



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

MÉRCIA AMARO DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS COMPOSTOS ACRILATOS-
INDÓLICOS E SEUS DERIVADOS DESTINADOS À TERAPÊUTICA DE
CÂNCER**

**CAMPINA GRANDE
2019**

MÉRCIA AMARO DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS COMPOSTOS ACRILATOS-
INDÓLICOS E SEUS DERIVADOS DESTINADOS À TERAPÊUTICA DE
CÂNCER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de bacharelado em farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de farmacêutico.

Área de concentração: Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

**CAMPINA GRANDE
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C837d Costa, Mércia Amaro da.
Desenvolvimento de potenciais compostos acrilatos-
indólicos e seus derivados derivados à terapêutica de câncer
[manuscrito] / Mercia Amaro da Costa. - 2019.
92 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura ,
Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Química medicinal. 2. Tratamento do câncer. 3.
Atividade antitumoral. 4. Hibridação molecular. I. Título
21. ed. CDD 615.19

MÉRCIA AMARO DA COSTA

DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS COMPOSTOS ACRILATOS-INDÓLICOS E SEUS DERIVADOS
DESTINADOS À TERAPÊUTICA DE CÂNCER

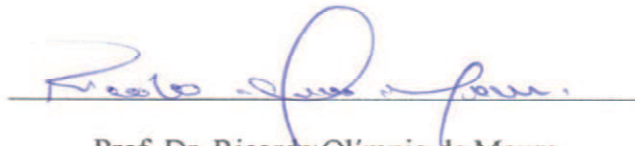
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de bacharelado em
farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de farmacêutico.

Área de concentração: Química
Medicinal

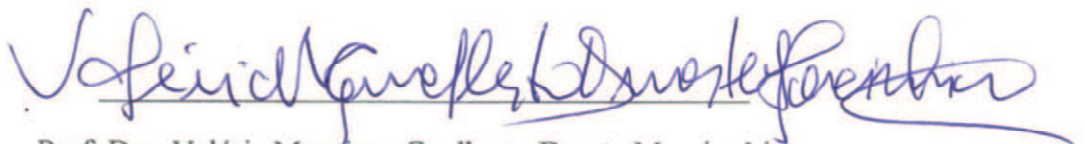
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio
de Moura.

Aprovada em: 16/05/2019.

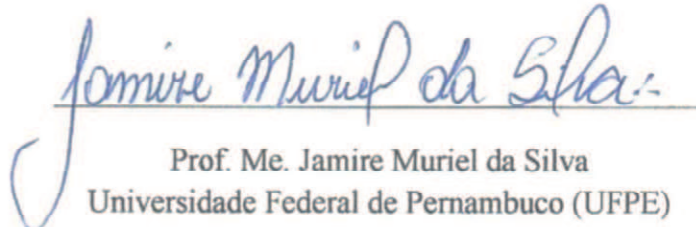
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Valéria Morgiana Gualberto Duarte Moreira Lima
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Jamire Muriel da Silva
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado até esse momento com saúde e muito discernimento, paciência nos momentos difíceis e naqueles de muitas lutas. Por todo o Seu amor por mim e por formar a pessoa que sou hoje.

Ao professor **Dr. Ricardo Olímpio de Moura**, por todos os ensinamentos, pelas palavras de apoio, pela a orientação e por todo o carinho que teve comigo durante a minha caminhada. Por me acolher em seu laboratório e me guiar não apenas como orientador, mas como um pai, me dando a oportunidade de enxergar horizontes novos na graduação.

Agradeço ao meu noivo **Raiff Dantas**, por todo o seu amor e carinho, por estar comigo em todos os momentos, sejam eles difíceis ou alegres. Por toda a sua compreensão nos momentos ruins, e por compartilhar comigo todos os dias a alegria de viver. Pelo apoio nas horas de cansaço e desânimo, e por todos os incentivos diários e por me fazer conhecer o amor.

A minha mãe e minha avó, **Márcia e Maria de Loudes**, por serem mulheres fortes e meus pilares, cheias de garra e muita fé, por formar a pessoa que eu sou. Por se fazerem presente todos os dias, por me guiar e me amar incondicionalmente. Cada parte de mim como ser humano, é uma parte de vocês.

Aos meus sogros, **Cleide e Lucio Vidal**, por me acolher como filha e me amar como tal. Por compartilhar momentos de felicidade e estar comigo todos os dias, se fazendo presente em cada detalhe.

A minha família, meu avô e minha irmã, por me apoiarem diariamente.

Aos meus amigos de graduação, em especial **Laryssa Mirelle, Maria Luísa, Beatriz Cardoso e Renam Silveira**, pelo companheirismo e pelos momentos de alegrias. Por compartilharem cada dia dessa graduação com muito amor e perseverança, me ensinando o valor de uma amizade.

Aos meus amigos de laboratório (LDSF), **Lucas Lócio, Sonaly Albino, William Charles, Gleyton Leonel, Jamire Muriel** e aos demais, por compartilharem dos momentos alegres, pelos ensinamentos diários e por toda ajuda nessa jornada.

Ao meu amigo **Rafael Macedo**, que permaneceu após a graduação, sempre disposto a me ajudar nos momentos precisos e a compartilhar momentos alegres da vida.

Ao corpo acadêmico, dentre eles professores e técnicos que passaram por mim, cada um deixando sua marca pelo caminho.

A UEPB, por me dá a oportunidade de crescimento, não apenas intelectual como pessoalmente, por ajudar na minha formação e me guiar até agora.

RESUMO

Um dos maiores desejos da atualidade, dentre os pesquisadores da área de química medicinal, está voltado para descoberta de um fármaco eficaz para o tratamento do câncer, uma das maiores causas de morte no mundo. Fármaco esse seguro, capaz de não provocar efeito colateral e que traga maior conforto ao paciente durante o período de tratamento. Esse desejo vem incentivando pesquisas no mundo inteiro, numa perspectiva de buscar cura ou um tratamento eficaz. Dessa forma, pensando na problemática que esse trabalho procurou desenvolver uma série de novos compostos, partindo de núcleos já privilegiados pela literatura, como o indol, dirigido para atividade antitumoral. Então, foram sintetizados 8 compostos a partir de reações de condensação de diferentes grupos metílicos com aldeídos-indólicos em meio etanólico e básico. As reações apresentaram bons rendimentos entre 52 à 80%, com bons parâmetros de pureza baseado em seus intervalos de temperatura de até 4° C na fixa de fusão, atendendo as regras de Lipinsk em seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico. Apenas 4 dos 8 compostos tiveram suas estruturas confirmadas através de técnicas espectroscópicas, sendo esses MA02, CAIC, ICIP e ICMD, apresentando bandas de absorção nos espectros de IV e RMN e massa esperadas. Todos os compostos foram submetidos ao teste de citotoxicidade utilizando eritrócitos humanos do tipo O+, baseando-se na capacidade das molécula causarem lise celular, sendo os compostos com maior capacidade de hemólise ICIP, M2 e M3, se aproximando mais do valor de referência esperado de 30%. Visando os possíveis efeitos antitumorais, os compostos foram submetidos a estudos computacionais de interação molecular no alvo *Topoisomerase II α* utilizando a metodologia do *docking*. O composto ICIP se destacou com melhores resultados de interação com o alvo, privilegiando o grupamento isopropílico que foi o principal responsável pela formação do complexo entre alvo e molécula e que não faz parte da estrutura molecular dos demais compostos. Os resultados de atividade citotóxica não alcançaram o valor padrão de 30%, porém apresentaram resultados próximos para os compostos ICIP, M2 e M3, abrindo margem para realização de outros testes para análise de possíveis mecanismos diferentes de lise celular a partir desses compostos.

Palavras-Chave: Derivados acrilatos-indólicos. Composto promissor. *Docking* Molecular.

ABSTRACT

One of the greatest desires of today, among researchers in the field of medicinal chemistry, is aimed at finding an effective drug for the treatment of cancer, one of the biggest causes of death in the world. This drug is safe, not to cause side effects and to bring greater comfort to the patient during the treatment period. This desire has been encouraging research worldwide, with a view to seeking healing or effective treatment. Thus, thinking about the problem that this work sought to develop a series of new compounds, starting from nuclei already privileged in the literature, such as indole, directed to antitumor activity. Then, 8 compounds were synthesized from condensation reactions of different methylene groups with aldehydes-indoles in ethanolic and basic medium. The reactions presented good yields ranging from 52 to 80%, with good purity parameters based on their temperature ranges of up to 4 ° C in the melt fixture, following the Lipinski rules in their hydrophilic-lipophilic equilibrium. Only 4 of the 8 compounds had their structures confirmed by spectroscopic techniques, such as MA02, CAIC, ICIP and ICMD, with absorption bands at expected IR and NMR and mass spectra. All compounds were submitted to a cytotoxicity test using human O + erythrocytes, based on the ability of the molecules to cause cell lysis, with the compounds with the highest capacity for hemolysis ICIP, M2 and M3 being closer to the expected reference value of 30%. Aiming at the possible antitumor effects, the compounds were submitted to molecular interaction computational studies on the Topoisomerase II α target using the docking methodology. The ICIP compound showed the best interaction results with the target, favoring the isopropyl grouping that was the main responsible for the formation of the complex between target and molecule and that is not part of the molecular structure of the other compounds. The results of cytotoxic activity did not reach the standard value of 30%, but presented close results for the ICIP, M2 and M3 compounds, opening the possibility for other tests to analyze different mechanisms of cell lysis from these compounds

Keywords: Acrylates-Indolic Derivatives. Promising compound. Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Divisão celular desordenada causada pelo processo cancerígeno	16
Figura 2	Transformação de uma célula normal para uma célula cancerígena	16
Figura 3	Representação do ciclo de replicação celular e suas fases	18
Figura 4	Estruturas Moleculares do Taxol e do antimetabólito Vimblastina	23
Figura 5	Estruturas das mostardas nitrogenadas	23
Figura 6	Exemplo do núcleo Indol	24
Figura 7	Reação de obtenção do núcleo indol a partir da reação do índigo	25
Figura 8	Estruturas de compostos biológicos contendo o anel indol	25
Figura 9	Estrutura do composto 52	26
Figura 10	Representação de interação do DNA com a <i>Topoisomerase II α</i>	32
Figura 11	Descoberta de novos fármacos considerando uma abordagem fisiológica	35
Figura 12	Exemplo de Bioisosterismo de fármacos utilizados na indústria	39
Figura 13	Processo de hibridação da sulfanilamida com o ácido salicílico	40
Figura 14	Estratégias de modificações adotadas	55
Figura 15	Espectro de IV do composto ICIP	60
Figura 16	Espectro de RMN ¹ H do composto ICIP	62
Figura 17	Espectro Expandido do composto ICIP	63
Figura 18	Espectro de RMN ¹³ C do composto ICIP	64
Figura 19	Espectro de Massa do composto ICIP	66
Figura 20	Comparação estrutural dos compostos sintetizados	68
Figura 21	Relação estrutural das interações realizadas com a <i>topoisomerase</i>	72
Figura 22	<i>Docking</i> Molecular do composto CAIC	73
Figura 23	Representação 3D das interações das moléculas MA02 e M1	75
Figura 24	Interações em 2D das moléculas no alvo <i>Topoisomerase</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de tipos de câncer e fatores possivelmente envolvidos	19
Tabela 2	Estatísticos de câncer para 2019 e os tipos mais comuns	20
Tabela 3	Demonstração dos produtos finais e suas denominações	52
Tabela 4	Caracterização Físico-Química dos compostos sintetizados	56
Tabela 5	Demonstração de grupos aceptores e doadores de ligação de H	59
Tabela 6	Dados obtidos pela Espectroscopia de IV	61
Tabela 7	Dados dos espectros de RMN ^1H dos compostos sintetizados	63
Tabela 8	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos sintetizados	64
Tabela 9	Dados das massas exatas dos íons moleculares dos compostos	65
Tabela 10	Dados da atividade hemolítica dos compostos acrilatos-indólicos	67
Tabela 11	Valores do Log P calculados no programa ChemDraw 3D	69
Tabela 12	Valores de score dos derivados acrilatos-indólicos	71
Tabela 13	Valores de score dos compostos MA02, M1, M2, M3 e M4	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Representação do JM-01	42
Esquema 2	Síntese do 2-ciano-3 (1H-indol-3-il) -N-fenilacrilamida (ICMD).	42
Esquema 3	Síntese do Isopropil-3-(Indol-3-il)-2-cianoacrilato (ICIP)	43
Esquema 4	Síntese do 2-ciano-3(1-indol-3-il) acrilamida (CAIC)	44
Esquema 5	Síntese do 2-ciano-3(indol-3-il)-3-cianoacetato de etila (M1)	44
Esquema 6	Síntese do 2-(5-bromoaldeído-3-carbonil) -malononitrila (M2)	45
Esquema 7	Síntese do 3-(5-bromo-indol-3-il) -2-ciano-3-acetato de etila (M3)	46
Esquema 8	Síntese do 3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-cianoacetato de etila (M4)	46
Esquema 9	Síntese do 2-(1H-indol-3-il)-malononitrila (MA02)	47
Esquema 10	Provável mecanismo para a obtenção do JM-01	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral	15
2.2	Específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	O câncer	16
3.1.1	Uma visão geral	16
3.2	Tratamento disponíveis para câncer	21
3.3	O DNA como alvo para tratamento do câncer	23
3.4	Núcleo indol e seus derivados	24
3.5	Topoisomerase como alvo principal para o tratamento do câncer	27
3.6	Toxicidade de fármacos	29
3.6.1	Teste de citotoxicidade por hemólise	30
3.7	Estudos in sílico: Realização de Docking Molecular	30
3.8	Química Medicinal	33
3.8.1	Etapas para descoberta de um fármaco	34
3.8.2	Planejamento Molecular	36
3.8.3	Estratégia de Modificação Molecular	37
3.8.4	Bioisosterismo	38
3.8.5	Hibridação Molecular	39
3.8.6	Restrição Conformacional	40
4	METODOLOGIA	42
4.1	Metodologia dos Compostos Sintetizados	42
4.2	Descrição de Síntese	42
4.3	Descrição do Teste Realizado	47
4.4	Descrições dos materiais utilizados	49
4.4.1	Realização da Síntese	49

4.4.2	Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)	49
4.4.3	Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)	49
4.4.4	Espectrometria de Massas	49
4.4.5	Ponto de fusão	50
4.4.6	Cromatografia	50
4.4.7	Cálculo teórico do Log de P e da Energia de Gibbs	50
4.4.8	Aparência	50
4.4.9	<i>Docking</i> Molecular	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1	Síntese	52
5.2	Caracterização físico-química dos derivados acrilatos-indólicos	56
5.3	Elucidação estrutural dos derivados acrilatos-indólicos	60
5.4	Avaliação da atividade hemolítica dos derivados acrilatos-indólicos	67
5.5	Estudos teóricos de <i>Docking</i> molecular	70
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	PERSPECTIVAS	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE	84

1. INTRODUÇÃO

Devido aos avanços tecnológicos dos últimos tempos, a ciência tem ganhado meios de desenvolver novas pesquisas, dentre essas, pesquisas que foquem em doenças onde a cura é de extrema dificuldade e o tratamento ofereça desconforto ao paciente. Cerca de 85% dos compostos bioativos da atualidade são de origem sintética, e assim se torna claro o quão importante é a pesquisa de novos compostos bioativos que ofereça maior probabilidade de cura e melhores meios de tratamento, como no caso dos diversos tipos de câncer (BARREIRO et al., 2009).

Uma vez que o câncer tem acometido mais pessoas nos últimos anos, e tem se caracterizado como umas das principais causas de morte global, onde a estimativa de acometidos para o ano de 2019 seja de aproximadamente 22 milhões de casos, e que a cada seis mortes uma será causada pelo câncer, este se torna uma problemática cada vez maior, tomando a atenção das pesquisas medicinais atuais (WHO, 2019).

Dessa forma, pensando nos tratamentos que a medicina lança mão, se têm algumas modalidades terapêuticas disponibilizadas, dentre elas as mais comuns são a quimioterapia, a cirurgia e radioterapia (BARRETO et al., 2010). A primeira é a modalidade a mais utilizada, já que oferece uma maior probabilidade de cura, palição e controle do crescimento celular exagerado (SAWADA et al., 2009). Consistindo na administração de um conjunto de drogas que atuam em nível celular, onde algumas delas não são seletivas, muitas das vezes apresentando alto grau de toxicidade não apenas para as células malignas como também aos tecidos saudáveis (SANTOS et al., 2001).

Sanchez (2016), afirma que a maioria dos agentes quimioterápicos são derivados de núcleos biologicamente ativos capazes de interação com o DNA das células cancerígenas, dentre esses destacam-se os núcleos piridínicos, quinilínicos, acridínicos e indólicos, apresentando atividades como antimalárico, antiprotozoários, antibactericidas e antitumorais. De modo complementar, Pedrosa (2017), afirma que os compostos indólicos são bons ligantes ao DNA, e dessa forma, são bem citados quanto a sua atividade anticancerígeno.

Segundo Oliveira e colaboradores (2017), em seu trabalho intitulado “Síntese, avaliação da atividade antiproliferativa, mecanismos de morte celular e ensaio de

inibição da topoisomerase em derivados indólicos Tiosemicarbazonas e 4-tiazolidinonas”, a atividade antiproliferativa de derivados indólicos está ligada ações nas células de replicação como indução da apoptose, interação com DNA e inibição enzimática da *topoisomerase II α* , esta é responsável por papéis essenciais no desencadeamento, no controle da replicação e na reparação de uma série de problemas passíveis de ocorrer com o DNA durante o processo de multiplicação, diferenciação e da sobrevivência da célula tumoral. Essa informações foram obtidas a partir da avaliação de seus compostos em oito linhagens de células tumorais humanas, onde resultados promissores em seus compostos foram descobertos (OLIVEIRA, et al., 2017).

Assim, devido a sua diversidade estrutural, os derivados indólicos têm se tornado um foco de grande importância para a síntese e desenvolvimento de candidatos que sejam ativos biologicamente e que apresentem possível segurança nos tratamentos destinado ao câncer (FERNANDES, 2016).

Pensando em tudo isso, a química medicinal atua aliando a pesquisa a prática, apresentando papel importante por trazer consigo diversas estratégias no processo de planejamento desses novos fármacos. Fornecendo informações sobre os processos evolutivos de reconhecimento molecular fortalecendo ainda mais as bases que são fundamentais para o entendimento, esclarecendo as diversas propriedades dos compostos bioativos, como potência, afinidade e a seletividade (SANGI et al., 2016).

Diante do que foi exposto, esse trabalho objetivou desenvolver uma série de derivados acrilatos-indólicos, formando novas entidades químicas com possível ação antitumoral. A partir desses compostos foram realizados estudos *in silico* utilizando o docking molecular como ferramenta, para análise das possíveis interações dos compostos com um dos principais alvos para o câncer: a *Topoisomerase II α* .

Essa análise nos permite prever as possíveis ligações da molécula com seu sítio ativo, quais os pontos de ligação e a sua orientação dentro do alvo. Sendo também realizado uma análise prévia da toxicidade, diante de um ensaio de citotoxicidade por hemólise em eritrócitos humanos. Assim, para se ter conhecimento do quão tóxica seriam essas moléculas na corrente sanguínea, se baseando na relação entre hemólise e na danificação das proteínas celulares, levando em consideração que é um teste importante, pois a maioria dos fármacos para o tratamento do câncer possuem ação

sistêmica e apresentam algum tipo de toxicidade à nível celular que pode causar reações secundárias malélicas para o paciente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Sintetizar e avaliar as propriedades físico-químicas, estruturais e atividades biológicas de novos derivados acrilatos-indólicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Promover a síntese química de novos compostos derivados acrilatos-indólicos
- Determinar as características físico-químicas dos novos compostos sintetizados;
- Elucidar estruturalmente os compostos através de RMN e ^1H e ^{13}C , Infravermelho e Massa;
- Realizar testes de citotoxicidade em eritrócitos humanos;
- Realizar estudo *in silico* no alvo *topoisomerase II α* : *Docking* molecular.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

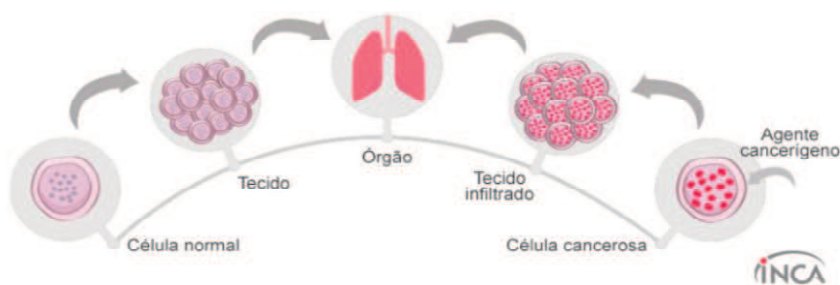
3.1 O Câncer

3.1.1 Uma Visão Geral

Muitas definições sobre o câncer são relatadas na literatura, dentre elas a de Schadeck e colaboradores (2012), onde afirmam que o câncer é uma patologia celular na qual uma única célula perde a capacidade de se auto reconhecer, perde também sua diferenciação, a funcionalidade, passando por diversas replicações celulares (mitose), formando então um aglomerado de células, que irá formar uma massa de tecidos, com ou sem capacidade de vascularização e nutrição, denominando-se tumor ou lesão cancerígena (SCHADECK et al., 2012).

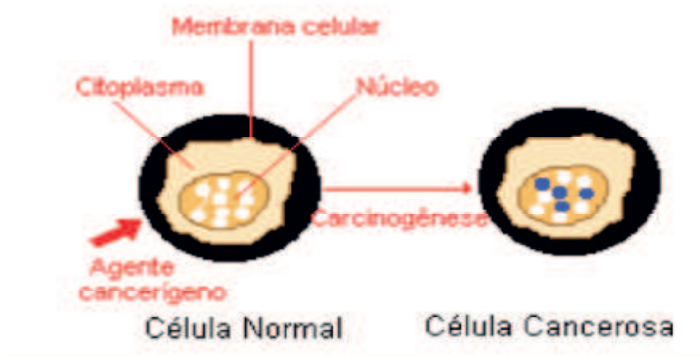
Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas (ALMEIDA et al, 2005), como é demonstrado na figura 1 e 2 a seguir.

Figura 1: Divisão celular desordenada causada pelo processo cancerígeno.



Fonte: ALMEIDA et al., 2005.

Figura 2: Transformação de uma célula normal para uma célula cancerígena.



Fonte: ALMEIDA et al., 2005.

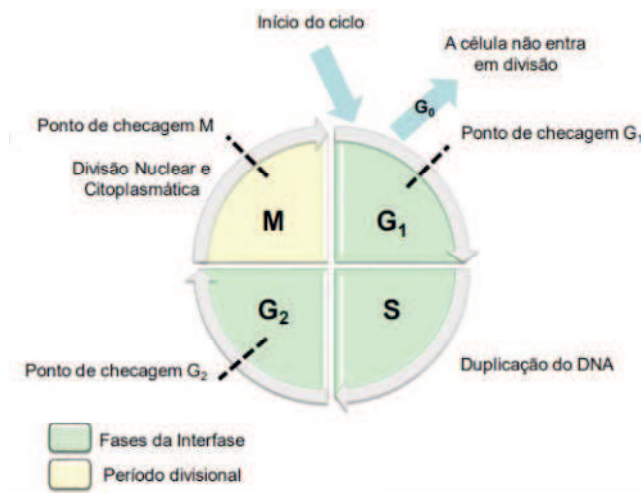
Essa patologia é causada primariamente por modificações genéticas adquiridas por fatores externos e não como uma doença genética passada de geração a geração. Essas modificações são principalmente mutações no DNA das células somáticas que se propagam por mitose (tipo de divisão celular). Os genes que promovem a divisão celular estão ativos na célula embrionária, mas inativos nas células adultas. No entanto, se sofrem alguma mudança, que possa ativá-los em momentos inadequados, eles se transformam em oncogênese e provocam o câncer, como é observado na figura 2, uma célula saudável a partir de determinado estímulo sofre alterações sucessivas até chegar ao estágio de uma célula “modificada” para o organismo (PRADO et al., 2014).

Com a uma constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos e elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem. Assim invadem inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (ALMEIDA et al., 2005).

Tendo como principal objetivo o crescimento e a divisão celular de forma perfeita, o processo passa a ser dividido em quatro fases na tentativa de diminuir os erros: onde a primeira fase é conhecida como G1 (*gap* ou intervalo) que é a fase de pós-mitótica, quando ocorre a síntese de proteínas, RNA (ácido ribonucleico) e o crescimento celular; S, que é a fase durante a qual ocorre a síntese de DNA, dando origem a dois conjuntos separados de cromossomos, um para cada célula-filha; G2 é a fase pré-mitótica, durante a qual a síntese de RNA e de proteínas continua; e M, fase de mitose ou divisão celular. A fase G0 é um período de descanso ou fase de repouso na qual a célula não se divide (PEDROSA, 2017).

Através da figura 3, é possível a observação ciclo celular e suas fases para que a célula gere novas células cancerígenas.

Figura 3: Representação do ciclo de replicação celular e suas fases



Fonte: FERNANDES, 2016.

A principal função do ciclo celular é garantir que o DNA seja fielmente duplicado durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células-filhas durante a mitose. Quando ocorre algum erro ou um dano na replicação, reparação do DNA ou alguma anormalidade cromossômica, as células interrompem a progressão do ciclo celular até que ocorra o reparo. No entanto, se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso e a reparação inviável, a célula inicia o mecanismo de apoptose, onde está programada a sua própria morte na tentativa de regular o seu ciclo sem que as próximas células filhas geradas apresente o material genético danificado (PEDROSA, 2017).

Os fatores de risco de câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditários. A maioria dos casos (cerca de 80%) estão relacionados ao meio ambiente, onde encontramos um grande número de fatores de risco. Entende-se por ambiente, o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2005). Hábitos como fumo, a vida sedentária, a dieta rica em alimentos gordurosos ou pobres em vegetais e frutas que, associados a fatores genéticos, podem levar ao desenvolvimento do câncer. Além disso, vírus como o da hepatite B (contra o qual existe vacina) e o vírus do Papiloma Humano (HPV) também estão ligados ao aparecimento do câncer (JURBERG et al., 2006). A

tabela 1 correlaciona os diversos tipos de câncer e os fatores envolvidos em suas ocorrências.

Tabela 1: Exemplos de tipos de câncer e fatores possivelmente envolvidos.

Tipos de Câncer	Riscos Extrínsecos	Exemplos
Mama	Susbtância	Uso de contraceptivos e estilo de vida
Prostata	Susbtância	Alimentação, obesidade e cigarro
Pulmão	90%	Cigarro e poluição
Melanoma	75%	Exposição Solar
Tireoide	72%	Dieta pobre em iodo, radiação local
Renal	58%	Cigarro, obesidade e radiação local
Intestinal	61%	Álcool, alimentação e cigarro

Fonte: FERNANDES et al., 2016; Fonte modificada da referência.

A Organização Mundial da Saúde ao incluir o câncer entre as situações crônicas de saúde, afirma que estas são persistentes, deixam incapacidade residual, causadas por alteração patológica não reversível. Além do mais, requerem treinamento especial do paciente para reabilitação. Embora, as neoplasias malignas ainda tenham o estigma de letalidade e mutilação, o avanço nos tratamentos, aliado a um diagnóstico cada vez mais precoce, tem elevado, consideravelmente, os índices de sobrevivência às pessoas que vivenciam esta situação crônica de saúde (CARDOSO et al., 2012).

Estatisticamente, em pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo com 12%, matando cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano. Atualmente, é a segunda causa de morte por doença no Brasil. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, sejam estes vizinhos ou distantes (ALMEIDA et al, 2005). Na tabela 2, são apresentados dados relativos a estimativa de câncer para o ano de 2019 e os gêneros mais afetados pela enfermidade fornecidos pelo INCA.

Tabela 2: Estatísticos de câncer para 2019 e os tipos mais comuns.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativas de casos novos		
	Homens	Mulheres	Total %
<i>Próstata</i>	68.220	-	31,7
<i>Mama Feminina</i>	-	59.700	29,5
<i>Colo do Útero</i>	-	16.370	8,1
<i>Traqueia, Brônquio e Pulmão</i>	18.740	12.530	7,4
<i>Cólon e Reto</i>	17.380	18.980	8,7
<i>Estômago</i>	13.540	7.750	5,0
<i>Cavidade Oral</i>	11.200	3.500	3,4
<i>Laringe</i>	6.390	1.280	1,8
<i>Bexiga</i>	6.690	2.790	2,2
<i>Esôfago</i>	8.240	2.550	2,5
<i>Ovário</i>	-	6.150	3,0
<i>Linfoma de Hodgkin</i>	1.480	1.050	0,6
<i>Linfoma não Hodgkin</i>	5.370	4.810	2,4
<i>Glândula Tireoide</i>	1.570	8.040	2,3
<i>Sistema Nervoso Central</i>	5.810	5.510	2,7
<i>Leucemias</i>	5.940	4.860	2,6
<i>Corpo do útero</i>	-	6.600	3,3
<i>Pele Melanoma</i>	2.920	3.340	1,5

Fonte: INCA 2019 Fonte modificada da referência.

Segundo o INCA, esses índices tendem a crescer nos próximos anos, levando a mais pessoas acometidas pela doença, conseqüentemente elevando o número das pesquisas relacionadas ao câncer e a sua cura, trazendo esperanças de novas descobertas, o que facilitaria o tratamento para o paciente e como lidar com todo o processo de uma forma melhor para a família. Ainda de acordo com o mesmo, conhecer informações sobre o perfil dos diferentes tipos de câncer e caracterizar possíveis mudanças do cenário ao longo do tempo são elementos norteadores para ações de Vigilância do Câncer, tornando-se um componente estratégico para o planejamento eficiente e efetivo dos programas de prevenção e controle de câncer no Brasil (INCA, 2019).

O diagnóstico de câncer tem, geralmente, um efeito devastador na vida da pessoa que o recebe, seja pelo temor às mutilações e desfigurações que os tratamentos podem provocar, seja pelo medo da morte ou pelas muitas perdas, nas esferas emocional, social e material, que quase sempre ocorrem (DA SILVA, 2008). Pensando então numa forma de apresentar melhores chances de cura e em oferecer um processo de tratamento mais tranquilo que as pesquisas se voltam para a área e crescem a cada dia.

3.2 Tratamentos disponíveis para o Câncer

O tratamento do câncer pode ser realizado mediante várias modalidades terapêuticas, como quimioterapia, radioterapia, cirurgia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser utilizadas combinadas ou não (BARRETO et al., 2010).

A quimioterapia constitui uma das modalidades de maior escolha para produzir cura, controle e palição. Esse tratamento envolve o uso de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por via sistêmica (SAWADA et al., 2009). Este tratamento consiste na administração de quimioterápicos, que constituem um grupo de aproximadamente 300 drogas que atuam ao nível celular para impedir o crescimento das células mutantes. Todavia, estas drogas não são seletivas, sendo tóxicas aos tecidos saudáveis, principalmente aqueles de rápida proliferação celular, causando todos os desafios da terapia, como as diversas reações adversas e desconfortos com os quais os pacientes são desafiados durante o processo de tratamento (DOS SANTOS et al., 2001).

Outra técnica é a cirúrgica que leva à remoção de tumores com eficácia, porém no caso de quadros de metástase apenas a remoção do tumor não é suficiente, sendo

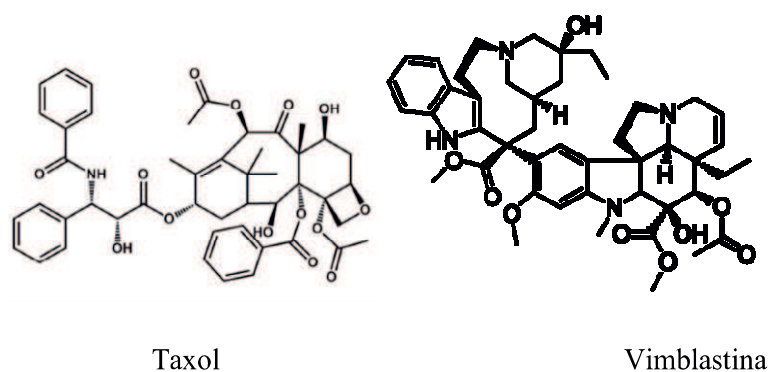
utilizado formas de tratamento em conjunto, como a união da quimioterapia ou incluindo até um transplante de medula (ALMEIDA et al., 2005).

Por último, outra terapia largamente utilizada é a radioterapia, exercendo seus efeitos no local da aplicação e atuando no DNA das células atingidas, impedindo a multiplicação dessas e/ou induzindo sua morte por apoptose. Essa terapia é menos agressiva às células normais que a quimioterapia, visto que essas células possuem maior capacidade de reparo do DNA que as malignas e, também, a radioterapia não é um tratamento sistêmico, pois atinge apenas as células que se localizam na região para a qual a radiação é direcionada (BARRETO et al., 2010).

Atualmente, é possível encontrar diversos fármacos que são utilizados para prevenir ou desacelerar o crescimento desenfreado dessas células tumorais. Segundo Lang (2013), esses fármacos são antimetabólitos, ou seja, exercem seus efeitos sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação bloqueando bioquimicamente a síntese do DNA, podendo também agir como inibidores enzimáticos influenciando também no metabolismo, ou agir de forma direta no DNA ou no RNA. (LANG et al., 2013). Na figura a seguir estão esquematizados as principais classes de fármacos utilizados para o tratamento do câncer.

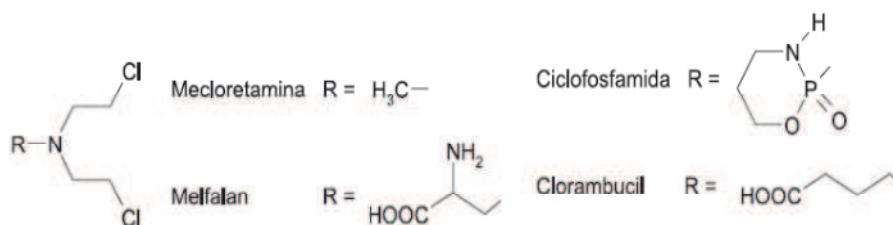
Os compostos citotóxicos utilizados na clínica para o tratamento de diversos tipos de câncer podem apresentar tanto um ciclo-celular específico quanto um não específico, sendo ambos relacionados ao DNA. Tendo como alguns exemplos: O metotrexato que é um agente antimetabólito utilizado clinicamente no tratamento do câncer; o alcaloide taxol advindo de um produto natural; e as mostardas nitrogenadas que são agentes alquilantes, essas se caracterizam como pioneiras no tratamento do câncer, sendo amplamente estudado por diversos pesquisadores e utilizado em larga escala ainda na atualidade, estruturas essas observadas nas figuras a seguir (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 4: Estruturas Moleculares do Taxol e do antimetabólito Vimblastina.



Fonte: FERNANDES, 2016.

Figura 5: Estruturas das mostardas nitrogenadas.



Fonte: ALMEIDA et al., 2005.

Avanços foram realizados no tratamento do câncer, mas ainda persistem os efeitos colaterais nas células normais de crescimento rápido. As consequências clínicas são a indução de náuseas e vômitos, lesão de esôfago, lesão de estômago, fraturas, má nutrição, desequilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-básico, que muitas vezes levam à recusa do paciente a continuar os ciclos do tratamento, comprometendo a eficácia do mesmo. (SAWADA et al., 2009).

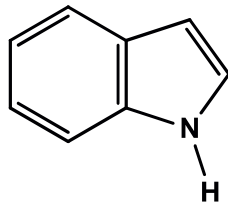
3.3 O DNA como alvo para o Tratamento do Câncer

Os agentes antineoplásicos mais antigos e mais usados são conhecidos como agentes alquilantes que, comprovadamente, interagem quimicamente com o DNA e não são ativos somente no processo de divisão celular. De fato, na quimioterapia são descritos muitos alvos que podem ser estudados com o intuito de se estabelecer novos fármacos antitumorais, sendo que o DNA se apresenta como um dos alvos mais estudados (ALMEIDA et al., 2005).

O DNA é um receptor celular essencial por ser a molécula alvo para a maioria das terapias anticâncer e antivirais. A ligação de moléculas ao DNA pode conduzir alterações nas propriedades estruturais, afetar a sua transcrição, replicação, expressão de informações genéticas nas células e, assim, influenciar a sua função fisiológica. Muitos compostos antineoplásicos se ligam ao DNA, alterando a sua replicação e inibindo o crescimento das células cancerígenas. Dessa forma, o estudo de agentes como potenciais ligantes ao DNA tem sido amplamente utilizado na concepção de fármacos, em especial antitumorais, já que um grande número de moléculas atualmente utilizadas exerce seus efeitos anticancerígenos por atuação no DNA (PEDROSA et al., 2017).

Dentre esses agentes quimioterápicos os derivados com núcleo indól (Figura 6), vem se destacando por apresentar boas atividades farmacológicas como antimalárico, antiprotozoário, antibactericida e também como antitumorais. Sua estrutura é formada por anéis aromáticos, sendo um deles um heterocíclico nitrogenado e, com um ou dois grupos substituintes que proporcionam alta estabilidade de ressonância (SANCHEZ et al., 2006).

Figura 6: Exemplo do núcleo Indol.

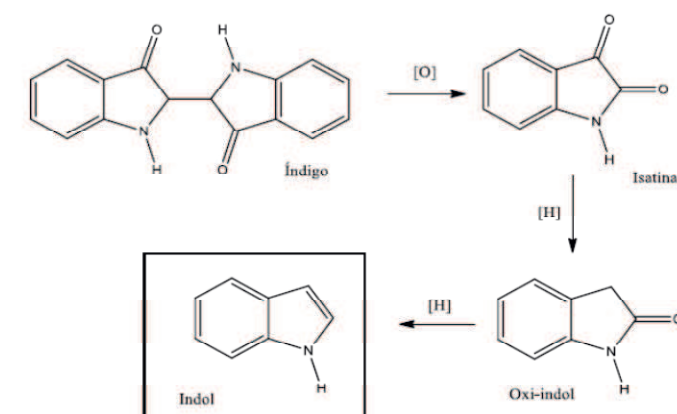


Fonte: Próprio Autor.

3.4 Núcleo indol e seus derivados

A química do indol teve início com a investigação da estrutura do índigo, um corante azulado extraído de plantas do gênero *Indigofera*. Em 1866, Baeyer e Knop sintetizaram pela primeira vez o indol a partir da reação de oxidação do índigo, obtendo-se a isatina seguido por duas etapas de redução, formando o intermediário oxi-indol e por fim o indol, representado na figura a seguir (PEDREOSA et al., 2017).

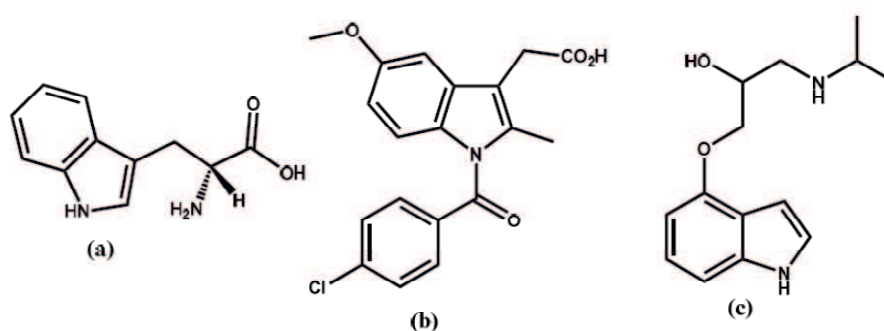
Figura 7: Reação de obtenção do núcleo indol a partir da reação do índigo.



Fonte: PEDROSA., 2017.

O sistema indólico consiste em um esqueleto aromático heterocíclico encontrado em vários compostos orgânicos, como é observado na figura a seguir no aminoácido triptofano (a), no anti-inflamatório indometacina (b) e no bloqueador beta adrenérgico pindolol (c) (FERNANDES, 2016).

Figura 8: Estruturas de compostos biológicos contendo o anel indol.



Fonte: Fernandes, 2016.

Os derivados do indol também são bem citados quanto à sua atividade anticâncer. Esses compostos apresentam importância na fisiologia celular e têm sido sintetizados também para serem usados com compostos intermediários. Esses derivados são também relatados com várias atividades biológicas, como anticâncer, antioxidante, anti-HIV, anti-inflamatório, analgésico, antipirético, anticonvulsivante, entre outras (PEDROSA, 2017).

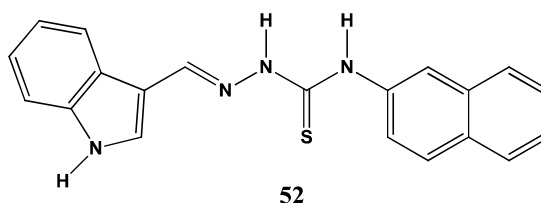
Neste contexto, os compostos heterocíclicos indólicos são considerados bons ligantes ao DNA devido à presença do átomo de nitrogênio possuir um par de elétrons localizado. Interações não covalentes com outras moléculas podem ocorrer através do

grupo NH e do empilhamento π - π de elétrons, na porção do anel aromático do indol características relevantes relatadas para compostos ligantes ao DNA (PEDROSA, 2017).

Devido a sua grande diversidade estrutural, os indóis tornaram-se um foco importante para a síntese e funcionalização de compostos biologicamente ativos. O anel indol é considerado como a porção da estrutura responsável pelas propriedades anticâncer de diversos compostos farmacologicamente ativos. Indóis derivados de produtos naturais, assim como produtos sintéticos e semi-sintéticos têm sido descritos como agentes bloqueadores da mitose devido a sua atividade sobre a polimerização de tubulina. Atribuí-se esta inibição à interação destas moléculas com o sítio da colchicina. Desta forma, compostos contendo o sistema indol como estrutura central são de especial para o tratamento do câncer (FERNANDES, 2016).

Oliveira (2017), realizou um estudo recente onde sintetizou uma série de derivados denominados de 4-tiazolidinonas, derivados estes indólicos que tiveram sua atividade anticancerígena analisada perante oito linhagem de células de diferentes tipos de câncer, constatando o composto 52 presente na figura 8, é um composto promissor, apresentando o melhor resultado em interação com o DNA e inibição da enzima topoisomerase II α , como pode ser observado na figura 9 a seguir (OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 9: Estrutura do composto 52



Fonte: OLIVEIRA et al., 2017.

O autor ainda relata uma atividade do composto no ciclo celular de células tumorais, especificamente na fase G2/M, que são a fase pré-mitótica e mitótica onde há a replicação do material genético da célula, o que faz com que o estudo possa predizer que esse composto pode apresentar-se como um fármaco utilizado para tratamento do câncer.

3.5 *Topoisomerase* como alvo principal para o tratamento do câncer

DNA e as *topoisomerasas* são alvos bem estabelecidos para muitos compostos orgânicos existentes e as suas interações simultâneas nas interfaces entre as biomoléculas são amplamente exploradas para a síntese de compostos promissores com atividade antitumoral, uma vez que esses compostos podem induzir a parada do ciclo de replicação e desencadear a apoptose celular (GOUVEIA et, al; 2018).

Ainda segundo Liang e colaboradores (2019), dentre todos os vários alvos moleculares para o tratamento do câncer, o DNA e as *topoisomerasas* apresentam-se como alvos favoráveis e adequados já que apresentam papéis essenciais no desencadeamento, no controle da replicação e na reparação de uma série de problemas passíveis de ocorrer com o DNA durante o processo de multiplicação, diferenciação e da sobrevivência da célula tumoral. (LIANG et, al; 2019).

De fato, o extraordinário comprimento do DNA e sua estrutura helicoidal dupla apresentam sérios problemas durante os processos de transcrição, replicação, recombinação e segregação cromatídica. As *topoisomerasas* do DNA atuam abrindo passagens transientes, com pontes de proteínas, simples ou duplas através das quais a fita de DNA pode ser passada a fim de resolver os problemas topológicos e aliviar o estresse de torção acumulado em todas as transações celulares da molécula de DNA (BASSI et, al., 2000).

Sendo as *topoisomerasas* essenciais a todos os domínios da vida, os vários tipos de *topoisomerasas* do DNA têm sido alvo de diversas classes de medicamentos já comercializados no mercado atual. As *topoisomerasas* são enzimas responsáveis pelas questões topológicas ligadas aos processos de transcrição e replicação do DNA (HEVERNER et, al; 2018). Essas enzimas aliviam a tensão que é gerada no DNA durante sua multiplicação (BERGOLD et al., 2004).

Segundo Hervener e colaboradores (2018), as *topoisomerasas* podem ser classificadas de forma geral em duas subfamílias: *topoisomerasas* do tipo I e *topoisomerasas* do tipo II. As do tipo I são aquelas que afetam a topologia do DNA que quebra apenas uma única fita do mesmo, utilizando um resíduo de tirosina ativo no processo para clivar a sua fita. Diferentemente das *topoisomerasas* tipo II que realizam a quebra da fita dupla e o DNA é então transcrito, podendo ser classificadas em alfa (α) ou em beta (β). Os cortes gerados pelas enzimas I e II são estabilizados por proteínas de ligação ao DNA. Existem outros subtipos que são classificados a partir de sua

polaridade da ligação DNA e proteína, a partir de seu mecanismo se é passagem de cadeia ou rotação e, por fim pelo número de bases de DNA pendentes na clivagem da cadeia dupla. (HEVERNER et, al; 2018).

De acordo com Jorge e colaboradores (2012), a principal função e a mais importante dessas enzimas é a propriedade que apresentam de relaxar o DNA que se encontra super torcido, atuando então nas regiões de transcrição da cromatina, associado aos processos de replicação e complexos transcricionais (JORGE et. al., 2012).

A quebra do DNA pelas *topoisomerases* é acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transiente entre um resíduo de tirosina específico da proteína e uma das extremidades da fita clivada. Vários tipos de reações são catalisadas pelas *topoisomerases*, a mais importante é o relaxamento de moléculas super-enoveladas. A mudança conformacional gerada pela ação da enzima separa as extremidades do corte no DNA, criando uma abertura ou intervalo pelo qual outro segmento de DNA de fita dupla (da mesma molécula ou de moléculas de DNA distintas), atravessa o intervalo criado, podendo gerar de acordo com o movimento da dupla fita o relaxamento (LOURENÇO, 2005).

O planejamento de inibidores destas isomerases representou grande sucesso no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos citotóxicos (DIAS, 2009). Os fármacos direcionados a *topoisomerase*, também chamados de inibidores de *topoisomerase*, podem ser classificados em dois grupos de acordo com o seu mecanismo de ação, sendo eles os “venenos de *topoisomerase*” e os inibidores catalíticos (SILVA.,2018).

Os venenos de *topoisomerase* constitui a classe de inibidores, atuando como intermediário da reação pelas *topoisomerases*, inibindo uma nova selagem na quebra do DNA, estabilizando o local de clivagem do mesmo. Isso resulta em indução de anormalidade no cromossomo (BASSI, et al., 2000). De forma mais resumida, Almeida e colaboradores, (2005) afirmam que esses “venenos” agem aumentando a atividade da enzima, pois forma uma ligação covalente com o DNA aumentando a quebra da molécula e formando intermediários prejudiciais ao metabolismo da célula tumoral o ocasiona uma cascata de eventos mutagênicos e letais (ALMEIDA, et al., 2005). Já os inibidores catalíticos, também inibidores da *topoisomerase*, são responsáveis por inibirem a atividade catalítica da enzima (BASSI et, al., 2000). Vale ressaltar que a formação desse complexo enzima-DNA-droga não é suficiente para induzir apoptose (LEHMANN et al., 2003).

Drogas capazes de favorecer a manutenção das quebras mediadas por estas enzimas podem ser potencialmente consideradas como agentes quimioterápicos, já que os múltiplos efeitos como os eventos genotóxicos que levam processos de morte celular, podem ser citotóxicos levando à célula tumoral a morte (LEHMANN et al., 2003).

Silva (2018), descreve a existência de um grande número de trabalhos relatando sobre a *topoisomerase* II α e que apresentam bons resultados na área farmacológica, o que faz com que essa enzima seja selecionada para avaliação de atividade antitumoral. Além do mais, essa enzima é a única disponível para descobrir os problemas topológicos nos cromossomos durante o processo de replicação e para introduzir quebras transitórias na cadeia dupla do DNA. Ainda afirma que as *topoisomerase*s são de extrema importância para as células em multiplicação e que as mesmas aumentam consideravelmente, pois são requeridas para a agregação dos cromossomos durante o processo. Por todos esses motivos que conhecer compostos que possam ser mais seletivos para essas enzimas é importante para desvendar novos candidatos de interesse para a clínica como possíveis quimioterápicos, sendo a maneira mais adequada para avaliar a potencialidade desses possíveis fármacos a realização de um estudo *in silico* usando a ferramenta do *Docking* molecular (SILVA, 2018).

3.6 Toxicidade de fármacos

Introduzir um novo fármaco na terapêutica é um processo longo, cerca de 12 anos em média e bastante oneroso, com probabilidade de sucesso pequena. De cada 100.000 novos compostos descobertos, apenas 250 são submetidos aos ensaios pré-clínicos e, apenas 5 entram em ensaios clínicos (testes em humanos). Ao final, estima-se que apenas uma molécula chegue ao mercado, uma nova entidade química que seja patenteável e, para isto deve ser segura, eficaz e/ou melhore a qualidade de vida dos pacientes. (FERREIRA et al., 2009).

Seguindo esse contexto, um dos principais desafios para o desenvolvimento de fármacos é a avaliação de sua toxicidade em seres humanos. Atualmente, métodos toxicológicos *in silico* estão demonstrando enorme utilidade na produção de informação para a indústria farmacêutica e grupos de pesquisa em Universidades no estágio de planejamento de fármacos, ajudando a identificar em fase pré-clínica compostos com baixo potencial toxicológico. A possibilidade de um fármaco causar mais prejuízo que efeitos benéficos para o organismo depende de diversos fatores, como idade e

predisposição genética a efeitos adversos. A toxicidade pode ser desencadeada por diversos mecanismos, que são divididos com base em paradigmas gerais em: efeitos adversos sobre o alvo; efeitos colaterais indesejados; produção de metabólitos tóxicos; resposta idiossincrásicas; produção de resposta imune prejudicial (GOLAN et al., 2009).

3.6.1 Teste de citotoxicidade por hemólise – *Red Blood Cell (RBC) Assay*

A corrente sanguínea é a principal via de distribuição para a maioria dos fármacos existentes no mercado atual, dessa forma, analisar a possível toxicidade desses para as células vermelhas é de extrema importância para a liberação de um fármaco para uso humano.

Dessa forma, segundo Abreu e colaboradores (2008), o ensaio de citotoxicidade através de hemólise é necessário no processo de desenvolvimento de muitos dos fármacos, pois nos permite quantificar a toxicidade dos mesmos através da lise das membras celulares das células vermelhas. Ao serem lisadas, essas células liberam uma proteína conhecida como hemoglobina, além do mais essa “quebra” das células provoca uma desnaturação das proteínas que são detectadas pela mudança de absorção das oxihemoglobinas, o que é indicador dos ambos os processos que são detectados através de espectrofotometria (ABREU et al., 2008).

3.7 Estudos *in silico*: Realização de *Docking Molecular*

A aplicação de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos têm se tornado uma prática rotineira nos dias atuais. Do ponto de vista do planejamento, é importante destacar que, quando se fala do uso da modelagem molecular, não se pretende chegar a uma molécula bioativa simplesmente através do uso de programas de computador. O processo de desenvolvimento dessas moléculas, devido à sua complexidade, envolve necessariamente o trabalho de uma equipe multidisciplinar, que emprega um grande conjunto de métodos computacionais de modo sistemático de forma a facilitar e otimizar o processo de desenvolvimento de compostos bioativos, em uma constante troca de informações com grupos de síntese química e avaliação da atividade destes compostos (SANT, et al., 2009).

Como é de conhecimento do químico medicinal, o processo de desenvolvimento de fármacos costuma ser um processo longo e de alto custo financeiro, para economizar

tempo e dinheiro no processo, os estudos de *docking* têm sido amplamente utilizados para prever a orientação preferida da molécula projetada a um receptor quando ligados entre si para formar um complexo estável (ADENIYL et al., 2017). Dessa forma, o *docking* molecular tem se tornado a melhor opção para antever as conformações de ligação energeticamente favoráveis dos ligantes na cavidade do sítio ativo de um dado receptor e vem ganhando bastante popularidade na comunidade científica pelo fato de melhorar os dois inconvenientes encontrados no processo, tempo e dinheiro (GRUPTA et al, 2018).

O maior objetivo do *docking* molecular é fornecer uma previsão da estrutura do complexo formado, ligante-receptor, lançando mão da tecnologia e utilizando métodos de computação. O encaixe pode ser conseguido através de dois passos interrelacionados: o primeiro por amostragem de conformações do ligante no sítio ativo da proteína, o segundo classificando essas conformações por meio de uma função de pontuação. De forma mais resumida, a abordagem de *docking* molecular pode ser usada para modelar a interação entre uma pequena molécula e uma proteína no nível atômico, o que nos permite caracterizar o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação de proteínas alvo, bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais (MENG, et al., 2011).

Essa elucidação antecipada do mecanismo de ligação ligante-receptor é conhecida como a teoria *lock-and-key* proposta por Fischer, na qual o ligante se encaixa no receptor como chave e fechadura. Os primeiros métodos de ancoragem relatados foram baseados nessa teoria e tanto o ligante quanto o receptor eram tratados como corpos rígidos. Então a teoria do “ajuste induzido” criado por Koshland leva a teoria de *lock-and-key* um passo adiante, afirmando que o sítio ativo da proteína é continuamente reformulado por interações com os ligantes, à medida que os ligantes interagem com a proteína. Essa teoria sugere que o ligante e o receptor devem ser tratados como flexíveis durante o acoplamento. Considerando a limitação dos recursos do computador, o acoplamento foi realizado com um ligante flexível e um receptor rígido por um longo tempo, e continua sendo o método mais popular em uso (MENG, et al., 2011).

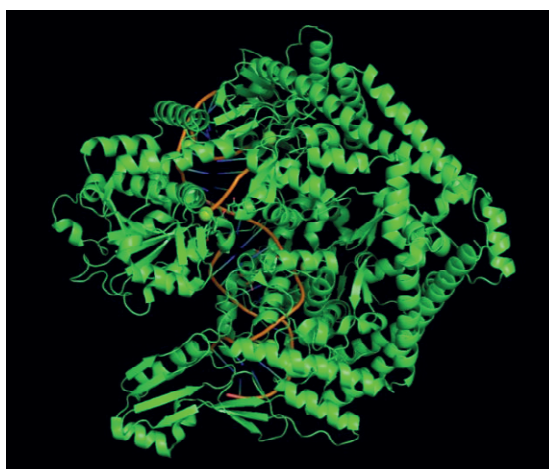
A ação das moléculas bioativas é um fenômeno bastante complexo, mas um dos paradigmas da química medicinal é que essas moléculas têm seus efeitos associados a interações ou até reações químicas com estruturas macromoleculares presentes no sistema vivo, proteínas, em sua grande maioria. Para que as interações ou as reações que

ocorrem durante a ação dos bioligantes aconteçam, deve haver complementaridade estrutural entre a molécula do bioligante e a biomacromolécula. Esta complementaridade permite o estabelecimento de interações mais ou menos específicas, como interações dipolo-dipolo e íon-íon, ligações hidrogênio e forças de dispersão, que contribuem para a energia de interação entre o bioligante e a biomacromolécula. É justamente neste ponto que a modelagem molecular pode dar sua contribuição para o desenvolvimento de bioligantes, pois através dela pode se ter uma descrição detalhada da estrutura, das interações intermoleculares e, se for o caso, das reações químicas entre o bioligante e a biomacromolécula (SANT, et al., 2009).

A ação bem sucedida de um fármaco está nas suas interações com o sítio alvo, onde a força desta é influenciada pelo arranjo dos átomos e sua natureza eletrônica, tanto do fármaco quanto do alvo (ADENIYL et al., 2017). Segundo Silva (2018), os cálculos obtidos ao final do processo auxiliam a encontrar, por exemplo, novos inibidores da *topoisomerase*, e ainda descrever como ocorreu à ligação ao alvo e em que ponto do alvo a mesma acontece. Além do mais, fornece informações como os tipos de interações formadas a partir da ligação do ligante ao receptor. Com essas informações apresentadas, é possível obter a energia de ligação do complexo ligante-receptor que prediz a afinidade pelo sítio ativo, e assim quanto menor a energia gerada pela ligação, maior será a afinidade com o alvo proposto (SILVA, 2018).

A figura 10 demonstra a molécula de DNA em sua interação com a enzima *topoisomerase II α* .

Figura 10: Representação de interação do DNA com a *Topoisomerase II α* .



Fonte: SILVA, 2018.

A imagem acima é a representação da *topoisomerase II α* retirada do *PDB*, apresentando a ação de muitos dos fármacos utilizados no tratamento do câncer, onde inibem a quebra das fitas de DNA ou agem aumentando sua quebra e impedindo sua replicação celular, como foi discutido anteriormente (SILVA, 2018).

3.8 Química Medicinal

Para afirmar a importância da descoberta de novos fármacos, Barreiro em seu trabalho intitulado *A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo*, descreve que o medicamento é instrumento essencial à preservação, a manutenção e a promoção da saúde. O acesso ao medicamento representa um importante fator de inclusão social que depende da disponibilidade do fármaco, do princípio ativo contido no medicamento e que em cerca de 85% dos casos é de origem sintética (BARREIRO et al., 2009).

Assim, a Química medicinal, química biodimedical ou química biológica como é referida nos anuais da Sociedade Brasileira de Química, compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica, a elucidação ou confirmação da estrutura, a caracterização das propriedades físico-químicas, a determinação da atividade biológica, a exploração desta atividade ao nível molecular e o estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica, SAR/QSAR (MONTANARI et al, 1995).

De forma sucinta, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*IUPAC*) afirma ainda que a Química Medicinal inclui o entendimento dos fatores relacionados aos aspectos da estrutura química e da atividade, assim como, os parâmetros relacionados à absorção, à distribuição, ao metabolismo, à eliminação e à toxicidade de compostos (LIMA et al, 2007).

A química medicinal tem se desenvolvido e alcançado sucesso nos tempos modernos, mas suas origens remontam da antiguidade mais longínqua (MONTANARI et al, 2000). Desde a síntese da uréia, realizada por Wohler em 1828, a área da síntese orgânica vem passando por diversos avanços, como afirma Sangi, em seu trabalho conhecido como *Estratégias de Síntese na Descoberta de Fármacos: O emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural* (SANGI et al., 2016). O pesquisador ainda afirma que, atualmente existem muitos métodos sintéticos e possibilidades de reações,

permitindo a síntese de compostos complexos de forma muito mais eficiente que há algumas décadas.

Nas últimas décadas, houve uma revolução no processo de descoberta de fármacos. Novos conhecimentos e tecnologias foram adicionados ao arsenal de métodos e técnicas, resultando em um processo mais proativo e dedutivo no desenvolvimento de fármacos (DA SILVA et al., 2013) Dessa forma, a síntese de compostos orgânicos constitui uma importante parte no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (MONTANARI et al., 2000).

3.8.1 Etapas para descoberta de um fármaco

Sabe-se que a Química Medicinal estuda as razões moleculares da ação dos fármacos de maneira a descrever a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, hierarquizando as diferentes contribuições funcionais (MONTANARI et al, 1995). Dessa forma, é fácil compreender que um projeto de Química Medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo (LIMA et al, 2007).

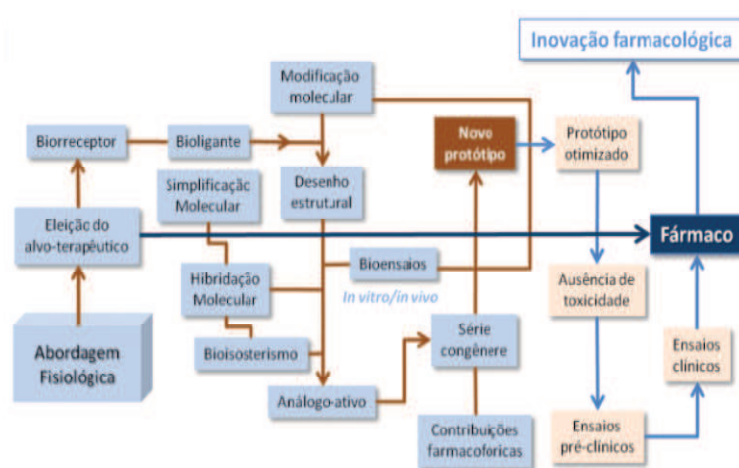
De uma forma mais simplificada, o desenvolvimento caracteriza-se, entre outros aspectos, pelo planejamento e otimização da molécula candidata a fármaco. Essa etapa se inicia com a escolha de uma doença, seguido da seleção de um alvo biomolecular que esteja relacionado com essa doença, e o estudo de uma molécula promissora que seja capaz de interagir com esse alvo, causando efeitos direcionados à erradicação da patologia (ŠARKNNJ, et al, 2013).

Guido e colaboradores (2010) descreve que o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos são divididos em duas grandes fases: a primeira seria a fase da descoberta conhecida também como fase pré-clínica ou de pesquisa básica onde há o início do processo, onde a pesquisa se concentra na identificação e na otimização de moléculas que são capazes de representar novas entidades químicas. A segunda fase seria o desenvolvimento ou fase clínica, aquela onde se realiza os testes farmacológicos levando em consideração os padrões farmacocinéticos. Em seu trabalho também descreve o quão importante é para o processo a existência de um alvo farmacológico, pois é através deste que se é possível obter informações essenciais, dentre elas como essa entidade química se portaria no processo fisiopatológico bem

como na seletividade diante um processo de cura de doenças humanas incluindo o câncer (GUIDO et al., 2010).

Escolher um alvo com ação farmacológica é uma etapa essencial, sendo definido por Barreiro (2009), como uma das etapas mais importante para esse processo, caracterizando o desenvolvimento do fármaco baseado a partir de um alvo terapêutico, a escolha mais adequada e a abordagem mais moderna, como é possível observar na imagem a seguir um esquema relatando passo a passo da descoberta de um novo fármacos (BARREIRO et al.,2009).

Figura 11: Descoberta de novos fármacos considerando uma abordagem fisiológica.



Fonte: BARREIRO et al., 2009.

Sendo assim, entende-se por descoberta a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada fisiopatologia, a aplicação de estratégias de planejamento molecular para desenho de ligantes do alvo selecionado utilizando as estratégias de modificação molecular clássicas da Química Medicinal, tais como bioisosterismo, simplificação e hibridação molecular, ou pelo emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular e o QSAR. Compreende, ainda, realizar a determinação das atividades farmacológicas do ligante, que uma vez ativo *in vivo*, preferencialmente por via oral, passa a ser denominado protótipo (LIMA et al., 2007)

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como a potência, a afinidade e a seletividade. Diante desse complexo

paradigma, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (SANGI et al., 2016).

A etapa de desenvolvimento do protótipo objetiva a otimização de suas propriedades ADMET, um acrônimo referente as propriedades farmacocinéticas e farmacológicas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Além do mais, visa melhorar propriedades farmacêuticas como a solubilidade, o odor e o sabor, de modo a viabilizar seu uso clínico através da preparação eventual de pró-fármacos, complexos de inclusão, microemulsões, formulações de liberação lenta, entérica etc (MONTANARI et al., 2000). Para que um protótipo seja considerado um candidato a fármaco, evoluindo do processo de descoberta para a etapa de desenvolvimento, alguns fatores devem ser considerados, tais como: simplicidade estrutural com possibilidade de modificações, visando à otimização de seu perfil farmacoterapêutico, ser membro de uma série congênere com SAR bem estabelecida; possuir situação patentária favorável e apresentar boa propriedade farmacocinética (MONTANARI et al., 1995).

Como Guido (2010) descreveu, um alvo biológico selecionado, seja ele qualquer, facilita a visualização estrutural em três dimensões (3D) do mesmo, fazendo com que seja possível priorizar a estratégia de planejamento mais adequada, capaz de aumentar a potencialidade da molécula e otimizar sua afinidade em relação as propriedades farmacológicas contidas na mesma, podendo também melhorar suas propriedades farmacocinéticas levando em consideração o espaço fisiológico (GUIDO et al., 2010).

Para as estratégias de planejamento, se retrata as mais utilizadas atualmente, dentre elas as que utilizada a estrutura de uma droga já conhecida do inglês *structure-based drug design* (SBDD), e aquelas baseada na estrutura do ligante originada do inglês *ligand-based drug design* (LBDD) (MATOS et al, 2016).

3.8.2 Planejamento Molecular

As estratégias de SBDD dependem do conhecimento da estrutura tridimensional do alvo molecular. Neste tipo de abordagem, a determinação estrutural de complexos moleculares do tipo receptor-ligante permite a identificação de conformações bioativas e interações intermoleculares; conhecimento que é utilizado para modular propriedades do ligante como potência, atividade e seletividade. Quando não se conhece a estrutura tridimensional do alvo molecular, os métodos de planejamento LBDD podem ser

utilizados (MATOS et al, 2016). Denominada *ligant-based drug design (LBDD)*, consiste no desenvolvimento do fármaco tendo uma molécula endógena como referência para determinação da estrutura, ficando mais fácil a visualização desse alvo (BIAGGIONI; ROBERTSON, 2014).

Outra estratégia que pode ser citada, já utilizada em diversas moléculas no mercado, descrita por BOJANŠARKANJ e colaboradores (2013), é conhecida como FBDD. Essa sigla deriva do conceito inglês *farmacophore-based drug design* e é uma estratégia simples onde se tem uma molécula ou um grupo farmacofórico já conhecido como ponto de partida para a descoberta de uma nova entidade química, ou seja, uma molécula já conhecida será utilizada como modelo molecular para o desenvolvimento de uma nova molécula. O autor descreve ainda que alguns desses fármacos desenvolvidos a partir dessa estratégia podem conter propriedades farmacológicas semelhantes ao composto utilizado como referência, porém apresentado melhores características como potência, eficácia e até melhor seletividade em comparação ao composto modelo, e a partir de então esses compostos passam a ser conhecidos como compostos melhores (ŠARKANJ, et al., 2013).

3.8.3 Estratégia de Modificação Molecular.

A química medicinal possui métodos eficientes para otimizar a potência e o perfil farmacológico de substâncias, levando ao planejamento e síntese de substâncias cada vez mais ativas, com biodisponibilidade satisfatória, desprovido de toxicidade e metabolismo adequado ao seu emprego terapêutico sendo denominado como composto *hit* que é o composto ativo identificado numa triagem biológica. Estes métodos podem consistir de aproximação intuitiva, tais como a síntese de análogos, isômeros e isósteros ou outros processos de modificação molecular, como a simplificação molecular, a latenciação, a modificação de sistemas anelares, entre outros (CERA et al., 2012).

Após o composto *hit* ter tido sua estrutura química elucidada, bem como validado sua atividade farmacológica, o próximo passo são as etapas de modificação molecular e a determinação da relação estrutura-atividade (SAR) do fármaco com o alvo. Silva (2012) relata que essas etapas tem como objetivo principal o desenho racional da entidade química que determinará a estratégia mais adequada, diante dos novos padrões moleculares, necessárias ao reconhecimento do fármaco pelo alvo

escolhido. Dentre essas estratégias, podem ser citados como exemplo o bioisosterismo, a hibridação e a restrição conformacional (SILVA et al., 2012).

3.8.4 Bioisosterismo

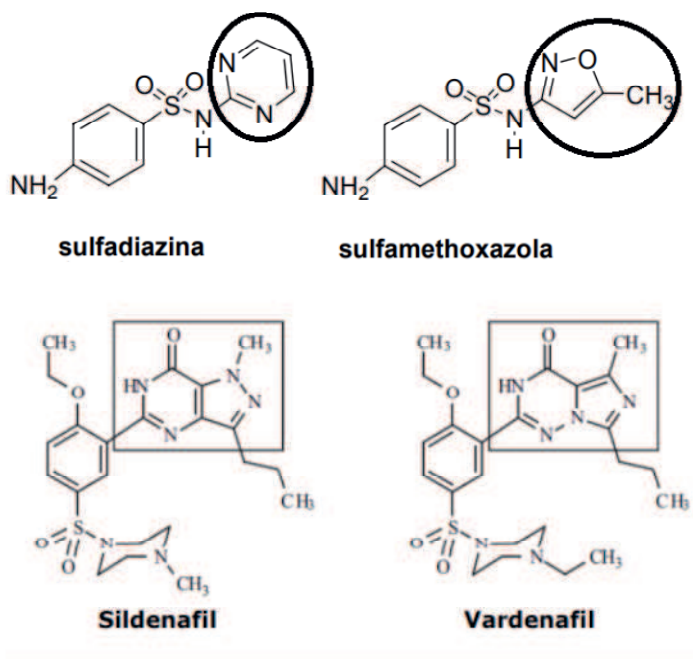
Uma estratégia de modificação molecular utilizada pelos químicos medicinais, para otimização de um composto protótipo é o bioisosterimo. Neste contexto o bioisósterio é um composto resultante da troca de átomos ou subunidades estruturais, por outros átomos ou subunidades estruturais similares em distribuições eletrônicas, volumes moleculares ou propriedades físico-químicas, capazes de apresentarem propriedades biológicas similares ao composto original (ALMEIDA et al., 2010).

A autora Marília Almeida e colaboradores (2010) classifica o bioisosterimo em dois: Bioisosterimos clássico e não-clássico. No primeiro empregam-se grupos de similaridade eletrônica e estéricas monovalentes (CH_3 , NH_2 , F), divalentes (O, S, Se) e trivalentes (CH, Sb, N) e anéis equivalentes. O segundo não segue as regras eletrônicas e estéricas dos bioisósteros clássicos, porém apresentam atividades biológicas semelhantes (ALMEIDA et al, 2010).

Tanto os biososterismos clássicos quanto os não clássicos são igualmente importantes em modificação molecular, sendo que qualquer substituição bioisostérica deve ser realizada cuidadosamente tendo diversos parâmetros em mente, como: o tamanho, o volume e a distribuição eletrônica dos átomos; a solubilidade do composto lead que é aquele composto que já possui propriedades otimizadas como potência e seletividade; a reatividade dos grupos funcionais que estão sendo adicionados, de modo a prever novos caminhos metabólicos; e os fatores conformacionais do grupamento bioisostero adicionado (LIMA; BARREIRO, 2005).

Dessa forma, muitos fármacos de diferentes classes terapêuticas são bioisósteros como é o caso do antibacteriano Sulfadizina e o Sulfametaxozola e os fármacos utilizados para disfunção erétil como a vardenafila e o sildenafil conhecido popularmente como viagra, estruturas encontradas na imagem 2.

Figura 12: Exemplo de Bioisosterismo de fármacos utilizados na indústria.



Fonte: ALMEIDA ET AL, 2010.

De forma resumida, os bioisómeros escolhidos para os fármacos acima foi a substituição clássica de anéis, onde no fármaco sildenafil houve uma substituição do anel pirazol para um anel imidazol, sendo a diferença estrutural referente apenas ao deslocamento do nitrogênio. Para o fármaco sulfadiazina houve a substituição do anel imidazol para um anel oxazol, o que fez com que as propriedades farmacocinéticas melhorassem dando origem ao composto sulfametaxazol (BARREIRO et al., 2014).

3.8.5 Hibridação Molecular

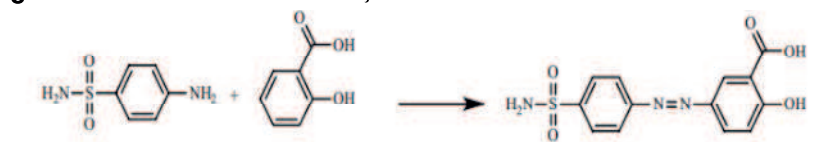
A hibridação molecular consiste em juntar dois ou mais grupamentos farmacofóricos de compostos ativos. Ao longo dos anos, essa estratégia têm sido empregada no desenvolvimento de fármacos multialvo, que são aqueles que interagem com mais de um alvo biológico. Geralmente é desejável que um fármaco seja seletivo para um receptor, no entanto, a interação mútua com mais de um alvo tem suas vantagens em casos específicos (SILVA et al., 2012).

Assim, a hibridação molecular entre subunidades estruturais de diferentes moléculas bioativas, utilizada como uma das principais ferramentas de planejamento estrutural tem levado à descoberta de inúmeros ligantes, com propriedades múltiplas, que apresentam atividade antioxidante, neuroprotetora, quelante de metais, inibitória de

colinesterases, antiamilóide, inibitória de secretases, intercaladora de DNA, indutora de apoptose, inibitória de tirosina quinases e antiinflamatória, dentre outras. Portanto, um conjunto de alvos terapêuticos já está sendo explorado como possíveis modos de intervenção terapêutica simultânea, buscando aliviar os sintomas e frear o avanço de doenças, como o câncer, até que uma cura quimioterápica definitiva possa ser realidade (DIAS, 2015).

É possível observar na figura 3 a hibridação entre dois fármacos amplamente utilizado na clínica, com funções antimicrobiana e anti-inflamatório havendo a otimizando farmacológica de ambas.

Figura 13: Processo de hibridação da sulfanilamida com o ácido salicílico.



Fonte: ARAÚJO et al., 2015.

3.8.6 Restrição Conformacional

A restrição conformacional pode ser empregada buscando fixar uma determinada conformação, capaz de responder pelo reconhecimento molecular de dado sítio-receptor com seletividade. A restrição molecular de moléculas bioativas flexíveis pode ser conseguida de diversas maneiras. A mera introdução de um grupamento metila é capaz de restringir a rotação livre de uma determinada ligação. O uso de grupamentos funcionais que possam provocar a formação de ligações H-intramoleculares ou, ainda, a introdução de uma instauração, preferencialmente uma ligação dupla, de forma a ser capaz de fixar a posição relativa de substituintes terminais ou germinais devido a sua rigidez (BARREIRO et al., 2014).

Segundo Solomons (2008), moléculas que possuem ligações simples entre seus átomos apresentam uma facilidade maior de rotações entre as suas ligações e, conseqüentemente o fármaco se torna mais flexível a diversas conformações moleculares onde, geralmente apenas uma destas conformações apresenta a capacidade de se ligar ao receptor e exercer o efeito biológico esperado. As outras conformações que o fármaco pode assumir são capazes de serem inativas ou causar um efeito indesejado, como efeitos colaterais e até toxicidade, já que as mesmas são capazes de

interagir com outros receptores que desencadeia essa cascata de efeitos (SOLOMONS et al, 2008).

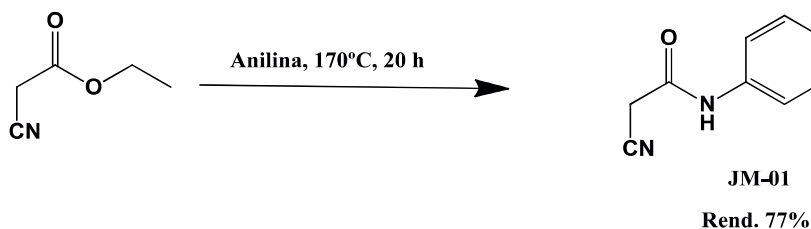
4 METODOLOGIA

4.1 Metodologia dos Compostos Sintetizados

Para obtenção dos compostos sintetizados foi adotada uma rota sintética simples, conhecida como via plena, utilizando reação de condensação onde há a conjugação de dois ou mais grupos funcionais desejados. O reagente aldeído-indólico não foi sintetizado no laboratório e sim adquiridos na SIGMA ALDRICH.

Um outro reagente utilizado foi o 2-ciano N-fenilacetamida (JM-01), já faz parte do arsenal de moléculas do nosso grupo de pesquisa e está publicado na dissertação de mestrado que se intitula: *Planejamento e Desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quínoínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral*. Através de uma metodologia convencional, a síntese se deu a partir de 0,5 ml de 2-cianoacetato de etila com 0,43 ml de anilina, usando como meio reacional 5 ml de dimetilformamida (DMF), sob agitação magnética e refluxo na temperatura de 170°C (SILVA, 2018).

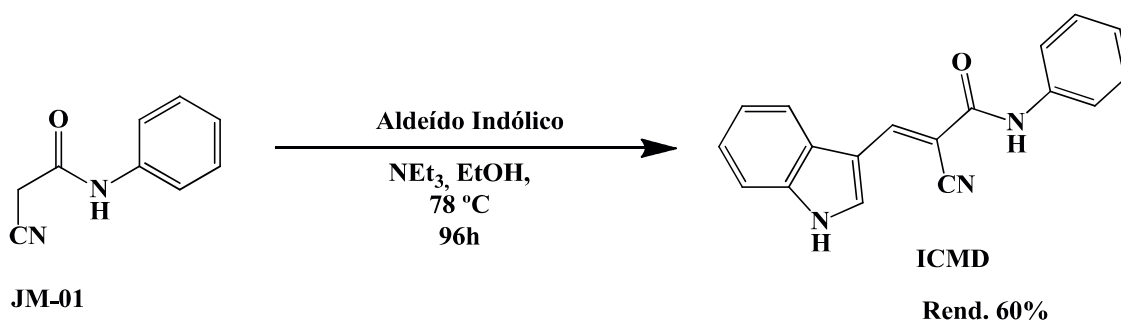
- **Esquema Reacional 1:** Representação do JM-01.



Fonte: SILVA, 2018.

4.2 Descrição de Síntese

- **Esquema Reacional 2:** Síntese do 2-ciano-3 ((1H-indol-3-il) -N-fenilacrilamida (ICMD).



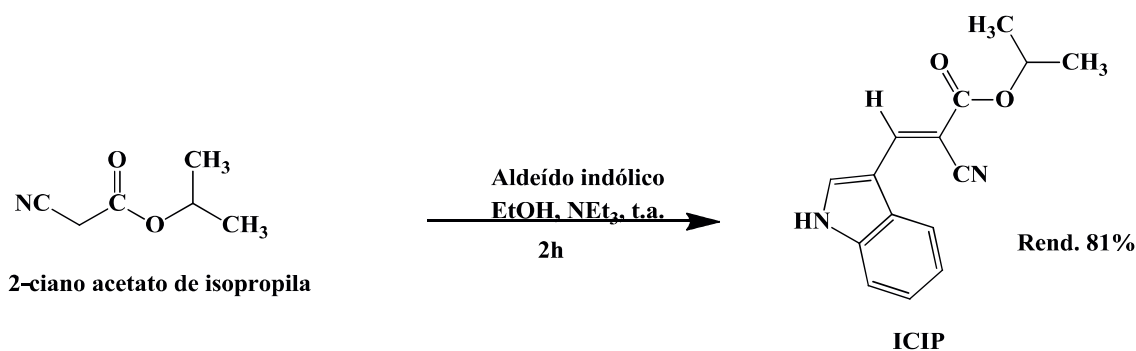
Fonte: SILVA, 2018.

Em um balão de 50 ml foi solubilizado 0,2206 g de JM-01 em 10 ml de etanol (EtOH), usando como catalisador 6 gotas de trietilamina (NEt₃). A mistura foi deixada sob agitação magnética durante 5 minutos em temperatura ambiente, e após esse tempo foi adicionado 0,2000 g de aldeído indólico elevando a temperatura da reação para aproximadamente 78°C. O andamento da reação foi realizado através de cromatografia em camada delgada.

Após 4 horas de reação foi observado que o produto de partida (JM-01) estava presente na reação, sendo então acrescentado 3 gotas do catalisador NEt₃. Após 96h foi verificado a ausência do produto de partida no meio reacional, indicando assim a formação do produto e o consumo total dos reagentes utilizados. A reação foi filtrada e lavada abundantemente com água destilada gelada para obtenção dos cristais, quando secos foi observado, através de CCD, manchas a cima do seu RF indicando a presença de possíveis impurezas.

Para purificação, os cristais foram dissolvidos numa mistura etanol/água, na proporção 1:1, essa mistura foi previamente aquecida até a redução do seu volume e então resfriada, obtendo-se ao final do processo os cristais puros. Os cristais finais foram denominados ICMD para melhor identificação.

- **Esquema Reacional 3:** Síntese do Isopropil-3-(Indol-3-il)-2-cianoacrilato (ICIP).

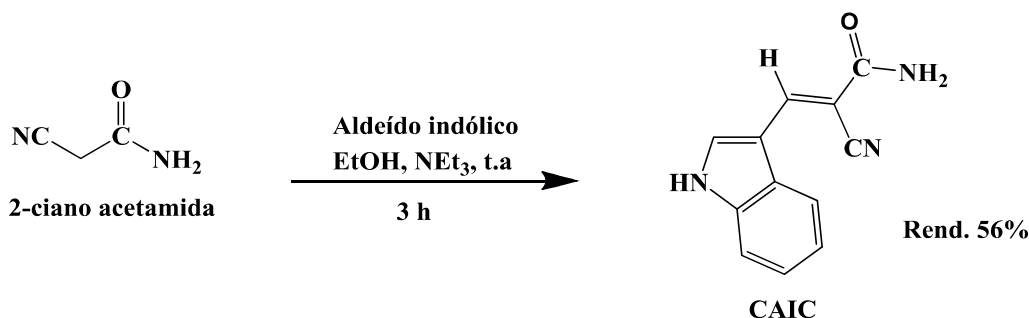


Fonte: SILVA, 2018.

Para síntese desse composto foi utilizado 0,2600 ml de 2-cianoacetato de isopropila em 5 ml de etanol (EtOH) em um balão de 50 ml, sendo solubilizado e adicionado 5 gotas do catalisador trietilamina (NEt₃), deixando a mistura sob agitação magnética durante 2 minutos. Após tempo transcorrido, foi adicionado 0,3000g de aldeído indólico e então a reação foi deixada em temperatura ambiente, durante duas horas.

Por meio de CCD, foi verificado que não havia mais a presença dos produtos de partida na mistura e então a reação foi lavada com água destilada para obtenção dos cristais por meio de precipitação do meio reacional. Após obtenção dos precipitados, os mesmos foram filtrados para seu isolamento e deixados secar, após secos através de CCD se verificou a pureza desses cristais. O produto final obtido foi denominado ICIP para melhor identificação.

- **Esquema Reacional 4:** Síntese do 2-ciano-3(I-indol-3-il) acrilamida (CAIC).

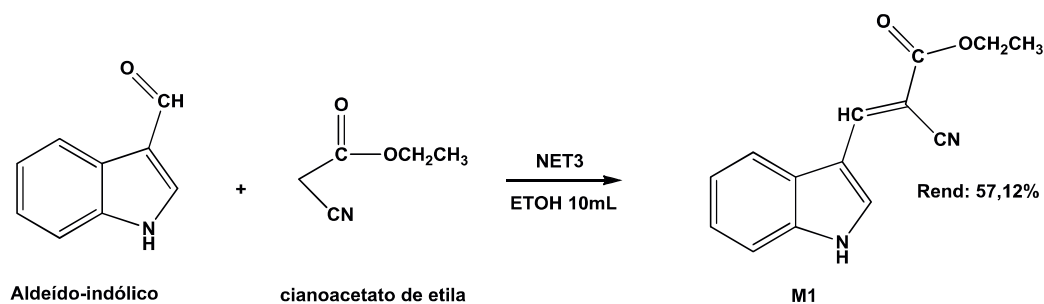


Fonte: SILVA, 2018.

Para obtenção desse composto utilizou um balão de 50 ml onde foi dissolvido 0,1752 de 2-ciano acetamida em 8 ml de etanol (EtOH) com 5 gotas de trietilamina (NEt_3), a mistura foi deixada sob agitação magnética em temperatura ambiente. Após 2 minutos foi adicionado ao meio reacional 0,3000 g de aldeído indólico, deixando reagir em temperatura ambiente.

A reação foi acompanhada por CCD e após 3h a reação apresentou consumo completo dos produtos de partida e a formação do produto final, sendo então obtido o precipitado através da adição de água destilada. O precipitado foi filtrado e os cristais não apresentaram nenhum ponto de impureza. O produto final foi denominado de CAIC.

- **Esquema Reacional 5:** Síntese do 2-ciano-3(indol-3-il)-3-cianoacetato de etila (M1).

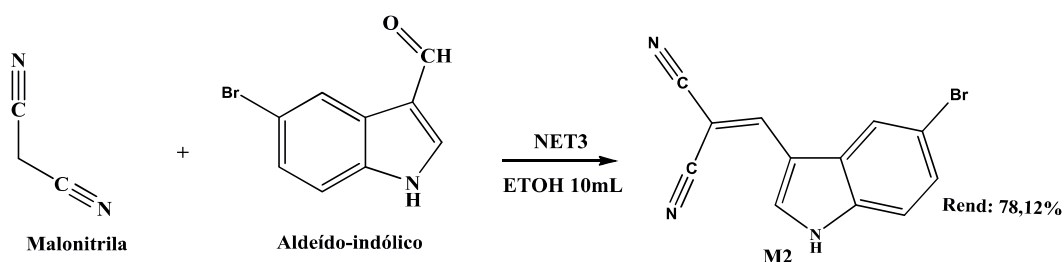


Fonte: Próprio Autor.

Para síntese desse composto foi adicionado, a um balão de 50 ml, 0,3180 ml de 2-ciano acetato de etila dissolvido em 10 ml de etanol (EtOH) com 5 gotas do catalisador trietilamina (NEt_3) e deixado sob agitação. Após 2 minutos, foi adicionado à mistura 0,3000 g de indol-3-carboxialdeído (aldeído indólico), sendo necessário aquecimento inicial de 10 minutos para que ocorresse a dissolução total dos produtos de partida. Após tempo transcorrido, a temperatura foi desligada, deixando a mistura sob agitação magnética em temperatura ambiente.

A reação foi acompanhada através de CCD onde após 24h não demonstrava andamento, sendo necessário a adição de 0,3180 ml (1Eq) de 2-ciano acetato de etila e elevando a temperatura para aproximadamente 100°C , deixando sob agitação magnética. Após 144h de reação, foi verificado que não havia mais presença de produto de partida e formação do produto final. O produto final foi denominado de M1.

- **Esquema Reacional 6:** Síntese do 2-(5-bromoaldeído-3-carbonil) -malononitrila (M2).

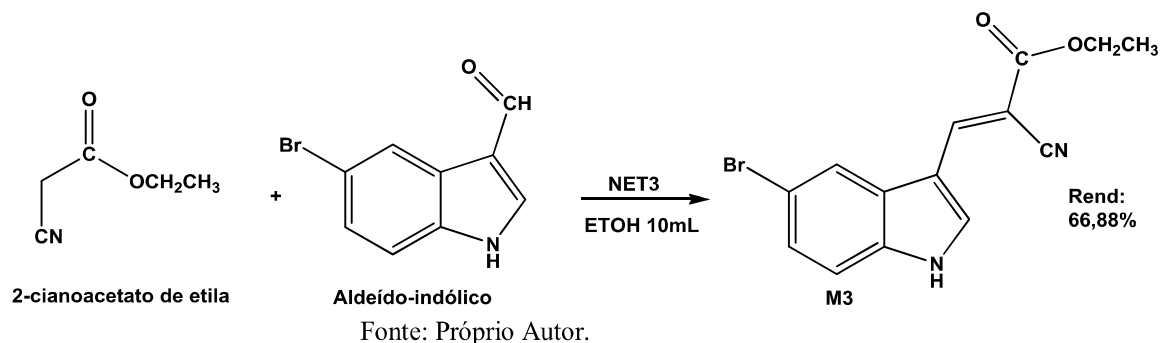


Fonte:

Fonte: Próprio Autor.

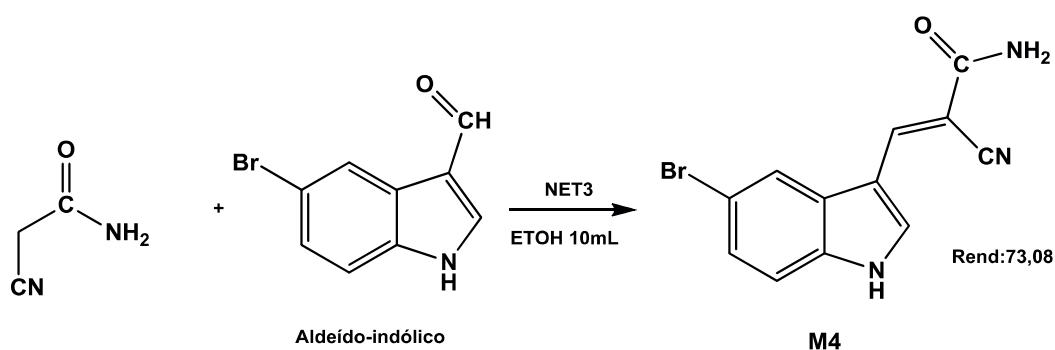
Em um balão de 50 ml foi adicionado 0,2000 g de bromo-indol dissolvido em 10 ml de etanol (EtOH) com 5 gotas de trietilamina (NEt_3), deixando sob agitação 2 minutos. Após tempo transcorrido, foi adicionado 0,12406 g de malononitrila e a mistura foi deixada sob agitação magnética no banho de gelo com aproximadamente 0°C . A reação foi acompanhada por CCD e após 2h e 30 minutos foi verificada a formação do produto final, sendo então a mistura lavada com etanol gelado e após precipitado foi filtrado. Os cristais obtidos foram pesados e denominados de M2.

- **Esquema Reacional 7:** Síntese do 3-(5-bromo-indol-3-il) -2-ciano-3-acetato de etila (M3).



Para síntese desse composto, em um balão de 50 ml foi adicionado 0,2000 g de bromo-indol dissolvidos em 10 ml de etanol (EtOH) com 5 gotas de trietilamina (NEt_3), deixando a mistura sob agitação por 3 minutos. Após tempo transcorrido, foi adicionado a mistura 0,4240 ml de 2-ciano acetato de etila e colocada sob agitação magnética e em temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD onde após 72h se verificou a formação total do produto, sendo então adicionada ao meio reacional água destilada para a precipitação dos cristais. O precipitado foi então filtrado, pesado e os cristais foram denominados de M3.

- **Esquema Reacional 8:** Síntese do 3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-cianoacetato de etila (M4).

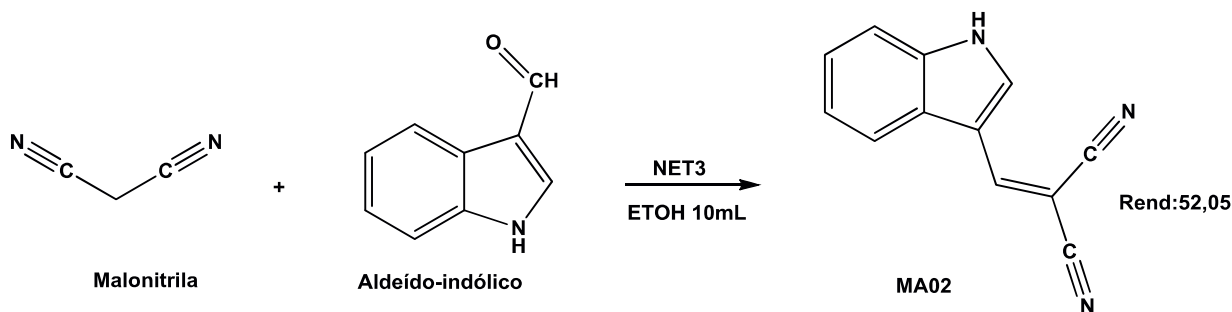


Para síntese desse composto, foi adicionado a um balão de 50 ml, 0,3000 g de bromo-indol dissolvido em 10 ml de etanol (EtOH) com 5 gotas de trietilamina (NEt_3), e deixado sob agitação durante 2 minutos. Após o tempo transcorrido, foi adicionado 0,1135 g de 2-ciano acetato de amida e a mistura foi deixada sob agitação magnética em temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD e após 24h foi

verificado o consumo total dos produtos de partida e a formação do produto final.

A reação foi lavada com água destilada para precipitação dos cristais, que foram filtrados, pesado e os cristais denominados de M4.

- **Esquema Reacional 9:** Síntese do 2-(1H-indol-3-il)-malononitrila (MA02).



Fonte: Próprio Autor.

Para síntese desse composto foi adicionado, a um balão de 50 ml, 0,1716 g de malononitrila dissolvido em 10 ml de etanol (EtOH) com 5 gotas de trietilamina (NEt_3), deixando sob agitação durante 2 minutos para dissolução total do produto de partida. Após tempo transcorrido, foi adicionado a mistura 0,2 g de indol e deixou a mistura sob agitação magnética em banho de gelo com temperatura aproximada de 0°C . A reação foi acompanhada por CCD e apresentou dificuldade para ocorrer, onde após 190 horas foi retirada da agitação e colocada sobre refrigeração por 72h.

Após 72h foi adicionado a mistura mais 0,1800 g de malononitrila com 5 ml de etanol ao meio reacional, deixando reagir em temperatura ambiente. Após 24h, a reação foi desligada e por meio de CCD se verificou a formação do produto final com consumo dos produtos de partida e então foi lavada com etanol gelado e os precipitados foram filtrados. Os cristais não apresentaram pontos de impureza na CCD, sendo então cristais aparentemente puros.

4.3 Descrição do Teste Realizado

4.3.1 Teste de citotoxicidade por hemólise

Para avaliação da atividade citotóxica dos compostos sintetizados, utilizou-se o método de hemólise de hemácias. Para realização do teste foram coletados cerca de 6 mL através de um cálculo prévio realizado a partir da quantidade de moléculas que iriam ser utilizadas. O tipo sanguíneo testado foi apenas O+ de um doador voluntário.

O tipo sanguíneo utilizado nesse teste não leva necessariamente o descarte da utilização de qualquer outro tipo sanguíneo. De fato, seria de muito interesse a realização do teste frente a mais grupos sanguíneos, onde os resultados poderiam se apresentar de forma diferente perante a outros tipos de sangue, podendo até haver capacidade de lise maiores das moléculas testada.

Assim, primeiramente foi preparado uma suspensão dos eritrócitos, para isso o sangue coletado foi lavado e centrifugado 3 vezes, durante 5 minutos cada vez, onde em cada processo de centrifugação o sobrenadante era descartado. Após obter a suspensão eritrocitária, foi retirado 2 mL do sedimentado que foi homogeneizado com solução salina em um balão volumétrico, aferido até 25 ml. Essa quantidade de 2 mL de eritrócitos foi o necessário para que não houvesse mais hemácias do que concentração de moléculas fazendo com o teste apresentasse falsos resultados. Como segundo passo, foi preparado uma suspensão das moléculas em análise, pensando cerca de 5 mg de cada uma. As moléculas foram depositadas em tubos de ensaio identificados corretamente, e a cada um desses tubos foram adicionados 10 mL de solução salina e 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) completando a mistura.

Vale salientar que todas essas concentrações foram definidas em testes prévios, antes do teste definitivo, através de adequações tanto das concentrações moleculares como da suspensão eritrocitária. Sendo importante para dá equilíbrio ao processo e para obtenção de dados seguros. Em outras concentrações moleculares e em outras quantidades de hemácias os resultados podem ser diferentes.

Tendo em mãos as suspensões preparadas, a cada tubo de ensaio contendo as suspensões das moléculas foram adicionados 1 mL da suspensão eritrocitária e então as misturas foram deixadas em repouso por aproximadamente 1 hora. Esse repouso é necessário para que haja as hemólises das hemácias de forma adequada entretanto, não quer dizer para hemólise de qualquer composto o mesmo tempo possa ser utilizado, já que cada substância ou molécula possuem tempo de permear a membrana diferentes, podendo até chegar a vários dias. Após transcorrido o tempo, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos e em seguida foi retirado de cada um cerca e 2 ml do sobrenadante. Os sobrenadantes obtidos foram lidos no espectrofotômetro, sendo as leituras das absorbâncias realizadas no comprimento de onda de 540 nm e todos os

resultados foram comparados ao líquido de Turk que hemolisa hemácias de forma total.

O teste foi realizado em duplicata e o estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, com número 0511/15, CAAE; 49005615.7.0000.5188.

4.4 Descrições dos materiais utilizados para comprovação estrutural e acompanhamento das sínteses.

4.4.1 Realização da Síntese

As sínteses foram realizadas no laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Utilizando agitadores magnéticos e condensadores.

4.4.2 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos através da leitura dos discos de KBr^+ dos compostos em Espectrofotômetro de FTIR, IRPrestige-21, da Shimadzu®. Os dados foram tratados com auxílio do software Origin 8.0. Uma parte dos espectros de IV foram obtidos no laboratório de síntese da UFPE e outros com parceria com a UFPB.

4.4.3 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro: Bruker Avance, 400 à 500 MHz, Ultrashield® e o tratamento dos espectros realizados no software MestReC 4.8.6.0. Uma parte dos espectros de ^1H e ^{13}C foram obtidos no laboratório de síntese da UFPE e outros com parceria com a UFPB.

4.4.4 Espectrometria de Massas

As medidas das massas exatas (EM) foram obtidas em espectrômetro de Massa *MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)*. *Laser Nd:YAG, smartbeam 1, 355 nm Freq. laser: 100 Hz*, Programa: *FlexControl Versão 3.0 (Bruker Daltonics)*. Placa *MALDI: MTP 384 ground steel (Bruker)*, Adaptador p/ placa: *MTP target frame III (Bruker)*. Exportação dos dados foram realizada no Programa *FlexAnalysis Versão 3.0 (Bruker Daltonics)* e a Calibração externa utilizando matriz

alfa-ciano e mistura padrão de peptídeos (*Bruker*). Os espectros foram obtidos com parceria com a CETENE/PE.

4.4.5 Ponto de fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas através de uma pequena amostra do produto, colocada em um capilar e analisadas através do *aparelho Quimis® Modelo Q-340M*.

4.4.6 Cromatografia

As cromatografias analíticas em camada delgada foram efetuadas em placas *FLUKA Analytical* sílica gel de 0,25 mm de espessura. As revelações das mesmas foram feitas por luz ultravioleta (254 ou 365 nm).

4.4.7 Cálculo teórico do Log de P e da Energia de Gibbs

O cálculo do Log de P e da Energia de *Gibbs* foram realizado através do programa *ChemDraw Ultra 12.0®*, sendo o Log de P teórico, calculado para cada moléculas sintetizadas, e para o cálculo teórico para Energia de *Gibbs*, a energia mínima foi calculada para os compostos sintetizados.

4.4.8 Aparência

A aparência dos compostos (cor e textura) foi avaliada apenas por observação visual do produto.

4.4.9 Docking Molecular

O *docking* molecular foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF). As estruturas bidimensionais das moléculas foram desenhadas e a estrutura tridimensional determinada. Em seguida foram aplicados o método de mecânica molecular MM+ e o método semi-empírico AM1 para otimizar a geometria das estruturas. Esses procedimentos foram realizados no *software HyperChem versão 8.0.7* para *Windows*.

Utilizou o *Protein Data Bank* para obter a estrutura do alvo: a *topoisomerase II* alfa, onde a macromolécula foi cristalizada juntamente ao *etoposído* utilizado como inibidor da *topoisomerase II*, este utilizado como parâmetro de referência. Esse

Etoposido é o fármaco quimioterápico que ajudou a determinar as coordenadas do alvo, servindo como controle do estudo *in silico*. O *docking* molecular foi realizado no software *Molegro Docker* para *Windows*

O ligante e a macromolécula foram importados para o *workspace*, e para isso foram retirados os cofatores, as moléculas de água e outra molécula qualquer que pudesse interferir nos resultados. No caso do ligante cristalizado, o *Etoposido*, determinado como ligante principal para guiar a área de busca, descobrindo as melhores interações com o alvo e as melhores formações de complexos enzima-ligante.

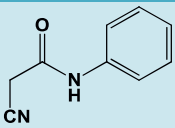
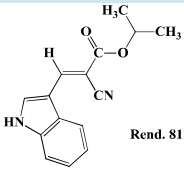
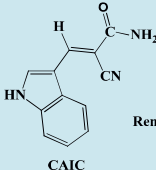
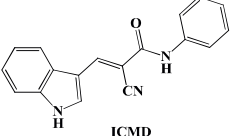
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

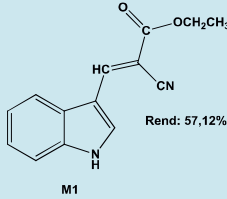
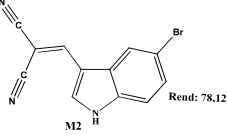
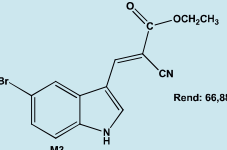
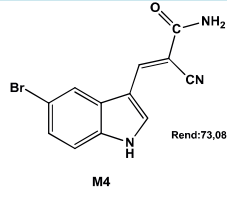
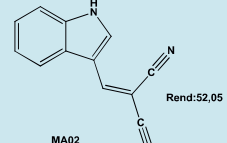
5.1 Síntese

Tendo como objetivo desenvolver a síntese de possíveis compostos mais potentes, que possam ser utilizados na terapia do câncer, foram sintetizados oito derivados indólico-acrilamidas. A partir desses compostos, foram realizados os estudos preliminares *in silico* utilizando a metodologia do *docking* molecular, tendo como alvo a *topoisomerase II α* para avaliação da interação dos compostos sintetizados com o complexo *DNA-Topo II α* , sendo mais fácil, a partir de então, escolher a molécula mais promissora para os futuros testes.

Para maior compreensão das reações realizadas, a tabela demonstra o produto final e as denominações escolhidas para cada composto.

Tabela 3: Demonstração dos produtos finais e suas denominações.

Nomenclatura (nome químico)	Código	Produto Final
2-ciano N-fenilacetamida	JM01	 <p>JML01 Rend. 77%</p>
Isopropil-3-(Indol-3-il)-2-cianoacrilato	ICIP	 <p>ICIP Rend. 81%</p>
2-ciano-3(I-indol-3-il) acrilamida	CAIC	 <p>CAIC Rend. 56%</p>
2-ciano-3 (IH-indol-3-il) -N-fenilacrilamida	ICMD	 <p>ICMD Rend. 60%</p>

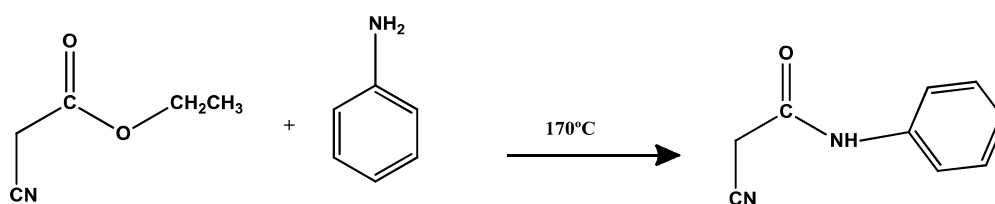
2-ciano-3(indol-3-il)- 3-cianoacetato de etila	M1	
2-(5-bromoaldeído-3- carbonil) - malononitrila	M2	
3-(5-bromo-indol-3- il) -2-ciano-3-acetato de etila	M3	
3-(5-bromo-1H- indol-3-il)-2- cianoacetato de etila	M4	
2-(1H-indol-3-il)- malononitrila	MA02	

Fonte: Próprio Autor.

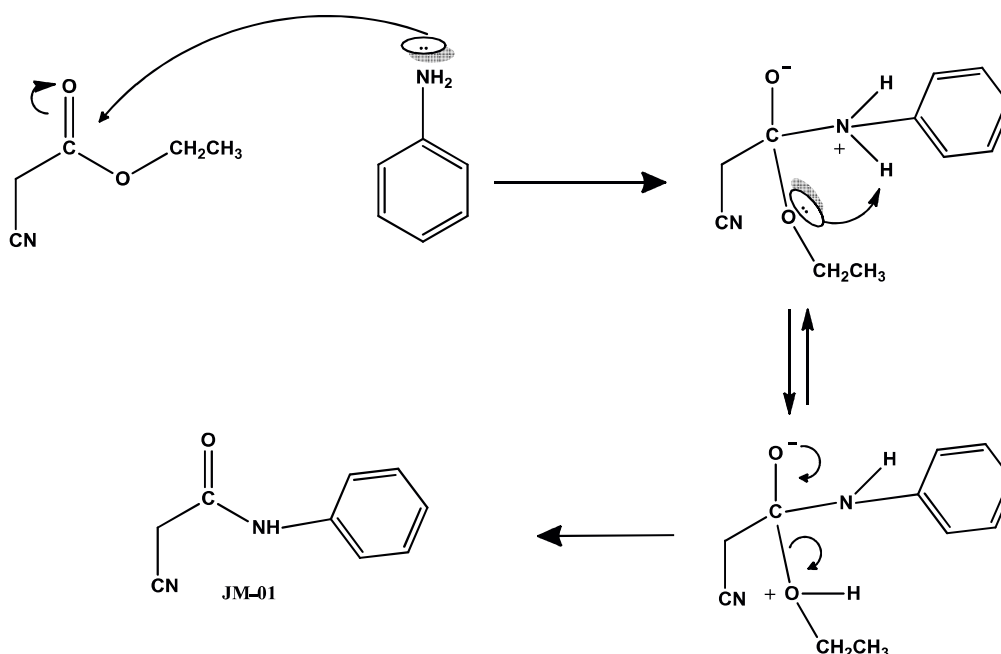
A primeira molécula sintetizada foi a JM-01, que foi utilizada como agente intermediário para a síntese do composto final denominado como ICMD, conforme foi descrito na metodologia acima. Para a obtenção desse composto, foi utilizada uma reação de amidação, onde ocorre uma ressonância na carbonila que favorece um ataque nucleofílico dos pares de elétrons livres do nitrogênio da anilina ao carbono da carbonila da função éster. Ao ocorrer esse ataque, um hidrogênio é transferido do nitrogênio para o oxigênio do éster, produzindo ao final um íon etanólico num processo conhecido quimicamente como prototropismo, e em seguida esse íon é eliminado em forma de uma molécula de etanol, formando no final uma amida (SILVA, 2018).

Para esclarecer melhor o mecanismo reacional para obtenção do composto JM-01, Silva (2018), em seu trabalho intitulado: *Planejamento e Desenvolvimento de Novos Derivados Acridínicos, Quinolínicos, Indólicos e Piridínicos com Potencial Atividade Antitumoral*, propôs o possível esquema de mecanismo para esta reação (SILVA, 2018).

- **Esquema Reacional 10:** Provável mecanismo para a obtenção do JM-01.



MECANISMO REACIONAL



Fonte: SILVA, 2018.

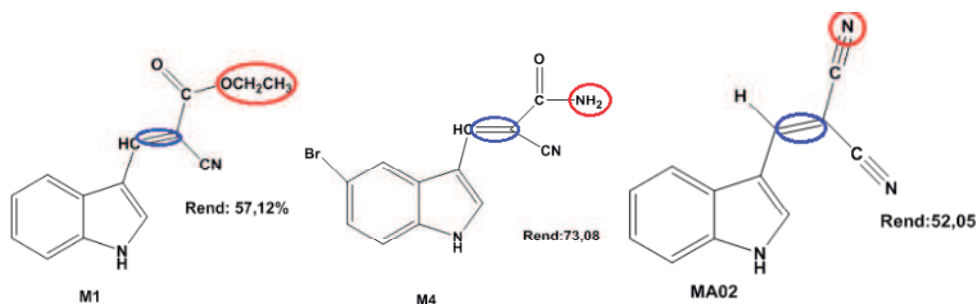
Os compostos foram sintetizados a partir de uma rota sintética simples, lançando mão de reações de condensação para obtenção dos compostos finais. Essa reação foi escolhida devido ao fato de ser uma ótima estratégia sintética, já que se caracteriza como uma reação multicomponente onde ocorre a conjugação de várias moléculas ou grupamentos funcionais diferentes. Além do mais, a mesma apresenta uma ótima variabilidade química devido à possibilidade de substituição diferente em cada uma das moléculas envolvidas. São reações que dependem da condição na qual esteja realizando a síntese, podendo durar tempo considerável, dependendo da metodologia de aquecimento utilizada (GRAEBIN et al., 2005).

As condensações de compostos carbonilados são muito importantes em síntese orgânica para formação de uma nova ligação carbono-carbono. Em sua versão mais

simples, esta é realizada a partir dos substratos carbonilados sobre catálise básica ou ácida. (DA SILVA et al.,2001). A base escolhida foi a trietilamina utilizada para retirar um próton do carbono entre o grupamento ciano e a carbonila, em seguida o carbono da carbonila dos aldeídos sofre um ataque nucleofílico do carbono com o par de elétrons livres, ocorrendo por fim a condensação. Para facilitar o entendimento, a trietilamina é utilizada na reação como catalisador, já que possui a capacidade de transferir seu próton para o oxigênio do aldeído, o que faz com que haja uma restauração da base a partir da formação de uma hidroxila (OH) e sua liberação da forma de água.

Como estratégia de planejamento, se lançou mão de FBDD que é conhecida do inglês *farmacophore-based drug desig*, partindo de um grupamento farmacofórico já reconhecido por suas características farmacológicas, como o caso do anel indol utilizado em todos os compostos. Para modificações moleculares, foram adotadas variações na cadeia carbonílica ligada ao anel indol, utilizando reações de substituições de bioisómeros não-clássicos, e para restringir a rotação da molécula para menores conformações, se optou pela introdução de um grupo vinílico, ou seja, uma ligação dupla, como é demonstrado na figura 10.

Figura 14: Estratégias de modificações adotadas.



Fonte: Próprio Autor

É possível observar que há uma substituição de grupamentos na ramificação do anel indol em todas as estruturas, essas substituições recebem o nome de bioisosterismo não clássico. Essa metodologia foi adotada para que houvesse a derivação dessa cadeia carbônica ligada ao anel farmacologicamente ativo, onde as substituições realizadas não seguem o padrão de similaridade eletrônica e estéricas, porém os grupamentos substituintes circulos em vermelho na imagem acima, demonstram a sua diferença em testes realizados mais adiante, como no caso da atividade hemolítica discutida mais a frente, fazendo com que fosse possível direcionar-se ao grupo mais tóxico para

eritrócitos humanos. Além do mais, a partir dessas substituições foi possível prever as alterações no coeficiente de partição e podendo modular a ligação dessas moléculas com o alvo *Topo II α* a partir dessas substituições, partindo da premissa de alguns grupamentos já privilegiados.

É possível também observar que em todas as moléculas há a introdução de uma dupla ligação entre carbonos, utilizado para causar uma restrição conformacional, buscando fixar uma determinada conformação, já que ligações simples apresentam uma maior facilidade de rotação entre os átomos e torna o fármaco mais flexível, podendo o mesmo assumir outras conformações que podem ser inativas ou atuarem de outra forma. Além do mais, essas restrições facilitam o reconhecimento molecular de dado sítio-receptor, o que seria benéfico já que facilitaria essa interação fármaco-alvo.

Dessa forma, restrições conformacionais levam a uma reconfiguração da molécula, onde está pode assumir configurações diferentes com a mesma forma molecular como isômeros. Essas reações de condensação levam geralmente a compostos com configuração E por estar mais impedido dentro da estrutura a assumir a outra conformação.

5.2 Caracterização físico-química dos derivados acrilatos-indólicos.

Na tabela 4 estão resumidos os dados das características físico-químicas dos compostos sintetizados, como: aparência, peso molecular teórico, rendimento teórico, fator de retenção, ponto de fusão, e a o Log de P teórico calculado através do programa *ChemDraw*.

Tabela 4: Caracterização Físico-Química dos compostos sintetizados.

Molécula	Aparência	PM	Rend %	RF	FF	FM	LogP
ICMD	Pó Amarelo	287,106	60,37	0,55	276-277	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	2,62
ICIP	Pó Amarelo	254,105	81,27	0,62	200-202	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,29
CAIC	Pó Amarelo	211,074	56,22	0,50	244-245	C ₁₂ H ₉ N ₃ O	0,72
MA02	Pó Amarelo	196,230	52,05	0,30	227-228	C ₁₂ H ₁₀ N ₃ O	1,93
M1	Pó Amarelo	258,271	57,12	0,76	144-145	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃	1,10
M2	Pó Amarelo	291,120	78,12	0,68	275-276	C ₁₂ H ₉ N ₃ O	1,80
M3	Pó Amarelo	340,197	66,88	0,80	235-236	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ BR	1,93

	pálido						
M4	Pó Amarelo pálido	311,159	73,08	0,75	185-187	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂ BR	1,06

F.F. – Faixa de fusão; **Rf** – Fator de retenção; **PM** – Peso molar; **FM** – Fórmula molecular; **Rend%**

Rendimento (%). ^an-hexano/Acet.* M4 acetato de etila.

Através desses resultados expostos, é possível observar que todos os compostos sintetizados obtiveram rendimentos satisfatórios, com valores variando entre 52,05 a 81,27%, o que comprova a viabilidade da rota sintética adotada. Algumas moléculas necessitaram de um processo de purificação, já que as mesmas apresentaram manchas na CCD abaixo do fator de retenção, indicando possível impureza. Para isso, foi adotado um processo simples, utilizando apenas filtração e uma lavagem abundante com uma mistura de etanol e água destilada aquecido na proporção de 1:1, fazendo com que a molécula precipitasse novamente e a impureza saísse no sobrenadante. Vale ressaltar que a facilidade de retirada dessa impureza se dá ao fato de estarem em RF abaixo da mancha do produto se caracterizando como manchas mais polares, capazes de serem arrastadas pela mistura de água e etanol. Após esse processo de purificação, se observou que os cristais se apresentaram mais puros na placa de sílica, com o valor do RF entre 0,5 e 0,8 cm, considerando que o valor de referência é de 0 até 1 cm.

A coloração dos compostos foi realizada a partir de uma observação visual, durante alguns dias, para identificação de possíveis mudanças de cor, o que poderia indicar algum tipo de degradação das moléculas sintetizadas. Dessa forma, todos os produtos obtidos apresentaram variações de cores dentro do amarelo, variando apenas na sua intensidade, onde os compostos M3 e M4 apresentaram um amarelo-pálido e o composto M1 apresentou um amarelo-escuro. Esse resultado demonstra a homogeneidade das reações realizadas.

As reações que necessitaram do uso de uma temperatura elevada, como os compostos ICMD, M1 e M3, foi necessário para favorecer a ressonância das ligações π da carbonila ao aldeído, já que este é caracterizado como um grupamento fortemente reativo que não contém grupo que possa ser substituído e assim age por mecanismo de ataque nucleofílico. Esses aldeídos são geralmente carbonilados, contendo pares de elétrons não compartilhados no oxigênio que são capazes de protonar ou atacar um ácido ou base, e o carbono da carbonila é eletrofílico e então pode ser atacado por um

nucleófilo. Além do mais, aldeídos possuem, quimicamente, menor interação estérica e menor impedimento ao ataque de um nucleófilo.

Mesmo na presença do catalisador utilizado, a partir de certo tempo de reação, a mesma não apresentava andamento, sendo necessária a utilização de uma temperatura elevada para que a energia do sistema aumentasse e favorecesse a formação da ligação dupla entre o carbono do aldeído e carbânio formado do grupo metileno reativo, levando em consideração que o aldeído é extremamente reativo e talvez a base utilizada não tenha sido suficiente para fornecer ao sistema energia capaz de formar ligação dupla C=C e de finalizar a mesma. Principalmente para as moléculas ICMD, M1 e M3 que as cadeias carbônicas utilizadas para condensação com aldeído eram mais extensas que as demais usadas para as outras reações.

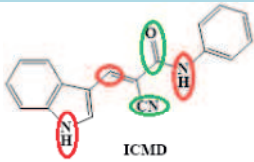
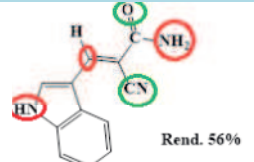
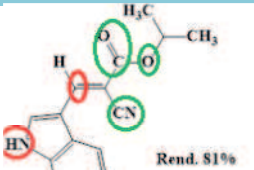
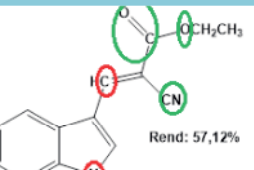
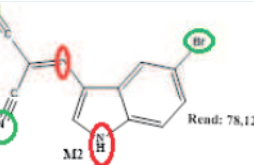
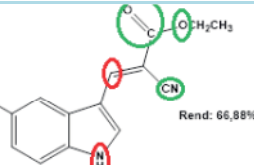
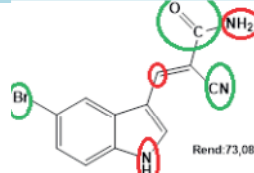
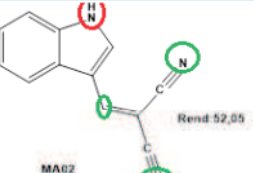
O fator de retenção das moléculas foi realizado em placa de sílica, onde o sistema utilizado para a maioria foi o hexano/acetato em várias concentrações, com exceção da M4 que apresentou dificuldade nesse sistema, sendo então utilizado acetato de etila. Através desses resultados é possível observar a polaridade das moléculas a partir da centralização dos valores obtidos, esperando sempre que esses esteja numa faixa entre 0 e 1.

O ponto de fusão é importante para avaliar as oscilações possíveis entre o momento inicial e o final onde a amostra fica em estado líquido, essas faixas de temperatura oferecem informações do quanto os compostos estão puros ou não. Dessa forma, as oscilações obtidas não foram maiores que 4°C, que é a faixa de oscilação sugerida para indicar que o composto se encontra puro, e que não há nenhuma “sujeira” capaz de alterar seu ponto de fusão dificultando sua passagem do estado sólido para o líquido, e assim todos os produtos obtidos apresentaram grau de pureza adequado, pois não possui uma variação de intervalo de temperatura mais longo.

Os valores de log de P, conhecido como coeficiente de partição, é um parâmetro utilizado na química farmacêutica como uma ferramenta para estudos de QSAR dando valores quantitativos de lipofilia dos compostos biologicamente ativos, trazendo uma melhor compreensão do comportamento farmacocinético desses compostos sintetizados. Os valores apresentados nesses resultados foram calculados pelo ChemDraw 3D e analisados de acordo com as regras de Linpsky, onde estabelece que uma molécula para ser considerada um bom fármaco deve apresentar valores múltiplos

de 5: o log de P dever ser menor ou igual a 5, a massa molecular calculada deve ser menor ou igual a 500g/mol, os aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 e os aceptores de hidrogênio menor ou igual a 5. Todas as moléculas sintetizadas se enquadraram nos parâmetros pedidos, como pode ser observada na tabela abaixo, mostrando o composto indólico-acrilamida M3 como referência para os demais.

Tabela 5 : Demonstração de grupos aceptores e doadores de ligação de H.

 <p>ICMD Rend. 60%</p>	 <p>CAIC Rend. 56%</p>
 <p>ICIP Rend. 81%</p>	 <p>M1 Rend: 57,12%</p>
 <p>M2 Rend: 78,12%</p>	 <p>M3 Rend: 66,88%</p>
 <p>M4 Rend: 73,08</p>	 <p>MA62 Rend: 52,05</p>

Legenda: Circulado em verde referentes a grupos aceptores; circulado em vermelho referentes a grupos doadores.

Através da tabela é possível perceber os grupos circutados em vermelho doadores de ligação de hidrogênio e circutados em verde os grupos aceptores de ligação de hidrogênio. Seguindo a teoria de que elementos com 5, 6 e 7 elétrons na camada de valência são suscetíveis de receberem um hidrogênio, na tentativa de se estabilizar eletronicamente, como é o caso dos elementos O da função carbonila e da função éster e o Br ligado ao anel indo, como também do N das nitrilas. Já elementos contendo 1, 2 e 3 elétrons em sua última camada eletrônica, são mais suscetíveis de doarem

hidrogênios como a amina do anel indol e o CH da dupla ligação são grupamentos doadores de ligação de hidrogênio. O CH₃ que acompanha estruturalmente a função éster das moléculas M1 e ICIP não exerce nenhum efeito como doador ou aceptor, pois não apresenta nenhuma diferença eletrônica que seja significativa ao ponto de realizar uma ligação de hidrogênio por qualquer uma das formas.

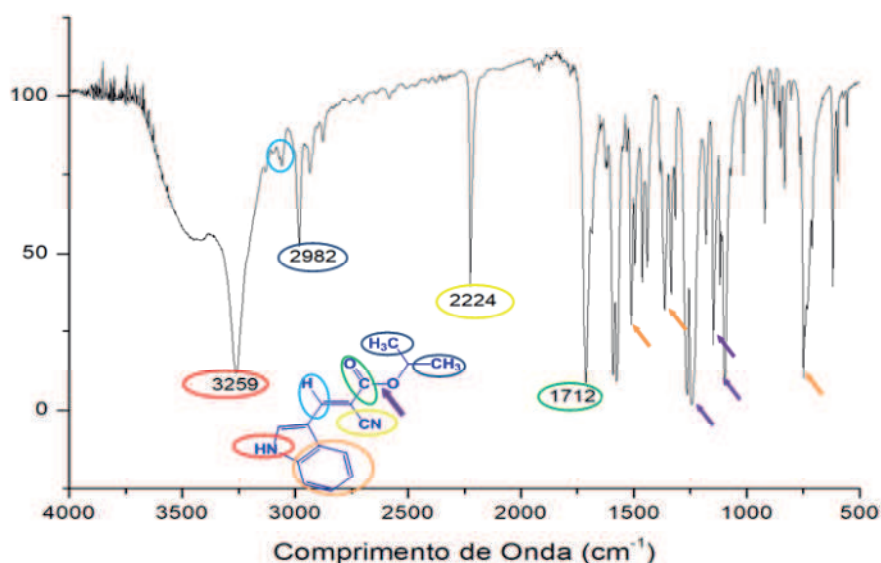
O Log de P, nesse caso, mostra certo equilíbrio, já que o valor adequado na literatura é de 0 à 3 para apresentar equilíbrio hidrofílico-lipofílico. Dessa forma, a molécula demonstra boa solubilidade em seus parâmetros farmacocinéticos e boa permeação numa membrana biológica. Lembrando que esses valores são teóricos, calculados por um programa computacional e podem divergir dos valores futuramente obtidos em testes in vivo.

5.3 Elucidação estrutural dos derivados acrilatos-indólicos.

Para identificação e caracterização dos compostos, foram realizadas as técnicas de RMN para ¹H e ¹³C, infravermelho-IV e Massas para os compostos ICMD, ICIP e CAIC. Para o composto MA02 só foi possível realizar o RMN de ¹H. A elucidação estrutural desses compostos foi realizada pelo LSVM em parceria com colaboradores da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A figura 14 é referente ao espectro de IV do composto, tomado como composto de referência para os demais.

Figura 15: Espectro de IV do composto ICIP.



Sendo o IV uma espectroscopia de absorção que utiliza a região do infravermelho, é comumente usada para a identificação de um composto ou determinar a sua composição. É uma das técnicas mais úteis para a síntese e transformações orgânicas. Dessa forma, nos espectros de IV dos compostos acima citados, é possível observar valores de absorção entre intervalos de 3175 cm^{-1} a 3558 cm^{-1} valor de absorção referente ao estiramento N-H de amins primárias e secundárias como também amidas. O pico próximo a 3350 cm^{-1} , observado no espectro, é indicativo de uma amida primária, caracterizado por pico baixo de absorbância. Nos picos de absorbância a seguir, é possível observar regiões de absorção como um estiramento em 3040 cm^{-1} sendo este característico de carbono sp^2 ($=\text{CH}$) referente aos carbonos dos anéis aromáticos, na região próxima à 1640 a 1723 cm^{-1} observa-se uma absorção referentes a função carbonila ($\text{C}=\text{O}$), em 1600 cm^{-1} observa-se uma região de absorção referente ao dobramento N-H da amida, na região entre 1570 cm^{-1} e 1442 cm^{-1} é possível observar o estiramento de ligação carbomo-carbono ($\text{C}=\text{C}$) referente aos anéis aromáticos, dentro do intervalo de 2208 a 2260 cm^{-1} é possível observar valores e bandas de absorção de ligação C-N do grupamento nitrila (CN), e por fim nas regiões de absorção próximas a 734 e 690 cm^{-1} é possível observar um estiramento C-H referente as ligações fora do anel aromático.

Para maior facilidade de compreensão, os valores foram das absorções de IV foram esquematizadas na tabela 6. As imagens dos espectros serão encontradas nos apêndices.

Tabela 6: Dados obtidos pela Espectroscopia de IV.

COMPOSTO	IV (valores em cm^{-1})
ICMD	3433 (estiramento N-H da amina secundária); 3322 (estiramento N-H da amida secundária); 3040 (estiramento $=\text{C-H}$); 2212 (estiramento CN); 1640 (estiramento $\text{C}=\text{O}$); 1600 (dobramento N-H da amida), 1570 e 1442 (estiramento $\text{C}=\text{C}$ e aromático); 1497 (dobramento N-H da amina); 734 e 690 (estiramento C-H fora do plano de aromático monossustituído)
ICIP	3259 (estiramento amina secundária); 3060 (estiramento $=\text{C-H}$); 2982 (estiramento C-H sp^3); 2224 (estiramento CN); 1712 (estiramento $\text{C}=\text{O}$); 1661, (dobramento N-H); 1275 e 1050 (estiramento C-O éster); 785 (estiramento C-H fora do plano de aromático ortossustituído).

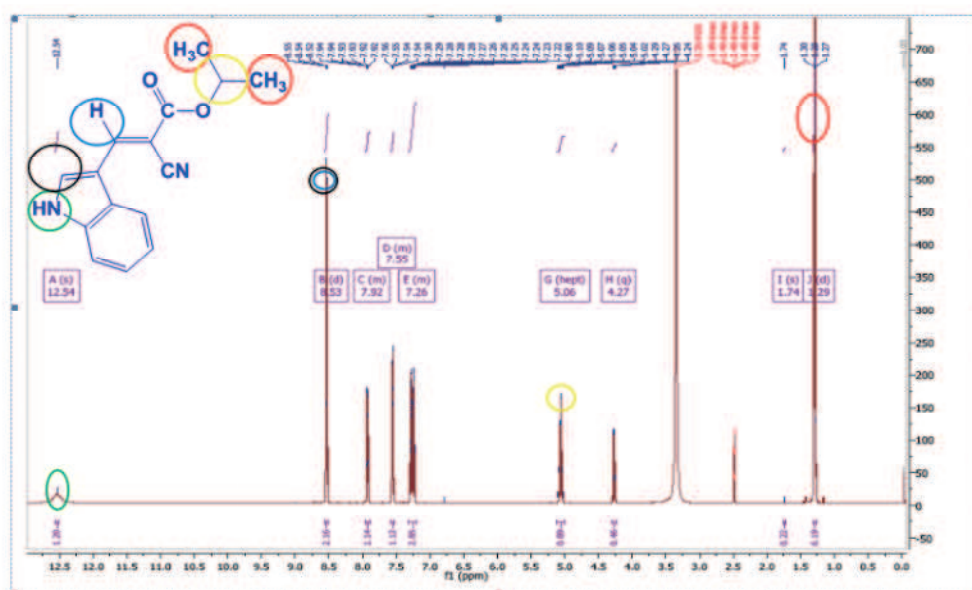
CAIC	3558 (estiramento amina); 3453 e 3285 (estiramento N-H-amida primária); 3085 (estiramento = C-H); 2208 (estiramento CN); 1696 (estiramento C=O); 1661 (C=C alceno alifático); 1559 (estiramento C=C de aromático);
-------------	--

Fonte: Próprio Autor.

Dando continuidade as caracterizações realizadas, foram analisados os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados.

Inicialmente, foram analisados os espectros de RMN de ^1H , sendo observados sinais como singletos referentes ao grupamento NH da amina para a molécula ICIP, apresentando deslocamento químico um pouco fora da faixa que é característica entre 10,17 a 10,54 ppm. Esse deslocamento químico ligeiramente diferente é devido ao efeito de anisotropia que permite que o H fique desblindado, sendo a faixa esperada de 5,0 a 9,0 ppm. É possível observar um sinal característico de condensação entre o aldeído e o grupo metileno que conduz a formação de um grupo vinílico (C=CH) na faixa entre 9,30 e 8,27 ppm. Também se observa um pico em 12,29 ppm, sinal esse sugestivo de grupamento NH possivelmente do anel indólico, observado principalmente na molécula CAIC e ICIP por serem derivados indólicos, se caracterizando como um pico de alta absorção por sofrer também com o H desprotegido devido ao efeito de anisotropia.

Figura 16: Espectro de RMN ^1H do composto ICIP.



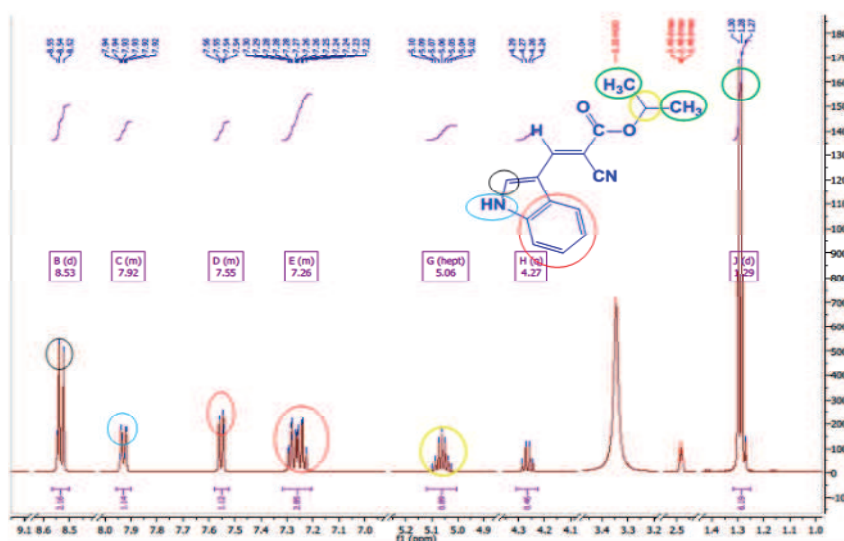
De forma geral, os espectros analisados das moléculas apresentaram singletos característicos também de reações de condensação, e sinais de hidrogênio de anéis aromáticos apresentaram deslocamento químico esperado, entre de 7,05 a 8,87, todos os deslocamentos químicos saíram de acordo com o esperado.

Tabela 7: Dados dos espectros de RMN ^1H dos compostos sintetizados.

ICMD	δ 12,43 (1H, s, NH indol); 10,17 (1H, s, NH amida); 8,62 (1H, s, C=CH ₂); 8,55 (1H, s, C=CH indol); 8,04-7,98 (1H, m, Ar indol); 7,70 (2H, d, J=7,9, Ar anilina); 7,59 (1H, m, Ar indol); 7,37 (2H, t, J=7,8, Ar anilina); 7,29 (2H, pd, Ar indol); 7,13 (1H, t, j=7,4, Ar anilina).
ICIP	δ = 9,30 (1H, s, C=CH ₂); 8,23 (2H, dt, J = 8,7, j = 0,9 Ar – acridina); 8,07 (2H, dt, J = 8,6, j = 0,9 Ar – acridina); 7,92 (2H, ddd, J = 8,8; 6,6, 1.3 Ar – acridina); 7,70 (2H, ddd, J = 8,7; 6,6, 1.3 Ar – acridina); 5,20 (1H, hept, J = 6,3, CH metina); 1,39 (6H, d, J = 6,3, CH ₃).
CAIC	δ 12,29 (1H, s, NH indol); 8,45 (2H, d, J=6,4 C=CH e C=CH indol); 7,92 (1H, dd, J=7,2 Ar); 7,76 (1H, m, NH ₂); 7,53 (1H, m, Ar); 7,43 (1H, s, NH ₂); 7,24 (2H, m, Ar).
MA02	δ 12,72 (1H, s, NH indol); 8,67 (1H, s, C=CH ₂); 8,52 (1H, s, CH indol); 8,03 (1H, m, CH Ar); 7,58 (1H, m, Ar); 7,29(2H, m, CH Ar).

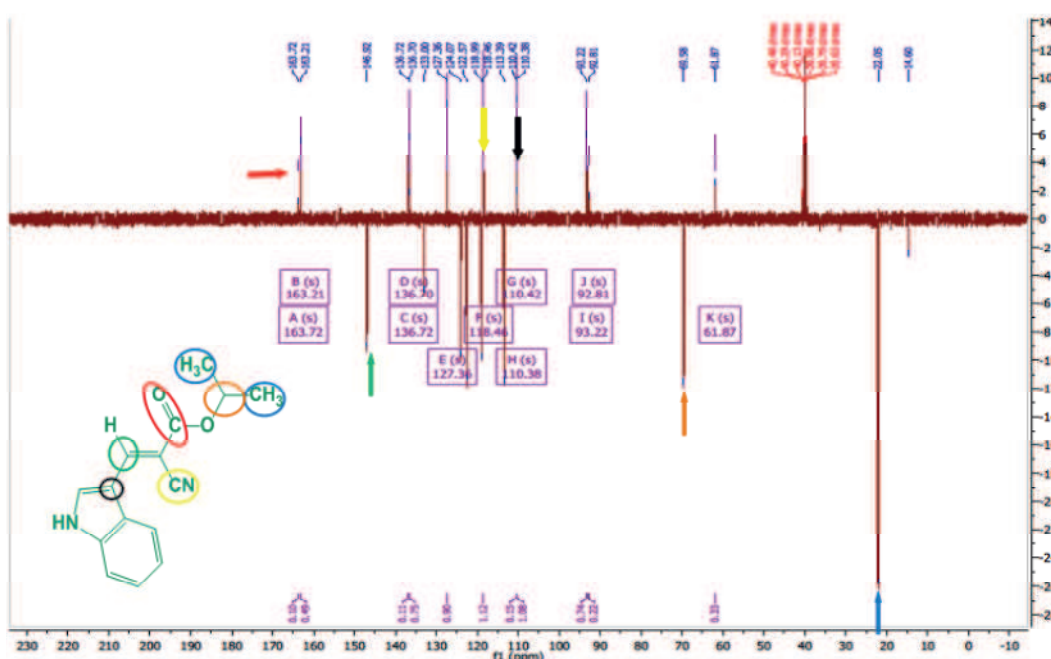
Fonte: Próprio Autor.

Figura 17: Espectro Expandido do composto ICIP.



Dando continuidade a ressonância magnética nuclear, para os espectros de RMN de ^{13}C dos produtos ICIP, ICMD e CAIC foram observados picos que comprovam a condensação dos núcleos privilegiados. De forma geral, os picos mais observados foram o do carbono ligado à carbonila com deslocamento químico entre 160,0 e 164,5 ppm, o carbono ligado a nitrila entre o intervalo de 142,7 à 153,1 ppm, sendo estes os picos de maior evidência. Deslocamento químico verificado entre de 137,0 a 122,2 referentes aos carbonos do anel indólico, todos de acordo com os deslocamentos químicos esperados pela literatura.

Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C do composto ICIP.



A tabela a seguir esquematiza todos os valores de deslocamentos de acordo com cada composto analisado.

Tabela 8: Dados dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos sintetizados.

ICMD	δ 161,7 (C, C=O); 143,2(C, C=C); 140,4(C, Ar); 137,0(C, Anel indólico); 131,1(C, Ar); 129,1(C, Anel indólico); 128,1(C, Ar); 124,4(C, Anel indólico); 123,8(C, Anel indólico); 122,1(C, Ar); 121,1(C, Anel indólico); 119,1(C, CN); 113,2(C, Anel indólico); 110,3(C, adjacente a CN).
-------------	---

ICIP	δ 163,7(C, C=O); 146,9(C, C=C); 136,7; 133,0; 127,4; 124,1; 122,6(C, Anel indólico); 119,0(C, CN); 118,9(C, Anel indólico); 113,4(C, adjacente CN); 93,2(C, Anel indólico); 69,6(C, sp ³); 22,1(C, CH ₃).
CAIC	δ 164,5(C, C=O); 142,7(C, C=C); 136,4; 130,6; 127,7; 123,7; 122,0(C, Anel indólico); 119,2(C, CN); 118,8(C, Anel indólico); 113,1(C, Anel indólico); 110,0(C, adjacente CN); 98,2(C, Anel indólico).

Legenda: a- 100 MHz, b – 125MHz

Na imagem do espectro, é possível perceber os sinais dos carbonos vinílicos observados entre os deslocamentos 142,7 e 153,1 ppm, estando dentro da faixa esperada para o sinal. Percebe-se também para nitrila os sinais dentro das faixas 115,61 e 119,34 ppm que também estão dentro da faixa de variação esperada para o sinal característico desse carbono. Também é possível observar a presença dos sinais característicos de anéis aromáticos entre as faixas entre 115,1 a 119,3 ppm, e por fim, para os sinais de carbonila, as faixas ficaram entre 160,0 e 164,5 ppm. Os espectros de ¹H e de ¹³C dos compostos ICIP e CAIC se encontram no apêndice B.

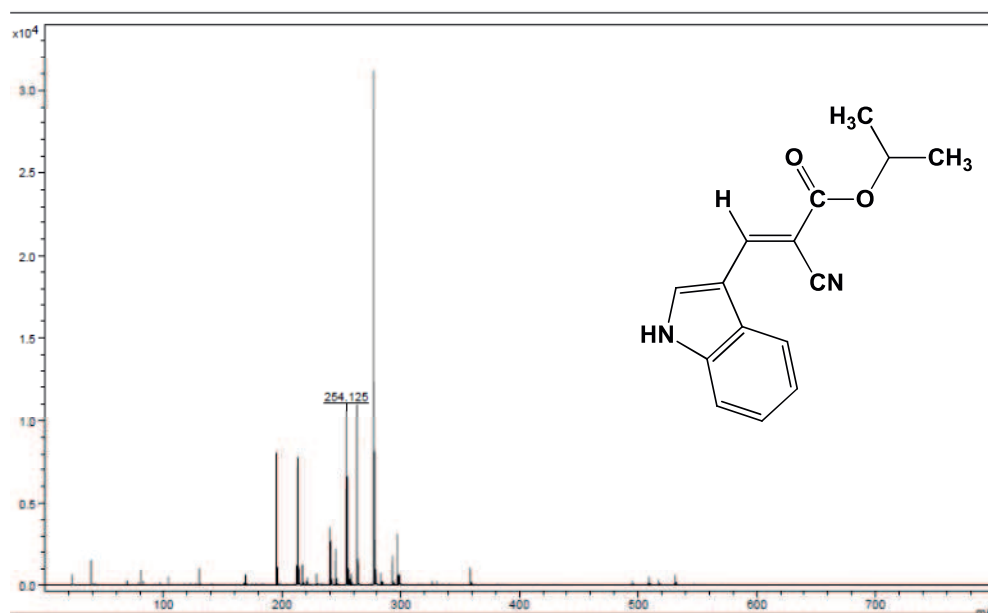
Por fim, para finalizar as caracterizações realizadas para os compostos ICIP, ICMD e CAIC, foram obtidos os valores exatos das massas a partir dos picos dos íons moleculares. Para tornar mais claro, os valores reais como também aqueles calculados estão presentes na tabela a seguir:

Tabela 9: Dados das massas exatas dos íons moleculares dos compostos.

Composto	MASSA CALCULADA[M/Z]	[M+H] ⁺	ERRO (ppm)	MASSA ENCONTRADA
ICMD	287,1059	310,0912	10,32	310,0880
ICIP	254,1055	255,1089	3856,78	254,1250
CAIC	211,0746	235,0677	39,56	235,0770

Fonte: Próprio Autor.

Os compostos tiveram uma diferença entre os valores menor que 1, sendo esta diferença aceitável na literatura, o que demonstra que o íon molecular é estável. Os espectros de massas dos compostos ICIP e CAIC se encontram no apêndice C.

Figura 19: Espectro de Massa do composto ICIP.

5.4 Avaliação da atividade hemolítica dos derivados acrilatos-indólicos.

O ensaio de citotoxicidade por hemólise permite quantificar, por meio de espectrofotometria, a toxicidade de fármacos e de outras substâncias mediante a membrana celular das células vermelhas, baseando-se na lise e liberação de hemoglobinas e na desnaturação proteica das proteínas dos eritrócitos. A relação entre hemólise e a danificação das proteínas celulares são detectadas com base na mudança de absorção das oxiemoglobinas, indicador de ambos os processos (ABREU, 2008).

A atividade hemolítica é um método de avaliação preliminar e foi realizada para todos os compostos sintetizados, onde para maior segurança dos resultados obtidos, o teste foi realizado em triplicada, onde para obtenção dos valores finais foi realizada uma média. Os valores dos resultados das hemólises se encontram na tabela abaixo, de forma esquematizada para maior compreensão.

Tabela 10: Dados da atividade hemolítica dos compostos acrilatos-indólicos.

Composto	Concentração 500µg/mL (%)
ICMD	10,26
ICIP	19,70
CAIC	10,81

MA02	10,45
M1	13,01
M2	18,97
M3	26,03
M4	2,75

Fonte: Próprio Autor.

Esse teste tem por finalidade indicar uma provável relação dose-reposta e estabelecer as condições seguras para exposição dessas substâncias em futura utilização na clínica (MARQUES, 2017). Através dos valores obtidos é possível observar que os resultados da atividade hemolítica dos compostos testados não apresentam valores discrepantes, acima de 30%, o que indica que os compostos não foram capazes de apresentar um potencial tóxico esperado para moléculas na concentração de 500 µg/mL com apenas 1hr de repouso.

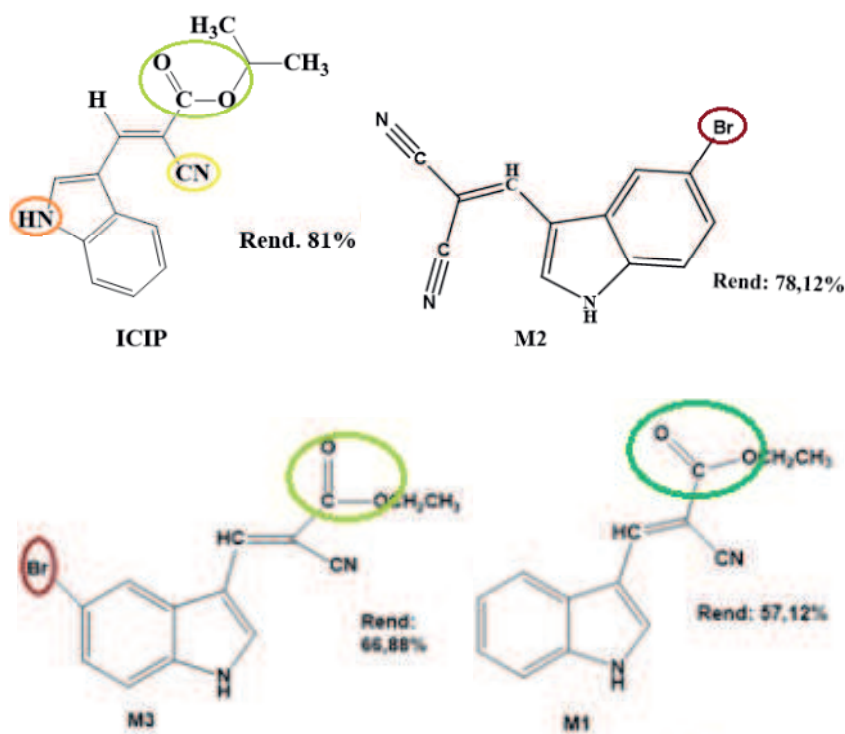
Na avaliação da atividade hemolítica nenhum dos derivados acrilatos-indólicos exibiu capacidade de causar lise em eritrócitos humanos nas concentrações testadas de 500 µg/mL, sendo apenas os compostos ICIP, M2 e M3 que apresentaram valores mais próximos de 30%, concentração necessária para o composto se enquadrar como capaz de causar hemólise em células tumorais.

Vale salientar que apenas uma hora de repouso para causar hemólise não tenha sido o suficiente e tenha interferido nos valores finais. Além do mais, esses resultados podem sugerir que os efeitos citotóxicos, possivelmente ligados a esses compostos, estejam relacionados a outros mecanismos de morte mais específicos e não ligados de forma direta a um dano celular na membrana plasmática da célula. Ou possa estar também ligado a outros grupos sanguíneos, já que a amostra possa ser de um paciente com desordens hematológicas e não totalmente saudável. Para isto, seria necessária a realização de outros testes como testes que comparem a hemólise de uma linhagem tumoral a uma linhagem saudável, ou uma comparação com a utilização de um fármaco controle como o fármaco doxorrubicina que é comumente utilizado (MARQUES, 2017).

Numa tentativa de justificar os maiores valores de hemólise (%) dos compostos M2, M3 e ICIP, pode-se observar as mudanças estruturais que poderiam ser

responsáveis por uma diferença na atividade hemolítica. Inicialmente, vamos observar os compostos que apresentaram atividade hemolítica mais expressiva, comparando as estruturas de cada um como mostra a figura 19.

Figura 20: Comparação estrutural dos compostos sintetizados.



Fonte: Próprio Autor.

Os compostos demonstrados nas imagens acima são referentes as moléculas que apresentaram hemólise acima de 10% e que de certa forma se aproximaram mais do valor de hemólise de 30%. É perceptível, através da observação que existem alterações de grupos funcionais, como o fato do composto M2 apresentar maior quantidade de nitrilas (CN) em sua constituição que os demais produtos. Porém, é possível observar elementos que são semelhantes, como a presença do bromo (Br) e do éster, e que os compostos que os continha apresentaram um maior poder de hemólise em eritrócitos humanos saudáveis. Dessa forma, é possível dizer que esses elementos inferiram na atividade hemolítica das moléculas, já que o éster por si só oferece certa toxicidade, e algumas publicações já relatam o fato do bromo apresentar toxicidade, e Silveira (2013), afirma que o elemento bromo pode sim inferir toxicidade molecular, o

que justifica os valores de hemólise mais aproximados de 30% dos compostos discutidos (SILVEIRA, et al; 2013).

O grupamento nitrila também apresenta toxicidade, porém não foi o responsável pela toxicidade causada por essas moléculas, como é possível observar na figura 19.

Outra observação pertinente, e que confirma a toxicidade inferida por esses dois grupamentos discutidos, seria o fato de que os compostos M3 e ICIP foram os que apresentaram valores de hemólise mais próximos do valor referência, onde o primeiro continha os dois grupamentos e o segundo continha apenas um. O ICIP com o grupamento éster apresentou uma hemólise de 19.70%, e o composto M3 contendo o bromo e o éster apresentou hemólise de 26.03, fazendo com que seja possível sugerir que o elemento químico que apresentou maior toxicidade para eritrócitos foi o éster, e o bromo pode ter atuado nessa molécula aumentando a capacidade hemolítica ligado ao éster.

É possível também correlacionar a hemólise do ICIP ao seu Log de P quando se observa, de forma comparativa, os valores do Log dos compostos CAIC e ICMD, localizados na tabela a seguir.

Tabela 11: Valores do Log P calculados no programa ChemDraw 3D.

Molécula	LogP
ICMD	2,62
ICIP	2,29
CAIC	0,72

Fonte: Próprio Autor.

Observando os valores acima, é possível sugerir que o valor de Log P do composto CAIC encontrado foi de aproximadamente de 0,72, o que faz com que a molécula seja muito hidrossolúvel, entretanto este fator não inferiu na sua toxicidade, mostrando valores razoáveis de hemólise. Já o composto ICIP apresentou um Log P um pouco maior, se comparado ao composto já discutido, porém o valor 2,29 é visto como dentro da faixa de equilíbrio hidrofílico-lipofílico com valor de 0 à 3, entretanto esse valor talvez tenha sido capaz de fazer com que a molécula tenha solubilizado mais que o necessário no momento da suspensão da mesma e da sua solubilização em DMSO,

fazendo com que mais composto estivesse presente e disponível para hemolisar as células vermelhas, inferindo assim na sua toxicidade e nos valores alterados da atividade hemolítica. O composto ICMD, apresentou um Log P semelhante ao composto ICIP, porém no momento da preparação da suspensão em DMSO, a mesma não apresentou uma boa solubilidade, e talvez por esse motivo não tenha apresentado valores para hemólise tão significantes como o composto anteriormente discutido. Os valores de Log P dos compostos M1, M2 e M3 são valores bem próximos, variando de 1,93 à 1,10, pois os mesmos apresentaram homogeneidade em suas dissoluções no DMSO, não apresentando aglomerados em presença do sangue em análise.

5.5 Estudos teóricos de *Docking* molecular

Foram realizados os estudos *in silico* utilizando a metodologia do *docking* molecular, para todos os compostos sintetizados.

Inicialmente foram analisados os valores de *scores*, que são valores referentes as quantidades de interações que o composto é capaz de realizar com os resíduos e os tipos de interação que ele faz no alvo ao qual está sendo submetido. Esses valores de *score* são teóricos, fazendo com que seja possível inferir que quando submetidos a testes *in vitro* possam demonstrar diferenças, sejam elas significantes ou não, apresentando efeitos de inibição da *topoisomerase* de forma diferente. Para usar como valores de referência do composto com melhor valor de interação, foi escolhido o composto ICIP que apresentou uma interação significativa com o alvo, em um trabalho prévio desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa intitulado: Planejamento e Desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quinolínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral (SILVA, 2018).

Para melhor compreensão, irá ser exposto todos os valores de *score* dos compostos ICIP, CAIC e ICMD, utilizados na dissertação de mestrado citada a cima, relatando as melhores interações e os resíduos aos quais interagiram.

Os compostos ICIP e CAIC foram aqueles que apresentaram valores de *score* mais relevantes, entre -58,8549 a -50,2768, sendo estes valores negativos para indicar melhores interações entre o alvo e os resíduos, neste caso o Etoposídeo. As interações

mais significantes foram com os resíduos Asp 463 (ácido aspártico), Gly 462 (glicina) e Arg 487 (Arginina).

Os valores de Score de cada composto analisado na dissertação, está esquematizado na tabela a seguir.

Tabela 12: Valores de score dos derivados acrilatos-indólicos.

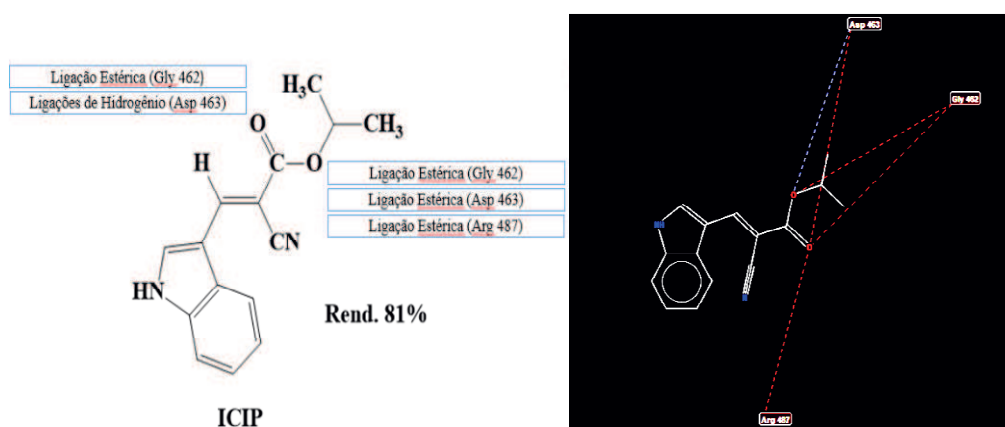
Moléculas	Scores (kcal/mol)
Etoposido	-64,1596
ICIP	-58,8549
CAIC	-50,2768
ICMD	-33,5723

Fonte: Próprio Autor.

Fazendo uma rápida comparação entre os valores dos scores obtidos, é possível observar que o valor que mais se aproximou do valor real do Etoposído foi o composto ICIP, o composto CAIC também apresenta um valor próximo e o composto ICMD foi aquele que mais se distanciou do esperado para uma boa interação. Sabendo previamente, que o Etoposído utilizado como fármaco de referência para atividade da inibição da topoisomerase II apresenta interações com os resíduos Asp 463, Gly 462 e Met 762, é possível observar que o composto ICIP realiza interações com os resíduos de arginina e glicina e não realiza interação com o resíduo de metionina, o que justifica o valor do score maior e uma potencial inibição da topoisomerase menor do composto ICIP.

O composto ICIP apresenta interações por ligações de hidrogênios que se dá no resíduo Asp 463 através do oxigênio do grupamento éster, realiza 4 ligações estéricas onde uma ocorre no mesmo oxigênio da ligação de hidrogênio com o resíduo Gly 462 que também faz ligação com o oxigênio ligado a carbonila. As outras duas ligações estéricas ocorrem no oxigênio da carbonila com os resíduos Asp 463 e Arg 487.

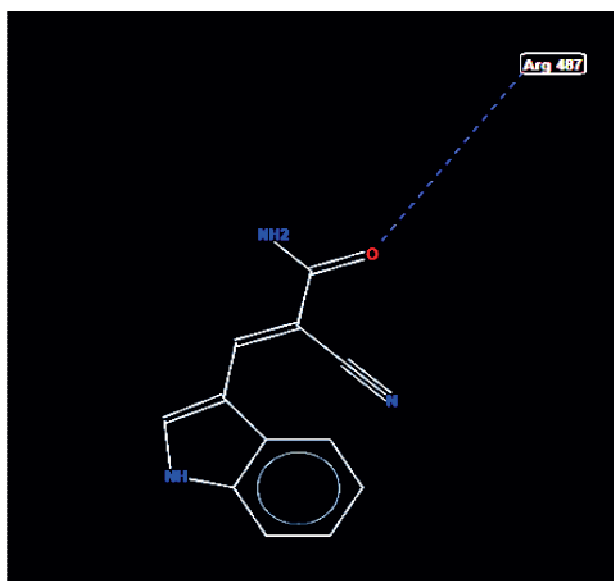
Figura 21: Relação estrutural das interações realizadas com a *topoisomerase*.



Fonte: SILVA, 2018; Modificada da referência.

O composto CAIC demonstrou no docking apenas uma interação que ocorre por ligação de hidrogênio no resíduo Arg 487 no oxigênio da carbonila, as outras interações apresentadas foram incompatíveis com aquelas apresentadas pelo Etoposido e já discutidas anteriormente.

De forma sucinta, o melhor score obtido dos derivados testados in silico nesse trabalho de mestrado, e o que se apresenta como uma proposta promissora para a pesquisa é o composto ICIP, sendo um derivado isopropílico, o que indica que esse grupamento possa ser um grupamento privilegiado para uma interação com a topoisomerase II α . Isso pode ser explicado a partir de uma simples observação estrutural da molécula, onde há um grupamento éster contendo dois oxigênios que apresentam maiores possibilidades de interações, seja por meio de ligação de hidrogênio ou por ligações estéricas. Se comparar com o composto CAIC, é possível esclarecer o motivo pelo qual este só realiza uma interação, pelo fato de conter apenas um oxigênio em sua estrutura que diminui as possibilidades de ligações.

Figura 22: Docking Molecular do composto CAIC.

Fonte: SILVA, 2018.

Dando continuidade as análises in silico, os compostos MA02, M1, M2, M3 e M4 também foram submetidas as análises de Docking molecular, utilizando o mesmo etoposido como fármaco de referência, e realizando o estudo de acordo com a metodologia dos compostos ICIP, CAIC e ICMD. Sendo o primeiro o composto que apresentou melhores interações ao alvo Topoisomerase II α .

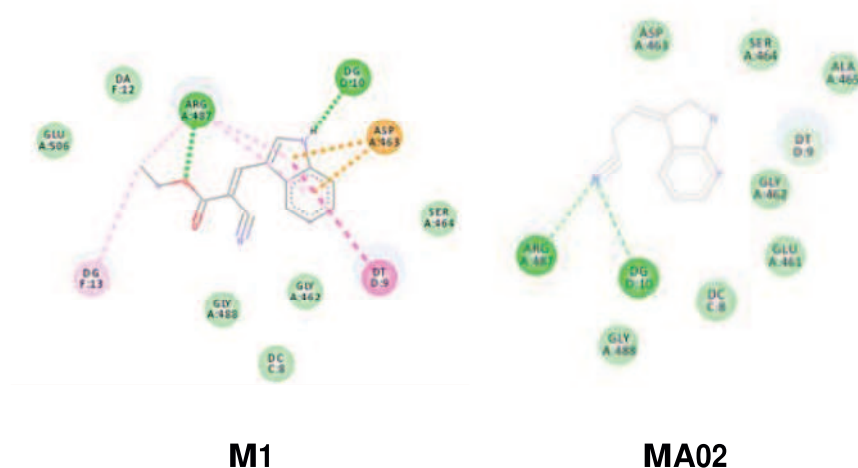
Na tabela 13 estão representados os valores de interações para os compostos a seguir.

Tabela 13: Valores de score dos compostos MA02, M1, M2, M3 e M4.

Moléculas	Scores (kcal/mol)
Etoposido	-64,1596
MA02	-45,0496
M1	-45,0996
M2	-44,8296
M3	-44,3096
M4	-44,2296

A partir dos valores de score da tabela acima, é possível observar que as moléculas obtiveram valores próximos, onde nenhum valor se caracteriza como discrepância, o que indica a homogeneidade do estudo in silico realizado. Levando em consideração que o etoposido apresentou interações entre os resíduos de Apartato, Glicina e Arginina e metionina, este será utilizado como composto referência para as próximas análises. Dessa forma, se baseando nos valores de interação obtidos através do docking molecular, os composto MA02 e M1 obtiveram valores semelhantes entre -45, 0496 e -45,0996 kcal/mol. Na figura a seguir se encontram as figuras referentes aos resíduos de interação da molécula com o alvo escolhido: *Topo II*.

Figura 23: Representação 3D das interações das moléculas MA02 e M1 com o alvo *Topoisomerase IIa*.



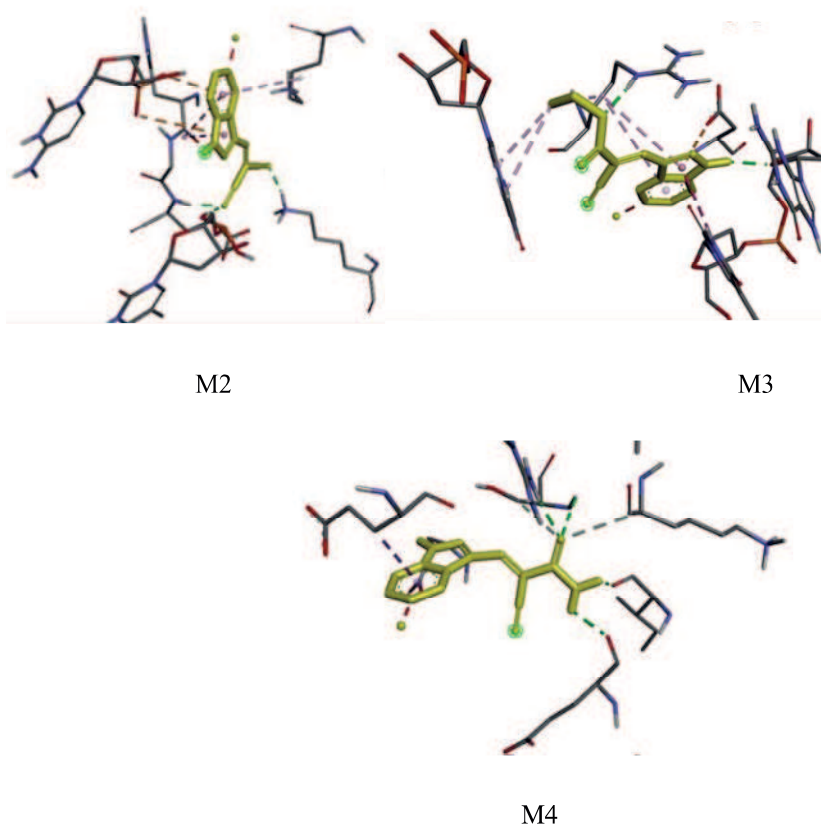
Fonte: PDB ID: 5gwk.

É possível observar a partir das imagens, que as moléculas fazem interações com os mesmos resíduos, ambos nos resíduos de Arg 487, entretanto os locais onde ocorrem as interações são diferentes. No composto M1, as interações com os resíduos de Arg ocorrem a partir de ligações de hidrogênios no oxigênio da carbonila da cadeia lateral do anel indol no grupamento éster etílico, assim como o composto ICIP, dando ênfase a esse grupamento na possível interação com o complexo *DNA-Topo II*. A molécula MA02 realiza ligação de hidrogênio também na cadeia lateral do anel indol, ocorrendo no nitrogênio do grupamento nitrila. O oxigênio e o nitrogênio trazem em comum a capacidade de serem bioisómeros clássicos aceptores de ligação de hidrogênio, porém pelo fato do oxigênio estar ligado a um grupamento éster etílico, o composto M1

apresentou uma melhor interação com o alvo, mesmo que tenha sido infimamente significativa comparada a molécula MA02, ainda assim confirmou a importância desse grupo para a interação da molécula ao alvo Topoisomerase II.

Os compostos M2, M3 e M4 também apresentam valores de complexos com energias bem próximas, variando de forma ínfima, o que pode inferir que as interações realizadas com o alvo possam ser as mesmas. Na molécula M2 há interações por ligação de hidrogênio no nitrogênio constituinte do anel indol e nos nitrogênios das nitrilas, interagindo apenas com o resíduo de Arg 487, para o composto M3 e M4 há interação por ligação de Hidrogênio no resíduo também de Arg 487, ambas nos oxigênios constituintes da carbonila, novamente confirmando a importância do grupo éster etílico para interação com o alvo, no caso do composto M3.

Figura 24: Interações em 2D das moléculas no alvo *Topoisomerase*.



Fonte: PDB ID: 5gwk

Através dessas imagens 2D, é possível observar as ligações feitas, a partir dos pontos verdes identificados nas imagens. Onde ocorrem interações por forças de Van der Waals em pontilhados verde claro, em verde escuro estão identificados ligações

convencionais de hidrogênio, pontilhados rosa são ligações Pi e em lilás estão as ligações do tipo Pi-alquil.

De forma sucinta, o composto que melhor apresentou complexos de energia com o alvo foi o ICIP, sugerindo para esse composto que a estrutura principal responsável por essa interação foi o grupamento isopropilico, em relação aos demais compostos analisados. É possível sugerir também que moléculas como ICMD contendo um anel aromático como ramificação não favorece a atividade da molécula perante o ligante, pois é um grupo volumoso e rígido demais para que haja uma interação adequada com o alvo que é flexível, por este motivo que foi o que apresentou o menor complexo de energia.

As demais moléculas não possuem um grupamento isopropilico e sim grupamentos éster e nitrila ligados ao anel aromático, e por este motivo não apresentou interações significantes com o alvo, ligando-se em sua maioria a apenas um resíduo de arginina, não mostrando nenhuma formação de complexo energético promissor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram sintetizados 8 compostos, sendo três deles sintetizados para a dissertação de mestrado intitulada “Planejamento e desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quinolínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral”, sendo as moléculas ICIP, CAIC e ICMD. Para todos os compostos sintetizados foram determinadas suas características físico-químicas, suas características estruturais, seus mecanismos reacionais e suas respectivas atividades hemolíticas. Todas as moléculas demonstraram bons rendimentos, comprovando a escolha da rota sintética, onde todos os compostos obtiveram grau de pureza adequado. Seus Log de P apresentaram valores esperados, estando de acordo com Lipinsk e a regra dos múltiplos de 5, se adequando ao equilíbrio hidrofílico-lipofílico.

A atividade hemolítica apresentou resultados próximos de 30%, abrindo margem para análises futuras de novos mecanismos de hemólise celular, onde a lise da membrana pode estar ligada a outros grupos sanguíneos ou maior tempo de repouso das suspensões. Entretanto, mesmo não alcançando valores maiores, foi possível observar que alguns grupamentos químicos inferiram os valores de hemólise, como o elemento bromo e o grupamento éster. Para os compostos ICMD, ICIP e CAIC foram realizadas as caracterizações estruturais, através de IV e RMN de ^1H e ^{13}C , observando bandas de absorção de acordo com a estrutura das moléculas. Os espectros de massa obtidos através de ressonância magnética se demonstraram como o esperado, apresentando uma variação dentre os valores de diferenças de até 1, sendo estes valores obtidos conferidos e analisados.

Para os estudos in silico, foi utilizado a metodologia do *docking* molecular, para todos os compostos. Dentre eles, o composto ICIP foi o que melhor apresentou complexo energético de ligação com o alvo *topoisomerase II*, sugerindo que o grupamento responsável por essa interação seja o grupamento isopropílico que não é encontrado nas demais moléculas sintetizadas. Sendo então por este motivo que os outros compostos talvez não apresentaram resultados tão promissores como a molécula ICIP. Dessa forma, é possível concluir que o produto ICIP foi o composto promissor, que será utilizado para análises futuras, avaliando sua interação com o DNA, seu possível mecanismo de hemólise celular e até avaliando sua provável atividade anticancerígena em células tumorais.

PERSPECTIVAS

- Dar continuidade ao trabalho avaliando através de outros testes a atividade hemolítica dos compostos.
- Realizar análises de interação com o DNA dos compostos com melhores resultados de interação com o alvo.
- Avaliar a atividade de inibição de crescimento celular tumoral através de linhagens de células tumorais.
- Verificar em testes futuros a atividade de inibição das moléculas frente a enzima *topoisomerase II α* humana,

REFERÊNCIAS

ABREU, C. *Avaliação Da Citotoxicidade Induzida Por Produtos Cosméticos Pelo Método De Quantificação De Proteínas Totais Em Células 3t3*; 2008. 106f. **Dissertação de Mestrado** – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

ADENIYI, Adebayo A.; SOLIMAN, Mahmoud ES. *Implementing QM in docking calculations: is it a waste of computational time?*. **Drug discovery today**, v. 22, n. 8, p. 1216-1223, 2017.

ALMEIDA, Marília Oliveira de. *Obtenção de derivados dos terpenos enidrina e afidicolina por biotransformação e semi-síntese e avaliação da atividade leishmanicida*. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, V. D., Leitão, A., Reina, L. D. C. B., Montanari, C. A., Donnici, C. L., & Lopes, M. T. P. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, 28(1), 118-29.

ARAÚJO, C. R. M., Leite Filho, C. A., dos Anjos Santos, V. L., & de Azevedo, G. L. (2015). Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual Scifinder®. **Química Nova**, 38(6), 868-873.

BARREIRO, E. J., Fraga, C. A., Miranda, A. L., & Rodrigues, C. R. (2002). A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. **Quim. Nova**, 25(1), 129-148.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. Artmed Editora, 2014.

BARRETO, Thâmara Sena; AMORIM, Rita da Cruz. A família frente ao adoecer e ao tratamento de um familiar com câncer. **Rev Enferm UERJ**, v. 18, n. 3, p. 462-7, 2010.

BASSI, Loredana; PALITTI, *Fabrizio*. *Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1065-1069, 2000

BERGOLD, Ana Maria; GEORGIADIS, Sofia. *Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão*. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004.

CARDOSO, Daniela Habekost et al. Viver com câncer: a percepção de pacientes oncológicos. **Journal of Nursing and Health**, v. 2, n. 2, p. 461-74, 2012.

CERA, Tatiane Peixote, and Camila Garcel PANCOTE. "Planejamento de Fármacos". *Revista Científica Unilago*, p.137-148, 2012

DA SILVA, Flavia Martins; JONES JR, Joel. Reações orgânicas em meio aquoso. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, p. 646-657, 2001.

- DA SILVA, Tiago F. Abordagens da química medicinal para o planejamento de protótipos de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 921-933, 2013.
- DA SILVA, Lucia Cecília. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em estudo**, v. 13, n. 2, p. 231-237, 2008.
- DE BRITO, Monique Araujo. *Avaliação de propriedades toxicológicas de fármacos in silico no curso experimental de química medicinal*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 4, p. 8-8, 2010.
- DOS SANTOS, Helimar Senna; DE SOUZA CRUZ, Wanise Maria. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-08, 2001.
- DIAS, L. C., Dessoy, M. A., Silva, J. J. N., Thiemann, O. H., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2009). Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**.
- DIAS, K. S. T., de Paula, C. T., Riquiel, M. M., do Lago, S. T., Costa, K. C. M., Vaz, S. M., & Viegas Jr, C. (2015). Aplicações recentes da abordagem de fármacos multialvo para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, 7(2), 609-648.
- FERNANDES, Daniara Cristina et al. Triagem biológica, síntese e planejamento de novos agentes quimioterápicos para a terapia do câncer. 2016.
- FERREIRA, F. G., Polli, M. C., Franco, Y. O., & Fraceto, L. F. (2009). Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista eletrônica de Farmácia**..
- GRAEBIN, Cedric Stephan; EIFLER-LIMA, Vera Lucia. O uso do forno de microondas na síntese orgânica em fase sólida. **Química nova**. São Paulo. Vol. 28, n. 1 (2005), p. 73-76, 2005.
- GOLAN, D. et al. Princípios de Farmacologia: A base Fisiopatológica da Farmacoterapia. ed. 2. Editora: Guanabara Koogan, 2009.
- GOUVEIA, R. G., Ribeiro, A. G., Segundo, M. Â. S. P., de Oliveira, J. F., de Lima, M. D. C. A., de Lima Souza, T. R. C., ... & de Moura, R. O. (2018). Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*. .
- GUIDO, Rafael VC, Adriano D. Andricopulo, and Glaucius Oliva. "Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas." *estudos avançados* 24.70 (2010).
- GUPTA, M., Sharma, R., Singh, M., & Kumar, A. (2018). Docking techniques in pharmacology: How much promising?. *Computational biology and chemistry* (2018).
- HEVENER, Kirke: Recente developments ind topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. **Acta farmacêutica sinica B**, v 8, n 6, 2018.

INCA - Instituto nacional de câncer. Estimativa 2016-2017 da incidência e mortalidade por câncer no Brasil Rio de Janeiro, 2019.

JORGE, P. M. Indução de parada no ciclo celular e apoptose pelo ditelureto de difenila: Uma possível relação com inibição de enzimas topoisomerases. 2012. 106 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

JURBERG, Claudia; GOUVEIA, Maria Emmerick; BELISÁRIO, Camila. Na mira do câncer: o papel da mídia brasileira. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 139-146, 2006.

LEHMANN, Maurício. Toxicidade genética das antraciclinas: associação entre estrutura química e ação inibitória sobre a topoisomerase II. 2003.

LANG, X.; LI, L.; CHEN, Y.; SUN, Q.; WUA, Q.; LIU, F.; TAN, C.; LIU, H.; GAO, C.; JIANG, Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 4170–4177, Jul, 2013.

LOURENÇO, Édio Eligio. Clonagem, sequenciamento e caracterização do gene que codifica a enzima DNA topoisomerase do tipo II do protozoário *Blastocritidia culicis* (Brueske, 1967). 2005.

LIANG, X., Wu, Q., Luan, S., Yin, Z., He, C., Yin, L., ... & He, M. (2019). A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade. **European journal of medicinal chemistry**.

LIMA, Lidia M.; BARREIRO, Eliezer J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIMA, Lída M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456, 2007.

MARQUES, Karla Mirella Roque. Determinação do potencial antitumoral e estudos de mecanismos de ação de derivados 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazônicos. 2017.

Dissertação de Mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

MATOS, Karina *Silvia*. Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

MENG, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.

MONTANARI, Carlos A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química nova**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.

MONTANARI, Carlos A. A química medicinal na próxima década. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 134-137, 2000.

OLIVEIRA J.F. DE, LIMA T.S., BARBOSA DÉ., COSTAVENDRAMINI., PEDROSA S.C.B. DE LACERDA, LAFAYETTE E.A., SILVA R.M.F. DA, ALMEIDA S.M.V. DE, MOURA R.O, RUIZ A.L.T.GOIS., CARVALHO J. E, LIMA, M.D.C.A. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 305-314, Aug, 2017.

PRADO, Bernardete Bisi Franklin do. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014.

PEDROSA, Sybelle Christianne Batista de Lacerda et al. Síntese, caracterização estrutural e estudos do mecanismo de ação antitumoral de derivados indólicos. 2017.

SANGI, Diego Pereira. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SANCHEZ, I., RECHES, R., CAIGNARD, DH., RENARD, P., DOLORS-PUJOL, M. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N-and O-substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 340-352, Marc, 2006

SANT, Carlos Mauricio R. "Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução." **Revista Virtual de Química** 1.1 (2009): 49-57.

SAWADA, Namie Okino et al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 43, n. 3, p. 581-587, 2009.

SCHADECK CR; NAKAMURA EK. Tratamento paliativo em feridas oncológicas. **NetSaber**, v. 14075, p 12-19. 2012.

ŠARKANĭ, B., Molnar, M., Čačić, M., & Gille, L. (2013). 4-Methyl-7-hydroxycoumarin antifungal and antioxidant activity enhancement by substitution with thiosemicarbazide and thiazolidinone moieties. **Food chemistry**, 139(1-4), 488-495.

SILVA, Jamire Muriel da et al. Planejamento e desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quinolínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral. 2018; **Dissertação de mestrado**.

SILVA, T. *Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Uma Nova Série de Derivados Cicloalquil-N-Acildrazonas: Análogos de Lassbio-294*. 2012. 246f. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SILVEIRA, Gustavo Pozza; CARVALHO, Cassandra Bonfante de; RIBEIRO, Thaís de Freitas. Preparação da d-ribonolactona empregando brometo e bromato de sódio. 2013.

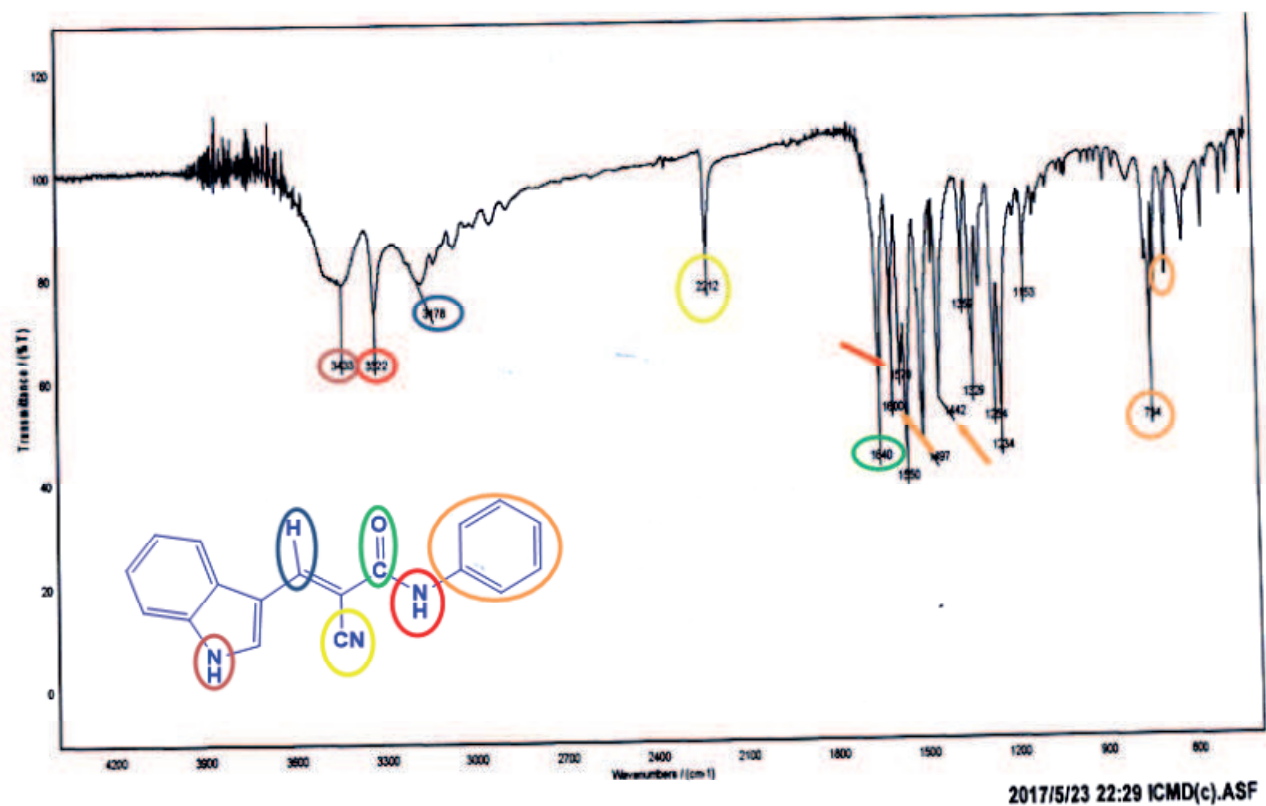
SOLOMONS, G. et al. Química Orgânica. ed. 9, Florida. Editora: Gen LTC, 2008.

XU, Mengang; LILL, Markus A. Induced fit docking, and the use of QM/MM methods in docking. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 3, p. e411-e418, 2013.

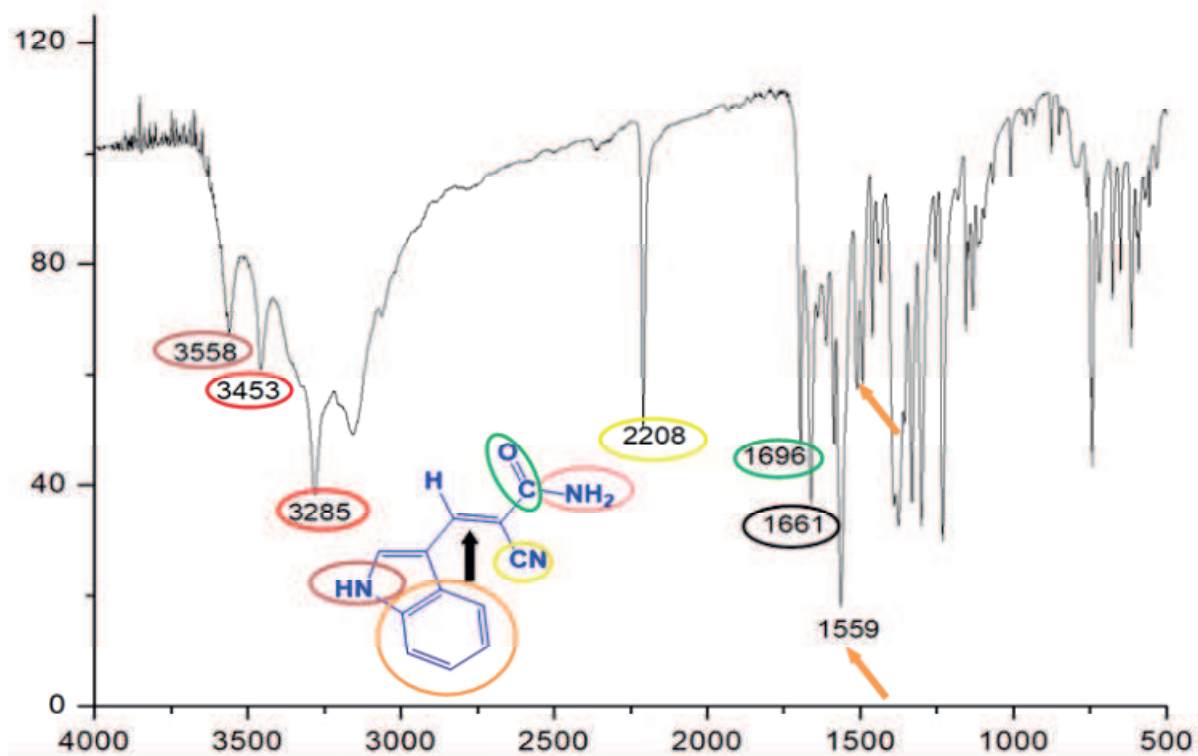
WHO. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> . Acesso em: 28 fev. 2019.

Apêndice A-Espectros de Infravermelho

Apêndice A.1- Espectro de Infravermelho do composto ICMD

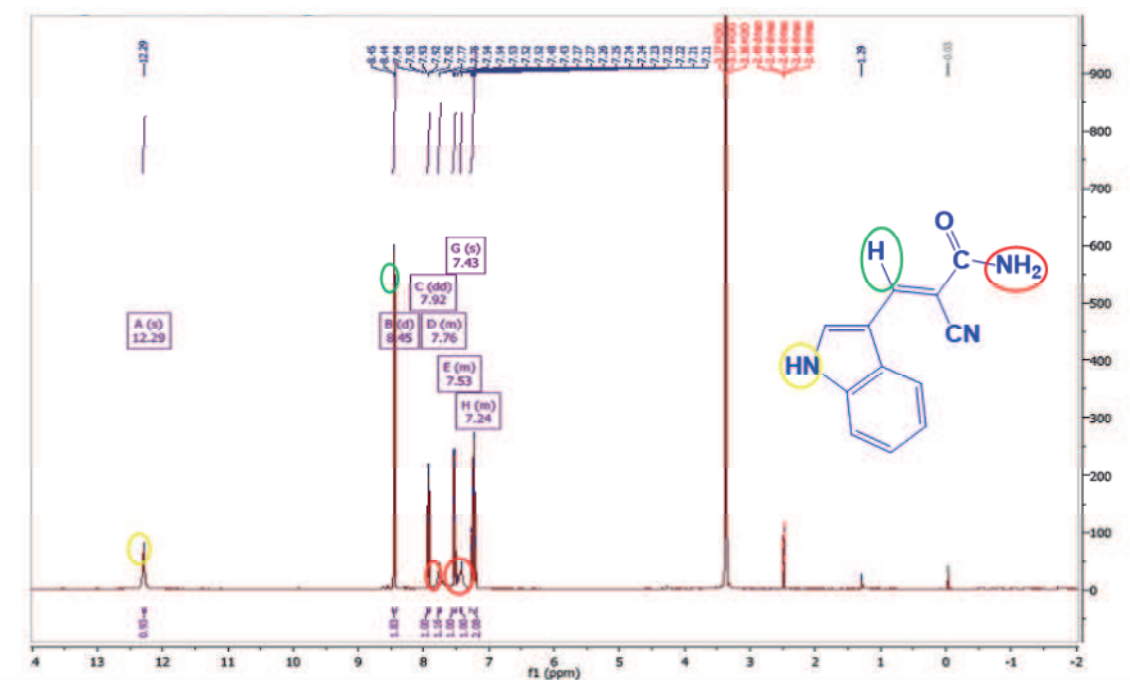


Apêndice A.2- Espectro de IV do composto CAIC

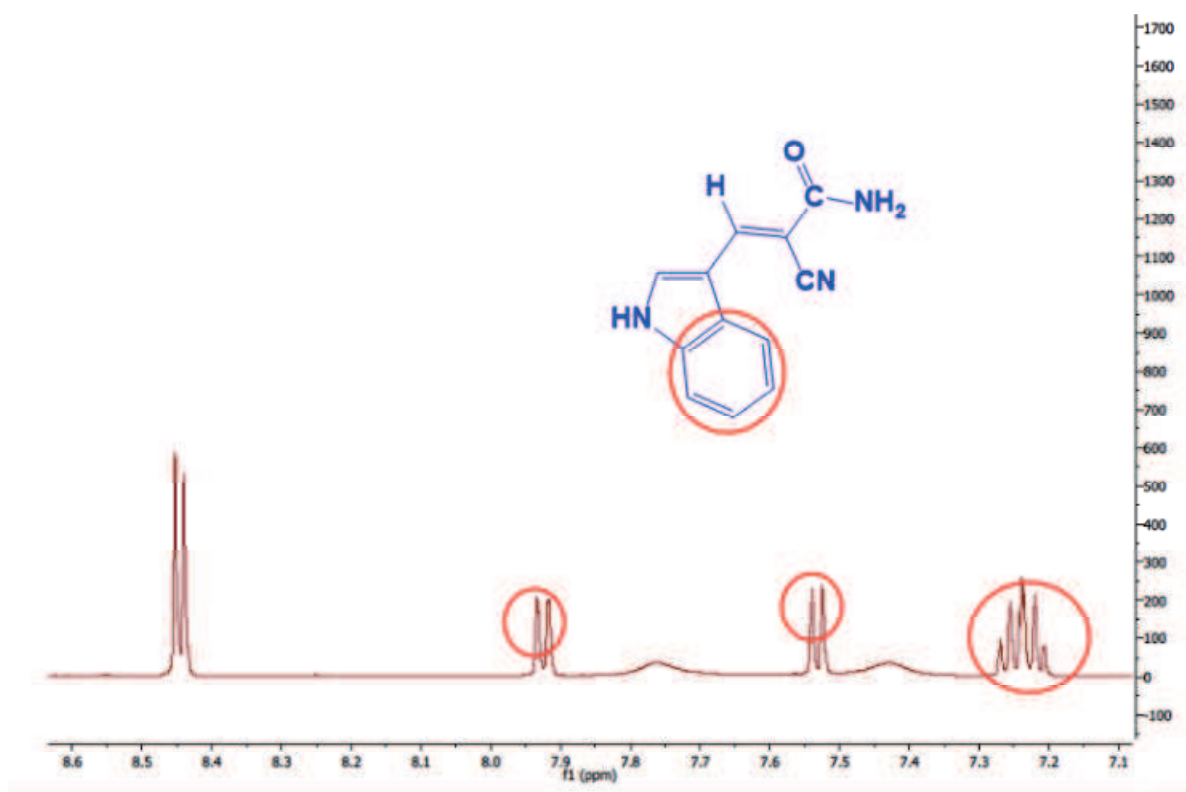


Apêndice B- ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C

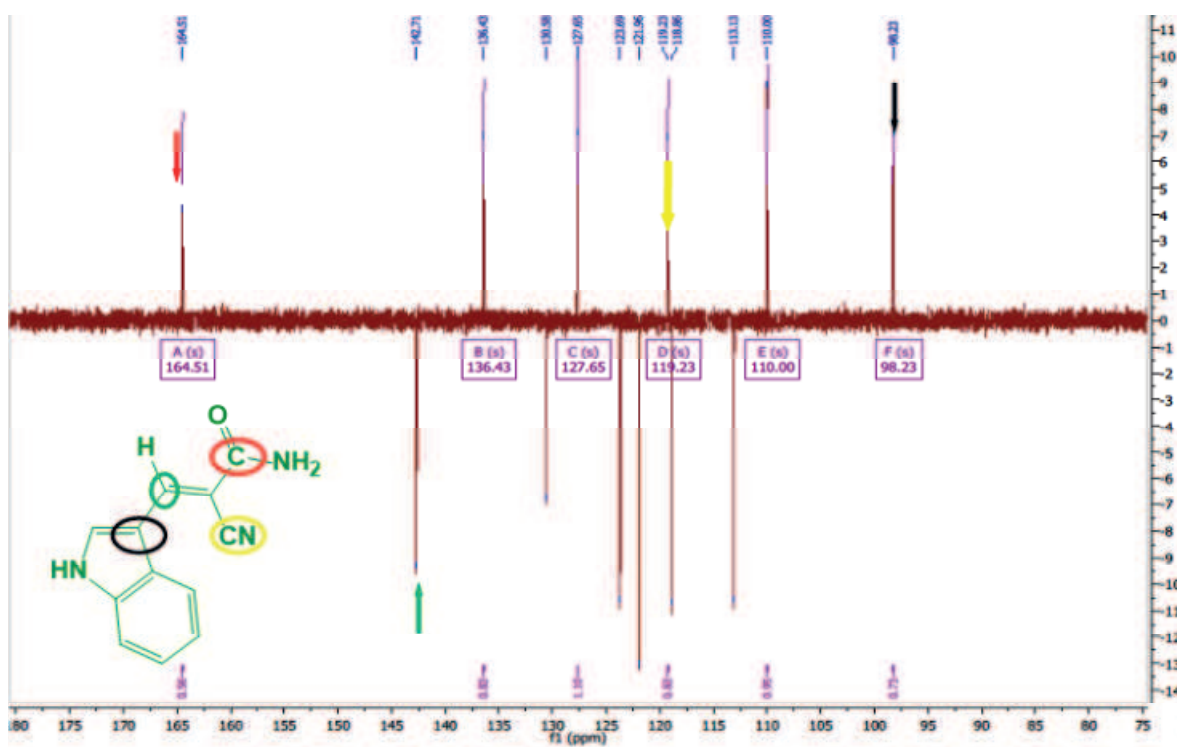
Apêndice B.1- RMN Espectro de RMN ^1H do composto CAIC



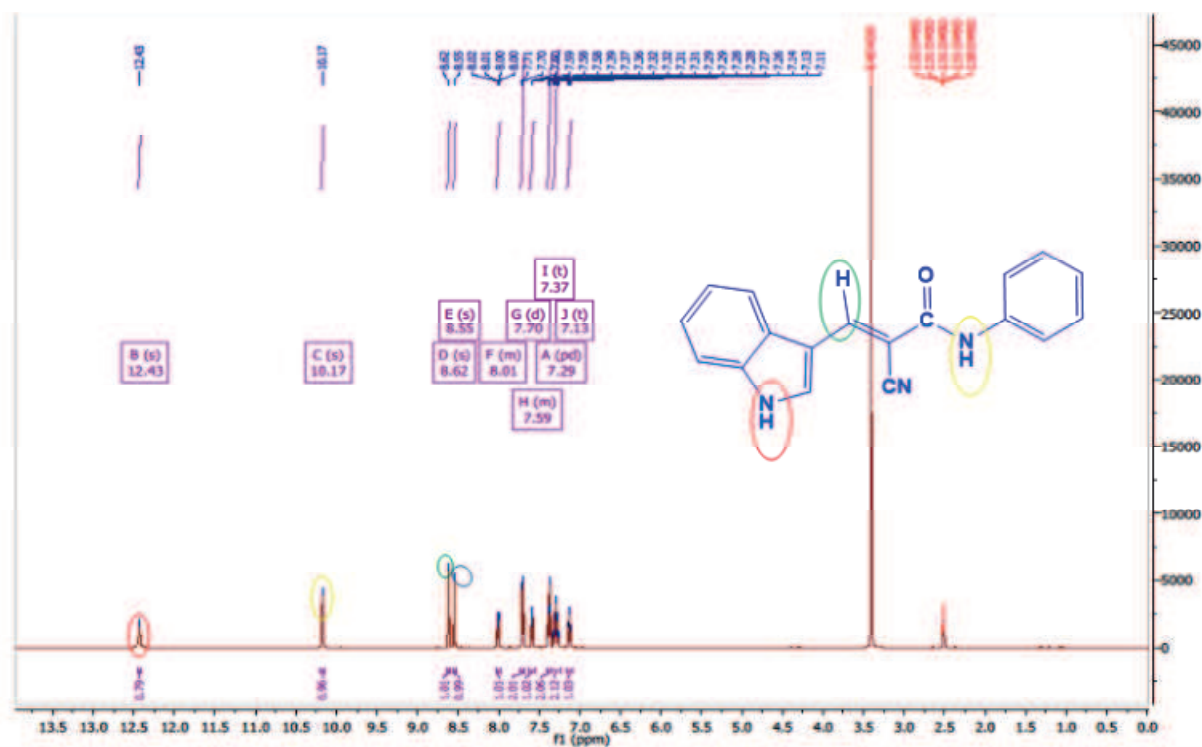
APÊNDICE B.1.1- Espectro expandido de RMN ^1H do composto CAIC



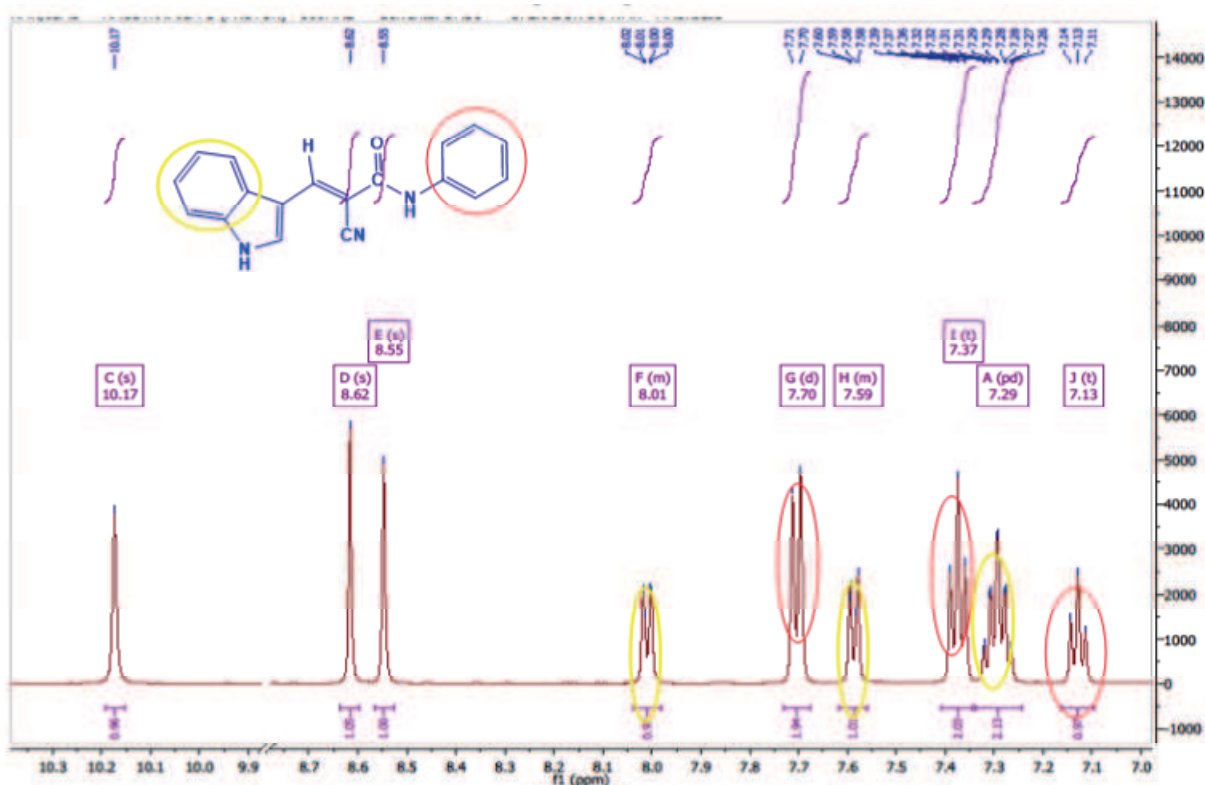
APÊNDICE B.2 - Espectro APT de RMN ^{13}C do CAIC



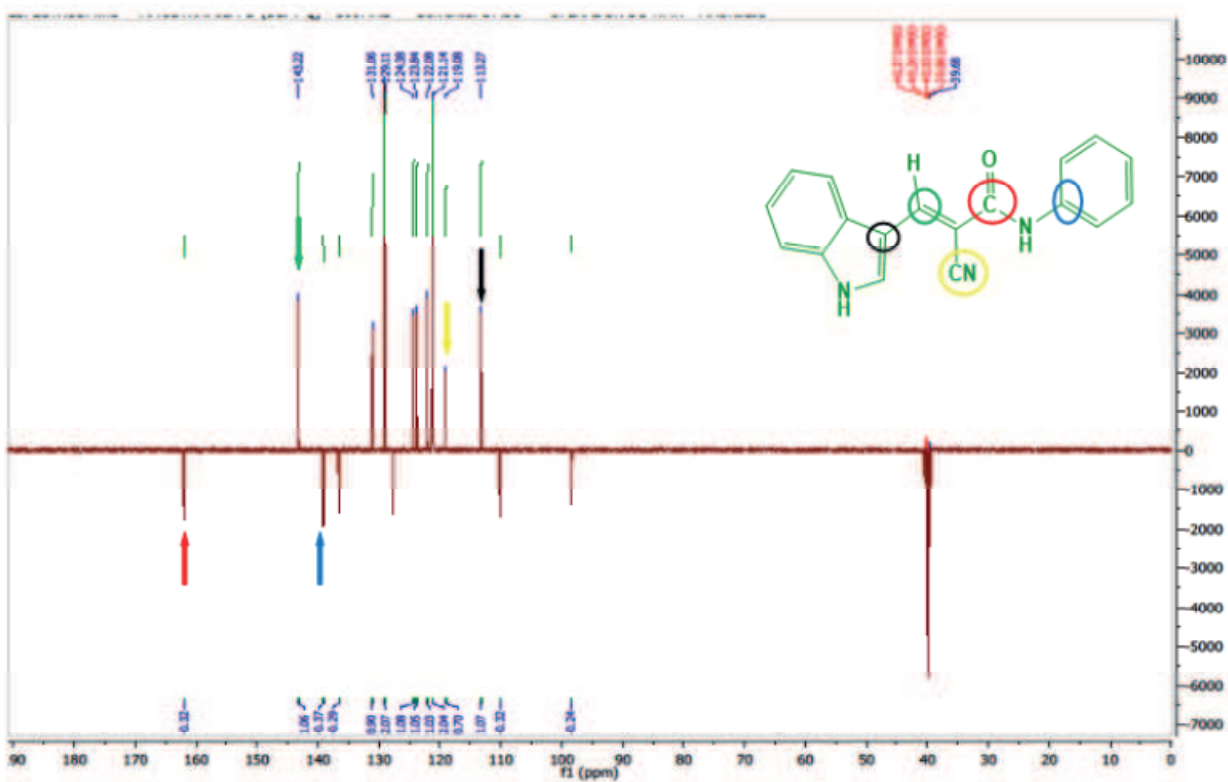
APÊNDICE B.3 - Espectro de RMN ^1H do composto ICMD



APÊNDICE B.3.1 - Espectro expandido de RMN ^1H do composto ICMD

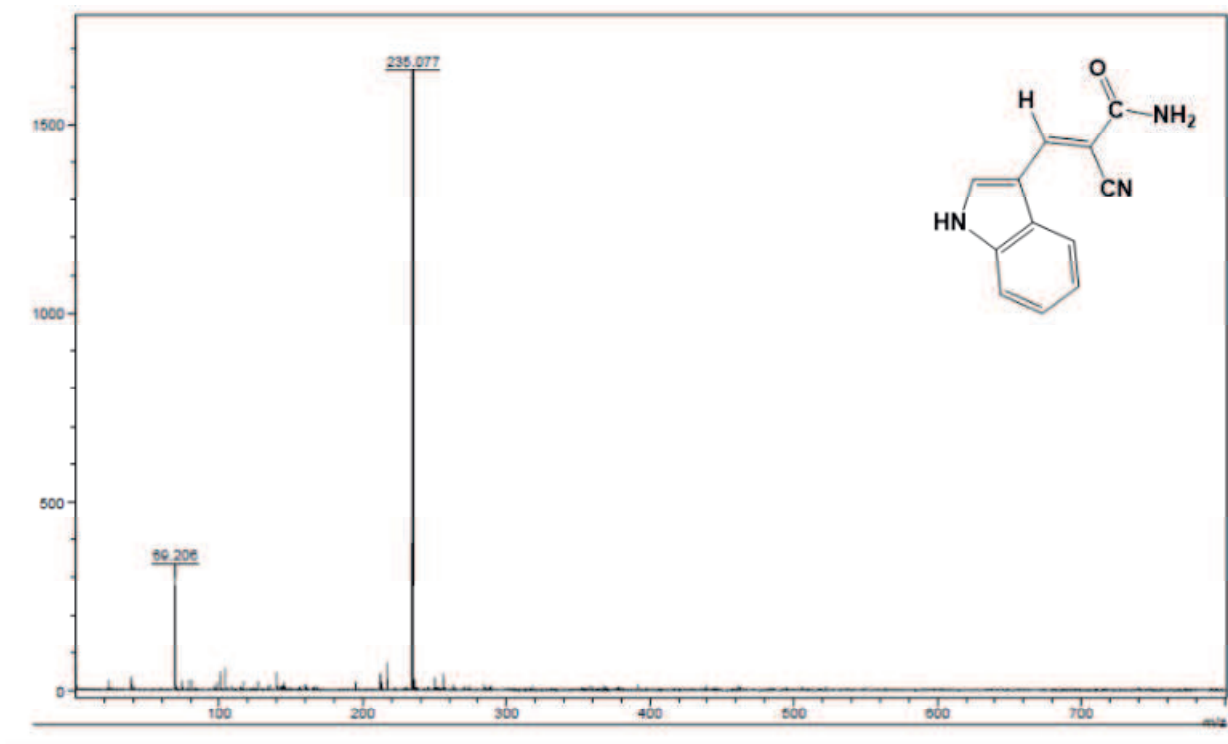


APÊNDICE B.4 - Espectro APT de RMN ^{13}C do composto ICMD

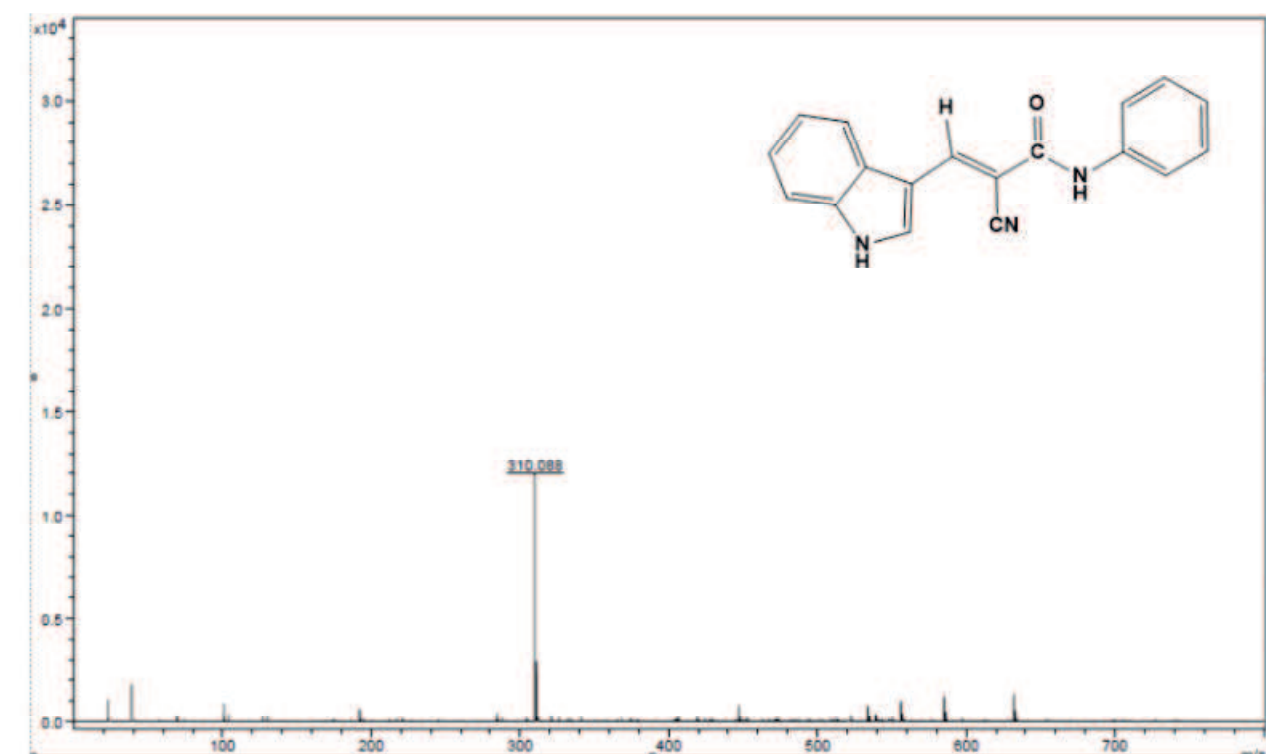


APÊNDICE C - ESPECTRO DE MASSAS

APÊNDICE C.1 - Espectro de Massas do composto CAIC

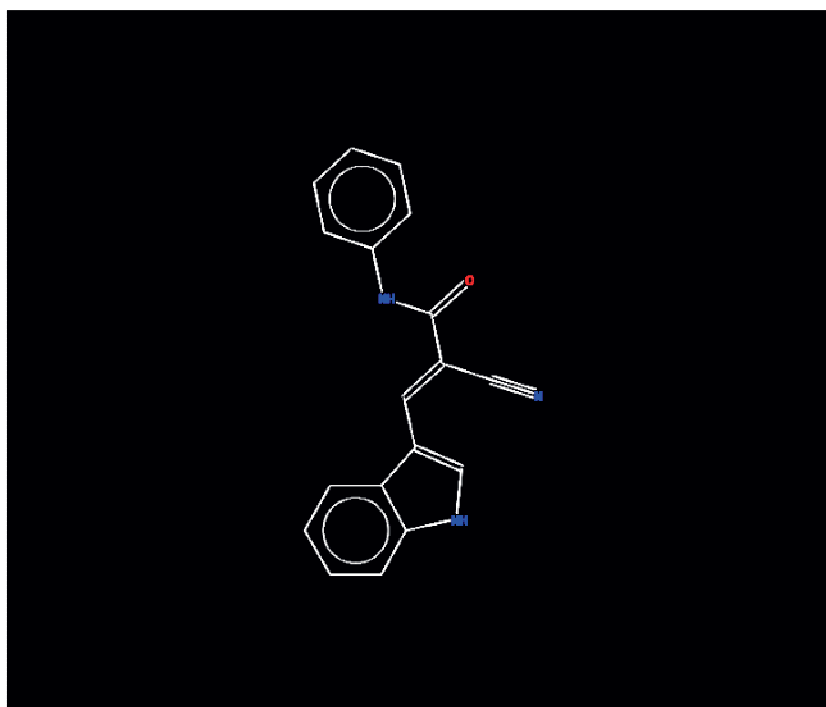


APÊNDICE C.2 - Espectro de Massas do composto ICMD

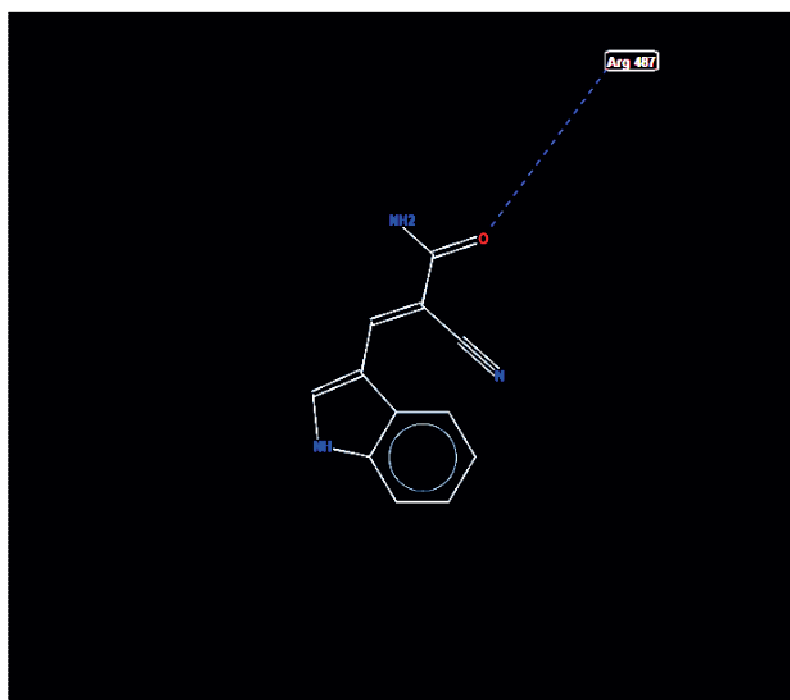


APÊNDICE D – DOCKING DOS DERIVADOS INDÓLICO-ACRILAMIDAS

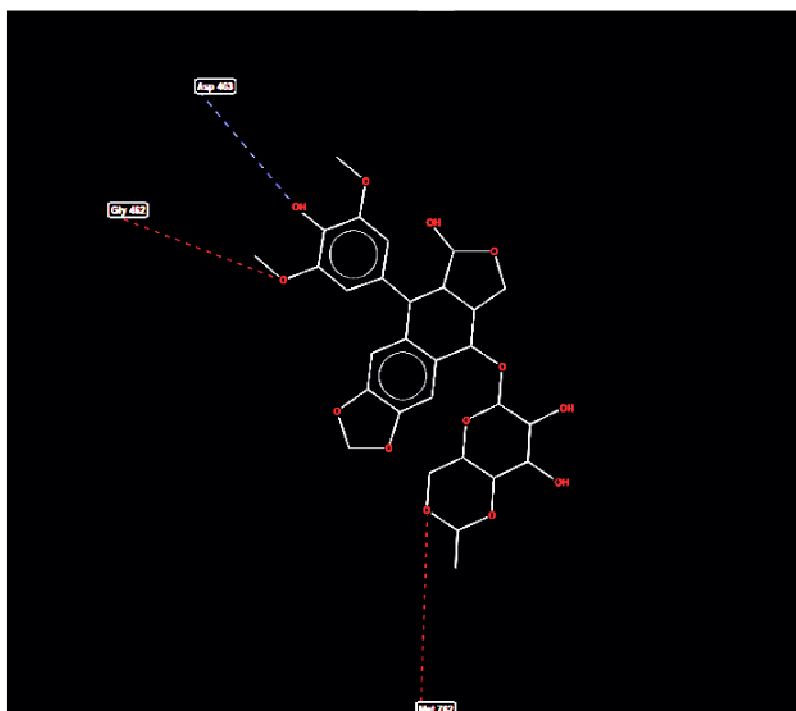
Apêndice D.1-Docking do composto ICMD



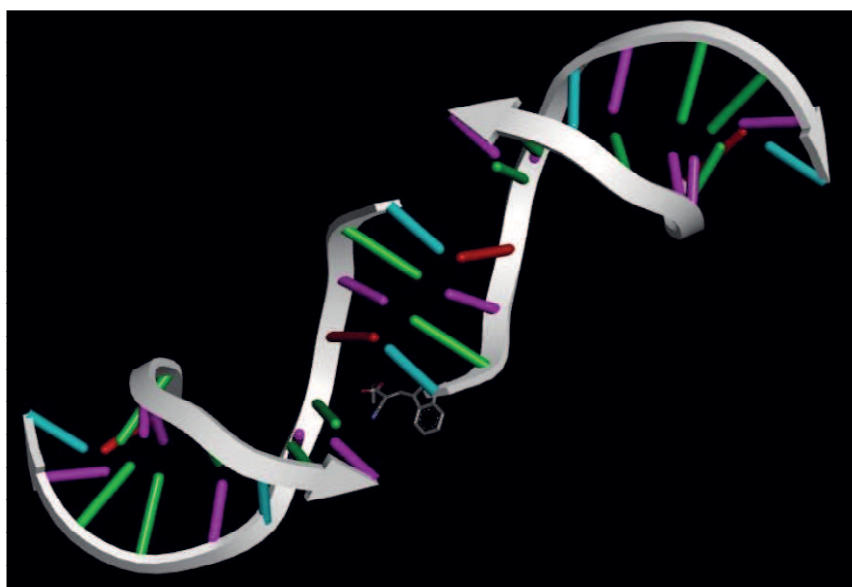
Apêndice D.2-Docking do composto CAIC



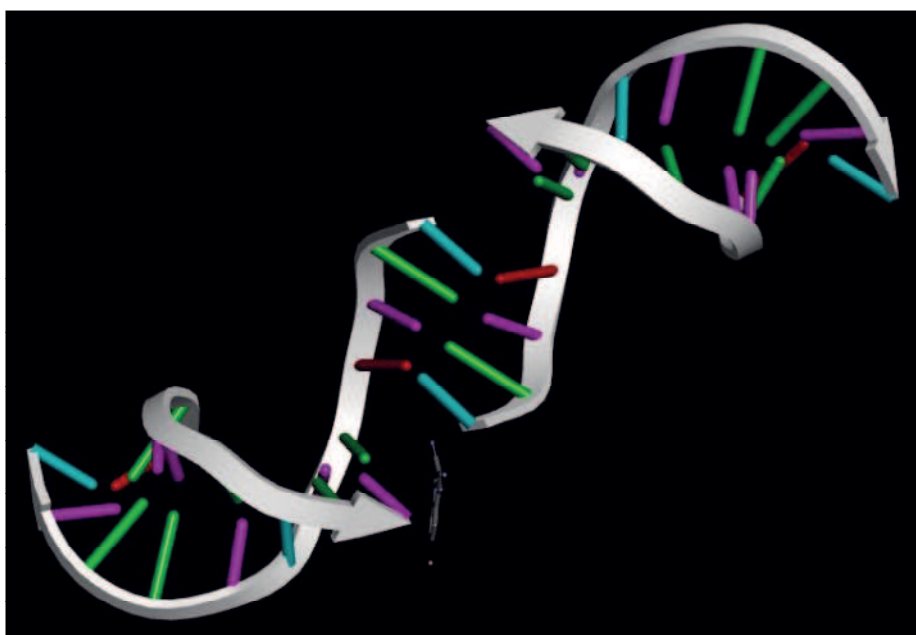
Apêndice D.3-Docking do etoposido utilizado como referência



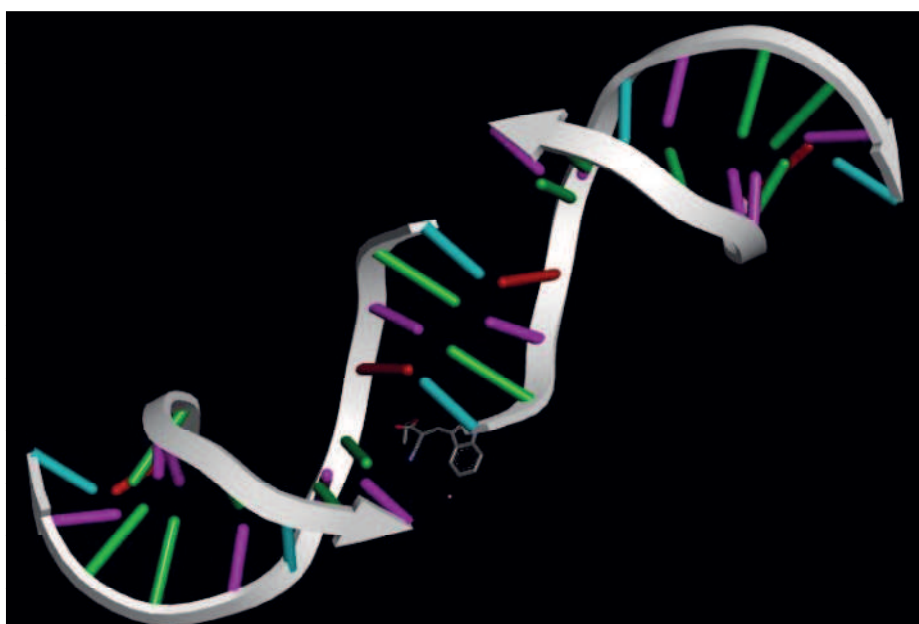
Apêndice D.4-Docking da molécula M1



Apêndice D.5- Docking da Molécula M2



Apêndice D.6-Docking da Molécula M3



Apêndice D.7-Docking da Molécula M4

