

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Otimização do protótipo LDQMC-014: uma
acridinona inibidora da polimerização de Tubulina**

Marina Brandão da Fonseca

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DO PROTÓTIPO LDQMC-014: UMA
ACRIDINONA INIBIDORA DA POLIMERIZAÇÃO DE
TUBULINA**

MARINA BRANDÃO DA FONSECA

Sob Orientação de

Prof. Dr. Cedric Stephan Graebin

E Co-Orientação de

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Dissertação submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Química
no Curso de Pós-Graduação em Química, área
de concentração em Química

Seropédica, RJ

Janeiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F676o Fonseca, Marina Brandão da, 1995-
Otimização do protótipo LDQMC-014: uma acridinona
inibidora da polimerização de Tubulina. / Marina
Brandão da Fonseca. - Seropédica, 2020.
129 f.: il.

Orientador: Cedric Stephan Graebin.
Coorientador: Adriano Defini Andricopulo.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em
química, 2020.

1. Reação multicomponente. 2. Câncer. 3. Tubulina.
I. Graebin, Cedric Stephan , 1981-, orient. II.
Andricopulo, Adriano Defini, 1971-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de pós-graduação em química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

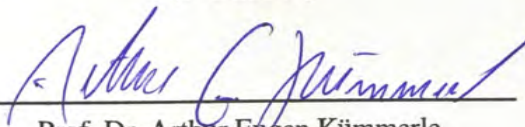
MARINA BRANDÃO DA FONSECA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química no Curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química

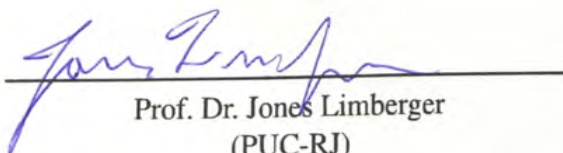
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 DE JANEIRO DE 2020.



Prof. Dr. Cedric Stephan Graebin (IQ/UFRRJ)
(Orientador)



Prof. Dr. Arthur Eggen Kümmerle
(IQ/UFRRJ)



Prof. Dr. Jones Limberger
(PUC-RJ)

A Deus por todo suporte e a todos que estiveram ao meu lado durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado as forças necessárias para conseguir concluir mais essa etapa.

A minha família, sobretudo a minha mãe que sempre esteve ao meu lado e nunca me deixou desanimar. Aos meus tios e primos pelo apoio.

Ao meu orientador Cedric por sempre acreditar no meu potencial e sempre querer os melhores caminhos pra mim.

Ao meu co-orientador, Adriano Andricopulo, e todo Laboratório de Química Medicinal e Computacional, sobretudo a Luma Magalhães, a Carolina Teixeira e o David Salcedo, que foram essenciais nos resultados desse trabalho e que me receberam de maneira tão receptiva no seu laboratório.

Ao professor Fernando Coelho e seu aluno Ralph Gomes por todo apoio e disponibilidade em realizar a separação dos enantiômeros.

A família LaDMol-QM, sobretudo a Larissa, Vitoria, Nathália e Lucas, por terem sido uma verdadeira família pra mim, dividindo choros e risos diários.

As meninas do alojamento feminino da pós graduação que dividiram comigo momentos tão importantes nessa jornada.

Aos meus amigos, Hudson, Vanessa e Nathália que sempre torceram por mim, mesmo à distância.

A todos os amigos que fiz nas disciplinas realizadas, por sofrerem e rirem junto comigo.

A todos os professores que tiveram paciência comigo, sobretudo a Rosane Nora, Marco Edilson Freire e Arthur Eugen.

Ao meu namorado Victor por ter sido uma base enorme pra mim, além de estar presente em todas as fases do meu mestrado, desde a prova para admissão, até a defesa da dissertação.

Ao meu afilhado Theo e minha enteada Maria Julia, por serem um sopro de esperança na minha vida, e por serem o motivo por eu tentar ser uma pessoa melhor.

A CAPES, FAPERJ e a UFRRJ, pelo apoio financeiro e acadêmico para realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

RESUMO

DA FONSECA, Marina Brandão. **Otimização do protótipo LDQMC-014: uma acridinona inibidora da polimerização de Tubulina.** 2020. 129p Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Atualmente, o câncer é uma das doenças que mais causa óbitos no mundo. O câncer de mama é o quinto mais letal, sendo seu subtipo triplo negativo o que apresenta maior taxa de mortalidade. Não existe tratamento específico para o subtipo triplo negativo, e com as elevadas taxas de reincidência da doença e de metástase faz com que seja necessária a busca por novas formas de tratamento. A reação multicomponente é um tipo de reação utilizada na síntese de produtos químicos, onde três ou mais reagentes levam a formação de um único produto, com alto grau de diversidade química, sendo a reação de Hantzsch uma das primeiras reações desse tipo relatada. No presente trabalho foram sintetizadas diversas moléculas, utilizando como base a reação de Hantzsch e estruturas análogas à produtos naturais como a Colchicina e Podofilotoxina, visando a otimização do protótipo LDQMC-014 (7-(3,4,5-trimetoxifenil)-9,10,11,12-tetraidrobenzo[c]acridin-8(7H)-ona), cujos resultados em trabalhos anteriores demonstram uma boa atividade citotóxica *in vitro*, tendo um perfil de inibição da polimerização de Tubulina (alvo amplamente validado como anticâncer). Obtiveram-se rendimentos variados, com confirmação das estruturas realizadas por RMN de carbono e hidrogênio. Uma vez que o composto LDQMC-014 obteve resultados satisfatórios, buscou-se otimizar os resultados de sua síntese. Foram realizadas mudanças sistemáticas nos parâmetros da síntese, que promoveu um aumento de mais de 78% no rendimento. Realizou-se a separação dos enantiômeros do composto LDQMC-014, através de cromatografia quiral, que proporcionou uma boa separação enantiomérica, que, posteriormente permitiu a determinação da configuração absoluta do centro assimétrico presente através do dicroísmo circular. Uma vez que os enantiômeros estavam isolados, foram realizadas suas avaliações biológicas *in vitro* (ensaio de citotoxicidade, migração celular, polimerização de Tubulina e análise do ciclo celular), a fim de determinar a atividade de cada um, além de um estudo de modelagem molecular para prever a interação dos enantiômeros isolados com a proteína Tubulina, chegando-se a conclusão que os enantiômeros interagem de maneira distintas com a proteína tanto nos testes *in silico* quanto nos teste *in vitro*. O estudo de modelagem molecular foi ampliado para todas acridinonas pretendidas a fim de prever uma possível interação com a proteína Tubulina. Realizou-se teste de migração celular (*Wound Healing*), para algumas das acridinonas obtidas, que determinou o perfil de inibição da migração celular, característica desejada em casos de metástase.

Palavras-chave: Reação multicomponente; câncer; Tubulina.

ABSTRACT

DA FONSECA, Marina Brandão. **Prototype optimization LDQMC-014: an acridinone inhibitor of Tubulin polymerization**. 2020. 129p. Dissert (Master's degree in chemistry). Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Today, cancer is one of the most deadly diseases in the world. Breast cancer is the fifth most lethal, and its triple negative subtype has the highest mortality rate. There is no specific treatment for the triple negative subtype, and the high rates of disease recurrence and metastasis make it necessary to search for new forms of treatment. A multicomponent reaction is a type of reaction for chemical synthesis, where three or more reagents react to form a single product with a high degree of chemical diversity, and the Hantzsch reaction is one of the first reactions of this type reported. In the present work, a series of molecules were synthesized, using as a basis the Hantzsch reaction and structures analogous to natural products such as Colchicine and Podophyllotoxin, aiming at the optimization of the LDQMC-014 (7-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-9,10,11,12-tetrahydrobenzo[*c*]acridin-8(7H)-one) prototype, whose results in previous works demonstrate good cytotoxic activity *in vitro*, with a profile of inhibition of Tubulin polymerization (target widely validated as anticancer). Varied yields were obtained with confirmation of the structures by carbon and hydrogen NMR. Once the LDQMC-014 compound obtained satisfactory results, it was sought to optimize the synthesis results. Systematic changes were made in the synthesis parameters, which promoted an increase of more than 78 % in the reaction yield. The enantiomers of LDQMC-014 were separated by chiral chromatography, which provided good enantiomeric separation, which subsequently allowed the determination of the absolute configuration of the asymmetric center present by circular dichroism. Once the enantiomers were isolated, their biological evaluations were performed in order to determine their activity, as well as a molecular modeling study to predict the interaction of the isolated enantiomers with the Tubulin protein. That enantiomers interact differently with the protein in both the *in silico* and the *in vitro* tests. The molecular modeling study was extended to all intended acridinones to predict a possible interaction with the Tubulin protein. A cell migration test (*Wound Healing*) was performed for some of the obtained acridinones, which determined the inhibition profile of cell migration, a desired characteristic in metastasis cases.

Keywords: Multicomponent reaction; cancer; Tubulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Números relativos a todos os tipos de câncer. Fonte: IARC (2019e)	1
Figura 2 – Números relativos ao câncer de mama. Fonte: IARC (2019f).	2
Figura 3 – Agentes estabilizantes e desestabilizantes de microtúbulos. Fonte: Steinmetz e Prota (2018), modificada.	4
Figura 4 – Sítios ativos da proteína Tubulina. Fonte: Steinmetz e Prota (2018), modificada.	4
Figura 5 – Estrutura da Colchicina (à esquerda) e Podofilotoxina (À direita).	5
Figura 6 – Mecanismo de ação dos compostos que se ligam no sítio da Colchicina. Fonte: Steinmetz e Prota (2018), modificada	7
Figura 7 – Esquemas gerais das reações multicomponentes. Fonte: Rogerio et al. (2016), modificada	8
Figura 8 – Esquema reacional da síntese da 1,4-dihidropiridina.	8
Figura 9 – Estruturas da DHP e do NADH comparativas. Fonte: Elaborada pela autora.	9
Figura 10 – Esquema reacional para síntese da 4-aza-2,3-dideidropodofilotoxina. Fonte: Tratat, Giorgi-Renault e Husson (2002), modificada.	9
Figura 11 – Esquema de intermediários da reação de obtenção da 4-aza-2,3-dideidropodofilotoxina. Fonte: Tratat, Giorgi-Renault e Husson (2002), modificada.	10
Figura 12 – Mecanismo proposto para síntese em meio básico. Fonte: Chung et al. (2015), modificada.	11
Figura 13 – Exemplo de encaixe receptor ligante. Fonte: ProteomicsCreative (2019), modificada.	13
Figura 14 – Estrutura do composto LDQMC-014. Fonte: Elaborada pela autora.	14
Figura 15 – Planejamento estrutural. Fonte: Elaborada pela autora.	18
Figura 16 – Esquema de retrossíntese para as acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.	19
Figura 17 – Estrutura do ligante NV4. Fonte: Elaborada pela autora.	19
Figura 18 – Planejamento estrutural baseado na Combrestatina. Fonte: Elaborada pela autora.	20
Figura 19 – Esquema reacional síntese clássica. Fonte: Elaborada pela autora.	21
Figura 20 – Produtos obtidos através da metodologia clássica. Fonte: Elaborada pela autora.	21
Figura 21 – Esquema de intermediários das reações de metodologia clássica. Fonte: Elaborada pela autora.	22
Figura 22 – Espectro ¹ H-RMN (500 MHz, DMSO-d ₆) para o produto 2 . Fonte: Elaborada pela autora.	24
Figura 23 – Espectro ¹³ C-RMN para o produto 2 . Fonte: Elaborada pela autora.	25
Figura 24 – Esquema reacional da síntese modificada. Fonte: Elaborada pela autora. . .	26
Figura 25 – Estruturas dos compostos pretendidos. Fonte: Elaborada pela autora.	27
Figura 26 – Estruturas dos compostos pretendidos. Fonte: Elaborada pela autora.	28

Figura 27 – Esquema de intermediários da obtenção das acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.	29
Figura 28 – Estrutura do 6-aminoindazol.	30
Figura 29 – ¹ H-RMN para o composto 13 . Fonte: Elaborada pela autora.	31
Figura 30 – ¹ H-RMN para o composto 15 . Fonte: Elaborada pela autora.	32
Figura 31 – ¹ H-RMN para o composto 23 com destaque para as impurezas presentes na região dos alifático e aromáticos. Fonte: Elaborada pela autora.	33
Figura 32 – ¹ H-RMN para o composto 25 com destaque para os sinais que não são referentes ao produto desejado. Fonte: Elaborada pela autora.	33
Figura 33 – Espectro ¹ H-RMN para o produto 5 . Fonte: Elaborada pela autora.	34
Figura 34 – Espectro ¹³ C-RMN para o produto 5 . Fonte: Elaborada pela autora.	36
Figura 35 – Esquema reacional LDQMC-014. Fonte: Elaborada pela autora.	38
Figura 36 – Espectro ¹ H-RMN para o produto LDQMC-014 . Fonte: Elaborada pela autora.	40
Figura 37 – Espectro ¹³ C-RMN para o produto LDQMC-014 . Fonte: Elaborada pela autora.	42
Figura 38 – Cromatograma obtido por CLAE. Fonte: Elaborada pela autora.	44
Figura 39 – Espectro obtido no dicroísmo circular. Fonte: Elaborada pela autora.	45
Figura 40 – Enantiômeros (<i>R</i>) e (<i>S</i>) pelas regras de quartantes aromáticos. Fonte: Elaborada pela autora.	46
Figura 41 – Estruturas da composto NV4. Fonte: Elaborada pela autora.	47
Figura 42 – Comparação da poses dos enantiômeros (azul – <i>R</i> ; rosa – <i>S</i>). Fonte: Elaborada pela autora.	47
Figura 43 – Comparação NV4 (vermelho) e enantiômero (<i>R</i>) (azul). Fonte: Elaborada pela autora.	48
Figura 44 – Comparação NV4 (vermelho) e enantiômero (<i>S</i>) (rosa). Fonte: Elaborada pela autora.	48
Figura 45 – Comparação das cavidades onde se encontram o enantiômero (<i>S</i>) (rosa) e o enantiômero (<i>R</i>) (azul). Fonte: Elaborada pela autora.	49
Figura 46 – Comparação 5 , 6 e 7 . Fonte: Elaborada pela autora.	53
Figura 47 – Comparação do enantiômeros (<i>R</i>). Fonte: Elaborada pela autora.	54
Figura 48 – Comparação do enantiômeros (<i>S</i>). Fonte: Elaborada pela autora.	54
Figura 49 – Polimerização de Tubulina. Fonte: Magalhaes (2019).	55
Figura 50 – Análise do ciclo celular. Fonte: Magalhaes (2019).	56
Figura 51 – Fotomicrografia da migração celular do produto 21 . Fonte: Elaborada pela autora.	58
Figura 52 – Similaridades estruturais dos compostos LDQMC-014, Podofilotoxina, 6 , 21 e 22 . Fonte: Elaborada pela autora.	59
Figura 53 – Esquema reacional da síntese clássica. Fonte: Elaborada pela autora.	60
Figura 54 – Esquema reacional da síntese modificada. Fonte: Elaborada pela autora.	63
Figura 55 – Esquema reacional do LDQMC-014. Fonte: Elaborada pela autora.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Compostos inibidores de tubulina que se encontram em fase clínica.	6
Tabela 2	–	Resumo dos resultados obtidos para o composto LDQMC-014.	14
Tabela 3	–	Resultados da otimização.	38
Tabela 4	–	Scores médios obtidos no Docking molecular.	49
Tabela 5	–	Scores obtidos por docking molecular para todos os produtos pretendidos.	51
Tabela 6	–	Avaliação biológica do composto LDQMC-014	54
Tabela 7	–	Média das porcentagens da inibição da migração.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
CC ₅₀	Concentração de composto requerida para observação de 50% da resposta citotóxica
CDCL ₃	Clorofórmio
CMTN	Câncer de mama triplo negativo
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHP	Dihidropiridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EGTA	Ácido etileno glicol-bis (β -amino-etil-éter) <i>N,N,N',N'</i> - tetra-acético
GTP	Guanosina trifosfato
HER-2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer
IC ₅₀	Concentração de composto requerida para inibir em 50% a atividade biológica observada
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LaDMol-QM	Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal
LQMC	Laboratório de Química Medicinal e Computacional
MC	Migração celular

MDA-MB-231	Linhagem celular oriunda de adenocarcinoma de mama humano
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxiphenil)-2-(4- sulfophenyl)-2H-tetrazolio]
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PIPES	Piperazina 1,4- bis (ácido 2-etanosulfônico)
PT	Polimerização de Tubulina
RMC	Reações multicomponentes
RMN	Ressonância magnética nuclear
SFB	Soro fetal bovino
SI	Índice de seletividade
TMS	Tetrametilsilano
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer	1
1.2	Câncer de mama	2
1.3	Tubulina como alvo molecular no tratamento do câncer	3
1.4	Reações Multicomponentes	7
1.5	Reação multicomponente de Hantzsch	8
1.6	Quiralidade dos fármacos	11
1.7	Modelagem Molecular	12
1.8	Resultados anteriores	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos Gerais	16
2.2	Objetivos Específicos	16
2.3	Planejamento Estrutural	17
3	RESSULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1	Síntese das acridinonas	21
3.1.1	Síntese Clássica de Hantzsch	21
3.1.2	Síntese modificada	26
3.2	Otimização da síntese do composto LDQMC-014	38
3.3	Cromatografia quiral	43
3.4	Dicroísmo circular	44
3.5	Modelagem molecular	46
3.5.1	Enantiômeros do produto LDQMC-014	46
3.5.2	Acridinonas pretendidas	50
3.6	Avaliação biológica	54
3.6.1	Enantiômeros do LDQMC-014	54
3.6.2	Acridinonas	57
4	METODOLOGIA	60
4.1	Síntese das Acridinonas	60
4.1.1	Síntese Clássica de Hantzsch	60
4.1.1.1	9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2<i>H</i>,5<i>H</i>)-diona	61
4.1.1.2	9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2<i>H</i>,5<i>H</i>)-diona	61
4.1.1.3	9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2<i>H</i>,5<i>H</i>)-diona	62

4.1.1.4	9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2 <i>H</i> ,-5 <i>H</i>)-diona	62
4.1.2	Síntese Modificada	63
4.1.2.1	5-(3,4,5-trimetoxifenil)-7,8,9,10-tetraidro-1 <i>H</i> -pirazol[4,3- <i>b</i>]acridin-6(5 <i>H</i>)-ona	64
4.1.2.2	5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-7,8,9,10-tetraidro-1 <i>H</i> -pirazol[4,3- <i>b</i>]acridin-6(5 <i>H</i>)-ona	64
4.1.2.3	11-(3-nitrofenil)-7,8,9,11-tetraidro-1 <i>H</i> -pirazol[3,4- <i>a</i>]acridin-10(6 <i>H</i>)-ona	65
4.1.2.4	9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6,7,8-trimetoxi-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2 <i>H</i>)-ona	65
4.1.2.5	6,7,8-trimetoxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2 <i>H</i>)-ona	66
4.1.2.6	6,7-dimetoxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2 <i>H</i>)-ona	66
4.1.2.7	6,7-dimetoxi-9-(3-nitrofenil)-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2 <i>H</i>)-ona	67
4.1.2.8	10,10-dimetil-7-(3,4,5-trimetoxifenil)-9,10,11,12-tetraidrobenzo[<i>c</i>]acridin-8(7 <i>H</i>)-ona	68
4.1.2.9	10-(3,4,5-trimetoxifenil)-6,7,8,10-tetraidro-[1,3]dioxolo[4,5 <i>b</i>]acridin-9(5 <i>H</i>)-ona	68
4.1.2.10	10-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6,7,8,10-tetraidro-[1,3]dioxolo[4,5 <i>b</i>]acridin-9(5- <i>H</i>)-ona	69
4.2	Otimização da síntese da molécula LDQMC-014	69
4.2.1	LDQMC-014: (7-(3,4,5-trimetoxifenil)-9,10,11,12-tetraidrobenzo[<i>c</i>]acridin-8(7 <i>H</i>)-ona)	71
4.3	Cromatografia Quiral	71
4.4	Dicroísmo Circular	72
4.5	Modelagem Molecular	72
4.6	Ensaio biológicos	72
4.6.1	Preparação dos compostos para os ensaios biológicos	73
4.6.2	Ensaio de citotoxicidade	73
4.6.3	Ensaio de polimerização da proteína Tubulina	73
4.6.4	Ensaio de migração celular <i>Wound Healing</i>	74
4.6.5	Análise estatística	74
5	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	ANEXOS	81
A.1	¹ H-RMN - 1	82
A.2	¹³ C-RMN - 1	83
A.3	¹ H-RMN - 2	84

A.4	¹³ C-RMN - 2	85
A.5	¹ H-RMN - 3	86
A.6	¹³ C-RMN - 3	87
A.7	¹ H-RMN - 4	88
A.8	¹³ C-RMN - 4	89
A.9	¹ H-RMN - 5	90
A.10	¹³ C-RMN - 5	91
A.11	¹ H-RMN - 6	92
A.12	¹³ C-RMN - 6	93
A.13	¹ H-RMN - 7	94
A.14	¹³ C-RMN - 7	95
A.15	¹ H-RMN - 8	96
A.16	¹³ C-RMN - 8	97
A.17	¹ H-RMN - 9	98
A.18	¹³ C-RMN - 9	99
A.19	¹ H-RMN - 10	100
A.20	¹³ C-RMN - 10	101
A.21	¹ H-RMN - 12	102
A.22	¹³ C-RMN - 12	103
A.23	¹ H-RMN - 19	104
A.24	¹³ C-RMN - 19	105
A.25	¹ H-RMN - 21	106
A.26	¹³ C-RMN - 21	107
A.27	¹ H-RMN - 22	108
A.28	¹³ C-RMN - 22	109
A.29	¹ H-RMN - LDQMC-014	110
A.30	¹³ C-RMN - LDQMC-014	111
A.31	COSY - LDQMC-014	112
A.32	¹ H- ¹³ C HSQC - LDQMC-014	113
A.33	¹ H- ¹³ C HMBC - LDQMC-014	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) câncer é o nome utilizado para um conjunto de mais de 100 doenças que tem como ponto em comum o anômalo crescimento celular. O crescimento anormal gera uma divisão celular acelerada, tal fator faz com que essas células sejam extremamente agressivas e incontroláveis, podendo, por sua vez, espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (INCA, 2019a).

Os levantamentos anuais do INCA para estimar os números de casos no Brasil dos diversos tipos da doença, mostra um constante crescimento da incidência e mortalidade gerados pela doença. Tal padrão também pode ser observado a nível mundial, chegando a uma previsão de aumento de quase 63% na incidência da doença na população mundial para o ano de 2040 (IARC, 2019e). Os números estimados de casos, para homens e mulheres, para o ano de 2018 e as projeções para 2040, no Brasil e no mundo, encontram-se na Figura 1.

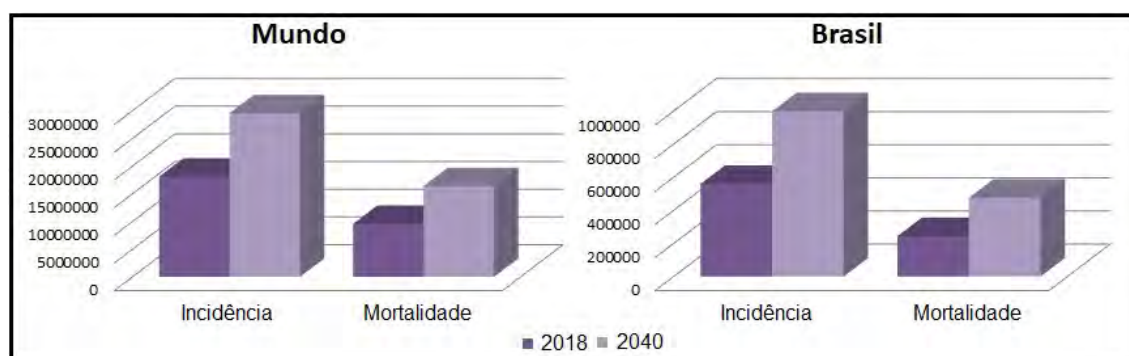


Figura 1 – Números relativos a todos os tipos de câncer. Fonte: IARC (2019e)

O tratamento da doença pode ser realizado de diferentes maneiras, muitas vezes faz-se necessário a combinação de mais de uma modalidade de tratamento. As modalidades de tratamento são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea (INCA, 2019e). A quimioterapia é um tratamento onde se utiliza um medicamento capaz de combater as células cancerígenas que formam um tumor, além de combater o espalhamento dessas células para outras regiões do corpo do paciente (INCA, 2019c), entretanto essa modalidade de tratamento pode gerar diversos efeitos adversos (fraqueza, diarreia, perda de peso, enjojo, queda de cabelo, etc) (INCA, 2019b), além de muitas vezes ter um custo muito elevado (NOBREGA; LIMA, 2014; HYEDA; SBARDELLOTTO; DA COSTA, 2015), fazendo com que seja necessário a busca por novos medicamentos que tenha menos incidência de efeitos colaterais e um preço mais acessível.

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença onde ocorre a multiplicação desordenada de células anômalas da mama, levando à formação de um tumor, sendo que a evolução da doença pode ocorrer de forma lenta ou rápida, dependendo do organismo (INCA, 2019d).

No último ano de análise dos números de câncer (2018), de acordo com a plataforma *Cancer Today*, o câncer de mama representa 11,6% de todos os casos de câncer no mundo, sendo o segundo de maior incidência. As estimativas para o Brasil colocam esse tipo da doença como o de maior incidência, sendo 15,3% do número total de casos (IARC, 2019a; IARC, 2019b). De acordo com o Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer (IARC), através da sua plataforma *Cancer Tomorrow*, o número de casos de câncer de mama previstos para o ano de 2040, tanto no Brasil como no mundo, tendem a ter um aumento considerável (IARC, 2019f), como pode ser visto na Figura 2.

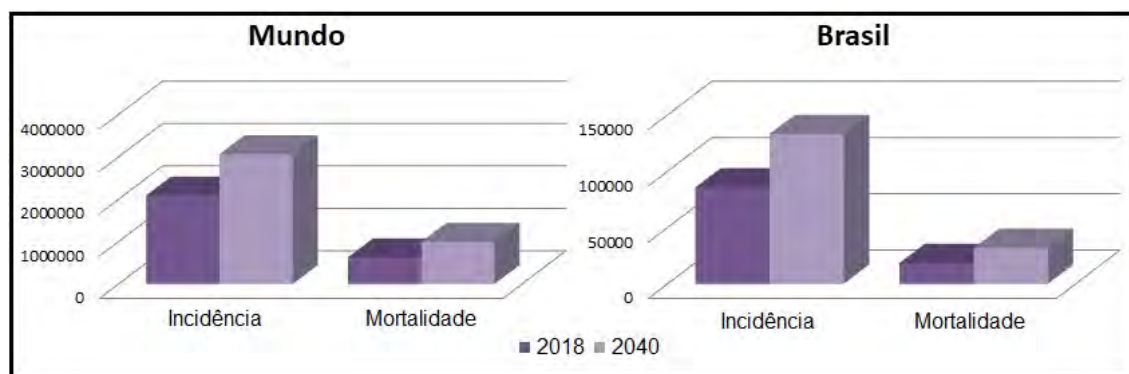


Figura 2 – Números relativos ao câncer de mama. Fonte: IARC (2019f).

O câncer de mama é o segundo mais comum no mundo, representando mais de 11% do número total de casos (IARC, 2019a), quinto mais letal, representando mais de 6% do número total de mortes pela doença (IARC, 2019c) e o primeiro em número estimado de casos prevalentes (IARC, 2019d), sendo o subtipo triplo negativo (CMTN) o que apresenta a maior taxa de mortalidade (MUSTACCHI; DE LAURENTIIS, 2015).

O subtipo triplo negativo corresponde a cerca de 20% do número total de casos de câncer de mama (INCA, 2009). Ele é caracterizado pelo fato de não possuir os três biomarcadores mais comuns nesse tipo de câncer, são eles: receptor de estrógeno, receptor de progesterona e a proteína HER-2 (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010). Em outros subtipos da doença, a presença desses marcadores facilita o tratamento, entretanto, para o CMTN não existe ainda um tratamento específico, e devido a sua alta taxa de reincidência em pacientes e elevada taxa de metástase, começou-se a busca novos alvos que possam atuar como tratamentos específicos para esse subtipo (DAWOOD, 2010; HSL, 2019).

O tratamento clássico para o CMTN inclui fármacos que atuam como moduladores de Tubulina (como paclitaxel e docetaxel) (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010), porém a elevada toxicidade dos fármacos atuais e a possibilidade de mecanismos de resistências das células neoplásicas faz com que novas formas de tratamento sejam buscadas. Um recente avanço no tratamento da doença encontra-se na imunoterapia, que com a utilização do Tecentriq[®] (*Atezolizumabe*) em combinação com nab-paclitaxel (uma forma de paclitaxel ligado à albumina, que funciona como um agente inibidor de microtúbulos), garante redução de 38% do risco de progressão da doença ou morte e ganho de 10 meses de sobrevida global (SCHMID et al., 2018; ANVISA, 2019).

1.3 Tubulina como alvo molecular no tratamento do câncer

Tubulina é um tipo de proteína globular. Os microtúbulos, que são polímeros de proteínas do citoesqueleto eucariótico, são compostos por dois heterodímeros da tubulina, denominados α e β -tubulina, que se associam para formar um protofilamento que se empacota para formar cilindros ocos. Os heterodímeros são adicionados no terminal positivo, que possui uma molécula de guanosina trifosfato (GTP) ligada à β -tubulina; e são removidos no terminal negativo, que possui uma unidade de α -tubulina; fazendo assim um sistema de polimerização e dissociação contínuo (MAKRIYANNIS; BIEGEL, 2003; SALUM, 2011; WADE, 2009).

Os microtúbulos desempenham um papel fundamental na divisão celular e na mitose, por isso são considerados alvos para agentes quimioterápicos visando o tratamento do câncer. Esse tipo de alvo é considerado relevante, pois a supressão da dinâmica dos microtúbulos interfere em suas funções, incluindo a formação das fibras do fuso mitótico. A ruptura das fibras do fuso bloqueia a mitose e interrompe o ciclo celular na fase G₂/M levando as células a apoptose (MAGALHAES, 2019).

A interação de um fármaco com a Tubulina pode ocorrer de duas formas, dividindo-se, portanto, seus agentes em dois grupos. O primeiro grupo são os estabilizantes de microtúbulos, que tem como representantes os *taxanos* e *epotilonas* (exemplo *Taxol*[®] e *Ontax*[®]), e o segundo grupo são os desestabilizadores de microtúbulos, que tem como representantes os alcaloides *vincas* (exemplo *Tecnocris*[®] e *Faulblastina*[®]) (KAVALLARIS, 2010). Os estabilizantes de microtúbulos atuam promovendo a polimerização, gerando um aumento na massa do polímero, já os desestabilizadores atuam inibindo a polimerização e diminuição da massa do polímero, como ilustrado na Figura 3. Nos últimos anos, os mecanismos individuais de ação de cada fármaco que interage com a tubulina têm sido estudados com maior profundidade (PEREZ, 2009).

Seis distintos sítios de ligações são encontrados na proteína Tubulina, são eles: *Taxane*, *Vinca*, *Laulimalide/Peloruside*, *Maytansine*, *Colchicine* e *Pironetin*; o local onde se encontra cada um dentro da proteína é mostrado na Figura 4. Em dois sítios se ligam agentes estabilizadores de microtúbulos e em quatro sítios se ligam agentes desestabilizadores de microtúbulos. A maioria

dos estudos, entretanto, vêm sendo realizados para apenas três sítios, sendo eles: *Taxane*, *Vinca* e *Colchicine* (STEINMETZ; PROTA, 2018).

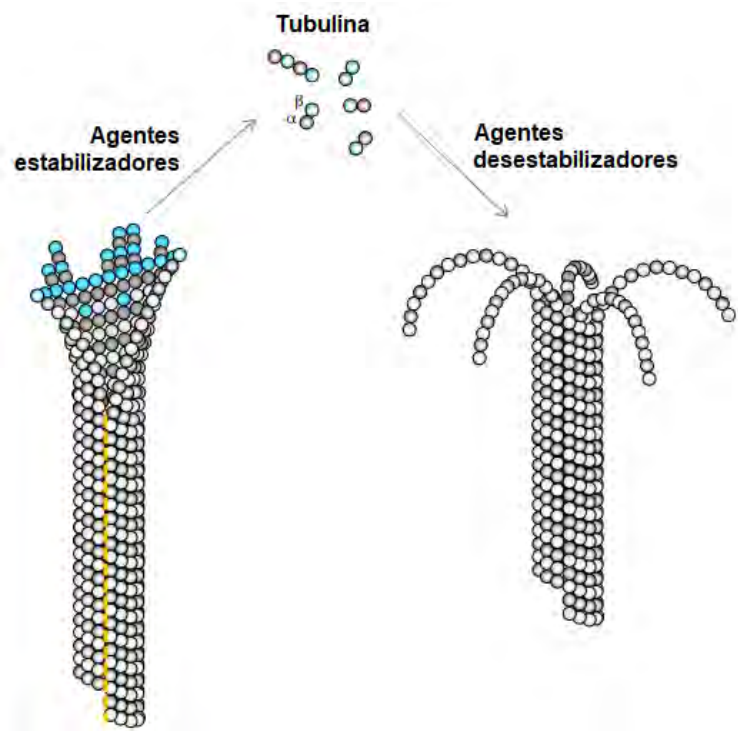


Figura 3 – Agentes estabilizantes e desestabilizantes de microtúbulos. Fonte: Steinmetz e Prota (2018), modificada.

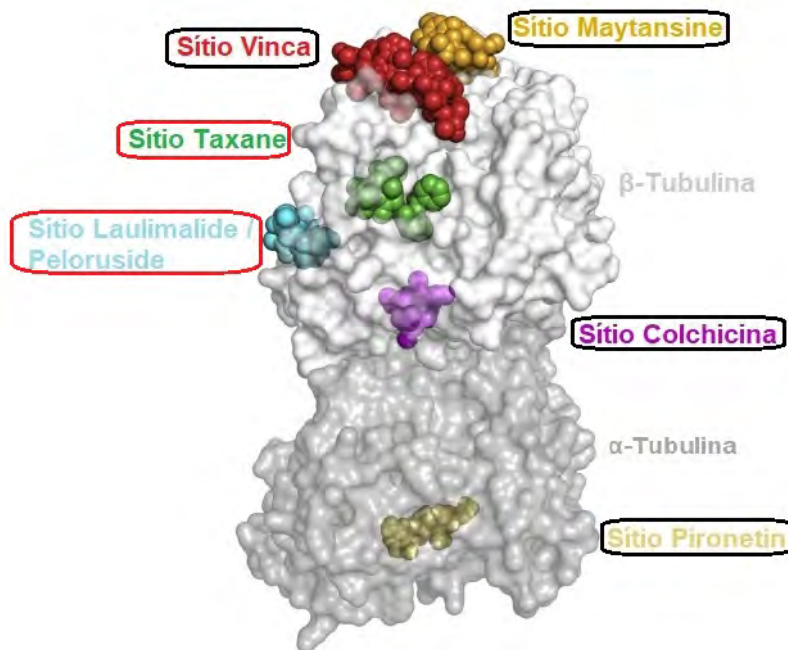


Figura 4 – Sítios ativos da proteína Tubulina. Fonte: Steinmetz e Prota (2018), modificada.

Nota: Sítios destacados com círculos vermelhos são os estabilizantes e em preto são os desestabilizantes.

Os compostos que se ligam no sítio da colchicina tem como características serem inibidores da polimerização de microtúbulos. Como representantes dos compostos que se ligam nesse sítio temos a colchicina (**1**) e seus análogos e a podofilotoxina (**2**) (Figura 5). A semelhança entre eles está justamente no grupo trimetoxifenil, que de acordo com estudos de modelagem molecular, é o grupo que pode realizar interações em maior número e força com o alvo tubulina (DUMONTET; JORDAN, 2010).

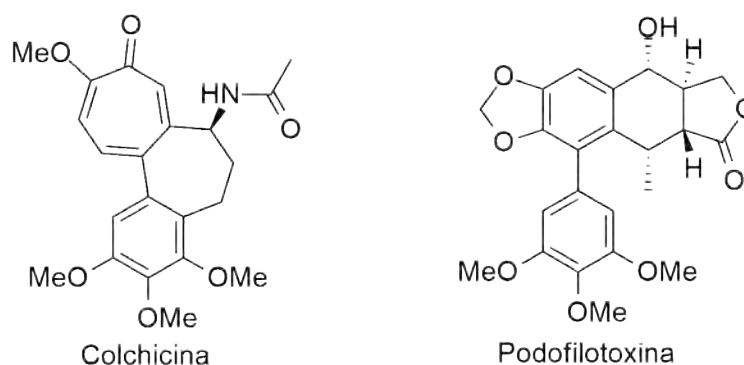
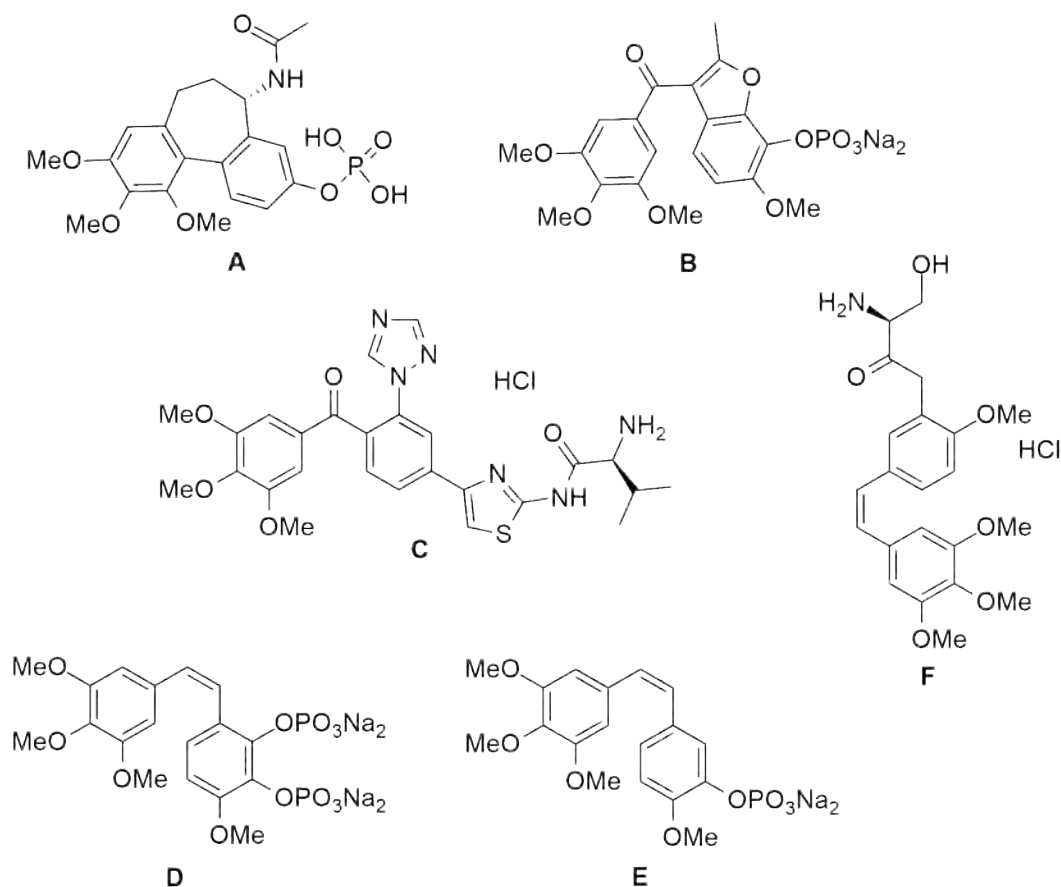


Figura 5 – Estrutura da Colchicina (à esquerda) e Podofilotoxina (À direita).

Nos últimos anos, diversos compostos que também contêm o grupo trimetoxifenil e se baseiam na inibição da polimerização de tubulina vêm sendo descobertos e alguns destes encontram-se em fase clínica de estudos (LI et al., 2018). Algumas dessas moléculas, além de sua respectiva fase clínica, encontram-se na Tabela 1.

O sítio da Colchicina é, dentre os moduladores de microtúbulos, o mais estudado, não há nenhum fármaco, entretanto, que se liga nesse sítio que tenha sido aprovado para a terapia contra o câncer, graças a fatores limitantes como baixa solubilidade, neurotoxicidade e efeitos colaterais adversos. O mecanismo de ação para os agentes que se ligam nesse sítio se baseia no fato de que normalmente, os heterodímeros se polimerizam de maneira alinhada pra formar os microtúbulos que, entretanto, precisam passar por uma mudança conformacional para ficarem alinhados, pois, originalmente eles teriam uma forma “curva” a presença de um ligante na interface entre os dímeros α e β da Tubulina, impede esta mudança conformacional, fazendo com que os heterodímeros se mantenham na forma “curva”, levando ao bloqueio da formação dos microtúbulos (ARNST et al., 2019), como ilustrado na Figura 6.

Tabela 1 – Compostos inibidores de tubulina que se encontram em fase clínica.



Composto	Estrutura	Indicação (fase clínica)
ZD6126	A	Neoplasias renais e carcinoma de células renais (fase II suspensa) (CLINICALTRIALS, 2019f)
BNC-105p	B	Carcinoma de células renais (fase II completa), câncer colorretal metastático (fase II recrutamento), leucemia linfocítica crônica (fase I) (CLINICALTRIALS, 2019b)
CKD-516	C	Tumor sólido (fase I completa) (CLINICALTRIALS, 2019e)
CA-1P	D	Metástase de neoplasias (fase I completa), leucemia mielóide aguda e síndromes mielodisplásticas (fase II recrutamento) (CLINICALTRIALS, 2019c)
CA-4P	E	Tumores neuroendócrinos, tumores sólidos, câncer de cabeça e e pescoço (fase II completa) (CLINICALTRIALS, 2019d)
AVE8062	F	Sarcoma (fase III completa) (CLINICALTRIALS, 2019a)

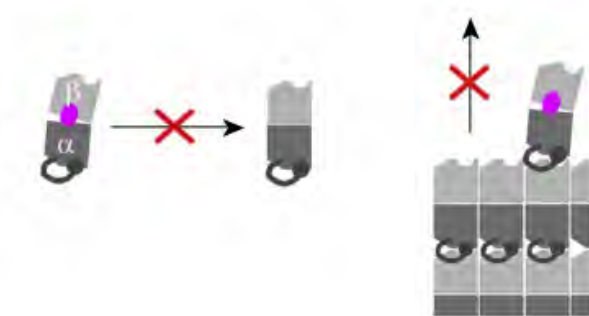


Figura 6 – Mecanismo de ação dos compostos que se ligam no sítio da Colchicina. Fonte: Steinmetz e Prota (2018), modificada

1.4 Reações Multicomponentes

Reações multicomponentes (RMC) são um conjunto de reações químicas que geram produtos com um grau de diversidade química elevado, devido ao fato destas reações ocorrerem entre três ou mais reagentes (denominados de componentes neste contexto) que geram um único produto com um bom grau de pureza, sendo executadas em uma única etapa ou em cascata. Diversas reações multicomponentes são conhecidas. Uma das primeiras relatadas foi a reação de Hantzsch (1882), seguida da reação de Biginelli (1891), Passerini (1921) e Ugi (1959), entre outras, descritas na Figura 7. De um modo geral, esse tipo de reação vem sendo utilizada para síntese de produtos naturais, e para síntese de compostos bioativos (BIGGS-HOUCK; YOUNAI; SHAW, 2010; GRAEBIN et al., 2019).

As RMCs apresentam diversas vantagens, entre elas: menor número de etapas, processo de purificação simplificado, o isolamento dos intermediários ser, em muitos casos, desnecessário e geração de menos resíduos pois, na grande maioria dos casos, todos os átomos de carbono presentes nos componentes estão incorporados no produto final. Esses fatores, aliados ao fato da enorme diversidade química que pode ter um composto gerado a partir de uma RMC, fizeram com que esse tipo de síntese seja um alvo constante de novos estudos (ROGERIO et al., 2016).

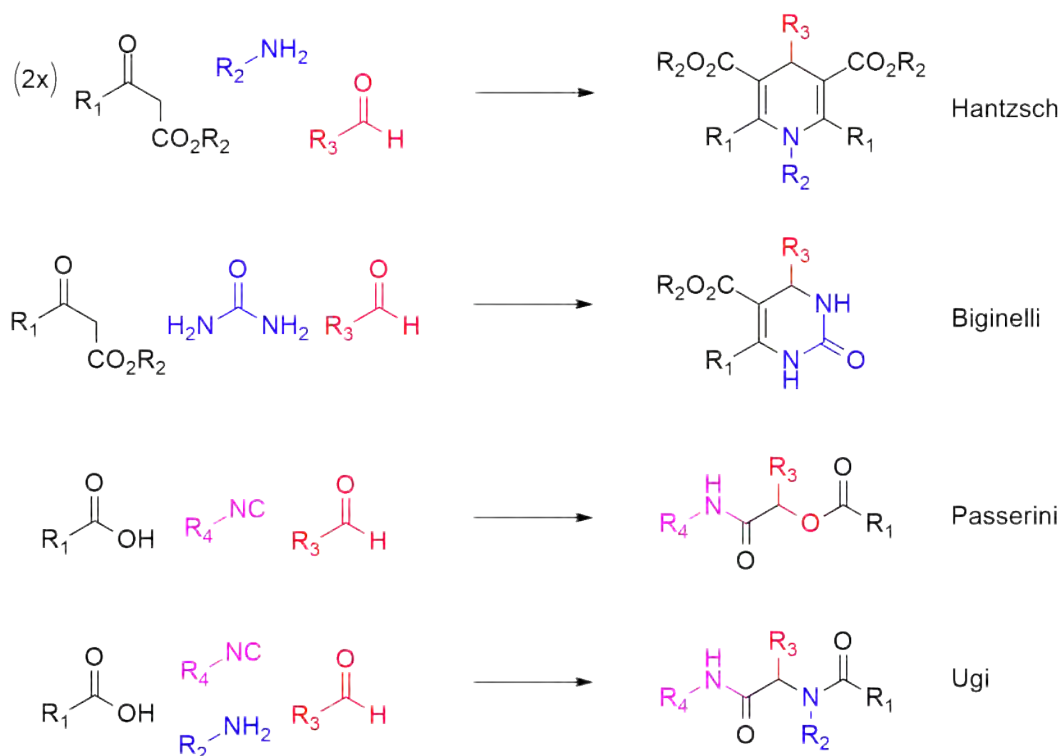


Figura 7 – Esquemas gerais das reações multicomponentes. Fonte: Rogerio et al. (2016), modificada

1.5 Reação multicomponente de Hantzsch

Essa reação foi descrita pela primeira vez por Arthur Hantzsch em 1882, onde descreveu-se a síntese da 1,4-dihidropiridina (DHP) (Figura 8), que envolveu a ciclocondensação de dois equivalentes de acetoacetato de etila, benzaldeído e amônia em refluxo de etanol, por um longo tempo reacional, gerando um único produto com bons rendimentos (HANTZSCH, 1882).

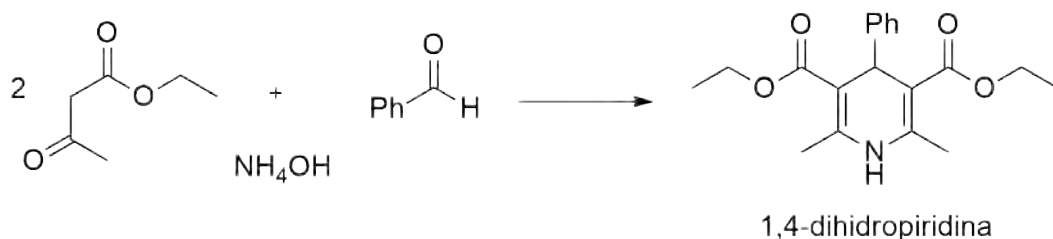


Figura 8 – Esquema reacional da síntese da 1,4-dihidropiridina.

As DHPs de Hantzsch possuem semelhanças estruturais com a estrutura da forma reduzida do Dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), como demonstradas na Figura 9. As reconhecidas atividades do NADH como agente de transferência de hidrogênio essencial em processos biológicos, além do fato da consolidada atividade anti-hipertensiva das DHPs fez com que se intensificasse os estudos que envolvessem a classe das dihidripiridinas. Além da reconhecida atividade anti-hipertensiva, as DHPs também vêm sendo exploradas devido as suas

possíveis atividades antitumoral, anti-inflamatória, anticonvulsiva e antituberculosa (SAINI; KUMAR; SANDHU, 2008).

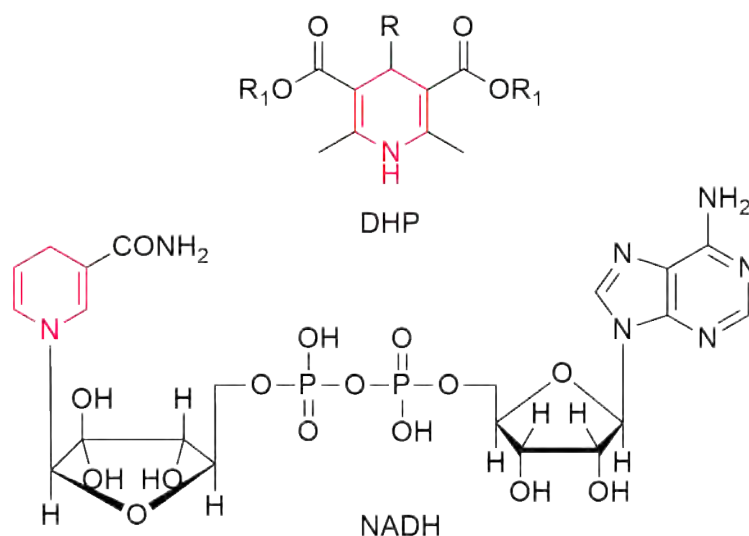


Figura 9 – Estruturas da DHP e do NADH comparativas. Fonte: Elaborada pela autora.

Tratrat, Giorgi-Renault e Husson (2002) descreveram a síntese de compostos análogos à Podofilotoxina (produto natural com conhecida atividade na modulação de microtúbulos), entretanto, as estruturas dos novos produtos apresentam uma simplificação molecular, uma vez que possui apenas um dos quatro centros de quiralidade da molécula original da Podofilotoxina, e com a vantagem de poder ser obtido em uma única etapa sintética. A reação descrita por eles (Figura 10) serve de base para algumas reações do presente trabalho.

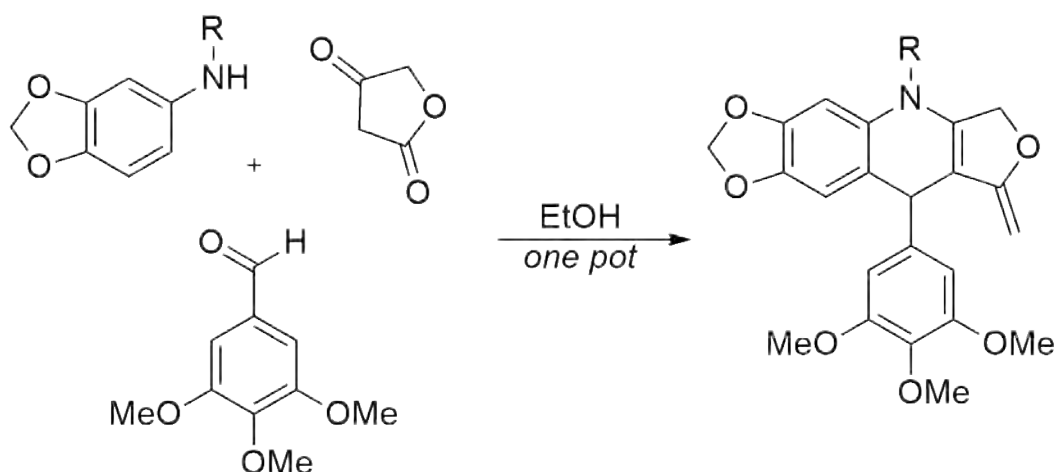


Figura 10 – Esquema reacional para síntese da 4-aza-2,3-dideidropodofilotoxina. Fonte: Tratrat, Giorgi-Renault e Husson (2002), modificada.

O mecanismo proposto para a síntese do 4-aza-2,3-dideidropodofilotoxina descrita por Tratrat, Giorgi-Renault e Husson (2002) envolve primeiramente uma condensação de Knoevenagel, formando um intermediário, que, sequencialmente, reage com a amina aromática em refluxo de etanol, gerando o produto final com um rendimento de 85%, como descrito na Figura 11.

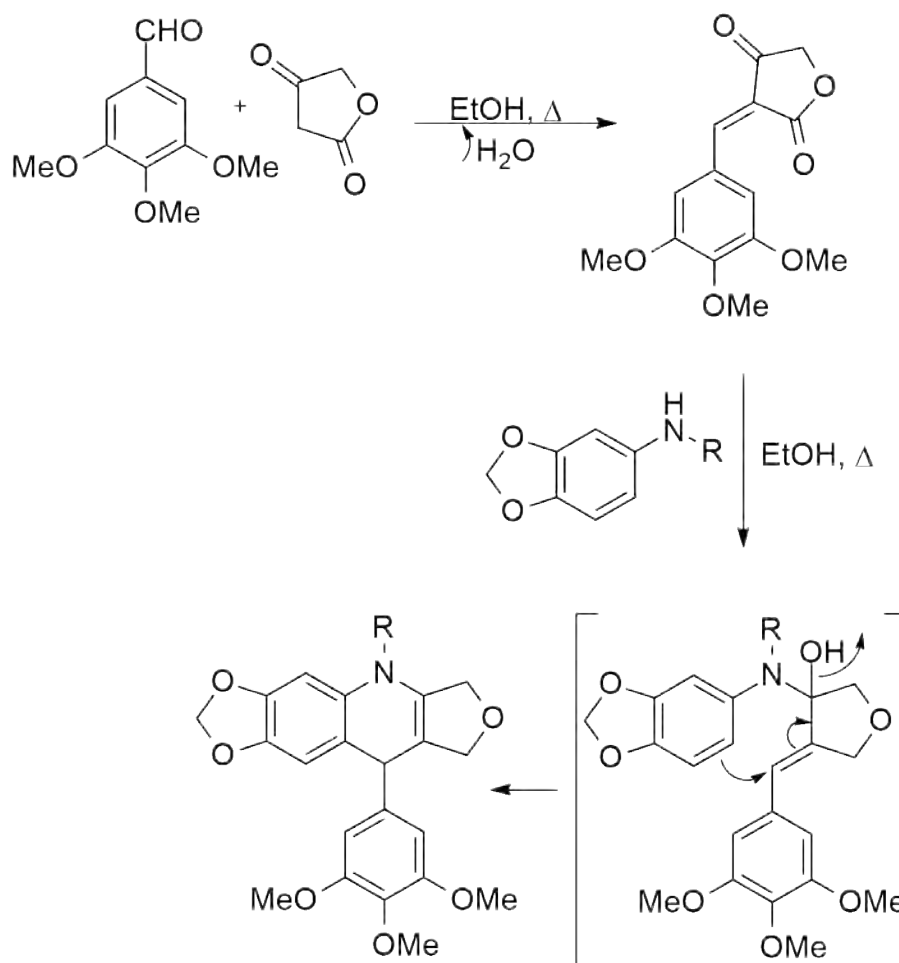


Figura 11 – Esquema de intermediários da reação de obtenção da 4-aza-2,3-dideidropodofiloxina. Fonte: Tratat, Giorgi-Renault e Husson (2002), modificada.

Entretanto, há estudos que mostram evidências que o mecanismo para esse tipo de reação, quando realizado em meio básico (piperidina), é diferenciado. O mecanismo envolveria um ataque nucleofílico do nitrogênio de uma amina aromática ao enol, produzido por uma adição de Michael, para produzir um produto que sofre uma desidratação gerando um intermediário enamínona. A ligação de hidrogênio intramolecular no produto da adição de Michael ativa a enona, tornando-a suscetível ao ataque nucleofílico. O imino enol sofre uma reação retro-aldol através do tautômero ceto para produzir o aza-trieno e a 1,3-dicetona. O aza-trieno sofre a ciclização para ocorrer a formação do anel obtendo-se produto final (CHUNG et al., 2015), como mostra a Figura 12.

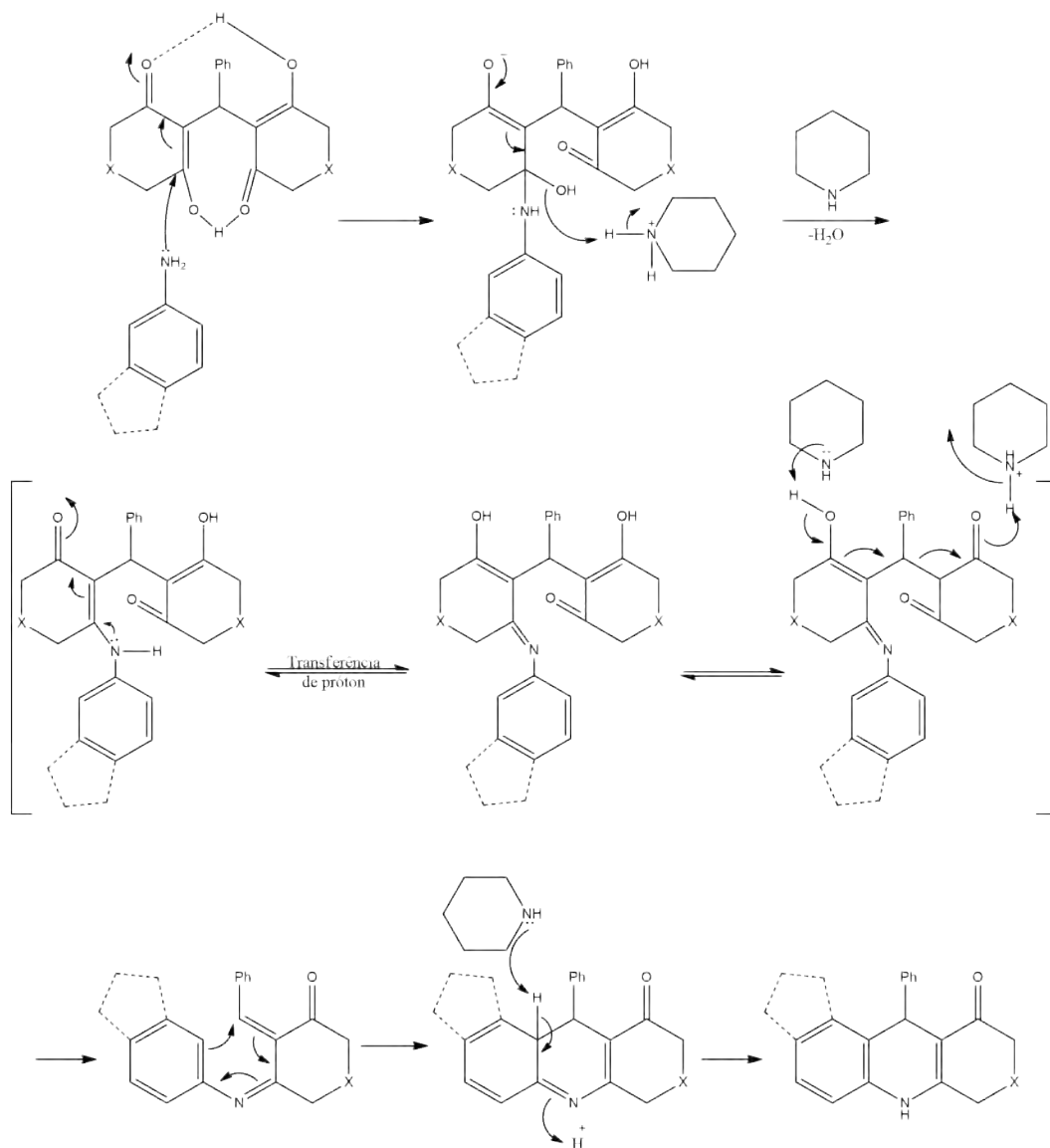


Figura 12 – Mecanismo proposto para síntese em meio básico. Fonte: Chung et al. (2015), modificada.

1.6 Quiralidade dos fármacos

Isômeros são compostos diferentes que têm a mesma fórmula molecular. Eles são basicamente divididos entre isômeros constitucionais e estereoisômeros. Por definição, estereoisômeros têm seus átomos conectados na mesma sequência, mas se diferem no arranjo espacial, esse tipo de isomeria é dividido em duas classes: enantiômeria e diastereoisômeria. Os enantiômeros são estereoisômeros cujas moléculas são imagens especulares não sobreponíveis, essas moléculas são denominadas quirais (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

O organismo humano possui enzimas e receptores muito estereosseletivos, esse fato faz com que moléculas quirais possam interagir de maneiras distintas com o receptor desejado. A importância da determinação da configuração absoluta na atividade biológica passou a ser

considerada como de extrema importância na década de 60, onde houve o famoso caso da Talidomida, que era comercializada na sua forma racêmica, entretanto após uma série de problemas de má formação congênitas de crianças foi-se descoberto que apenas um dos enantiômeros (*R*) tinha a atividade esperada (redução de enjoos matinais), enquanto o seu antípoda (*S*) gerava a teratogenicidade (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Existem diversos casos em que isômeros apresentam atividades biológicas distintas, como citado por (LIMA, 1997) e descritos abaixo:

- Um estereoisômero é ativo e o outro inativo (exemplo: antihipertensivo α -Metildopa);
- Ambos os enantiômeros apresentam potência e atividades similares (exemplo: anti-histamínico Prometazina);
- Enantiômeros com atividades similares mas potências diferentes (exemplo: anticoagulante Warfarina);
- Um estereoisômero antagoniza o efeito secundário de outro (exemplo: Indacrinona);
- Um estereoisômero pode ser o responsável principal pela ação terapêutica desejada e o outro pelos efeitos secundários (exemplo: antiparkinsoniano *L*-Dopa);
- A atividade existe para os dois isômeros, enquanto que o efeito indesejado é atribuído a apenas um deles (exemplo: Prilocaina);
- Cada estereoisômero possui diferentes tipos de atividade de interesse terapêutico (exemplo: *Dextropropoxifeno* (Darvon[®]) e *Levopropoxifeno* (Novrad[®]));
- Um mistura de diastereoisômeros pode levar a efeitos benéficos (exemplo: agente antihipertensivo Labetalol);

Os casos citados como exemplo mostra a necessidade de estudos individuais para cada enantiômero pois eles podem ter propriedades biológicas distintas. Nos casos em que um enantiômero apenas apresenta a atividade desejada ele é denominado eutômero, enquanto o enantiômero que apresenta efeitos inócuos ou tóxicos é denominado distômero (BROOKS; GUIDA; DANIEL, 2011).

1.7 Modelagem Molecular

Um novo fármaco pode levar mais de 11 anos para conseguir chegar ao mercado, e o custo podem ficar acima dos 2 bilhões de dólares. O tempo e o custo elevados são reflexo da necessidade de integração de diversas áreas, como química, biologia e computação. A pesquisa inicia-se no desenvolvimento pré-clínico, passando pela identificação do composto bioativo (*hit*), onde se identifica a atividade biológica associada a um composto, seguido de consecutivas etapas

de validação do alvo terapêutico. O composto com os melhores resultados é indicado para sofrer uma otimização dos parâmetros necessários, gerando um composto líder (*lead*), que, em seguida, passa pelo desenvolvimento clínico, onde ele será administrado em humanos para que assim seja possível avaliar seu perfil de segurança, farmacocinética e eficácia (MAGALHAES, 2019).

Uma das estratégias utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos é a utilização da modelagem molecular. Essa ferramenta computacional gera uma maior eficiência no processo de descoberta de fármacos, pois reduzir em até 50% o custo e tempo de pesquisa (SOUZA, 2012). Essa técnica permite que se preveja a interação entre uma molécula e um alvo biológico, tal previsão é baseada em cálculos quânticos ou de mecânica molecular. A vantagem dessa técnica é a diminuição do tempo e custo necessário para avaliar sistemas moleculares complexos, além de facilidade de compreensão, entretanto, como desvantagens podemos citar a parametrização errônea de algumas moléculas, além de não ser a melhor ferramenta para a determinação de propriedades onde efeitos eletrônicos são predominantes (BARREIRO et al., 1997).

Dentre as técnicas de modelagem molecular temos o *docking* molecular, que faz com que seja possível uma investigação das possíveis estruturas químicas, além das possíveis orientações que ela pode assumir para que seja possível um encaixe no sítio ativo de um biorreceptor ou entre duas macromoléculas (proteína-proteína ou proteína-DNA) (ROSADO, 2010). A Figura 13 ilustra o encaixe de composto ligante com uma proteína-alvo através do docking molecular.

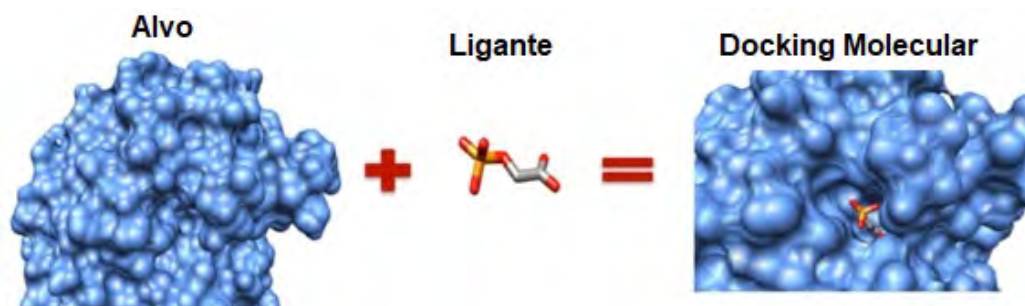


Figura 13 – Exemplo de encaixe receptor ligante. Fonte: ProteomicsCreative (2019), modificada.

1.8 Resultados anteriores

Em trabalhos anteriores do Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM) utilizou-se como base a reação de Hantzsch para se obter, na forma de mistura racêmica, uma série de acridinonas planejadas para interagirem com a Tubulina no sítio ativo da Colchicina, que foram testadas quanto a sua atividade biológica frente a proteína-alvo (FONSECA, 2017). Dentre os compostos testados encontra-se o composto denominado LDQMC-014 (Figura 14), que apresentou os melhores resultados nos testes promovidos.

Os testes biológicos realizados para o composto supracitado foram: ensaio de migração celular *Wound Healing*, ensaio de migração celular em câmara de *Boyden*, ensaio de citotoxi-

cidade, ensaio de polimerização da proteína Tubulina, ensaio de competitividade pelo sítio da Colchicina, imunofluorescência, análise do ciclo celular, análise de apoptose, ensaio de atividade anti-angiogênica in vitro, ensaio de efluxo de Calceína. Nesses ensaios foram comparadas as atividades do composto e de padrões positivos (Colchicina e Podofilotoxina). Um resumo dos principais resultados se encontra na Tabela 2, e a estrutura do composto encontra-se na Figura 14 (FONSECA, 2017; MAGALHAES et al., 2016).

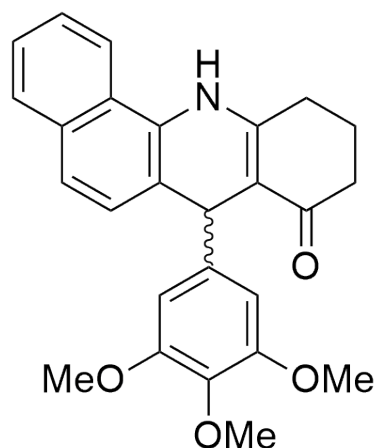


Figura 14 – Estrutura do composto LDQMC-014. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Resumo dos resultados obtidos para o composto LDQMC-014.

	IC ₅₀ (μM)	Composto		
		Colchicina	Podofilotoxina	LDQMC-014
Migração celular^a		0,320±0,003	0,33±0,06	0,33±0,02
Polimerização Tubulina^d		0,99±0,01	0,37±0,05	0,9±0,2
Citotoxicidade^b	MDA-MB-231	0,02±0,01	0,011±0,001	0,11±0,02
	HFF1	<0,02	>50	>50
	SI^c	1	>1000	>400
	HUVEC	0,03±0,01	n.d.	0,120±0,08

^{a,b} Média ± DP de dois experimentos independentes em duplicata. ^c Índice de seletividade ($IC_{50}^{MDA-MB-231}/IC_{50}^{HFF1}$). ^d Ensaio de fluorescência.

Dados são apresentados como Média ± desvio padrão de duplicatas.

Os resultados mostrados na Tabela 2 mostra que o perfil de migração celular do LDQMC-014 são comparáveis aos perfis encontrados nos padrões positivos (Colchicina e Podofilotoxina). Os valores encontrados para a inibição da polimerização da proteína mostra que o composto testado apresenta um perfil comparável a Colchicina, entretanto, menor que a Podofilotoxina.

Os valores de IC₅₀ determinados nos ensaios de citotoxicidade com a linhagem tumoral MDA-MB-231 mostram que o composto LDQMC-014 apresenta um perfil menos citotóxico do que os padrões. A citotoxicidade foi avaliada contra a linhagem de fibroblastos humanos

saudáveis HFF1 para verificar a seletividade dos compostos para células tumorais. A Podofilotoxina e o composto testado não apresentaram citotoxicidade contra a linhagem saudável até a concentração limite de 50 μM (máxima concentração na qual os compostos apresentam solubilidade aquosa adequada). Os resultados mostram que os compostos são seletivos, sendo o LDQMC-014 mais seletivo que a Colchicina, porém menos que a Podofilotoxina; sendo essa característica fundamental, visto que um dos maiores desafios dos candidatos a antitumorais é eliminar seletivamente as células doentes. Os resultados utilizando células endoteliais HUVEC mostram que o composto testado é um potencial agente anti-angiogênese, assim como a Colchicina. Essa característica é importante para casos de câncer com grande incidência de metástase.

A acridinona LDQMC-014 obteve resultados promissores nas avaliações biológicas, com perfil de inibição da migração celular e da polimerização da Tubulina comparáveis a Colchicina, entretanto, testes posteriores indicaram que esse composto apresenta um baixo perfil de solubilidade em água, fator primordial para o desenvolvimento de qualquer fármaco. O composto LDQMC-014 foi considerado, portanto, o *hit* do projeto e todo o planejamento do presente trabalho visa à otimização estrutural desse composto para melhorar o seu perfil de solubilidade, aumentando ou mantendo a atividade, além da separação quiral dos enantiômeros para que se possa determinar o perfil de atividade deles separados e realização dos estudos de Docking molecular, para facilitar o processo de otimização e determinar quais interações acontecem no sítio da Colchicina na proteína Tubulina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho é planejar, sintetizar e caracterizar uma coleção de acridinonas análogas ao protótipo LDQMC-014. Avaliar a interação das acridinonas propostas frente à proteína Tubulina usando técnicas *in silico* e *in vitro*. Fazer a resolução dos enantiômeros do composto LDQMC-014 além dos respectivos testes *in silico* e *in vitro* que demonstrem sua atividade frente a proteína Tubulina.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar uma família de acridinonas, utilizando como método principal a reação multicomponente de Hantzsch;
- Otimizar a síntese de obtenção do produto LDQMC-014;
- Separar os enantiômeros obtidos na síntese de LDQMC-014 através de cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral;
- Determinar a configuração absoluta dos enantiômeros separados do produto LDQMC-014 através da análise de Dicroísmo Circular;
- Determinar a atividade dos enantiômeros isolados, através de ensaios celulares (*Wound Healing*, citotoxicidade, polimerização de Tubulina e progressão do ciclo celular), a fim de se identificar o eutômero (enantiômero ativo).
- Demonstrar a interação receptor-ligante dos enantiômeros da molécula LDQMC-014 com a proteína Tubulina através de estudos de modelagem molecular;
- Avaliação biológica das acridinonas por meio de ensaios de migração celular (*Wound Healing*) e citotoxicidade;
- Realizar um estudo de modelagem molecular de todas as acridinonas afim de prever a possível interação com a proteína de interesse;
- A partir dos resultados dos ensaios biológicos e da modelagem molecular, elucidar e elaborar relações entre a estrutura das acridinonas e sua atividade inibidora de tubulina;

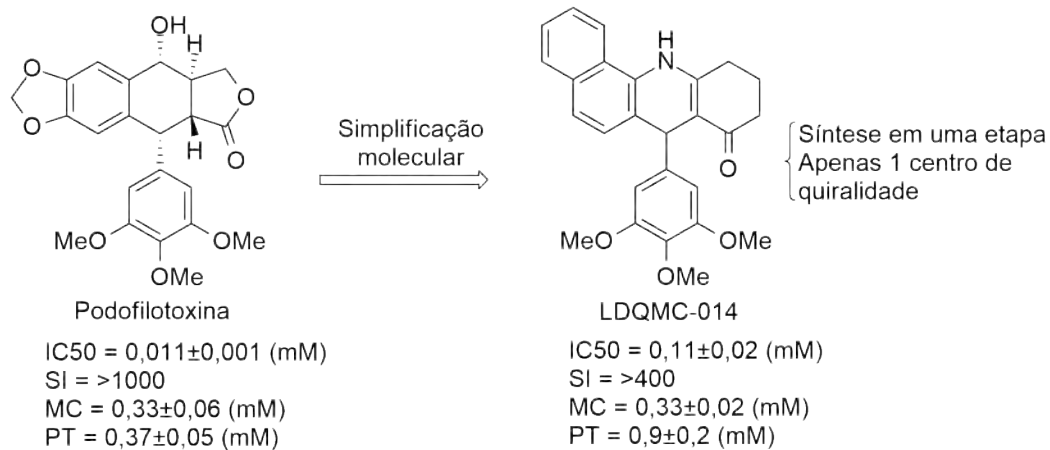
2.3 Planejamento Estrutural

A podofilotoxina (Figura 5, página 5) serviu de inspiração para a síntese do presente trabalho graças à sua comprovada atividade na inibição da polimerização de Tubulina. Uma das primeiras metas deste projeto foi a utilização da estratégia de simplificação molecular de modo a reduzir a complexidade do protótipo natural, reduzindo-se o número de centros de quiralidade de quatro (no protótipo natural podofilotoxina) para um no análogo LDQMC-014 em trabalhos anteriores (FONSECA, 2017).

A reação multicomponente de Hantzsch é a melhor opção para obtenção das acridinonas desejadas uma vez que permite que o produto seja obtido em apenas uma etapa de síntese.

O composto LDQMC-014 (Figura 14, página 14) tem sua síntese em uma única etapa, uma purificação simplificada, possuindo apenas um centro de quiralidade, porém a sua solubilidade em água não é satisfatória ($\text{CHILogD} = 2,67$). Os resultados de ensaios biológicos são demonstrados na Figura 15, onde estão indicados os valores de IC_{50} , os valores de seletividade (SI), os valores de inibição da migração celular (MC) e os valores de inibição da polimerização da Tubulina (PT).

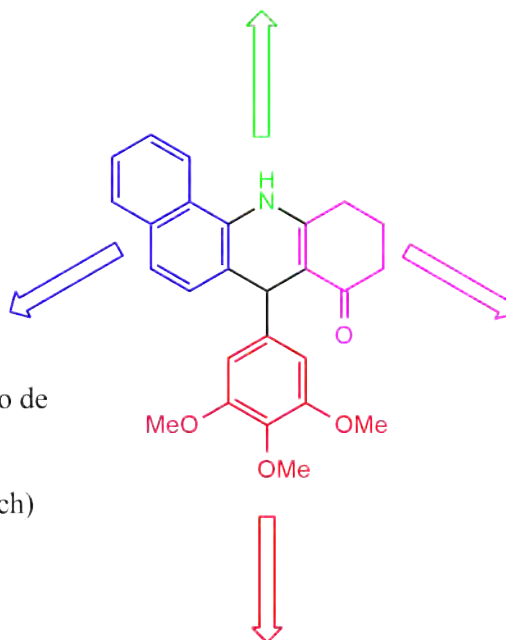
Os bons resultados de atividade citotóxica do composto LDQMC-014 levaram à estratégia de modificação molecular em 4 regiões distintas como demonstradas na Figura 15.



***Alquilação** (similaridade com nv4)

*Aumentar a solubilidade

- *Necessidade de planaridade
- *Adicionar heteroátomos para melhorar a solubilidade
- ***Hibridação molecular** (introdução de grupos -OMe, análogos a CA-4)
- *Substituição por dicarbonílicos (diidropiridinas clássicas de Hantzsch)



*Substituição por outros dicarbonílicos

- *3,4,5-trimetoxifenil
- *4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil
- *3-nitrofenil

Figura 15 – Planejamento estrutural. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 16 mostra o esquema de retrosíntese para reação.

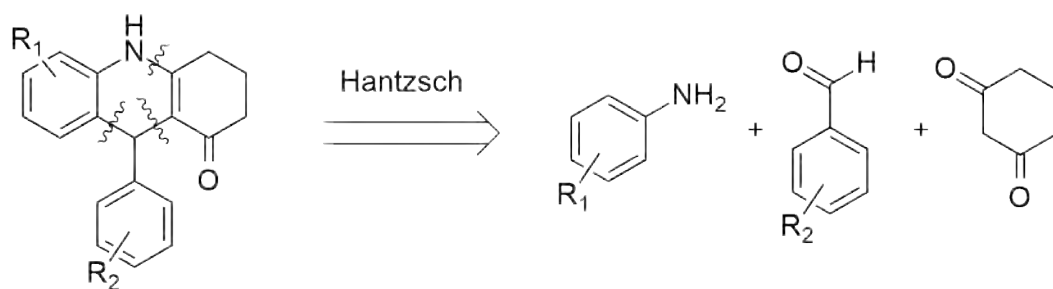


Figura 16 – Esquema de retrosíntese para as acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.

- Região verde: nessa região foi proposto uma alquilação para inserir uma região alifática que pudesse interagir como sítio ativo de maneira similar ao NV4 (ligante cristalizado na proteína Tubulina - código PDB: 5JCB, Figura 17, além da troca do nitrogênio pelo oxigênio para explorar uma possível melhora da solubilidade;

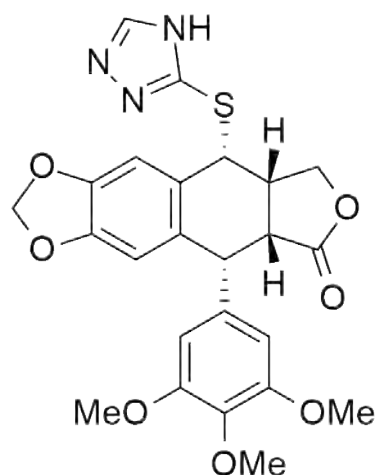


Figura 17 – Estrutura do ligante NV4. Fonte: Elaborada pela autora.

- Região azul: resultados anteriores (MAGALHAES, 2019) já haviam demonstrado a necessidade de planaridade nessa região para uma melhor atividade biológica, buscou-se, portanto, empregar na síntese aminas aromáticas heterocíclicas que mantivessem a região plana e que possivelmente melhorassem a solubilidade. Explorou-se também a substituição da amina aromática por componentes 1,3-dicarbonílicos, gerando dihidropiridinas clássicas de Hantzsch, para determinar se também teriam uma atividade satisfatória, apesar da perda da planaridade. Realizou-se hibridização molecular como demonstrado na Figura 18, onde adicionou-se grupos di e trimetoxi, semelhantes aos presentes no produto natural Combrestatina (reconhecido como modulador de Tubulina) (PETTIT et al., 1989);

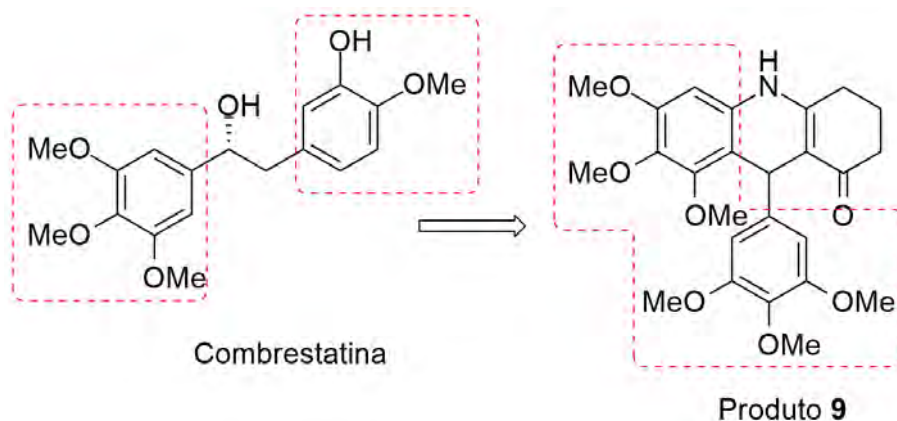


Figura 18 – Planejamento estrutural baseado na Combrestatina. Fonte: Elaborada pela autora.

- Região rosa: substituiu-se a região rosa por outros dicarbonílicos afim de explorar como novas estruturas se comportariam no sítio ativo;
- Região vermelha: devido a resultados anteriores (MAGALHAES, 2019) realizou-se sínteses com os três aldeídos que geraram as melhores atividades biológicas pois apresentaram mais interações com o sítio ativo, são eles 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído e 3-nitrobenzaldeído;

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese das acridinonas

3.1.1 Síntese Clássica de Hantzsch

Baseando-se na reação de obtenção da 1,4-diidropiridina descrita por Arthur Hantzsch, utilizou-se uma metodologia análoga para obtenção de acridinonas. Tal metodologia é realizada de maneira *one-pot* sendo a sua reprodutibilidade mais fácil. A metodologia “clássica” (Figura 19) foi utilizada para obtenção de quatro acridinonas, sendo uma inédita. As estruturas encontram-se na Figura 20.

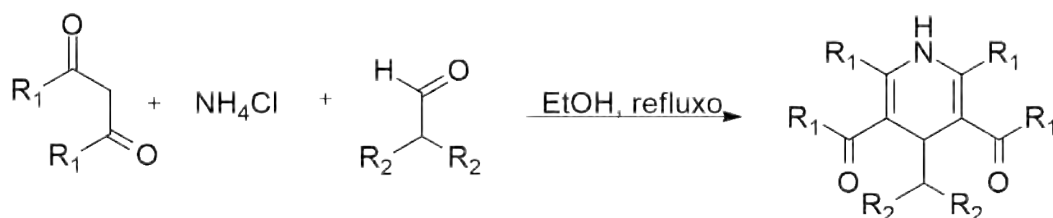


Figura 19 – Esquema reacional síntese clássica. Fonte: Elaborada pela autora.

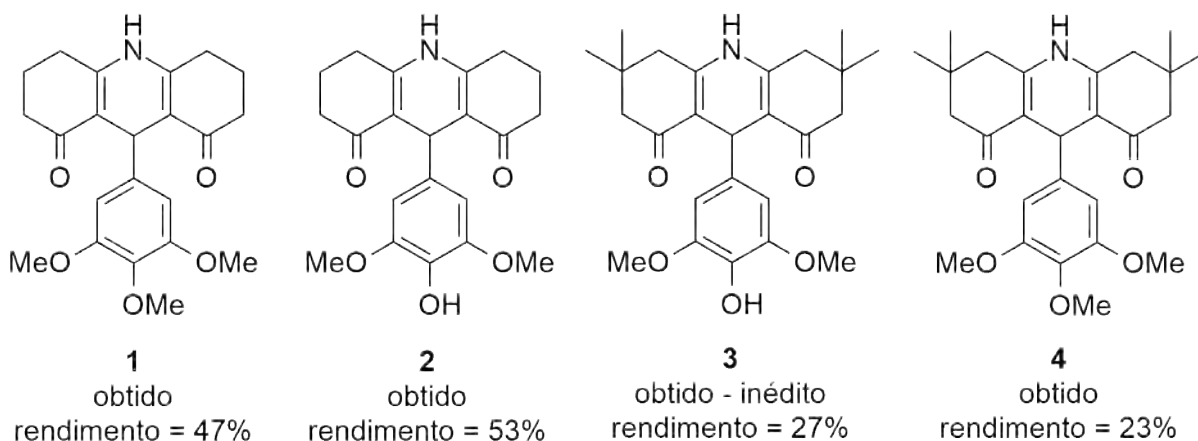


Figura 20 – Produtos obtidos através da metodologia clássica. Fonte: Elaborada pela autora.

O mecanismo proposto para as reações é semelhante ao mecanismo da reação de Hantzsch clássica (Figura 21). A primeira etapa é a formação de uma enamina (**III**), originada da reação entre a amônia e um equivalente do dicarbonilado (**I**). O aldeído passa por uma reação de Knoevenagel (**VI**) com o outro equivalente molar do componente dicarbonilado, formando um composto carbonílico α,β -insaturado (**X**), que posteriormente faz uma reação de adição de Michael com a enamina, gerando o produto desejado (**XIII**).

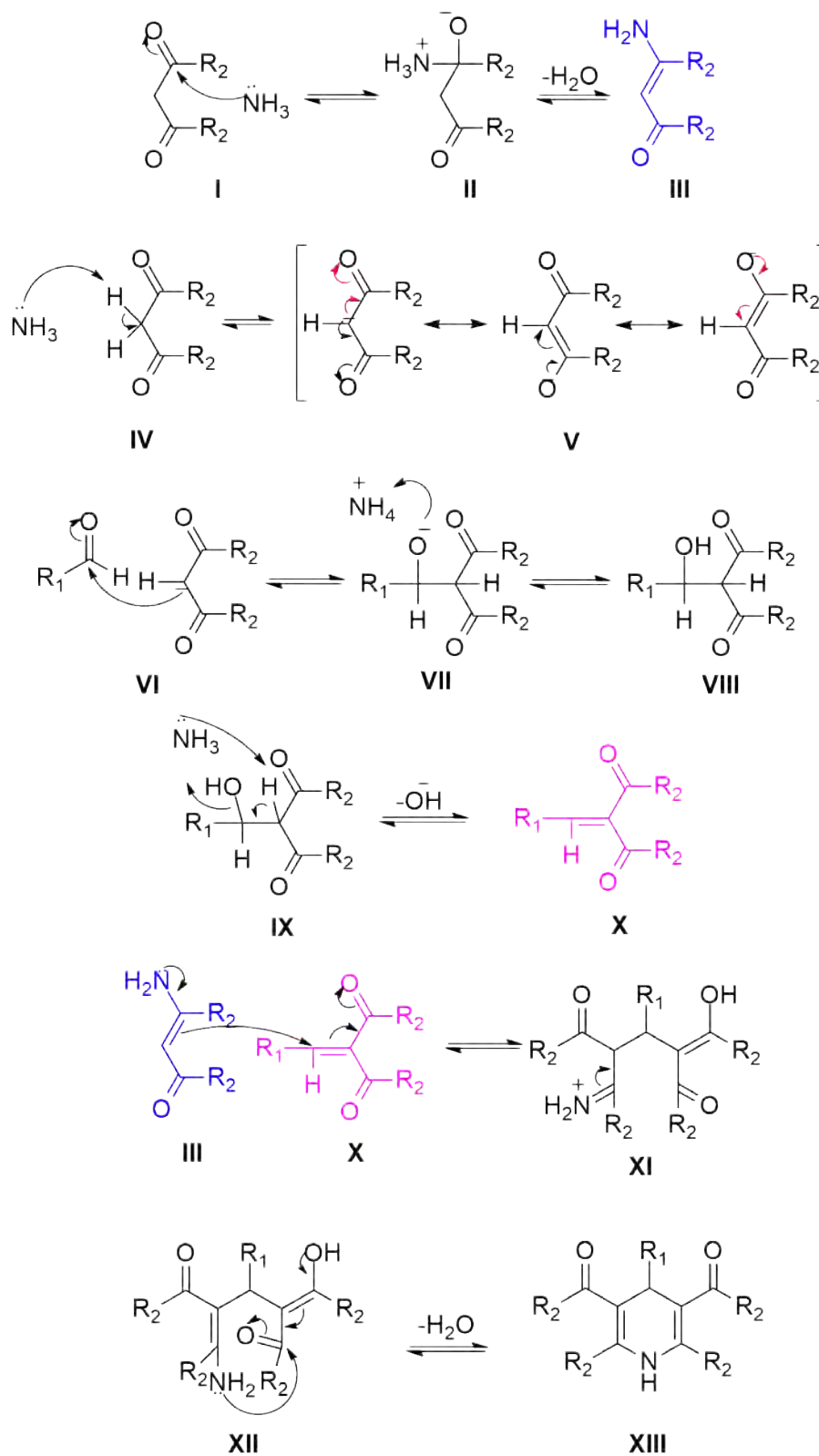


Figura 21 – Esquema de intermediários das reações de metodologia clássica. Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos dessa metodologia tiveram rendimentos isolado variados (47,8%; 53,6%; 27,8%; 23,2%, respectivamente), entretanto o rendimento para os produtos que utilizaram como reagente a 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (27,8% e 23,2%) é cerca de metade do rendimento obtido quando se utiliza a 1,3-ciclohexanodiona (47,8% e 53,6%). Tal fato não reflete uma tendência que era esperada, uma vez que a 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona ($pK_a = 5.32 \pm 0.40$) é menos ácida do que a 1,3-ciclohexanodiona ($pK_a = 5.26 \pm 0.20$). Ao perder um próton, a 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona, deveria gerar uma base conjugada mais estável, logo, uma reação de Knoevenagel mais rápida. Uma vez que a etapa lenta da reação é a adição de Michael, que depende diretamente do produto da reação de Knoevenagel, esperaria-se um rendimento superior pra os produtos **3** e **4** portanto, um rendimento maior. Entretanto, a acidez não é único fator que pode interferir na reação, outro fator muito importante, que deve ser considerado, é impedimento estérico que pode estar impossibilitando o ataque do nucleofílico ao carbono carbonílico da 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (etapa **I**), gerando uma menor quantidade do produto **III**, que é essencial na etapa lenta do mecanismo, diminuindo, portanto, o rendimento da reação.

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono traz algumas informações que comprovam que a estrutura pretendida foi alcançada. Uma vez que as estruturas são muito semelhantes e analogias podem ser feitas entre as estruturas, apenas os resultados de um produto será discutidos.

A Figura 22 auxilia o entendimento dos sinais obtidos através do RMN de 1H para o produto **2**. Uma expansão desse espectro pode ser visto na página 84.

O simpleto com deslocamento de 4,54 ppm é o mais significativo do espectro, pois pode-se dizer que é o sinal que caracteriza a formação do produto. Esse sinal é referente ao hidrogênio 4. Uma vez que esse sinal não está presente em nenhum dos reagentes, ele é que nos indica que houve a ciclização esperada.

Os sinais com deslocamento de 1.87 ppm e 1.96 ppm são multipletos referentes aos quatro hidrogênios nas posições 8 e 12. A multiplicidade do sinal não está bem definida. Nota-se que os sinais são referentes a dois hidrogênios cada, o que pode ser explicado pelo fato desses hidrogênios estarem em posições pseudo-axial e pseudo-equatorial, dando a eles ambientes químicos distintos. O tripleto com deslocamento de 2.29-2.32 ppm é correspondente aos quatro hidrogênios 7 e 11, que têm um valor de deslocamento mais alto, apesar de serem alifáticos, pelo fato de estar próximo a um carbono sp^2 . O multipletto com deslocamento entre 2.56-2.62 ppm e os dois tripletos com deslocamento entre 2.66-2.71 ppm são referentes aos hidrogênios 9 e 13, por estarem próximo a carbonila, eles sofrem o efeito anisotrópico que faz com que, apesar de alifáticos, eles fiquem mais desprotegidos, tendo um deslocamento mais alto. O mesmo caso de posição pseudo-axial e pseudo-equatorial ocorre para esses hidrogênios, por isso nota-se que o multipletto é referente a dois hidrogênios e cada tripleto referente a mais um hidrogênio. A multiplicidade esperada era tripleto, devido aos dois hidrogênios vicinais.

O simpleto com deslocamento de 3.69 ppm é referente aos seis hidrogênios dos dois

grupos metoxila (16 e 20). O valor de deslocamento mais alto é proveniente do efeito retirador de elétrons que o oxigênio promove, deixando os hidrogênios mais desprotegidos. O simpleto com deslocamento de 6.39 ppm é referente aos hidrogênios aromáticos 16 e 20. Esse sinal nos indica exatamente o padrão de substituição do anel fenílico esperado.

O simpleto com deslocamento de 8.17 ppm provavelmente é referente ao hidrogênio 1, que está ligado ao nitrogênio. Esse sinal está mais desprotegido devido ao fato do hidrogênio estar numa posição bisalílica, o que gera a maior desproteção. O hidrogênio ligado ao oxigênio (hidroxila) não aparece no espectro, o que pode acontecer em hidrogênios de grupos funcionais álcool e fenol.

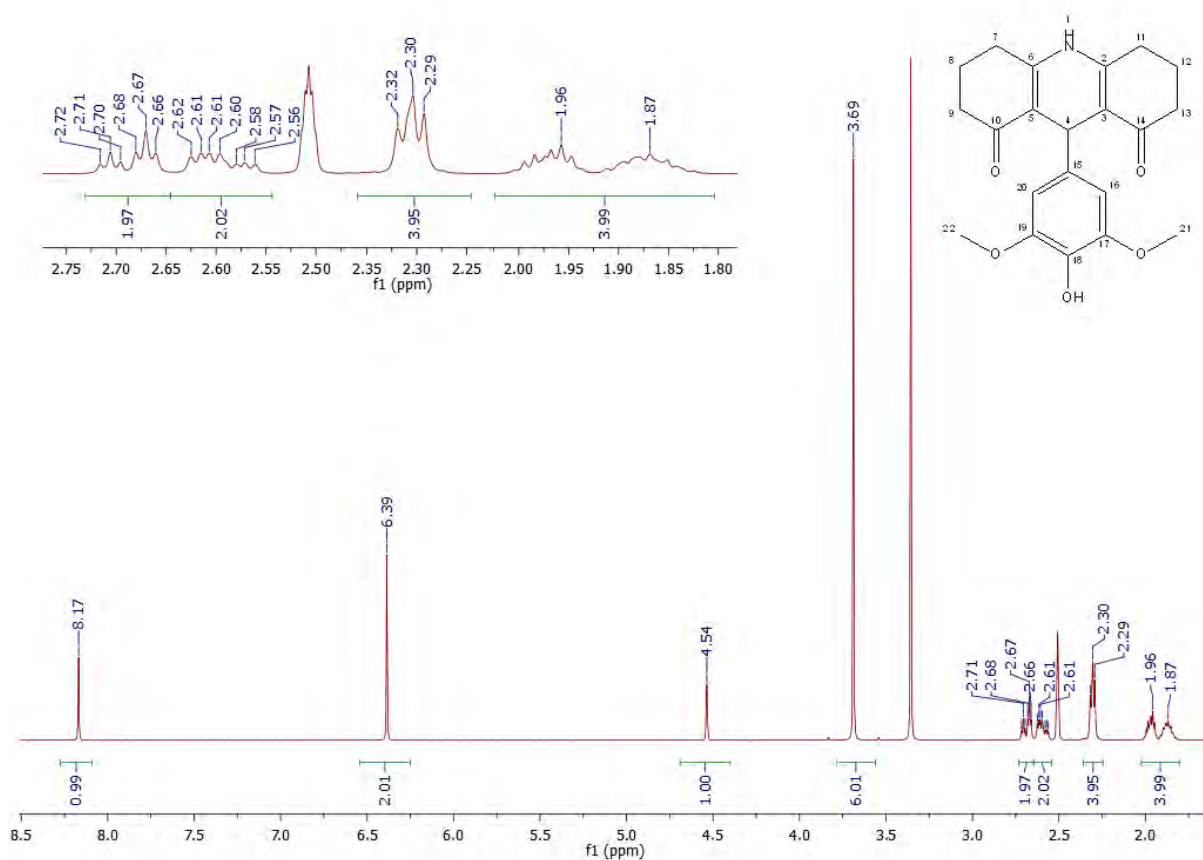
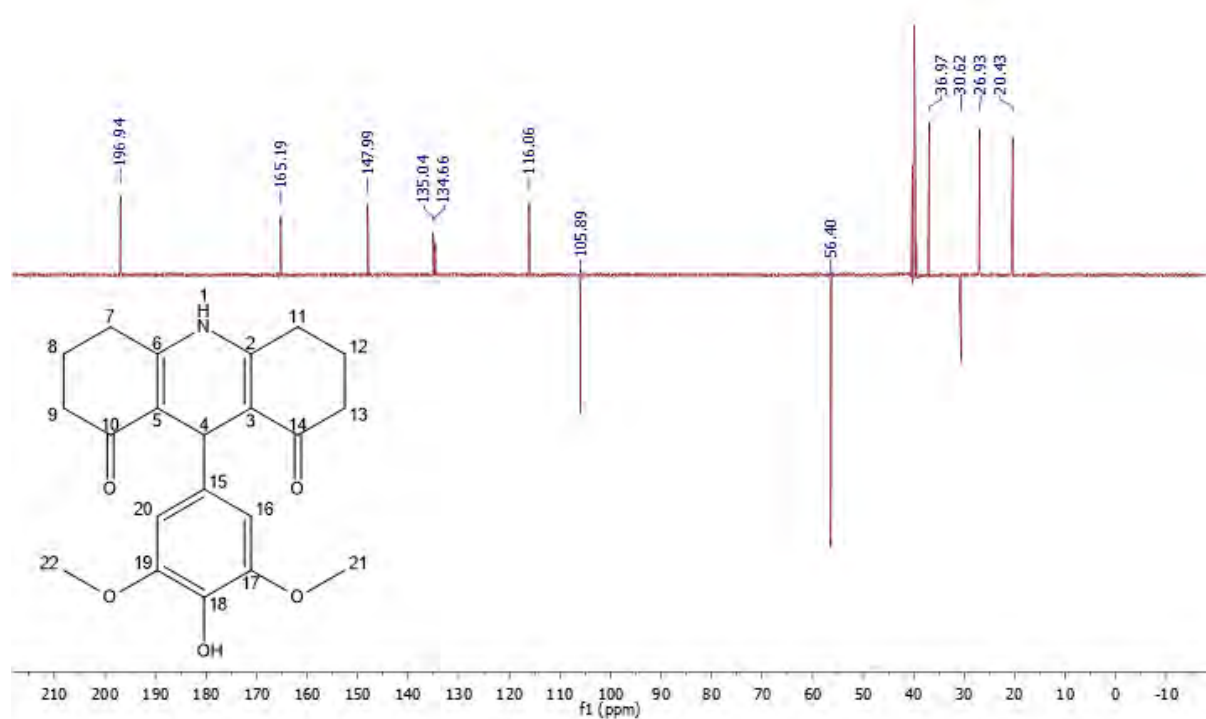


Figura 22 – Espectro ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆) para o produto 2. Fonte: Elaborada pela autora.

Para o produto 1 (espectro página 82) a principal diferença do espectro discutido é a presença de mais um simpleto com deslocamento em 3.78 ppm, que é referente a outra metoxila presente na posição para do anel. Para o produto 3 (espectro página 86) temos três diferenças do espectro discutido. A primeira é que o simpleto referente ao hidrogênio 1 não está presente, pois pode ter sofrido troca com a água, entretanto há um simpleto com deslocamento de 5.39 ppm, que podemos associar ao hidrogênio da hidroxila. A segunda distinção é a presença de dois simpleto (deslocamentos de 1.04 ppm e 1.13 ppm) referente aos seis hidrogênios das metilas. A terceira distinção é o fato de possuir quartetos bem definidos que representam os oito hidrogênios das

regiões alifáticas (7, 9, 11 e 13), apesar das metilas estarem a 4 ligações de distância, elas podem estar próxima no espaço, gerando essa multiplicidade. Para o produto **4** (espectro página 88) temos três diferenças do espectro discutido. A primeira é que o simpleto referente ao hidrogênio 1 não está presente, pois pode ter sofrido troca com a água. A segunda distinção é a presença de dois simpleto (deslocamentos de 0.94 ppm e 1.04 ppm) referente aos seis hidrogênios das metilas. A terceira distinção é que possui dois dupletos referente aos hidrogênios 9 e 13, que também sofrem o efeito de pseudo-axial e pseudo-equatorial, por isso estão separados em dupletos; além de termos um duplete, que pode ser um quarteto que foi sobreposto pelo sinal do solvente, que é referente aos hidrogênios 7 e 11.

A Figura 23 auxilia o entendimento dos sinais obtidos através do RMN de ^{13}C para o produto **2**, uma expansão desse espectro pode ser visto na página 85.



O sinal com deslocamento de 30.62 ppm é referente ao carbono 4 (CH), que é o mais importante do espectro pois nos indica que a reação foi bem sucedida e houve a ciclização. O sinal com deslocamento de 20.43 ppm é referente aos carbonos alifáticos 8 e 12 (CH_2) que são os mais protegidos. O sinal com deslocamento em 26.93 ppm é referente aos carbonos 7 e 11 (CH_2), que apesar de alifáticos estão vizinhos a uma ligação dupla, o que faz com que sejam mais desblindados. O sinal com deslocamento de 36.97 ppm é referente aos carbonos 9 e 13 (CH_2), que sofrem efeito anisotrópico da carbonila deixando-os mais desblindados em comparação com os outros alifáticos. O sinal com deslocamento em 56.40 ppm é referente aos carbonos 21 e 22, que por serem de metoxilas estão mais desblindados. O sinal com deslocamento de 105.89 ppm

é referente aos carbonos 16 e 20, que são os únicos CH aromáticos. O sinal com deslocamento de 116.06 ppm é referente aos carbonos 3 e 5, que são sp² e vizinhos a uma carbonila, por isso mais desblindados do que os carbonos 16 e 20 (que também são sp²). O sinal com deslocamento de 134.66 ppm é referente ao carbono 18, que possui esse deslocamento por ser sp² (aromático), estar ligado diretamente a um oxigênio (hidroxila) e na posição orto a duas metoxilas. O sinal com deslocamento de 135.04 ppm é referente ao carbono 15, que é aromático, mas está meta a duas metoxilas (que gera desproteção). O sinal com deslocamento de 147.19 ppm é referente aos carbonos 17 e 19 que tem o deslocamento com valores mais altos por serem sp² e estarem ligados ao oxigênio das metoxilas. O sinal com deslocamento de 165.19 ppm é referente aos carbonos 2 e 6, que por serem sp² e estarem ligados ao nitrogênio são mais desprotegidos. O sinal com deslocamento de 196.94 ppm é referente aos carbonos 10 e 14 que os mais desblindados de todos por serem carbonílicos.

Para o produto **1** (espectro página 83) a principal diferença do espectro discutido é a presença de mais um sinal, com deslocamento de 60.70 ppm, que é referente a outra metoxila presente na posição para do anel. Para o produto **3** (espectro página 87) temos como diferença para o espectro discutido a presença de dois sinais referentes aos quatro CH₃, com deslocamento de 27.11 ppm para os carbonos 23 e 25, e 29.43 ppm para os carbonos 24 e 26. Para o produto **4** (espectro página 89) temos como diferenças do espectro discutido a presença de mais um sinal, com deslocamento de 60.36 ppm, referente a outra metoxila presente na posição para do anel e a presença de dois sinais referentes aos quatro CH₃, com deslocamento de 26.81 ppm para os carbonos 23 e 25, e 29.16 ppm para os carbonos 24 e 26.

3.1.2 Síntese modificada

Essa metodologia (Figura 24) foi baseada nas modificações propostas por Tratat, Giorgi-Renault e Husson (2002) para se obter acridinonas assimétricas. Foram obtidas dez acridinonas, sendo seis delas inéditas, porém foram pretendidas obter vinte e seis. Todos os produtos pretendidos e obtidos encontram-se listadas nas Figuras 25 e 26, juntamente com seus rendimentos.

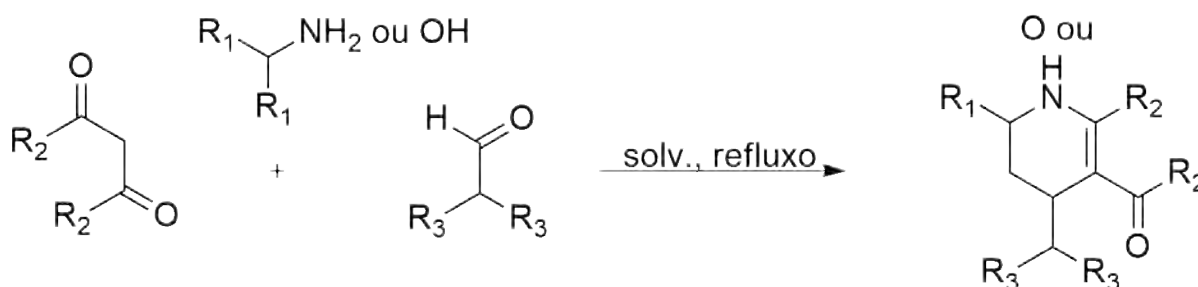


Figura 24 – Esquema reacional da síntese modificada. Fonte: Elaborada pela autora.

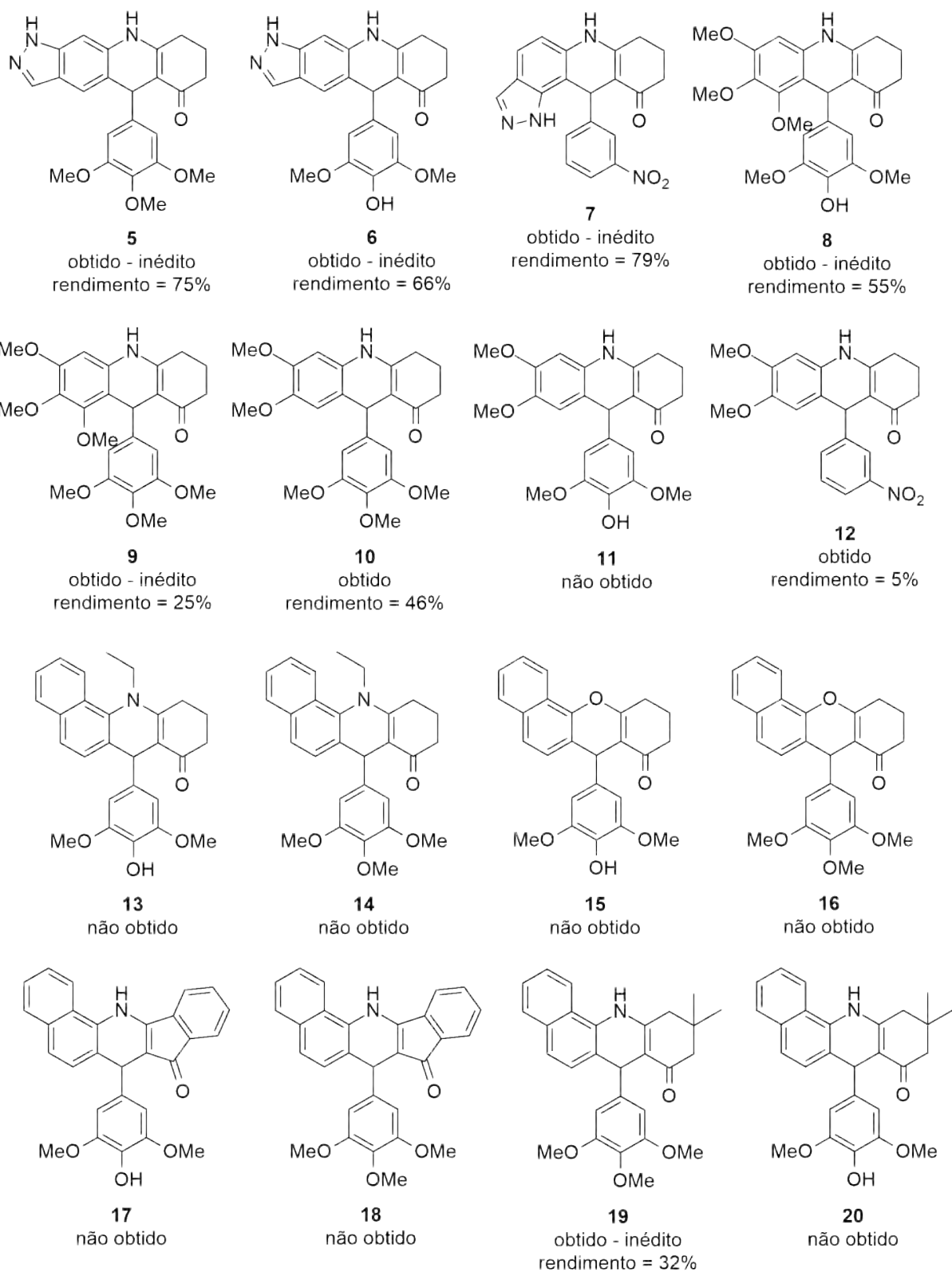


Figura 25 – Estruturas dos compostos pretendidos. Fonte: Elaborada pela autora.

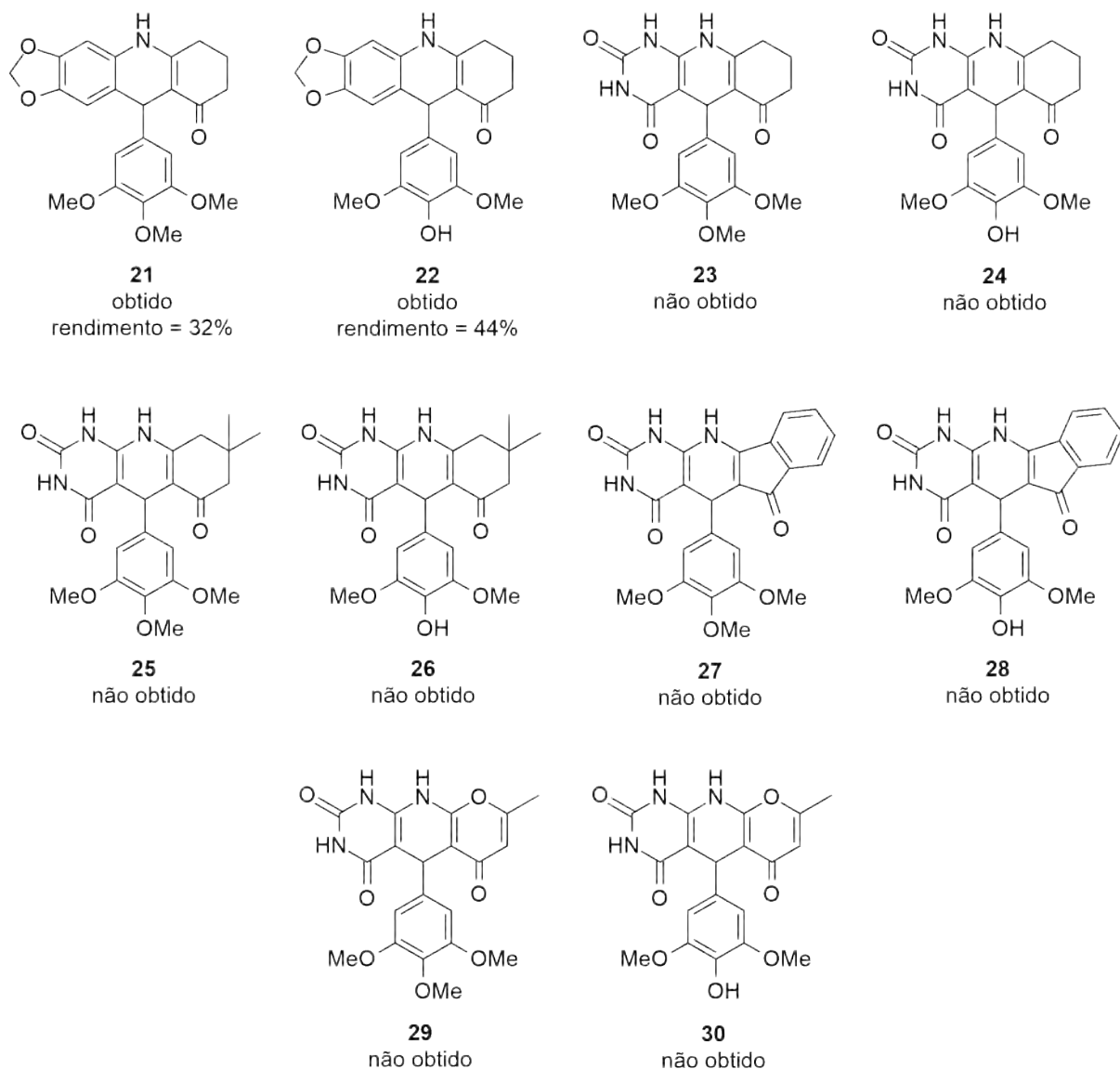


Figura 26 – Estruturas dos compostos pretendidos. Fonte: Elaborada pela autora.

O esquema de intermediários para essas reações está descrito na Figura 27, que também é válido para o composto LDQMC-014. A primeira etapa é a abstração do hidrogênio alfa à carbonila do dicarbonilado (**I**) realizado pelo par de elétrons livres da amina ou do fenol, que age como nucleófilo. Formou-se um intermediário estabilizado por ressonância (**II**). O carbânion **II** formado ataca o carbono carbonílico do aldeído (**III**) formando um intermediário com carga negativa no oxigênio **IV**, que abstrai um próton do nucleófilo, protonado anteriormente, para gerar outro intermediário **V**. No intermediário formado, há uma abstração do próton alfa à carbonila realizado pelo nucleófilo, posteriormente ocorre a formação da dupla ligação e a eliminação de de hidroxila, formando o intermediário **VI**. O par de elétrons livre presente no nucleófilo ataca um dos carbonos carbonílicos formando o intermediário **VII** que tem uma carga negativa no oxigênio, atravésdo solvente há uma transferência de próton levando ao intermediário **VIII**. No intermediário **VIII** ocorre um ataque da dupla ligação do anel aromático ao carbono

sp² beta à carbonila, ocorrendo uma ciclização. Esse ataque faz com que haja a perda de –OH, que mesmo não sendo um bom grupo abandonador, é eliminado pelo fato da ligação dupla estar deslocalizada, formando o intermediário **IX**. O –OH presente no meio abstrai um próton presente no carbono vizinho ao que possui uma carga positiva, para assim restaurar a aromaticidade do anel naftalênico, e com a eliminação de água chega-se ao produto final **X**.

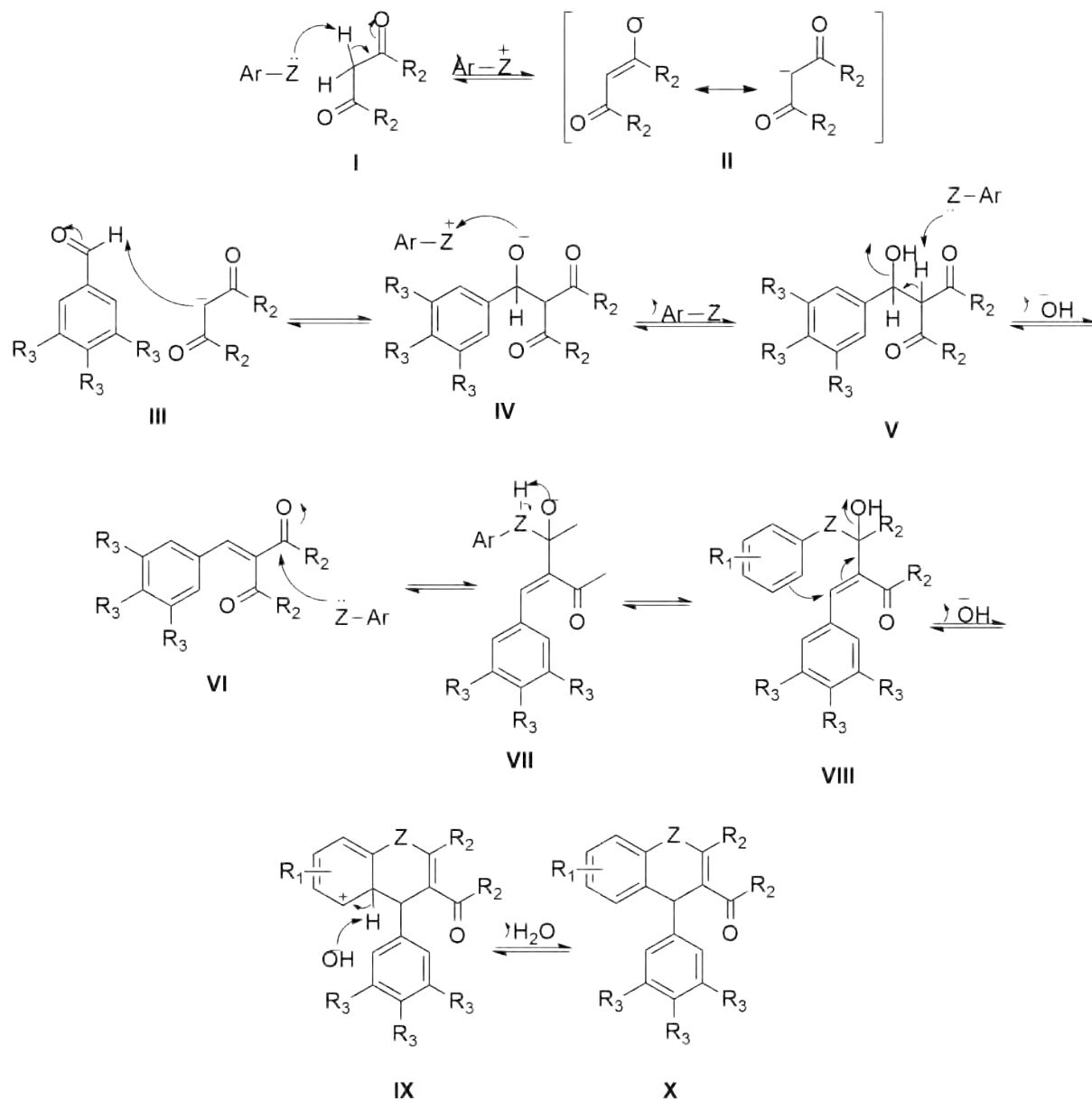


Figura 27 – Esquema de intermediários da obtenção das acridinonas. Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Z = NH² (NH) ou OH (O).

As sínteses cujos produtos desejados foram obtidos, obtiveram rendimento variados. Tal fato pode ser explicado por quatro fatores. O primeiro fator é a diferença de solvente utilizado, as síntese que se utilizou etanol obtiveram rendimentos menores. O segundo fator é a diferença da acidez dos hidrogênios provenientes dos dicarbonylados. O terceiro fator é a diferença do

nucleófilo, cuja força é fundamental em duas etapas do mecanismo **I** e **VI**. O quarto fator é a diferença da solubilidade de cada reagente no solvente utilizado.

Os produtos que utilizam como reagente o 6-aminoindazol (**5**, **6** e **7**) tem um rendimento (75,4%, 66,6% e 79,9%, respectivamente) maior que a média encontrada em trabalhos anteriores (29%) (FONSECA, 2017). Esse fato pode ser explicado por dois possíveis fatores. O primeiro fator é devido ao uso de isopropanol como solvente. Devido ao fato de possuir uma maior porção apolar, o isopropanol pode favorecer a solubilização dos reagentes, aumentando sua interação e conseqüentemente o rendimento. O segundo fator deve-se a amina utilizada. Em resultados de trabalhos anteriores (FONSECA, 2017), o mesmo aldeído e dicetona foram utilizados para obtenção de produtos com outras aminas, entre elas a α -naftilamina, entretanto os rendimentos obtidos eram mais baixo, entre 30 e 40%, porém, quando se utiliza a 6-aminoindazol (Figura 28) a reação tem rendimentos altos, ente 66 e 80%, provavelmente devido ao fato do par de elétrons presentes no nitrogênio *1* estar em ressonância o que aumenta a nucleofilicidade da amina primária que é quem faz o ataque nucleofílico que ocorre nas etapas **I** e **VI**, fazendo ela ser mais reativa e, portanto, aumentando o rendimento.

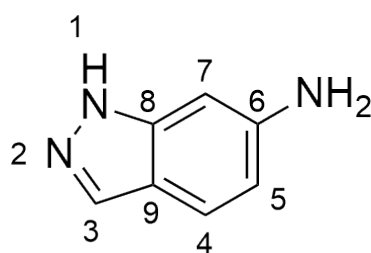


Figura 28 – Estrutura do 6-aminoindazol.

Os produtos pretendidos **11**, **13 a 18**, **20** e **23 a 30** não foram obtidos com sucessos. Para os produtos **13**, **14** e **18** será realizada uma nova síntese, futuramente, aumentando o tempo reacional e utilizando sempre isopropanol como solvente. Já para os produtos **11**, **15 a 17**, **20** e **23 a 30**, os produtos passarão, futuramente, por uma nova etapa de purificação por coluna, para que as impurezas possam vir a serem retiradas.

Para os produtos **13**, **14** e **18** o ¹H-RMN indica que não houve ciclização, pois o hidrogênio que está ligado ao carbono assimétrico, geralmente presente com deslocamento entre 4.00 e 5.50 ppm, não está presente, como pode ser visto na Figura 29. Dois desses produtos (**13** e **14**) utilizam como nucleófilo a N-etilnaftilamina, que por ser uma amina secundária e não primária, pode sofrer um impedimento estérico devido a seu grupamento etila que impede a aproximação ideal para a realização do ataque nucleofílico e a formação do produto desejado. Já para o composto **18** utiliza-se como dicarbonílico a 1,3-indanodiona (pka = 8.95 ± 0.20), que possui uma menor acidez do que a 1,3-ciclohexanodiona (pka = 5.26 ± 0.20) e do que a 5,5-dimetil-1,3ciclohexanodiona (pka = 5.32 ± 0.40), tal fato faz com que os hidrogênio α -carbonilas não sejam suficientemente ácidos para serem abstraídos pela amina utilizada (etapa

I do esquema de intermediários), sendo, portanto, a primeira etapa do mecanismo comprometida.

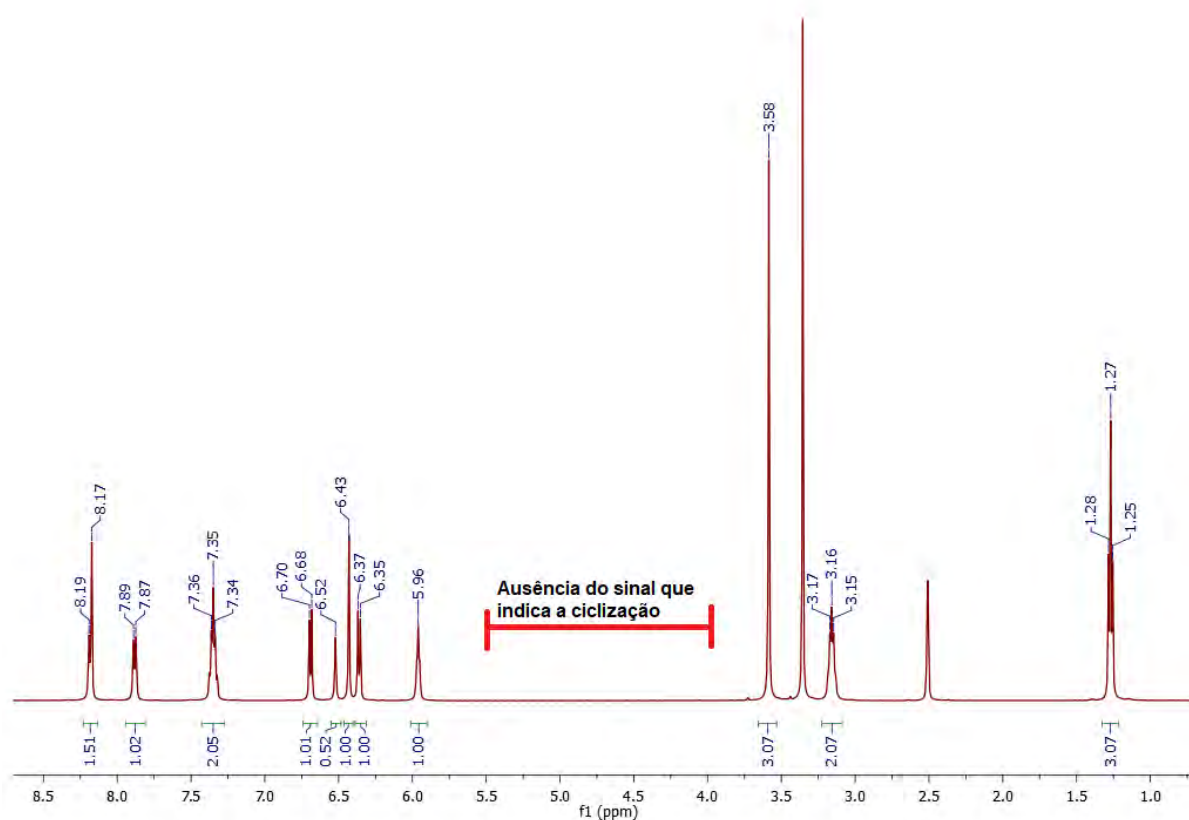


Figura 29 – ^1H -RMN para o composto **13**. Fonte: Elaborada pela autora.

Para os produtos **11**, **15**, **16**, **17**, **20** temos uma diferença em relação aos casos anteriores, pois eles possuem sinais que caem na faixa habitual para o hidrogênio ligado ao centro assimétrico, apresentando, entretanto, um grande número de sinais adicionais, provavelmente impurezas, que impedem a caracterização do produto, como mostrado na Figura 30. Tal fato nos leva a crer que a etapa de recristalização pode ter sido ineficiente e portanto uma nova metodologia utilizando purificação por cromatografia em coluna deve ser realizada futuramente.

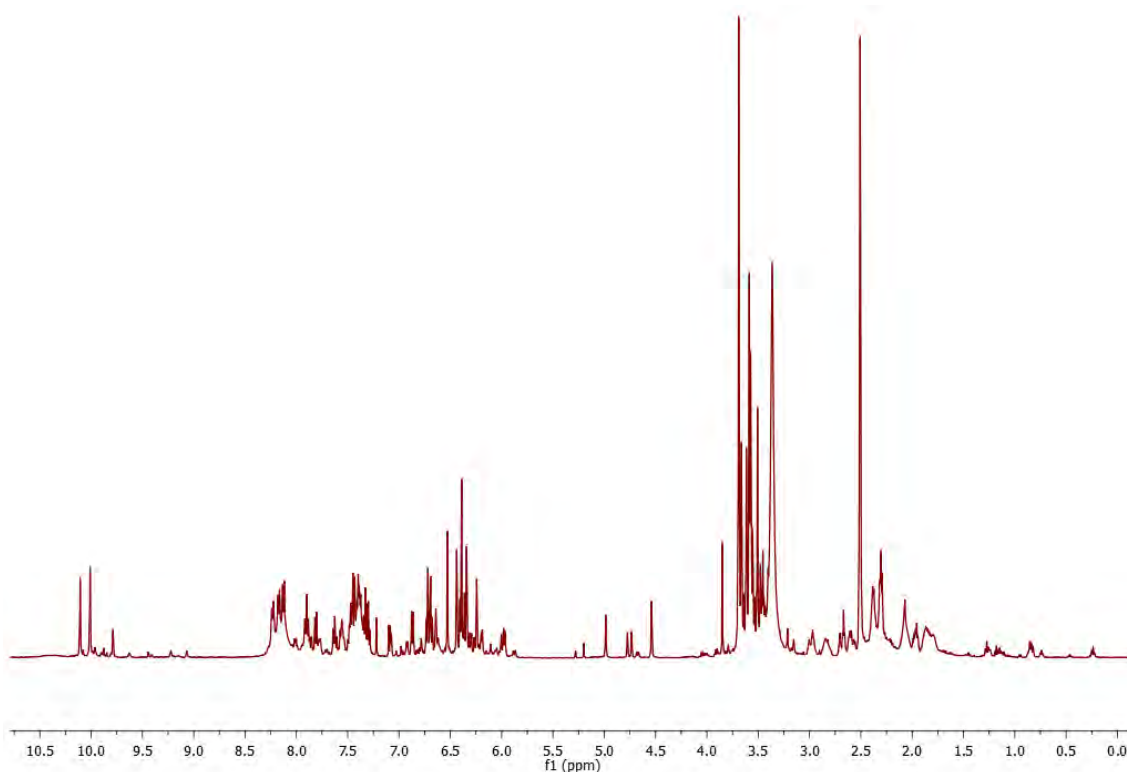


Figura 30 – ^1H -RMN para o composto **15**. Fonte: Elaborada pela autora.

Para os produtos **23** a **30** temos duas situações distintas. A primeira situação ocorre nos compostos **23**, **24**, **27**, **28** e **30**, nesses casos há a presença de impurezas presentes em duas regiões principalmente, na porção dos alifáticos e dos aromáticos, como mostrado na Figura 31 que é o espectro de hidrogênio para o composto **23**. Para o compostos **29** e **30** vemos algumas impurezas, porém menos significativas. A segunda situação ocorre para todos os compostos dessa série, como exemplificado na Figura 32 que representa o espectro de hidrogênio do composto **25**. Nota-se alguns sinais que não estão de acordo com o esperado para a estrutura proposta. Acredita-se que esses sinais possam ser referente a um segundo produto que é tautômero do proposto, entretanto, tal fato deve ser confirmado futuramente, através de análise por HPLC e RMN dinâmico. O padrão de sinais é semelhante para todos os compostos dessa série.

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono traz algumas informações que comprovam que a estrutura pretendida foi alcançada em algumas sínteses. Uma vez que as estruturas são muito semelhantes e analogias podem ser feitas entre as estruturas, apenas os espectros de um produto serão discutidos.

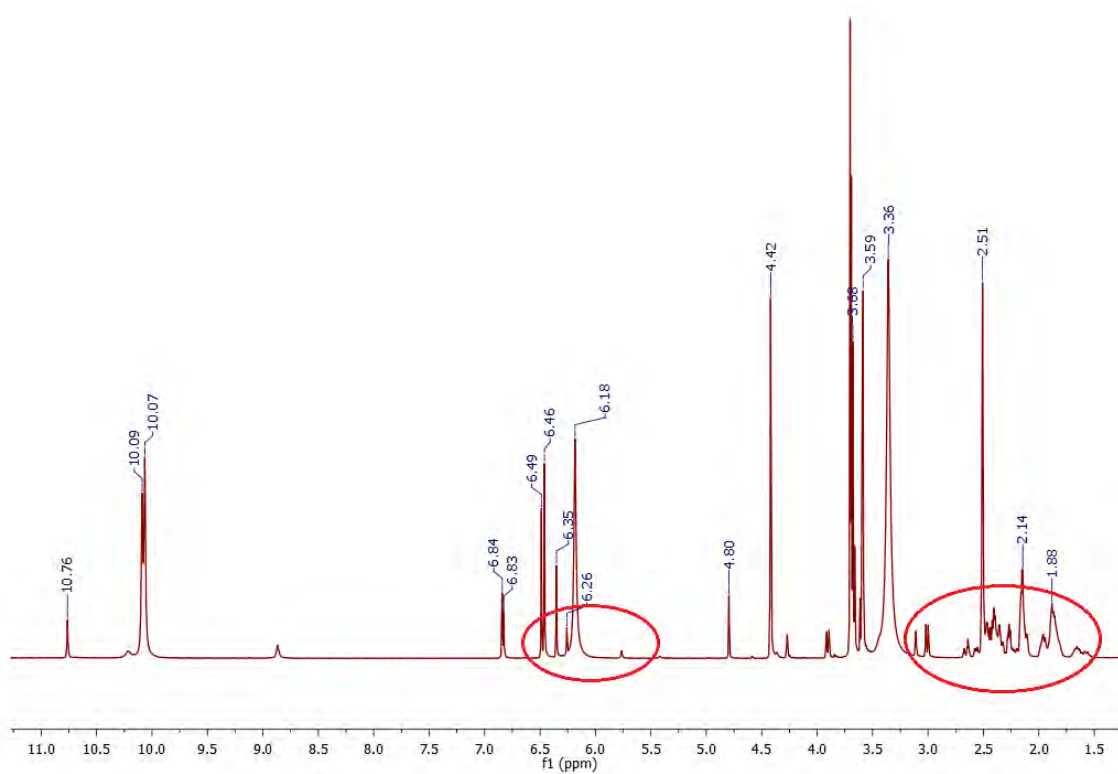


Figura 31 – ^1H -RMN para o composto **23** com destaque para as impurezas presentes na região dos alifático e aromáticos. Fonte: Elaborada pela autora.

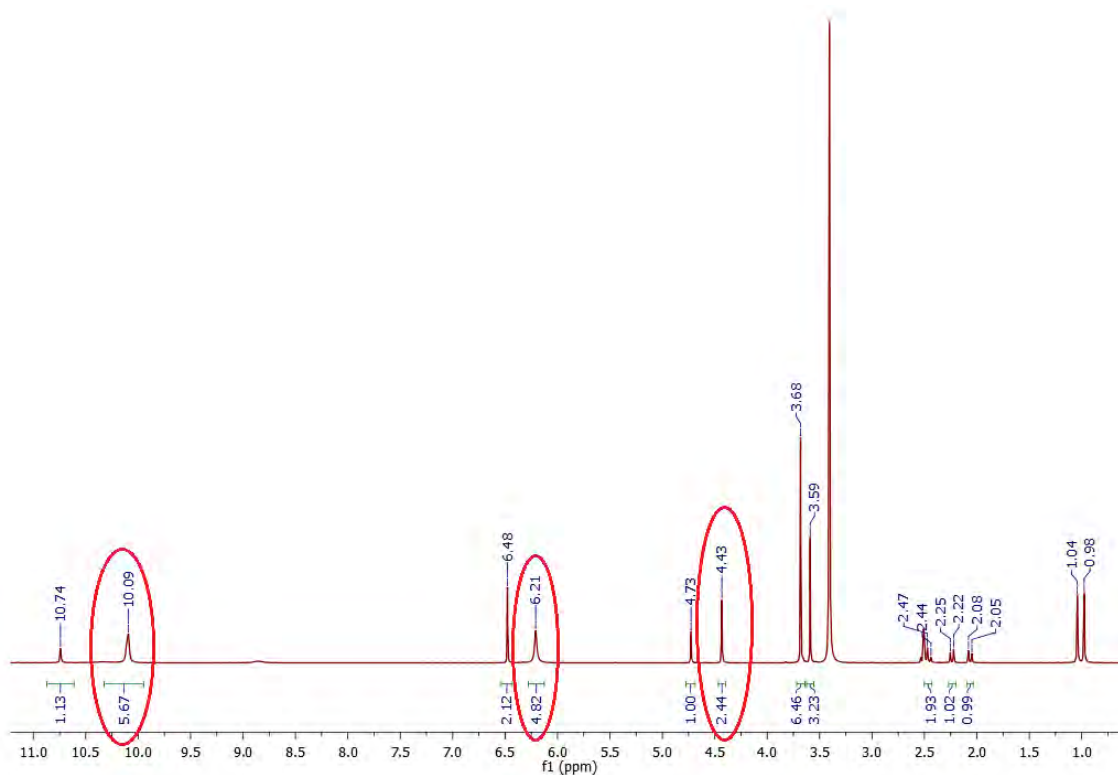


Figura 32 – ^1H -RMN para o composto **25** com destaque para os sinais que não são referentes ao produto desejado. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 33 auxilia o entendimento dos sinais obtidos através do RMN de ^1H para o produto **5**. Uma expansão desse espectro pode ser visto na página 90.

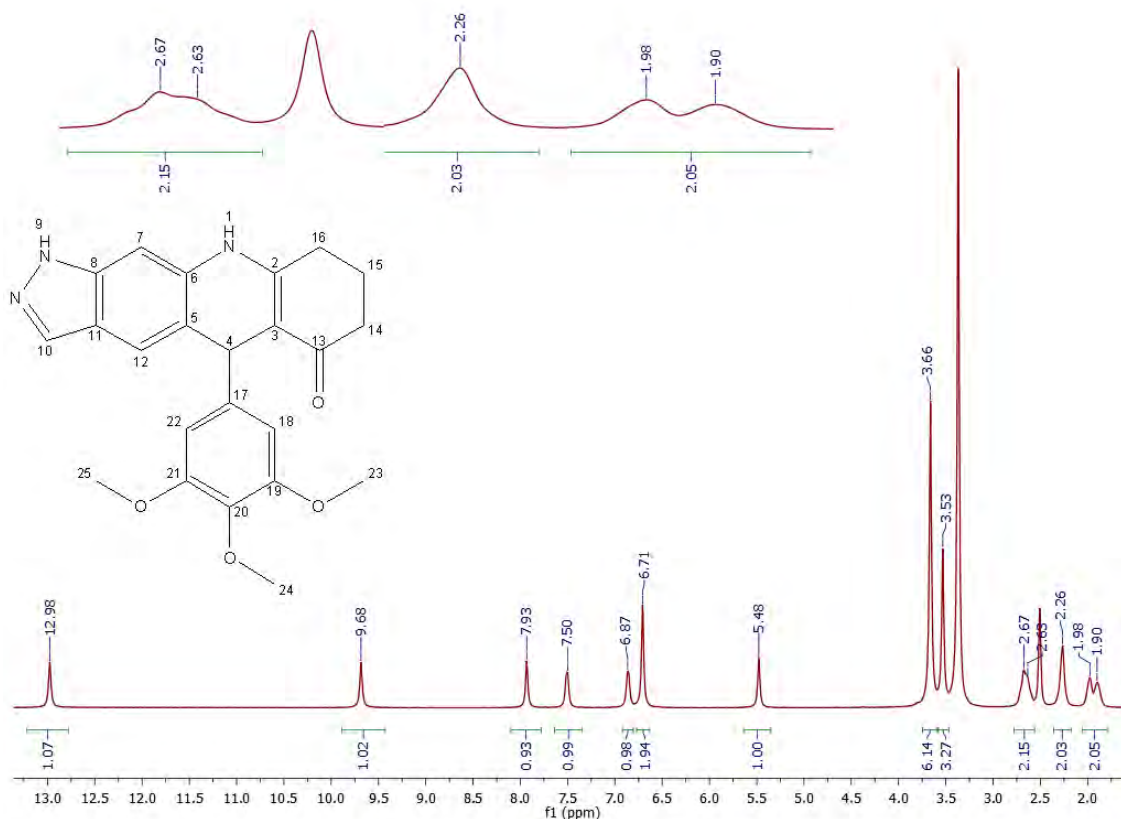


Figura 33 – Espectro ^1H -RMN para o produto **5**. Fonte: Elaborada pela autora.

O simpleto com deslocamento de 5.48 ppm é o mais significativo do espectro, pois pode-se dizer que é o sinal que caracteriza a formação do produto. Esse sinal é referente ao hidrogênio 4. Uma vez que esse sinal não está presente em nenhum dos reagentes, ele é que nos indica que houve a ciclização esperada.

O sinal com deslocamento de 1,90-1,98 ppm é um duplete largo referente aos hidrogênios 15. Esse sinal é o de menor deslocamento dentre os alifáticos por estarem mais distante do efeito anisotrópico da carbonila e da dupla ligação. Nota-se que os sinais saem como duplete largo mas na verdade deveria ser um multiplete, devido aos 4 hidrogênios vicinais. O sinal com deslocamento de 2.26 ppm está como um simpleto largo, mas na verdade deveria ser um triplete, pois é referente aos hidrogênios 16, eles tem um valor de deslocamento mais alto, apesar de serem alifáticos, pela proximidade com a ligação dupla. O multiplete com deslocamento de 2.63-2.67 ppm é referente aos hidrogênios 14, por estarem próximo a carbonila, eles sofrem o efeito anisotrópico que faz com que, apesar de alifáticos, eles fiquem mais desprotegidos, tendo um deslocamento mais alto.

O simpleto de 3.53 ppm é referente aos três hidrogênios ligados ao carbono da metoxila 24, o valor de deslocamento mais alto é proveniente do efeito retirador de elétrons do oxigênio.

O simpleto de 3.66 ppm é referente aos seis hidrogênios ligados ao carbono das metoxilas 23 e 25.

O simpleto com deslocamento de 6.71 ppm é referente aos hidrogênios aromáticos provenientes do aldeído (18 e 22). Esse sinal nos indica exatamente o padrão de substituição do anel fenílico esperado. O simpleto com deslocamento de 6.87 ppm provavelmente é referente ao hidrogênio 7, por estar na posição orto em relação a dois -NH (1 e 9), ele fica mais protegido. O simpleto com deslocamento de 7.50 ppm provavelmente é referente ao hidrogênio 12, graças a posição meta em relação a dois -NH (1 e 9) o valor desse hidrogênio aromático é um pouco mais desprotegido. Esse padrão de dois simpletos é o fator que comprova que o anel pirazol se encontra na posição representada. O simpleto com deslocamento de 7.93 ppm é referente ao hidrogênio 10, ele é mais desprotegido graças ao fato de ser ligado a um carbono sp², além da proximidade com o nitrogênio. O sinal com deslocamento de 9.68 ppm é um simpleto referente ao hidrogênio 1, enquanto o simpleto com deslocamento de 12.98 ppm é referente ao hidrogênio 9, que por estar próximo ao outro nitrogênio e uma ligação dupla, faz com que ele tenha um deslocamento mais alto.

Para o produto **6** (espectro página 92) a principal diferença para espectro discutido é a ausência do simpleto referente a metoxila da posição para do anel fenílico. Em contra partida um simpleto com deslocamento de 8.06 ppm, referente ao hidrogênio da hidroxila na posição para do anel fenílico. Para o produto **7** (espectro página 94) temos uma diferença significativa em relação ao espectro discutido, além da presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos 18, 20, 21 e 22; o fato que chama mais atenção é que nesse composto a posição do anel pirazol está em uma posição distinta. A nova posição do anel é corroborada pelos dubletos referentes aos hidrogênios 7 e 8. A posição distinta pode ser justificada pelo menor impedimento estérico causado pelo grupo nitro ou por uma possível interação intramolecular entre o NH, proveniente do anel pirazol, e o grupo nitro, proveniente do aldeído, que força a posição do anel pirazol ficar distinta dos compostos **5** e **6**. Os produtos **8** (espectro página 96) e **9** (espectro página 98) tem como principais diferenças para o espectro discutido a presença de simpletos referentes as metoxilas 24, 25 e 26. Para o produto **8** temos um simpleto com deslocamento em 8.05 ppm que é referente ao hidrogênio da hidroxila 22. Os produtos **10** (espectro página 100) e **12** (espectro página 102) tem como principais diferenças para o espectro discutido a presença de simpletos referentes as metoxilas provenientes da amina utilizada. O padrão de simpletos se repete indicando que o mesmo padrão de substituição é encontrado. Para o produto **12** vemos o mesmo padrão de sinais aromáticos do produto **7**, que também possui o grupo nitro. O produto **19** (espectro página 104) possui um padrão dos sinais aromáticos semelhantes ao produto **LDQMC-014** (espectro página 110), o que gera uma diferença em relação ao produto **5**. Outra diferença é a presença do duplete (deslocamento de 1.11-1.12 ppm) que é referente as metilas 19 e 20. Para os produtos **21** (espectro página 106) e **22** (espectro página 108) vemos a presença de um duplete com deslocamento entre 5.86-5.97 ppm que é referente aos hidrogênios do sistema dioxo. O valor do seu deslocamento é justificado pelo fato de serem vizinhos a dois oxigênios. Para o produto **8**

temos um simpleto com deslocamento de 8.02 ppm que é referente ao hidrogênio da hidroxila 23.

A Figura 34 auxilia o entendimento dos sinais obtidos através do RMN de ^{13}C para o produto **5**, uma expansão desse espectro pode ser visto na página 91.

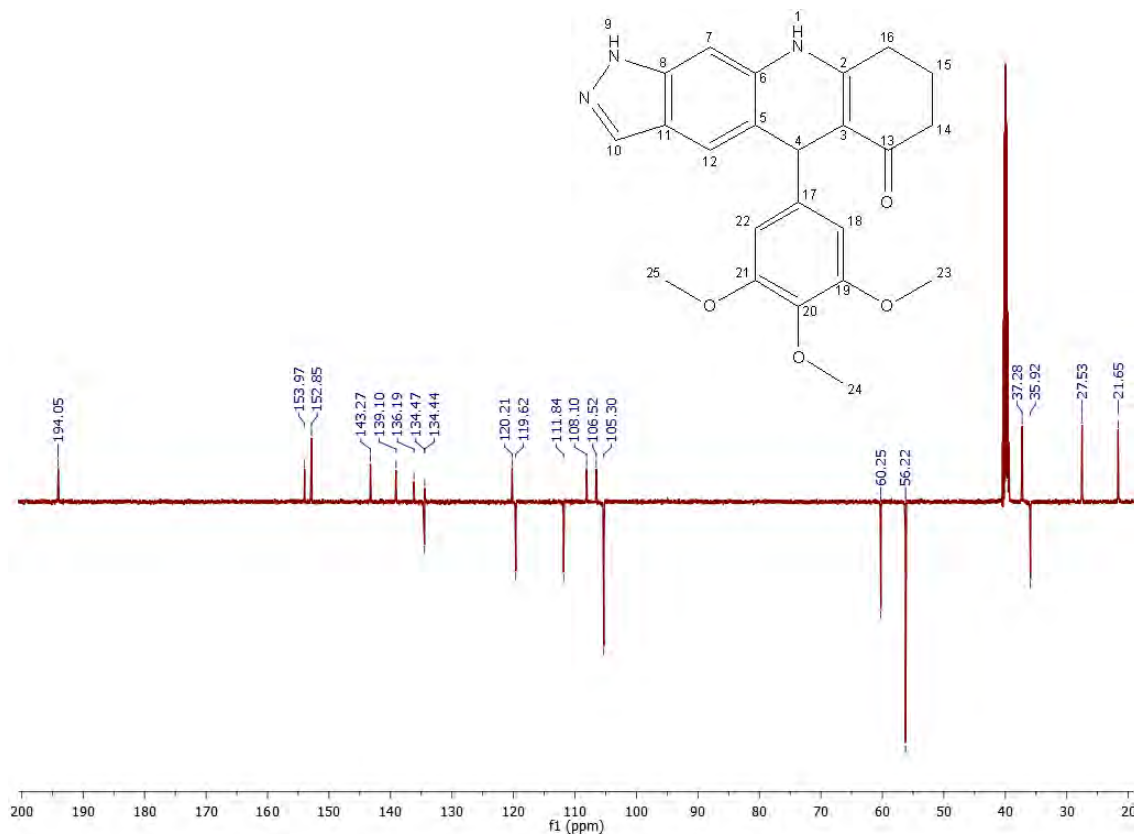


Figura 34 – Espectro ^{13}C -RMN para o produto **5**. Fonte: Elaborada pela autora.

O sinal com deslocamento de 35.92 ppm é referente ao carbono 4, que é o mais importante do espectro pois nos indica que a reação foi bem sucedida e o centro assimétrico foi formado. O sinal com deslocamento em 21.65 ppm é referente ao carbono alifáticos 15 que é o mais protegido por estar mais distante do efeito anisotrópico da carbonila e da dupla ligação. O sinal deslocamento de 27.53 ppm é referente ao carbono 16, que apesar de alifáticos está vizinho a uma carbono sp^2 , o que faz com que seja mais desprotegidos. O sinal com deslocamento de 37.28 ppm é referente ao carbono 14, que sofrem efeito anisotrópico da carbonila deixando-os mais desprotegidos em comparação com os outros alifáticos. O sinal com deslocamento de 56.21 ppm é referente aos carbonos das metoxilas 23 e 25, que por estarem ligados ao oxigênio está mais desprotegido, assim como o sinal com deslocamento de 60.25 ppm, que é referente ao carbono da metoxila 24. O sinal com deslocamento de 105.30 ppm é referente aos carbonos 16 e 22, que são os aromáticos provenientes do aldeído. O sinal com deslocamento de 106.52 ppm é referente ao carbono 3, que é sp^2 e sofre o efeito anisotrópico da carbonila. O sinal com deslocamento de 108.10 ppm é referente ao carbono 11 que é sp^2 e está na posição para a amina. O sinal com deslocamento de 111.84 ppm é referente ao carbono 7, que se encontra orto a amina,

portanto é um pouco mais protegido. O sinal com deslocamento de 119.82 ppm é referente ao carbono 12, que está meta a amina, logo, mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 120.21 ppm é referente ao carbono 5 que é sp². O sinal com deslocamento de 134.44 ppm é referente ao carbono 2, que está ligada ao nitrogênio, fazendo com que ele seja mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 134.47 ppm é referente ao CH 10, que é sp² e está ligado a um nitrogênio, deixando o carbono mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 136.19 ppm é referente ao carbono 20, que, apesar de estar ligado a um oxigênio, está também orto a duas metoxilas, que faz com que ele seja mais protegido em relação aos outros carbonos ligados a metoxilas. O sinal com deslocamento de 139.10 ppm é referente ao carbono 17, que está mais desprotegido por estar duplamente meta a metoxilas. O sinal com deslocamento em 143.27 ppm é referente ao carbono 8, que está ligado a um nitrogênio e é sp², por isso mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 152.85 ppm é referente aos carbonos 19 e 21 que são sp² e estão ligados a metoxilas, porém orto a uma outra metoxila. O sinal com deslocamento de 153.97 ppm é referente ao carbono 6, que é sp² e está ligado a um nitrogênio, que faz com que ele esteja mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 194.05 ppm é referente ao carbono carbonílico 13.

Para o produto **6** (espectro página 93) a principal diferença para espectro discutido é a ausência do sinal referente a metoxila da posição para do anel fenílico. Para o produto **7** (espectro página 95) temos como diferença em relação ao espectro discutido a presença dos sinais dos carbonos aromáticos provenientes do aldeído; além do fato do carbono 8 ser um CH enquanto o 12 é um C, o que corrobora a posição diferenciada do anel pirazol. Os produtos **8** (espectro página 97) e **9** (espectro página 99) tem como principais diferenças para o espectro discutido a presença de sinais referentes as 3 metoxilas 24, 25 e 26. Para o produto **8** temos a ausência do sinal referente a metoxila 22. Os produtos **10** (espectro página 101) e **12** (espectro página 103) tem como principais diferenças para o espectro discutido a presença de sinais referentes as duas metoxilas provenientes da amina utilizada. O padrão de onde o carbono 7 e o 10 são CH indicam o mesmo padrão de substituição do produto **5** é encontrado. Para o produto **12** vemos o mesmo padrão de sinais aromáticos do produto **7**, que também possui o grupo nitro. O produto **19** (espectro página 105) possui um padrão dos sinais aromáticos semelhantes ao produto **LDQMC-014** (espectro página 111), o que gera uma diferença em relação ao produto **5**. Outra diferença é a presença do dois sinais de CH₃ que é referente as metilas 19 e 20. Para os produtos **21** (espectro página 107) e **22** (espectro página 109) vemos a presença de um sinal referente a CH₂ com deslocamento próximo à 101 ppm que é referente ao carbono 9 do sistema dioxo. O valor do seu deslocamento é justificado pelo fato de serem vizinhos a dois oxigênios. Para o produto **8** temos a ausência do carbono referente a metoxila na posição para proveniente do aldeído.

Podemos concluir, portanto, que foram sintetizados com sucesso 10 produtos, sendo 6 deles inéditos, cujas as interações previstas por modelagem molecular com a proteína de interesse será apresentada no item 3.5.2.

3.2 Otimização da síntese do composto LDQMC-014

O processo de otimização foi realizado para encontrar as melhores condições reacionais para a síntese do composto LDQM-014. O esquema da reação base (descrita em Fonseca (2017)), encontra-se na Figura 35. Na sua realização não se utilizou catalisador e a quantidade de solvente foi 3mL, o tempo foi de 24 horas em chapa de aquecimento (à 75°C) seguidos de 30 minutos no freezer, obtendo-se assim um rendimento de 27%. A partir dessa reação base cada parâmetro foi alterado individualmente. Todas as modificações e seus respectivos rendimentos se encontram na tabela 3.

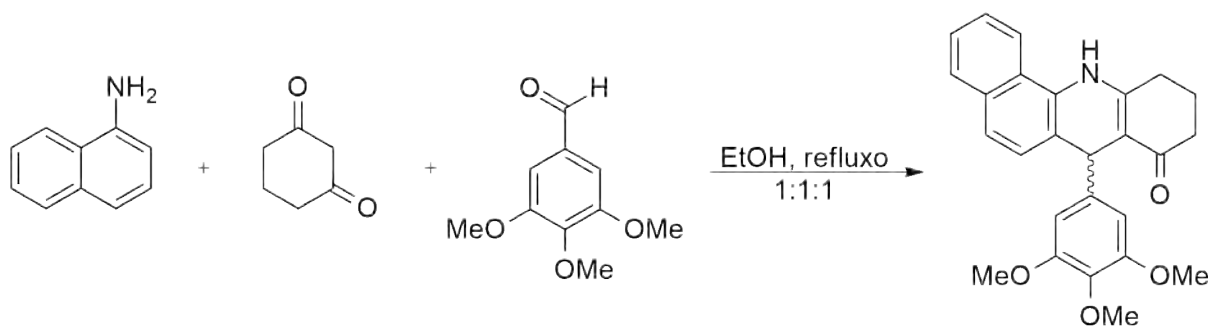


Figura 35 – Esquema reacional LDQMC-014. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 – Resultados da otimização.

Parâmetro	Modificação	Rendimento
Tempo	24 horas	27%
	48 horas	18%
	72 horas	23%
Proporção (amina:dicetona:aldeído)	1:1:3	11%
	1,5:1:1	35%
	2:1:1	45%
	3:1:1	45%
Solvente / temperatura	Metanol (60°C)	24%
	Isopropanol (82°C)	39%
	Terc-butanol (83°C)	32%
	1-Butanol (117,5°C)	27%
	Acetonitrila (82°C)	Não obteve-se o produto
	Dimetilformamida (153°C)	Não obteve-se o produto
	Dimetilsulfóxido (189°C)	Não obteve-se o produto
	Tolueno (110,6°C)	Não obteve-se o produto
Catalisador	HCl	Não obteve-se o produto
	Morfolina (10 mol% eq.)	24%
Volume de solvente	2 mL	16%
	4 mL	17%
Uso de freezer	sem uso	19%

A temperatura utilizada nas reações sempre eram a temperatura de ebulição do solvente. Nota-se que apenas quando álcoois são utilizados como solvente, que a reação se completou. Esse fator reforça a necessidade de álcoois como solvente, uma vez que álcoois são os solventes que melhor solubilizam os reagentes, fazendo assim com que a interação necessária para ocorrer a reação seja ideal.

Os melhores rendimentos quando se utilizou como tempo 24 horas e a quantidade de solvente de 3 mL mostrou que a esses parâmetros, também proposto por Tratat, Giorgi-Renault e Husson (2002), são os ideais.

O parâmetro da proporção nos indica que um excesso de amina é necessário para que toda a reação seja completa. Esse fator nos indica que a amina pode estar participando da reação em duas etapas diferentes, logo, faz-se necessário a utilização de 2 equivalentes de amina.

O uso de catalisadores nos mostra que essa reação, em específico, não ocorre em meio ácido, enquanto o meio mais básico (quando adicionou-se morfolina) também não trouxe nenhum favorecimento no quesito rendimento. Logo, chegamos a conclusão que a utilização desses catalisadores é desnecessária pois a própria amina utilizada faz o papel de nucleófilo.

O resfriamento da reação através do uso do freezer, aproximadamente 0°C, se mostrou uma etapa importante na reação, pois a diminuição da temperatura força a precipitação do produto que ainda se encontra solúvel à quente. Portanto, a utilização do resfriamento da solução em freezer deve ser mantida como uma metodologia padrão, podendo-se, futuramente, ser realizado um teste para determinar se mais tempo a baixa temperatura pode levar a mais formação de produto.

Fez-se um teste onde uma reação “ideal” foi realizada, nessa reação as melhores modificações de cada condição foi utilizada, ou seja, o solvente utilizado foi o isopropanol, tempo de 24 horas, 3 mL de solvente, proporção dos reagentes (amina:dicetona:aldeído) de **2:1:1** e uso de freezer. O rendimento encontrado nessa reação foi de 48,6%, representando um aumento de mais de 78% no rendimento original (27,3%), entretanto, esse valor de rendimento é muito próximo do foi alcançado alterando apenas proporção dos reagentes. Tal fato nos leva a considerar que a utilização da amina em proporções dobradas é o fator chave para o aumento do rendimento, o que pode ser explicado pela necessidade dela em dois momentos cruciais no mecanismo.

O esquema de intermediários proposto é análogo ao descrito na Figura 27 (página 29), através dele pode-se salientar os dois momentos cruciais cuja a quantidade de amina pode alterar o rendimento da reação. Primeiro para abstração do próton da 1,3-ciclohexanodiona (**I**), levando a formação do carbânion (**II**) e segundo para o ataque nucleofílico (**V**) para formação do intermediário **VII**.

De forma geral, conclui-se que a otimização foi realizada de maneira assertiva, pois foi possível alcançar um aumento considerável do rendimento da reação.

Todos as metodologias testadas tiveram seus produtos confirmados por cromatografia

de camada delgada e ponto de fusão, uma vez que já se dispunha de uma amostra do produto confirmado por RMN com ponto de fusão e interação com a placa de CCD definidos.

A Figura 36 auxilia o entendimento dos sinais obtidos através de RMN ^1H para o produto LDQMC-014, uma expansão desse espectro pode ser vista na página 110. A atribuição dos sinais foi definida utilizando métodos espectroscópicos 2D (COSY - página 112; HMBC - página 114; HSQC - 113).

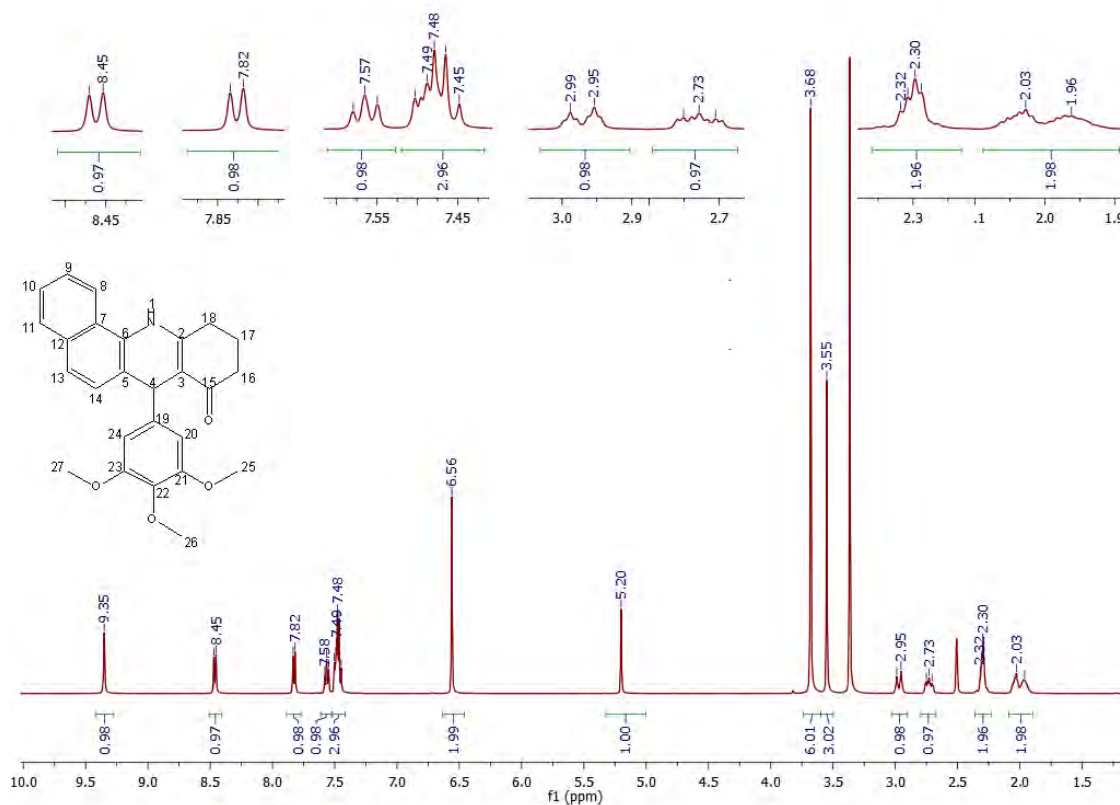


Figura 36 – Espectro ^1H -RMN para o produto **LDQMC-014**. Fonte: Elaborada pela autora.

O simpleto com deslocamento de 5.20 ppm é o mais significativo do espectro, pois pode-se dizer que é o sinal que caracteriza a formação do produto. Esse sinal é referente ao hidrogênio 4. Uma vez que esse sinal não está presente em nenhum dos reagentes, ele é o indicativo que houve a ciclização esperada.

O sinal com deslocamento de 1,96-2.03 ppm é um multipletto largo referente aos hidrogênios 16. Esse sinal é o de menor deslocamento dentre os alifáticos, o que contraria o esperado, pois como esse hidrogênio está vizinho a carbonila, o efeito anisotrópico deveria desblindá-lo. Tal atribuição do sinal só foi possível utilizando o HMBC. Esse sinal é um mutipletto devido as interação dos dois hidrogênios geminais, os dois vicinais e a possível interação em W com os hidrogênios 18. O sinal com deslocamento de 2.29-2.32 ppm é um multipletto pois é referente aos hidrogênios 17, tendo interações vicinais com quatro hidrogênios, ele está a três ligações de uma carbonila e de uma dupla ligação, por esse fator está com o segundo maior deslocamento

dentre os alifáticos. O multiplete com deslocamento de 2.70-2.75 ppm é referente aos hidrogênios 18 axial enquanto o multiplete com deslocamento de 2.95-2.99 ppm ao hidrogênio 18 equatorial, tal separação é devido ao efeito anisotrópico em ciclohexanos, isso se deve ao fato de apesar da falta de mobilidade, os hidrogênios se encontram em posições pseudo-axial e pseudo-equatorial, tal fato faz com que a proximidade com o carbono sp² seja diferente, fazendo assim os sinais referentes a esses hidrogênios serem distintos.

O simpleto com deslocamento de 3.55 ppm é referente aos três hidrogênios ligados ao carbono da metoxila 26, o valor de deslocamento mais alto é proveniente do efeito retirador de elétrons do oxigênio. O simpleto com deslocamento de 3.68 ppm é referente aos seis hidrogênios ligados ao carbono das metoxilas 25 e 27.

O simpleto com deslocamento de 6.56 ppm é referente aos hidrogênios aromáticos provenientes do aldeído (20 e 24). Esse sinal nos indica exatamente o padrão de substituição do anel fenílico esperado.

O multiplete com deslocamento de 7.45-7.50 ppm é referente aos hidrogênios aromáticos 10, 13 e 14. Apesar do ambiente químico dos três não serem o mesmo, seus deslocamentos caem muito próximos, gerando um multiplete, impossibilitando a diferenciação da multiplicidade dos sinais. O tripleto com deslocamento de 7.55-7.58 ppm é referente ao hidrogênio aromático 9. Esse sinal tem a multiplicidade compatível com o ambiente químico em que se encontra, é um aromático com dois hidrogênios vizinhos. O duplete com deslocamento de 7.82-7.83 ppm é referente ao hidrogênio aromático 11. Esse sinal tem a multiplicidade compatível com o ambiente químico em que se encontra, é um aromático com um hidrogênio vizinho. O duplete com deslocamento de 8.45-8.47 ppm é referente ao hidrogênio aromático 8. Esse sinal tem a multiplicidade compatível com o ambiente químico em que se encontra, além de ter um *J* que nos mostra que ele faz interação com o hidrogênio 9. O sinal com deslocamento de 9.35 ppm é um simpleto referente ao hidrogênio 1, é o mais desprotegido do espectro devido ao fato de estar ligado a um nitrogênio.

A Figura 37 auxilia o entendimento dos sinais obtidos através do RMN de ¹³C para o produto **LDQMC-014**, uma expansão desse espectro pode ser visto na página 111.

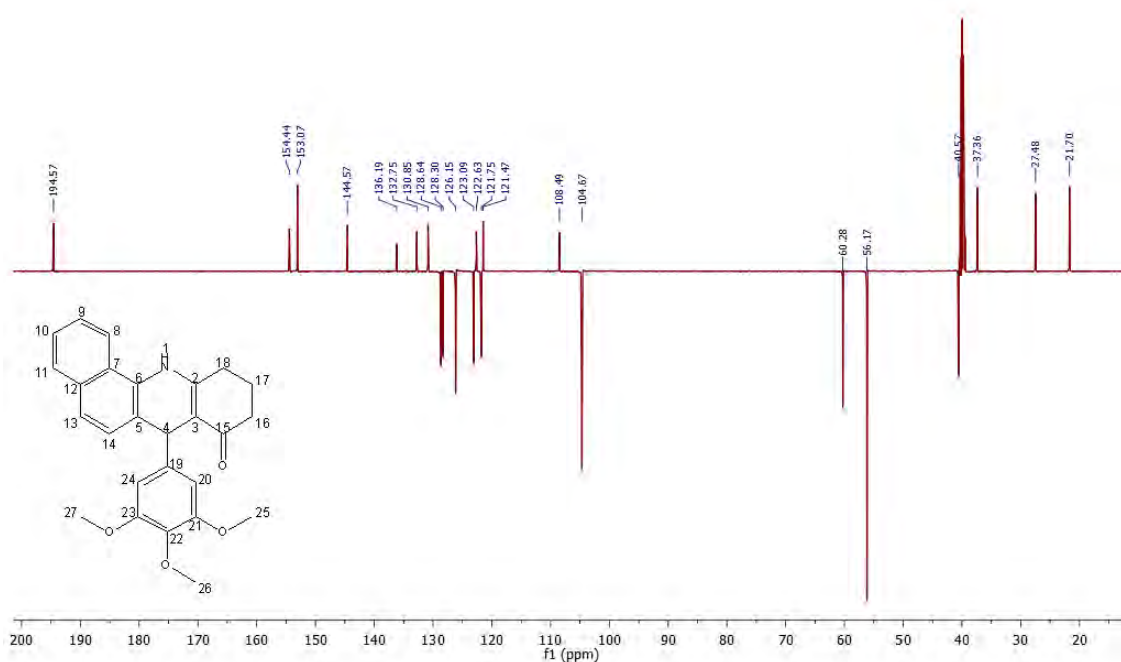


Figura 37 – Espectro ¹³C-RMN para o produto **LDQMC-014**. Fonte: Elaborada pela autora.

O sinal com deslocamento de 40.57 ppm é referente ao carbono 4, que é o mais importante do espectro pois nos indica que a reação foi bem sucedida e o centro assimétrico quiral foi formado. O sinal com deslocamento de 21.70 ppm é referente ao carbono alifáticos 16 que é o mais protegido, sendo o contrário do que se esperava para um carbono que sofre efeito anisotrópico da carbonila. O sinal deslocamento de 27.46 ppm é referente ao CH₂ 18, que apesar de alifáticos está vizinho a uma carbono sp², o que faz com que seja mais desprotegidos. O sinal com deslocamento de 37.36 ppm é referente ao CH₂ 17. O sinal com deslocamento de 56.47 ppm é referente aos carbonos das metoxilas 25 e 27, que por estarem ligados ao oxigênio estão mais desprotegidos, assim como o sinal com deslocamento de 60.28 ppm, que é referente ao carbono da metoxila 26. O sinal com deslocamento de 104.67 ppm é referente aos carbonos 20 e 24, que são os aromáticos provenientes do aldeído. O sinal com deslocamento de 108.49 ppm é referente ao carbono 3, que é sp² e sofre o efeito anisotrópico da carbonila. O sinal com deslocamento de 21.47 é referente ao C 5 que é sp² e está na posição meta a amina. O sinal com deslocamento de 121.75 ppm é referente ao CH 8. O sinal com deslocamento de 122.63 ppm é referente ao C 7. O sinal com deslocamento de 123.09 ppm é referente ao carbono 13, que está na posição para em relação a amina, logo, mais protegido. O sinal com deslocamento de 126.15 ppm é referente aos CH 9 e 10 que são sp². O sinal com deslocamento de 128.30 ppm é referente ao CH 14, que está na posição meta em relação a amina e, portanto, mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 128.64 ppm é referente ao CH 11, que é sp². O sinal com deslocamento de 130.85 ppm é referente ao C 12, que é sp². O sinal com deslocamento de 132.75 ppm é referente ao C 6, que é sp² e está ligado ao nitrogênio da amina. O sinal com deslocamento de 136.19 ppm é referente ao C 22, que é sp² e está ligado a um oxigênio de metoxila e orto a duas metoxilas, deixando o

carbono mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 144.57 ppm é referente ao C 19, que se encontra na posição para a uma metoxila e na posição meta a duas metoxilas o que faz com que seja mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 153.07 ppm é referente aos carbonos 21 e 23 que são sp² e estão ligados as metoxilas, porém orto a uma outra metoxila. O sinal com deslocamento de 154.44 ppm é referente ao C 2, que é sp² e está ligado a um nitrogênio, que faz com que ele esteja mais desprotegido. O sinal com deslocamento de 194.575 ppm é referente ao carbono carbonílico 15.

3.3 Cromatografia quiral

Afim de determinar se há a presença de um eutômero e um distômero realizou-se a separação dos enantiômeros do produto LDQMC-014 via HPLC utilizando uma coluna semipreparativa quiral (*Chiralpak IA - SFC semi-preparative HPLC column, 5 μm, 250 mm x 10mm*). A fase móvel foi isocrático Hexano:Isopropanol 70:30 (v/v). Isolou-se assim cerca de 2mg de cada enantiômero, partindo de 60mg de mistura, que posteriormente foram utilizados no dicroísmo circular, além da determinação da atividade biológica.

Os três cromatogramas (Figura 38) foram obtidos em 254,4nm. O primeiro é referente a apenas um enantiômero isolado. O segundo é referente ao segundo enantiômero, onde se observa uma base mais alargada, o que não é o ideal, mas pode ser explicado pelo solvente utilizado não ter sido o ideal para processo. Entretanto, o terceiro cromatograma, que é referente a separação da mistura racêmica, apresenta três bandas de absorção, sendo a primeira (cerca de 3,3 minutos) referente ao solvente utilizado para injeção (acetato de etila), a segunda banda (6,5 minutos) e a terceira banda (8,7 minutos) são referentes aos dois enantiômeros separados. Nota-se que as bandas não se sobrepõem, o que nos mostra que a metodologia utilizada foi eficiente, sendo a quantificação por área muito semelhante (48,65% do enantiômero em 6,5 minutos e 48,80% do enantiômero em 8,7 minutos), o que nos comprova que a mistura era realmente racêmica. Acredita-se que o efeito de calda visto nas bandas dos enantiômeros seja pela força da fase móvel utilizada.

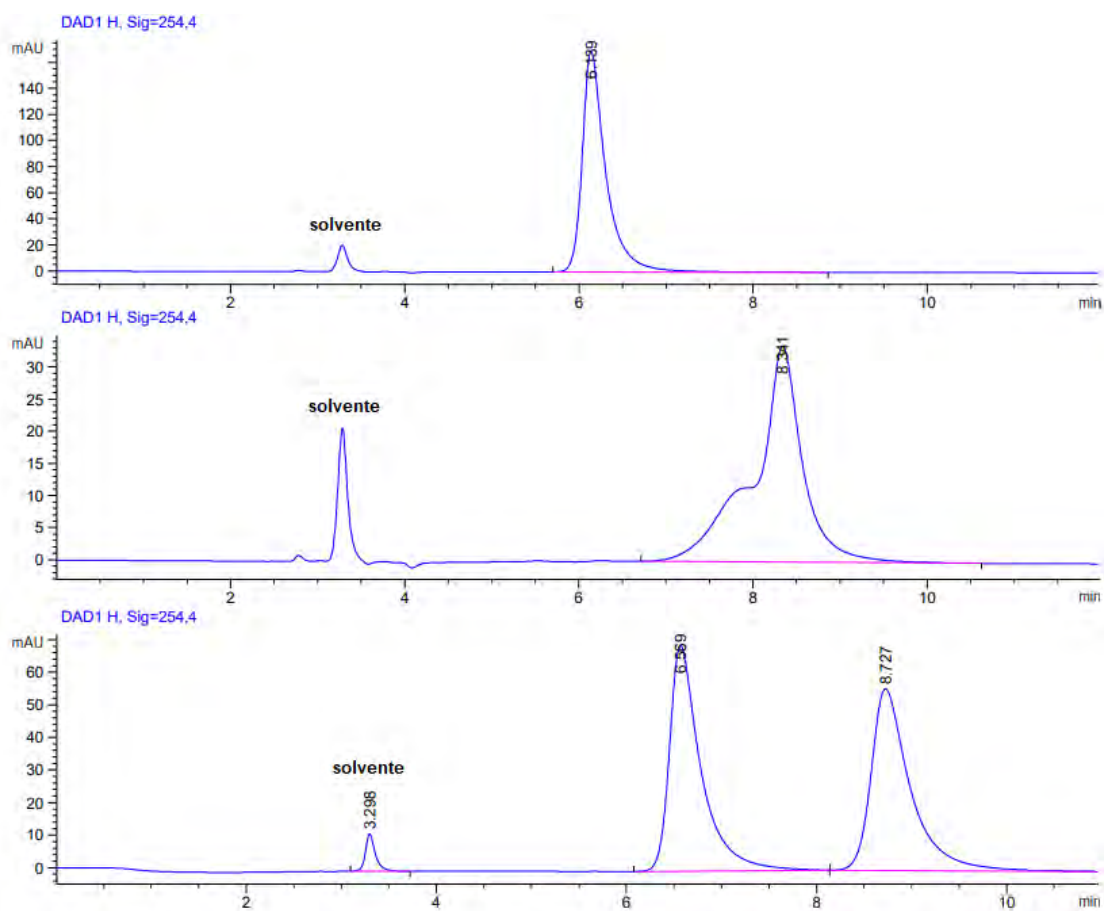


Figura 38 – Cromatograma obtido por CLAE. Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Dicroísmo circular

Os espectros obtidos no ensaio de dicroísmo circular encontram-se combinados na Figura 39. Nesse gráfico encontram-se as curvas obtidas para os dois enantiômeros, sendo ACRI 1 (vermelho) a curva do enantiômero responsável pelo sinal em 6,5 minutos na CLAE (Figura 38) e ACRI 2 (preto) a curva do enantiômero responsável pelo sinal em 8,7 minutos na CLAE.

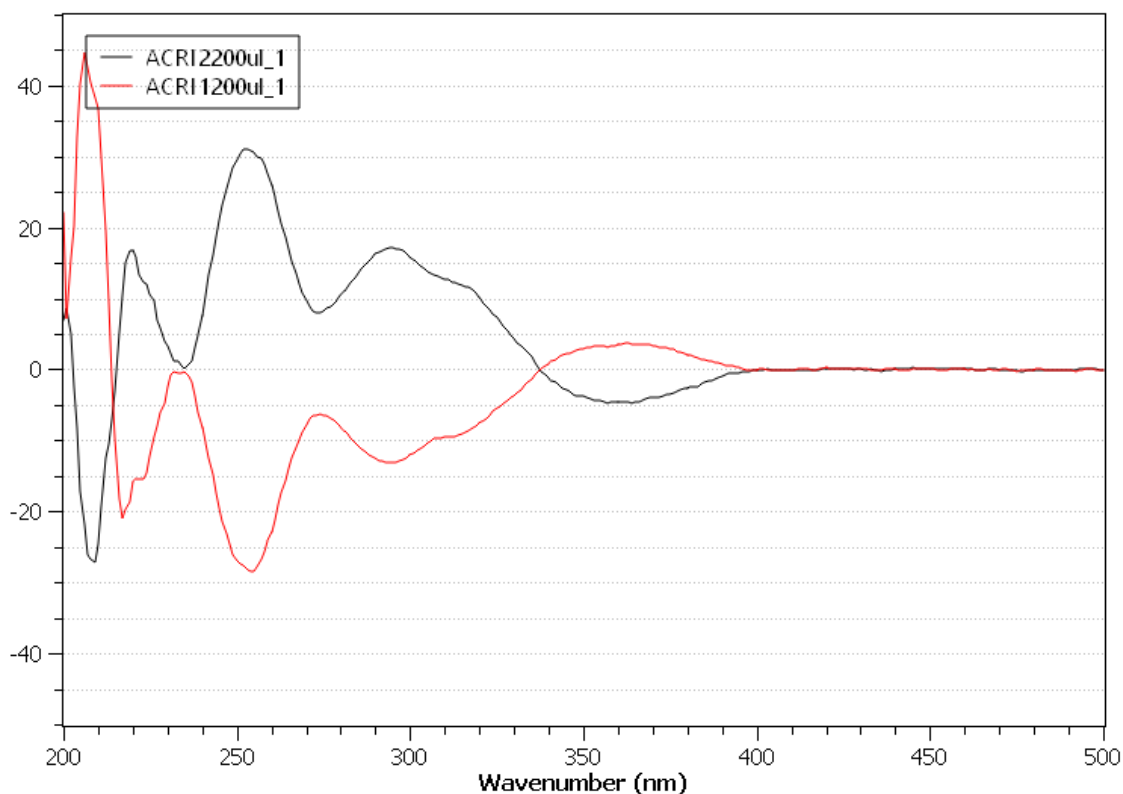


Figura 39 – Espectro obtido no dicroísmo circular. Fonte: Elaborada pela autora.

Uma característica de dois enantiômeros é possuírem curvas opostas quando submetidos ao aparelho de luz circularmente polarizada (CRABBÉ, 1974). No espectro obtido pode-se observar que há uma boa simetria entre as bandas dos dois enantiômeros, o que nos indica que realmente a separação dos enantiômeros pela CLAE foi eficiente.

O comprimento de onda que gera a banda de maior intensidade é $\lambda=254$ nm, portanto, essa foi a banda utilizada para analisar a diferença de efeito Cotton nos dois enantiômeros. A primeira acridinona analisada tem efeito Cotton negativo e a segunda acridinona analisada tem efeito Cotton positivo.

Seguindo a regra do quadrante para aromáticos descrita por DeAngelis e Wildman (1969), considerou-se o anel naftalênico como o plano A, pois é o cromóforo com maior planaridade, rigidez e tem o efeito Cotton mais significativos, uma vez que as partes das moléculas estão mais distantes dos planos, e considerou-se o anel benzênico trimetoxilado como o plano B. Pode-se observar que, quando utiliza-se o enantiômero (*R*) (Figura 40), a maior porção da molécula que se encontra longe do plano (enona), está no quadrante a direita e pra baixo, ou seja, um quadrante positivo, o que indica que esse enantiômero tem uma maior contribuição para o efeito Cotton é positivo, logo, no espectro de dicroísmo, a banda mais significativa terá o aspecto positivo (enantiômero 2). Quando se analisa o enantiômero (*S*), o efeito Cotton é mais significativo no quadrante negativo, logo, no dicroísmo, ele é o que tem a banda mais significativa com aspecto negativo (enantiômero 1). Conclui-se, portanto, que o enantiômero (*R*) é o que possui o tempo de

retenção 8,727 minutos e o enantiômero (*S*) é o que possui o tempo de retenção 6,569 minutos no HPLC.

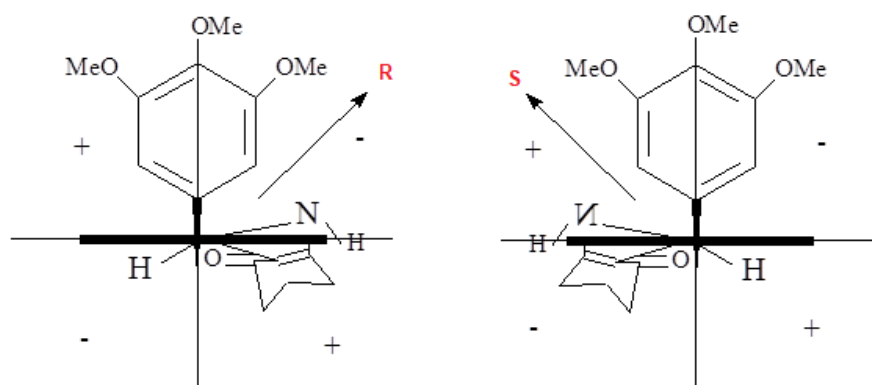


Figura 40 – Enantiômeros (*R*) e (*S*) pelas regras de quartantes aromáticos. Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Modelagem molecular

Os dados de modelagem molecular foram obtidos através do docking molecular realizado no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal na UFRRJ.

3.5.1 Enantiômeros do produto LDQMC-014

Um estudo de modelagem molecular foi realizado a fim de prever se os enantiômeros do composto LDQMC-014, teriam uma boa interação com a proteína Tubulina no sítio da Colchicina e se a interação teria resultados muito distintos para os dois enantiômeros. Nesse estudo utilizou-se a Tubulina (PDB ID: 5JCB) que tem na sua estrutura um ligante que chamaremos de NV4 (Figura 41), esse ligante é um composto análogo a Podofilotoxina. Para os enantiômeros foram analisadas 100 poses distintas a fim de abranger o máximo de conformações possíveis e assim obter resultados mais acurados. Todas as imagens referentes as interações moleculares entre proteína e ligante foram geradas no programa *Discovery Studio Visualizer*.

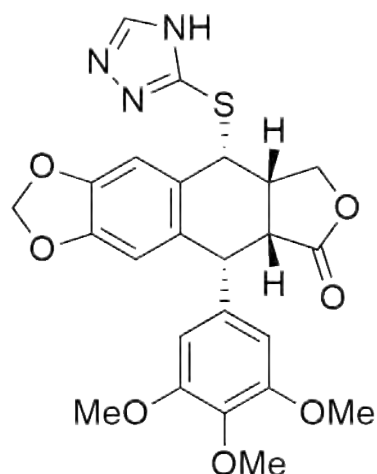


Figura 41 – Estruturas da composto NV4. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 42 nos mostra uma comparação entre as duas melhores poses dos enantiômeros (*R*) e (*S*), de acordo com os *scores* obtidos, já no sítio de ligação da Colchicina na Tubulina, onde a molécula rosa é referente ao enantiômero (*S*), a molécula azul é referente ao enantiômero (*R*).

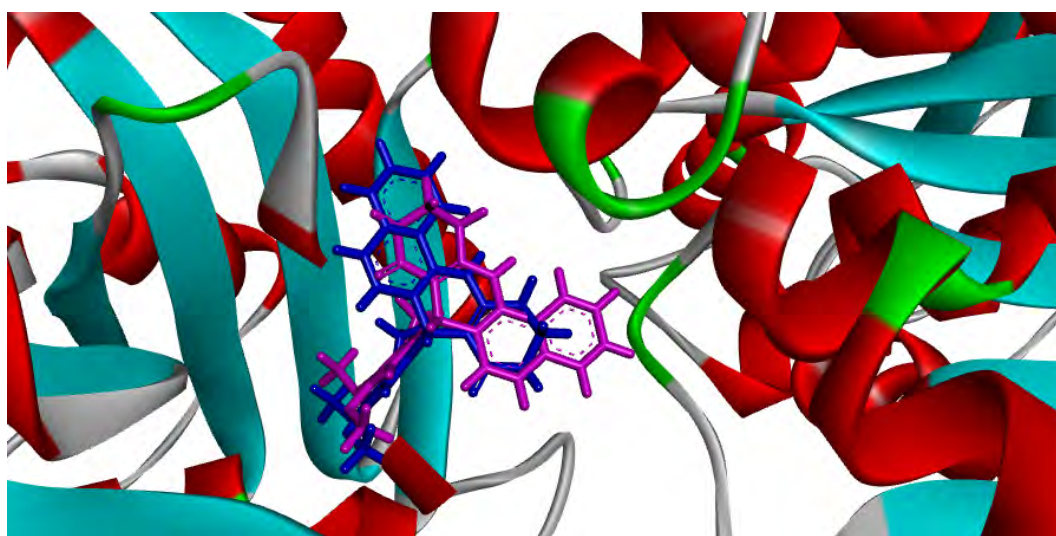


Figura 42 – Comparação da poses dos enantiômeros (azul – *R*; rosa – *S*). Fonte: Elaborada pela autora.

Como se pode observar o grupo que rege a conformação é o 3,4,5-trimetoxifenil, logo, esse grupo se encontra em uma posição fixa, o que resulta na posição invertida dos quatro anéis fusionados para os dois enantiômeros. Isto nos leva a crer que as interações serão distintas entre os dois enantiômeros, o que se confirma quando vemos o resultado dos *scores* obtidos.

As Figuras 43 e 44 nos mostram uma comparação entre o ligante original da proteína (NV4) e os enantiômeros. Como se pode observar, tanto para o (*S*) quanto para o (*R*), há sobreposição da conformação dos enantiômeros e do NV4, tal fato nos comprova que os dois enantiômeros fazem interações com a Tubulina de maneira semelhante ao seu ligante

original (NV4). Entretanto, é a partir da função *score* que conseguimos comparar o quanto essa sobreposição é mais ou menos efetiva.

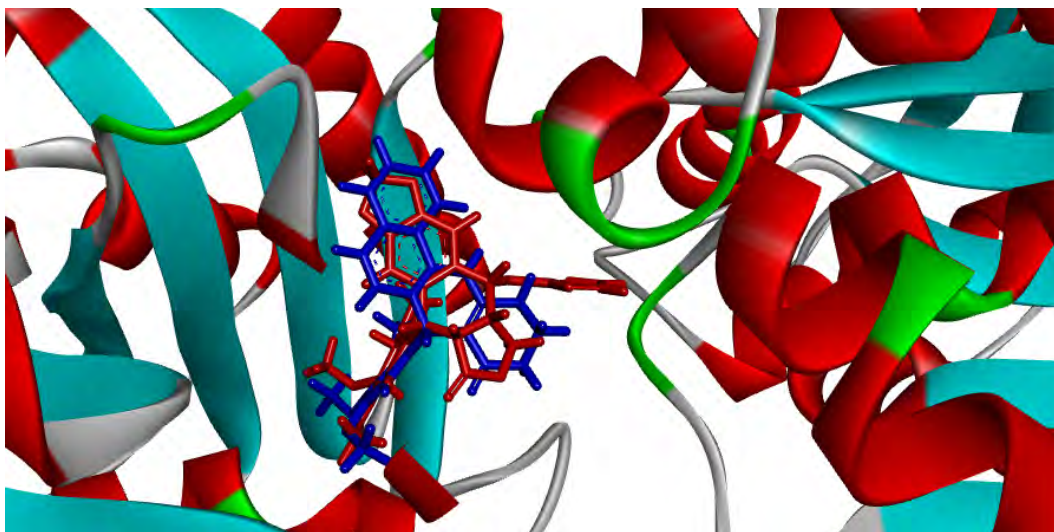


Figura 43 – Comparação NV4 (vermelho) e enantiômero (*R*) (azul). Fonte: Elaborada pela autora.

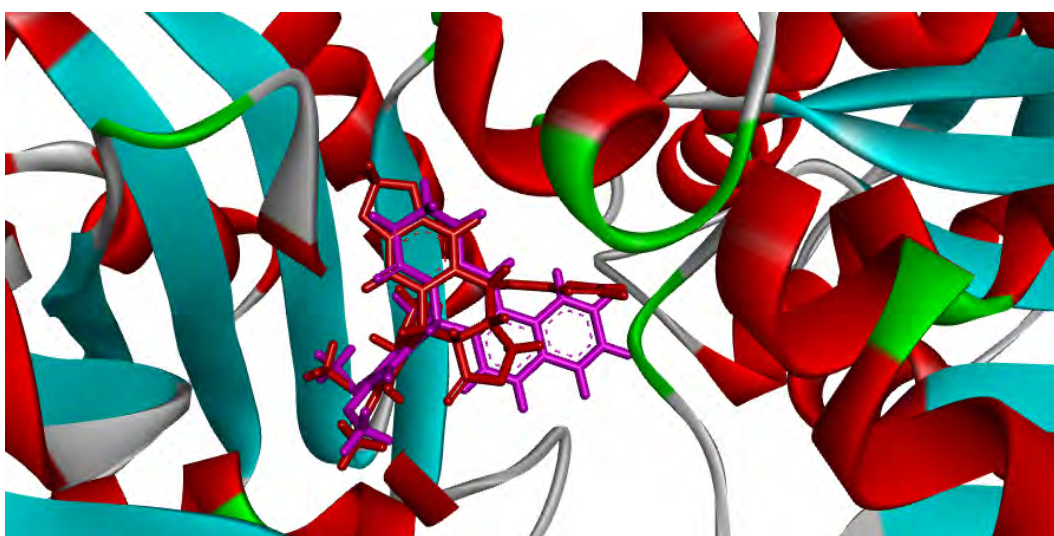


Figura 44 – Comparação NV4 (vermelho) e enantiômero (*S*) (rosa). Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 45 mostra os dois enantiômeros dentro da cavidade do sítio ativo, que gera a conclusão que os dois enantiômeros testados conseguem se encaixar no sítio ativo, sendo o posicionamento do grupo trimetoxifenil fixo. Dessa forma, concluímos, que a função *score* é a ferramenta mais adequada para analisar as interações.

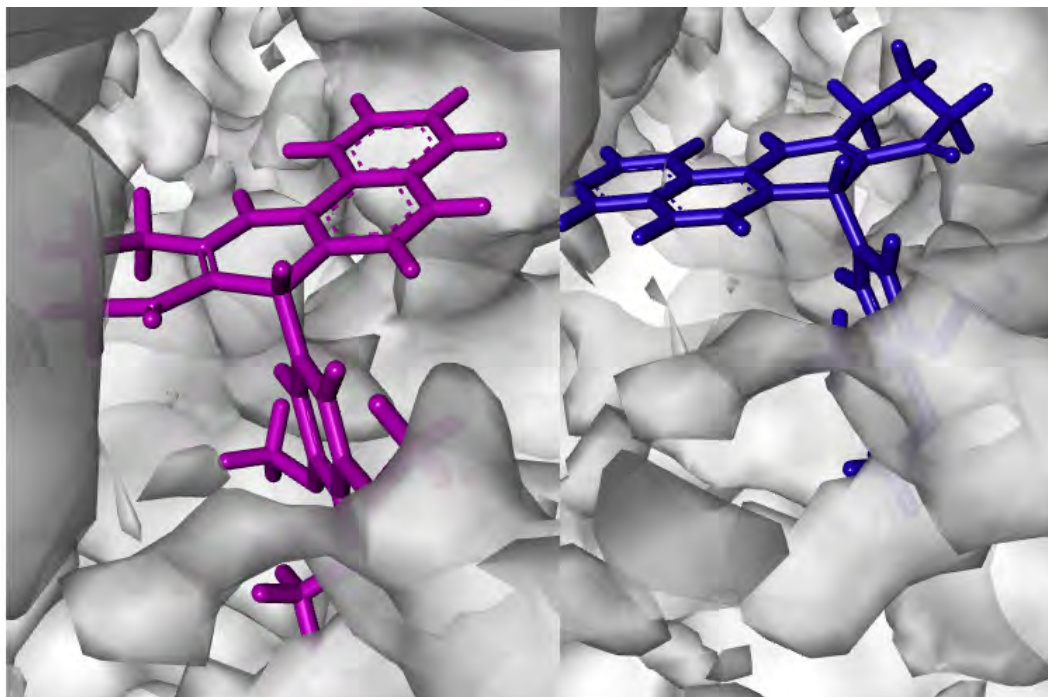


Figura 45 – Comparação das cavidades onde se encontram o enantiômero (*S*) (rosa) e o enantiômero (*R*) (azul). Fonte: Elaborada pela autora.

A simulação computacional é realizada em duas etapas. A primeira envolve a busca por diferentes modos de ligação entre o ligante e o sítio ativo da proteína, considerando-se diversas conformações do ligante em questão. A segunda etapa envolve uma avaliação da afinidade de cada conformação usando uma função *score*, que representa a fidelidade no alinhamento realizado. Os valores de *scores* médios, considerando 100 corridas, encontrados, Tabela 4, foram utilizados para prever o quanto a interação com a proteína foi significativa. A fim de ter um parâmetro base, realizou-se o mesmo docking molecular para o ligante original da proteína (NV4), para que posteriormente a análise dos *scores* fosse mais efetiva.

Tabela 4 – **Scores médios obtidos no Docking molecular.**

Ligante	Scores (médio)
NV4	89,33
Enantiômero (<i>R</i>)	61,71
Enantiômero (<i>S</i>)	82,41

Como se pode observar a interação ligante-proteína ocorre para os dois enantiômeros, entretanto, quando comparamos os valores dos *scores* vemos que há uma melhor interação entre o enantiômero (*S*), tendo esse enantiômero um *score* médio mais próximo do *score* médio do NV4 (que é considerada a interação padrão positiva). Entretanto, o enantiômero (*R*) também faz interações com a proteína, mas, de acordo com *score* obtido, de maneira não tão efetiva, o que sugere que as atividades biológicas *in vitro* tendem a serem distintas para os dois enantiômeros

estudados. Esses resultados nos comprovam que a configuração tem uma relação direta com a interação com a proteína, sendo possível dois enantiômeros terem atividades completamente distintas.

A provável causa para a interação ocorrer nos dois enantiômeros, apesar dos quatro anéis fusionados estarem em posições invertidas, é o fato dos dois enantiômeros possuírem o anel 3,4,5-trimetoxifenil, que, ao que aparenta, é o grupo farmacofórico, principal na interação com a proteína.

3.5.2 Acridinonas pretendidas

Foi realizado um Docking molecular para cada acridinona pretendida, afim de predizer se haveria ou não uma possível interação entre as acridinonas e a proteína. Utilizou-se a Tubulina (PDB ID: 5JCB) e pra cada acridinona foi obtido o resultado de *score* médio das 10 melhores poses, de maneira isolada quando havia enantiômeros. O *score* é a função de pontuação utilizada, com ele é possível supor que quando mais alto o seu valor, melhor será a interação receptor/ligante. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – *Scores* obtidos por docking molecular para todos os produtos pretendidos.

Produto	<i>Scores</i> (médio)	Produto	<i>Scores</i> (médio)
1	41,38	17 S	82,96
2	63,98	18 R	72,46
3	54,04	18 S	90,41
4	52,60	19 R	61,78
5 R	79,75	19 S	79,28
5 S	77,90	20 R	49,08
6 R	73,91	20 S	72,20
6 S	75,15	21 R	74,66
7 R	62,45	21 S	73,06
7 S	58,94	22 R	71,23
8 R	35,55	22 S	69,46
8 S	73,61	23 R	61,85
9 R	39,68	23 S	41,67
9 S	77,46	24 R	47,00
10 R	37,39	24 S	45,56
10 S	70,13	25 R	39,81
11 R	37,72	25 S	34,07
11 S	71,19	26 R	51,87
12 R	52,74	26 S	39,61
12 S	64,97	27 R	40,48
13 R	72,58	27 S	66,38
13 S	60,22	28 R	61,27
14 R	75,66	28 S	61,45
14 S	63,23	29 R	34,29
15 R	58,24	29 S	41,53
15 S	79,15	30 R	41,43
16 R	52,41	30 S	44,64
16 S	55,15	NV4	89,68
17 R	69,41		

Os resultados do *score* médios nos mostram que boa parte das estruturas testadas conseguem realizar interações com a Tubulina, sendo algumas interações de valores comparáveis aos valores do padrão positivo (NV4). Das estruturas testadas temos 25 (cerca de 41,7%) com valores de *scores* menores que 60 (número que consideraremos mínimo desejável). Temos na estrutura **18** (figura 26, página 28) enantiômero (*S*) o maior *score* (90,41) sendo maior inclusive que o ligante NV4 (89,68) o que nos indica que ele possui uma interação muito eficiente.

Dos 30 compostos testados 8 utilizam como reagente o 6-aminouracil (**23-30**). Cada um desses 8 compostos foram testados na forma de enantiômeros e apenas 4 deles possuem um *score* médio maiores que 60. Tal fato nos mostra que essa série não seria ideal para interação com a Tubulina, pois apenas o composto **28** possui uma interação satisfatória para ambos enantiômeros, entretanto, de acordo com Evdokimov et al. (2011), compostos com estruturas semelhantes a

essas apresentam atividades anticâncer através do alvo Topoisomerase, o que faz com que novos estudos entrem em perspectiva.

Existe uma característica comum a todos os enantiômeros testados. Quando analisamos as duas melhores poses de enantiômeros do mesmo composto temos uma sobreposição muito boa entre o anel fenílico proveniente do aldeído, isso nos comprova que essa parte da molécula interage de forma mais rígida, não variando de conformação. Entretanto, quando analisamos os anéis fusionado vemos que eles sempre se encontram de formas invertidas (como visto na figura 42, página 47), afim de que o anel fenílico fique na mesma posição, isso nos mostra que esse grupo é o principal na interação com a proteína (grupo farmacofórico).

Um fato que deve ser salientado é que para mais de 60% dos compostos que apresentam centro assimétrico, o enantiômero (*S*) é quem possui a interação mais favorável, esse padrão é o mesmo que encontramos para o composto LDQMC-014, cujos os resultados teóricos foram corroborados pelos testes *in vitro* (seção 3.6.1). Contudo, compostos que apresentam *scores* satisfatórios para os dois enantiômeros são os ideais, pois uma vez que a metodologia sintética utilizada gera um produto na forma de mistura racêmica, o isolamento de enantiômeros encarece o processo. Dentre os compostos analisados que possuem melhores resultados para os dois enantiômeros pode-se destacar os produtos **5**, **6**, **18** e **21**, cujos dois enantiômeros possuem *scores* maiores que 70, nos indicando que são os melhores indicados para a síntese e avaliação biológica na forma de mistura racêmica.

Para os enantiômeros dos compostos **5**, **7**, **13**, **14**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25** e **26** (estruturas nas páginas 27 e 28) temos um resultado diferente do padrão, pois nesses casos temos o enantiômero (*R*) como sendo o de maior interação com a proteína. Os valores possuem uma diferença de no máximo 20 unidades.

Foi realizada uma comparação entre os enantiômeros dos compostos **5**, **6** e **7**, uma vez que eles apresentam os 4 anéis fusionados com os mesmos átomos, afim de determinar se existem diferenças na interação com a proteína que explique o motivo que faz com que para o **6** o enantiômero (*S*) realiza melhores interações, enquanto para o **5** e **7** é o enantiômero (*R*). A figura 46 nos mostra que os 4 anéis fusionados estão com uma boa sobreposição. Dessa forma, podemos concluir que a maior interação para o enantiômero (*R*) nos composto **5** e **7** pode ser resultante de um número de poses insuficientes para ter se chegar a um resultado distinto, ou algumas interações específicas. No enantiômero **5** (*R*) existe uma interações π -sulfur ocorrendo entre o indazol e o resíduo MET B:259 que não ocorre para o (*S*); enquanto para o enantiômero **7** (*R*) existe duas interação π -alquil ocorrendo entre o indazol e os resíduos LYS B:352 e ALA B:316, enquanto no enantiômero (*S*) só há interação π -alquil entre o indazol e o resíduo LEU B:248.

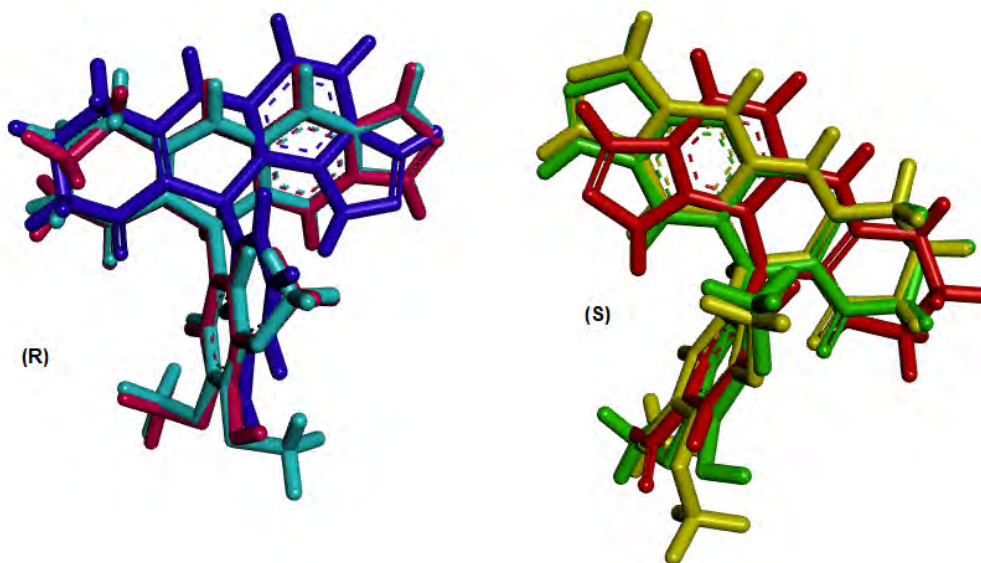


Figura 46 – Comparação **5**, **6** e **7**. Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: **5**: ciano e amarelo; **6**: rosa e verde; **7**: azul escuro e vermelho.

Para os compostos **13** e **14** os melhores *scores* são para o enantiômero (*R*), esse fato pode ser devido a necessidade de acomodação do grupo etil gerar mais interações para esse enantiômero. Para o **13** (*R*) temos duas interações π -sulfur entre o anel naftalênico e a MET B:259, duas interações π -alquil entre o anel naftalênico e ALA B:316 e LYS B:352 e uma π -sigma entre o anel naftalênico e ASN B:358, enquanto para o **13** (*S*) temos apenas três interações π -alquil entre o anel naftalênico e os resíduos de aminoácidos ALA B:250, LYS B:254, LEU B:248. Para o **14** (*R*) temos duas interações π -sulfur entre o anel naftalênico e a MET B:259, uma interação π -alquil entre o anel naftalênico e ALA B:316 e uma π -sigma entre o anel naftalênico e ASN B:258, enquanto para o **14** (*S*) temos apenas três interações π -alquil entre o anel naftalênico e os resíduos de aminoácidos ALA B:250, LYS B:254, LEU B:248.

Para os compostos **21** e **22**, as estruturas dos anéis fusionados é a mesma. O *score* maior para os enantiômeros (*R*) é explicada pelo fato de que para esse enantiômero, nos dois compostos, haver uma interação π -sulfur entre o anel aromático e a MET B:259, além de três interações ligação carbono-hidrogênio do grupo metilenodioxo e os resíduos ASN B:258, ASN B:350 e VAL B:315 e uma interação ligação de hidrogênio convencional entre a carbonila e ASP B:251.

Para os compostos **23** a **30** é possível observar uma diferença na posição em comparação com os compostos de **1** a **22** e LDQMC-014 como exemplificado na figura 47 e 48 para os compostos **23-26**. Quando comparamos os produtos com o composto LDQMC-014 vemos que o anel pirimidinona é sobreposto a ciclohexanona e não ao anel naftalênico como esperado. Tal fato pode ser explicado pelo fato de que em um dos lados do sítio ativo há um bolsão hidrofílico, e como o anel pirimidinona possui heteroátomos, há uma preferência desse anel ficar do mesmo lado do bolsão hidrofílico. Tais mudanças fazem com que as interações sejam distintas do padrão observado até então, logo é explicável o maior *score* para o enantiômero (*R*), além de um *score*

médio mais baixo que o *score* médio geral (60,20).

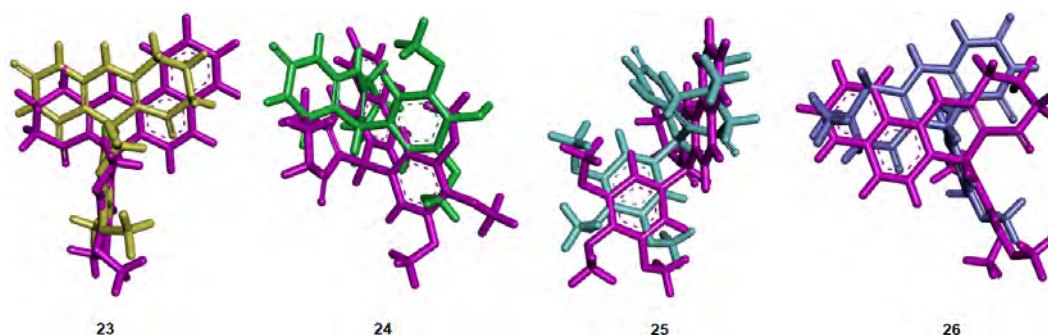


Figura 47 – Comparação do enantiômeros (*R*). Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: LDQMC-014: rosa; **23**: amarelo; **24**: verde; **25**: ciano; **26**: lilás.

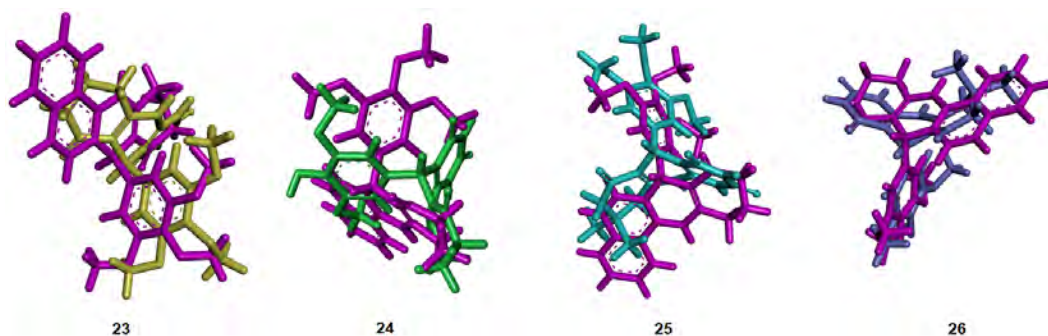


Figura 48 – Comparação do enantiômeros (*S*). Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: LDQMC-014: rosa; **23**: amarelo; **24**: verde; **25**: ciano; **26**: lilás.

3.6 Avaliação biológica

3.6.1 Enantiômeros do LDQMC-014

Os enantiômeros (*S*) e (*R*) foram avaliados nos ensaios *wound healing*, citotoxicidade contra a linhagem MDA-MB-231, polimerização da tubulina e progressão do ciclo celular. A mistura racêmica também foi avaliada paralelamente em todos os ensaios, e os resultados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação biológica do composto LDQMC-014

Composto	IC ₅₀ (μM)	
	Citotoxicidade (MDA-MB-231)	Polimerização de Tubulina
Mistura racêmica	0,12±0,02	1,35±0,06
Enantiômero <i>S</i>	0,013±0,003	0,78±0,03
Enantiômero <i>R</i>	6±2	Inativo

Nota: Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de dois ensaios independentes em duplicata.

No ensaio de migração celular de *wound healing*, o enantiômero (*S*) e a mistura racêmica inibiram a migração celular em 90% e 80%, respectivamente, enquanto o enantiômero (*R*) não apresentou nenhum efeito em relação ao controle negativo. O ensaio de polimerização da tubulina foi realizado em 5 concentrações para cada composto (25 – 0,3 μM , diluição 1:2). A mistura apresentou IC_{50} de 1,35 μM . O enantiômero (*S*) apresentou IC_{50} de 0,78 μM enquanto o (*R*) não apresentou atividade (figura 49), sendo, portanto, o enantiômero (*S*) o eutômetro para a atividade moduladora de Tubulina. Vale ressaltar que o enantiômero (*S*) foi cerca de 2 vezes mais potente que mistura, de acordo com o esperado quando temos a presença de um distômero em uma mistura racêmica.

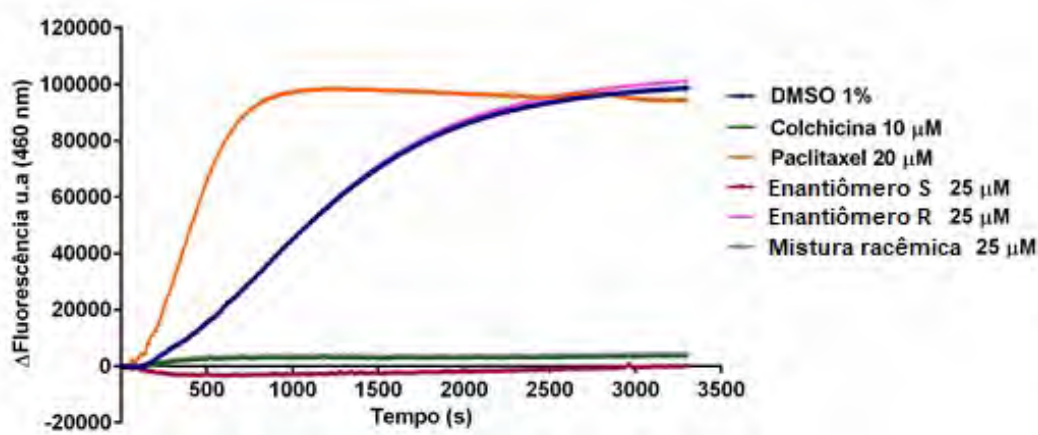


Figura 49 – Polimerização de Tubulina. Fonte: Magalhaes (2019).

Os resultados de inibição da polimerização da tubulina corroboram os estudos de modelagem molecular. As poses geradas para o enantiômero (*S*) apresentaram *score* mais favorável. Este resultado mostra a importância da integração de técnicas *in silico* e *in vitro*.

Nos ensaios de citotoxicidade, a mistura racêmica apresentou CC_{50} de 0,12 μM , novamente de acordo com os resultados anteriores (MAGALHAES et al., 2016). O enantiômero (*S*) apresentou CC_{50} de 0,013 μM enquanto o enantiômero (*R*) apresentou CC_{50} de 6 μM . A potência do enantiômero *S* foi aumentada em 10 vezes em relação à mistura racêmica, muito além do esperado (duas vezes, de acordo com Wermuth (2008)). Para a nossa surpresa, o enantiômero (*R*) apresentou atividade citotóxica 50 vezes menor que a mistura, sendo inativo como inibidor de polimerização de Tubulina. Estes resultados indicam que os compostos podem atuar em um segundo alvo molecular, sendo a identificação desse segundo alvo uma perspectiva para trabalhos futuros.

Para melhor compreender o efeito dos enantiômeros na tubulina intracelular, o efeito dos compostos sobre a progressão do ciclo celular foi estudado por meio da quantificação do conteúdo de DNA das células tratadas. Como controles positivos de perturbação do ciclo celular foram utilizadas a Colchicina, que leva a um acúmulo de células na fase G_2/M e a Doxorubicina, que leva a um acúmulo de células na fase *S*, devido à inibição da enzima topoisomerase II.

Podemos observar (figura 50) que a mistura e o enantiômero (*S*) apresentam um perfil similar ao obtido para a Colchicina, causando um acúmulo de células na fase G_2/M devido a perturbação do fuso mitótico. Observamos também um aumento no número de células tetraploides ($4n$) pois, devido à natureza tumoral das células e à comportamentos anômalos inerentes de culturas *in vitro*, algumas células continuam a multiplicar seu material genético mesmo em condições adversas.

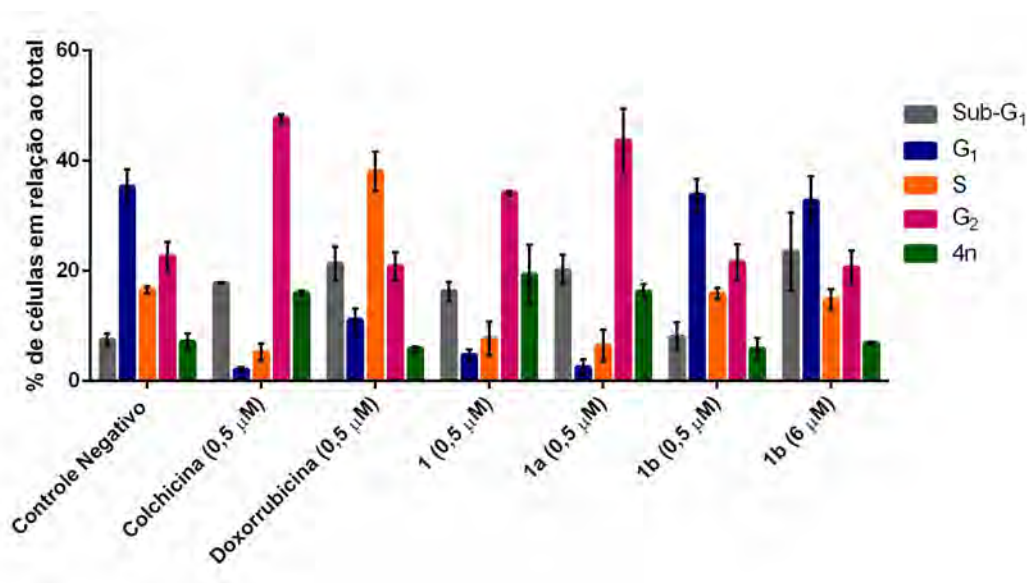


Figura 50 – Análise do ciclo celular. Fonte: Magalhaes (2019).

Nota: Distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular para o controle negativo (DMSO 0.1%) e após 48 h de tratamento com Colchicina, Doxorrubicina, 1 (mistura racêmica), 1a (enantiômero *S*) e 1b (enantiômero *R*).

Uma característica comum a todos os agentes citotóxicos é o aumento do número de células Sub-G₁, ou seja, células mortas ou apoptóticas. Podemos observar esse efeito nas células tratadas com Doxorrubicina, Colchicina, mistura e enantiômero (*S*). O tratamento com o enantiômero (*R*) em concentrações subtóxicas não causou nenhum efeito significativo em relação ao controle negativo. No entanto, o tratamento com o enantiômero (*R*) a 6 μM levou à um aumento no número de células em Sub-G₁, confirmando sua natureza citotóxica. Contudo, o perfil de distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular não sofreu alterações em relação ao controle. O que indica que seu mecanismo citotóxico não está relacionado a nenhuma via envolvida na progressão do ciclo celular e confirma que o enantiômero (*R*) não se liga à Tubulina..

Tais resultados corroboram o perfil teórico de interação obtidos por docking molecular, onde o enantiômero (*S*) é o mais ativo. Novas perspectivas de trabalho surgiram, buscando-se investigar o mecanismo de ação que gera o perfil citotóxico do enantiômero (*R*), além de confirmar que a metodologia utilizada na modelagem molecular nos fornece dados confiáveis.

3.6.2 Acridinonas

Na triagem inicial, seis compostos da série **5**, **6**, **7**, **21** e **22**, foram avaliados em 5 concentrações, partindo de 50 μM . Os três compostos que apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem tumoral MDA-MB-231 foram selecionados para avaliação em ensaios posteriores (**6**, **21** e **22**). Não foi possível determinar o CC_{50} dos compostos, devido a uma inviabilidade dos padrões utilizados.

O ensaio celular *Wound Healing* é realizado apenas como forma de uma avaliação qualitativa da migração celular, uma vez que há visualização do perfil inibidor da migração celular, é realizado uma avaliação quantitativa que se baseia na medição das áreas da fenda, no início e ao finalizar o experimento, utilizando-se o software *Image J*, dessa forma, os valores encontrados foram utilizados para determinação da porcentagem de inibição da migração celular.

A migração celular tem papel em processos celulares essenciais para a manutenção e desenvolvimento do tumor: a angiogênese e a metástase. Estes processos requerem a reorganização do citoesqueleto, a remodelação da matriz celular, e também com a modulação da adesão célula-célula.

O ensaio consiste no cultivo de uma monocamada de células tumorais à qual será infligida fenda. O fechamento dessa, devido à migração celular, é avaliado por meio de fotomicrografias. Nesses ensaios, foram estudados os compostos **6**, **21** e **22** em duas concentrações, a 10 e 5 μM e um padrão positivo (Colchicina 1 μM). A atividade inibitória dos compostos foi determinada e se encontram na tabela 7. Uma vez que o produto **21** foi o que obteve a maior média da porcentagem na inibição da migração, a fotomicrografia referente ao produto **21** se encontra na figura 51.

Tabela 7 – Média das porcentagens da inibição da migração.

Produto	Média da porcentagem de inibição (%)
6 10 μM	64,3 \pm 4,1
6 5 μM	51,3 \pm 1,2
21 10 μM	69,1 \pm 1,25
21 5 μM	44,4 \pm 11,3
22 10 μM	58,9 \pm 3,5
22 5 μM	43,2 \pm 0,9
Colchicina 1 μM	90,7 \pm 0,45

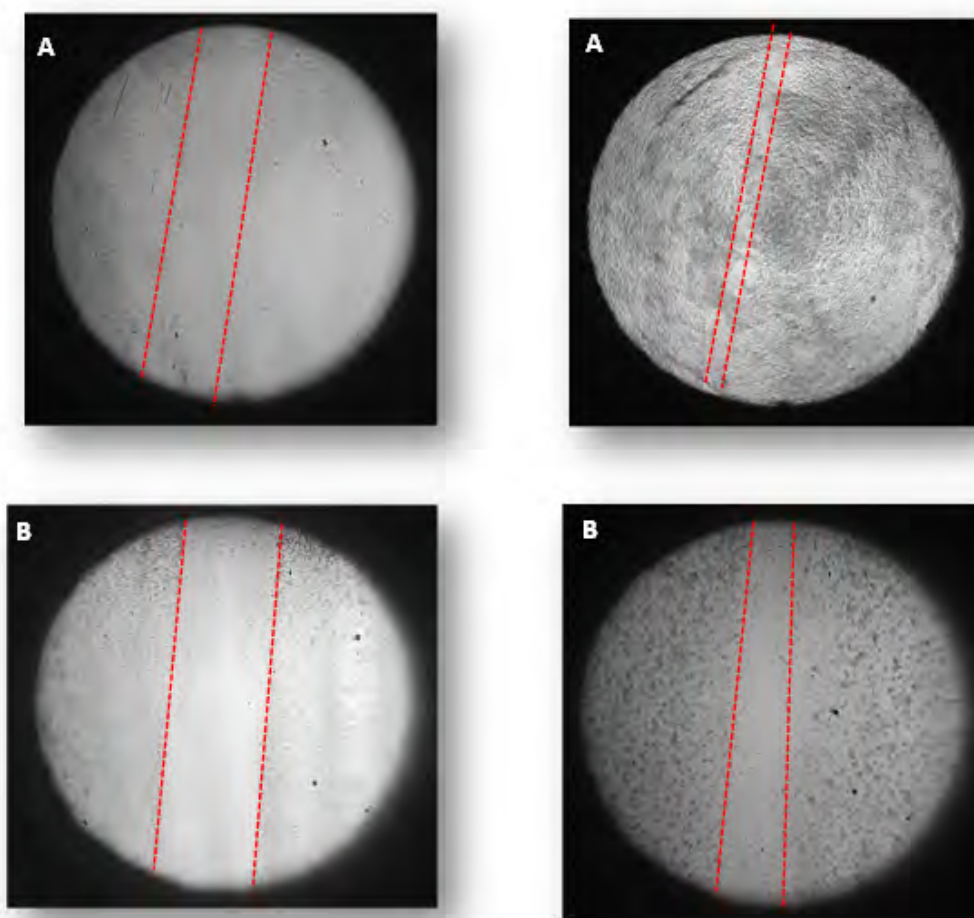


Figura 51 – Fotomicrografia da migração celular do produto **21**. Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A) branco a 0h e 24h após incubação e B) **20** - 10 μ M em 0h e 24h após incubação.

Nesse ensaio podemos comprovar que os produtos **6**, **21** e **22** foram eficiente na inibição da migração celular, uma vez que após o tempo de 24 horas, não houve fechamento da fenda na monocamada celular. Entretanto a sua porcentagem de inibição de migração celular é menor do que o padrão positivo, e menor que a porcentagem encontrada para o produto LDQMC-014 (80%).

A Figura 52 mostra que os produtos **6**, **21** e **22** apresentam similaridades estruturais tanto com o composto *hit* LDQMC-014, quanto com a Podofilotoxina. O anel metoxilado é é matido nos novos produtos, e está presente também no protótipo e na Podofilotoxina. A parte da estrutura em azul é idêntica no *hit* e nos produtos. Já o anel de 5 membros (em vermelho) presente na Podofilotoxina na forma de dioxo é conservado nos produtos **21** e **22**, enquanto no produto **6** a quantidade de carbonos do anel é mantida, porém é uma anel pirazol. Podemos concluir, portanto, que modificações estruturais no protótipo pode gerar novos produtos com atividade antimigratória, entretanto, não superior ao protótipo.

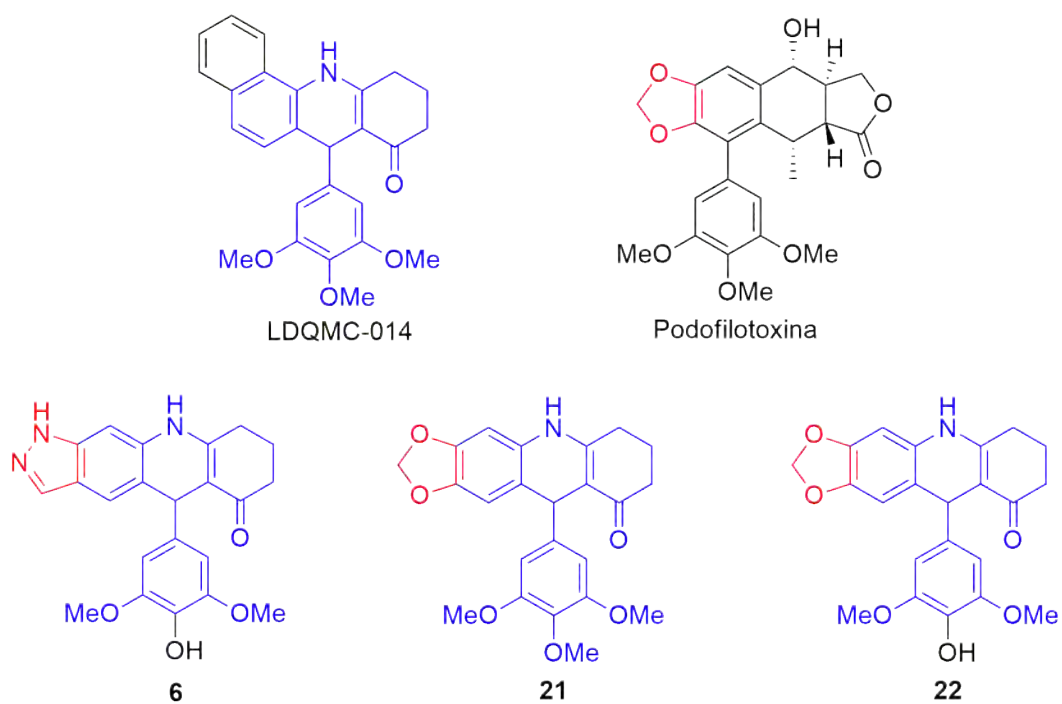


Figura 52 – Similaridades estruturais dos compostos LDQMC-014, Podofiloxina, **6**, **21** e **22**.
 Fonte: Elaborada pela autora.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese das Acridinonas

O planejamento, síntese, purificação e caracterização das moléculas obtidas neste trabalho foram executados no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM), situado no Instituto da Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As análises espectroscópicas para confirmação dos produtos obtidos foram realizadas aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400, operando a 500 MHz e 400 MHz para ^1H -RMN COSY, HMBC e HSQC, e a 125 MHz e à 100 MHz para ^{13}C -RMN. O equipamento encontra-se situado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no Instituto de Química. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 e DMSO contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

Os reagentes utilizados foram adquiridos dos fornecedores Sigma-Aldrich e VETEC e utilizados sem purificação adicional.

4.1.1 Síntese Clássica de Hantzsch

Misturou-se cloreto de amônio (1 mmol), a dicetona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona; 1,3-ciclohexanodiona) (2,2mmol), o aldeído (3,4,5-trimetoxibenzaldeído; syringaldeído) (1mmol), 3 mL de etanol absoluto e um agitador magnético em um tubo reacional. Levou-se a uma placa de aquecimento e deixou-se em refluxo por 48 horas. O esquema reacional pode ser visto na Figura 53.

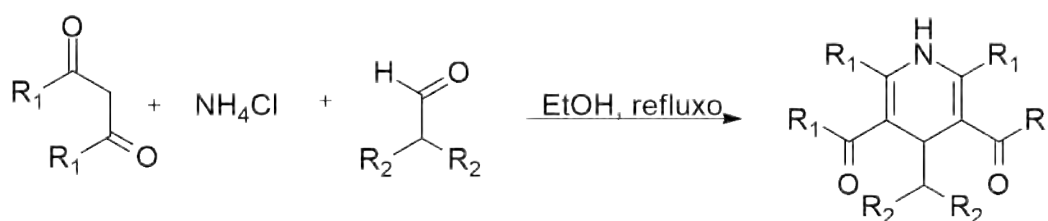
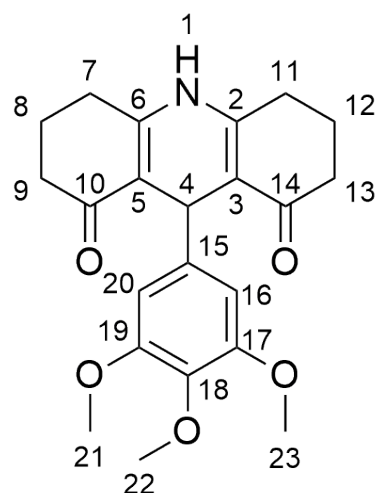


Figura 53 – Esquema reacional da síntese clássica. Fonte: Elaborada pela autora.

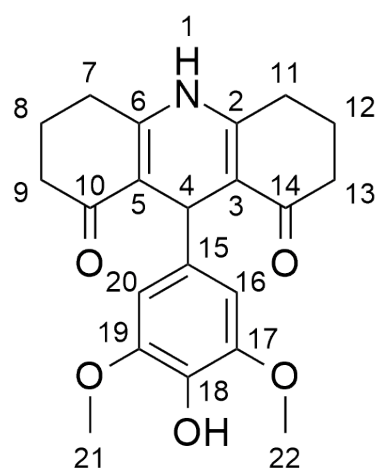
Após o tempo reacional realizou-se uma cromatografia de camada delgada para confirmar que um produto foi formado, em seguida a reação foi resfriada até a temperatura ambiente e levada ao freezer por 72 horas. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavada com, aproximadamente, 10 mL de etanol gelado. Realizou-se uma recristalização em etanol e o precipitado formado for filtrado a vácuo e lavado com etanol gelado (aproximadamente 10 mL). Promoveu-se a secagem do produto, deixando-o exposto ao ar por aproximadamente 24 horas.

4.1.1.1 9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2H,5H)-diona



O produto **1** foi obtido como um sólido de cor creme e com rendimento de 47,8%. Ponto de fusão na faixa de 176-180°C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 1.99-2.10 (H₈ e H₁₂, m); 2.32-2.38 (H_{a7} e H_{a11}, m); 2.41-2.47 (H_{e7} e H_{e11}, dt, *J* = 20Hz); 2.55-2.62 (H_{9a} e H_{13a}, m); 2.65-2.70 (H_{9b} e H_{13b}, dt, *J* = 20Hz); 3.78 (H₂₂, s); 3.84 (H₂₁ e H₂₃, s); 4.81 (H₄, s); 6.54 (H₁₆ e H₂₀, s). ¹³C-RMN: 20.36 (C₈ e C₁₂); 27.19 (C₇ e C₁₁); 31.45 (C₄); 37.00 (C₉ e C₁₃); 56.18 (C₂₁ e C₂₃); 60.70 (CH₂₂); 105.67 (C₂₂ e C₂₂); 116.74 (C₅ e C₁₄); 136.65 (C₁₈); 139.90 (C₁₅); 152.83 (C₂ e C₆); 164.07 (C₁₇ e C₁₉); 196.71 (C₁₀ e C₁₄). Espectros associados: anexos A.1 (página 82) e A.2 (página 83).

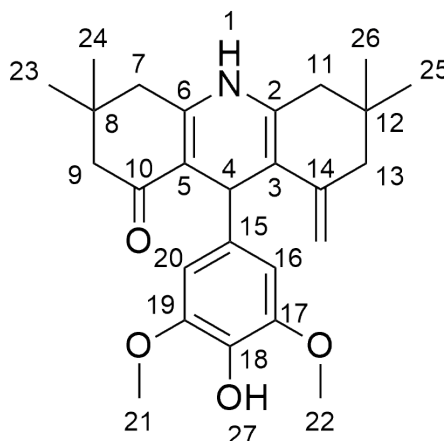
4.1.1.2 9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2H,5H)-diona



O produto **2** foi obtido como um sólido de cor branca e com rendimento de 53,6%. Ponto de fusão na faixa de 216-220°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): 1.87-1.96 (H₈ e H₁₂, m); 2.29-2.32 (H₇ e H₁₁, t, *J* = 5Hz); 2.56-2.62 (H_{a9} e H_{a13}, m, *J* = 10Hz); 2.66-2.72 (H_{e9} e H_{e13}, dt, *J* = 10Hz); 3.69 (H₂₁ e H₂₂, s); 4.54 (H₄, s); 6.39 (H₁₆ e H₂₀, s); 8.17 (H₁, s). ¹³C-RMN: 20.43 (C₈ e C₁₂); 26.93 (C₇ e C₁₁); 30.62 (C₄); 36.97 (C₉ e C₁₃); 56.40 (C₂₁ e C₂₂); 105.89 (C₁₆ e C₂₀);

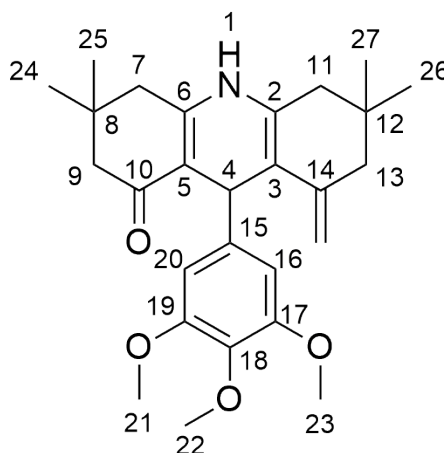
116.06 (C₃ e C₅); 134.66 (C₁₈); 135.04 (C₁₅); 147.19 (C₂ e C₆); 165.19 (C₁₇ e C₁₉); 196.94 (C₁₀ e C₁₄). Espectros associados: anexos A.3 (página 84) e A.4 (página 85).

4.1.1.3 9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2H,5H)-diona



O produto **3** foi obtido como um sólido de cor creme e com rendimento de 27,8%. Ponto de fusão na faixa de 218-222°C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃-d₃): 1.04 (H₂₃ e H₂₅, s); 1.13 (H₂₄ e H₂₆, s); 2.20-2.28 (H₉ e H₁₃, q, *J* = 25Hz); 2.44-2.52 (H₇ e H₁₁, q, *J* = 25Hz); 3.85 (H₂₁ e H₂₂, s); 4.70 (H₄, s); 5.39 (H₂₇, s); 6.54 (H₁₆ e H₂₀, s). ¹³C-RMN: 27.11 (C₂₃ e C₂₅); 29.43 (C₂₄ e C₂₆); 31.60 (C₄); 32.19 (C₈ e C₁₂); 40.90 (C₇ e C₁₁); 50.74 (C₉ e C₁₃); 56.33 (C₂₁ e C₂₂); 105.47 (C₁₆ e C₂₀); 115.70 (C₃ e C₅); 133.42 (C₁₈); 135.42 (C₁₅); 146.61 (C₂ e C₆); 162.18 (C₁₇ e C₁₉); 196.53 (C₁₀ e C₁₄). Espectros associados: anexos A.5 (página 86) e A.6 (página 87).

4.1.1.4 9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,3,6,6-tetrametil-3,4,6,7,9,10-hexaidroacridino-1,8(2H,5H)-diona



O produto **4** foi obtido como um sólido de cor branca e com rendimento de 23,2%. Ponto de fusão na faixa de 208-212°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 0.94 (H₂₄ e H₂₆, s); 1.04 (H₂₅

e H₂₇, s); 2.11-2.15 (H_{a9} e H_{a13}, d, *J* = 20Hz); 2.27-2.30 (H_{e9} e H_{e13}, d, *J* = 15Hz); 2.55-2.56 (H₇ e H₁₁, d, *J* = 5Hz); 3.60 (H₂₂, s); 3.69 (H₂₁ e H₂₃, s); 4.49 (H₄, s); 6.41 (H₁₆ e H₂₀, s). ¹³C-RMN: 26.81 (C₂₃ e C₂₅); 29.16 (C₂₄ e C₂₆); 31.63 (C₄); 32.34 (C₈ e C₁₂); 40.20 (C₇ e C₁₁); 50.49 (C₉ e C₁₃); 56.21 (C₂₁ e C₂₃); 60.36 (C₂₂); 105.81 (C₁₆ e C₂₀); 114.70 ((C₃ e C₅); 136.35 (C₁₈); 140.36 (C₁₅); 152.80 (C₂ e C₆); 163.50 (C₁₇ e C₁₉); 196.66 (C₁₀ e C₁₄). Espectros associados: anexos A.7 (página 88) e A.8 (página 89).

4.1.2 Síntese Modificada

Visto que a reação clássica de Hantzsch utiliza como reagentes de partida cloreto de amônia, um aldeído e um dicarbonilado, para gerar um produto simétrico, foi proposto uma modificação baseando-se na metodologia de Tratat, Giorgi-Renault e Husson (2002), onde foram utilizados como reagentes de partida 1 mmol do composto dicarbonilado cíclico (1,3-ciclohexanodiona; 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona; 1,3-indanodiona; 2-hidroxi-6-metil-2-pirone) 1 mmol do aldeído (3,4,5-trimetoxibenzaldeído; 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído; 3-nitrobenzaldeído), 1 mmol de um nucleófilo (α-naftilamina; 6-aminoimidazole; α-naftol; 3,4,5-trimetoxianilina; 3,4-dimetoxianilina; N-etilnaftilamina; 3,4-(metilenedioxi)anilina), 3 mL de solvente (isopropanol ou etanol) e um agitador magnético em um tubo reacional. Levou-se a uma placa de aquecimento e deixou-se em refluxo por 24 a 48 horas. O esquema reacional pode ser visto na Figura 54.

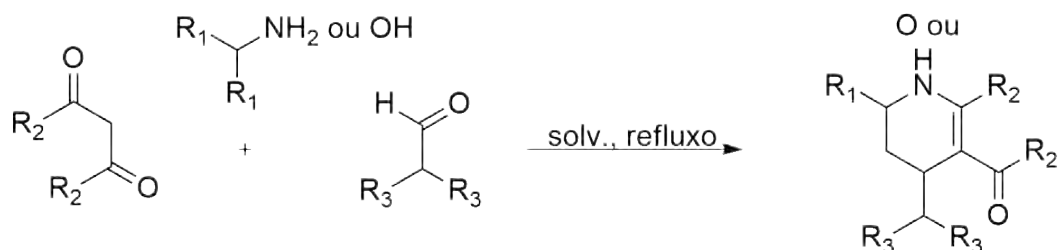
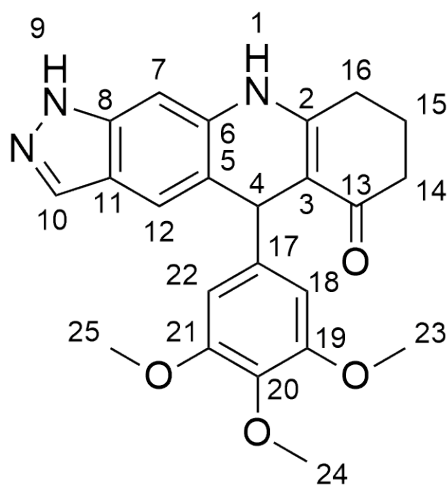


Figura 54 – Esquema reacional da síntese modificada. Fonte: Elaborada pela autora.

Após o tempo reacional realizou-se uma cromatografia de camada delgada para confirmar que um produto foi formado, em seguida a reação foi resfriada até a temperatura ambiente e o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com, aproximadamente, 10 mL do solvente utilizado gelado. Realizou-se uma recristalização em etanol e o precipitado formado for filtrado a vácuo e lavado com etanol gelado (aproximadamente 10 mL). Promoveu-se a secagem do produto, deixando-o exposto ao ar por aproximadamente 24 horas.

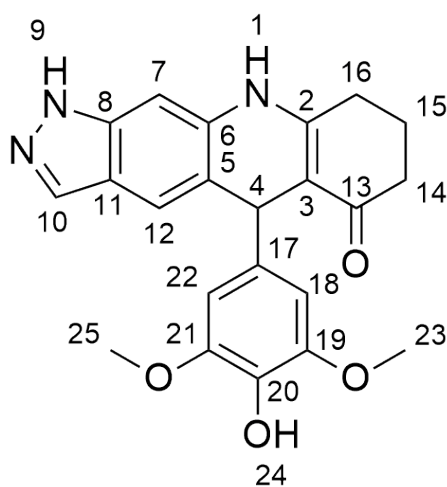
A metodologia descrita foi utilizada para tentar-se obter 26 produtos, contudo, apenas 10 foram obtidos.

4.1.2.1 5-(3,4,5-trimetoxifenil)-7,8,9,10-tetraidro-1H-pirazol[4,3-b]acridin-6(5H)-ona



O produto **5** foi obtido como um sólido de cor branca e com rendimento de 75,4%. Ponto de fusão na faixa de 273-277°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆: 1.90-1.98 (H₁₅, dl, *J* = 40Hz); 2.26 (H₁₆, s); 2.63-2.67 (H₁₄, m); 3.53 (H₂₄, s); 3.66 (H₂₃ e H₂₅, s); 5.48 (H₄, s); 6.71 (H₁₈ e H₂₂, s); 6.87 (H₇, s); 7.50 (H₁₂, s); 7.93 (H₁₀, s); 9.68 (H₁, s); 12.98 (H₉, s). ¹³C-RMN: 21.65 (C₁₅); 27.53 (C₁₆); 35.92 (C₄); 37.28 (C₁₄); 56.22 (C₂₃ e C₂₅); 60.25 (C₂₄); 105.30 (C₁₈ e C₂₂); 106.52 (C₃); 108.10 (C₁₁); 111.84 (C₇); 119.62 (C₁₂); 120.21 (C₅); 134.44 (C₂); 134.47 (C₁₀); 136.19 (C₂₀); 139.10 (C₁₇); 143.27 (C₈); 152.85 (C₁₉ e C₂₁); 153.97 (C₆); 194.05 (C₁₃). Espectros associados: anexos A.9 (página 90) e A.10 (página 91).

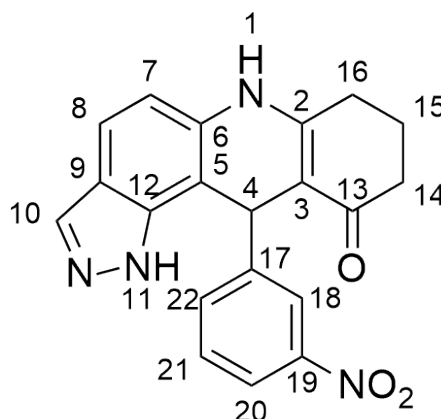
4.1.2.2 5-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-7,8,9,10-tetraidro-1H-pirazol[4,3-b]acridin-6(5H)-ona



O produto **6** foi obtido como um sólido de cor cinza e com rendimento de 66,6%. Ponto de degradação na faixa de 289-293°C. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆: 1.90-1.98 (H₁₅, dl, *J* = 32Hz); 2.27 (H₁₆, sl); 2.66 (H₁₄, sl); 3.65 (H₂₃ e H₂₅, s); 5.44 (H₄, s); 6.66 (H₁₈ e H₂₂, s); 6.87 (H₇, s); 7.50 (H₁₂, s); 7.93 (H₁₀, s); 8.06 (H₂₄, s); 9.65 (H₁, s); 12.95 (H₉, s). ¹³C-RMN: 21.68

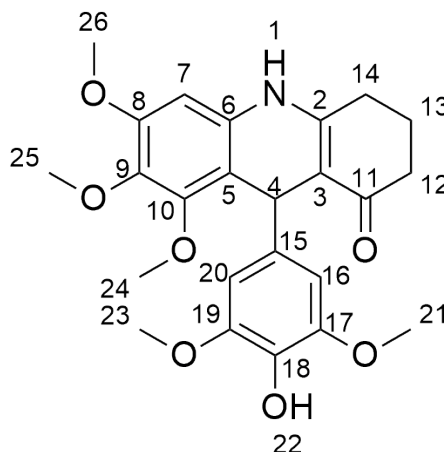
(C₁₅); 27.55 (C₁₆); 35.52 (C₄); 37.33 (C₁₄); 56.44 (C₂₃ e C₂₅); 105.72 (C₁₈ e C₂₂); 106.98 (C₃); 108.41 (C₁₁); 111.81 (C₇); 119.42 (C₁₂); 120.17 (C₅); 134.35 (C₂); 134.40 (C₁₀); 137.95 (C₂₀); 139.12 (C₁₇); 147.93 (C₈); 153.72 (C₆); 194.09 (C₁₃). Espectros associados: anexos A.11 (página 92) e A.12 (página 93).

4.1.2.3 11-(3-nitrofenil)-7,8,9,11-tetraidro-1H-pirazol[3,4-a]acridin-10(6H)-ona



O produto **7** foi obtido como um sólido de cor amarela e com rendimento de 79,9%. Ponto de degradação na faixa de 288-292°C. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): 1.82-1.95 (H₁₅, dl); 2.24-2.33 (H₁₆, m); 2.65 (H₁₄, sl); 5.73 (H₄, s); 6.92-6.94 (H₇, d, *J* = 8Hz); 7.45-7.49 (H₂₁, t, *J* = 8Hz); 7.58-7.60 (H₈, d, *J* = 8Hz); 7.71-7.73 (H₂₂, d, *J* = 8Hz); 7.92-7.96 (H₁₈ e H₂₀, dl, *J* = 16Hz); 8.29 (H₁₀, s); 9.91 (H₁, s); 13.03 (H₁₁, s). ¹³C-RMN: 21.43 (C₁₅); 27.47 (C₁₆); 35.76 (C₄); 37.02 (C₁₄); 105.04 (C₃); 107.70 (C₅); 111.89 (C₇); 120.30 (C₉); 120.50 (C₈) 121.56 (C₂₂); 122.53 (C₂₀); 129.99 (C₂₁); 134.68 (C₁₈); 134.76 (C₁₀); 139.06 (C₆); 147.91 (C₁₂); 149.34 (C₁₉); 154.39 (C₁₇); 194.13 (C₁₉). Espectros associados: anexos A.13 (página 94) e A.14 (página 95).

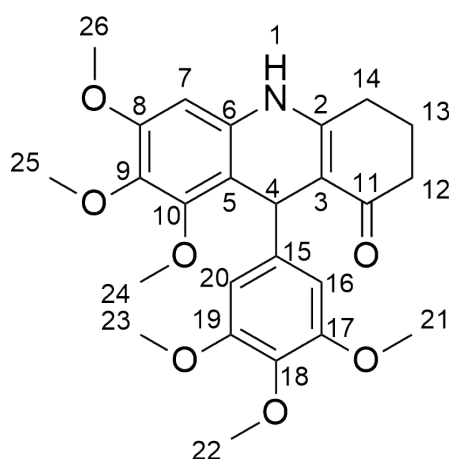
4.1.2.4 9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6,7,8-trimetoxi-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2H)-ona



O produto **8** foi obtido como um sólido de cor preto e com rendimento de 55,4%. Ponto de degradação na faixa de 103-107°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 1.81-1.91 (H₁₃, d); 2.20

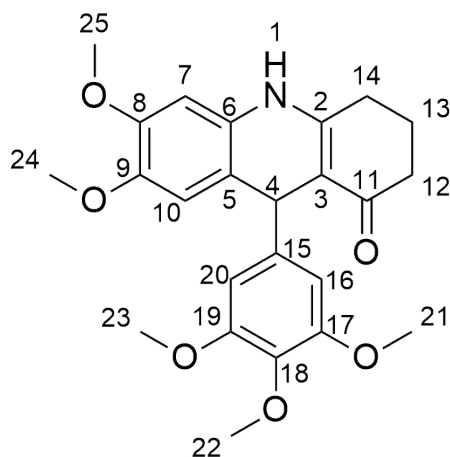
(H₁₄, sl); 2.54 (H₁₂, m); 3.59 (H₂₆, s); 3.62 (H₂₁ e H₂₃, s); 3.64 (H₂₄, s); 3.75 (H₂₅, s); 5.16 (H₄, s); 6.37 (H₁₆ e H₂₀, s); 6.40 (H₇, s); 8.05 (H₂₂, s); 9.37 (H₁, s). ¹³C-RMN: 21.50 (C₁₃); 27.42 (C₁₄); 33.66 (C₄); 37.06 (C₁₂); 56.05 (C₂₆); 56.37 (C₂₁ e C₂₃); 60.80 (C₂₄); 60.85 (C₂₅); 95.30 (C₇); 105.60 (C₁₆ e C₂₀); 108.36 (C₃); 112.04 (C₅); 133.34 (C₉); 134.16 (C₂); 137.67 (C₁₈); 138.88 (C₆); 147.83 (C₁₇ e C₁₉); 151.21 (C₁₅); 152.52 (C₁₀); 153.76 (C₈); 193.84 (C₁₁). Espectros associados: anexos A.15 (página 96) e A.16 (página 97).

4.1.2.5 6,7,8-trimetoxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2H)-ona



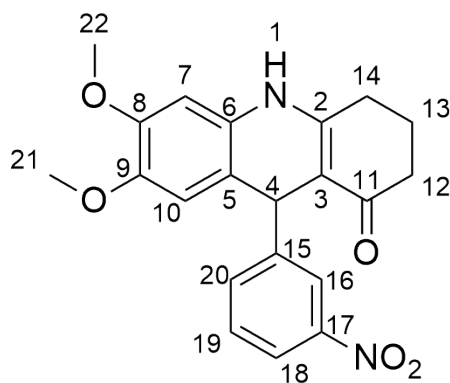
O produto **9** foi obtido como um sólido de cor branco e com rendimento de 25,4%. Ponto de fusão na faixa de 213-218°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 1.82-1.92 (H₁₃, m); 2.20-2.24 (H₁₄, t, *J* = 7.5Hz); 2.54-2.60 (H₁₂, m); 3.57 (H₂₂, s); 3.63 e 3.65 (H_{21, 23, 24} e H₂₆, s); 3.76 (H₂₅, s); 5.21 (H₄, s); 6.41 e 6.42 (H_{7, 16} e H₂₀, s); 9.40 (H₁, s). ¹³C-RMN: 21.50 (C₁₃); 27.43 (C₁₄); 34.08 (C₄); 37.23 (C₁₂); 56.07 (C₂₆); 56.12 (C₂₁ e C₂₃); 60.34 (C₂₄); 60.83 (C₂₅); 60.86 (C₂₂); 95.36 (C₇); 105.15 (C₁₆ e C₂₀); 107.97 (C₃); 111.57 (C₅); 133.36 (C₉); 136.02 (C₂); 137.67 (C₁₈); 144.15 (C₆); 151.20 (C₁₅); 152.67 (C₁₀); 152.69 (C₁₇ e C₁₇); 154.05 (C₈); 193.80 (C₁₁). Espectros associados: anexos A.17 (página 98) e A.18 (página 99).

4.1.2.6 6,7-dimetoxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2H)-ona



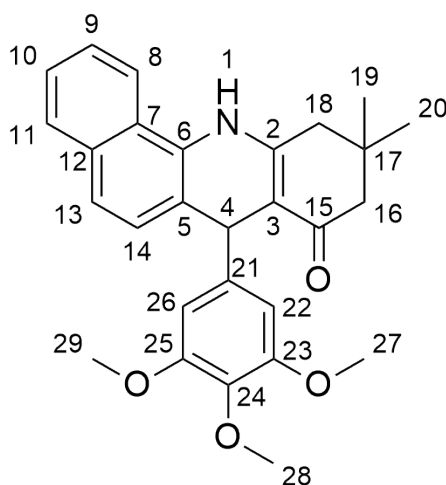
O produto **10** foi obtido como um sólido de cor cinza e com rendimento de 46,7%. Ponto de fusão na faixa de 203-207°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 1.90-1.96 (H₁₃, m); 2.22-2.24 (H₁₄, t, *J* = 5Hz); 2.56-2.65 (H₁₂, m); 3.57 (H₂₂, s); 3.66 (H₂₅, s); 3.69 (H₂₁ e H₂₃, s); 3.70 (H₂₄, s); 5.01 (H₄, s); 6.50 (H₁₆ e H₂₀, s); 6.52 (H₇, s), 6.91 (H₁₀, s) 9.33 (H₁, s). ¹³C-RMN: 21.73 (C₁₃); 27.59 (C₁₄); 37.30 (C₁₂); 39.50 (C₄); 55.86 (C₂₅); 56.17 (C₂₁ e C₂₃); 56.45 (C₂₄); 60.29 (C₂₂); 100.19 (C₇); 104.44 (C₁₆ e C₂₀); 106.60 (C₃); 113.45 (C₁₀); 117.64 (C₅); 129.87 (C₂); 135.92 (C₅); 144.76 (C₁₈); 145.32 (C₁₅); 148.20 (C₈); 152.98 (C₁₇ e C₁₉); 154.17 (C₇); 193.73 (C₁₁). Espectros associados: anexos A.19 (página 100) e A.20 (página 101).

4.1.2.7 6,7-dimetoxi-9-(3-nitrofenil)-3,4,9,10-tetraidroacridin-1(2H)-ona



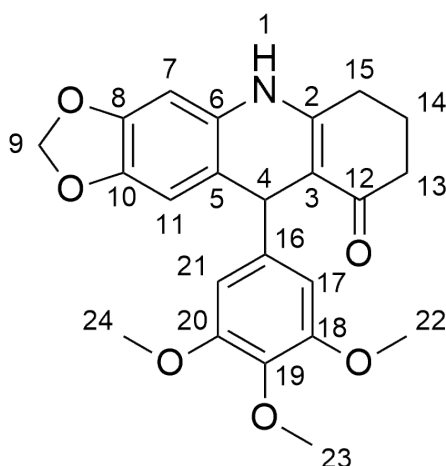
O produto **12** foi obtido como um sólido de cor laranja e com rendimento de 5,2%. Ponto de fusão na faixa de 233-237°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 1.81-1.92 (H₁₂, m); 2.15-2.24 (H₁₃, m); 2.56-2.59 (H₁₄, m); 3.61 (H₂₂, s); 3.73 (H₂₁, s); 5.25 (H₄, s); 6.60 (H₇, s); 6.80 (H₁₀, s); 6.48-7.51 (H₁₉, t, *J* = 15Hz); 7.62-7.64 (H₂₀, d, *J* = 10Hz); 7.93-7.95 (H₁₈, d, *J* = 10Hz); 8.00 (H₁₆, s); 9.50 (H₁, s). ¹³C-RMN: 21.50 (C₁₂); 27.52 (C₁₄); 37.06 (C₁₃); 39.49 (C₄); 55.83 (C₂₂); 56.38 (C₂₁); 100.36 (C₇); 106.49 (C₃); 113.42 (C₁₀); 116.11 (C₅); 121.15 (C₂₀); 121.88 (C₁₈); 130.05 (C₁₉); 130.10 (C₂); 134.44 (C₁₆); 145.63 (C₆); 148.14 (C₉); 148.59 (C₁₇); 151.23 (C₈); 154.34 (C₁₅); 193.61 (C₁₁). Espectros associados: anexos A.21 (página 102) e A.22 (página 103).

4.1.2.8 10,10-dimetil-7-(3,4,5-trimetoxifenil)-9,10,11,12-tetraidrobenzo[*c*]acridin-8(7H)-ona



O produto **19** foi obtido como um sólido de cor amarela e com rendimento de 32,2%. Ponto de fusão na faixa de 268-272°C. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): 1.11-1.12 (H₁₉ e H₂₀, d, *J* = 4Hz); 2.07-2.32 (H_{a16} e H_{e16}, d, *J* = 16Hz); 2.68-2.81 (H₁₈, q); 3.56 (H₂₈, s); 3.68 (H₂₇ e H₂₉, s); 5.16 (H₄, s); 6.59 (H₂₂ e H₂₆, s); 7.43-7.50 (H₁₀, H₁₃ e H₁₄, m); 7.56-7.59 (H₉, t, *J* = 4Hz); 7.82-7.84 (H₁₁, d, *J* = 8Hz); 8.45-8.47 (H₈, d, *J* = 8Hz); 9.30 (H₁, s). ¹³C-RMN: 26.98 (C₂₀), 30.07 (C₁₉); 32.55 (C₁₇); 40.78 (C₁₈); 40.96 (C₄); 50.71 (C₁₆); 56.14 (C₂₇ e C₂₉); 60.30 (C₂₈); 104.62 (C₂₂ e C₂₆); 107.43 (C₃); 121.57 (C₅); 121.79 (C₈); 122.68 (C₇); 123.10 (C₁₃); 126.16 (C₉); 126.21 (C₁₀); 128.30 (C₁₄); 128.65 (C₁₁); 130.80 (C₁₂); 132.75 (C₆); 136.14 (C₂₄); 144.93 (C₂₁); 152.66 (C₂₃ e C₂₅); 153.09 (C₂); 194.14 (C₁₅). Espectros associados: anexos A.23 (página 104) e A.24 (página 105).

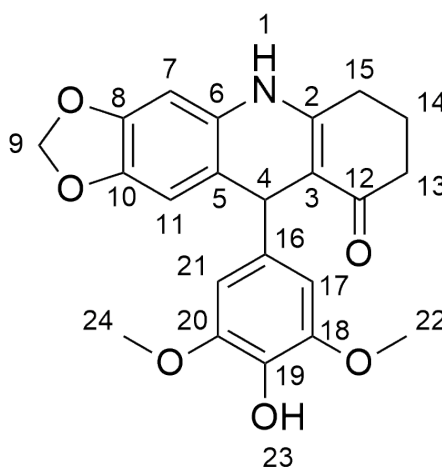
4.1.2.9 10-(3,4,5-trimetoxifenil)-6,7,8,10-tetraidro-[1,3]dioxolo[4,5b]acridin-9(5H)-ona



O produto **21** foi obtido como um sólido de cor marrom e com rendimento de 32,2%. Ponto de degradação na faixa de 235-239°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 1.89-1.95 (H₁₃,

m); 2.21-2.24 (H₁₄, m); 2.56-2.64 (H₁₅, m); 3.57 (H₂₃, s); 3.69 (H₂₂ e H₂₄, s); 4.96 (H₄, s); 5.87-5.97 (H₉, d, *J* = 30Hz); 6.49 (H₁₇ e H₂₁, s); 6.51 (H₇, s); 6.89 (H₁₁, s); 9.32 (H₁, s). ¹³C-RMN: 21.70 (C₁₃); 27.48 (C₁₅); 37.26 (C₁₄); 40.01 (C₄); 56.19 (C₂₂ e C₂₄); 60.29 (C₂₃); 97.01 (C₇); 101.26 (C₉); 104.46 (C₁₇ e C₂₁); 106.57 (C₃); 109.29 (C₁₁); 118.78 (C₅); 130.60 (C₆); 136.02 (C₁₉); 143.40 (C₁₀); 144.97 (C₁₆); 146.38 (C₈); 153.02 (C₁₈ e C₂₀); 153.94 (C₂); 193.80 (C₁₂). Espectros associados: anexos A.25 (página 106) e A.26 (página 107).

4.1.2.10 10-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6,7,8,10-tetraidro-[1,3]dioxolo[4,5*b*]acridin-9(5*H*)-ona



O produto **22** foi obtido como um sólido de cor marrom e com rendimento de 44,6%. Ponto de degradação na faixa de 261-266°C. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): 1.88-1.95 (H₁₃, m); 2.21-2.23 (H₁₄, m); 2.56-2.63 (H₁₅, m); 3.57; 3.67 (H₂₂ e H₂₄, s); 4.91 (H₄, s); 5.86-5.92 (H₉, d, *J* = 30Hz); 6.43 (H₁₇ e H₂₁, s); 6.50 (H₇, s); 6.86 (H₁₁, s); 8.02 (H₂₃, s); 9.28 (H₁, s). ¹³C-RMN: 21.71 (C₁₃); 27.49 (C₁₅); 37.31 (C₁₄); 39.62 (C₄); 56.42 (C₂₂ e C₂₄); 96.94 (C₇); 101.19 (C₉); 104.89 (C₁₇ e C₂₁); 106.91 (C₃); 109.28 (C₁₁); 119.26 (C₅); 130.60 (C₆); 134.22 (C₁₉); 139.61 (C₁₆); 143.33 (C₁₀); 146.23 (C₈); 148.13 (C₁₈ e C₂₀); 153.68 (C₂); 193.78 (C₁₂). Espectros associados: anexos A.27 (página 108) e A.28 (página 109).

4.2 Otimização da síntese da molécula LDQMC-014

O produto LDQMC-014 (7-(3,4,5-trimetoxifenil)-9,10,11,12-tetraidrobenzo[*c*]acridin-8(7*H*)-ona) foi, de acordo com trabalhos anteriores, o que obteve melhor perfil de atividade frente a Tubulina (MAGALHAES et al., 2016; MAGALHAES, 2019; FONSECA, 2017), porém seu rendimento relatado foi de apenas 27,3% utilizando 3mL de etanol (solvente), iguais proporção dos reagentes, à 75°C por um período de 24 horas seguidos de 30 minutos no freezer. A metodologia original dessa síntese é mostrada na Figura 55.

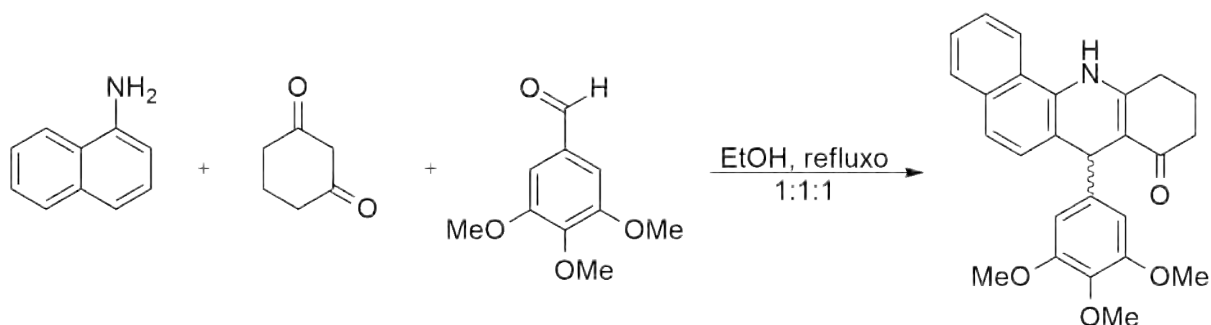


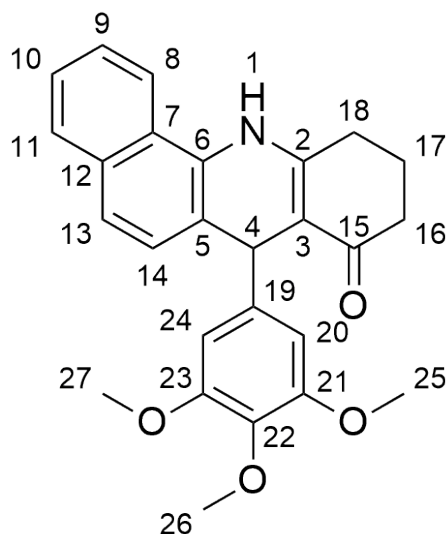
Figura 55 – Esquema reacional do LDQMC-014. Fonte: Elaborada pela autora.

Buscou-se melhorar o rendimento da síntese realizando uma otimização, onde os reagentes utilizados eram sempre os mesmos, porém mudanças sistemáticas em alguns parâmetros da metodologia foram realizadas, são elas: tempo (24, 48 ou 72 horas), solvente (metanol, etanol, isopropanol, terc-butanol, 1-butanol, acetonitrila, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, tolueno), proporção (**1:1:1**, **1,5:1:12:1:1**, **3:1:1**), uso de catalisadores (HCl e morfolina), quantidade de solvente utilizado (2, 3 e 4 mL) e passagem pelo freezer.

Para a obtenção do produto desejado misturou-se α -naftilamina, 1,3-ciclohexanodiona e 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 3 mL de solvente, podendo ter ou não catalisadores e um agitador magnético em um tubo reacional. Levou-se a uma placa de aquecimento e deixou-se em refluxo pelo tempo necessário.

Após o tempo reacional realizou-se uma cromatografia de camada delgada para confirmar que o produto desejado foi formado, em seguida a reação foi resfriada até a temperatura ambiente, podendo ou não ser levada ao freezer por 30 minutos. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com, aproximadamente, 10 mL do solvente utilizado na reação gelado. Realizou-se uma recristalização em etanol e o precipitado formado for filtrado a vácuo e lavado com etanol gelado (aproximadamente 10 mL). Promoveu-se a secagem do produto, deixando-o exposto ao ar por aproximadamente 24 horas.

4.2.1 LDQMC-014: (7-(3,4,5-trimetoxifenil)-9,10,11,12-tetraidrobenzo[*c*]acridin-8(7H)-ona)



O produto **LDQMC-014** foi obtido como um sólido branco. Ponto de fusão na faixa de a 248-252°C. ¹H-RMN 500 MHz, DMSO-*d*₆: 1.96-2.05 (H₁₆, m); 2.29-2.32 (H₁₇, m); 2.70-2.75 (H_{18 a}, m); 2.95-2.99 (H_{18 e}, m); 3.55 (H₂₆, s); 3.68 (H₂₅ e H₂₇, s); 5.20 (H₄, s); 6.56 (H₂₀ e H₂₄, s); 7.45-7.50 (H₁₀, H₁₃ e H₁₄, m); 7.55-7.58 (H₉, t, *J* = 10Hz); 7.82-7.83 (H₁₁, d, *J* = 5Hz); 8.45-8.47 (H₈, d, *J* = 10Hz); 9.35 (H₁, s). ¹³C-RMN: 21.70 (C₁₆); 27.46 (C₁₈); 37.36 (C₁₇); 40.57 (C₄); 56.47 (C₂₅ e C₂₇); 60.28 (C₂₆); 104.67 (C₂₀ e C₂₄); 108.49 (C₃); 121.47 (C₅); 121.75 (C₈); 122.63 (C₇); 123.09 (C₁₃); 126.15 (C₉ e C₁₀); 128.30 (C₁₄); 128.64 (C₁₁); 130.85 (C₁₂); 132.75 (C₆); 136.19 (C₂₂); 144.57 (C₁₉); 153.07 (C₂₁ e C₂₃); 154.44 (C₂); 194.57 (C₁₅). Espectros associados: anexos A.29 (página 110), A.30 (página 111), A.31 (página 112), A.32 (página 113) e A.33 (página 114).

4.3 Cromatografia Quiral

Todas as etapas da cromatografia foram realizadas pelo Doutor Ralph da Costa Gomes na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob supervisão do Professor Doutor Fernando Antônio Santos Coelho.

Para a realização da cromatografia utilizou-se Sistema semi-preparativa Waters: bomba binária 1525, detector de fotodíodos (DAD) Waters modelo 2998, coletor de frações Waters III, software Masslynx. A coluna utilizada foi uma semipreparativa quiral (*Chiralpak IA - SFC semi-preparative HPLC column, 5 μm, 250 mm x 10mm*). Fase móvel isocrático Hexano:Isopropanol 70:30 (v/v). Vazão 21 mL/min. A amostra foi solubilizada em uma mistura acetonitrila:acetato de etila na proporção 1:1 para solubilizar 60 mg de amostra em 4 mL de solução. O cromatograma foi obtido em detector a 254,4 nm.

4.4 Dicroísmo Circular

A análise de dicroísmo circular foi realizada no Instituto de Química da UFRRJ. Essa análise foi realizada para comprovação de separação dos enantiômeros e para definir a sua configuração absoluta. O equipamento utilizado foi *Jasco J-815 CD Spectrometer*, com termostato acoplado. O software utilizado foi o *SpectraManager*.

Para essa análise 2,15mg de amostra de cada enantiômero foi solubilizada em 4mL de etanol e 1mL de isopropanol (os dois de grau espectroscópico). Levou-se ao aquecimento em banho com água a cerca de 50°C com agitação de 5 em 5 minutos. O aquecimento se deu por cerca de uma hora. Deixou-se as soluções chegarem a temperatura ambiente e levou-se ao equipamento de dicroísmo.

Foi realizada uma análise previa pra determinar a linha de base utilizando-se etanol, e posteriormente, fizeram-se as análises de cada solução separadamente utilizando 200 μ L da solução, e completando-se a cubeta (quartzo 1 x 1 cm, 3 mL) com etanol (grau espectroscópico).

4.5 Modelagem Molecular

Métodos de docking molecular foram empregados a fim de prever as interações proteína-ligante. As estruturas tridimensionais (3D) dos compostos foram geradas no programa Vega ZZ 3.1.1 e minimizadas utilizando o campo de força *AMIBCC*. As cargas parciais foram calculadas pelo método *Gasteiger*. A estrutura da tubulina em complexo com um análogo da Podofilotoxina (NV4) foi obtida no banco de dados de proteínas PDB (código: 5JCB). As simulações de docagem foram realizadas no programa Gold 5.6.2 (*Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, Reino Unido*). As estruturas proteicas foram preparadas para o docking com a remoção do ligante e a adição de átomos de hidrogênios. As coordenadas do ligante original foram usadas como referência para a localização do sítio de docagem. O sítio da NV4 foi definido como os resíduos presentes em um raio de 10 Å a partir das coordenadas dos ligantes originais. A função de pontuação empregada foi a *GoldScore*, que é baseada em campos de força e considera as contribuições energéticas das interações de van der Waals e das interações de hidrogênio, tanto intramoleculares quanto intermoleculares (entre a proteína e o ligante). Os resultados do *GoldScore* é dado na forma da média dos resultados das poses dos ligantes, de maneira isolada para cada enantiômero. O método foi validado por meio do docking do ligante original.

4.6 Ensaios biológicos

Todos os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC) localizado no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) sob supervisão do Professor Doutor Adriano Defini Andricopulo e com o auxílio da discente de pós-graduação Luma Godoy Magalhães e da discente de graduação Carolina Teixeira.

4.6.1 Preparação dos compostos para os ensaios biológicos

As soluções-estoque dos compostos foram preparadas a 25 mM e 10 mM em 100% de DMSO. As soluções utilizadas nos ensaios celulares foram preparadas em meio de cultura, a partir das soluções-estoque, de modo a se obter a concentração de composto desejada e uma concentração final de DMSO de 1%. As soluções utilizadas nos ensaios bioquímicos foram preparadas em tampão geral de tubulina (descrito no item 4.6.3), a partir das soluções-estoque, de modo a obter-se a concentração de composto desejada e uma concentração final de DMSO de 1%.

4.6.2 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio MTS (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Células MDA-MB-231 foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^3 células por poço em placas de 96 poços (TPPTM). Após 24h de incubação em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, os compostos-teste e controles foram adicionados aos poços (100 – 0,01 μ M) e incubados por 72h a 37°C. Após esse período, as soluções dos poços foram substituídas por uma solução contendo 80 μ L de DMEM sem vermelho de fenol, 10% de SFB e 20 μ L do reagente MTS (Promega). As placas foram incubadas por 3h em estufa a 37°C. A seguir, a absorbância dos poços em comprimento de onda de 490 nm foi medida em um espectrofotômetro *SpectraMax Plus384* (Molecular Devices). A determinação dos parâmetros CC₅₀ foi feita como descrito no item 4.6.5.

4.6.3 Ensaio de polimerização da proteína Tubulina

A modulação da Tubulina foi avaliada por meio de ensaios de polimerização da proteína *in vitro*. Foram realizados ensaios de fluorescência (ALBINI et al., 1987) utilizando kits de polimerização da tubulina (código BK011P, *Cytoskeleton Inc*). O kit contém 10 mg de tubulina liofilizada purificada de cérebro de porco com pureza superior a 99%, GTP e paclitaxel liofilizados, e tampões de reconstituição (tampão 1) e polimerização (tampão glicerol). O tampão 1 é constituído por: 80 mM PIPES (piperazina-1,4- bis (ácido 2-etanosulfônico); 2 mM cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,5 mM EGTA (ácido etileno glicol-bis (β -amino-etil-éter) N,N,N9,N9-tetra-acético) e 10 μ M de DAPI em pH 6,9. O tampão glicerol contém: 80 mM PIPES; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM EGTA e 60% de glicerol em volume em pH 6,9. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços pretas e de meia área fornecidas junto com o kit. Em cada poço foram adicionados 5 μ L de composto teste solubilizado em 10% de DMSO e 45 μ L de mistura reacional (2 mg/mL de tubulina; 80 mM PIPES; 0,5 mM EGTA; 1 mM GTP; 2 mM MgCl₂, 15% de glicerol e 10 μ M de DAPI; em pH 6,9). Esta mistura foi adicionada aos poços da placa logo após seu preparo, com o auxílio de uma pipeta multicanal. A concentração final de DMSO no ensaio é de 1%, o que minimiza a interferência do solvente na polimerização dos microtúbulos. Em seguida, a placa foi colocada no fluorímetro *SpectraMax Gemini EM* (Molecular Devices)

pré-aquecido a 37°C. As placas foram analisadas utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão de, respectivamente, 340 e 460 nm. Foram executados 70 ciclos de leitura com intervalos de 45s entre duas leituras do mesmo poço. Para a determinação de IC₅₀ foram empregadas 7 concentrações dos compostos-teste, em duplicata.

4.6.4 Ensaio de migração celular *Wound Healing*

O ensaio de *Wound Healing* foi realizado para a avaliação da capacidade de inibição da migração celular. Consiste na realização de uma fenda na monocamada celular que, devido à migração celular, se fecha ao decorrer do período de incubação. Para tanto, as células foram cultivadas em uma placa de cultura de 24 poços. O cultivo se deu por 48h e com 5×10^4 células por poço. Passado este período, uma fenda foi realizada na monocamada celular com o auxílio de uma ponteira p100 estéril. Cada poço, em seguida, foi lavado com meio de cultura sem SFB para que se removesses resíduos celulares decorrentes da realização da fenda. As soluções foram preparadas a 10 e 5 μ M e adicionadas, juntamente com meio de cultura suplementado com SFB, aos poços com as fendas. A placa foi incubada por 24h em estufa a 37°C. As fendas foram fotografadas digitalmente por meio de um microscópio invertido em dois momentos: no início (0h) e no final (24h). Para a determinação da porcentagem de inibição de migração celular, utilizaram-se os valores das áreas finais e iniciais das fendas em relação ao controle negativo (DMSO 0,1%). Colchicina (1 μ M) foi utilizada como controle positivo.

4.6.5 Análise estatística

Os valores de CC e IC₅₀ foram determinados por meio do método de regressão não-linear de melhor ajuste em curvas do tipo concentração x resposta. As determinações foram realizadas com o auxílio do programa *Sigmaplot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, Estados Unidos)*.

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir, portanto, que a síntese clássica se mostrou assertiva, obtendo-se quatro produtos, sendo um inédito cujas estruturas foram confirmadas por técnicas espectroscópicas. Já a síntese modificada se mostrou muito eficiente para alguns nucleófilos utilizados, sobretudo quando utilizou-se o 6-aminoindazol, gerando 10 produtos, sendo 6 deles inéditos, cujas estruturas foram confirmadas por técnicas espectroscópicas.

A reação multicomponente mostrou-se ser uma rota de síntese favorável do ponto de vista ambiental, uma vez que a utilização de solventes e a quantidade de descarte são consideravelmente menores quando comparadas com outras rotas sintéticas, além do fato de ser realizada em uma única etapa, o que facilita a reprodução da metodologia.

A otimização da síntese do produto LDQMC-014 assim como a cromatografia e o dicróismo circular foram realizados de maneira excelente, uma vez que foi possível aumentar o rendimento da reação, além de ter sido possível uma boa separação enantioméricas que possibilitou a definição da configuração absoluta dos enantiômeros.

Os ensaios biológicos para os enantiômeros isolados mostraram um perfil de atividade distinto para os dois enantiômeros, sendo o enantiômero *S* 10 vezes mais ativo que a mistura racêmica frente a linhagem celular MDA-MB-231, enquanto o enantiômero *R* é 50 vezes menos ativo que a mistura. Entretanto, quando analisamos a polimerização da proteína Tubulina vemos que o enantiômero *S* é mais ativo que a mistura, porém o enantiômero *R* é inativo, indicando q esse enantiômero provavelmente atua em um segundo alvo molecular, que será investigado futuramente.

Os resultados de modelagem molecular foram satisfatórios tanto para o produto LDQMC-014 quanto para as acridinonas pretendidas. Os enantiômeros do composto LDQMC-014 têm interações distintas com a proteína, sendo o enantiômero (*S*) o que tem melhor interação, fato corroborado pelos ensaios biológicos. Para as acridinonas pretendidas chegou-se a bons resultados, onde mais de 60% as estruturas testadas tem interação com valores de *scores* favoráveis (maior que 60). Além de uma estrutura com interação superior ao ligante considerado padrão positivo (NV4).

O ensaio de migração celular *Wound Healing* realizados para parte das estruturas obtidas comprovaram que os produtos **6**, **21** e **22** conseguiu ser eficiente na inibição da migração celular, uma vez que após o tempo de 24 horas, não houve fechamento da fenda na monocamada celular. Entretanto a sua porcentagem de inibição de migração celular é menor do que o padrão positivo, e menor que a porcentagem encontrada para o produto LDQMC-014 (página 14).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINI, A. et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer research*, v. 47, n. 12, p. 3239–45, jun 1987. ISSN 0008-5472. Citado na página 73.

ANVISA. *Tecentriq® (atezolizumabe): nova indicação - Informações Técnicas - Anvisa*. 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p{_}p{_}id=101{_}INSTANCE{_}WvKKx2fhdjM2{\&}p{_}p{_}col{_}id=column-2{\&}p{_}p{_}col{_}pos=1{\&}p{_}p{_}col{_}count=2{\&}{_}101{_}INSTANCE{_}WvKKx2fhdjM2{_}groupId=219201{\&}{_}101{_}IN>. Citado na página 3.

ARNST, K. E. et al. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, v. 39, n. 4, p. 1398–1426, 2019. ISSN 10981128. Citado na página 5.

BARREIRO, E. J. et al. *Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal*. [S.l.], 1997. v. 20, n. 1. Citado na página 13.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 3^a. ed. [S.l.]: Artmed, 2015. 608 p. ISBN 978-8582711170. Citado na página 12.

BIGGS-HOUCK, J. E.; YOUNAI, A.; SHAW, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, Elsevier Ltd, v. 14, n. 3, p. 371–382, 2010. ISSN 13675931. Citado na página 7.

CHUNG, T. W. et al. Multicomponent Synthesis of Functionalized Tetrahydroacridinones: Insights into a Mechanistic Route. *Organic Letters*, v. 17, n. 21, p. 5368–5371, 2015. ISSN 15237052. Citado 3 vezes nas páginas 8, 10 e 11.

CLINICALTRIALS. *Search of: AVE8062 - List Results - ClinicalTrials.gov*. 2019. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond={\&}term=AVE8062{\&}cntry={\&}state={\&}>>>. Citado na página 6.

CLINICALTRIALS. *Search of: BNC-105p - List Results - ClinicalTrials.gov*. 2019. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=BNC-105p{\&}age{_}v={\&}gndr={\&}type={\&}rsl>. Citado na página 6.

CLINICALTRIALS. *Search of: CA-1P - List Results - ClinicalTrials.gov*. 2019. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond={\&}term=CA-1P{\&}cntry={\&}state={\&}>>>. Citado na página 6.

CLINICALTRIALS. *Search of: CA-4P - List Results - ClinicalTrials.gov*. 2019. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond={\&}term=CA-4P{\&}cntry={\&}state={\&}>>>. Citado na página 6.

CLINICALTRIALS. *Search of: CKD-516 - List Results - ClinicalTrials.gov*. 2019. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=CKD-516{\&}age{_}v={\&}gndr={\&}type={\&}rsl>. Citado na página 6.

CLINICALTRIALS. *Search of: ZD6126 - List Results - ClinicalTrials.gov*. 2019. Disponível em: <[CRABBÉ, P. *Actividad optica, dispersión rotatoria optica y dicroísmo circular en química organica*. \[S.l.\]: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1974. 68 p. ISBN 082701418X 9780827014183. Citado na página 45.](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond={&}term=ZD6126{&}cntry={&}state={&}>>. Citado na página 6.</p></div><div data-bbox=)

DAWOOD, S. Triple-Negative Breast Cancer. *Drugs*, v. 70, n. 17, p. 2247–2258, dec 2010. ISSN 0012-6667. Citado na página 2.

DEANGELIS, G.; WILDMAN, W. Circular dichroism studies—I: A quadrant rule for the optically active aromatic chromophore in rigid polycyclic systems. *Tetrahedron*, v. 25, n. 20, p. 5099–5112, jan 1969. ISSN 00404020. Citado na página 45.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 10, p. 790–803, oct 2010. ISSN 1474-1776. Citado na página 5.

EVDOKIMOV, N. M. et al. Structural Simplification of Bioactive Natural Products with Multicomponent Synthesis. 3. Fused Uracil-Containing Heterocycles as Novel Topoisomerase-Targeting Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, n. 7, p. 2012–2021, apr 2011. ISSN 0022-2623. Citado na página 51.

FONSECA, M. B. *Síntese de heterociclos com atividade anticâncer*. 2017. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). UFRRJ, Seropédica. Citado 6 vezes nas páginas 13, 14, 17, 30, 38 e 69.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, nov 2010. ISSN 0028-4793. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 3.

GRAEBIN, C. S. et al. Multicomponent Reactions for the Synthesis of Bioactive Compounds: A Review. *Current Organic Synthesis*, v. 16, n. 6, p. 855–899, nov 2019. ISSN 15701794. Citado na página 7.

BROOKS, W. H.; GUIDA, W. C.; DANIEL, K. G. The Significance of Chirality in Drug Design and Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 7, p. 760–770, apr 2011. ISSN 15680266. Citado na página 12.

HANTZSCH, A. Ueber die Synthese pyridinartiger Verbindungen aus Acetessigäther und Aldehydammoniak. *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, v. 215, n. 1, p. 1–82, 1882. ISSN 00754617. Citado na página 8.

HSL. *Câncer de mama triplo-negativo - Hospital Sírio-Libanês*. 2019. Disponível em: <<https://www.hospitalsiriolibanes.org.br/sua-saude/Paginas/cancer-mama-triplo-negativo-imunoterapia-tratamento.aspx>>. Citado na página 2.

HYEDA, A.; SBARDELLOTTO, É.; DA COSTA, M. Uma análise preliminar dos custos em quimioterapia ambulatorial no sistema de saúde suplementar A preliminary analysis of the costs for outpatient chemotherapy in the supplementary health system. *J Bras Econ Saúde*, v. 7, n. 2, p. 99–109, 2015. Citado na página 1.

IARC. *Cancer Today*. 2019. Disponível em: <[IARC. *Cancer Today*. 2019. Disponível em: <\[IARC. *Cancer Today*. 2019. Disponível em: <\\[IARC. *Cancer Today*. 2019. Disponível em: <\\\[IARC. *Cancer Tomorrow*. 2019. Disponível em: <\\\\[IARC. *Cancer Tomorrow*. 2019. Disponível em: <\\\\\[INCA. Contra o triplo-negativo. *Rede Câncer 08*, p. 44, 2009. Citado na página 2.\\\\\]\\\\\(https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0{&}population=900{&}mode=population{&}sex=2{&}cancer=39{&}age{&}group=value{&}ap>. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 2.</p></div><div data-bbox=\\\\\)\\\\]\\\\(https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0{&}population=900{&}mode=population{&}sex=0{&}cancer=39{&}age{&}group=value{&}ap>. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 1.</p></div><div data-bbox=\\\\)\\\]\\\(https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018{&}mode=cancer{&}mode{&}population=continents{&}population=900{&}populations=900{&}key=total{&}sex=0{&}cancer=39{&}type=2{&}statistic=5{&}prevalence=1{&}population{&}group=0{&}ages{&}group{&}>. Citado na página 2.</p></div><div data-bbox=\\\)\\]\\(https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018{&}mode=cancer{&}mode{&}population=continents{&}population=900{&}populations=900{&}key=total{&}sex=0{&}cancer=39{&}type=1{&}statistic=5{&}prevalence=0{&}population{&}group=0{&}ages{&}group{&}>. Citado na página 2.</p></div><div data-bbox=\\)\]\(https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018{&}mode=cancer{&}mode{&}population=continents{&}population=900{&}populations=76{&}key=total{&}sex=0{&}cancer=39{&}type=0{&}statistic=5{&}prevalence=0{&}population{&}group=0{&}ages{&}group{&}>. Citado na página 2.</p></div><div data-bbox=\)](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018{&}mode=cancer{&}mode{&}population=continents{&}population=900{&}populations={&}key=total{&}sex=0{&}cancer=39{&}type=0{&}statistic=5{&}prevalence=0{&}population{&}group=0{&}ages{&}group{%}>. Citado na página 2.</p></div><div data-bbox=)

INCA. *O que é câncer?* | INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Citado na página 1.

INCA. *Quais os efeitos colaterais da quimioterapia?* | INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/quais-os-efeitos-colaterais-da-quimioterapia>>. Citado na página 1.

INCA. *Quimioterapia* | INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento/quimioterapia>>. Citado na página 1.

INCA. *Tipos de câncer* | INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Citado na página 2.

INCA. *Tratamento do câncer* | INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento>>. Citado na página 1.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 3, p. 194–204, mar 2010. ISSN 1474175X. Citado na página 3.

LI, L. et al. Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Elsevier Masson SAS, v. 151, p. 482–494, 2018. ISSN 17683254. Citado na página 5.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, feb 2007. ISSN 1754-2189. Citado na página 73.

LIMA, V. L. E. *Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem*. [S.l.], 1997. v. 20, n. 6. Citado na página 12.

MAGALHAES, L. G. *Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento de câncer*. 2019. Tese (Doutorado). USP, São Carlos. Citado 8 vezes nas páginas 9, 3, 13, 19, 20, 55, 56 e 69.

MAGALHAES, L. G. et al. Discovery of a series of acridinones as mechanism-based tubulin assembly inhibitors with anticancer activity. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, p. 1–17, 2016. ISSN 19326203. Citado 3 vezes nas páginas 14, 55 e 69.

MAKRIYANNIS, A.; BIEGEL, D. *Drug Discovery Strategies and Methods*. [S.l.]: CRC Press, 2003. 338 p. ISBN 9780203913277. Citado na página 3.

MUSTACCHI, G.; DE LAURENTIIS, M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. *Drug Design, Development and Therapy*, p. 4303, aug 2015. ISSN 1177-8881. Citado na página 2.

NOBREGA, C. R.; LIMA, A. F. C. Procedures' costs related to outpatient chemotherapy treatment of women suffering from breast cancer. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 48, n. 4, p. 699–705, aug 2014. ISSN 0080-6234. Citado na página 1.

PEREZ, E. A. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 8, n. 8, p. 2086–2095, aug 2009. ISSN 15357163. Citado na página 3.

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia*, v. 45, n. 2, p. 209–211, feb 1989. ISSN 0014-4754. Citado na página 19.

PROTEOMICSCREATIVE. *Molecular Docking Service*. 2019. Disponível em: <<https://www.creative-proteomics.com/services/molecular-docking-service.htm>>. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 13.

ROGERIO, K. R. et al. Multicomponent reactions: A brief history and their versatility for the synthesis of biologically active molecules. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 6, p. 1934–1962, 2016. ISSN 19846835. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 7.

ROSADO, J. O. *Análise de redes de interações entre drogas quimioterápicas usadas no tratamento de câncer gástrico: explorando proteínas e processos biológicos por meio de ferramentas de farmacologia de sistemas*. 2010. Dissertação (mestrado). UFRGS, Porto Alegre. Citado na página 13.

SAINI, A.; KUMAR, S.; SANDHU, J. S. Hantzsch reaction: Recent advances in Hantzsch 1,4-dihydropyridines. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 67, n. 2, p. 95–111, 2008. ISSN 00224456. Citado na página 9.

SALUM, L. B. *Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais*. 2011. Tese (Doutorado). USP, São Carlos. Citado na página 3.

SCHMID, P. et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 379, n. 22, p. 2108–2121, nov 2018. ISSN 0028-4793. Citado na página 3.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. 10. ed. [S.l.: s.n.], 2012. ISBN 9788521620334. Citado na página 11.

SOUZA, S. *Estudo de inibidores de colinesterases aplicando técnicas de QSAR-2D (HQSAR) e docking molecular*. 2012. Tese (Doutorado). UFRJ, Rio de Janeiro. Citado na página 13.

STEINMETZ, M. O.; PROTA, A. E. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, Elsevier Ltd, v. 28, n. 10, p. 776–792, 2018. ISSN 18793088. Citado 3 vezes nas páginas 8, 4 e 7.

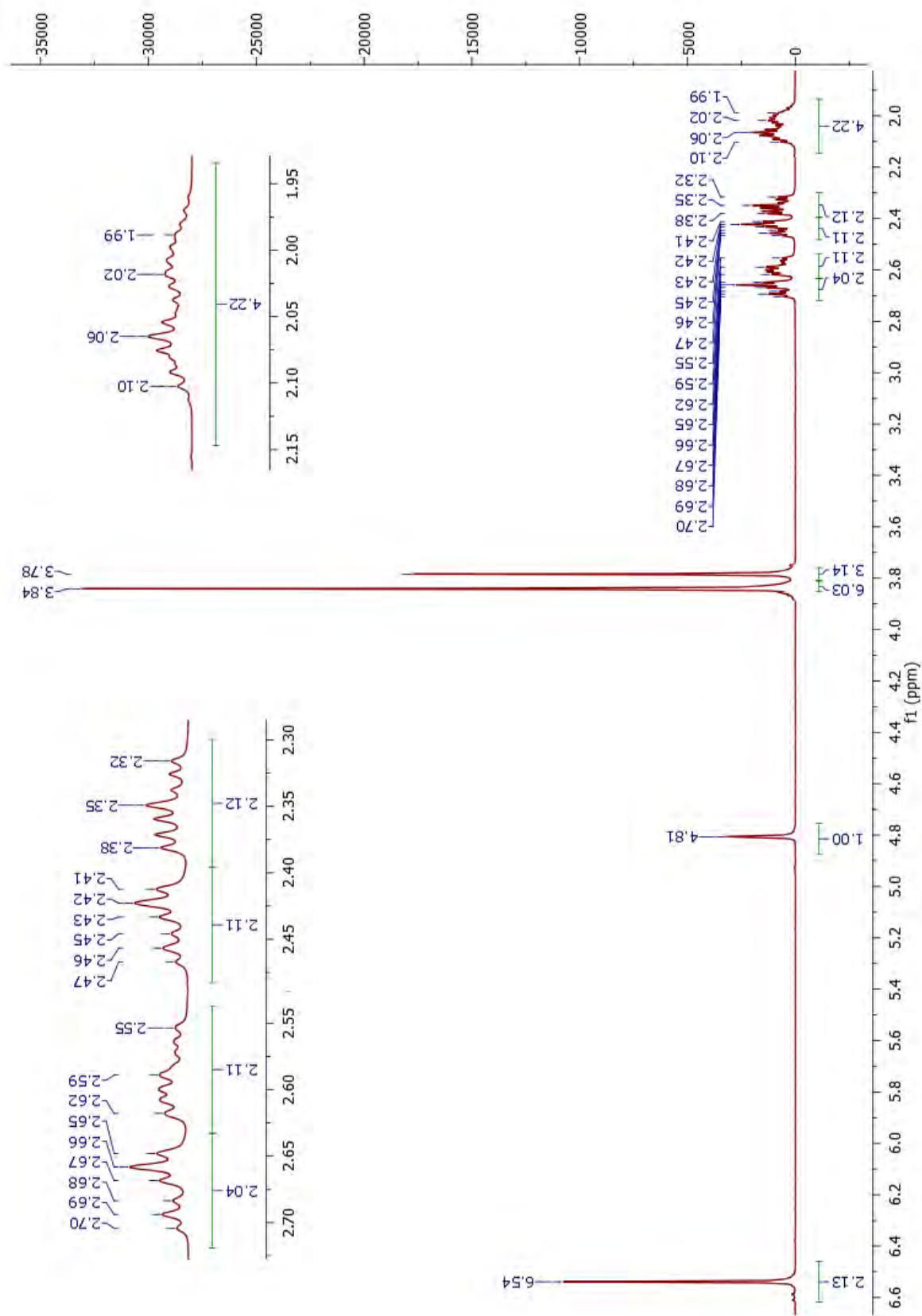
TRATRAT, C.; GIORGI-RENAULT, S.; HUSSON, H. A Multicomponent Reaction for the One-Pot Synthesis of 4-Aza-2,3-didehydropodophyllotoxin and Derivatives. *Organic Letters*, v. 4, n. 19, p. 3187–3189, sep 2002. ISSN 1523-7060. Citado 6 vezes nas páginas 8, 9, 10, 26, 39 e 63.

WADE, R. H. On and Around Microtubules: An Overview. *Molecular Biotechnology*, v. 43, n. 2, p. 177–191, oct 2009. ISSN 1073-6085. Citado na página 3.

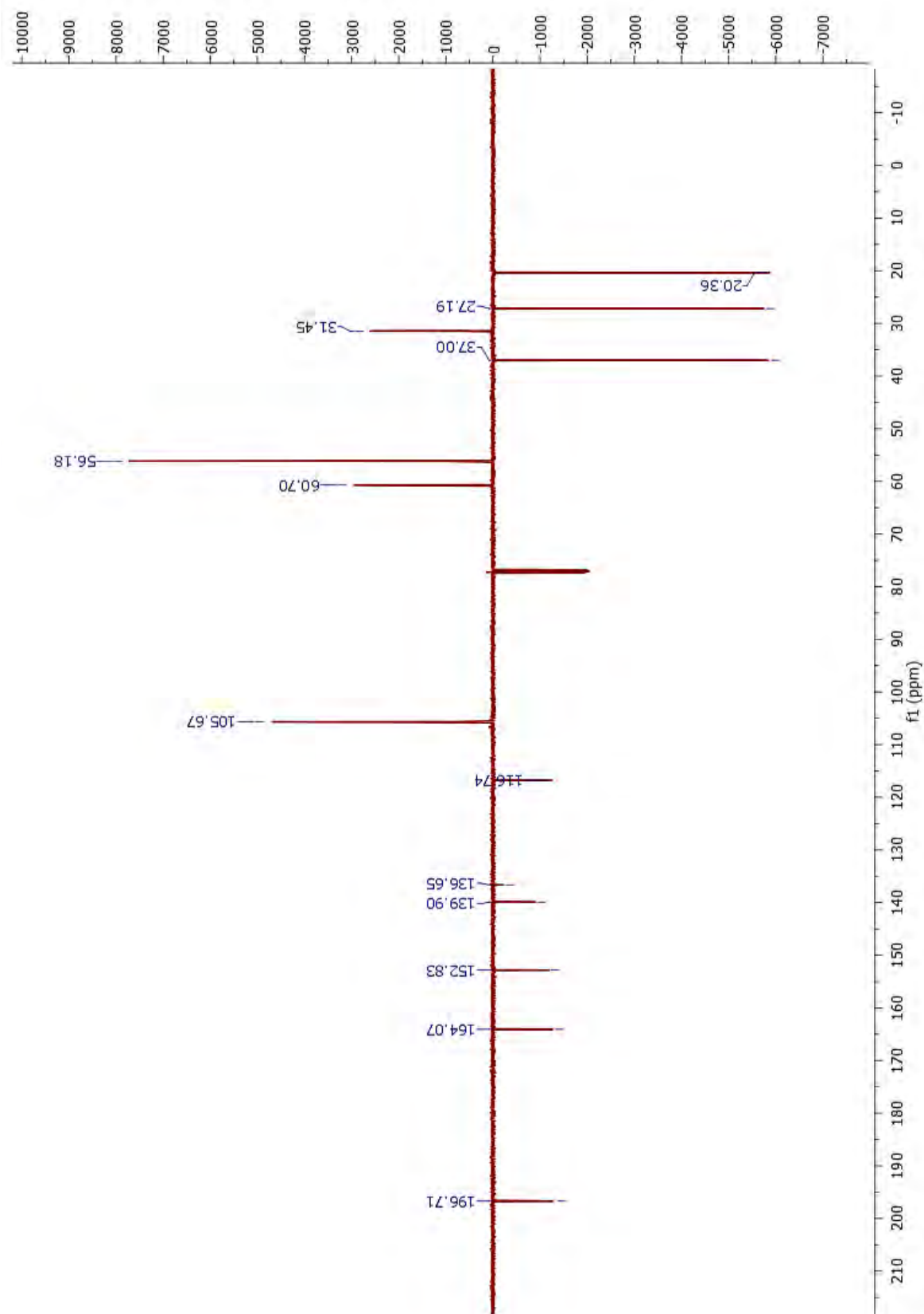
WERMUTH, C. G. *The practice of Medicinal Chemistry*. 3^a. ed. [S.l.]: Academic Press, 2008. ISBN 9780123741943. Citado na página 55.

Anexos

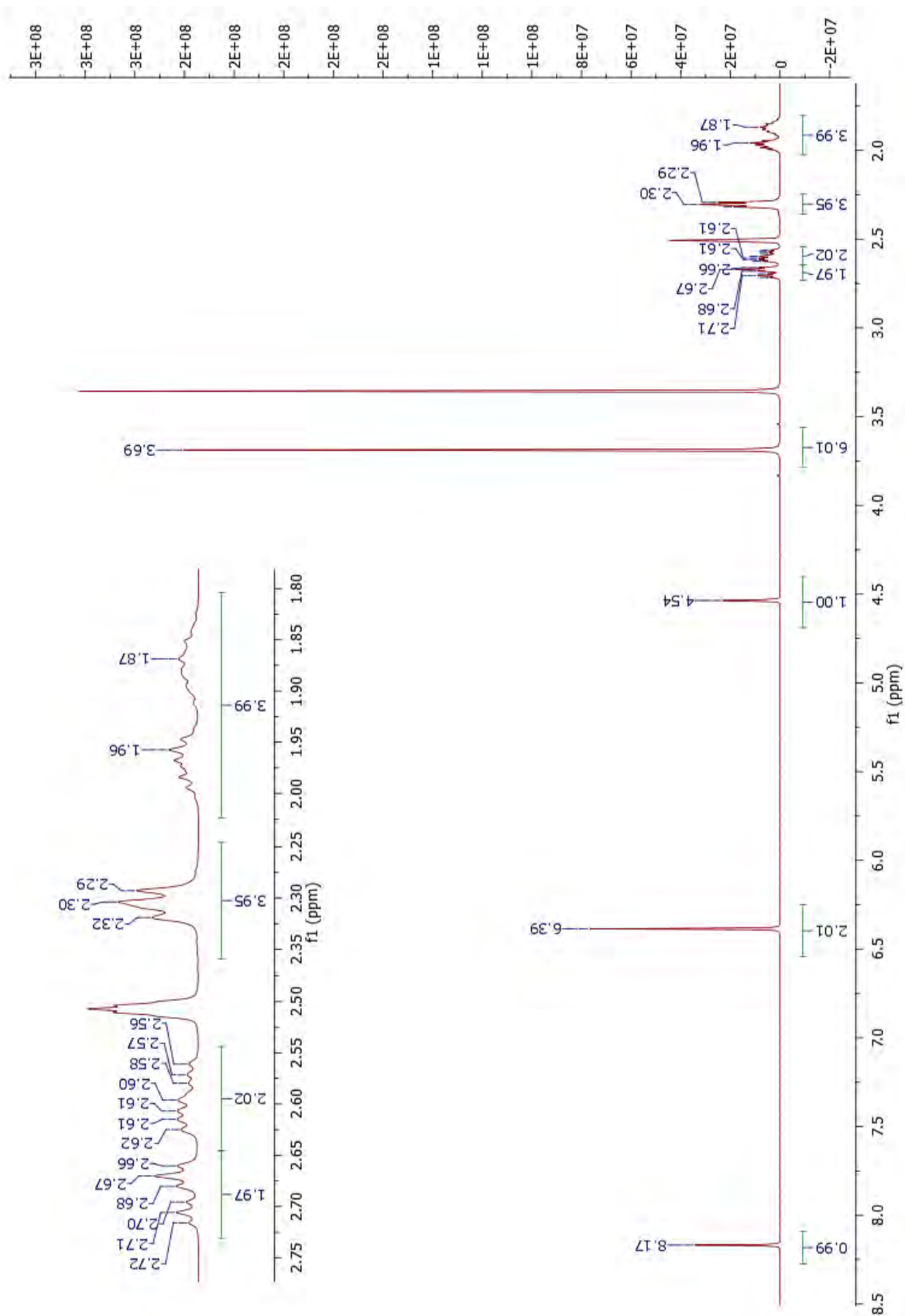
A.1 ¹H-RMN - 1



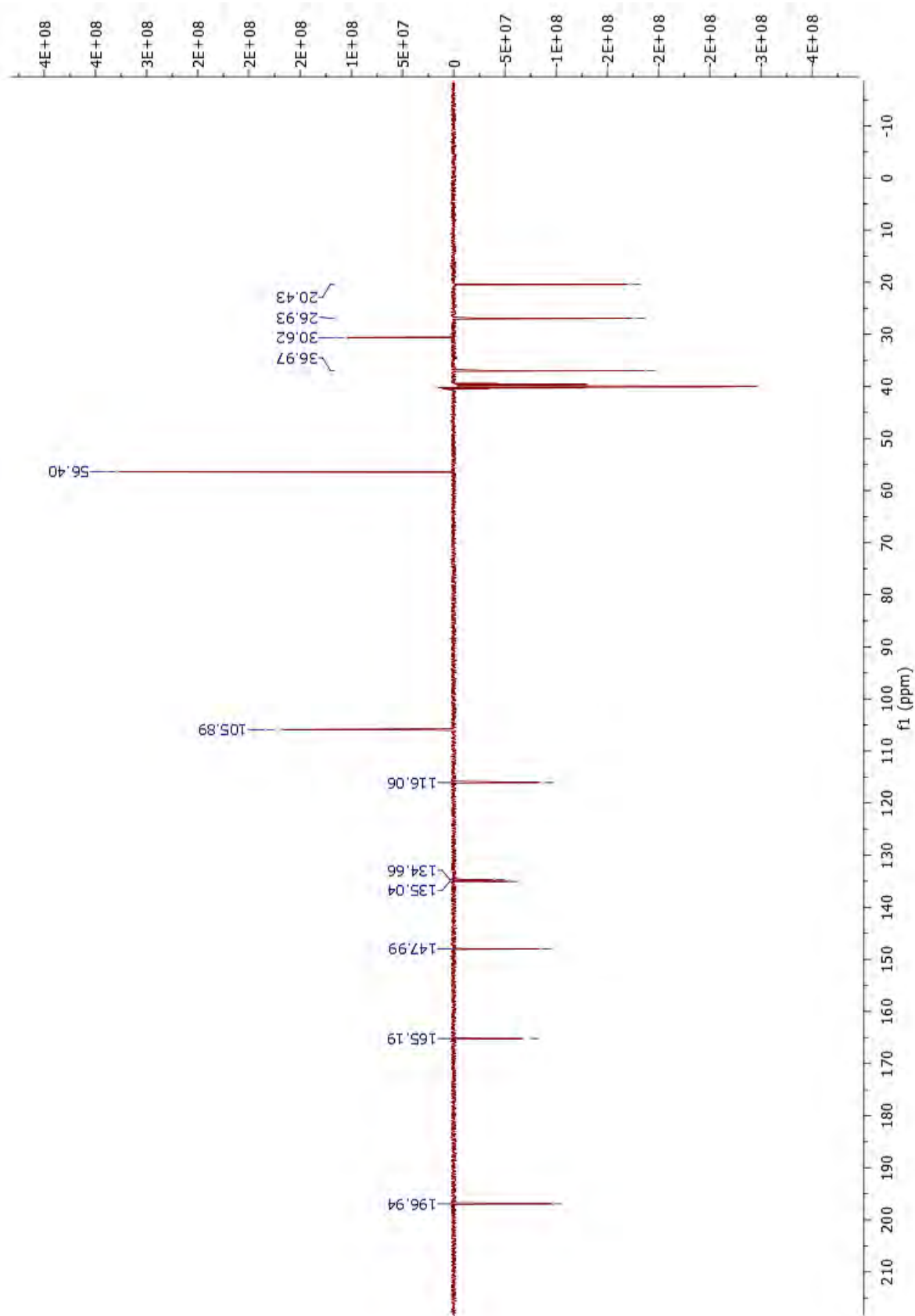
A.2 ^{13}C -RMN - 1



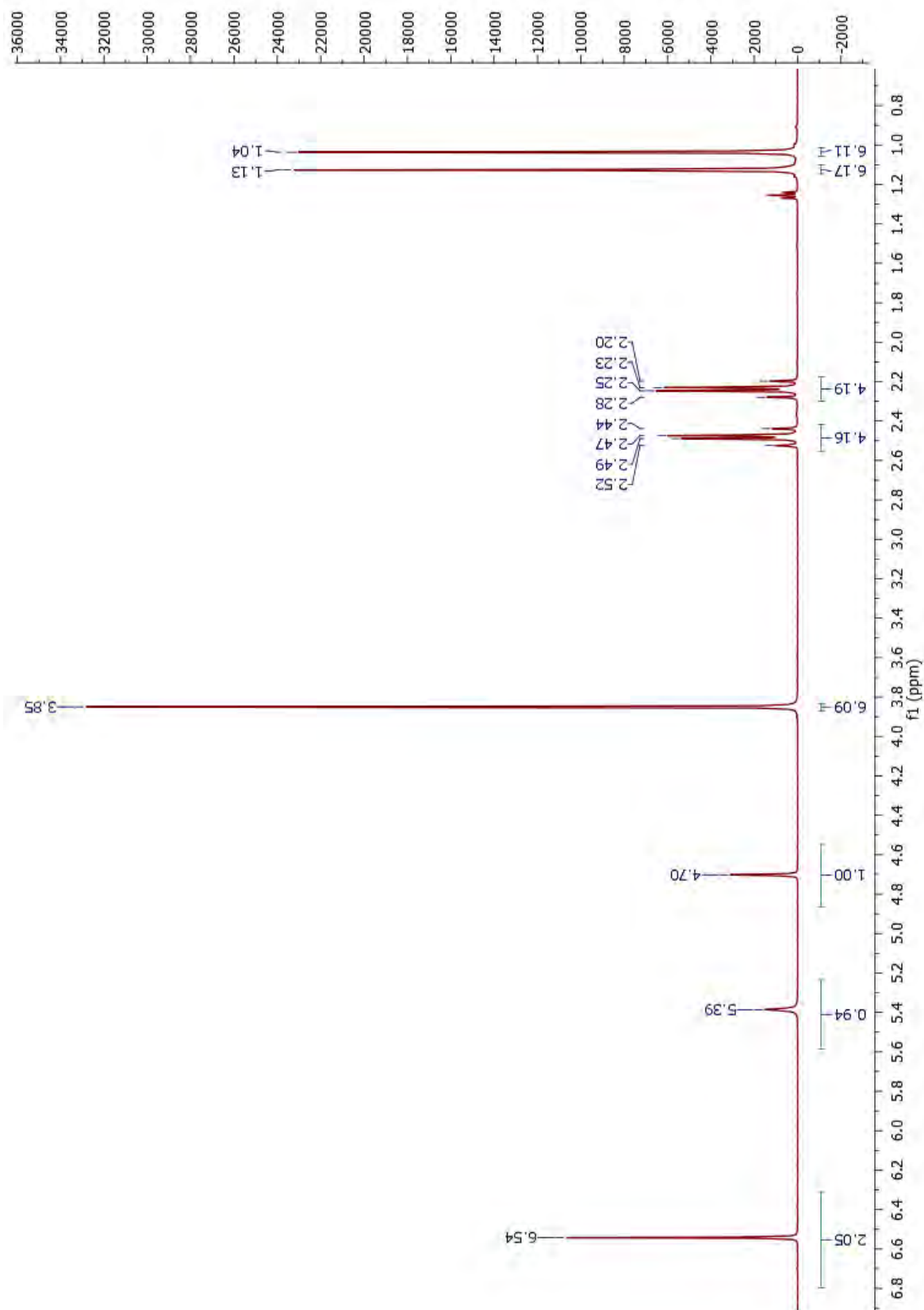
A.3 ^1H -RMN - 2



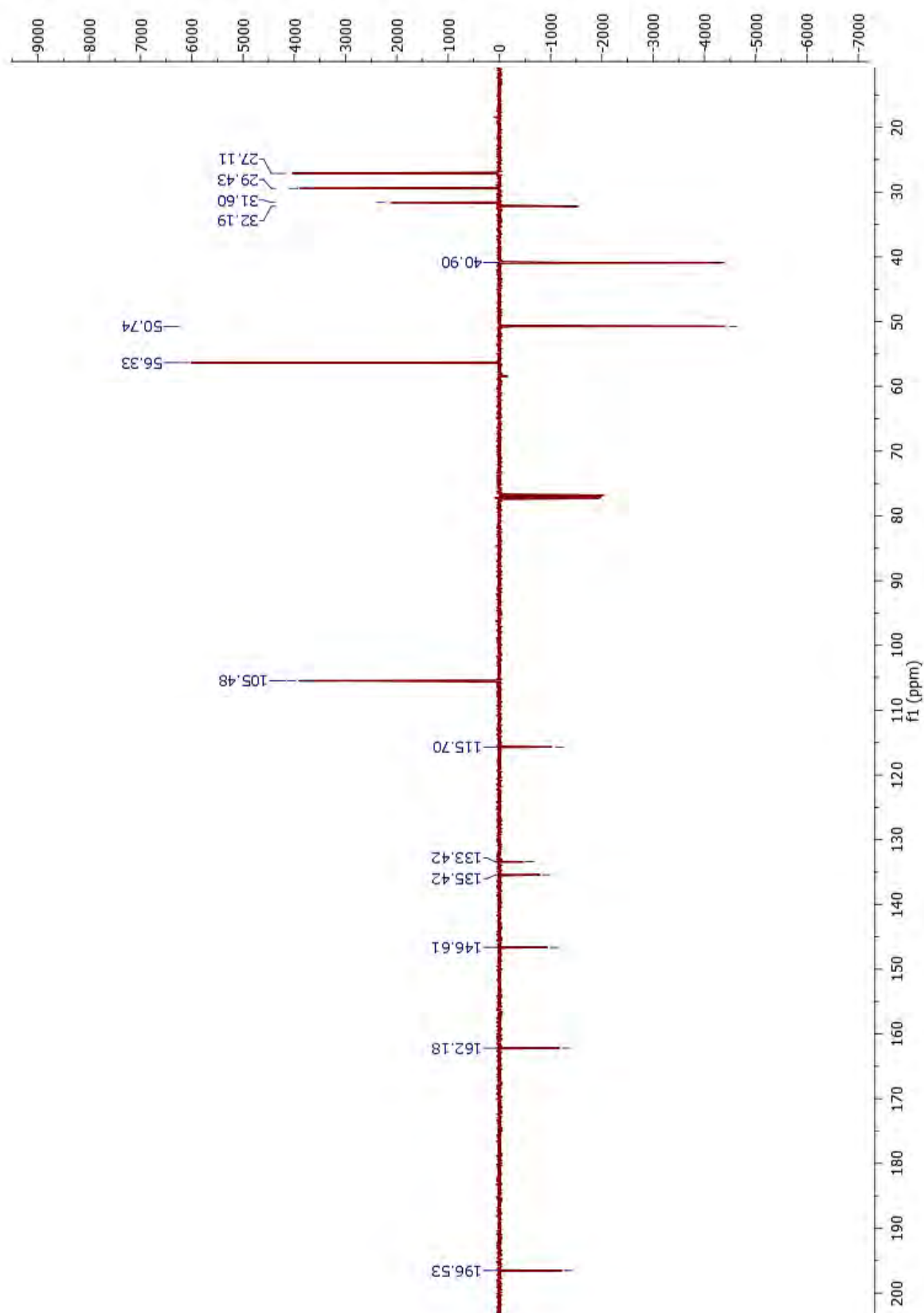
A.4 ^{13}C -RMN - 2



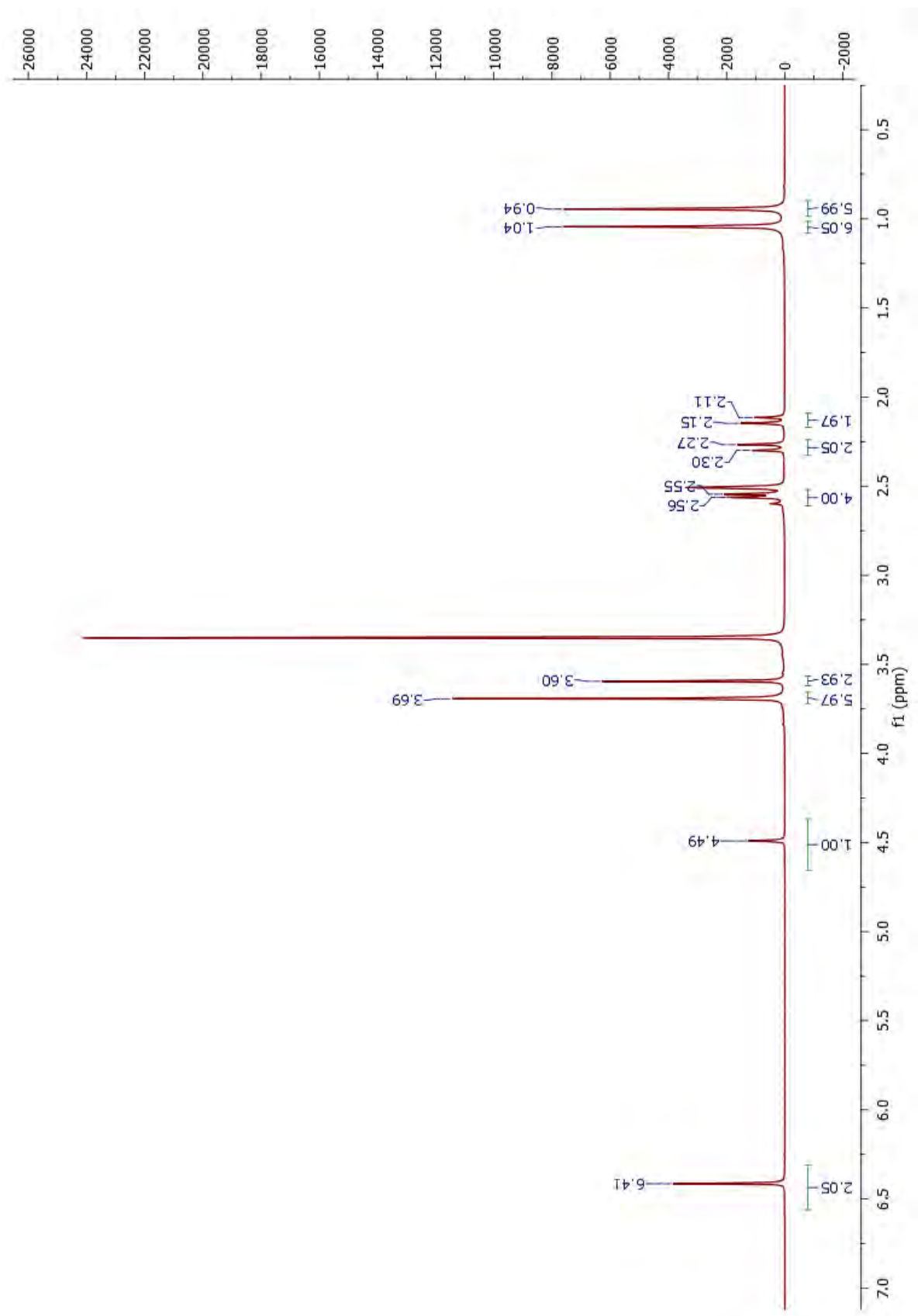
A.5 ^1H -RMN - 3



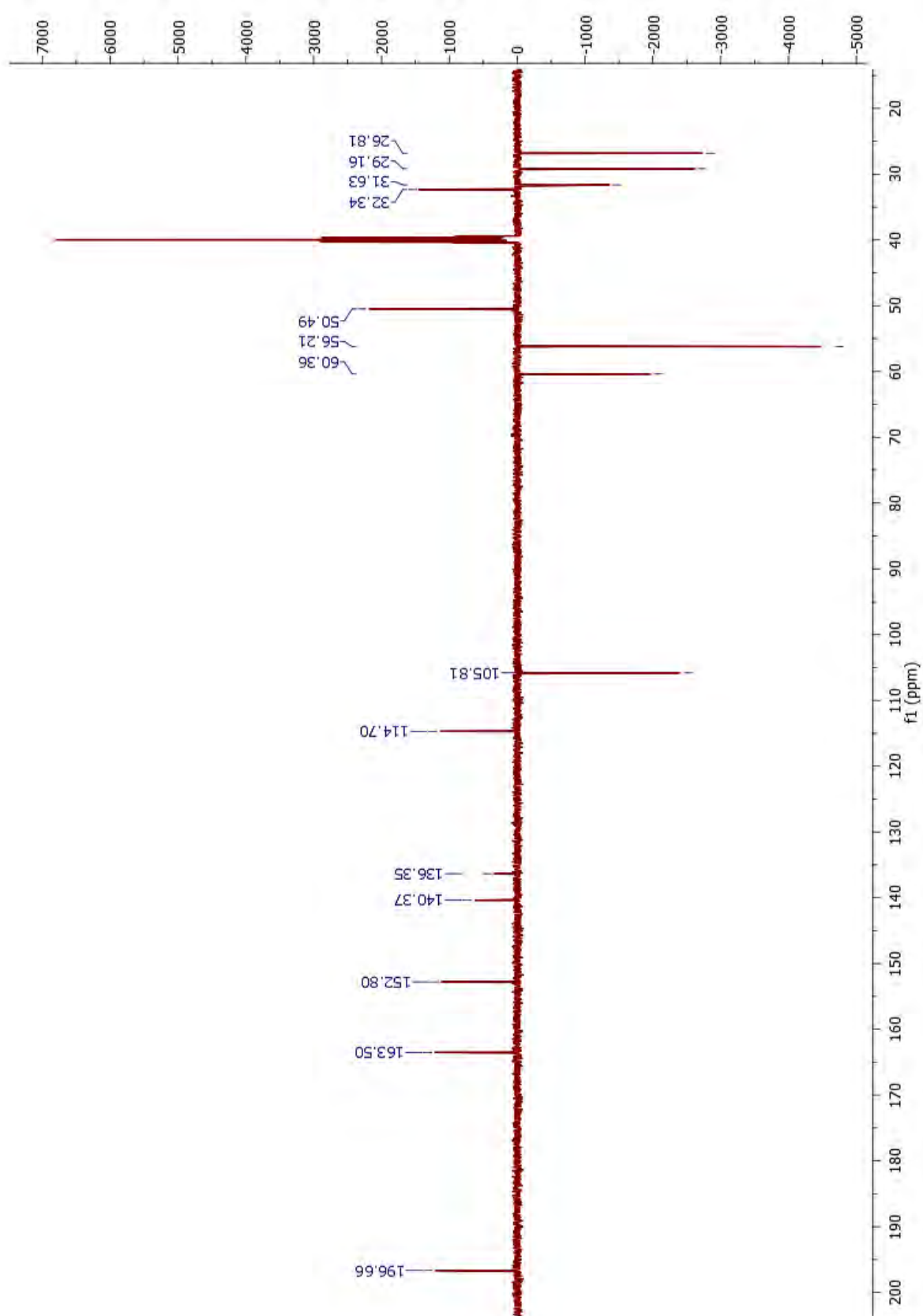
A.6 ^{13}C -RMN - 3



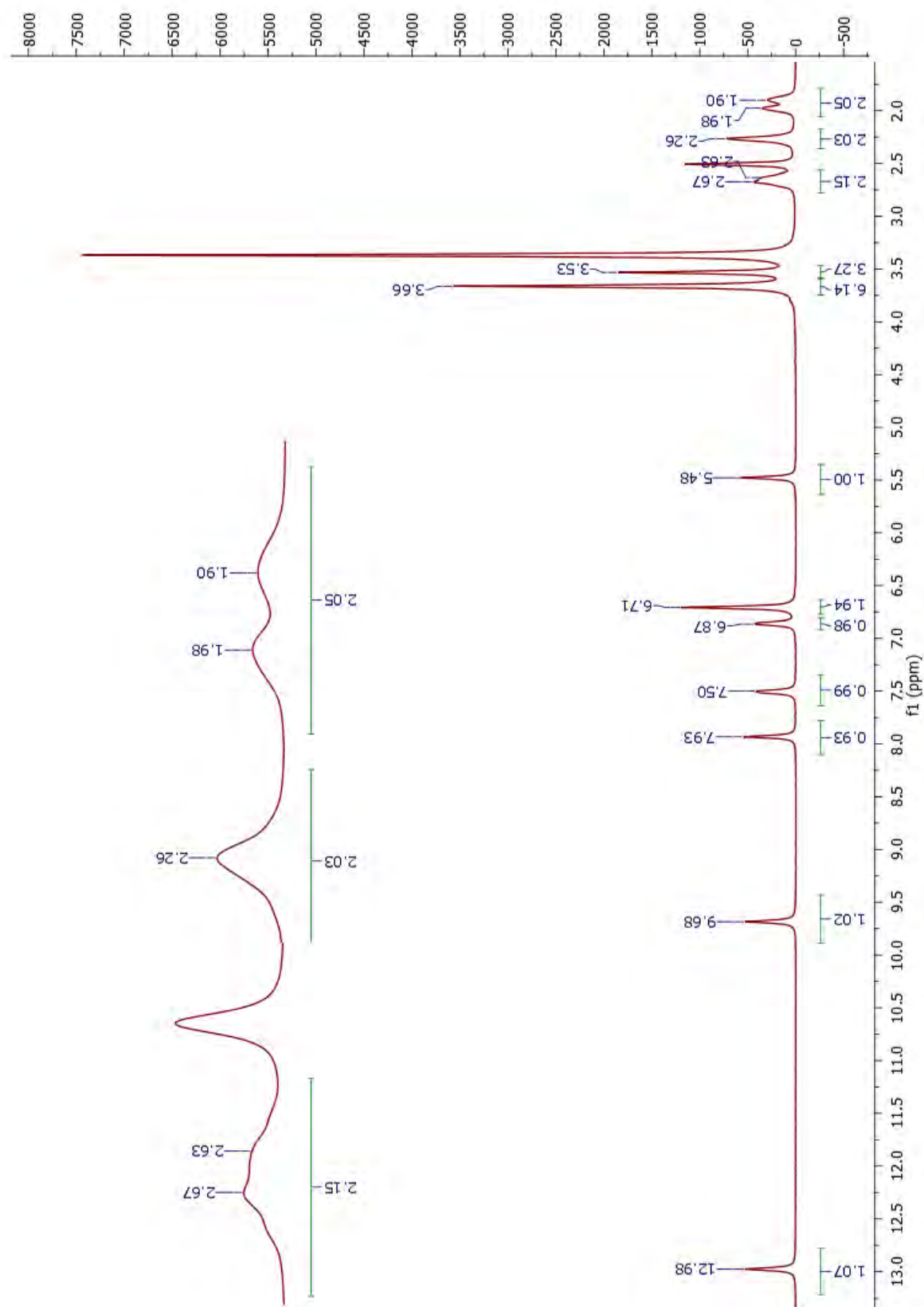
A.7 ¹H-RMN - 4



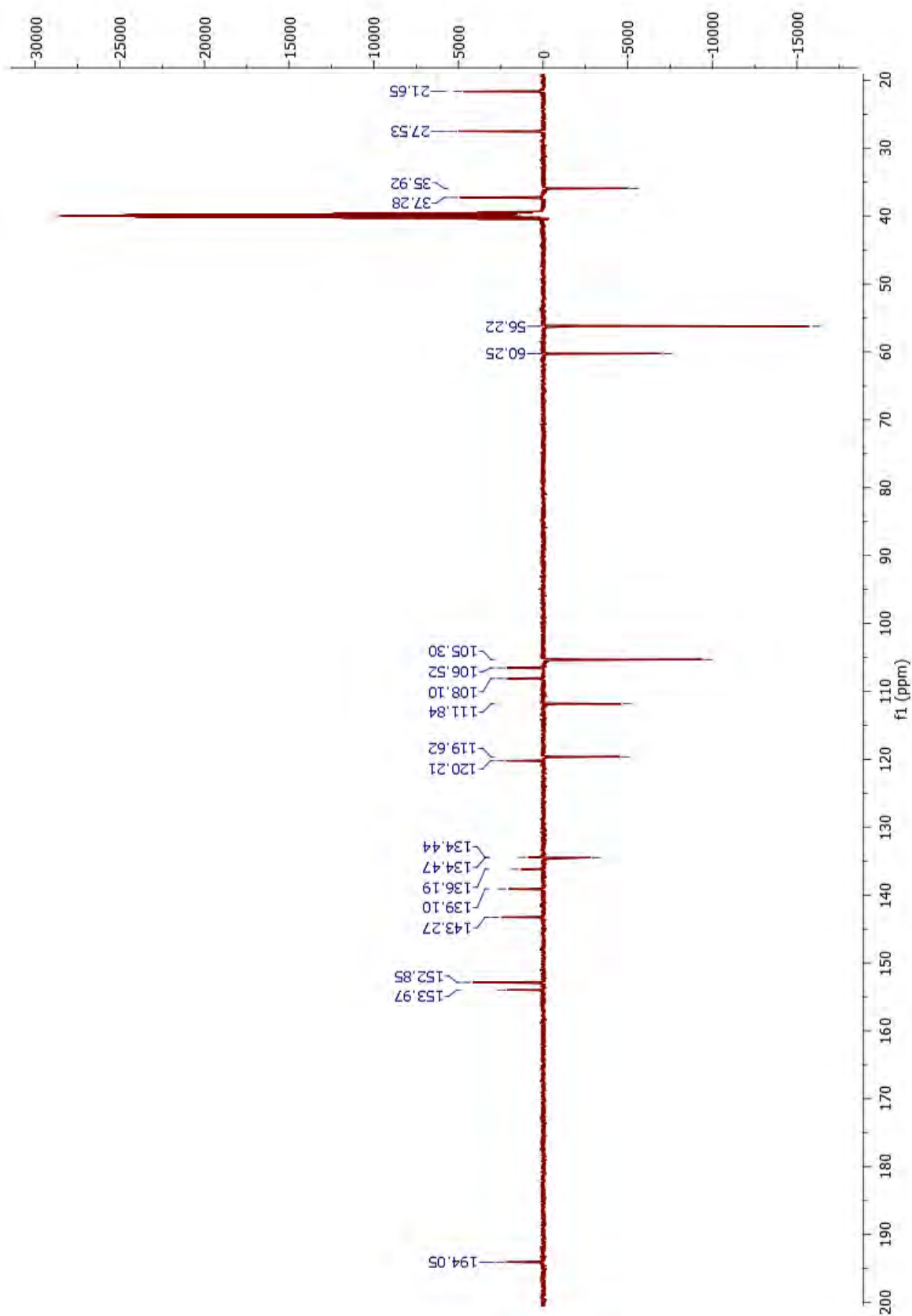
A.8 ¹³C-RMN - 4



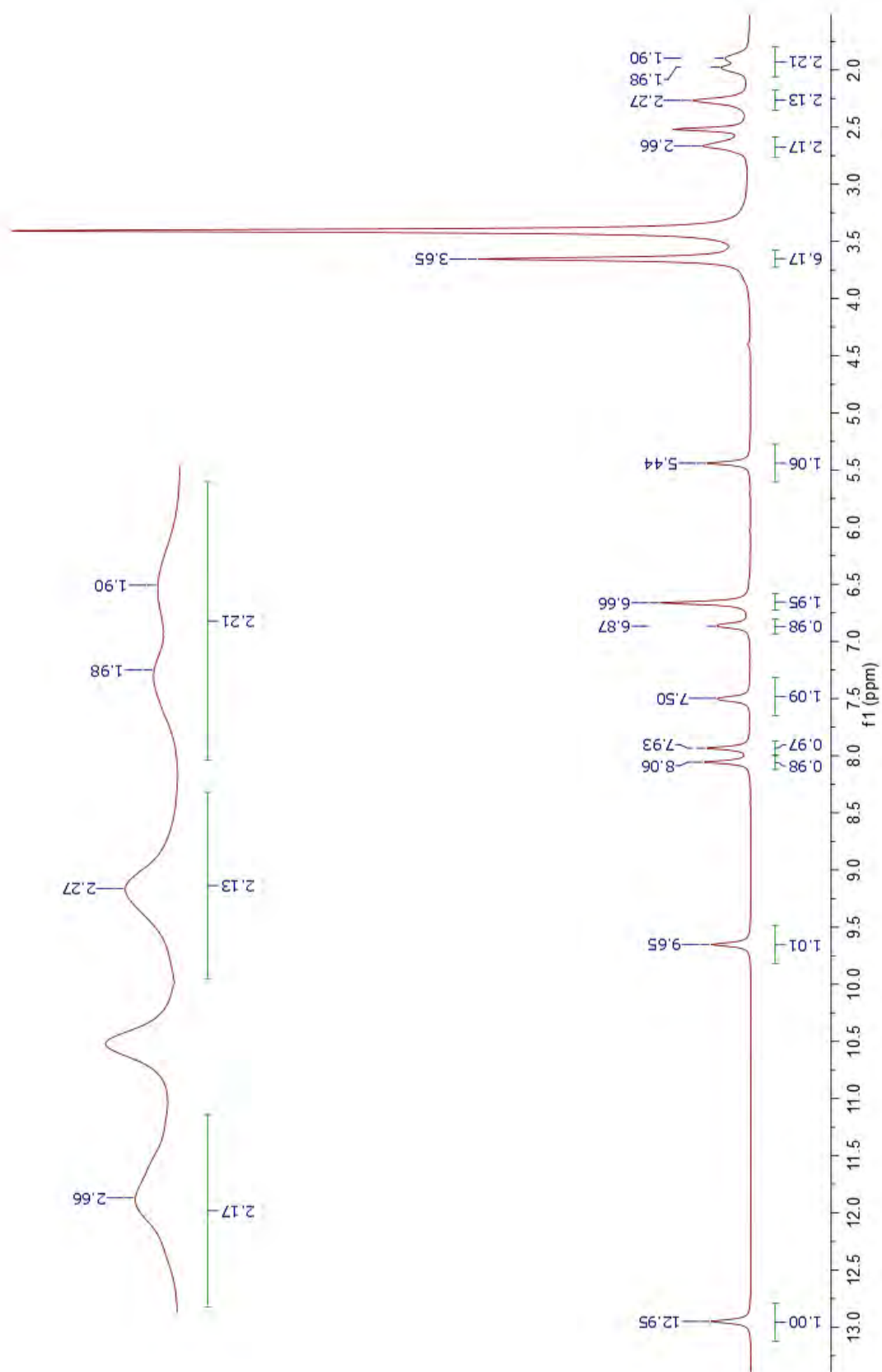
A.9 ¹H-RMN - 5



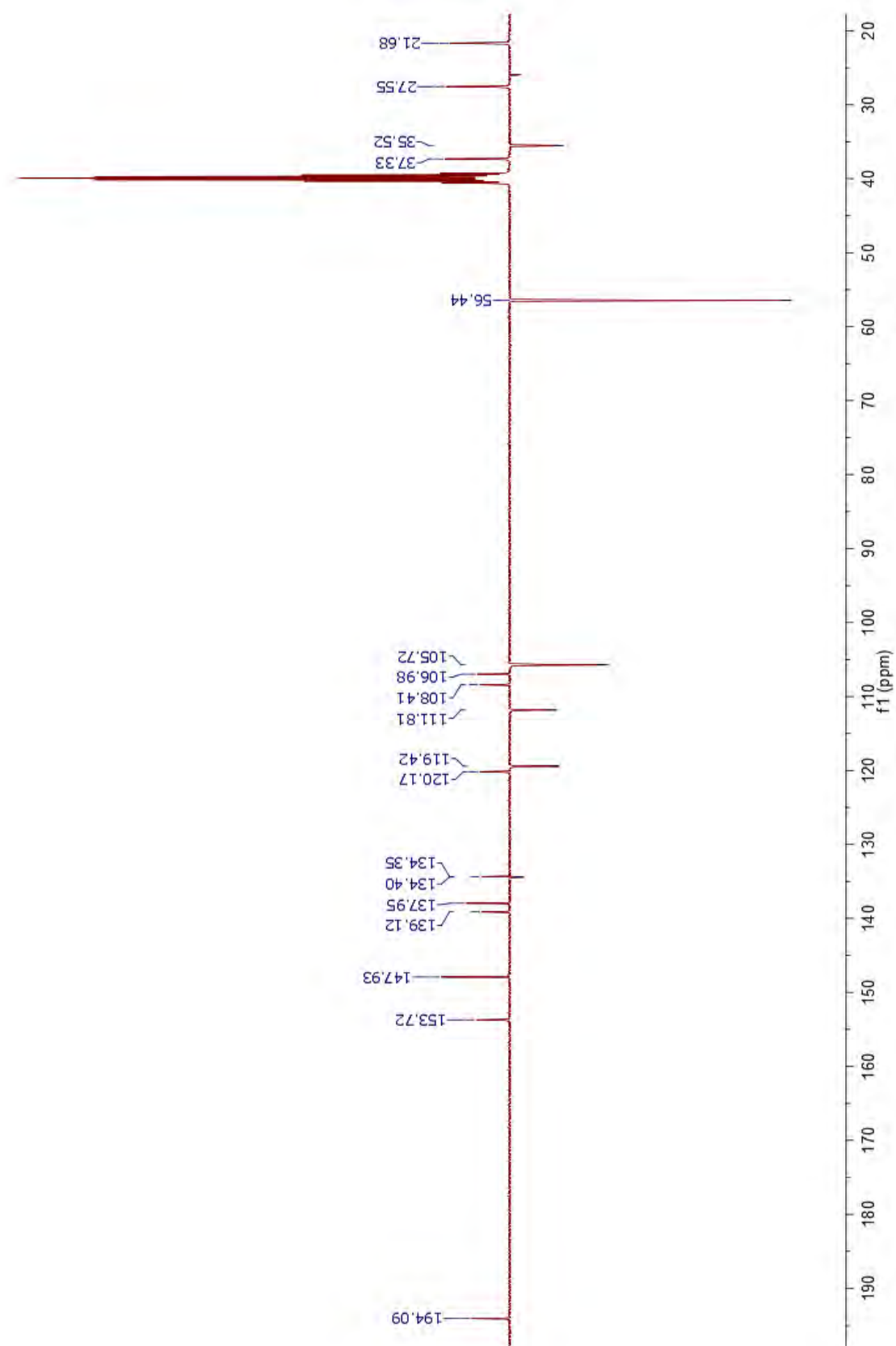
A.10 ^{13}C -RMN - 5



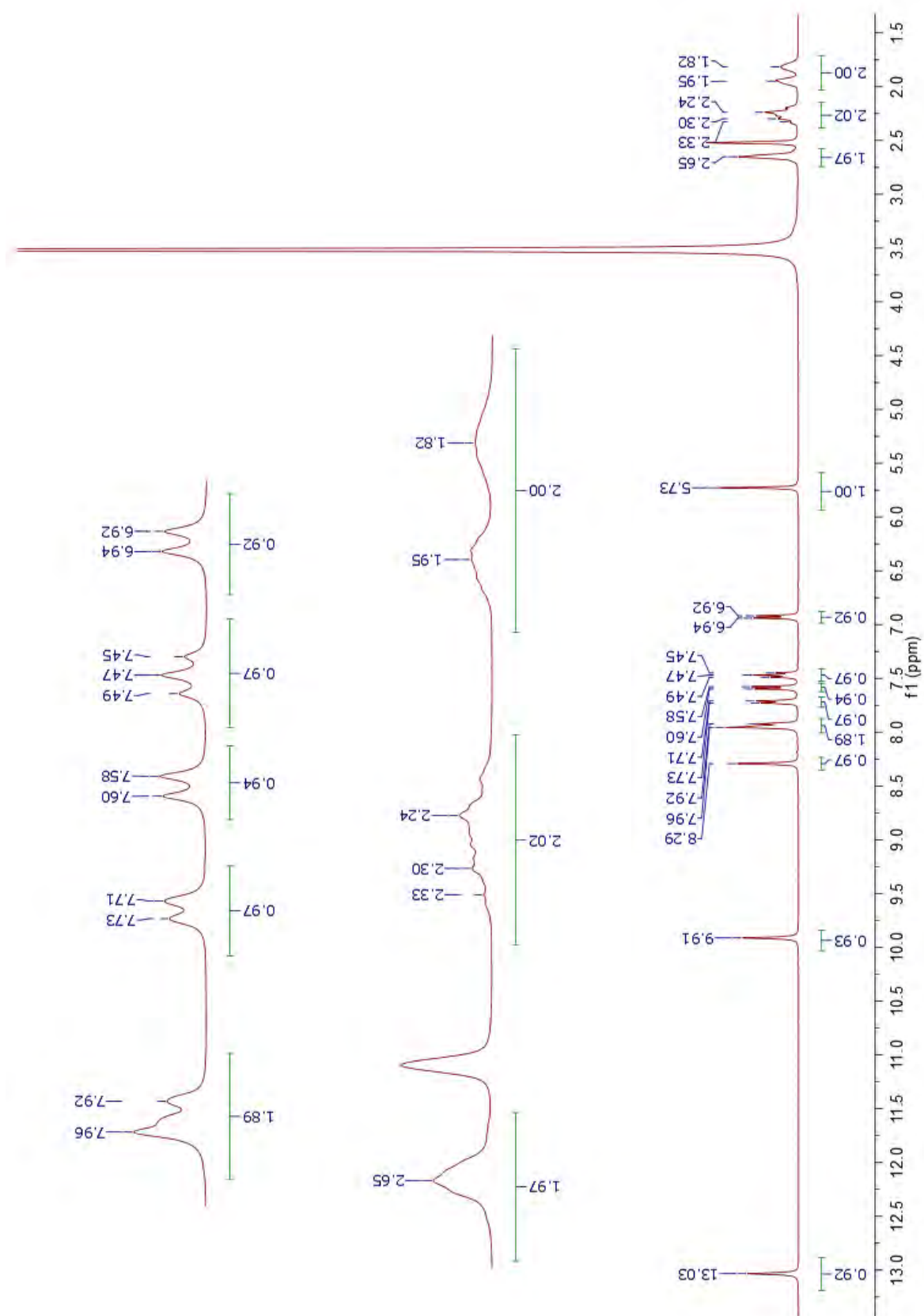
A.11 ¹H-RMN - 6



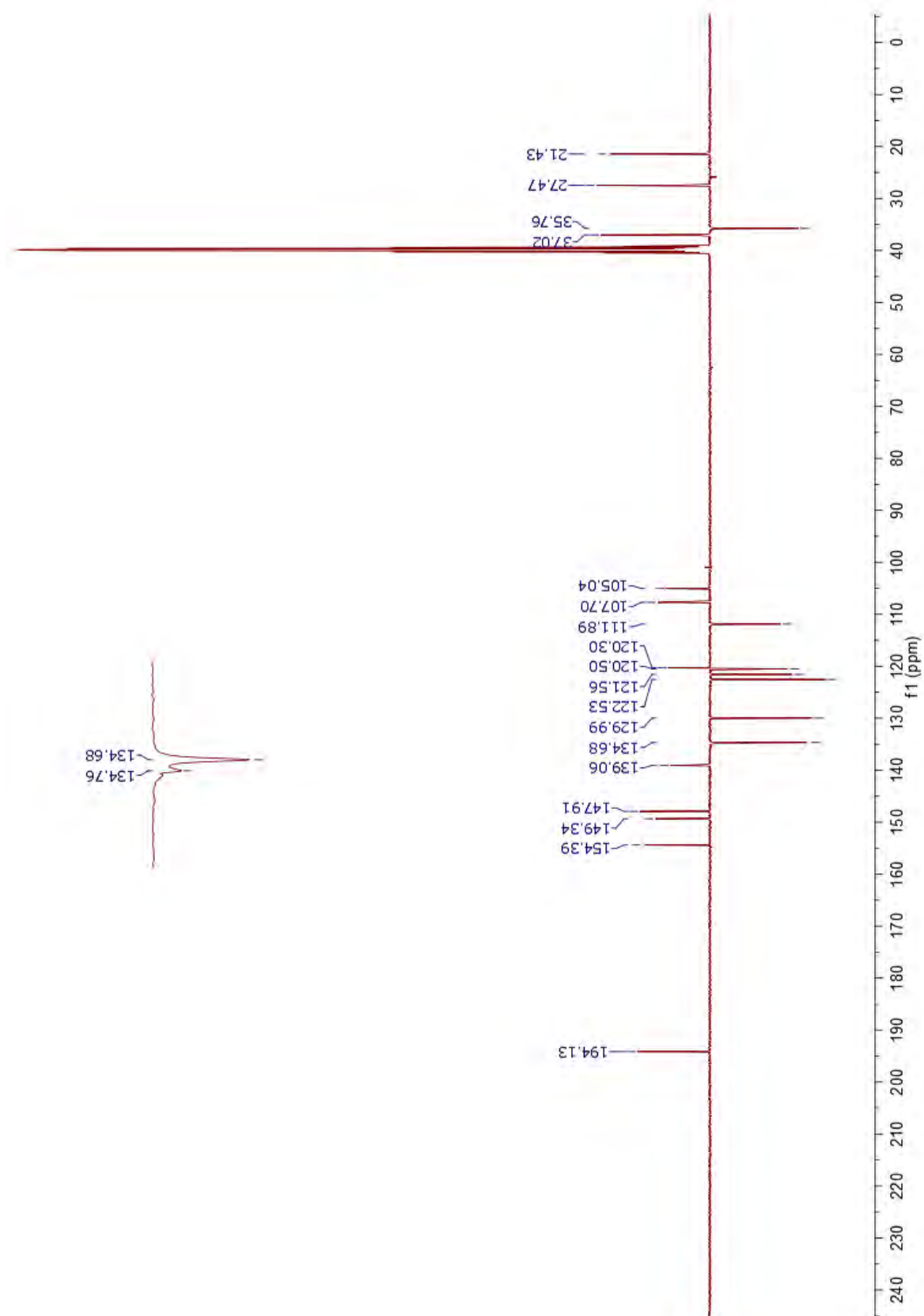
A.12 ^{13}C -RMN - 6



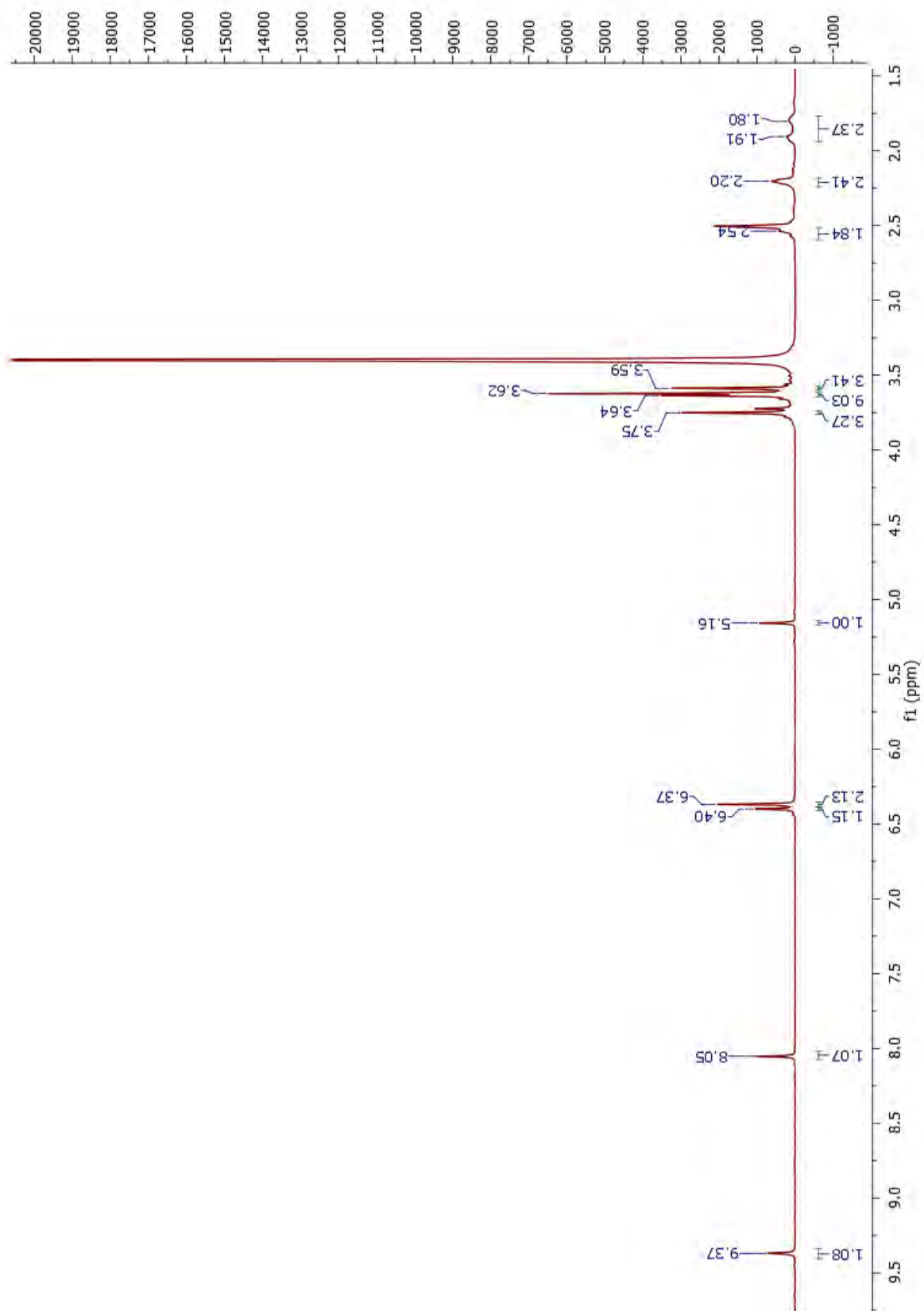
A.13 ^1H -RMN - 7



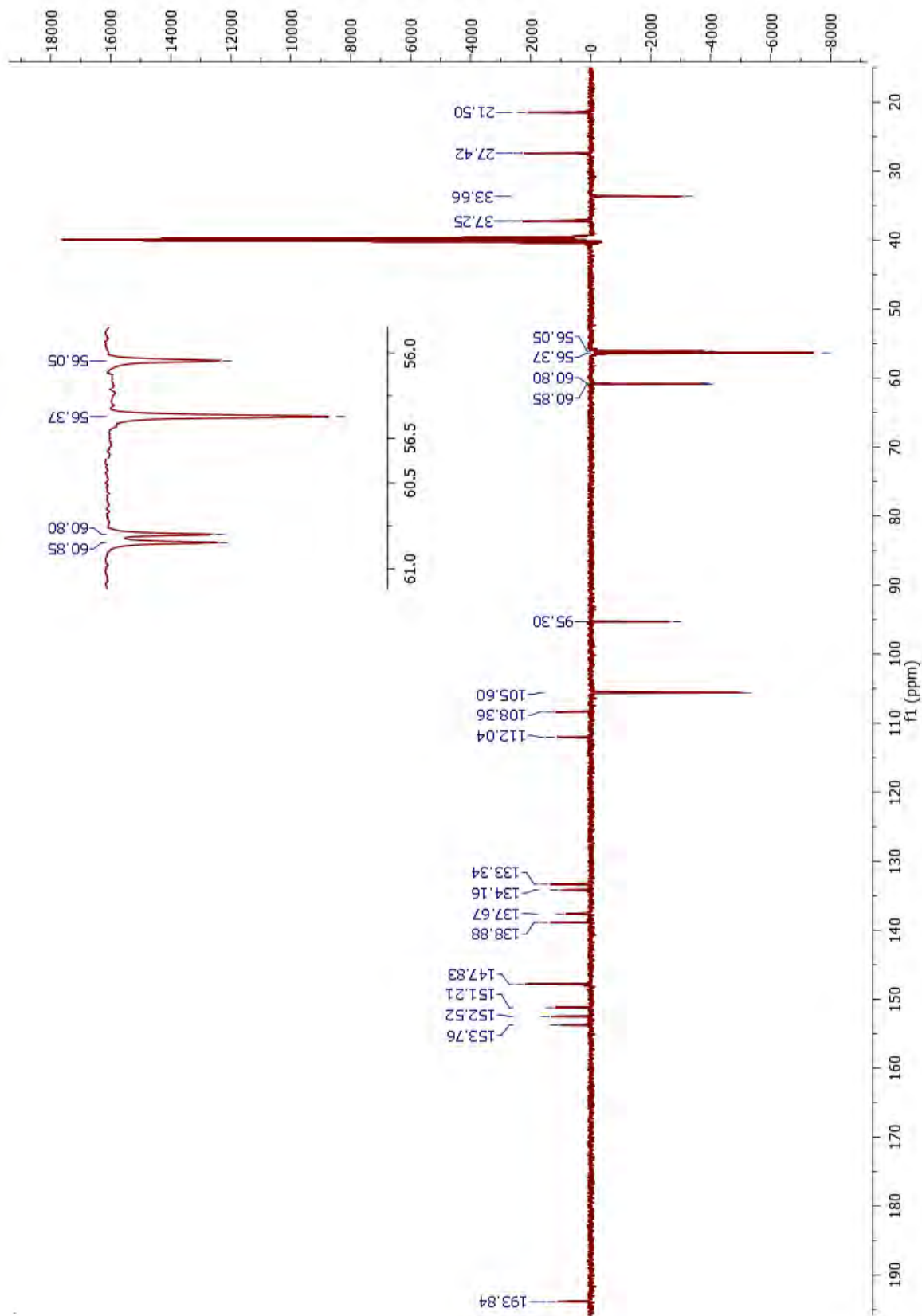
A.14 ^{13}C -RMN - 7



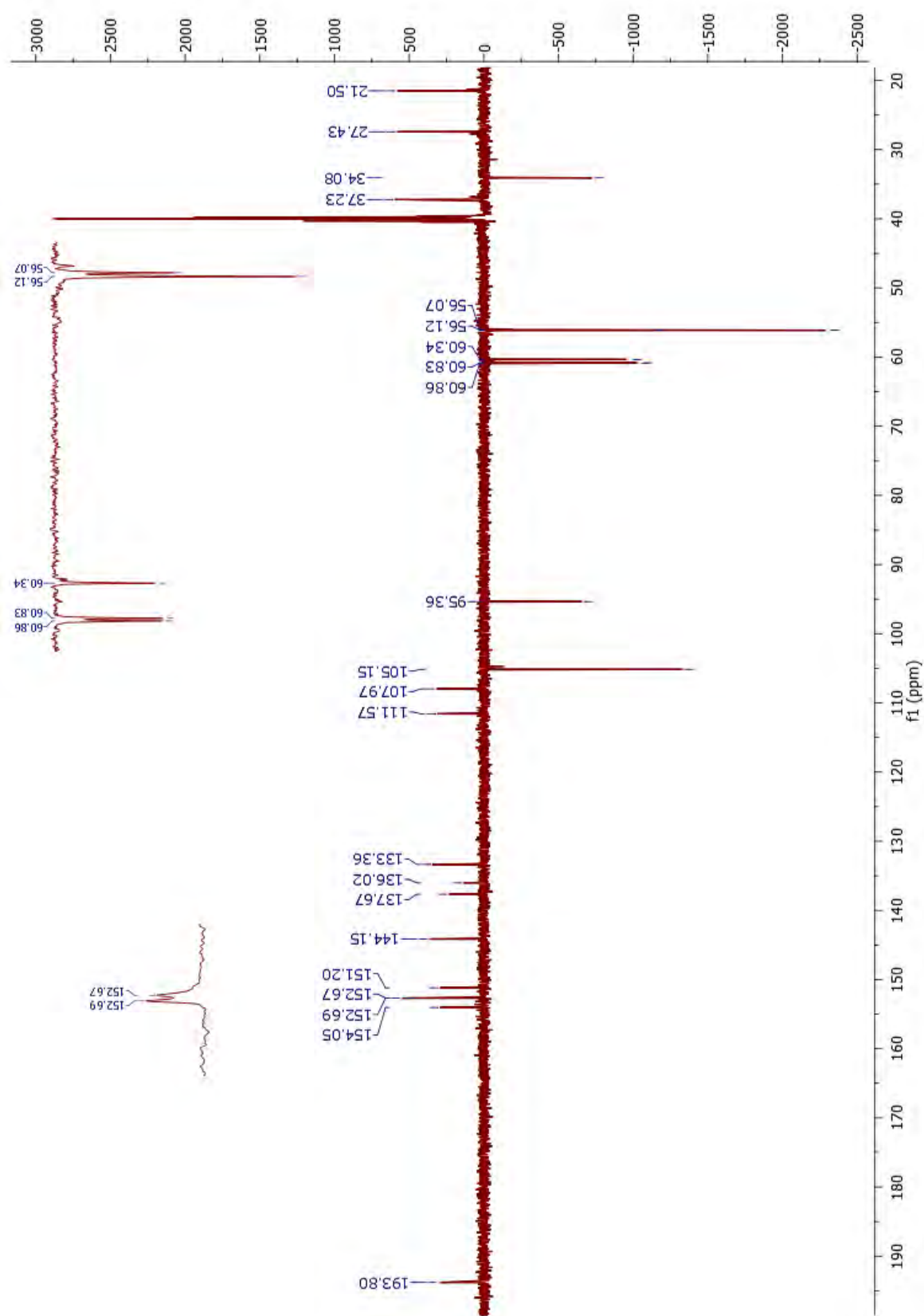
A.15 ^1H -RMN - 8



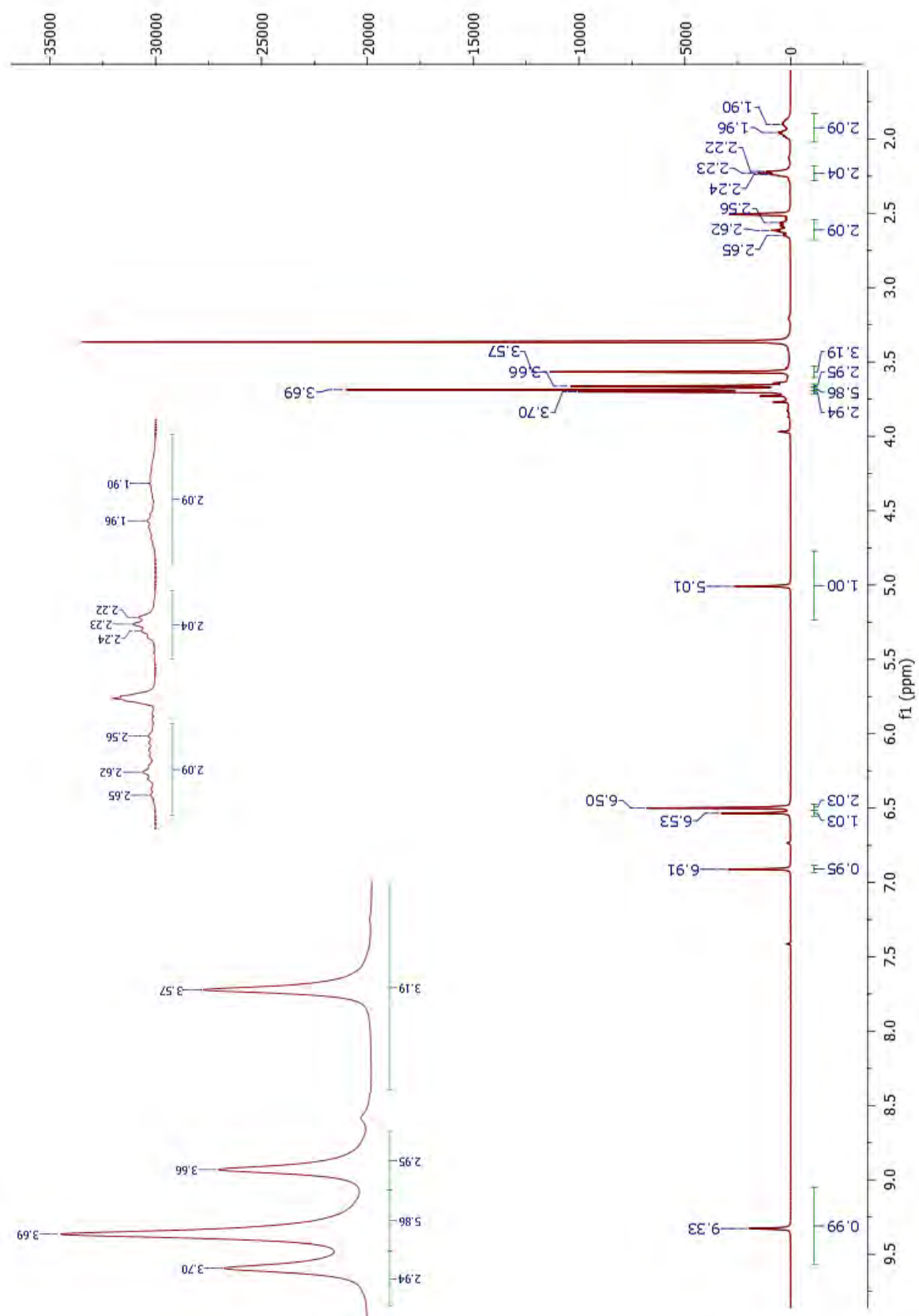
A.16 ^{13}C -RMN - 8



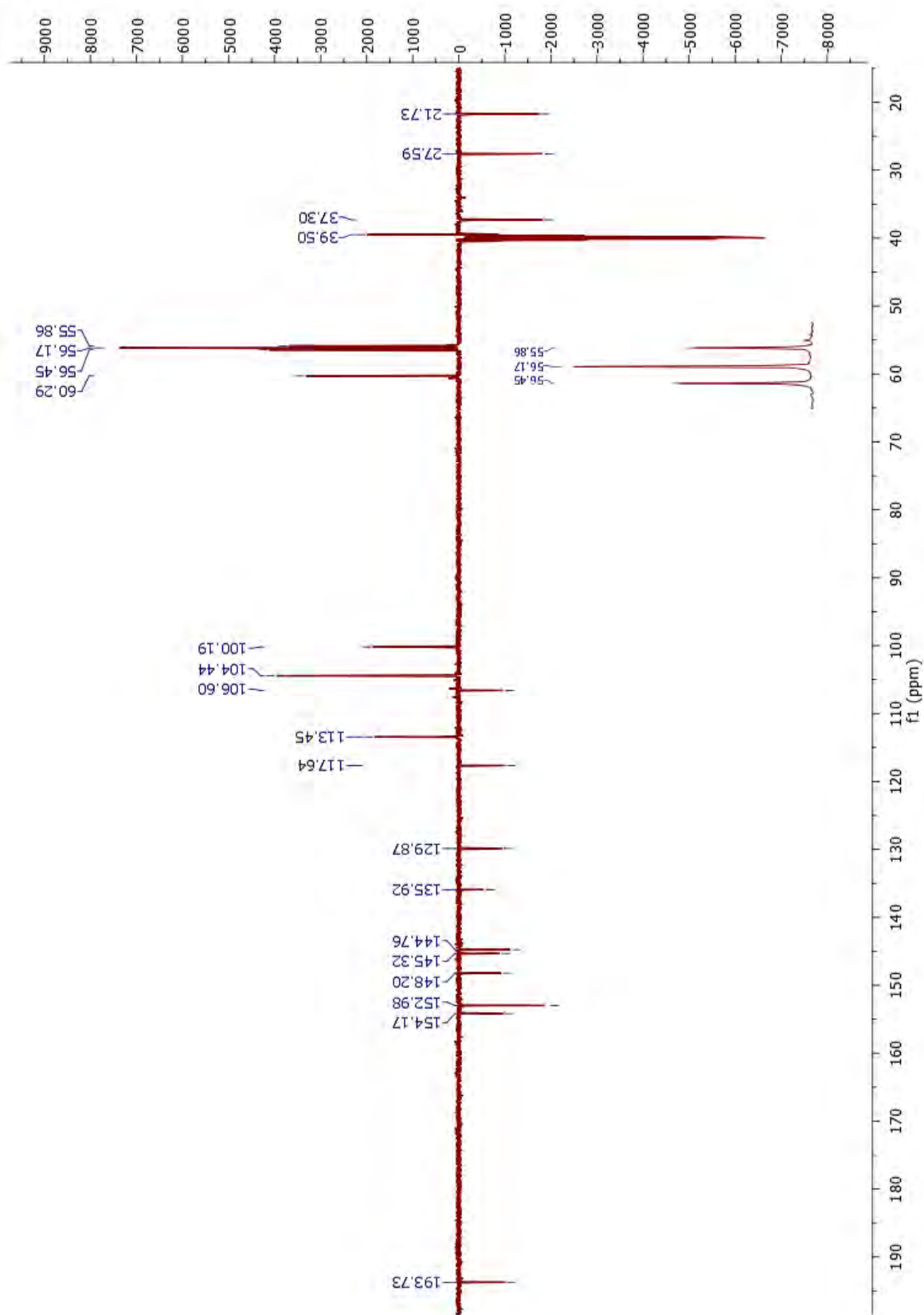
A.18 ^{13}C -RMN - 9



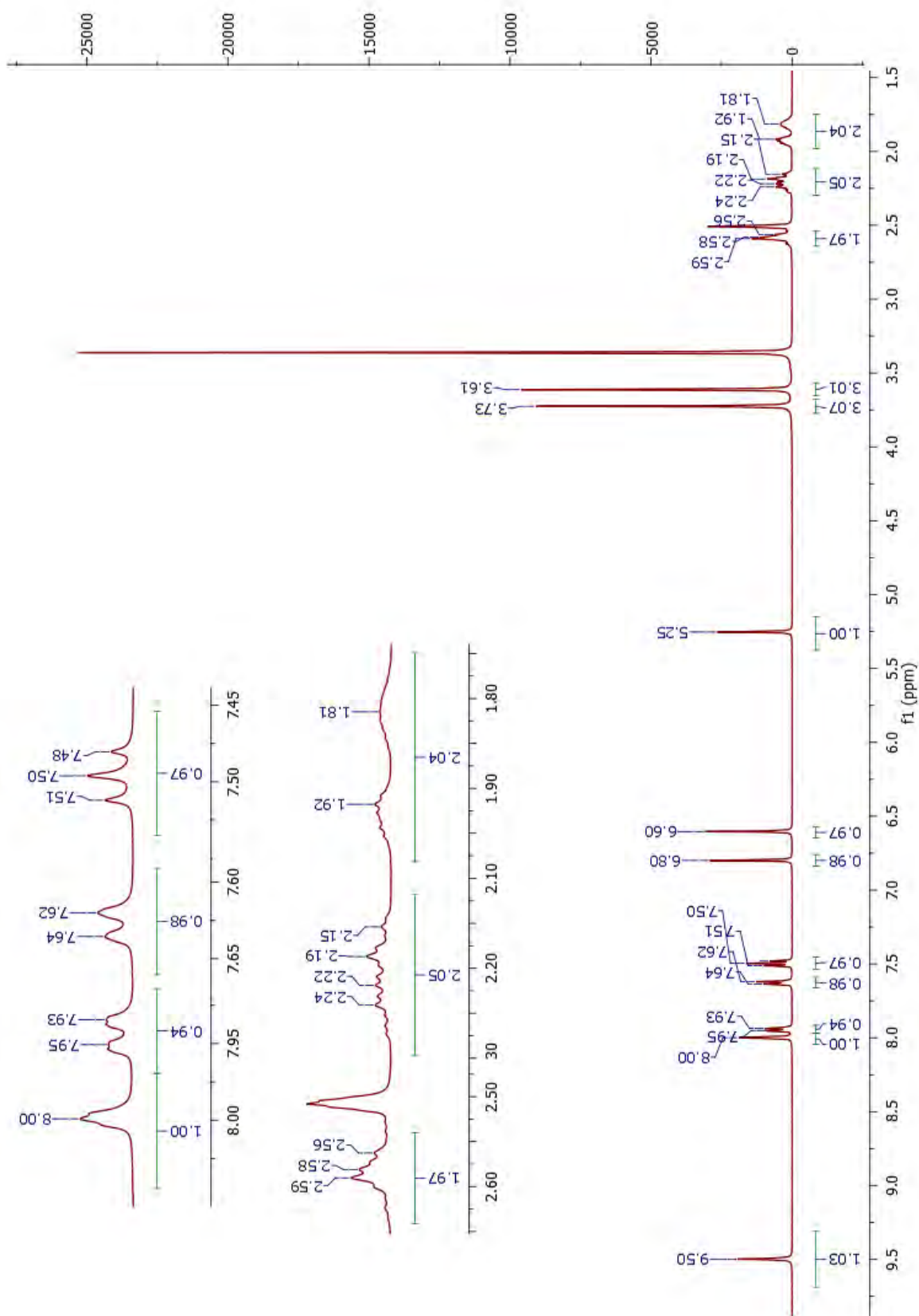
A.19 ¹H-RMN - 10



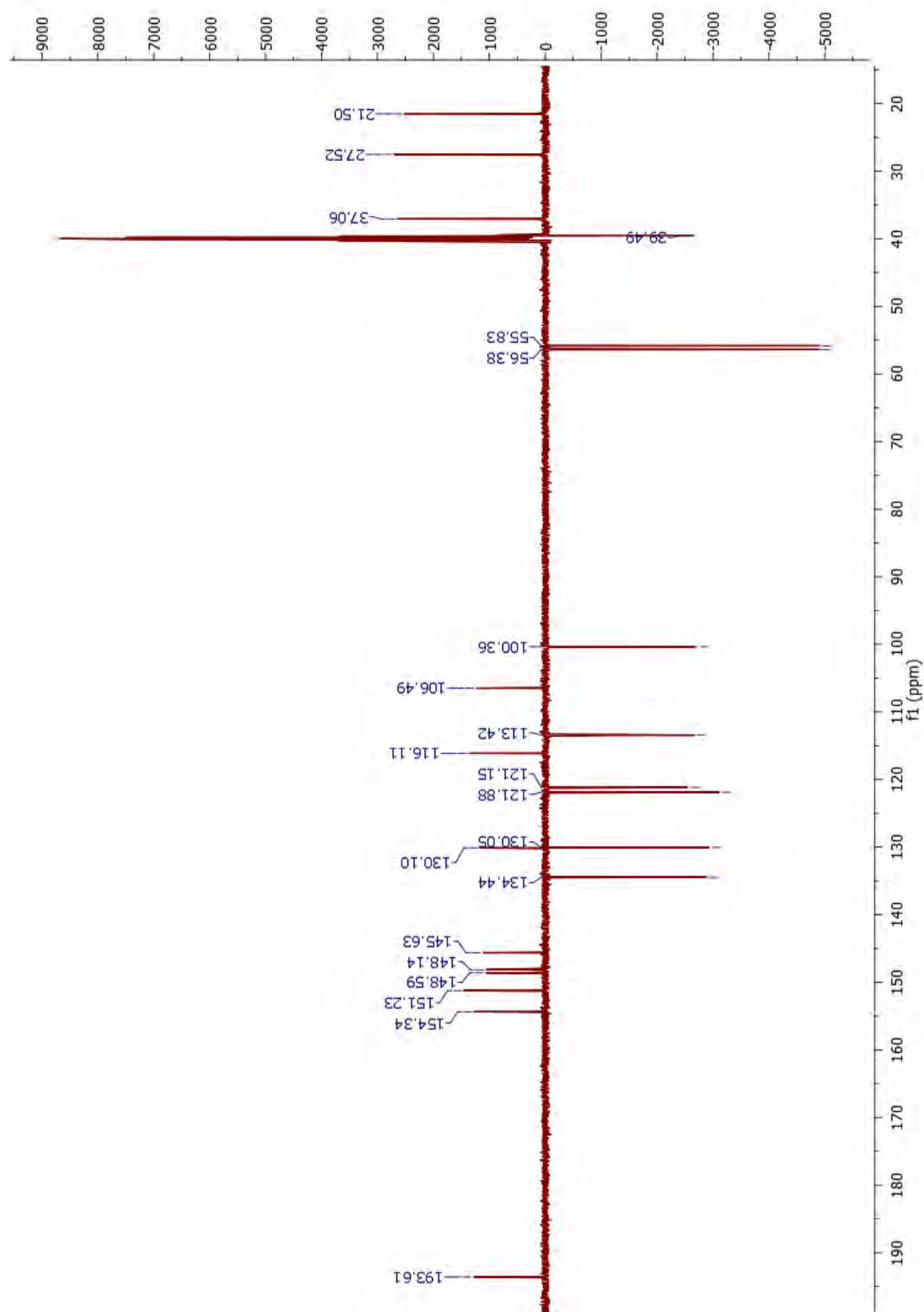
A.20 ¹³C-RMN - 10



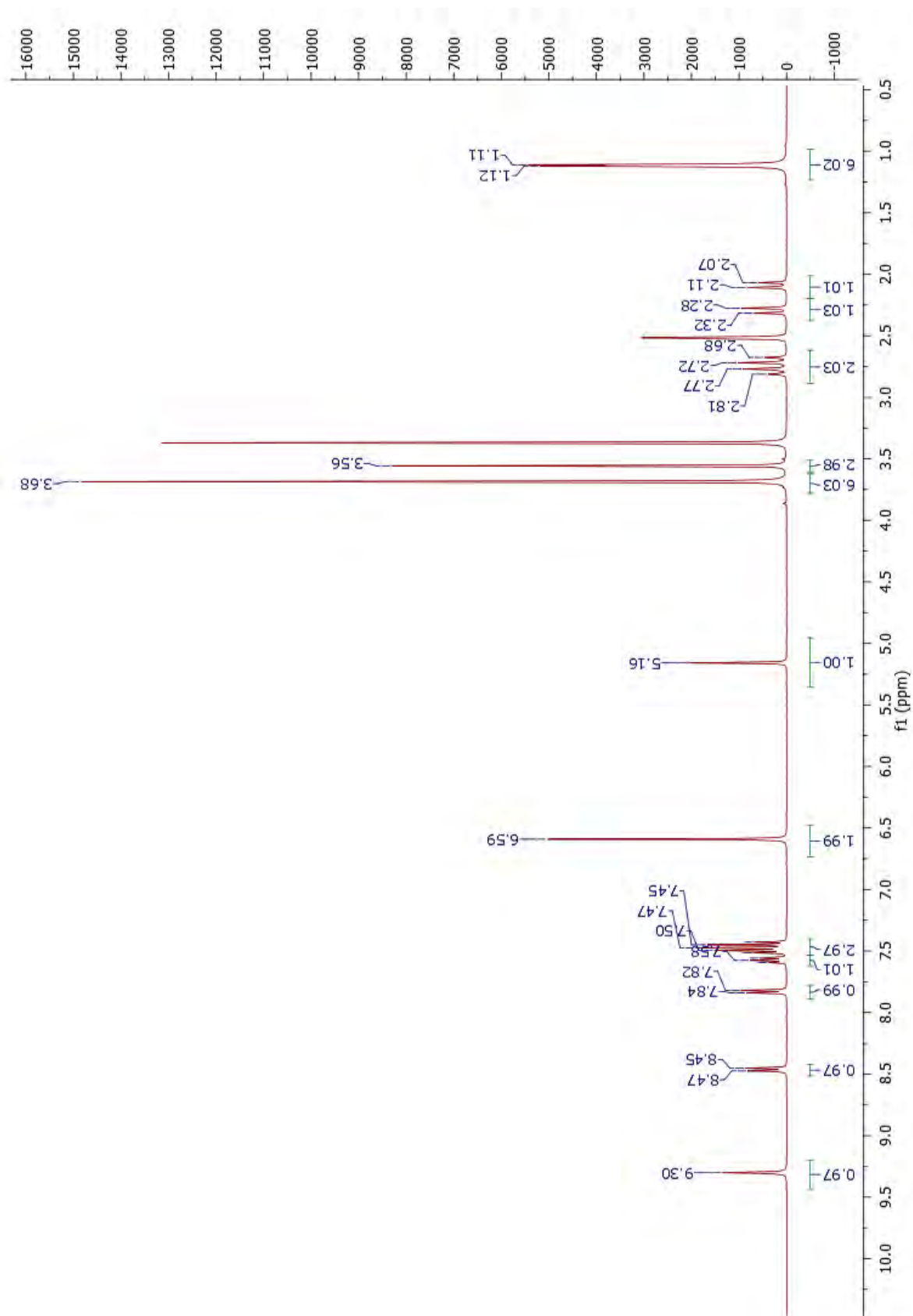
A.21 ¹H-RMN - 12



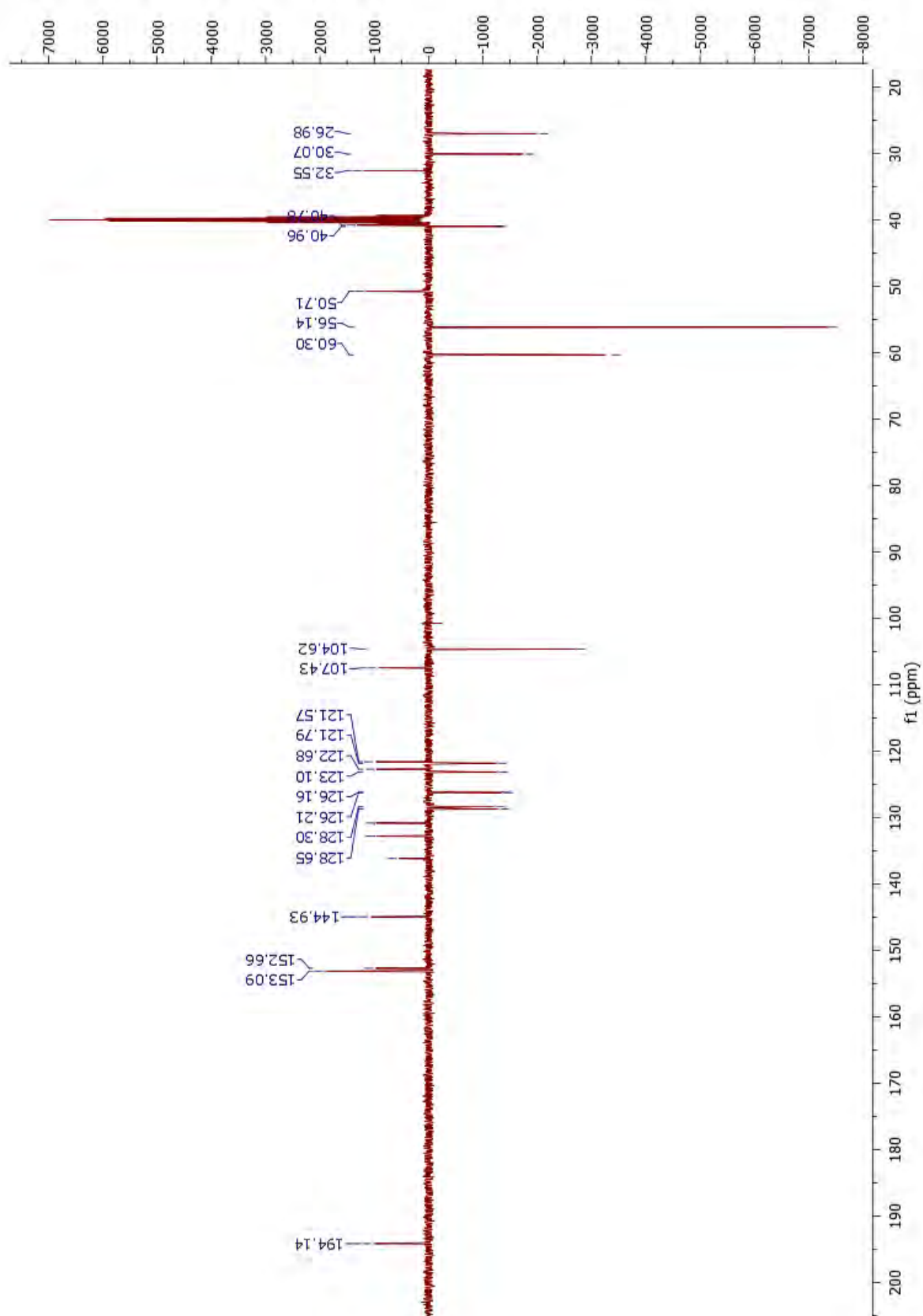
A.22 ^{13}C -RMN - 12



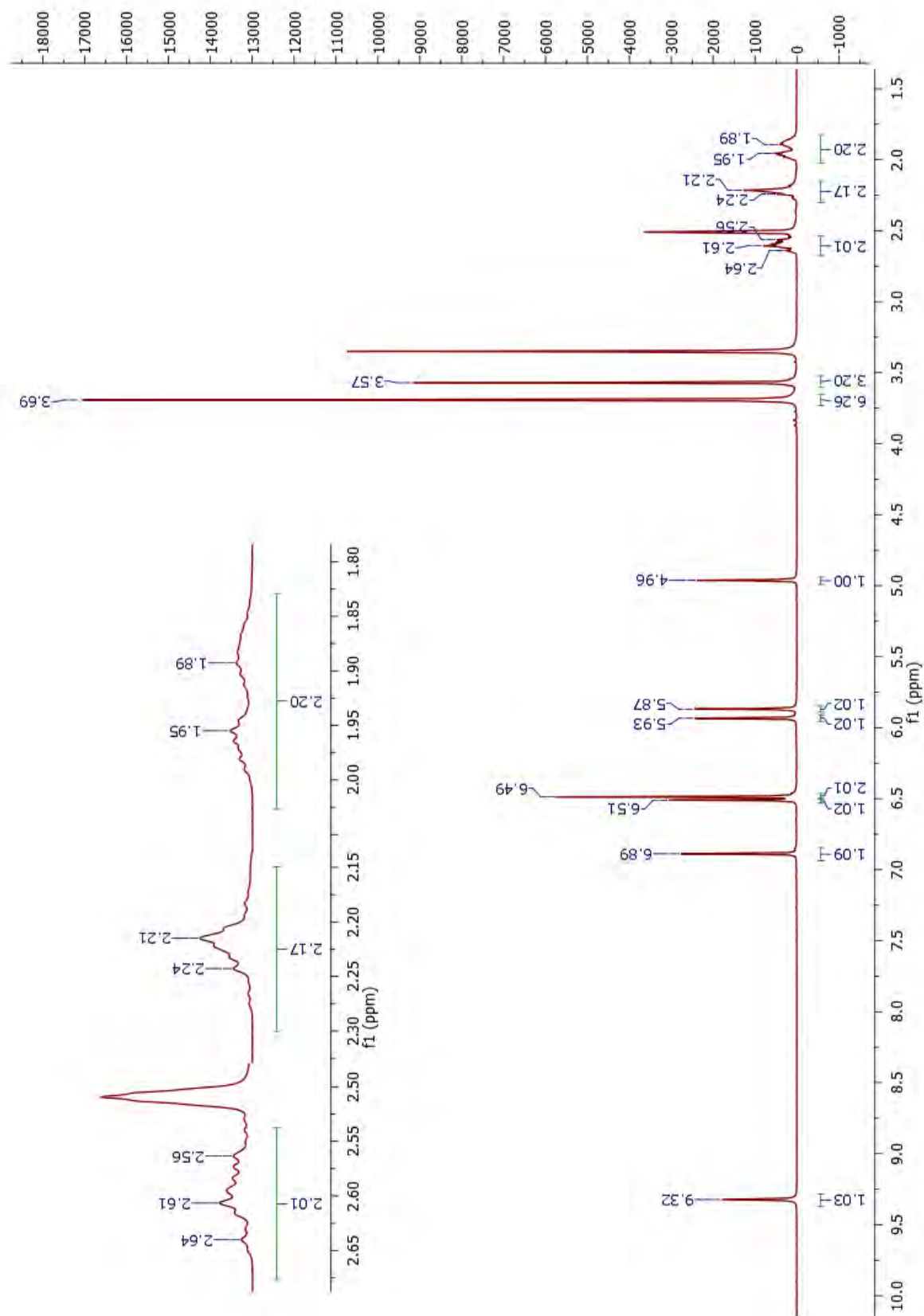
A.23 ^1H -RMN - 19



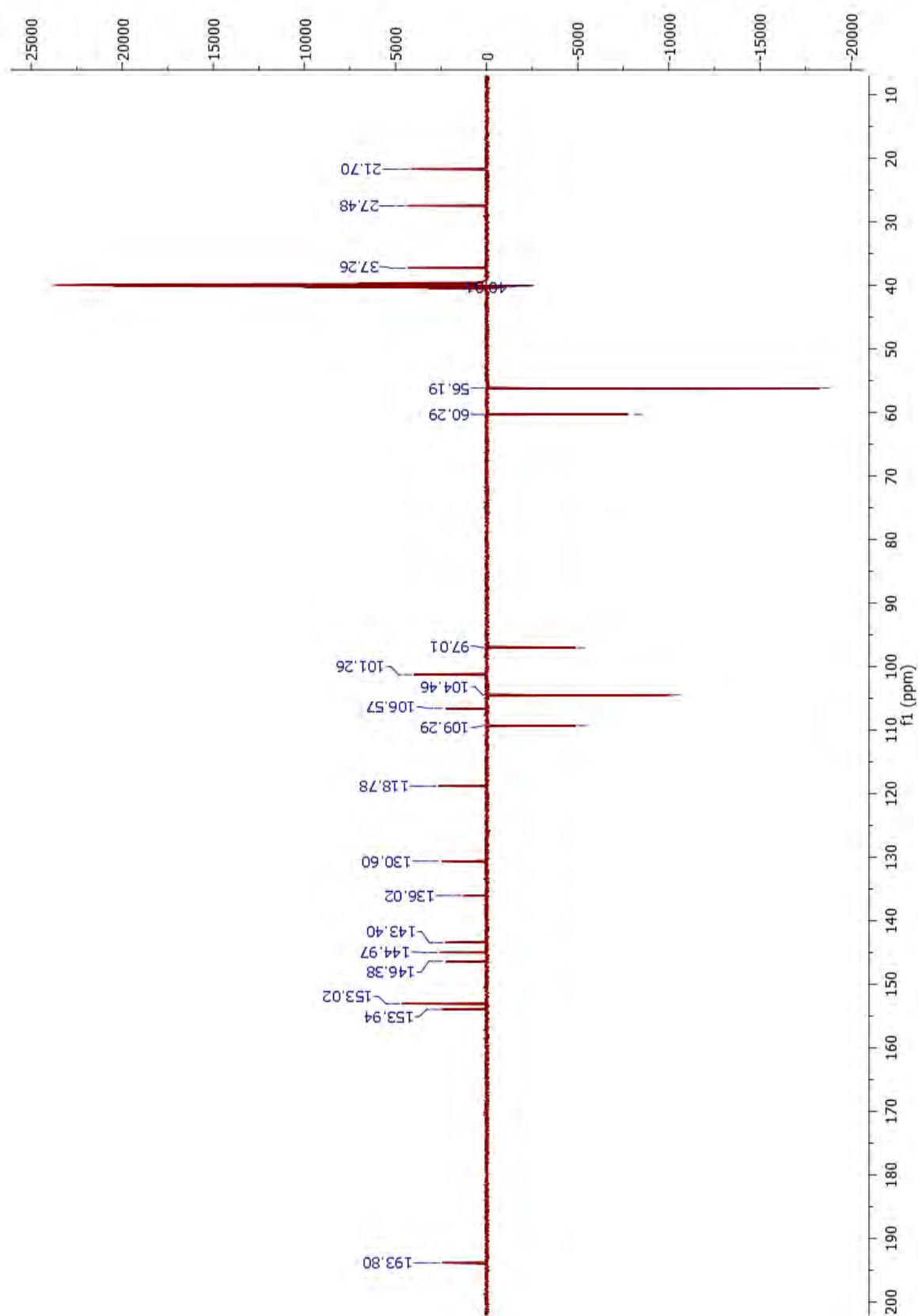
A.24 ¹³C-RMN - 19



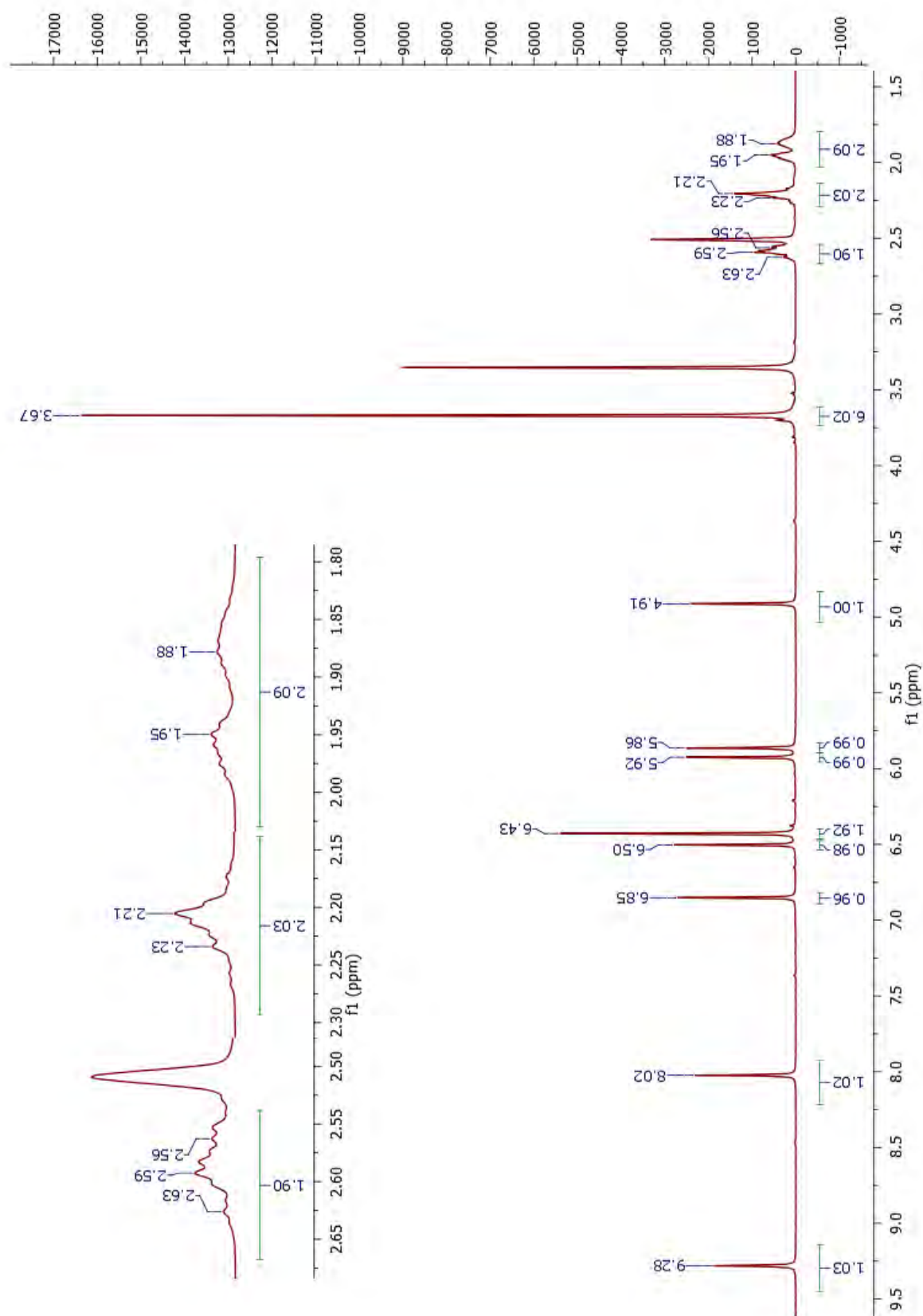
A.25 ¹H-RMN - 21



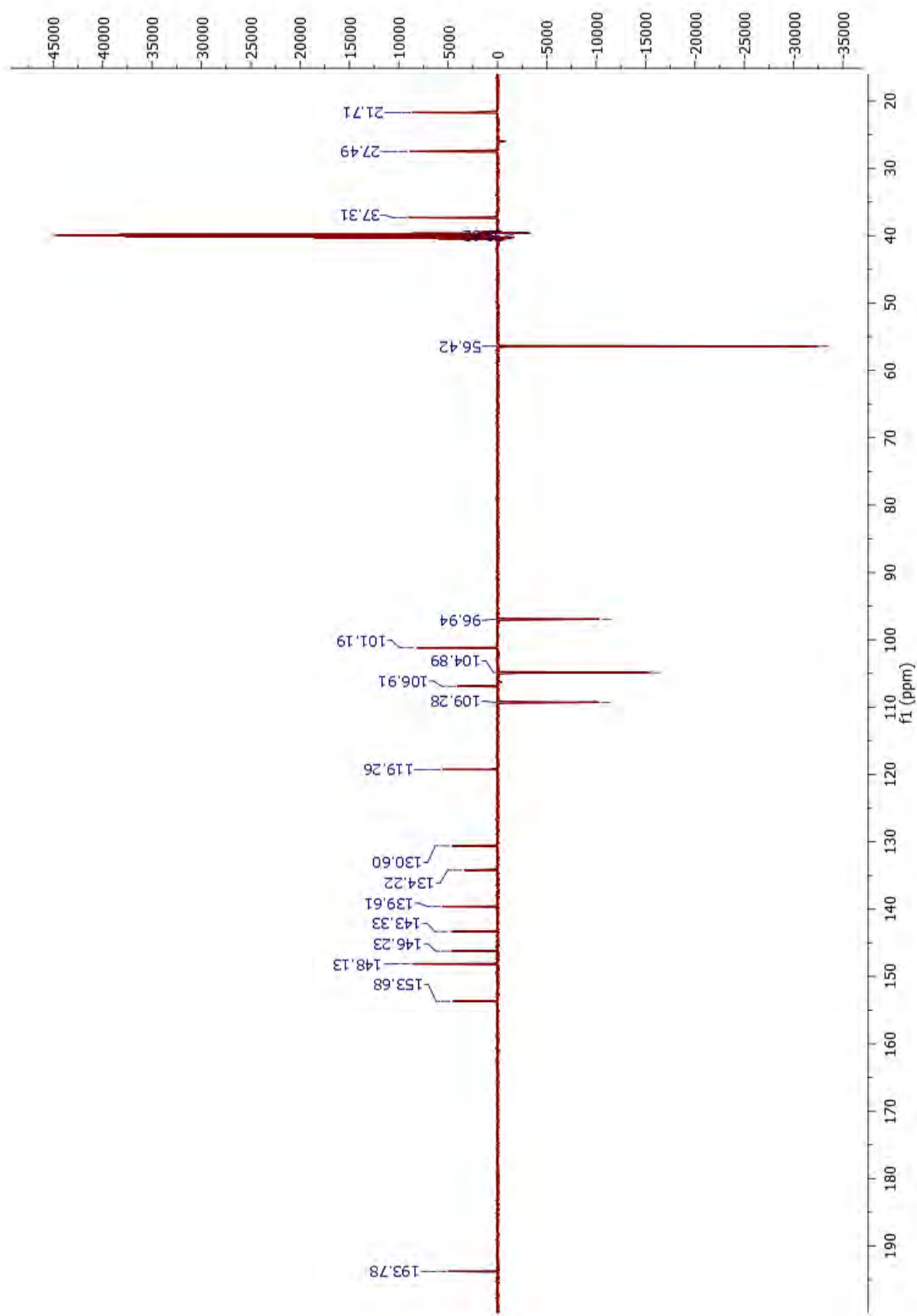
A.26 ¹³C-RMN - 21



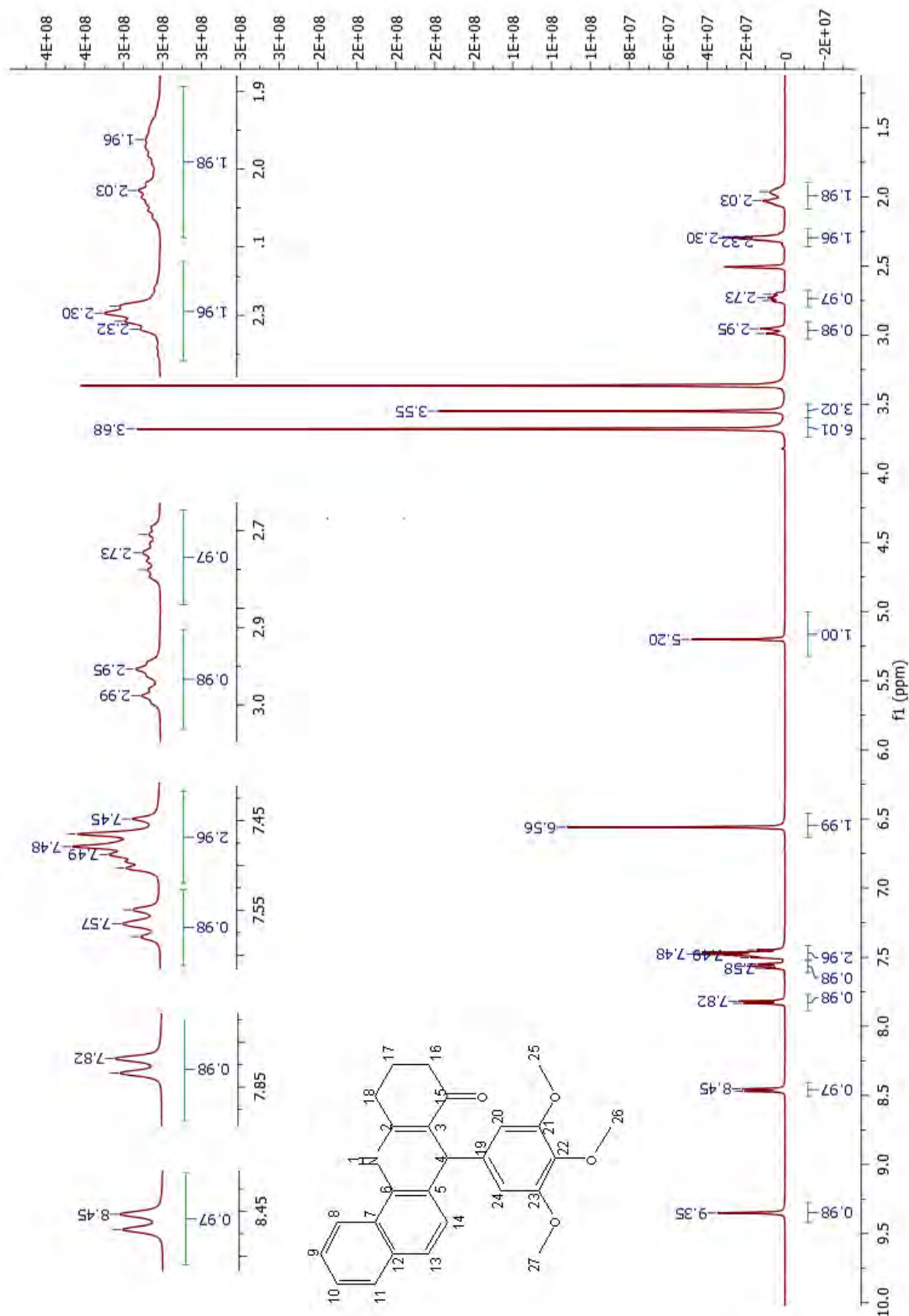
A.27 ¹H-RMN - 22



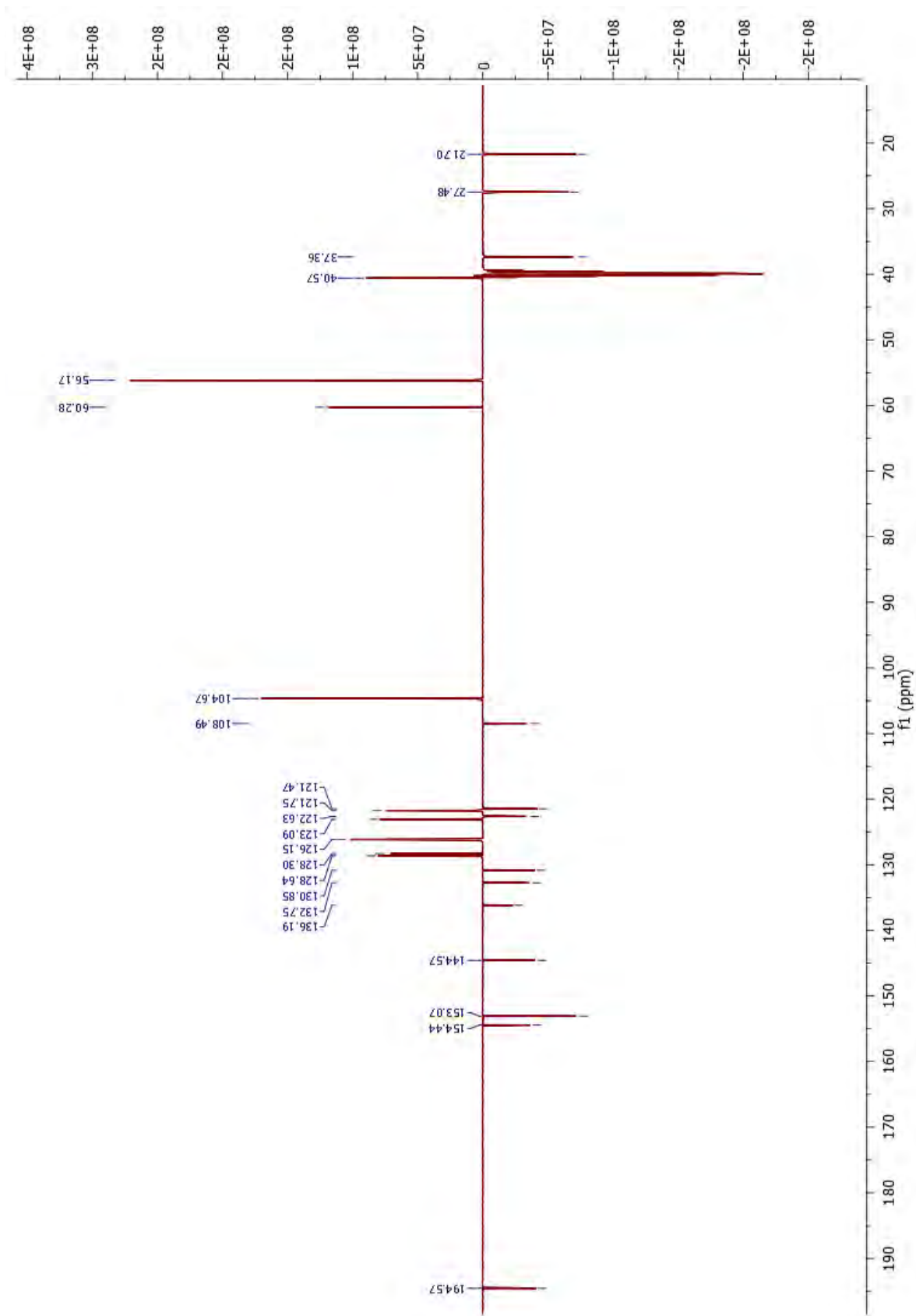
A.28 ¹³C-RMN - 22



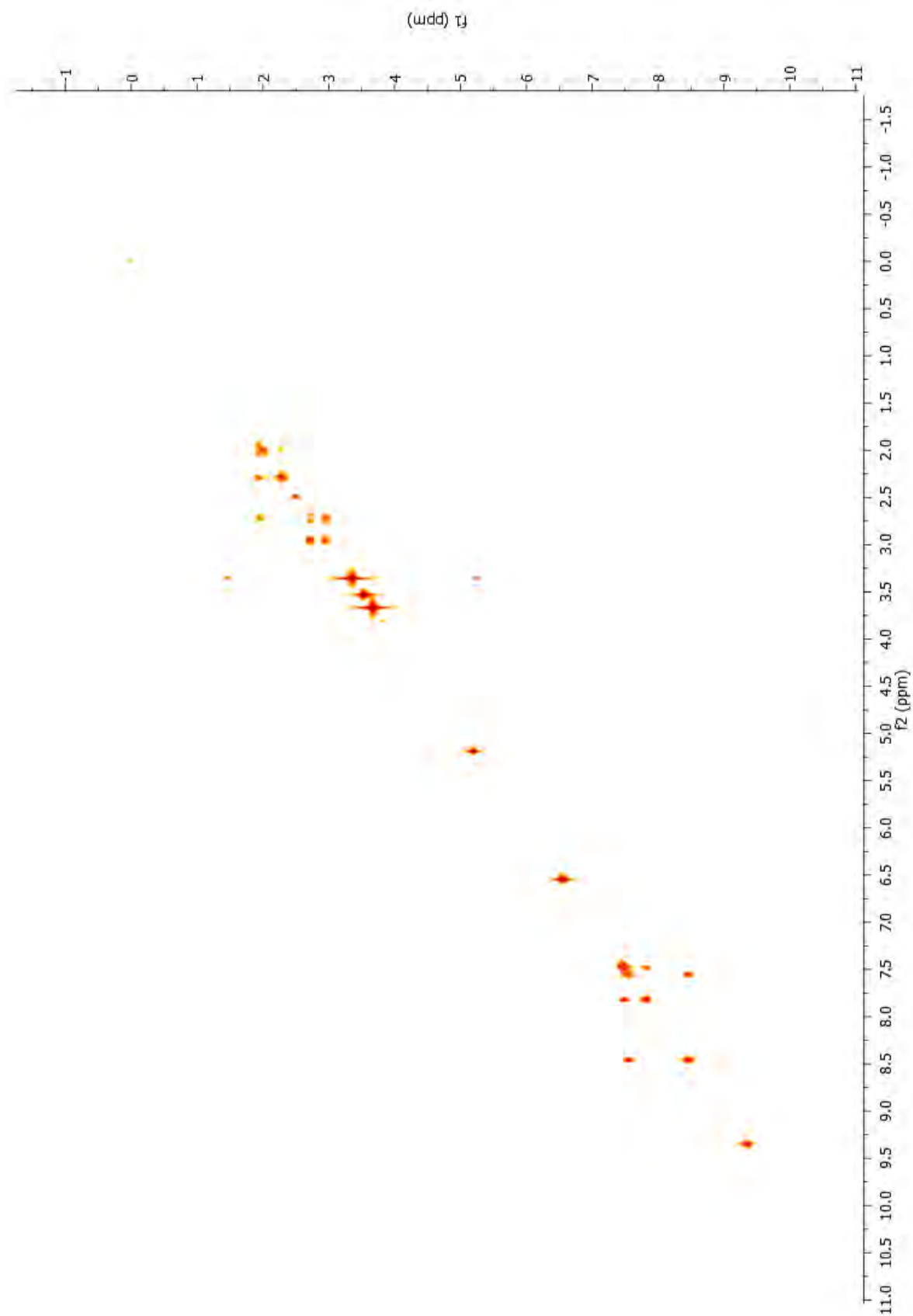
A.29 ¹H-RMN - LDQMC-014



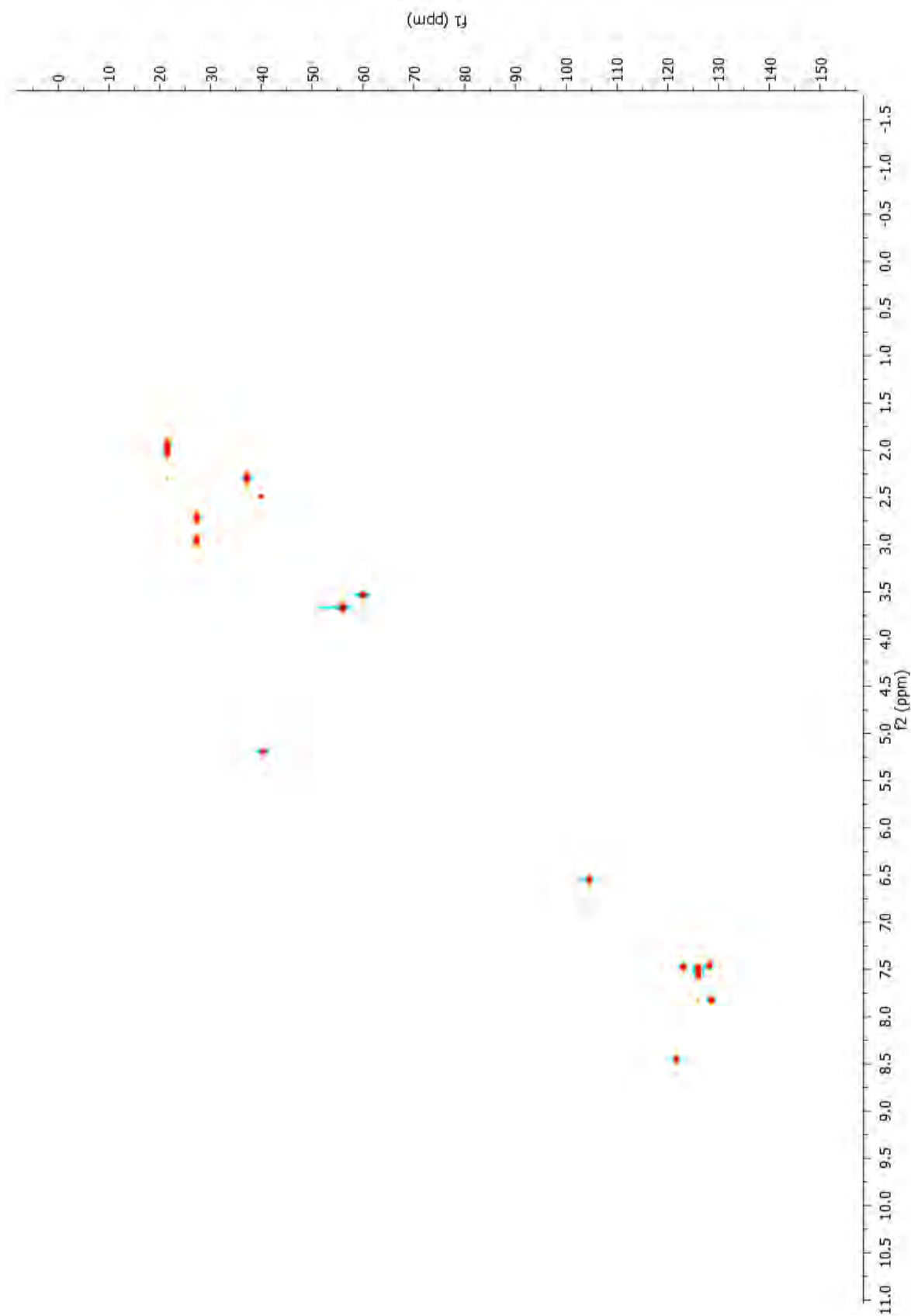
A.30 ¹³C-RMN - LDQMC-014



A.31 COSY - LDQMC-014



A.32 ^1H - ^{13}C HSQC - LDQMC-014



A.33 ^1H - ^{13}C HMBC - LDQMC-014

