANTE, A. A. C.; FREITAS, R. M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 217-223, 2001.

ROHENKOHL, C. C.; CARNIEL, A. P.; COLPO, E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 1, p. 107-112, 2011.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; RENNÓ, M. N.; FALCÃO, D. Q.; CERQUEIRA, D. M.; MINTO, A. B.; NOQUEIRA, F. L.; QUARESMA, C. H.; SILVA, J. F.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 229-33, 2005.

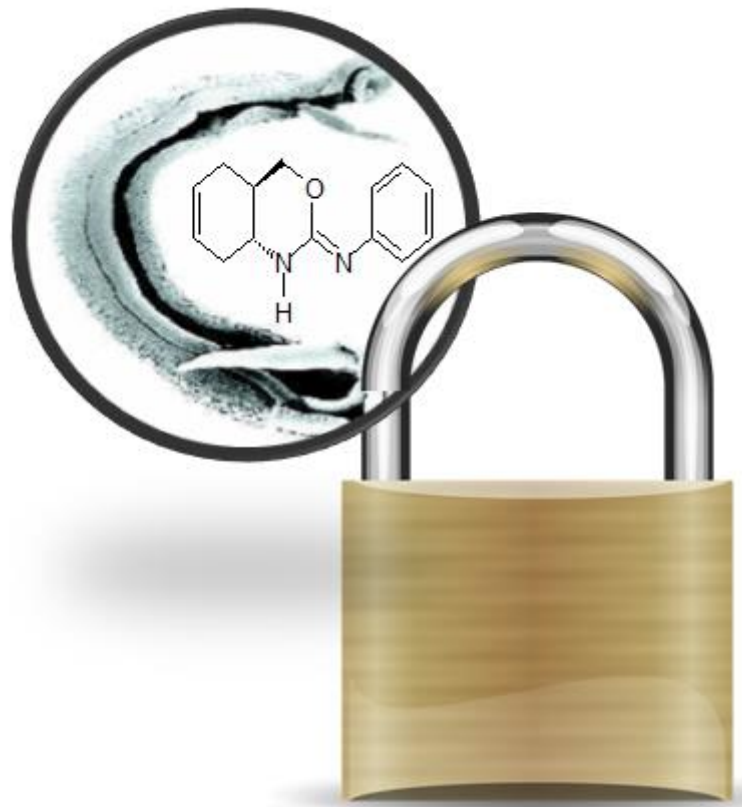
SUKHORUKOV, A. YU.; NIRVANAPPA, A. C.; SWAMY, J.; IOFFE, S. L.; SWAMY, S. N.; BASAPPA; RANGAPPA, K. S. Synthesis and characterization of novel 1,2-oxazine-based small molecules that targets acetylcholinesterase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3618-3621, 2014.

UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; TORRES, J. L.; VINARDELL, M. P. Biobased epicatechin conjugates protect erythrocytes and nontumoral cell lines from H₂O₂-induced oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4459-4465, 2009.

WANG, C.; QIN, X.; HUANG, B.; HE, F.; ZENG, C. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, p. 773-777, 2010.

CAPÍTULO V

PATENTE: “PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS DO DERIVADO OXAZINA PARA TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE”



RESUMO

“PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS DO DERIVADO OXAZINA PARA TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE”

Compreende-se a presente patente de invenção uma composição farmacêutica contendo derivados oxazinas, denominada WP2331, como princípio ativo para profilaxia e tratamento de parasitoses como a esquistossomose, dedicado ao uso humano e/ou veterinário, devido à presença de ovos em tecidos e/ou órgãos, principalmente no tecido hepático, caracterizada pela administração de uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz da WP2331 em associação com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

REIVINDICAÇÕES

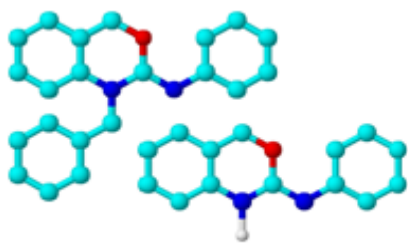
1. **“Processo de obtenção e aplicações farmacêuticas do derivado oxazina para tratamento da esquistossomose”** produto sintético **caracterizado por** ser a fórmula estrutural [N-[(2Z,4aR,8aR)-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-2H-3,1-benzoxazin-2-ylidene]aniline] e peso molecular 242,32, g/mol.

2. **“Processo de obtenção e aplicações farmacêuticas do derivado oxazina para tratamento da esquistossomose”** produto **caracterizado por** ser o princípio ativo para preparar fármaco (sintético, semissintético, fitofármaco, mineral, biológico, biotecnológico, fitoterápico ou fitomedicamento) anti-helmíntico, preferencialmente esquistossomicida.

3. **“Processo de obtenção e aplicações farmacêuticas do derivado oxazina para tratamento da esquistossomose”** produto da reivindicação 1, sendo suas formulações **caracterizada por** ser na forma líquida, semissólida e/ou seca obtida por meio de solventes, soluções extrativas, técnicas e/ou processos de síntese e secagem que possua ou não excipiente sólido como carreador.

4. **“Processo de obtenção e aplicações farmacêuticas do derivado oxazina para tratamento da esquistossomose”** formulações da reivindicação 2, **caracterizado por** serem veiculadas em produtos farmacêuticos isolados ou associados a outro fármaco compondo formulação ou medicamento anti-helmíntico do mesmo nas formas seca, semissólidas e/ou líquidas, estéreis e em formas de liberação imediata e/ou controlada.

5. **“Processo de obtenção e aplicações farmacêuticas do derivado oxazina para tratamento da esquistossomose”** de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ser o princípio ativo de medicamento anti-helmíntico, preferencialmente esquistossomicida, para uso veterinário e/ou humano.



*Considerações
finais*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

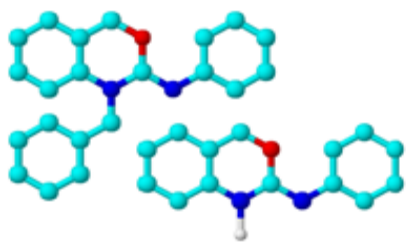
A prospecção científica e tecnológica sobre o uso e a aplicação terapêutica dos derivados de oxazinas mostram a necessidade de um investimento científico e tecnológico, para valorização, investigação e melhor aproveitamento das propriedades terapêuticas apontadas para esta espécie e seus derivados.

Os derivados de oxazinas (WP45 e WP2331) foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e DSC. Foi possível avaliar a toxicidade *in vitro* da WP45 e da WP2331.

Os testes antioxidantes realizados *in vitro*, a avaliação das propriedades antibacteriana, antitumoral e também antihelmíntica dos compostos sintéticos derivados de oxazina, especialmente a WP2331, demonstraram um potencial de atividade biológica promissora.

O potencial da WP2331 contra o parasita *Schistosoma mansoni*, subsidiou a redação de registro de depósito de patente protegendo a utilização dessas moléculas em formulações farmacêuticas com fins de profilaxia e/ou tratamento da esquistossomose.

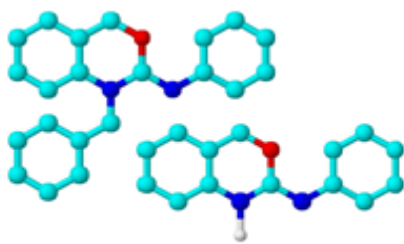
A bioprospecção de fármacos derivados de oxazinas atenderá à demanda crescente por substâncias inovadoras com a possibilidade de menores custos de obtenção.



Perspectivas

PERSPECTIVAS

1. Os resultados obtidos configuram como estímulo e subsídio às pesquisas congêneres futuras em nível de graduação e pós-graduação que ampliem os achados científicos, trazendo novas experiências e que desenvolva novos estudos que possam elucidar os mecanismos de ação e a melhor aplicação destas substâncias.
2. Aprofundar as avaliações não-clínicas e promover a ampliação investigativa de atividades e potencial farmacológico com a realização de avaliações clínicas, subsidiando o desenvolvimento de produtos derivados de oxazina.
3. Os testes de atividade antioxidante e a avaliação do estresse oxidativo que se mostraram promissores para a WP45 e para WP2331, podem ser avaliados em outros testes antioxidante *in vitro*.
4. Avaliar a aplicação dos derivados de oxazinas a outras atividades farmacológicas e aplicar as atividades citadas por esse estudo por meio de outras cepas bacterianas e a busca por atividade antifúngica.



*Produção
científica*

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

RESUMOS EXPANDIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

FAILLACE, M. S.; BRITO, M. R. M.; PEPINO, A. J.; COSTA, J. P.; SILVA, A. P. S. C. L.; PACHECO, A. G. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; ARGÜELLO, G. A.; FREITAS, R. M.; PELÁEZ, W. J. **Synthesis and antimicrobial activity of hydrothiazine, hydrooxazine, hydroquinazolinone and hydropyrimidine derivatives.** 3º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina. ANO

FAILLACE, M., BRITO, M. R. M., SILVA, T. G., MILITÃO, G. C. G., COSTA, J. P., SILVA, A. P. S. C. L., FREITAS, R. M., PELÁEZ, W. J. **Synthesis and evaluation of cytotoxicity of derivatives hidroquinazolinonas.** 3º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Córdoba, Argentina.

MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO, YAN DE CARVALHO ARAÚJO, RIVELILSON MENDES DE FREITAS, WALTER J. PELÁEZ. **Ensaio de toxicidade com *Artemia salina* de derivados sintéticos de hexahydrooxazines.** IV Congresso de Medicinal Laboratorial. Teresina, Piauí.

MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO, YAN DE CARVALHO ARAÚJO, RIVELILSON MENDES DE FREITAS. **Processos de obtenção de substâncias heterocíclicas e suas aplicações uma revisão.** IV Congresso de Medicinal Laboratorial. Teresina, Piauí.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

BRITO, M.R.M., FAILLACE M. S., MARQUEZ D. M., PEPINO, A. J., PELÁEZ W. J. ARGÜELLO G. A., FREITAS R. M. **DPPH radical scavenging assay of synthetics 5-methylen-imidazolidine-2,4-diones and the 2-thione analogs.** II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas. Teresina, Piauí.

BRITO, M. R. M., ARAÚJO, Y. C., SILVA, A.P.S.C.L, COSTA, J.P., FAILLACE, M. S., PELÁEZ, W. J., FREITAS, R. M. **Estudo da atividade esquistossomocida de derivados da oxazina.** II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas. Teresina, Piauí.

MENÇÃO HONROSA

MARIA DOS REMÉDIOS MENDES DE BRITO, YAN DE CARVALHO ARAÚJO, RIVELILSON MENDES DE FREITAS, WALTER J. PELÁEZ. **Ensaio de toxicidade com *artemia salina* de derivados sintéticos de hexahydrooxazines**. IV Congresso de Medicinal Laboratorial. Teresina, Piauí.