



**ALINE DE FÁTIMA SILVA**

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE BENZO[C]ACRIDINONAS E  
DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO  
COM CICLODEXTRINAS E SEU POTENCIAL  
BIOLÓGICO.**

**LAVRAS-MG  
2023**

**ALINE DE FÁTIMA SILVA**

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE BENZO[C]ACRIDINONAS E  
DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA  
E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutora.

Prof: Dr. Sérgio Scherrer Thomasi  
Orientador

Prof. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Aline de Fátima.

Síntese de derivados de benzo[c]acridinonas e desenvolvimento de complexos de inclusão com ciclodextrinas e seu potencial biológico / Aline de Fátima Silva. - 2023.

134 p: il.

Orientador(a): Sérgio Scherrer Thomasi.

Coorientador(a): Luciana de Matos Alves Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Reações multicomponente. 2. Complexos de inclusão. 3. Atividade Biológica. I. Thomasi, Sérgio Scherrer. II. Pinto, Luciana de Matos Alves. III. Título.

**ALINE DE FÁTIMA SILVA**

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE BENZO[C]ACRIDINONAS E DESENVOLVIMENTO  
DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA E SEU POTENCIAL  
BIOLÓGICO.**

**SYNTHESIS OF BENZO[C]ACRIDINONE DERIVATIVES AND DEVELOPMENT  
OF INCLUSION COMPLEXES WITH CYCLODEXTRIN AND THEIR  
BIOLOGICAL POTENTIAL.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 31 de julho de 2023

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto-UFLA

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha-UFLA

Dr. Dr. Lucas Bragança de Carvalho-UPL

Profa. Dra. Luciana Lopes Silva Pereira-UFLA

Prof: Dr. Sérgio Scherrer Thomasi  
Orientador

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2023**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, pela conclusão desse trabalho!

Aos meus orientadores prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi e profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto por todos os ensinamentos, pela paciência e por toda motivação durante meu doutorado.

Aos professores do programa de agroquímica, obrigada por todos os ensinamentos. Em especial aos professores: Dra. Adelir, Dra. Barbara e Dr. Felipe.

Ao Departamento de química e laboratório de bioquímica por toda infraestrutura proporcionada. À Central de Análises e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras, e à Finep, Fapemig, CNPq e Capes pelo fornecimento dos equipamentos e suporte técnico para os experimentos envolvendo análises. Também à Fapemig pela concessão da bolsa de doutorado. À Universidade Federal de São Carlos, pela realização das análises de RMN.

Aos colegas e amigos do laboratório, Larissa, Jéssica, Javier, Horácio, Paula, Fabiana, Cristiane. Em especial à Débora, Marcos, Ruth e Mariana por toda amizade e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Rafael, à minha mãe, meus irmãos, sobrinhos e cunhados por estarem sempre presentes, me apoiando sempre.

Muito obrigada!

“A arte de concluir pela experiência e observação consiste em avaliar probabilidades, em estimar se são altas ou numerosas o suficiente para constituir uma prova. Esse tipo de cálculo é mais complicado e difícil do que se possa imaginar.”

*Antoine Lavoisier*

## RESUMO

As reações multicomponentes ocorrem com a adição de três ou mais componentes em um frasco, sem a necessidade de purificação de cada intermediário. Uma classe de compostos obtida por essa reação é as benzo[c]acridinonas, que possuem potencial em atividade antimicrobiana e anticancerígena. Entretanto, este composto apresenta baixa solubilidade em água. Para contornar esse problema, se propõe a obtenção de complexos de inclusão, usando como molécula hospedeira, as ciclodextrinas. Estas possuem o formato de um tronco cônico com polaridade diferente dentro e fora de sua estrutura, permitindo abrigar em seu interior outras moléculas. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar a formação dos complexos de inclusão entre ciclodextrina e dois derivados de benzo[c]acridinona. A síntese foi realizada partindo de três componentes: benzaldeído,  $\alpha$ -naftilamina e dimedona (BCA1) ou 5,5-cicloexanodiona (BCA2), que foram posteriormente caracterizados por RMN e FTIR. A ciclodextrina foi selecionada através da cinética de inclusão. Além disso, foi verificada a formação do complexo de inclusão no estado líquido, em que foram realizados ensaios de isoterma de solubilidade e estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional. No estado sólido o complexo foi estudado por meio da calorimetria diferencial de varredura e espectroscopia na região do infravermelho. Foi verificada a dissolução *in vitro* das moléculas e complexos de inclusão, bem como o potencial biológico através de ensaios de atividade de fosfolipase A2, atividade proteolítica e antibacteriana. Como resultados observou-se que a  $\beta$ -CD foi a ciclodextrina mais eficiente na complexação das duas moléculas, sendo a mesma utilizada nos outros ensaios. No estudo da formação do complexo de inclusão no estado líquido, foi possível observar a formação de complexos poucos estáveis indicado pela constante de associação (BCA1  $K_a = 29 \text{ M}^{-1}$  e BCA  $K_a = 68 \text{ M}^{-1}$ ) e pelos resultados de RMN<sup>1</sup>H. Também foi determinada a interação espacial entre os átomos da molécula e a  $\beta$ -CD por ROESY-2d, observando a formação de complexo de inclusão com a molécula BCA2 e complexo de não inclusão com a molécula BCA1. Os complexos sólidos foram caracterizados e foram observadas poucas alterações nos espectros e perfil calorimétrico, sugerindo a formação de sistema instáveis e que o processo de inclusão gerou complexos instáveis, corroborando os resultados dos demais experimentos. Observou-se no ensaio de dissolução *in vitro* que houve um aumento na solubilidade intrínseca da molécula em água. As benzo[c]acridinonas e seus complexos de inclusão demonstraram potencial *in vitro* para inibir a atividade das enzimas fosfolipase A2 e protease, e potencial para inibir a bactéria *Bacillus subtilis*. Foi observada a presença de uma molécula contaminante, possivelmente derivada de reações paralelas durante a síntese. Essa molécula foi caracterizada, sendo um xanteno, composto que interagiu com a CD na formação do complexo com o derivado 1 (BCA1). Desta forma, foi possível obter os complexos de inclusão e não inclusão, com melhores propriedades físico-químicas como um aumento na dissolução da molécula em água e potencializou seus efeitos biológicos.

Palavras-chave: **Reações multicomponente, química verde, complexos de não- inclusão, Ressonância magnética nuclear, fosfolipase A2, protease**

## ABSTRACT

Multicomponent reactions occur by adding three or more components to one vial, without the need to purify each intermediate. One class of compounds obtained by this reaction is the benzo[c]acridinones, which have potential antimicrobial and anticancer activity. However, this compound has low solubility in water. To overcome this problem, it is proposed to obtain inclusion complexes, using cyclodextrins as host molecules. These have the shape of a conical trunk with different polarity inside and outside its structure, allowing other molecules to be housed inside. Given the above, the aim of this study was to investigate the formation of inclusion complexes between cyclodextrin and two benzo[c]acridinone derivatives. The synthesis was performed starting from three components: benzaldehyde,  $\alpha$ -naphthylamine and dimedone (BCA1) or 5,5-cyclohexanedione (BCA2), which were later characterized by NMR and FTIR. Cyclodextrin was selected through inclusion kinetics. In addition, the formation of the inclusion complex in the liquid state was verified, in which solubility isotherm tests and one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy studies were performed. In the solid state, the complex was studied using differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy. The *in vitro* dissolution of molecules and inclusion complexes was verified, as well as the biological potential through assays of phospholipase A2 activity, and proteolytic and antibacterial activity. It was found that  $\beta$ -CD was the most efficient cyclodextrin in complexing the two molecules. This was the same cyclodextrin used in the other assays. In the study of the formation of the inclusion complex in the liquid state, it was possible to observe the formation of poorly stable complexes indicated by the association constant (BCA1  $K_a = 29 \text{ M}^{-1}$  and BCA  $K_a = 68 \text{ M}^{-1}$ ) and by the results of NMR1H. The spatial interaction between the atoms of the molecule and the  $\beta$ -CD was also determined by ROESY-2d, observing the formation of an inclusion complex with the BCA2 molecule and a non-inclusion complex with the BCA1 molecule. The solid complexes were characterized, and few changes were observed in the spectra and calorimetric profile, suggesting the formation of unstable systems and that the inclusion process generated unstable complexes, corroborating the results of the other experiments. It was observed in the *in vitro* dissolution assay that there was an increase in the intrinsic solubility of the molecule in water. Benzo[c]acridinones and their inclusion complexes demonstrated *in vitro* potential to inhibit the activity of phospholipase A2 and protease enzymes, and potential to inhibit *Bacillus subtilis* bacteria. The presence of a contaminating molecule was observed, possibly derived from parallel reactions during the synthesis. This molecule was characterized as a xanthene, a compound that interacted with CD in the formation of the complex with derivative 1 (BCA1). In this way, it was possible to obtain the inclusion and non-inclusion complexes, with better physicochemical properties such as an increase in the dissociation of the molecule in water and potentiated its biological effects.

**Keywords:** Multicomponent reactions, green chemistry, non-inclusion complex, Nuclear magnetic resonance, phospholipase A2, protease



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Os 12 princípios da química verde .....	18
Figura 2-	Representação geral da síntese de Strecker .....	19
Figura 3-	Reação multicomponente a) Reação de Hantzsch b) Estrutura do fármaco Nifedipino .....	19
Figura 4-	Reação multicomponente de Biginelli entre aldeído, acetoacetato de etila e tiouréia para a síntese de di-hidropirimidinonas .....	20
Figura 5-	Reação multicomponente entre uma amina, um aldeído e um composto carbonílico para obtenção das bases de Mannich .....	20
Figura 6-	Reações multicomponente de Ugi (quatro componentes) e de Passerini (três componentes) .....	21
Figura 7-	a) Acridina e b) Amsacrine (princípio ativo para o tratamento de leucemia) .....	22
Figura 8-	Reação entre 1-naftilamina, dimedona e aldeído para obtenção das benzo[c]acridinonas .....	23
Figura 9-	Mecanismo para a obtenção de derivados de benzo[c]acridinona utilizando como catalisador o SBA-Pr-SO <sub>3</sub> H .....	24
Figura 10-	Mecanismo de síntese dos derivados de benzo[c]acridinonas utilizando L-prolina como catalisador .....	24
Figura 11-	Principais CD naturais, $\alpha$ -CD (n=6), $\beta$ -CD (n=7) e $\gamma$ -CD (n=8), sendo “n” as unidades de glicose de cada ciclodextrina e suas dimensões internas .....	26
Figura 12-	Ciclodextrinas modificadas Me $\beta$ -CD, HP $\beta$ -CD e SBE $\beta$ -CD .....	27
Figura 13-	Estrutura tronco cônica das ciclodextrinas, unidades de $\alpha$ -D-glicopiranosose e representação da organização dos átomos na ciclodextrina, mostrando a cavidade hidrofóbica e exterior hidrofílica .....	28
Figura 14-	Representação da formação dos complexos de inclusão, as esferas em vermelho representam os átomos de oxigênio e em preto os hidrogênios presentes na molécula de água .....	29
Figura 15-	Exemplos de complexo de inclusão formado pela molécula hospedeira e hóspede e estequiometrias possíveis .....	30
Figura 16-	Isotermas de solubilidade AP, AL e AN: Complexos com solubilidade limitado pela CD, BS: Complexos de solubilidade limitada e BI: Complexos insolúveis.....	36
Figura 17-	Bothrops Moojeni .....	38
Figura 18-	Esquema da ação das fosfolipase A2 no processo inflamatório .....	39
Figura 19-	Mecanismo de quebra de uma ligação peptídica com a serina protease, e auxílio da porção histidina .....	41
Figura 20-	Síntese das benzo[c]acridinonas a) mistura dos reagentes b) refluxo e c) produto bruto na água gelada .....	43
Figura 21-	Mecanismo reacional para a formação das benzo[c]acridinonas .....	53
Figura 22-	Estrutura do composto orgânico BCA1 - Derivado 1 da benzo[c]acridinona com os números em rosa indicando a posição dos átomos de hidrogênio .....	54
Figura 23-	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H para o BCA1 em CDCl <sub>3</sub> .....	57
Figura 24-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C para o BCA1 em CDCl <sub>3</sub> .....	58
Figura 25-	Estrutura do composto orgânico BCA2 - Derivado 2 da benzo[c]acridinona com os números em rosa indicando a posição dos átomos de hidrogênio .....	59
Figura 26-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o BCA2 em CDCl <sub>3</sub> .....	63
Figura 27-	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o BCA2 em DMSO-d <sub>6</sub> .....	64
Figura 28-	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C para o BCA2 em DMSO-d <sub>6</sub> .....	65
Figura 29-	Espectro na região do FTIR para BCA1.....	67
Figura 30-	Espectro na região do FTIR para BCA2 .....	67
Figura 31-	Estudo da cinética de solubilidade para BCA1 utilizando $\beta$ -CD, $\gamma$ -CD, Me- $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD na proporção 1:1 .....	68
Figura 32-	Estudo da cinética de solubilidade para BCA1 utilizando $\beta$ -CD, $\gamma$ -CD, Me- $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD na proporção 1:1. E SBE- $\beta$ -CD e $\beta$ -CD na proporção 1:2 .....	69

Figura 33- Isoterma de solubilidade a) BCA 1 e $\beta$ -CD e b) BCA2 e $\beta$ -CD .....	73
Figura 34- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz) $\beta$ -CD (em D <sub>2</sub> O), CI1a (em D <sub>2</sub> O/ DMSO-d <sub>6</sub> ) e BCA1 (em DMSO-d <sub>6</sub> ) para metodologia 1 (24 h e T. ambiente) .....	78
Figura 35- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz) $\beta$ -CD (em D <sub>2</sub> O), CI2a (em D <sub>2</sub> O/ DMSO-d <sub>6</sub> ) e BCA2 (em DMSO-d <sub>6</sub> ) para metodologia 1 (4 h, T. ambiente) .....	80
Figura 36- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz) $\beta$ -CD (em D <sub>2</sub> O), CI1 $\beta$ (em D <sub>2</sub> O/ DMSO-d <sub>6</sub> ) e BCA1 (em DMSO-d <sub>6</sub> ) para metodologia 2 (48 h, 55 °C) .....	82
Figura 37- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz) $\beta$ -CD (em D <sub>2</sub> O), CI2 $\beta$ (em D <sub>2</sub> O/ DMSO-d <sub>6</sub> ) e BCA2 (em DMSO-d <sub>6</sub> ) para metodologia 2 (48 h, 55 °C) .....	84
Figura 38- Estrutura das moléculas hóspede/hospedeira e os hidrogênios presentes e sugestão da forma como ocorre a interação para formar o complexo .....	86
Figura 39- Estrutura das moléculas hóspede/hospedeira e os hidrogênios presentes e sugestão da forma como ocorre a interação para formar o complexo .....	87
Figura 40- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI1a em DMSO-d <sub>6</sub> e D <sub>2</sub> O .....	89
Figura 41- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI2a em DMSO-d <sub>6</sub> e D <sub>2</sub> O .....	90
Figura 42- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI1b em DMSO-d <sub>6</sub> e D <sub>2</sub> O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa (no eixo x), refere-se aos hidrogênios da molécula e no eixo y, em verde, refere-se aos hidrogênios da CD .....	91
Figura 43- Representação dos átomos envolvidos na formação do complexo de inclusão, as correlações mostradas por setas referente ao RMN ROESY 2D do complexo CI1b em DMSO-d <sub>6</sub> e D <sub>2</sub> O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa referem-se aos hidrogênios da molécula e em verde, refere-se aos hidrogênios da CD .....	92
Figura 44- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI2b em DMSO-d <sub>6</sub> e/ou D <sub>2</sub> O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa (no eixo x), refere-se aos hidrogênios da molécula e no eixo y, em verde, refere-se aos hidrogênios da CD .....	93
Figura 45- Representação dos átomos envolvidos na formação do complexo de inclusão, as correlações mostradas por setas referente ao RMN ROESY 2D do complexo CI1b em DMSO-d <sub>6</sub> e D <sub>2</sub> O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa referem-se aos hidrogênios da molécula e em verde, refere-se aos hidrogênios da CD .....	94
Figura 46- Mapa de contorno de difusão a) CI1b b) BCA1 livre c) $\beta$ -CD livre .....	97
Figura 47- Mapa de contorno de difusão a) CI2b b) BCA2 livre c) $\beta$ -CD livre .....	98
Figura 48- Perfil calorimétrico de DSC para BCA1, $\beta$ -CD, CI1a e MF1 obtidos pela metodologia 1 .....	104
Figura 49- Perfil calorimétrico de DSC para BCA1, $\beta$ -CD, CI1b e MF1, para a metodologia 2....	105
Figura 50- Perfil calorimétrico de DSC para BCA2, $\beta$ -CD, CI2a e MF2, para a metodologia 1 ....	106
Figura 51- Perfil calorimétrico de DSC para BCA2, $\beta$ -CD, CI2b e MF2b, para a metodologia 2 ..	107
Figura 52- Espectro na região do FTIR para BCA1, $\beta$ -CD, CI1a e MF1, metodologia 1 .....	108
Figura 53- Espectro da região do FTIR para BCA2, $\beta$ -CD, CI2a e MF2, metodologia 1 .....	110
Figura 54- Espectro na região do FTIR para BCA1, $\beta$ -CD, CI1b e MF1 metodologia 2 .....	111
Figura 55- Espectro da região do FTIR para BCA2, $\beta$ -CD, CI2b e MF2, metodologia 2 .....	112
Figura 56- Perfil de dissolução em água da molécula de benzo[c]acridinona (BCA1 e BCA2) e dos complexos de inclusão BCA1/ $\beta$ -CD e BCA2/ $\beta$ -CD obtido pelo método de liofilização na proporção 1:1 .....	114
Figura 57- Atividade da enzima fosfolipase A2, demonstrada pela formação dos halos .....	115
Figura 58- Efeitos da molécula a) BCA1 b) BCA2 c) CI1b e d) CI2b sobre a atividade fosfolipásica (%) induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> . O controle positivo (10 $\mu$ g) foi considerado como 100% de atividade enzimática. Os resultados foram expressos como as médias das triplicatas obtidas em cada concentração da substância e seus desvios padrão. * As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey (p < 0,05) .....	116

Figura 59-	Estrutura do amido black usado na coloração das placas contendo agar, substrato e os tratamentos (pós- incubação) e os halos, pós-descoloração .....	117
Figura 60-	Efeitos da molécula a) BCA1 b) BCA2 c) CI1b e d) CI2b sobre a atividade proteásica (%) induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> . O controle positivo (10 µg) foi considerado como 100% de atividade enzimática. Os resultados foram expressos como as médias das triplicatas obtidas em cada concentração da substância e seus desvios padrão. * As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey (p < 0,05) .....	119
Figura 61-	Halos de inibição causados pelos derivados de benzo[c]acridinonas sobre a bactéria <i>Bacillus subtilis</i> .....	120
Figura 62-	Gráfico das médias dos halos de inibição para <i>Bacillus subtilis</i> . * As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey (p < 0,05) .....	120
Figura 63-	Estrutura do 3,3,6,6-tetrametil-9-fenil-3,4,5,6,7,9-hexahidro-2H-xantheno-1,8-dione ...	122
Figura 64-	Espectro de RMN mostrando os hidrogênios referentes as moléculas de xanteno, intermediário e benzo[c]acridinona .....	122
Figura 65-	Intermediário reacional, isolado junto com a benzo[c]acridinona .....	123
Figura 66-	Mecanismo reacional para obtenção das benzo[c]acridinonas (1) e reação paralela para formação dos xantenos .....	124
Figura 67-	Partes do espectro de ROESY 2D obtido para o complexo de inclusão entre BCA1 e B-CD pela metodologia 2 .....	125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Reagentes utilizados para a síntese das benzo[c]acridinonas e produtos das sínteses .....	50
Tabela 2-	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de <sup>1</sup> H e RMN de <sup>13</sup> C experimental ( <sup>1</sup> H 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) e RMN de e encontrado na literatura ( <sup>1</sup> H 300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) para BCA1 .....	56
Tabela 3-	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento (J) obtidos a partir de espectros de RMN de <sup>1</sup> H e RMN de <sup>13</sup> C experimental ( <sup>1</sup> H 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> e DMSO-d <sub>6</sub> ) e RMN de e encontrado na literatura ( <sup>1</sup> H 400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) para BCA2 .....	62
Tabela 4-	Valores de deslocamentos químicos para a $\beta$ -CD, BCA1 e CI1a e variação de $\delta$ entre complexo e moléculas livres para metodologia 1 (24 h e T. ambiente) .....	77
Tabela 5-	Valores de deslocamentos químicos para $\beta$ -CD, BCA2, CI2a e variação de $\delta$ entre complexo e moléculas livres para metodologia 1 (24 h, T. ambiente) .....	79
Tabela 6-	Valores de deslocamentos químicos para a $\beta$ -CD, BCA1 e CI1b e variação de $\delta$ entre complexo e moléculas livres para metodologia 2 (48 h, 55 °C) .....	81
Tabela 7-	Valores de deslocamentos químicos para a $\beta$ -CD, BCA2 e CI2 $\beta$ e variação de $\delta$ entre complexo e moléculas livres para metodologia 2 (28 h, 55 °C) .....	83
Tabela 8-	Valores referentes aos picos observados nas curvas calorimétricas de DSC para BCA1, $\beta$ -CD, CI1a (metodologia 1) e CI1b (metodologia 2) e MF1 .....	100
Tabela 9-	Valores referentes aos picos observados nas curvas calorimétricas de DSC para BCA2, $\beta$ -CD, CI2a (metodologia 1) e CI2b (metodologia 2) e MF2 .....	102
Tabela 10-	Taxa de dissolução em água para BCA2 e complexo de inclusão BCA2/ $\beta$ -CD em água .....	114
Tabela 11-	Médias em porcentagem obtidas para cada tratamento para BCA1, BCA2 CI1b e CI2b sobre a atividade proteásica.*As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey (p < 0,05) .....	118

## LISTA DE SIGLAS

RMC	Reações Multicomponente
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier
UV/VIS	Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
CD	Ciclodextrina
CI	Complexo de inclusão
CNI	Complexo de não-inclusão
ME	Metil
HP	Hidroxipropil
SBE	Sulfobutileter
DOSY	Espectroscopia Ordenada por Difusão
ROESY	Espectroscopia de Efeito Overhauser Nuclear de estrutura Rotativo
BCA1	7,10,11,12-Tetrahidro-10,10-dimetil-7-fenilbenzo[c]acridin-8(9H)-ona
BCA2	7,10,11,12-Tetrahidro-7-fenilbenzo[c]acridin-8(9H)-ona
DMSO	Dimetilsulfóxido
CI1a	Complexo de inclusão com a molécula 1 e metodologia 1
CI1b	Complexo de inclusão com a molécula 1 e metodologia 2
CI2a	Complexo de inclusão com a molécula 2 e metodologia 1
CI2b	Complexo de inclusão com a molécula 2 e metodologia 2
Ka	Constante de associação
DP <sub>30</sub>	Porcentagem da molécula dissolvida após 30 minutos
T <sub>50</sub>	Tempo necessário para dissolver 50% da molécula

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	OBJETIVOS .....	16
2.1	Objetivos gerais .....	16
2.2	Objetivos específicos .....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
3.1	Síntese multicomponente .....	17
3.2	Tetrahidrobenzo[c]acridinonas .....	21
3.3	Complexos de inclusão .....	25
3.4	Caracterização de compostos orgânicos e complexos de inclusão .....	32
3.4.1	Métodos analíticos para caracterização dos complexos em solução .....	32
3.4.1.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear (RMN) .....	32
3.4.1.2	Espectroscopia na região do UV/vis .....	35
3.4.1.3	Isoterma de solubilidade.....	36
3.4.2	Métodos analíticos para caracterização dos complexos sólidos .....	37
3.4.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) .....	37
3.4.2.2	Análise térmica: Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	37
3.5	Atividades biológicas .....	38
3.5.1	Atividade fosfolipásica .....	38
3.5.2	Atividade proteásica .....	39
3.5.3	Atividade antibacteriana .....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
4.1	Tetrahidrobenzo[c]acridinonas .....	43
4.1.1	Síntese das Tetrahidrobenzo[c]acridinonas .....	43
4.1.2	Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	44
4.1.3	Espectroscopia na região do infravermelho .....	44
4.2	Seleção da CD usando cinética de inclusão .....	45
4.3	Avaliação do processo de inclusão .....	45
4.3.1	Isoterma de solubilidade .....	45
4.3.2	Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ , ROESY e DOSY .....	45
4.4	Complexos de inclusão .....	46
4.4.1	Preparo do complexo de inclusão .....	46
4.4.2	Caracterização dos complexos de inclusão .....	47

4.4.2.1	Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	47
4.4.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho .....	47
4.5	Ensaio de dissolução <i>in vitro</i> .....	47
5.6	Atividades biológicas .....	48
4.6.1	Atividade sobre a fosfolipase A2 .....	48
5.6.2	Atividade proteásica sobre a caseína .....	48
4.6.3	Atividade antibacteriana .....	49
4.6.3	Análise estatística dos ensaios biológicos .....	49
5	RESULTADOS .....	50
5.1	Tetrahidrobenzo[c]acridinonas .....	50
5.1.1	Síntese das Tetrahidrobenzo[c]acridinonas .....	50
5.1.2	Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das BCA1 .....	54
5.1.3	Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das BCA2.....	59
5.1.4	Espectroscopia na região do infravermelho .....	66
5.2	Seleção da CD usando cinética de inclusão .....	68
5.3	Avaliação do processo de inclusão .....	70
5.3.1	Isoterma de solubilidade .....	70
5.3.2	Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ , ROESY e DOSY .....	74
5.4	Caracterização dos complexos de inclusão .....	99
5.4.1	Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	99
5.4.2	Espectroscopia na região do infravermelho .....	108
5.5	Ensaio de dissolução <i>in vitro</i> .....	112
5.6	Atividades biológicas .....	115
5.6.1	Atividade sobre a fosfolipase A2 .....	115
5.6.2	Atividade proteásica sobre a caseína .....	117
5.6.3	Atividade antibacteriana .....	119
5.7	Reações paralelas e subprodutos .....	121
6	CONCLUSÃO .....	126
	REFERÊNCIAS .....	128

## 1.INTRODUÇÃO

A química sintética apresenta uma ampla relevância para a sociedade. Por meio dela, foi possível a expansão dos fertilizantes e agroquímicos, que promoveram um incremento na produção de alimentos, reflexo do crescimento populacional. Atualmente, os estudos referem-se ao melhoramento desses fitossanitários para a concepção de compostos que possam ser usados de forma sustentável (LI et al., 2021). Além disso, a síntese orgânica é indispensável na produção dos fármacos, associados, por sua vez, ao aumento da expectativa de vida. As indústrias farmacêuticas estão sempre em busca da otimização de metodologias para acompanhar o desenvolvimento de novos princípios ativos e para a preparação mais rápida dessas substâncias (DENIS et al., 2021).

Um tipo de síntese pela qual tem-se demonstrado interesse é a reação multicomponente (RMC). A partir da RMC é possível a elaboração de produtos dos mais simples aos mais complexos. Todo o processo é realizado em um único frasco (também chamada de *one pot*), não sendo necessário realizar diversas etapas sintéticas. É considerada vantajosa, principalmente no que se refere à química verde, já que ela segue vários dos seus 12 princípios, além de permitir a obtenção de altos rendimentos do produto desejado (BOSICA et al., 2021) (FUNICELLO et al., 2021).

As RMC são estratégias sintéticas simples e eficientes, que consistem na mistura de três ou mais reagentes, que são mantidos em determinadas condições reacionais, obtendo-se o produto, que, por sua vez, contém todos ou a maioria dos átomos do material de partida (RAMOS; RODRIGUES; NETO, 2019). Diversos cientistas como Hantzsch, Biginelli, Mannich, Ugi, Passerini, dentre outros, dedicaram-se a estudar as RMC, produzindo compostos com potencial para diversas aplicações biológicas, como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antitumorais, anti-hipertensivos, dentre outras (YAZDANI; HOOSHMAND; STENZEL, 2022).

A partir das RMC é possível obter as benzo[c]acridinonas. Na literatura encontram-se diversas metodologias sintéticas baseadas nessas reações, muitas delas, produzem altos rendimentos das substâncias. As metodologias descritas utilizam diferentes estratégias. Como exemplo pode-se citar o uso de irradiação por micro-ondas (KUMAR et al., 2018) e por ultrassom (ZANG et al., 2011) ou a utilização de diversos catalisadores (ABDOLMOHAMMADI; MOHAMMADNEJAD, 2013; ZIRANI et al, 2013). Essa classe de

compostos tem despertado interesse e já foram descritas na literatura apresentando potencial antitumoral e antimicrobiano (BEHBAHANI et al., 2019).

As benzo[c]acridinonas possuem baixa capacidade de dissolução em água. Diversos estudos demonstram como possível alternativa para resolver esse problema a obtenção dos complexos de inclusão, a partir das ciclodextrinas. Essa estratégia permite melhorar as propriedades físico-químicas como a solubilidade intrínseca, estabilidade e permite que o composto seja liberado para o meio aquoso de uma forma controlada, sendo um atributo desejável para as indústrias farmacêuticas, alimentícias, dentre outras (LIU et al., 2022).

As ciclodextrinas são hidratos de carbono formados pela união de unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose, por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. Possuem estrutura na forma de um cone, ideal para abrigar em seu interior diversas estruturas, e isso é possível pois a cavidade é hidrofóbica e seu exterior hidrofílico (BOCZAR; MICHALSKA, 2022).

Diante do exposto, este trabalho objetivou aliar a síntese orgânica, através das reações multicomponente, para a preparação de princípios ativos e promover melhorias em suas propriedades físico-químicas, garantindo que, ao serem complexados em ciclodextrinas, os compostos possuam maior aplicabilidade.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi sintetizar dois derivados de benzo[c]acridinonas e realizar a complexação de dois compostos derivadas das benzo[c]acridinonas com as ciclodextrinas. Propôs analisar o potencial biológico das moléculas e os seus complexos de inclusão para reduzir ou inibir a atividade enzimática da fosfolipase A2 e serinoprotease.

### 2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar dois derivados das benzo[c]acridinonas por reação multicomponente e realizar a caracterização das moléculas usando técnicas espectroscópicas como: Espectroscopia na região do infravermelho e Espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- Realizar a seleção da ciclodextrina através dos ensaios de cinética de inclusão.
- Avaliar a afinidade das substâncias com as ciclodextrinas e verificar alterações na solubilidade intrínseca dessas moléculas em água, através da isoterma de solubilidade e estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
- Obter os complexos de inclusão entre as benzo[c]acridinonas e a molécula hospedeira e caracterizar os complexos de inclusão por técnicas espectroscópicas como infravermelho, calorimetria diferencial de varredura, espectroscopia de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional.
- Realizar ensaios de dissolução *in vitro*;
- Verificar potencial na atividade fosfolipase A2, atividade proteolítica usando a caseína e atividade antibacteriana para *Bacillus subtilis*

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Síntese multicomponente

A demanda por uma maior quantidade de moléculas por parte das indústrias farmacêuticas, aliada ao desenvolvimento de novos métodos sintéticos, fez com que a obtenção dos fármacos a partir dos produtos naturais fosse substituída parcialmente pelos sintéticos. É inegável a importância da síntese orgânica para a elaboração de novos medicamentos, uma vez que a partir dela é possível planejar uma substância específica para interagir com o sítio ativo de uma enzima, por exemplo, ou obter uma série de compostos com maior diversidade estrutural e maior complexidade, permitindo maior abrangência na aplicação (SANGI, 2016).

A síntese orgânica é responsável pela criação de substâncias através de uma sequência de reações, podendo-se replicar no laboratório moléculas de grande interesse, obtidas a partir de produtos naturais (NICOLAOU, 2014). Utilizam-se de diferentes vias sintéticas para essa finalidade. A via linear envolve várias etapas, podendo envolver reações de proteção e desproteção e transformações de grupos funcionais. Nessa via, pequenas unidades são adicionadas a uma cadeia (MACHADO, 2011; YOSHIDA et al., 2018). Já na via convergente ocorre a união de fragmentos. Essa via apresenta vantagens, uma vez que são mais seletivas, possuem menor necessidade de grupos de proteção, são mais rápidas, utilizam materiais de menores custos etc. (MACHADO, 2011).

Independente da via escolhida, ela deve possuir algumas características para ser considerada uma síntese próxima ao “ideal”, tais como: seletividade, alto rendimento e pureza do produto desejado, possuir um menor número de etapas, usar solventes menos tóxicos e não inflamáveis, dentre outros (CHEN et al., 2019; SANGI, 2016).

As reações multicomponentes (RMC) são processos realizados em um único frasco reacional (*one pot*), altamente convergente. Consiste na condensação de três ou mais substratos, gerando estruturas química diversas, das mais simples às mais complexas (IBARRA; ISLAS-JÁCOME; GONZÁLEZ-ZAMORA, 2018). Ao nível molecular as RMC irão ocorrer seguindo um princípio cascata, onde, ao efetivar a primeira reação, há a formação de um intermediário que irá condensar com um outro substratos (ZHI; MA; ZHANG, 2019). As subreações envolvidas são reversíveis, porém a etapa de formação do produto é irreversível (WEBER, 2002), sendo que os componentes podem ser adicionados em qualquer ordem (HOUCK; YOUNAI; SHAW, 2010).

Diante disso, as RMCs são importantes estratégias sintéticas, uma vez que estão de acordo com vários dos 12 princípios da química verde, formulados por Anastas e Warner (Figura 1). Como exemplo, a economia atômica, uma vez, que nessa reação o produto contém o máximo dos átomos envolvidos no processo. Além disso, como não é necessário isolar cada intermediário gera menos resíduos. Também possibilita o uso de catalisadores e estão associadas a diminuição do gasto energético, pois, ocorrem normalmente em condições amenas (menores temperaturas e a pressão ambiente) (CIOG; RUIJTER; ORRU, 2014).

Figura 1- Os 12 princípios da química verde



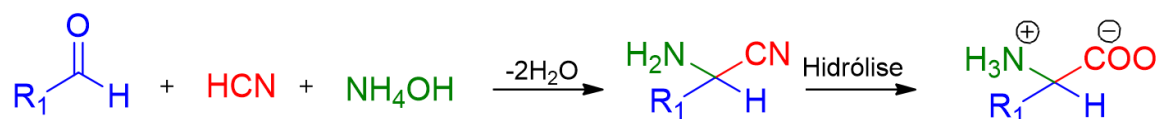
Fonte: Do autor (2023)

As RMC apresentam diversas vantagens, como exemplo, podemos citar o rendimento global, muitas sínteses descritas na literatura apresentam maior rendimento quando comparado aos processos que envolvem etapas múltiplas. Tem-se uma redução na mão de obra necessária, uma vez que, mistura-se os reagentes e a reação é mantida por determinado momento, sem a necessidade de etapas de purificação dos intermediários (GU, 2012).

As RMCs foram descritas pela primeira vez na literatura em 1850 através do estudo de von Adolph Strecker, que reagiu um aldeído, uma cetona e uma fonte de cianeto, gerando como produto os  $\alpha$ -aminoácidos (Figura 2). É um método simples e eficiente para a obtenção dos aminoácidos, moléculas biologicamente importantes (EZZATZADEH; HOSSAINI, 2020; KOUZNETSOV; GALVIS, 2018). Uma aplicação da síntese de Strecker é de fármacos, como exemplos, pode-se citar o copidogrel utilizado para prevenir a formação de coágulos

sanguíneos. Tal como, para a síntese de medicamentos analgésicos opióides à base de 4-anilidopiperidina como o carfentanil, remifentanil e alfentanilou (KOUZNETSOV; GALVIS, 2018).

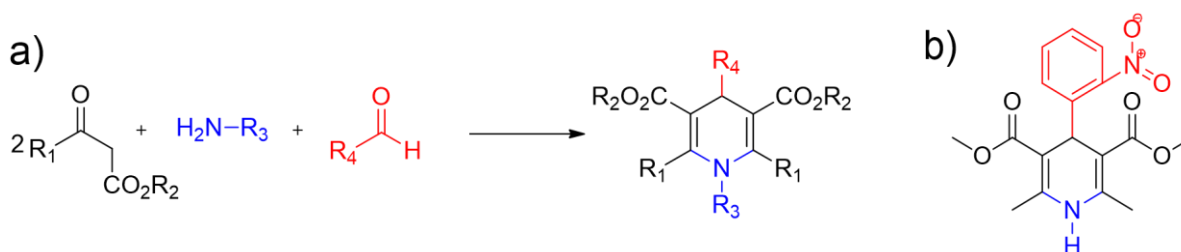
Figura 2- Representação geral da síntese de Strecker



Fonte: Do autor (2023)

Outros pesquisadores estudaram as RMC, como exemplo, pode-se citar o estudo de Hantzsch, em 1882, ele desenvolveu uma síntese utilizando quatro componentes (dois compostos dicarbonil, uma amina e um aldeído) adquirindo a dihidropiridina (DHP) (Figura 3a) (BRINKERHOFF et al., 2019; HOUCK; YOUNAI; SHAW, 2010). Um exemplo industrial da síntese de Hantzsch é a obtenção do nifedipino (Adalat®) (Figura 3b), esse fármaco é utilizado como bloqueador dos canais de cálcio, sendo empregado para o tratamento de hipertensão e como vasodilatador (BRINKERHOFF et al., 2019).

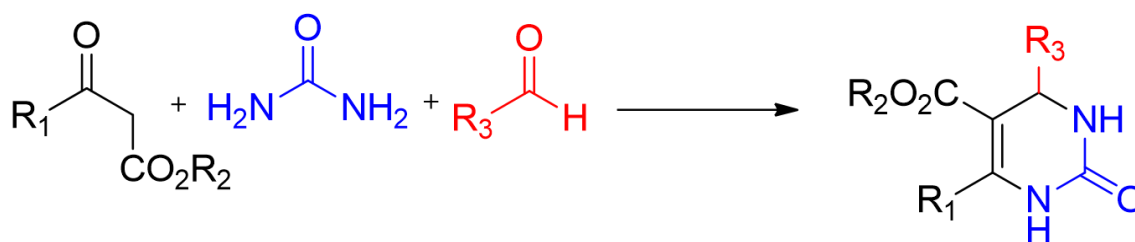
Figura 3- Reação multicomponente a) Reação de Hantzsch b) Estrutura do fármaco Nifedipino



Fonte: Do autor (2023)

Biginelli, em 1893, foi outro pesquisador que estudou esse tipo de reação, estudou as sínteses de 3,4-di-hidropirimidin-2(1H)-ona (DHPM), partindo de três componentes: benzaldeído, acetoacetato de etila e tiouréia (Figura 4). O mecanismo para esse processo tem sido estudado por meios teóricos e experimentais, sendo motivo de muitos debates. A síntese de Biginelli tem sido amplamente utilizada para sistemas heterocíclicos, para compostos com diversas propriedades farmacológicas, como antimalárico e antituberculose (NAGARAJAIAH; MUKHOPADHYAY; MOORTHY, 2016; RAMOS; RODRIGUES; NETO, 2019).

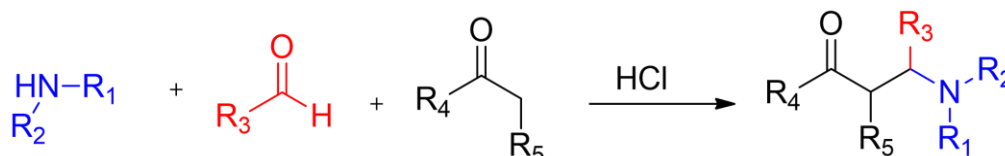
Figura 4- Reação multicomponente de Biginelli entre aldeído, acetoacetato de etila e tiouréia para a síntese de di-hidropirimidinonas



Fonte: Do autor (2023)

Em 1912, Carl Mannich, partindo de três componentes desenvolveu uma RMC, utilizou uma amina, um aldeído e um composto carbonílico, na presença de ácido, e obteve-se produtos, denominados bases de Mannich (Figura 5). São compostos descritos com potencial biológico, como exemplo, os compostos bis 1,2,4-triazólicos, que apresentam atividades antifúngica e bactericida. Na síntese de alcaloides diterpenos, que apresentam atividade anti-inflamatória, analgésico, antitumoral, dentre outras (FILHO et al., 2017). Além disso, os produtos das sínteses de Mannich são importantes intermediários sintéticos, tanto para a elaboração de medicamentos como de moléculas oriundas de produtos naturais. Sendo indispensável na construção de moléculas que possuem o nitrogênio (N) na estrutura (ROGERIO et al., 2016).

Figura 5- Reação multicomponente entre uma amina, um aldeído e um composto carbonílico para obtenção das bases de Mannich



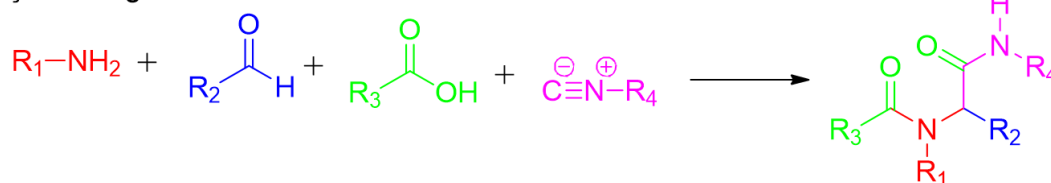
Fonte: Do autor (2023)

Posteriormente, Passerini (1921) e Ugi (1959) estudaram a reatividade das isonitrilas. A RMC de Ugi, parte de quatro componentes sendo um aldeído, uma amina, um ácido carboxílico e uma isonitrila (Figura 6) (RAMOS; RODRIGUES; NETO, 2019). Já a reação de Passerini parte de um aldeído, um ácido carboxílico e uma isonitrila, produzindo aciloxicarboxamidas (Figura 6), síntese útil para a produção de fungicidas (LAMBERTH, 2020). Muitas sínteses por RMC baseiam-se na isonitrila como reagente, pois apresentam grande versatilidade e a possibilidade do desenvolvimento de uma grande variedade de

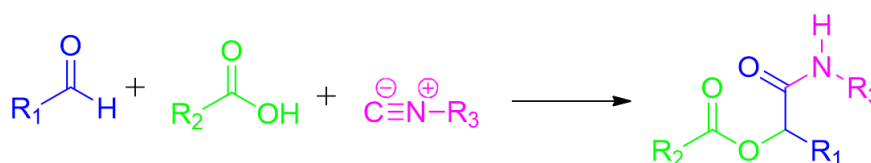
compostos. Além disso, a isonitrila é útil na formação de heterocíclicos com aplicação medicinal (LUO et al., 2020).

Figura 6- Reações multicomponente de Ugi (quatro componentes) e de Passerini (três componentes)

Reação de Ugi



Reação de Passerini



Fonte: Do autor (2023)

As RMC são conhecidas há várias décadas e muitas apresentam diversas vantagens como altos rendimentos, geração de menor quantidade de resíduos, dentre outras já mencionadas. Essa síntese ficou muito tempo esquecida devido à falta de interesse comercial pelos seus produtos. Porém, com as descobertas biológicas e farmacológicas de alguns desses produtos, seu estudo está em crescimento (ROGERIO et al., 2016). O aumento no destaque das RMC ocorreu na década de 90 devido ao uso da química combinatória e à formação de bibliotecas de síntese. Nessa época, também foi desenvolvida sua aplicação na síntese de moléculas oriundas da natureza (HOUCK; YOUNAI; SHAW, 2010).

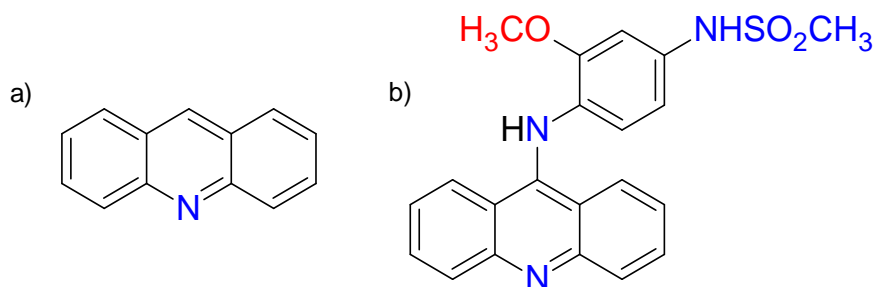
### 3.2 Tetrahidrobenzo[c]acridinonas

Acridinas, também conhecidas por dibenzo [b, e] piridina, benzo [b] quinolina, 2,3,5,6- dibenzopiridina ou 10-azaantraceno, podem ser encontradas na natureza como alcalóides da acridona ou pode ter alterações em suas estruturas parciais, como sistemas de anéis tetracíclicos, pentacíclicos ou ainda maiores. O primeiro relato da obtenção desse alcaloide foi a partir de plantas da família *Rutaceae*. As substâncias isoladas, por sua vez, serviram de inspiração para o desenvolvimento de compostos antitumorais (SCHMIDT; LIU, 2015).

As acridinas (Figura 7a) podem ser obtidas por sínteses a partir das RMCs. Essas substâncias são conhecidas desde o século 19, sendo inicialmente utilizadas como corantes e pigmentos. Durante a primeira guerra mundial, essas moléculas foram testadas para combater

infecções causadas por bactérias e protozoários e contra malária. Em 1920, suas propriedades anticâncer foram consideradas e, a partir desse momento, inúmeras acridinas, sintéticas e naturais, foram testadas como agentes antitumorais. Dentre essas, merece destaque a Amsacrine (Figura 7b), que atualmente é utilizada clinicamente no tratamento de leucemia aguda (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001).

Figura 7- a) Acridina e b) Amsacrine (princípio ativo para o tratamento de leucemia)



Fonte: Do autor (2023)

Devido às inúmeras duplas conjugadas presentes nas acridinas e seus derivados, existe relato dessas substâncias como luminóforos, ou seja, possuem propriedades luminescentes, podendo ser utilizadas em diversas aplicações, por exemplo, em química forense. É citada também sua utilização na produção de plásticos e microeletrônicos (ZHIKHARKO; KOZLOV; BASALAEVA, 2016).

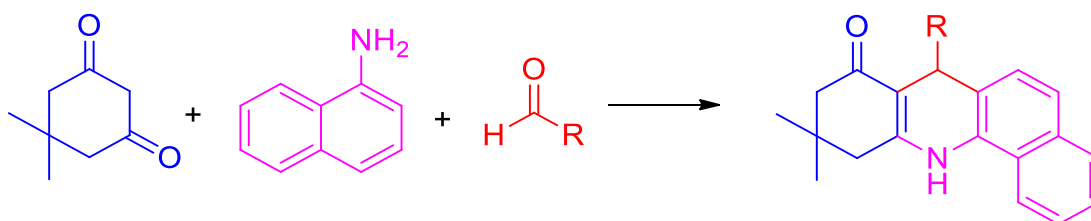
As benzo[c]acridinonas são uma subclasse das acridinas, são descritas na literatura possuindo atividade antimicrobiana, através dos estudos realizados para os derivados do 7,10,11,12-tetra-hidrobenzo[c]acridin-8(9H)-ona substituído. Nesse trabalho verificou a capacidade antifúngica dessas substâncias, para o fungo, *Rhodotorula rubra*, uma levedura oportunista responsável por causar infecções nos seres humanos (NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009; WIRTH; GOLDANI, 2012). Os derivados também apresentam potencial para serem usados contra diversos outros micro-organismos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, dentre outros (NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009).

Além disso, estudos com os derivados dessa subclasse sugerem potencial *in vitro* para células cancerígenas de diversas linhagens celulares como de próstata, ovário, fibrossarcoma, cervical e rins (KUMAR et al., 2018b).

Na literatura encontra-se diversas metodologias utilizando como reagentes 1-naftilamina, dimedona e aldeído, para a obtenção dos derivados das benzo[c]acridinonas

(Figura 8). O método clássico envolve a utilização de solventes orgânicos (etanol, benzeno etc.) e o uso de refluxo para a obtenção dos produtos. O rendimento pode variar entre (24-99%), e esse, depende dos grupos substituintes presentes no aldeído, do solvente utilizado e das demais condições utilizadas. Além disso, o tempo para a obtenção desse produto pode variar entre 2- 20 horas (CORTÉS et al., 1987).

Figura 8- Reação entre 1-naftilamina, dimedona e aldeído para obtenção das benzo[c]acridinonas



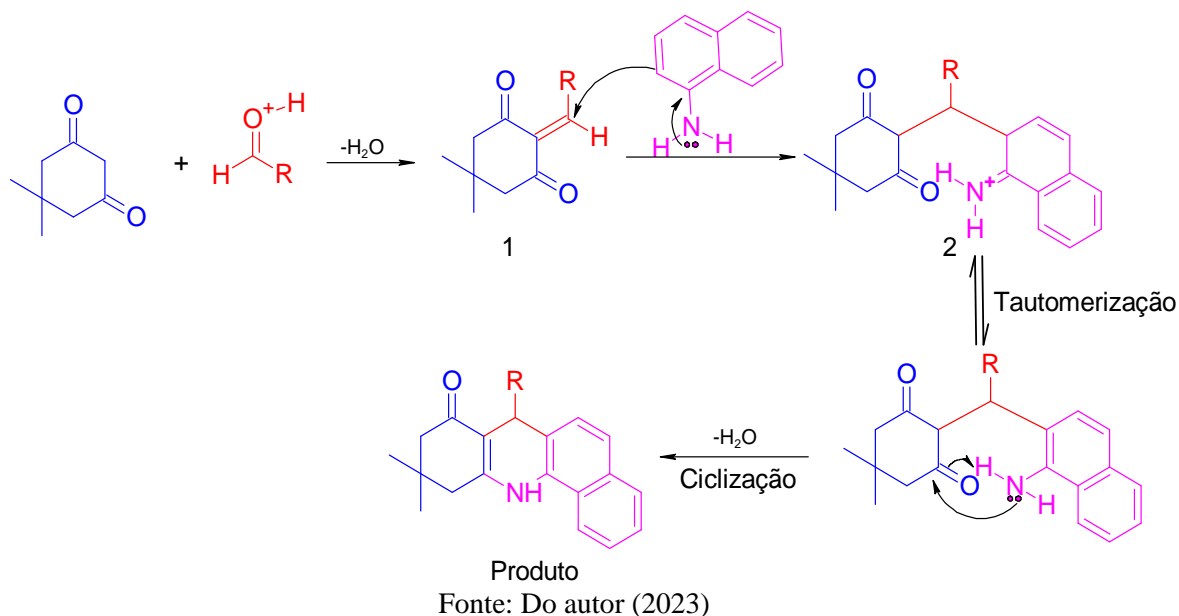
Fonte: Do autor (2023)

Outras metodologias foram e estão sendo desenvolvidas para melhorar o rendimento e diminuir o tempo reacional. Como exemplo de estratégias podemos citar as metodologias que utilizam irradiação por ultrassom (ZANG et al., 2010), transformação eletrolítica (HERAVI et al., 2018), irradiação de micro-ondas (TU et al., 2006). Além disso, está cada vez mais crescente o uso de catalisadores, alguns que já foram relatados na literatura são: Cloreto de benziltriethylamônio (TEBAC) (WANG et al., 2006), SBA-Pr-SO<sub>3</sub>H como nano catalisador (ZIARANI et al., 2014), fosfato de ferro III (FePO<sub>4</sub>) (BEHBAHANI; FARAHANI, 2015), os ácidos sulfâmicos (H<sub>3</sub>NSO<sub>3</sub>) e o H<sub>6</sub>P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>.18H<sub>2</sub>O (HERAVI et al., 2012), utilizando a L-prolina (HERAVI; AGHAMOHAMMADI, 2012), dentre outros.

Diversos autores sugerem mecanismos de como ocorre a reação entre a 1-naftilamina, dimedona e o aldeído, ZIARANI e colaboradores (2014), sugere que o catalisador SBA-Pr-SO<sub>3</sub>H age como fonte de hidrogênio protonando a carbonila do aldeído. Isso, aumenta o foco de carga positiva no carbono, deixando-o mais reativo, ocorre uma reação de Knoevenagel, formando um intermediário entre a dimedona e o aldeído. Posteriormente, ocorre uma desidratação produzindo o intermediário 1, após ocorre a adição da 1-naftilamina, produzindo o intermediário 2, e seguido por uma tautomerização e ciclização gerando o produto (Figura 9).

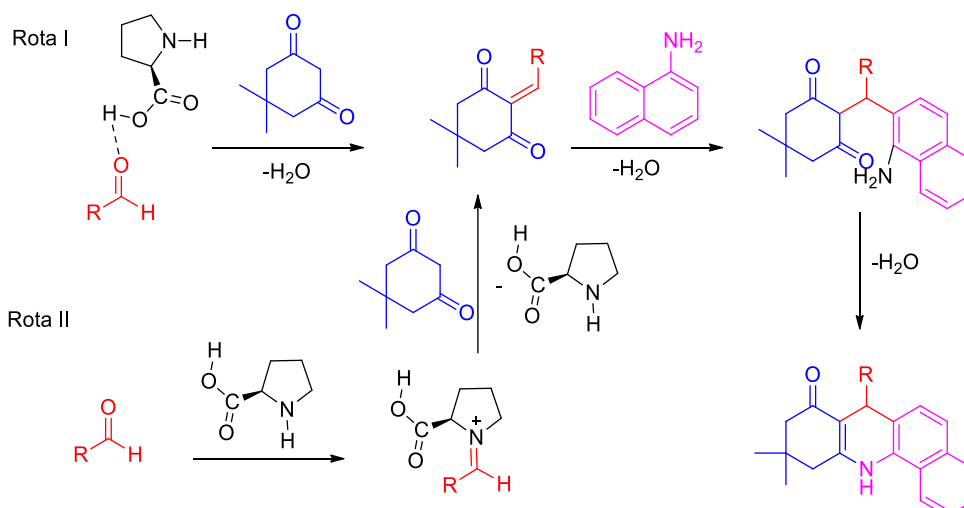


Figura 9- Mecanismo para a obtenção de derivados de benzo[c]acridinona utilizando como catalisador o SBA-Pr-SO<sub>3</sub>H



HERAVI e AGHAMOHAMMADI (2012) propuseram um mecanismo para explicar a reação entre a dimedona, 1- a-naftilamina e o aldeído correspondente, através de uma RCM utilizando a L-prolina como catalisador. Eles sugeriram dois caminhos diferentes (Figura 10); no primeiro, há ativação do oxigênio do aldeído pela parte ácida da L-prolina através de uma ligação intermolecular com o H e posteriormente ocorre a condensação com a dimedona. No segundo caminho, ela reage com o aldeído formando o íon imínio; posteriormente, irá ocorrer a condensação com a dimedona. Ambas as reações geram o intermediário B, que reage com a amina, formando o intermediário C, que sofre uma desidratação.

Figura 10- Mecanismo de síntese dos derivados de benzo[c]acridinonas utilizando L-prolina como catalisador.



Fonte: Do autor (2023)

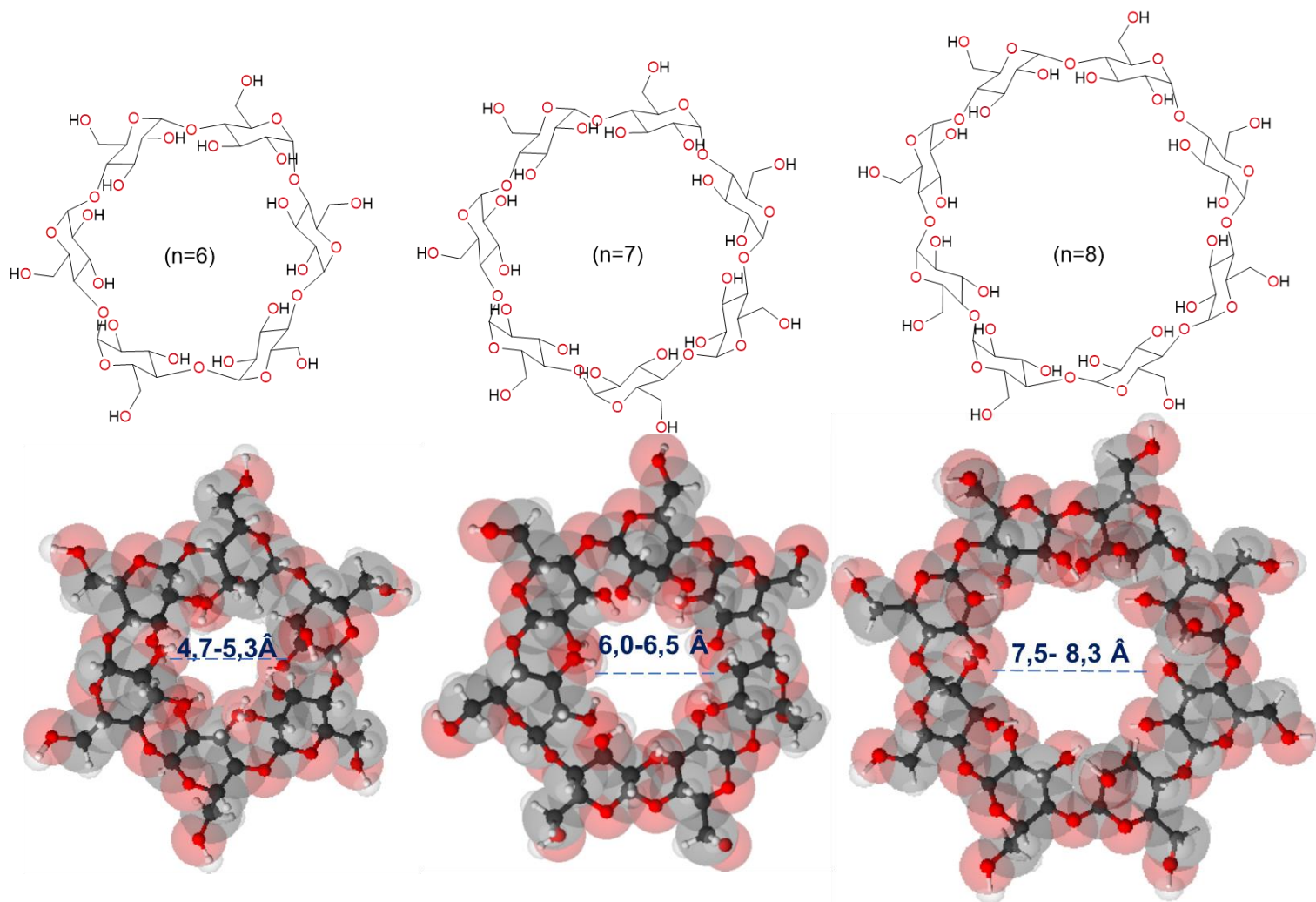
Embora grande parte dos trabalhos sobre essa classe de compostos lide com informações sobre sua síntese, pouco se sabe sobre seu potencial biológico. Ao analisar sua estrutura e dados teóricos (SCIFINDER) sobre a solubilidade dessa molécula, constatou-se que ela possui baixa solubilidade. Considerando o uso, por exemplo na indústria farmacêutica, é necessário que esses compostos tenham uma certa solubilidade (COLTESCU; BUTNARIU; SARAC, 2020). Uma forma de contornar as dificuldades de utilização dessa classe de compostos seria a formação de complexos de inclusão com as ciclodextrinas.

### 3.3 Complexos de inclusão

Em 1891, Antoine Villiers isolou uma substância cristalina, que ele denominou de celulosina, a partir da digestão do amido pela bactéria *Bacillus amylobacter*. Mais tarde essa substância ficou conhecida como ciclodextrinas (CD). Em 1903, Franz Schardinger descreveu o preparo, separação e purificação e em 1911 estudou as propriedades das CD (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018). Nos anos de 1950 e 1970, os estudos foram focados nos complexos de inclusão e somente por volta de 1970, iniciou-se a produção em escala industrial. Nessa época também se iniciaram as pesquisas toxicológicas das CDs e consequentemente as aplicações em diversas áreas, como nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos (MORIN-CRINI et al., 2021).

As CDs podem ser definidas como oligossacarídeos cíclicos, que contém em sua estrutura unidades de glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. São encontrados três principais ciclodextrinas naturais; elas contém seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas, respectivamente,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (Figura 11). Apresentam estruturas cristalinas, homogêneas e não-higroscópicas (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; SOMSRI et al., 2020).

Figura 11- Principais CD naturais,  $\alpha$ -CD ( $n=6$ ),  $\beta$ -CD ( $n=7$ ) e  $\gamma$ -CD ( $n=8$ ), sendo “ $n$ ” as unidades de glicose de cada ciclodextrina e suas dimensões internas



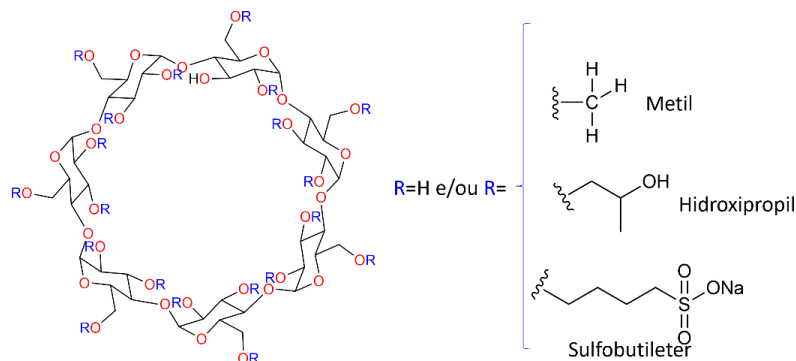
Fonte: Do autor (2023)

As CDs possuem diferentes solubilidades em água; a menos solúvel é a  $\beta$ -CD (18 mg/MI), seguido da  $\alpha$ -CD (145 mg/mL) e  $\gamma$ -CD (249 mg/mL), sendo esses valores obtidos em uma temperatura de 25 °C. A  $\beta$ -CD possui menor solubilidade devido à sua estrutura tridimensional; contém as hidroxilas posicionadas para o exterior, o que permite a formação de ligação de hidrogênio intramolecular, o que torna a estrutura rígida em comparação com a  $\alpha$ -CD. A  $\alpha$ -CD possui uma glicose distorcida, o que dificulta a ligação de hidrogênio intramolecular; por esse motivo possui uma maior solubilidade quando comparada à  $\beta$ -CD. A  $\gamma$ -CD é mais flexível e isso permite sua maior solubilidade (LIU et al., 2022) (ARRUDA et al., 2022).

As CDs interagem umas com as outras por ligações de hidrogênio, intermolecular fortes no estado cristalino, isso ocasiona um decréscimo nas suas solubilidades. Para resolver esse problema desenvolveram as ciclodextrinas modificadas, substituindo os grupos hidroxilas por outros grupos como grupo alquil. Os derivados podem ser classificados como modificados quimicamente ou naturalmente, os modificados naturalmente são produzidos pelas enzimas pululanase, como exemplo, a glicosil-CD (970 mg/mL) e maltosil-CD (>1500) (JAMBHEKAR; BREEN, 2016; SZENTE; SZEJTLI, 1999).

Enquanto para a obtenção das quimicamente modificadas encontra-se diversas metodologias para a inserção de grupos, como a metilação de Kuhn-Trischmann, para obter as metil-ciclodextrina (Me-CD). As hidroxipropil-ciclodextrina (HP-CD) são produzidas pela reação das CDs com óxido de propileno. Outros derivados das CDs que são comumente utilizadas são: sulfobutiletil-ciclodextrina (SBE-CD) e a CDs sulfatadas (SZENTE; SZEJTLI, 1999). A solubilidade da HP $\beta$ -CD, Me $\beta$ -CD e SBE $\beta$ -CD (Figura 12), são respectivamente, 1200, >500 e >1200 mg/mL (SAOKHAM et al., 2018) .

Figura 12- Ciclodextrinas modificadas Me $\beta$ -CD, HP $\beta$ -CD e SBE $\beta$ -CD

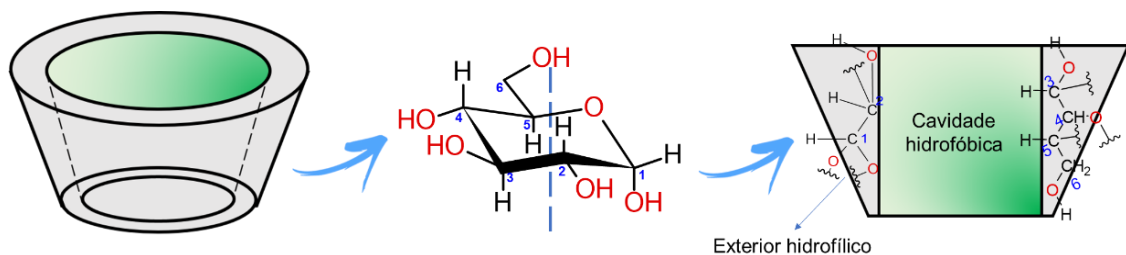


Fonte: Do autor (2023)

Mesmo sendo a menos solúvel dentre as três CD naturais e as modificadas, a  $\beta$ -CD é a mais comumente utilizada. Um dos fatores são devido sua estrutura poder acomodar compostos com massa molecular entre 100 e 400 g/mol, sendo essa faixa de massa molecular de uma grande maioria de moléculas de interesse biológico. Além disso, ela interage facilmente com um grande grupo de compostos orgânicos. E seu valor comercial é menor que as outras CDs (AGUIAR et al., 2014; PRABU; SIVAKUMAR; RAJAMOHAN, 2018).

As estruturas das CDs possuem o formato de um cone truncado e o seu interior é ligeiramente hidrofóbico, ou seja, tem afinidade por compostos não polares. O exterior das CDs é hidrofílico, isso se deve as hidroxilas, expostas para fora da estrutura, tendo afinidade por água e outros solventes polares (Figura 13) (PEREVA et al., 2019).

Figura 13- Estrutura tronco cônica das ciclodextrinas, unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose e representação da organização dos átomos na ciclodextrina, mostrando a cavidade hidrofóbica e exterior hidrofílica.



Fonte: Do autor (2023)

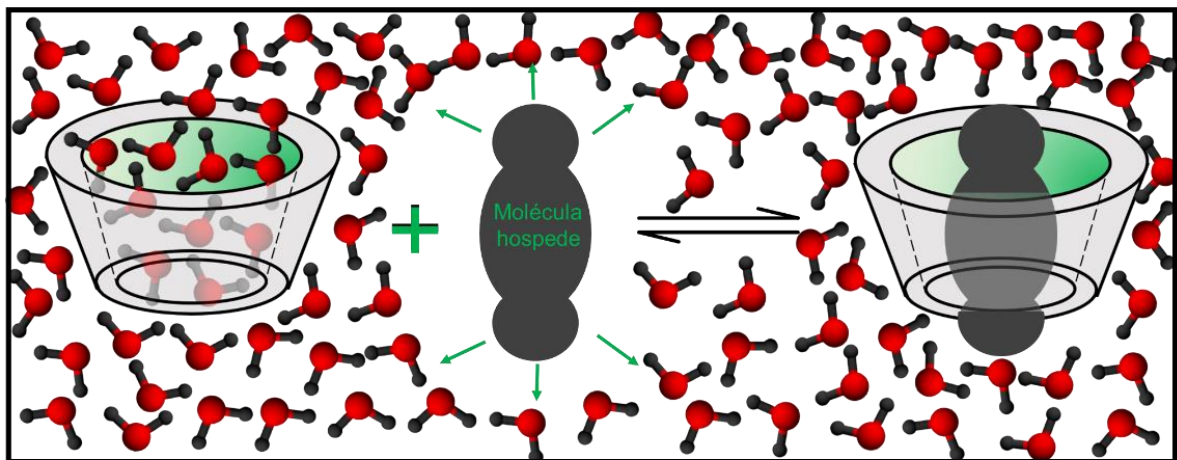
A capacidade de interagir com substâncias hidrofóbicas na sua cavidade são responsáveis pelas CDs agirem como molécula hospedeira, abrigo em seu interior as moléculas convidadas. Os compostos que podem ser usadas para o preparo dos complexos de inclusão (CI) podem estar de diferentes estados físicos como sólidas, líquidas ou gasosas.

Complexos podem ser definidos como um conjunto molecular formado pela associação de espécies químicas, ligados por interações mais fracas que uma ligação covalente. Sendo os complexos de inclusão formados quando um dos componentes formam cavidades, tuneis ou canais onde uma segunda espécie pode ser inserida (MCNAUGHT; WILKINSON, 2014).

Ao formar o CI causa alterações nas propriedades físico-químicas das moléculas, aumentando por exemplo sua solubilidade, sua estabilidade físico-química, e a distribuição do fármaco na membrana plasmática (SAOKHAM et al., 2018).

Em solução aquosa as moléculas de água preenchem a cavidade das ciclodextrinas, formando um ambiente termodinamicamente desfavorável, devido as interações que ocorrem no interior da ciclodextrinas com a água que é polar. Moléculas menos polar que a água, são adicionadas no interior das CD, expulsando moléculas de água, formando os complexos de inclusão, a formação desse, depende também de vários outros fatores (Figura 14) (SZEJTLI, 1998; WANKAR et al., 2020).

Figura 14- Representação da formação dos complexos de inclusão, as esferas em vermelho representam os átomos de oxigênio e em preto os hidrogênios presentes na molécula de água.



Fonte: SZEJTLI, 1988 com modificações pelo autor (2023)

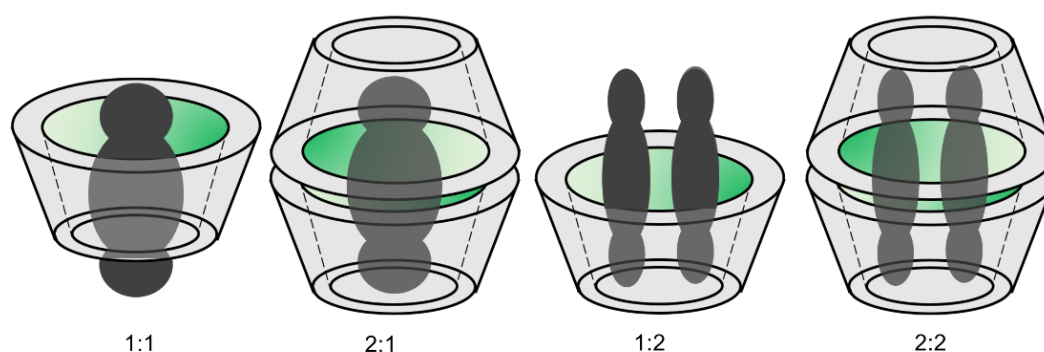
A formação dos CI pode ser influenciada pelo efeito estérico, ou seja, depende do tamanho da CD, seu diâmetro interno, e do tamanho da molécula hóspede ou dos grupos que serão inseridos na cavidade da CD (DEL VALLE, 2004). Outro fator que influencia, é a polaridade das moléculas, compostos hidrofílicos são fracamente complexadas, somente quando possuem menor polaridade que a água é complexada por ciclodextrinas. A presença de grupos substituintes hidrofóbicos nessas moléculas também aumenta a estabilidade dos complexos de inclusão (SZEJTLI, 1988).

A temperatura também pode influenciar, o aumento faz com que se aumente a solubilização da CD e da molécula, porém altas temperaturas desestabilizam os CI. Além disso, altas temperaturas pode decompor os CI. Alguns estudos demonstram que os complexos começam a se decompor entre 50-60 °C. Porém em compostos altamente insolúveis ou quando a interação que ocorre entre a CD e a molécula hospedeira é muito forte essa temperatura é mais alta. Quando se utiliza moléculas em partículas finas dispersas ou solubilizadas o processo de formação dos CI também é facilitado. Para a solubilização

normalmente utiliza-se a água, porém quando a molécula possui baixa solubilidade em água é necessário o uso de solvente orgânico, para aumentar a velocidade de complexação ou mesmo torná-la possível (DEL VALLE, 2004).

Ao formar o CI não ocorre a quebra ou a formação de nenhuma ligação; a molécula convidada e a CD, em um CI são mantidas através de interações intermoleculares como exemplo podemos citar a ligação de hidrogênio, interação eletrostática, interação de van der Waals, dentre outras (LIU et al., 2018). Além disso, são encontrados complexos de inclusão com as seguintes estequiometrias 1:1, 1:2, 2:1 ou 2:2, a proporção de molécula hospedeira: hóspede vai depender do tamanho da molécula hóspede (Figura 15) (ASTRAY; MEJUTO; SIMAL-GANDARA, 2020; CRINI, 2014).

Figura 15- Exemplos de complexo de inclusão formado pela molécula hospedeira e hóspede e estequiometrias possíveis



Fonte: Do autor (2023)

Além dos complexos de inclusão, tem sido relatado na literatura a obtenção de complexos de não inclusão, onde a molécula é ancorada no exterior da CD. Estudos tem demonstrado que algumas moléculas coexistem em solução como complexos de inclusão e não inclusão com as CDs. Além disso, ocorre alterações nas propriedades das moléculas como um aumento na solubilidade intrínseca nesses complexos de não inclusão (DE JESUS et al., 2012; MESSNER et al., 2010).

Na literatura encontra-se diversos estudos a respeito da toxicidade das CD, as três CD naturais mais comuns,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, são consideradas não tóxicas quando administradas por via oral e isso é devido à baixa absorção no trato intestinal. Porém, estudos demonstraram que colírios contendo  $\alpha$ -CD em dosagens >4%, pode causar toxicidade nas córneas de coelho, isso pode ser justificado pela capacidade da  $\alpha$ -CD e  $\beta$ -CD de extrair colesterol e compostos lipídicos das membranas das células (ABDELKADER et al., 2018). Devido a possibilidade de funcionalizar as principais CDs é possível encontrar mais de 1500

derivados e a toxicidade dessas moléculas é variável, alguns dos danos que alguns derivados podem causar envolvem ação hemolítica e toxicidade renal, porém outras CD funcionalizadas foram desenvolvidas para não apresentarem nenhuma toxicidade (BRAGA, 2019).

Devido suas propriedades, as ciclodextrinas possuem diversas aplicações, podendo ser utilizada na indústria farmacêutica, de alimentos, cosméticos, nanotecnologia, de fragrâncias e aromas, dentre outras (CRINI, 2014). Na área de alimentos, por exemplo, as CDs podem ser usadas para produzir ou extrair compostos bioativos, para produzir produtos livres de açúcar, glúten ou reduzir a quantidade de colesterol em ovos e leite, modificar as características organolépticas como o odor de peixes; podem ser usadas também em embalagens de alimentos, entre outras aplicações (ALONSO; CALVO; FONTECHA, 2019; MATENCIO et al., 2020).

As CDs são muito utilizadas na indústria farmacêutica, sendo usado associados a diferentes princípios ativos, por exemplo, na França é encontrado o  $17\beta$ -estradiol + Me- $\beta$ -CD (spray nasal). Nos EUA os fármacos ziprazidona (antipsicótico) e voriconazol (antimicótico) são usados com a SBE- $\beta$ -CD. No Brasil o piroxicam em conjunto com a  $\beta$ -CD é um anti-inflamatório e analgésico de uso pediátrico. Medicamentos contendo as CD são encontrados em outros países como Japão, Itália, Alemanha, dentre outros (BHARGAV; SHEEBA, 2021).

As CDS também são utilizadas para superar problemas biofarmacêuticos através dos sistemas de liberação de fármacos. São desenvolvidos complexos de inclusão com a finalidade de entregar a quantidade necessária do princípio ativo ao local que irá reagir de forma hábil, concisa e em um período específico (UEKAMA; OTAGIRI, 1987) (REAL et al., 2021).

Os complexos de inclusão podem ser preparados usando diferentes técnicas. Nos métodos em solução, os componentes são solubilizados em um sistema de solvente orgânico/água, podendo variar a temperatura e pH, para garantir uma interação efetiva entre a molécula hospede e hospedeira (JUG; MURA, 2018). Diferentes metodologias são usadas como co-precipitação, método adequado para compostos não solúveis em água. Spray-drying e liofilização (CID-SAMAMED et al., 2022). São métodos considerados simples e eficientes, sendo necessário a utilização, em alguns casos, de aparelhagem específica (CID-SAMAMED et al., 2022).



No método em estado semissólido a molécula e a CD são amassadas utilizando um pequeno volume de solvente, normalmente água/etanol. Obtém-se um material pastoso, o solvente é então seco, obtendo o complexo sólido (JUG; MURA, 2018).

No estado sólido envolve, por exemplo, a utilização de micro-ondas, tem como desvantagem a degradação da molécula por irradiação. Porém gera altos rendimentos e tempos reacionais mais curtos. O método do aquecimento suave, utiliza temperaturas menores que o ponto de fusão dos componentes. Outra técnica é a ativação mecanoquímica que operam com diferentes tipos de moinhos, têm a vantagens de não utilizar solventes orgânicos. Também apresenta rapidez, eficiência, econômica e ambientalmente favorável (JUG; MURA, 2018).

### **3.4 Caracterização de compostos orgânicos e complexos de inclusão**

Os complexos de inclusão podem ser obtidos no estado sólido e no estado líquido, para caracterizá-los, lidam-se com diversas ferramentas analíticas. No estado líquido são comumente empregadas técnicas espectroscópicas como: ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV/vis), espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, métodos eletroanalíticas e de separação como a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (MURA, 2014).

Os complexos no estado sólido são normalmente caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análises térmicas como a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de varredura, dentre outras (MURA, 2015). São processos essenciais e muito empregues devido a sua capacidade de obter resultados com eficiência (DE MIRANDA et al., 2011; FICARRA et al., 2002). Abaixo estão descritos os recursos analíticos usados no desenvolvimento desse trabalho.

#### **3.4.1 Métodos analíticos para a caracterização dos complexos em solução**

##### **3.4.1.1 Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN)**

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta essencial nas mais diversas áreas. Na química orgânica é aplicada na identificação da estrutura de um composto sintético ou isolado de plantas, fungos e animais marinhos (NASCIMENTO, 2016). É empregado em estudos metabolômicos de biofluidos e tecidos (WISHART, 2019) e de plantas (LANZOTTI et al., 2022; XIAO et al., 2022) e análise de polissacarídeos (YAO et al., 2021), de células

(SIEGAL; SELENKO, 2019), alimentos e nutrientes (HATZAKIS, 2019), dentre outras. Outra aplicação é seu uso para a caracterização dos complexos de inclusão, tendo potencial para verificar a orientação da molécula hospede na cavidade da CD, e determinar a estequiometria (MURA, 2014).

Baseia-se na interação entre radiação eletromagnética com a matéria. Para determinados compostos serem analisados por essa técnica é necessário que sua estrutura contenha núcleos com propriedades magnéticas, que são descritas em termos de seu momento angular e de spin. Isso é verificado através de cálculos matemáticos e quando o número de spin é zero, indica que o núcleo não exibe propriedades magnéticas não podendo ser identificados por RMN. Alguns exemplos de átomos que possuem número de spin diferente de zero, portanto analisáveis por RMN são:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ , dentre outros (PAVIA et al., 2015).

No processo, quando um material é colocado em um campo magnético, podem absorver energia eletromagnética, o que faz com que ocorra inversão do *spin* (ressonância). A frequência que ele irá absorver depende da posição dos núcleos na molécula e da força do campo, a energia é liberada (relaxação) e detectada na forma de espectros (JACOBSEN, 2007).

Para a análise dos complexos de inclusão uma forma simples de comprovar é através de modificações nos sinais de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ , onde é possível notar alterações nos valores de deslocamento químico (LAVERDE et al., 2002; MURA, 2014). As técnicas unidimensionais podem não ser suficientes para obter as informações desejadas. Comumente utilizam-se dos métodos bidimensionais, que tem como finalidade simplificar a visualização de espectros complexos consistindo em muitas bandas sobrepostas. A partir desses, é possível adquirir informações como estabilidade, estequiometria e orientação das moléculas hospede no interior das CDs (DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

Um exemplo de RMN bidimensional é a espectroscopia ordenada por difusão (DOSY, do inglês "*Diffusion Ordered Spectroscopy*"), empregam-se medidas de difusão molecular por RMN, através do núcleo de  $^1\text{H}$ . Nessa ferramenta os deslocamentos químicos são mostrados em uma dimensão e o coeficiente de difusão em outra. Obtendo informações sobre a constante de associação, por exemplo (LAVERDE et al., 2002; MURA, 2014).

A DOSY consiste em separar os sinais obtidos por RMN em função do coeficiente de difusão. Onde os espectros “spin eco”, sequência de pulso, são medidos com diferentes intensidades de gradiente de campo pulsado, com a atenuação do sinal é possível calcular os coeficientes de difusão (D) (KLEKS et al., 2021). Difusão é o movimento browniano da molécula, ou seja, as moléculas em solução se movimentam de forma aleatória, depende de parâmetros como: tamanho, forma, viscosidade e temperatura (SILVA, J. M.; LIMA, 2007).

O coeficiente de difusão é descrito pela equação de Stokes- Einstein (Equação 1), que permite estimativas do tamanho das partículas quando são maiores que o solvente (NEUFELD; STALKE, 2015). Os parâmetros da equação são: k: constante de Boltzmann, T: temperatura,  $\eta$ : viscosidade do líquido e  $r_s$ : raio hidrodinâmico da molécula.

Equação 1: Equação de Stokes-Einstein que descreve o coeficiente de difusão

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

Alguns RMN bidimensional dependem do Efeito Nuclear Overhauser (NOE) a partir dos espectros é possível verificar as conformações espaciais da molécula no interior da ciclodextrina (MURA, 2014). O NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) fornece dados via acoplamento dipolar. Baseado nos dados fornecidos por essa metodologia é possível investigações sobre a distância intermolecular pelas medidas de intensidade dos picos (NASCIMENTO, 2016; PAVIA et al., 2015).

A ROESY (*Rotational Overhauser Effect Spectroscopy*), assim como a NOESY, também se baseia no acoplamento dipolar. A partir da ROESY é possível a obtenção dos espectros quando o efeito NOE é muito fraco, não sendo possível utilizar a NOESY. Isso ocorre devido a diferença em relação ao tempo de correlação e a relaxação entre essas duas técnicas (NASCIMENTO, 2016; PAVIA et al., 2015).

A ROESY tem como vantagem a empregabilidade em moléculas de tamanho médio (1000 a 3000 Da), quando não é possível usar o NOE (a diminuição do NOE depende da solução e do equipamento usado). Nesses casos o ROESY é mais eficiente em comparação com o NOESY onde os picos são fracos. Uma desvantagem dessa técnica é que não são consideradas altamente sensíveis, sendo necessário concentrações maiores da amostra, na faixa de mM (DOOST et al., 2019).

### 3.4.1. 2 Espectroscopia na região do UV/vis

A região do ultravioleta (UV) abrange entre 10-380 nm do espectro eletromagnético, que pode ser dividido em UVA (320-380 nm), UVB (280-320 nm), UVC (100-280 nm) e região de vácuo (10-200 nm). A faixa utilizada na espectroscopia de UV vai de 180-380 nm, enquanto a faixa do visível (vis) está entre 380-750.

Nessa técnica uma molécula ou um átomo absorve um fóton de luz; nesse processo, toda a energia é transferida e a energia interna aumenta de acordo com a quantidade de energia que o fóton possuía. Isso faz com que ocorra um processo de transição eletrônica, os elétrons passam de um estado de baixa energia para um estado excitado, ao voltar para seu estado fundamental a energia liberada é medida para detectar a concentração (PENNER, 2017; PICOLLO; ACETO; VITORINO, 2018).

Nem todos os compostos podem ser analisados por UV/vis, para tal é necessário a presença de grupos cromóforos, ou seja, a presença em sua estrutura de ligações  $\pi$  (ligações duplas) e orbitais não ligantes (n). As transições de menor energia, portanto mais útil em diversas análises são n a  $\pi^*$  e n à  $\sigma^*$ . Grupos como os alcanos que possuem apenas transições eletrônicas  $\sigma$  a  $\sigma^*$ , de alta energia, absorvendo no comprimento de onda de 111 nm. Os equipamentos operam na faixa de 190-800 nm, dessa forma não é possível analisá-los. O mesmo é observado em alcenos que contém apenas uma ligação dupla, dentre as transições possíveis a de menor energia é  $\pi$  à  $\pi^*$  (160 nm), não é detectável pelo equipamento. A presença de grupos substituintes influencia nesses valores nos alcenos (PAVIA et al., 2015).

Dois cientistas, Johann Heinrich Lambert e August Beer, formularam através de cálculos matemáticos, a relação entre a absorbância do material medida é proporcional a concentração. Nos seus estudos eles comprovaram que a intensidade da luz (absorbância) é proporcional a concentração e ao caminho óptico, e pode ser demonstrado através da equação para medidas de radiação:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde: A: absorbância;  $\epsilon$ : absorvidade molar da amostra; b: caminho óptico percorrido; c: concentração da amostra (PICOLLO; ACETO; VITORINO, 2018).

As técnicas UV/vis são capazes de seres aplicados na detecção da formação dos complexos de inclusão através de modificações nas absorbâncias dos espectros UV/vis tem

potencial para indicar sua formação. Podem ser verificados deslocamentos hipsocrômicos ou batocrômicos, constatando se houve aumento ou diminuição na intensidade (MURA, 2014).

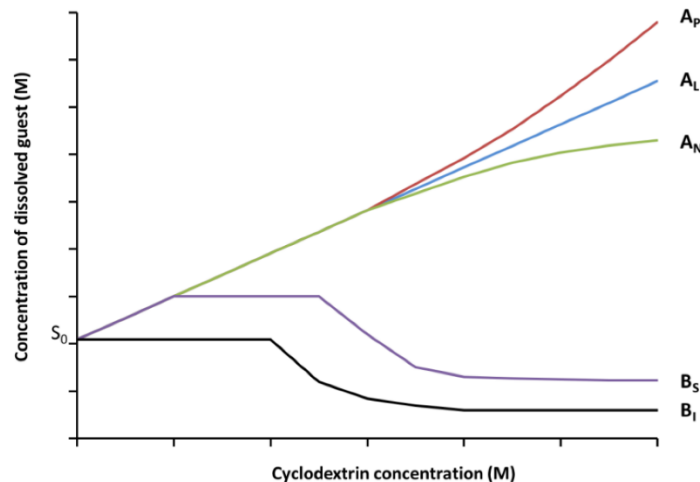
Os deslocamentos hipsocrômicos são deslocamentos para comprimentos de onda menores que o comprimento máximo absorvido por determinado grupo cromóforo (azul). O batocromico é a alteração para comprimentos de ondas maiores (vermelho) (PAVIA et al., 2015).

### 3.4.1.3 Isoterma de solubilidade

Em 1965, Higuchi e Connors desenvolveram um método para avaliar complexos de inclusão em solução. Baseia-se na medição de mudanças na solubilidade em água de uma molécula em contato com diferentes concentrações da molécula hospedeira, como as ciclodextrinas (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Essa técnica permite obter a constante de associação ( $K_a$ ), que é um indicador das alterações nas propriedades físico-químicas resultantes do processo de inclusão molecular (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

Os complexos de inclusão formados podem exibir diferentes perfis de isoterma, com aumento ou diminuição da solubilidade. É proposto cinco perfis de isoterma (Figura 16), onde  $A_P$ ,  $A_L$  e  $A_N$ , formam complexos muito solúveis, sendo sua solubilidade determinado pelo tipo de ciclodextrinas. Complexos com solubilidade  $B_S$  indica uma limitação na solubilidade e  $B_I$  indica a formação de complexos insolúveis (HIGUCHI; CONNORS, 1965). Sendo essa, uma informação de grande importância, principalmente em relação à aplicabilidade do complexo.

Figura 16- Isotermas de solubilidade  $A_P$ ,  $A_L$  e  $A_N$ : Complexos com solubilidade limitado pela CD,  $B_S$ : Complexos de solubilidade limitada e  $B_I$ : Complexos insolúveis.



Fonte: (KFOURY; LANDY; FOURMENTIN, 2018)

### **3.4. 2 Métodos analíticos para a caracterização dos complexos sólidos**

#### **3.4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)**

Podemos dividir a região do infravermelho (IR) em: IR próximo que corresponde entre 400-10  $\text{cm}^{-1}$ , IR médio que abrange entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  e IR distante 14000-4000  $\text{cm}^{-1}$  (DUTTA, 2017). Para a obtenção dos espectros de IR, os equipamentos utilizam o IR médio. A partir da espectroscopia de IR é possível obter informações estruturais de moléculas em diferentes estados físicos (sólido, líquido e gasoso). Essa técnica apresenta aplicações em diferentes áreas como: biotecnologia, produção industrial, medicamentos, análise ambiental, dentre outras (HAAS; MIZAIKOFF, 2016).

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) baseia-se nas transições de energia vibracional. Quando as ligações químicas são expostas a radiações no IR, devido sua capacidade de vibrarem em frequências características, elas absorvem radiação e essa energia é convertida pela amostra a energia vibracional ou rotacional. Medir a frequência de absorção produz os espectros, que permitem, analisar grupos funcionais e compostos, cada molécula contém um espectro único (DUTTA, 2017).

Apenas compostos que possuem ligações covalentes, e essas possuem momento de dipolo que muda em função do tempo, absorvem na região do IR. Essa técnica é usada para determinar os grupos funcionais presentes em determinadas amostras, já que cada grupo absorve uma frequência característica de radiação no infravermelho (PAVIA et al., 2015).

#### **3.4.2.1 Análise térmica: Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Dentre as análises térmicas a DSC é muito utilizada para detectar a formação do CI, onde é possível verificar alterações físico-químicas na molécula hóspede no interior das CDs. Com base nesse método é possível medir as propriedades térmicas do material, e estabelecer uma relação entre a temperatura e as propriedades físicas. Também pode-se obter informações a respeito de sua estabilidade, cristalinidade e sobre a entalpia relacionada ao sistema (AGUIAR et al., 2014; GILL, POORIA; MOGHADAM, TAHEREH TOHIDI AND RANJBAR, 2010).

Para o procedimento experimental a amostra é colocada no instrumento dentro de um suporte, chamado de panela, esse pode ser de metal, porcelana, de caolina etc. A amostra é submetida a uma faixa de temperatura específica, e ocorrem modificações químicas, como as reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de óxido-redução, dentre outras. Também podem ocorrer transições físicas como fusão, ebulição, sublimação, congelamento,

inversões de estruturas cristalinas. Essas modificações causam os eventos endotérmicos ou exotérmicos, criando um fluxo de calor específico que é medido pelo instrumento (IONASHIRO, 2004; ZHENG et al., 2019).

### 3.5 Atividades biológicas

Os complexos de inclusão além de melhorias as atividades físico-químicas, tem demonstrado melhora na biodisponibilidade dos compostos em diversas atividades biológicas como exemplo atividade anticancerígena, antioxidante, inibição da colinesterase, anti-inflamatório, antimalárico, dentre outras (GAO et al., 2022; GONZÁLEZ; SOTO TELLINI; BENJUMEA GUTIÉRREZ, 2022; PONGSAMART et al., 2022; WDOWIAK et al., 2022; ZAFAR et al., 2022). Essas atividades biológicas podem ser verificadas por ensaios *in vivo*, usando diferentes animais como camundongos, ratos, peixes, dentre outros. Ou com os ensaios *in vitro* como os antimicrobianos e utilizando enzimas como exemplo a atividade fosfolipásica ou caseínolítica.

#### 3.5.1 Atividade fosfolipásica

A espécie *Bothrops Moojeni* pertence à família Viperidae, pode ser encontrada na América do sul em países como Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. Seu peçonha tem ação rápida causando inflamação, dor e aumento no tempo de coagulação, quando não tratado pode causar necrose ou gangrena (AMÉLIO et al., 2021). O constituinte majoritário dos peçonhas das serpentes pertencentes a família das Viperidae, são as fosfolipase A2 (HIU; YAP, 2020).

Figura 17- *Bothrops Moojeni*



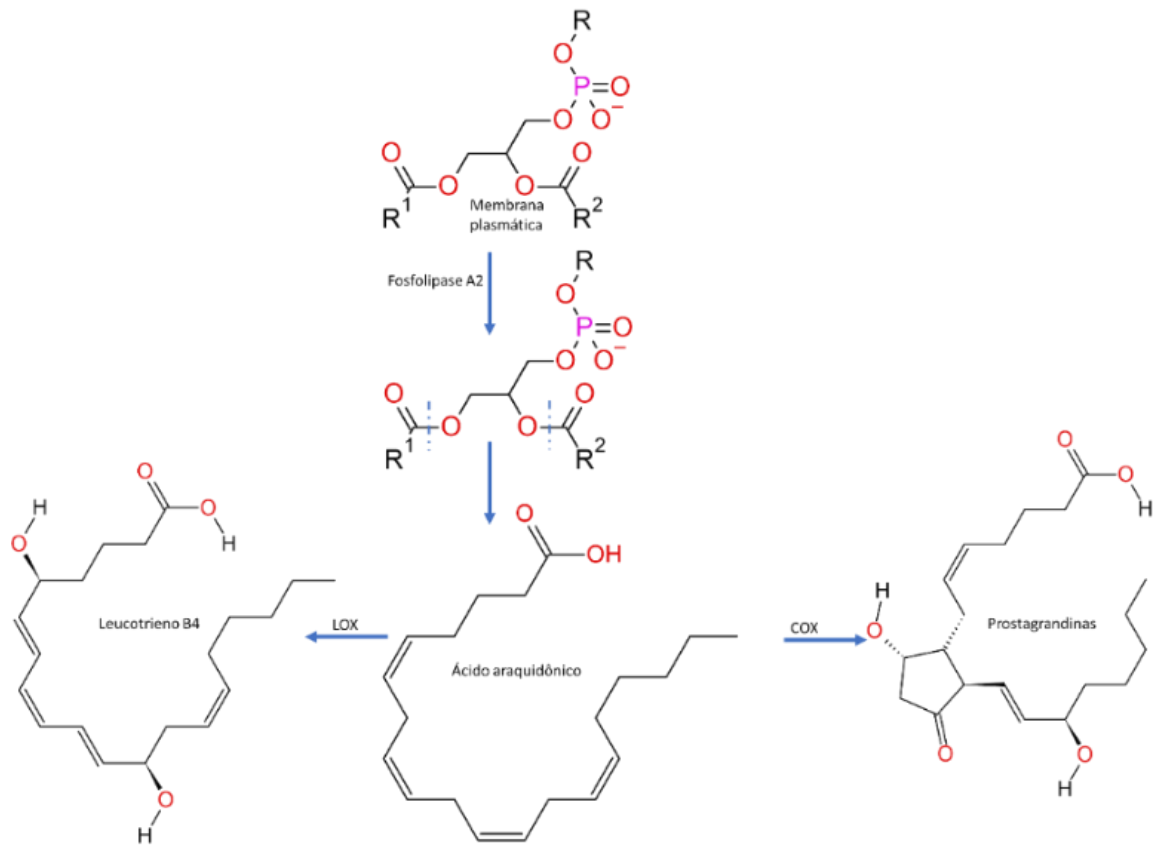
Fonte: Sávio Stefanini Sant'Anna, Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

As fosfolipases A2 (E.C.3.1.1.4) são enzimas de enorme relevância. Nos processos inflamatórios é responsável por catalisar a lise nos fosfolipídios presentes nas membranas

plasmáticas, liberando o ácido araquidônico. Esse sofre ação de outras enzimas, como a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), que converte o ácido araquidônico em eicosanoides, como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Figura 18). Essas moléculas são sinais químicos da inflamação responsáveis pela dor, vasodilatação, febre, agregação plaquetária e quimiotaxia (migração celular) (KUDO; MURAKAMI, 2002; SUN et al., 2021).

As peçonhas de serpente tem sido usadas para verificar a resposta inflamatória através da inibição dessa enzima por produtos sintéticos e naturais (CESAR et al., 2021; MARQUES et al., 2021).

Figura 18- Esquema da ação das fosfolipase A2 no processo inflamatório



Fonte: Do autor (2023)

### 3.5.2 Atividade proteásica

As proteases são enzimas que catalisam as reações de hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos presentes nas proteínas, podem ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos (FLORES-GALLEGOS et al., 2018). Essas enzimas atuam em diversos processos biológicos tanto benéficos como maléficos. Estão relacionadas a digestão como exemplo a quimiotripsina e a tripsina, enzimas encontradas no sistema digestivo dos humanos. Também atuam na coagulação sanguínea, combatem infecções, no vírus da hepatite



C ajudam a infectar as células, também agem amplificação dos sinais celulares, regulação do ciclo celular e apoptose (BRÁS-COSTA et al., 2023; NEITZEL, 2010).

Algumas enzimas proteásicas podem agir no meio da cadeia polipeptídica, enquanto outras agem nos terminais, sendo denominadas endoproteases e exoproteases, respectivamente (DI CERA, 2009). Também são categorizadas em glutâmicas, aspárticas e metaloproteases. Essas utilizam a molécula de água como nucleófilo para quebrar as ligações peptídicas. As outras classificações são cisteína, treonina e serina, essas por sua vez, utilizam um fragmento do aminoácido localizado no sítio ativo enzimático como nucleófilo, o nome delas refere-se à porção que irá reagir. Podem ser divididas em famílias e em clãs, com base em suas sequências de aminoácidos e semelhanças nas suas estruturas tridimensionais (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Dentre os seis grupos mencionados, existem um grande número de serina proteases, sendo responsáveis por cerca de 40% das proteases conhecidas (KASPERKIEWICZ, 2021). Dispõe de diferentes alvos de ação como mucosa intestinal ou pulmonar, célula epitelial, dentre outras. Além disso, elas podem reagir com diferentes substratos como caseína, albumina, hemoglobina, proteínas da matriz extracelular como fibronectina, fibrinogênio, colágeno, dentre outros. Detêm diversidade na sua especificidade e isso é devido a diferentes fatores contidos na estrutura da enzima como a presença de revestimento de aminoácidos hidrofóbicos, ser carregado negativamente ou positivamente, sítios ativos grandes ou pequenas, dentre outros (NEITZEL, 2010; PATEL, 2017).

Assim como as enzimas fosfolipases A2, as serina proteases são encontradas abundantemente nas peçonhas de serpentes terrestres das famílias Viperidae, Elapidae e Crotalidae (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020). São usadas no diagnóstico de irregularidades médicas como problemas de coagulação sanguínea (LATINOVIĆ et al., 2020).

As metaloproteases também são encontradas nas peçonhas de cobras, sobretudo em espécies da família *Viperinae* e *Crotalinae*, em especial no gênero *Bothrops*. São enzimas que dependem de um cofator (zinco), moléculas auxiliares, que ajudam na atividade catalítica da enzima, pertencentes as famílias *metzincina* (LARRÉCHÉ et al., 2021).

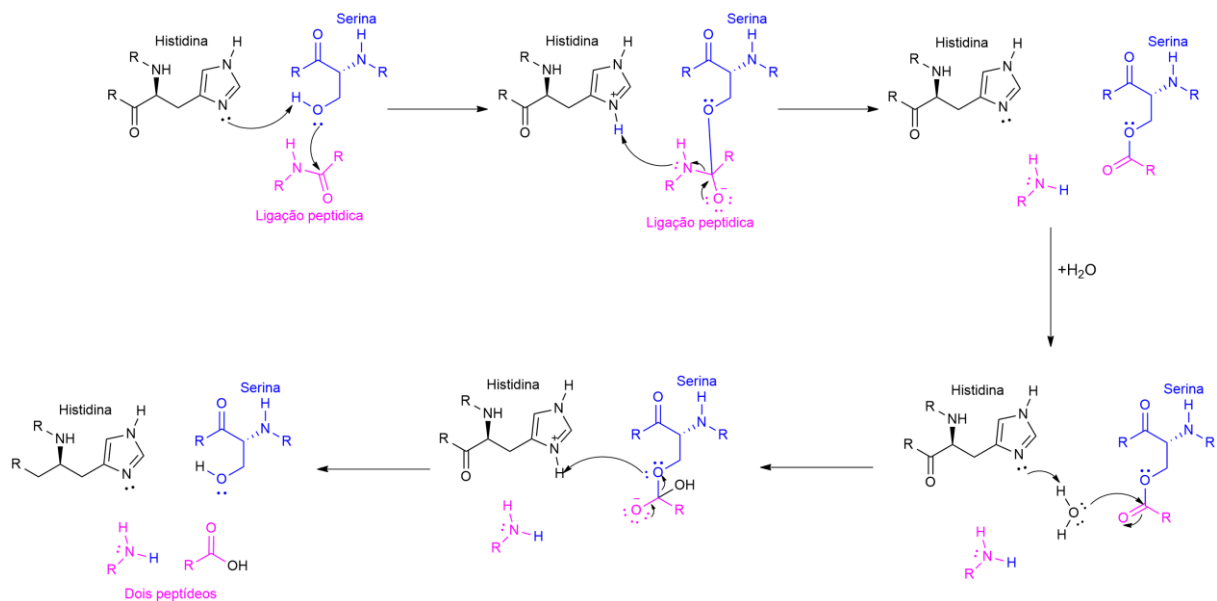
As serina proteases e as metaloproteases são enzimas que interferem em diferentes rotas da cascata de coagulação sanguínea, sendo importante para o desenvolvimento de fármacos (AMORIM et al., 2018). As serina proteases podem ser pro-coagulante é capaz por

ativar os fatores II, VII ou X, ou as trombinas (enzimas) que são responsáveis pela clivagem do fibrinogênio para fibrina, promovendo a ativação plaquetária. Em contrapartida agem na ativação da proteína C, plasminogênio, inibição da antitrombina, nessa etapa ocorre a fibrinogênolise, a destruição da fibrina, tendo efeito anticoagulante (LARRÉCHÉ et al., 2021).

O mecanismo de catalise das serina proteases envolvem uma reação de acilação, onde o grupo serina da enzima se conecta a ligação que será quebrada do substrato, formando um intermediário tetraédrico e depois uma acil enzima, seguida do ataque de uma molécula de água, levando a formação de outro intermediário com a liberação de um fragmento N-terminal (Figura 19) (RADISKY et al., 2006).

Existe uma necessidade inerente de regular as proteases, uma vez que elas catalisam reações hidrolíticas irreversíveis, sendo essencial para tratar a inflamação e hemostasia (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Figura 19- Mecanismo de quebra de uma ligação peptídica com a serina protease, e auxílio da porção histidina



Fonte: FREMOUT (2014) com modificações pelo autor (2023)

### 3.5.3 Atividade antibacteriana

As bactérias podem ser definidas como organismos unicelulares, não visíveis a olho nu, possuem de 0,5  $\mu\text{m}$  a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e de 2,0  $\mu\text{m}$  a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Podem ser classificadas com base nas suas características morfológicas em cocos, bacilos e espirilos (SALVATIERRA, 2014).

Também são classificadas como gram-positivas e gram-negativas, essa classificação tem origem no sistema de cor desenvolvida por Hans Cristiam Gram (1884) (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2015). As gram-positivas emite uma coloração azul, vista no microscópio, isso ocorre devido sua parede mais espessa de peptidoglicano que retém o corante. Enquanto, as gram-negativas não retém o corante azul, pois sua parede celular é formada por lipopolissacarídeos, apresentando uma coloração do vermelho a rosa. As bactérias gram-negativas possuem uma parede externa que a deixa menos susceptível a antibióticos (PANAWALA, 2017).

Como exemplo de bactérias patogênicas gram-negativas tem a *Vibrio cholerae* causadora da cólera, *Treponema pallidum* (sífilis), etc. Alguns exemplos de gram-positivas responsáveis por causar patologias são *Streptococcus pneumoniae* (pneumonia), *Clostridium botulinum* é responsável por causar intoxicação alimentar letal, *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose), dentre outras (BLACK; BLACK, 2021).

As doenças causadas por bactérias são combatidas com o uso de antibióticos, o desenvolvimento dessa classe de medicamentos é indispensável e a pesquisa por novos compostos está em constante crescimento. As indústrias farmacêuticas investem no desenvolvimento de novos princípios ativos devido a resistência bacteriana, causada pela facilidade de mutação das bactérias (ROY et al., 2008; SINGH et al., 2018).

Os compostos antibacterianos podem ser classificados como substâncias que destroem ou diminuem o crescimento de bactérias sem apresentar toxicidade para os tecidos próximos. São categorizados como bactericidas aqueles agentes que matam as bactérias ou bacteriostáticos que retardam o crescimento bacteriano (SINGH et al., 2018).

Pensando em desenvolver novos princípios ativos diversas classes de substâncias foram estudadas como compostos fenólicos, polifenóis, alcaloides, esteroides, ácidos graxos, dentre outras. Fitoquímicos muitas vezes extraídos de plantas como *Ageratum conyzoides* L. (mentrasto), *Gossypium hirsutum* (algodão), *Phyllanthus tenellus* (quebra pedra), e *Polygonum hydropiperoides* (erva de bicho), *Allium sativum* Lineu (alho) que possuem potencial antimicrobiano (MIRANDA et al., 2013; ROY et al., 2008; SILVA, ALEXSANDRA PRUDÊNCIO DA et al., 2012).

Os nanomateriais tem chamado a atenção para o seu uso devido a melhorias na eficiência das drogas, causado por alterações nas suas propriedades físico-químicas e medicinais (GAIKWAD et al., 2019; URNUKHSAIKHAN et al., 2021).

As benzo[c]acridinonas foram estudadas para uma série de bactérias como *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, dentre outras (NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009). Sendo de amplo interesse o estudo da atividade antibacteriana dos complexos de inclusão formados entre essa molécula e a ciclodextrina, para avaliar possíveis melhorias na sua atividade bactericida.

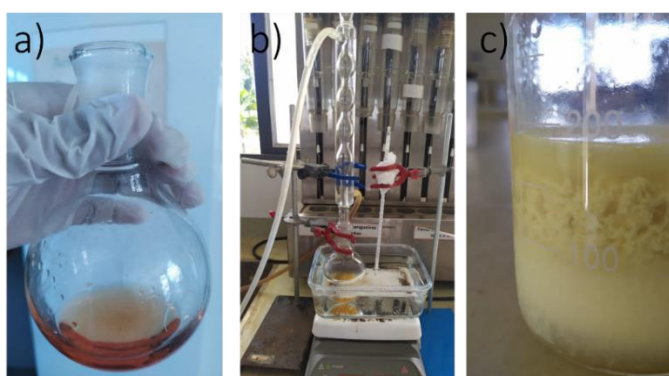
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Tetrahidrobenzo[c]acridinonas

#### 4.1.1. Síntese das Tetrahidrobenzo[c]acridinonas

Para a síntese dos derivados benzo[c]acridinonas foi usada a metodologia descrita por ZHANG et al., 2010. Foi adicionado em um balão de fundo redondo 1 mmol de  $\alpha$ -naftilamina, 1mmol de benzaldeído e 1 mmol de 5,5-dimetilciclo-hexano-1,3-diona (1° síntese) ou ciclohexan-1,3-diona (2° síntese) (Figura 20a). Essa solução foi mantida em refluxo a 80 °C, por 2 horas (Figura 20b). Após o termino da reação, o produto foi vertido sobre água gelada (Figura 20c) e, posteriormente, filtrado e recristalizado com etanol a quente.

Figura 20- Síntese das benzo[c]acridinonas a) mistura dos reagentes b) refluxo e c) produto bruto na água gelada



Fonte: Do autor

As benzo[c]acridinonas foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de ultravioleta-visível (UV/vis). Os equipamentos e condições que foram utilizados são:

#### 4.1.2. Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Para a caracterização dos compostos sintetizados foi utilizada a técnica de RMN unidimensional de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Para o preparo da amostra, o material sintetizado foi solubilizado em 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (Ultrashield Plus®) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (Triple Resonance Cryoprobe Inverse) de 5 mm, com bobinas de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77 K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA® (Automatic OTuning e Matching). O processamento para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi feito aplicando-se uma transformada de Fourier com 65.536 pontos (SI). A fase (apk) e a linha de base (abs) foram corrigidas automaticamente. Os espectros de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  necessários serão realizados com a sequência de pulso zgpg30, sem girar a amostra e numa temperatura de 25 °C. Os parâmetros de aquisição padrão são: número de pontos do domínio de tempo (TD) 32.768; janela espectral (SW) 240,0 ppm; tempo de aquisição (AQ) 0,68 s; número de promediações (ns) 1024; duração do pulso de 30° (13C) 4,95  $\mu\text{s}$ ; frequência central do pulso (O1P) 100,0 ppm; tempo de relaxação (d1) 0,2 s; programa de desacoplamento (CPDPRG) waltz16; duração do pulso de 90° para desacoplamento 90  $\mu\text{s}$ . Na sequência, os dados foram processados utilizando uma rotina que o fabricante denomina c13cryo. Esta rotina contempla a realização da transformada de Fourier, que é realizada com 32.768 pontos (SI), e as correções automáticas de fase (apk) e de linha de base (abs). Além dessas correções rotineiras o processamento ainda elimina ruídos eletrônicos típicos da criosonda, uma vez que a bobina transmissora e receptora de sinal é sensível a aplicações de pulsos de mais alta potência, como é o caso dos pulsos no carbono-13.

#### 4.1.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um aparelho Digilab Excalibur, série FTS 3000 com faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e 32 scans. Para a análise foram utilizadas pastilhas de KBr. Foram pesadas 2,0 mg da amostra que foi diluída em 200,0 mg de KBr. A mistura foi homogeneizada e seca. Esse ensaio foi executado na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ), localizada no Departamento de Química/UFLA.

## 4.2. Seleção da CD usando a cinética de inclusão

A metodologia utilizada foi descrita por (PINTO et al., 2021). O estudo da cinética de inclusão foi realizado com o objetivo de averiguar qual ciclodextrina acomoda melhor a molécula de benzo[c]acridinona e para investigar o tempo necessário para correr a complexação. As ciclodextrinas utilizadas foram:  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, Me-CD, HP-CD e SBE-CD. As ciclodextrinas e as benzo[c]acridinona foram pesadas em proporções equimolares de 1:1 em água ultrapura, adicionadas em frasco reacional e utilizou-se como solvente água ultrapura. As soluções foram mantidas em agitação a 25 °C. Também foi utilizado um controle com a molécula hóspede pura nas mesmas condições. Após a homogeneização e em momentos específicos (iniciando a cada 5 minutos e aumentando até a estabilização), foram retiradas alíquotas e medidas por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda máximo da molécula até que o equilíbrio fosse atingido. As absorvâncias foram normalizadas em relação à absorvância inicial, e as curvas que foram obtidas foram analisadas usando uma regressão linear dos dados: absorvância vs tempo,  $\ln$  absorvância vs tempo e  $1/\text{absorvância}$  vs tempo (zero-, primeira e segunda ordem, respectivamente) para determinar a constante cinética do processo. O experimento foi realizado em triplicata.

## 4.3. Avaliação do processo de inclusão

### 4.3.1. Isotermas de solubilidade

Os ensaios de isotermas de solubilidade e determinação da constante de associação foram realizados para analisar a afinidade da molécula hóspede pela cavidade da ciclodextrinas. Para esse ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Higuchi e Connors (1965). Foram preparadas soluções contendo excesso das moléculas de benzo[c]acridinonas (5 mM) e foi adicionada a  $\beta$ -CD (escolhida a partir dos resultados da cinética de inclusão) nas concentrações (0, 3, 6, 9, 12 e 15 mM). O solvente empregado para o preparo dessa solução foi a água ultrapura. Essa solução foi mantida em agitação a uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C, por um período de 48 horas (BCA1-Derivado 1) e 24 horas (BCA2- Derivado-2). Foi retirada uma alíquota que foi centrifugada a 13000 rpm, por 30 minutos. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma seringa e filtrado usando membranas Millex de 0,22  $\mu\text{m}$ . A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (*Biochrom Libra S12*) em 260 nm. A constante de associação ( $K_a$ ) foi calculada a partir da Equação 1.

Equação 1: Equação para o cálculo da constante de associação

$$K_a = \frac{\textit{inclinação}}{S_0 (1 - \textit{inclinação})}$$

onde  $S_0$  é a solubilidade intrínseca da molécula hóspede.

Além disso, foi determinada a eficiência de complexação utilizando a Equação 2.

Equação 2: Eficiência de complexação

$$EC = \frac{\textit{Inclinação}}{1 - \textit{Inclinação}}$$

### 4.3.2. Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ , ROESY e DOSY

A ressonância magnética nuclear de próton (RMN de  $^1\text{H}$ ) foi usada para investigar as interações entre molécula/ciclodextrina em solução aquosa. As benzo[c]acridinonas foram solubilizadas em DMSO- $d_6$ , a CD em água deuterada e o complexo de inclusão em uma solução 1:1 de DMSO- $d_6$ /  $\text{D}_2\text{O}$ . Os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foram registrados na temperatura de 20 °C, utilizando o espectrômetro descrito no item 4.1.2. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em partes por milhão (ppm) relativo ao pico do solvente residual para observar alterações depois da complexação. Também foram realizadas análises bidimensionais ROESY e DOSY.

Para os espectros bidimensionais, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (SIF2) e 512 em F1 (SIF1), utilizando a função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos.

## 4.4. Complexo de inclusão

### 4.4.1. Preparo do complexo de inclusão

Os complexos de inclusão no estado sólido foram preparados empregando a  $\beta$ -CD e utilizando a metodologia descrita por (DE CARVALHO; PINTO, 2012) com modificações. Para isso, as benzo[c]acridinonas foram solubilizadas em acetona e foi adicionada  $\beta$ -CD solubilizada em água ultrapura, foi colocado o mínimo de solvente para solubilizar as moléculas hóspede/hospedeira. O experimento foi realizado usando quantidades equimolares de molécula/CD (1:1). Esse sistema foi mantido em agitação constante, pelo tempo e temperaturas descritos na metodologia 1 e 2. Posteriormente a solução obtida foi rotoevaporada e suspensa em água ultrapura, congelada e liofilizada (Labconco Freezone 4.5). Os complexos obtidos foram armazenados na geladeira para posterior uso.

**Metodologia 1:** O tempo reacional foi de 24 horas e temperatura ambiente. Os complexos obtidos são descritos como CI1a (complexo entre  $\beta$ -CD e BCA1) e CI2a (complexo entre  $\beta$ -CD e BCA1). Proporção acetona/água (8:2).

**Metodologia 2:** O sistema foi mantido em agitação constante por 28/48 horas (dependendo do tempo de cinética da molécula) em temperatura de 55 °C. Foi obtido o CI1b (complexo entre  $\beta$ -CD e BCA1) e CI2b (complexo entre  $\beta$ -CD e BCA1). Proporção acetona/água (2:8).

Além disso, foi preparada também uma mistura física para cada composto, foram pesadas quantidades equimolares (1:1) de benzo[c]acridinona e  $\beta$ -CD, foram maceradas em almofariz e pistilo por trinta minutos obtendo as misturas físicas que foram armazenadas em eppendorfs na geladeira sendo eles: MF1 e MF2.

#### **4.4.2. Caracterização dos complexos de inclusão**

##### **4.4.2.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A análise de DSC foi realizada no CAPQ para verificar o aparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos. Para a obtenção das curvas de calorimetria, foram realizadas leituras em um equipamento DSC 60 Shimadzu. As amostras a serem analisadas, foram pesadas (5 mg das amostras, com precisão) em painéis de amostra DSC, e aquecidas a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup>, em um intervalo de 30 a 300 °C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>.

##### **4.4.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho**

Para obter os espectros de infravermelho foi utilizado um aparelho Digilab Excalibur, série FTS 3000 com faixa espectral de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> e resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e 32 scans. Para a análise foram utilizadas pastilhas de KBr, pesadas 2,0 mg da amostra e diluídas em 200,0 mg de KBr. Esse ensaio foi executado na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ), localizada no Departamento de Química/UFLA.

#### **4.5. Ensaio de dissolução *in vitro***

Foram pesadas 0,0060 g da molécula de benzo[c]acridinona (BCA2 e BCA1) e a massa correspondente para que em cada complexo de inclusão tenha 0,0060 g da molécula. Foram adicionados 10 mL de água e essa mistura foi mantida em agitação a 37 °C. Foram retiradas alíquotas de 2 mL, diluído em 10 mL de água, foram filtradas usando filtro de membrana de 0,45  $\mu$ m e foram realizadas leituras em espectrofotômetro de UV/vis em 260 nm. A cada 2 mL removidos foram adicionados a mesma quantidade de água ultrapura.



## 4.6. Atividade biológica

### 4.6.1. Atividade Fosfolipase A2

A inibição da enzima fosfolipase A2 foi avaliada em meio sólido segundo a metodologia descrita por Gutiérrez et al (1988) com modificações. Foram preparadas placas de Petri contendo um gel a base de ágar 1% e PBS 1:3 v/v (pH 7,4). Essa solução foi aquecida até ficar translúcida, resfriada a 75 °C e foi adicionado o cloreto de cálcio. A solução foi novamente resfriada até 60 °C e foi colocada a gema de ovo e 0,1 g de azida de sódio. Quando o gel atingiu a temperatura de 45-50 °C, foi vertido sobre as placas de petri. Após a gelatinização foram cortados orifícios de 0,4 cm. Para induzir a clivagem dos fosfolipídios foi utilizada a peçonha de *Bothrops moojeni*. Os compostos e os complexos de inclusão foram incubados previamente com 30 µg de peçonha em diferentes proporções peçonha:tratamento (1:0,05; 1:0,1; 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:2,5) por 30 minutos a temperatura de 37 °C. Após, foi adicionado, em triplicata, as soluções incubadas nos orifícios das placas de petri. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em câmara de cultura de células. As atividades fosfolipásicas foram avaliadas pela medida (mm) do halo translúcido formado ao redor dos orifícios nos géis onde as amostras foram adicionadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade enzimática considerando-se a média dos controles contendo somente peçonha como 100% de atividade. O experimento foi realizado em triplicata

### 4.6.2. Atividade proteolítica sobre a caseína

O ensaio da atividade proteolítica foi realizado para estudar o efeito das moléculas puras e complexos de inclusão sobre a coagulação sanguínea. O ensaio da atividade proteolítica utilizando substrato de caseína foi realizado de acordo com a metodologia descrita por (Gutiérrez et al. (1988) e por Wang, Shih e Huang (2004)). Foi preparada uma solução de caseína na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>, em tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0), essa solução ficou em agitação por 24 horas. Em seguida foi preparado o gel, usando agar, azida sódica e a solução de caseína. Foi usado a peçonha de *B. moojeni* (10 µg) e os tratamentos (moléculas sintetizadas e complexos de inclusão) nas proporções peçonhas:tratamento (1:0,05; 1:0,1; 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:2,5), a solução contendo peçonha e tratamento foram incubados por 30 minutos a 37 °C. Os tratamentos foram aplicados aos orifícios feitos no gel, em um volume final de 30 µL, utilizou-se como controle as amostras sem a peçonha de cobra, o solvente e a peçonha. As placas de petri foram incubadas por 20 horas à 37 °C. Posteriormente o gel foi submetido à coloração com solução de amido black a 1%, seguido por descoloração utilizando ácido acético a 10%. Para análise foram medidos os halos

translúcidos e os resultados foram expressos em porcentagem, onde os controles contendo apenas peçonha foram considerados como 100% de atividade proteolítica. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.6.3. Atividade antibacteriana**

A análise de atividade antibacteriana foi realizada de acordo a metodologia descrita por NADARAJ; SELVI; MOHAN (2009) com modificações, pelo método de disco-difusão. Foram utilizadas as amostras nas concentrações de 2000 e 1000 µg/mL em DMSO, onde os discos de 5 mm, foram dispostos nas placas contendo como meio agar nutritivo inoculado com as bactérias, posteriormente foi pipetado 5 µL dos tratamentos em cada disco. O solvente usado para preparar as soluções como controle negativo. As placas foram mantidas a 25 °C por 24 h e a atividade antibacteriana foi avaliada medindo a zona de inibição. O experimento foi realizado em triplicata. O experimento foi realizado utilizando o *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

#### **4.6.4. Análise estatística dos ensaios biológicos**

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão de três replicatas. Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey com 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) por meio do software GraphPad Prism (versão 8.02).

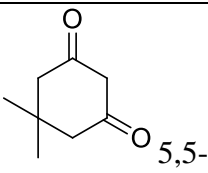
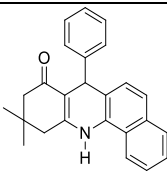
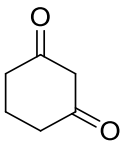
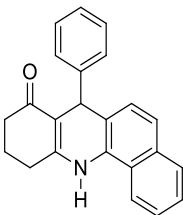
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Tetraidrobenzo[c]acridinonas

#### 5.1.1. Síntese das Tetraidrobenzo[c]acridinonas

Foram sintetizados dois compostos através de uma RMC. A reação partiu de três reagentes, sendo os componentes comuns entre eles o benzaldeído e a  $\alpha$ -naftilamina. O composto 7,10,11,12-tetrahidro-10,10-dimetil-7-phenilbenzo[c] acridin-8(9H)-one (**BCA1**) foi obtido a partir do dimetilciclo-hexano-1,3-diona (dimedona) (Tabela 1 -1<sup>o</sup>síntese). Para o segundo composto, 7,10,11,12-Tetrahidro-7-phenilbenzo[c]acridin-8(9H)-one (**BCA2**), foi utilizada para a síntese a ciclohexan-1,3-diona (Tabela 1-2<sup>o</sup>síntese).

Tabela 1- Reagentes utilizados para a síntese das benzo[c]acridinonas e produtos das sínteses.

Síntese	Produto
1 <sup>o</sup>  5,5-dimetilciclohexano-1,3-diona	 7,10,11,12-Tetrahidro-10,10-dimetil-7-fenilbenzo[c] acridin-8(9H)-ona ( <b>BCA1</b> )
2 <sup>o</sup>  ciclohexan-1,3-diona	 7,10,11,12-Tetrahidro-7-fenilbenzo[c]acridin-8(9H)-ona ( <b>BCA2</b> )

Fonte: Do autor

#### Mecanismo

Para o mecanismo (Figura 21), sugere que primeira reação que ocorre ao misturar todos os reagentes no balão de fundo redondo é a formação do intermediário I; este é obtido devido à reação entre a dimedona (R= CH<sub>3</sub>) ou ciclohexan-1,3-diona (R= H) com o benzaldeído. A síntese que ocorre entre esse tipo de composto é conhecida como condensação de Knoevenagel. Nessa síntese, uma base, como, por exemplo o etanol, pode remover um próton da dimedona ou do ciclohexan-1,3-diona; o próton removido será o que está ligado ao carbono da posição 6, sendo esse o H mais ácido desse composto. Ao remover esse

hidrogênio, forma-se um ânion que pode se estabilizar por ressonância com os dois grupos carbonílicos na estrutura.

O ânion se condensa com o benzaldeído, ligando-se na posição 1' do benzaldeído. Em seguida, o oxigênio, que possui agora uma carga negativa, captura um próton do meio reacional, deixando o intermediário formado neutro. Uma base presente no meio reacional pode remover o outro hidrogênio ácido presente no carbono 6, ao mesmo tempo em que o par de elétrons que antes ligava esse hidrogênio ao carbono, se move em direção aos carbonos 6 e 1', formando a dupla ligação, ao mesmo tempo em que a hidroxila é expulsa. A hidroxila não é um bom grupo abandonador, porém vai sair devido à formação de um composto carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado, o intermediário I, que é um produto muito estável. Agora, a ligação dupla formada pode entrar em ressonância com o anel aromático e com os grupos carbonílicos. Essa etapa é uma reação de eliminação (E1cb) e é favorecida devido ao uso de uma temperatura mais elevada (80°C), ocasionada pelo sistema de refluxo utilizado.

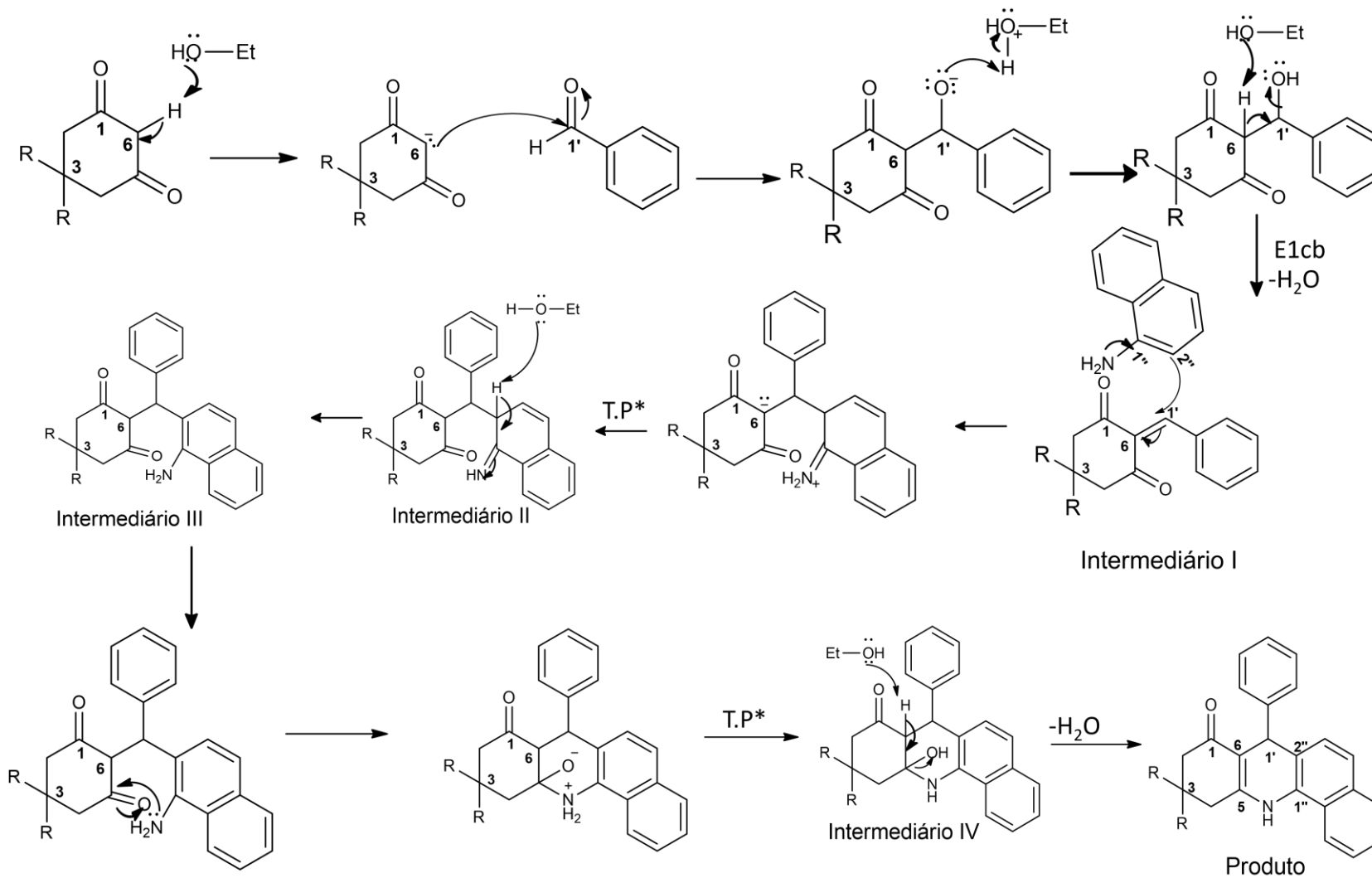
O intermediário I é um aceptor de Michael, um composto contendo uma carbonila e uma ligação dupla, separados por uma ligação simples. O frasco reacional contém a  $\alpha$ -naftilamina, que reage com o intermediário I por meio de uma adição conjugada. Mas o átomo que vai reagir é o carbono 2'' do anel aromático. O átomo de carbono 2'' próximo ao grupo amino, se conecta ao carbono 1' do aceptor de Michael, ao mesmo tempo em que o par de elétrons da ligação C6 e C1' se movimenta na direção do carbono 6. Além disso, o nitrogênio usa o seu par de elétrons livres para estabelecer uma ligação dupla com o átomo de carbono 1', ficando com uma carga positiva. Em seguida, ocorre uma transferência de prótons com o uso de uma base, formando o intermediário II.

O intermediário II pode perder o H ácido (presente no carbono 2'') com o uso de uma base. Os pares de elétrons que antes estabeleciam uma ligação entre o carbono e o hidrogênio, se movimentam em direção aos carbonos 1'' e 2'', formando uma ligação dupla C-C. Essa reação é favorecida, pois reestabelece a aromaticidade do sistema, formando o intermediário III.

O intermediário III sofre uma condensação intramolecular. A reação que ocorre dentro da molécula é favorável, uma vez que não é necessária uma diminuição na entropia. O par de elétrons livres do nitrogênio pode ficar de frente para o carbono carbonílico que possui um foco de carga positiva, ocorre uma atração eletrostática e o nitrogênio se liga ao carbono, ao mesmo tempo em que a ligação dupla é rompida e os pares de elétrons vão em direção ao oxigênio. Em seguida, ocorre uma transferência de prótons, formando o intermediário IV.

Novamente ocorre uma reação de eliminação, pois no intermediário IV ainda contém um hidrogênio muito ácido, o hidrogênio ligado ao carbono 6. Uma base pode usar seus pares de elétrons e remover esse próton e, ao removê-lo, ocorre a formação de uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6, ao mesmo tempo em que ocorre a expulsão da hidroxila, formando o produto um sistema altamente conjugado e estável

Figura 21- Mecanismo reacional para a formação das benzo[c]acridinonas

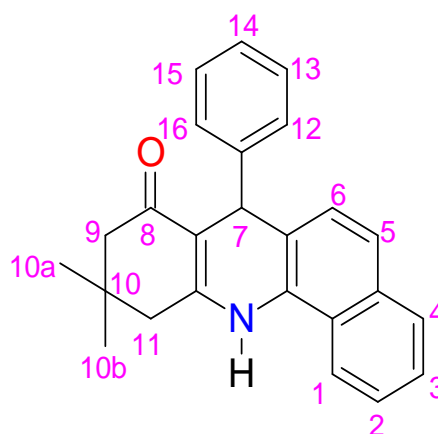


Fonte: Do autor (2023)

### 5.1.2. Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ BCA1

A molécula de BCA1 (Figura 22) contém fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NO}$  e foi analisada em espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  utilizando como solvente o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 23 e Figura 24).

Figura 22- Estrutura do composto orgânico BCA1 - Derivado 1 da benzo[*c*]acridinona com os números em rosa indicando a posição dos átomos de hidrogênio



Fonte: Do autor (2023)

Os sinais observados usando esse solvente na região entre 7,22 e 7,81 observa-se um padrão de picos referentes ao anel fundido, totalizando 6 hidrogênios, esses possuem maior deslocamento químico quando comparado aos hidrogênios monossustituído devido a soma dos efeitos da anisotropia diamagnética de dois anéis aromáticos que desblinda em maior proporção os sinais, uma vez que são somados os efeitos de cada anel.

O deslocamento químico ( $\delta$ ) entre 7,78-7,81 ppm referente a dois hidrogênios. Esse sinal se desdobra em um multipeto, com o sinal referente dos dois hidrogênios sobrepostos. Um dos hidrogênios acopla a três e a quatro ligações com os hidrogênios H-2 e/ou H-3, sendo esse referente ao H-1 (7,78-7,80 ppm). O outro hidrogênio é referente ao H-6 (7,79-7,81 ppm). Os  $\delta_{\text{H-2}}$  e  $\delta_{\text{H-4}}$  apresentam valores 7,45-7,49 ppm e 7,44-7,48 ppm, respectivamente, apresentando como desdobramento multipeto. São mais blindados devido ao efeito mesomérico causado pelo átomo de nitrogênio sobre o sistema aromático, assim como os valores de  $\delta_{\text{H-5}}$  entre 7,22-7,24. Esse sinal é um dubleto com valor de constante de acoplamento de 8,30 Hz, devido a interação com o hidrogênio 5. O  $\delta_{\text{H-3}}$  possui desdobramento de duplo duplo dubleto (ddd), com duas constante de acoplamento  $J=1,35$  Hz e  $J=8,40$  Hz, devido ao acoplamento com os H1 e H2 a três ligações e com o H4 a quatro ligações.

O anel benzênico possui cinco hidrogênios, sendo dois hidrogênios com  $\delta$  entre 7,27-7,29 (duplo duplete) referente aos hidrogênios H-13 e H-15, com constante de acoplamento de 8,3 e 1,75 Hz, devido ao acoplamento a três ligações com os hidrogênios 12/16 e 14 além disso, integra para 2. Os H-12 e H-16 se desdobram em um triplo duplete com  $\delta$  entre 7,15-7,19 e  $J$ : 8,3 e 1,32 Hz. O valor de  $\delta$  entre 7,04-7,08 é referente ao H-14 sendo um triplo tripleto devido ao acoplamento com os hidrogênios H-14/16 a três ligações e com H-13/17 a quatro ligações.

O H-7 possui  $\delta$  de 5,41, valor característico de hidrogênios metílicos (CH). Esse sinal é um singlete, uma vez que não contém hidrogênios próximos para acoplar. Valores de sinais semelhantes foram encontrados para esse próton; NADARAJ e colaboradores (2009), por exemplo, encontraram  $\delta_H$  5,64-5,86 para diversos derivados das benzo[c]acridinonas.

No espectro observa-se, também, dois singletos que integram cada qual para 3. Os valores de  $\delta$  1,05 e 1,13 sugerem que são compatíveis com os hidrogênios metílicos (10a e 10b). Os metilênicos H-9 e H-11 possuem  $\delta$  de 2,26-2,29 (d,  $J = 9,97$  Hz) e 2,52-2,53 (d,  $J$ : 3,15 Hz), respectivamente. Sendo H-9 mais desblindado devido a maior proximidade com o átomo de oxigênio, que por ser mais eletronegativo retira densidade eletrônica desblindando esse próton.

Além da confirmação dos hidrogênios presentes no composto, conforme demonstrado acima, foi verificado o RMN de  $^{13}\text{C}$ , em que foi observado a presença de 25 átomos. Os carbonos saturados (metílicos, metilênicos e metínicos) possuem  $\delta$  entre 27,27 e 50,71, sendo  $\delta_{C-7}$  50,71;  $\delta_{C-9}$  42,34,  $\delta_{C-10}$  40,85,  $\delta_{C-11}$  32,76,  $\delta_{C-12a/b}$  27,37 e 29,45. O carbono 8, carbono de carbonila apresenta  $\delta_C$  de 195,05, pois esse carbono está ligado diretamente a um átomo eletronegativo, o que o deixa muito desblindado; como consequência, seu valor de deslocamento químico é maior. Os carbonos aromáticos possuem  $\delta_C$  entre 109 e 149,8.

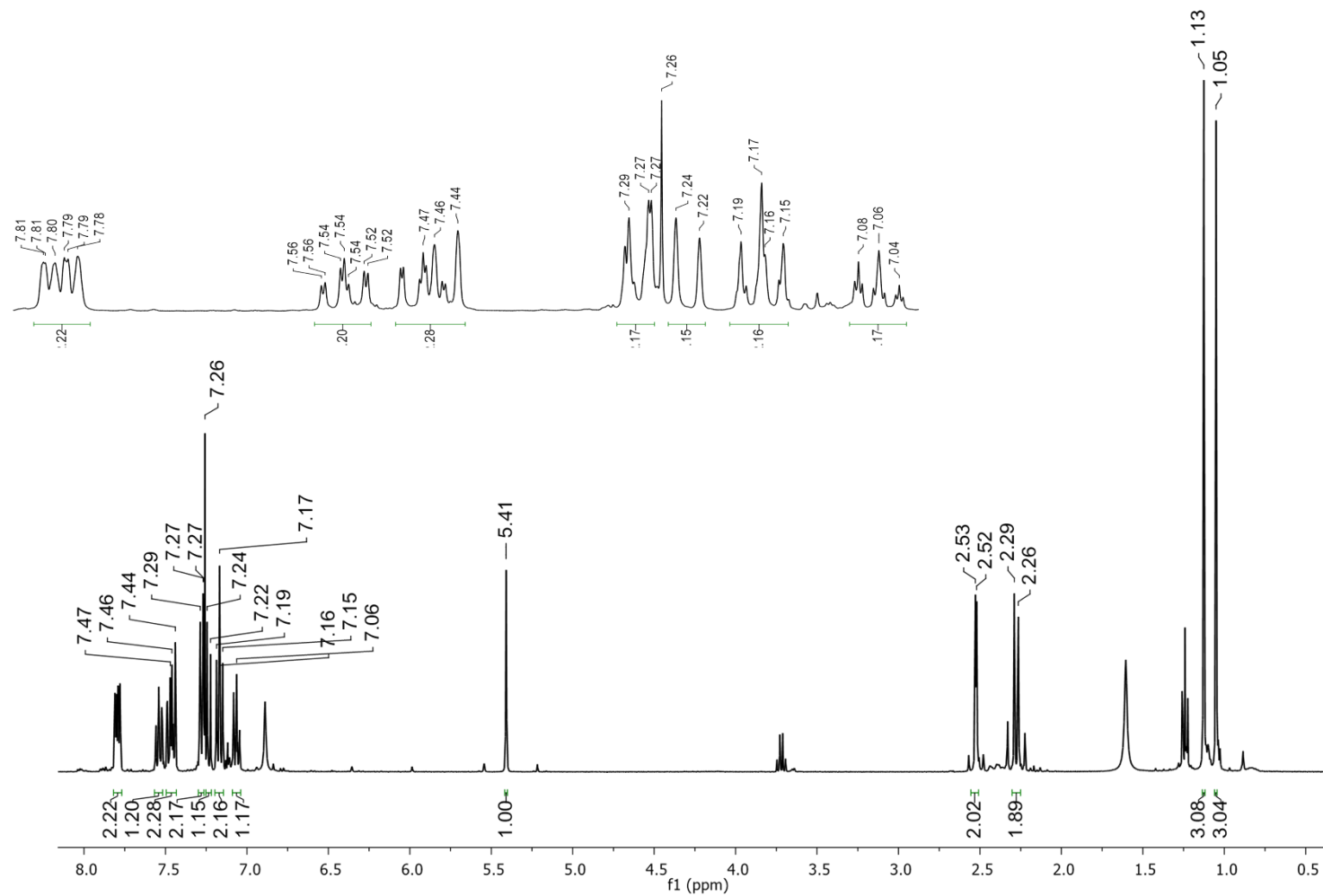


Tabela 2- Deslocamentos químicos ( $\delta$ ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento ( $J$ ) obtidos a partir de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  experimental ( $^1\text{H}$  600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e RMN de e encontrado na literatura ( $^1\text{H}$  300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) para BCA1.

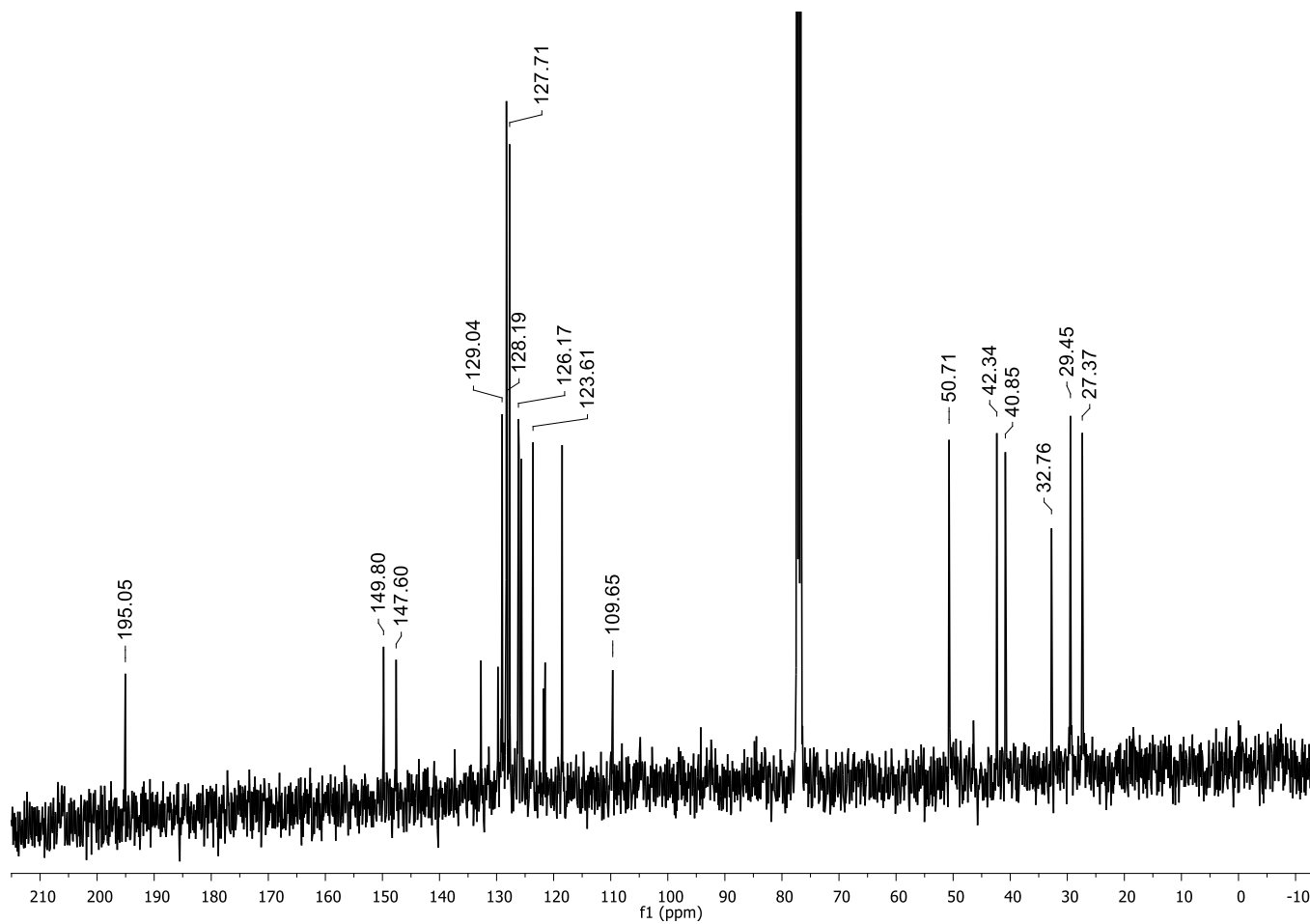
Posição	Experimental $\delta$ $^1\text{H}$ ; multiplicidade; $J$	(ZANG <i>et al.</i> , 2011)
1	7,78-7,80; m (1H)	*
1a	-	-
2	7,45-7,49; m (1H)	*
3	7,52-7,56; ddd; $J$ : 1,35 Hz e $J$ : 8,40 Hz (1H)	*
4	7,44-7,48; m (1H)	*
4a	-	-
5	7,22-7,24; d; $J$ : 8,30 Hz (1H)	*
6	7,79-7,81; m (1H)	*
6a	-	-
6b	-	-
7	5,41, s (1H)	5,87, s (1H)
7a	-	-
8	-	-
9	2,52-2,53; d, $J$ : 3,15 Hz (2H)	2,57-2,78; dd; $J$ : 15 Hz (2H)
10	-	-
10 a e b	1,05 e 1,13; s (6H)	1,01 e 1,06; s (6H)
11	2,26-2,29; d, $J$ = 9,97 Hz	2,03-2,27; dd; $J$ : 12,5 Hz
12a	-	-
12/16	7,15-7,19; dt, $J$ : 8,3 e 1,75 Hz (2H)	*
13/15	7,27-7,29; dd, $J$ : 8,3 e 1,32 Hz (2H)	*
14	7,04-7,08, tt, $J$ : 8,3 e 1,75 Hz (1H)	*
N-H	-	9,22, s (1H)

Fonte: Do autor (2023)

\*Hidrogênios com deslocamentos químicos entre 6,85-8,42 ppm, refere-se aos hidrogênios do anel aromático, não foi explorado no artigo a qual refere-se cada um hidrogênio.

Figura 23- Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  para o BCA1 em  $\text{CDCl}_3$ 

Fonte: Do autor

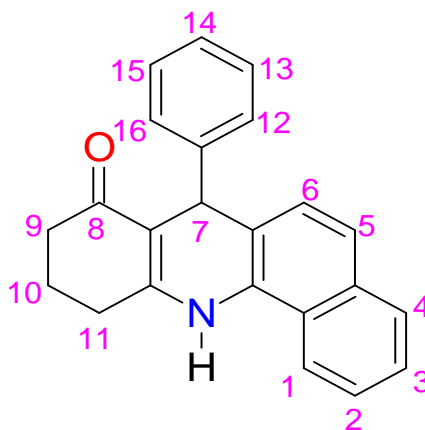
Figura 24- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o BCA1 em  $\text{CDCl}_3$ 

Fonte: Do autor

### 5.1.3. Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ das BCA2

A molécula de BCA2 (Figura 25), que possui fórmula molecular  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ON}$ , teve sua obtenção confirmada através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 26 e Figura 27) em  $\text{CDCl}_3$  e em  $\text{DMSO-d}_6$  e o espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28) em  $\text{DMSO-d}_6$ .

Figura 25- Estrutura do composto orgânico BCA2 - Derivado 2 da benzo[c]acridinona com os números em rosa indicando a posição dos átomos de hidrogênio



Fonte: Do autor (2023)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  é possível verificar um sinal singlete com deslocamento químico referente a hidrogênios metínicos (CH),  $\delta_{\text{H-7}}$  de 5,48 em  $\text{CDCl}_3$ , já em  $\text{DMSO}$  o valor observado foi de 5,26 ppm, sendo um singlete. Na literatura encontraram-se sinais semelhantes, sendo o valor do H-7 de 5,84 ppm em  $\text{DMSO}$  (NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009).

A região dos alifáticos é representada na Figura 24 em  $\text{CDCl}_3$ , que mostra uma ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Nessa região é possível visualizar os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios metilênicos ( $\text{CH}_2$ ). Os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio 9 ( $\delta_{\text{H-9}}$ ) possuem multipletto com  $\delta_{\text{H-9}}$  2,67-2,72 que integra para 2, sendo esse sinal um multipletto. Esse valor maior no deslocamento indica que esses hidrogênios estão mais desblindados e isso ocorre devido à sua proximidade com a carbonila. O multipletto com  $\delta_{\text{H-11}}$  2,42-2,48 (referente a dois hidrogênios) também possui um valor de deslocamento maior e isso se deve à presença do nitrogênio próximo a esses átomos. Assim como o oxigênio, o nitrogênio desprotege os hidrogênios, causando alteração nos valores de deslocamentos. O sinal multipletto entre  $\delta_{\text{H-10}}$  2,04-2,12 também é referente a dois hidrogênios metilênicos. Esse sinal apresenta menor deslocamento químico, pois esses hidrogênios estão mais blindados que os outros hidrogênios. Essa maior blindagem ocorre porque esses átomos estão mais afastados dos átomos eletronegativos.

A região com  $\delta_H$  entre 6,5 e 8,5, corresponde à região dos oleofinicos e região aromática (Figura 25). No espectro é possível observar 11 hidrogênios nessa região e a partir deles é possível notar alguns padrões. Observa-se a presença de um anel benzênico monossustituído, que possui quatro hidrogênios. É importante destacar que esse anel contém uma simetria e isso influencia nos deslocamentos químicos dos hidrogênios. O H-12 está num mesmo ambiente químico que H-16, sendo o  $\delta_{H-12}$  e  $\delta_{H-16}$  entre 7,17-7,22, sendo um duplo tripleto com constante de acoplamento de 7,3 e 1,76 Hz devido à interação com dois tipos de hidrogênios diferentes (H-13 ou H-15 e H-14).

Os sinais H-13 e H-15 também estão no mesmo ambiente químico, indicando que vão apresentar os mesmos valores de deslocamentos químicos; para esses hidrogênios encontraram-se os seguintes valores de  $\delta_{H-13}$  e  $\delta_{H-15}$  entre 7,29-7,31. O seu sinal se desdobra em um multipeto. Observa-se, também, um triplo tripleto com  $\delta_{H-14}$  entre 7,08-7,12 devido a interação a três ligações com H-13 e H-15 e a quatro ligação com H-12 ou H-16 seu desdobramento é um triplo tripleto com constante de acoplamento de 7,30 e 1,76 Hz.

Outro padrão que é possível observar é referente a um anel benzênico dissubstituído, contendo os substituintes em posição orto. Como são substituintes diferentes, observa-se que os deslocamentos químicos para os hidrogênios serão diferentes para cada. Além disso, é possível identificar os hidrogênios H-1 e H-6 como os mais desblindado, isso porque ele está a quatro ligações do átomo de nitrogênio, átomo eletronegativo, o que isso deixa esse hidrogênio mais desprotegido, apresentando valores mais altos de deslocamento químico. Foi observado o desdobramento do sinal desses hidrogênios como multipeto (devido a sobreposição desses dois sinais), sendo o  $\delta_{H-1}$  entre 7,82-7,84 e para  $\delta_{H-6}$  entre 7,84-7,85. Para hidrogênios nessa posição de outros derivados das benzo[c]acridinonas, encontram-se na literatura valores da ordem de  $\delta_{H-1}$  8.38 (KOVAL'SKAYA; KOZLOV; DIKUSAR, 2010).

Os hidrogênios 2 e 4 apresentam deslocamento químico entre 7,47-7,52, seus sinais estão sobrepostos, integrando para 2 hidrogênios e desdobram como um multipeto. O H-3 se desdobra em um duplo, duplo dubleto com valor de deslocamento entre 7,54-7,58 ppm e constante de acoplamento de 1,5 Hz e  $J$ : 8,2 Hz. Já o hidrogênio H-5 é dubleto entre 7,25-7,28 com constante de acoplamento de 8,42 Hz, devido sua interação com o H-6.

Os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio com o DMSO-d6 têm uma ligeira modificação, conforme pode-se observar na Tabela 3.

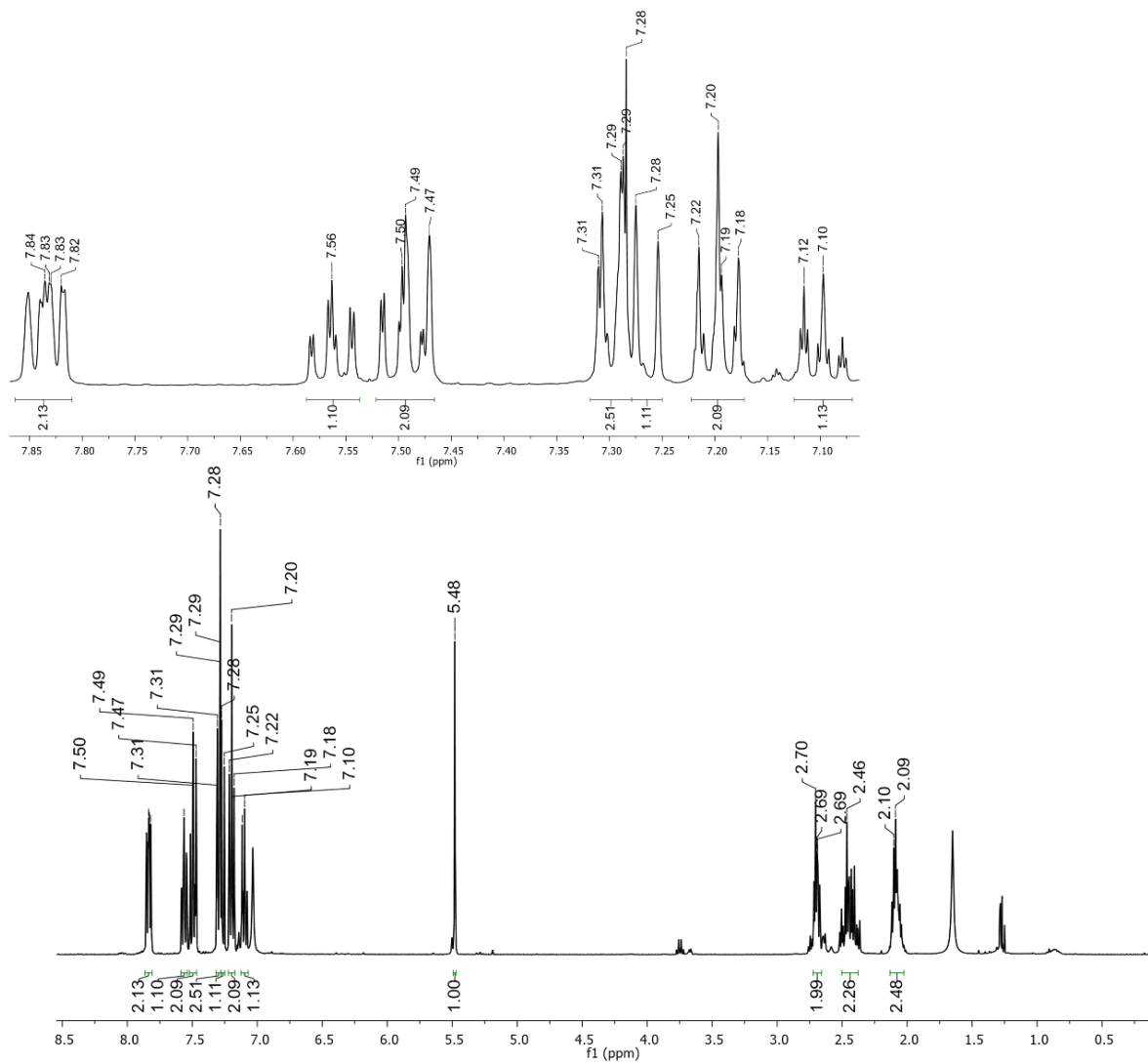
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 28), em DMSO, observam-se carbonos na faixa de 15-55 ppm, que corresponde aos carbonos metilênicos e metínicos. O sinal  $\delta_{\text{C-10}}$  21,53 foi atribuído a esse carbono, pois é o C metilênico mais blindado e isso significa que o seu deslocamento é o menor.  $\delta_{\text{C-11}}$  27,45 é levemente mais desblindado que o H-10 devido ao efeito do nitrogênio sobre esse átomo. Já o  $\delta_{\text{C-9}}$  37,26 é o mais desblindado, pois está ao lado de uma carbonila, que desprotege esse átomo, fazendo com que seu valor de deslocamento químico seja maior. Como o oxigênio é um átomo mais eletronegativo que o nitrogênio ele exerce maior influência, desblindando os átomos próximos. O sinal referente com  $\delta_{\text{C}}$  198,9 é referente à carbonila; os sinais com  $\delta_{\text{C}}$  entre 108-160 referem-se à região dos carbonos aromáticos.

Tabela 3- Deslocamentos químicos ( $\delta$ ), multiplicidade dos sinais e a constante de acoplamento ( $J$ ) obtidos a partir de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  experimental ( $^1\text{H}$  600 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e DMSO- $d_6$ ) e RMN de e encontrado na literatura ( $^1\text{H}$  400 MHz, DMSO- $d_6$ ) para BCA2.

Posição	Experimental ( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ $^1\text{H}$ ; multiplicidade; $J$	Experimental (DMSO- $d_6$ ) $\delta$ $^1\text{H}$ ; multiplicidade; $J$	(NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009)
1	7,82-7,84; m (1H)	7,81-7,83; d; (1H)	*
1a	-	-	-
2	7,48-7,52; m (1H)	7,49-7,51; d; (1H)	*
3	7,54-7,58; ddd; $J$ : 1,5 Hz e $J$ : 8,2 Hz (1H)	7,55-7,60; t; (1H)	*
4	7,47-7,49; m (1H)	7,45-7,47; d; (1H)	*
4a	-	-	-
5	7,25-7,28; d; $J$ : 8,42 Hz (1H)	7,29-7,31; d;(1H)	*
6	7,84-7,85; m (1H)	8,46-8,48; d; (1H)	*
6a	-	-	-
6b	-	-	-
7	5,48, s (1H)	5,26, s (1H)	5,84, s (1H)
7a	-	-	-
8	-	-	-
9	2,67-2,72; m (2H)	2,71-2,97; m (2H)	1,81-2,45, m (6H)
10	2,04-2,12; m (2H)	1,80-2,00; m (2H)	
11	2,42-2,48; m (2H)	2,20-2,29; m (2H)	
12	-	-	-
12/16	7,17-7,22; dt, $J$ : 7,3 e 1,76 Hz (2H)	7,15-7,18; t, e Hz (2H)	*
13/15	7,29-7,31; m (2H)	7,21-7,23; d; (2H)	*
16	7,08-7,12, tt, $J$ : 7,3 e 1,76 Hz (1H)	7,03-7,06, t (1H)	*
N-H	-	-	9,22, s (1H)

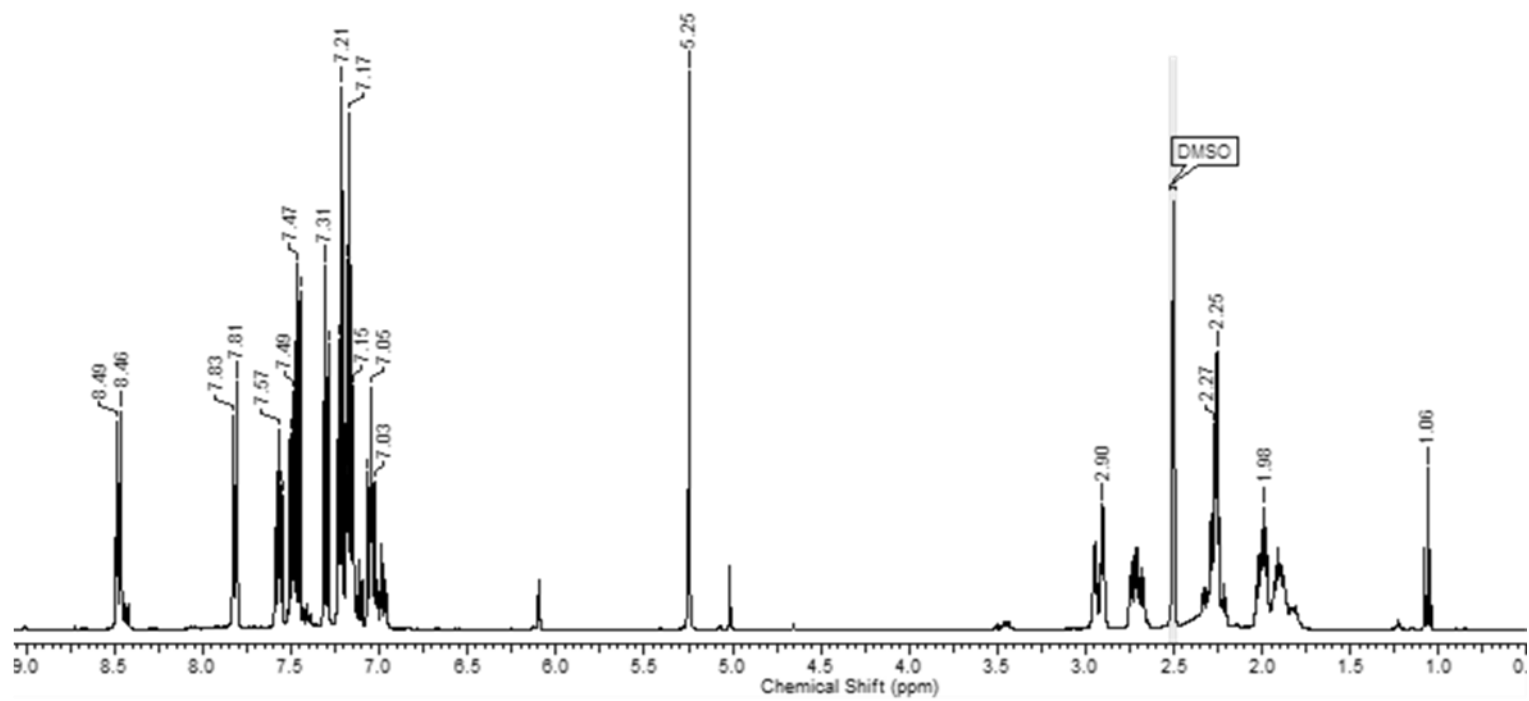
Fonte: Do autor (2023)

\*Hidrogênios com deslocamentos químicos entre 6,92-8,42 ppm, refere-se aos hidrogênios do anel aromático, não foi explorado no artigo a qual refere-se cada um hidrogênio.

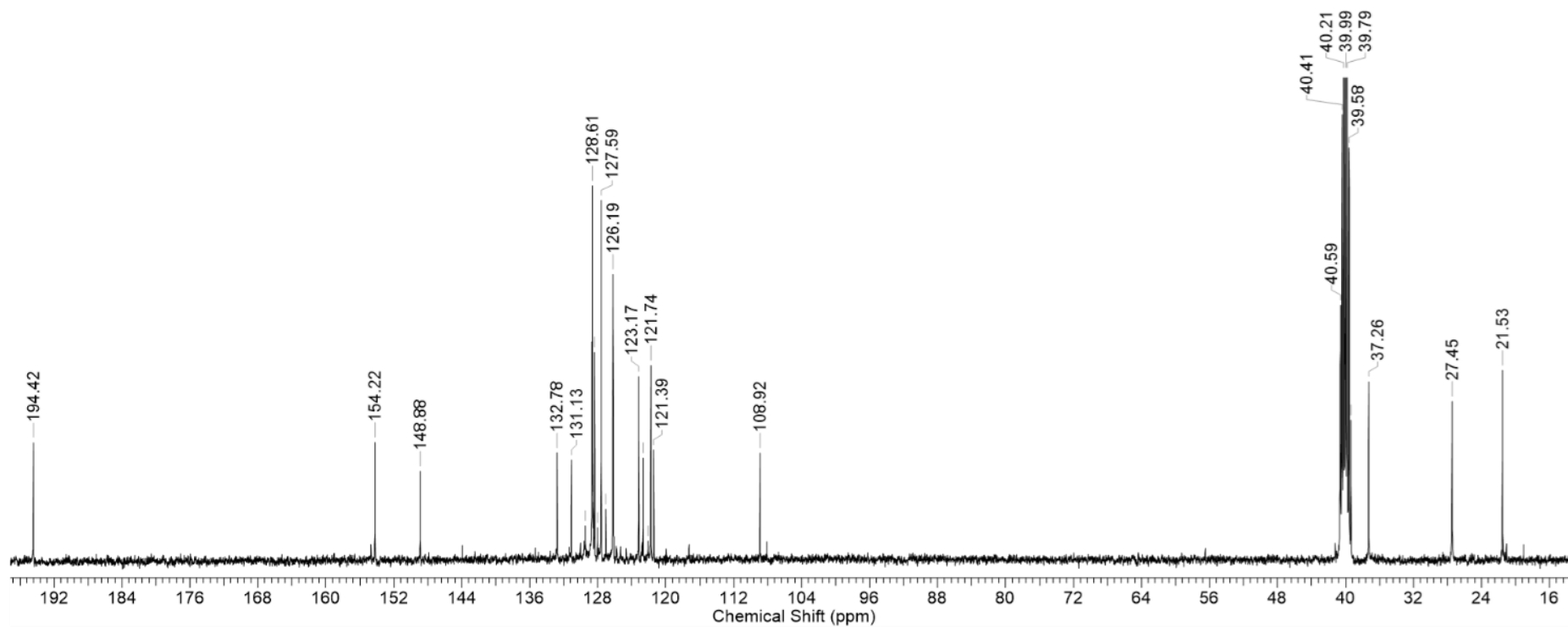
Figura 26- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o BCA2 em  $\text{CDCl}_3$ 

Fonte: Do autor



Figura 27- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o BCA2 em DMSO- $d_6$ 

Fonte: Do autor

Figura 28- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o BCA2 em DMSO-d6

Fonte: Do autor

### 5.1.3. Espectroscopia na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

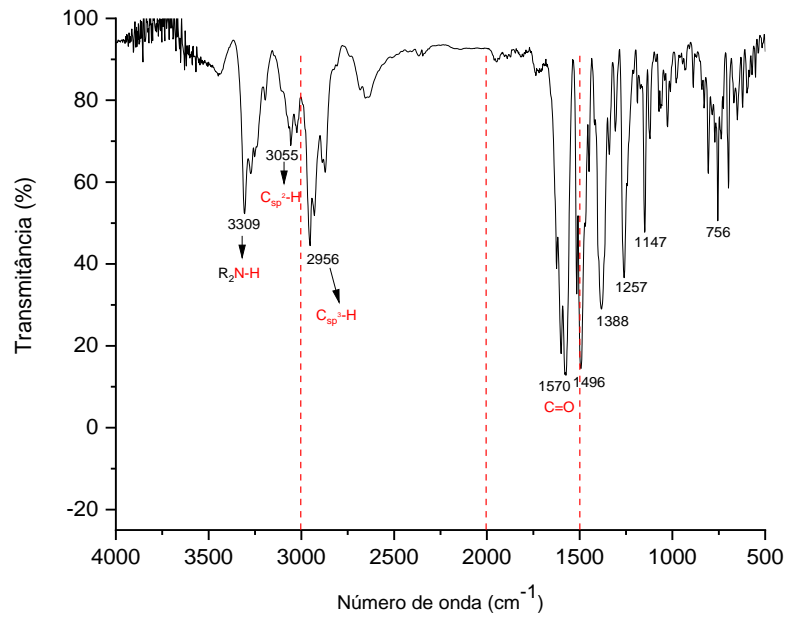
Outra técnica utilizada para comprovar a formação dos dois derivados de tetrahydrobenzo[c]acridinona foi a espectroscopia na região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), sendo possível verificar as funções orgânicas presentes na amostra analisada.

Para o derivado BCA1 (Figura 29) as bandas observadas foram: 3309, 3055, 2956, 1570, 1496, 1388, 1257, 1147 e 756  $\text{cm}^{-1}$ . Dados semelhantes foram encontrados para o BCA1 na literatura, sendo os valores descritos: 3312, 3077, 2888, 1566, 1511, 1433, 1132 e 811  $\text{cm}^{-1}$  (GHASHANG; MANSOOR; ASWIN, 2017). Para a molécula BCA2 (Figura 30) os estiramentos observados foram: 3290, 3053, 2943, 1635, 1583, 1487, 1386, 1265, 1188 e 696  $\text{cm}^{-1}$ . Para o composto BCA2 o relato de caracterização por FTIR contém apenas as bandas em 1590  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) e 3220  $\text{cm}^{-1}$  (NH) (NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009), mas suas bandas não diferem das obtidas para o derivado BCA1.

A região de número de onda entre 4000-3000  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos estiramentos das ligações O-H e N-H. Geralmente a banda formada pela ligação O-H é um pico largo, enquanto a ligação N-H é formada por uma ou duas bandas mais finas e de menor intensidade quando comparadas aos da ligação O-H. Próximo à região de 3000  $\text{cm}^{-1}$  encontram-se os estiramentos das ligações C-H, sendo referente aos carbonos com hibridização  $\text{sp}^3$ ,  $\text{sp}^2$  e  $\text{sp}$ . A região entre 3000-2000  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída às ligações triplas. Em 2000-1500  $\text{cm}^{-1}$  aos estiramentos das ligações duplas; já a região entre 1500-1000  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à impressão digital, sendo específica para cada molécula (PAVIA et al., 2015).

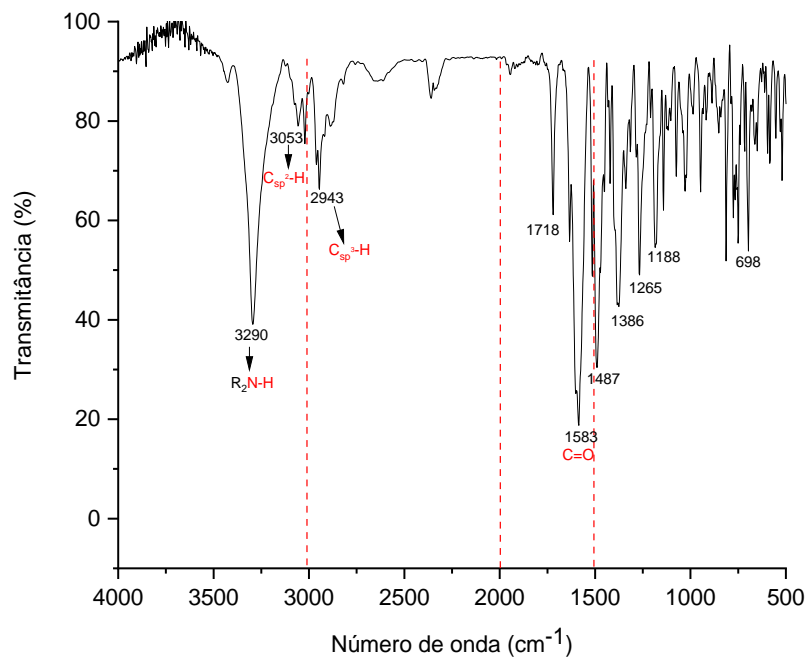
As bandas em 3309/3294  $\text{cm}^{-1}$  são referentes aos estiramentos das ligações N-H de aminas secundárias. Em 3055/3053  $\text{cm}^{-1}$  referem-se às ligações entre os átomos de carbono  $\text{sp}^2$  e átomos de hidrogênio; em 2956/2943  $\text{cm}^{-1}$  são devidos aos estiramentos das ligações carbono  $\text{sp}^3$ -H. A banda em 1570/1583  $\text{cm}^{-1}$  é referente ao estiramento da carbonila de cetona; possivelmente esses picos estão sobrepondo as bandas correspondentes as ligações duplas carbono-carbono, referentes aos anéis aromáticos. Entre 2000-1500  $\text{cm}^{-1}$  foi possível observar as harmônicas de combinação do anel aromático.

Figura 29- Espectro na região do FTIR para BCA1



Fonte: Do autor

Figura 30- Espectro na região do FTIR do BCA2



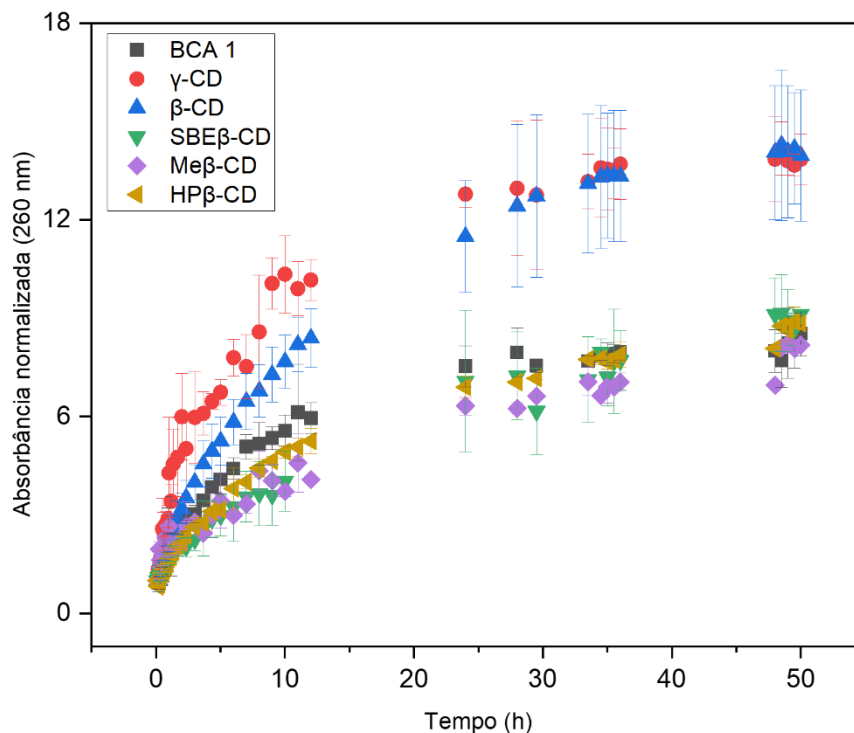
Fonte: Do autor

## 5.2. Seleção da CD usando cinética de inclusão

A seleção da ciclodextrina foi realizada com base nos resultados do ensaio de cinética de inclusão. Foram testadas diferentes ciclodextrinas, com a finalidade de verificar quais delas seriam mais eficientes para formar complexos de inclusão com a molécula.

De acordo com os resultados foi observado que quando a molécula BCA1 foi submetida à agitação com as ciclodextrinas: hidroxipropil (HP), sulfobutileter (SBE) e metil (Me), ambas derivadas da  $\beta$ -CD, na proporção 1:1, não se diferiu estatisticamente da molécula pura. Isso pode indicar que o tamanho da molécula hóspede foi um fator que impediu a formação dos complexos de inclusão, devido aos grupos que substituem as hidróxilas. As CDs mais eficientes para formar complexo de inclusão com a BCA1 foram  $\gamma$ -CD e  $\beta$ -CD, na proporção 1:1 (Figura 31). Um dos fatores que podem justificar esses dados observados é o impedimento estérico nas CDs modificadas, pois, como a molécula é volumosa, possivelmente dificultou o processo de inclusão.

Figura 31- Estudo da cinética de solubilidade para BCA1 utilizando  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, Me-  $\beta$ -CD, SBE-  $\beta$ -CD e HP-  $\beta$ -CD na proporção 1:1.

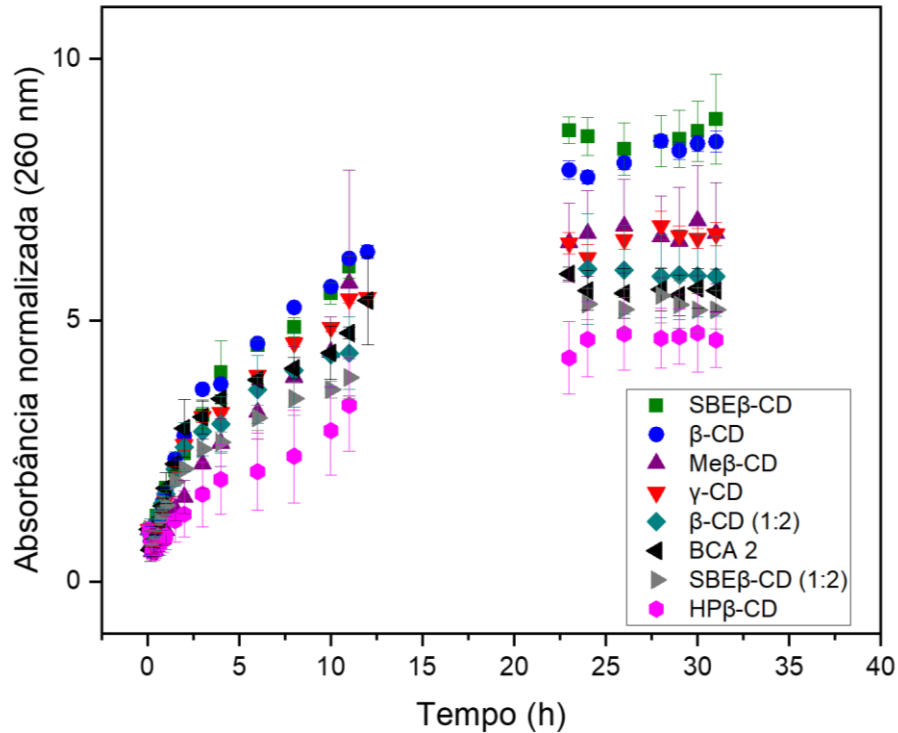


Fonte: Do autor (2023)

Como resultado para o ensaio de cinética de solubilidade do derivado 2, observou-se que os complexos formados por BCA2 e as CDs: HP $\beta$ -CD e Me $\beta$ -CD na proporção 1:1, e  $\beta$ -CD e SBE $\beta$ -CD na proporção equimolar 1:2, não diferiram estatisticamente da molécula pura.

Já  $\gamma$ -CD,  $\beta$ -CD e SBE $\beta$ -CD, na razão molar 1:1, apresentaram melhores resultados, sendo superiores e diferindo estatisticamente do BCA2 (Figura 32).

Figura 32- Estudo da cinética de solubilidade para BCA1 utilizando  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, Me-  $\beta$ -CD, SBE-  $\beta$ -CD e HP-  $\beta$ -CD na proporção 1:1. E SBE-  $\beta$ -CD e  $\beta$ -CD na proporção 1:2.



Fonte: Do autor (2023)

Possivelmente a diferença estrutural dos dois derivados interferiu na complexação, uma vez que foram observadas preferências por CD diferentes. A presença de dois grupos metilas no BCA1 pode ter causado um ligeiro aumento no volume da molécula, o que dificultou a complexação com a SBE $\beta$ -CD. Entretanto, sua ausência no BCA2 fez com que o encapsulamento fosse favorecido.

Posteriormente foi determinada a ordem da reação, sendo construídos os seguintes gráficos: absorbância *versus* tempo (ordem zero),  $\ln$  da absorbância *versus* tempo (primeira ordem) e  $1/\text{absorbância}$  *versus* tempo (segunda ordem) para os valores de absorbância para a molécula complexada (BCA1 e BCA2) com a  $\beta$ -CD (Figura 04). A escolha do melhor ajuste da curva foi baseada no valor de  $R^2$ : quanto mais próximo de 1, maior o ajuste, indicando que possivelmente refere-se a um processo de ordem zero, com  $R^2=0,9823$  (BCA1) e  $R^2=0,9666$  (BCA2), para a razão estequiométrica 1:1. Um processo de ordem zero indica que alterações na concentração de qualquer um dos reagentes (BCA e CDs) não influencia na velocidade de formação do complexo de inclusão.

Com base no gráfico de ordem zero foi possível determinar a constante cinética ( $k$ ); para BCA1 foi de  $0,649 \text{ h}^{-1}$  e para o BCA2 foi  $0,483 \text{ h}^{-1}$ . Na literatura alguns valores são descritos para o complexo de inclusão entre praziquantel com HP- $\beta$ -CD e Me- $\beta$ -CD sendo os valores de  $k$  de  $0,183 \text{ h}^{-1}$  e  $0,147 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente (CHAVES et al, 2010) (RODRIGUES et al, 2011). Já para o complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e a dibenzalocetona o valor de  $k$  obtido foi de  $0,1855 \text{ h}^{-1}$  (Pinto et al, 2020).

A constante cinética descreve a formação dos CI em função do tempo. Possivelmente BCA2 é inserido mais rápido dentro da cavidade da ciclodextrinas, quando comparado ao BCA1, indicado pelo menor valor na constante cinética. Como mencionado, possivelmente devido à ausência dos grupos metil. Em comparação com os complexos mencionados na literatura, tanto BCA1 quanto BCA2 formam complexos de forma mais lenta, provavelmente devido ao volume dessas moléculas.

Devido às vantagens da  $\beta$ -CD, como exemplo, pode formar complexos de inclusão com diversas substâncias pelo tamanho de sua cavidade. Aliadas ao seu baixo custo quando comparada às outras CDs, ela foi escolhida para o ensaio de isoterma de solubilidade e para obtenção dos complexos de inclusão.

### **5.3. Avaliação do processo de inclusão**

#### **5.3.1. Isotermas de solubilidade**

A partir da isoterma de solubilidade foi possível verificar a afinidade da BCA1 (Figura 33-item a) pela cavidade da CD em água. O diagrama de solubilidade mostra que a  $\beta$ -CD promoveu um aumento de 1,5 vezes na solubilidade a concentração de BCA1 na ausência de CD foi  $0,0093 \text{ mmol/L}$  e teve um aumento para  $0,01395 \text{ mmol/L}$  quando adicionou  $15 \text{ mmol/L}$  de  $\beta$ -CD. O que indica a formação de complexos muito solúveis; o limite de solubilidade desse complexo depende da ciclodextrina utilizada.

Para o complexo de inclusão com BCA2 (Figura 33-item b), o diagrama de solubilidade indicou que a  $\beta$ -CD promoveu um aumento de solubilidade de 1,94 vezes, sendo a concentração da molécula pura de  $0,069 \text{ mmol/L}$  aumentou para  $0,14 \text{ mmol/L}$  na concentração mais alta de  $\beta$ -CD. Mesmo a  $\beta$ -CD sendo a CD menos solúvel em água, ela foi capaz de duplicar a solubilidade de BCA1 e BCA2, que são compostos praticamente insolúveis. Além disso, de acordo com a classificação de Higuchi e Connors, ambas as

moléculas apresentaram um perfil do tipo AL, o que sugere a formação de complexos solúveis e o limite depende da ciclodextrina utilizada.

A constante de associação ( $K_a$ ) indica o quão forte é a associação entre a ciclodextrina e BCA1, o valor obtido foi de  $29,7 \text{ M}^{-1}$ . O baixo valor da constante de solubilidade sugere uma fraca interação entre a molécula hóspede e a  $\beta$ -CD. Valor próximo foi descrito na literatura para o complexo de inclusão entre HP $\beta$ -CD e imiquimode com  $K_a$  de  $23,3 \text{ M}^{-1}$  (RAMINENI et al, 2013).

Entre a  $\beta$ -CD e BCA2, o valor obtido foi de  $68,24 \text{ M}^{-1}$ . Esse valor baixo de  $K_a$  pode estar associado a uma pouca interação da molécula com a CD devido ao tamanho da cavidade da molécula, porém mesmo que pequena a interação, foi capaz de duplicar a solubilidade da molécula. Complexos de inclusão com valores de  $K_a$  menores que 100 são considerados instáveis e indica uma pouca melhora na solubilidade do composto, sendo o intervalo ideal entre  $100\text{-}5000 \text{ M}^{-1}$  (BERA et al, 2016) (YIN et al, 2021).

Entretanto, alguns pesquisadores sugerem que o valor de  $K_a$  para aplicações biológicas seria entre  $50\text{-}2000 \text{ M}^{-1}$  (SIERPE et al., 2017) (GUEDES et al., 2020). Ademais, valores semelhantes foram encontrados na literatura para outras moléculas, sendo o  $K_a$  de  $67,90 \text{ M}^{-1}$  para o complexo de inclusão entre o albendazol e a  $\beta$ -CD (GARCIA et al., 2014). O  $K_a$  para o complexo de inclusão entre o omeprazol e  $\beta$ -CD foi de  $57 \text{ M}^{-1}$  (FIGUEIRAS et al, 2007). Para o sistema aceclofenaco/ $\beta$ -CD o valor de  $K_a$  encontrado foi de  $42,0 \text{ M}^{-1}$  (RAO, UDGIRKAR AND MULE, 2010).

Possivelmente a presença dos grupos metilas no BCA1 influencia na associação da molécula com a CD. Como o valor da constante de estabilidade foi menor em BCA1 do que em BCA2, isso indica que a interação intermolecular entre os componentes do complexo é menor em BCA1 e os complexos formados por essa molécula e essa CD formam complexos menos estáveis que o formado com o BCA2.

Estudos descritos na literatura sugerem que em compostos que apresentam baixa solubilidade podem ocorrer erros na determinação da constante de associação. Isso porque a constante é dependente da solubilidade inicial da molécula. Além disso, em soluções aquosas podem existir complexos de inclusão e não inclusão, autoassociação das moléculas com baixa solubilidade, autoagregação dos complexos e formação de micelas (KFOURY; LANDY; FOURMENTIN, 2018; LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2007). A eficiência de



complexação (EC) pode ser calculada pela equação 2, descrita na sessão Materiais e métodos. É independente da solubilidade inicial da molécula, sendo um parâmetro mais preciso nesse caso (KFOURY; LANDY; FOURMENTIN, 2018).

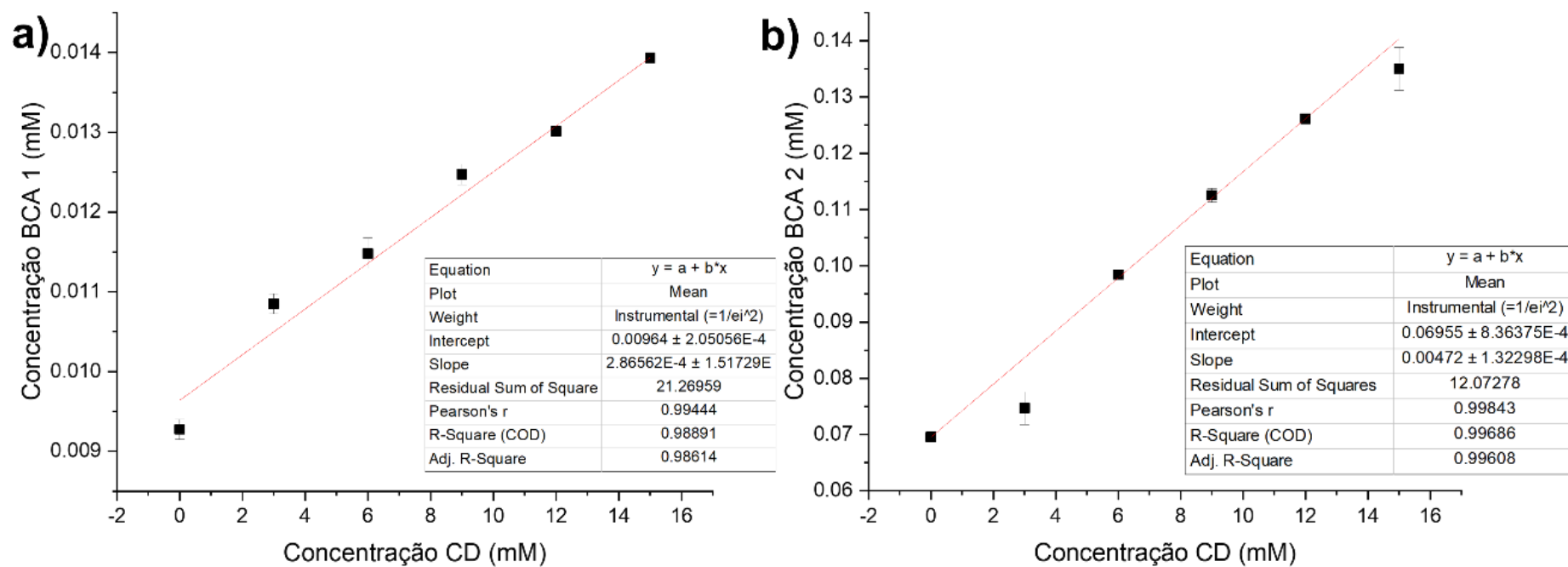
A inclinação da reta refere-se à inclinação obtida a partir do diagrama de solubilidade. Foi verificado para o derivado 1 de benzo[c]acridino, BCA1, uma eficiência de complexação de 0,000286, enquanto para o derivado 2, BCA2, a EC foi de 0,00474, ambos quando submetidos ao processo de inclusão com a  $\beta$ -CD. Outro parâmetro passível de ser calculado é a razão entre molécula hóspede/hospedeira pela equação 3.

Equação 3: Relação molar molécula/ciclodextrina calculada a partir da eficiência de complexação

$$\frac{\text{Molécula}}{\text{CD}} = 1\left(1 + \frac{1}{\text{EC}}\right)$$

Foi observada para o derivado 1 de benzo[c]acridino, BCA1, uma razão molar de 1:3497, ou seja, uma molécula de BCA1 para 3497  $\beta$ -CD, em solução aquosa e temperatura ambiente. Já para o derivado 2, BCA2, a foi de razão de 1:211 (1 molécula de BCA2 para 211 moléculas de  $\beta$ -CD).

De acordo com os resultados apresentados na literatura, o valor de EC pode variar; como exemplo, o complexo formado entre tamoxifen/HP- $\beta$ -CD e cyclosporine A/HP- $\alpha$ -CD obteve uma EC de 0,004 e razão molar de 1:250, enquanto o complexo formado entre omeprazol/HP- $\beta$ -CD apresentou uma eficiência de complexação de 0,002 (1:500). Sugere-se que a baixa eficiência de complexação está relacionada à baixa solubilidade da molécula hóspede (LOFTSSON; HREINSDÓTTIR; MÁSSON, 2007).

Figura 33- Isoterma de solubilidade a) BCA 1 e  $\beta$ -CD e b) BCA2 e  $\beta$ -CD

Fonte: Do autor (2023)

### 5.3.2 Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ , ROESY e DOSY

#### Ressonância magnética nuclear $^1\text{H}$ (RMN de $^1\text{H}$ )

Para verificar a formação do complexo de inclusão a partir do RMN de  $^1\text{H}$  foram analisadas alterações nos deslocamentos químicos ( $\delta$ ). Essas variações são causadas pela mudança no meio físico e químico devido à formação do complexo (ZHU; ZHU; XIAO, 2019). Na análise dos espectros são realizadas comparações entre os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos complexos de inclusão (CI) com os valores de  $\delta$  das moléculas hóspede/hospedeira livres.

As moléculas BCA1 e BCA2 foram caracterizadas de forma detalhada no item 5.1.1. As pequenas alterações nos valores de deslocamento são devidas à utilização de um solvente diferente. Os valores de  $\delta$  podem ser observados nas Tabela 4 e Tabela 6 (BCA1) e Tabela 5 e Tabela 7 (BCA2) e os espectros na Figura 36 (item b (BCA1)), Figura 35 e Figura 37 (BAC2). Sendo H referente aos hidrogênios das moléculas e  $\text{H}_{\text{CD}}$  referente aos hidrogênios das ciclodextrinas.

A  $\beta$ -CD possui 6 sinais referentes aos hidrogênios ligados a carbono de sua estrutura, sendo eles:  $\text{H}_{\text{CD-1}}$  (4,83-4,84 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-2}}$  (3,31 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-3}}$  (3,66-3,67 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-4}}$  (3,31-3,33 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-5}}$  (3,62-3,64 ppm) e  $\text{H}_{\text{CD-6}}$  (3,55-3,58 ppm). Contém também os picos referentes às hidroxilas  $\text{H}_{\text{CD-OH2}}$  (5,75-5,77 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-OH3}}$  (5,68-5,70 ppm) e  $\text{H}_{\text{CD-OH6}}$  (4,45-4,50 ppm) (Tabela 4 a Tabela 7 e Figura 37, item a). Para confirmar a atribuição dos sinais, estes foram comparados com os valores mencionados na literatura PINTO et al. (2021) descreveram resultados similares para o descrito nesse trabalho.

O  $\text{H}_{\text{CD-1}}$  na posição 4,83-4,84 ppm confirma que a ciclodextrina é composta por glicose em sua forma beta. Uma vez que nessa posição, o hidrogênio 1, está mais blindado devido a interação orbitalar entre os pares de elétrons livres do oxigênio e o orbital antiligante da ligação C-H.

Na metodologia 1, ao analisar os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 4) para o CIIa na Figura 34-item c, foi possível verificar que ocorre pouca variação nos valores de deslocamento químico; todos apresentaram uma variação de 0,01 ppm, sendo os hidrogênios que tiveram modificações o  $\text{H}_{\text{CD-6}}$  (3,56-3,59 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-OH2}}$  (5,72-5,74 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-OH3}}$  (5,68 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-OH6}}$  (4,44-4,47 ppm),  $\text{H}_{\text{CD-2}}$  (3,30 ppm),  $\text{H}_{11}$  (2,20-2,27 ppm),  $\text{H}_{12/16}$  (7,17-7,18

ppm), H<sub>13/15</sub> (7,22-7,24 ppm) e R<sub>2</sub>NH (9,25 ppm). Também foi observado uma variação de 0,02 ppm para H<sub>CD-4</sub> (3,31 ppm) e H<sub>1</sub> (7,81-7,83 ppm).

Para o CI2a (Figura 35-item c e Tabela 5) observou-se pequena diferença nos deslocamentos químicos para os hidrogênios H<sub>CD-6</sub> (3,56-3,59 ppm), H<sub>CD-OH2</sub> (5,72-5,74 ppm), H<sub>CD-OH3</sub> (5,68 ppm), H<sub>CD-OH6</sub> (4,44-4,47 ppm), H<sub>6</sub> (8,47-8,49 ppm), H<sub>11</sub> (2,68-2,72 ppm), H<sub>14</sub> (7,04-7,07 ppm). Uma variação de 0,02 ppm para os hidrogênios H<sub>12/16</sub> (7,16-7,19 ppm) e H<sub>10</sub> (1,92 ppm). Os hidrogênios H<sub>CD-4</sub> (3,31 ppm) e H<sub>9</sub> (2,91-2,95 ppm) teve uma variação nos seus deslocamentos de 0,03 e 0,06, respectivamente.

A variação nos deslocamentos obtidos para os complexos de inclusão obtidos pelas moléculas 1 e 2 com a β-CD sugere que a interação entre a molécula e a CD é fraca. Indicando que possivelmente a formação de complexos instáveis sendo o processo de inclusão principalmente na parte externa para o CI1a e CI2a. Uma vez que não observa nenhuma alteração nos hidrogênios H<sub>CD-5</sub> e H<sub>CD-3</sub>, sendo um indicativo da formação de complexos de não inclusão.

Na metodologia 2, para o CI1b, observou-se alterações pouco expressivas em seus deslocamentos químicos ( $I\Delta\delta I \leq 0,01$ ) H<sub>CD-1</sub> (4,83-4,84 ppm), H<sub>CD-5</sub> (3,62-3,64 ppm) e R<sub>2</sub>NH (9,26 ppm). Também foi observado uma variação de 0,02 ppm para H<sub>CD-4</sub> (3,31 ppm), H<sub>CD-6</sub> (3,56-3,59 ppm) e H<sub>CD-2</sub> (3,28 ppm). Uma variação de 0,03 ppm H<sub>CD-OH2</sub> (5,72-5,74 ppm) e H<sub>2</sub> (7,50-7,51 ppm). E de 0,04 ppm referente aos hidrogênios H<sub>CD-OH6</sub> (4,44-4,47 ppm) e H<sub>CD-3</sub> (3,67-3,70 ppm) (Tabela 6 e Figura 36, item c).

Os hidrogênios H<sub>CD-5</sub> (3,62-3,64), H<sub>CD-3</sub> (3,66-3,69 ppm), H<sub>CD-6</sub> (3,56-3,58 ppm), H<sub>CD-OH6</sub> (4,47-4,50 ppm), H<sub>7</sub> (5,24 ppm), H<sub>12/16</sub> (7,15-7,19 ppm), H<sub>13/15</sub> (7,21-7,23 ppm), H<sub>14</sub> (7,04-7,05 ppm) e H-NR<sub>2</sub> (9,33 ppm) presentes no complexo CI2β apresentaram alterações nos deslocamentos químicos menores ou iguais a ( $\Delta\delta \leq$ ) 0,01 ppm. Nesse complexo os hidrogênios mais relevantes foram H<sub>1</sub> (7,79-7,84 ppm)  $\Delta\delta$  de 0,02 ppm, H<sub>CD-OH2</sub> (5,72-5,77 ppm) e H<sub>11</sub> (7,79-7,84 ppm)  $\Delta\delta$  de 0,03 ppm. O H<sub>10</sub> (1,84-1,99 ppm)  $\Delta\delta$  de 0,04 e H<sub>9</sub> (2,91-2,95 ppm)  $\Delta\delta$  de 0,06 ppm. (Tabela 7 e Figura 37). Os hidrogênios não mencionados não tiveram nenhuma alteração em seus valores de deslocamentos.

A partir dos dados de RMN de <sup>1</sup>H pode-se concluir que ocorre a formação de complexos de inclusão para as duas moléculas na metodologia 2, uma vez que são observadas

alterações nos hidrogênios 3 e 5 da ciclodextrina, esses hidrogênios estão voltados para sua cavidade e variação nos valores de deslocamento são indicativos da formação dos complexos.

Além disso, para o CI1b observou-se que o valor de deslocamento de  $H_{CD-3}$  (3,67-3,70 ppm) foi 0,04 ppm, enquanto para  $H_{CD-5}$  (3,62-3,64 ppm) foi de 0,01 ppm, isso é um indicativo que possivelmente a molécula interage principalmente pela borda larga da CD. As alterações nos valores de deslocamentos das hidroxilas ( $H_{CD-OH2}$  e  $H_{CD-OH6}$ ) e com  $H_{CD-6}$  sugere que em paralelo aos complexos de inclusão, também ocorre a formação dos complexos de não inclusão.

Para o CI2b as alterações observadas para  $H_{CD-5}$  e  $H_{CD-3}$  foram iguais, não sendo possível determinar a borda em que ocorre preferencialmente o processo de inclusão.

Os sinais observados são de baixa frequência, sugerindo a formação de complexos fracos. Resultados similares são observados nas isotermas de solubilidade, demonstrado pela baixa constante de associação. Além disso, para os complexos de inclusão com a molécula 1 molécula e 2 nas duas metodologias, as informações de RMN de  $^1H$  não foram suficientes para fornecer informações sobre a parte da molécula que foi inserida no interior da CD e qual a parte da molécula são responsáveis pela formação de complexos de não inclusão.

Resultados semelhantes foram encontrados para o complexo de inclusão entre heptakis-(2,3-diacetil-6-sulfo) - $\beta$ -ciclodextrina e R-tedizolida, com a formação de complexo de inclusão fraco. Para determinar a posição das moléculas de BCA1 e BCA2 dentro da cavidade das CDs, foram realizados ensaios de RMN bidimensional ROESY.

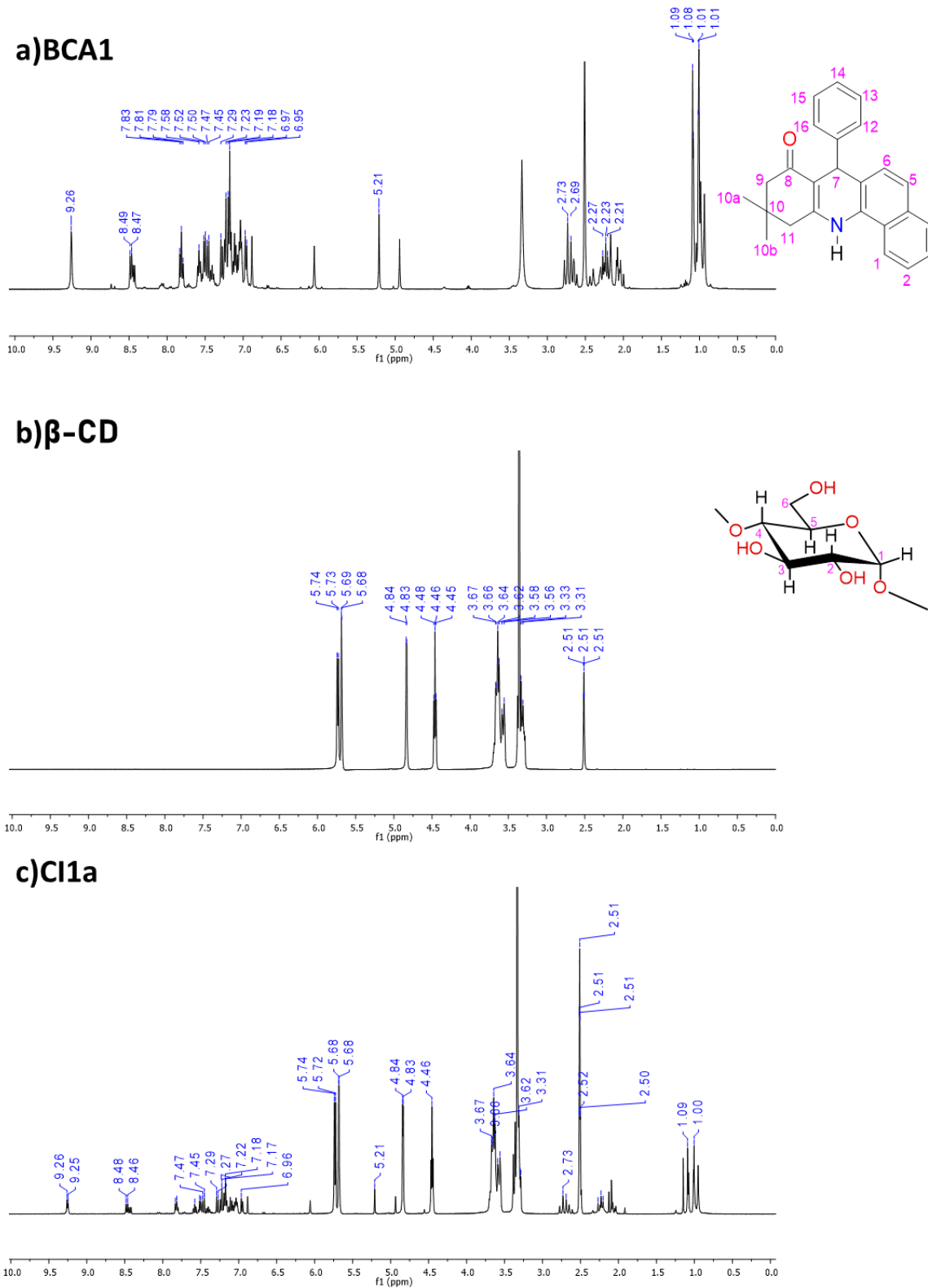
Nos espectros de RMN de  $^1H$  da molécula e do complexo de inclusão, foi notado o aparecimento de picos que não eram previstos, sugerindo que possivelmente a amostra contém contaminantes. Entretanto, foi realizada a análise de ROESY para verificar se a molécula de benzo[c]acridinona estava interagindo com a CD.

Tabela 4- Valores de deslocamentos químicos para a  $\beta$ -CD, BCA1 e CIIa e variação de  $\delta$  entre complexo e moléculas livres para metodologia 1 (24 h e T. ambiente).

Hidrogênios	$\beta$ -CD (ppm)	BCA1 (ppm)	CIIa (ppm)	$\Delta \delta$
H <sub>CD</sub> -1	4,83-4,84		4,83-4,84	0
H <sub>CD</sub> -2	3,31		3,30	-0,01
H <sub>CD</sub> -3	3,66-3,67		3,66-3,67	0
H <sub>CD</sub> -4	3,33		3,31	0,02
H <sub>CD</sub> -5	3,62-3,64		3,62-3,64	0
H <sub>CD</sub> -6	3,56-3,58		3,56-3,59	-0,01
OH2	5,73-5,74		5,72-5,74	0,01
OH3	5,68-5,69		5,68	0,01
OH6	4,44-4,48		4,44-4,47	0,01
H1		7,79-7,83	7,81-7,83	-0,02
H2		7,50-7,52	7,50-7,51	0,01
H3		7,56-7,60	7,56-7,60	0
H4		7,27-7,29	7,27-7,29	0
H5		7,45-7,47	7,45-7,47	0
H6		8,47-8,49	8,46-8,48	0,01
H7		5,21	5,21	0
H9		2,69-2,73	2,69-2,73	0
H10a e b		1,01 e 1,09	1,01 e 1,09	0
H11		2,21-2,27	2,20-2,27	0,01
H12/H16		7,16-7,19	7,17-7,18	0,01
H13/H15		7,23-7,24	7,22-7,24	0,01
H14		7,02-7,05	7,02-7,05	0
NH <sub>2</sub>		9,26	9,25	0,01

Fonte: Do autor (2023)

Figura 34- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz)  $\beta$ -CD (em  $\text{D}_2\text{O}$ ), Cl1a (em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ ) e BCA1 (em  $\text{DMSO-d}_6$ ) para metodologia 1 (24 h e T. ambiente).



Fonte: Do autor (2023)

Tabela 5- Valores de deslocamentos químicos para  $\beta$ -CD, BCA2, CI2a e variação de  $\delta$  entre complexo e moléculas livres para metodologia 1 (24 h, T. ambiente)

Hidrogênios	$\beta$ -CD (ppm)	BCA2 (ppm)	CI2a (ppm)	$\Delta\delta$
H <sub>CD</sub> -1	4,83-4,84		4,83-4,84	0
H <sub>CD</sub> -2	3,31		3,31	0
H <sub>CD</sub> -3	3,66-3,67		3,66-3,67	0
H <sub>CD</sub> -4	3,33		3,36	-0,03
H <sub>CD</sub> -5	3,62-3,64		3,62-3,64	0
H <sub>CD</sub> -6	3,56-3,58		3,56-3,59	-0,01
OH2	5,73-5,74		5,72-5,74	-0,01
OH3	5,68-5,69		5,68	0,01
OH6	4,44-4,48		4,44-4,47	-0,01
H1		7,82-7,84	7,82-7,84	0
H2		7,49-7,52	7,49-7,52	0
H3		7,56-7,60	7,56-7,60	0
H4		7,30-7,32	7,30-7,32	0
H5		7,46-7,48	7,46-7,48	0
H6		8,47-8,48	8,47-8,49	-0,01
H7		5,25	5,25	0
H9		2,91-3,01	2,91-2,95	0,06
H10		1,90	1,92	-0,02
H11		2,69-2,72	2,68-2,72	0,01
H12/H16		7,14-7,19	7,16-7,19	-0,02
H13/H15		7,22-7,24	7,22-7,24	0
H14		7,03-7,06	7,04-7,07	-0,01
RN-H		9,32	9,32	0

Fonte: Do autor (2023)



Figura 35- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz)  $\beta$ -CD (em  $\text{D}_2\text{O}$ ), CI2a (em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ ) e BCA2 (em  $\text{DMSO-d}_6$ ) para metodologia 1 (4 h, T. ambiente)

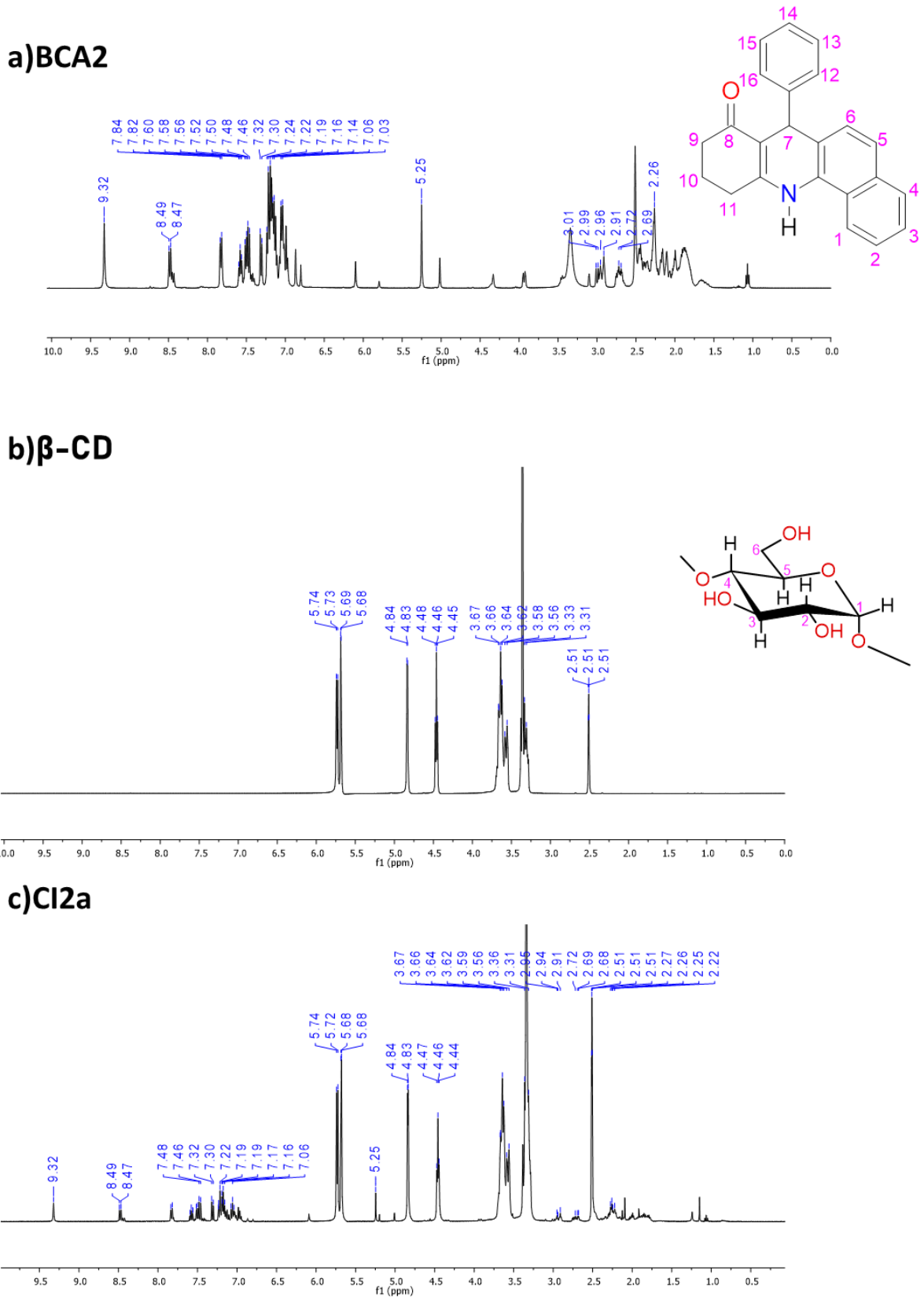
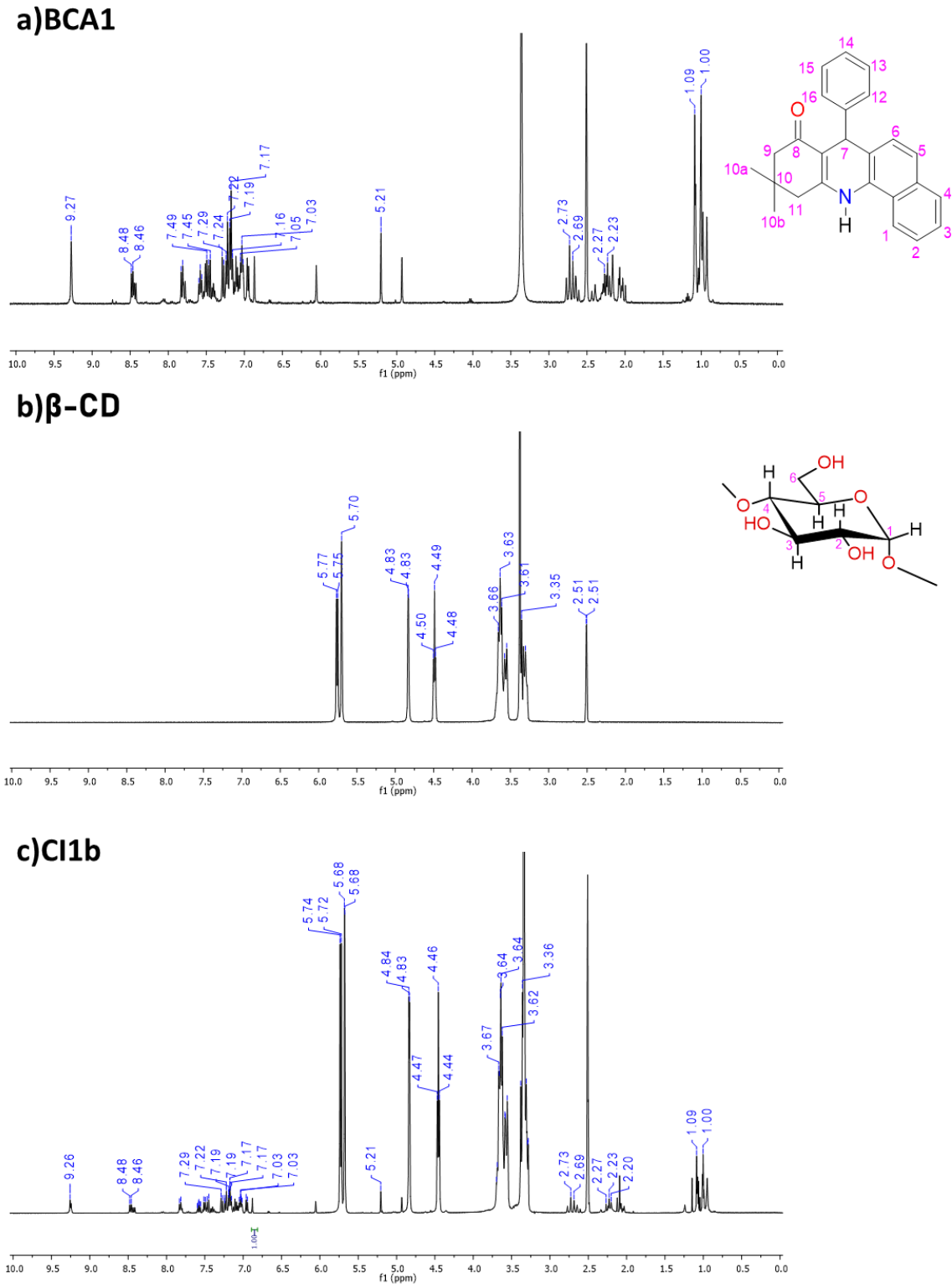


Tabela 6- Valores de deslocamentos químicos para a  $\beta$ -CD, BCA1 e CI1b e variação de  $\delta$  entre complexo e moléculas livres para metodologia 2 (48 h, 55 °C)

Hidrogênio	$\beta$ -CD (ppm)	BCA1 (ppm)	CI1b (ppm)	$\Delta \delta$
H <sub>CD</sub> -1	4,83		4,83-4,84	-0,01
H <sub>CD</sub> -2	3,31		3,28	0,02
H <sub>CD</sub> -3	3,65-3,66		3,67-3,70	-0,04
H <sub>CD</sub> -4	3,33		3,31	0,02
H <sub>CD</sub> -5	3,61-3,63		3,62-3,64	-0,01
H <sub>CD</sub> -6	3,55-3,57		3,56-3,59	-0,02
OH2	5,75-5,77		5,72-5,74	0,03
OH3	5,70		5,68	0,02
OH6	4,48-4,50		4,44-4,47	0,04
H1		7,81-7,83	7,81-7,83	0
H2		7,47-7,49	7,50-7,51	-0,03
H3		7,56-7,60	7,56-7,60	0
H4		7,27-7,29	7,27-7,29	0
H5		7,45-7,47	7,45-7,47	0
H6		8,46-8,48	8,46-8,48	0
H7		5,21	5,21	0
H9		2,69-2,73	2,69-2,73	0
H10a e b		1,00 e 1,09	1,00 e 1,09	0
H11		2,23-2,27	2,23-2,27	0
H12/H16		7,16-7,19	7,15-7,19	0
H13/H15		7,22-7,24	7,22-7,24	0
H14		7,02-7,05	7,02-7,05	0
RN-H		9,27	9,26	0,01

Fonte: Do autor (2023)

Figura 36- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz)  $\beta$ -CD (em  $\text{D}_2\text{O}$ ), CI1 $\beta$  (em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ ) e BCA1 (em  $\text{DMSO-d}_6$ ) para metodologia 2 (48 h, 55  $^\circ\text{C}$ )



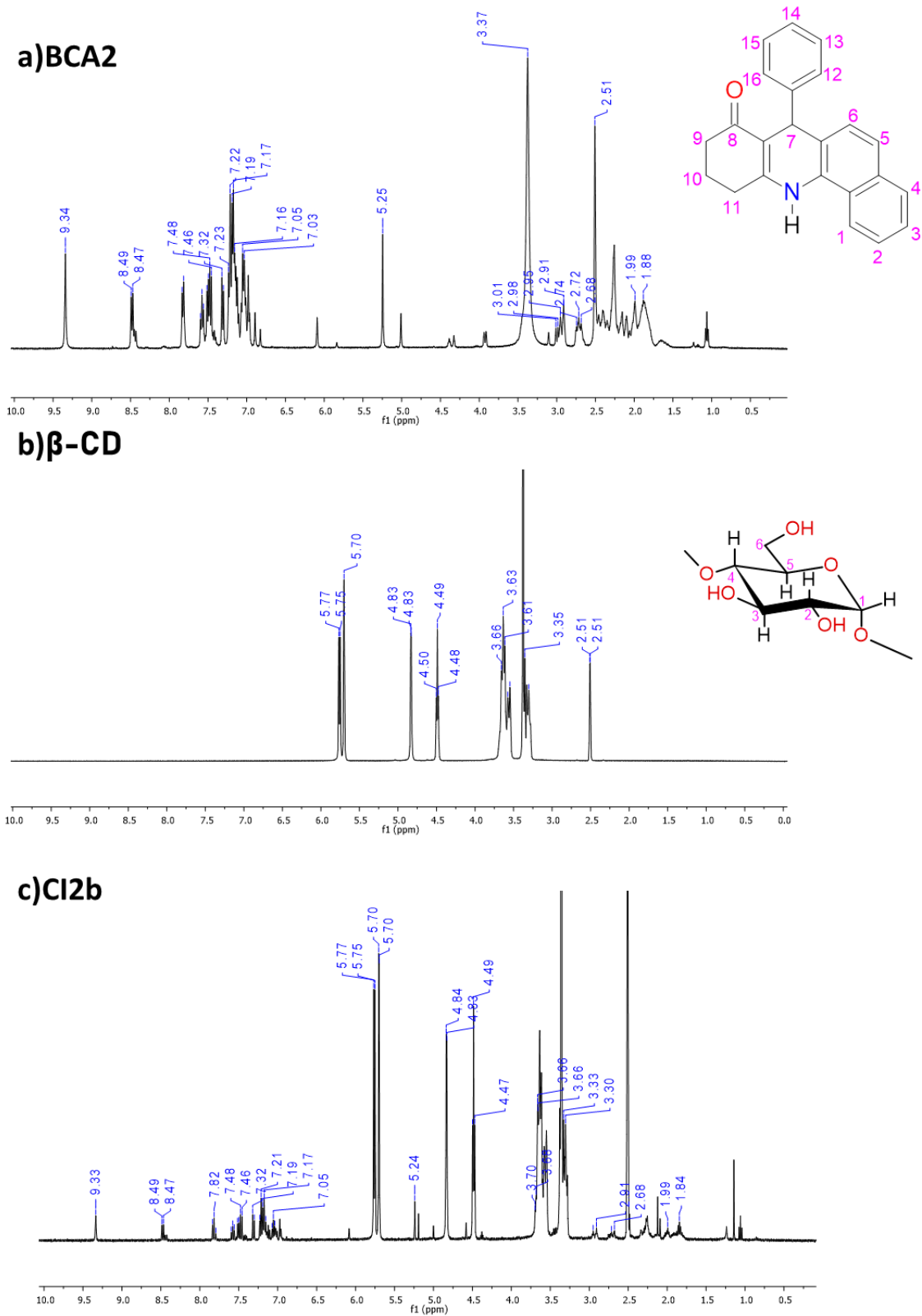
Fonte: Do autor (2023)

Tabela 7- Valores de deslocamentos químicos para a  $\beta$ -CD, BCA2 e CI2 $\beta$  e variação de  $\delta$  entre complexo e moléculas livres para metodologia 2 (28 h, 55 °C)

Hidrogênios	$\beta$ -CD (ppm)	BCA2(ppm)	CI2b (ppm)	$\Delta \delta$
H <sub>CD</sub> -1	4,83		4,83-4,84	0
H <sub>CD</sub> -2	3,30		3,30	0
H <sub>CD</sub> -3	3,65-3,69		3,66-3,69	0,01
H <sub>CD</sub> -4	3,33		3,33	0
H <sub>CD</sub> -5	3,61-3,63		3,62-3,64	-0,01
H <sub>CD</sub> -6	3,55-3,57		3,56-3,58	0,01
OH2	5,75		5,72-5,77	0,03
OH3	5,70		5,70	0
OH6	4,48-4,50		4,47-4,50	0,01
H1		7,81-7,83	7,79-7,84	0,02
H2		7,46-7,51	7,46-7,51	0
H3		7,56-7,60	7,56-7,60	0
H4		7,30-7,32	7,30-7,32	0
H5		7,46-7,51	7,46-7,51	0
H6		8,47-8,49	8,47-8,49	0
H7		5,25	5,24	0,01
H9		2,91-3,01	2,91-2,95	0,06
H10a e b		1,88-1,99	1,84-1,99	0,04
H11		2,68-2,74	2,68-2,71	0,03
H12/H16		7,16-7,19	7,15-7,19	0,01
H13/H15		7,22-7,23	7,21-7,23	0,01
H14		7,03-7,05	7,04-7,05	0,01
H-NR <sub>2</sub>		9,34	9,33	0,01

Fonte: Do autor (2023)

Figura 37- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz)  $\beta$ -CD (em  $\text{D}_2\text{O}$ ), CI2 $\beta$  (em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ ) e BCA2 (em  $\text{DMSO-d}_6$ ) para metodologia 2 (48 h, 55  $^\circ\text{C}$ )



### **Espectroscopia de efeito Overhauser nuclear de estrutura rotativa - ROESY**

Para confirmar a formação do CI e identificar como as interações ocorrem entre a molécula hóspede e a CD, foi utilizada a técnica de RMN bidimensional com o experimento de ROESY 2D, que correlaciona os hidrogênios próximos (até 4,5 angstroms), espacialmente.

Para os complexos de inclusão obtidos entre BCA1 ou BCA2 com a  $\beta$ -CD, pela metodologia 1, CI1a e CI2a (Figura 40 e Figura 41), foram analisados os espectros de ROESY 2D. Não foram observadas correlações entre a molécula e a ciclodextrina. As correlações observadas foram entre hidrogênios que estão espacialmente próximos na estrutura da molécula, como entre 7,23 (H12 ou H16) e 7,31 (H6) com 5,21 (H7), referente à molécula de BCA1 e entre os hidrogênios que correlacionam na estrutura da CD, 5,72 (OH2) e 4,45 (OH6). Isso sugere que possivelmente ocorreu a formação de agregados entre moléculas de ciclodextrinas e que elas estão interagindo uma com a outra por meio de ligação de hidrogênio entre as bordas estreitas e larga, conforme já descrito na literatura (RYZHAKOV et al., 2016).

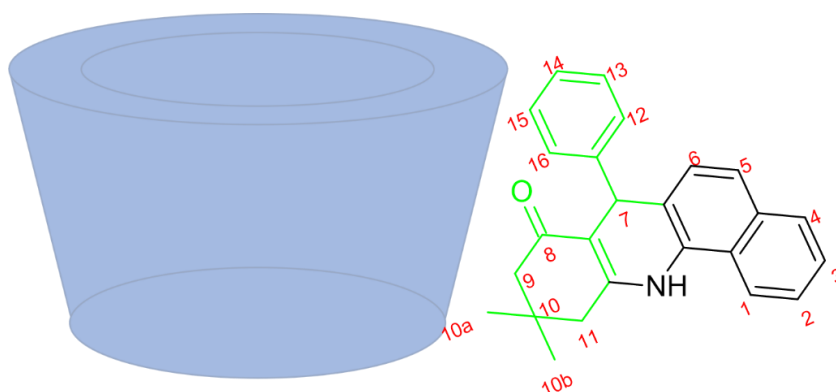
Porém, não se pode descartar a formação de complexos de inclusão por essa metodologia; é provável que tenham sido formados complexos de inclusão instáveis, que duraram poucos milésimos de segundos ao serem adicionados à água. Outro fator que possivelmente afetou a formação dos complexos pode ter sido a utilização de uma maior proporção de acetona. Solventes orgânicos facilitam a solubilização da molécula, porém, em alguns casos, podem dificultar a entrada da molécula no interior da ciclodextrina (CHARUMANEE et al., 2016).

Para os complexos obtidos pela metodologia 2, as seguintes observações foram realizadas: Para CI1b houve correlação entre o  $H_{CD-1}$  (4,84 ppm) e o  $H_{CD-6}$  (3,55 ppm) da  $\beta$ -CD com os hidrogênios H10a ou H10b (1,00 e 1,09 ppm), também com H7 (5,21 ppm) da molécula BCA1; o hidrogênio da hidroxila 2 (5,75 ppm) presente na estrutura da  $\beta$ -CD interage com H7 (5,21 ppm), H14 (7,03 ppm), H12 e/ou H16 (7,22 ppm), H13 e/ou H15 (7,17) e H10a ou H10b (1,00 e 1,09 ppm); já o hidrogênio da hidroxila 3 (5,70 ppm) se correlaciona com H12 e/ou H16 (7,22 ppm) e H10a ou H10b (1,00 e 1,09 ppm), enquanto o hidrogênio da hidroxila 6 (4,49 ppm) com H7 (5,21 ppm), H12 e/ou H16 (7,22 ppm), H13 e/ou H15 (7,17 ppm) e H10a ou H10b (1,00 e 1,09 ppm). Tais correlações são expostas nas Figuras 44 e 45.

Esses dados sugerem que a parte da molécula em verde na estrutura da BCA1, formada pelo anel 5,5-dimetil-2-ciclohexe-1-ona e o fenil, está próxima à CD e possivelmente está relacionada ao processo de formação desse complexo. Os resultados sugerem também que a superfície externa da CD é o que interage com a molécula (Figura 38). Além disso, não foram observadas correlações entre os hidrogênios da molécula com os hidrogênios internos da CD ( $H_{CD-3}$  e  $H_{CD-5}$ ), sendo esse um possível indicativo de que a molécula está formando complexo com a CD, porém, pelo lado externo. Resultados similares foram observados para a obtenção do complexo de inclusão entre a riboflavina e ciclodextrina. Nesse ensaio também não houve correlações com os hidrogênios  $H_{CD-3}$  e  $H_{CD-5}$ , sugerindo-se a formação de um complexo de não inclusão.

Possivelmente o complexo é mantido através de uma ligação de hidrogênio entre a carbonila e uma das hidroxilas externas. Outra interação intermolecular que pode estar acontecendo são as forças de Van der Waals, entre as porções apolares da molécula e a CD.

Figura 38- Estrutura das moléculas hóspede/hospedeira e os hidrogênios presentes e sugestão da forma como ocorre a interação para formar o complexo



Fonte: Do autor (2023)

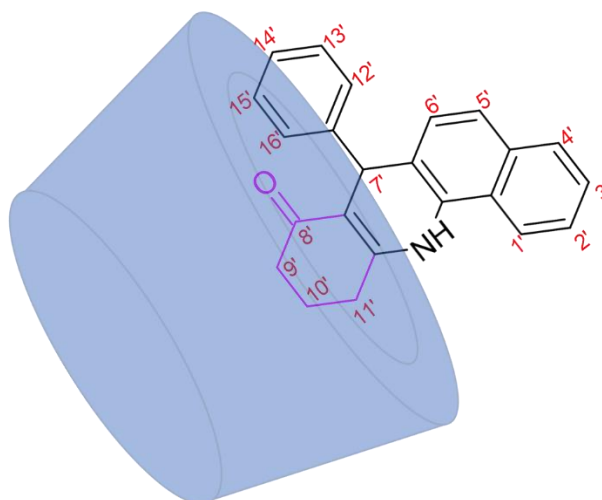
Para o CI2b (Figura 44), complexo formado entre BCA2 e  $\beta$ -CD, foram observadas diversas correlações, dentre elas a estabelecida entre os hidrogênios da molécula: H9 (2,91 ppm), H10 (1,84 ppm) e H11 (2,71 ppm) com o  $H_{CD-3}$  (3,66 ppm). Já os hidrogênios H1 (7,82 ppm), H2 (7,58 ppm), H13/H15 (7,17 ppm) e H6 (7,32 ppm) se correlacionam com a hidroxila 3 (5,70 ppm); os hidrogênios H12 e/ou H16 (7,21 ppm) com a hidroxila 2 (5,75 ppm); e os hidrogênios da CD  $H_{CD-1}$  (4,83 ppm),  $H_{CD-2}$  (3,30 ppm) e  $H_{CD-4}$  (3,35 ppm), com respectivamente, H12/H16 (7,21 ppm), H1 (8,49 ppm) e H6 (7,32 ppm).

Diferente dos outros complexos, foram observadas nesse CI correlações com os hidrogênios  $H_{CD-3}$  da CD, que ficam na cavidade. Isso é um indicativo de que, ao contrário da

BCA1, quando se utiliza a molécula BCA2 uma pequena parte da estrutura dessa molécula interage com a cavidade da CD (Figura 39). Esse resultado, associado ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , sugere que a molécula entra parcialmente na estrutura da CD, sendo sua entrada pela borda larga da estrutura, o que pode ser verificado pela ausência de interação com  $\text{H}_{\text{CD-6}}$  e  $\text{OH}_6$ .

A cavidade interna da CD não possui a capacidade de formar ligações de hidrogênio, isso porque as hidroxilas estão dispostas nas extremidades superior e inferior. Com isso, o complexo formado é mantido por forças de Van der Waals, que têm a capacidade de estabilizar o complexo formado entre  $\beta$ -CD/BCA2. O grupo acila é descrito na literatura presente em diversas moléculas que foram complexadas; é sugerido que esse grupo interage através da força de Van der Waals ao formar complexos de inclusão (POULSON et al, 2021). Além disso, estudos sugerem que a principal contribuição para a formação dos complexos de inclusão, que faz com que as moléculas entrem espontaneamente e permaneçam na cavidade, é devido às interações de Van der Waals (DENG et al., 2022a).

Figura 39- Estrutura das moléculas hóspede/hospedeira e os hidrogênios presentes e sugestão da forma como ocorre a interação para formar o complexo



Fonte: Do autor (2023)

Cada molécula se comportou de uma forma ao ser inserida na cavidade da  $\beta$ -CD; com a BCA2 foi formado um complexo de inclusão e possivelmente a BCA1 forma um complexo de não inclusão. Uma provável justificativa para a molécula de BCA1 não conseguir entrar na cavidade da  $\beta$ -CD pode ser devido a um efeito estérico adicional, formado pelos grupos metila, que, possivelmente, junto com toda a molécula, que é volumosa, causa repulsão entre os átomos da molécula e da CD. Como alternativa, a molécula interage na superfície externa

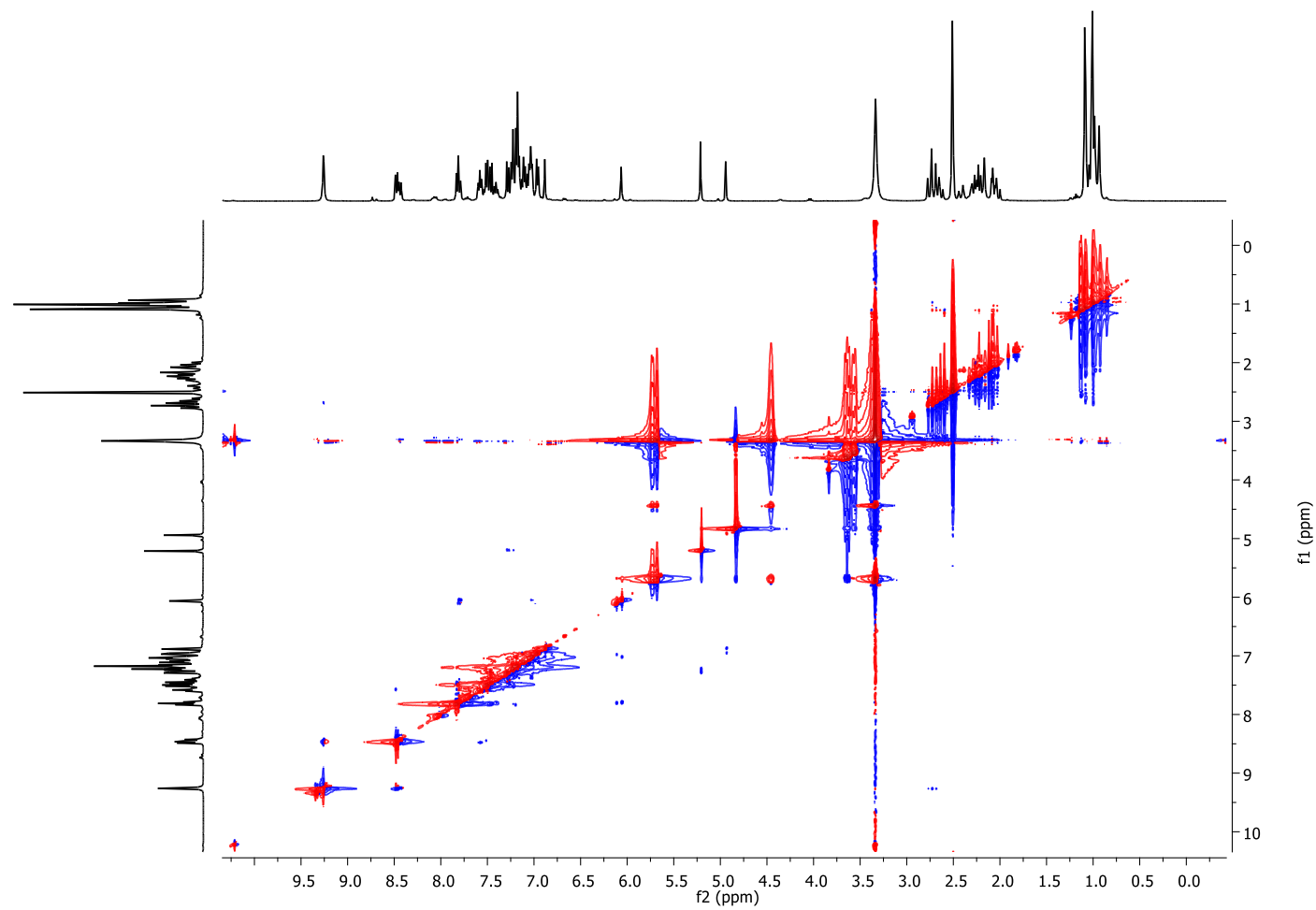


da CD devido à atração eletrostática, formando uma ligação de hidrogênio entre um dos hidrogênios de suas hidroxilas com o oxigênio da carbonila.

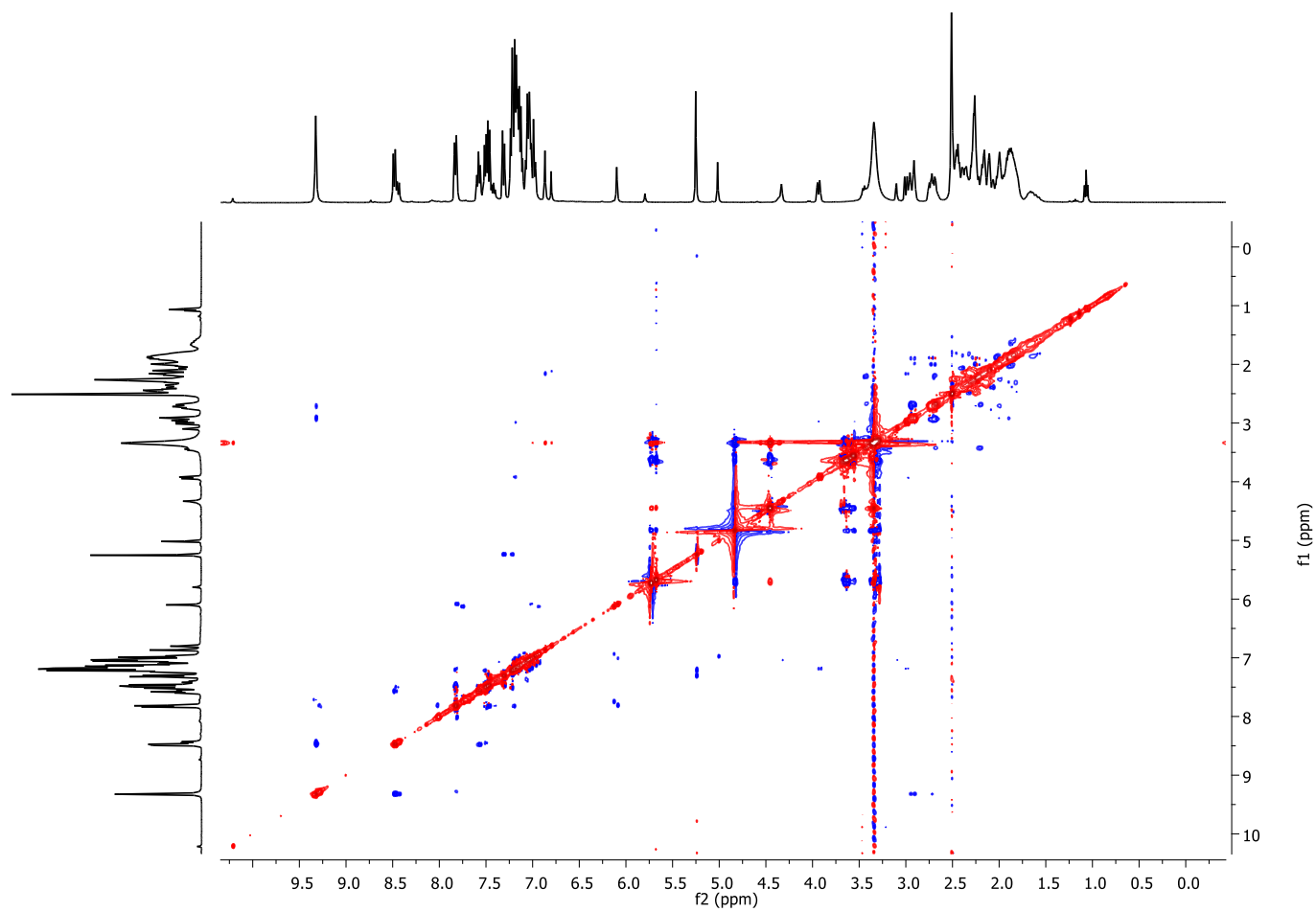
Para BCA1 com diferentes CDs observou-se a formação do complexo de não inclusão, quando se usa a  $\beta$ -CD. Possivelmente o maior tamanho da CD pode influenciar nesse resultado favorecendo a formação de complexo de inclusão.

Nos espectros de RMN de ROSY observou-se correlação com hidrogênios referente a uma outra molécula, possivelmente à molécula contaminante que foi observada em outras análises, já citadas anteriormente, como DSC e RMN de  $^1\text{H}$ . Desta forma, não se pode descartar que as impurezas possam estar influenciando na formação do complexo de inclusão, agindo como um competidor. Outro fator a ser considerado é que os complexos foram preparados em quantidade menor de moléculas devido à presença das impurezas e esse fator pode ter influenciado nos resultados.

Esses resultados estão de acordo com os dados observados no estudo da cinética de inclusão. Para a molécula 1, BCA1, os resultados indicam que ao substituir os grupos hidroxilas por grupos maiores, se reduz a interação da molécula com a CD, o que dificulta a formação do complexo de não inclusão. Os resultados observados na isoterma de solubilidade indicam também a formação de um sistema mais estável para a molécula 2, pela formação do complexo de inclusão, com maior constante de associação.

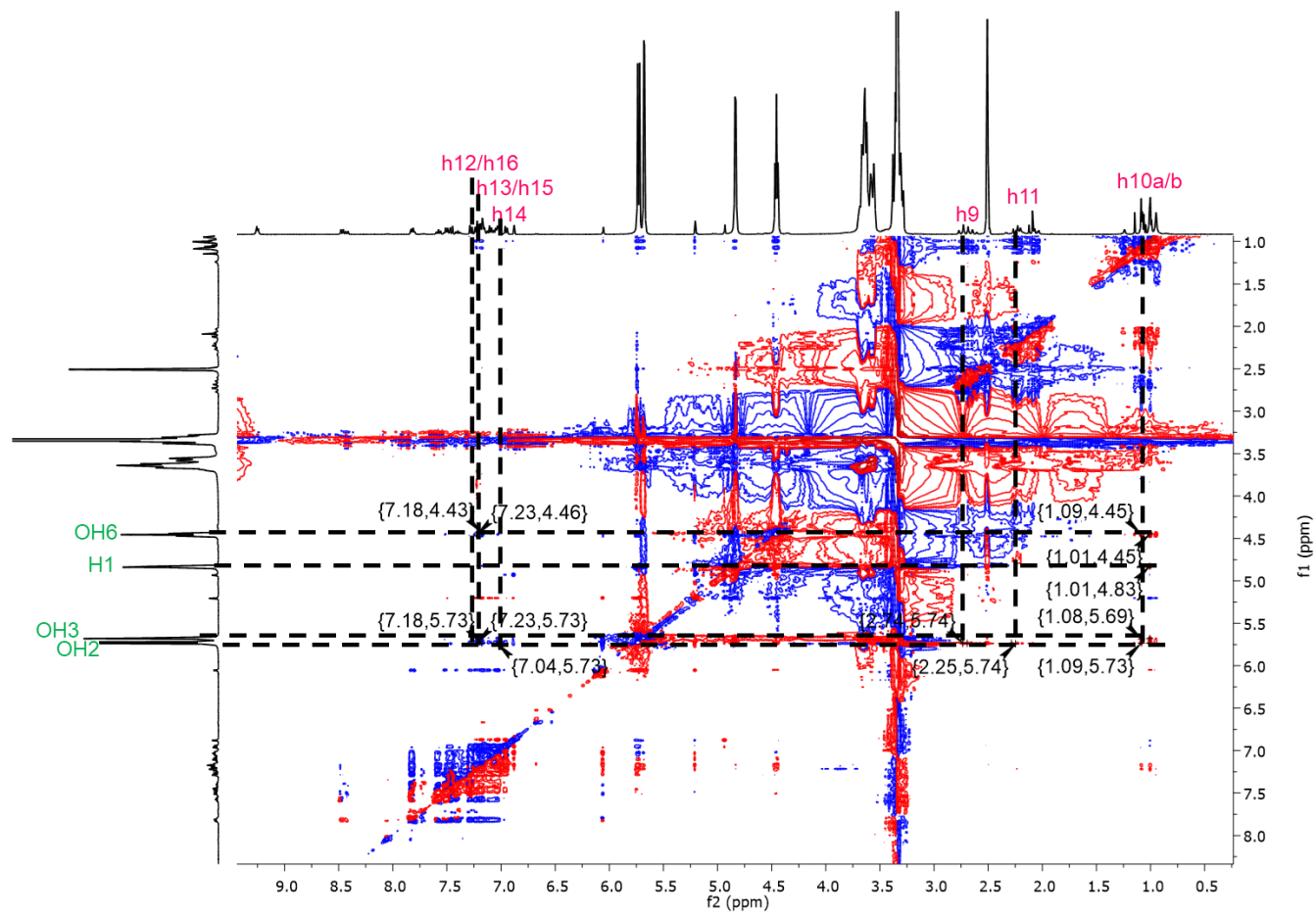
Figura 40- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI1a em DMSO-d<sub>6</sub> e D<sub>2</sub>O

Fonte: Do autor (2023)

Figura 41- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI2a em DMSO-d6 e D<sub>2</sub>O

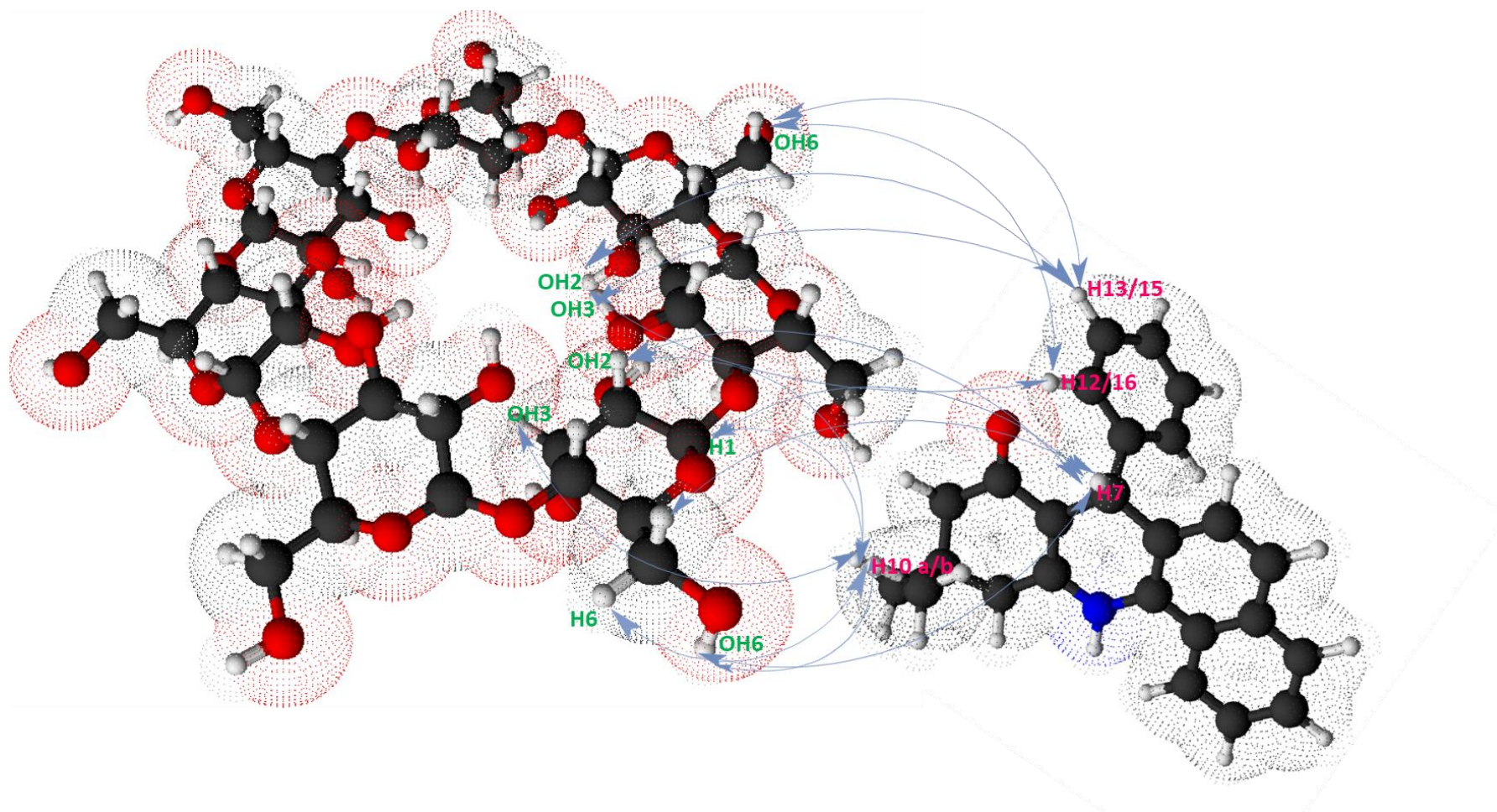
Fonte: Do autor (2023)

Figura 42- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI1b em DMSO-d6 e D2O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa (no eixo x), refere-se aos hidrogênios da molécula e no eixo y, em verde, refere-se aos hidrogênios da CD.



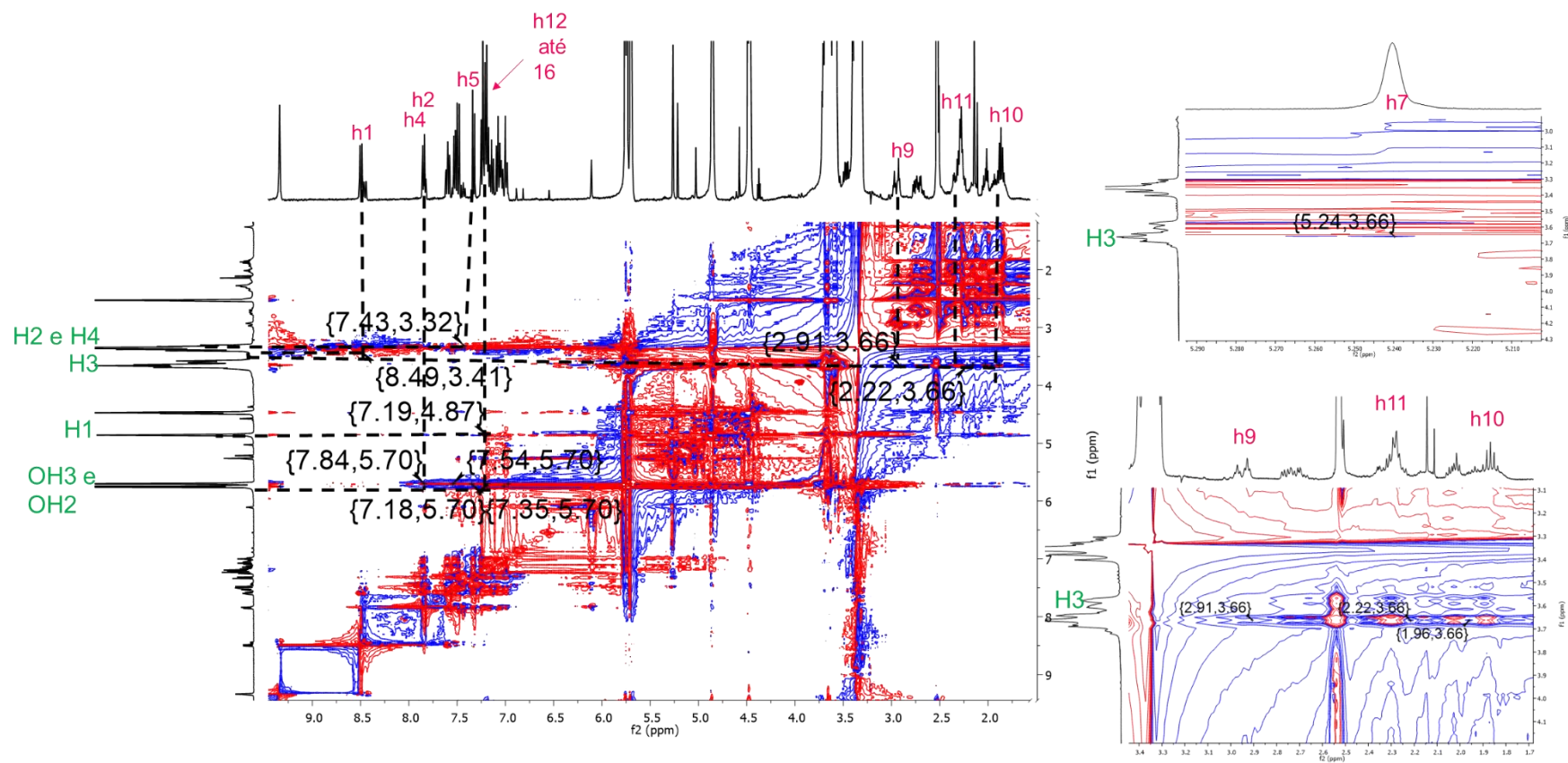
Fonte: Do autor (2023)

Figura 43- Representação dos átomos envolvidos na formação do complexo de inclusão, as correlações mostradas por setas referente ao RMN ROESY 2D do complexo CI1b em DMSO-d<sub>6</sub> e D<sub>2</sub>O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa referem-se aos hidrogênios da molécula e em verde, refere-se aos hidrogênios da CD.



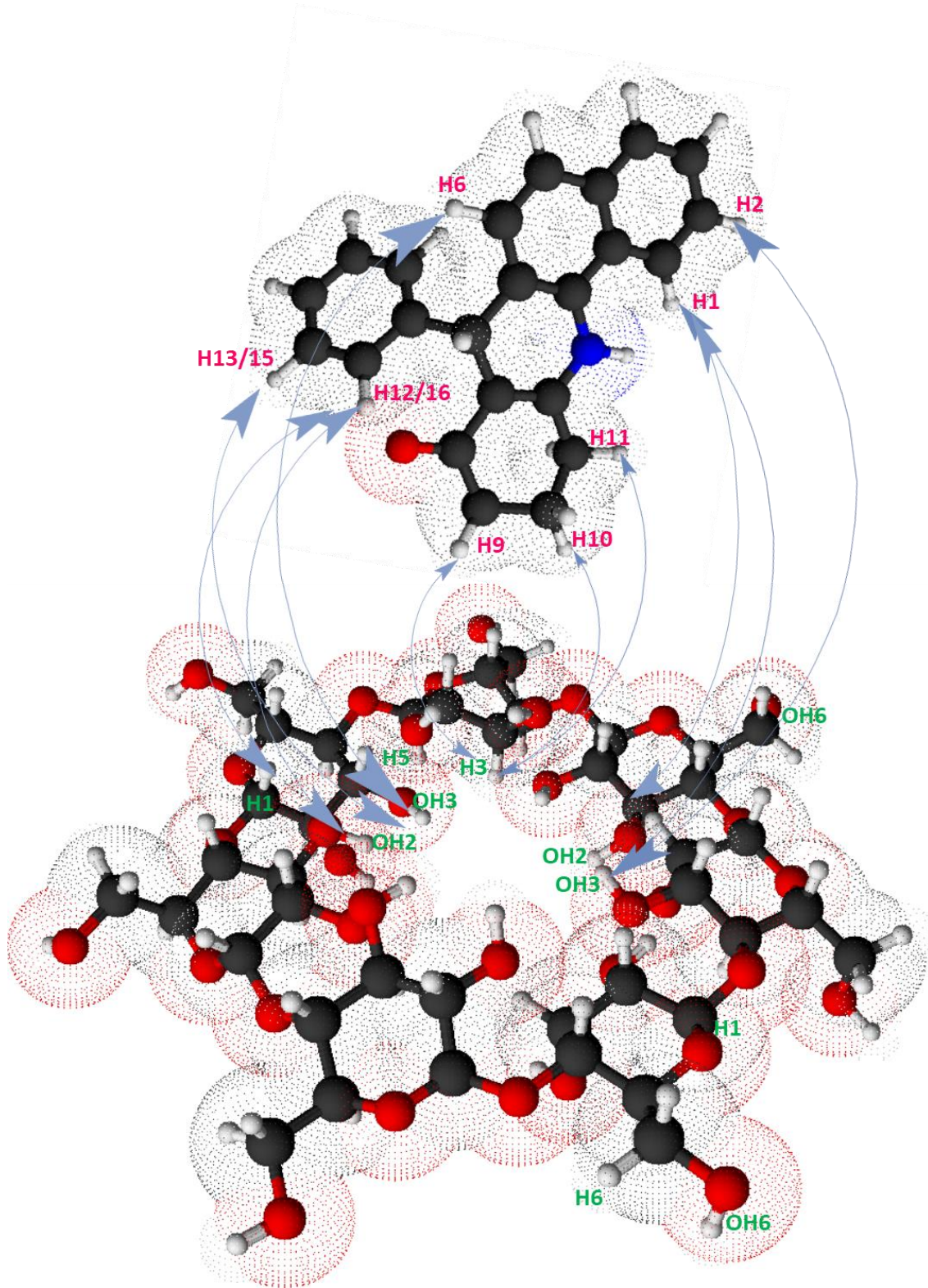
Fonte: Do autor (2023)

Figura 44- Espectros de RMN ROESY 2D do complexo CI2b em DMSO-d<sub>6</sub> e/ou D<sub>2</sub>O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa (no eixo x), refere-se aos hidrogênios da molécula e no eixo y, em verde, refere-se aos hidrogênios da CD.



Fonte: Do autor (2023)

Figura 45- Representação dos átomos envolvidos na formação do complexo de inclusão, as correlações mostradas por setas referente ao RMN ROESY 2D do complexo CI1b em DMSO-d<sub>6</sub> e D<sub>2</sub>O. Os hidrogênios representados com a coloração rosa referem-se aos hidrogênios da molécula e em verde, refere-se aos hidrogênios da CD.



Fonte: Do autor (2023)

### **Espectroscopia por Difusão Ordenada - DOSY**

A partir do experimento de espectroscopia por difusão ordenada, foram obtidos os dados brutos, os gráficos foram processados e foi obtido o mapa de difusão, onde todos os sinais referentes a uma molécula vão estar em uma determinada velocidade. A partir deste, é possível obter diversas informações, como a constante de difusão e a proporção de cada constituinte.

Uma redução no coeficiente de difusão demonstra a formação do complexo de inclusão, uma vez que no processo de complexação ocorre um aumento no raio hidrodinâmico, o que ocasiona um acréscimo na mobilidade do meio (MURA, 2014). Além disso, essa diferença é um indicativo da proporção da fração complexada.

Relativo ao complexo CI1b o valor de coeficiente de difusão encontrado para a molécula de BCA1 livre foi de  $2,26 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Além disso, foi observado outro pico em  $1,69 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Figura 46 b). Para a  $\beta$ -CD o coeficiente de difusão foi de  $1,02 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Figura 46 c); esses valores foram obtidos para as moléculas hóspede e hospedeira em sua forma livre. Quando complexados, os valores observados no complexo de inclusão foram CI1b:  $2,18 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $1,69 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para a molécula BCA1 e  $1,09 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para a ciclodextrina, referente ao valor de constante de difusão para a molécula (Figura 46 a).

Para as moléculas livres foram observados os seguintes valores de constante de difusão:  $1,02 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para a  $\beta$ -CD (Figura 47 c) e  $2,31 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para o derivado 2 das benzo[c]acridinonas- BCA2 (Figura 47 b). Ao se formar os complexos de inclusão, observou-se uma pequena alteração nos valores de coeficientes de difusão, sendo estes  $1,07 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para o sinal característico da  $\beta$ -CD e  $2,20 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para BCA2, ligados (Figura 47 a).

Observa-se uma pequena variação nos valores de coeficiente de difusão ao se formar o complexo de inclusão para todos os complexos testados, sugerindo uma fraca interação entre a molécula e a CD. DE JESUS e colaboradores (2012) obtiveram resultados semelhantes, em que se observou pequenas mudanças nos coeficientes de difusão, não sendo possível calcular a fração e a constante de associação.

Mesmo se obtendo uma pequena variação nos valores de coeficiente de difusão, foram calculadas a fração complexada ( $f_{\text{ligado}}$ ) (Equação 1) e a constante de associação ( $K_a$ ) (Equação 2). Para tal, utilizaram-se as equações abaixo:



Equação 4: Cálculo de fração complexada

$$D_{obs} = f_{ligado} D_{ligado} + f_{livre} D_{livre}$$

Equação 5: Cálculo para a constante de associação

$$k_a = \frac{f_{ligado}}{(1 - f_{ligado})([CD] - f_{ligado}[molécula])}$$

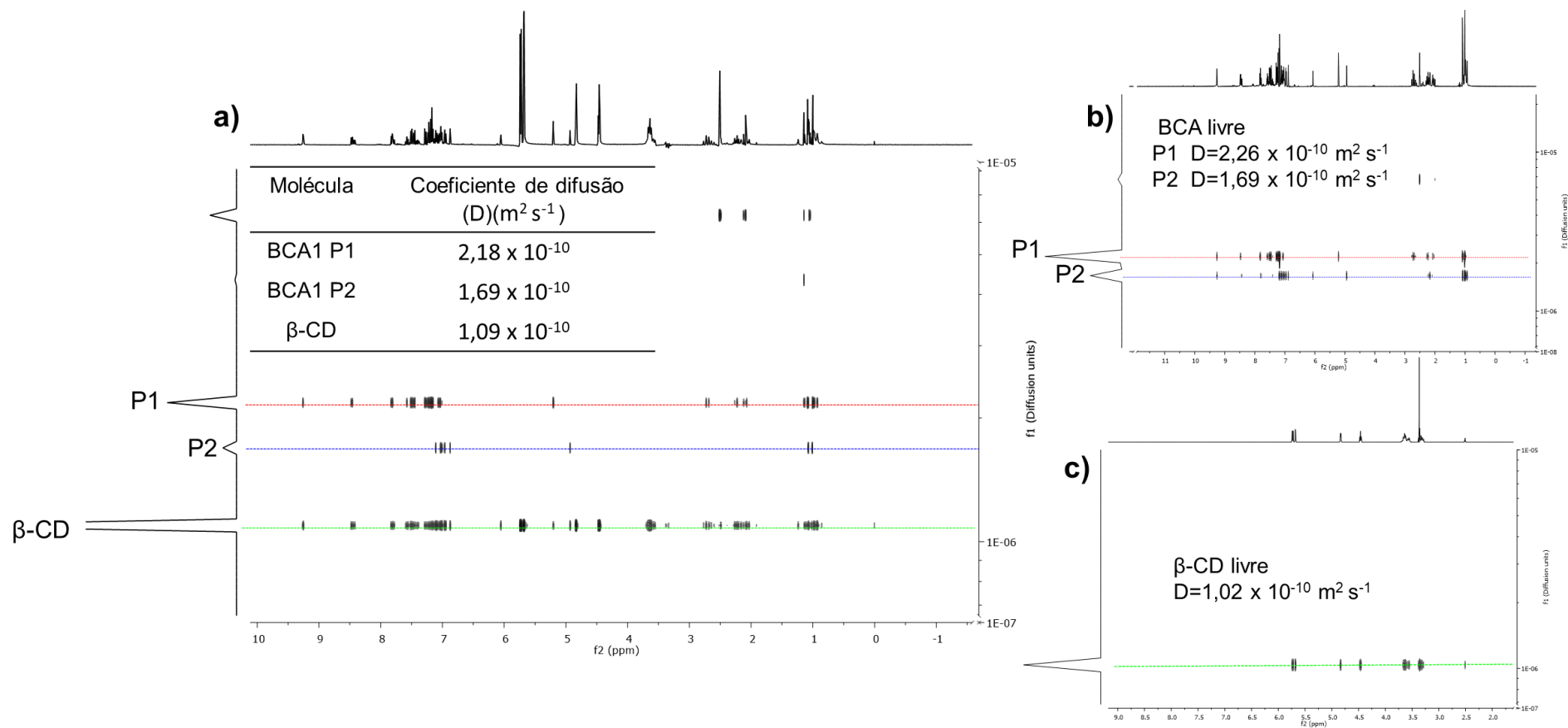
Onde  $D_{obs}$ =constante de difusão do complexo,  $D_{livre}$ = constante de difusão da molécula livre e  $D_{ligado}$ = constante de difusão da ciclodextrina ligado. O  $f$  significa a fração, onde  $f_{livre}$ = indica a quantidade de moléculas livre em solução e  $f_{ligado}$ = mostra a quantidade de moléculas ligadas a ciclodextrinas. Para os complexos obtiveram-se os seguintes valores: CI1 $\beta$  ( $f_{ligado} = 6,93\%$  e  $K_a = 7,56 \text{ L mol}^{-1}$ ) e CI1 $\beta$  ( $f_{ligado} = 8,87 \%$  e  $K_a = 9,74 \text{ L mol}^{-1}$ ). Isso indica que os complexos CI1 $\beta$  e CI2 $\beta$  apresentam as seguintes porcentagens de moléculas livres: ~93% e ~90%, respectivamente.

O baixo valor observado na fração complexada e constante de associação para todos os complexos testados sugere interação pouco favorável entre a molécula e a cavidade das CD testadas, indicando a possível formação de complexos de não-inclusão, ou a formação de complexos muito instáveis, não detectáveis pela técnica.

Em um estudo com a ropivacaína e a  $\beta$ -CD, encontraram-se valores maiores para a formação desse complexo, sendo  $f_{ligado} = 22 \%$  e  $K_a = 37 \text{ L mol}^{-1}$ . Ao se substituir a CD pela HP-CD os valores foram consideravelmente superiores, sendo  $f_{ligado} = 98,3 \%$  e  $K_a = 72.279 \text{ L mol}^{-1}$  (SOUZA et al., 2022), indicando nesse caso que tal substituição determinou aumento na afinidade.

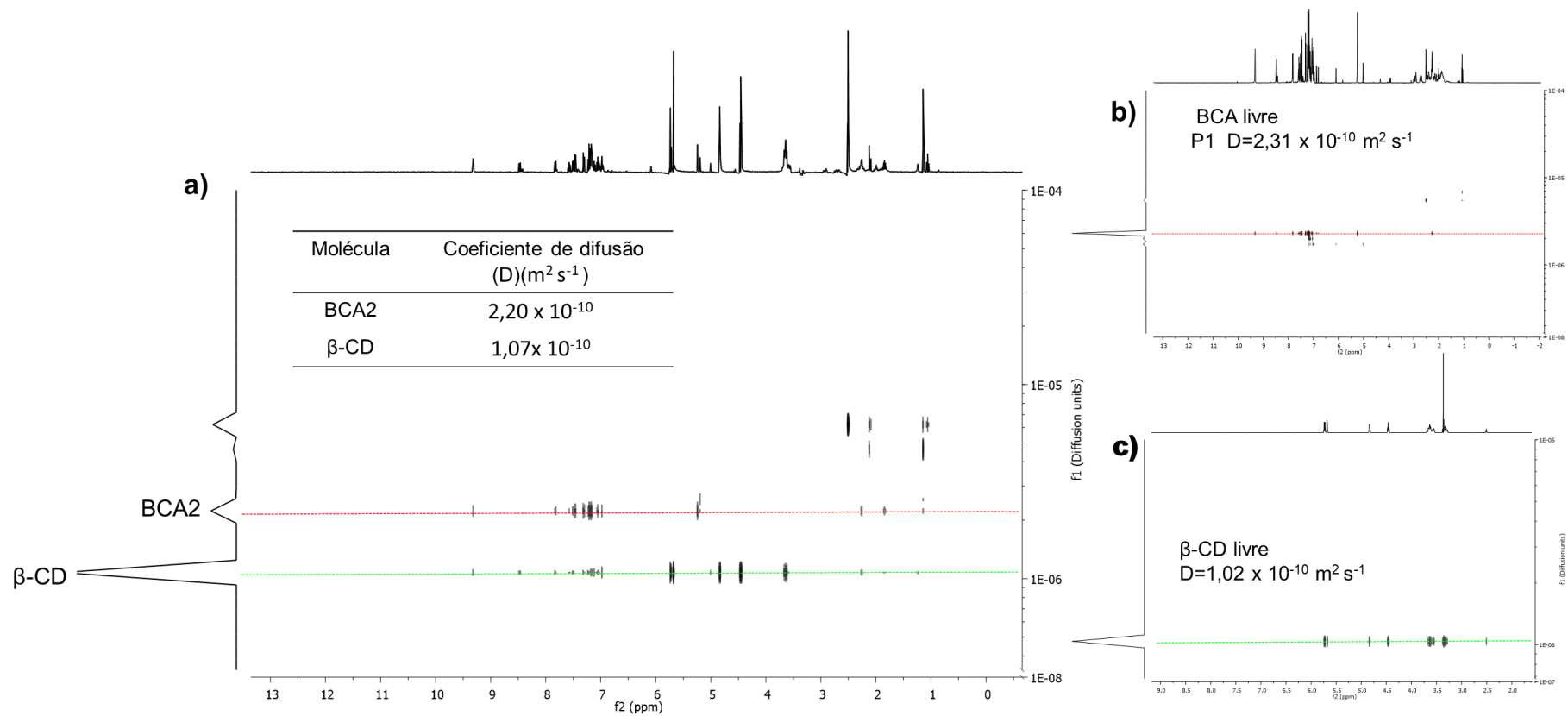
Além disso, ao se comparar os valores da constante de associação obtida pelo DOSY com o da isoterma de solubilidade, observa-se uma redução no valor. Um fator que possivelmente influenciou os resultados obtidos por essa técnica é o uso de solventes, que pode ter influenciado a molécula a dispersar pelo DMSO, reduzindo a fração complexada e o valor da constante de dissociação. Além disso, a utilização de um método de análise diferente do usado na isoterma de solubilidade, o tempo de armazenamento e a temperatura também podem ter influenciado os resultados.

Figura 46- Mapa de contorno de difusão a) CIIb b) BCA1 livre c)  $\beta$ -CD livre



Fonte: Do autor (2023)

Figura 47- Mapa de contorno de difusão a) CI2b b) BCA2 livre c)  $\beta$ -CD livre



Fonte: Do autor (2023)

## 5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Os complexos de inclusão no estado sólido foram confirmados através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia na região do infravermelho e visível (FTIR).

### 5.4.1. Calorimetria exploratória diferencial- DSC

A calorimetria exploratória de varredura (DSC) tem sido usada de forma eficiente para a detecção da formação dos complexos de inclusão no estado sólido, através do desaparecimento dos picos da molécula hóspede, deslocamento da temperatura característica dos picos ou diminuição nos valores de entalpia ( $\Delta H$ ) (JIANG et al., 2021; WADOWIAK et al., 2022).

#### Complexo de inclusão entre BCA1 e $\beta$ -CD-Metodologias 1 e 2

Os valores das temperaturas referentes aos picos podem ser observados na Tabela 8, assim como nos perfis calorimétricos de DSC obtida para BCA1,  $\beta$ -CD, CI1a/CI1b e MF1 para as metodologias 1 Figura 48 e metodologia 2 Figura 49.

No perfil calorimétrico da  $\beta$ -CD, na metodologia 1, foi observado um pico endotérmico acentuado em 87,2 °C, sendo a entalpia ( $\Delta H$ ) de 204,61 J/g. Segundo Martins e colaboradores (2020) esse pico é referente à perda de moléculas de água do interior da cavidade da ciclodextrina.

Foi observado no termograma de DSC para o composto BCA1 a presença de dois picos endotérmicos em 259,69 °C e 270,38 °C, sendo os valores de entalpia, respectivamente, 11,99 J g<sup>-1</sup> e 4,72 J g<sup>-1</sup>. Na literatura, diversos autores relataram a temperatura de fusão (T.F.) desse composto; como exemplo, (BABAEE et al., 2018) relataram T.F.: 260-263 °C e (GHASHANG; MANSOOR; ASWIN, 2017) obtiveram a T.F. desse composto entre 258-260 °C. Normalmente compostos orgânicos puros apresentam um pico acentuado referente ao ponto de fusão, como os observados para o amiodarona (RUBIM et al., 2017). Também é possível observar mais de um pico agudo, que pode ser indicativo de outros eventos térmicos, como o da degradação observado para o dissulfiram (PEREIRA et al., 2022).

Nos termogramas do complexo entre BCA1 e da mistura física (CI1a/MF1), na metodologia 1, também foi observado um pico intenso, como na  $\beta$ -CD, com deslocamento nos valores de temperaturas e redução na entalpia, sendo os valores encontrados para CI1 em 72,4 °C ( $\Delta H=169,71$  J/g), enquanto MF1 apresentou um pico em 80.03 °C com  $\Delta H=162,47$  J/g.

Além disso, foi observado outro pico endotérmico com menor intensidade em 260,6 °C ( $\Delta H=3,60$  J/g) e um pico exotérmico em 276,94 °C ( $\Delta H=-20,53$  J/g) para o complexo. Também foi observado na MF1 picos em 255,33 °C ( $\Delta H=2,36$  J/g) e em 274,83 °C ( $\Delta H=-24,29$  J/g) (Figura 06).

Tabela 8- Valores referentes aos picos observados nas curvas calorimétricas de DSC para BCA1,  $\beta$ -CD, CIIa (metodologia 1) e CIIb (metodologia 2) e MF1.

Amostra	Metodologia 1		Metodologia 2	
	Pico (°C)	Entalpia ( $\Delta H$ ) (J/g)	Pico (°C)	Entalpia ( $\Delta H$ ) (J/g)
BCA 1	263,90	11,99	259,69	11,99
	273,13	4,72	270,38	4,72
	291,48	-4,59	291,48	-4,59
$\beta$ -CD	87,2	204,61	90,19	266,02
	217,22		217,22	-0,74
CIIa/ CIIb	72,4	169,71	75,17	207,56
	260,6	3,60	200,52	3,26
	276,94	20,53	260,28	2,87
MF1	80,03	155,44	80,03	155,44
	218,65	1,36	218,65	1,36
	256,16	4,53	256,16	4,53
	276,47	-12,13	276,47	-12,13

Fonte: Do autor (2023)

Nos resultados de DSC observou-se uma pequena diferença nos valores de  $\Delta H$ , por exemplo, o valor de entalpia do pico em 87,2 °C da  $\beta$ -CD foi de 204,61 J/g enquanto para o CIIa (72,4 °C) e MF1 (80,03 °C) os valores foram respectivamente  $\Delta H=169,71$  J/g e  $\Delta H=162,47$  J/g. Tanto para complexo de inclusão quanto a mistura física para a metodologia 1, observa-se uma pequena interação entre a molécula e a ciclodextrina, sugerindo a formação de um complexo de inclusão no estado sólido pouco estável. Isso é observado devido a permanência e pouca alteração no pico em 72,40 e 80,03 °C, indicando pouca alteração no pico referente a saída da molécula de água do interior da CD.

Foi observado nos perfis calorimétricos de DSC para o composto BCA1, na metodologia 2, a presença de dois picos endotérmicos, como foi observado anteriormente. Os

picos possuem temperaturas de 259,69 °C e 270,38 °C e os valores de entalpia, respectivamente, 11,99 J g<sup>-1</sup> e 4,72 J g<sup>-1</sup>. A β-CD apresentou dois picos, um endotérmico em 90,19 °C ( $\Delta H = 266,02 \text{ J g}^{-1}$ ), referente à perda da molécula de água no interior da cavidade hidrofóbica da CD e outro pico em 217,22 com  $\Delta H = -0,74 \text{ J g}^{-1}$  referente a volatilização, dados semelhantes foram encontrados na literatura sendo 97 e 162 °C, respectivamente (MARTINS et al., 2020).

O CI1b apresentou quatro picos, um em 75,17 °C ( $\Delta H = 207,56 \text{ J g}^{-1}$ ), correspondente à perda de água da β-CD. Foi observada uma redução nesse pico, característico da CD ao formar o CI, indicando um possível deslocamento das moléculas de água pelas moléculas de BCA1. Os outros sinais que aparecem no CI1b são um pico em 200,52 °C com  $\Delta H$  de 3,26 J g<sup>-1</sup> e em 260,28 °C ( $\Delta H = 2,87 \text{ J g}^{-1}$ ). Observa-se uma redução no valor da entalpia no sinal em 260,28 °C quando comparado com os picos observados na molécula (259,69 °C e 270,38 °C com  $\Delta H$ , respectivamente, 11,99 J g<sup>-1</sup> e 4,72 J g<sup>-1</sup>).

No termograma da MF1 foi observado quatro picos com temperaturas de 80,03; 218,65; 256,16 e 275,82 °C com valores de entalpia de 155,55; 1,36; 4,37 e 12,13 J g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores entre os complexos e as misturas físicas são análogos. Diversos trabalhos na literatura descrevem uma curva típica de DSC para a mistura física como uma sobreposição da curva da molécula e da CD (YAO et al., 2020).

Para o CI1b e MF1 o pico residual da molécula de água sofreu poucas alterações nos valores dos picos e entalpia, indicando que as moléculas de água possivelmente não foram completamente substituídas pelas moléculas de água dentro da cavidade da CD. No complexo de inclusão entre a riboflavina e β-CD, observou resultados análogos, no trabalho em questão, foi notado a formação de um complexo com fraca interação (DE JESUS et al., 2012). De fato, ao observar a constante de associação para o complexo de inclusão entre BCA1 e β-CD no estudo da isoterma de solubilidade, foi observado um valor baixo ( $29 \text{ M}^{-1}$ ), indicando que a interação que ocorre entre eles é fraca.

### **Complexo de inclusão entre BCA2 e β-CD- Metodologia 1 e 2**

Na metodologia 1, foi observado que o composto BCA2 possui dois picos endotérmicos em 205,53 °C e 269,25°C com  $\Delta H$  de 25,61J/g e 2,63 J/g, respectivamente. No CI2a e MF2 foram observados quatro picos, um em 74,04 °C e 81,95 °C, respectivamente, sendo esse pico intenso, como o presente na β-CD. Estes, possuem valores de entalpia,

respectivamente, 211,35 J/g e 221,79 J/g. O CI2a ainda possui os picos nas seguintes temperaturas 194,44 °C ( $\Delta H=15,20$  J/g), 245,4 °C ( $\Delta H=3,97$  J/g) e 281,67 °C ( $\Delta H=-4,18$  J/g). E a MF2 possui picos em 186,95 °C ( $\Delta H=3,46$  J/g), 220,28 °C ( $\Delta H=4,16$  J/g) e 280,07 °C ( $\Delta H=-2,82$  J/g)

Figura 50. Nesses dados de DSC observou-se uma pequena diferença nos valores de  $\Delta H$ , por exemplo, o valor de entalpia do pico em 87,2 °C da  $\beta$ -CD foi de 204,61 J/g ou nos valores dos picos.

Para a metodologia 2, foi verificado também a formação do complexo de inclusão com a molécula 2 (BCA2), todos os resultados podem ser observados na Figura 51. Para a BCA2, foram observados dois picos endotérmicos, em 205,53 °C e 269,25 °C, com valores de entalpia de 21,68 J g<sup>-1</sup> e 2,59 J g<sup>-1</sup>, respectivamente. NADARAJ; SELVI; MOHAN (2009) sintetizou essa molécula e o valor de temperatura de fusão obtido foi entre 246-248 °C, sendo esse um possível indicativo que essa molécula também contém impurezas.

O termograma do CI2b mostra uma redução no pico característico da  $\beta$ -CD (90,19 °C e  $\Delta H = 293,85$  J g<sup>-1</sup>) para 83,28 °C e 169,31 J g<sup>-1</sup>. Uma redução análoga pode ser observada para a MF2 (81,95 °C e  $\Delta H = 204,07$  J g<sup>-1</sup>). Esses resultados indicam uma fraca interação entre a molécula e  $\beta$ -CD, sugerindo que há um pequeno deslocamento das moléculas de água.

Uma diminuição foi verificada para o pico da molécula presente no CI. Tanto o valor de temperatura como o valor de  $\Delta H$  foram deslocados para valores de temperaturas menores, 187,27 °C e  $\Delta H = 2,28$  J g<sup>-1</sup>. A MF apresentou resultados análogos aos do CI, sugerindo novamente a formação de complexos de inclusão com fraca interação. Enquanto a MF2 apresentou um pico em 186,06 °C e  $\Delta H = 3,74$  J g<sup>-1</sup>.

Tabela 9- Valores referentes aos picos observados nas curvas calorimétricas de DSC para BCA2,  $\beta$ -CD, CI2a (metodologia 1) e CI2b (metodologia 2) e MF2

Amostra	Metodologia 1		Metodologia 2	
	Pico (°C)	Entalpia ( $\Delta H$ ) (J/g)	Pico (°C)	Entalpia ( $\Delta H$ ) (J/g)
BCA2	205,53	25,61	205,53	21,68
	269,25	2,63	269,25	2,59
$\beta$ -CD	87,2	204,61	90,19	266,02
	217,22		217,22	-0,74

CI2 $\beta$	74,04		83,28	169,31
	194,44	15,20	187,27	2,28
	245,4	3,97	234,41	0,83
	281,67	4,18	270,04	-13,80
MF2 $\beta$	81,95	204,07	81,95	204,07
	186,06	3,74	186,06	3,74
	220,28	2,59	220,28	2,59
	280,08	-9,05	280,08	-9,05

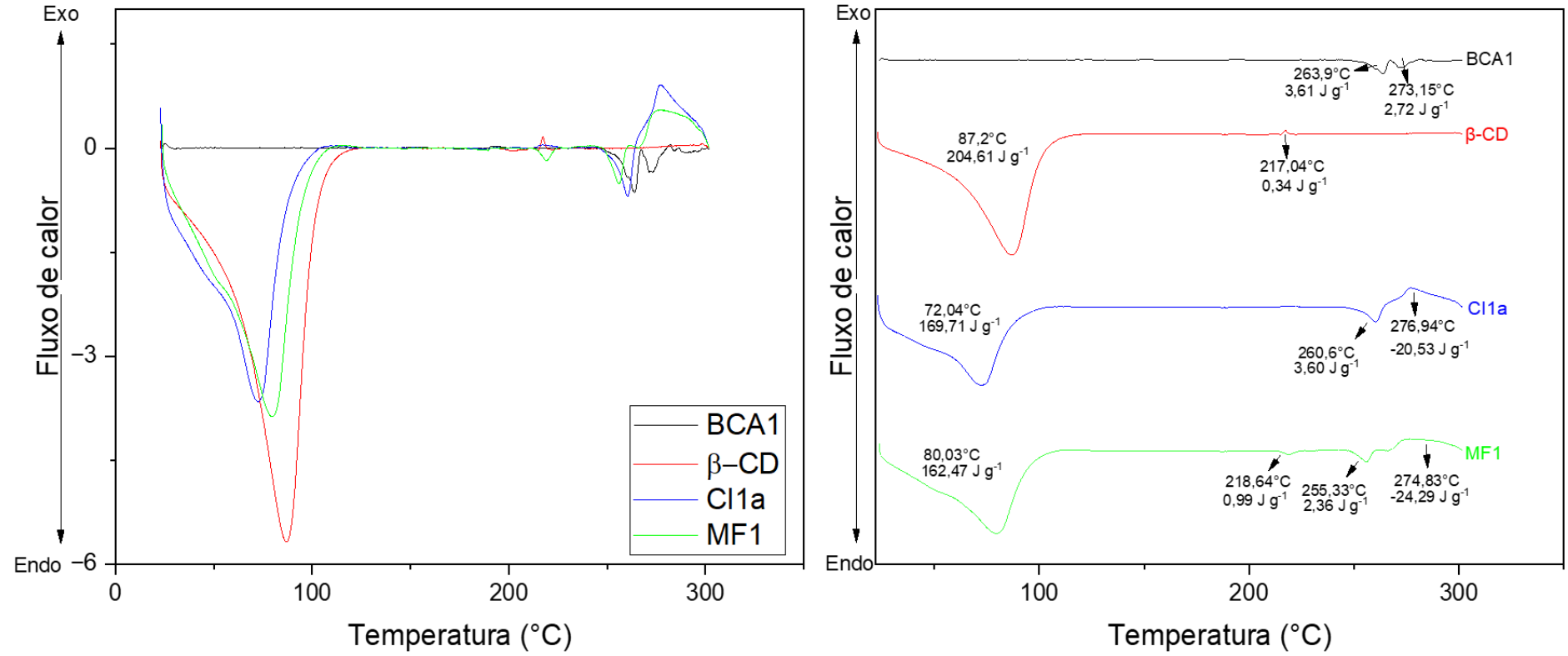
Fonte: Do autor (2023)

Na literatura foi observado para o complexo obtido entre a sulfadiazina e  $\beta$ -CD a formação de CI com interações fortes entre a molécula hóspede e hospedeira, envolve o desaparecimento do pico referente ao P.F. e redução considerável no pico endotérmico relacionado a perda da água do interior da cavidade da CD (MICHEL et al., 2022).

Entretanto, foram comparados os valores obtidos para os complexos de inclusão, levando em consideração a alteração no valor da entalpia na formação do complexo de inclusão, observa-se que o CI2 $\beta$  possui uma interação mais forte, o que é demonstrado tanto pelos valores da constante de associação no experimento da isoterma de solubilidade, como em uma maior alteração nos valores de entalpia, uma redução de 97 J g<sup>-1</sup> ( $\Delta H = 169,31$  J g<sup>-1</sup>) na formação do complexo de inclusão quando se compara com o CI1 $\beta$  uma redução de 59 J g<sup>-1</sup> ( $\Delta H = 207,56$  J g<sup>-1</sup>), referente ao pico característico da substituição da água pela molécula de BCA1 ou BCA2 na  $\beta$ -CD que possui entalpia de 266 J g<sup>-1</sup>.

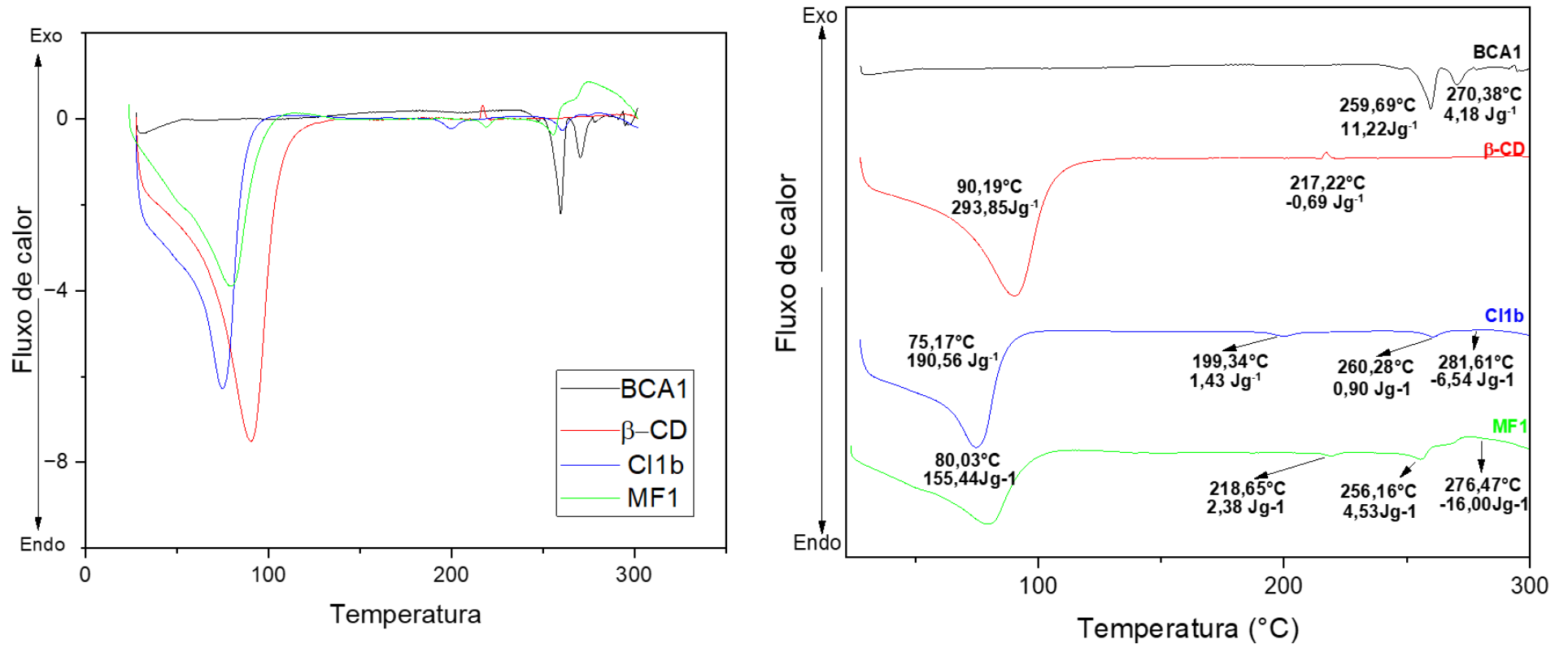


Figura 48- Perfil calorimétrico de DSC para BCA1,  $\beta$ -CD, CI1a e MF1 obtidos pela metodologia 1



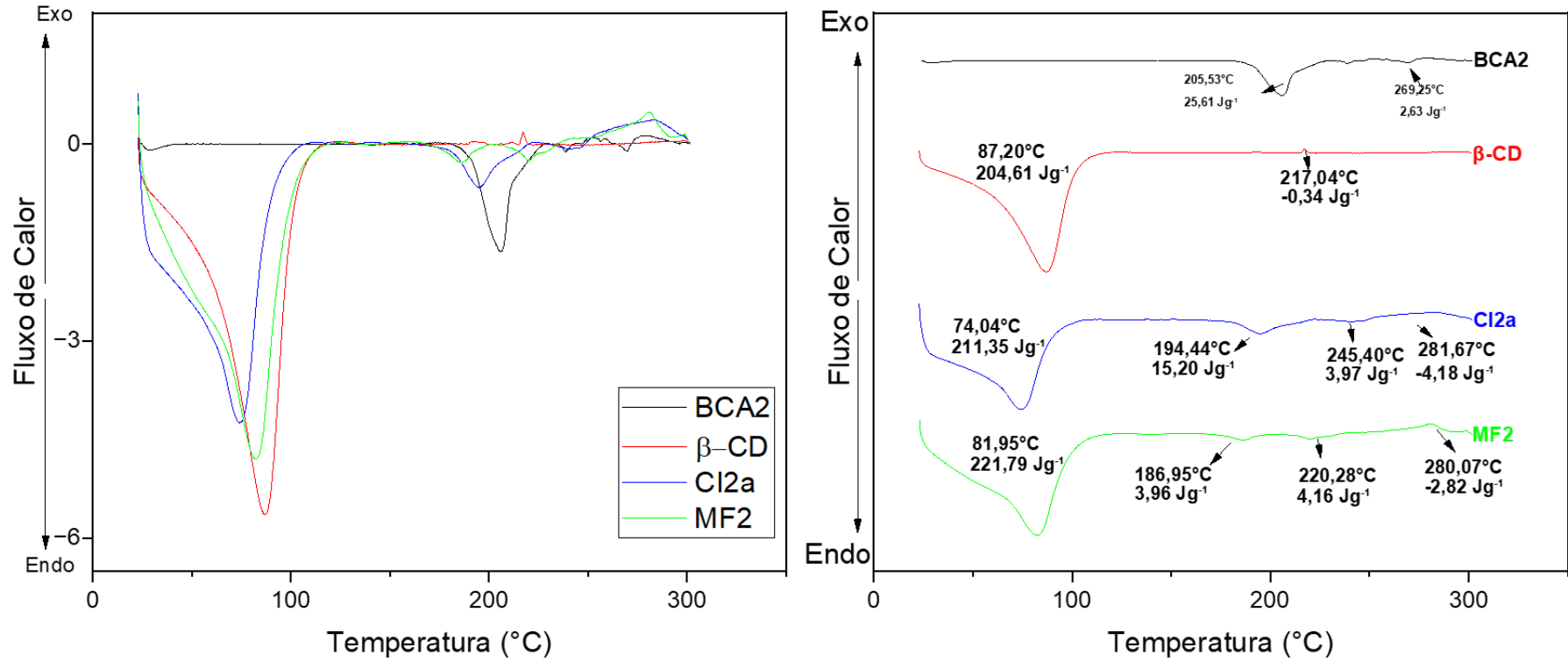
Fonte: Do autor (2023)

Figura 49- Perfil calorimétrico de DSC para BCA1, β-CD, CI1b e MF1, para a metodologia 2



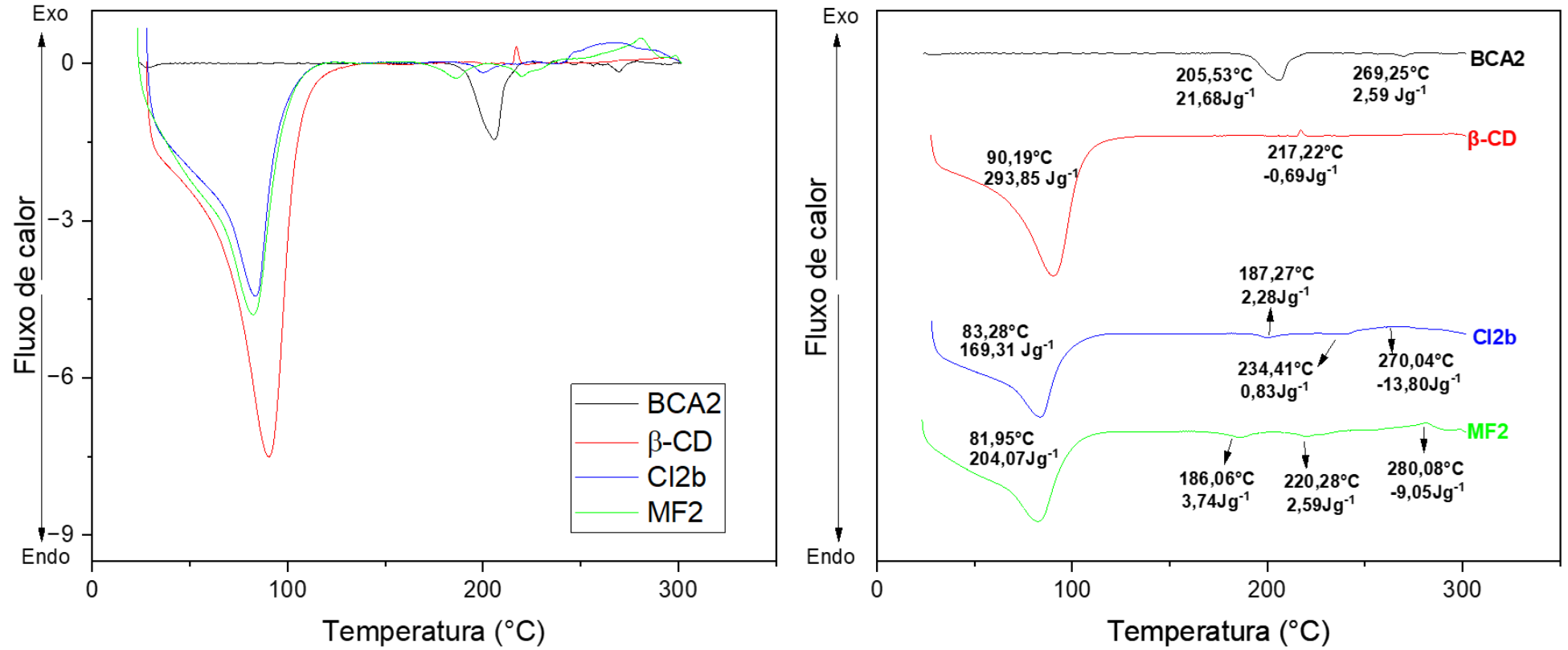
Fonte: Do autor (2023)

Figura 50- Perfil calorimétrico de DSC para BCA2,  $\beta$ -CD, CI2a e MF2, para a metodologia 1



Fonte: Do autor (2023)

Figura 51- Perfil calorimétrico de DSC para BCA2,  $\beta$ -CD, CI2 $\beta$  e MF2 $\beta$ , para a metodologia 2

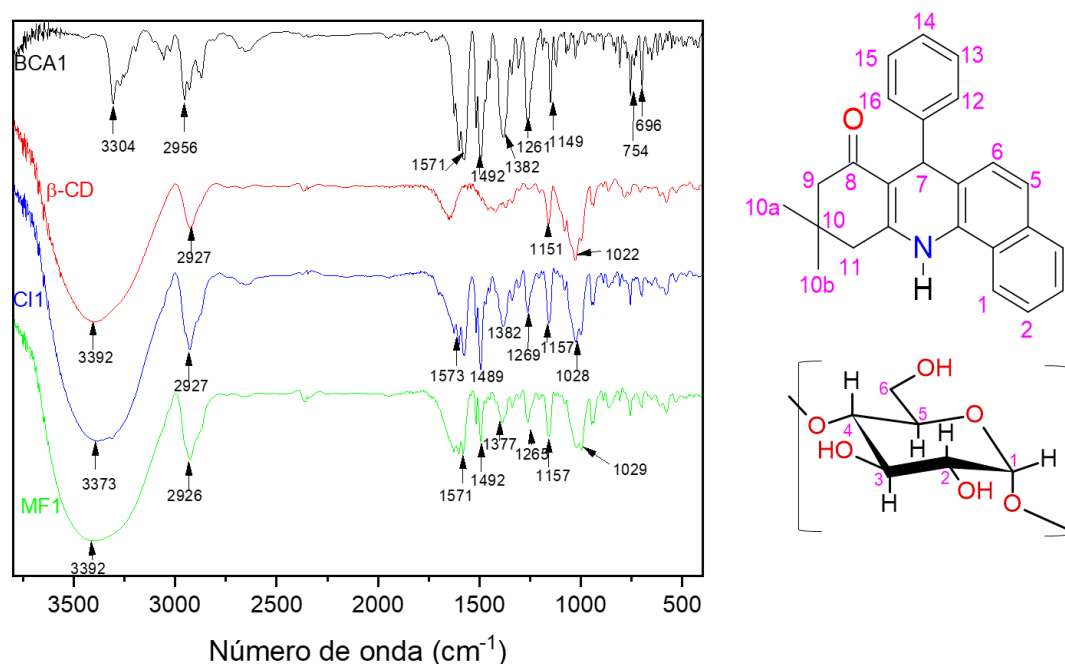


Fonte: Do autor (2023)

### 5.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Outra técnica comumente utilizada para averiguar a formação do complexo de inclusão no estado sólido é a espectroscopia de FTIR. Nessa técnica são verificadas alterações nas vibrações das moléculas ao se formarem o complexo de inclusão, tais como o desaparecimento do pico, alargamento das bandas ou mudança na intensidade (MURA, 2015). Todos os espectros de FTIR podem ser observados nas figuras 52-55.

Figura 52- Espectro na região do FTIR para BCA1,  $\beta$ -CD, CI1a e MF1 metodologia 1



Fonte: Do autor (2023)

A análise do espectro de Infravermelho com transformada de Fourier para a metodologia 1 foi realizada. As moléculas BCA1 e BCA2 foram caracterizadas no item 5.2.2 - Espectroscopia na região do FTIR, onde foram discutidas detalhadamente todas as bandas características. Para BCA1 foram observadas bandas de estiramento em  $3304\text{ cm}^{-1}$  e  $1571\text{ cm}^{-1}$ , sendo uma banda de absorção fraca, referente à presença de amina secundária e uma banda em  $2956\text{ cm}^{-1}$ , referente aos estiramentos C-H de carbonos alifáticos, possivelmente do grupo  $\text{CH}_3$ , assim como a banda observada em  $1382\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à deformação angular do  $\text{CH}_3$ . As bandas de estiramento  $1492\text{ cm}^{-1}$  e  $754\text{ cm}^{-1}$  podem ser referentes à deformação angular do grupo  $\text{CH}_2$ . A ligação C-N pode ser observada na banda em  $1261\text{ cm}^{-1}$ . Já a banda em  $754\text{ cm}^{-1}$  também pode indicar a deformação angular do anel aromático monossustituído (Figura 50)

No espectro da  $\beta$ -CD, a banda em  $3392\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento O-H, sendo uma banda larga,  $2927\text{ cm}^{-1}$ , devida ao estiramento C-H do grupo  $\text{CH}_2$ ;  $1651\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação angular H-O-H; a banda em  $1151\text{ cm}^{-1}$  devida ao estiramento C-O-C do anel e da ligação glicosídica e o estiramento em  $1022\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O-C de álcool.

No CI1a e MF1, observa-se bandas característicos da  $\beta$ -CD, como a banda  $3392\text{ cm}^{-1}$  que foi mantida na MF1. Porém no CI1a esse valor aparece deslocado, com estiramento em  $3373\text{ cm}^{-1}$ . A banda de estiramento  $2927\text{ cm}^{-1}$  é observado no CI1a e a MF1 apresenta em  $2926\text{ cm}^{-1}$ . Outras bandas presentes na  $\beta$ -CD e que também aparecem são:  $1157\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento C-O-C do anel e da ligação glicosídica (CI1 e MF1); e  $1028\text{ cm}^{-1}$  (CI1) e  $1029\text{ cm}^{-1}$  (MF1), que seriam referentes à ligação C-O-C e que aparecem um pouco deslocadas quando comparadas às obtidas para a ciclodextrina. Além disso, CI1a e MF1 apresentaram bandas de estiramento que foram observadas em BCA1. Para MF1 observaram-se as bandas  $1492\text{ cm}^{-1}$ ,  $1377\text{ cm}^{-1}$  e  $1265\text{ cm}^{-1}$ , enquanto para o CI1 as bandas em  $1573\text{ cm}^{-1}$ ,  $1489\text{ cm}^{-1}$ ,  $1382\text{ cm}^{-1}$  e  $1269\text{ cm}^{-1}$  foram observadas.

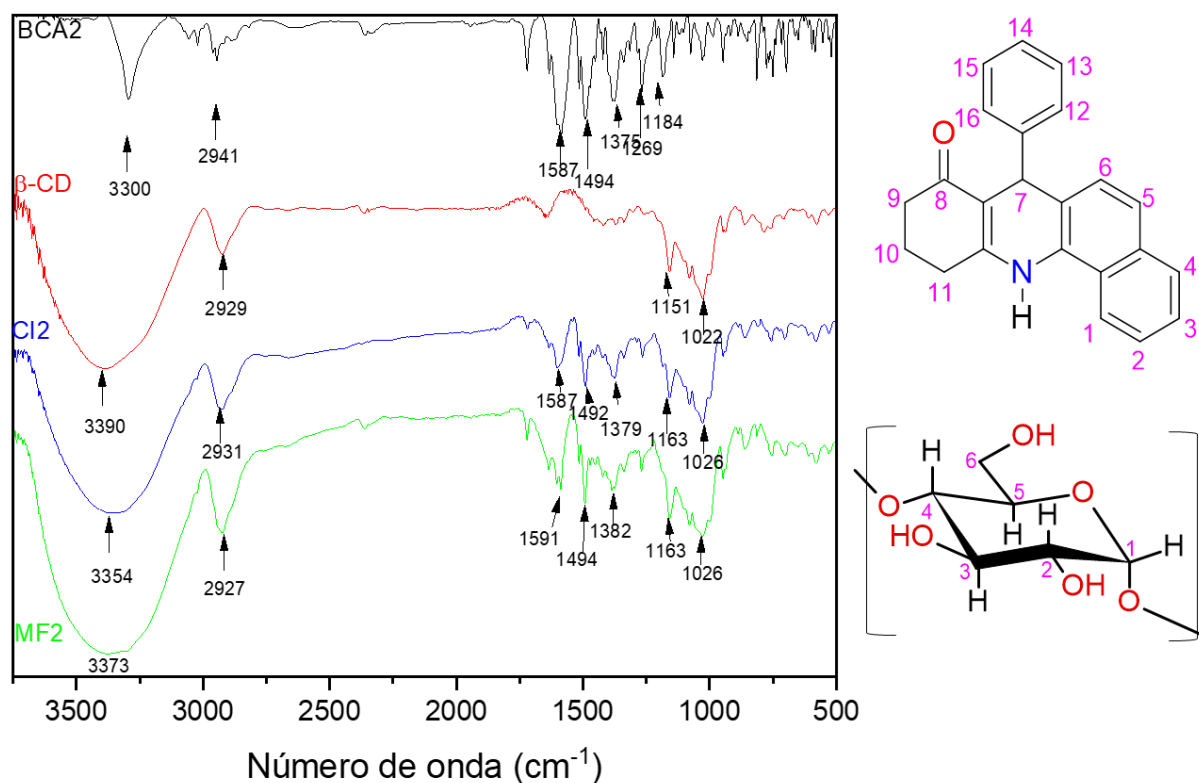
Na Figura 53 os dados obtidos a partir da espectroscopia na região do IV para o composto BCA2,  $\beta$ -CD, complexo de inclusão e mistura física são mostrados. Para o composto BCA2 observam-se as bandas de estiramento  $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $1587\text{ cm}^{-1}$ , sendo uma banda de absorção fraca, referente à presença de amina secundária. A banda em  $2960\text{ cm}^{-1}$  é referente aos estiramentos C-H de carbonos alifáticos, possivelmente do grupo  $\text{CH}_3$ , assim como  $1375\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à deformação angular do  $\text{CH}_3$ . As bandas de estiramento  $1494\text{ cm}^{-1}$  e  $694\text{ cm}^{-1}$  podem ser referentes à deformação angular do grupo  $\text{CH}_2$ . A ligação C-N pode ser observada na banda em  $1184\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro da  $\beta$ -CD, a banda em  $3392\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento O-H, sendo uma banda larga,  $2929\text{ cm}^{-1}$ , devida ao estiramento C-H do grupo  $\text{CH}_2$ ,  $1651\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação angular H-O-H;  $1151\text{ cm}^{-1}$  devida ao estiramento C-O-C do anel e da ligação glicosídica e o estiramento em  $1022\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-O-C de álcool.

Os espectros obtidos para CI2a e MF2 não se diferenciam, ambos apresentam os mesmos picos com uma ligeira variação. Para CI2a observou-se uma banda em  $3354\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento OH; em  $2931\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento C-H do grupo  $\text{CH}_2$ , assim como as bandas em  $1163\text{ cm}^{-1}$  e  $1026\text{ cm}^{-1}$ , que são característicos das  $\beta$ -CD. As bandas em  $1587\text{ cm}^{-1}$ ,  $1492\text{ cm}^{-1}$  e  $1379\text{ cm}^{-1}$  são sinais encontrados no BCA2. O mesmo padrão é

observado para as MF2, onde os seguintes picos são observados:  $3373\text{ cm}^{-1}$ ,  $2927\text{ cm}^{-1}$ ,  $1591\text{ cm}^{-1}$ ,  $1494\text{ cm}^{-1}$ ,  $1382\text{ cm}^{-1}$ ,  $1163\text{ cm}^{-1}$  e  $1026\text{ cm}^{-1}$ .

Figura 53- Espectro da região do FTIR para BCA2,  $\beta$ -CD, CI2a e MF2, metodologia 1



Fonte: Do autor (2023)

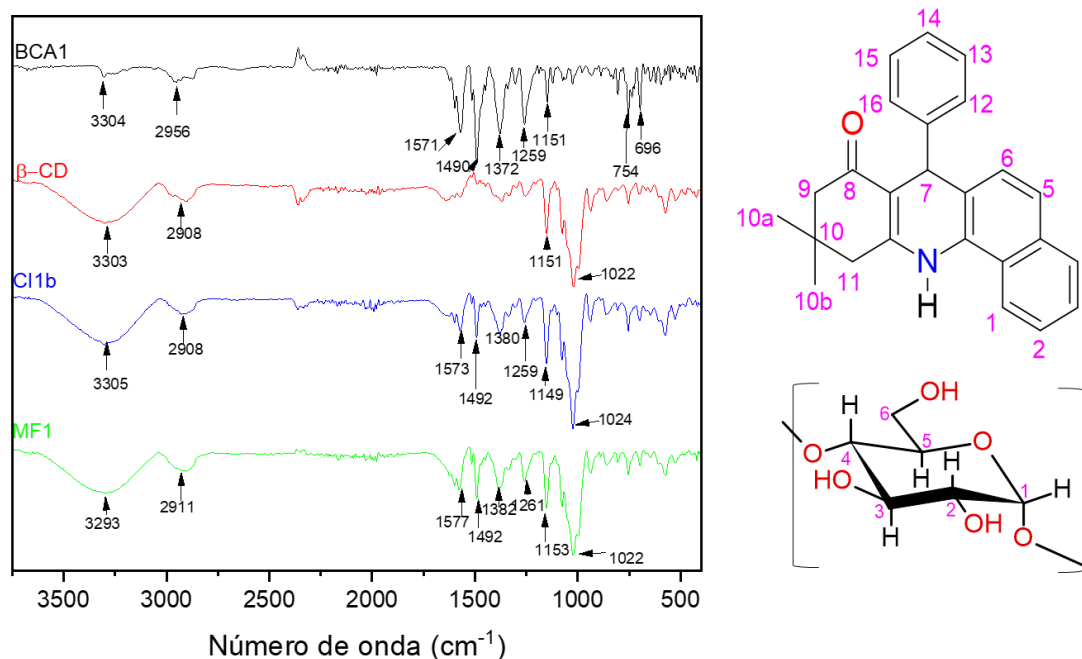
Na metodologia 2 são observadas as seguintes bandas para BCA1 (Figura 54):  $3307\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $2954\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ),  $1567\text{ cm}^{-1}$  (C=O) e, referente à região de impressão digital da molécula, as bandas  $1497$ ,  $1373$ ,  $1259$ ,  $1151$ ,  $755$  e  $694\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro da  $\beta$ -CD Figura 54, a banda larga observada em  $3392\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento O-H. A banda em  $2927\text{ cm}^{-1}$  é devida ao estiramento da ligação C-H de carbono  $\text{sp}^3$ . A banda em  $1651\text{ cm}^{-1}$  é referente à deformação angular H-O-H, da molécula de água complexada. Já a banda em  $1151\text{ cm}^{-1}$  é devida ao estiramento C-O-C do anel da ligação glicosídica e o estiramento em  $1022\text{ cm}^{-1}$  referente à ligação C-C e C-O. Essas bandas estão de acordo com os valores encontrados na literatura; (ZHU; ZHU; XIAO, 2019) encontraram os seguintes valores para essas bandas:  $3369$ ,  $1647$ ,  $1158$  e  $1022\text{ cm}^{-1}$ .

Para o CI1b e MF1 (Figura 54) foi possível verificar algumas bandas características da  $\beta$ -CD, como as bandas largas em  $3288/3272\text{ cm}^{-1}$  e  $2911/2929\text{ cm}^{-1}$ , que possivelmente sobrepuseram os sinais de  $3307\text{ cm}^{-1}$  e  $2954\text{ cm}^{-1}$  da molécula de menor intensidade. Foi

observado também o desaparecimento da banda  $1567\text{ cm}^{-1}$ , característica da molécula BCA1 e referente ao estiramento C=O da carbonila de cetona. Além disso, observa-se uma redução nas intensidades das bandas  $1494\text{ cm}^{-1}$  e  $1373\text{ cm}^{-1}$ .

Figura 54- Espectro na região do FTIR para BCA1,  $\beta$ -CD, CI1b e MF1 metodologia 2



Fonte: Do autor (2023)

No espectro da BCA2 (Figura 55) as bandas observadas foram  $3295\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $2948\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ),  $1583\text{ cm}^{-1}$  (C=O) e referentes à região de impressão digital da molécula as bandas  $1492$ ,  $1378$ ,  $1263$  e  $696\text{ cm}^{-1}$ .

Os dois últimos espectros na região do FTIR (Figura 55, letras c e d) contêm as informações para CI2b e MF2. Foi possível observar o desaparecimento da banda em  $1583\text{ cm}^{-1}$ , característica da BCA2, nem como redução nas intensidades das bandas características da molécula presentes no CI2 $\beta$ /MF2 $\beta$  ( $1488/1490\text{ cm}^{-1}$ ,  $1371/1376\text{ cm}^{-1}$  e  $1261/1266\text{ cm}^{-1}$ ).

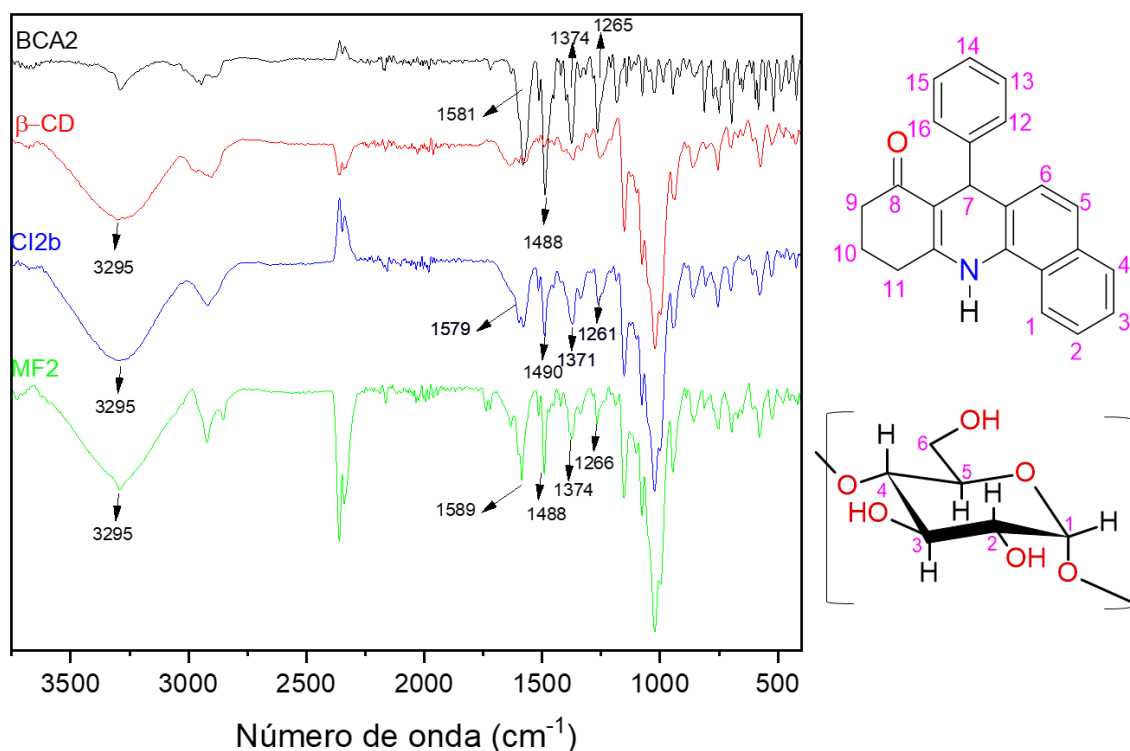
Nos espectros dos complexos foi observada pouca alteração nas bandas características da molécula pura e das CDs. Um dos efeitos foi a redução na intensidade das bandas, que sugere que esses grupos podem estar relacionados à formação do CI, uma vez que a inserção da molécula na cavidade da CD provoca uma restrição conformacional, reduzindo a intensidade do sinal (KRINGEL et al., 2017).

As bandas  $1567$  e  $1583\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento da ligação C=O, não foram observadas no CI1b e CI2b, sugerindo que possivelmente a carbonila está interagindo de



alguma maneira com a CD, de forma que seu sinal foi suprimido. (DENG et al., 2022a) também observaram o desaparecimento da banda referente à carbonila e sugerem que ao se formar o complexo de inclusão, a cavidade da CD sobrepõe esse sinal.

Figura 55- Espectro da região do FTIR para BCA2,  $\beta$ -CD, CI2b e MF2, metodologia 2



Fonte: Do autor (2023)

### 5.5. Dissolução *in vitro*

O ensaio de dissolução *in vitro* é um teste físico-químico que determina quantidade de uma substância que se dissolvem no meio em um determinado período. O objetivo de se obter um perfil de dissolução foi prever ou simular o comportamento de um princípio ativo (DE SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007). Este ensaio permite a verificação do aumento inerente na solubilidade das moléculas após a formação de complexos de inclusão. O aumento na solubilidade intrínseca da molécula, pode estar relacionado ao aumento na biodisponibilidade das moléculas, uma vez que moléculas pouco solúveis, mesmo que sejam biologicamente ativas *in vitro*, dificilmente estão disponíveis quando testadas *in vivo* (BOU-CHACRA et al., 2017; RAJEWSKI; STELLA, 1996).

Através do teste de dissolução *in vitro*, foi possível verificar os perfis de dissolução para o complexo CI1b (BCA1 e  $\beta$ -CD) e para CI2b (BCA2 e  $\beta$ -CD) e para as moléculas

pura BCA1 e BCA2. Observa-se que os complexos se dissolvem mais rapidamente do que as moléculas puras (Figura 56), verificando um aumento em sua solubilidade intrínseca.

Foi determinado que 9,6% das moléculas estavam solúveis após 30 minutos ( $DP_{30}$ ), enquanto após 180 minutos, tempo total do ensaio, não foram dissolvidos 50% do composto ( $T_{50}$ ) para a amostra BCA2, substância pura (Tabela 10). Para o Cl2b, 34% foram dissolvidos após 30 min e 50% do composto foi detectado em solução após 55 min.

Para a molécula BCA1 após 30 minutos 8,52 % das moléculas estavam dissolvidas, no tempo em que foi realizado o experimento não chegou a 50% da molécula dissolvida. Para o Cl1b, 53,66% foram dissolvidos após 30 min e 50% do composto foi detectado em solução após 25 min.

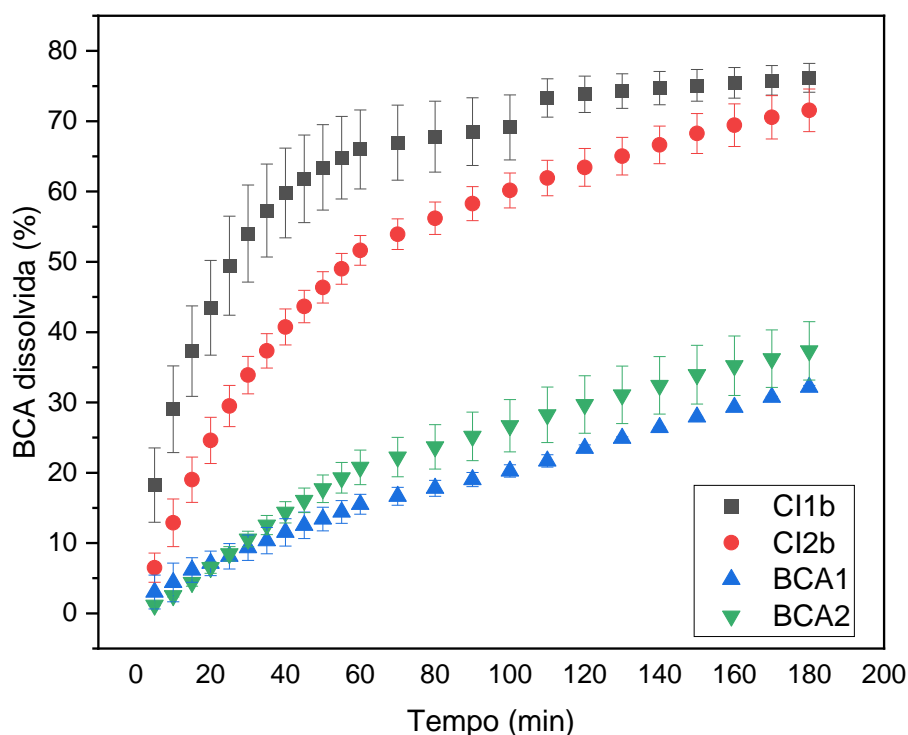
Diversos trabalhos na literatura observaram esse aumento na dissolução da molécula hospede, como exemplo, podemos citar o complexo de inclusão com a piperina e a  $\beta$ -CD modificada com etilenodiamina, esse sistema libera 100% da molécula em 1 hora, sendo que liberada quando o experimento é realizado para a molécula pura é de 40% (LIU et al., 2020). Para o complexo entre a diosmina e a HP  $\beta$ -CD, foi observado que 63,63% da molécula estava dissolvida após 30 minutos e apenas 16,25%, quando foi usado a molécula pura (AI et al., 2014).

Esses valores observados na literatura são superiores ao observado para os complexos de inclusão entre a  $\beta$ -CD e BCA1/BCA2, e para a molécula pura, pois essas moléculas são consideravelmente mais apolares que as dos exemplos. Porém, ao comparar com o complexo de inclusão obtido por liofilização entre a  $\beta$ -CD e a hidroquinolina, foi possível observar que o tempo necessário para 50% da molécula estar dissolvida foi de 70 minutos (PINTO et al., 2021), um tempo maior que o observado nesse trabalho, isso pode ser um indicativo de formação de complexos de inclusão mais estável.

Embora, várias teorias sejam propostas acerca da melhora na dissolução ao formar o complexo de inclusão ou não-inclusão, por exemplo, o processo ainda não é totalmente compreendido. Entretanto, alguns dos efeitos que podem contribuir para um aumento na dissolução, descritos na literatura como a diminuição da tensão interfacial entre a molécula e o solvente, isso se deve a proporção hidrofílica da molécula hospedeira (RUAN et al., 2005). Outros fatores predominantes são: diminuição no estado cristalino da molécula, pois ao formar o complexo de inclusão a molécula tende a passar para um estado amorfo, assim como

uma diminuição no tamanho da partícula (CRAIG, 2002). E o aumento na molhabilidade, ou seja, ocorre o umedecimento da superfície hidrofóbica da molécula devido a solubilização da ciclodextrina (DUA et al., 2011).

Figura 56- Perfil de dissolução em água da molécula de benzo[c]acridinona (BCA1 e BCA2) e dos complexos de inclusão BCA1/ $\beta$ -CD e BCA2/ $\beta$ -CD obtido pelo método de liofilização na proporção 1:1.



Fonte: Do autor (2023)

Tabela 10- Taxa de dissolução em água para BCA2 e complexo de inclusão BCA2/ $\beta$ -CD em água

Amostras	DP <sub>30</sub> (%)	T <sub>50</sub> (min)
BCA2	9,6	> 180
CI2b	34,0	55
BCA1	8,52	> 180
CI1b	53,66	25

Fonte: Do autor

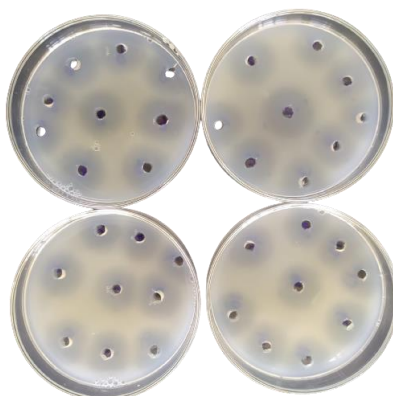
## 5.6. Atividade biológica

### 5.6.1. Atividade sobre a fosfolipase A2

O ensaio da atividade fosfolipásica permitiu observar os efeitos da molécula sobre os processos inflamativos, devido a inibição da fosfolipase A2. Essa enzima é responsável por catalisar a clivagem da porção lipídica da membrana plasmática, nesse experimento, foi utilizado a gema de ovo como substrato, fonte de fosfolípidios (KUPFERBERG; YOKOYAMA; KÉZDY, 1981). Utilizou o cloreto de cálcio como cofator enzimático, uma vez que o  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial no mecanismo de hidrólise dos fosfolípidios (TEIXEIRA et al., 2020). Esse experimento foi realizado usando a mesma proporção da molécula, tanto em sua forma pura ou complexo.

Foram medidos os halos formados (Figura 57) e os dados obtidos foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey*.

Figura 57- Atividade da enzima fosfolipase A2, demonstrada pela formação dos halos

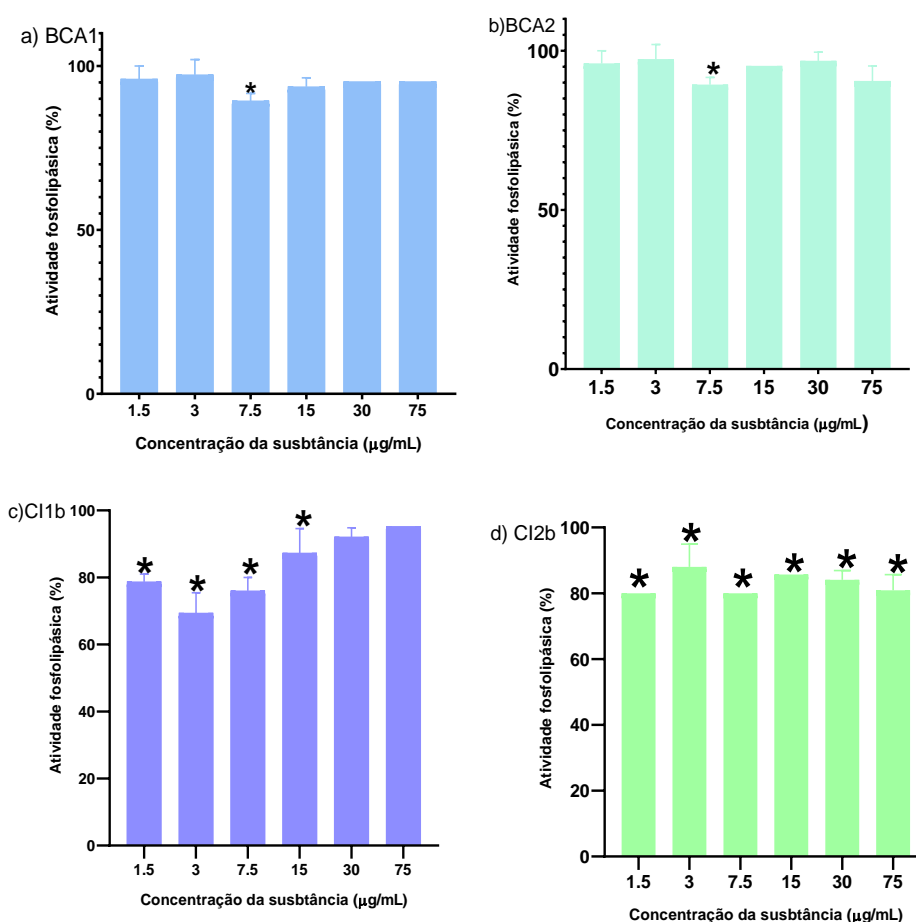


Fonte: Do autor (2023)

Além disso, foi obtido o controle, a amostra que continha apenas a peçonha, sem nenhum tratamento, ela foi considerada como referente a 100% da atividade fosfolipásica e a partir dela foi calculado a porcentagem de atividade para cada tratamento. Foi plotado os gráficos para cada tratamento, sendo a) BCA1, b) BCA2, c) CI1b (complexo de inclusão obtido entre BCA1 e  $\beta$ -CD) e d) CI2b (complexo de inclusão obtido entre BCA1 e  $\beta$ -CD) (Figura 58).

Ao usar as concentrações de 15, 30 e 75  $\mu\text{g}$  os melhores resultados foram obtidos para o tratamento utilizando o complexo de inclusão CI2b, obtendo 85,71, 84,09%, 80,92 da atividade fosfolipásica.

Figura 58: Efeitos da molécula a) BCA1 b) BCA2 c) CI1b e d) CI2b sobre a atividade fosfolipásica (%) induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*. O controle positivo (10  $\mu$ g) foi considerado como 100% de atividade enzimática. Os resultados foram expressos como as médias das triplicatas obtidas em cada concentração da substância e seus desvios padrão. \* As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Do autor

Todas as amostras testadas BCA1, BCA2, CI1b e CI2b, apresentaram bons resultados, diferenciaram estatisticamente do controle na concentração de 7,5  $\mu$ g, obtendo 89%, 89%, 76% e 80%, respectivamente. Nessa concentração, foi possível observar que os complexos foram mais eficientes para inibir a atividade fosfolipásica.

Os resultados obtidos um potencial para reduzir a atividade fosfolipásica, utilizando baixas concentrações da substância, ao utilizar o complexo de inclusão, em uma quantidade proporcional a da molécula pura, observa-se uma redução na atividade da enzima quando comparado com o composto puro. Foi obtido uma redução em torno de 13-30% da atividade

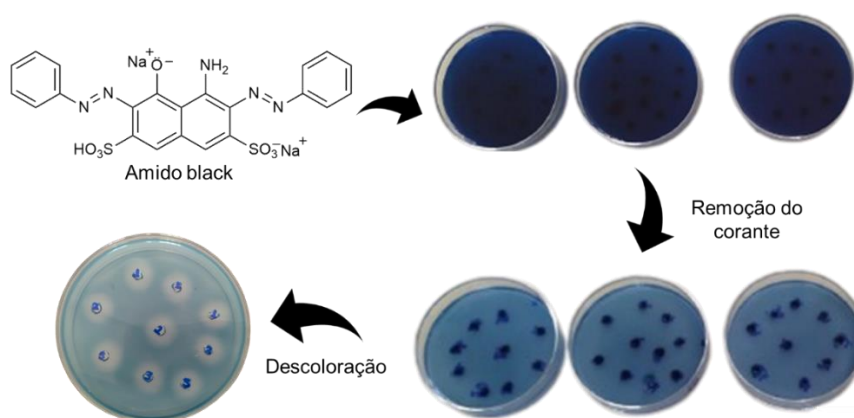
enzimática para os derivados de benzo[c]acridinonas complexados ou não com a CD, de acordo com os valores descritos na literatura.

Como para o derivado da poliidroquinolina, que se utilizou concentrações na faixa 50-125 mg e teve uma redução de 30% na atividade fosfolipídica (MACHADO et al., 2021). Alguns estudos com extratos de plantas também obtiveram valores similares utilizando concentrações na faixa de 5 a 400 µg para a inibição entre 12-16 % da atividade da enzima (MARQUES et al., 2021).

### 5.6.2. Atividade proteolítica sobre a caseína

A caseína foi utilizada no ensaio de atividade proteolítica. Ao ser quebrada por uma enzima protease, presente na peçonha de cobras, como as serina proteases, libera aminoácidos e fragmentos de peptídeos. Foi adicionado o amido black, que reage com as proteínas, fazendo com que sua coloração fique azul, conforme mostrado na Figura 59 (WILSON, 1979). Posteriormente, ocorre a descoloração das placas, utilizando o ácido acético, para a verificação dos halos, que foram medidos e convertidos em porcentagem, considerando o valor obtido para o controle, contendo apenas a peçonha, como 100%. Além disso, não foi verificada a formação de halos para os controles negativos. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey*.

Figura 59- Estrutura do amido black usado na coloração das placas contendo agar, substrato e os tratamentos (pós- incubação) e os halos, pós-descoloração.



Fonte: Do autor (2023)

A molécula de BCA2 e o complexo de inclusão (CI2b) (Figura 60) reduziram a atividade proteásica em todas as concentrações e diferiram estatisticamente do controle, sendo as porcentagens de inibição para as concentrações 1,5; 3; 7,5; 15; 30 e 75 µg para BCA2: 91,3%, 84,78%, 86,95%, 84,78%, 78,26% e 84,78% e para CI2b: 78,26%, 78,26%, 82,61%, 78,26%,

78,26% e 80,43%, respectivamente (Tabela 11). Foi verificado que, ao comparar a molécula pura com a mesma concentração da molécula complexada, houve um efeito significativo sobre a atividade enzimática, demonstrado por um aumento na inibição da enzima

A molécula BCA1 (Figura 60) diferenciou-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do controle nas concentrações de 3; 7,5 e 30  $\mu\text{g}$ , reduzindo a atividade em 10,87% nas três concentrações, enquanto o complexo de inclusão reduziu a atividade enzimática nas concentrações 1,5; 3; 15; 30 e 75  $\mu\text{g}$  em 15,22%, 19,57%, 8,7% e 15,22%, 19,57%, respectivamente. Nesse estudo foi observado que as concentrações de 3 e 30  $\mu\text{g}$  foram as melhores em reduzir a atividade proteásica para todos os tratamentos.

Tabela 11- Médias em porcentagem obtidas para cada tratamento para BCA1, BCA2 CI1b e CI2b sobre a atividade proteásica. \* As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

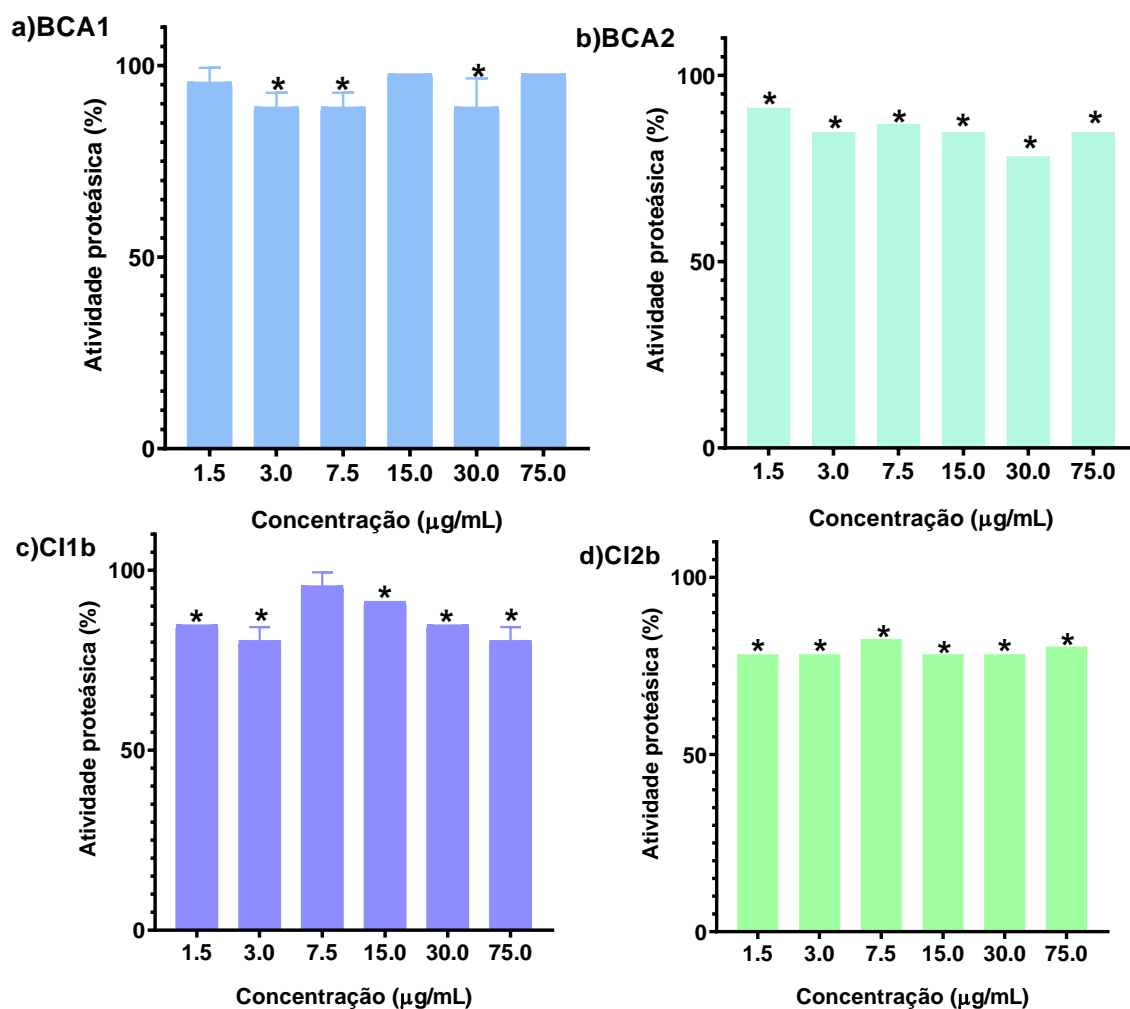
Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	BCA 1	BCA2	CI1b	CI2b
1.5	95.66	91.3*	84.78*	78.26*
3	89.13*	84.78*	80.43*	78.26*
7.5	89.13*	86.95*	95.66	80.43*
15	97.84	84.78*	91.3*	78.26*
30	89.13*	78.26*	84.78*	78.26*
75	97.84	84.78*	80.43*	80.43*

Fonte: Do autor (2023)

Esses resultados estão de acordo com os dados descritos na literatura. Diversos trabalhos relatam a atividade da enzima protease em extratos de diferentes espécies de plantas, como *Averrhoa carambola* L. (carambola) (OLIVEIRA et al., 2021) e *Morinda citrifolia* (noni) (MARQUES et al., 2021). Com a substância isolada/ou composto sintético, pode-se se mencionar o estudo utilizando o ácido vanílico para inibir a atividade proteásica sobre a caseína, em que se obteve porcentagens de inibição entre 10-20% com concentrações da substância entre 4-400  $\mu\text{g}$ , utilizando peçonha de diferentes espécies de serpentes (CESAR et al., 2021).

Compostos orgânicos como as benzo[c]acridinonas podem se ligar ao sítio de coordenação no interior das proteases, modificando sua forma e, conseqüentemente, causando alterações na sua atividade (OLIVEIRA et al., 2021).

Figura 60- Efeitos da molécula a) BCA1 b) BCA2 c) CI1b e d) CI2b sobre a atividade proteásica (%) induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*. O controle positivo (10 µg) foi considerado como 100% de atividade enzimática. Os resultados foram expressos como as médias das triplicatas obtidas em cada concentração da substância e seus desvios padrão. \* As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Do autor (2023)

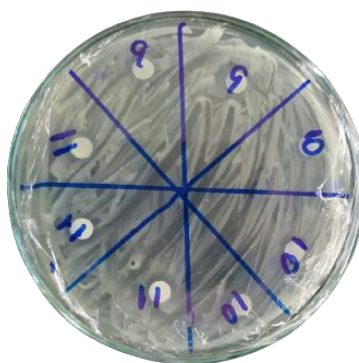
### 5.6.3. Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana foi relatada para vários derivados das benzo[c]acridinonas, demonstrando potencial para reduzir o crescimento de diversos micro-organismos (NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009). Para verificar se os complexos de inclusão causam algum efeito sobre a bactéria *Bacillus subtilis* (gram positiva) e *Escherichia Coli* (gram negativa), foi realizado o ensaio de difusão em dico.



Para a *E. coli* não foi observado a formação de halos em nenhum dos tratamentos e nas condições utilizadas, entretanto, Nadaraj e colaboradores (2009), verificaram a inibição do crescimento bacteriano para uma série de derivados das benzo[c]acridinonas. Esse fenômeno é constantemente observado em fungos e bactérias, devido as diferentes cepas existentes e a capacidade de mutação desses microorganismos (BRIDIER *et al.*, 2011; KYAW; ARORA; LIM, 2012). Foi observado a formação de halos para a bactéria *Bacillus subtilis* (Figura 61), que indicam a zona de inibição do crescimento bacteriano, tanto para a molécula pura como para os complexos de inclusão.

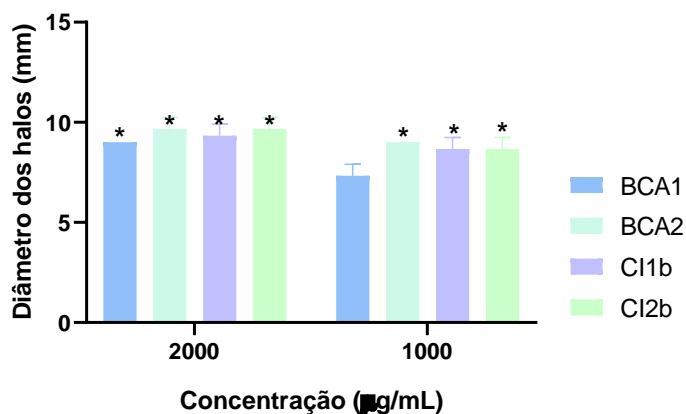
Figura 61- Halos de inibição causados pelos derivados de benzo[c]acridinonas sobre a bactéria *Bacillus subtilis*



Fonte: Do autor (2023)

Para todos os tratamentos foi observado o aparecimento de halos de inibição e as médias dos resultados podem ser observadas na (Figura 62).

Figura 62- Gráfico das médias dos halos de inibição para *Bacillus subtilis*. \* As médias diferem estatisticamente do respectivo controle positivo - teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Do autor (2023)

Na concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , todos os tratamentos diferenciaram estatisticamente do controle negativo, mas não houve diferença entre estatística entre nenhum dos tratamentos testados, sendo os valores médios dos halos de BCA1- 9 mm, BCA 2- 9,67 mm, CI1b- 9,33 mm e CI2b- 9,67 mm. Na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , a molécula BCA1 não foi diferente estatisticamente do controle, entretanto o complexo de inclusão com esse derivado, BCA1, demonstrou maior potencial de inibir o crescimento bacteriano que a molécula pura, sendo as médias do halo de inibição para BCA1 de 7,33 mm e para CI1b de 8,67 mm. Já entre BCA2 e CI2b, não teve diferença estatística, sendo a média dos seus halos de inibição 9 mm e 8,67mm, respectivamente.

A  $\beta$ -CD não apresenta atividade antimicrobiana, o que está de acordo com vários dos relatos descritos na literatura. Ou seja, a atividade observada é referente a molécula de benzo[c]acridinonas e os valores observados estão próximos aos descritos (NADARAJ; SELVI; MOHAN, 2009).

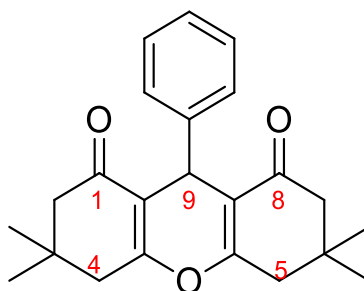
A formação do complexo de inclusão aparentemente não influenciou na atividade bactericida da molécula (LI et al., 2017). Resultados similares foram observados ao formar complexo de inclusão com o ácido clorogênico e a  $\beta$ -CD, não foi observado diferenças estatísticas entre a molécula pura e o complexo (ZHAO et al., 2010). Entretanto, outros trabalhos relatam uma atividade melhorada, como entre o eugenol e a  $\beta$ -CD, os autores relataram que possivelmente a ciclodextrina impediu a volatilização rápida o que causou benefícios na atividade biológica (WANG et al., 2011).

### **5.7. Reações paralelas e subprodutos**

Durante as análises dos experimentos de DSC e RMN para as moléculas BCA1 e BCA2 foi observado que elas não estavam puras. A formação de compostos de reações paralelas fora relatada, na obtenção de compostos em que se utiliza a 1-naftilamina. A presença de subprodutos utilizando uma metodologia similar, com o uso de refluxo, para as benzo[c]acridinonas foi mencionado na literatura, sendo necessário o uso de cromatografia líquida de alta resolução para obter o produto com maior pureza (MAGALHAES, 2019).

Os dados sugerem que o composto contaminante é um xanteno (XAN), como o 3,3,6,6-tetrametil-9-fenil-3,4,5,6,7,9-hexahidro-2H-xantheno-1,8-dione (Figura 63). Esse composto foi relatado como subproduto de outras reações, foi sintetizado de forma simultânea junto com o decahidroacridine-1,8-diona, o estudo tinha como finalidade aplicar essas moléculas para aplicações de bicromóforos em fotofísica (MARTINEZ GOMEZ et al., 2014).

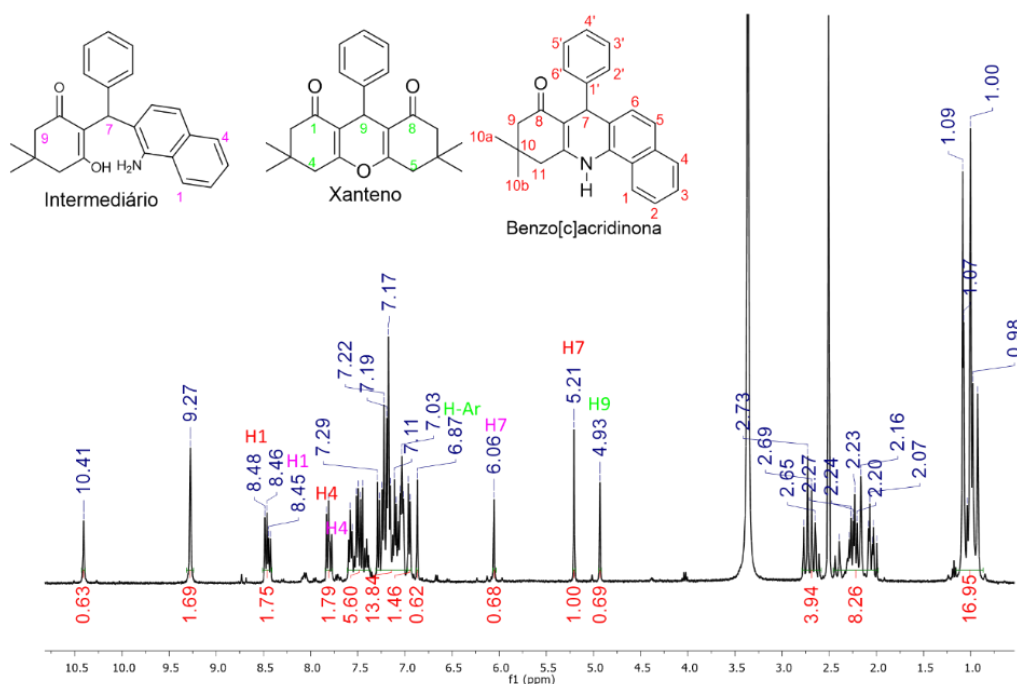
Figura 63- Estrutura do 3,3,6,6 tetrametil-9-fenil-3,4,5,6,7,9-hexahidro-2H-xanteno-1,8-dione



Fonte: Do autor

A comprovação da formação desse composto pode ser obtida a partir do espectro de RMN DE  $^1\text{H}$ , um espectro com maior grau de contaminantes foi usado para verificar e provar a presença do xanteno. No espectro é possível observar a presença de um sinal em 4,93, referente ao carbono 9, também foi observado a presença dos carbonos metilenos que estão sobrepostos aos sinais do grupo  $\text{CH}_3$  da molécula. Além disso, são observados sinais entre 6,88-7,30 que possivelmente pertence a essa molécula. Na literatura essa molécula os valores de deslocamentos químicos encontrados para ela são RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ): 7,26-6,89 (m, 5H), 4,93 (s, 1H C-9), 2,42 e 2,03 (8H,  $\text{CH}_2$ ) e 0,9 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ) (MOHAMMADIAN; AKHLAGHINIA, 2018).

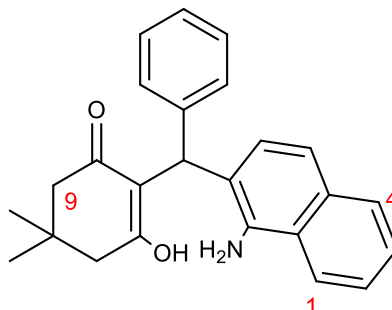
Figura 64- Espectro de RMN mostrando os hidrogênios referentes as moléculas de xanteno, intermediário e benzo[c]acridinona



Fonte: Do autor

Foram observados outros sinais no RMN de  $^1\text{H}$ , acredita-se que além do xanteno, essa amostra contém um intermediário reacional (Figura 64).

Figura 65- Intermediário reacional, isolado junto com a benzo[c]acridinona



Fonte: Do autor

A presença desse composto pode ser evidenciada pela presença de hidrogênios metílicos com deslocamento em 1 e 1,09 ppm. Além disso, o sinal em 8,42-8,54 ppm indica a presença do H-1. Outro indicativo é a presença de um hidrogênio singlete em 6,05 referente ao H-7, ele aparece mais desblindado, pois esse hidrogênio possui uma maior mobilidade, podendo se aproximar dos grupos OH e  $\text{NH}_2$ , que contém átomos doadores de ligação de hidrogênio. A observação desse composto sugere que é necessário um maior tempo reacional para um maior rendimento do produto.

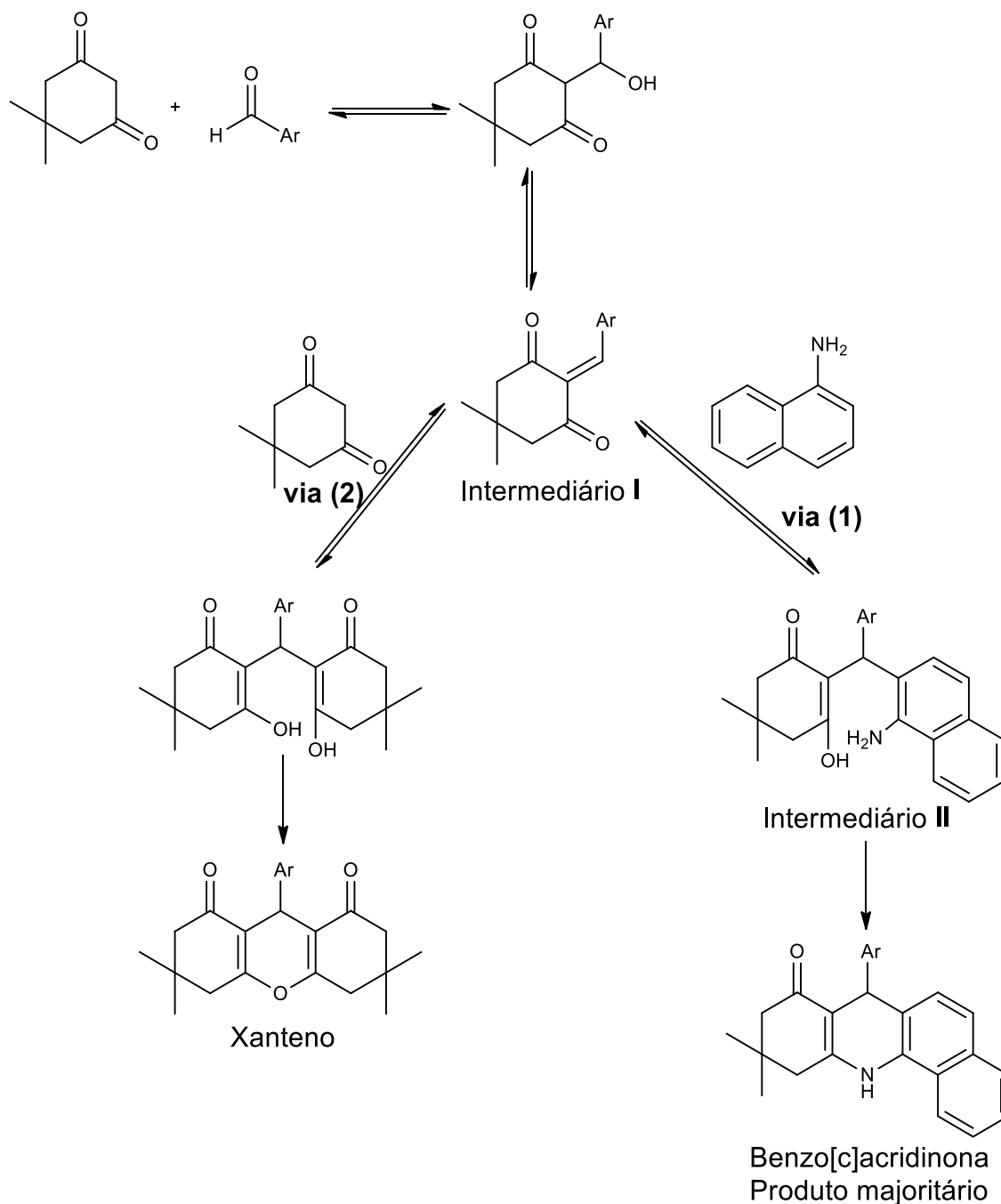
A presença do xanteno e de um intermediário reacional similar foi observado como subprodutos na reação para a obtenção de benzoxantenos. Neste trabalho o autor observou que ao modificar condições experimentais como o tempo, temperatura, quantidade de catalisador e o tipo de catalisador e o solvente, mudou a quantidade do produto majoritário e dos contaminantes (xanteno e intermediário) (LI; LU; SU, 2010)

O mecanismo para obtenção das benzo[c]acridinonas, segue a via (1 (Figura 66) tem a formação do intermediário I, através de uma condensação de Knoevenagel, ocorre a saída de um átomo de hidrogênio entre as duas carbonilas. Esse ânion se conecta ao carbono carbonílico do benzaldeído, seguida de uma reação de eliminação.

O intermediário II, que foi um dos contaminantes observados foi formado através da reação do intermediário I com a 1-naftilamina. A benzo[c]acridinona é formada através da ciclização intramolecular.

A via (2) (Figura 66) é uma reação paralela, onde o intermediário I, reage com outra molécula de dimedona, seguida de uma ciclização intramolecular com a liberação de uma molécula de água e a formação do xanteno.

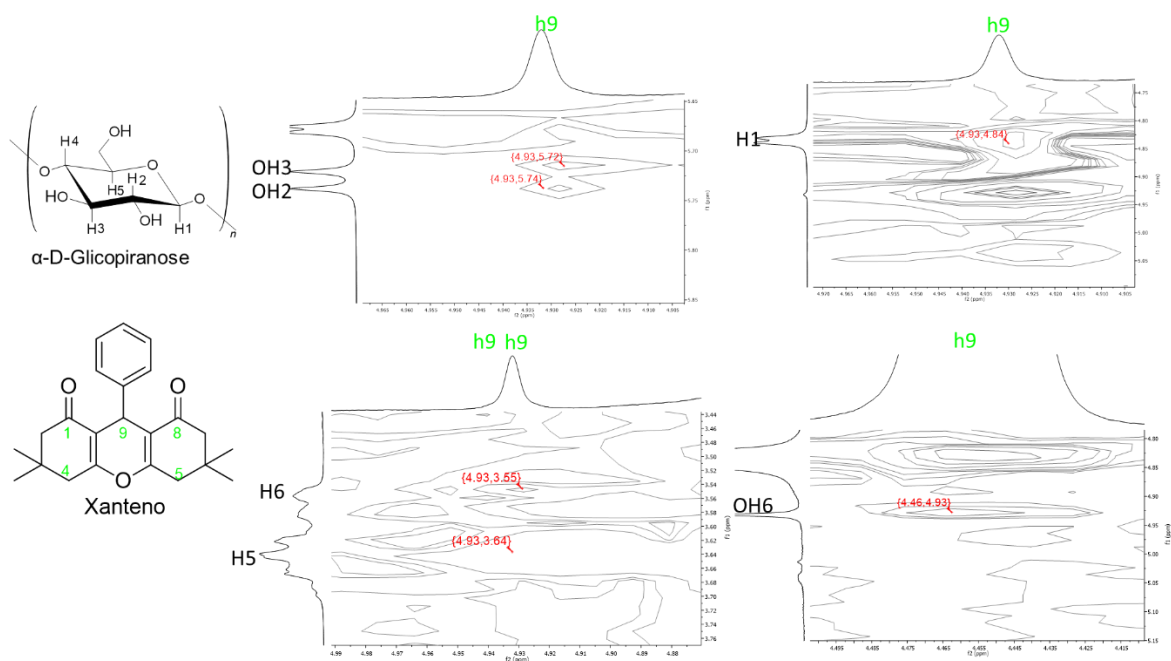
Figura 66- Mecanismo reacional para obtenção das benzo[c]acridinonas (1) e reação paralela para formação dos xantenos



No CI2 não foi observado a formação de complexos inclusão entre a molécula contaminante e a CD, observou-se apenas a formação do CI com a benzo[c]acridinona, uma possível justificativa, talvez seja a maior proporção desse composto, não sendo influenciado pelo xanteno.

Entretanto no CI1 foi observado a interação do xanteno com a ciclodextrinas, formando complexo de inclusão. Sendo comprovado através das correlações no ROESY, observou-se correlação, principalmente entre o h9 (do xanteno) com H5, OH2, OH3, OH6 e H1 e H6, hidrogênios da ciclodextrina (Figura 67). Sugerindo que o xanteno possivelmente pode-se ligar a ciclodextrina tanto pelo lado externo como pelo interno, interagindo pela borda estreita. E isso pode justificar os valores de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para o complexo 1, uma vez que foi observado alteração no hidrogênio 5 (variação no deslocamento químico de -0,01), e possivelmente é referente a formação do CI entre a CD e o xanteno.

Figura 67- Partes do espectro de ROESY 2D obtido para o complexo de inclusão entre BCA1 e B-CD pela metodologia 2



Fonte: Do autor

## 6. CONCLUSÃO

Apesar de ter encontrados dificuldades para obter as benzo[c]acridinonas com maior pureza, elas foram sintetizadas de forma majoritária para os dois compostos, sendo necessário possivelmente uma etapa adicional de purificação, quando for observado a presença de impurezas. As técnicas de Espectroscopia de ressonância magnética nuclear e Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier foram técnicas essenciais para a caracterização dessas moléculas, podendo identificar e caracterizar esses subprodutos.

Nos ensaios preliminares das benzo[c]acridinonas foi demonstrado que elas podem formar complexo de inclusão com diversas ciclodextrinas, sendo a  $\beta$ -CD uma das mais eficientes para ambas as moléculas. Além disso, essa ciclodextrina também aumentou em duas vezes a solubilidade da molécula, indicado pelo estudo da isoterma de solubilidade.

Apesar disso, os complexos de inclusão podem ser formados com o derivado 2 (BCA2). Enquanto para o derivado 1 (BCA1), foi observado os complexos de não-inclusão (CNI). Seria interessante verificar se com a ausência de impurezas formaria o complexo de inclusão, uma vez que foi verificado a presença de complexos com o xanteno. As técnicas usadas para a caracterização dos complexos de inclusão foram suficientes para comprovar a formação dos CI e CNI, através das interações entre os átomos de hidrogênio da estrutura tridimensional, alterações nas intensidades dos sinais em FTIR e dos picos em calorimetria exploratória diferencial.

A formação de complexos de inclusão e não inclusão favoreceram a taxa de dissolução da molécula em ambos os casos, sugerindo uma maior disponibilidade da molécula em solução.

Para as atividades biológicas: atividade fosfolipásica, caseínolítica e antibacteriana, a molécula pura apresentou potencial para serem utilizadas. E quando associada a  $\beta$ -CD teve seu potencial ampliado, principalmente em menores concentrações.

Desta forma, utilizar as ciclodextrinas como materiais para alterar as propriedades físico-químicas dessa classe de compostos podem ser realizadas de forma eficaz, com melhorias na solubilidade intrínseca e no potencial biológico, tanto na formação de complexos de inclusão como os complexos de não inclusão.

Como perspectivas futuras é interessante testar a formação dos complexos de inclusão dessas moléculas com ciclodextrinas mais solúveis com a Y-CD e a SBE-CD. Como são

ciclodextrinas mais solúveis, podem aumentar a proporção de solubilidade das moléculas dessa classe. Também seria interessante o uso de outros aldeídos, a fim de obter, benzo[c]acridinonas com maior potencial biológico.

De acordo com os resultados obtidos é possível inferir que o complexo de inclusão obtido a partir da molécula 2, foi mais eficiente para a formação do complexo de inclusão e apresentou uma maior inibição na atividade fosfolipásica, proteolítica e antibacteriana.



## REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, H. et al. Cyclodextrin Enhances Corneal Tolerability and Reduces Ocular Toxicity Caused by Diclofenac. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Mina, v. 2018, p. 1-13, fev. 2018.
- ABDOLMOHAMMADI, S.; MOHAMMADNEJAD, M.; SHAFAEI, F. TiO<sub>2</sub> Nanoparticles as an Efficient Catalyst for the One-pot Preparation of Tetrahydrobenzo[c]acridines in Aqueous Media. **Zeitschrift Für Naturforschung B**, Tehran, v. 68, n. 4, p. 362-366, abr. 2013.
- AGUIAR, U. N. et al. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β-ciclodextrina. **Química Nova**, Teresina, v. 37, n. 1, p. 50-55, set. 2014.
- ALONSO, L.; CALVO, M. V.; FONTECHA, J. The influence of β-cyclodextrin on the reduction of cholesterol content in egg and duck liver pâté. **Foods**, Asturias v. 8, n. 7, p. 241-247, jul. 2019.
- ARRUDA, T. R. et al. Natural bioactives in perspective: The future of active packaging based on essential oils and plant extracts themselves and those complexed by cyclodextrins. **Food Research International**, Viçosa, v. 156, n. March, p. 1-23, mar. 2022.
- ASTRAY, G.; MEJUTO, J. C.; SIMAL-GANDARA, J. Latest developments in the application of cyclodextrin host-guest complexes in beverage technology processes. **Food Hydrocolloids**, Ourense, v. 106, n. 105882, p. 1-9, mar. 2020.
- BABAEI, S. et al. 1,10-Phenanthroline-Based Molten Salt as a Bifunctional Sulfonic Acid Catalyst: Application to the Synthesis of N-Heterocycle Compounds via Anomeric Based Oxidation. **ChemistrySelect**, Hamedan, v. 3, n. 31, p. 8947–8954, ago. 2018.
- BEDNAREK, E.; BOCIAN, W.; MICHALSKA, K. Nuclear magnetic resonance spectroscopic study of the inclusion complex of (R)-tedizolid with HDAS-β-CD, β-CD, and γ-cyclodextrin in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Warsaw, v. 169, p. 170–180, fev. 2019.
- BEHBAHANI, F. K.; FARAHANI, M. Iron (III) phosphate catalyzed synthesis of 7, 10, 11, 12 tetrahydrobenzo [c] acridin 8 (9 H) ones. **Russian Chemical Bulletin**, Karaj, v. 64, n. 1, p. 151–153, jan. 2015.
- BEHBAHANI, F. S. et al. Synthesis and biological evaluation of novel benzo[c]acridine-diones as potential anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors. **Archiv der Pharmazie**, Mashhad, v. 352, n. 6, p. 1-12, mar. 2019.
- BHARGAV, A.; SHEEBA, F. R.; Bhargav, A. Beta-Cyclodextrin as an Excipient In Drug Formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, Silvepura Bangalore, v. 9, n. 4, p. 122–127, ago. 2021.
- BOSICA, G. et al. Green Organic Synthesis via Multicomponent Reactions. **Science Journal of the Malta Chamber of Scientists**, Msida, v. 9, n. Special Issue, p. 173–179, set. 2021.
- BRAGA, S. S. Cyclodextrins: Emerging medicines of the new millennium. **Biomolecules**, Aveiro, v. 9, n. 12, p. 801–819, nov. 2019.
- BRINKERHOFF, R. C. et al. Evaluation of the antioxidant activities of fatty polyhydroquinolines synthesized by Hantzsch multicomponent reactions. **RSC Advances**, Rio Grande, v. 9, n. 43, p. 24688–24698, jul. 2019.
- CHEN, M. N. et al. Magnetic nanocatalysts: Synthesis and application in multicomponent reactions. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, Shijiazhuang, v. 15, p. 27–37, set. 2019.
- CIOC, R. C.; RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. Multicomponent reactions: Advanced tools for sustainable organic synthesis. **Green Chemistry**, Amsterdam, v. 16, n. 6, p. 2958–2975, fev. 2014.

- CORTÉS, E. et al. Synthesis and Spectra of 7-(o- and p-R-Phenyl) -10,10-dimethyl-8,9,10,11-tetrahydrobez[c]acridin-8-ones. **Journal Heterocyclic Chemical**, Coyoacán, v. 25, p. 895-899, mai./jun. 1987.
- CRINI, G. Review: A history of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, Besançon, v. 114, n. 21, p. 10940–10975, set. 2014.
- DA CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Santiago de Compostela, v. 28, n. 1, p. 1–9, ago. 2007.
- DE CARVALHO, L. B.; PINTO, L. De M. A. Formation of inclusion complexes and controlled release of atrazine using free or silica-anchored  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Lavras, v. 74, n. 1–4, p. 375–381, mar. 2012.
- DE JESUS, M. B. et al. Non-inclusion complexes between riboflavin and cyclodextrins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Campinas, v. 64, n. 6, p. 832–842, jan. 2012.
- DE MIRANDA, J. C. et al. Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 665–681, out./dez. 2011.
- DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, Salamanca, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, jul. 2004.
- DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, Grenoble, v. 7, n. 17, p. 1703–1724, nov. 2001.
- DENG, C. et al. Formation and stabilization mechanism of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex with C10 aroma molecules. **Food Hydrocolloids**, Hefei, v. 123, n. June 2021, p. 107013, fev. 2022.
- DENIS, J. D. St. et al. Fragment-based drug discovery: opportunities for organic synthesis. **RSC Medicinal Chemistry**, Cambridge, v. 12, n. 3, p. 321–329, dez. 2021.
- DOOST, A. S. et al. A review on nuclear overhauser enhancement (NOE) and rotating frame overhauser effect (ROE) NMR techniques in food science: Basic principles and applications. **Trends in Food Science and Technology**, Coupure, v. 86, p. 16–24, abr. 2019.
- DUTTA, A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization**, Aurangabad, v. 2, p. 73-93, mai. 2017.
- EZZATZADEH, E.; HOSSAINI, Z. A novel one-pot three-component synthesis of benzofuran derivatives via Strecker reaction: Study of antioxidant activity. **Natural Product Research**, Ardabil, v. 34, n. 7, p. 923–929, dez. 2020.
- FICARRA, R. et al. Study of flavonoids/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Catanzaro, v. 29, n. 6, p. 1005–1014, ago. 2002.
- FILHO, J. F. A. et al. Multicomponent Mannich reactions: General aspects, methodologies and applications. **Tetrahedron**, Vitoria, v. 73, n. 50, p. 6977–7004, out. 2017.
- FUNICELLO, M. et al. Biginelli Reaction and  $\beta$ -Secretase Inhibition: A Multicomponent Reaction as a Friendly Educational Approach to Bioactive Compounds. **Journal of Chemical Education**, Potenza, v. 98, n. 5, p. 1756–1761, abr. 2021.
- GHASHANG, M.; MANSOOR, S. Sheik; ASWIN, K. Succinimide-N-sulfonic acid: An efficient and recyclable catalyst for the one-pot synthesis of tetrahydrobenzo[c]acridine-8(7H)-one derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, Melvisharam, v. 21, p. S44–S51, out. 2017.

- GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **Journal of Biomolecular Techniques**, Tehran v. 21, n. 1, p. 167–193, dez. 2010.
- GU, Y. Multicomponent reactions in unconventional solvents: State of the art. **Green Chemistry**, Wuhan, v. 14, n. 8, p. 2091–2128, mai. 2012.
- HAAS, J.; MIZAIKOFF, B. Advances in Mid-Infrared Spectroscopy for Chemical Analysis. **Annual Review of Analytical Chemistry**, Ulm, v. 9, p. 45–68, abr. 2016.
- HERAVI, M. M. et al.  $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$  and  $\text{H}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}$   $18\text{H}_2\text{O}$ -catalyzed, three-component, one-pot synthesis of benzo[c]acridine derivatives. **Synthetic Communications**, London, v. 42, n. 14, p. 2033–2039, set. 2012.
- HERAVI, M. R. P.; AGHAMOHAMMADI, P. L-Proline-catalysed one-pot synthesis of tetrahydrobenzo[c]acridin-8(7H)-ones at room temperature. **Comptes Rendus Chimie**, Tehran, v. 15, n. 5, p. 448–453, jan. 2012.
- HERAVI, M. R. P. et al. Electrocatalytic multicomponent assembling of aldehydes, dimedone and 1-naphthylamine for synthesis of novel tetrahydrobenzo[c]acridin-8(7H)-one derivatives. **Quarterly Journal of Iranian Chemical Communication**, Tehran, v. 6, n. 0, p. 380–388, out. 2018.
- HOUCK, E. B. H.; YOUNAI, A.; SHAW, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, Davis, v. 14, n. 3, p. 371–382, abr. 2010.
- IBARRA, I. A.; ISLAS-JÁCOME, A.; GONZÁLEZ-ZAMORA, E. Synthesis of polyheterocycles via multicomponent reactions. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Ciudad de México, v. 16, n. 9, p. 1402–1418, jan. 2018.
- IONASHIRO, M. **Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial**. Araraquara: Editora GIZ, p. 1–98, 2004.
- JACOBSEN, N. E. **NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology**. Arizona: John Wiley & Sons, Inc, p. 551–626, 2007.
- JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complexes. **Drug Discovery Today**, Bradenton, v. 21, n. 2, p. 356–362, fev. 2016.
- JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties, and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Reykjavík, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, nov. 2018.
- JIANG, S. et al. Preparation and characterization of tea tree oil/ hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex and its application to control brown rot in peach fruit. **Food Hydrocolloids**, Ningbo, v. 121, n. May, jul. 2021.
- KOUZNETSOV, V. V.; GALVIS, C. E. P. Strecker reaction and  $\alpha$ -amino nitriles: Recent advances in their chemistry, synthesis, and biological properties. **Tetrahedron**, Piedacuesta, v. 74, n. 8, p. 773–810, dez. 2018.
- KOVAL'SKAYA, S. S.; KOZLOV, N. G.; DIKUSAR, E. A. Synthesis of chiral benzoacridinone derivatives by three-component condensation of [(1S,4Sr)-1,7,7-Trimethyl-bicyclo [2.2.1] hept-2-ylidene] acetaldehyde with naphthalen-1-amine and cyclic  $\beta$ -diketones. **Russian Journal of Organic Chemistry**, Minsk, v. 46, n. 8, p. 1121–1134, jun. 2010.

- KRINGEL, D. H. et al. Production, Characterization, and Stability of Orange or Eucalyptus Essential Oil/ $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex. **Journal of Food Science**, Pelotas, v. 82, n. 11, p. 2598–2605, nov. 2017.
- KUMAR, N. P. et al. Microwave-assisted one-pot synthesis of new phenanthrene fused-tetrahydrodibenzo-acridinones as potential cytotoxic and apoptosis inducing agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Hyderabad, v. 151, p. 173–185, mar. 2018.
- LAMBERTH, C. Multicomponent reactions in crop protection chemistry. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Stein, v. 28, n. 10, p. 115471, mar. 2020.
- LAVERDE, A. et al. An NMR tool for cyclodextrin selection in enantiomeric resolution by high-performance liquid chromatography. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Campinas, v. 40, n. 7, p. 433–442, mar. 2002.
- LI, J.; LU, L.; SU, W. A new strategy for the synthesis of benzoxanthenes catalyzed by proline triflate in water. **Tetrahedron Letters**, Hangzhou, v. 51, n. 18, p. 2434–2437, fev. 2010.
- LI, P. et al. Eco-friendly biomolecule-nanomaterial hybrids as next-generation agrochemicals for topical delivery. **EcoMat**, Brisbane, v. 3, n. 5, p. 1–19, out. 2021.
- LIU, G. et al. Cyclodextrin-based host-guest supramolecular hydrogel and its application in biomedical fields. **Polymer Chemistry**, Guangzhou, v. 9, n. 25, p. 3436–3449, jun. 2018.
- LIU, Y. et al. Recent advances in cyclodextrin-based films for food packaging. **Food Chemistry**, Ya'an, v. 370, p. 1–12, fev. 2022.
- LUO, J. et al. Recent Developments on Catalytic Enantioselective Isocyanide-Based Reactions: Beyond Passerini and Ugi Multicomponent Reactions. **Chemistry – A European Journal**, Weinheim, v. 27, n. 22, p. 6598–6619, abr. 2021.
- MACHADO, A. A. S. C. Vias de síntese linear e convergente - Qual é mais verde. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1862–1868, dez. 2011.
- MAGALHAES, L. G. **Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer**. Tese (Doutorado em Física aplicada) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. São Carlos, p. 134, 2019.
- MAMIDI, N.; VELASCO DELGADILLO, R. M.; BARRERA, E. V. Covalently functionalized carbon nano-onions integrated gelatin methacryloyl nanocomposite hydrogel containing  $\gamma$ -cyclodextrin as drug carrier for high-performance ph-triggered drug release. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 14, n. 4, mar. 2021.
- MARTINEZ GOMEZ, S. M. et al. Competitive one-pot reactions: Simultaneous synthesis of decahydroacridine-1,8-diones and 1,8-dioxo-octahydroxanthenes and photophysical characterization. **Synthetic Communications**, Philadelphia, v. 44, n. 5, p. 648–659, jun. 2014.
- MARTINS, L. N. S. B. et al. Inclusion complex of Callistemon viminalis essential oil prepared by kneading. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 97, n. 1–2, p. 109–119, jun. 2020.
- MATENCIO, A. et al. Applications of cyclodextrins in food science. A review. **Trends in Food Science and Technology**, Murcia, v. 104, p. 132–143, out. 2020.
- MICHEL, B. et al. Inclusion complex formation between sulfadiazine and various modified  $\beta$ -cyclodextrins and characterization of the complexes. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Grenoble, v. 76, p. 1–23, out. 2022.

- Ziarani, G. M. et al. Application of Sulfonic Acid Functionalized Nanoporous Silica (SBA-Pr-SO<sub>3</sub>H) in the Green One-pot Synthesis of Polyhydroacridine Libraries. **Iran. J. Chem. Chem. Eng.**, Tehran, v. 32, n. 4, p. 9–16, dez. 2013.
- MOHAMMADIAN, N.; AKHLAGHINIA, B. Calcined oyster shell nanoparticles (COS NPs): a new, efficient, and reusable catalyst for one-pot rapid preparation of 1,8-dioxo-octahydroxanthenes under solvent-free conditions. **Research on Chemical Intermediates**, Mashhad, v. 44, n. 2, p. 1085–1103, set. 2018.
- MORIN-CRINI, N. et al. 130 years of cyclodextrin discovery for health, food, agriculture and industry: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Besançon, v. 19, p. 2561–2617, jan. 2021.
- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Florence, v. 101, p. 238–250, mar. 2014.
- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Florence, v. 113, p. 226–238, fev. 2015.
- NADARAJ, V.; SELVI, S.; MOHAN, S. Microwave-induced synthesis, and anti-microbial activities of 7,10,11,12-tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Coimbatore, v. 44, n. 3, p. 976–980, jul. 2009.
- NAGARAJAIAH, H.; MUKHOPADHYAY, A.; MOORTHY, J. N. Biginelli reaction: an overview. **Tetrahedron Letters**, Kanpur, v. 57, n. 47, p. 5135–5149, nov. 2016.
- NASCIMENTO, C. **Ressonância magnética nuclear**. São Paulo: Blucher, 2016.
- NICOLAOU, K. C. Organic synthesis: The art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, Houston, v. 470, n. 2163, p. 1–17, nov. 2014.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 2<sup>o</sup> Ed trad ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- PENNER, M. H. **Basic Principles of Spectroscopy**. Food Analysis, p. 79–88, 2017.
- PEREIRA, A. M. et al. Preparation and Characterization of Disulfiram and Beta Cyclodextrin Inclusion Complexes for Potential Application in the Treatment of SARS-CoV-2 vias Nebulization. **Molecules**, Chelmsford, v. 27, n. 17, ago. 2022.
- PEREVA, S. et al. Water inside  $\beta$ -cyclodextrin cavity: amount, stability, and mechanism of binding. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Sofia, v. 15, p. 1592–1600, set. 2019.
- PICOLLO, M.; ACETO, M.; VITORINO, T. UV-Vis spectroscopy. **Physical Sciences Reviews**, Firenze, v. 4, n. 4, p. 1–14, abr. 2018.
- PINTO, L. M. A. et al. A single-step multicomponent synthesis of a quinoline derivative and the characterization of its cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Structure**, Lavras, v. 1237, p. 1–10, ago. 2021.
- PRABU, S.; SIVAKUMAR, K.; RAJAMOHAN, R. Supramolecular assembly between adenocard and native beta-cyclodextrin: Preparation, characterization, and in-vitro cytotoxic evaluation. **Spectroscopy Letters**, Tamil Nadu, v. 51, n. 9, p. 496–509, dez. 2018.
- RAMOS, L. M.; RODRIGUES, M. O.; NETO, B. A. D. Mechanistic knowledge, and noncovalent interactions as the key features for enantioselective catalysed multicomponent reactions: A critical review. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Anápolis, v. 17, n. 31, p. 7260–7269, jun. 2019.
- REAL, D. A. et al. Cyclodextrin-modified nanomaterials for drug delivery: Classification and advances in controlled release and bioavailability. **Pharmaceutics**, Santiago, v. 13, n. 12, dez. 2021.

- ROGERIO, K. R. et al. Multicomponent reactions: A brief history and their versatility for the synthesis of biologically active molecules. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 6, p. 1934–1962, dez. 2016.
- RUBIM, A. M. et al. Inclusion complex of amiodarone hydrochloride with cyclodextrins: Preparation, characterization and dissolution rate evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Santa Maria, v. 53, n. 2, p. 1–11, fev. 2017.
- SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: O emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, Volta Redonda, v. 39, n. 8, p. 995–1006, set. 2016.
- SAOKHAM, P. et al. Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. **Molecules**, Bangkok, v. 23, n. 5, p. 1–15, mai. 2018.
- SCHMIDT, A.; LIU, M. Recent Advances in the Chemistry of Acridines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, Clausthal-Zellerfeld, v. 115, p. 1-34, jun. 2015.
- SOMSRI, S. et al. Self-assembly of cyclic hexamers of  $\gamma$ -cyclodextrin in a metallocsupramolecular framework with d-penicillamine. **Chemical Science**, Osaka, v. 11, n. 34, p. 9246–9253, ago. 2020.
- SOUZA, G. K. et al. Inclusion Complex between Local Anesthetic/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in Stealth Liposome. **Molecules**, Campinas, v. 27, n. 13, p. 1-13, jun. 2022.
- SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology**. 1. ed. Dordrecht: Springer Science+ Business Media, cap. 1, p. 79–185, 1988.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Budapest, v. 36, n. 1, p. 17–28, mar. 1999.
- TU, S. et al. An efficient one-pot synthesis of polyhydrobenzoacridine-1-one derivatives under microwave irradiation without catalyst. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, Jiangsu, v. 43, n. 6, p. 1621–1627, mar. 2006.
- UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Kumamoto, v. 3, n. 1, p. 1–40, 1987.
- WANG, X. S. et al. A clean procedure for synthesis of benzo[c]acridine derivatives: Reaction of N-arylidene-naphthalen-1-amine with 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexadione in aqueous medium. **Arkivoc**, Xuzhou, v. 2006, n. 2, p. 117–123, jan. 2006.
- WDOWIAK, K. et al. Amorphous Inclusion Complexes: Molecular Interactions of Hesperidin and Hesperetin with HP-B-CD and Their Biological Effects. **International Journal of Molecular Sciences**, Poznan, v. 23, n.7, p. 4000-4026, abr. 2022.
- WEBER, L. The Application of Multi-Component Reactions in Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, Minnesota, v. 9, n. 23, p. 2085–2093, dez. 2002.
- WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of rhodotorula: An emerging pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Porto Alegre, v. 2012, p. 1-7, set. 2012.
- YAO, Q. et al. In vitro and in vivo evaluation of didymin cyclodextrin inclusion complexes: characterization and chemosensitization activity. **Drug Delivery**, Wenzhou, v. 27, n. 1, p. 54–65, dez. 2020.
- YAZDANI, H.; HOOSHMAND, S. E.; STENZEL, M. H. Fusion of Cellulose and Multicomponent Reactions: Benign by Design. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, Tehran, v. 10, n. 14, p. 4359–4373, mar. 2022.
- YOSHIDA, S. et al. Convergent synthesis of trifunctional molecules by three sequential azido-type-selective cycloadditions. **Chemical Communications**, Chiyoda-ku, v. 54, n. 30, p. 3705–3708, mar. 2018.

- ZANG, H. et al. Ultrasound-promoted one-pot synthesis of 7-aryl-7,10,11,12- tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one derivatives. **Synthetic Communications**, Tianjin v. 41, n. 21, p. 3207–3214, jul. 2011.
- ZANG, H. et al. An efficient ultrasound-promoted method for the one-pot synthesis of 7,10,11,12-tetrahydrobenzo[c]acridin-8(9H)-one derivatives. **Ultrasonics Sonochemistry**, Tianjin, v. 17, n. 3, p. 495–499, mar. 2010.
- ZHENG, Q. et al. Understanding Glass through Differential Scanning Calorimetry. **Chemical Reviews**, Jinan, v. 119, n. 13, p. 7848–7939, mai. 2019.
- ZHI, S.; MA, X.; ZHANG, W. Consecutive multicomponent reactions for the synthesis of complex molecules. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Jiangsu, v. 17, n. 33, p. 7632–7650, jul. 2019.
- ZHIKHARKO, Y. D.; KOZLOV, N. G.; BASALAEVA, L. I. Synthesis of 8,16-diarylacridino[4,3-c]acridine-1,9-dione derivatives. **Russian Journal of Organic Chemistry**, Minsk, v. 52, n. 3, p. 383–388, mai. 2016.
- ZHU, G.; ZHU, G.; XIAO, Z. A review of the production of slow-release flavor by formation inclusion complex with cyclodextrins and their derivatives. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Shanghai, v. 95, n. 1–2, p. 17–33, jun. 2019.
- ZIARANI, G. M. et al. One-pot synthesis of benzo[c]acridine derivatives using SBA-Pr-SO<sub>3</sub>H as nano catalyst. **Journal of the Mexican Chemical Society**, Ciudad de México, v. 58, n. 2, p. 168–172, abr./jun. 2014.