



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Rede Nordeste de Biotecnologia
Universidade Federal do Piauí
– Ponto Focal –

**CARACTERIZAÇÃO FISIOFARMACOLÓGICA *in vitro* E *in vivo* DE NOVOS
DERIVADOS DA CLASSE DAS 2-CLORO-N-ARILACETAMIDAS:
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS**

Kátia da Conceição Machado

Teresina – PI
2019

Kátia da Conceição Machado

**CARACTERIZAÇÃO FISIOPHARMACOLÓGICA *in vitro* E *in vivo* DE NOVOS
DERIVADOS DA CLASSE DAS 2-CLORO-N-ARILACETAMIDAS:
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal da Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro
Ferreira

Teresina – PI
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO

TÍTULO DO PROJETO: “CARACTERIZAÇÃO FISIOFARMACOLÓGICA IN VITRO E IN VIVO DE NOVOS DERIVADOS DA CLASSE DAS 2-CLORO-N-ARILACETAMIDAS: POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u>Paulo Michel</u>
Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Aldeídia</u>
Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Ana Amélia</u>
Prof. Dr. Dalton Dittz Júnior – UFPI (Examinador)	<u>SANSFATÓRIO</u>	<u>Dalton Dittz Jr</u>
Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa - UFC (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Cláudia Pessoa</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 29 de maio de 2019.

HORÁRIO: 08:30

LOCAL: Auditório do curso de Farmácia/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENACAO GERAL DO PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM
BIOTECNOLOGIA - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)**

Profa. Dra. Lucymara Fassarella Agnez Lima

**VICE-COORDENADOR GERAL DO PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM
BIOTECNOLOGIA - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)**

Profa. Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros

**COORDENACAO DO PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM
BIOTECNOLOGIA - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – PONTO
FOCAL PIAUÍ (RENORBIO-UFPI)**

Profa. Dra. Carla Eiras

Dedico essa conquista a **Deus** e a **Nossa Senhora** por sempre estarem comigo, me iluminando e mostrando o caminho certo. Pela força e por permitirem que eu chegasse até aqui. Aos meus **pais e irmã**, pelo apoio e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, minha fonte inesgotável de fé, pelo dom da vida, pela força, apoio e por impulsionar sempre seguir em frente nos momentos de dificuldades e por iluminar meus caminhos com sua proteção divina e a **Nossa Senhora** por sempre interceder por mim junto ao Pai.

Aos meus pais, *Luiza Maria da Conceição Machado* e *Luiz Alves Machado*, por sempre estarem ao meu lado, pelos momentos de plenitude e apoio familiar e por ter feito de mim a pessoa que sou. Minha eterna gratidão pelo esforço, pelo amor incondicional em todos os momentos de minha vida. À minha querida e estimada irmã, *Keylla da Conceição Machado*, pelo amor, compreensão, apoio, amizade e companhia. Aos tios, primos, madrinhas e padrinho por sempre torcerem pelo meu sucesso e estarem ao meu lado. Aos meus avós (*in memoriam*), pois apesar da ausência física, sei que eles torcem pelo meu sucesso e minha felicidade.

Meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador, professor *Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira*, por aceitar minha orientação mesmo após 1 ano de início do doutorado, pelos ensinamentos, compreensão, enorme paciência, apoio científico, confiança e por esses seis anos que trabalhamos juntos, desde o mestrado.

Ao professor *Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (in memoriam)*, pela amizade, ensinamentos, conselhos, por nos estimular sempre, por tirar o melhor de nos, pelo exemplo de profissionalismo e por ter me incentivado e me aceito no começo do doutorado, e mesmo não estando aqui fisicamente sempre ficarão seu exemplo e ensinamentos. Minha eterna gratidão e imensas saudades!

À professora *Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante* por me mostrar o caminho da pesquisa, desde a graduação, pelo apoio e encorajamento nos momentos difíceis. A ela devo a paixão pela pesquisa e a construção inicial dessa jornada acadêmica, grata por sempre está pronta a ajudar e a acolher.

Ao Prof. Dr. Ricardo José Alves e Dra. Stefânia Neiva Lavorato da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG por, gentilmente, disponibilizarem os compostos para os testes.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Genética (LAPGENIC), por me acolherem e ajudarem sempre, Marcus Vinícius, Antonio Luiz, Márcia Fernanda, Ana Maria, Antonielly e Rosália. Aos amigos e colegas dos Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) e Laboratório de Cancerologia

Experimental (LABCANCER), em especial a *Amanda Almeida* pela amizade e cumplicidade durante essa etapa de minha vida, fazendo parte sempre. Quero você para sempre na minha vida. Ao meu amigo *Jurandy do Nascimento Silva* por toda parceria, desde o mestrado, pela paciência, calma, incentivo e ajuda sempre que precisei, meu muito obrigada.

Aos funcionários do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) – UFPI, pela ajuda, carinho, atenção e dedicação com todos. Minha eterna gratidão: Sr. Orlando, Sr. Ari, Sr. Francisco, Dona Ivelta e Leane Brunele. Aos funcionários da secretaria da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Jefferson e Sávvia Braga obrigada pela amizade, conversas e convivência quase que diária.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, do ponto focal da Universidade Federal do Piauí eu agradeço pela dedicação e incentivo. E agradeço também, aos membros da Banca de Qualificação e de defesa da Tese pela disposição em colaborar com o aperfeiçoamento desse estudo, através de importantes críticas e sugestões.

À Universidade Federal do Piauí por nos proporcionar a oportunidade de usufruir de sua estrutura técnico-científica e por permitir o crescimento profissional e intelectual.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo financeiro durante o período do doutorado.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

MACHADO, K.C. **Caracterização fisiofarmacológica *in vitro* e *in vivo* de novos derivados da classe das 2-cloro-N-arilacetamidas: potencial antineoplásico e aspectos toxicológicos**. 2019. 166p. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO), Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-Piauí.

RESUMO

As estimativas para os anos de 2018/2019 no Brasil será cerca de 600 mil novos casos de câncer, no entanto o tratamento quimioterápico leva a efeitos colaterais, assim pesquisas de novas moléculas que proporcionem efeitos antitumorais com seletividade em relação a toxicidade de células normais. O presente estudo avaliou as atividades citotóxicas, tóxicas e antitumorais de compostos sintéticos 2-cloro-N-4-clorofenil acetamida (composto 2), 3: 2-cloro-N-4-bromofenil acetamida (composto 3) e 2-cloro-N-4-nitrofenil acetamida (composto 4), derivados da classe 2-cloro-N-arilacetamidas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os compostos avaliados foram escolhidos após triagem de atividades antiproliferativas de dez (1-10) derivados sintéticos de 2-cloro-N-arilacetamidas, em linhagens tumorais (HL-60: leucemia promielocítica, HCT-116: carcinoma colorretal, SF-295: glioblastoma, HEPG-2: carcinoma de fígado e OVCAR-8: carcinoma de ovário) e em culturas primárias de células mononucleares do sangue periférico, bem como atividade hemolítica em eritrócitos humanos. Os compostos 2 (2-cloro-N-4-clorofenil acetamida), 3 (2-cloro-N-4-bromofenil acetamida) e 4 (2-cloro-N-4-nitrofenil acetamida) em concentrações crescentes (0,04-25 µg/mL) foram analisados quanto sua citotoxicidade em linhagens celulares de fibroblastos normais (MRC-5: humano e L-929: murino). A toxicidade dos compostos foi avaliada em meristema de *Allium cepa*, em *Artemia salina* e em embriões de peixe-zebra (FET) com o composto 2. Em *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliado a atividade antioxidante/oxidante. Em camundongos nas doses de 150 e 300 mg/kg foram avaliados quanto aos aspectos toxicológicos e comportamentais. Atividade antitumoral dos compostos na dose de 25 mg/kg/dia foi avaliada em camundongos imunodeficientes transplantados com células de carcinoma de cólon. Os compostos 2, 3 e 4 apresentaram valores de CI_{50} frente às linhagens tumorais variando de 1 a >10 µg/mL, de 4,2 a 9,8 µg/mL e 2,4 a 8,9 µg/mL, respectivamente. Os compostos avaliados não foram citotóxicos em eritrócitos e células mononucleares do sangue periférico humanas. Em *A. salina* os três compostos apresentaram baixa CE_{50} (composto 2: 0,005 µg/mL; composto 3: 0,009 µg/mL e composto 4: 7,06 µg/mL), portanto sendo classificados como tóxicos. Em embriões de peixe-zebra tratados com o composto 2 nas concentrações de 1,93 e 7,2 mg/L, apresentaram percentuais de 90% e 100% de morte. Na avaliação da atividade citotóxica em células de fibroblasto humano e murino os compostos apresentaram CI_{50} de 2,5; 4,8 e 1,2 µg/mL para os compostos 2, 3 e 4 respectivamente. Como também em meristemas de raízes de *Allium cepa* por inibição do índice mitótico nas concentrações 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL, apresentando efeitos genotóxicos. Em *Saccharomyces cerevisiae* o composto 1 não interfere em danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio, entretanto os compostos 2 e 3 apresentaram atividades antioxidantes nas menores concentrações testadas (1 e 5 µg/mL). Na avaliação da toxicidade em camundongos, foram observadas mortes somente na dose de 300 mg/kg, não apresentando alterações exploratórias e motoras. Na investigação do potencial antitumoral *in vivo*, apenas os compostos 1 e 2 reduziram o crescimento tumoral em 21,2% e 27,5% quando comparados ao controle negativo. O estudo aponta que os compostos 1, 2 e 3 apresentaram potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*, com seletividade em relação às células normais humanas, como também não apresentaram toxicidade por alterações hipocráticas e comportamentais em animais. Assim sugere-se que os compostos avaliados podem ser usados em formulações farmacêuticas, como antitumorais.

Palavras-chave: Arilacetamidas. Anticâncer. Quimioterápicos sintéticos. Toxicidade.

MACHADO, K.C. ***In vitro* and *in vivo* physiopharmacological characterization of new derivatives of the class of 2-chloro-N-arylacetamides: antineoplastic potential and toxicological aspects.** 2019. 166p. Thesis (Northeast Biotechnology Network Graduate Program – RENORBIO), Supervisor: Dr Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Federal University of Piauí (UFPI). Teresina-Piauí.

ABSTRACT

The estimates for the years 2018/2019 in Brazil will be about 600 thousand new cases of cancer, however the chemotherapy treatment leads to side effects, thus research of new molecules that provide antitumor effects with selectivity in relation to normal cell toxicity. The present study evaluated the cytotoxic, toxic and antitumor activities of synthetic compounds 2-chloro-N-4-chlorophenylacetamide (compound 2), 3: 2-chloro-N-4-bromophenylacetamide (compound 3) and 2-chloro-N-4-nitrophenylacetamide (compound 4), derivatives of class 2-chloro-N-arylacetamides in *in vitro* and *in vivo* studies. The compounds evaluated were selected after screening for antiproliferative activities of ten (1-10) synthetic 2-chloro-N-arylacetamide derivatives in tumoral lines (HL-60: promyelocytic leukemia, HCT-116: colorectal carcinoma, SF-295: glioblastoma, HEPG-2: liver carcinoma and OVCAR-8: ovarian carcinoma) and in primary cultures of peripheral blood mononuclear cells, as well as hemolytic activity in human erythrocytes. The compounds 2- (2-chloro-N-4-chlorophenylacetamide), 3- (2-chloro-N-4-bromophenylacetamide) and 4- (2-chloro-N-4-nitrophenylacetamide) in increasing concentrations -25 µg / ml) were analyzed for cytotoxicity in normal fibroblast cell lines (MRC-5: human and L-929: murine). The toxicity of the compounds was evaluated in *Allium cepa* meristem, *Artemia salina* and zebrafish (FET) embryos with compound 2. In *Saccharomyces cerevisiae* the antioxidant / oxidant activity was evaluated. In mice at doses of 150 and 300 mg / kg were evaluated for toxicological and behavioral aspects. Antitumor activity of the compounds at the dose of 25 mg / kg / day was evaluated in immunodeficient mice transplanted with colon carcinoma cells. Compounds 2, 3 and 4 presented IC₅₀ values against tumoral strains ranging from 1 to > 10 µg / mL, from 4.2 to 9.8 µg / mL and 2.4 to 8.9 µg / mL, respectively. The evaluated compounds were not cytotoxic to erythrocytes and human peripheral blood mononuclear cells. In all three compounds, the three compounds showed low EC 50 (compound 2: 0.005 µg / mL, compound 3: 0.009 µg / mL and compound 4: 7.06 µg / mL), thus being classified as toxic. In zebrafish embryos treated with compound 2 at concentrations of 1.93 and 7.2 mg / L, they presented 90% and 100% percentages of death. In the evaluation of cytotoxic activity in human and murine fibroblast cells the compounds had IC 50 of 2.5; 4.8 and 1.2 µg / mL for compounds 2,3 and 4 respectively. As well as in root meristem of *Allium cepa* by inhibition of the mitotic index at concentrations 1, 5, 10, 25 and 50 µg / mL, presenting genotoxic effects. In *Saccharomyces cerevisiae*, compound 1 does not interfere with oxidative damage caused by hydrogen peroxide. However, compounds 2 and 3 presented antioxidant activities at the lowest concentrations tested (1 and 5 µg / mL). In the evaluation of toxicity in mice, deaths were observed only at the dose of 300 mg / kg, without exploratory and motor alterations. In the investigation of the antitumor potential *in vivo*, only compounds 1 and 2 reduced tumor growth by 21.2% and 27.5% when compared to the negative control. The study shows that compounds 1, 2 and 3 showed antitumor potential *in vitro* and *in vivo*, with selectivity in relation to normal human cells, nor did they present toxicity due to hippocampal and behavioral alterations in animals. Thus it is suggested that the evaluated compounds can be used in pharmaceutical formulations, such as antitumor.

Keywords: Arylacetamides. Anticancer. Synthetic chemotherapeutics. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Organograma da tese.....	20
--	----

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Capacidades adquiridas pelas células tumorais.....	26
Figura 2 - Mecanismo de ação do 5-FU.....	35
Figura 3 - Estrutura química da ciclofosfamida.....	36
Figura 4 - Estrutura química do Imatinibe.....	37
Figura 5 - Estrutura química geral das cloroacetamidas.....	38

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Síntese de derivados de 2-cloro-N-irilacetamidas.....	60
Figura 2 - Modelo de sistema utilizado para coleta dos ovos de embriões de peixe-zebra.....	62
Figura 3 - Esquema dos testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra.....	63
Figura 4 - Esquema da realização das análises com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
Figura 5 - Tamanho das raízes de <i>Allium cepa</i> tratadas com as arilacetamidas durante 72h de exposição.....	71
Figura 6 - Fotomicrografias de microscopia óptica células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações do composto 2, 3 e 4 após 72 h de exposição.....	76
Figura 7 - Viabilidade e valores de DL ₅₀ da arilacetamida 2 em embriões de peixe-zebra <i>Danio rerio</i> após diferentes tempos de exposição.....	78
Figura 8 - Efeitos embriotóxicos da arilacetamida 2 em embriões de peixe-zebra <i>Danio rerio</i> após diferentes tempos de exposição.....	81
Figura 9 - Avaliação do efeito protetor do composto 2 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	85
Figura 10 - Avaliação da atividade antioxidante do composto 2 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	86
Figura 11 - Avaliação do efeito reparador do composto 2 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	87
Figura 12 - Avaliação do efeito protetor do composto 3 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	89
Figura 13 - Avaliação da atividade antioxidante do composto 3 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	90
Figura 14 - Avaliação do efeito reparador do composto 3 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	91
Figura 15 - Avaliação do efeito protetor do composto 4 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	93
Figura 16 - Avaliação da atividade antioxidante do composto 4 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	94
Figura 17 - Avaliação do efeito reparador do composto 4 nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> por meio do teste de disco central.....	95

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Síntese de derivados de 2-cloro-N-amilacetamidas (1-10).....	111
Figura 2 - Estrutura química dos compostos 2, 3 e 4, respectivamente.....	113
Figura 3 - Efeito dos compostos 2, 3 e 4 sobre o número de cruzamentos, autolimpeza e levantamentos após a administração única via intraperitoneal em camundongos <i>Swiss</i>	129
Figura 4 - Fotomicrografias do tumor HCT-116 inoculado em camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 2, 3 e 4, durante quinze dias consecutivos.....	137
Figura 5 - Fotomicrografias de tecido hepático de camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 5-FU, 2, 3 e 4, durante quinze dias consecutivos.....	139
Figura 6 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 5-FU, 2, 3 e 4, durante quinze dias consecutivos.....	141
Figura 7 - Fotomicrografias de tecido renal de camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 5-FU, 2, 3 e 4 durante quinze dias consecutivos.....	143
Figura 8 - Avaliação do trânsito intestinal de camundongos adultos <i>Swiss</i> tratados com arilacetamidas sintéticas via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg.....	145

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	30
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas nos testes.....	66
Tabela 2 - Potencial citotóxico das arilacetamidas em linhagens de fibroblastos normais murinos (L-929) e humanos (MRC-5) após 72h de exposição e determinado pelo ensaio do <i>Alamar Blue</i>	68
Tabela 3 - Atividade tóxica das arilacetamidas em náuplios de <i>Artemia salina</i> após 72h de exposição.....	69
Tabela 4 - Efeito citotóxico em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após 72 h de exposição aos compostos 2, 3 e 4.....	72
Tabela 5 - Alterações cromossômicas causadas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após 72 h de exposição aos compostos 2, 3 e 4.....	75
Tabela 6 - Malformações em embriões de peixe-zebra <i>Danio rerio</i> expostos ao composto 2 na concentração de 0,52µg/mL por 120h.....	80

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade MTT.....	113
Tabela 2 - Potencialidade antiproliferativa dos compostos 1-10 em linhagens tumorais humanas e cultura primária de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e análise da capacidade hemolítica.....	121
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos compostos (1-10).....	123
Tabela 4 - Efeitos tóxicos agudos dos compostos 2, 3 e 4 após administração intraperitoneal em camundongos adultos <i>Swiss</i>	127
Tabela 5 - Efeitos dos compostos 2, 3 e 4 sobre a coordenação motora de camundongos <i>Swiss</i> após a administração única via intraperitoneal avaliados pelo teste <i>rota rod</i>	128
Tabela 6 - Efeitos dos compostos 2, 3 e 4 sobre o comportamento exploratório de camundongos <i>Swiss</i> após a administração única via intraperitoneal avaliados pelo teste labirinto em cruz elevado.....	131
Tabela 7 - Efeito de arilacetamidas sintéticas no peso relativo de órgãos-chave e crescimento tumoral em camundongos CB-17 portadores de carcinoma de cólon HCT-116 após 15 dias de tratamento intraperitoneal.....	134
Tabela 8 - Perfil hematológico de arilacetamidas sintéticas no peso relativo de órgãos-chave e no crescimento tumoral e camundongos CB-17 portadores de carcinoma de cólon HCT-116 após 15 dias de tratamento intraperitoneal.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluoruracil
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CE₅₀	Concentração efetiva média
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CI₅₀	Concentração inibitória média
CL₅₀	Concentração letal de 50%
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal)
DMEN	Meio Dulbecco MEM
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FET	<i>Fish Embryo Toxicity</i>
GSH	Glutathiona
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCT-116	Carcinoma de cólon humano
HEPG2	Carcinoma de fígado
HL-60	Carcinoma de leucemia promielocítica
i.p.	Administração intraperitoneal
IM	Índice Mitótico
INCA	Instituto Nacional de Câncer
L-929	Fibroblastos de camundongos
MRC-5	Fibroblastos derivados de tecido pulmonar humano
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEBF	Número de entradas nos braços fechados

OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OVCAR-8	Carcinoma de ovário humano
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PISQ/OMS	Programa Internacional de Segurança Química da Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCID	Imunodeficiência combinada grave
SF-295	Glioblastoma
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido desmutase
SOD CuZn	Superóxido dismutase citoplasmática
SOD Mn	Superóxido dismutase mitocondrial
Sod1Δ	Superóxido dismutase citoplasmática mutada
Sod1Sod2Δ	Superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial mutada
Sod2Δ	Superóxido dismutase mitocondrial mutada
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	Tempo de permanência nos braços fechados
YEL	Meio líquido completo
YEPD	Meio sólido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	21
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral.....	24
2.2 Específicos.....	24
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	26
3.1 Biologia e Epidemiologia do Câncer.....	26
3.2 Agentes quimioterápicos e seus efeitos adversos.....	30
3.3 Substâncias sintéticas no tratamento do câncer.....	33
3.4 Acetamidas sintéticas.....	37
3.5 Modelos de ensaios citotóxicos, antioxidantes e toxicológicos.....	39
3.5.1 Ensaios de viabilidade celular.....	40
3.5.2 <i>Danio rerio</i> (zebra fish) e <i>Artemia salina</i>	41
3.5.3 Ensaio <i>Allium cepa</i>	42
3.5.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico.....	43
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 1 - Uso de métodos alternativos como ferramentas farmacológicas para a determinação da toxicidade de análogos das arilacetamidas.....	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
1 INTRODUÇÃO.....	58
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.1 Obtenção dos compostos.....	59
2.2 Ensaios antiproliferativos em células humanas normais.....	60
2.3 Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	61
2.4 Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra.....	61
2.4.1 Manutenção e coleta de ovos de peixe-zebra.....	61
2.4.2 Exposição dos ovos ao composto teste.....	63
2.5 Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal de <i>Allium cepa</i>	64
2.6 Avaliação oxidante/antioxidante em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
2.7 Análises estatísticas.....	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1 Citotoxicidade contra fibroblastos normais e náuplios de <i>Artemia salina</i>	67
3.2 Toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal <i>Allium cepa</i>	69
3.3 Toxicidade aguda com embriões de peixe-zebra.....	76
3.4 Ação oxidante/antioxidante em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82

4 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	99
CAPÍTULO 2 - Arilacetamidas sintéticas: ferramentas farmacológicas contra cânceres humanos, toxicidade aguda em mamíferos e estudos físico-químicos e de relação estrutura-atividade	107
RESUMO.....	108
ABSTRACT.....	109
1 INTRODUÇÃO	110
2 MATERIAIS E MÉTODOS	111
2.1 Obtenção dos compostos.....	111
2.2 Cultivo celular e ensaio de citotoxicidade.....	111
2.3 Ensaio hemolítico.....	113
2.4 Estudo antiproliferativo com células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	114
2.5 Estudo de toxicidade <i>in vivo</i>	114
2.5.1 Animais.....	114
2.5.3 Toxicidade aguda.....	115
2.6 Avaliação comportamental.....	116
2.6.1 Campo aberto.....	116
2.6.2 <i>Rota rod</i>	116
2.6.3 Labirinto em cruz elevado.....	117
2.7 Avaliação antitumoral <i>in vivo</i> em modelo xenográfico de carcinoma de cólon humano.....	117
2.8 Trânsito Intestinal.....	118
2.9 Análises estatísticas.....	119
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
3.1 Potencial citotóxico e antiproliferativo.....	119
3.2 Toxicidade sistêmica e alterações comportamentais aguda.....	126
3.3 Ação antitumoral <i>in vivo</i> e parâmetros fisiológicos.....	132
4 CONCLUSÃO	146
REFERÊNCIAS	125
ANEXO	133
CAPÍTULO 3 – Depósito de pedido de patente	155
Resumo.....	156
Reinvindicação.....	157
CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
Anexos	160

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo, causando mais de um quarto de todas as mortes em muitos países e representa um ônus pessoal e social substancial, com sério impacto tanto na economia quanto na qualidade de vida. É caracterizado como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter proliferativo, mutacional, de crescimento celular aberrante e descontrolado. Derivadas principalmente por mutações genéticas das células somáticas, as células tumorais podem migrar para tecidos normais (vizinhos ou distantes) acarretando metástases (tumores secundários) em locais diferentes da origem inicial do tumor primário (MASOUDI-NEJAD; ASGARI, 2015; FERREIRA; PESSOA; 2017; WARK; PETO, 2017).

O número absoluto de pessoas diagnosticadas com câncer está aumentando constantemente devido ao aumento contínuo da expectativa de vida e da população mundial, e estima-se que haverá 15 milhões de novos casos por ano até 2020 (GOMEZ-RUBIO; MATURANA, 2019). De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer, nos anos de 2018/2019, o Brasil terá cerca de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2017). Para tratar a grande maioria desses cânceres, a quimioterapia continua sendo uma das ferramentas mais comuns e eficazes. Entretanto, é conhecido que drogas quimioterápicas são naturalmente tóxicas e podem atacar células normais. O sucesso da quimioterapia pode ser conseguido aumentando a morte das células cancerosas e prevenindo efeitos tóxicos sobre células normais (LIANG; LEUNG; MOK, 2008; KHADRAOUI et al., 2016).

Estudos indicam que as aprovações anuais de fármacos têm se mantido em um nível constantemente baixo desde os anos 1950, apesar de avanços tecnológicos e aumento de investimentos. O custo atual de desenvolver um medicamento de conceito no mercado é estimado em cerca de US\$ 2,6 bilhões (STRATTON; NEWMAN; TAN, 2015). Os avanços na química medicinal e na biologia estrutural tornaram possível descobrir medicamentos mais direcionados às células tumorais e, ainda, com a realização iminente do projeto genoma, o futuro foi alvejado para terapias individualizadas, que utiliza moléculas completamente sintéticas ou anticorpos específicos contra

proteínas alvo ao mesmo tempo que algumas companhias farmacêuticas consideram produtos naturais muito caros e demorados para descobrir, caracterizar e isolar em quantidades adequadas e muito complexos para sintetizar em laboratório (LAM, 2007; BASMADJIAN et al., 2014, CALVERT, 2014).

Um dos desafios da química orgânica e farmacêutica é o entendimento e síntese de novos compostos que são úteis para o estudo de processos biologicamente importantes. Dentre tais compostos estão as acetamidas, que são substâncias orgânicas classificadas como amida do ácido acético e apresenta solubilidade na água e são de fácil obtenção como um produto químico comercial em massa (NIKALJE et al., 2011; LIU; LIU, 2016). Alguns derivados das acetamidas tem demonstrado atividade anticonvulsivante, antidepressiva (ZHEN et al., 2015), antimicrobiana (TOCHE; JANRAO, 2015), anti-HIV (BHAVSAR et al., 2011) e antituberculose (GIACOBBO et al., 2017).

Embora a quimioterapia tenha sido amplamente empregada para vários tratamentos contra o câncer, a toxicidade severa e a resistência a agentes quimioterápicos convencionais torna necessário desenvolver drogas mais seletivas para a terapia do câncer (KULABAS et al., 2016). Assim, o desenvolvimento de novos e potentes fármacos antineoplásicos é um dos alvos mais importantes da química medicinal moderna. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica, antitumoral e toxicológica de compostos sintéticos da classe 2-cloro-*N*-arilacetamidas utilizando métodos não clínicos.

A presente tese encontra-se estruturada da seguinte maneira: no capítulo 1 foi avaliado a atividade citotóxica *in vitro* de três compostos da classe 2-Cloro-*N*-arilacetamidas nos seguintes métodos alternativos: linhagens celulares normais humanas, náuplios de *Artemia salina*, embriões de peixe-zebra, raízes meristemáticas em crescimento de *Allium cepa* e cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* para avaliação oxidante/antioxidante, no capítulo 2 foi abordado a citotoxicidade *in vitro* de dez compostos da classe das arilacetamidas, diferindo em seus substituintes aromáticos, em células tumorais e normais, sua toxicidade *in vivo*, investigando alterações comportamentais e os seus possíveis efeitos antitumorais em modelo xenográfico heterotópico utilizando camundongos imunodeficientes

transplantados com carcinoma de cólon humano e no capítulo 3 é apresentado um depósito de pedido de patente, junto ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC da Universidade Federal do Piauí intitulado: Compostos farmacêuticos derivados de arilacetamidas sintéticas com atividade antiproliferativa contra neoplasias (**Figura 1**).

Figura 1 - Organograma da tese.



Fonte: Autoria própria

REFERÊNCIAS

- BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 1447-1457, 2009.
- BASMADJIAN, C.; ZHAO, Q.; BENTOUHAMI, E.; DJEHAL, A.; NEBIGIL, C.G.; JOHNSON, R.A.; SEROVA, M.; GRAMONT, A.; FAIVRE; RAYMOND, E.; DESAUBRY, L.G. Cancer wars: natural products strike back. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 1-18, 2014.
- BHAVSAR, D.; TRIVEDI, J.; PAREKH, S.; SAVANT, M.; THAKRAR, S.; BAVISHI, A.; RADADIYA, A.; VALA, H.; LUNAGARIYA, J.; PARMAR, M.; PARESH, L.; LODDO, R.; SHAH, A. Synthesis and in vitro anti-HIV activity of N-1,3-benzo[d]thiazol-2-yl-2-(2-oxo-2H-chromen-4-yl)acetamide derivatives using MTT method. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 3443-3446, 2011.
- CALVERT, H. Cancer Drug Design and Discovery. **Cancer Drug Design and Discovery**, v. 2, p. 11-13, 2014.
- FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. Molecular biology of human epidermal receptors, signaling pathways and targeted therapy against cancers: new evidences and old challenges. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, p. 1-17, 2017.
- FLOOR, S.L.; DUMONT, J.E.; MAENHAUT, C.; RASPE, E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, p. 509-515, 2012.
- GIACOBBO, B.C.; PISSINATE, K.; RODRIGUES-JUNIOR, V.; VILLELA, A.D.; GRAMS, E.S.; ABBADI, B.L.; SUBTIL, F.T.; SPEROTTO, N.; TRINDADE, R.V.; BACK, D.F.; CAMPOS, M.M.; BASSO, L.A.; MACHADO, P.; SANTOS, D.S. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 491-501, 2017.
- GOMES-RUBIO, P.; MATURANA, E.L. Molecular Epidemiology and Cancer Risk. **Encyclopedia of Cancer**, v. 3, p. 487-493, 2019.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128p.
- ISLAM, F.; QIAO, B.; SMITH, R.A.; GOPALAN, V.; LAM, A.K. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, p. 184-191, 2015.
- KHADRAOUI, S.; HARROU, F.; NOUNOU, H.N.; NOUNOU, M.N.; DATTA, A.; BHATTACHARYYA, S.P. A measurement-based control design approach

for efficient cancer chemotherapy. **Information Sciences**, v. 333, p. 108-125, 2016.

KULABAŞ, N.; TATAR, E.; BINGÖL ÖZAKPINAR, Ö.; ÖZSAVCI, D.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E.; KÜÇÜKGÜZEL, İ. Synthesis and antiproliferative evaluation of novel 2-(4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetamide derivatives as inducers of apoptosis in cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 58-70, 2016.

LAM, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LIANG, Y.; LEUNG, K.S.; MOK, T.S.K. Evolutionary drug scheduling models with different toxicity metabolism in cancer chemotherapy. **Applied Soft Computing**, v. 8, p. 140-149, 2008.

LIU, B.; LIU, Y. Properties for binary mixtures of (acetamide + KSCN) eutectic ionic liquid with ethanol at several temperatures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 92, p. 1–7, 2016.

MASOUDI-NEJAD, A.; ASGARI, Y. Metabolic Cancer Biology: Structural-based analysis of cancer as a metabolic disease, new sights and opportunities for disease treatment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 30, p. 21-29, 2015.

NIKALJE, A.P.G.; KHAN, F.K.; GHODKE, M. Design and synthesis of 2-(1, 3-dioxoisindolin-2-yl)-N-(4-oxo-2-substitutedthiazolidin-3-yl) acetamide derivatives as potential anticonvulsant agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5448-5455, 2011.

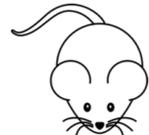
STRATTON, C.F.; NEWMAN, D.J.; TAN, D.S. Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 4802-4807, 2015.

TOCHE, R.B.; JANRAO, R.A. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel urea, sulfonamide and acetamide 3,4-dihydropyrazino[1,2-a]indol-1(2H)-one derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, *In Press*, Corrected Proof, 2015.

WARK, P.A.; PETO, J. Cancer Epidemiology. **International Encyclopedia of Public Health**, v. 2, p. 339-346, 2017.

ZHEN, X.; PENG, Z.; ZHAO, S.; HAN, Y.; JIN, Q.; GUAN, L. Synthesis, potential anticonvulsant and antidepressant effects of 2-(5-methyl-2,3-dioxindolin-1-yl)acetamide derivatives. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, p. 343-349, 2015.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar as atividades citotóxicas, antitumorais e toxicológicas de compostos sintéticos da classe 2-cloro-*N*-arilacetamidas utilizando métodos não clínicos.

2.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade de dez compostos derivados da classe 2-cloro-*N*-arilacetamidas em linhagens de células tumorais e normais por meio do teste MTT e *Alamar Blue*;
- Averiguar a toxicidade aguda em náuplios de *Artemia salina* de três compostos (2-cloro-*N*-4-clorofenil acetamida), (2-cloro-*N*-4-bromofenil acetamida) e (2-cloro-*N*-4-nitrofenil acetamida),
- Determinar a toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra bem como a genotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal *Allium cepa*;
- Avaliar possíveis efeitos oxidantes e antioxidantes dos compostos em cepas deficientes de enzimas antioxidantes de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Determinar a atividade antitumoral *in vivo* em modelo xenográfico heterotópico de carcinoma de cólon humano dos três compostos mais ativos;
- Verificar a toxicidade *in vivo* dos compostos em camundongos, investigando alterações comportamentais, histológicas, hematológicas e neurológicas.

REFERENCIAL TEÓRICO



3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biologia e Epidemiologia do Câncer

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte, com cerca de 12,7 milhões de casos em todo o mundo afetando ambos os sexos igualmente. Este número deverá aumentar para 21 milhões até 2030. É uma doença complexa, heterogênea e altamente dinâmica, que é caracterizada como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas com múltiplos constituintes moleculares em evolução. A sequência de eventos subjacentes que impulsionam a gênese e a progressão do câncer continua sendo um grande desafio para pesquisadores e clínicos (MOSES et al., 2018).

Hanahan e Weinberg (2011) descreveram as capacidades adquiridas pelas células tumorais durante a carcinogênese que são: sustentação da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, fuga da destruição imune, permitem a imortalidade replicativa, promovem a inflamação, ativação da invasão e metástase, induzem a angiogênese, instabilidade genômica e mutação, resistência a morte celular (**Figura 1**).

Figura 1 - Capacidades adquiridas pelas células tumorais.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011)

As células neoplásicas são células transformadas e reprogramadas para evitar os *checkpoints* no controle do suprimento de nutrientes, crescimento, envelhecimento, morte e migração, geralmente como resultado de múltiplas mutações em genes envolvidos no controle do crescimento de células e alterações metabólicas nas células tumorais e no microambiente tumoral que facilitam ou aceleram o crescimento final do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; GOLEMIS et al., 2018).

O sistema imunológico interage intimamente com tumores ao longo de todo o processo de desenvolvimento da doença e progressão para metástase. O desenvolvimento e a sobrevivência do tumor é um processo caoticamente governado que envolve a interação entre as células cancerígenas, as células estromais normais e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Geralmente, células T citotóxicas CD8⁺ (CTL) e células T auxiliares CD4⁺ (Th) 1 freiam o desenvolvimento do câncer através de mecanismos comumente envolvendo a produção de interferon e citotoxinas, mas outros fatores, como inflamação crônica, podem anular esses efeitos para promover o desenvolvimento do câncer (ZAMARRON; CHEN, 2011; VINAY et al., 2015).

A resposta inflamatória desencadeada por infecções precede o desenvolvimento do tumor e faz parte da defesa do hospedeiro normal, cujo objetivo é a eliminação do patógeno. No entanto, patógenos tumorigênicos subvertem a imunidade do hospedeiro e estabelecem infecções persistentes associadas a inflamação crônica de baixo grau. Outro tipo de inflamação crônica que precede o desenvolvimento do tumor é causado pela desregulação imune e autoimunidade (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

A capacidade evolutiva rápida adquirida pelas células tumorais devido à instabilidade genômica permite que tais unidades celulares se adaptem a novos ambientes, metastatizem, escapem do sistema imunológico e, assim, resistam até mesmo aos tratamentos (NILSSON; NIELSEN, 2017). De fato, a característica biológica mais importante de uma neoplasia maligna é sua capacidade de metastatizar, uma característica ausente em neoplasias benignas, mas as benignas também podem comprimir o tecido normal adjacente (TANAKA, 2009; TANAKA; ISHIGAMORI, 2011).

Mudanças em genes específicos - isto é, oncogenes (que impulsionam o crescimento de células) ou genes supressores de tumor (que retardam o

crescimento anormal das células) - são seguidos pelo crescimento estimulado para expandir a população de células iniciadas. À medida que essa expansão ocorre, o potencial para eventos adicionais dentro de uma célula iniciada aumenta até que a célula adquira a capacidade de escapar dos controles de crescimento, evite os mecanismos normais de morte celular programada, escape da vigilância imunológica, remodele um microambiente para prosperar e metastatize. As alterações nos oncogenes ou genes supressores de tumor podem ser alterações que afetam sua seqüência de DNA ou alterações epigenéticas que controlam a expressão desses genes (GOLEMIS et al., 2018). À medida que a célula mutada se divide ainda mais, mudanças epigenéticas e genéticas adicionais ocorrem na lesão recém-formada (TANAKA et al., 2013).

Os fatores carcinogênicos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer são classificados como exógenos ou endógenos. Os fatores exógenos incluem agentes associados à preservação e preparação de alimentos, motivos socioeconômicos, estilo de vida, radiação ionizante e não ionizante, compostos químicos naturais e sintéticos e xenobióticos, incluindo a *Helicobacter pylori*, o vírus de *Epstein-Barr*, papiloma vírus humano, vírus da hepatite B e hepatite C, parasitas, o consumo de álcool, tabaco, ingestão de certos alimentos contaminados com micotoxinas são igualmente responsáveis por causar certos tipos de neoplasias (TANAKA; ISHIKAWA, 2013).

Os fatores carcinogênicos endógenos incluem condições e agentes que causam disfunção do sistema imunológico e subsequente inflamação, como a colite ulcerativa. Estudos epidemiológicos sugerem que o risco de desenvolver câncer varia entre diferentes grupos populacionais e estão associadas a diferenças genéticas e a fatores e hábitos relacionados ao estilo de vida. De fato, a migração de certas populações para novas regiões com diferentes estilos de vida pode resultar no desenvolvimento de novos tipos de câncer não prevalentes naquele grupo (OHSHIMA; TATEMICHII; SAWA, 2003; TIMOFTE, 2017).

A iniciação da tumorigênese maligna envolve a formação de uma célula pré-neoplásica mutante a partir de um evento genotóxico irreversível, mas dependente da dose. A promoção envolve a expansão clonal seletiva da célula iniciada através de um aumento no crescimento celular que ocorre a partir de

um aumento na proliferação celular e/ou uma diminuição na apoptose na população de células alvo. Os eventos deste estágio são dose-dependentes e reversíveis após a remoção do estímulo de promoção do tumor. Na terceira fase - da progressão - as alterações celulares e moleculares ocorrem do pré-neoplásico ao estado neoplásico. Esse estágio é irreversível, envolve instabilidade genética, mudanças na ploidia nuclear e interrupção da integridade dos cromossomos (DIGIOVANNI, 1992; SASAKI et al., 2017; KLAUNING; YANG, 2018).

A incidência de novos casos anuais de câncer está aumentando e é previsto que cresça rapidamente. O termo "epidemia de câncer" tem sido usado com frequência, não apenas pela mídia, mas também por periódicos acadêmicos e pela Organização Mundial da Saúde. O problema é particularmente alarmante em países de baixa e média renda. Para alguns países ricos, as taxas de incidência estão se estabilizando (ou diminuindo ligeiramente), porém em níveis muito altos (LUZZATI; PARENTI; RUGHI, 2018).

Nos próximos dois anos (2018-2019), são esperados ocorrência de 600 mil novos casos de câncer. Os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres (**Tabela 1**) serão os mais frequentes (INCA, 2017).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

HOMENS ♂			MULHERES ♀		
Localização Primária	Casos Novos	%	Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	68,22	31,7%	Mama feminina	59,50	29,5%
Traqueia, brônquios e pulmão	18,74	8,7%	Cólon e reto	18,98	9,4%
Cólon e reto	17,38	8,1%	Colo do útero	16,37	8,1%
Estômago	13,54	6,3%	Traqueia, brônquio e pulmão	12,53	6,2%
Cavidade oral	11,20	5,2%	Glândula tireóide	8,04	4,0%
Esófago	8,24	3,8%	Estômago	7,75	3,8%
Bexiga	6,69	3,1%	Corpo do útero	6,60	3,3%
Laringe	6,39	3,0%	Ovário	6,15	3,0%
Leucemias	5,94	2,8%	Sistema nervoso central	5,51	2,7%
Sistema nervoso central	5,81	2,7%	Leucemias	4,86	2,4%

Fonte: INCA (2017).

Todos os registros de câncer mostram diferenças marcantes na incidência como, por exemplo, a idade e tecidos (LÓPEZ-LÁZARO, 2018). Ao mesmo tempo, já é bem conhecido que essa é uma patologia relacionada à idade que se desenvolve no limite da proliferação da senescência celular (ERENPREISA; CRAGG, 2007).

3.2 Agentes quimioterápicos e seus efeitos adversos

A história do tratamento do câncer começa nos tempos antigos. Embora Hipócrates (460-370 a.C) tenha introduzido a palavra *cancer*, são os Papiros de Edwin Smith e Ebers (por volta de 1600 a.C) os documentos médicos mais

antigos que descrevem algumas formas de tratamento (PAPAC, 2001; WOZNIAK et al., 2012). O primeiro método aplicado para o tratamento do câncer, reconhecido até hoje, foi a ressecção cirúrgica. Mas foi nos primeiros anos do século XX que o químico alemão Paul Ehrlich desenvolveu medicamentos eficazes contra doenças infecciosas. Ele chamou esse processo de “quimioterapia” e definiu esse conceito como um tratamento com o uso de agentes farmacológicos (KRUKIEWICZ; ZAK, 2016).

A quimioterapia é um dos métodos mais comumente usados no tratamento do câncer até os dias atuais, sendo um importante componente no tratamento do câncer, aumentando a sobrevida dos pacientes. No entanto, apesar de prolongar a vida, o efeito da quimioterapia na qualidade de vida de um paciente é questionável. O pensamento convencional afirma que os agentes quimioterápicos atacam diretamente as células tumorais. Este conceito surge do fato de que estes agentes interferem na síntese de DNA, do RNA, de proteínas ou produzem danos diretos ao DNA, no entanto eles agem tanto nas células tumorais quanto nas células saudáveis e são conhecidos por alterar e causar mutações no DNA (CORRIE, 2008; EMAM et al., 2018).

Infelizmente, na maior parte dos casos, o tratamento quimioterápico leva a efeitos colaterais severos, como anemia, diarreia, dor, fadiga, mudança de apetite, náuseas, vômitos, dispneia, arritmias e déficits cognitivos, perda de cabelo, supressão da medula óssea, toxicidade renal, entre outros, que podem causar complicações sistêmicas substanciais e que têm impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes com câncer. Eles variam de acordo com o tempo de exposição, da concentração e do tipo de fármaco e quando graves, é exigido a redução da dose ou a descontinuação da quimioterapia (COLAGIURI et al., 2008; FUJITA et al., 2018).

Efeitos centrais cognitivos sutis foram observados em um número substancial de pacientes, com incidência variando de 15 a 80% dos pacientes recebendo quimioterapia. O conjunto das complicações adversas frequentemente interferem no protocolo terapêutico, exige adaptações do tratamento ou até mesmo sua finalização precoce (SEIGERS et al., 2013; GRASU; LAPORTE, 2015). Além disso, ao longo de um período de tempo, o tratamento pode favorecer o surgimento de resistência (SAJITH et al., 2015).

Fármacos quimioterápicos como paclitaxel e docetaxel, ambos da família dos taxanos, são amplamente utilizados no tratamento do câncer de ovário, câncer de mama, câncer de pulmão e câncer de pâncreas. A supressão do crescimento celular é conseguida através da polimerização de microtúbulos por ligação à subunidade beta da tubulina. O paclitaxel causa sintomas de neuropatia periférica em até 90% dos pacientes tratados, mas é menos freqüente com docetaxel do que com paclitaxel. Além disso, a encefalopatia aguda em pacientes que receberam paclitaxel foi documentada. Roedores tratados com paclitaxel ou docetaxel apresentaram prejuízos na aprendizagem e memória. Assim, apesar da baixa taxa de penetração destes fármacos no SNC, as alterações na morfologia e cognição relacionadas sugerem um impacto prejudicial do tratamento dos taxanos no funcionamento cognitivo (ZISKE et al., 2002; MUALLAOGLU; KOCER; GULER, 2012; FARDEL; VARDE; JOHNSTON, 2013; CALLAGHAN; O`MARA, 2015; MUSTAFA et al., 2017; SMITH et al., 2017).

Certos tipos de radiação e quimioterapia também estão associados ao aumento do risco de desenvolver complicações cardiovasculares, e alguns desses efeitos podem não se manifestar até 20 anos após o tratamento do câncer. Dentre os quimioterápicos que têm sido implicados em causar cardiomiopatia estão as antraciclina, anticorpos monoclonais, agentes alquilantes, agentes antimicrotubulares e inibidores do proteassoma. A classe quimioterapêutica mais conhecida neste processo contém as antraciclina (particularmente a doxorubicina) por aumentar o risco de cardiomiopatia (disfunção sistólica e insuficiência cardíaca) por geração de radicais livres (SWAIN et al., 2003; OKWUOSA; ANZEVINO; RAO, 2016).

No passado, a alopecia era o evento dermatológico mais comum que se aparecia após o início do uso de quimioterápicos. A maior incidência e gravidade dos efeitos dermatológicos com novas terapias, como a síndrome mão-pé (síndrome eritrodisestesia palmo-plantar), *rash* papulo-pustular (acneiforme) e ceratoacantomas/carcinomas epidermóides tornaram-se mais prevalentes e uma preocupação crescente no tratamento de pacientes com câncer e tem um profundo impacto no bem-estar físico, emocional, financeiro e psicossocial dos pacientes (AGHA et al., 2007; EILERS, et al., 2010; JOSHI et al., 2010; CHEN et al., 2012).

Como os agentes quimioterápicos tem preferência por células em divisão, o efeito tóxico da quimioterapia na espermatogênese já foi demonstrado pela avaliação de análises de sêmen e outros testes de diagnóstico de espermatozóides. Os homens enfrentam um alto risco de azoospermia permanente com dosagens crescentes de agentes alquilantes (isto é, ciclofosfamida) (PATEL; HOTALING, 2019)

Diante de diversos efeitos colaterais causados pela quimioterapia, a descoberta de novos fármacos desafia constantemente a ciência a investigar novos fármacos e/ou procurar novas formas de tratar malignidades com menos efeitos colaterais, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (RUHLMANN et al., 2015).

3.3 Substâncias sintéticas no tratamento do câncer

O conceito do valor dos medicamentos recentemente dominou a oncologia. O investimento em pesquisa e desenvolvimento farmacêutico (P & D) aumentou substancialmente nas últimas décadas. Lamentavelmente, isso não se traduziu em um aumento correspondente na produção em termos de novos medicamentos aprovados, indicando que a inovação terapêutica se tornou mais desafiadora (MUNOS, 2009). Ao mesmo tempo, os custos dos cuidados de saúde estão em constante ascensão, alimentados pelo envelhecimento da população e pelo aumento paralelo da carga de doenças crônicas, incluindo o câncer (VAUDANO, 2013).

Os investimentos em larga escala produziram grandes avanços na compreensão da biologia tumoral, o que se traduziu em um aumento, mas não proporcional aos investimentos, de novos medicamentos anticâncer aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA, Estados Unidos). Esses novos medicamentos antineoplásicos geraram expectativas, especialmente, medicamentos para medicina personalizada - os pacientes a serem tratados são selecionados com base em um biomarcador preditivo genômico - representando uma grande esperança na luta contra o câncer (KOEHLER et al., 2016; MILLER; LANTHIER, 2015).

De fato, mais de dois terços dos medicamentos colocados no mercado farmacêutico são derivados de produtos naturais ou estruturalmente

semelhantes, entretanto a competição entre as empresas farmacêuticas para criar novas classes de drogas levou-as a encontrar uma maneira de acelerar o processo de descoberta de medicamentos. O desenvolvimento da tecnologia *high throughput screening* (HTS - triagem de alta produtividade) foi esse avanço. O aumento dramático da velocidade do ensaio, juntamente com a introdução da química combinatória, levou as empresas farmacêuticas a acreditar que a combinação dessas duas tecnologias forneceria as primeiras drogas que desejavam. O paradigma de triagem de produtos naturais estabelecido no final dos anos 80 e início dos anos 90 não era compatível com a abordagem HTS em termos da linha do tempo da chamada tela "blitz" (início ao fim em três meses). Assim, a promessa de um suprimento pronto de grandes bibliotecas de compostos sintéticos levou muitas empresas a eliminar ou reduzir drasticamente seus esforços de seleção de produtos naturais (LAM, 2007; NEWMAN; CRAGG, 2016).

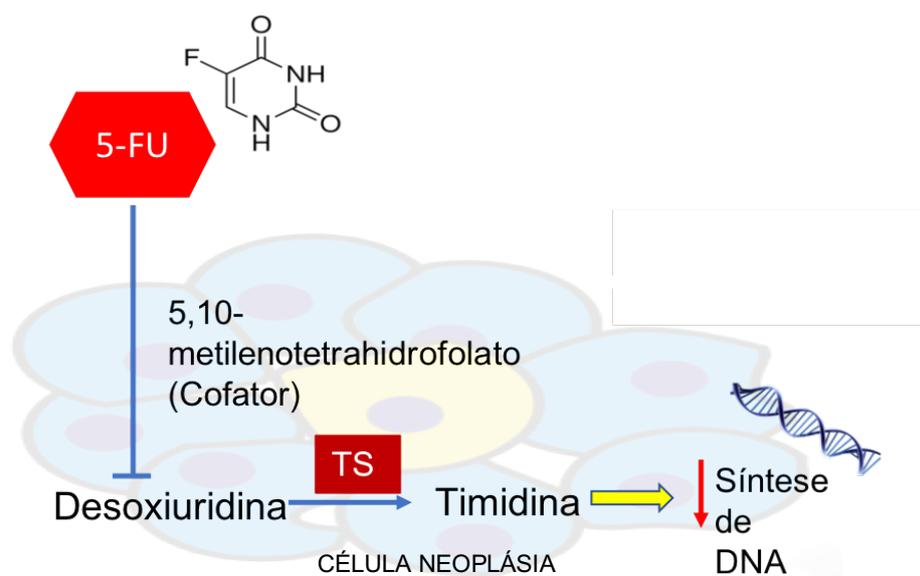
A falta de foco de muitas empresas farmacêuticas foi outra queda para os produtos naturais - há tantas fontes diversificadas de produtos naturais que as empresas farmacêuticas se esforçam demais ao olhar para muitas áreas. Essas questões levaram à percepção dentro da indústria de que encontrar um produto natural promissor para o tratamento de qualquer doença era um desafio caro e difícil que não valia a pena o tempo e o custo. Além disso, a descoberta de medicamentos de produtos naturais tem várias limitações quando comparada à descoberta de drogas químicas sintéticas (AMIRKIA; HEINRICH, 2015).

Os medicamentos de primeira classe, os quais dependem de um novo mecanismo de ação farmacológico, representam o sucesso da inovação radical e podem, portanto, ter um alto valor (VIVOT et al., 2017). Nesse contexto específico, o número de aprovações regulatórias para novas entidades moleculares anticâncer aumentou nos últimos 5 anos, provavelmente devido à capacidade de projetar agentes direcionados, uma consequência da melhor compreensão molecular das bases do câncer. Alguns medicamentos demonstraram atividade clínica excepcional em pequenos ensaios de fase I ou fase II (KOEHLER et al., 2016).

Um bom exemplo foi o de Heidelberger et al. (1957) ao sintetizarem o 5-Fluoruracil (5-FU) em 1957, como antimetabólito. A forma ativa dessas

drogas é a uridina 5'-fosfato, que é gerada *in vivo* (**Figura 2**). O 5-FU e os seus derivados são potentes inibidores da timidilato sintase (TS) baseados no mecanismo, uma enzima que converte 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) em 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) utilizando 5, 10-metilenotetrahidrofolato como a fonte do grupo metila, bem como o redutor. O 5-FU tem sido amplamente utilizado no tratamento de câncer de pele, mama, colorretal e gástrico. Infelizmente, descobriu-se que o 5-FU tem efeitos colaterais neurotóxicos e cardiotoxicos. A toxicidade também deriva da falta de seletividade do fármaco contra tumores e pode ocorrer resistência se a célula produz quantidades excessivas de dUMP para competir com o fármaco no sítio ativo (ISANBOR; O`HAGAN, 2006).

Figura 2 - Mecanismo de ação do 5-FU

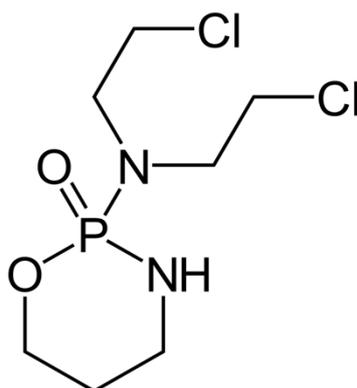


Legenda: TS: timidilato sintase; 5-FU: 5-Fluorouracil

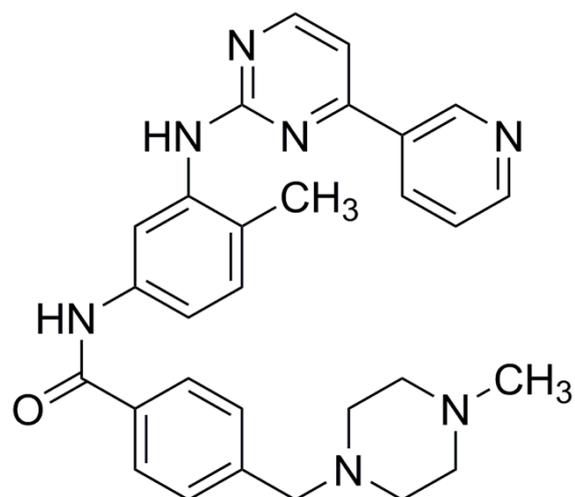
A ciclofosfamida (2- [bis- (2-cloroetil) amino] -tetra-hidro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-óxido, **Figura 3**), um agente alquilante, foi sintetizada pela primeira vez em 1958 por Norbert Brock e desde então tem sido usada para tratar uma série de doenças. A alta dose de ciclofosfamida definida como uma dose superior a 120 mg/kg foi, posteriormente, usada para tratar uma série de cânceres devido ao seu efeito citotóxico contra câncer de mama, mieloma múltiplo e leucemias. Até hoje, 40 anos após sua introdução, a ciclofosfamida é um dos quimioterápicos mais utilizados e constituinte de muitos regimes de

poliquimioterapia (ARNOLD; BOURSEAUX; BROCK, 1958; BAUMANN; PREISS, 2001; BRUMMAIER et al., 2013; TELES et al., 2017). A baixa dose de ciclofosfamida, tipicamente 1 a 3 mg/kg, é usada para tratar o câncer, sendo esta geralmente bem tolerada e reduzido risco de efeitos colaterais (HANDOLIAS et al., 2016).

Figura 3 - Estrutura química da ciclofosfamida



Em 1993, Druker e colaboradores sintetizaram e testaram uma série de moléculas contendo o esqueleto fenilaminopirimidina, dentre elas o imatinibe (**Figura 4**). Com o avanço dos testes clínicos, este fármaco passou a ser considerado como um “milagre da ciência”. Estatísticas demonstraram que quase 100% dos pacientes tratados com o mesilato de imatinibe alcançavam a remissão total da doença. O imatinibe é um inibidor de tirosina quinase usado primeiramente para leucemia mielóide crônica (LMC) positiva para cromossomo Filadélfia (Ph⁺). Depois, verificou-se que o imatinibe tem efeito terapêutico em vários tumores sólidos. Por exemplo, sua função antimetastática é relatada em câncer de mama, câncer de pulmão e dermatofibrossarcoma protuberante quando usado isoladamente ou combinado com outros agentes antitumorais (CAPDEVILLE et al., 2002; STACCHIOTTI et al., 2016).

Figura 4 - Estrutura química do Imatinibe

Embora seja amplamente reconhecido que avanços foram feitos tanto no entendimento, como no tratamento do câncer, um grande número de fármacos anticâncer ainda falham devido à falta de eficácia em estudos de estágio avançado, o que exige melhorias na compreensão da biologia subjacente do câncer e o desenvolvimento de novas moléculas mais seletivas e eficazes contra o câncer (RUGGERI; CAMP, 2013).

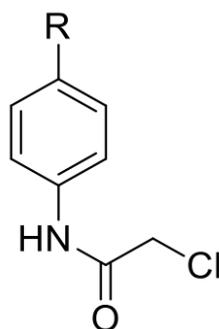
3.4 Acetamidas sintéticas

As acetamidas são amplamente utilizadas como fármacos, pesticidas, fibras, solventes e reagentes (FINLAYSON; PITTS, 1999). Elas são responsáveis pelas ligações de hidrogênio que ajudam a formar as estruturas secundárias e terciárias das proteínas. Seus derivados são compostos orgânicos de interesse significativo em química medicinal (BARNES et al., 2010) e manifestam uma série de propriedades farmacológicas: analgésico, antipirético (JAWED et al., 2010; OZKAY et al., 2011), leishmanicida (PACHECO et al., 2013; VOSOOGHI et al., 2015), antitumoral (KALDRIKYAN et al., 2009), inseticida (HLADIK et al., 2006), bactericida e fungicida (ERTAN et al., 2007; KATKE, 2011), amebicida, giardicida (HERNANDEZ-NUNEZ et al., 2009), tratamento da diabetes (HAYAKAWA et al., 2010) e também possuem aplicações agropecuárias e características toxicológicas (BARNES et al., 2010).

Além disso, estes compostos têm sido amplamente utilizados como intermediários para a síntese de substâncias bioativas (JAIN et al., 2013; HARKOV et al., 2013), destacando a relevância desses compostos nos campos farmacológicos e sintéticos. Deles a atividade biológica é considerada resultante da alquilação de nucleófilos essenciais (JABLONKAI, 2003),

As cloroacetamidas ($\text{ClCH}_2\text{CONH}_2$, **Figura 5**) estão entre os herbicidas mais utilizados e de amplo espectro. Eles são usados para controlar gramíneas e ervas daninhas de folhas largas em culturas de milho, soja e algodão. Além disso, são usadas para a síntese de outros compostos biologicamente ativos (HERNANDEZ-NUNEZ et al., 2009).

Figura 5 - Estrutura química geral das cloroacetamidas



Considera-se que a atividade biológica das cloroacetamidas resulta da alquilação de nucleófilos biologicamente importantes, especialmente de grupos tiol (JAWORSKI, 1956), tais como enzimas contendo glutathione e tiol (JABLONKAI, HATZIOS, 1991; JABLONKAI, DUTKA, 1992). Em um modelo, um deslocamento nucleofílico pode ocorrer entre o α -halogênio reativo da cloroacetamida e o grupo amino de iniciação - metionil-tRNA - bloqueando assim a biossíntese de proteínas (JABLONKAI, 2003). As moléculas 2-cloro-N-alkil ou arilacetamidas também atuam como um intermediário que é sintetizado por reação de substituição nucleofílica de cloreto de cloroacetil e diferentes aminas aquosas (KATKE et al., 2011).

Estudos de metabolismo revelaram que o metabolismo inicial de várias cloroacetamidas ocorre através da conjugação da glutathione (GSH). Uma vez que numerosos sistemas enzimáticos contêm grupos sulfidril vitais à atividade

da enzima, é concebível que uma grande variedade de enzimas possa ser inibida pelas cloroacetamidas (SCHMALFUB et al., 2000). Acredita-se que a seletividade de cloroacetamidas dependa da concentração, com a conjugação da glutatona como a reação crucial nesse processo. Como herbicidas, tais acetamidas afetam a formação de ácidos graxos e sua dessaturação (WEISSHAAR; BOGER, 1991).

Do ponto de vista da quimioterapia anticâncer, moléculas de arilacetamidas tem sido pouco estudadas (KALDRIKYAN et al., 2009). Soma-se a isso o fato que a resistência a agentes quimioterápicos abriu o caminho para desenvolver novas moléculas sintéticas que agem de forma alvo-dirigida (SAJITH et al., 2015).

As células cancerígenas apresentam notável adaptabilidade e robustez para sobreviver, fazer metástase e resistir a terapias, o que tem tornado o desenvolvimento de medicamentos ainda mais desafiador devido aos mecanismos moleculares heterogêneos subjacentes à progressão do tumor humano (MARDINOGLU; NIELSEN, 2015). Nesse contexto, moléculas baseadas nas arilacetamidas são relativamente mais simples e facilmente modificadas, permitindo a síntese de uma grande variedade de moléculas.

Dessa forma, o desenvolvimento de terapias efetivas contra o câncer é um objetivo importante e presente nas ciências biomédicas modernas, sendo um grande investimento para os setores público e privado. A disponibilidade limitada de sistemas pré-clínicos preditivos obscurece a capacidade de selecionar tratamentos que possam apresentar sucesso ou eventuais falhas durante a investigação clínica (PANTALEAO; LUCHS, 2010; COOK; JODRELL; TUVESON, 2012). Portanto, utilizar diferentes sistemas pré-clínicos preditivos da ação antitumoral aumenta as chances de selecionar moléculas com atividade com maior probabilidade em demonstrar atividade anticâncer em pelo menos em clínicos de Fase II.

3.5 Modelos de ensaios citotóxicos, toxicológicos e antioxidantes

3.5.1 Ensaios de viabilidade celular

Os modelos toxicológicos *in vitro* baseiam-se mais frequentemente em ensaios de cultura de tecidos e ensaios de viabilidade celular. Os ensaios de viabilidade celular baseiam-se numa ampla variedade de princípios, desde os testes clássicos de exclusão de corantes até à libertação de LDH, e técnicas fluorescentes e bioluminescentes (SALI et al., 2016). Muitos métodos de avaliação de citotoxicidade foram desenvolvidos para examinar a viabilidade e proliferação de células cultivadas na presença de compostos químicos.

O metabolismo celular é o foco de muitos ensaios de viabilidade celular. Ensaios de células vivas versus células mortas em uma amostra fornecem estimativas da resposta celular a um insulto e são usadas como critério de avaliação de citotoxicidade. Estes ensaios envolvem inclusão diferencial, exclusão ou conversão de um corante adicionado ou conversão enzimática de um precursor de corante em células vivas versus células mortas que podem então ser distinguidas e quantificadas colorimetricamente (REKHA; ANILA, 2019).

Os ensaios de proliferação e viabilidade celular para células cultivadas foram largamente baseados na redução de sais de tetrazólio incolores a formazans coloridos. O MTT foi introduzido para a detecção histoquímica da atividade da desidrogenase por Pearse (1957).

O MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) é um dos testes mais amplamente utilizados para estudos de viabilidade celular, proliferação, citotoxicidade, quimio e radiosensibilidade *in vitro*. Em comparação com métodos alternativos, o ensaio de viabilidade MTT é mais simples e consome menos tempo, e também permite avaliação semiautomática usando placas de múltiplos poços e leitores de placas fotométricas. (STOCKERT et al., 2018). Testes baseados em tetrazólio, como o ensaio MTT, medem a viabilidade celular em termos da capacidade de células metabolicamente ativas de reduzir o sal amarelo de tetrazólio em cristais de formazan púrpura que podem ser solubilizados e quantificados espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983).

Problemas envolvendo o produto formazan insolúvel de MTT levaram à investigação e à criação de tetrazólios alternativos com propriedades diferentes. O XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5-carboxanilida-2H-tetrazólio) foi o primeiro tetrazólio desenvolvido que produziu um produto

solúvel de formazano solúvel mediante redução celular (PAULL et al., 1988). Os dois grupos de ácido sulfônico no XTT são críticos para a solubilidade como um produto formazan e deram a este ensaio de viabilidade uma nova abordagem, eliminando a necessidade de uma segunda adição de solvente de solubilização. No entanto, XTT tem lutado para ganhar ampla aceitação devido à sua inerente solubilidade limitada em tampões aquosos (NILES; MORAVEC; RISS, 2008).

O ensaio Alamar blue, também conhecido como teste de redução da resazurina, trabalha com base no fato de que a resazurina (azul e não fluorescente) é reduzida pelo NADH para produzir resorufina (rosa e altamente fluorescente). Como o alamar blue não causa toxicidade e destruição às células, a avaliação da viabilidade celular com este corante oferece a vantagem de conduzir experimentos simultâneos envolvendo mRNA, imunofenotipagem, ensaios de apoptose e citogenética (TAHARA et al., 2017).

Seu ingrediente ativo é resazurina (7-hidroxi-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) que também é conhecida como resazurina, resazoína, diazo-resorcinol ou azoresorcin (RAMPERSAD, 2012). A resazurina é não fluorescente, mas ao se reduzir é convertido num composto fluorescente (resorufina). É amplamente aceito que essa redução de resazurina para resorufina ocorre dentro das células vivas pelas enzimas redutoras e, portanto, a fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de viabilidade celular (MUNSHI et al., 2014).

3.5.2 *Danio rerio* (zebra fish) e *Artemia salina*

O *zebra fish* é um peixe pequeno de água doce de 2-4 centímetros, cujas características físicas facilitam a observação da anatomia interna, a dos estágios de desenvolvimento e a identificação de traços fenotípicos durante a mutagênese. Vantagens como o tamanho pequeno (requer menos espaço que ratos e camundongos), ciclo de vida curto, alta fecundidade, sequência genômica conhecida e as várias aplicações (investigação de câncer, doenças cardíacas, doenças comportamentais, disfunções neurológicas e observação de mutações e problemas no desenvolvimento de órgãos após exposição à

substância química) facilitam seu uso a nível laboratorial e científico (PETERSON et al., 2008).

Tem sido amplamente utilizado em estudos biológicos e bioquímicos para verificar as consequências genotóxicas. O embrião de peixe-zebra emergiu como um importante modelo de desenvolvimento de vertebrados, uma vez que os embriões são opticamente transparentes durante os primeiros estágios da vida, tem um córion claro desenvolvido externamente, o que elimina a toxicidade materna como um fator de confusão. Também este peixe tem alta fecundidade e sua organogênese ocorre rapidamente. Como tal, encontrou utilidade na triagem de diferentes produtos químicos tóxicos que inibem ou interferem nos processos de desenvolvimento (SREEDEVI et al., 2014, SUGANYA et al., 2019).

O microcrustáceo *Artemia salina*, um animal cosmopolita eurialino é, frequentemente, aplicado em bioensaios de toxicidade para pesquisa preliminar de atividade biológica de extratos e frações obtidos a partir de produtos naturais e sintéticos. É um organismo simples convenientemente usado para monitorar a citotoxicidade de toxinas e insumos ativos e inativos devido ao seu ciclo biológico curto e sensibilidade (MERINO et al., 2015).

3.5.3 Ensaio *Allium cepa*

Historicamente, as plantas têm sido usadas como organismos indicadores, em estudos de mutagênese em eucariotos superiores. Os sistemas vegetais possuem uma variedade de parâmetros genéticos bem definidos, incluindo alterações na ploidia, aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs (DEBNATH et al., 2018).

O *Allium cepa* (cebola) tem sido considerado como o sistema de teste mais bem estabelecido para indicar a presença de substâncias químicas mutagênicas devido à dinâmica sensível do crescimento da raiz, fase mitótica clara, número cromossômico estável com características cinéticas de proliferação, portanto adequado para estudo citogenotóxico. O teste é baseado no estudo cromossômico das células meristemáticas das células da raiz apical de *A. cepa* para determinar as influências de substâncias genotóxicas ou

substâncias aneugênicas (PATHIRATNE; HEMACHANDRA; DE SILVA, 2015).

Esse sistema de teste permite a avaliação de diferentes parâmetros tóxicos/genotóxicos (por exemplo, inibição/retardamento do crescimento radicular e do índice mitótico para avaliar toxicidade/citotoxicidade, aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares para testar genotoxicidade e indução de micronúcleos para verificar mutagenicidade) . Além disso, este sistema de teste fornece informações para avaliar os mecanismos genotóxicos de um agente (efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos) no material genético (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

3.5.4 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) é um organismo modelo para estudos básicos de biologia celular eucariótica. Facilmente cultivada, a levedura se divide rapidamente em um curto período de tempo. O crescimento e a divisão da levedura podem ser controlados de forma eficaz através da modulação das condições de cultura (MENG et al., 2017). Estes são eucariontes unicelulares cuja estrutura e processos biológicos e fisiológicos são semelhantes aos das células de eucariotos superiores. Pesquisas utilizando levedura podem ser uma etapa intermediária entre estudos bioquímicos *in vitro* e estudos em animais e humanos (ŚWIECŁO et al., 2018).

Atualmente, várias cepas de leveduras (tipo selvagem e mutantes) são usadas para determinar as propriedades antioxidantes de diversos tipos de amostras. Normalmente eles são prejudicados por meio de uma substância pró-oxidante, como o peróxido de hidrogênio. A restauração de parâmetros fisiológicos ou bioquímicos em seu estado prévio (antes do tratamento com o pró-oxidante) na presença de compostos bioativos é indicativa de suas propriedades antioxidantes (PIOVEZAN-BORGES et al., 2016)

Baseado na conservação da resposta ao estresse oxidativo entre *S. cerevisiae* e humanos, *S. cerevisiae* também é usado como um organismo modelo para pesquisa de estresse oxidativo e defesa antioxidante. Tanto os processos metabólicos internos quanto os estímulos de estresse ambiental produzem Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), e como consequência, o

acúmulo excessivo de EROs ativa a resposta ao estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante (MENG et al, 2017).

A Cu/Zn-superóxido dismutase citoplasmática (SOD), codificada pelo gene SOD1, parece ser uma enzima chave envolvida na regulação dos níveis intracelulares de EROs e na proteção de células da toxicidade exógena de agentes oxidantes. As defesas antioxidantes celulares também incluem vários outros fatores importantes, como a superóxido dismutase-Mn mitocondrial, codificada pelo gene SOD2. Protege as mitocôndrias das EROS geradas durante a respiração e a exposição ao etanol (PEREIRA et al., 2003; MARTINS; MANFREDINI; BENFATO, 2005). A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante comum presente quase em todos os tecidos vivos que utilizam oxigênio. A enzima usa ferro ou manganês como cofator e catalisa a degradação ou redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conseqüentemente completando o processo de desintoxicação imitado pela SOD (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

REFERÊNCIAS

- AGHA, R.; KINAHAN, K.; BENNETT, C.L.; LACOUTURE, M.E. Dermatologic challenges in cancer patients and survivors. **Oncology**, v. 21, p. 1462-1472, 2007.
- AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: a survey of stakeholders in industry and academia. **Frontiers Pharmacology**, v. 6, p. 1-8, 2015.
- ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat. **Nature**, v. 181, n. 4613, p. 931, 1958.
- BARNES I.; SOLIGNAC, G.; MELLOUKI, A.; BECKER, K.H. Aspects of the atmospheric chemistry of amides. **ChemPhysChem**, v.11, p. 3844–3857, 2010.
- BAUMANN, F.; PREISS, R. Cyclophosphamide and related anticancer drugs. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 764, n. 1–2, p. 173-192, 2001.
- BRUMMAIER, T.; POHANKA, E.; STUDNICKA-BENKE, A.; PIERINGER, H. Using cyclophosphamide in inflammatory rheumatic diseases. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 7, p. 590-596, 2013.
- CALLAGHAN, C.K.; O'MARA, S.M. Long-term cognitive dysfunction in the rat following docetaxel treatment is ameliorated by the phosphodiesterase-4 inhibitor, rolipram. **Behavior Brain Research**, v. 290, p. 84-89, 2015.
- CAPDEVILLE, R.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; MATTER A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. **Nature Reviews**, v. 1, n. 7, p. 493-502, 2002.
- CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 61, p. 192-208, 2004.
- CHEN, A.P.; SETSER, A.; ANADKAT, M.J.; COTLIAR, J.; OLSEN, E.A.; GARDEN, B.C.; LACOUTURE, M.E. Grading dermatologic adverse events of cancer treatments: The Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 4.0. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1025-1039, 2012.
- COLAGIURI, B.; ROSCOE, J.A.; MORROW, G.R.; ATKINS, J.N.; GIGUERE, J.K.; COLMAN, L.K. Do patient expectancies, quality of life, and postchemotherapy nausea interrelate? **Cancer**, v. 113, p. 654-661, 2008.

COOK, N.; JODRELL, D. I.; TUVESON, D. A. Predictive *in vivo* animal models and translation to clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 253-260, 2012.

CORRIE, P.G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine**, v. 36, p. 24-28, 2008.

DEBNATH, P.; MONDAL, A.; HAJRA, A.; DAS, C.; MONDAL, N.K. Cytogenetic effects of silver and gold nanoparticles on *Allium cepa* roots. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, n. 2, p. 519-526, 2018.

DIGIOVANNI, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 54, n. 1, p. 63-128, 1992.

DRUKER, B.J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO, S.; SEGAL, G.M.; FANNING, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N.B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. **Nature Medicine**, v. 2, p. 561–566 1996.

EILERS, R.E.J.; GANDHI, M.; PATEL, J.D.; MULCAHY, M.F.; AGULNIK, M.; HENSING, T.; LACOUTURE, M.E. Dermatologic infections in cancer patients treated with epidermal growth factor receptor inhibitor therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, p. 47-53, 2010.

EMAM, S.E.; ANDO, H.; LILA, A.S.A.; KOBAYASHI, S.; SHIMIZU, T.; OKUHIRA, K.; ISHIMA, Y.; ISHIDA, T. Doxorubicin Expands in Vivo Secretion of Circulating Exosome in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.41, p. 1078–1083, 2018.

ERENPREISA, J.; CRAGG, M.S. Cancer: a matter of life cycle? **Cell Biology International**, v. 31, n. 12, p. 1507-1510, 2007.

ERTAN, T.; YILDIZI, I.; OZKAN, S.; TEMIZ-ARPACI, O.; KAYNAK, F.; YALCIN, I.; AKI-SENER, E.; ABBASOGLU, U. Synthesis and biological evaluation of new N-(2-hydroxy-4(or 5) nitro/aminophenyl) benzamides and phenylacetamides as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 2032-2044, 2007.

FARDELL, J.E.; VARDY, J.; JOHNSTON, I.N. The short and long term effects of docetaxel chemotherapy on rodent object recognition and spatial reference memory. **Life Science**, v. 93, n. 17, p. 596-604, 2013.

FINLAYSON-PITTS, B.J.; PITTS JR, J.N. Chemistry of the upper and lower atmosphere: theory, experiments, and applications, **Academic Press**, v.2, p. 1-10,1999.

FUJITA, Y.; HINO, S.; SAWAKI, K.; NAKANO, M.; KANEKO, T.; HORIE, N.; IIDA, S. Peripheral neuropathy arose in the trigeminal nerve during chemotherapy with docetaxel: A report of two cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology**, v. 30, n. 4, p. 359-364, 2018.

GOLEMIS, E.A.; SCHEET, P.; BECK, T.N.; SCOLNICK, E.M.; HUNTER, D.J.; HAWK, E.; HOPKINS, N. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. **Genes & Development**, v. 32, n. 13-14, p. 868-902, 2018.

GRASU, B.L.; LAPORTE, D.M. Hand Problems Related to Chemotherapeutic Agents. **The Journal of Hand Surgery**, v. 40, n. 12, p. 2473-2476, 2015.

GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, p. 883–899, 2010.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANDOLIAS, D.; QUINN, M.; FOO, S.; MILESHKIN, L.; GRANT, P.; DUTU, G.; RISCHIN, D. Oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 1, p. E154-160, 2016.

HARKOV, S.; HAVRYLYUK, D.; ATAMANYUK, V.; ZIMENKOVSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and biological activity of isatines bearing thiazolidinone and pyrazoline moieties. **Pharmacia**, v.60, p.8-18, 2013.

HAYAKAWA, M.; KIDO, Y.; NIGAWARA, T.; OKUMURA, M.; KANAI, A.; MAKI, K.; AMINO, N., 2010. Phenylacetamide derivative. U.S. Patent 20100286171 A1.

HEIDELBERGER, C.; CHAUDHUARI, N.K.; DANENBERG, P.;MOOREN, D.; GRIESBACH, L. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature*, v. 179, p. 663-666, 1957.

HERNANDEZ-NUNEZ, E.; TLAHUEXT, H.; MOO-PUC, R.; TORRES-GOMEZ, H.; REYES-MARTINEZ, R.; CEDILLO-RIVERA, R.; NAVA-ZUAZO, C.; NAVARRETE-VAZQUEZ, G. Synthesis and *in vitro* trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of N acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1H-imidazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2975-1984, 2009.

HLADIK, M.L.; LYNN ROBERTS, A.; BOUWER, E.J. **Chloroacetamide herbicides and their transformation products in drinking water**. Awwa Research Foundation and U.S. Washington: Environmental Protection Agency, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.

ISANBOR, C.; O'HAGAN, D. Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 303-319, 2006.

JABLONKAI, I. Alkylating reactivity and herbicidal activity of chloroacetamides. **Pest Management Science**, v. 59, n. 4, p. 443-450, 2003.

JABLONKAI, I.; DUTKA, F. Preparative-scale synthesis and physicochemical properties of cysteine and glutathione conjugates of chloroacetamides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.506-508, 1992.

JABLONKAI, I.; HATZIOS, K.K. Role of glutathione and glutathione s-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.41, p.221-231, 1991.

JAIN, N.P.; UPASANI, C.D.; KALKOTWAR, R.S.; JAIN, U.N. Synthesis and anti-inflammatory activity of N-(Alkyl or Aryl)-2-(1H-benzotriazol-1-yl)acetamide derivatives. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science**, v. 4, n. 3, p. 1470-1480, 2013.

JAWED, H.; SHAH, S.U.A.; JAMALL, S.; SIMJEE, S.U. N-(2-hydroxy phenyl) acetamide inhibits inflammation-related cytokines and ROS in adjuvant-induced arthritic (AIA) rats. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 900-905, 2010.

JAWORSKI, E.G. Biochemical action of CDAA, a new herbicide. **Science**, v.123, p.847-848, 1956.

JOSHI, S.S.; ORTIZ, S.; WITHERSPOON, J.N.; RADEMAKER, A.; WEST, D.P.; ANDERSON, R.; ROSENBAUM, S.E.; LACOUTURE, M.E. Effects of epidermal growth factor receptor inhibitor-induced dermatologic toxicities on quality of life. **Cancer**, v. 116, p. 3916-3923, 2010.

KALDRIKYAN, M.A.; GRIGORYAN, L.A.; MELIK-OGANDZHANYAN, R.G.; ARSENYAN, F.G. Synthesis and antitumor activity of some benzofuryl-substituted 1,2,4-triazoles. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 5, p. 11-13, 2009.

KATKE, S.A.; AMRUTKAR, S.V.; BHOR, R.J.; KHAIRNAR, M.V. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/arylacetamide derivatives. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 148-156, 2011.

KLAUNING, J.E.; WANG, Z. Oxidative stress in carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 116-121, 2018.

KOEHLER, M.; DONNELLY, E.T.; KALANOVIC, D.; DAGHER, R.; ROTHENBERG, M.L. Pragmatic randomized clinical trials: a proposal to enhance evaluation of new cancer therapies with early signs of exceptional activity. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 7, p. 1342-1348, 2016.

KRUKIEWICZ, K.; ZAK, J.K. Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 927-942, 2016.

LAM, K.S. New aspects of natural products in drug Discovery. **Trend in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.

LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 123, n. 1, p. 95-113, 2018.

LUZZATI, T.; PARENTI, A.; RUGHI, T. Economic Growth and Cancer Incidence. **Ecological Economics**, v. 146, p. 381-396, 2018.

MARDINOGLU, A.; NIELSEN, J. New paradigms for metabolic modeling of human cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 34, p. 91-97, 2015.

MARTINS, V.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S. High levels of catalase in sod mutants of *Saccharomyces cerevisiae* in high aeration conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 347-351, 2005 .

MENG, D.; ZHANG, P.; LI, S.; HO, C.T.; ZHAO, H. Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 36-44, 2017.

MERINO, F.J.Z.; OLIVEIRA, V.B.; PAULA, C.S.; CANSIAN, F.C.; SOUZA, A.M.; ZUCHETTO, M.; HIROTA, B.C.K.; DUARTE, A.F.S.; KULIK, J.D.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, p.1031-1040, 2015.

MILLER, K.L.; LANTHIER, M. Regulatory watch: innovation in biologic new molecular entities: 1986–2014. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 83-83, 2015.

MOSES, C.; GARCIA-BLOJ, B.; HARVEY, A.R.; BLANCAFORT, P. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. **European Journal of Cancer**, v. 93, p. 10-18, 2018.

MUALLAOGLU, S.; KOCER, M.; GULER, N. Acute transient encephalopathy after weekly paclitaxel infusion. **Medical Oncology**, v. 29, n. 2, p. 1297-1299, 2012.

MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature**, v. 8, p. 959-968, 2009.

MUNSHI, S.; TWINING, R.C.; DAHL, R. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 70, n. 2, p. 195–198, 2014.

MUSTAFA A.M.; MOELLER, M.; RYBICKI, L.; MOORE, H.C.F. Long-term peripheral neuropathy symptoms in breast cancer survivors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 166, n. 2, p. 1-8, 2017.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NILES, A.L.; MORAVEC, R.A.; RISS, T.L. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 655-669, 2008.

NILSSON, A.; NIELSEN, J. Genome scale metabolic modeling of câncer. **Metabolic Engineering**, v. 43, p. 103-112, 2017.

OHSHIMA, H; TATEMACHI, M.; SAWA, T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 3-11, 2003.

OKWUOSA, T.M.; ANZEVINO, S.; RAO, R. Cardiovascular disease in cancer survivors. **Postgraduate Medical Journal**, v. 93, n. 1096, p. 82-90, 2016.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Disponível em: <<http://www.oecd.org/home/>>. Acessado em: 11 set. 2017.

OZKAY, D.U.; OZKAY, Y.; CAN, O.D. Synthesis and analgesic effects of 2-(2-carboxyphenylsulfanyl)-N-(4-substitutedphenyl)acetamide derivative. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, p. 152-157, 2011.

PACHECO, D.J.; TRILLERAS, J.; QUIROGA, J.; GUTIÉRREZ, J.; PRENT, L.; COAVAS, T.; MARÍN, J.C.; DELGADO, G. N-(4-((E)-3-arylacryloyl)phenyl)acetamide derivatives and their antileishmanial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1685-1690, 2013.

PANTALEAO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 439–445, 2010.

PAPAC, R.J. Origins of cancer therapy. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.74, p. 391-398, 2001.

PATEL, B.V.; HOTALING, J.M. Impact of chemotherapy on subsequent generations. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 1, p. 1-4, 2019.

PATHIRATNE, A., HEMACHANDRA, C.K., DE SILVA, N. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 1-12, 2015.

PAULL, K.D.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R.; PARSONS, J.L.; RISBOOD, P.A.; BARBERA, W.A.; GROTE, M. The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 911–914, 1988.

PEREIRA, M.D.; HERDEIRO, R.S.; FERNANDES, P.N.; ELEUTHERIO, E.C.A.; PANEK, A.D. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1620, p. 245–251, 2003.

PETERSON, R.T., NASS, R., BOYD, W.A., FREEDMAN, J.H., DONG, K., NARAHASHI, T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. **Neurotoxicology** v. 29, p. 546–555, 2008.

PIOVEZAN-BORGES, A.C.; VALÉRIO-JÚNIOR, C.; GONÇALVES, I.L.; MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.; VADUGA, A.T. Antioxidant potential of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 539-544, 2016 .

REKHA, S.; ANILA, E.I. In vitro cytotoxicity studies of surface modified CaS nanoparticles on L929 cell lines using MTT assay. **Materials Letters**, v. 236, p. 637-639, 2019.

RUGGERI, B.A.; CAMP, F. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 150-161, 2013.

RUHLMANN, C.H.; IVERSEN, T.Z.; OKERA, M.; MUHIC, A.; KRISTENSEN, G.; FEYER, P.; HANSEN, O.; HERRSTEDT, J. Multinational study exploring patients' perceptions of side-effects induced by chemo-radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 117, n. 2, p. 333-337, 2015.

SAJITH, A.M.; ABDUL KHADER, K.K.; JOSHI, N.; REDDY, M.N.; SYED ALI PADUSHA, M.; NAGASWARUPA, H.P.; NIBIN JOY, M.; BODKE, Y.D.; KARUVALAM, R.P.; BANERJEE, R.; MURALIDHARAN, A.; RAJENDRA, P. Design, synthesis and structure--activity relationship (SAR) studies of imidazo[4,5-b]pyridine derived purine isosteres and their potential as cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 21-31, 2015.

SALI, N., NAGY, S., POÓR, M., & KŐSZEGI, T. (2016). Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 79, p. 45–54, 2016.

SASAKI, Y.; OCHIAI, T.; TAKAMURA, M.; KONDO, Y.; YOKOYAMA, C.; HARA, S. Role of prostacyclin synthase in carcinogenesis. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 133, p. 49-52, 2017.

SCHMALFUB, J.; MATTHES, B.; KNUTH, K.; BÖGER, P. Inhibition of Acyl-CoA Elongation by Chloroacetamide Herbicides in Microsomes from Leek Seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 67, n. 1, p. 25-35, 2000.

SEIGERS, R.; SCHAGEN, S.B.; TELLINGEN, O.V.; DIETRICH, J. Chemotherapy related cognitive dysfunction: current animal studies and future directions. **Brain Imaging and Behavior**, v. 7, n. 4, p. 453-459, 2013.

SMITH, A.E.; SLIVICKI, R.A.; HOHMANN, A.G.; CRYSTAL, J.D. The chemotherapeutic agent paclitaxel selectively impairs learning while sparing source memory and spatial memory. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 48-57, 2017.

SREEDEVI, B.; SUVARCHALA, G.; PHILIP, G.H. Morphological and physiological abnormalities during development in zebra fish due to Chlorpyrifos. **Indian Journal of Scientific Research**, v. 5, p. 1-8, 2014.

STACCHIOTTI, S.; PANTALEO, M.A.; NEGRI, T.; ASTOLFI, A.; TAZZARI, M.; DAGRADA, G.P.; URBINI, M.; INDIO, V.; MAESTRO, R.; GRONCHI, A.; FIORE, M.; DEI TOS, A.P.; CONCA, E.; PALASSINI, E.; VINCENZI, B.; GROSSO, F.; PILOTTI, S.; CASTELLI, C.; CASALI, P.G. Efficacy and biological activity of imatinib in metastatic dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP). **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 4, p. 837-846, 2016.

SUGANYA, M.; GNANAMANGAI, B.M.; GOVINDASAMY, C.; ELSADEK, M.F.; PUGAZHENDHI, A.; CHINNADURAI, V.; SELVARAJ, A.; RAVINDRAN, B.; CHANG, S.W.; PONMURUGAN, P. Mitochondrial dysfunction mediated apoptosis of HT-29 cells through CS-PAC-AgNPs and investigation of genotoxic effects in zebra (Danio rerio) fish model for drug delivery. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 767-776, 2019.

SWAIN, S.M.; WHALEY, F.S.; EWER, M.S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. **Cancer**, v. 97, p. 2869-2879, 2003.

ŚWIĘCIŁO, A.; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, K.; NAJDA, A.; KRZEPIŁKO, A.; PRAŻAK, R.; ZAWIŚLAK, G. Application of growth tests employing a Δ sod1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to study the antioxidant activity of berry fruit extracts. **LWT**, v. 94, p. 96-102, 2018.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2009.

TANAKA, T. Introduction for inflammation and cancer. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, p. 121-122, 2013.

TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. **Journal of Oncology**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

TANAKA, T.; ISHIKAWA, H. Mast cells and inflammation-associated colorectal carcinogenesis. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 2, p. 245-254, 2013.

TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI, T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced Carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 203-209, 2013.

TELES, K.A.; SOUZA, P.M.; LIMA, F.A.C.; ARAÚJO, B.G.; LIMA, R.A.C. Rotina de administração de ciclofosfamida em doenças autoimunes reumáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 6, p. 596-604, 2017.

TIMOFTE, C. Multiscale analysis of a carcinogenesis model. **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 133, p. 298-310, 2017.

VAUDANO, E. The innovative medicines initiative: a public private partnership model to foster drug Discovery. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 6, n. 7, p. 1-7, 2013.

VINAY, D.S.; RYAN, E.P.; PAWELEC, G.; TALIB, W.H.; STAGG, J.; ELKORD, E.; LICHTOR, T.; DECKER, W.K.; WHELAN, R.L.; KUMARA, H.M.C.S.; SIGNORI, E.; HONOKI, K.; GEORGAKILAS, A.G.; AMIN, A.; HELFERICH, W.G.; BOOSANI, C.S.; GUHA, G.; CIRIOLO, M.R.; CHEN, S.; MOHAMMED, S.I.; AZMI, A.S.; KEITH, W.N.; BILSLAND, A.; BHAKTA, D.; HALICKA, D.; FUJII, H.; AQUILANO, K.; ASHRAF, S.S.; NOWSHEEN, S.; YANG, X.; CHOI, B.K.; KWON, B.S. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S185-S198, 2015.

VIVOT, A.; JACOT, J.; ZEITOUN, J.D.; RAVAUD, P.; CREQUIT, P.; PORCHER, R. Clinical benefit, price and approval characteristics of FDA-approved new drugs for treating advanced solid cancer, 2000–2015. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 5, p. 1111–1116, 2017.

VOSOOGHI, M.; SABOURIAN, R.; TAHGHIGHI, A.; MAHDAVI, M.; EMAMI, S.; RAZMI, S.; ARDESTANI, S.K.; SAFAVI, M.; FOROUMADI, P.; KAVEH, S.; KHOSHNEVISZADEH, M.; EDRAKI, N.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR study of (1,3,4-thiadiazol-2-ylthio) acetamides derived from 5-nitrofurans. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, p. 891–900, 2015.

WEISSHAAR, H.; BOGER, P. Further effects of chloroacetamides and evidence for inhibition of acetylation of DNA-associated protein. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 20-26, 1991.

WOZNIAK, A.; SZYFTER, K.; SZYFTER, W.; FLOREK, E. Head and neck cancer—history. **Przegląd lekarski**, v. 69, p. 1079-1083, 2012.

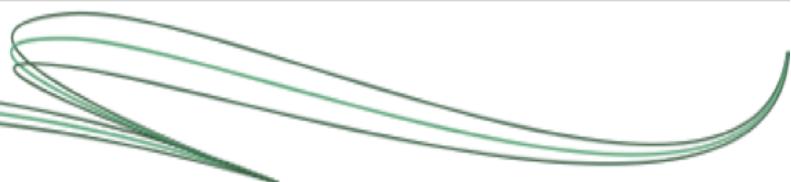
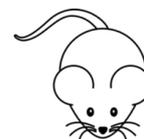
ZAMARRON, B.F.; CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 5, p. 651-658, 2011.

ZISKE, C.G.; SCHOTTKER, B.; GORSCHLUTER, M.; MEY, U.; KLEINSCHMIDT, R.; SCHLEGEL, U.; SAUERBRUCH, T.; SCHMIDT-WOLF, I.G. Acute transient encephalopathy after paclitaxel infusion: report of three cases. **Annals of Oncology**, v. 13, n. 4, p. 629-631, 2002.



CAPÍTULO 1

Avaliação toxicológica de derivados sintéticos das
arilacetamidas com aplicação de métodos
alternativos



Avaliação toxicológica de derivados sintéticos das arilacetamidas com aplicação de métodos alternativos

Kátia da Conceição Machado^a, Stefânia Neiva Lavorato^{b,c}, Jurandy do Nascimento Silva^a, Keylla da Conceição Machado^a, Débora Caroline do Nascimento Rodrigues^a, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^a, Patrícia Canteri de Souza^d, Ricardo Sergio Couto de Almeida^d, José Roberto de Oliveira Ferreira^e, Rhaul de Oliveira^f, Cesar Koppe Grisolia^f, Ricardo José Alves^b, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{a,g*},

^a Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Brasil

^b Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brasil

^c Centro de Ciências da Saúde e Biológicas da Universidade Federal do Oeste da Bahia, 47808-021, Barreiras, Brasil

^d Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057970, Londrina, Brasil

^e Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Alagoas, 57010-382, Maceió, Brasil

^f Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70910900, Brasília, Brasil

^g Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil

Avaliação toxicológica de derivados sintéticos das arilacetamidas com aplicação de métodos alternativos

Resumo

Em estudos não clínicos, os testes de *Artemia salina*, *Allium cepa* e *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo bastante aplicados na avaliação toxicológica de compostos candidatos à atividade antitumoral pelas análises de suas toxicidades, citotoxicidades e oxidante/antioxidante, assim o presente estudo avaliou a atividade citotóxica de 3 compostos da classe 2-Cloro-N-arilacetamidas ([2-cloro-N-(4-clorofenil) acetamida (composto 2), 2-cloro-N-(4-bromofenil) acetamida (composto 3) e 2-cloro-N-(4-nitrofenil) acetamida (composto 4)]) em *Artemia salina*, embriões de peixe zebra, *Allium cepa*, bem como seus efeitos oxidantes e antioxidantes em *Saccharomyces cerevisiae*. foram submetidos aos ensaios de MTT para determinar a ação antiproliferativa em linhagens de fibroblastos normais humanos e murinos (MRC-5 e L-929). Os compostos nas concentrações de 0,001; 0,01; 1; 10 e 100 µg/mL foram avaliados em *A. salina* pela viabilidade celular e em *A. cepa* nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL pela inibição do crescimento de raízes e índice mitótico, também foi identificado o potencial genotóxico dos compostos. Em *S. cerevisiae* nas concentrações tais 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL dos compostos 2, 3 e 4 foram avaliados quanto aos efeitos oxidante e antioxidante. Na avaliação da atividade citotóxica de MRC-5 e L-929, todas as 3 substâncias foram tóxicas às células, com valores de CI_{50} variando de 1,2 a 4,9 µg/mL. Os compostos apresentaram toxicidade em *A. salina* quando comparado ao controle, sendo o composto 2 o que apresentou menor valor. A citotoxicidade também foi observada especialmente para o composto 2 nas concentrações 1,93 e 7,2 mg/L, com 90% e 100% de morte dos embriões, atividades tóxicas e citotóxicas também foram observadas em *A. cepa*. Entretanto os compostos em baixa concentrações (1 e 5 µg/mL) apresentaram atividade antioxidante em *S. cerevisiae* mas em altas concentrações não modularam danos oxidativos do peróxido de hidrogênio. As atividades tóxicas, citotóxicas e genotóxicas observadas para os compostos em métodos alternativos não clínicos indicam o uso desses derivados sintéticos das arilacetamidas em pesquisas frente a suas possíveis atividades antitumorais.

Palavras-chave: 2-Cloro-N-arilacetamidas. *Saccharomyces cerevisiae*. Toxicidade. *Zebrafish*.

Toxicological evaluation of synthetic derivatives of arylacetamides with the application of alternative methods

ABSTRACT

In non-clinical studies, the tests of *Artemia salina*, *Allium cepa* and *Saccharomyces cerevisiae* have been widely applied in the toxicological evaluation of compounds that are candidates for antitumor activity by the analysis of their toxicities, cytotoxicity and oxidant/antioxidant, so the present study evaluated the cytotoxic activity of 3 (2-chloro-N-(4-bromophenyl) acetamide (compound 3) and 2-chloro-2-chloro-N-arylacetamides (2-chloro-N-(4-chlorophenyl)-N-(4-nitrophenyl) acetamide (compound 4)] in *Artemia salina*, zebrafish embryos, *Allium cepa*, as well as its oxidizing and antioxidant effects on *Saccharomyces cerevisiae*. Were submitted to MTT assays to determine antiproliferative action in human and murine normal fibroblast (MRC-5 and L-929) strains. Compounds at concentrations of 0.001; 0.01; 1; 10 and 100 µg/mL were evaluated in *A. salina* by cell viability and in *A. cepa* at concentrations of 1, 5, 10, 25 and 50 µg/mL by inhibition of root growth and mitotic index, the potential of the compounds. In *S. cerevisiae* concentrations of 1, 5, 10, 25 and 50 µg / mL of compounds 2, 3 and 4 were evaluated for oxidant and antioxidant effects. In the evaluation of the cytotoxic activity of MRC-5 and L-929, all 3 substances were toxic to cells, with IC 50 values ranging from 1.2 to 4.9 µg / mL. The compounds showed toxicity in *A. salina* when compared to the control, and compound 2 presented the lowest value. Cytotoxicity was also observed especially for compound 2 at concentrations of 1.93 and 7.2 mg / L, with 90% and 100% death of the embryos, toxic and cytotoxic activities were also observed in *A. cepa*. However, the compounds at low concentrations (1 and 5 µg / mL) showed antioxidant activity in *S. cerevisiae* but at high concentrations did not modulate oxidative damages of hydrogen peroxide. The toxic, cytotoxic and genotoxic activities observed for the compounds in non-clinical alternative methods indicate the use of these synthetic derivatives of arylacetamides in research against their possible antitumor activities.

Keywords: 2-Chloro-N-arylacetamides. *Saccharomyces cerevisiae*. Toxicity. *Zebrafish*.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de modelo animal, em especial, camundongos e ratos, é uma prática consolidada nas pesquisas biomédicas, visando usualmente, caracterizar processos biológicos ou testar tratamentos e medicamentos antes de verificar se os resultados se aplicam aos seres humanos. Tal uso de animais se deve à proximidade genética entre humanos e roedores e na suposição de que os processos biológicos de humanos e animais sejam similares (SOUZA, 2017).

O número de animais usados tem crescido com o avanço das tecnologias biomédicas, o que torna muito difícil mensurar o número real de animais usados nas pesquisas científicas, procedimentos e em aulas práticas. No ano de 2017, no Reino Unido, foram usados 3,79 milhões de animais, principalmente, camundongos, peixes, ratos e pássaros; nos Estados Unidos, 820 mil mamíferos, enquanto os dados não oficiais que incluem camundongos e ratos, sugerem que de 12 a 27 milhões de animais são utilizados anualmente; na Suíça, Noruega e Coreia do Sul foram utilizados 630 mil, 5,5 milhões e 2,88 milhões em 2016, respectivamente. Em 2015, na Austrália, 9,9 milhões e no Canadá, cerca de 3,57 milhões de animais foram usados (UNDERSTANDING ANIMAL RESEARCH, 2017). Entretanto, esse uso disseminado e, muitas vezes, indiscriminado de animais nas pesquisas tem sido motivo de diversas discussões, principalmente de caráter ético, em função do grande número de mamíferos requerido e do sofrimento causado aos mesmos durante os estudos experimentais (WHITE, 2001; MEYER, 2003; RUSCHE, 2003).

Nesse contexto, vários métodos têm sido sugeridos para evitar o uso de animais mamíferos em experimentos. Eles têm proporcionado meios alternativos para testar substâncias com potencialidade biológica e, em geral, apresentam como vantagens: melhor aproveitamento do tempo, menor mão-de-obra e boa relação custo-benefício. Dentre tais métodos alternativos podemos citar, a cultura de linhagens celulares e de tecidos e organismos alternativos como peixes, invertebrados, microrganismos e vegetais (PETERSON et al., 2008; SIGGERS; LESSER, 2008; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; DOKE; DHAWALE, 2015; ISLAM et al., 2016; ARAÚJO et al., 2016).

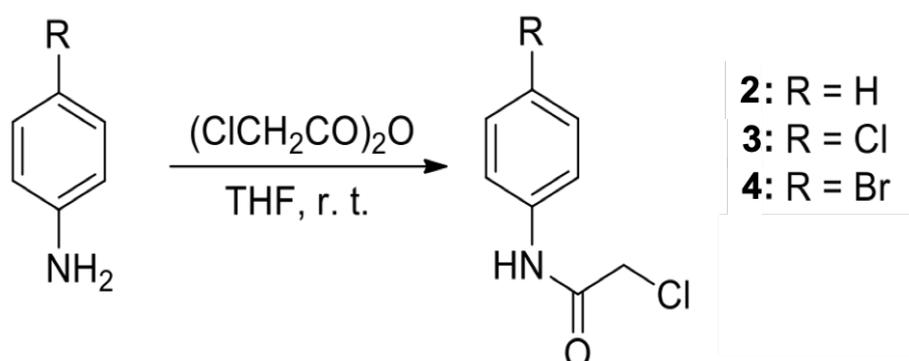
Do ponto de vista farmacotológico, o grupo das arilacetamidas tem apresentado diferentes atividades, desde uma ação agrotóxica, microbicida, inseticida, citotóxica até antidiabética (HLADIK et al., 2006; ERTAN et al., 2007; HERNANDEZ-NUNEZ et al., 2009; KALDRIKYAN et al., 2009; KATKE, 2011; PACHECO et al., 2013; LAVORATO et al., 2017). No entanto, devido à grande variedade de compostos e/ou a falta de interesse de grupos de pesquisa e das indústrias farmacêuticas, as análises toxicológicas são renegadas a segundo plano. Assim, neste trabalho, avaliamos a atividade citotóxica *in vitro* de três compostos da classe 2-Cloro-*N*-arilacetamidas nos seguintes métodos alternativos de toxicidade: linhagens celulares normais humanas, náuplios de *Artemia salina*, embriões de peixe-zebra, raízes meristemáticas em crescimento de *Allium cepa* e cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos compostos

Os compostos foram fornecidos pelo prof. Dr. Ricardo José Alves da Universidade Federal de Minas Gerais. Os compostos são da classe das 2-cloro-*N*-arilacetamidas, onde são identificadas por [2-cloro-*N*-(4-clorofenil) acetamida (composto 2), 2-cloro-*N*-(4-bromofenil) acetamida (composto 3) e 2-cloro-*N*-(4-nitrofenil) acetamida (composto 4)] os mesmos foram obtidos por meio de síntese química, pela reação da anilina apropriadamente *p*-substituída com anidrido cloroacético (LAVORATO et al., 2017).

Figura 1- Síntese de derivados de 2-cloro-N-arilacetamidas.



Fonte: Autoria própria

2.2 Ensaios antiproliferativos em células humanas normais

A citotoxicidade em L-929 (fibroblastos de camundongos) e MRC-5 (fibroblastos derivados de tecido pulmonar humano) dos 3 compostos foi determinada pelo ensaio do Alamar Blue™. As células foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. As células foram incubadas 24 h antes da adição do composto. Os 3 compostos foram adicionados (0,04-25 µg/mL) e a placa foi incubada em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação de 72 h, 20 µL da solução estoque (0,156 mg/mL) de Alamar Blue foram adicionados em cada poço. Após 72 h de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter) a 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado). Para o cálculo da inibição da proliferação celular (PC), utilizou-se a seguinte fórmula: $PC (\%) = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$, onde A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao Alamar Blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente (COSTA et al., 2008). Os grupos controles (negativo e positivo) receberam a mesma quantidade de solvente

(DMSO 0,1%). Doxorubicina (0,005 - 5 µg/mL) foi usada como controle positivo.

2.3 Toxicidade em *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade em náuplios de *A. salina* Leach foi realizada segundo metodologia descrita por Meyer (1982) e McLaughlin (1992). O teste consiste na exposição dos náuplios na fase II ou III durante 24 e/ou 48 h a concentrações crescentes do composto que se pretende testar com análise do número de organismos mortos ao final do período de exposição (CETESB, 1987; VEIGA; VITAL, 2002; EL FELS; HAFIDI; OUHDOUCH, 2016). Inicialmente, foram preparados 500 mL de uma solução sintética de sal marinho (30 g/L: NaCl 77,23%, MgSO₄ 9,62%, MgCl 7,13%, CaCl₂ 3,32%, KCl 2,11% e NaHCO₃ 0,59%), à qual foi posteriormente adicionada água mineral não clorada na proporção 1:1 (água marinha artificial) para a incubação dos ovos de *A. salina* (10 mg/L) obtidos comercialmente. Estes foram mantidos a 25 °C, com aeração constante, durante 48 h para favorecer a eclosão das larvas de náuplios. Para o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em tubos de ensaio em um volume total de 5 mL em concentrações logarítmicas dos compostos 2, 3 e 4 (0,001, 0,01, 1, 10 e 100 µg/mL). O grupo controle negativo foi representado apenas por água. Os náuplios de fase II (48 h de vida) foram analisados e a contagem do número larvas mortas foi realizada após 24 h de exposição e expressa como resultados na curva de concentração-efeito (GAD, 2014).

2.4 Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra

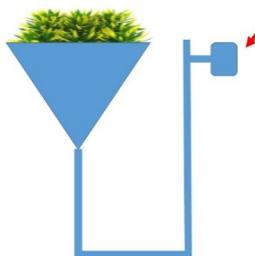
2.4.1 Manutenção e coleta de ovos de peixe-zebra

Os embriões do peixe-zebra (*Danio rerio*, Cyprinidae) utilizados nos testes de embriotoxicidade foram fornecidos pelo sistema de cultivo do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade de Brasília (G-Tox/UnB, Brasília). Os peixes adultos foram mantidos em um sistema recirculante de água, abastecido com água filtrada por carvão ativado e aerada para

eliminação de cloro. As características físicas e químicas do sistema são mantidas em: pH 7,2-7,6; dureza 6,7° dH; temperatura de 26 ± 1 °C; condutividade 468 μ S. A sala de aquários dispõe de um fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os peixes foram alimentados de duas a três vezes ao dia com ração comercial (SERAVipan™; Tetramin™) e alimentação viva (nauplii de *Artemia salina*).

A reprodução foi realizada da seguinte maneira: um dia antes do teste, foi colocado no aquário onde já se encontravam os peixes adultos machos e fêmeas (10 a 12 casais), um funil em cuja boca havia uma tela de plástico com pequenas plantas artificiais como estímulo ao acasalamento dos peixes (**Figura 2**). Na manhã seguinte, assim que as luzes se acendiam, ocorria a desova e a fecundação. Após 60 minutos, os embriões já podiam ser coletados no copo coletor acoplado ao funil. Para isso, o tubo do funil dispunha de um tubo de aeriação que levava os ovos até o coletor.

Figura 2 - Modelo de sistema utilizado para coleta dos ovos de embriões de peixe-zebra.

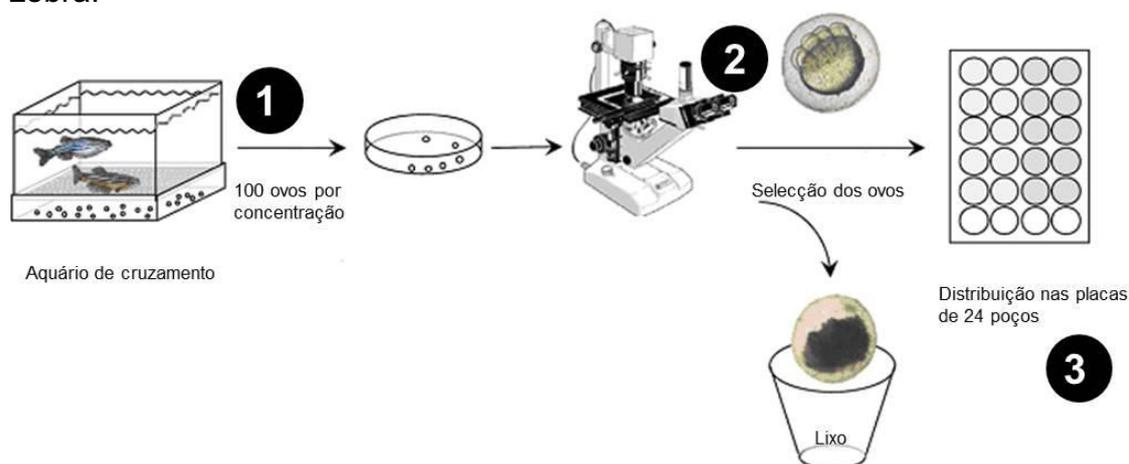


Funil tampado com uma tela (malha de 1,5mm) contendo plantas artificiais. O funil é ligado a um cano em cuja extremidade há um copo coletor com uma tela mais fina (60 μ m) (seta vermelha), para onde os ovos eram levados pela corrente provocada pela aeriação no interior do tubo.

Para a obtenção de embriões, grupos de peixes machos e fêmeas, na proporção de 1:2, respectivamente, foram colocados em aquários de 10L, no dia anterior ao teste, separados por uma barreira de acrílico. O fundo do aquário de desova foi equipado com barreiras para evitar a predação dos embriões pelos adultos. No dia posterior à preparação do acasalamento as barreiras foram retiradas pela manhã cinco minutos antes das luzes da sala de cultivo acenderem, permitindo, assim, o contato entre machos e fêmeas e, conseqüentemente, a desova. Respeitando o intervalo de desova entre 30 -

120 min, os peixes adultos foram recolhidos e devolvidos para o sistema de cultivo. A água dos aquários foi filtrada por uma peneira para a separação dos ovos, os quais foram lavados para remoção de restos de fezes e alimento. Posteriormente foi feita uma primeira triagem dos ovos viáveis a olho nu, seguida de uma seleção criteriosa dos ovos fertilizados ao estereomicroscópio (Stereoscopic STEMI 2000, Zeiss). Por fim, esses foram distribuídos, um ovo por poço, em microplacas de 24 poços, contendo as diferentes soluções teste. Para um melhor entendimento, um desenho esquemático é apresentado na **Figura 3**.

Figura 3 - Esquema dos testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra.



Da esquerda para a direita: (1) os ovos foram recolhidos dos aquários de cruzamento; (2) Os ovos foram selecionados ao estereomicroscópio e os ovos não fertilizados ou defeituosos são descartados; (3) os ovos são distribuídos em placas de 24 poços (OECD, 2013). O monitoramento diário foi feito em microscópio invertido.

2.4.2 Exposição dos ovos ao composto teste

Os ensaios com embriões foram baseados no protocolo para avaliação de toxicidade estabelecido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development*, OECD), número 236 (OECD 236) *Fish Embryo Toxicity* (FET) (OECD, 2013). Após o recolhimento dos ovos dos aquários de cruzamento, eles foram lavados e distribuídos imediatamente em microplacas com as soluções, para garantir o início da exposição nos estágios iniciais. Nas horas

seguintes, os ovos foram inspecionados individualmente em estereomicroscópio, sendo descartados os não fertilizados (ovos inviáveis), os que apresentavam danos, irregularidades na clivagem, ou injúrias no córion (OLIVEIRA et al., 2016).

A exposição foi realizada em microplacas de 24 poços com dois mililitros de cada concentração (0,14, 0,520, 1,93 e 7,2 µg/mL) do composto 2. As placas foram acondicionadas em câmara climática em condições de cultivo a 26 °C. As soluções-teste foram preparadas com a água de cultivo (características físicas e químicas previamente descritas). Os testes foram feitos em triplicata com um total de 60 organismos/concentração para a determinação da CL₅₀ em 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação com o composto 2 (HAMILTON et al., 1977).

Na fase de embrião, avaliou-se a mortalidade antes e após a eclosão (coagulação dos ovos e morte de embriões). Ademais, foram avaliadas alterações em parâmetros de desenvolvimento embrionário como: pigmentação do corpo e dos olhos, formação de somitos, presença de batimento cardíaco, separação da cauda do saco vitelínico, edema, acúmulo de hemácias, absorção do saco vitelínico. Após a eclosão foram avaliados a pigmentação do corpo e olhos, batimento cardíaco, edema, acúmulo de hemácias, absorção do saco vitelínico, inflação da bexiga natatória (120 h) e má formações da cauda (OLIVEIRA et al., 2016).

2.5 Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal de *Allium cepa*

O teste *Allium cepa* tem sido utilizado para avaliar os danos aos cromossomos, tais como aberrações cromossômicas, micronúcleos e alterações no ciclo mitótico. Foram utilizadas cebolas de tamanho pequeno e uniforme de mesma origem, não germinadas e saudáveis. As raízes secas, as camadas extremas e o parênquima central da coroa de brotamento foram retirados para aumentar a absorção pelas raízes novas e para garantir a uniformidade de brotamento e crescimento radicular. Todas as cebolas foram lavadas em água corrente, por cerca de 20 min (FISKESJÖ, 1985).

Foram utilizados cinco bulbos para cada concentração dos compostos 2, 3 e 4 (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e para os controles negativo (água desclorificada) e positivo (sulfato de cobre: 0,6 µg/mL). Posteriormente, foram colocados em frascos de vidro e o volume dos compostos foi completado a cada 24 h para 5 mL finais. As cebolas foram mantidas por 72 h no escuro a cerca de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o tempo de crescimento, as raízes foram removidas e mensuradas com auxílio de uma régua, sendo o tamanho das raízes utilizado como avaliação de toxicidade. Posteriormente, foram fixadas em solução Carnoy (etanol: ácido acético na proporção de 3:1) por 24 h, depois estocadas em etanol a 70%, conservando-se sob refrigeração até o momento da preparação histológica das lâminas (FISKESJÖ, 1985).

Para o preparo das lâminas, as raízes coletadas foram lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min), seguida de hidrólise com HCl 1N por 11 min a 60°C em banho-maria, sendo os tubos resfriados em água corrente, seguido de um novo banho de água destilada a temperatura ambiente. As raízes foram transferidas para frascos contendo o reativo de Schiff (1,5 g de fucsina básica, 4,5 g de metabissulfito de K ou Na, 45 ml de HCl 1N, 10 g de carvão ativado e 300 ml de H_2O), por aproximadamente 2 h. Logo depois, as raízes foram lavadas com água destilada até a total retirada do corante, foram colocadas sobre uma lâmina e uma incisão foi realizada para a separação da região meristemática. Aos materiais seccionados, foi adicionada uma gota de carmim acético 2% e as lâminas foram cobertas com lamínulas. Para análise, foi utilizado microscópio óptico em um aumento de 400X, sendo observadas 5.000 células por concentração (1000 células/lâmina), avaliando-se dados relacionados ao Índice Mitótico (IM) e alterações cromossômicas (micronúcleos, atrasos, perdas, pontes e quebras).

2.6 Avaliação oxidante/antioxidante em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliar o efeito oxidante/antioxidante das arilacetamidas 2, 3 e 4, foram utilizadas cepas mutadas de *S. cerevisiae* cujos genótipos estão descritos no **Tabela 1**. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD -

produto do gene SOD1); a EG110 é defectiva no gene SOD mitocondrial (MnSOD - produto do gene SOD2); EG133 é o duplo mutante, pois é defectiva para SOD1 e SOD2 e EG103 corresponde à linhagem selvagem (SOD WT), e portanto, proficiente para todas essas enzimas. As linhagens utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Toxicológica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Tabela 1 - Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nos testes.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 (SOD WT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1: URA3 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2: TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1: URA3 sod2: TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, except cat1: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, except sod1: URA3 and cat1: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

Então, foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glicose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária (OLIVEIRA et al., 2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foram acrescentadas, nas distintas placas, 10 μ L das concentrações (1; 5; 10, 25, 50 e 100 μ g/mL) dos compostos 2, 3 e 4. Para correlação estatística com os resultados dos grupos testes, dois grupos controle foram utilizados: H₂O₂ como controle positivo (10 μ L); e, solução salina (0,9 %) como controle negativo. Após 48h de incubação em estufa a 30°C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel filtro até o

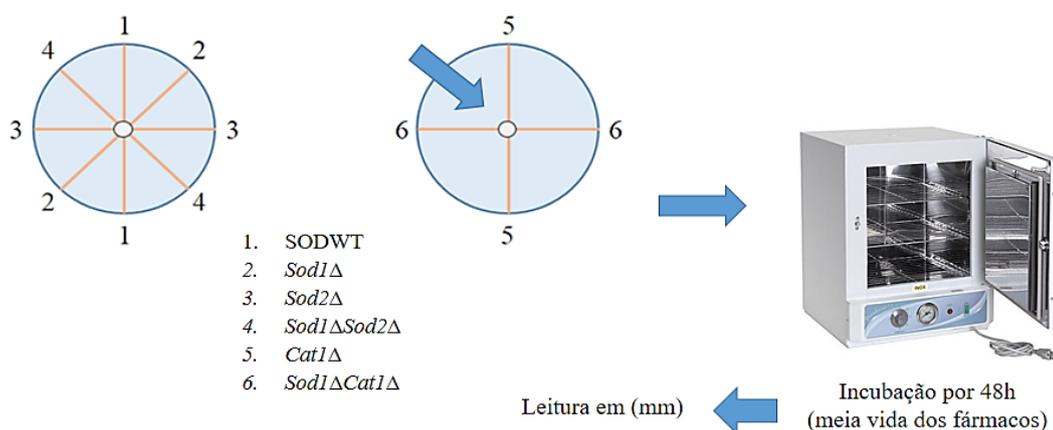
início do crescimento celular (**Figura 4**). Sendo realizados os seguintes tratamentos:

Pré-tratamento: Adição de 10µL dos 3 compostos, em diferentes concentrações, sobre o disco central em placas de Petri. Após 2h, foram adicionados 10µL de H₂O₂ e, posterior incubação em estufa a 30°C por 48h.

Co-tratamento: Adição de 10µL de H₂O₂ + 10µL dos 3 compostos, em diferentes concentrações, sobre o disco central em placas de Petri e, posterior incubação em estufa a 30°C por 48h.

Pós-tratamento: Adição de 10µL de H₂O₂ sobre o disco central em placas de Petri. Após 2h, foram adicionados 10µL do extrato dos compostos, em diferentes concentrações e, posterior incubação em estufa a 30°C por 48h.

Figura 4 - Esquema da realização das análises com *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Autoria própria

2.7 Análises estatísticas

Para a determinação dos valores de CI_{50} , CE_{50} e CL_{50} e de seus intervalos de confiança (IC 95%), os resultados de cada composto testado em triplicata e em duas avaliações biológicas independentes ($n=2$) foram analisados por regressão não-linear. Quanto aos valores expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.), a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos foi determinada por variância (ANOVA) seguida

de Student-Newman-Keuls, usando o programa GraphPad Prism, versão 6.0, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Citotoxicidade contra fibroblastos normais e náuplios de *Artemia salina*

Os resultados obtidos com os três compostos (2, 3 e 4) em relação a citotoxicidade em duas linhagens de fibroblastos normais, apresentaram ação citotóxica em ambas as linhagens testadas, com valores de CI_{50} variando de 1,2 $\mu\text{g/mL}$ (composto 4 em L-929) a 4,9 $\mu\text{g/mL}$ (composto 2 em MRC-5) (**Tabela 2**). Esses resultados diferem de estudos anteriores com derivados de acetamidas contendo os grupamentos cloro e nitro que não mostraram atividade citotóxica em células normais de rim canino (MDCK) (HERNANDEZ-NUNEZ et al., 2009).

Tabela 2 - Potencial citotóxico das arilacetamidas em linhagens de fibroblastos normais murinos (L-929) e humanos (MRC-5) após 72h de exposição e determinado pelo ensaio do *Alamar Blue*.

Composto	CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$ (μM)]*	
	L-929	MRC-5
2 (R= Cl) 2-cloro- <i>N</i> -(4-clorofenil)acetamida	2,5 (12,3) 2,2 – 2,8	4,9 (24,0) 3,2 – 7,3
3 (R= Br) 2-cloro- <i>N</i> -(4-bromofenil)-2-cloroacetamida	4,8 (19,3) 4,16 – 5,6	4,2 (16,9) 2,7 – 6,6
4 (R= NO_2) 2-cloro- <i>N</i> -(4-nitrofenil)acetamida	1,2 (5,6) 1,1 – 1,4	3,6 (16,8) 1,9 – 6,9
Doxorrubicina	0,7 0,5-0,9	1,8 0,8 – 4,1

Os dados são apresentados como valores de CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Doxorrubicina foi usada como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em duplicada.

De forma paralela, os compostos 2, 3 e 4 foram tóxicos em náuplios de *A. salina*, mostrando valores de CL_{50} de 0,005; 0,009 e 7,06 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Tabela 3**). O dicromato de potássio usado como controle tóxico positivo causou 100% de mortalidade dos náuplios. Historicamente, valores de $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ indicam que tais são compostos farmacologicamente ativos (MEYER et al., 1982) e valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ as classificam como muito tóxicas (DAVID et al., 2001; NGUTA et al., 2011). Além disso, este bioensaio indicou uma correlação da atividade citotóxica dos compostos sintéticos em células normais com atividade tóxica nos microcrustáceos, confirmando estudos anteriores que indicam relação da atividade biológica entre o modelo de *A. salina* com outros estudos pré-clínicos (ARCANJO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017).

Tabela 3 – Atividade tóxica das arilacetamidas em náuplios de *Artemia salina* após 72h de exposição.

Composto	CL_{50} [$\mu\text{g/mL}$ (μM)]*	Coefficiente de correlação linear (r^2)
2 (R= Cl)	0,005 (0,025) 0,004 – 0,006	0,98
3 (R= Br)	0,009 (0,036) 0,007 – 0,012	0,91
4 (R= NO_2)	7,06 (32,95) 6,95 – 7,55	0,97

Os dados são apresentados como valores de CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Dicromato de potássio (50 $\mu\text{g/mL}$) usado como controle positivo causou 100 % de mortalidade. Todos os experimentos foram realizados em duplicada.

Diante de tal potência contra náuplios de *A. salina*, é importante enfatizar que as cloroacetamidas estão entre os herbicidas mais explorados pelo setor agropecuário (JABLONKAI, 2003). Esta classe de pesticidas consiste de um número de herbicidas de amplo espectro, como o alacloro, acetocloro, amidocloro, butacloro, metolacoloro e propacloro. Levando em consideração que: a) microcrustáceos são filtradores atuando como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores, o que explica seu

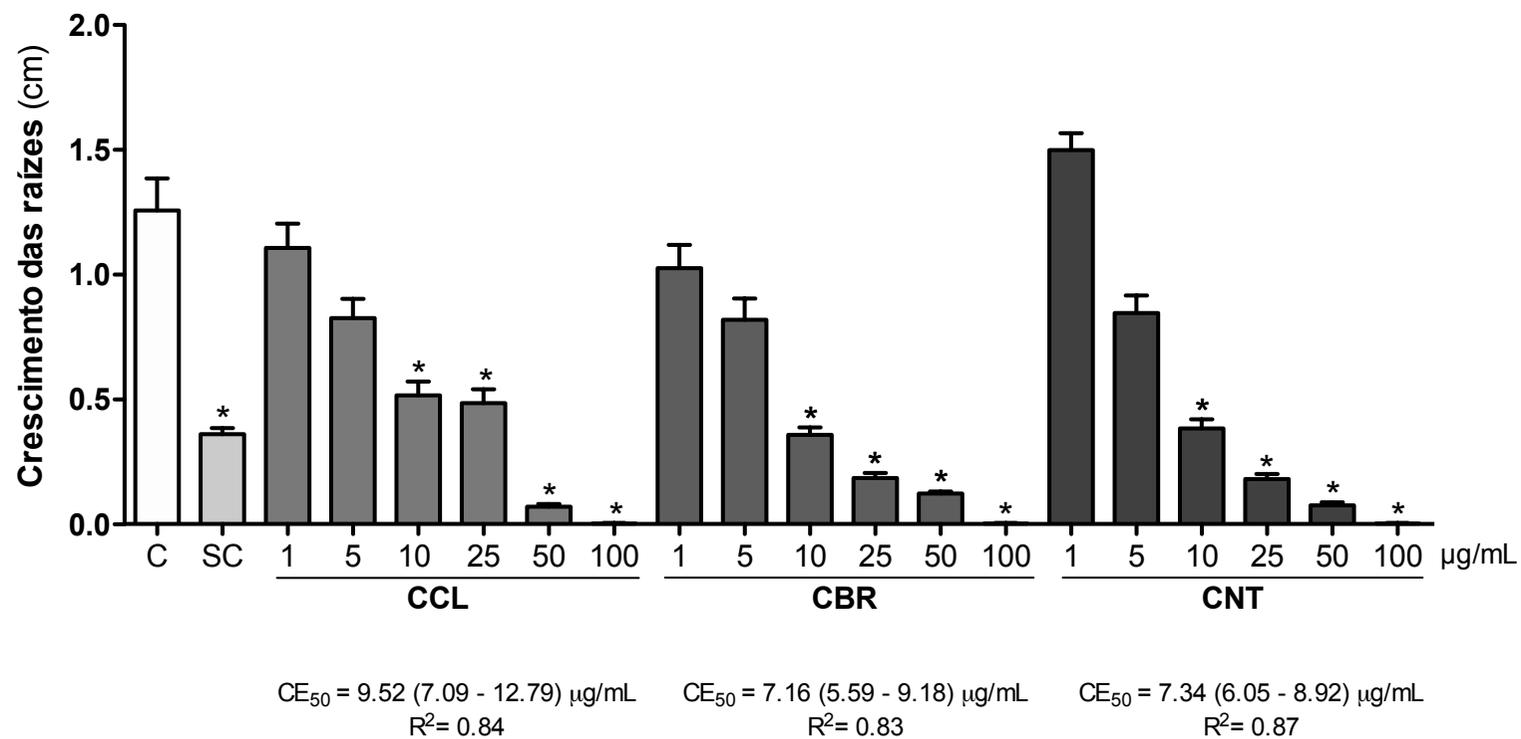
uso como biossensor ecotoxicológico; b) que tais compostos, depois de consumidos, podem se depositar nos tecidos dos animais devido a sua lipossolubilidade, e c) que o acúmulo possa gerar danos celulares (HAMM; SPEZIALE, 1956; VEIGA; VITAL, 2002; SIVEY; ROBERTS, 2012; EL FELS; HAFIDI; OUHDOUCH, 2016; ISLAM et al., 2016), acredita-se ser necessário avaliar os possíveis mecanismos de toxicidade e genotoxicidade destes compostos e impactos ambientais e na saúde da população.

3.2 Toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal *Allium cepa*

No presente estudo, os compostos 2 ($0,51 \pm 0,06$; $0,48 \pm 0,05$; $0,07 \pm 0,01$; $0,01 \pm 0,0$ cm), 3 ($0,35 \pm 0,02$; $0,18 \pm 0,02$; $0,12 \pm 0,01$; $0,01 \pm 0,0$ cm) e 4 ($0,38 \pm 0,03$; $0,18 \pm 0,02$; $0,07 \pm 0,01$; $0,01 \pm 0,0$ cm) inibiram significativamente o crescimento das raízes nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de forma dependente da concentração quando comparadas ao controle negativo ($1,26 \pm 0,13$ cm; $p < 0,05$), e os valores de CE_{50} encontrados foram de 9.52 (7.09 - 12.79), 7.16 (5.59 - 9.18) e 7.34 (6.05 - 8.92) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O grupo tratado com a solução de sulfato de cobre 0,6 $\mu\text{g/mL}$ apresentou raízes com $0,36 \pm 0,02$ cm e inibição do crescimento das raízes de $72,6 \pm 2,7$ % (**Figura 5**).

Confirmando a capacidade de inibição do crescimento radicular, os compostos 2 e 4 também causaram redução do índice mitótico (IM) em todas as concentrações testadas (1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) de forma dependente da concentração ($6,5 \pm 0,7$, $6,4 \pm 0,4$, $4,1 \pm 0,5$, $2,2 \pm 0,3$, $1,5 \pm 0,3$; $3,8 \pm 0,3$, $4,9 \pm 0,2$, $4,5 \pm 0,5$, $1,90 \pm 0,6$ e $1,60 \pm 0,3$ %, respectivamente) em comparação com o controle negativo ($56,9 \pm 0,8$ %), e redução de células em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) ($p < 0,05$) com parada de células na intérfase, semelhante aos resultados encontrado para o controle positivo ($13,7 \pm 0,5$ %) (**Tabela 4**).

Figura 5 - Tamanho das raízes de *Allium cepa* tratadas com as arilacetamidas durante 72h de exposição.



O controle negativo foi exposto à água desclorificada e o controle positivo, ao sulfato de cobre 0,6 µg/mL (SC). Os valores são expressos em média ± E.P.M. Números em percentual representam a inibição do crescimento radicular. *p < 0.05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman-Keuls

Tabela 4 - Efeito citotóxico em células meristemáticas de *Allium cepa* após 72 h de exposição aos compostos 2, 3 e 4.

Tratamentos	Índice de fase / 5000 células					IM (%) média ± DPM	
	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase		
Controles	CN	434,6 ± 7,9	399,0 ± 3,1	77,8 ± 6,2	58,4 ± 2,3	32,2 ± 2,7	56,9 ± 0,8
	CP	860,8 ± 4,4*	103,6 ± 2,5*	11,6 ± 1,5*	10,8 ± 1,6*	11,2 ± 2,5*	13,7 ± 0,5*
Composto 2	1	934,6 ± 6,6*	52,6 ± 5,8*	3,0 ± 0,9*	5,0 ± 1,7*	4,8 ± 0,6*	6,5 ± 0,7*
	5	935,6 ± 4,0 *	48,6 ± 2,6 *	3,6 ± 0,7*	3,2 ± 0,9*	9,0 ± 1,7*	6,4 ± 0,4*
	10	958,6 ± 5,0*	28,0 ± 2,4*	3,8 ± 1,6*	3,6 ± 0,9*	6,0 ± 2,5*	4,1 ± 0,5*
	25	977,8 ± 2,9*	17,4 ± 2,2*	0,6 ± 0,4*	2,4 ± 0,6*	2,2 ± 0,2*	2,2 ± 0,3*
	50	984,6 ± 3,4*	15,0 ± 3,5*	0,0 ± 0,0*	0,4 ± 0,2*	0,0 ± 0,0*	1,5 ± 0,3*
	1	962,4 ± 3,2*	25,2 ± 2,7*	1,6 ± 0,5*	2,8 ± 0,9*	8,0 ± 1,0*	3,8 ± 0,3*
Composto 3	5	951,4 ± 2,4*	29,4 ± 1,7*	6,2 ± 1,4*	4,0 ± 1,3*	9,0 ± 0,5*	4,9 ± 0,2*
	10	954,4 ± 5,0*	26,8 ± 4,0*	6,2 ± 1,5*	3,6 ± 0,4*	9,0 ± 2,2*	4,5 ± 0,5*
	25	981,0 ± 5,6*	18,2 ± 5,3*	0,4 ± 0,2*	0,4 ± 0,2*	0,0 ± 0,0*	1,9 ± 0,6*
	50	983,6 ± 3,5*	15,4 ± 3,2*	0,2 ± 0,2*	0,8 ± 0,2*	0,0 ± 0,0*	1,6 ± 0,3
	1	950,8 ± 5,2*	28,8 ± 5,0*	8,2 ± 2,8*	3,8 ± 2,4*	8,4 ± 3,8*	5,0 ± 0,6*
Composto 4	5	965,2 ± 3,5*	17,0 ± 4,3*	5,8 ± 2,0*	4,0 ± 2,6*	8,0 ± 4,8*	3,5 ± 0,3*
	10	973,2 ± 5,8*	19,6 ± 3,4*	2,0 ± 1,2*	1,0 ± 1,0*	4,2 ± 3,4*	2,7 ± 0,6*
	25	984,4 ± 4,6*	12,2 ± 2,3*	1,0 ± 1,0*	0,6 ± 0,9*	1,8 ± 2,2*	1,6 ± 0,5*
	50	993,6 ± 0,9*	5,2 ± 1,3*	0,0 ± 0,0*	0,2 ± 0,4*	1,0 ± 1,2*	0,6 ± 0,1*

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 5000 células (n= 5 bulbos/grupo).

* p < 0.05 quando comparado ao controle negativo (C) por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

**Índice mitótico é calculado como se segue: P+M+A+T / N° Total de células x 100.

O teste vegetal com raízes de *Allium cepa* é um modelo usado como bioindicador laboratorial e ambiental de efeitos adversos de produtos químicos de origem natural ou sintética e de misturas complexas sobre o material genômico e apresenta uma correlação de 82% com testes de carcinogenicidade em roedores devido a sua alta sensibilidade e superioridade de captação de toxicidade em relação a outros organismos. É validado pelo Programa Internacional de Segurança Química da Organização Mundial de Saúde (PISQ/OMS) e, por apresentar elevada sensibilidade e correspondência com testes em animais, é ideal para uma avaliação e comparação preliminar de efeitos antiproliferativos e genotóxicos (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009; NEVES et al., 2014; MISIK et al., 2014; MOURA et al., 2016; SANTANA et al., 2016).

Uma vez que o índice mitótico (IM) é um importante indicador de proliferação celular, o nível de citotoxicidade de um agente pode ser determinado pelo aumento ou diminuição desse parâmetro. A redução do IM está relacionada à inibição da síntese de DNA, parada ou bloqueio do ciclo em alguma fase, retardamento da taxa de progressão celular através da mitose ou indução de saída da célula do ciclo para G₀, impedindo a célula de voltar para a divisão celular. Valores de IM significativamente abaixo do controle negativo indica alterações possivelmente causadas por ações de substâncias que inibem o crescimento e desenvolvimento do organismo. De fato, muitos compostos com ação antiproliferativa costumam induzir parada da divisão celular em alguma fase da mitose, atuando como parte do mecanismo de ação do composto citotóxico. Isso se deve a danos cromossômicos aneugênicos ou clastogênicos e ocorre de forma a dar oportunidade à maquinaria celular para corrigir o dano e tentar escapar da morte celular por apoptose (LEME; MARIN-MORALES, 2009; PANDEY; KUMAR; ROY, 2014; SANTANA et al., 2016).

A redução do índice mitótico encontrada aqui sugere a atividade citotóxica dos três compostos analisados também contra células vegetais e confirma seu potencial citotóxico previamente descrito contra diferentes linhagens celulares de mamíferos (KALDRIKYAN et al., 2009; KATKE et al., 2011). No estudo de Goujon e colaboradores (2015) que analisaram um composto contendo cloro frente a raízes de *A. cepa* e observaram que na concentração de 1×10^{-8} M obteve IM de 6,9%. Em outro estudo de Goujon e

colaboradores (2014) ao avaliar a citotoxicidade de herbicidas, também foi observado significativa redução do IM (7,5%), corroborando com o presente estudo em que os três compostos reduziram o IM significativamente em todas as concentrações testadas e de forma dose-dependente.

Os produtos químicos podem produzir efeitos genotóxicos, direta ou indiretamente, inibindo o sistema de reparo do DNA; por exemplo, competindo com certos íons essenciais para DNA polimerases. As aberrações induzidas por efeitos genotóxicos diretos podem ser reparadas por intervenção de mecanismos de reparo de DNA para manter a integridade do genoma. A atividade antiproliferativa pode ser resultante de danos ao DNA, os quais são evidenciados por aberrações cromossômicas (AC) (**Figura 6**) ou micronúcleos (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; DATTA et al., 2018).

Nesse caso, os compostos 2, 3 e 4 revelaram potencial genotóxico e mutagênico, pois não houve aumento de AC, nem do índice genotóxico (IG) e do IM. Nenhum dos compostos apresentaram micronúcleos. O controle positivo sulfato de cobre induziu aumento de todas as formas de alterações cromossômicas [micronúcleos (11.5 ± 0.7), atrasos ($12,8 \pm 0.6$), perdas cromossômicas ($16,2 \pm 0,7$), pontes ($6,2 \pm 0,5$) e quebras ($8,0 \pm 0,8$)] quando comparadas ao controle negativo (2.3 ± 0.3 , 2.0 ± 0.3 , 1.2 ± 0.2 , 1.2 ± 0.2 e 0.6 ± 0.2 , respectivamente) (**Tabela 5**).

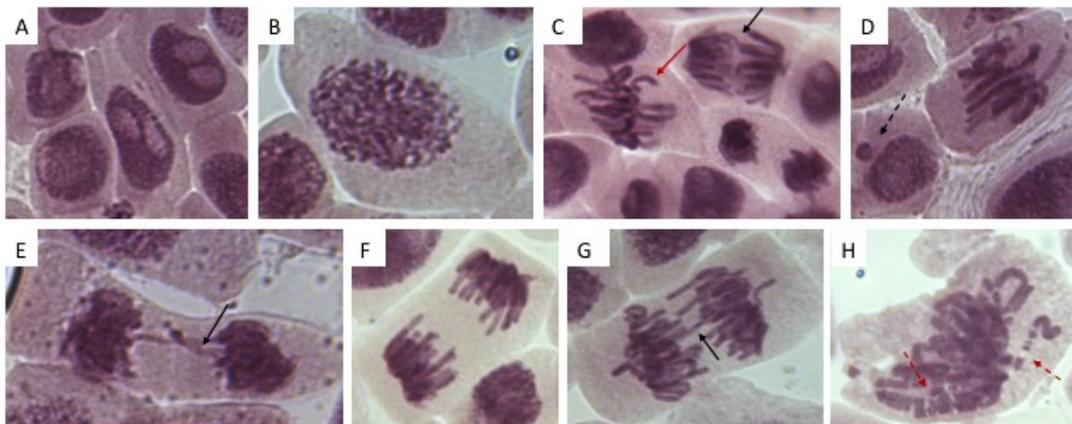
Tabela 5 - Alterações cromossômicas causadas em células meristemáticas de *Allium cepa* após 72 h de exposição aos compostos 2, 3 e 4.

Amostra	Tratamentos [µg/mL]	Aberrações cromossômicas/5000 células ± D.P.M.				IG (%)
		Pontes	Perda c.	Fragmentos c.	Atrasos	
Controles	CN	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,6 ± 0,2	2,0 ± 0,3	7,2 ± 0,7
	CP	6,2 ± 0,5*	16,2 ± 0,7*	8,0 ± 0,8*	12,8 ± 0,6*	55,0 ± 1,5*
Composto 2	1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,4	1,4 ± 0,9	7,0 ± 3,7	0,9 ± 0,5*
	5	1,6 ± 0,9	2,4 ± 1,0	2,2 ± 0,6	4,8 ± 2,9	1,1 ± 0,4*
	10	2,0 ± 1,1	4,8 ± 1,2*	5,4 ± 3,2	4,8 ± 1,8	1,7 ± 0,6*
	25	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,4	1,6 ± 0,9	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1*
	50	0,0 ± 0,0	2,2 ± 1,4	0,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2*
Composto 3	1	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,4	1,6 ± 0,5	0,4 ± 0,1*
	5	1,2 ± 0,6	2,6 ± 0,8	2,6 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1*
	10	0,2 ± 0,2	5,2 ± 2,0	7,0 ± 2,0*	2,6 ± 0,7	1,5 ± 0,4*
	25	0,4 ± 0,2	3,2 ± 2,0	0,8 ± 0,6	0,2 ± 0,2*	0,5 ± 0,3*
	50	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,9	0,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0*	0,2 ± 0,1*
Composto 4	1	1,0 ± 1,0	3,0 ± 1,2	0,8 ± 0,8	2,8 ± 1,9	0,8 ± 0,2*
	5	0,4 ± 0,5	4,0 ± 2,1*	4,6 ± 1,8*	1,6 ± 1,9	1,1 ± 0,4*
	10	0,4 ± 0,5	0,8 ± 0,4	1,4 ± 1,1	1,4 ± 1,3	0,4 ± 0,3*
	25	0,2 ± 0,4	0,6 ± 0,9	0,6 ± 0,9	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,2*
	50	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0*

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 5000 células (n= 5 bulbos/grupo).

* p < 0.05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

Figura 6 - Fotomicrografias de microscopia óptica células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações dos compostos 2, 3 e 4 após 72 h de exposição.



A (composto 2 50 µg/mL) = Interfase; B (Controle negativo)= Prófase; C (composto 4 10 µg/mL) = Metáfase com cromossomo solto (seta vermelha inteira), anáfase com ponte cromossômica (seta preta inteira) e telófase; D (Controle positivo) = Metáfase e célula com micronúcleo (seta preta tracejada); E e G = Pontes cromossômicas (setas pretas inteiras); F (composto 3 10 µg/mL) = Atrasos; H (composto 2 10 µg/mL) = Fragmentação cromossômica (setas vermelhas tracejadas). Aumento de 400X.

3.3 Toxicidade aguda com embriões de peixe-zebra

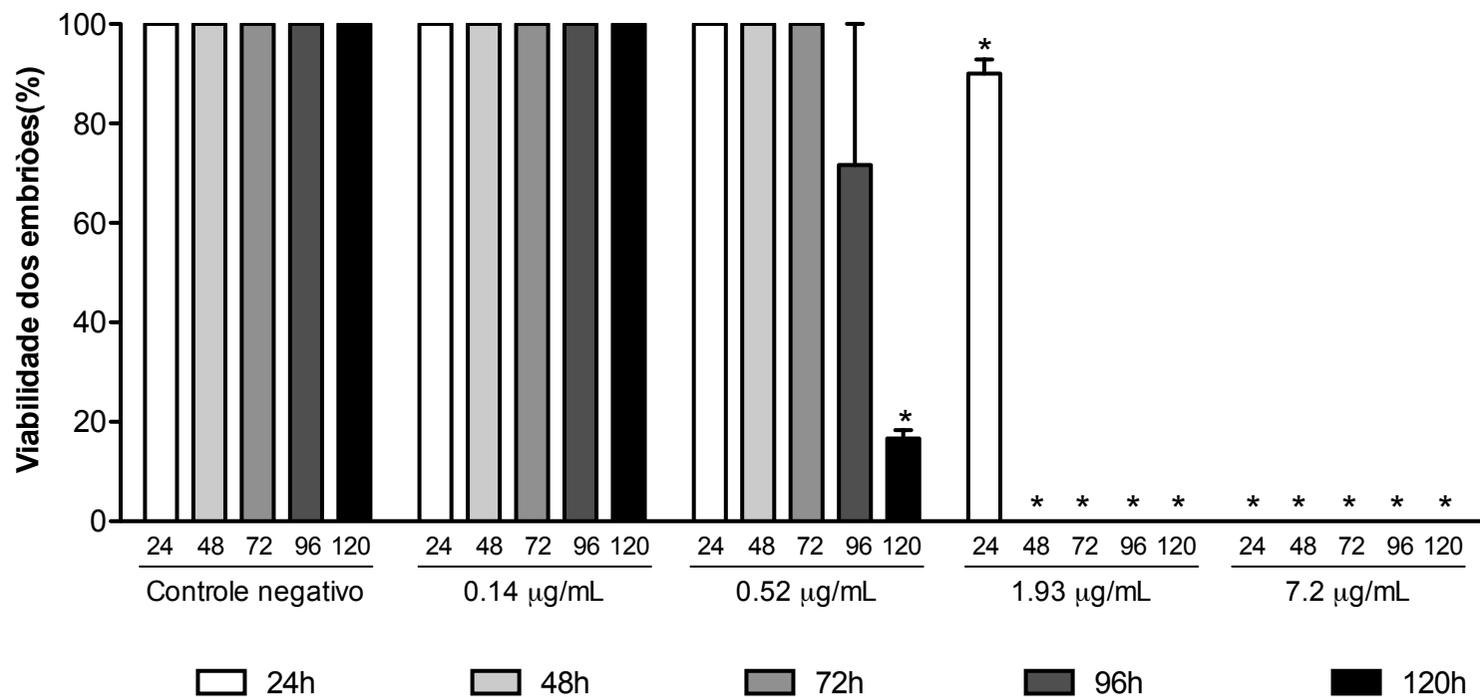
Embriões de peixe-zebra e larvas em fases iniciais do desenvolvimento podem servir como ferramentas de rastreio na fase pré-regulatória e pré-clínica da descoberta de novos medicamentos, pois é um organismo consolidado como modelo experimental na genética, biologia do desenvolvimento, comportamento, toxicologia e neurociências (BRAUNBECK et al., 2015; NISHIMURA et al., 2015). Com a intenção de substituir roedores nas fases avançadas da pesquisa, os embriões de peixe-zebra podem ser complementares aos ensaios com roedores ou baseados em resultados de estudos prévios (ALI et al., 2011). Com isso, decidiu-se realizar este experimento apenas com o composto 2, o qual apresentou maior toxicidade em microcrustáceos de *A. salina*.

Os embriões foram expostos a quatro concentrações do composto 2: 0,14; 0,520; 1,93 e 7,2 µg/mL por até 120 h. Segundo a OECD (2013), um dos parâmetros considerados para a aceitabilidade do ensaio é a sobrevivência no controle com água de diluição maior ou igual a 90%. Durante as 120 h, não foi observada mortalidade significativa do grupo controle e os embriões

pertencentes a esse grupo apresentaram desenvolvimento normal ($p < 0,05$) (**Figura 7**). Considerando os resultados referentes as três réplicas, às 24 h, observou-se severa mortalidade nos organismos expostos às maiores concentrações (1,93 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$ com 90% e 100% de morte, respectivamente). Às 48 h, os organismos de todos os grupos começaram a eclodir, enquanto o grupo que foi tratado com 1,93 $\mu\text{g/mL}$ apresentou 100% de mortalidade. Todos os embriões do controle negativo já haviam eclodido às 96 h porém na concentração de 0,52, $\mu\text{g/mL}$ 26,6% dos embriões ainda não haviam eclodido, ultrapassando, portanto, o limite do valor de 20% de embriões não eclodidos que é considerado como normal (OECD, 2013).

A fim de padronizar as análises para avaliar a concentração letal para 50% dos embriões (CL_{50}), optou-se por utilizar apenas o modelo de logística de 4 parâmetros. Em relação a mortalidade, os valores de CL_{50} após 24 h (1,704 $\mu\text{g/mL}$), 48 h (1,004 $\mu\text{g/mL}$), 72 h (1,004 $\mu\text{g/mL}$), 96 h (0,599 $\mu\text{g/mL}$) e 120 h (0,531 $\mu\text{g/mL}$) revelaram resultados dependentes do tempo de exposição.

Figura 7 - Viabilidade e valores de DL₅₀ da arilacetamida 2 em embriões de peixe-zebra *Danio rerio* após diferentes tempos de exposição.



CL ₅₀ (µg/mL)	1.704 ± 0.019	1.004 ± 0.000	1.004 ± 0.000	0.599 ± 0.030	0.531 ± 0.046
R ²	0.99	0.98	0.98	0.98	0.99

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 20 embriões em triplicata. *p < 0.05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

Foi, portanto, observado que a exposição de embriões de peixe-zebra ao composto 2 causou mortalidade significativa já nas primeiras 24 h de tratamento, indicando que o composto possui toxicidade aguda em organismos aquáticos. Com um valor de CL_{50} em torno de $0,53 \mu\text{g/mL}$ ($2,6 \mu\text{M}$) após 120h de exposição, mostrando ser mais potente do ponto de vista embriotóxico que outros compostos da classe das cloroacetamidas usados como herbicidas, como o acetocloro (CL_{50} de $50 \mu\text{M}$) e o metolacloro (CL_{50} de $46,2 \mu\text{g/mL}$) (XU et al., 2016; YANG et al., 2016; QUINTANEIRO et al., 2017).

Sabendo que os estágios embrionários da vida dos vertebrados são mais sensíveis que o tratamento agudo dos peixes em sua fase larval e, assim, fornecem mais sinais de toxicidade para elucidar os mecanismos de compostos tóxicos (ZHOU et al., 2009; DAHM; GEISLER, 2006; ALI et al., 2011), as anormalidades morfológicas nos embriões em desenvolvimento após tratamento com o composto 2 foram também investigadas. Nesta etapa, encontrou-se uma alta porcentagem de alterações na pigmentação do corpo e dos olhos, edema, deformações da cauda, acumulação anormal de hemácias, não inflação da bexiga natatória, perda de equilíbrio, não absorção do saco vitelino e atraso na eclosão no grupo tratado com composto 2 $0,52 \mu\text{g/mL}$ (**Tabela 6, Figura 8**). Nessa concentração após 48h de incubação, 55% dos embriões já mostravam alterações como comprometimento da absorção do saco vitelínico, edema e acumulação de hemácias. Após 96h, quase 100% dos embriões apresentavam alterações. Essas alterações foram estatisticamente significantes quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$), o qual não apresentou embriões com malformações.

Tabela 6 – Malformações em embriões de peixe-zebra *Danio rerio* expostos ao composto 2 na concentração de 0,52 µg/mL por 120 h.

Parâmetro alterado	Percentual de Malformações (%)					
	Controle negativo	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Malformação na cauda	-	-	-	25 ± 5,8*	29 ± 6,2*	83,4 ± 1,6*
Edema	-	-	55 ± 10,4*	98,3 ± 1,7*	96,7 ± 3,3*	84,2 ± 3,4*
Não absorção do saco vitelino	-	-	25 ± 7,6*	93,3 ± 4,4*	98,2 ± 1,7*	88,7 ± 3,5*
Acúmulo de hemácias	-	-	61,7 ± 8,8*	85 ± 5,8*	74,7 ± 4,8*	-
Alteração na pigmentação	-	-	-	-	-	83,4 ± 10,6*
Bexiga natatória não inflada	-	-	-	-	-	82,6 ± 9,5*
Perda do equilíbrio	-	-	-	-	65,8 ± 4,3*	87,9 ± 12,1*
Atraso na eclosão	-	-	-	-	26,6 ± 1,9*	Não detectado

"-" sem anormalidade. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 20 embriões em triplicata. *p < 0.05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

Figura 8 - Efeitos embriotóxicos da arilacetamida 2 em embriões de peixe-zebra *Danio rerio* após diferentes tempos de exposição



Legenda: mc = malformação da cauda, sv = não absorção do saco vitelino, ed = edema, ae = atraso na eclosão e ac = acumulação de hemácias.

A eclosão, que é um período crítico da embriogênese, tem sido usada criticamente como ponto final no teste da fase inicial da vida dos peixes. Basicamente é classificada em dois tipos de eclosão mecânica e enzimática. Durante o processo de eclosão normal, o córion é digerido pela enzima de incubação, a corionase secretada a partir das células da glândula de incubação do embrião, que por sua vez se acumula no espaço perivitelino, atinge o córion e induz a sua quebra libertando a larva de vida livre (SREEDEVI; SUVARCHALA; PHILIP, 2014). O atraso na eclosão, especialmente na concentração de 0,52 µg/mL do composto 2 após 96h e 120h, foi claramente notado, indicando que o composto poderia estar inibindo a liberação de corionase interferindo na atividade da enzima incubadora.

Malformações do desenvolvimento são frequentemente observadas em embriões de *Danio rerio* após a exposição a xenobióticos (ZHUANG et al., 2015). Como essa espécie possui pigmentos de melanina na superfície do corpo, isso facilita a observação direta e o acompanhamento da formação de

pigmentação sem procedimentos experimentais complicados (ZHOU et al., 2009). Tu e colaboradores (2013) observaram edema pericárdico e vitelínico em embriões de peixe-zebra expostos à cloroacetamida Butaclor após 48 horas, além de mortalidade significativa, dependente da concentração, especialmente em concentrações mais altas após a exposição de 84 horas (16 e 20 μ M).

Várias são as aplicações do uso desse modelo como uma ferramenta laboratorial preditiva de alterações fisiológicas e morfogenéticas, já que alvos farmacológicos/toxicológicos são bem conservados entre o peixe-zebra e os seres humanos, sugerindo, inclusive sua aplicação na compreensão da biologia da angiogênese tumoral, de permitir um rastreio farmacológico de menor custo. Outras vantagens ao utiliza-lo incluem: a) facilidade no cultivo de todos os estágios de vida em laboratório; b) baixo custo de cultivo e menor gasto de manutenção quando comparado a roedores; c) elevada performance reprodutiva com desova abundante, já que uma peixe-zebra fêmea pode colocar até 10.000 ovos/ano; d) embriões são translúcidos/transparentes, permitindo avaliação do desenvolvimento embrionário e análises teratológicas órgão-específicas; e) tamanho pequeno, que permite o cultivo em espaços reduzidos; f) genoma sequenciado, permitindo o desenvolvimento de estudos genéticos comparativos; e g) aplicação laboratorial e em estudos de impacto ambiental atendendo a filosofia dos 3R's: Redução (*Reduction*), Refinamento (*Refinement*) e Substituição (*Replacement*) cuja previsão de toxicidade e sensibilidade de captação dos xenobióticos é reconhecida internacionalmente (BROUGHTON et al., 2001; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004; DAHM; GEISLER, 2006; WHEELER; BRANDLI, 2009; ALI et al., 2011; BRAUNBECK et al., 2015; NISHIMURA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA-FILHO et al., 2018).

3.4 Ação oxidante/antioxidante em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é um organismo muito utilizado em estudos básicos de biologia celular, estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante (LEMONS et al., 2016; MENG et al., 2017). Por serem eucariontes

unicelulares cujos processos biológicos e fisiológicos são semelhantes aos de eucariotos superiores, cepas de leveduras com enzimas defectivas/mutadas tem se revelado como uma etapa intermediária entre estudos bioquímicos *in vitro* e estudos em animais e humanos e na aplicação biotecnológica de proteínas endógenas ou heterólogas envolvidas na compreensão da apoptose, de reguladores de sobrevivência e de aspectos básicos da biologia celular de doenças neurodegenerativas como *Alzheimer*, *Parkinson* e *Huntington* usando proteínas endógenas ou heterólogas envolvidas na origem de tais doenças (MELL; BURGESS, 2002; SWIECILO et al., 2018).

No presente trabalho foram realizados testes com os três compostos frente a 6 linhagens de *S. cerevisiae*: SODWT (não possui mutação, linhagem selvagem); SOD1 Δ (deficiente para a superóxido dismutase citosólica); SOD2 Δ (deficiente para a superóxido dismutase mitocondrial); SOD1 Δ SOD2 Δ (deficiente para ambas superóxidos dismutases); CAT1 Δ (deficiente para a enzima catalase), e SOD1 Δ CAT1 Δ (deficiente para a SOD citosólica e catalase). Os testes foram realizados em diferentes estágios: pré-tratamento, cotratamento e pós-tratamento com o peróxido de hidrogênio.

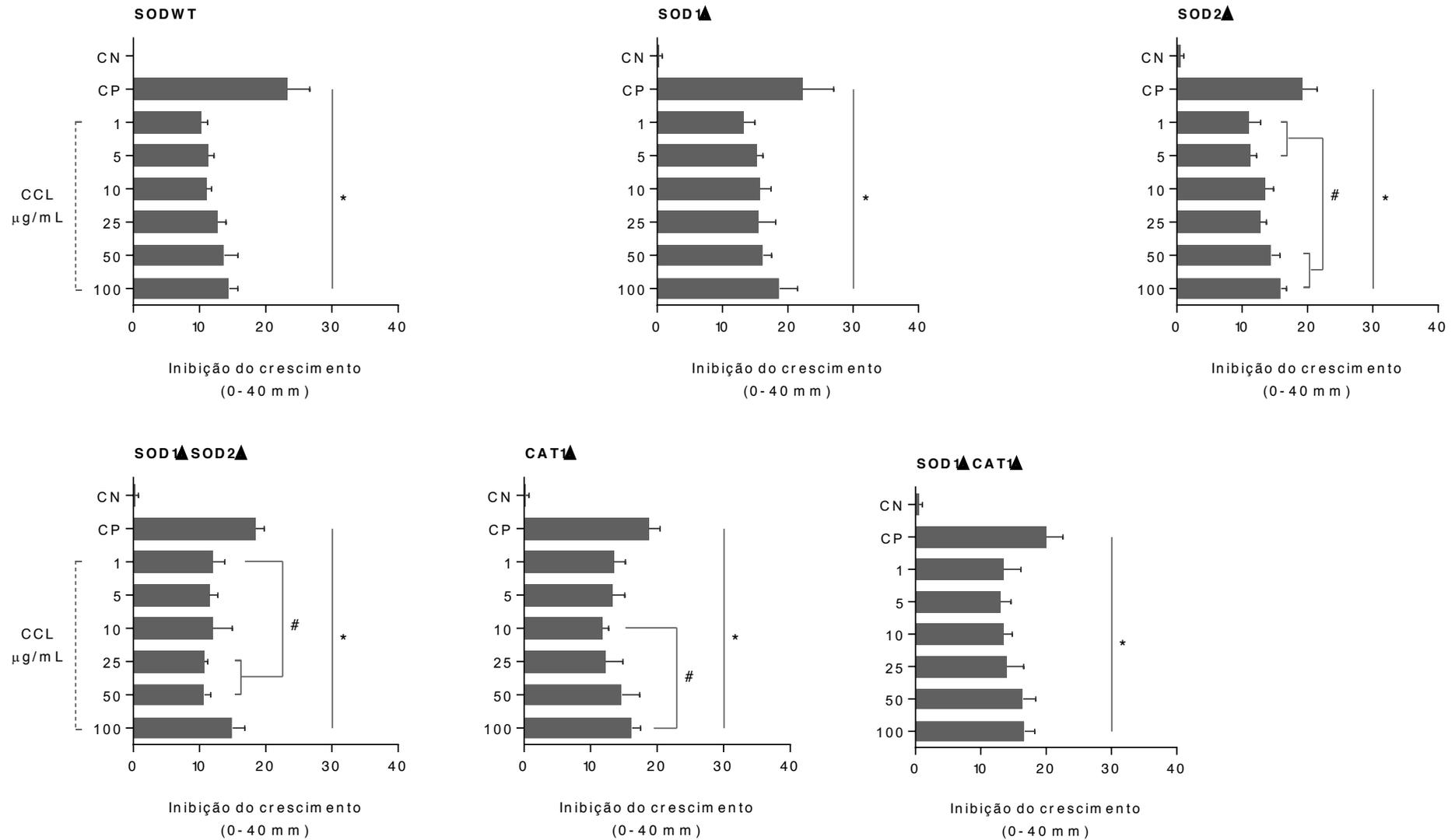
Nos estudos de pré-tratamento (protetor), a linhagem proficiente para superóxido dismutase (SODWT) com o composto 2 não foi protegida de danos oxidativos quando comparado ao controle negativo, bem como em relação ao peróxido de hidrogênio ($p > 0,05$) (**Figura 9**). Achados similares não significativos foram encontrados para as cepas mutada para superóxido dismutase citoplasmática (SOD1 Δ) e mitocondrial (SOD2 Δ) bem como para a duplo mutante. Entretanto, o composto 2 modulou os danos em relação aos induzidos pelo H₂O₂, exceto para a maior concentração testada (100 μ g/mL) ($p < 0,05$). Em relação à cepa mutada para catalase (CAT1 Δ) e duplo mutante, o composto 2 também não preveniu os danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ em relação ao controle negativo, porém ela modulou os danos do H₂O₂, exceto para as duas maiores concentrações em relação ao H₂O₂ (50 e 100 μ g/mL), sugerindo que o composto 2 não conseguiu prevenir os danos causados pelo H₂O₂ mas não aumentou tais danos.

O cotratamento (antioxidante) com composto 2 e H₂O₂ na linhagem proficiente em superóxido dismutase não inibiu os danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ em relação ao controle negativo ($p > 0,05$) (**Figura 10**), mas mostrou

efeitos modulatórios em relação ao H_2O_2 em todas as concentrações testadas. Não inibiu os danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 nas linhagens $SOD1\Delta$, $SOD2\Delta$, $SOD1\Delta SOD2\Delta$, mesmo com o indicativo de modulação dos danos do H_2O_2 em relação aos danos induzidos pelo H_2O_2 sem associação com o composto 2. Não teve efeitos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 na linhagem mutada para catalase, bem como para o duplo mutante $SOD1\Delta CAT1\Delta$.

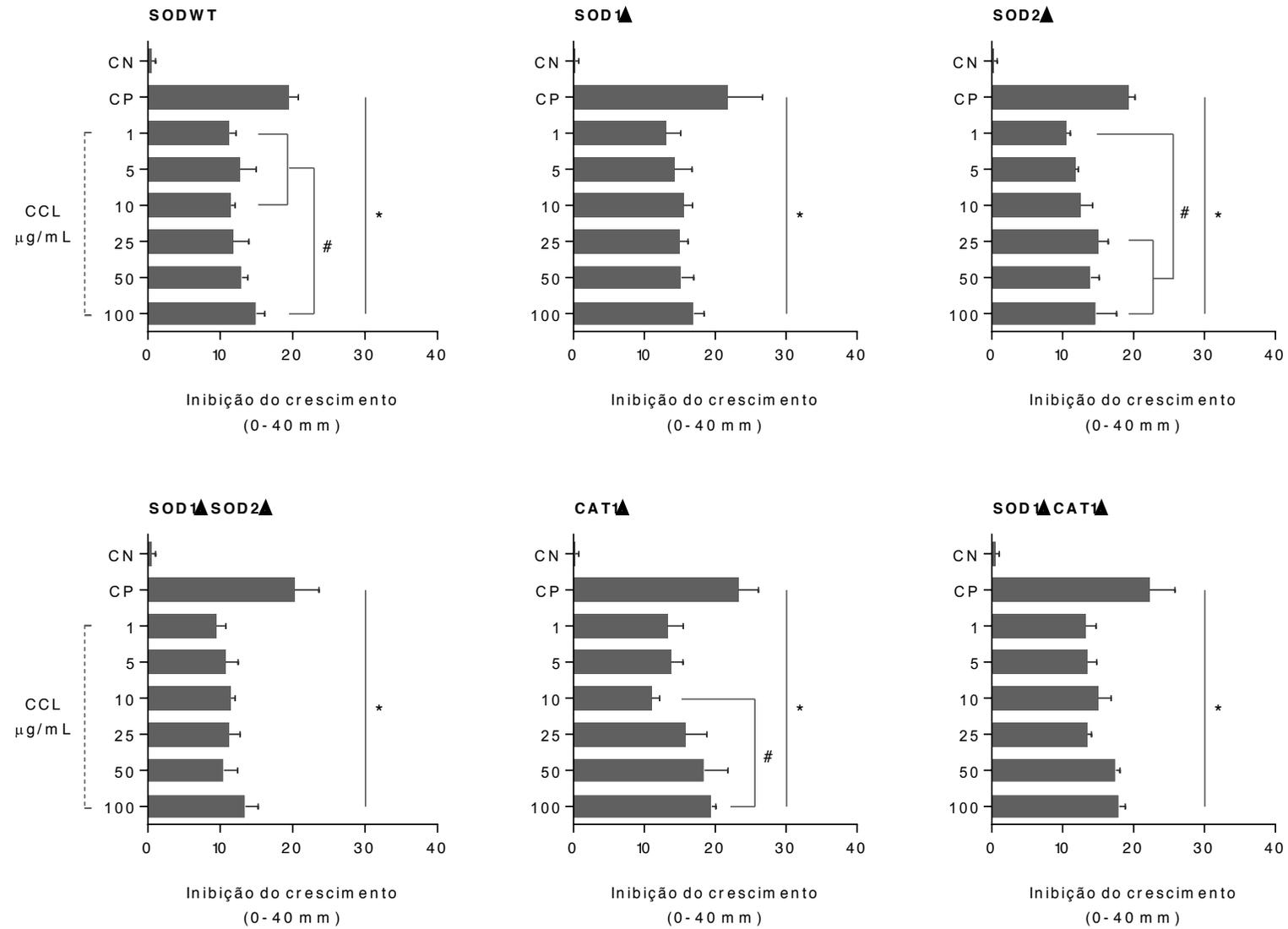
O composto 2 não inibiu os danos induzidos pelo H_2O_2 quando em pós-tratamento, em relação ao controle negativo nas linhagens proficientes e mutada ($SOD1\Delta$). Mas em relação aos danos induzidos pelo H_2O_2 , os dados foram significantes apenas nas duas maiores concentrações nas linhagens $SOD2\Delta$ e no duplo mutante $SOD1\Delta SOD2\Delta$ ($p < 0,05$). Dados similares foram observados para catalase e para o duplo mutante $SOD1\Delta CAT1\Delta$ (**Figura 11**).

Figura 9 - Avaliação do efeito protetor do composto 2 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



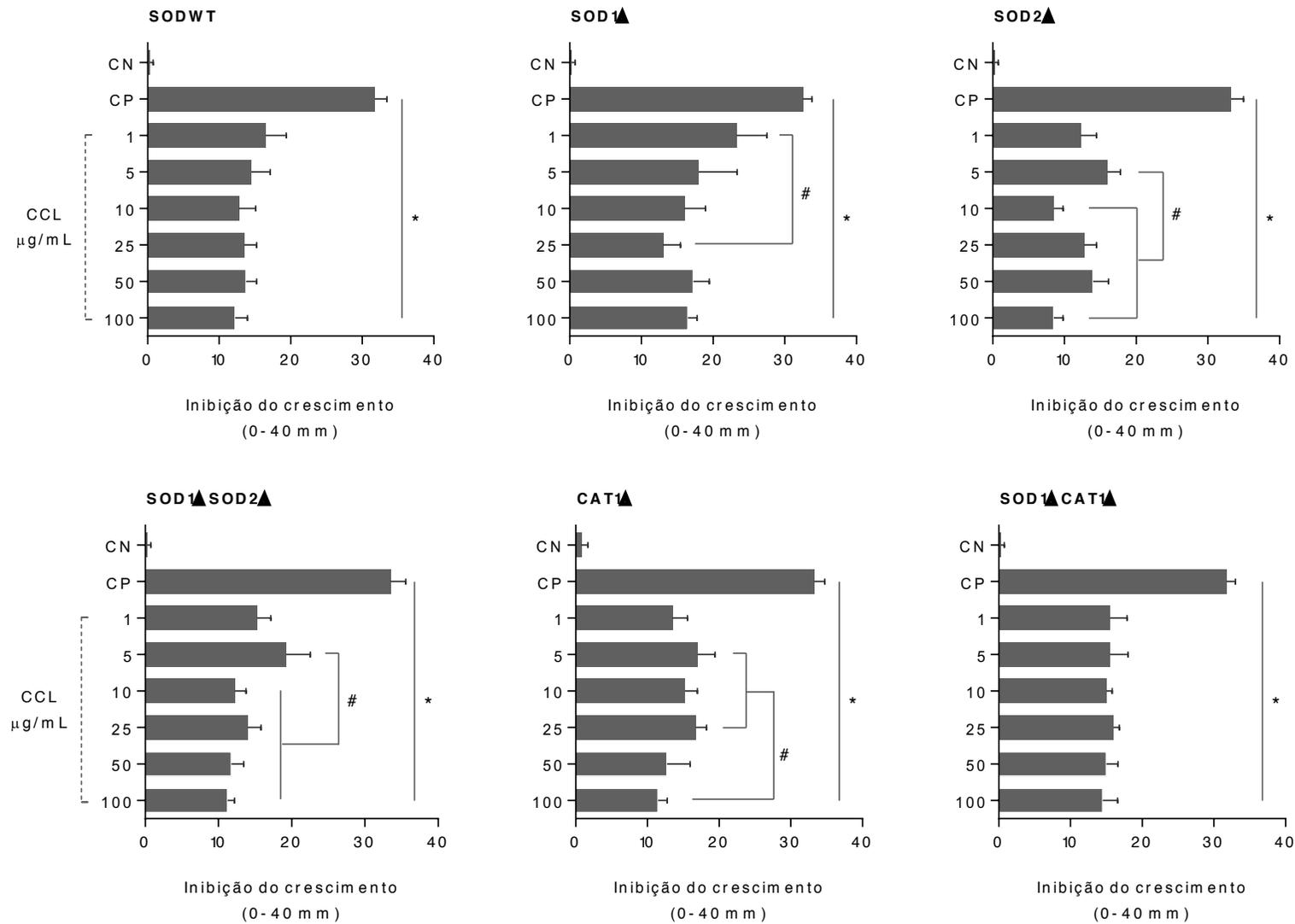
Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 10 - Avaliação da atividade antioxidante do composto 2 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 11 - Avaliação do efeito reparador do composto 2 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



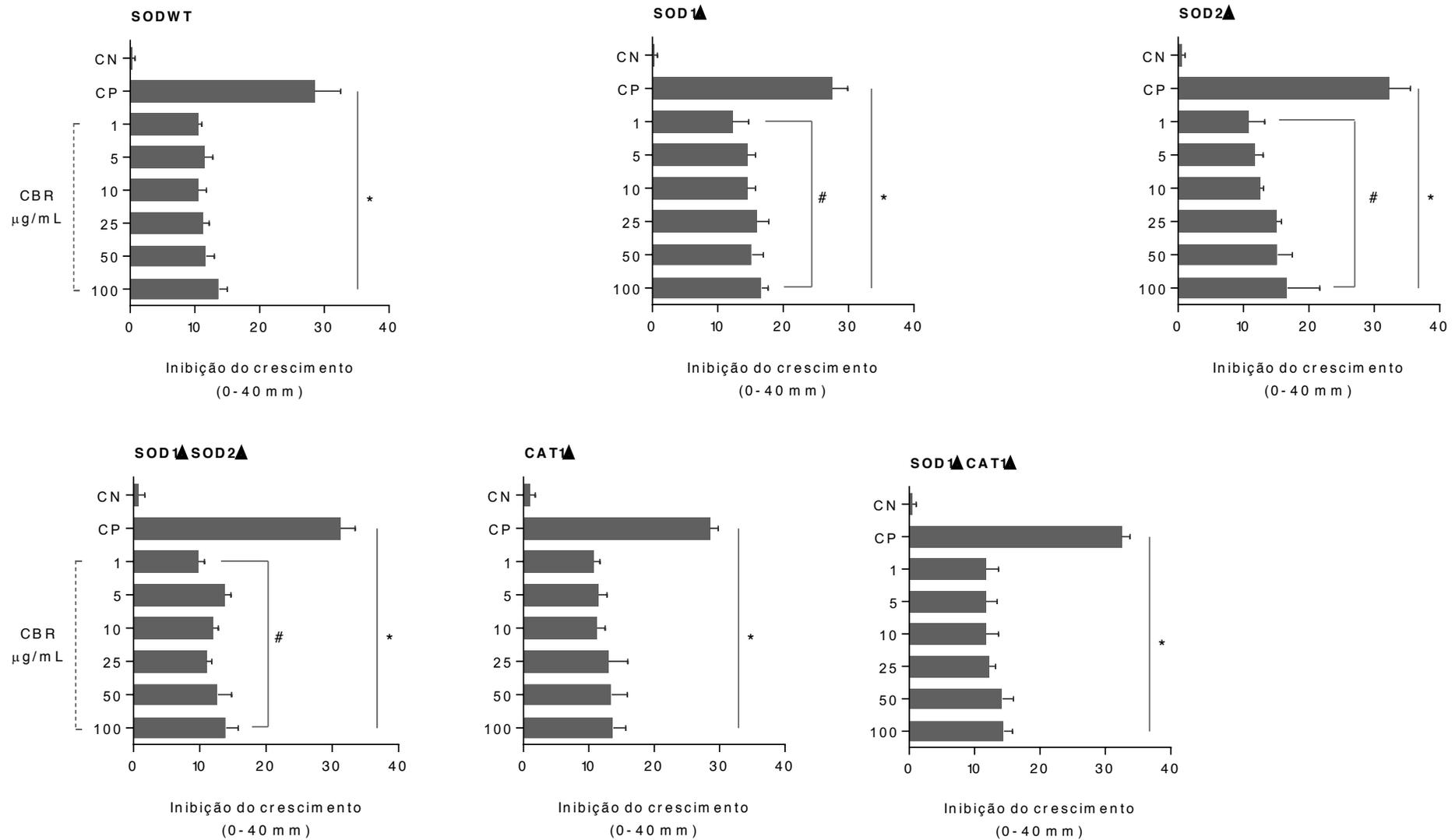
Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

O pré-tratamento da cepa SODWT com o composto 3 não impediu os danos oxidativos induzidos pelo peróxido, indicando que o composto não atuou na prevenção do estresse oxidativo quando comparado ao controle negativo. A maior concentração testada foi significativa (100 µg/mL) em relação a menor (1 µg/mL). De forma similar para as cepas SOD1Δ e SOD2Δ, não foram observados efeitos preventivos, mas o composto modulou os danos oxidativos do peróxido, sem inibir a oxidação. Nas cepas SOD1ΔSOD2Δ, CAT1Δ e SOD1ΔCAT1Δ, não preveniu nem modulou os danos oxidativos ($p > 0,05$) (**Figura 12**).

Em co-tratamento com peróxido na linhagem SODWT, o composto 3 apresentou atividades de modulação dos danos oxidativos induzidos pelo peróxido apenas nas 3 menores concentrações (1, 5 e 10 µg/mL) ($p < 0,05$). Como observado na linhagem proficiente, os dados obtidos no teste mostram que o composto modula os danos oxidativos induzidos pelo peróxido apenas nas menores concentrações quando comparados ao controle positivo. Danos oxidativos também foram observados para SOD2Δ e para a cepa duplo mutante SOD1ΔSOD2Δ. Em relação a catalase, induziu danos nas linhagens CAT1Δ e SOD1ΔCAT1Δ. Entretanto, apenas nas duas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL) não foram observados efeitos na modulação dos danos oxidativos (**Figura 13**).

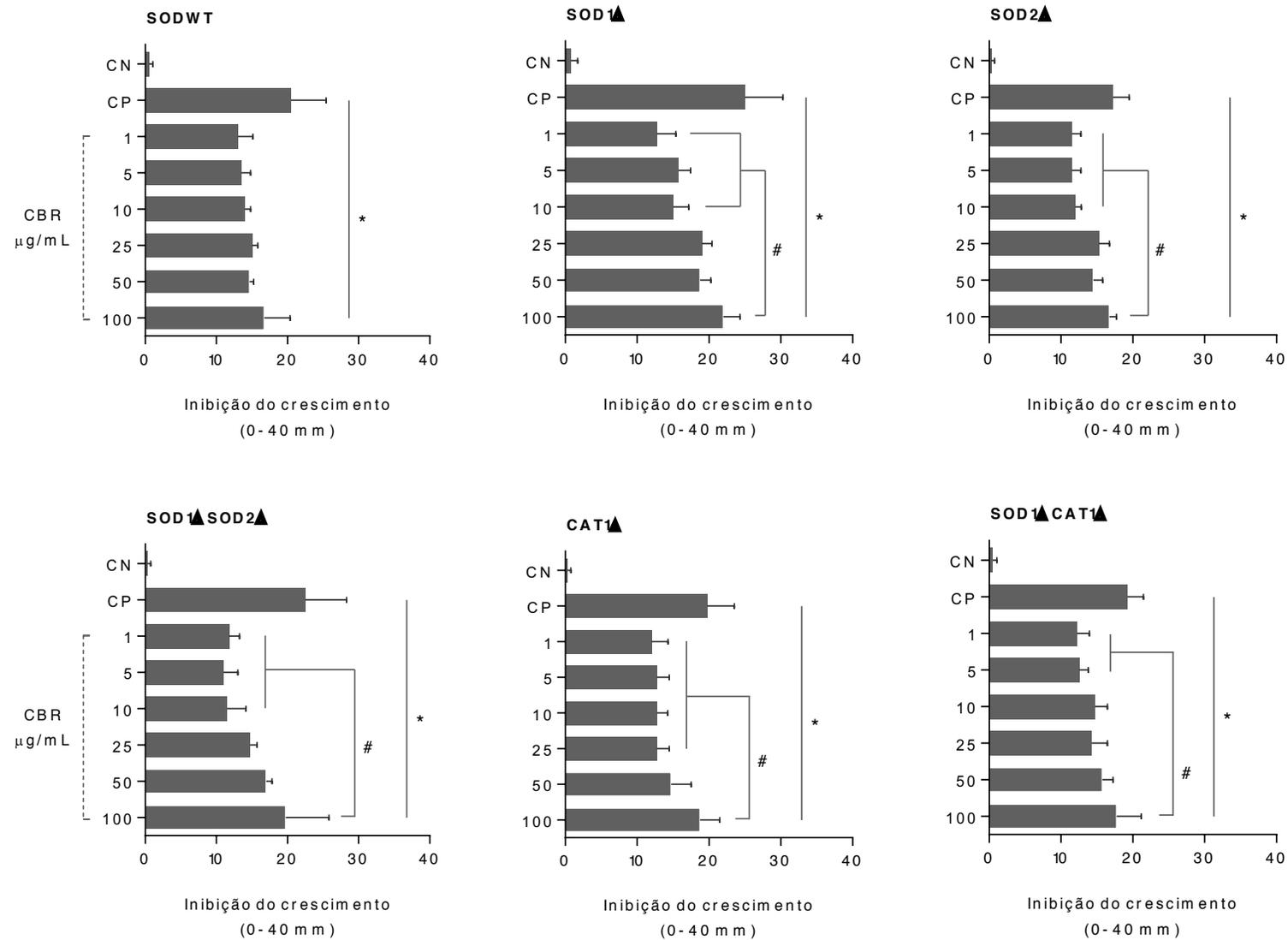
Em relação ao pós-tratamento, o composto 3 pode atuar em mecanismos de reparo de danos ($p < 0,05$), exceto para a maior concentração testada na cepa proficiente para superóxido dismutase SODWT. Na linhagem SOD1Δ, o composto induziu danos oxidativos em relação ao grupo salina e não foram observados efeitos após os danos induzidos pelo peróxido. Já com as cepas SOD2Δ e SOD1ΔSOD2Δ, induziu danos oxidativos, não reduziu os danos ocasionados pelo peróxido, mas, nas menores concentrações, ele reduziu o dano oxidativo. Em relação à catalase, em SOD1ΔCAT1Δ após o tratamento induzido pelo peróxido, não reduziu os danos em comparação ao controle negativo, mas os modulou nas quatro menores concentrações testadas (**Figura 14**).

Figura 12 - Avaliação do efeito protetor do composto 3 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



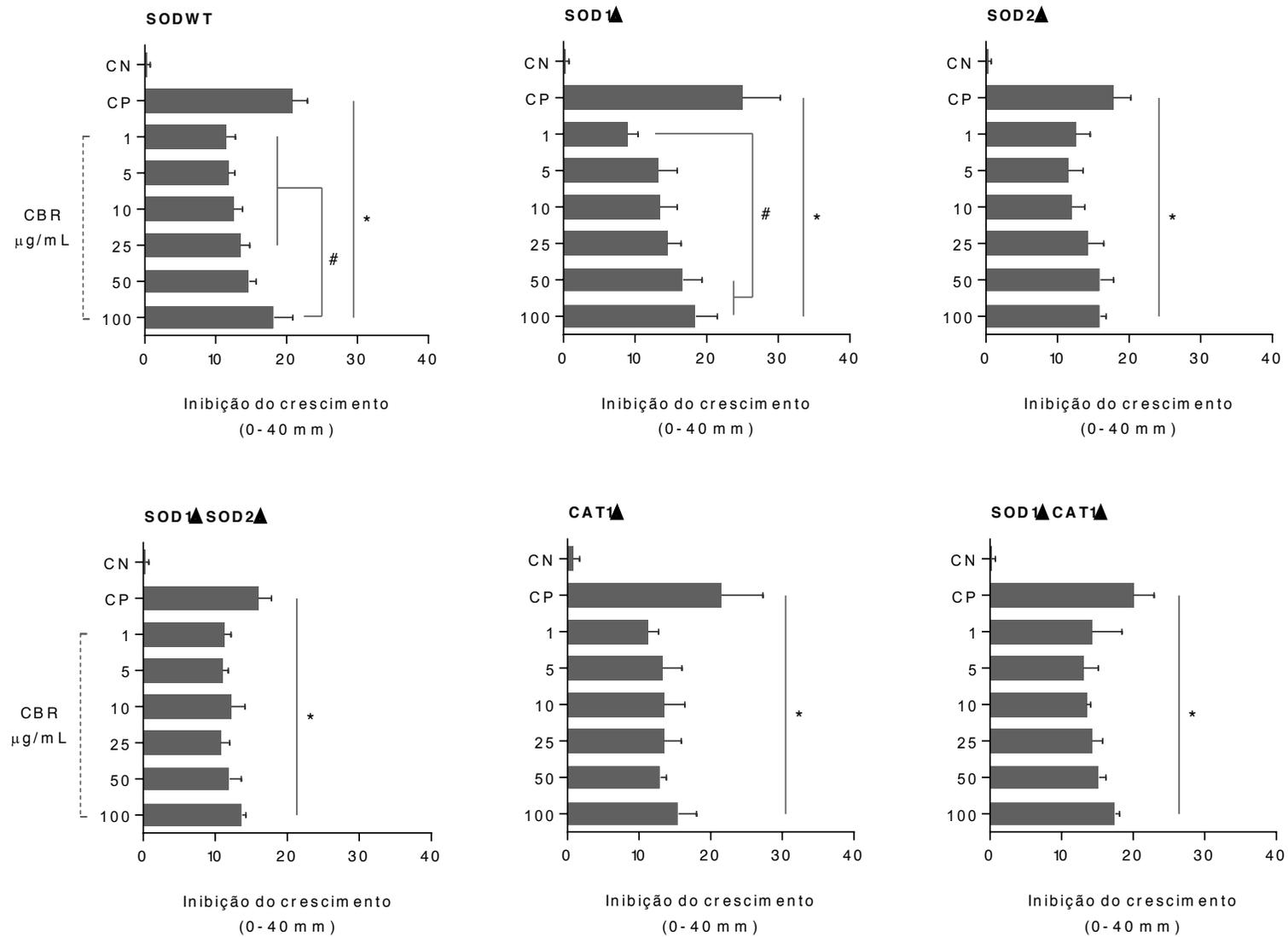
Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 13 - Avaliação da atividade antioxidante do composto 3 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 14 - Avaliação do efeito reparador do composto 3 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



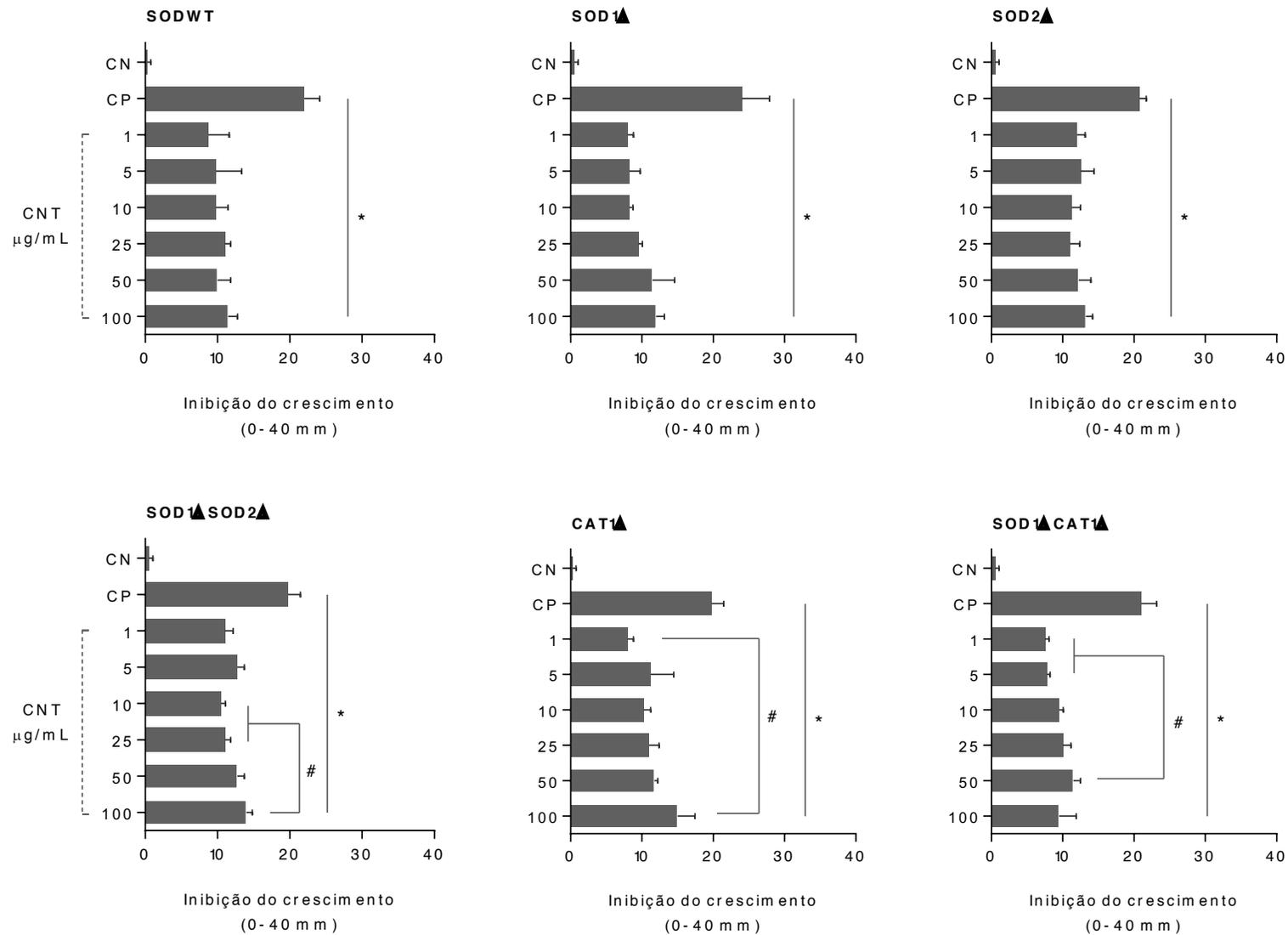
Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Em relação ao composto 4, no pré-tratamento não preveniu os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em todas as concentrações testadas nas cepas proficiente e mutada para SOD1 Δ , quando comparadas ao controle negativo ($p > 0,05$). Entretanto, modulou os danos do peróxido. Dados similares foram observados para as cepas SOD2 Δ , duplo mutante (SOD1 Δ SOD2 Δ), a catalase e duplo mutante (SOD1 Δ CAT1 Δ) (**Figura 15**).

Em relação ao co-tratamento com H₂O₂, o composto inibiu os danos do peróxido de forma parcial ($p < 0,05$) já que a ação oxidante do H₂O₂ prevaleceu em relação ao controle negativo. De forma contraditória, na linhagem SOD1 Δ a atividade antioxidante foi observada para a menor concentração testada (1 μ g/mL). Embora o composto não tivera efeitos antioxidantes sobre a cepa SOD2 Δ nas concentrações testadas, esse efeito foi observado no duplo mutante nas duas maiores concentrações ($p < 0,05$). Modulou os danos induzidos pelo peróxido em todas as concentrações testadas para linhagem mutada da catalase, mas efeitos oxidantes do H₂O₂ ainda assim foram observados em relação ao controle negativo. Dados similares foram observados no duplo mutante (SOD1 Δ CAT1 Δ) exceto para a maior concentração testada (**Figura 16**).

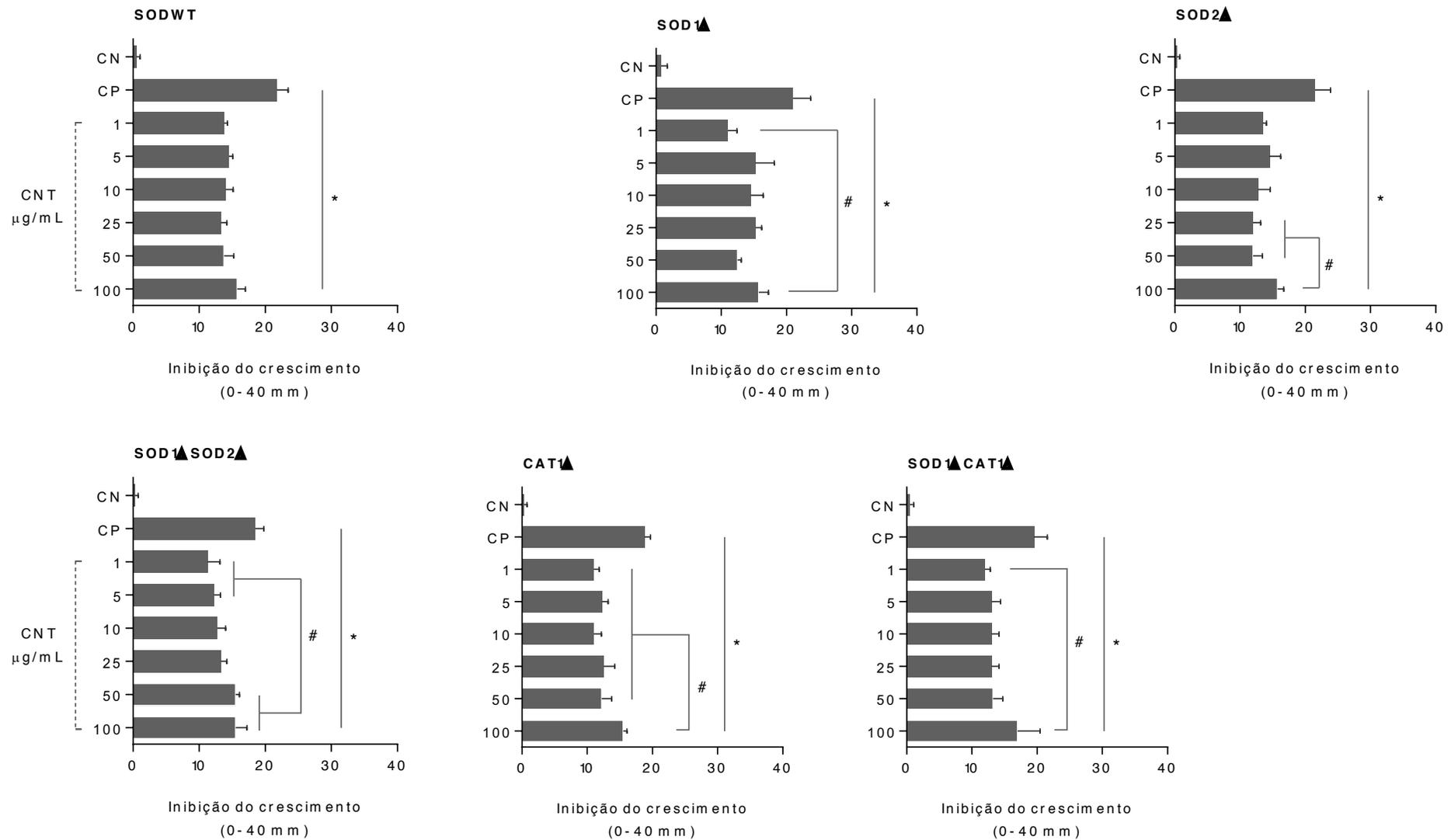
O pós-tratamento da cepa proficiente para SOD modulou os danos induzidos pelo peróxido mas os inibiu por completo. Porém, o composto 4 não modulou os danos do peróxido na cepa SOD1 Δ . Efeitos similares aos observados com a SODWT também foram encontrados para SOD2 Δ , SOD1 Δ SOD2 Δ , CAT1 Δ e duplo mutante SOD1 Δ CAT1 Δ (**Figura 17**).

Figura 15 - Avaliação do efeito protetor do composto 4 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central



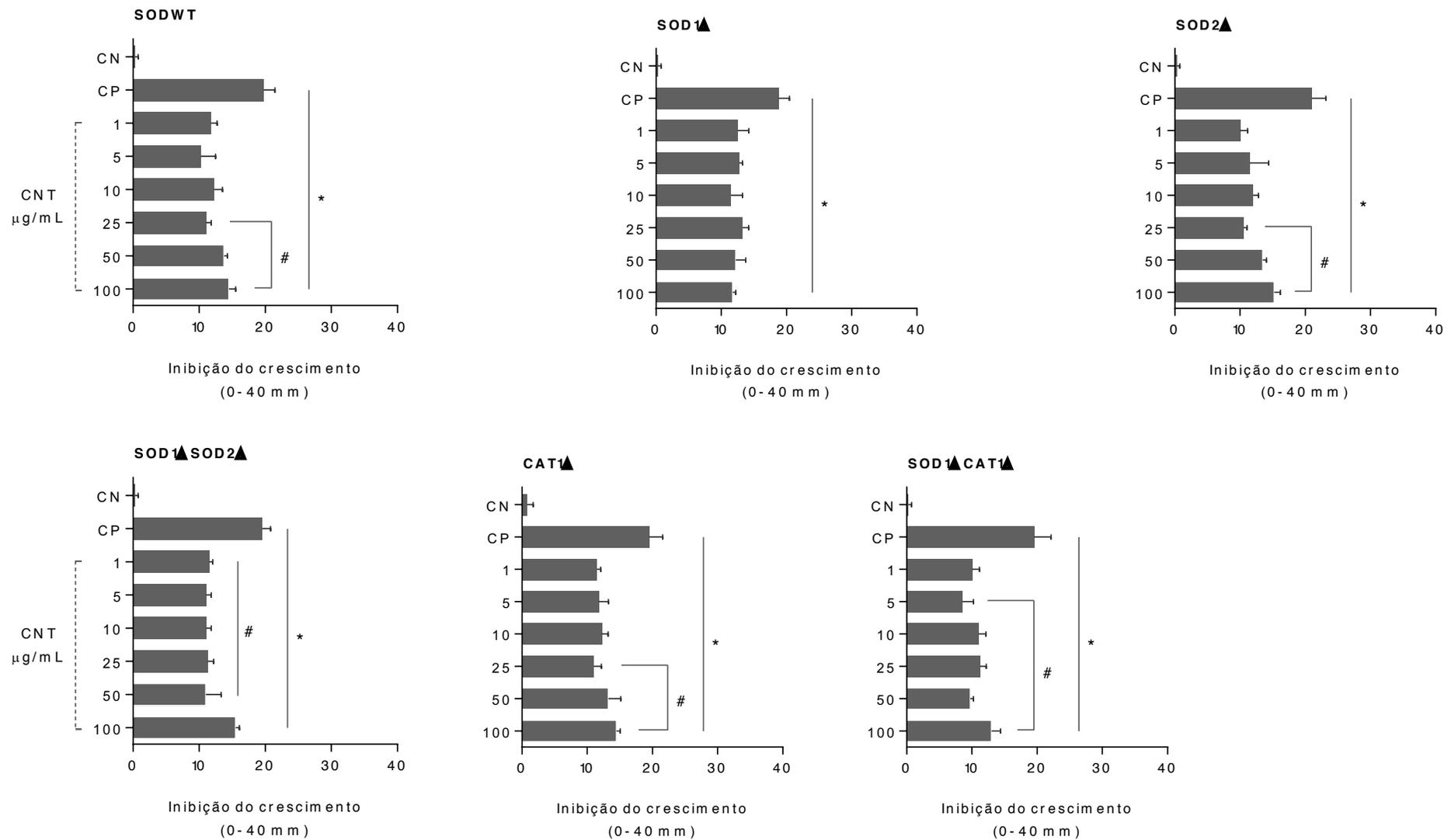
Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 16 - Avaliação da atividade antioxidante do composto 4 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 17 - Avaliação do efeito reparador do composto 4 nas linhagens de *S. cerevisiae* por meio do teste de disco central.



Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) CN: controle negativo (Salina 0,9%); CP: controle positivo (H_2O_2 10 mM). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ analisado por ANOVA seguido de Bonferroni.

Assim, no presente estudo, os compostos não demonstraram efeitos sobre as cepas mutadas para SOD e CAT, não demonstrando atividade antioxidante ou oxidante em altas concentrações. Entretanto, nas menores concentrações, os compostos 2 e 4 demonstraram ação antioxidante e moduladoras. Estudos prévios com diferentes herbicidas da classe das cloroacetamidas mostraram aumento da expressão e atividade das enzimas SOD e CAT em raízes e folhas de milho como uma forma de adaptação a uma nova situação fisiológica considerada mais estressante (GRIGORYUK et al., 2016).

Martins et al. (2011), ao avaliarem as respostas antioxidantes de três bactérias isoladas de solo previamente tratado com herbicidas da classe das cloroacetamidas (metolaclo e acetocloro), observaram que os isolados bacterianos não exibiram grandes mudanças na atividade total da SOD após o tratamento com os herbicidas, mas a CAT revelou aumento de sua atividade, demonstrando que essas enzimas podem proteger as bactérias contra a ação danosa dos herbicidas. Isso poderia explicar, pelo menos parcialmente, porque as células defectivas nessas enzimas não sofreram mudanças frente a ação dos compostos, não inibindo os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

Levando em consideração que os compostos desse estudo apresentam cloro em sua estrutura e que tais compostos clorados promovem acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (JI et al., 2018), é possível que compostos clorados causem peroxidação lipídica e, possivelmente, danos no DNA nuclear e/ou mitocondrial, desequilibrando o balanço redox celular por aumento de radicais livres. Inclusive, os radicais livres, seja eles de oxigênio ou nitrogênio, tem um papel preponderante para indução de danos genotóxicos e tumorigênicos (KRYSTON et al., 2011; MENG et al., 2017).

Várias drogas quimioterápicas induzem a acumulação intracelular de EROs que promove morte apoptótica ou não apoptótica (necrose, necroptose, autofagia ou catástrofe mitótica) de células cancerígenas. Como o aumento de EROs nas células cancerígenas pode desempenhar um papel importante na iniciação e progressão do câncer, esse estresse oxidativo intrínseco é frequentemente visto como um evento adverso. No entanto, como níveis excessivos de estresse com EROs também podem ser tóxicos para as células,

é provável que as células cancerígenas com aumento do estresse oxidativo sejam mais vulneráveis a danos causados por insultos de EROs induzidos por agentes exógenos. Portanto, manipular os níveis de EROs pela modulação redox é uma forma de matar seletivamente as células cancerígenas sem causar toxicidade significativa às células normais (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009; FERNANDO; RUPASINGHE; HOSKIN, 2019).

O papel do estresse oxidativo na promoção do desenvolvimento do câncer fornece diferentes razões para duas estratégias terapêuticas opostas contra o câncer (WANG; YI, 2008). A primeira é aumentar a capacidade de eliminação de EROs usando antioxidantes, anulando assim a sinalização de EROs e suprimindo o crescimento do tumor. No entanto, vários antioxidantes utilizados em ensaios clínicos foram associados ao aumento da incidência de câncer. Este efeito adverso dos antioxidantes pode estar relacionado à inibição da apoptose mediada por EROs e à prevenção de danos oxidativos em tumores já estabelecidos e, portanto, podem promover a sobrevivência de células tumorais (HALLIWELL, 2000).

Uma abordagem oposta é tratar células cancerígenas com agentes farmacológicos que possuem propriedades pró-oxidantes, que aumentam a geração de EROs ou anulam os sistemas antioxidantes celulares. Em modelos pré-clínicos, os agentes geradores de EROS mostraram toxicidade seletiva em células tumorais com aumento de EROs endógenos, elevando o estresse oxidativo acima do limiar de toxicidade à medida que os sistemas antioxidantes se tornam sobrecarregados (ALEXANDRE et al., 2006).

Ainda não está bem esclarecido se um bom agente quimioterápico seria um antioxidante ou um pró-oxidante, ou até mesmo a combinação deles, sendo necessários mais estudos clínicos e pré-clínicos que comprovem os reais efeitos benéficos e maléficos (FERNANDO; RUPASINGHE; HOSKIN, 2019).

4 CONCLUSÃO

Os compostos 2, 3 e 4 pertencentes à classe das arilacetamidas mostraram ser citotóxicos contra linhagens normais de fibroblastos humanos e murinos, revelaram alta toxicidade contra náuplios de *Artemia salina*, apresentaram efeito antiproliferativo e citostático em raízes em crescimento de

Allium cepa sem causar efeitos genotóxicos e mutagênicos e apresentaram efeitos antioxidantes e modulantes da oxidação em cepas defectivas de *Saccharomyces cerevisiae* somente nas menores concentrações testadas. Além disso, o composto 2 causou mortalidade significativa de embriões do peixe *Danio rerio* desde as primeiras 24 h até às 120 h de tratamento, cuja embriotoxicidade aguda se revelou tempo e concentração dependente, e interferiu no desenvolvimento do animal, levando a anormalidades morfológicas e malformações de órgãos. Portanto os achados pré-clínicos deste trabalho sugerem a potencialidade farmacotoxicológica dos análogos das arilacetamidas e a possibilidade real do uso de ferramentas laboratoriais substitutivas aos mamíferos para a triagem toxicológica de produtos bioativos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, J.; BATTEUX, F.; NICCO, C.; CHÉREAU, C.; LAURENT, A.; GUILLEVIN, L.; WEILL, B.; GOLDWASSER, F. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 1, p. 41-48, 2006.
- ALI, S.; CHAMPAGNE, D.L.; SPAINK, H.P.; RICHARDSON, M.K. Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. **Birth Defects Research (Part C)**, v. 93, p. 115–133, 2011.
- ARAÚJO, E.J.F.; LIMA, L.K.F.; SILVA, O.A.; REZENDE JUNIOR, L.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; CARVALHO, F.A.A.; LIMA, F.C.A.; PESSOA, C.; FREITAS, R.M.; FERREIRA, P.M.P. *In vitro* antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkaloids from *Aniba riparia* (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 309-314, 2016.
- ARAÚJO, E.J.F.; SILVA, O.A.; REZENDE JUNIOR, L.M.; SOUSA, I.J.O.; ARAUJO, D.Y.M.L.; CARVALHO, R.B.F.; PEREIRA, S.T.; GUTIERREZ, S.J.C.; FERREIRA, P.M.P.; LIMA, F.C.A. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1142, n. 1, p. 84-91, 2017.
- ARCANJO, D.D.R.; ALBUQUERQUE, A.C.M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L.C.L.R.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 444–447, 2007.
- BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E.; OTTE, J.; SCHNEIDER, K.; STENGEL, D.; STRECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.
- BROUGHTON, R.E.; MILAM, J.E.; ROE, B.A. The Complete Sequence of the Zebrafish (*Danio rerio*) Mitochondrial Genome and Evolutionary Patterns in Vertebrate Mitochondrial DNA. **Genome Research**, v. 11, pp.1958–1967, 2001.
- CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 289-299, 2004.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Água**

do Mar: teste de toxicidade aguda com *Artemia*. São Paulo, L05.021/1987.

COSTA, P.M.; FERREIRA, P.M.P.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; SANTOS, V.A.F.F.M.; CORSINO, J.; MORAES, M.O.; LOTUFO, L.C.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 4, p. 854-863, 2008.

DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 329-345, 2006.

DATTA, S.; SINGH, J.; SINGH, J.; SINGH, S.; SINGH, S. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. **Sustainable Environment Research**, v. 28, n. 4, p. 171-178, 2018.

DAVID, J.P.; SILVA, E.F.; MOURA, D.L.; GUEDES, M.L.S.; ASSUNÇÃO, R.J.; DAVID, J.M. Lignans and triterpenes from cytotoxic extract of *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, 223–229, 2015.

EL FELS, L.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y. *Artemia salina* as a new index for assessment of acute cytotoxicity during co-composting of sewage sludge and lignocellulose waste. **Waste Management**, 2016.

ERTAN, T.; YILDIZI, I.; OZKAN, S.; TEMIZ-ARPACI, O.; KAYNAK, F.; YALCIN, I.; AKI-SENER, E.; ABBASOGLU, U. Synthesis and biological evaluation of new N-(2-hydroxy-4(or 5) nitro/aminophenyl) benzamides and phenylacetamides as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 2032-2044, 2007.

FERNANDO, W.; RUPASINGHE, H.P.V.; HOSKIN, D.W. Dietary phytochemicals with anti-oxidant and pro-oxidant activities: A double-edged sword in relation to adjuvant chemotherapy and radiotherapy? **Cancer Letters**, v. 452, p. 168-177, 2019.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, p. 1770-1778, 2011.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

GAD, S. C. LD50/LC50 (Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50). **Encyclopedia of Toxicology**, p. 58–60, 2014.

GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 47–54, 2014.

GOUJON, E.; RICHARD, C.; GOUPIL, P.; LEDOIGT, G. Cytotoxicity on *Allium cepa* of the two main sulcotrione photoproducts, xanthene-1,9-dione 3,4-dihydro-6-methylsulphonyl and 2-chloro-4-mesybenzoic acid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 37–42, 2015.

GRIGORYUK, I.P.; LYKHOLAT, U.V.; ROSSYKHINA-GALYCHA, G.S.; KHROMYKH, N.O.; SERGAC, O.I. Effect of soil herbicides on the antioxidant system of maize vegetative organs during ontogenesis. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, n. 2, p. 95-98, 2016.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v.12, n.4, p.417, 1977.

HAMM, P.C.; SPEZIALE, A.J. Relation of herbicidal activity to the amide moiety of N-substituted alpha-chloroacetamides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 518-522, 1956.

HERNANDEZ-NUNEZ, E.; TLAHUEXT, H.; MOO-PUC, R.; TORRES-GOMEZ, H.; REYES-MARTINEZ, R.; CEDILLO-RIVERA, R.; NAVA-ZUAZO, C.; NAVARRETE-VAZQUEZ, G. Synthesis and *in vitro* trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of N acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1H-imidazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2975-1984, 2009.

HLADIK, M.L.; LYNN ROBERTS, A.; BOUWER, E.J. **Chloroacetamide herbicides and their transformation products in drinking water**. Awwa Research Foundation and U.S. Washington: Environmental Protection Agency, 2006.

ISLAM, T.; SANTOS, J.V.O.; FERREIRA, J.R.O.; SOUSA, J.M.C.; PAZ, M.F.C.J.; CARVALHO, R.M.; MATA, A.M.O.F.; LIMA, L.H.G.M.; LIMA, R.M.T.; SILVA, M.B.S.; ALENCAR, M.V.O.B.; FERREIRA, P.M.P.; DANTAS, S.M.M.M.; CAVALCANTE, A.A.C.M. A Possible Phytol-cytoprotective Trait through Reactive Species-Induced Oxidative Stress Ebbing Pathway. **International Archives of Medicine**, v. 9, p. 1-11, 2016.

JABLONKAI, I. Alkylating reactivity and herbicidal activity of chloroacetamides. **Pest Management Science**, v. 59, n. 4, p. 443-450, 2003.

JI, Z.; ZHANG, Y.; TIAN, J.; WANG, F.; SONG, M.; LI, H. Oxidative stress and cytotoxicity induced by tetrachlorobisphenol A in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 1-7, 2018.

KALDRIKYAN, M.A.; GRIGORYAN, L.A.; MELIK-OGANDZHANYAN, R.G.; ARSENYAN, F.G. Synthesis and antitumor activity of some benzofuryl-substituted 1,2,4-triazoles. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 5, p. 11-13, 2009.

KATKE, S.A.; AMRUTKAR, S.V.; BHOR, R.J.; KHAIRNAR, M.V. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/arylacetamide derivatives. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 148-156, 2011.

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

LAVORATO, S. N.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H. R.; COELHO, E. A. F.; ALVES, R. J. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 1-7, 2017.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LEMOS, A.S.; RODRIGUES, V.L.C.; Alencar, M.V.O.B.; ISLAM, M.T.; AGUIAR, R.P.S.; PAZ, M.F.C.J.; FEITOSA, C.M.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C. Possible oxidative effects of isotretinoin and modulatory effects of vitamins A and C in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 145-152, 2016.

MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P.L.; DOURADO, M.N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, R.A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1186-1195, 2011.

McLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C-J.; SMITH, D.L. In: *Studies in Natural Products*, v.9, Ed. Attaur-Rahman, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, p.383-409, 1992.

MELL, J. C., BURGESS, S. M. **Yeast as a model genetic organism**. Encyclopedia of Life Sciences. Mcmillan Publishers Ltda., 2002.

MENG, D.; ZHANG, P.; LI, S.; HO, C.T.; ZHAO, Antioxidant activity evaluation of dietary phytochemicals using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. **Journal of Functional Foods** v. 38, p. 36-44, 2017.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medica**, v.45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, v. 140- 141, p. 21-30, 2003.

MISIK, M.; PICHLER, C.; RAINER, B.; FILIPIC, M.; NERSESYAN, A.; KNASMULLER, S. Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: Possible impact on the environment. **Environmental Research**, v. 135, p. 196–203, 2014.

MOURA, A. G.; SANTANA, G. M. ; FERREIRA, P. M. P.; SOUSA, J. M. C.; PERON, A. P. Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allium cepa* L root meristems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 439-443, 2016.

NEVES, E.S.B.; FERREIRA, P.M.P.; LIMA, L.H.G.M.; PERON, A.P. Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 1131-1136, 2014.

NGUTA, J.M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D.; KIAMA, S. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacology Online**, v. 2, n. 1, p.458-78, 2011.

NISHIMURA, Y.; OKABE, S.; SASAGAWA, S.; MURAKAMI, S.; ASHIKAWA, Y.; YUGE, M.; KAWAGUCHI, K.; KAWASE, R.; TANAKA, T. Pharmacological profiling of zebrafish behavior using chemical and genetic classification of sleep-wake modifiers. **Front Pharmacology**, v. 3, n. 6, p. 1-21, 2015.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; BRITO, D.Q.; DIAS, Z.M.B.; GUARIEIRO, M.S.; CARVALHO, E.L.; FASCINELI, M.L.; NIVA, C.C.; GRISOLIA, C.K. Effects of ashes from a Brazilian savanna wildfire on water, soil and biota: An ecotoxicological approach. **Science of the Total Environment**, v. 15, n. 618, p. 101-111, 2018.

OLIVEIRA, I.M.; DEGRANDI, T.H.; JORGE, P.M.; SAFFI, J.; ROSA, R.M.; GUECHEVA, T.N.; HENRIQUES, J.A. Dicholesteroyl diselenide: cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research**, v. 15, p. 1-11, 2014.

OLIVEIRA, R.; GRISOLIA, C. K.; MONTEIRO, M. S.; SOARES, A.M.V.M.; DOMINGUES, I. Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebrafish life stages. **Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology**, v. 187, p. 50, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD, 2013.

PACHECO, D.J.; TRILLERAS, J.; QUIROGA, J.; GUTIÉRREZ, J.; PRENT, L.; COAVAS, T.; MARÍN, J.C.; DELGADO, G. N-(4-((E)-3-arylacryloyl)phenyl)acetamide derivatives and their antileishmanial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1685-1690, 2013.

PANDEY, H.; KUMAR, V.; ROY, B. K. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 300-308, 2014.

PETERSON, R.T., NASS, R., BOYD, W.A., FREEDMAN, J.H., DONG, K., NARAHASHI, T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. **Neurotoxicology** v. 29, p. 546–555, 2008.

QUINTANEIRO, C.; PATRÍCIO, D.; NOVAIS, S.C.; SOARES, A.M.; MONTEIRO, M.S. Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 390-400, 2017.

RUSCHE, B. The 3 Rs and animal welfare-conflict or the way forward. **ALTEX**, v. 20, p. 63–76, 2003.

SANTANA, G. M. ; DEUS, M. S. M. ; SOUSA, J. M. C. ; FERREIRA, P. M. P. ; FERNANDES, H. B. ; PERON, A. P. . Antimitotic and antimutagenic action of the *Hymenaea stigonocarpa* bark on dividing cells. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 520-525, 2016.

SIGGERS, K.A.; LESSER, C.F. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. **Cell Host & Microbe**, v. 4, n. 1, p. 8–15, 2008.

SIVEY, J.D.; ROBERTS, A.L. Abiotic reduction reactions of dichloroacetamide safeners: transformations of “inert” agrochemical constituents. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 2187-2195, 2012.

SOUZA, I.M.A. Corpos comensuráveis: produção de modelos animais nas ciências biomédicas. **Horizontes Antropológicos**, n. 48, p. 275-302, 2017.

SREEDEVI, B.; SUVARCHALA, G.; PHILIP, G.H. Morphological and physiological abnormalities during development in zebra fish due to Chlorpyrifos. **Indian Journal of Scientific Research**, v. 5, p. 1-8, 2014.

SWIECILO, A.; RYBCZYNSKA-TZACZYK, K.; NAJDA, A.; KRZEPILKO, A.; PRAZAK, R.; ZAWISLAK, G. Application of growth tests employing a Δ so Δ 1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to study the antioxidant activity of berry fruit extracts. **LWT**, v. 94, p. 96-102, 2018.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews**, v. 8, n. 7, p. 579-591, 2009.

TU, W.; NIU, L.; LIU, W.; XU, C. Embryonic exposure to butachlor in zebrafish (*Danio rerio*): endocrine disruption, developmental toxicity and immunotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 89, p. 189–195, 2013.

UNDERSTANDING ANIMAL RESEARCH, **Numbers of animals in 2017**.

Disponível em: <

[http://www.understandinganimalresearch.org.uk/animals/numbers-animals/#Numbers of animals used in 2016](http://www.understandinganimalresearch.org.uk/animals/numbers-animals/#Numbers%20of%20animals%20used%20in%202016)>. Acesso em: 20 jun. 2018.

VEIGA, L. F. & VITAL, N., 2002, **Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.*** In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 12, p. 1875-1884, 2008.

WHEELER, G.N.; BRÄNDLI, A.W. Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *Xenopus*. **Developmental Dynamic**, v. 238, n. 6, p. 1287-1308, 2009.

WHITE, F.J.G. Are Ethnic Groups Biological “Species” to the Human Brain? **Current Anthropology**, v. 42, n. 4, 2001.

XU, C.; TU, W.; DENG, M.; JIN, Y.; LU, B.; ZHANG, C.; LIN, C.; WU, Y.; LIU, W. Stereoselective induction of developmental toxicity and immunotoxicity by acetochlor in the early life stage of zebrafish. **Chemosphere**, v. 164, p. 618-626, 2016.

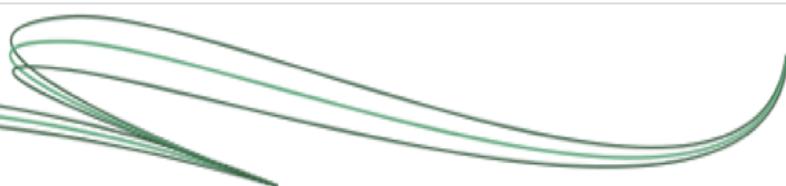
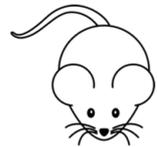
YANG, M.; HU, J.J.; LI, S.Y.; MA, Y.N.; GUI, W.J.; ZHU, G.N. Thyroid endocrine disruption of acetochlor on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, p. 844-852, 2016.

ZHOU, S.; DONG, Q.; LI, S.; GUO, J.; WANG, X.; ZHU, G. Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 339-346, 2009.

ZHUANG, S.L.; ZHANG, Z.S.; ZHANG, W.J.; BAO, L.L.; XU, C.; ZHANG, H. Enantioselective developmental toxicity and immunotoxicity of pyraclofos toward zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 159, p. 119-126, 2015.

CAPÍTULO 2

Arilacetamidas sintéticas: ferramentas farmacológicas contra cânceres humanos, toxicidade aguda em mamíferos e estudos físicoquímicos e de relação estrutura-atividade



Arilacetamidas sintéticas: ferramentas farmacológicas contra cânceres humanos, toxicidade aguda em mamíferos e estudos físicoquímicos e de relação estrutura-atividade

Kátia da Conceição Machado^a, Stefânia Neiva Lavorato^{b,c}, Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira^d, Jurandy do Nascimento Silva^a, Keylla da Conceição Machado^a, Luciano de Souza Santos^f, Valdenizia Rodrigues Silva^e, Daniel Pereira Bezerra^e, Milena Botelho Pereira Soares^{e,f}, Manoel Odorico de Moraes^d, Cláudia Pessoa^d, José Roberto de Oliveira Ferreira^g, Ricardo José Alves^b, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{a,h,*},

^a Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Brasil

^b Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brasil

^c Centro de Ciências da Saúde e Biológicas da Universidade Federal do Oeste da Bahia, 47808-021, Barreiras, Brasil

^d Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 60430-270, Fortaleza, Brasil

^e Fundação Oswaldo Cruz, 40296-710, Salvador, Brasil

^f Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, Salvador, 41253-190, Salvador, Brasil

^g Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Alagoas, 57010-382, Maceió, Brasil

^h Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental da Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil

Arilacetamidas sintéticas: ferramentas farmacológicas contra cânceres humanos, toxicidade aguda em mamíferos e estudos físicoquímicos e de relação estrutura-atividade

RESUMO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 200 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Vários produtos sintéticos apresentam perspectivas para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos e devem ser submetidos a uma série de estudos pré-clínicos para fornecer informações sobre a segurança com provável aplicação industrial com ênfase em suas propriedades farmacêuticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa de dez compostos derivados de 2-cloro-N-arilacetamidas em linhagens de células tumorais e células normais, além de estudar a toxicidade aguda em camundongos *Swiss* e atividade antitumoral em camundongos imunodeficientes. Foi abordado a atividade antiproliferativa dos dez compostos frente a 5 linhagens tumorais e em culturas primárias de células mononucleares do sangue periférico com o ensaio de MTT e *Alamar blue*, respectivamente, bem como sua atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos. O composto 2 [2-cloro-N-(4-clorofenil)acetamida] foi o mais ativo contra três das cinco linhagens tumorais estudadas neste trabalho (HL-60: leucemia promielocítica, SF295: glioblastoma e HCT-116: carcinoma colorretal). Os compostos não causaram ação hemolítica *in vitro* significativa dos eritrócitos humanos. A maioria dos compostos também não foram citotóxicas na proliferação de células mononucleares do sangue periférico dentre as concentrações testadas. Um estudo toxicológico em duas doses (150 e 300 mg/kg) foi realizado observando parâmetros gerais de comportamento por *screening* hipocrático, taxa de letalidade, assim como avaliação da atividade exploratória e coordenação motora por meio dos testes de campo aberto, *rota rod* e labirinto em cruz elevado utilizando os 3 compostos mais ativos (composto 2: 2-cloro-N-(4-clorofenil)acetamida, composto 3: 2-cloro-N-(4-bromofenil)acetamida e composto 4: 2-cloro-N-(4-nitrofenil)acetamida). Foram observadas mortes na maior dose (300 mg/kg) nos três compostos, porém nenhuma morte foi observada na dose de 150 mg/kg e não apresentaram alterações exploratórias e motoras. Para a avaliação do potencial antitumoral *in vivo*, os três compostos foram administrados via intraperitoneal na dose de 25 mg/kg/dia, durante 15 dias consecutivos em camundongos imunodeficientes transplantados com células de carcinoma de cólon humano. Apenas os compostos 2 e 3 reduziram significativamente o crescimento tumoral em 21,2% ($0,57 \pm 0,02$ g) e 27,5% ($0,53 \pm 0,04$ g) quando comparados ao controle negativo. Mortes ou alterações no peso relativo de órgãos e em parâmetros hematológicos e histológicos não foram detectados. Assim, demonstrando a possível atividade antitumoral dos compostos causando sinais aparentes de toxicidade sistêmica e alterações histológicas significativas.

Palavras-chave: Arilacetamida. Atividade antiproliferativa. Ensaio xenográfico.

Synthetic arylacetamides: pharmacological tools against human cancers, acute toxicity in mammals, and physical-chemical and structure-activity relationships

ABSTRACT

Cancer is the name given to a set of more than 200 diseases that have in common the disordered (malignant) growth of cells that invade the tissues and organs, and can spread (metastasize) to other regions of the body. Several synthetic products present prospects for the pharmaceutical and cosmetic industries and should undergo a number of pre-clinical studies to provide safety information with probable industrial application with an emphasis on their pharmaceutical properties. The objective of this work was to evaluate the antiproliferative activity of ten compounds derived from 2-chloro-N-arylacetamides in tumor cell lines and normal cells, besides studying the acute toxicity in Swiss mice and antitumor activity in immunodeficient mice. The antiproliferative activity of the ten compounds against 5 tumor lines and in primary cultures of peripheral blood mononuclear cells with the MTT and Alamar blue assay respectively, as well as their hemolytic activity against human erythrocytes, were approached. Compound 2 [2-chloro-N- (4-chlorophenyl) acetamide] was the most active against three of the five tumor lines studied in this work (HL-60: promyelocytic leukemia, SF295: glioblastoma and HCT-116: colorectal carcinoma). The compounds did not cause significant in vitro hemolytic action of human erythrocytes. Most compounds were also not cytotoxic in the proliferation of peripheral blood mononuclear cells within the concentrations tested. A two-dose toxicological study (150 and 300 mg / kg) was performed observing general parameters of behavior by hippocratic screening, lethality rate, as well as evaluation of exploratory activity and motor coordination through the open field, rotated rod and labyrinth tests (compound 2: 2-chloro-N- (4-chlorophenyl) acetamide, compound 3: 2-chloro-N- (4-bromophenyl) acetamide and 4: 2-chloro-N - (4-nitrophenyl) acetamide). Deaths were observed at the highest dose (300 mg / kg) in the three compounds, but no deaths were observed at 150 mg / kg and did not present exploratory and motor changes. For the evaluation of the antitumor potential in vivo, the three compounds were administered intraperitoneally at a dose of 25 mg / kg / day for 15 consecutive days in immunodeficient mice transplanted with human colon carcinoma cells. Only compounds 2 and 3 significantly reduced tumor growth in 21.2% (0.57 ± 0.02 g) and 27.5% (0.53 ± 0.04 g) when compared to the negative control. Deaths or changes in relative organ weights and haematological and histological parameters were not detected. Thus, demonstrating the possible antitumor activity of the compounds studied, without showing toxic activity in vivo.

Keywords: Arylacetamide. Antiproliferative activity. Xenographic test.

1 INTRODUÇÃO

O câncer, como uma doença multifatorial, é a segunda causa de morte no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (STEWART; WILD, 2014). Embora grandes esforços tenham sido depositados para superar o câncer nas últimas décadas, muitos tumores, principalmente os sólidos, tem se mostrado resistentes e refratários (MENON et al., 2018).

A quimioterapia seguida ou não de radioterapia ou pós-cirurgia representa as principais estratégias para melhorar o prognóstico de pacientes com câncer. Para obter uma taxa de resposta mais elevada, os regimes quimioterápicos mais ativos envolvendo quimioterapia tripla têm sido mais utilizados nos últimos anos. Eventos adversos como mielossupressão, alopecia, diarreia e neutropenia febril, por vezes, levam à interrupção da quimioterapia ou reduções na dosagem de medicamentos administrados. (SJOQUIST et al., 2011; MOTOORI et al., 2017).

Como alternativa, compostos sintéticos têm se revelado como opções viáveis científica e financeiramente para as empresas farmacêuticas como uma saída aos entraves legais e laboratoriais enfrentados com os produtos naturais para inovação na terapêutica oncológica (COSTA et al., 2015; FERREIRA et al., 2015). Nesse contexto, o grupo das arilacetamidas tem revelado potencialidades biológicas promissoras contra microrganismos, insetos e células tumorais (HLADIK et al., 2006; ERTAN et al., 2007; KALDRIKYAN et al., 2009; KATKE et al., 2011; PACHECO et al., 2013; LAVORATO et al., 2017).

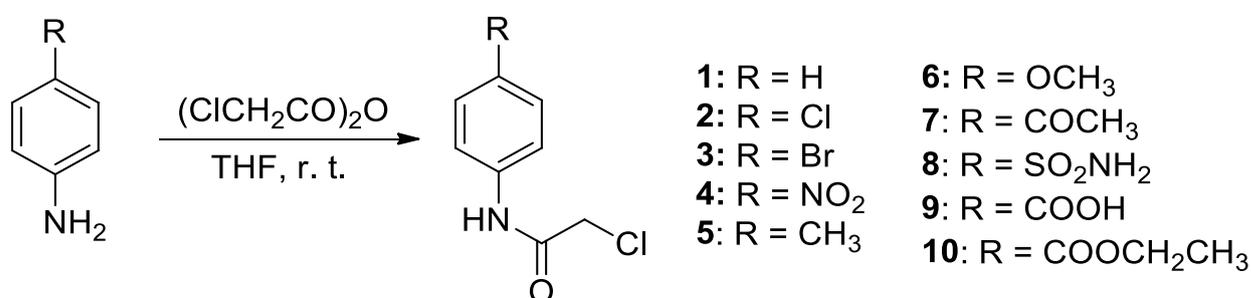
Os estudos de uma nova molécula com atividade farmacológica iniciam com ensaios pré-clínicos sobre o rastreio da toxicidade e evoluem para avaliação da toxicidade em doses repetidas para determinar a segurança em longo prazo (BRAZ-FILHO, 2010; ANVISA, 2013; DENNY; STEWART, 2013). Diante disto, o presente estudo, avaliou a citotoxicidade *in vitro* de dez compostos da classe das arilacetamidas, diferindo em seus substituintes aromáticos, em células tumorais e normais e a toxicidade *in vivo* dos compostos sintéticos, investigando alterações comportamentais. Ainda foi avaliado os possíveis efeitos antitumorais *in vivo* em modelo xenográfico heterotópico utilizando camundongos imunodeficientes transplantados com carcinoma de cólon humano.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos compostos

Os compostos foram fornecidos pelo prof. Dr. Ricardo José Alves da Universidade Federal de Minas Gerais. Os compostos da classe das 2-cloro-N-arilacetamidas foram obtidas por meio de síntese química pela reação da anilina apropriadamente p-substituída com anidrido cloroacético (**Figura 1**) (LAVORATO et al., 2017).

Figura 1 - Síntese de derivados de 2-cloro-N-arilacetamidas (1-10).



2.2 Cultivo celular e ensaio de citotoxicidade

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade citotóxica foram obtidas a partir do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e suas respectivas concentrações de plaqueamento para o teste do MTT estão discriminadas na **Tabela 1**.

As linhagens celulares foram manuseadas em cabine biológica com ambiente estéril e mantidas em incubadora de células a 37 °C e 5% de CO₂. As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL, Corning), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 ou DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 mg/mL de antibióticos para uma concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão (Biosystems) a cada 24 h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo. Para

o desprendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Cultilab™) diluída em PBS.

A capacidade citotóxica foi determinada usando o método do MTT (MOSMANN, 1983). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, pela atividade da enzima mitocondrial succinil-desidrogenase presente nas células metabolicamente ativas (BERRIDGE et al., 1996), permitindo calcular indiretamente a quantidade de células vivas.

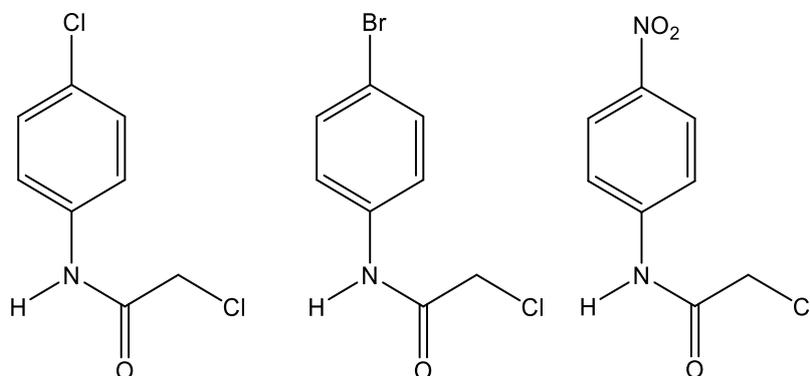
As células foram distribuídas em placas de 96 poços em densidade ajustada para cada linhagem, como mostrado na **Tabela 1**. Os compostos (0,004-10 µg/mL) foram acrescentadas e o quimioterápico Doxorubicina (0,005-5 µg/mL) foi usado como controle positivo. Como controle negativo, utilizou-se DMSO 0,1%. Após 69h de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min) e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 h em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspenso em 150 µL de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram mensuradas através do espectrofotômetro de placa utilizando o programa Mutimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Origem	Concentração de Plaqueamento (células/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	0.3 x 10 ⁶
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	0.7 x 10 ⁵
SF-295	Glioblastoma	Humana	0.1 x 10 ⁶
HEPG-2	Carcinoma de fígado	Humana	0.7 x 10 ⁵
OVCAR-8	Carcinoma de ovário	Humana	0.1 x 10 ⁶

2.3 Ensaio hemolítico

Os compostos identificadas por **2** - [2-cloro-N-(4-clorofenil)acetamida, **3** - 2-cloro-N-(4-bromofenil)acetamida e **4** - 2-cloro-N-(4-nitrofenil)acetamida] (**Figura 2**) foram testadas para atividade hemolítica de acordo com Santos et al. (2010) a 1200 µM em placas de 96 poços durante 60 min à temperatura ambiente (25°C) utilizando suspensão de eritrócitos de camundongos (2% em NaCl a 0,85% contendo 10 mM de CaCl₂). Após a centrifugação, os níveis de hemoglobina no sobrenadante foram determinados por espectrofotometria (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter) a 540 nm.

Figura 2 - Estrutura química dos compostos 2, 3 e 4, respectivamente.

2.4 Estudo antiproliferativo com células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Todos os compostos foram também investigados quanto à citotoxicidade em CMSP murinas obtidas a partir de punção cardíaca e avaliadas pelo ensaio Alamar Blue™. As CMSP foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 4% de fitohemaglutinina para estimulação do crescimento. As CMSP foram plaqueadas em placas de 96 poços (3×10^5 células/poço em 100 μ L de meio). Após 16-24 h, os três compostos dissolvidos em DMSO foram adicionados a cada poço (0,4 – 25 μ g/mL) e as células foram incubadas por 72 h.

Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação de 72h, 20 μ L da solução estoque (0,156 mg/mL) de Alamar Blue foram adicionados em cada poço. Após 72h de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter) a 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado). Para o cálculo da inibição da proliferação celular (PC), utilizou-se a seguinte fórmula: $PC (\%) = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$, onde A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao Alamar Blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente (COSTA et al., 2008).

2.5 Estudo de toxicidade *in vivo*

2.5.1 Animais

Foram utilizadas duas linhagens de camundongos *Mus musculus* do sexo feminino: *Swiss* e CB17 SCID (imunodeficiência combinada grave), estes últimos são totalmente deficientes de linfócitos T e B. Ambos com 2 meses de idade e peso variando de 25-30 g. Os camundongos *Swiss* foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram aclimatados a 25 ± 2 °C e mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 cm², com ciclo claro/ escuro de 12 h, receberam ração padrão tipo Purina® e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal (CEEA - Protocolo 202/16) da Universidade Federal do Piauí (UFPI, Teresina). Os camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID foram provenientes da FIOCRUZ/Bahia. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA - Protocolo 006/2015) no uso de animais do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, FIOCRUZ, Bahia). Assim, os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes brasileiras (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e internacionais sobre cuidados e uso de animais experimentais (Diretiva 2010/63/UE do Conselho do Parlamento Europeu).

2.5.2 Toxicidade aguda

Levando em consideração a minimização da dor e do sofrimento, bem como a garantia da robustez e reprodutibilidade dos estudos, realizou-se a metodologia de toxicidade aguda Classe Tóxica estabelecida pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development*, OECD), número 423 (OECD, 2001). Uma vez que estudos prévios não detalhavam a toxicidade e farmacologia dos compostos aqui avaliados, este estudo foi realizado iniciando-se com a dose única de 300 mg/kg e, verificado a ocorrência de mortes, passou-se a segunda dose de 150mg/kg (BRASIL, 2013).

Antes das administrações, os animais – camundongos *Swiss* - foram aclimatados durante 5 dias no Biotério setorial de Experimentação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e mantidos em jejum por 4-6h com acesso à água *ad libitum* antes da administração. Uma dose única de cada composto (150 e 300 mg/kg, n=5/grupo) foi administrado via intraperitoneal. O controle negativo recebeu dimetilsulfóxido 5% em água destilada. Os animais (n=5/grupo) foram alimentados após 2h e observados para detecção de morte e outros sinais e sintomas de toxicidade aos 30 min, 1h, 2h e 4h. Foram avaliados os efeitos sobre: a) Estado de consciência e disposição (frênto vocal e irritabilidade); b) Coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, reflexo de endireitamento); c) Tônus muscular (tônus do corpo, força para agarrar, ataxia); d) Reflexos (corneal); e) Atividade

do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômeno de “Straud”, hipnose, anestesia); f) Atividade do sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, respiração) (LUCIO et al., 2000).

2.6 Avaliação Comportamental

Para avaliar alterações na exploração, coordenação motora e tônus muscular induzidos pelos compostos 2, 3 e 4, os animais foram analisados usando os testes de campo aberto, barra giratória (*rota rod*) e labirinto em cruz após 30 min da administração intraperitoneal de 150 e 300 mg/kg dos compostos teste. O controle negativo recebeu dimetilsulfóxido 5% em água destilada. O grupo controle positivo recebeu diazepam via i.p. na dose de 2 mg/kg.

2.6.1 Campo Aberto

A avaliação da alteração exploratória por cruzamentos (*crossings*), coordenação motora (*rearing*) e autolimpeza (*grooming*) dos animais foi realizada em uma caixa de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividida em 9 quadrantes iguais. Neste teste foram observados durante o tempo de 5 min: o número de cruzamentos com as quatro patas (*crossings*), comportamento de autolimpeza (*groomings*) e levantamentos (*rearings*) (ARCHER, 1973). Após cada sessão individual do teste, o equipamento foi desinfetado com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

2.6.2 Rota rod

Para a avaliação da coordenação e relaxamento muscular, usou-se o teste de barra giratória conhecido como *rota rod*. Os camundongos foram treinados 24 h antes do experimento para adquirir capacidade de se manter por 180 s em uma haste de 25 mm de diâmetro girando a 17 rpm. Os animais foram colocados com as 4 patas sobre a barra giratória por um período de 3

min, registrando-se, então o número de quedas, com três reconduções, no máximo (CARLINI; BURGOS, 1979). Após cada sessão individual do teste, o equipamento foi desinfetado com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

2.6.3 Labirinto em cruz elevado

Para avaliação da ansiedade (observada pelo número e tempo de entradas individualmente nos braços abertos e fechados) e alterações na exploração (pelo número total de entradas) foi realizado o ensaio labirinto em cruz elevado que é fisicamente um aparato feito de madeira e consiste em dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm) cruzados perpendicularmente, no qual o animal é colocado 60 cm acima do solo exatamente na interseção dos braços (plataforma central 5 x 5 cm) com a cabeça voltada para a entrada dos braços fechados. Os animais foram colocados na interseção entre os braços do labirinto 30 min após os tratamentos e observados durante 5 minutos. Os parâmetros quantificados no experimento foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e fechados (NEBF), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e fechados (TPBF) em segundos e o número total de entrada (LISTER, 1987). O teste foi realizado com um animal de cada vez. Após cada sessão individual do teste, o equipamento foi desinfetado com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

2.7 Avaliação antitumoral *in vivo* em modelo xenográfico de carcinoma de cólon humano

As células HCT-116 foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado, contadas em câmara de *Neubauer* e implantadas subcutaneamente na axila dianteira esquerda de camundongos CB-17 saudáveis (2×10^7 células/mL/animal). No dia seguinte, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n = 12 cada) e os compostos (2, 3 e 4) dissolvidas em DMSO 5% foram administradas por via intraperitoneal por 15 dias a 25 mg/kg/dia. Os controles negativos e positivos receberam DMSO

5% (i.p.) e 5-FU (25 mg/kg/dia, i.p.). No 16º dia, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) + xilazina (4,5 mg/kg) para coleta de sangue de cada animal via plexo retrorbital (WAYNFORTH, 1980) utilizando tubos estéreis e pipetas de heparina para determinar o perfil de leucócitos periféricos circulantes e analisadas em aumento de 400x em esfregaços de sangue marcados com May-Grünwald-Giemsa (dois por animal) para obter quantidade diferencial de glóbulos brancos (WBC). A contagem absoluta de um subtipo de leucócitos foi calculada como o produto de sua respectiva porcentagem diferencial e contagem total de leucócitos (BIERMANN et al., 1999).

Posteriormente, todos os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e tumores, fígados, rins, corações e pulmões foram dissecados, pesados e fixados em formaldeído a 10% para exame de tamanho, alterações de cor e hemorragias. O percentual de inibição do crescimento tumoral (%) foi calculada conforme fórmula que segue:

$$\text{Percentual de inibição (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

Onde:

- A - peso médio do tumor no controle negativo;
- B - média para cada grupo tratado.

Tumores, fígado, coração, rins e pulmões foram fixados em formol tamponado a 10% e, posteriormente, cortados em pequenos pedaços para preparar secções histológicas (4-7 µm) e corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi realizada sob microscopia de luz com aumento de 100 a 400x.

2.8 Trânsito Intestinal

Camundongos *Swiss* fêmeas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos (n= 8 animais/grupo): controle negativo (DMSO 5% i.p.), controle positivo para aumento do trânsito intestinal (Bisacodil, 10 mg/kg via oral por gavagem), controle positivo para redução do trânsito intestinal (sulfato de atropina, 5 mg/kg, i.p.) e os compostos 2, 3 e 4 (50 mg/kg i.p.). Assim, 60 min após o tratamento, os animais receberam uma suspensão de carvão ativado

10 % em solução de carboximetilcelulose 1,5 % na proporção de 0,3 mL/animal via oral por gavagem. Trinta minutos depois, os camundongos foram eutanasiados com pentobarbital sódico (150 mg/kg) via intraperitoneal e o intestino delgado foi retirado desde o piloro até o início do ceco. O resultado foi expresso como porcentagem do comprimento total do intestino delgado (MILLER et al., 1981; HARRISON et al., 2004) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Trânsito intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo carvão ativado}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

2.9 Análises estatísticas

Para análise de valores de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e CE_{50} (concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), os resultados de cada composto testado em triplicata e em duas avaliações biológicas independentes ($n=2$) foram analisados por regressão não-linear. Quanto aos valores expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.), a ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos foi determinada por variância (ANOVA) seguida de *Student-Newman-Keuls*, usando o programa *GraphPad Prism*, versão 6.0, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial citotóxico e antiproliferativo

Duas abordagens universais têm sido utilizadas nos testes pré-clínicos: sistemas celulares *in vitro* e modelos animais *in vivo*. Culturas de células *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para a compreensão da biologia do câncer, na pesquisa de quimioterápicos e no desenvolvimento, estabelecimento e uso de ferramentas com terapêutica direcionada, o que coloca os modelos celulares como um dos principais pilares do progresso na descoberta de novas alternativas para tratar tumores sólidos, displasias

hematológicas e leucemias (COOK; JODRELL; TUVESON, 2012; FERREIRA et al., 2016). No presente trabalho, uma série de 2-cloro-N-arilacetamidas (1-10) foi avaliada quanto à citotoxicidade contra cinco linhagens de células tumorais. Estes compostos foram obtidos pela reação de dez derivados de anilina para-substituídos com anidrido 2-cloroacético à temperatura ambiente (LAVORATO et al., 2017).

Com exceção dos compostos 6 e 9, foi possível detectar valores de CI_{50} para todos os compostos variando de 4,9 μM (para células HL-60) a 50,1 μM (células OVCAR-8) (**Tabela 2**). O composto 2 (R = Cl) foi o mais ativo contra três das cinco linhagens tumorais estudadas (HL-60, SF-295 e HCT-116). Adicionalmente, os compostos 3 (R = Br) e 4 (R = NO_2) foram os únicos ativos contra a linhagem celular mais resistente SF-295 (glioblastoma), pois se tratando de um tumor no sistema nervoso central de difícil acesso de medicamentos, nenhum dos atuais tratamentos de última geração para o glioma maligno pode ser considerado efetivo (ZHANG et al., 2015).

Curiosamente, os compostos não causaram ação citolítica *in vitro* significativa dos eritrócitos humanos até a concentração testada (1200 μM). A maioria dos compostos também foram citotóxicas em CMSP humanas, com valores de CI_{50} variando de 11,8 a 44,6 μM (**Tabela 2**).

Embora não seja possível estabelecer claramente o efeito do substituinte arila na atividade antiproliferativa de 2-cloro-N-arilacetamidas, alguns aspectos devem ser destacados. Em vista disso, os dados físico-químicos dos compostos estudados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 2 - Potencialidade antiproliferativa dos compostos 1-10 em linhagens tumorais humanas e cultura primária de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e análise da capacidade hemolítica.

Compostos	R	CI ₅₀ [µg/mL (µM)]*						Hemólise (%)**
		HL-60	OVCAR-8	SF-295	HCT-116	HepG-2	CMSP	
1	H	6,0 (35,4)	8,5 (50,1)	> 10 (> 59,0)	8,4 (49,5)	4,5 (26,7)	7,6 (44,6)	0,06 ± 0,16
2-cloro- <i>N</i> -fenilacetamida		5,4-6,8	7,5-9,7		7,5-9,4	3,8-5,4	6,1-9,4	
2	Cl	1,0 (4,9)	> 10 (> 49,0)	5,6 (27,4)	3,4 (16,7)	2,4 (11,8)	3,4 (11,8)	5,22 ± 6,97
2-cloro- <i>N</i> -(4-clorofenil)acetamida		0,6-1,5		4,1-7,7	2,5-4,5	2,0-2,9	3,0-3,8	
3	Br	8,4 (33,8)	7,4 (29,8)	9,8 (39,4)	7,0 (28,2)	4,2 (16,7)	5,7 (22,9)	0,45 ± 0,32
2-cloro- <i>N</i> -(4-bromofenil)-2-cloroacetamida		6,7-10,5	6,4-8,6	8,2-11,8	5,5-8,9	3,2-5,4	4,7-6,8	
4	NO ₂	4,8 (22,4)	4,4 (20,5)	8,9 (41,5)	4,7 (21,9)	2,4 (11,2)	3,0 (14,1)	0,11 ± 0,05
2-cloro- <i>N</i> -(4-nitrofenil)acetamida		4,2-5,9	4,1-4,8	7,7-10,3	3,8-5,8	1,8-3,2	2,3-4,0	
5	CH ₃	5,9 (32,1)	6,9 (37,6)	> 10 (> 54,5)	10,0 (54,5)	2,8 (15,3)	> 25 (> 136,1)	0,07 ± 0,01
2-cloro- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolil)acetamida		4,6-7,7	6,0-8,1		8,6-11,5	2,3-3,5		
6	OCH ₃	> 10 (> 50,1)	> 10 (> 50,1)	> 10 (> 50,1)	> 10 (> 50,1)	nd	nd	nd
2-cloro- <i>N</i> -(4-metoxifenil)acetamida								
7	COCH ₃	8,3 (39,2)	> 10 (> 47,3)	> 10 (> 47,3)	9,6 (45,4)	1,9 (9,0)	5,2 (24,4)	0,01 ± 0,01
<i>N</i> -(4-acetilfenil)-2-cloroacetamida		7,3-9,5			7,8-11,9	1,5-2,4	4,1-6,6	

8	SO ₂ NH ₂	5,6 (22,5)	9,8 (39,4)	> 10 (> 40,2)	6,5 (26,1)	2,4 (9,6)	6,1 (24,5)	0,01 ± 0,02
	2-cloro- <i>N</i> -(4-sulfamoilfenil)acetamida	4,6-7,0	6,8-14,2		4,5-9,1	1,8-3,1	4,9-7,7	
9	COOH	> 10 (> 46,8)	> 10 (> 46,8)	> 10 (> 46,8)	> 10 (> 46,8)	nd	nd	nd
	4-(2-cloroacetamida)ácido benzóico							
10	COOCH ₂ C ₃	> 10 (> 41,4)	7,5 (31,0)	> 10 (> 41,4)	> 10 (> 41,4)	2,9 (12,0)	4,8 (19,8)	0,11 ± 0,26
	Etil 4-(2-cloroacetamida)benzoato		6,3-8,9			2,3-3,7	3,6-6,3	
Doxorubicina	-	0,02 (0,04)	1,3 (2,4)	0,2 (0,4)	0,01 (0,02)	0,11 (0,21)	1,9 (3,2)	-
		0,01-0,02	1,0-1,9	0,2-0,3	0,01-0,02	0,17-0,25	1,4-2,4	

R-Radical

* Os dados são apresentados como valores de Cl₅₀ e intervalos de confiança de 95% para linhagens tumorais de leucemia (HL-60), ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295), cólon (HCT-116) e fígado (HEPG-2) determinadas por ensaio MTT, e para cultura primária de células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) realizadas por ensaio *Alamar Blue*. A doxorubicina foi usada como controle positivo.

** Os dados são apresentados em porcentagem para hemólise ± E.P.M at 1200 µM.

Todos os experimentos foram realizados em duplicada.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos compostos (1-10).

Compostos	R	σ_R^a	ClogP ^b	vdWV ^c (Å ³)	Momento dipolo ^d (D)
1	H	0	1.75	143.68	0.957
2	Cl	0.23	2.35	157.61	2.580
3	Br	0.23	2.52	161.93	2.287
4	NO ₂	0.78	1.69	166.65	5.880
5	CH ₃	-0.17	2.26	160.45	0.977
6	OCH ₃	-0.27	1.59	169.78	2.148
7	COCH ₃	0.50	1.31	179.88	4.063
8	SO ₂ NH ₂	0.57	0.35	191.47	6.352
9	COOH	0.45	-1.66	171.45	2.484
10	COOCH ₂ CH ₃	0.45	2.11	205.83	3.078

^a σ_R : Constante eletrônica do substituinte de Hammet; obtido de Hansch e Leo (1979); ^bClogP: coeficiente de partição calculado; calculado usando o MarvinSketch 6.2.0 [ChemAxon, 2012, (<https://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>)]; ^cvdWV: volume de van der Waals calculado usando MarvinSketch 6.2.0; ^dcalculado usando HyperChem [HyperChem (TM) Professional 8.0.8, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Flórida 32601, EUA].

Entre 1981 e 2010, 1.073 novas entidades químicas (NCEs) foram aprovadas como droga pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América e 36% delas são moléculas sintéticas. O interesse em modelagem molecular, química combinatória e outras técnicas de síntese química da química medicinal são responsáveis pelos mais novos agentes terapêuticos contra parasitas e cânceres, e para tratar distúrbios inflamatórios, neurodegenerativos e sensoriais (SOARES et al., 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; FERREIRA et al., 2015; LOPES et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017).

Os compostos sintéticos da classe das arilacetamidas apresentaram atividade antiproliferativa diferente de acordo com a linhagem celular tumoral testada e a natureza do substituinte arila na posição *p* (para). O composto 6 (R = OCH₃) e 9 (R = COOH) foram considerados inativos contra todas as linhagens celulares avaliadas, enquanto apenas os compostos 3 (R = Br) e 4 (R = NO₂) foram ativos contra todas as células tumorais. Embora não possamos estabelecer claramente o efeito do substituinte arila na atividade antiproliferativa das 2-cloro-N-arilacetamidas, alguns aspectos devem ser destacados. Neste ponto de vista, apenas os compostos 2 (R = Cl), 3 (R = Br) e 4 (R = NO₂) foram ativos contra células SF-295 de glioblastoma. Estes compostos apresentam volumes de van der Waals variando de 157,61 a

166,65 Å. Isto pode indicar que o volume ocupado por tais compostos pode ser uma característica importante para a atividade citotóxica. No entanto, com base apenas neste parâmetro, esperaríamos que o composto 5 (R = CH₃), cujo volume de van der Waals é 160,45 Å³, fosse também ativo na linhagem SF-295.

Esses resultados, corroboram com os encontrados por Wan et al. (2018) em que substâncias contendo cloro (cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio) inibiu significativamente a viabilidade celular das células HepG2 de forma dependente da concentração e tempo, revelando assim, efeitos citotóxicos nestas células.

Além dos aspectos estéricos, é provável que o efeito eletrônico do substituinte arila também possa interferir na bioatividade. O efeito eletrônico de um substituinte pode ser medido pela constante eletrônica de Hammett (σ_R). Um valor σ positivo indica que o substituinte é um grupo que retira elétrons, enquanto um σ negativo está relacionado a um grupo doador de elétrons (TAVARES et al., 2004). De acordo com seus valores de σ , cloro, bromo e nitro desempenham um efeito de retirada de elétrons, enquanto o grupo metil desempenha um efeito doador de elétrons, o que pode contribuir para explicar as diferenças de bioatividade desses compostos. Este fato indica que um anel aromático com baixa densidade eletrônica é uma característica relevante para promover efeitos antiproliferativos.

O composto 4 (R = NO₂) apresenta um substituinte com o maior e positivo σ_R da série, indicando seu alto caráter de retirada de elétrons. Por outro lado, o composto 1 (R = H) não possui substituintes. Então, o valor σ atribuído ao hidrogênio é zero. Assim, esperávamos que o composto 8 (R = SO₂NH₂), com o segundo maior valor de σ_R (0,57), fosse mais ativo contra as linhagens tumorais. No entanto, os resultados frustraram essa possibilidade. Provavelmente, ocorreu porque este composto apresentou a menor lipofilicidade da série (Clog P = 0,35).

Um composto com baixa lipofilicidade é menos capaz de atravessar as membranas celulares ou atacar o DNA, o que reduz sua capacidade de atuar nas células tumorais (RUTKOWSKA et al., 2013). Embora possuam um valor menor de σ_R para bromo, o composto 3 (R = Br) apresenta maior potencial citotóxico que os compostos 7 e 8, provavelmente devido ao seu maior nível

de ClogP. Com base nas características físico-químicas, não encontramos razão para a inatividade do composto 2 (R = Cl) contra apenas as células OVCAR-8.

Nos ensaios de MTT, o composto 9 (R = COOH) foi inativo contra todas as linhagens celulares tumorais. Curiosamente, o composto 10 (R = COOCH₂CH₃), um éster etílico do composto 9, foi ativo contra apenas duas linhagens. O seu potencial antiproliferativo pode ser reduzido, uma vez que não pode permear as membranas e entrar nas células tumorais (LIMA et al., 2007). Se isso for verdade, a baixa atividade antiproliferativa do composto 10 pode ser explicada por sua hidrólise *in situ* e conversão para 9.

Quando analisados em eritrócitos humanos, nenhum dos compostos apresentou ação lítica, sugerindo que a citotoxicidade não está relacionada à ação direta por ruptura da membrana celular. Por outro lado, apenas o composto 5 (R = CH₃) não foi tóxico para as CMSP (CI₅₀ > 25 µg/mL) (**Tabela 2**). Assim, os compostos não revelaram citotoxicidade seletiva para células tumorais.

Anteriormente, estudos com 2-cloro-N-arilacetamidas já mostraram ação antimicrobiana contra fungos filamentosos (*Aspergillus niger*: composto 3), leveduras (*Candida albicans*: compostos 1, 4 e 6), bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*: compostos 1, 4 e 6) e na estirpe de *Mycobacterium tuberculosis* sensível a fármacos (composto 1) (MARCO-CONTELLES; GÓMEZ-SÁNCHEZ, 2005; KATKE et al., 2011; ASCHALE et al., 2012). Recentemente, também relatamos a atividade antileishmanial destes compostos contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (LAVORATO et al., 2017), e tais resultados indicaram que a atividade antipromastigota desses compostos depende do tipo de substitutos posicionados no nitrogênio da acetamida.

Apesar destes estudos descreverem a bioatividade desta classe química, este é o primeiro trabalho focado nas propriedades antiproliferativas das 2-cloro-N-arilacetamidas.

3.2 Toxicidade sistêmica e alterações comportamentais agudas

Os estudos de toxicidade aguda em roedores são utilizados para avaliar a toxicidade individual produzida por um composto após dosagem única, seguida da observação durante os primeiros 30 min e periodicamente durante as primeiras 24 h, com especial atenção nas primeiras 4 h, e diariamente a partir daí, para um total de 14 dias. As observações são realizadas quanto à morte, diarreia, letargia, convulsões e alterações macroscópicas, exceto se for necessário para ser removido do estudo e sacrificado por razões de proteção dos animais ou são encontrados mortos (ANVISA, 2013).

O composto 2 causou defecção aumentada, atividade geral e força de agarrar diminuídas, ptose palpebral na maior dose (300 mg/kg) e atividade geral e força de agarrar diminuída na menor dose (150 mg/kg). Dois animais morreram no grupo de 300 mg/kg após 24h. O segundo composto analisado, que possui bromo em sua estrutura química (composto 3) provocou atividade geral diminuída (apatia, ausência de tônus corporal), característico de atividade depressora no sistema nervoso central (SNC), causando morte dos 5 animais. Entretanto, na dose de 150 mg/kg apresentou somente atividade geral diminuída, e nenhuma morte foi observada. O composto 4 diminuiu a atividade geral, reflexo corneal e a força de agarrar, e aumentou a micção e defecação na dose de 300 mg/kg, sendo observada a morte de um animal. Na dose de 150 mg/kg, apesar da atividade geral diminuída, nenhuma morte ocorreu (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Efeitos tóxicos agudos dos compostos 2, 3 e 4 após administração intraperitoneal em camundongos adultos *Swiss*.

Grupo	Dose (mg/kg)	Sinais e sintomas de toxicidade		
		Sobrevida	1h	24h
Controle negativo	DMSO 5%	5/5	-	-
	150	5/5	-	Atividade geral e força de agarrar diminuídas
Composto 2	300	3/5	Defecação aumentada	Atividade geral e força de agarrar diminuídas, ptose palpebral e defecação aumentada
	150	5/5	-	Atividade geral diminuída
Composto 3	300	0/5	Atividade geral e força de agarrar diminuídas	Atividade geral diminuída, presença de ptose palpebral, defecação e micção aumentadas
	150	5/5	Atividade geral diminuídos	Atividade geral e força de agarrar diminuídos
Composto 4	300	4/5	Atividade geral e tônus corporal diminuídos	Atividade geral, reflexo corneal e força de agarrar diminuídos, micção e defecação aumentados

De acordo com o Guia OECD usado para classificar as substâncias em cinco categorias de toxicidade com base em sistemas internacionalmente aceitos (*Globally Harmonised System - GHS*), é possível inferir que os compostos se enquadram na Categoria 3 de periculosidade com valor de DL₅₀ entre 50-300 mg/kg (OECD, 2001).

No estudo de *screening* hipocrático com os três compostos (2, 3 e 4), os eventos mais comumente encontrados foram a redução da atividade geral e perda da força de agarrar. Esses efeitos sugerem atividade depressora do SNC embora perda do reflexo de endireitamento não tenha sido observada. Isto indica que os compostos possuem ação depressora central ou atividade sedativa seletiva. A perda da força de agarrar pode ser considerada uma indicação para a atividade relaxante muscular esquelética, cujo local de ação

pode ser periférico (na junção neuromuscular) ou central (KANJANAPOTHI et al., 2004).

Pensando nisso, avaliou-se os efeitos motores na barra giratória quanto ao número de quedas e o tempo de permanência (**Tabela 5**). Nesse teste, foi observado que somente nos grupos do composto 2 300 mg/kg ($2,8 \pm 0,2$ quedas) e composto 4 (150 mg/kg: $2,4 \pm 0,2$; e 300 mg/kg: $2,8 \pm 0,2$ quedas) causaram aumentos no número de quedas em relação ao controle negativo ($1,0 \pm 0,4$) ($p < 0,05$). O composto 2 na dose de 300 mg/kg foi o único que causou significativa redução do tempo de permanência na barra giratória para $46,8 \pm 10,6$ s, um valor quase 4 vezes menor ($p < 0,05$) que o grupo controle negativo ($173,8 \pm 2,93$ s). É possível, portanto, que o composto 4 e, principalmente, o 2, tenham atividade miorrelaxante e causem leve retardo psicomotor (CARLINI; BURGOS, 1979; DANTAS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2017).

Tabela 5 - Efeitos dos compostos 2, 3 e 4 sobre a coordenação motora de camundongos *Swiss* após a administração única via intraperitoneal avaliados pelo teste *rota rod*.

Amostras	Doses (mg/kg)	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
Controle negativo	-	$1,0 \pm 0,4$	$173,8 \pm 2,93$
Diazepam	2	$3,0 \pm 0,5^*$	$71,0 \pm 3,5^*$
Composto 2	150	$1,8 \pm 0,4$	$160,6 \pm 8,3$
	300	$2,8 \pm 0,2^*$	$46,8 \pm 10,6^*$
Composto 3	150	$1,2 \pm 0,7$	$157,8 \pm 15,3$
	300	$1,6 \pm 0,7$	$143,8 \pm 16,4$
Composto 4	150	$2,8 \pm 0,2^*$	$144,5 \pm 17,3$
	300	$2,4 \pm 0,2^*$	$139,3 \pm 10,4$

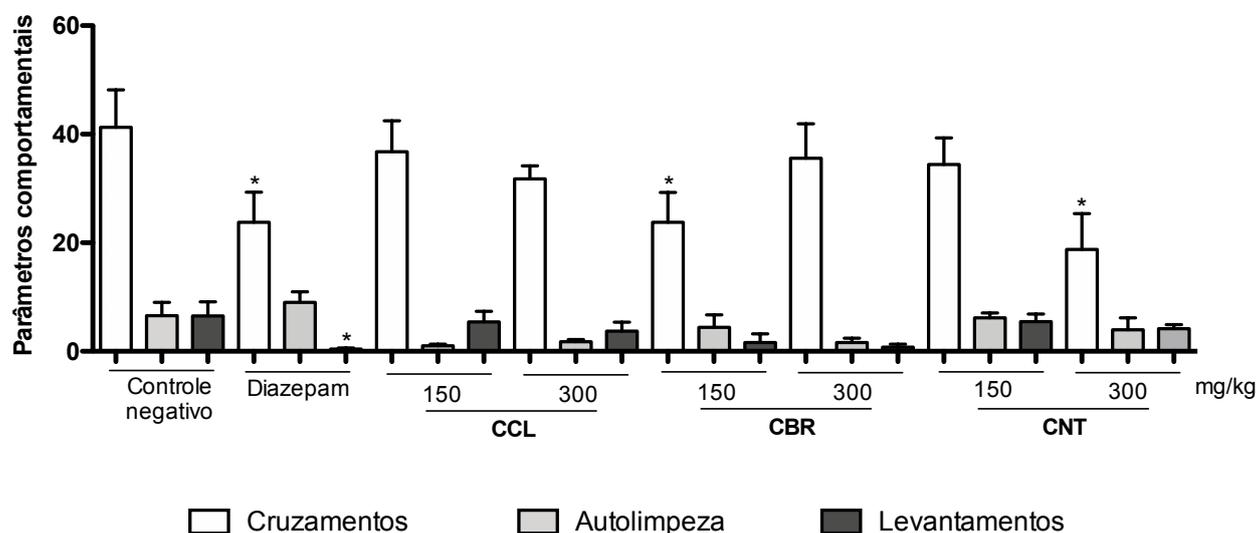
Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n= 5 animais/grupo). Diazepam (2 mg/kg) foi usado como controle positivo. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de *Newman-Keuls test*.

Para avaliar a atividade locomotora foi utilizado o teste do campo aberto. É uma técnica que permite verificar a coordenação motora nos animais em função do número de quadrantes percorridos e da quantidade de *rearings* (comportamento exploratório) e *groomings* (imobilidade ao executar autolimpeza), de forma a constatar se os compostos podem produzir

mudanças da atividade motora por meio da exploração e emocionalidade. Diazepam foi utilizado como controle positivo, um bom modelo de substância com potencial de alteração da atividade de coordenação motora (ARCHER, 1973; NEUMANN et al., 2011; NOGUEIRA-NETO et al., 2012).

A atividade locomotora espontânea dos animais, representada pelo número de cruzamentos foi reduzida nos grupos do composto 3 150 mg/kg ($23,8 \pm 5,5$) e composto 4 300 mg/kg ($22,8 \pm 6,8$) quando comparadas ao controle negativo ($41,3 \pm 6,9$) ($p < 0,05$) (**Figura 3**). Por outro lado, nenhum dos três compostos foi capaz de alterar o número de autolimpezas nem de levantamentos, sendo possível sugerir que esses compostos não interferem na atividade exploratória do animal nem afetam a coordenação motora, sendo, provavelmente, tais compostos desprovidos dos efeitos colaterais comumente observados com benzodiazepínicos (HERRERA-RUIZ et al., 2006; FIRMINO et al., 2011).

Figura 3 – Efeito dos compostos 2, 3 e 4 sobre o número de cruzamentos, autolimpeza e levantamentos após a administração única via intraperitoneal em camundongos *Swiss*.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. ($n = 5$ animais/grupo). Diazepam (2 mg/kg) foi usado como controle positivo. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman-Keuls test.

Por último, realizou-se o teste de labirinto em cruz elevado. Ele é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos tendo como premissa básica o fato que ambientes novos evocam curiosidade

e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva (MONTGOMERY, 1955; RODGERS et al., 1997). No presente estudo, apenas o composto 4 alterou o NEBA para 1.0 ± 0.3 entradas, valor menor que controle negativo (3.6 ± 0.4), e novamente, o composto 2 na dose de 300 mg/kg e composto 4 em ambas as doses (150 e 300 mg/kg) aumentaram o TPBA (179.0 ± 16.7 , 196.2 ± 15.3 e 269.0 ± 10.4 s) e reduziram o TPBF (121.0 ± 17.0 , 103.8 ± 15.3 e 38.8 ± 9.0 s), assim como o diazepam (199.6 ± 27.3 s e 125.5 ± 14.0 s), quando comparados ao controle negativo (100.2 ± 8.4 e 199.8 ± 8.4 s), respectivamente ($p < 0,05$, **Tabela 6**). O número total de entradas (número de entradas no aberto + número de entradas no braço fechado) foi reduzido nos grupos tratados com composto 3 100 mg/kg (3.2 ± 1.5) e composto 4 300 mg/kg (2.2 ± 0.5 entradas) ($p < 0,05$).

O labirinto em cruz elevado é utilizado para detectar e avaliar propriedades do tipo ansiolíticas/ansiogênicas de substâncias. A frequência e o tempo gasto nos braços abertos é o principal índice de ansiedade no modelo de labirinto em cruz elevado, uma vez que a área aberta é extremamente aversiva para roedores (ALMEIDA et al., 2014). Sabe-se que os roedores de laboratório apresentam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos e numa chance de escolha como em um labirinto em Y, eles preferem consistentemente os braços fechados. Além disso, o número de entradas pode ser considerado como índice de atividade locomotora. Logo, ansiolíticos como o fármaco diazepam aumentam a proporção de entradas nos braços abertos, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuem tais parâmetros fisiológicos (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987).

Tabela 6 - Efeitos dos compostos 2, 3 e 4 sobre o comportamento exploratório de camundongos Swiss após a administração única via intraperitoneal avaliados pelo teste labirinto em cruz elevada.

Amostras	Dose (mg/kg)	NEBA	NEBF	TPBA (s)	TPBF (s)	Número total de entradas
Controle negativo	-	3.6 ± 0.4	4.6 ± 0.4	100.2 ± 8.4	199.8 ± 8.4	8.2 ± 0.8
Diazepam	2	3.4 ± 0.9	3.2 ± 0.9	199.6 ± 27.3*	125.5 ± 14.0*	6.6 ± 1.7
Composto 2	150	2.2 ± 0.4	1.8 ± 0.4*	137.0 ± 12.4	163.0 ± 12.4	4.0 ± 0.6
	300	2.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4*	179.0 ± 16.7*	121.0 ± 17.0*	4.6 ± 0.7
Composto 3	150	2.0 ± 0.8	1.4 ± 0.7*	153.8 ± 57.8	182.8 ± 14.6	3.2 ± 1.5*
	300	2.8 ± 0.6	2.4 ± 0.7	162.2 ± 36.3	172.3 ± 14.6	5.2 ± 1.2
Composto 4	150	1.8 ± 0.4	2.6 ± 0.5	196.2 ± 15.3*	103.8 ± 15.3*	4.4 ± 0.9
	300	1.0 ± 0.3*	1.2 ± 0.2*	269.0 ± 10.4*	38.8 ± 9.0*	2.2 ± 0.5*

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n= 5 animais/grupo). Diazepam (2 mg/kg) foi usado como controle positivo. *p<0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de *Newman-Keuls test*.

NEBA: nº de entradas nos braços abertos; NEBF: nº de entrada nos braços fechados; TPBA: tempo de permanência nos braços abertos; TPBF: tempo de permanência nos braços fechados

Em uma visão geral, os sinais comportamentais agudos mais comumente associados aos animais tratados com os compostos 2, 3 e 4 foram relaxamento muscular e redução da atividade locomotora por redução do tônus/equilíbrio na barra giratória com consequente aumento no número de quedas, diminuição do número de entradas nos braços fechados, com aumento do TPBA nas maiores doses, sugerindo ações sedativas e/ou hipnóticas. Esses dados comportamentais confirmam a redução da atividade geral, da coordenação do sistema motor (força de agarrar) e da tonificação muscular na triagem hipocrática (MALONE; ROBICHAUD, 1962; NOGUEIRA-NETO et al., 2012; TRAESEL et al., 2014).

Ash (2004) demonstrou que a DL_{50} de algumas 2-cloroacetamidas em camundongos é da ordem de 100mg/kg, o que poderia justificar a presença de alguns sinais de toxicidade na dose de 150mg/kg. Em um estudo em que analisou a atividade locomotora e os efeitos ansiolíticos de herbicidas, foi observado que produziram alterações na atividade locomotora, achados sugestivos de ansiedade e alteração de memória em camundongos adultos, sugerindo que estas observações podem ser uma consequência de alterações nos sistemas de neurotransmissão que compreendem os sistemas GABAérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e/ou colinérgico (BAIER et al., 2017).

3.3 Ação antitumoral *in vivo* e parâmetros fisiológicos

Os compostos 2, 3 e 4 foram testados quanto à atividade antitumoral *in vivo* utilizando um modelo de xenoenxerto de carcinoma do cólon com a linhagem HCT-116. Após 15 dias de tratamento, apenas os compostos 2 e 3 na dose de 25 mg/kg/dia reduziram significativamente o crescimento tumoral em 21,2% ($0,57 \pm 0,02$ g) e 27,5% ($0,53 \pm 0,04$ g) quando comparados ao controle negativo ($0,73 \pm 0,04$ g, respectivamente, $p < 0,05$). Comparativamente, 5-FU, como controle positivo, também causou redução do tumor ($p < 0,05$, Tabela 7).

Mortes ou alterações no peso relativo de órgãos e em parâmetros hematológicos não foram detectados nos animais tratados com as arilacetamidas ($p > 0,05$), embora 5 dos 12]animais tratados com 5-FU tenham

morrido, e os fígados aumentaram em camundongos tratados com 5-FU ($6,18 \pm 0,39$ g, $p < 0,05$) em comparação com os animais do controle negativo ($4,95 \pm 0,14$ g) (**Tabela 7**). Semelhantemente, apenas os animais que receberam 5-FU revelaram diminuição de eritrócitos, leucócitos, teor de hemoglobina e níveis de hematócrito ($p < 0,05$, **Tabela 8**).

Tecnicamente, os xenoenxertos são facilmente implantados em camundongos atímicos, camundongos imunodeficientes gravemente comprometidos (SCID) ou outros animais imunocomprometidos. Eles têm sido amplamente utilizados como modelos ectópicos e ortotrópicos para avaliação da eficácia anticâncer, para monitorar a tumorigenicidade e acompanhar o crescimento do tumor com facilidade. Ao simular a complexidade das anormalidades genéticas e epigenéticas que existem na população de tumores humanos, os estudos xenográficos auxiliam no desenvolvimento de abordagens terapêuticas moleculares individualizadas e aumentam a probabilidade de descobrir novos compostos eficazes em testes clínicos de fase II (MORTON; HOUGHTON, 2007; JUNG et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

No presente estudo, optou-se pelo carcinoma de cólon como modelo de câncer pré-clínico devido a sua importância epidemiológica: a) a neoplasia colorretal é o terceiro câncer mais comum no mundo; b) causa cerca de 694.000 mortes por ano (10% de todas as mortes por câncer); c) apresenta ampla variação geográfica na incidência com taxas que variam dez vezes em ambos os sexos, e d) 95% deles são adenocarcinomas, especialmente encontrados (dois terços dos casos) em países caracterizados por altos ou muito altos índices de desenvolvimento e/ou renda, o que demonstra fortemente como certos fatores de estilo de vida afetam o risco de desenvolver carcinomas colorretais (FERLAY et al., 2014; MÁRMOL et al., 2017). Portanto, o desenvolvimento de novas moléculas e opções quimioterápicas contra carcinomas de cólon é uma necessidade de saúde pública.

Tabela 7 - Efeito de arilacetamidas sintéticas no peso relativo de órgãos-chave e crescimento tumoral em camundongos CB-17 portadores de carcinoma de cólon HCT-116 após 15 dias de tratamento intraperitoneal.

Grupos	Dose (mg/kg/dia)	Peso (g)	Sobrevida	Fígado	Rins	Pulmões	Coração	Tumor (g)	Inibição do tumor (%)
				g(100g)					
Controle negativo	-	20,03 ± 0,43	12/12	4,95 ± 0,14	1,46 ± 0,04	0,67 ± 0,04	0,51 ± 0,02	0,73 ± 0,04	-
5- Fluorouracil	25	18,53 ± 0,88	7/12	6,18 ± 0,39*	1,59 ± 0,10	0,82 ± 0,05	0,59 ± 0,05	0,32 ± 0,06*	56,6*
Composto 2	25	19,00 ± 0,31	12/12	4,99 ± 0,23	1,45 ± 0,06	0,72 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,57 ± 0,02*	21,2*
Composto 3	25	18,60 ± 0,44	12/12	5,08 ± 0,26	1,54 ± 0,06	0,78 ± 0,04	0,56 ± 0,02	0,53 ± 0,04*	27,5*
Composto 4	25	19,98 ± 0,70	12/12	5,02 ± 0,31	1,33 ± 0,08	0,71 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,67 ± 0,05	8,2

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n= 12 animais/grupo). O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (5% de DMSO). 5-Fluorouracil foi usado como controle positivo. * p <0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Tabela 8 - Perfil hematológico de arilacetamidas sintéticas no peso relativo de órgãos-chave e no crescimento tumoral e camundongos CB-17 portadores de carcinoma de cólon HCT-116 após 15 dias de tratamento intraperitoneal.

Grupos	Dose (mg/kg/day)	Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematocrito (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	Contagem diferencial de leucócitos (%)		
							Linfócitos	Monócitos	Granulócitos
Controle negativo	-	9,88 ± 0,32	12,59 ± 0,47	46.31 ± 1.58	633.6 ± 56.20	2.62 ± 0.41	42.17 ± 3.65	29.72 ± 3.65	28.20 ± 4.31
5-Fluorouracil	25	8,27 ± 0,20*	10,81 ± 0,41*	41.03 ± 1.81*	653.3 ± 102.5	1.53 ± 0.15*	41.08 ± 6.36	31.83 ± 3.28	27.08 ± 3.57
Composto 2	25	9,81 ± 0,34	13,19 ± 0,29	50.14 ± 1.10	549.6 ± 51.20	3.23 ± 0.11	27.16 ± 1.66	40.72 ± 1.01	31.04 ± 1.97
Composto 3	25	9,77 ± 0,20	12,77 ± 0,09	48.46 ± 0.61	453.6 ± 71.46	3.33 ± 0.61	37.90 ± 4.61	36.70 ± 2.96	25.34 ± 3.56
Composto 4	25	8,98 ± 0,07	12,26 ± 0,23	46.40 ± 1.11	473.3 ± 56.21	1.86 ± 0.23	40.30 ± 4.42	31.72 ± 3.14	27.96 ± 2.16

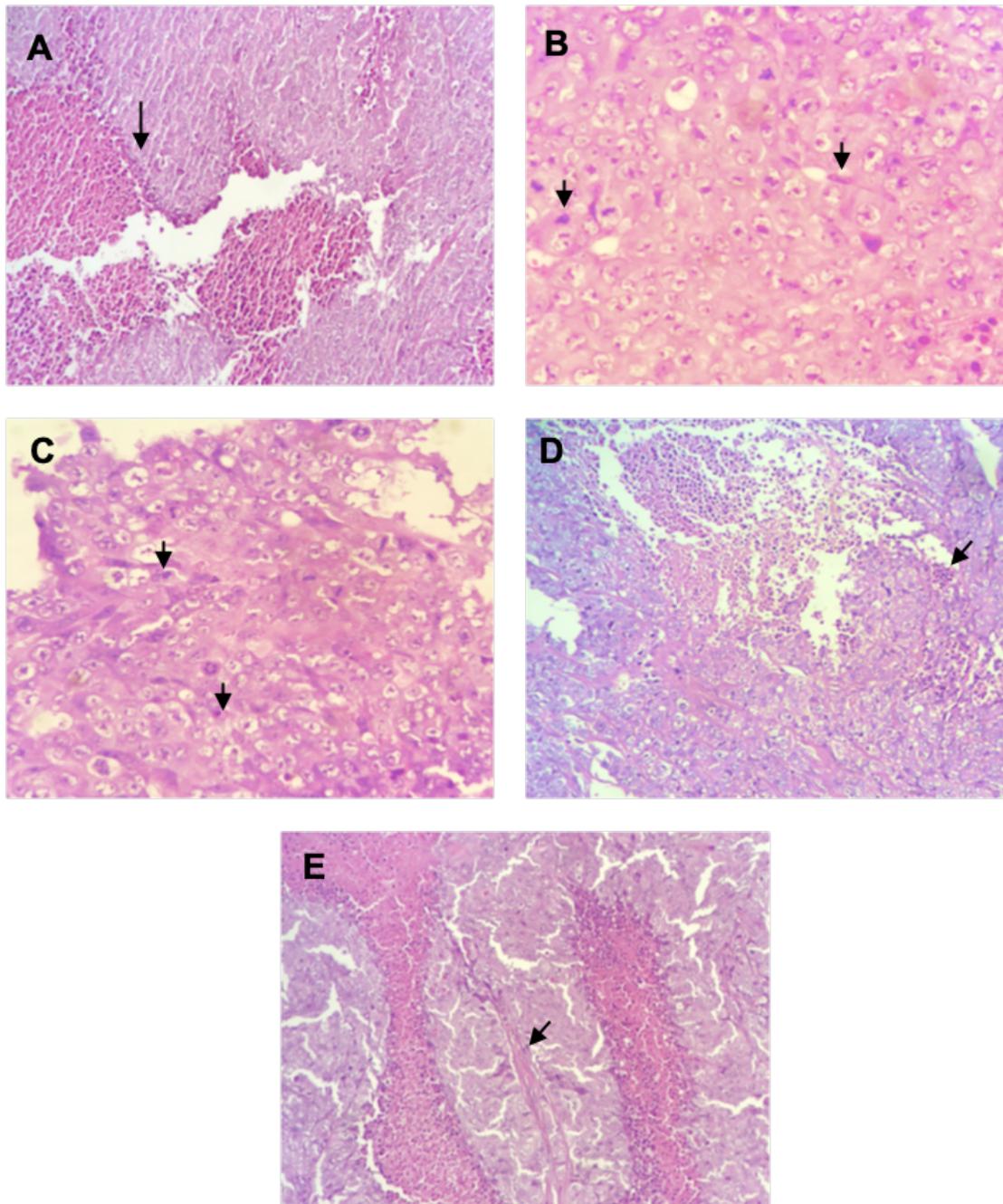
Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n= 12 animais/grupo). O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (5% de DMSO). 5-Fluorouracil foi usado como controle positivo. * p <0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Percebeu-se que os compostos 2 e 3 reduziram significativamente o crescimento do tumor carcinoma do cólon. Eles são mais lipofílicos, informação essa confirmada por altos valores de ClogP, o que certamente teve papel positivo em sua atividade antitumoral. A propósito, a constante eletrônica do substituinte do anel (σ) também parece afetar a atividade antiproliferativa da série contra células HCT-116 *in vitro*, sendo observada uma tendência ao aumento da bioatividade à medida que σ aumenta, ou seja, com o anel a densidade eletrônica diminui. No entanto, os compostos 2 (R = Cl) e 3 (R = Br) não seguem esta tendência e as taxas de inibição do tumor *in vivo* foram comparáveis ($p > 0,05$). Os compostos 2 e 3 tem estrutura química simples e são facilmente sintetizadas e manipuladas, o que justificaria esforços para aumentar a atividade antitumoral e a seletividade das mesmas.

Investigações anteriores demonstraram que as 2-cloro-N-arilacetamidas se comportam como agentes alquilantes, especialmente de peptídeos e proteínas contendo grupos sulfidríla (JABLONKAI, HATZIOS, 1991; JABLONKAI, 2003). Também vale a pena notar que classes clássicas de moléculas antitumorais, como mostardas de nitrogênio, nitrosoureas e quinonas têm sua atividade relacionada às propriedades eletrônicas e lipofílicas (HANSCH et al., 1972; DENNY; WILSON, 1986; GOURDIE et al., 1990; DRIEBERGEN et al., 1993).

As amostras teciduais de tumores nos animais pertencentes ao grupo controle negativo (DMSO 5%) apresentaram focos de necrose e hemorragia, com células neoplásicas com característica morfológica anaplásica e com mitoses atípicas e explosivas. Nos grupos tratados com 5-FU, compostos 2, 3 e 4, as amostras de tecido neoplásico evidenciavam áreas centrais de necrose, com presença de várias figuras de mitose atípicas, deposição colagênica difusa, além infiltração adiposa em áreas periféricas do tecido e infiltrado inflamatório mononuclear (**Figura 4**).

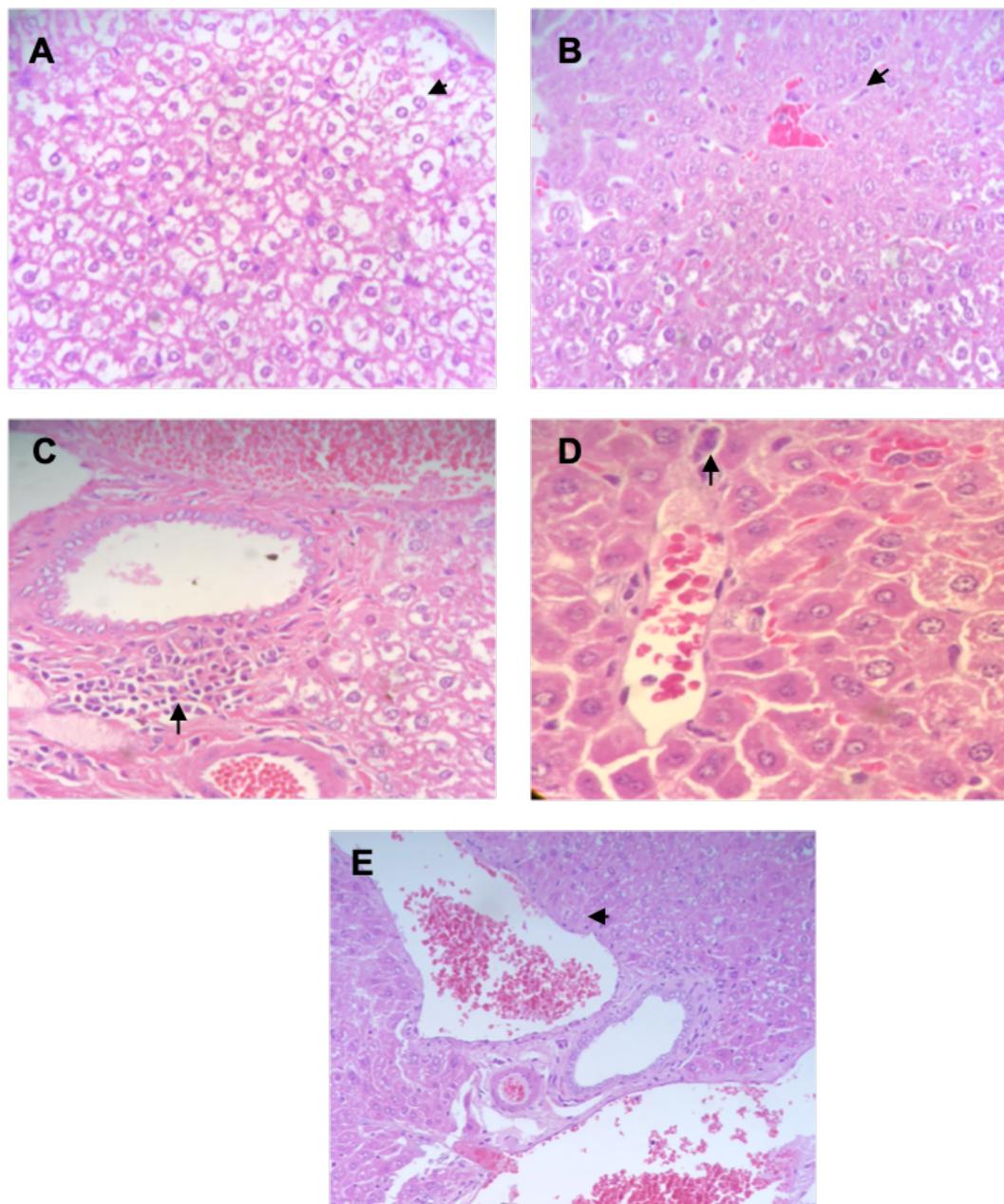
Figura 4 - Fotomicrografias do tumor HCT-116 inoculado em camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 2, 3 e 4, durante quinze dias consecutivos.



O controle negativo (A), apresentou extensa área necrótica (seta). Observam-se inúmeras figuras de mitose atípicas, células pleomórficas e com núcleo hiper cromático nas amostras tumorais do grupo 5-FU e composto 4 (B e C) (setas). O composto 2 (D) apresentou áreas multifocais de necrose e agregados de células inflamatórias mononucleares na adjacência, além de evidente desmoplasia (seta). No composto 3 (E) foram observadas áreas de necrose invadidas por infiltrado inflamatório mononuclear e deposição colagênica (seta). Coloração pela H.E. Aumento de 40x e 100x.

No grupo tratado com DMSO (grupo controle negativo), o fígado apresentou degeneração vacuolar difusa, com alguns hepatócitos com morfologia sugestiva de esteatose, com aumento de volume celular e alguns núcleos deslocados para a periferia da célula, intercalados com células necróticas individuais, além da presença de congestão passiva periportal leve. O grupo 5-FU apresentou hiperplasia de células de kupffer, degeneração vacuolar difusa e congestão passiva branda. Os grupos tratados com o composto 2 e 3 apresentaram hiperplasia das células de Kupffer de padrão moderado, degeneração vacuolar, e presença de infiltrado inflamatório mononuclear. No grupo do composto 2 foi observada pequenas áreas multifocais de hepatonecrose, sugestivo de hepatite medicamentosa idiossincrática. No grupo do composto 4 foi observado foco inflamatório periductal, aglomerado de células inflamatórias mononucleares adjacente à área de hepatonecrose, e congestão passiva moderada (**Figura 5**).

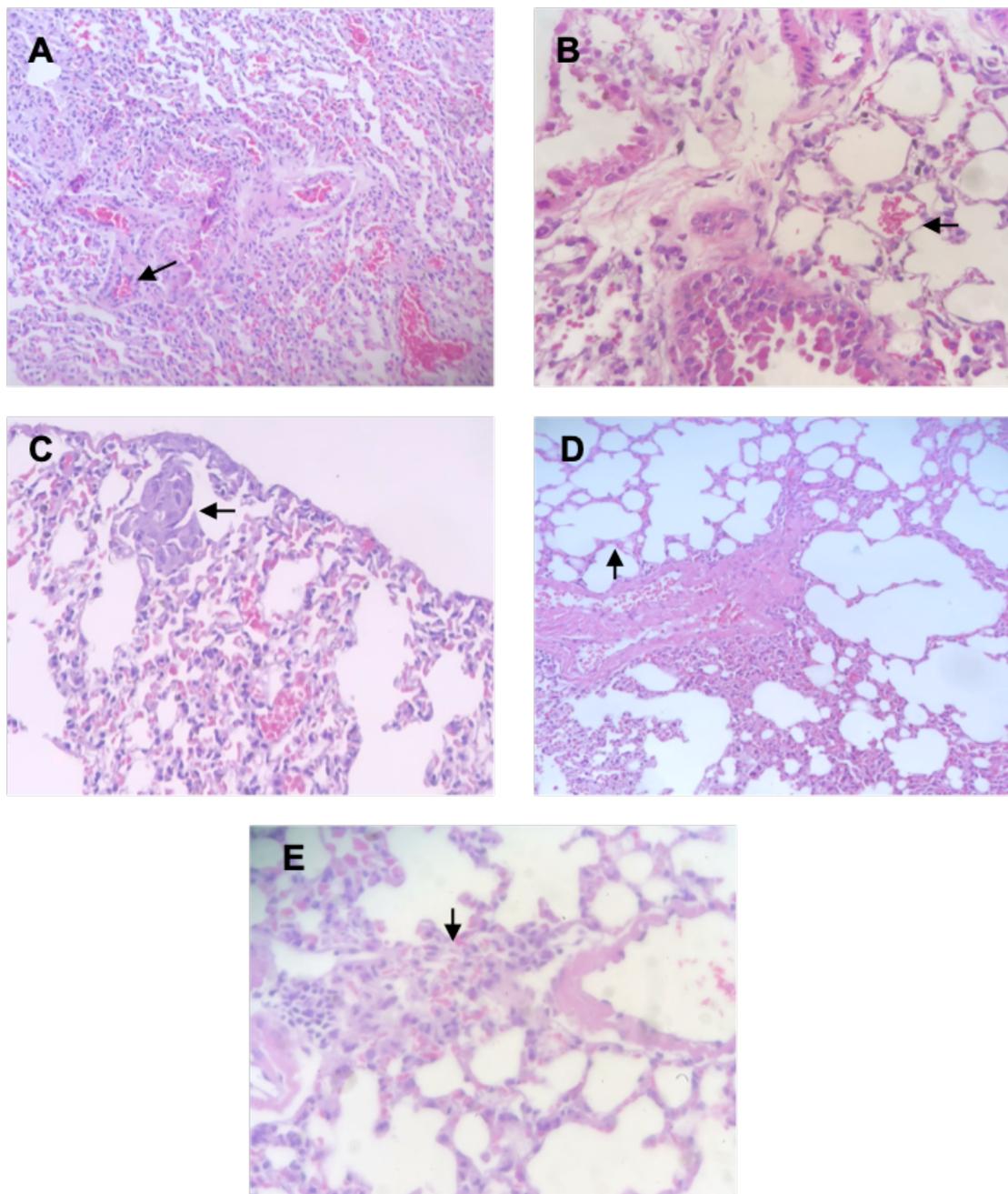
Figura 5 - Fotomicrografias de tecido hepático de camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 5-FU, 2, 3 e 4, durante quinze dias consecutivos.



O controle negativo (A), apresenta hepatócitos com degeneração vacuolar difusa e células necróticas individuais (seta). O grupo controle positivo 5-FU (B) mostra células de kupffer (seta) hiperplasiadas próximas a hepatócitos com degeneração vacuolar e necróticos (núcleo em cariorrexis). O composto 4 (C) apresenta foco inflamatório mononuclear periductal (seta), e algumas células com hepatonecrose. No composto 2 (D) evidencia-se algumas células de kupffer hipertrofiadas (seta), e no composto 3 (E) observa-se moderada degeneração vacuolar peri-portal (seta). Coloração pela H.E. Aumento de 40x e 100x.

Os pulmões dos camundongos tratados com DMSO (grupo controle negativo) apresentavam áreas focais de espessamento de septo alveolar com diminuição da luz alveolar, alternados com alvéolos com atelectasia, congestão passiva moderada de capilares alveolares, hemorragia alveolar focal, infiltrado inflamatório misto. O grupo 5-FU, composto 2 e 4 apresentaram espessamento de septo alveolar, congestão passiva moderada, áreas de hemorragia alveolar, êmbolo de células tumorais e fibrose. O grupo do composto 3 apresentou pneumonia intersticial crônica, êmbolo de células tumorais, áreas focais de edema alveolar, descamação do epitélio peribronquiolar e áreas de fibrose (**Figura 6**).

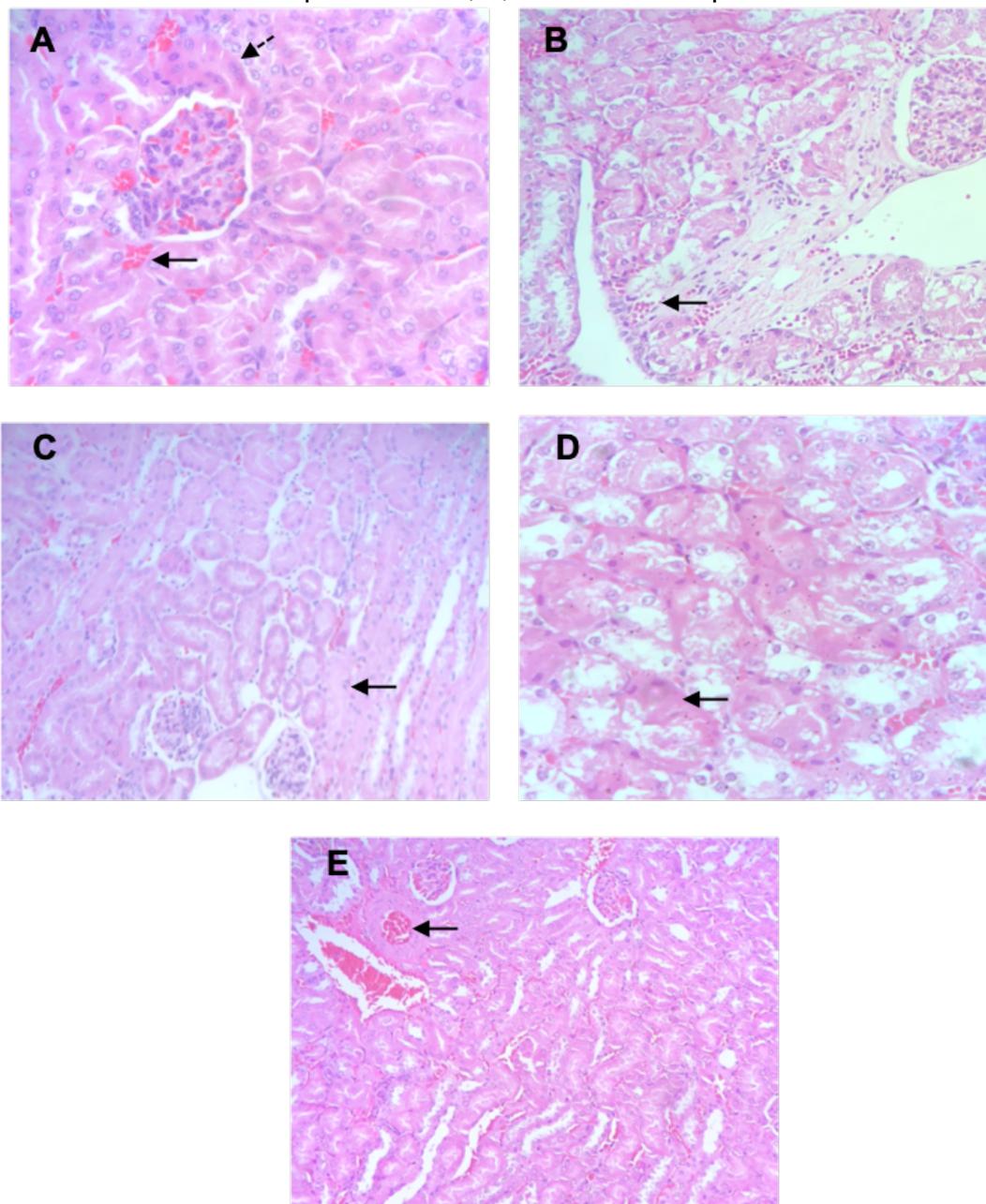
Figura 6 - Fotomicrografias de tecido pulmonar de camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 5-FU, 2, 3 e 4, durante quinze dias consecutivos.



O controle negativo (A) apresenta-se com espessamento de septo e diminuição da luz alveolar (seta), alternados com alvéolos com atelectasia. O grupo controle positivo 5-FU (B) mostra hemorragia alveolar (seta) e morte de células do epitélio cúbico bronquiolar. O composto 4 (C) apresentando êmbolo de células tumorais (seta). O composto 2 (D) apresenta espessamento de septo alveolar (seta) próximo a áreas de ruptura septal. No composto 3 (E) com infiltrado inflamatório mononuclear circundando células pleomórficas (seta), além de congestão passiva capilar. Coloração pela H.E. Aumento de 40x e 100x.

Os rins de camundongos do grupo controle negativo (DMSO) apresentaram focos de necrose tubular aguda, congestão passiva moderada em capilares glomerulares, hiper celularidade glomerular e diminuição do espaço urinário, túbulos contornados atrofiados e presença de cilindros hialinos, nefrose tubular subcapsular, além de infiltrado inflamatório mononuclear brando focal. Nos grupos 5-FU, composto 2 e 3 os rins apresentaram hemorragia difusa, infiltrado inflamatório mononuclear, necrose tubular difusa, congestão passiva moderada e nefrose difusa. No grupo do composto 3 apresentou hipertrofia de tufo glomerular (glomerulonefrite proliferativa). O composto 4 apresentou necrose tubular cortical, congestão passiva túbulo-intersticial, nefrose e cilindros hialinos (**Figura 7**).

Figura 7 - Fotomicrografias de tecido renal de camundongos imunodeficientes e tratados com os compostos 5-FU, 2, 3 e 4 durante quinze dias consecutivos.



O controle negativo (A) mostra descamação epitelial e alguns túbulos com necrose tubular (seta tracejada), além de congestão passiva túbulo-intersticial (seta preta). O grupo controle positivo 5-FU (B) mostra túbulos com nefrose e congestão passiva túbulo-intersticial. O composto 4 (C) apresenta moldes hialinos em luz tubular e túbulo com necrose (seta). O composto 2 (D) evidencia vários túbulos com necrose e nefrose (seta), e no composto 3 (E) observa vários túbulos com necrose e congestão passiva túbulo-intersticial (seta). Coloração pela H.E. Aumento de 40x e 100x.

De maneira geral, o tecido muscular cardíaco não apresentou alterações morfológicas significativas em nenhum grupo estudado.

Por meio das análises histológicas dos tumores de HCT-116, todos os grupos apresentaram regiões com necrose, A necrose pós-tratamento é um preditor confiável de desfechos em tumores malignos, sendo caracterizada morfológicamente pela vacuolização do citoplasma, quebra da membrana plasmática e uma indução de inflamação ao redor da célula que está morrendo, atribuível à liberação de conteúdos celulares e moléculas pró-inflamatórias. As células que morrem por necrose freqüentemente exibem mudanças na morfologia nuclear (EDINGER; THOMPSON, 2004; SALAH et al., 2018).

Uma vez que o fígado é responsável pelo metabolismo e eliminação de muitos agentes anticancerígenos, a hepatotoxicidade pode resultar em depuração hepática alterada e aumento da toxicidade não hepática (VINCENZI et al., 2018). Os eventos adversos na função hepática induzidos pela quimioterapia também são modificados por doença hepática preexistente, sensibilidade genética à quimioterapia e à própria localização hepática do tumor. Além disso, o aumento da idade, sexo feminino e hábitos sociais específicos, como o tabaco ou a ingestão de álcool, podem aumentar o risco de toxicidade hepática (KING; PERRY, 2001).

No grupos tratados com 5-FU e com os compostos 2 e 3 foram observados hiperplasia de células de Kupffer, estas são as representantes, no fígado, do chamado Sistema Fagocitário Mononuclear e proliferam em diversas situações inespecíficas, quando há agressão hepática ou sistêmica. (ENGELMAN et al., 2001). Segundo Shulman e colaboradores (1980) algumas lesões no fígado são consideradas alterações não específicas que podem ocorrer dentre vários motivos devido os efeitos de quimiorradioterapia.

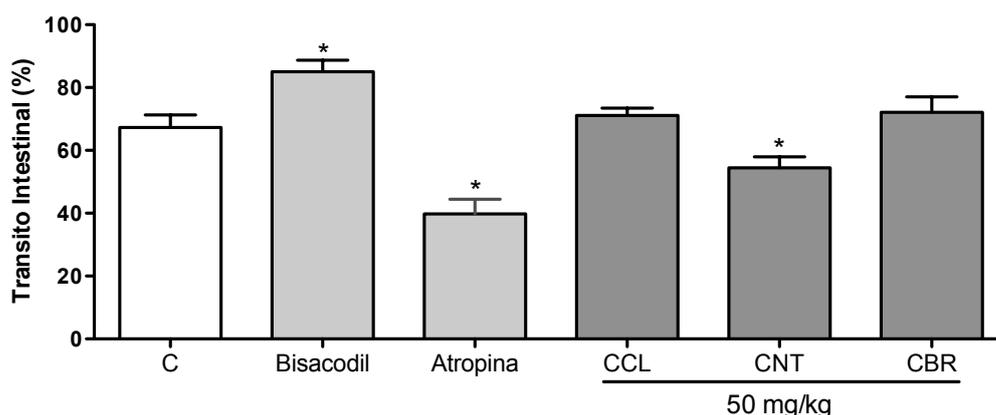
Nas análises histológicas dos pulmões dos camundongos o aspecto mais freqüentemente observado é o espessamento dos septos alveolares, o que pode ser devido ao processo inflamatório e congestão passiva. Deve-se considerar, contudo, que espessamento intersticial pode também ocorrer por fibrose, por edema causado pela obstrução linfática ou congestão, ou ainda por uma combinação de todos estes fatores (MARCHIORI; IRION; SOUZA-JUNIOR, 2002).

Os grupos tratados com 5-FU e com os três compostos (2, 3 e 4) apresentaram êmbolo de células tumorais, o que pode indicar um início de metástase. Metástases de câncer colorretal para o pulmão é o segundo tipo

mais comum relacionado à esse tumor. A metástase pulmonar secundária é um problema significativo no campo do câncer, pois é a característica mais fatal do tumor maligno, responsável por mais de 90% da mortalidade relacionada ao tumor (VILLENEUVE; SUNDARESAN, 2009; SCHROEDER et al., 2012).

Muitos fármacos com propriedades antineoplásicas atualmente em uso na clínica também alteram a fisiologia do trato gastrointestinal, seja por ação antiproliferativa inespecífica sobre os enterócitos do intestino delgado em constante renovação ou por ação irritativa da mucosa, o que leva à perda de peso, de nutrientes, vômitos, constipação e/ou diarreia (STEIN et al., 2010; FUJITA et al., 2018). Logo, decidiu-se avaliar se os compostos 2, 3 e 4 alteram o trânsito intestinal e, assim, interferem na absorção de nutrientes. Confirmando a ausência de indução de diarreia, os compostos 2 e 3 (50 mg/kg i.p.) não alteraram a distância percorrida pelo carvão ativado ($71,1 \pm 2,3$, $54,45 \pm 3,5$ e $72,2 \pm 4,9$ %) quando comparados ao controle negativo ($67,3 \pm 4,0$ %). Por outro lado, bisacodil 5 mg/kg aumentou a distância percorrida para $85,1 \pm 3,7$ %, enquanto a atropina 3 mg/kg a diminuiu para $39,8 \pm 7,7$ % ($p < 0,05$, **Figura 8**).

Figura 8 – Avaliação do trânsito intestinal de camundongos adultos *Swiss* tratados com arilacetamidas sintéticas via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg.



O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). Como controles positivos foram usados Bisacodil 5 mg/kg oral e Atropina 3 mg/kg i.p. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. ($n = 7$ /grupo). * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls.

4 CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho com foco nas propriedades antiproliferativas *in vitro* e *in vivo* de compostos derivados de 2-cloro-N-arylacetamidas. A maioria dos derivados apresentou ação antiproliferativa contra as linhagens tumorais. Os compostos 2 e 3 reduziram o crescimento tumoral em camundongos portadores de carcinomas de xenoenxerto de cólon causando sinais aparentes de toxicidade sistêmica e alterações histológicas significativas, embora relaxamento muscular, redução da atividade locomotora e diminuição número de entradas nos braços fechados indiquem uma possível ação sedativa e/ou tóxica, principalmente do composto 2.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2ª versão. Brasília: ANVISA, 2013. 48p.

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; SILVA, O.A.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 118, p. 69-78, 2014.

ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.

ALMEIDA, A.A.C.; SILVA, R.O.; NICOLAU, L.A.D.; BRITO, T.V.; SOUSA, D.P.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; LOPES, L.S.; MEDEIROS, J.R.; FERREIRA, P.M.P. Physio-pharmacological investigations about the anti-inflammatory and antinociceptive efficacy of (+)-Limonene epoxide. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 511-522, 2017.

ARAÚJO, E.J.F.; LIMA, L.K.F.; SILVA, O.A.; REZENDE JUNIOR, L.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; CARVALHO, F.A.A.; LIMA, F.C.A.; PESSOA, C.; FREITAS, R.M.; FERREIRA, P.M.P. *In vitro* antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkaloids from *Aniba riparia* (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 309-314, 2016.

ARAÚJO, E.J.F.; SILVA, O.A.; REZENDE JUNIOR, L.M.; SOUSA, I.J.O.; ARAUJO, D.Y.M.L.; CARVALHO, R.B.F.; PEREIRA, S.T.; GUTIERREZ, S.J.C.; FERREIRA, P.M.P.; LIMA, F.C.A. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1142, n. 1, p. 84-91, 2017.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ASCHALE, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, n. 4, p.1437-1441, 2012.

ASH, M. 2004. Handbook of Preservatives. Synapse Information Resources Inc, EUA.

BAIER, C.J.; GALLEGOS, C.E.; VOZARI, R.R.; MINETTI, A. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 64, p. 63-72, 2017.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemistry**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BIERMANN, H.; PIETZ, B.; DREIER, R.; SCHMID, K.W.; SORG, C.; SUNDERKOTTER, C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 2, 217-231, 1999.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33 n. 1, p. 229-239, 2010.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Revista de Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, n. 1, p. 25-31, 1979.

COOK, N.; JODRELL, D. I.; TUVESON, D. A. Predictive *in vivo* animal models and translation to clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 253-260, 2012.

COSTA, P. M. ; COSTA, M. P. ; CARVALHO, A. A. ; CAVALCANTI, S. M. T. ; CARDOSO, M. V. O. ; BEZERRA FILHO, G. O. ; VIANA, D. A. ; FECHINE-JAMACARU, F. V. ; LEITE, A. C. L. ; MORAES, M. O. ; PESSOA, C. ; FERREIRA, P. M. P. Improvement of *in vivo* anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 239, p. 174-183, 2015.

DANTAS, M.C.; DE OLIVEIRA, F.S.; BANDEIRA, S.M.; BATISTA, J.S.; SILVA JR, C.D.; ALVES, P.B.; ANTONIOLLI, A.R.; MARCHIORO, M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 129-133, 2004.

DENNY, K.H.; STEWART, C. W. Acute, Sub-acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. In Faqi, A, S. A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development. 1ª Edição. Amesterdão. Editora Elsevier. pp. 87-104, 2013.

DENNY, W.A.; WILSON, W.R. Consideration for the design of nitrophenyl mustards as drugs selectively toxic for hypoxic mammalian cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 879-887, 1986.

DRIEBERGEN, R.J.; HOLTHUIS, J.J.; HULSHOFF, A.; POSTMA-KELDER, S.J.; VERBOOM, W.; REINHOUDT, D.N.; LELIEVELD, P. Electrochemistry of potential bioreductive alkylating quinones: its use in the development of new aziridinyquinones. **Anticancer Research**, v. 6, n. 1, p. 605-619, 1986.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n.6, p. 663-669, 2004.

ENGELMAN, M.F.B.; GUIDUGLI-NETO, J.; ANDRADE, C.H.V.; HERNANDEZ, R.; GOULART, L.B.N.T. Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 2, p. 173-179, 2001.

ERTAN, T.; YILDIZI, I.; OZKAN, S.; TEMIZ-ARPACI, O.; KAYNAK, F.; YALCIN, I.; AKI-SENER, E.; ABBASOGLU, U. Synthesis and biological evaluation of new N-(2-hydroxy-4(or 5) nitro/aminophenyl) benzamides and phenylacetamides as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 2032-2044, 2007.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; DA COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R.; ALENCAR, N. M.; FIGUEIREDO, I. S.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X : *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270–279, 2016.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA, P. M. ; COSTA, A. M. ; LIMA, D. J. B. ; DRUMOND, R. R. ; MOREIRA, D. R. M. ; BEZERRA FILHO, G. O. ; MAGALHÃES, J. F. ; QUEIROZ, M. G. R. ; LEITE, A. C. L. ; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 313-330, 2015.

FIRMINO, K.F.; ABREU, M.H.N.G.; PERINI, E.; MAGALHÃES, S.M.S. Fatores associados ao uso de benzodiazepínicos no serviço municipal de saúde da cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 27, n. 6, p. 1223-1232, 2012.

FUJITA, Y.; HINO, S.; SAWAKI, K.; NAKANO, M.; KANEKO, T.; HORIE, N.; IIDA, S. Peripheral neuropathy arose in the trigeminal nerve during chemotherapy with docetaxel: A report of two cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, In Press, Corrected Proof, 2018.

GOURDIE, T.A.; VALU, K.K.; GRAVATT, G.L.; BORITZKI, T.J.; BAGULEY, B.C.; WAKELIN, L.P.; WILSON, W.R.; WOODGATE, P.D.; DENNY, W.A. DNA-directed alkylating agents. 1. Structure-activity relationships for acridine-linked aniline mustards: consequences of varying the reactivity of the mustard. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 1177-1186, 1990.

- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p.1-5, 1984.
- HANSCH, C.; SMITH, N.; ENGLE, R.; WOOD, H. Quantitative structure-activity relationships of antineoplastic drugs: nitrosoureas and triazenoimidazoles. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 56, n. 4, p. 443-456, 1972.
- HARRISON, A. P.; ERLWANGER, K. H.; ELBRØND, V. S.; ANDERSEN, N. K.; UNMACK, M. A. Gastrointestinal-tract models and techniques for use in safety pharmacology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, n. 3, p. 187-199, 2004.
- HERRERA-RUIZ, M.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; JIMÉNEZ-FERRER, E.; ZAMILPA, A.; ALVAREZ, L.; RAMÍREZ, G.; TORTORIELLO, J. Anxiolytic effect of natural galphimines from *Galphimia glauca* and their chemical derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 59-61, 2006.
- HLADIK, M.L.; LYNN ROBERTS, A.; BOUWER, E.J. **Chloroacetamide herbicides and their transformation products in drinking water**. Awwa Research Foundation and U.S. Washington: Environmental Protection Agency, 2006.
- JABLONKAI, I. Alkylating reactivity and herbicidal activity of chloroacetamides. **Pest Management Science**, v. 59, n. 4, p. 443-450, 2003.
- JABLONKAI, I.; HATZIOS, K.K. Role of Glutathione and Glutathione S-Transferase in the Selectivity of Acetochlor in Maize and Wheat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 41, n. 3, p. 221-231, 1991.
- JUNG, J. Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. **Toxicological Research**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2014.
- KALDRIKYAN, M.A.; GRIGORYAN, L.A.; MELIK-OGANDZHANYAN, R.G.; ARSENYAN, F.G. Synthesis and antitumor activity of some benzofuryl-substituted 1,2,4-triazoles. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 5, p. 11-13, 2009.
- KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; LERTPRASERTSUKE, N.; TAESOTIKUL, T.; RUJJANAWATE, C.; KAEWPINIT, D.; SUDTHAYAKORN, R.; CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; JITPAKDI, A.; PITASAWAT, B. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2–3, p. 359-365, 2004.
- KATKE, S.A.; AMRUTKAR, S.V.; BHOR, R.J.; KHAIRNAR, M.V. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/arylamide derivatives. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 148-156, 2011.

KING P.D.; PERRY, M.C. Hepatotoxicity of chemotherapy. **Oncologist**, v. 6, n. 2, p. 162-176, 2001.

LAVORATO, S. N.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H. R.; COELHO, E. A. F.; ALVES, R. J. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-N-arylacetamides. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 1-7, 2017.

LIMA, L.M. Modern Medicinal Chemistry: challenges and Brazilian contribution. **Química Nova**, v.30, n.6, p.1456-1468, 2007.

LISTER, R. G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOPES, M.S.; DE ANDRADE SENA, C.F.; SILVA, B.L.; DE SOUZA, C.M.; RAMOS, J.P.; CASSALI, G.D.; DE SOUZA-FAGUNDES, E.M.; ALVES, R.J.; DE OLIVEIRA, M.C.; DE OLIVEIRA, R.B. Synthesis of nitroaromatic compounds as potential anticancer agents. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, 206-216, 2015.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A. Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Llordya**, v. 25, n. 4, p. 320-331, 1962.

MARCO-CONTELLERES, J.; GOMEZ-SANCHEZ, E. New agents with antimycobacterial activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 338, n. 11, p. 562-563, 2005.

MARCHIORI, E.; IRION, K.L.; SOUZA JUNIOR., A.S. Neoplasias pulmonares difusas - correlação da tomografia computadorizada de alta resolução com a anatomopatologia. **Radiologia Brasileira**, v. 35, n.4, p.225-233, 2002.

MÁRMOL, I.; SÁNCHEZ-DE-DIEGO, C.; PRADILLA DIESTE, A.; CERRADA, E.; RODRIGUEZ YOLDI, M.J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1-39, 2017.

MENON, R.; NAIR, C.G.; BABU, M.; JACOB, P.; KRISHNA, G.P. The Outcome of Papillary Thyroid Cancer Associated with Graves' Disease: A Case Control Study. **Journal of Thyroid Research**, v. 2018, p. 1-5, 2018.

MILLER, M. S.; GALLIGAN, J. J.; BURKS, T. F. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 6, n. 3, p. 211-217, 1981.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative And Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.

MORTON, C.L.; HOUGHTON, P.J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 247-250, 2007.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55–63, 1983.
- MOTOORI, M.; YANO, M.; MIYATA, H.; SUGIMURA, K.; SAITO, T.; OMORI, T.; FUJIWARA, Y.; MIYOSHI, N.; AKITA, H.; GOTOH, K.; TAKAHASHI, H.; KOBAYASHI, S.; NOURA, S.; OHUE, M.; ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; ISHIKAWA, O.; SAKON, M. Randomized study of the effect of synbiotics during neoadjuvant chemotherapy on adverse events in esophageal cancer patients. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 93-99, 2017.
- NEUMANN, I. D.; WEGENER, G.; HOMBERG, J. R.; COHEN, H.; SLATTERY, D. A.; ZOHAR, J.; OLIVIER, J. D. A.; MATHÉ, A. A. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1357-1375, 2011.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NOGUEIRA-NETO, J. D.; ALMEIDA, A. A. C.; SILVA, O. A.; CARVALHO, R. B. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do nerolidol em camundongos. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**, v. 08, p. 42-56, 2012.
- OLIVEIRA, M. V. A.; ALVES, D. D. L.; LIMA, L. H. G. M.; CASTRO, J. M.; PERON, A. P. Citotoxicidade dos corantes alimentares erythrosine (E 127), azul brilhante (E-133) e red 40(E-129) em sistema-teste vegetal. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 35, n. 4, p. 557-562, 2013.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test No. 423**: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Paris: OECD, 2001.
- PACHECO, D.J.; TRILLERAS, J.; QUIROGA, J.; GUTIÉRREZ, J.; PRENT, L.; COAVAS, T.; MARÍN, J.C.; DELGADO, G. N-(4-((E)-3-arylacryloyl)phenyl)acetamide derivatives and their antileishmanial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1685-1690, 2013.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 3, p. 289-304, 1997.
- RUTKOWSKA, E.; PAJAK, K.; JÓŹWIAK, K. Lipophilicity - methods of determination and its role in medicinal chemistry. **Acta Polonae Pharmaceutica**, v. 70, n. 1, p. 3-18, 2013.

SALAH, S.; LEWIN, J.; AMIR, E.; ABDUL RAZAK, A. Tumor necrosis and clinical outcomes following neoadjuvant therapy in soft tissue sarcoma: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 69, p. 1–10, 2018.

SCHROEDER, A.; HELLER, D.A.; WINSLOW, M.M.; DAHLMAN, J.E.; PRATT, G.W.; LANGER, R.; JACKS, T.; ANDERSON, D.G. Treating metastatic cancer with nanotechnology. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 39–50, 2012.

SJOQUIST, K.M.; BURMEISTER, B.H.; SMITHERS, B.M.; ZALCBERG, J.R.; SIMES, R.J.; BARBOUR, A.; GEBSKI, V. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. **The Lancet. Oncology**, v. 12, n. 7, p. 681-692, 2011.

SHULMAN, H.M.; MCDONALD, G.B.; MATTHEWS, D.; DONEY, K.C.; KOPECKY, K.J.; GAUVREAU, J.M.; THOMAS, E.D. An analysis of hepatic venoocclusive disease and centrilobular hepatic degeneration following bone marrow transplantation. **Gastroenterology**, v. 79, n. 6, p. 1178-1191, 1980.

SOARES, G.A.; OLIVEIRA, R.B.; ANDRADE, S.F.; ALVES, R.J.; ZANI, C.L.; DE SOUZA-FAGUNDES, E.M. Synthesis and in vitro cytotoxic activity of compounds with pro-apoptotic potential. **Molecules**, v. 15, n. 1, p. 12-26, 2009.

STEIN, A.; VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 2, n. 1, p. 51-63, 2010.

STEWART, B.W.; WILD, C.P. World Cancer Reports 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014.

TAVARES, L.C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TRAESEL, G. K.; SOUZA, J. C.; BARROS, A. L.; SOUZA, M. A.; SCHMITZ, W. O.; MUZZI, R. M.; OESTERREICH, S. A.; ARENA, A. C. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 320-325, 2014.

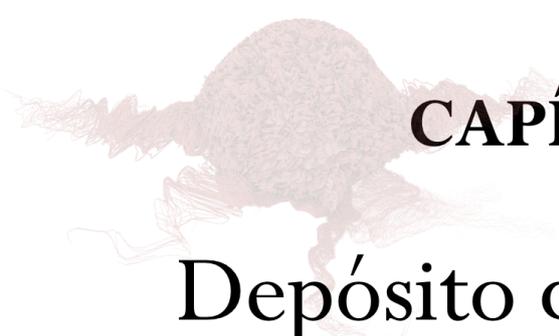
WAN, R.; XIA, X.; WANG, P.; HUO, W.; DONG, H.; CHANG, Z. Toxicity of imidazoles ionic liquid [C16mim]Cl to HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 1-7, 2018.

WAYNFORTH, B.H., 1980. Injection techniques: experimental and surgical techniques in the rat. London: Academic Press.

VILLENEUVE, P.; SUNDARESAN, R. Surgical Management of Colorectal Lung Metastasis. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 22, n. 04, 233–241, 2009.

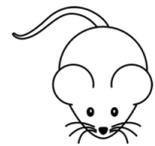
VINCENZI, B.; RUSSO, A.; TERENCEIO, A.; GALVANO, A.; SANTINI, D.; VORINI, F.; ANTONELLI-INCALZI, R.; VESPASIANI-GENTILUCCI, U.; TONINI, G. The use of same in chemotherapy-induced liver injury. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 130, p. 70–77, 2018.

ZHANG, F.; XU, C. L.; LIU, C. M. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. **Journal of Drug Design Development and Therapy**, v. 9, p. 2089-2100, 2015.



CAPÍTULO 3

Depósito de pedido de patente



RESUMO

“COMPOSTOS FARMACÊUTICOS DERIVADOS DE ARILACETAMIDAS SINTÉTICAS COM ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CONTRA NEOPLASIAS”

A presente invenção trata de compostos farmacêuticos da classe das arilacetamidas, em particular, [2-cloro-N-(4-clorofenil) acetamida (CCL), 2-cloro-N-(4-bromofenil) acetamida (CBR), e 2-cloro-N-(4-nitrofenil) acetamida (CNT)] com aplicação na área de prevenção e/ou tratamento de qualquer tipo de lesão relacionada às desordens proliferativas celulares visando utilizar os compostos como princípio ativo em formulações farmacêuticas para o tratamento de neoplasias.

REINVINDICAÇÕES

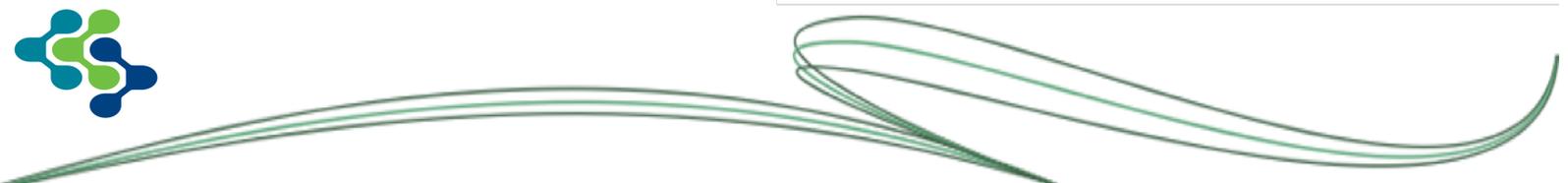
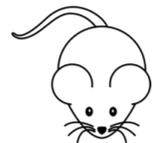
1. **“COMPOSTOS FARMACÊUTICOS DERIVADOS DE ARILACETAMIDAS SINTÉTICAS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL”** é caracterizado por apresentar compostos de fórmula estrutural da classe 2-Cloro-N-Arilacetamida, obtidos por síntese química pela reação da anilina p-substituída com anidrido cloroacético.

2. **“COMPOSTOS FARMACÊUTICOS DERIVADOS DE ARILACETAMIDAS SINTÉTICAS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL”** de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por compostos objetos da presente invenção apresentarem elevada atividade antitumoral contra linhagens de células tumorais humanas: HL 60 (células de leucemia promielocítica humana), SF295 (linhagem celular de glioblastoma) e HCT116 (linhagens de câncer colorretal).

3. **“COMPOSTOS FARMACÊUTICOS DERIVADOS DE ARILACETAMIDAS SINTÉTICAS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL”** é caracterizado por compostos mencionados nas reivindicações 1 e 2, apresentarem toxidez seletiva, ou seja, são mais tóxicos para as células cancerosas do que para células saudáveis.

4. **“COMPOSTOS FARMACÊUTICOS DERIVADOS DE ARILACETAMIDAS SINTÉTICAS COM ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CONTRA NEOPLASIAS”** de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por poder ser utilizado como princípio ativo em formulações na forma líquida, semissólida e/ou seca, estéreis e em formas de liberação imediata e/ou controlada, para uso em humano, destinado a administração pediátrica, adulta e/ou geriátrica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

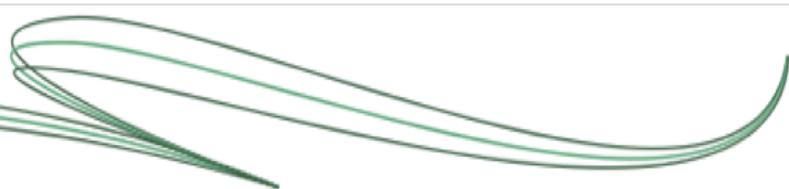
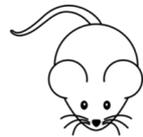


5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica, antitumoral e toxicológica de compostos sintéticos da classe das 2-cloro-*N*-arilacetamidas utilizando métodos pré-clínicos, assim como avaliar possíveis efeitos oxidantes e antioxidantes dos compostos em cepas deficientes de enzimas antioxidantes de *Saccharomyces cerevisiae* e verificar a toxicidade *in vivo* dos compostos em camundongos, e cujos resultados possibilitaram as seguintes inferências:

- Os compostos 2, 3 e 4 pertencentes à classe das arilacetamidas mostraram ser citotóxicos contra linhagens normais de fibroblastos humanos e murinos;
- No teste contra náuplios de *Artemia salina* revelaram alta toxicidade;
- Os três compostos apresentaram efeito antiproliferativo e citostático em raízes em crescimento de *Allium cepa* sem causar efeitos genotóxicos e mutagênicos;
- Apresentaram efeitos antioxidantes e modulantes da oxidação em cepas defectivas de *Saccharomyces cerevisiae* somente nas menores concentrações testadas;
- Em embriões do peixe *Danio rerio* composto 2 causou mortalidade significativa desde as primeiras 24 h até às 120 h de tratamento, cuja embriotoxicidade aguda se revelou tempo e concentração dependente e apresentou anormalidades morfológicas e malformações de órgãos.
- De 10 compostos da classe 2-cloro-*N*-arilacetamida, a maioria dos derivados apresentou ação antiproliferativa contra as linhagens tumorais;
- Os compostos 2 e 3 reduziram o crescimento tumoral em camundongos mutados CB17/SCID portadores de carcinomas de xenoinxerto de cólon sem causar sinais aparentes de toxicidade sistêmica nem alterações histológicas significativas;
- Os compostos 2, 3 e 4 apresentaram relaxamento muscular, redução da atividade locomotora e diminuição número de entradas nos braços fechados indiquem uma possível ação sedativa e/ou hipnótica, principalmente do composto 2.

ANEXOS



ANEXO A: Avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

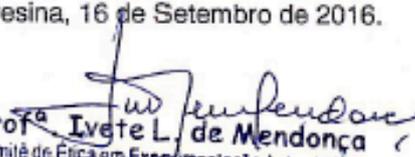


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização fisiofarmacológica de novos derivados da classe das arilacetamidas e aminopropano", registrada nº 202/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA- Núcleo de Tecnologia Farmacêutica/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **16/09/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Novembro/ 2016 à Março/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo heterogênico/ <i>swiss</i> 2. Rato heterogênico/ <i>novergicus</i>
Nº de Animais	1. 400 2. 48
Peso/ Idade	1. 20-30 g/ 2 meses 2. 120-130 g/ 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do CCA/UFPI

Teresina, 16 de Setembro de 2016.


 Prof.^a Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO B: Comprovante de tramitação do pedido de registro de depósito de patente emitido pelo NINTEC-UFPI.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO– Mestranda, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 14/03/2019, cujo título denomina-se “**COMPOSTOS FARMACÊUTICOS DERIVADOS DE ARILACETAMIDAS SINTÉTICAS COM ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CONTRA NEOPLASIAS**”, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 10 de maio de 2019.

Prof^ª. Dr^ª. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

James Dielson Barbosa do Nascimento
Matrícula SIAPE Nº 01149665

ANEXO C: Confirmação de submissão à Revista Toxicology and Applied Pharmacology – Qualis A2 Biotecnologia

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology
and Applied Pharmacology
Manuscript Draft

Manuscript Number: TAAP-D-19-00018R1

Title: Physicochemical and toxicological profile of arylacetamides as pharmacological tools against human cancers

Article Type: Research Paper

Keywords: colon carcinoma; xenograft model; physiological parameters; anxiolytic-like effects; behavioral animal.

Corresponding Author: Dr. Paulo Michel Pinheiro Michel Pinheiro Ferreira, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: Paulo Michel Pinheiro Ferreira, PhD

Order of Authors: Paulo Michel Pinheiro Ferreira, PhD; Kátia C Machado, Ms; Stefânia N Lavorato, Ph.D; Fátima de Cássia E Oliveira, Ph.D; Jurandy N Silva, Ms; Antonia Amanda C Almeida, Ph.D; Luciano S Santos, Ms; Valdenizia R Silva, Ms; Daniel P Bezerra, Professor; Milena Botelho B Soares, Professor; Cláudia Pessoa, Professor; Manoel O Moraes Filho, Professor; José Roberto O Ferreira, Professor; Ana Amélia C Melo-Cavalcante, Professor; João Marcelo C Sousa, Professor; Ricardo J Alves, Professor

Abstract: Arylacetamides are widely used as synthetic intermediates to obtain medicinal substances. This work evaluated in vitro antiproliferative activity of ten 2-Chloro-N-arylacetamides against human normal and cancer cells and performed in vivo toxicological and anticancer investigations. Initially, compounds were submitted to cytotoxic colorimetric assays on tumor lines, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and erythrocytes. Compounds 2, 3 and 4 were tested for acute toxicity (50, 150 and 300 mg/kg) and for subacute antitumoral capacity in HCT-116 colon carcinoma-bearing xenograft mice for 15 days at 25 mg/kg/day. Most compounds revealed cytotoxic action on tumor lines and proliferating PBMC but no for human erythrocytes. Molecular dipole moment, lipophilicity and electronic constant of aryl substituents had effects upon in vitro antiproliferative capacity. More common in vivo acute behavioral signals with compounds 2, 3 and 4 were muscle relaxation, reduction of spontaneous locomotor activity and number of entries in closed arms and increased number of falls and time spent in open arms, suggesting diazepam-like anxiolytic properties. Decrease of grabbing strength and overall activity were common, but palpebral ptosis and deaths occurred at 300 mg/kg only. Compounds 2 and 3 reduced colon carcinoma growth (21.2 and 27.5 %, respectively, $p < 0.05$) without causing apparent signals of organ-specific toxicity after subacute exposure. The structural chemical simplicity of arylacetamides make them cost-effective alternatives and justifies further improvements to enhance activity and selectivity and the development of pharmaceutical formulations.



Certificado



Certificamos que KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO, OLIVEIRA, F.C.E., LAVORATO, S.N., PESSOA, C., ALVES, R.J., FERREIRA, P.M.P. apresentaram o trabalho "CITOTOXICIDADE DE NOVOS DERIVADOS DE ARILACETAMIDAS" na sessão Painel no III Encontro Estratégico de Ciências Farmacêuticas, III Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos e do II Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, realizado no período de 26 a 28 de Abril de 2017 na Universidade Federal do Piauí na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Teresina, Piauí, 22 de Junho de 2017.

Hilris Rocha e Silva
Hilris Rocha e Silva
Presidente II Simpósio Internacional
de Farmácia Clínica

Lívio César Cunha Nunes
Lívio César Cunha Nunes
Presidente

Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva
Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva
Comissão Científica