



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Alessandra Mascarello

**Busca racional por moléculas bioativas em modelos de diabetes,
leucemia e tuberculose**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica
Ênfase: Química Medicinal

Florianópolis - SC
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mascarello, Alessandra

Busca racional por moléculas bioativas em modelos de diabetes, leucemia e tuberculose [tese] / Alessandra Mascarello ; orientador, Ricardo José Nunes ; co-orientador, Rosendo Augusto Yunes. - Florianópolis, SC, 2012.

256 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. leucemia. 3. tuberculose. 4. glicemia. I. Nunes, Ricardo José. II. Yunes, Rosendo Augusto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Alessandra Mascarello

**Busca racional por moléculas bioativas em modelos de diabetes,
leucemia e tuberculose**

Esta Tese de Doutorado foi julgada e aprovada para obtenção do título
de **Doutor em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química**
da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 14 de dezembro de 2012

Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Orientador

Prof. Dr. Rosendo Augusto
Yunes
Co-Orientador

Prof. Dr. Wilson Joao Cunico Filho
(CCQFA-UFPeI, Relator)

Prof. Dr. José Daniel
Figueroa-Villar
(DQ-IME-RJ)

Profa. Dra. Inês Maria Costa
Brighente
(QMC-UFSC)

Profa. Dra. Tânia Beatriz
Creczynski-Pasa
(CIF-UFSC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valdecir e Salete, por todo o amor, esforço e companheirismo, por me ensinarem os valores essenciais e por irradiarem de luz o meu viver.

A toda minha família, em especial, meu irmão Luís; meus avós Luiz e Graciosa; meu namorado Marco, minha prima Gabriela e minha madrinha Rose, por todo o carinho e amor, sem os quais meus objetivos não teriam sido alcançados.

Ao meu orientador, prof. Ricardo José Nunes e co-orientador Rosendo Augusto Yunes, por todo o tempo dedicado, fios de cabelos brancos, aceleramentos cardíacos e compreensão, me ensinando muito mais do que eles mesmos possam imaginar.

Ao grupo de pesquisa Estrutura e Atividade: Taisa, Pedro, Marlon, Paulo, Bruna, Luiz, Karin e Jorge, em especial: às colegas Louise e Patrícia que me ajudaram com suas contribuições científicas e pessoais e tornaram-se duas grandes amigas para todos os momentos.

Aos professores Dr. Hernán Terenzi, Dra. Fátima Mena Barreto Silva, Dr. José Andres Yunes, Dr. Adriano Defini Andricopulo, Dr. Andreas Vogt e em especial, Dr. Bruno Botta, Dr. Franco Delle Monache e Dr. Maurizio Botta, meus co-orientadores no período de doutorado-sanduíche na Itália, que cederam disposição, tempo, laboratório, materiais e valiosos conhecimentos, sou muito grata a vocês e respectivos grupos de pesquisa, em especial à Msc. Marisa Frederico, à Dra. Louise Domeneghini Chiaradia, à Msc. Angela Menegatti, a Dr. Livia Salum, ao Msc. Rafael Canevarolo e ao Dr. Mattia Mori.

Aos professores Dr. Wilson João Cunico Filho, Dr. José Daniel Figueroa-Villar, Dra. Inês Maria Costa Brighente, Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa e Dr. José Carlos Gesser membros da banca, por terem aceito o convite.

A todos os meus amigos-irmãos, sem nominar, que tornam os meus dias mais alegres e minha caminhada mais prazerosa e cheia de sorrisos. Aos meus amigos italianos, em especial Selma e Carmine que foram a minha segunda família neste período de além-mar. E aos demais, e não menos importante, que conheci nas Universidades que passei (sejam elas as científicas ou as da vida) e que, por algum motivo devo agradecer porque fizeram parte do meu dia-a-dia, compartilhando conhecimentos, congressos, horas de estudos, festas e momentos inesquecíveis.

Ao Departamento de Química da UFSC e a Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelas análises espectroscópicas.

Ao CNPq pelo suporte financeiro no Brasil e a CAPES pelo suporte financeiro na Itália.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese.

“Quem tem um ‘porquê’ enfrenta qualquer ‘como’”
Viktor Emil Frankl

RESUMO

Esta tese apresenta o desenho racional de moléculas bioativas baseadas na estrutura de fármacos (ou moléculas comprovadamente ativas) e está subdividida em três capítulos de acordo com cada doença-alvo: 1) *diabetes*; 2) *leucemia* e 3) *tuberculose*.

No capítulo 1, foram planejadas e sintetizadas sulfonamidas e sulfonil(tio)uréias, baseadas na estrutura da glibenclamida, aplicando a estratégia de bioisosterismo para obtenção de potenciais agentes hipoglicemiantes, num total de 22 compostos sintetizados, sendo 15 inéditos. A sulfonamida **5** (desenhada a partir do fragmento da glibenclamida), substituída com o grupo *p*-metóxi no anel A, mostrou a mais pronunciada atividade entre todos os compostos analisados neste capítulo em ambos modelos, *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos para este composto sugerem que o mecanismo nas ilhotas pancreáticas envolve a diminuição na permeabilidade ao potássio na membrana de células- β , causando assim uma despolarização e ativando a proteína quinase C (PKC), que leva a ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) e captação de cálcio, que pode culminar na liberação de insulina. Demonstrando que o composto **5** pode contribuir para a homeostase da glicose, uma vez que é equipotente como a glibenclamida, mas sem provocar sobrecarga das células- β nos processos de secreção.

No capítulo 2, foram sintetizadas quatro classes de compostos: acilhidrazonas, oxadiazóis, imidas e tiazolidinonas baseadas nos fármacos colchicina e combretastatina A-4, num total de 62 moléculas, sendo 34 estruturas inéditas. Foram identificados 7 compostos com atividade anti-leucêmica na faixa de nanomolar, sendo o **29** o composto mais potente, com atividade de 15nM frente às células da linhagem Jurkat e de 25nM em células REH, apresentando baixa toxicidade para células normais, e como mecanismo de ação, a inibição da tubulina.

No capítulo 3, apresenta-se o primeiro estudo de *screening* virtual de bibliotecas de compostos na proteína tirosina fosfatase B (PtpB) de *Mycobacterium tuberculosis*, baseados na única estrutura de raio-X disponível PtpB:OMTS. Na primeira etapa, realizou-se o *screening* da biblioteca de produtos naturais com mais de 800 compostos resultando na identificação de vários potentes inibidores da PtpB, e através de estudos cinéticos identificamos a competitividade e seletividade do composto mais ativo Kuwanol E (K_i $1,6 \pm 0,1$ μ M). Os resultados obtidos a partir dos estudos *in silico* mostraram a alta correlação entre os resultados experimentais dos 7 mais potentes compostos (KuwE, PirIII,

Ega1, 6016, M2, Δ3 e Ac3) e respectivos resultados de *rescoring*. Em uma segunda etapa, foi analisada a biblioteca de compostos comerciais *Drugs Now* do banco de dados ZINC, com mais de 5 milhões de estruturas. Baseados na estrutura do inibidor OMTS gerou-se o farmacóforo e o *query* baseado no *shape* e no volume de sobreposição, e foram utilizados como filtros de seleção para posterior *docking e rescoring* dos compostos, resultando na seleção de 13 moléculas com alta diversidade estrutural.

Palavras-chave: sulfonamidas, sulfonil(tio)uréias, acil-hidrazonas, oxadiazóis, leucemia, hiperglicemia, tuberculose.

ABSTRACT

This thesis presents the rational design of bioactive molecules (or proved active molecules) based on the structure of drugs and it is divided into three sections according to each disease-target: 1) diabetes, 2) leukemia and 3) tuberculosis.

In Chapter 1, sulfonamides and sulfonyl(thio)ureas were designed and synthesized, all based on the structure of glibenclamide, applying the bioisosterism strategy in order to obtain potential hypoglycemic agents, a total of 22 compounds synthesized, 15 unpublished. The sulfonamide **5** (drawn from the fragment of glibenclamide), substituted with the *p*-methoxy group in ring A, showed the most pronounced activity among all the compounds analyzed in this chapter in both models, *in vitro* and *in vivo*. The results obtained for this compound suggest that the mechanism in the pancreatic islets involves a decrease in the potassium permeability of the membrane of β -cells, thus causing depolarization and activating protein kinase C (PKC), which leads to the activation of calcium channels dependent on voltage (VDCC) and calcium uptake, which may culminate in the release of insulin. Demonstrating that the compound **5** can contribute to glucose homeostasis, since it is equipotent as glibenclamide, but without overloading β -cells in secretory processes. In Chapter 2, four classes of compounds were synthesized: acyl hydrazones, oxadiazoles, imides and thiazolidinones based on colchicine and combretastatin A-4, a total of 62 molecules, 34 being novel structures. 7 compounds with anti-leukemic activity in the nanomolar range were identified, the compound **29** being the most potent, with an activity of 15nM facing Jurkat cell lines and 25nM in REH cell lines, presenting low toxicity for normal cells, and as a mechanism of action, inhibition of tubulin.

In Chapter 3 it is presented the first virtual screening study of libraries of compounds in protein tyrosine phosphatase B (PtpB) from *Mycobacterium tuberculosis*, based on the unique X-ray structure available PtpB:OMTS. In the first stage, the screening of the natural products library was held with over 800 compounds resulting in the identification of several potent inhibitors PtpB, and through kinetic studies it was possible to identify the competitiveness and selectivity of the most active compound Kuwanol E (K_i 1.6 ± 0.1 μ M). The results from the *in silico* studies showed a high correlation between the experimental results of the 7 most potent compounds (KuwE, PirIII, Ega1, 6016, M2, Δ 3 and Ac3) and the respective rescoring results. In a second step, the library of commercial compounds *Drugs Now* from

ZINC database with over 5 million structures was analyzed. Based on the structure of the OMTS inhibitor, the pharmacophore was generated and the query was based on the shape and bulk of the overlap, and both were used as selection filters for docking and rescoring of compounds, resulting in 13 selected molecules with high structural diversity.

Keywords: sulfonamides, sulfonyl(thio)ureas, acyl hydrazones, oxadiazoles, leukemia, hyperglycemia, tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Regulação do metabolismo da glicose (adaptado de <http://health.howstuffworks.com/diabetes1.htm>). 38
- Figura 2.** Mecanismo de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. 39
- Figura 3.** Hipoglicemiantes orais utilizados no controle do diabetes mellitus. 41
- Figura 4.** Modificações estruturais da glibenclamida propostas por alguns autores. 43
- Figura 5.** Espectro de RMN de ^1H da sulfonamida **11**. 47
- Figure 6.** Estudos da captação de cálcio pela sulfonamida **5** usando: A) Diazoxida; B) Nifedipina; C) BAPTA-AM e D) RO-31820. 53
- Figura 7.** Espectro de RMN de ^1H do composto **16**. 59
- Figura 8.** Sequência de diferenciação celular hematopoética (Vilela, 2009). 65
- Figura 9.** Fármacos utilizados como antileucêmicos: daunorrubicina (a), doxorrubicina (b), dexametasona (c), vincristina (d), metotrexato (e) e mercaptopurina (f). 67
- Figura 10.** Os microtúbulos são resultantes do empacotamento dos protofilamentos de dímeros de α,β -tubulina lado a lado (adaptado de Howard & Hyman, 2009). 68
- Figura 11.** Agentes que interagem com os microtúbulos. A) colchicina; B) combretastatina A-4; C) podofilotoxina; D) colcemida e E) chalcona **A23**. 69
- Figura 12.** Principais estados conformacionais que podem ser atribuídos à unidade central *N*-acil-hidrazona. 70
- Figura 13.** Posicionamentos obtidos por *docking* molecular para as conformações D e B da acil-hidrazona sem substituinte no anel B. A acil-hidrazona está em amarelo e a colchicina em azul. 71
- Figura 14.** Espectro de RMN de ^1H da acil-hidrazona **27**. 74
- Figura 15.** Espectro de RMN ^1H do composto **66**. 78
- Figura 16.** O conceito de Mapa de Conectividade. 85
- Figura 17.** As alterações da expressão gênica provocadas pelo composto **29** são semelhantes à provocada por fármacos classificados no grupo ATC. 86
- Figura 18.** (A) O gráfico de enriquecimento do conjunto de genes mostra o enriquecimento no controle das células HL-60 não tratadas *versus* células tratadas com o composto **29**. (B) Valores de expressão de 16 genes compreendidos no conjunto de genes; baixa expressão (quadrados azuis) e alta expressão (quadrados vermelhos). 88

Figura 19. Coloração de imunofluorescência para marcadores de parada mitótica em células HeLa.	91
Figura 20. Efeito do composto 29 sobre linfócitos humanos T e linhagens celulares Jurkat e REH.	92
Figura 21. Espectro de RMN ^1H do composto 77 .	96
Figura 22. Novas acil-hidrazonas desenhadas a partir do composto mais potente, 29 .	97
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do composto 82 .	99
Figura 24: Estrutura química da (a) rifampicina; (b) pirazinamida; (c) isoniazida.	102
Figura 25. Representação da interação entre a PtpA e a proteína citoplasmática VPS33B do macrófago (adaptado de Chao <i>et al</i> , 2010).	103
Figura 26. Esquema proposto para a interação entre a PtpB e o meio extracelular (Mascarello, 2012 – baseado em Zhou <i>et al</i> , 2010).	104
Figura 27. Inibidores da PtpA (a-d) e da PtpB (e-m) de <i>M. tuberculosis</i> .	106
Figura 28. Dados físico-químicos da biblioteca de produtos naturais calculados com o programa QikProp e comparados com 95% dos fármacos comerciais.	108
Figura 29. Representação das três moléculas de água presentes no sítio ativo da PtpB.	109
Figura 30. Moléculas de água dentro do sítio ativo da estrutura cristalográfica da PtpB. As moléculas de água cristalográficas são mostradas como esferas vermelhas; Os mapas de potenciais gerados por GRID para <i>WAT probe</i> são mostradas como telas em amarelo claro.	110
Figure 31. Minimização com Amber e <i>docking</i> com Goldscore.	111
Figura 32. <i>Scaffolds</i> presentes nas estruturas dos compostos ativos. (A) presente em KuwE, Ega1, M2 e M2H. (B) presente em PirIII, $\Delta 3$, 6016 e Ac3.	116
Figura 33. Perfil de inibição dos compostos KuwE, PirIII, Ega1, 6016, Ac3 e $\Delta 3$ frente à PtpB de Mtb.	120
Figura 34. Alinhamento da sequência primária de aminácidos presentes no sítio catalítico da PtpB de Mtb e da PTP1B humana.	121
Figura 35. Modo de ligação de KuwE dentro do sítio catalítico de PtpB, proposto por <i>docking</i> .	122
Figure 36. <i>Query</i> gerado pelo programa ROCS a partir dos dados cristalográficos do complexo PtpB:OMTS.	123
Figure 37. Farmacóforo gerado pelo programa Ligandscout a partir dos dados cristalográficos do complexo PtpB:OMTS.	124

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Etapas envolvidas no uso dos microarranjos de DNA.	29/84
Esquema 2. Síntese das sulfonamidas. (a) Piridina.	44
Esquema 3. Proposta de mecanismo de reação para obtenção das sulfonamidas.	46
Esquema 4. Síntese das novas sulfonil(tio)uréias. (i) RSO_2Cl , piridina; (ii) K_2CO_3 , isocianato ou isotiocianato, acetona.	56
Esquema 5. Proposta de mecanismo de reação para obtenção das sulfonil(tio)uréias.	57
Esquema 6. Esquema de síntese dos compostos.	72
Esquema 7. Mecanismo de reação para obtenção das acil-hidrazonas.	73
Esquema 8. Mecanismo de reação para obtenção dos 1,3,4-oxadiazóis.	77
Esquema 9. Proposta e mecanismo de obtenção dos derivados diretos da acil-hidrazona 29 : 66 (oxadiazol não ativo); 76 e 77 (novas tiazolidinonas propostas). (i) tolueno, 60°C , 12h.	94
Esquema 10. Proposta e mecanismo de reação dos novos análogos da acil-hidrazona 29 : imidas cíclicas (82 , 83 e 84). (i) anidrido substituído, tolueno, refluxo 3h.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento, ponto de fusão experimental e número de registro no CHEMCATS das sulfonamidas.	45
Tabela 2. Efeito da glibenclamida (10, 1 e 100 mg/kg) e das sulfonamidas (10 mg/kg) em níveis séricos de glicose em ratos Wistar em jejum.	50
Tabela 3. Efeito da glibenclamida e das sulfonamidas (10 mg/kg) nos níveis de insulina sérica em ratos Wistar em jejum.	51
Tabela 4. Efeito da glibenclamida e das sulfonamidas (10 mg/kg) no conteúdo de glicogênio em ratos Wistar em jejum.	55
Tabela 5. Rendimento e ponto de fusão das novas sulfonil(tio)uréias.	57
Tabela 6. Efeito da glibenclamida e das sulfoni(tio)uréias (10 mg/kg) nos níveis de glicose sérica em ratos <i>Wistar</i> em jejum.	60
Tabela 7. Efeito da glibenclamida e das sulfoniltiouréias (10 mg/kg) nos níveis de insulina sérica em ratos <i>Wistar</i> em jejum.	62
Tabela 8. Rendimento, ponto de fusão (experimental e o reportado na literatura) e número de registro no CHEMCATS das acil-hidrazonas 23-65 .	75
Tabela 9. Rendimento, ponto de fusão (experimental e relatados na literatura) e número de registro no CHEMCATS dos 1,3,4-oxadiazóis (66-75).	79
Tabela 10. <i>Screening</i> da colchicina e dos novos compostos (23-75) a 0,1 μ M nas células leucêmicas REH e Jurkat.	80
Tabela 11. IC ₅₀ dos compostos mais ativos em células leucêmicas REH e Jurkat.	81
Tabela 12. Efeito dos compostos selecionados na migração celular de câncer de mama (MDA-MB-231).	83
Tabela 13. Efeitos na inibição da polimerização dos MT e análise de alto conteúdo (do inglês <i>high-content analysis</i>) de parada mitótica em células HeLa tratadas com as acil-hidrazonas.	89
Tabela 14. Lista dos 14 compostos selecionados por <i>virtual screening</i> como possíveis inibidores da PtpB.	112
Tabela 15. Resultados de <i>docking</i> e <i>rescoring</i> para os compostos selecionados.	114
Tabela 16. Valores de IC ₅₀ das moléculas selecionadas da biblioteca <i>in-house</i> frente à PtpB de Mtb e índices de	116

seletividade (IS) frente à PTP1B humana.

Tabela 17. Panorama comparativo dos resultados experimentais e teóricos para a biblioteca de PN na PtpB. 117

Tabela 18. Valores de K_i e modo de inibição da PtpB provocado pelos inibidores. 119

Tabela 19. Lista dos 30 compostos selecionados por *virtual reening* como possíveis inibidores da PtpB. 126

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CHEMCATS	Chemical Catalogs Online - produzido por CAS, base de dados de produtos químicos comercialmente disponíveis e seus fornecedores.
CHN	Análise elementar
Cmap	Mapas de conectividade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrao
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EM	Espectrometria de Massas
HIV	Vírus HIV
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IR	Receptor de insulina
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>K_i</i>	Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
LLA	Leucemia linfóide aguda
REH	Células leucêmicas humanas da linhagem B
JURKAT	Células leucêmicas humanas da linhagem T
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
nm	Nanomolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMTS	(oxalilamino-metileno)-tiofeno sulfonamida
<i>P</i>	Significância
p.f.	Ponto de fusão
PDB	Banco de Dados de Proteínas
PKC	Proteína Quinase C
<i>p</i> NPP	<i>para</i> -nitro-fenilfosfato
PTK	Proteína Tirosina Quinase
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SBDD	Planejamento baseado na estrutura do receptor
SUR	Receptor de sulfoniluréias
TMS	Tetrametilsilano
VDCC	Canais de cálcio dependentes de voltagem
VERO	Fibroblastos de rim de macaco (células não tumorais)
VPS33B	<i>Vacuolar Protein Sorting 33B</i> . Regulador de membrana de fusão
	Deslocamento químico em ppm
μM	Micromolar

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ESQUEMAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	19
1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Química Medicinal	25
1.2. Correlações entre estrutura química e atividade biológica	25
1.3. Planejamento racional de compostos bioativos	26
1.4. Métodos computacionais	27
1.5. Expressão gênica – DNA chip	29
1.6. Mapas de Conectividade (CMap)	30
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos Gerais	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 JUSTIFICATIVA	35
CAPITULO 1	37
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
4.1. Diabetes mellitus	37
4.2. Terapia atual do diabetes mellitus	38
4.2.1. <i>Sulfoniluréias e Glinidas</i>	39
4.2.3. <i>Inibidores da α-glicosidase</i>	40
4.2.4. <i>Biguanidas</i>	40
4.2.5. <i>Tiazolidinodionas</i>	40
4.3. Planejamento de novos hipoglicemiantes – Glibenclamida- like	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Síntese das sulfonamidas	43
5.2. Atividade antihiperlicêmica das sulfonamidas	48
5.2.1. <i>Efeito da glibenclamida e das sulfonamidas</i> <i>sintetizadas nos níveis de glicose sérica</i>	48
5.2.2. <i>Estudos da secreção de insulina</i>	50
5.2.3. <i>Estudos da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas</i>	52

<i>ncreáticas</i>	
5.2.4. Estudos do conteúdo de glicogênio	54
5.2.5. Estudos da atividade da LDH	55
5.3. Síntese das sulfonil(tio)uréias	55
5.4. Atividade antihiperlipidêmica das sulfonil(tio)uréias	59
5.4.1. Efeito das sulfonila(tio)uréias nos níveis de glicose sérica	59
5.4.2. Efeito das sulfoniltiouréias na secreção de insulina	61
5.4.3. Efeito das sulfoniltiouréias no conteúdo de glicogênio	61
5.4.4. Efeito das sulfoniltiouréias e da glibenclamida na atividade da LDH	62
6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	62
CAPITULO 2	65
7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	65
7.1. Processos cancerosos e leucemias	65
7.2. Leucemia linfóide aguda	66
7.3. Terapia atual para leucemias	66
7.4. Planejamento de novos antileucêmicos	67
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
8.1. Síntese das acil-hidrazonas e dos oxadiazóis	70
8.1.1. Modelagem Molecular.	70
8.1.2. Síntese das acil-hidrazonas e dos oxadiazóis.	71
9 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	80
9.1. Atividade inibitória <i>in vitro</i> do crescimento celular.	80
9.2. Efeitos na migração celular.	82
9.3. Mecanismo de ação	83
9.3.1. Modulação de transcrição.	83
9.3.1.1. Chip de DNA	83
9.3.1.2. Análise dos mapas de conectividade (CMap)	84
9.3.1.3. Análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA)	86
9.4. Ensaio de inibição da tubulina	88
9.5. Ensaio celulares de alto conteúdo.	89
9.6. Toxicidade seletiva.	91
9.7. Novas estratégias sintéticas baseadas nos resultados obtidos	92

10 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	99
CAPITULO 3	101
11 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	101
11.1. Tuberculose	101
11.2. Proteínas tirosina fosfatases A e B (PtpA e PtpB) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	102
11.3. Inibidores conhecidos da PtpA e da PtpB	104
11.4. Novas estratégias na busca de inibidores da PtpB: biblioteca de produtos naturais	106
12 RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
12.1. A biblioteca de Produtos Naturais (PN)	107
12.2. O papel das moléculas de água de cristalização	109
12.3. <i>Docking</i> com GOLD	110
12.4. <i>Rescoring</i> dos resultados de <i>docking</i> com MM-GBSA	111
13 AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA	115
13.1. Atividade inibitória <i>in vitro</i> na PtpB	115
13.2. Estudos Cinéticos	118
13.3. Ensaio de seletividade	121
13.4. Previsão do modo de ligação de KuwE e indicativos da sua seletividade	121
14 Novas estratégias na busca de inibidores da ptpb: biblioteca de compostos comerciais	123
14.1. Aplicação de filtros de seleção	124
15 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	128
16 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	129
17 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS	131
17.1. Caracterização dos compostos	131
17.2. SÍNTESES – CAPÍTULO 1 (<i>Sulfonamidas e sulfonil(tio)uréias</i>)	131
17.2.1. <i>Síntese dos intermediários de reação</i>	131
17.2.2. <i>Síntese das sulfonamidas (1-12)</i>	132
17.2.3. <i>Síntese das sulfonil(tio)uréias (13-22)</i>	137
17.3. ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICÊMICA E DIABETES	143
17.4. SÍNTESES – CAPÍTULO 2 (<i>acil-hidrazonas, oxadiazóis, tiazolidinonas, imidas</i>)	145

17.4.1. Sínteses do reagente	145
17.4.2. Síntese e purificação das acil-hidrazonas (23-65, 78-80)	146
17.4.3. Síntese dos oxadiazóis (66-75)	162
17.4.4. Síntese das tiazolidinonas (76 e 77)	167
17.4.5. Síntese e purificação das imidas (82, 83 e 84)	168
17.4.6. Síntese e purificação da acil-hidrazona 81	169
17.5. ATIVIDADE ANTI-LEUCÊMICA	171
17.6. EXPERIMENTAL DO CAPÍTULO 3	176
18 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
ANEXOS	205

INTRODUÇÃO

1.1. Química Medicinal

Devido à complexidade para a elucidação das estruturas químicas dos fármacos e a correlação entre propriedades físico-químicas, determinação da atividade biológica e estudo das relações estrutura-atividade, tornou-se necessária a interação entre a química, a farmacologia, e áreas correlatas, com o intuito de obter fármacos mais específicos, com atividades e aplicações bem definidas. Desta interação e multidisciplinaridade, surgiu a Química Medicinal, a qual inclui o planejamento de fármacos, a síntese e determinação de suas estruturas, os ensaios farmacológicos e os estudos das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (Amaral *et al.*, 2002).

A descoberta de novos fármacos inclui três fases importantes: *i) etapa de descobrimento* – consiste na identificação e produção de novas substâncias ativas, originadas da síntese orgânica, de produtos naturais ou de processos biotecnológicos; *ii) etapa de otimização* – baseia-se nas modificações sintéticas das estruturas, no sentido de aumentar a potência, seletividade e conferir menor toxicidade; *iii) etapa de desenvolvimento* – consiste na otimização das rotas sintéticas para a produção em larga escala e a modificação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da substância ativa para uso clínico (Wermuth, 2008).

1.2. Correlações entre estrutura química e atividade biológica

Uma molécula ativa e com eficácia elevada é reflexo das interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor (farmacodinâmica) e biodisponibilidade, resultado de fatores responsáveis pela absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco (farmacocinética), além de apresentar baixa toxicidade (Barreiro, 2001).

A substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte pode modificar a potência, a duração e ainda a natureza do efeito farmacológico de uma molécula, bem como as várias propriedades físico-químicas desta molécula. Os estudos de correlação estrutura e atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel (Calixto, 2001).

Neste sentido, alguns estudos postulam que as propriedades físico-químicas de moléculas bioativas, em sua maioria, seguem algumas regras, tais como: *i*) número de átomos pesados entre 10 e 70; *ii*) número de ligações que permitem rotatividade entre 2 e 8; *iii*) índice de refratividade molar entre 40 e 130; e *iv*) número de anéis entre 1 e 6, sendo não mais que 3 aromáticos (Lepre, 2001).

O bioisosterismo é uma ferramenta importante na obtenção de fármacos mais potentes e com menores efeitos adversos, sendo um dos mais explorados processos de modificação molecular. Há uma divisão entre bioisosterismo clássico e não-clássico, em que o primeiro é referente às características definidas por Grimm e Erlenmeyer nas primeiras três décadas do século XX: os bioisósteros são átomos ou grupos de átomos que possuem camadas de valência semelhantes. Já no bioisosterismo não-clássico, a substituição visa uma atividade similar, independente da estrutura eletrônica da molécula (Patani & Lavoie, 1996; Ciapetti & Giethlen, 2008).

Ainda podemos destacar que o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos fármacos é um fator crucial que afeta sua absorção através das paredes do intestino, e que o peso molecular da substância deveria, em teoria, ser irrelevante. Na prática, porém, moléculas grandes tendem a ser pobremente absorvidas, porque geralmente contém um grande número de grupos funcionais polares, o que faz com que estes compostos sejam absorvidos ou metabolizados pelo sistema digestivo. Como regra, fármacos absorvidos oralmente tendem a obedecer ao que é conhecido como a *Regra de Lipinski* (ou Regra de cinco), desenvolvida em 1997 por pesquisadores da Pfizer, onde cada um dos parâmetros envolvidos usa valores múltiplos do número cinco. Nesta regra, os autores postulam que a atividade farmacológica de uma molécula é devida à sua melhor absorção e permeabilidade, que ocorrem quando ela possui: *i*) ≤ 5 centros doadores de ligação hidrogênio; *ii*) ≤ 10 grupos aceptores de ligação hidrogênio; *iii*) peso molecular ≤ 500 unidades; e *iv*) $\log P$ calculado ≤ 5 (Lipinski *et al.*, 1997).

1.3. Planejamento racional de compostos bioativos

A maioria dos fármacos deve seus efeitos à sua ligação específica a uma biomacromolécula ou alvo molecular. A estrutura tridimensional única e específica do fármaco é requisito para sua atividade farmacológica (Yunes *et al.*, 2001). A modificação estrutural constitui-se no método mais utilizado para a obtenção de compostos

farmacologicamente ativos ou para otimizar a atividade de substâncias naturais ativas (Barreiro, 1991).

Um dos maiores desafios no planejamento de novos candidatos a fármacos é a identificação de moléculas que possam ser modificadas estruturalmente para aumentarem seu potencial terapêutico, identificados por uma melhora nas suas propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas e baixa toxicidade (Andricopulo *et al.*, 2009).

O sucesso no planejamento racional de moléculas ativas baseia-se no conhecimento dos mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos fisiológicos da patologia em questão, o que é essencial para eleição do(s) alvo(s) terapêutico(s) (Barreiro *et al.*, 2009). Com estas informações se podem definir as estratégias que serão adotadas para identificação dos candidatos a novos fármacos.

1.4. Métodos computacionais

A bioinformática, juntamente com a química computacional, tem oferecido um excelente direcionamento no planejamento de fármacos, com inúmeros exemplos de sucesso como os importantes e bem conhecidos fármacos losartan, atorvastatina e celecoxib (Mashall, 2004).

As abordagens de Modelagem Molecular utilizadas na derivação de modelos preditivos no planejamento racional de fármacos são duas: uma baseada na estrutura e outra nos ligantes. No primeiro caso, a estrutura 3D do alvo molecular deve ser conhecida, seja por determinação experimental (cristalografia de raios-X ou RMN) ou teórica (por construção de modelos de homologia). No segundo caso, utilizam-se informações de composto(s) ativo(s) para um determinado alvo, como a identificação de grupos aceptores/doadores de ligação hidrogênio, cátions, ânions, zonas hidrofóbicas, no planejamento de novos ligantes (Mashall, 2004).

Os grandes avanços da genômica e proteômica, bem como a evolução de técnicas como a cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN), proporcionam um aumento significativo no número de alvos moleculares que possuem suas estruturas 3D disponíveis no *Banco de Dados de Proteínas* (PDB) (Westbrook *et al.*, 2003). O conhecimento da estrutura do alvo macromolecular permite o planejamento racional de inibidores enzimáticos, ou de antagonistas de receptores através da estratégia de *planejamento baseado na estrutura do receptor* (do inglês *Structure Based Drug Design – SBDD*).

O *docking* molecular é um dos principais métodos de SBDD empregados em química medicinal, que foi introduzido no início da década de 80, tendo contribuído significativamente na fase de otimização de compostos líderes em relação a uma série de propriedades, como potência e afinidade, além de algumas propriedades farmacocinéticas (Moitessier *et al.*, 2008). Esta técnica consiste na predição da conformação bioativa de uma micromolécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula, seguida da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (Guido *et al.*, 2008).

O processo de *docking* molecular pode ser dividido em duas etapas principais: (i) modelagem do modo de ligação de moléculas no sítio de interação (predição da conformação bioativa) e (ii) predição da afinidade do ligante pelo sítio. A primeira etapa é considerada a mais simples e robusta do processo, no qual os programas computacionais utilizam diferentes métodos de amostragem que atribuem flexibilidade à molécula do ligante. A segunda etapa avalia e classifica o modo de interação entre a macro e a micromolécula através de funções de pontuação, envolvendo: (i) *campos de força*; (ii) *funções empíricas* – ajuste teórico dos dados experimentais; e (iii) *funções baseadas no conhecimento* – dados estatísticos da interação do complexo (Wang *et al.*, 2003).

Os programas computacionais de *docking* são úteis na proposição de interações intermoleculares envolvidas no reconhecimento molecular, e utilizam diferentes algoritmos e capacidades de processamento, envolvendo funções de energia, as quais geram modelos matemáticos que classificam as melhores orientações e conformações dos ligantes, segundo uma lista de escores de energia (Alonso *et al.*, 2006).

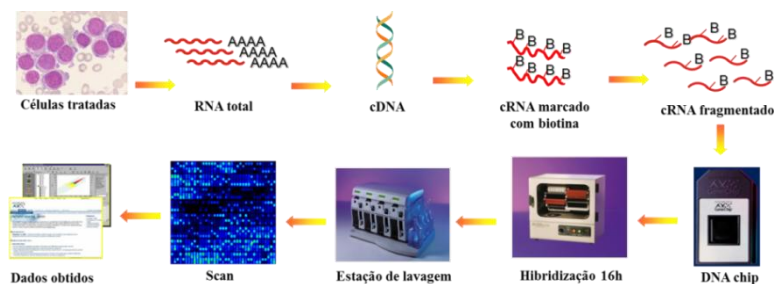
A pesquisa virtual por pequenas bibliotecas (do inglês *in house database*) de produtos sintéticos ou naturais, bem como a análise de grandes bibliotecas comerciais, têm demonstrado um impacto positivo nos processos de *docking* e busca de moléculas bioativas, temas que serão abordados nesta tese.

1.5. Expressão gênica – DNA chip

Outra técnica que vêm auxiliando na descoberta do modo de ação de compostos bioativos são os chips de DNA, que são microarranjos de DNA dispostos em um suporte sólido, com tamanho

semelhante a uma lâmina de microscópio óptico. Esta recente tecnologia, que ainda não é muito difundida no Brasil, permite analisar um grande volume de dados simultaneamente, sendo uma técnica poderosa para a análise prévia da composição genômica de determinado organismo ou para traçar um perfil da expressão gênica deste genoma em determinado momento (Lemke *et al.*, 2008).

Estes microarranjos são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos (mRNA na forma de cDNA ou DNA genômico) provenientes de amostras biológicas, as quais são colocadas para hibridar com o DNA fixado no chip (hibridação por complementariedade de bases). A detecção é possível devido às amostras serem marcadas com isótopo ^{33}P ou os fluorocromos cianina 3 (Cy3) ou cianina 5 (Cy5), e posteriormente a imagem de hibridação é obtida por meio de leitores a laser (para os fluorocromos) ou leitores de fósforo (para o isótopo ^{33}P) (Li e Wong, 2001) (Esquema 1).



Esquema 1. Etapas envolvidas no uso dos microarranjos de DNA: (i) Células patogênicas são tratadas com o fármaco, (ii) RNA total é extraído, fragmentado e hibridizado no chip, (iii) com posterior lavagem. O chip é scaneado e os dados obtidos são tratados em softwares adequados (adaptado de Affymetrix HG 1.0 ST).

A tecnologia dos microarranjos tem impulsionado de maneira importante a pesquisa de genômica funcional dos diferentes organismos, desde bactérias até o homem, incluindo situações normais ou patológicas (câncer, doenças autoimunes, doenças degenerativas entre outras) (Pandya *et al.*, 2007).

No que se refere ao câncer, esta tecnologia permite comparar a expressão gênica de células saudáveis e de células tumorais, e através das diferenças encontradas, identificar genes que possuam função chave no desenvolvimento da doença. No decorrer desta tese, usaremos os

microarranjos de DNA para analisar células tumorais tratadas com os compostos mais ativos, a fim de verificar quais genes são ou não expressos, e propôr, através da interpretação por mapas de conectividade, um possível mecanismo de ação para estas moléculas.

1.6. Mapas de Conectividade (CMap)

O desafio fundamental que existe na biomedicina é a necessidade de estabelecer a relação entre as doenças, processos fisiológicos, e as medidas terapêuticas com pequenas moléculas. Em 2006, Lamb e col. criaram uma abordagem sistemática para a descoberta de conexões funcionais entre as doenças, perturbações genéticas e ação dos fármacos, através da primeira coleção de referência de perfis de expressão gênica de células humanas tratadas com pequenas moléculas bioativas, culminando em um software com padrões para estes dados (Lamb *et al.*, 2006).

Dessa forma, o objetivo dos CMaps é fornecer uma solução genérica para este problema, tentando descrever todos os estados-fisiológicos em termos de assinaturas genômicas, criar um grande banco de dados público de fármacos e genes, e desenvolver ferramentas de correspondência-padrão para detectar similaridades entre estes dados (Lamb, 2007). A interpretação dos resultados obtidos com os chips de DNA é possível através do uso destes mapas de conectividade, que descrevem as informações obtidas sobre um estado biológico (por exemplo, os níveis de mRNA medidos) em termos de uma assinatura genômica.

Nesta tese, utilizaremos vários recursos tecnológicos para a obtenção dos resultados a serem apresentados, como expressão gênica (chip de DNA), mapas de conectividade (CMap), modelagem molecular (*screening* virtual, *docking* molecular), além de modernos métodos bioquímicos, no intuito de compreender o(s) mecanismo(s) de ação dos compostos estudados e na tentativa de diminuir o fator sorte na obtenção de novos fármacos.

Para facilitar a leitura e compreensão desta tese, ela está dividida em 3 capítulos, que apresentam as estratégias sintéticas para obtenção dos compostos de acordo com cada patologia-alvo: *Capítulo 1* – Diabetes Mellitus; *Capítulo 2* – Processos cancerosos e leucemias e *Capítulo 3* – Tuberculose. Cada capítulo apresenta uma revisão

bibliográfica sobre o tema, seguida da seção de resultados e discussão para cada patologia.

Deste modo, a partir desta seção, são expostos os objetivos, as justificativas do trabalho, seguidas pelos Capítulos 1, 2 e 3. Na seqüência é apresentada a parte experimental, onde estão descritas as metodologias de síntese dos compostos e dos testes *in vitro*, *in vivo* e *in silico* realizados. Finalmente, apresentam-se as conclusões, as perspectivas e as referências bibliográficas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Esta pesquisa tem como objetivo geral o planejamento racional, síntese e avaliação da atividade biológica de cada grupo de compostos desenhados a partir das suas patologias-alvo: (i) diabetes; (ii) leucemia e (iii) tuberculose, a fim de determinar o mecanismo de ação destas moléculas e encontrar protótipos de fármacos de importância terapêutica.

2.2 Objetivos Específicos

CAPÍTULO 1: *Diabetes Mellitus*

- Desenho de compostos baseados na estrutura do fármaco glibenclamida;
- Síntese e caracterização de uma série de sulfonamidas com estrutura baseada em um fragmento da Glibenclamida (*fragment-based*);
- Síntese e caracterização de uma série de sulfonil(tio)uréias com estrutura baseada na Glibenclamida (*structure-based*);
- Estudo da ação dos compostos obtidos em modelo de hiperglicemia e diabetes *in vivo*, e avaliação do mecanismo de ação através de métodos bioquímicos *in vitro*.

CAPÍTULO 2: *Leucemia*

- Desenho de compostos baseados na estrutura da colchicina e da combretastatina A4;
- Síntese e caracterização de duas séries de acil-hidrazonas;
- Síntese e caracterização de oxadiazóis, a partir das acil-hidrazonas obtidas;
- Determinação *in vitro* da atividade dos compostos obtidos em linfócitos de linhagem T (Jurkat) e B (REH);
- Estudos bioquímicos e determinação do mecanismo de ação dos compostos ativos através de expressão gênica utilizando microarranjos de DNA e CMap para interpretação dos resultados;
- Síntese, caracterização e avaliação biológica de novos análogos baseados nas estruturas dos compostos mais potentes.

CAPÍTULO 3: *Tuberculose*

- Planejamento de inibidores da proteína tirosina fosfatase B (PtpB) de *Mycobacterium tuberculosis*, baseados na estrutura do único complexo PtpB:inibidor disponível no *Protein Data Bank* (PDB:2OZ5);

- *Screening* virtual de uma biblioteca de aproximadamente 800 compostos naturais (*in house database*) na PtpB;
- *Screening* virtual de uma biblioteca comercial de aproximadamente 5 milhões de compostos na PtpB;
- Ensaios *in vitro* de inibição, determinação do mecanismo de ação e seletividade dos compostos selecionados frente à PtpB.

3 JUSTIFICATIVA

A busca pelo tratamento de inúmeras patologias tem impulsionado a pesquisa científica na área da química medicinal, com o intuito de obter novos fármacos mais seguros, eficientes, com menores efeitos colaterais e com custos reduzidos para o tratamento.

Em relação ao diabetes mellitus, apesar da existência de hipoglicemiantes orais, muitos apresentam sérios efeitos adversos, ou ainda possuem um longo tempo para início de sua ação. A terapia que inclui aplicações diárias de preparações insulínicas via subcutânea é a forma mais comumente utilizada pelos pacientes, entretanto, o desconforto dos pacientes diabéticos é contínuo em função das aplicações.

Apesar da ampla aceitação da glibenclamida e várias outras sulfoniluréias, inúmeros riscos limitam sua utilização na terapêutica. Especificamente, a glibenclamida está associada à hipoglicemia e ganho de peso, hiperinsulinemia e deterioração da diabetes, e ao aumento do risco de mortalidade cardiovascular (em tratamentos de longa duração). Além disso, pacientes com diabetes mellitus têm alto risco de desenvolver complicações a longo prazo, incluindo neoplasias, neuropatias e nefropatias (Vigneri *et al.*, 2009).

Nosso grupo de pesquisas vem trabalhando nos últimos anos na busca por moléculas terapeuticamente úteis para esta patologia (Alberton *et al.*, 2008; Damazio *et al.*, 2009; Damazio *et al.*, 2010). Nestas características também se baseia nossa estratégia atual: desenvolver derivados que mantenham a ação de um medicamento já conhecido (glibenclamida), porém reduzindo, principalmente, seus efeitos adversos.

Referente ao câncer, apesar dos recentes avanços, estima-se que em 2012 surjam no Brasil 4.570 novos casos de leucemia em homens e 3.940 em mulheres (INCA, 2012). Os agentes antineoplásicos atualmente usados na quimioterapia afetam o processo de divisão celular, interferindo também nos tecidos normais que possuem células de divisão rápida, podendo provocar muitos efeitos indesejáveis, como a redução da produção das células de defesa do organismo, esterilidade e teratogenicidade (Rang *et al.*, 2004).

Embora nosso interesse específico seja o estudo da leucemia linfóide aguda pediátrica, por ser o câncer de maior incidência em crianças de 0 a 14 anos (INCA, 2012), os resultados obtidos poderão ser relevantes também para outros tipos de leucemia e para tumores que

metastatisam na medula óssea, como por exemplo, o neuroblastoma e sarcoma de Ewings em crianças (Pein *et al.*, 1995) e o câncer de mama (Molino *et al.*, 1999) e de próstata (Mansi *et al.*, 1999) em adultos.

Compostos sintéticos desenvolvidos recentemente pelo nosso grupo de pesquisas têm apresentado importante ação antileucêmica e antitumoral em experimentos *in vitro* (Navarini *et al.*, 2009; Pedrini *et al.*, 2010; Locatelli *et al.*, 2011; Cordova *et al.*, 2011; Mielcke *et al.*, 2012).

As proteínas tirosina fosfatases (Ptps) A e B têm sido consideradas alvos terapêuticos importantes na busca por novos agentes anti-tuberculose, pelo seu papel como reguladores chave da sinalização celular e por estarem envolvidas na patogenicidade do *Mycobacterium tuberculosis* (Grundner *et al.*, 2005). Uma estratégia no desenvolvimento de inibidores enzimáticos é baseada na obtenção de compostos que simultaneamente atinjam o sítio ativo e que sejam seletivos, interagindo com resíduos de aminoácidos específicos.

Seguindo uma linha promissora para a obtenção de agentes inibidores da proteína tirosina fosfatase B de *M. tuberculosis* (Mtb) e, considerando que nos últimos anos nosso grupo de pesquisas tem quase que pioneiramente trabalhado com enfoque nas Ptps de Mtb (Chiaradia *et al.*, 2008; Mascarello *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Chiaradia *et al.*, 2012), propomos aqui o uso de ferramentas computacionais de virtual *screening* para a seleção de novos candidatos.

Somado ao uso de Modelagem Molecular, os estudos propostos nesta tese também visam introduzir modernos métodos para determinação do mecanismo de ação dos compostos, através dos microarranjos de DNA associado aos Mapas de Conectividade, fortalecendo ainda mais nossa pesquisa, que utilizará ferramentas de alta tecnologia, não antes utilizadas nesta universidade.

Ainda, destacamos aqui o papel da interdisciplinaridade, tão necessária dentro das universidades e na pesquisa por novos fármacos. Muitos dos estudos desta tese foram realizados em colaboração com pesquisadores da UFSC e de outras universidades.

Por fim, o conhecimento adquirido na área de química medicinal nos encorajaram a propôr esta tese, que é original, no que tange à abordagem de métodos modernos de determinação do mecanismo de ação de compostos, em busca de moléculas líderes para as patologias escolhidas, e ainda prometedora, do ponto de vista terapêutico.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus define-se como um grupo de desordens metabólicas resultante de defeitos da secreção e/ou ação da insulina, levando a um distúrbio no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (American Diabetes Association, 2004). A característica principal desta doença é a hiperglicemia, que se manifesta com sintomas como perda de peso, polifagia e perturbações visuais. Quando não tratada, pode levar a complicações como retinopatia com potencial perda da visão, neuropatia com consequente falência renal, neuropatia periférica com risco de amputações e neuropatia autonômica causando sintomas cardiovasculares, gastrointestinais, geniturinários e disfunção erétil (Ball e Barber, 2003). De acordo com o último estudo publicado pela Organização Mundial da Saúde, 1 em cada 10 adultos sofrem de diabetes no mundo (WHO, 2012).

Existem duas classificações clínicas para a doença: a *diabetes Tipo 1* ou insulino-dependente (DMID), que é resultante da destruição auto-imune das células β pancreáticas, ocorrendo em 5-10% dos pacientes diabéticos, na qual o tratamento indicado é o uso de insulina exógena (Concannon *et al.*, 2005); e o *diabetes Tipo 2* ou não insulino-dependente (DMNID), que é provocado pela resistência à insulina, ou seja, pela redução da habilidade da insulina em realizar suas funções, ocorrendo em 90-95% dos pacientes, na qual o tratamento indicado é o uso de hipoglicemiantes orais (American Diabetes Association, 2004).

A insulina, produzida pelas células β do pâncreas, é um dos hormônios responsáveis pela homeostase da glicose (Rang *et al.*, 2004). Sua secreção, dependente do aumento de cálcio intracelular, é estimulada pelas altas concentrações de glicose na corrente sanguínea (Henquin, 2004). Uma vez secretada, promove a captação, armazenamento e rápida utilização da glicose pelos tecidos corporais, principalmente o fígado, músculo e tecido adiposo. A captação da glicose pelas células musculares é iniciada por uma ligação da insulina ao seu receptor na membrana das células, seguida da ativação da

proteína tirosina quinase, levando a sinalização molecular que promove a entrada de glicose nas células (Pessin *et al.*, 1999) (Figura 1).

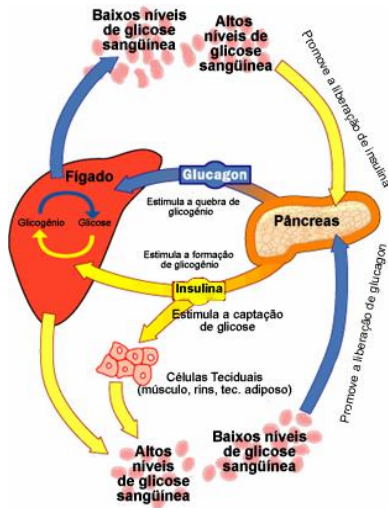


Figura 1. Regulação do metabolismo da glicose (adaptado de <http://health.howstuffworks.com/diabetes1.htm>).

4.2. Terapia atual do diabetes mellitus

O controle do diabetes mellitus pode ser realizado através de preparações insulínicas ou com o auxílio de hipoglicemiantes orais, conferindo redução da morbidade e mortalidade associadas às suas complicações.

A terapia com insulina é mais comumente utilizada em pacientes com diabetes mellitus tipo 1, mas também pode ser usada em pacientes com tipo 2 que não conseguem atingir um bom controle glicêmico com a dieta, exercícios e medicamentos orais. As aplicações do hormônio mimetizam o padrão normal de secreção endógena, através de injeções subcutâneas de insulina; neste processo, no entanto, não ocorre a liberação da insulina na circulação porta e sim na periférica, o que elimina o efeito preferencial desta nos processos metabólicos hepáticos (Gerich, 2002; Lindholm, 2002), além de causar um desconforto contínuo aos pacientes, em função das aplicações.

Os hipoglicemiantes orais são utilizados por pacientes com diabetes mellitus tipo 2, e pertencem às seguintes classes:

4.2.1. Sulfoniluréias e Glinidas

O receptor de sulfoniluréia 1 (SUR-1), localizado na membrana plasmática das células β pancreáticas possui dois sítios de ligação: sítio A e sítio B. A ligação de compostos nestes dois sítios produzem o mesmo efeito final, ou seja, fechamento de canais de potássio dependentes de ATP com subsequente despolarização da membrana plasmática e aumento do influxo de cálcio. O aumento do cálcio intracelular, por sua vez, sinaliza a secreção de insulina. As sulfoniluréias, como o tolbutamida e a glibenclamida, ligam-se ao sítio A do SUR-1. Já as glinidas, como a repaglinida, exercem a ação através de ligação ao sítio B do SUR-1 e a nateglinida ao sítio A (Henquin, 2004) (Figura 2).

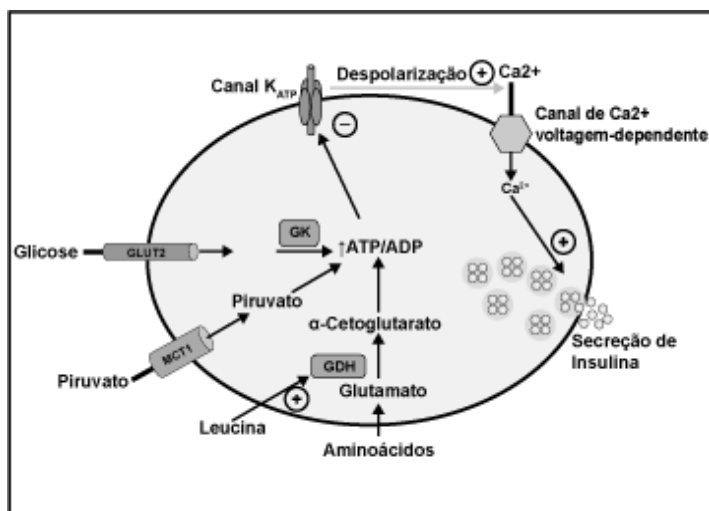


Figura 2. Mecanismo de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. O aumento na relação ATP:ADP inibe o canal K_{ATP} resultando no fechamento do canal, despolarização da membrana, influxo de cálcio e liberação de insulina (Palladino *et al*, 2008).

As primeiras sulfoniluréias a serem utilizadas clinicamente foram o tolbutamida e a clorpropamida (Figura 3a e 3b), que apresentam início de ação demorado e efeito de longa duração, sendo o principal efeito colateral a hipoglicemia. Os fármacos mais recentes, como glibenclamida e glizipida (Figura 3c e 3d) apresentam potência

aumentada e menor tempo de ação, como também menores efeitos colaterais comparados aos demais (Perfetti, 2000).

4.2.3. Inibidores da α -glicosidase

Os inibidores de α -glicosidase inibem a captação de carboidratos da dieta (amido, dextrinas e dissacarídeos) através da inibição competitiva das α -glicosidases, que são enzimas responsáveis pelo processamento de carboidratos complexos, glicoproteínas e glicolipídeos (Rosak, 2002; Seo *et al.*, 2005). Entre os medicamentos desta classe terapêutica está a ascarbose (Figura 3e), que apresenta, entre outros efeitos adversos, flatulência, diarreia e distensões abdominais (Rang *et al.*, 2004).

4.2.4. Biguanidas

As biguanidas são agentes hipoglicemiantes que não necessitam das células β pancreáticas funcionantes para alterar o metabolismo da glicose. A metformina (Figura 3f) é a principal representante desta classe de fármacos. O mecanismo de ação consiste em diminuir a produção de glicose hepática, reduzindo a gliconeogênese e melhorando a resistência à insulina, aumentando assim a captação de glicose no fígado e músculo. Possui ações metabólicas adicionais, como redução da concentração plasmática de lipoproteínas de baixa densidade e lipoproteínas de densidade muito baixa. O principal efeito indesejável também consiste em distúrbios intestinais transitórios, náuseas e diarreias (Chan *et al.*, 2007).

4.2.5. Tiazolidinodionas

Tiazolidinodionas melhoram a sensibilidade à insulina em pacientes com diabetes tipo 2. Os efeitos desses agentes ocorrem pelo aumento da disponibilidade da glicose nos tecidos periféricos e a supressão da produção de glicose pelo fígado. Estes agentes também diminuem o nível de triglicerídeos e ácidos graxos livres e aumentam a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Fujiwara e Horikoshi, 2000). Entre os medicamentos desta classe está a rosiglitazona (Figura 3g).

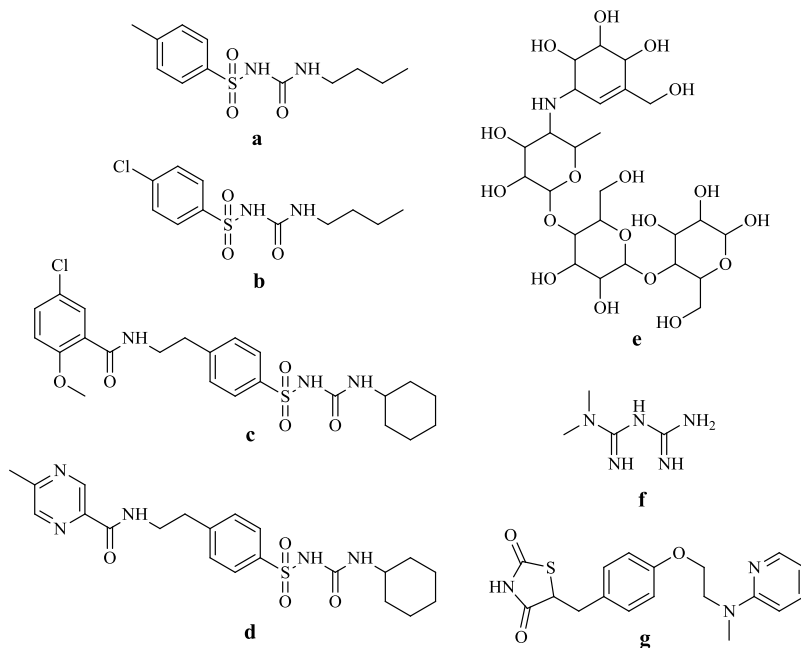


Figura 3. Hipoglicemiantes orais utilizados no controle do diabetes mellitus: tolbutamide (a), clorpropamida (b), glibenclamida (c), glipizida (d), ascarbose (e), metformina (f) e rosiglitazona (g).

4.3. Planejamento de novos hipoglicemiantes – Glibenclamida-like

As sulfonamidas são caracterizadas pela presença do grupo $R-SO_2-NR'R''$. Aproximadamente 150 diferentes sulfonamidas já são comercializadas como agentes antibacterianos (Patrick, 2005), sendo que as modificações são efetuadas principalmente para aumentar a potência, obtendo um espectro antibacteriano mais amplo e maior solubilidade ou ação prolongada. Já as sulfoniluréias possuem em sua estrutura os grupos $R-SO_2-NCONR'$, sendo estudadas principalmente por sua ação hipoglicemiante (Patrick, 2005).

A sulfoniluréia objeto de nossos estudos é a glibenclamida (Figura 3c), um fármaco hipoglicemiante de segunda geração conhecido há mais de 30 anos, mas que ainda merece atenção e novos estudos, seja devido ao seu alto poder hipoglicemiante, seja pelos efeitos adversos associados à sua administração a longo prazo.

O mecanismo descrito para a ação hipoglicemiante da glibenclamida, envolve (i) o bloqueio dos canais de potássio dependentes de ATP (K^+ -ATP), (ii) uma diminuição na permeabilidade de potássio na membrana plasmática das células- β , (iii) despolarização que ativa os canais de cálcio dependentes de voltagem, e (iv) de absorção de Ca^{2+} , o que provoca um aumento do Ca^{2+} citoplasmático livre, desencadeamento exocitose de grânulos de insulina pré-formada (ver Figura 2) (Henquin, 2004).

Alguns estudos sobre modificações estruturais da glibenclamida foram realizados ao longo dos anos (Figura 4). Russ e col. propuseram modificações no anel A e eliminação do anel B da glibenclamida e os resultados mostraram que este novo composto apresenta um perfil de seletividade muito diferente daquele apresentado pela glibenclamida, com uma grande perda de afinidade pelo receptor SUR-1 e ligeira preferência pelo SUR-2A (Russ *et al.*, 2001). Em outro trabalho, Yuriev e col. demonstraram a importância de certos elementos estruturais para bloquear os canais de potássio (K_{ATP}) por meio de previsões teóricas de CoMFA, e propuseram novos análogos de glibenclamida (Yuriev *et al.*, 2004).

Schneider e col. propuseram a inclusão de uma molécula de glicose como substituinte no anel A a fim de melhorar a sua solubilidade, mas a glibenclamida-glicosilada não aumentou a afinidade pelo receptor SUR-1 (K_D 2,08 nM) em comparação com o análogo não-glicosilado (K_D 0,38nM) (Schneider *et al.*, 2007). Diferentemente, a inserção de uma pregnenolona no anel A da glibenclamida, proposto por Figueiroa-Valverde e col., promoveu maior atividade hipoglicemiante que a glibenclamida original (Figueiroa-Valverde *et al.*, 2011).

Calderone e col. alteraram o anel B da glibenclamida com derivados nitro-oximetilbenzoato como substituintes (que é um metabólito hidroxilado ativo da glibenclamida), e os resultados mostraram que a sua atividade hipoglicêmica é aumentada pelo efeitos doador de NO, que confere propriedades úteis para diabetes relacionadas com doenças cardiovasculares (Calderone *et al.*, 2009). Recentemente, Zhang e col. propuseram a síntese de análogos com base na estrutura de duas sulfonamidas com ação antiplaquetária e nefroprotetora, que formam híbridos com a estrutura original da glibenclamida, gerando compostos hipoglicemiantes promissores (Zhang *et al.*, 2009).

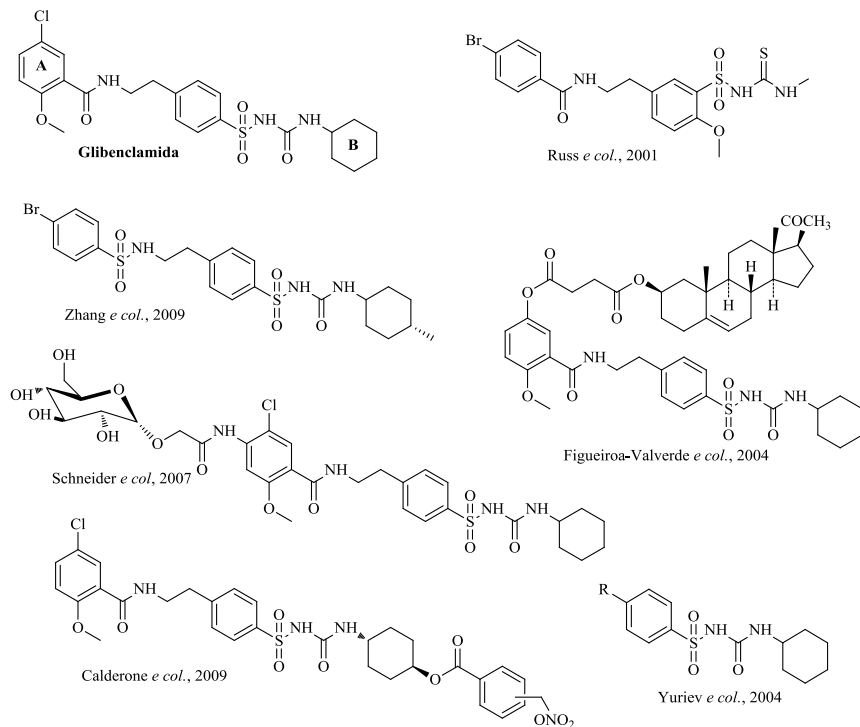


Figura 4. Modificações estruturais da glibenclamida propostas por alguns autores.

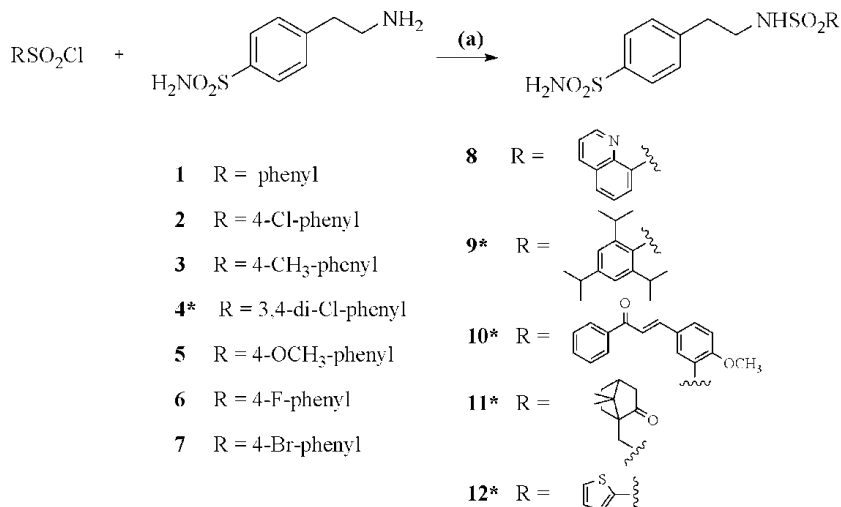
Nosso grupo de pesquisas têm trabalhado nos últimos anos com o estudo de chalconas sintéticas terapeuticamente úteis para esta patologia (Alberton *et al.*, 2008; Damazio *et al.*, 2009; Damazio *et al.*, 2010). Neste trabalho, propomos a síntese de novas sulfonamidas e sulfonil(tio)uréias baseadas na estrutura da glibenclamida. Primeiramente apresentaremos os resultados obtidos com as sulfonamidas, seguido dos resultados obtidos com as sulfonil(tio)uréias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese das sulfonamidas

Nossa primeira estratégia sintética foi obter sulfonamidas com os substituintes do topo do esquema de Topliss: H, *p*-Cl, *p*-CH₃, *m,p*-Cl₂

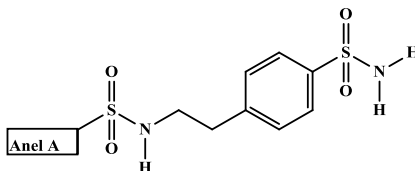
e *p*-OCH₃ (**1**, **2**, **3**, **4** e **5**, respectivamente), e também outros compostos *p*-substituídos com grupos retiradores de elétrons, F e Br (**6** e **7**, respectivamente). A segunda estratégia considerou substituintes mais complexos (**8-12**), como mostrado no Esquema 2.

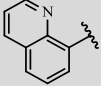
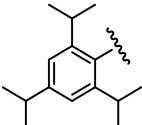


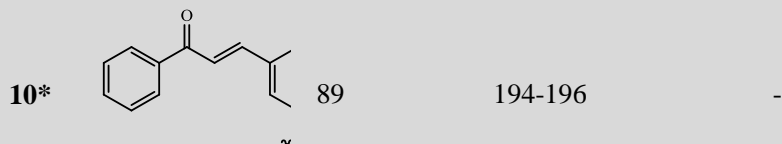
Esquema 2. Síntese das sulfonamidas. **(a)** Piridina. *compostos inéditos

As sulfonamidas **1-12** (Tabela 1 e Esquema 2) foram preparadas a partir da reação entre a 4-(2-aminoetil)benzenossulfonamida e diferentes cloretos de sulfonila em piridina por 16h, à temperatura ambiente. Os compostos foram obtidos com rendimentos variáveis entre 61 e 89%. As estruturas dos compostos **4**, **9**, **10**, **11** e **12** são inéditas e foram caracterizadas por RMN de ¹H, RMN de ¹³C, IV e EM. A caracterização espectral de todas as sulfonamidas é apresentada na parte experimental, e os espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos inéditos estão no Anexo 1.

Tabela 1. Rendimento, ponto de fusão experimental** e número de registro no CHEMCATS das sulfonamidas.

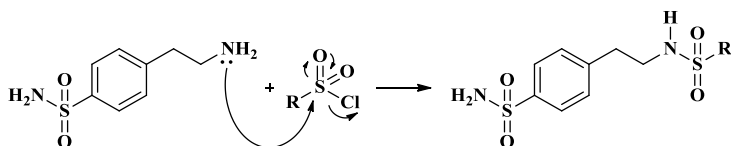


Composto	Anel A	Rend. (%)	p.f. (°C) Exp.	Nº Registro CHEMCATS
1	Fenil	85	155-157	349620-34-4
2	4-Cl-fenil	81	145-146	349620-56-0
3	4-CH ₃ -fenil	69	160-161	349620-94-6
4*	3,4-Cl ₂ -fenil	85	161-162	-
5	4-OCH ₃ -fenil	78	175-176	349622-04-4
6	4-F-fenil	71	164-165	349624-31-3
7	4-Br-fenil	81	152-153	349614-35-3
8		89	227-228	258510-55-3
9*		62	198-199	349441-65-2



CHEMCATS = número de registro no CAS, obtido através do SciFinder. *Compostos inéditos. **os p.f. dos compostos não-inéditos não foram encontrados na literatura; -Dados não encontrados na literatura.

O possível mecanismo de reação para obtenção das sulfonamidas envolve o ataque nucleofílico do nitrogênio amínico ao enxofre eletrofílico do grupo sulfonila (Esquema 3), com posterior perda de um hidrogênio muito provavelmente pelo próprio solvente (piridina), formando como produto a sulfonamida.



Esquema 3. Proposta de mecanismo de reação para obtenção das sulfonamidas.

No espectro de RMN de ^1H do composto **11** (Figura 5), podemos observar a presença das duas metilas pertencentes ao grupo canforil em 0,78 ppm e 0,99 ppm, e os demais deslocamentos referentes aos nove hidrogênios (a-i) do grupo canforil entre 1,37 e 3,29 ppm, sendo: em 1,37 ppm (*m*, Hf); 1,50 ppm (*m*, Hg); 1,88 ppm (*m*, Hi); 1,92 ppm (*m*, Hh); 2,03 ppm (*t*, He); 2,30 ppm (*m*, Hc, Hd); 2,88 ppm (*d*, Hb); 3,29 ppm (*d*, Ha). Os deslocamentos característicos dos

grupos metileno aparecem em 2,85 ppm na forma de um tripleto (NH-CH₂-CH₂) e em 3,24 ppm na forma de um quarteto (NH-CH₂-CH₂). Os hidrogênios NH e NH₂ aparecem em forma de um tripleto em 7,13 ppm e um sinpleto em 7,29 ppm, respectivamente. Os demais hidrogênios referentes ao anel aromático encontram-se em 7,44 (d, *J* = 8,0Hz, H2, H6) e 7,75 (d, *J* = 8,0Hz, 2H, H3, H5).

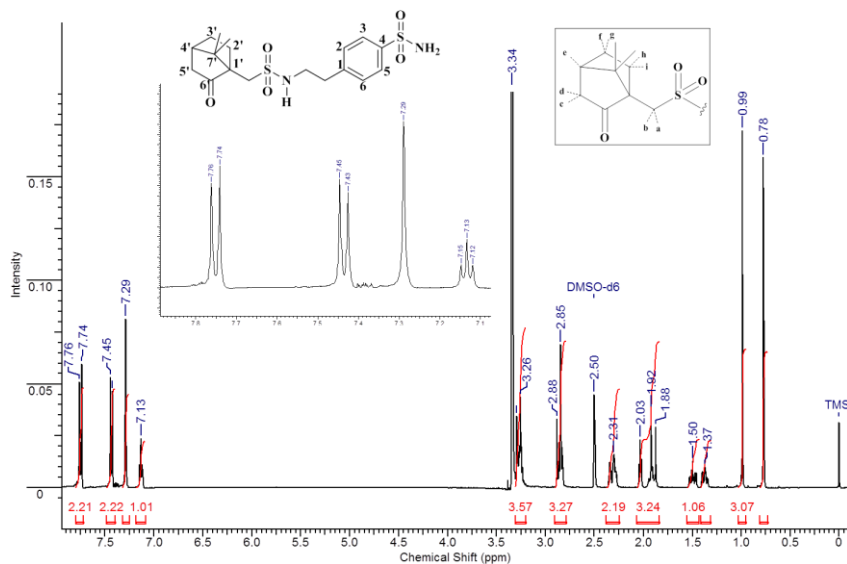


Figura 5. Espectro de RMN de ¹H da sulfonamida **11**.

O espectro de RMN de ¹³C deste composto revelou a presença de sinais característicos das duas metilas em 19,75 ppm, e também referentes aos carbonos do grupo tiofenil em: 24,86 (C3'); 26,71 (C2'); 42,42 (C4', C5'); 47,95 (C7'); 58,23 (C1', -CH₂SO₂). Os grupos metilênicos aparecem em 35,94 ppm (NH-CH₂-CH₂) e 44,11 ppm (NH-CH₂-CH₂), e os carbonos aromáticos em 126,11 (C3, C5); 129,72 (C2, C6); 142,62 (C4); 143,60 (C1). O sinal da carbonila encontra-se em 215,10 ppm (vide espectro no Anexo 1).

O espectro de infravermelho revelou bandas características dos grupos NH₂ em 3397, NH em 3233 e referentes aos estiramentos simétricos (SO₂^{sym}) e assimétricos (SO₂^{assym}) do grupo sulfonila em 1572 e 1348, respectivamente (vide caracterização na seção experimental).

5.2. Atividade antihiperglicêmica das sulfonamidas

5.2.1. Efeito da glibenclamida e das sulfonamidas sintetizadas nos níveis de glicose sérica

A Tabela 2 mostra o efeito das sulfonamidas nos níveis séricos de glicose de ratos hiperglicêmicos. Inicialmente, foram obtidas as curvas dose-resposta do controle positivo para a glibenclamida (1, 10 e 100 mg/Kg) e a curva de tolerância à glicose oral. Como esperado, no teste de tolerância à glicose oral, o grupo controle hiperglicêmico teve os níveis aumentados com o tempo quando comparados ao tempo zero do mesmo grupo. A glibenclamida produziu redução da glicose sérica em 15, 30 e 60 minutos na dose de 10 mg/Kg (23%, 32% e 32%) e na dose de 100 mg/Kg (14%, 31% e 22%), quando comparado com o grupo hiperglicêmico, respectivamente. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada no tratamento com 1 mg/Kg. Baseando-se nesses resultados, a dose de 10 mg/Kg foi adotada para os estudos com as sulfonamidas.

Como pode ser observado na Tabela 2, a administração oral da sulfonamida **1** é aguda e duradoura, diminuindo os níveis de glicose cerca de 24%, 16% e 14% em 15, 30 e 60 minutos, respectivamente. No entanto, a inserção do grupo *p*-cloro na sulfonamida **2** não levou a uma boa redução da glicemia (o nível máximo de redução da glicose sérica foi de cerca de 23% depois de 15 minutos), sendo menos potente, então, que o composto **1**.

Com o objetivo de comparar o composto **2** com outros grupos aceptores de elétrons, foram analisadas as sulfonamidas **6** e **7** (*p*-flúor e *p*-bromo, respectivamente). A sulfonamida **6** mostrou uma sutil atividade biológica somente depois de 30 minutos, e um efeito similar na redução da glicemia foi observada para a sulfonamida **7**. Estes resultados indicam que nenhum destes dois compostos apresentou efeito significativo em termos de atividade antihiperglicêmica nestas condições experimentais.

Na sequência, foi avaliado o efeito da sulfonamida **3** (*p*-CH₃). Seu efeito agudo mostra um perfil de curva de tolerância à glicose similar ao observado para a glibenclamida, com um nível máximo de glicose sérica reduzida em torno de 24% aos 60 minutos. Além disso, o tratamento com a sulfonamida **5** (*p*-OCH₃) diminuiu os níveis de glicose sérica em cerca de 26%, 24% e 23% nos tempos de 15, 30 e 60 minutos, respectivamente.

Para analisarmos a importância de grupos alquílicos nas sulfonamidas, avaliamos o composto **9** (2,4,6-tri-isopropil). Essa sulfonamida diminuiu significativamente a glicemia em cerca de 24%, 24% e 13% aos 15, 30 e 60 minutos, respectivamente, e está entre os melhores compostos antihiper-glicêmicos estudados. Baseando-se nestes resultados, a presença de grupos doadores de elétrons no anel A parece ser importante para a atividade antihiper-glicêmica das sulfonamidas.

Outra inédita e interessante sulfonamida foi sintetizada e avaliada, tendo uma chalcona como anel A. Nosso grupo de pesquisas demonstrou previamente a atividade hipoglicemiante de chalconas (Alberton *et al.*, 2008; Damazio *et al.*, 2009; Damazio *et al.*, 2010), e então decidimos incorporar este fragmento na estrutura da sulfonamida **10**. Os resultados revelam que este composto também diminuiu significativamente os níveis séricos de glicose, quando comparados ao grupo controle.

A presença do grupo quinolinil como substituinte no composto **8** conferiu redução dos níveis séricos de glicose em cerca de 14% quando comparado ao grupo controle. Já as outras duas sulfonamidas inéditas, **11** e **12** (com os grupos canforil e tiofenil como anel A, respectivamente) exibiram um efeito antihiper-glicêmico interessante, embora não apresentassem nenhuma redução nos níveis séricos de glicose importante quando comparados aos demais compostos.

Em resumo, a inserção de substituintes aceptores de elétrons nos fragmentos de glibenclamida parece não apresentar relevância para a atividade antihiper-glicêmica (**2**, **6**, **7**). Entretanto, os grupos doadores de elétrons aumentam essa atividade (**3**, **5**, **9**) e apresentaram os melhores efeitos na curva de tolerância à glicose. Com estes resultados, podemos usar o Método de Topliss Modificado (Lazzarotto *et al.*, 2005) para prever os substituintes do anel fenílico que provavelmente terão um poder antihiper-glicêmico ainda maior: 4-N-(C₂H₅)₂; 3,4-(CH₃)₂; 4-NH₂; 4-NH-C₄H₉; 4-OH; 4-OCH-(CH₃)₂; 3-CH₃, compostos que serão sintetizados na continuidade do trabalho, como perspectivas desta tese.

Tabela 2. Efeito da glibenclamida (10, 1 e 100 mg/kg) e das sulfonamidas (10 mg/kg) em níveis séricos de glicose em ratos Wistar em jejum.

Grupo	Níveis de glicose sérica (mg/dL) Tempo (min)				
	0	15	30	60	180
<i>Hiperglicêmico</i> <i>Glibenclamida</i>	102,29 ± 6,34	177,46 ± 5,95	190,15 ± 1,77	182,55 ± 6,95	141,15 ± 4,47
1 mg/Kg	105,26 ± 1,42	178,53 ± 2,55	171,20 ± 1,42	170,82 ± 1,91	146,24 ± 1,93
10 mg/Kg	112,06 ± 5,61	140,49 ± 11,13 ^a	135,24 ± 5,67 ^c	121,67 ± 8,15 ^c	111,45 ± 10,08 ^a
100 mg/Kg	98,77 ± 1,51	145,90 ± 2,60 ^c	140,43 ± 2,54 ^c	141,90 ± 2,45 ^c	131,27 ± 1,14
<i>Sulfonamida</i> (10 mg/Kg)	114,70 ± 0,68	135,96 ± 4,02 ^c	158,70 ± 2,62 ^c	155,00 ± 4,60 ^b	142,39 ± 4,68
1					
2	97,41 ± 1,92	137,40 ± 3,61 ^c	166,82 ± 4,49 ^c	177,19 ± 5,72	124,00 ± 2,67
3	112,69 ± 1,51	147,18 ± 2,69 ^c	157,22 ± 4,89 ^c	138,40 ± 2,89 ^c	131,61 ± 8,33
4	110,01 ± 2,053	146,59 ± 0,95 ^c	148,20 ± 2,52 ^c	152,17 ± 4,20 ^a	143,28 ± 3,05
5	100,66 ± 2,30	131,03 ± 4,04 ^c	145,04 ± 5,00 ^c	140,05 ± 4,30 ^c	135,72 ± 4,39
6	107,65 ± 2,71	174,07 ± 5,78	166,42 ± 12,43 ^b	185,92 ± 4,99	125,15 ± 3,14 ^b
7	101,39 ± 1,84	139,98 ± 10,24 ^c	153,59 ± 9,61 ^c	158,48 ± 9,06	147,04 ± 4,37
8	115,92 ± 2,80	163,92 ± 0,24 ^c	164,79 ± 6,80	160,27 ± 4,00	142,10 ± 1,86
9	115,69 ± 1,42	133,59 ± 2,31 ^c	144,34 ± 8,93 ^c	158,91 ± 6,13 ^c	129,64 ± 7,04
10	120,93 ± 6,68	143,33 ± 8,36 ^c	130,93 ± 3,94 ^c	139,33 ± 6,13 ^c	140,00 ± 4,23
11	104,53 ± 3,39	131,85 ± 7,87 ^c	133,64 ± 4,74 ^c	127,10 ± 2,95 ^c	128,16 ± 4,68
12	105,46 ± 3,95	144,96 ± 3,41 ^c	153,12 ± 6,88 ^c	157,99 ± 6,88	131,63 ± 2,86

Cada valor significa \pm S.E.M. de seis determinações. ^a $P \leq 0,05$, ^b $p \leq 0,01$, ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico (4g/kg).

5.2.2. Estudos da secreção de insulina

O mecanismo usado por estas sulfonamidas, provavelmente, envolve a secreção de insulina a partir das células- β , isto porque, algumas sulfonamidas e sulfoniluréias (como a glibenclamida) apresentam esse tipo de mecanismo, agindo nos canais K^+ -ATP das células- β que secretam a insulina. Considerando isso, analisamos o perfil das sulfonamidas como secretagogas de insulina (bifásica), com medidas em 15, 30 e 60 minutos por tratamento oral.

A Tabela 3 mostra um modelo típico de estimulação de insulina depois da sobrecarga de glicose (4g/Kg) no grupo controle hiperglicêmico. Como esperado, a glibenclamida foi efetiva em induzir a secreção de insulina em todos os tempos estudados, exibindo um índice insulínico (II) de cerca de 1,98.

Para analisar o perfil das sulfonamidas, selecionamos 3 compostos ativos (**3**, **5** e **9**) e 2 pouco ativos (**1** e **7**). Os resultados mostraram que a sulfonamida **3** teve um ótimo efeito na secreção de

insulina, apresentando um Π em torno de 2,54 vezes maior que o controle hiperglicêmico, seguido pela sulfonamida **1** e pela sulfonamida **5**, que apresentaram valores de Π em torno de 1,54 e 1,5 vezes maior que o grupo controle, respectivamente. Além disso, o efeito da sulfonamida **5** mostrou-se duradouro, ou seja, esse composto foi mais efetivo em 60 minutos quando comparado aos demais. De modo geral, os valores de Π obtidos estão de acordo com o efeito antihiperglicêmico apresentado na Tabela 2.

Também podemos destacar que a sulfonamida **3** teve maior poder de induzir a secreção de insulina que a glibenclamida, no período de 15 minutos. Contudo, a sulfonamida **5** exibiu um interessante perfil de secreção da insulina, uma vez que, no período estudado, a liberação de insulina permaneceu quase inalterada. Isso significa que, além de regular os níveis de glicose sérica, esses compostos também preservam a fisiologia das células- β . Embora a glibenclamida seja um dos fármacos mais efetivos em termos de controle de glicose, a hiperplasia de células- β causada pelo tratamento crônico com essa sulfoniluréia é um efeito colateral que precisa ser melhorado com novos candidatos a fármacos.

Tabela 3. Efeito da glibenclamida e das sulfonamidas (10 mg/kg) nos níveis de insulina sérica em ratos Wistar em jejum.

Grupo	Níveis de insulina sérica (ng/mL)				Π^*
	0	15	30	60	
<i>Hiperglicêmico</i>	0,09 \pm 0,001	2,84 \pm 0,002	0,75 \pm 0,007	0,59 \pm 0,004	0,66
<i>Glibenclamida</i>	-	3,83 \pm 0,430 ^a	2,66 \pm 0,001 ^b	2,46 \pm 0,070 ^c	1,98
1	-	3,89 \pm 0,007 ^c	0,54 \pm 0,075	1,46 \pm 0,006 ^c	1,02
3	-	6,03 \pm 0,002 ^c	1,48 \pm 0,412 ^c	1,44 \pm 0,009 ^c	1,68
5	-	1,20 \pm 0,014	1,50 \pm 0,064 ^c	1,83 \pm 0,009 ^c	0,99
7	-	0,80 \pm 0,191	0,88 \pm 0,05	0,73 \pm 0,014 ^a	0,50
9	-	0,21 \pm 0,056	0,40 \pm 0,010	0,87 \pm 0,154 ^a	0,30

Cada valor significa \pm S.E.M. de quatro determinações. ^a $P \leq 0,05$, ^b $p \leq 0,01$, ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico (4g/kg). * Índice insulinogênico.

5.2.3. Estudos da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas

No intuito de definir o mecanismo de ação dos nossos compostos na secreção de insulina, o efeito dos compostos **1**, **3**, **5**, **7** e **9** foi estudado na absorção de cálcio *in vitro*, uma vez que o cálcio está envolvido na secreção de insulina pelas células- β . Neste experimento, investigamos a absorção de cálcio nas ilhotas pancreáticas isoladas tratadas com diferentes doses de glibenclamida ou sulfonamidas.

Devido ao rápido efeito estimulatório da sulfonamida **5**, que foi 1,8 vezes maior que para glibenclamida na concentração de 20 μM , bem como, dos resultados de tolerância a glicose, perfil de secreção de insulina e influência significativa na captação de cálcio comparados com a glibenclamida, selecionamos este composto para estudos de mecanismo de ação nas ilhotas pancreáticas.

No sentido de estudar o papel dos canais de K^+ -ATP sobre o efeito estimulatório da sulfonamida **5** na absorção de cálcio, usamos diazoxida, que é um agonista dos canais de K^+ -ATP, na dose de 250 μM . Nestas condições experimentais, diazoxida foi capaz de suprimir o aumento da captação de cálcio pela sulfonamida **5** (Figura 6A), indicando claramente que os canais de K^+ -ATP são essenciais para a ação desta sulfonamida.

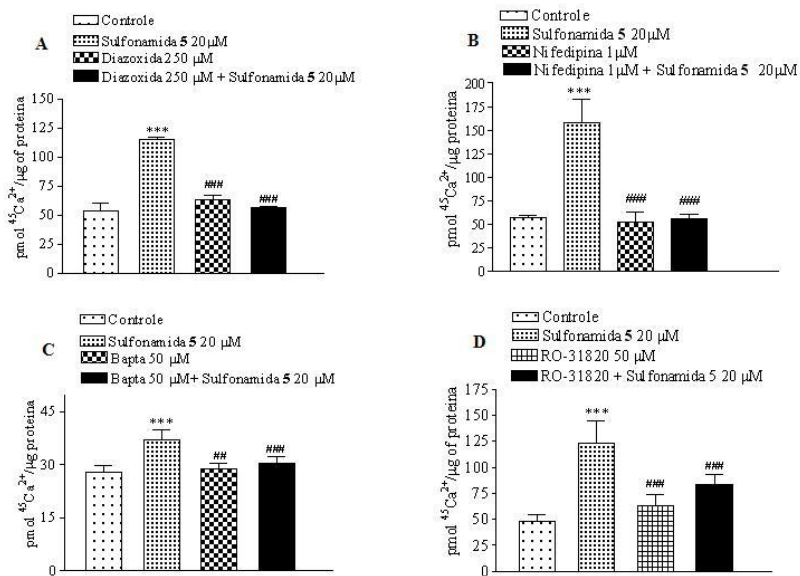


Figure 6. Estudos da captação de cálcio pela sulfonamida **5** usando: A) Diazoxida; B) Nifedipina; C) BAPTA-AM e D) RO-31820.

A sequência de eventos desencadeados pelo composto **5** em relação à captação de cálcio foi também verificada na presença de nifedipina, um bloqueador clássico de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-L (do inglês *Voltage-Dependent Calcium Channel*, *VDCCs*). Na Figura 6B, 1 μM de nifedipina suprimiu o efeito estimulatório do composto **5**. Desta forma, estes VDCCs também parecem fazer parte do mecanismo de ação de captação de cálcio induzidos pela sulfonamida **5**, seguindo um mecanismo similar ao da glibenclamida.

Para analisarmos a participação intracelular do cálcio no efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação de cálcio, foi usado BAPTA-AM, um quelante de cálcio intracelular. A Figura 6C mostra que BAPTA-AM inibiu parcialmente o efeito estimulatório da sulfonamida **5**, sugerindo também a participação intracelular no mecanismo de ação deste composto nas ilhotas pancreáticas.

Tem sido reportado na literatura que a rápida associação da proteína quinase C (do inglês PKC) com grânulos de insulina é essencial

para exocitose da insulina induzida pela glibenclamida (Mendez *et al.*, 2003). Desta forma, para investigarmos a influência de PKC na captação de cálcio, usamos RO-31820 (50 μ M), que é um inibidor da PKC. Como pode ser visto na Figura 6D, o inibidor diminuiu a absorção de cálcio estimulada pela sulfonamida **5** em cerca de 60%.

5.2.4. Estudos do conteúdo de glicogênio

Considerando o efeito da glibenclamida na síntese de glicogênio no fígado, reportado por Abdel e col. (Abdel *et al.*, 1996), investigamos o efeito insulinomimético no conteúdo de glicogênio do fígado e também no músculo esquelético (alvo da insulina). A Tabela 4 mostra que não há acúmulo de glicogênio no fígado depois do tratamento com glibenclamida ou com os compostos **1**, **3**, **5**, **7** ou **9**, quando comparados ao grupo controle hiperglicêmico. Por outro lado, a glibenclamida e os compostos **1**, **5** e **7** aumentaram significativamente o conteúdo de glicogênio muscular, isso ocorreu mais notavelmente com o composto **5**. O efeito estimulatório do composto **5** no conteúdo de glicogênio pode ser consequência da secreção de insulina induzida por esse composto. O efeito secretagogo desta sulfonamida corrobora com os demais resultados, uma vez que nenhuma alteração nos níveis séricos de glicose foi observado nos ratos diabéticos (dados não apresentados).

Adicionalmente, em experimentos similares realizados nos trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisas com séries de chalconas (Damazio *et al.*, 2009; Damazio *et al.*, 2010), nenhum composto exibiu um duplo efeito bioquímico capaz de melhorar o *status* da diabetes. Desta forma, estes resultados indicam que, além da potencial ação secretagoga de insulina, um efeito insulinomimético destes compostos é também desencadeado no músculo esquelético, sendo este o primeiro estudo de duplo efeito de uma sulfonamida em um experimento *in vivo*.

Tabela 4. Efeito da glibenclamida e das sulfonamidas (10 mg/kg) no conteúdo de glicogênio em ratos Wistar em jejum.

Grupo	Músculo	Fígado
<i>Hyperglicêmico</i>	8,60 ± 1,00	14,60 ± 1,27
<i>Glibenclamida</i>	17,46 ± 1,80 ^c	8,71 ± 1,49
1	15,07 ± 1,30 ^b	10,46 ± 0,44
3	5,60 ± 0,24	14,94 ± 1,30
5	19,31 ± 1,30 ^c	11,72 ± 2,10
7	17,02 ± 0,55 ^c	6,49 ± 1,47
9	8,43 ± 0,23	11,13 ± 0,78

Cada valor significa ± S.E.M. de quatro determinações. ^b $P \leq 0,01$, ^c $P \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico (4g/kg).

5.2.5. Estudos da atividade da LDH

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima chave do metabolismo dos glicídeos e pode ser encontrada na maioria dos organismos. Os níveis séricos de LDH são elevados quando ocorrem danos aos tecidos, e este modelo é usado como medida de toxicidade (Lemke, 2008).

Assim, analisamos a viabilidade tecidual através de medidas da atividade de LDH no soro. Através dos resultados obtidos, a atividade de LDH manteve-se inalterada pelos compostos **1**, **3**, **5**, **7** e **9** em todos os períodos estudados, *in vivo* e *in vitro*, e demonstraram a baixa toxicidade destas sulfonamidas.

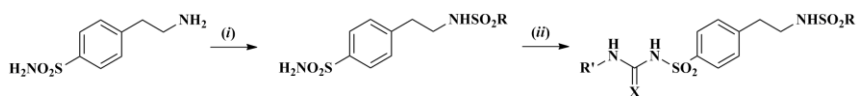
A sequência do trabalho foi a síntese das sulfonil(tio)uréias derivadas das sulfonamidas anteriores, e os ensaios das mesmas nos modelos de hiperglicemia e diabetes.

5.3. Síntese das sulfonil(tio)uréias

Para investigarmos novas características estruturais da glibenclamida, nossa estratégia para a obtenção dos análogos químicos foi baseada na estrutura completa desta molécula. Utilizando princípios de bioisosterismo, propusemos a inclusão da tiouréia no lugar da uréia original (bioisosterismo clássico) e a substituição do grupo carbonila por um grupo sulfonila (bioisosterismo não-clássico), além de variar os

substituintes no anel A e anel B, indicados pelo estudo precedente com as sulfonamidas.

Foram identificadas sulfonamidas com baixa (H e *p*-F), boa (8-quinolina, 10-canforil e tiofenil) e excelente (*p*-CH₃, *p*-OCH₃ e 2,4,6-triisopropil) atividade como agentes hipoglicemiantes orais, com destaque especial para o composto **5** (*p*-OCH₃-substituído). Com base nestes resultados, sintetizamos as sulfoniltiouréias (**13-20**) derivadas, com estes substituintes, e também sintetizamos os compostos **21** (tiouréia) e **22** (uréia) com o anel A mantendo a substituição *p*-OCH₃, porém mudando o anel B da glibenclamida original para *p*-Cl-fenil (**21**) e de 1-naftil (**22**) (Esquema 4).



13 R = fenil; R' = fenil; X = S

14 R = 4-CH₃-fenil; R' = fenil; X = S

15 R = 4-OCH₃-fenil; R' = fenil; X = S

16 R = 2,4,6-triisopropyl-fenil; R' = fenil; X = S

17 R = 8-quinoline; R' = fenil; X = S

18 R = 10-camforil; R' = fenil; X = S

19 R = tiofenil; R' = fenil; X = S

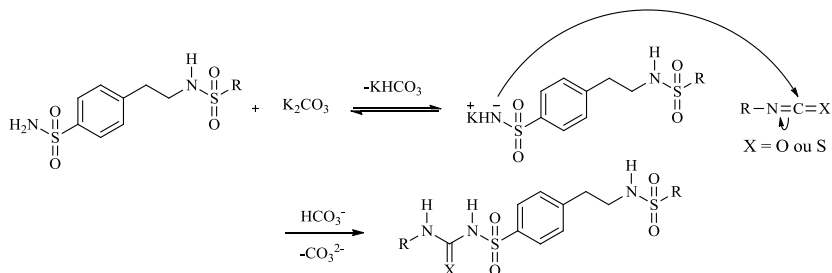
20 R = 4-F-fenil; R' = fenil; X = S

21 R = 4-OCH₃-fenil; R' = 4-Cl-fenil; X = S

22 R = 4-OCH₃-fenil; R' = 1-naftil; X = O

Esquema 4. Síntese das novas sulfonil(tio)uréias. (i) RSO₂Cl, piridina; (ii) K₂CO₃, isocianato ou isotiocianato, acetona.

As sulfonil(tio)uréias **13-22** (Tabela 5 e Esquema 4), foram preparadas a partir da reação entre a benzeno-sulfonamida substituída previamente sintetizada e carbonato de potássio anidro em acetona, sob refluxo, durante 2 horas, possivelmente ocorre a formação do amideto pois o pKa do carbonato é 10,3 e da sulfonamida em torno de 16, esse equilíbrio é favorecido pelo aumento da temperatura. Posteriormente, deve ocorrer o ataque nucleofílico do amideto sobre o carbono eletrofílico do iso(tio)cianato. A reação termina com a protonação do nitrogênio pelo HCO₃⁻ presente (pKa 10), resultando na sulfonil(tio)uréia desejada e CO₃²⁻ (Esquema 5). Os compostos foram obtidos com rendimentos que variaram entre 41 a 79%.




Esquema 5. Proposta de mecanismo de reação para obtenção das sulfonyl(tio)uréias.

Todos os compostos sintetizados são estruturas inéditas e foram caracterizados por RMN de 1H , RMN de ^{13}C , IV e análise elementar (ou alternativamente, por EM). A caracterização espectral detalhada para todos os compostos é apresentada na parte experimental, e os espectros de RMN de 1H e ^{13}C estão no Anexo 1.

Tabela 5. Rendimento e ponto de fusão das novas sulfonyl(tio)uréias.

Composto	Anel A	Anel B	X	Rend. (%)	p.f. (°C) Exp.
13*	fenil	Fenil	S	52	220-223
14*	4-CH ₃ -fenil	Fenil	S	59	225-227
15*	4-OCH ₃ -fenil	Fenil	S	71	146-147
16*		Fenil	S	53	155-157
17*		Fenil	S	41	200-202
18*		Fenil	S	68	146-147

19*		Fenil	S	72	220-222
20*	4-F-fenil	Fenil	S	43	120-122
21*	4-OCH ₃ -fenil	4-Cl-fenil	S	79	152-153
22*	4-OCH ₃ -fenil	1-naftil	O	77	161-162

*Todas as estruturas são inéditas.

O espectro de RMN de ¹H do composto **16** (Figura 7) apresenta os deslocamentos químicos referentes aos 18 hidrogênios pertencentes às seis metilas em 1,13 (3H); 1,14 (6H); 1,16 (3H); 1,17 (3H) e 1,19 (3H) ppm. Os grupos metilênicos característicos destes compostos apresentam-se em forma de um tripleto em 2,81 ppm (NH-CH₂-CH₂) e em forma de um quarteto em 3,07 ppm (NH-CH₂-CH₂). Os três grupos CH referentes aos substituintes isopropil do anel A encontram-se em forma de septetos em 2,90-2,85 ppm (1H) e 4,06-4,12 ppm (2H). Os deslocamentos referentes aos hidrogênios aromáticos encontram-se em 7,20-7,81 ppm como multipletos (11H), juntamente com o sinal do hidrogênio amínico NH. Um dos hidrogênios da tiouréia é visualizado em 10,09 ppm, e o outro é suprimido no espectro, fato que ocorre na maioria dos espectros dos compostos desta série.

No espectro de RMN de ¹³C do composto **16**, observamos a presença das seis metilas em 23,89 (2C) e 25,16 (4C). Os carbonos CH aparecem em 29,22 (2C) e 33,75 (1C), e os carbonos metilênicos em 35,48 (NH-CH₂-CH₂) e 43,18 (NH-CH₂-CH₂) ppm. Os demais carbonos aromáticos correspondem aos sinais em 123,60 (C5''); 123,99 (C3''); 126,10 (C2', C6'); 128,19 (C5); 128,87 (C3); 128,93 (C6); 129,27 (C2); 129,50 (C3', C5'); 129,67 (C4); 133,60 (C1''); 137,91 (C1); 142,58 (C4'); 143,37 (C1'); 150,06 (C2'', C6'') e 152,45 (C4''). O deslocamento referente ao grupo tiocarbonil é observado em 182,10 ppm (vide espectro no Anexo 1).

O espectro de infravermelho do composto **16** revelou bandas características dos grupos NH em 3254 e bandas referentes aos estiramentos simétricos (SO₂^{sym}) e assimétricos (SO₂^{as}) do grupo sulfonila em 1140 e 1390, respectivamente. Em 1085, observamos a presença de uma banda característica de tiocarbonila (vide caracterização na seção experimental). O desaparecimento da banda de NH₂ da sulfonamida precursora, e a presença da banda da tiocarbonila também comprovam a obtenção da sulfoniltiouréia.

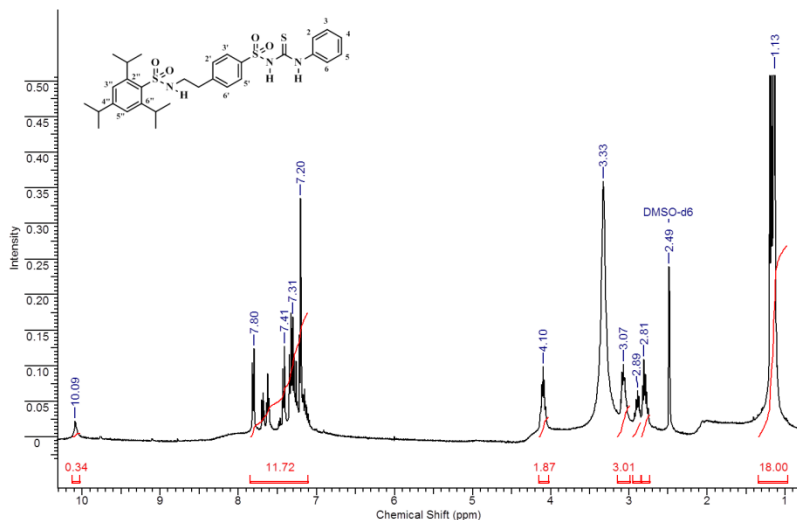


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H do composto **16**.

5.4. Atividade antihiperlicêmica das sulfonil(tio)uréias

5.4.1. Efeito das sulfonil(tio)uréias nos níveis de glicose sérica

Como pode ser observado na Tabela 6, a administração oral do composto **13** (sem substituintes no anel A) mostrou abaixamento agudo e duradouro dos níveis de glicose sérica, cerca de 17%, 20% e 13% em 15, 30 e 60 min, respectivamente. O composto **14** (*p*-CH₃-substituído) também mostrou uma boa redução da glicose (cerca de 14% e 17% em 15 e 30 min, respectivamente), com efeito similar à sulfoniltiouréia **16** (2,4,6-triisopropil-substituído), porém não tão significativo quanto o composto **13**. O composto **20** (*p*-F-substituído) não apresentou atividade no período estudado.

De acordo com os ótimos resultados anteriores obtidos com a sulfonamida **5**, sintetizamos e avaliamos as sulfonil(tio)uréias com o mesmo padrão de substituição no anel A (*p*-OCH₃-fenil), apesar de não mostrarem os excelentes resultados obtidos com a sulfonamida, as sulfoniltiouréias **15** e **21** (fenil e *p*-Cl-fenil como anel B) apresentaram uma atividade boa, baixando a glicemia em torno de 20% (15 min.), e a

única sulfoniluréia sintetizada neste trabalho, **22** (1-naftil como anel B) não apresentou atividade.

Em relação às sulfoniltiouréias com anel A diferente de fenil ou fenil-substituído, podemos observar na Tabela 1 o efeito agudo do composto **17** (8-quinolinil como anel A) mostrando um perfil de curva de tolerância à glicose similar à glibenclamida e exibindo uma diminuição da glicose sérica em cerca de 23% em 60 min. O composto **19** com anel A substituído por um tiofenil, modificou notavelmente o nível da glicemia para 25% durante o período estudado, e também exibiu uma potência maior que 78% quando comparada com a glibenclamida, em 30 min. Porém, o tratamento com a sulfoniltiouréia **18** (canforil como anel A), não reduziu significativamente os níveis de glicose no soro entre 15-60 min.

Os compostos mais ativos, **13**, **15**, **17**, **19** e **21**, foram selecionados para a avaliação da secreção de insulina, a atividade da LDH, e o conteúdo de glicogênio no músculo e no fígado em experimentos *in vivo*.

Tabela 6. Efeito da glibenclamida e das sulfonil(tio)uréias (10 mg/kg) nos níveis de glicose sérica em ratos *Wistar* em jejum.

Grupo	Níveis de glicose sérica (mg/dL) Tempo (min)				
	0	15	30	60	180
<i>Hiperglicêmico</i>	102,29 ± 6,34	177,46 ± 5,95	190,15 ± 1,77	182,55 ± 6,95	141,15 ± 4,47
<i>Glibenclamida</i>	112,06 ± 5,61	140,49 ± 11,13 ^a	135,24 ± 5,67 ^c	121,67 ± 8,15 ^c	111,45 ± 10,08 ^a
<i>Sulfonil(tio)uréia</i>					
13	102,13 ± 1,40	146,02 ± 3,27 ^c	151,62 ± 5,90 ^c	158,27 ± 4,94 ^c	134,44 ± 3,82
14	111,06 ± 6,88	151,25 ± 3,63 ^c	157,14 ± 2,48 ^c	173,51 ± 5,28	152,60 ± 0,50
15	109,55 ± 2,38	150,98 ± 7,05 ^c	144,75 ± 5,80 ^c	154,79 ± 4,04	124,70 ± 2,51
16	110,42 ± 2,34	149,51 ± 4,77 ^c	168,72 ± 7,49 ^b	152,76 ± 1,56	142,08 ± 4,63
17	114,24 ± 1,71	147,97 ± 3,11 ^c	160,22 ± 4,81 ^c	140,08 ± 4,63 ^c	139,63 ± 2,92
18	112,25 ± 2,79	151,58 ± 9,07 ^c	160,61 ± 3,12 ^c	149,03 ± 3,50 ^a	149,35 ± 0,10
19	105,45 ± 6,06	150,23 ± 1,61 ^c	141,60 ± 5,10 ^c	140,96 ± 3,45 ^a	139,26 ± 5,98
20	116,53 ± 6,28	148,80 ± 10,57 ^b	165,70 ± 6,61 ^a	165,30 ± 2,70	146,40 ± 5,66
21	103,70 ± 2,30	141,45 ± 6,48 ^c	158,69 ± 2,76 ^c	151,74 ± 3,75 ^a	139,54 ± 0,43
22	114,70 ± 3,03	155,68 ± 5,98 ^b	156,40 ± 4,58 ^c	157,90 ± 1,24	143,60 ± 6,42

Cada valor representa a média ± S.E.M. de seis determinações. ^a $p \leq 0,05$, ^b $p \leq 0,01$, ^c $p \leq 0,001$ quando comparado ao grupo controle hiperglicêmico (4g/kg).

5.4.2. Efeito das sulfoniltiouréias na secreção de insulina

A glibenclamida estimula a secreção de insulina a partir de células β pancreáticas (Davis *et al.*, 2001) e como esperado, aumentou significativamente a secreção de insulina a 134%, 354% e 416%, em 15, 30 e 60 min, respectivamente. De acordo com Bessesen *et al.*, 2001, a glicose ou a área sob a curva de insulina após a estimulação da glicose é amplamente utilizada para avaliar o índice insulinogênico (II) ou a sensibilidade à insulina. Entre os compostos estudados, o composto **17** aumentou a secreção de insulina em cerca de 180% comparada ao controle de hiperglicêmico, em 30 min. O II calculado para este composto foi de cerca de 50% (1,27) em comparação com o II da glibenclamida. Notavelmente, o composto **19** aumentou significativamente a secreção de insulina em 105%, 158% e 247% em todo o período de avaliação e apresentou um II de 1,6 vezes maior do que o controle hiperglicêmico. Este resultado, associado com os resultados de glicemia na Tabela 1, mostram que sulfoniltiouréia **19** apresentou a melhor atividade hipoglicemiante dentre os compostos estudados. Os demais compostos apresentaram um II menor que 1,15 em comparação ao grupo controle.

5.4.3. Efeito das sulfoniltiouréias no conteúdo de glicogênio

Glibenclamida tem uma ação positiva sobre a deposição de glicogênio, com ação direta sobre a glicogênio fosforilase (Musbah e Furman, 1980). Além disso, em estudos *in vitro*, a glibenclamida aumentou a captação de glicose em células do músculo esquelético (Tsiani *et al.*, 1995). Com base nestes trabalhos, também analisamos o conteúdo de glicogênio do fígado e do músculo *in vivo* após o tratamento com as sulfoniltiouréias. Nosso estudo mostra que não há acúmulo de glicogênio no fígado após tratamento seja com a glibenclamida que com os compostos **13**, **17** e **19**, em comparação ao grupo hiperglicêmico. Por outro lado, os compostos **15** e **21** aumentam significativamente o teor de glicogênio no fígado em 714% e 475%, respectivamente. Já em relação ao conteúdo de glicogênio muscular, a glibenclamida provocou um aumento de 200%, o composto de **19** de 240%, e o composto **21** cerca de 330%, em comparação com o grupo hiperglicêmico. Os compostos **13**, **15** e **17** não alteraram o conteúdo de glicogênio muscular. O aumento do teor de glicogênio muscular pelo composto **19** e **21** pode ser um resultado do aumento da secreção de

insulina induzida por estes compostos (Tabela 7), de acordo com o descrito para a glibenclamida por Davis e Granner, 2001.

Tabela 7. Efeito da glibenclamida e das sulfoniltiouréias (10 mg/kg) nos níveis de insulina sérica em ratos *Wistar* em jejum.

Grupo	Níveis de insulina sérica (ng/mL) Tempo (min)				
	0	15	30	60	II*
<i>Hyperglicêmico</i>	0,09 ± 0,00	2,84 ± 0,002	0,75 ± 0,007	0,59 ± 0,004	0,66
<i>Glibenclamida</i>	-	3,83 ± 0,430 ^a	2,66 ± 0,001 ^b	2,46 ± 0,070 ^c	1,98
13	-	0,39 ± 0,041	0,35 ± 0,11	0,78 ± 0,048	0,31
15	-	2,75 ± 0,030	0,70 ± 0,006	0,53 ± 0,02	0,77
17	-	2,26 ± 0,001	1,36 ± 0,002 ^c	0,60 ± 0,009	0,84
19	-	3,01 ± 0,001 ^a	1,19 ± 0,125 ^c	1,46 ± 0,006 ^c	1,06
21	-	2,69 ± 0,011	0,71 ± 0,006	0,52 ± 0,004	0,72

Cada valor representa a média ± S.E.M. de quatro determinações. ^a $p \leq 0,05$, ^b $p \leq 0,01$, ^c $p \leq 0,001$ quando comparado ao grupo controle hiperglicêmico (4g/kg). *Índice insulínogênico.

5.4.4. Efeito das sulfoniltiouréias e da glibenclamida na atividade da LDH

Compostos que são secretagogos de insulina nas células β frequentemente apresentam toxicidade, por este motivo, a viabilidade tecidual foi analisada, através de medidas da atividade da LDH *in vivo* (lactato desidrogenase). Através dos resultados obtidos, a atividade da LDH permaneceu inalterada para as sulfoniltiouréias analisadas via oral, do mesmo modo que as sulfonamidas, demonstrando assim, que ambas não apresentam toxicidade importante.

6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Em resumo, neste capítulo, desenhamos e sintetizamos uma família de sulfonamidas e de sulfonil(tio)uréias, baseadas na estrutura da glibenclamida, aplicando a estratégia de bioisosterismo para obtenção de potenciais agentes hipoglicemiantes, num total de 22 compostos sintetizados, sendo 15 inéditos. Através dos estudos de curva de tolerância à glicose, as sulfonamidas **1**, **3**, **7** e **9** e as sulfoniltiouréias **13**, **15**, **17**, **19** e **21** foram selecionadas para novas investigações. A sulfonamida **5**, substituída com o grupo 4-OCH₃ no anel A, mostrou

notável atividade em ambos modelos, *in vitro* e *in vivo*. O composto **5** induziu uma potente secreção da insulina, com um significativo índice insulinogênico, e levou a um considerável conteúdo de glicogênio muscular. O mecanismo sugerido para esta sulfonamida nas ilhotas pancreáticas envolve a diminuição na permeabilidade do K^+ da membrana de células- β , causando assim uma despolarização e ativando a PKC, que leva a ativação de VDCC e captação de Ca^{2+} , que pode culminar na liberação de insulina. Os resultados aqui mostrados sugerem que o composto **5** pode contribuir para a homeostase da glicose, uma vez que é equipotente como a glibenclamida, mas sem provocar sobrecarga das células- β nos processos de secreção. Já em relação às sulfonil(tio)uréias testadas, contrariamente ao esperado, os compostos 4-OCH₃-substituídos no anel B não apresentaram os melhores resultados. O composto mais atrativo foi o **19**, que apresenta um grupo tiofenil no lugar do anel B, que mostrou eficácia no abaixamento da glicose sérica, além de apresentar potente ação secretagoga de insulina e índice insulinogênico significativo, também apresentou um importante conteúdo de glicogênio muscular. Finalmente, este composto demonstrou não ser tóxico como medido pelos níveis de LDH. Novos experimentos estão sendo realizados para este composto no intuito de elucidar o seu mecanismo de ação.

7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**7.1. Processos cancerosos e leucemias**

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação e propagação descontrolada pelo corpo de formas anormais das próprias células humanas. As células neoplásicas diferenciam-se das células normais pelo alto poder de invasão que possuem, pela perda de função, perda de diferenciação e pela capacidade de metástase, por possuírem menor adesão entre si (Rang *et al.*, 2004).

No caso das leucemias, as células neoplásicas são decorrentes da proliferação descontrolada de células hematopoiéticas linfóides ou mielóides, provenientes de uma única célula-tronco mutada (Figura 8) (Greaves, 1993).

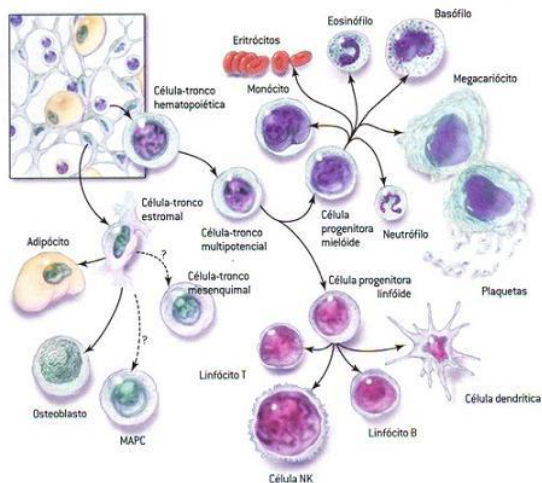


Figura 8. Sequência de diferenciação celular hematopoiética (Vilela, 2009).

7.2. Leucemia linfóide aguda

A leucemia linfóide aguda (LLA) caracteriza-se por um defeito na maturação celular, o que ocasiona um desequilíbrio entre a sua proliferação e maturação, levando a uma expansão contínua do clone leucêmico (Bain, 2003). A LLA é responsável por 80% dos casos de leucemia aguda na infância (Laks *et al.*, 2003) e 50% de todas as malignidades hematopoiéticas (Downing & Shannon, 2002); entretanto, tem bom prognóstico, pois acomete células progenitoras linfóides maduras (Greaves, 1993). Em adultos a LLA é relativamente rara, contabilizando 2-3% das malignidades hematopoiéticas (Downing & Shannon, 2002); porém, o prognóstico é muito pior que para as crianças, pois acomete células-tronco multipotentes, originando uma leucemia mais agressiva (Greaves, 1993).

As primeiras manifestações clínicas envolvem a infiltração da medula óssea pelas células leucêmicas, impedindo a proliferação de células normais, provocando anemia, trombocitopenia e neutropenia nos pacientes, além de infecções sucessivas e hemorragias. Já nas manifestações tardias, ocorre a infiltração de células leucêmicas em outros sistemas do organismo como o fígado, o baço, os linfonodos e, mais freqüentemente, o sistema nervoso central (SNC) (Bain, 2003; Viele, 2003).

7.3. Terapia atual para leucemias

As pesquisas com o uso de fontes naturais como quimioterápicos são amplas, um exemplo disso é o antineoplásico paclitaxel (TaxolTM) que é um dos mais importantes produtos naturais anticâncer já descobertos, reportado pela primeira vez em 1971 (Wani *et al.*, 1971) e aprovado pelo FDA para o uso clínico em 1992. Outro exemplo é a vincristina, um alcalóide utilizado na terapia de leucemia aguda e outros tipos de tumores atuando, assim como o paclitaxel, através da ligação à tubulina, impedindo a polimerização dos microtúbulos (Goodman e Gilman, 2006).

Os quimioterápicos mais usados na terapia das leucemias (Figura 9) incluem daunorrubicina, doxorubicina, dexametasona, vincristina, metotrexato e mercaptopurina (Plasschaert *et al.*, 2004). Estes quimioterápicos conferem benefício terapêutico, mas também significativa toxicidade ao organismo e às células normais, devido a sua atuação na inibição da proliferação celular (Herr & Debatin, 2001), na

indução da apoptose ou na diferenciação dos blastos leucêmicos, que evoluirão para apoptose (Leszczyńska *et al.*, 2001).

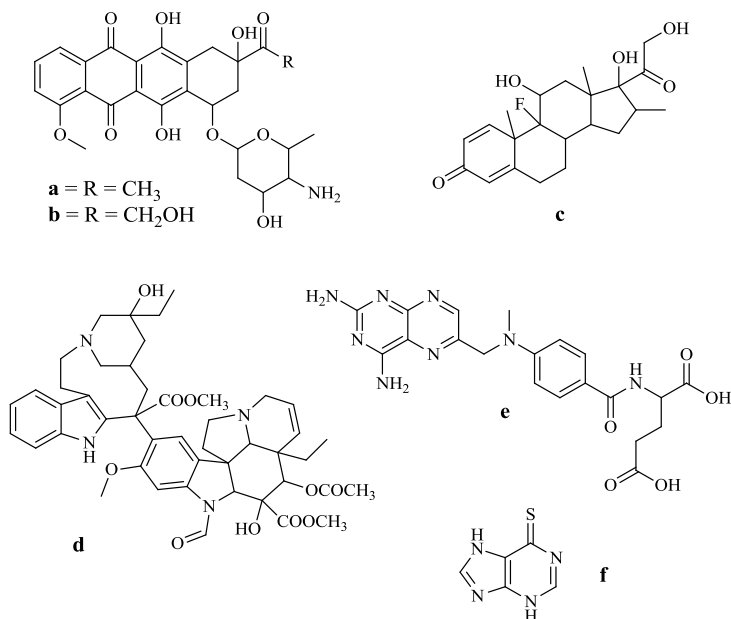


Figura 9. Fármacos utilizados como antileucêmicos: daunorubicina (a), doxorubicina (b), dexametasona (c), vincristina (d), metotrexato (e) e mercaptopurina (f).

7.4. Planejamento de novos antileucêmicos

Agentes que interagem com a tubulina têm desempenhado um papel fundamental na quimioterapia do câncer nas últimas décadas, tornando microtúbulos celulares (MT) um dos poucos alvos anticancerígenos validados. Os microtúbulos são polímeros dinâmicos de tubulina, componentes estruturais celulares envolvidos em vários processos vitais, como mitose e comunicação intracelular, tendo como unidades estruturais α , β -dímeros de tubulina (Figura 10).

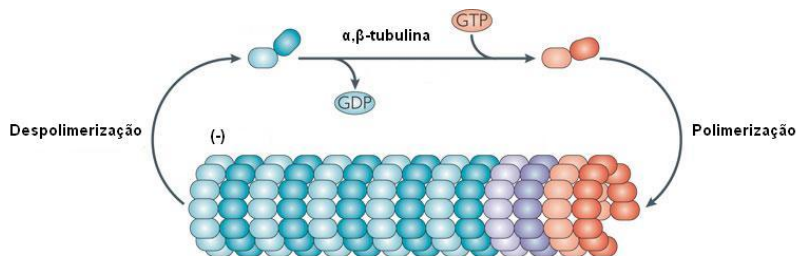


Figura 10. Os microtúbulos são resultantes do empacotamento dos protofilamentos de dímeros de α,β -tubulina lado a lado (adaptado de Howard & Hyman, 2009).

A colchicina (Figura 11A) é um alcalóide, originalmente extraído de plantas do gênero *Colchicum* (*Colchicum autumnale*), que inibe a divisão celular pela prevenção da formação dos microtúbulos, ou seja, é um agente despolimerizante natural de microtúbulos, através da ligação com a tubulina. É altamente citotóxico, mas apesar do seu papel central na elucidação de propriedades físicas e funções biológicas dos microtúbulos, não tem sido utilizada como uma alternativa terapêutica para o tratamento de câncer devido à sua elevada toxicidade, até mesmo comparada à intoxicação por arsênio. Recentemente, no entanto, os compostos que atuam no sítio de ligação da colchicina tem atraído atenção particular como agentes anticancerígenos (Battacharyya *et al.*, 2008; Nauyen *et al.*, 2005). O grande interesse em tais moléculas é devido ao fato de análogos da combretastatina A-4 (Figura 11B), podofilotoxina (Figura 11C) e colcemida (Figura 11D) serem potentes inibidores da tubulina com atividade citotóxica e anti-mitótica, bem como, estruturas simples que estão atualmente sob investigação clínica como potenciais fármacos para quimioterapia (Tron *et al.*, 2006; Nam, 2003; Siemann *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009; Mauer *et al.*, 2008).

Neste contexto, nosso grupo vem trabalhando na pesquisa de novos inibidores, resultando em chalconas 3,4,5-trimetoxi-substituídas, como por exemplo **A23** (Figura 11E), com potencial atividade citotóxica em linhagens REH e Jurkat (Mascarello, 2006). A significância do *scaffold* 3,4,5-trimetoxifenil para a inibição da tubulina já foi discutida por alguns autores (Vogt *et al.*, 2009; Salum, 2012) e será usado no planejamento das sínteses propostas neste capítulo.

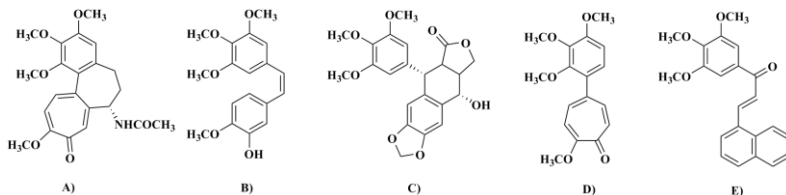


Figura 11. Agentes que interagem com os microtúbulos. A) colchicina; B) combretastatina A-4; C) podofilotoxina; D) colcemida e E) chalcona A23.

As acil-hidrazonas são compostos orgânicos com a estrutura $R_1R_2C=NNHCOR_3$. O nitrogênio iminico possui hibridização sp^2 e pode ocorrer isomeria em torno da ligação dupla carbono-nitrogênio. Esses compostos têm recebido um crescente interesse por suas diversas aplicações. Biologicamente atuam como herbicidas, inseticidas e estimulantes de crescimento de plantas (Robinson *et al.*, 1963). Ácidos isonicotinícos-hidrazônicos foram pesquisados em termos de atividade biológica no tratamento da tuberculose (Vigorita *et al.*, 1994). Coordenadas a metais, as hidrazonas também foram referenciadas como agentes bacteriológicos e bacteriostáticos (Samus *et al.*, 1994).

Propomos também o estudo com derivados das acil-hidrazonas, os oxadiazóis, obtidos pela estratégia de bioisosterismo não clássico. Os 1,3,4-oxadiazóis são uma importante classe de compostos heterocíclicos com uma ampla gama de atividades biológicas, tais como antiviral, antimicrobiana, antineoplásica, fungicida, inibição de tirosinase e catepsina K (Kumar *et al.*, 2009). Além disso, são ótimos bioisósteros de amidas e ésteres, que podem contribuir substancialmente no aumento da atividade farmacológica, participando em ligações de hidrogênio com os receptores (Guimaraes *et al.*, 2005).

Neste trabalho, como uma continuação da pesquisa focada em encontrar novos compostos estruturalmente simples que inibam os MT, planejamos e sintetizamos duas séries de acil-hidrazonas, uma composta por 29 diferentes 3,4,5-trimetoxi-hidrazonas (**23-51**), e outra com 14 acil-hidrazonas (**52-65**), bem como, duas séries de 1,3,4-oxadiazóis derivados, cada série com 5 estruturas: 3,4,5-trimetoxi-fenil-1,3,4-oxadiazóis (**66-70**) e fenil-1,3,4-oxadiazóis (**71-75**) (Esquema 6) e avaliamos a citotoxicidade destes compostos em linhagens de leucemia humana. De fato, como nas chalconas, as acil-hidrazonas e os 1,3,4-oxadiazóis representam *scaffolds* químicos atraentes para a concepção de novos moduladores dos MT, devido à sua versatilidade química, simplicidade e eficiência de síntese.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. Síntese das acil-hidrazonas e dos oxadiazóis

8.1.1. Modelagem Molecular.

Simulações prévias de dinâmica molecular com *N*-acil-hidrazonas sugerem que diferentes estados conformacionais podem coexistir em solução (Pol-Fachin *et al.*, 2010). Diferentes conformações das *E-N*-acil-hidrazonas possíveis em solução são apresentadas na Figura 12. Análises conformacionais da acil-hidrazona não-substituída **23** sugerem que, em solvente aquoso, as diferenças de energia entre diferentes conformações populadas podem ser tão pequenas quanto 1 kcal/mol, permitindo que diferentes estados conformacionais coexistam nesse ambiente (Salum, 2012).

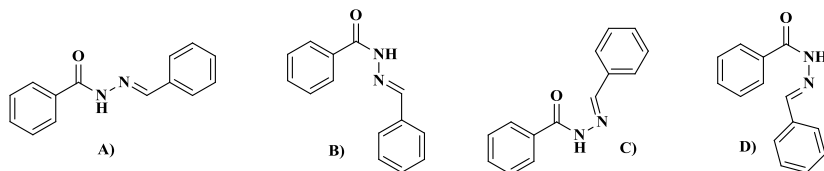


Figura 12. Principais estados conformacionais que podem ser atribuídos à unidade central *N*-acil-hidrazona.

Simulações de *docking* foram realizadas para explorar os possíveis modos de ligação das *N*-acil-hidrazonas e dos 1,3,4-oxadiazóis propostos no sítio de ligação da colchicina. Como pode ser visto na Figura 13, a *N*-acil-hidrazona **23** se liga perfeitamente na cavidade da tubulina onde se liga DAMA-colchicina (*N*-deacetil-*N*-(2-mercaptoacetil)colchicina), com os seus grupos 3,4,5-trimetoxifenil compartilhando o mesmo bolsão hidrofóbico. Além disso, o oxigênio da carbonila faz ligações hidrogênio semelhantes com Asp β 251 e Leu β 255 enquanto as interações de van der Waals são importantes para a interação dos anéis aromáticos, posicionados no lado oposto da cavidade de ligação, na mesma região do anel de tropona da colchicina.

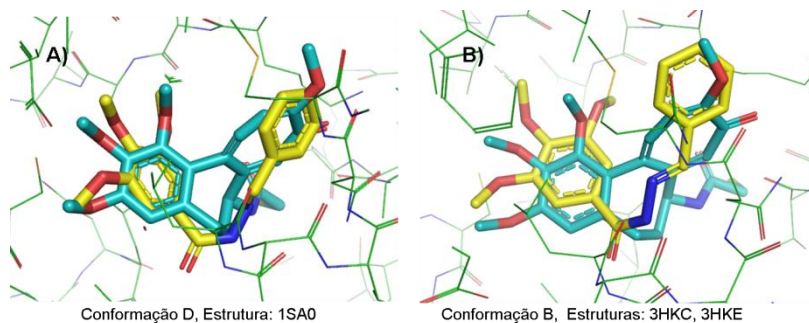
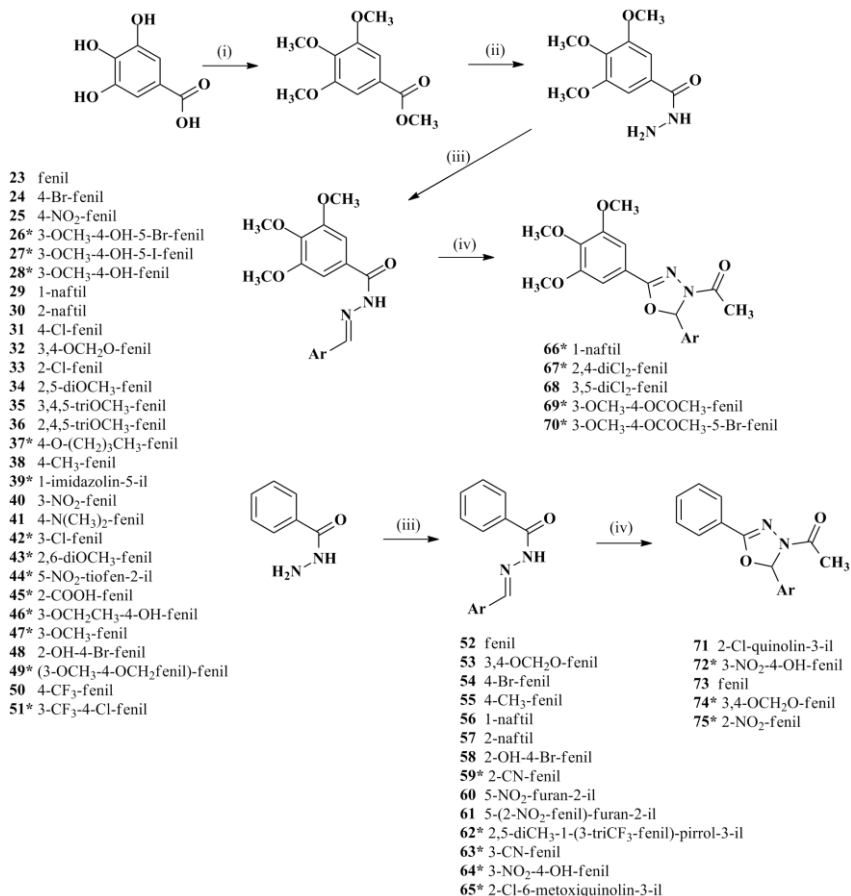


Figura 13. Posicionamentos obtidos por *docking* molecular para as conformações D e B da acil-hidrazona sem substituinte no anel B. A acil-hidrazona está em amarelo e a colchicina em azul.

Portanto, as novas classes de compostos foram concebidas para investigar *i*) a relação estrutura-atividade resultante da presença do substituinte 3,4,5-trimetoxifenil no anel A, *ii*) a influência do número e da posição dos substituintes no anel B, incluindo a substituição do grupo fenil por anéis heterocíclicos e *iii*) o efeito de análogos conformacionalmente restritos na atividade biológica (1,3,4-oxadiazóis).

8.1.2. Síntese das acil-hidrazonas e dos oxadiazóis.

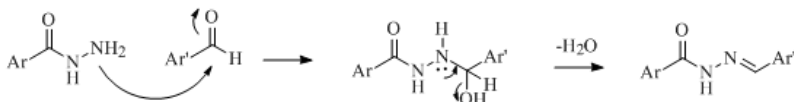
Vinte e nove diferentes 3,4,5-trimetoxi-hidrazonas (**23-51**), quatorze acil-hidrazonas (**52-65**), cinco 3,4,5-trimetoxi-fenil-1,3,4-oxadiazóis (**66-70**) e cinco fenil-1,3,4-oxadiazóis (**71-75**) foram sintetizados (Esquema 6). As acil-hidrazonas foram preparadas por condensação da acil-hidrazida apropriada e diferentes aldeídos substituídos, sob refluxo (Troeberg *et al.*, 2000) e os 1,3,4-oxadiazóis foram preparados por ciclização das acil-hidrazonas previamente obtidas com anidrido acético sob refluxo (Jin *et al.*, 2006). Os reagentes utilizados foram comercialmente disponíveis (Sigma Aldrich®), exceto a 3,4,5-trimetoxi-hidrazida, que foi preparada como previamente descrito, com rendimento de 80% (Chida *et al.*, 2001).



Esquema 6. Esquema de síntese dos compostos: (i) (CH₃)₂SO₄, K₂CO₃, acetona, TBAI, refluxo, 12 h; (ii) H₂NNH₂.H₂O, MeOH, refluxo, 5 h; (iii) aldeído respectivo, MeOH, refluxo, 2 h; (iv) anidrido acético, refluxo, 3h. Os compostos **23-51** são 3,4,5-trimetoxi-hidrazonas, **52-65** são acil-hidrazonas, **66-70** são 3,4,5-trimetoxi-fenil-1,3,4-oxadiazóis e **71-75** são fenil-1,3,4-oxadiazóis (*inéditos).

A reação de condensação entre benzaldeídos substituídos e hidrazida é relativamente rápida levando a bons rendimentos, que podem variar de acordo com a maior ou menor eletrofilicidade da carbonila para o ataque pelo nucleófilo -NH₂ da hidrazida. Como pode ser observado no Esquema 7, o mecanismo proposto começaria com o

ataque nucleofílico pelo par de elétrons do nitrogênio da hidrazida à carbonila do aldeído, levando à formação de um intermediário tetraédrico, que após a eliminação de uma molécula de água resultaria nas acil-hidrazonas desejadas. As acil-hidrazonas foram obtidas com rendimentos de 29% a 93% (Tabela 8).



Esquema 7. Mecanismo de reação para obtenção das acil-hidrazonas.

Através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H é possível observarmos a formação das acil-hidrazonas pela presença do hidrogênio ligado ao carbono, $-\text{HC}=\text{N}-$, em aproximadamente 8,5 ppm (como um simpleto) e do hidrogênio ligado ao nitrogênio, $-\text{NH}-$, em aproximadamente 11,6 ppm (como um simpleto), presentes em todas as acil-hidrazonas sintetizadas. Para o composto **27** (Figura 14), podemos observar, além destes sinais característicos (HC=N em 8,29 ppm e NH em 11,65 ppm), os deslocamentos referentes às quatro metoxilas em 3,71 ppm (3H); 3,85 ppm (6H) e 3,87 ppm (3H). Os hidrogênios aromáticos aparecem em 7,20 (H2, H6); 7,32 (H6') e 7,59 (H2'), e o hidrogênio da hidroxila é observado em 10,07 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C destacam-se os deslocamentos característicos das metoxilas em 56,78 e 60,81 ppm; dos carbonos aromáticos: 85,17 (C3'); 105,84 (C2, C6); 109,72 (C6'); 128,28 (C1); 129,31 (C1'); 130,75 (C2'); 141,03 (C4); 147,97 (C5'); 149,00 (C4'); 153,36 (C3, C5) ppm; do C=N em 147,35 ppm e da carbonila em 163,16 ppm (vide espectro em Anexo 1).

No espectro de infravermelho, algumas absorções características foram observadas, como o NH em 3382, a carbonila em 1636, o C=N em 1565, além das bandas de aromáticos em 1290, 1585, 1490, 1334, 1137, 997 (vide caracterização na seção experimental).

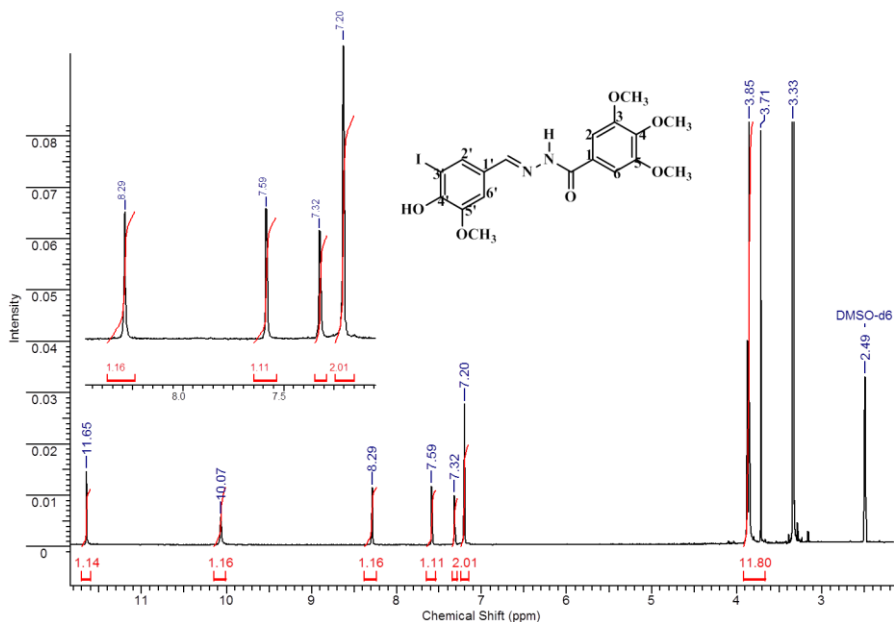
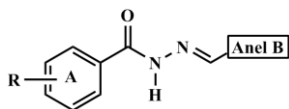


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da acil-hidrazona **27**.

Entre as acil-hidrazonas sintetizadas nesta primeira etapa, 18 são estruturas inéditas (**26**, **27**, **28**, **37**, **39**, **42-47**, **49**, **51**, **59**, **62**, **63**, **64** e **65**) e 25 (**23-25**, **29-36**, **38**, **40**, **41**, **48**, **50**, **52-58**, **60** e **61**) foram previamente publicadas (Mazzone *et al.*, 1984; Shehata *et al.*, 1996; Cave *et al.*, 1990; Jin *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Khalil *et al.*, 1993; Maccioni *et al.*, 2011; Galons *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 2011; Horner & Fernekess, 1961; Lien *et al.*, 2009; Pouralimardan *et al.*, 2007; Vlaovic *et al.*, 1990; Grammaticakis, 1956; Kumar *et al.*, 2010). Todos os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . A caracterização espectral detalhada para os compostos inéditos (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , IV e análise elementar ou alternativamente, EM) é apresentada na seção experimental e os espectros no Anexo 1. Os dados de rendimento e pontos de fusão dos compostos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Rendimento, ponto de fusão (experimental e o reportado na literatura) e número de registro no CHEMCATS das acil-hidrazonas **23-65**.



Composto	R	Anel B	Rend. (%)	p.f. (°C) Exp.	p.f. (°C) Lit.	Nº Registro CHEMCATS
23	3,4,5-trimetóxi	Fenil	91	140-141	141-142 [£]	39229-58-8
24	3,4,5-trimetóxi	4-Br-fenil	82	208-209	211-212 [§]	69785-55-3
25	3,4,5-trimetóxi	4-NO ₂ -fenil	75	213-214	**	180251-17-6
26*	3,4,5-trimetóxi	3-OCH ₃ -4-OH-5-Br-fenil	71	262-263	-	300673-71-6
27*	3,4,5-trimetóxi	3-OCH ₃ -4-OH-5-I-fenil	69	247-248	-	-
28*	3,4,5-trimetóxi	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	70	198-199	-	303085-33-8
29	3,4,5-trimetóxi	1-naftil	82	229-230	**	39271-77-7
30	3,4,5-trimetóxi	2-naftil	89	231-232	**	39271-78-8
31	3,4,5-trimetóxi	4-Cl-fenil	91	190-192	194-195 [£]	1190131-33-9
32	3,4,5-trimetóxi	3,4-OCH ₂ O-fenil	95	212-214	216 [§]	90754-78-2
33	3,4,5-trimetóxi	2-Cl-fenil	83	213-214	211 [¥]	133661-68-4
34	3,4,5-trimetóxi	2,5-diOCH ₃ -fenil	84	209-210	**	351492-41-6
35	3,4,5-trimetóxi	3,4,5-triOCH ₃ -fenil	75	240-241	239-240 [§]	90754-75-9
36	3,4,5-trimetóxi	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	79	222-223	225 [§]	90754-76-0
37*	3,4,5-trimetóxi	4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ -fenil	81	118-120	-	351471-10-8
38	3,4,5-trimetóxi	4-CH ₃ -fenil	79	187-188	**	39229-60-2
39*	3,4,5-trimetóxi	1-imidazolin-5-il	75	230-231	-	-
40	3,4,5-trimetóxi	3-NO ₂ -fenil	68	241-242	**	303085-94-1
41	3,4,5-trimetóxi	4-N(CH ₃) ₂ -fenil	65	218-219	**	39229-61-3
42*	3,4,5-trimetóxi	3-Cl-fenil	83	184-186	-	346721-52-6
43*	3,4,5-trimetóxi	2,6-diOCH ₃ -fenil	93	245-246	-	-
44*	3,4,5-trimetóxi	5-NO ₂ -tiofen-2-il	61	219-220	-	351364-14-2
45*	3,4,5-trimetóxi	2-COOH-fenil	70	183-184	-	675172-22-2

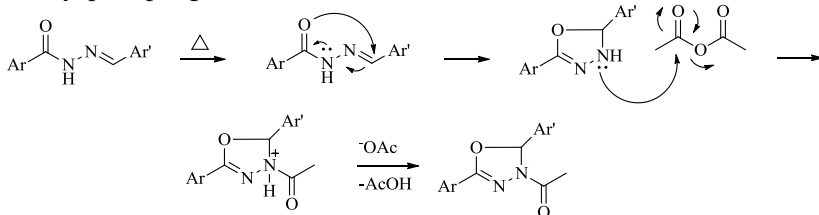
46*	3,4,5-trimetóxi	3-OCH ₂ CH ₃ -4-OH-fenil	79	194-195	-	356107-15-8
47*	3,4,5-trimetóxi	3-OCH ₃ -fenil	93	181-183	-	300676-34-0
48	3,4,5-trimetóxi	2-OH-5-Br-fenil	65	206-208	**	1190131-32-8
49*	3,4,5-trimetóxi	(3-OCH ₃ -4-OCH ₂ Bz)-fenil	78	195-196	-	300672-14-4
50	3,4,5-trimetóxi	4-CF ₃ -fenil	91	194-195	221-222 [‡]	475392-89-3
51*	3,4,5-trimetóxi	3-CF ₃ -4-Cl-fenil	83	203-204	-	-
52	H	Fenil	73	205-207	205-206 [‡]	14850-89-6
53	H	3,4-OCH ₂ O-fenil	92	272-273	**	851102-55-1
54	H	4-Br-fenil	89	181-182	**	51771-27-8
55	H	4-CH ₃ -fenil	75	159-160	159-161 [†]	7253-65-8
56	H	1-naftil	71	177-178	**	24090-92-4
57	H	2-naftil	79	215-217	**	24091-07-4
58	H	2-OH-5-Br-fenil	83	196-198	199-204 [‡]	41377-36-0
59*	H	2-CN-fenil	29	184-186	-	-
60	H	5-NO ₂ -furan-2-il	41	220-221	218 ^π	28123-74-2
61	H	5-(2-NO ₂ -fenil)-furan-2-il	39	186-188	**	20924-95-2
62*	H	2,5-diCH ₃ -1-(3-CF ₃ -fenil)pirrol-3-il	53	110-112	-	-
63*	H	3-CN-fenil	74	169-171	-	-
64*	H	3-NO ₂ -4-OH-fenil	82	226-228	-	342002-46-4
65*	H	2-cloro-6-metoxiquinolin-3-il	31	260-262	-	633320-27-1

CHEMCATS = número de registro no CAS, obtido através do SciFinder.

*Compostos inéditos. **p.f. não encontrado na literatura; –Dados não encontrados na literatura; [§]Mazzone *et al.*, 1984; [¥]Galons *et al.*, 1990; [‡]Cao *et al.*, 2011; [‡]Horner & Fernekess, 1961; [†]Lien *et al.*, 2009; [‡]Pouralimardan *et al.*, 2007; ^πVlaovic *et al.*, 1990. ^φGrammaticakis, 1956; ^φKumar *et al.*, 2010.

Para a síntese dos oxadiazóis (**66-75**), utilizou-se a metodologia descrita por Jin e col. (2006), que utiliza anidrido acético sob refluxo por 2 horas ou mais, até a ciclização da hidrazona. Como pode ser visto no Esquema 8, um mecanismo de reação pode ser proposto baseado nas regras de Balwin (Baldwin *et al.*, 1976) para fechamento de anéis, segundo estas regras a formação do anel 5-*endo-trig* não é privilegiada (como podemos observar pelos baixos rendimentos obtidos, Tabela 9) porém pode ser favorecida pela alta temperatura. Deste modo, propõe-se que a alta temperatura promove uma reação intramolecular da acil-hidrazona, através do ataque do par de elétrons do oxigênio sobre a dupla ligação. Por fim, o par de elétrons do nitrogênio promoveria um ataque nucleofílico na carbonila do anidrido acético, com eliminação do grupo ^-OAc . A reação seria concluída com a abstração do hidrogênio ligado a um dos nitrogênios do anel pelo grupo acetato livre, formando assim os 1,3,4-oxadiazóis.

Entre os oxadiazóis sintetizados neste trabalho, 7 são estruturas inéditas (**66**, **67**, **69**, **70**, **72**, **74** e **75**) e 3 (**68**, **71** e **73**) foram previamente publicadas (Somogyi, 2007; Khalil *et al.*, 1993; Hearn e Chanyaputhipong, 1995).



Esquema 8. Mecanismo de reação para obtenção dos 1,3,4-oxadiazóis.

Como pode ser visto na Figura 15, o espectro de RMN de 1H do composto **66** mostra deslocamentos que comprovam a ciclização da acil-hidrazona original em oxadiazol: (i) deslocamento referente aos 3H da metila ligada a carbonila em 2,47 ppm e (ii) deslocamento referente ao hidrogênio HC-N em 7,76 ppm. Além disso, também podemos observar a presença dos 9 hidrogênios das metoxilas em 3,87 ppm e os hidrogênios aromáticos em 7,08 (s, H2, H6); 4,48-7,62 (m, H4', H5', H9', H10'); 7,91 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H6', H8'); 8,22 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H3') ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C RMN deste composto, sinais característicos da formação do oxadiazol podem ser observados em 21,57 ppm (CH_3); 91,17 ppm (C-N); 155,83 ppm (C=N) e 168,26 ppm (C=O). Os deslocamentos referentes às metoxilas aparecem em 56,28 e 60,98 ppm, e os demais carbonos aromáticos são observados em 104,27

(C2, C6); 119,61 (C1); 123,04 (C2'); 125,07 (C9'); 125,20 (C3'); 126,05 (C7'); 126,95 (C8'); 128,95 (C4'); 130,51 (C6'); 130,61 (C10'); 130,79 (C5'); 134,04 (C1'); 141,11 (C4); 153,29 (C3, C5) ppm (vide espectro no Anexo 1).

Absorções características no espectro de infravermelho para o composto **66** aparecem em 1731 para a carbonila, 1669 para C=N, 1254 para C-O, 1124 para C-N, bem como algumas bandas de aromáticos em 2997, 2827, 1509, 1416, 1369, 1006, 980, 847 e 784.

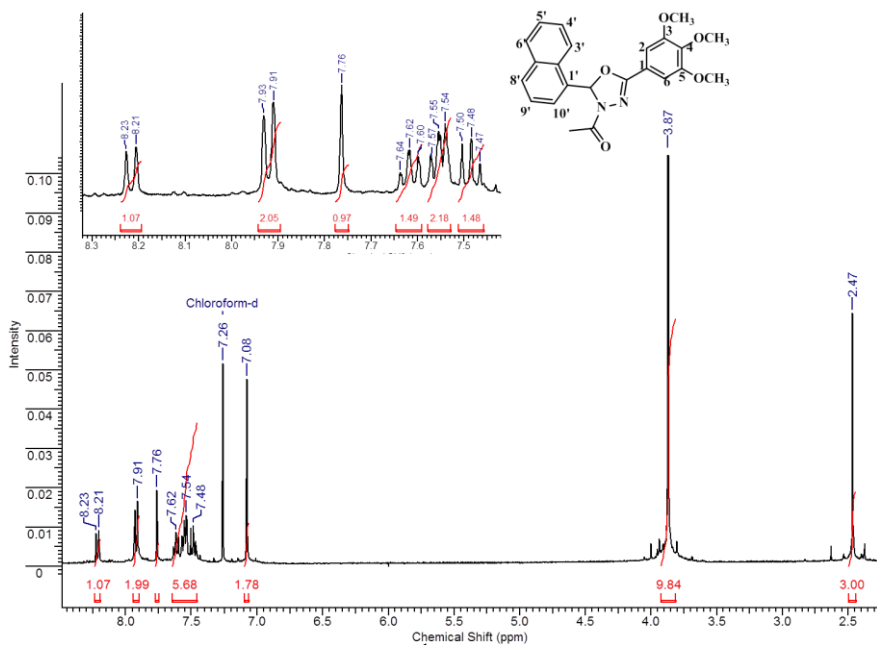
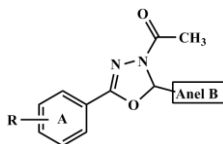


Figura 15. Espectro de RMN ^1H do composto **66**.

A caracterização espectral detalhada para os compostos inéditos (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , IV e análise elemental, ou alternativamente EM) é apresentada na seção experimental e os espectros no Anexo 1. Os dados de obtidos para os oxadiazóis são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Rendimento, ponto de fusão (experimental e relatados na literatura) e número de registro no CHEMCATS dos 1,3,4-oxadiazóis (66-75).



Composto	R	Anel B	Rend. (%)	p.f. (°C) Exp.	p.f. (°C) Lit.	Nº Registro CHEMCATS
66*	3,4,5-trimetóxi	1-naftil	35	189-192	-	-
67*	3,4,5-trimetóxi	2,4-Cl ₂ -fenil	29	166-167	-	-
68	3,4,5-trimetóxi	3,5-Cl ₂ -fenil	47	145-146	**	913254-27-0
69*	3,4,5-trimetóxi	3-OCH ₃ -4- OCOCH ₃ -fenil	25	170-172	-	-
70*	3,4,5-trimetóxi	3-OCH ₃ -4- OCOCH ₃ -5- Br-fenil	30	177-179	-	-
71	H	2-Cl-quinolin- 3-il	69	147-148	**	154255-43-3
72*	H	3-NO ₂ -4-OH- fenil	68	142-143	-	-
73	H	Fenil	38	88-89	91 [#]	13864-76-1
74*	H	3,4-OCH ₂ O- fenil	27	79-81	-	-
75*	H	2-NO ₂ -fenil	38	119-120	-	-

CHEMCATS = número de registro no CAS, obtido através do SciFinder. *Compostos inéditos. **P.F. não encontrado na literatura; – Dados não encontrados na literatura. [#]Somogyi, 2007.

9 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

9.1. Atividade inibitória *in vitro* do crescimento celular.

Os compostos sintetizados foram inicialmente avaliados em uma concentração única (0,1 μM) em relação à capacidade de reduzir a sobrevivência das linhagens celulares de leucemia linfóide aguda humana, REH (linfócitos B) e Jurkat (linfócitos T) (Tabela 10). Podemos observar que as únicas acil-hidrazonas ativas apresentam padrão de substituição 3,4,5-trimetoxi-fenil no anel A, confirmando a importância destes substituintes para a atividade (Ducki *et al.*, 2009; Ducki, 2009; Lawrence *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 1990). Já entre os 1,3,4-oxadiazóis (**66-70**) nem os que possuem este mesmo padrão de substituição no anel A, foram ativos para as células leucêmicas, provavelmente porque estes análogos possuem uma conformação desfavorável.

Tabela 10. *Screening* da colchicina e dos novos compostos (**23-75**) a 0,1 μM nas células leucêmicas REH e Jurkat.

Composto	% de sobrevivência a 0,1 μM (48h)		Composto	% de sobrevivência a 0,1 μM (48h)	
	REH	Jurkat		REH	Jurkat
Colchicina	41%	18%	49	91%	91%
23	92%	88%	50	94%	63%
24	45%	30%	51	98%	98%
25	98%	96%	52	94%	92%
26	99%	102%	53	95%	86%
27	103%	103%	54	89%	98%
28	99%	101%	55	90%	89%
29	39%	30%	56	95%	94%
30	94%	104%	57	102%	101%
31	68%	33%	58	95%	96%
32	43%	30%	59	93%	102%
33	68%	34%	60	103%	101%
34	106%	122%	61	99%	102%
35	101%	121%	62	100%	98%
36	94%	83%	63	100%	87%
37	88%	100%	64	102%	92%
38	37%	17%	65	97%	94%
39	88%	115%	66	94%	97%
40	97%	119%	67	91%	83%
41	94%	121%	68	88%	100%
42	100%	86%	69	99%	108%
43	102%	90%	70	103%	91%

44	97%	94%	71	94%	73%
45	96%	81%	72	98%	98%
46	95%	86%	73	94%	97%
47	89%	78%	74	99%	89%
48	90%	79%	75	85%	98%

Os compostos que apresentaram atividade significativa (<70% de sobrevivência a 0,1 μM) neste estudo preliminar de dose única, foram selecionados para a determinação da sua atividade antiproliferativa contra as células de leucemia (Tabela 11).

Tabela 11. IC₅₀ dos compostos mais ativos em células leucêmicas REH e Jurkat.

Composto	IC ₅₀ (nM)	
	REH	Jurkat
Colchicina	9,5	7,7
24	33,7	31,4
29	25,4	15,7
31	328,3	202,9
32	206,2	154,5
33	458,7	189,4
38	70,6	71,5
A23	1585,2	1029,3

O composto **29** (que apresenta o grupamento 1-naftil como anel B) foi o mais potente na inibição do crescimento das células Jurkat e REH. A chalcona **A23** que apresenta o mesmo padrão de substituição nos anéis A e B do composto **29**, também mostrou uma atividade citotóxica para estas duas linhagens em concentrações baixas, porém em micromolar, seguindo um padrão de valores de IC₅₀ já obtidos para outras chalconas do nosso grupo (Navarini *et al*, 2009; Pedrini *et al*, 2010; Mielcke *et al*, 2011), demonstrando assim, que o *scaffold* acil-hidrazona parece ser mais privilegiado que a estrutura base das chalconas para a atividade antitumoral.

Os derivados **24** e **38**, que possuem como anel B os grupos 4-Br-fenil e 4-CH₃-fenil respectivamente, também inibiram a proliferação celular em ambas as linhagens celulares em concentrações nanomolares, assim como os compostos **31**, **32** e **33** porém, estes não foram tão potentes quanto os primeiros.

9.2. Efeitos na migração celular.

A migração direcional de células de câncer metastáticas requer alterações na polaridade das células e o remodelamento do citoesqueleto, o que depende da regulação dos microtúbulos, actina e filamentos intermediários nas células. Dessa forma, além dos efeitos na divisão celular, os agentes antitubulina também interferem na migração celular (Small *et al.*, 2002)

A identificação de compostos com potência citotóxica em nanomolar entre as *N*-acil-hidrazonas nos motivaram a novas avaliações frente à inibição da migração de células metastáticas de câncer de mama. Para esta etapa, selecionamos seis compostos representativos para avaliação: (i) **23** e **52**, que representam os esqueletos das duas séries de acil-hidrazonas e não mostraram atividade significativa na inibição da proliferação de células de leucemia; (ii) o composto **29**, o mais potente entre os análogos estudados e (iii) três oxadiazóis não ativos, **66**, **69** e **70**, bem como a colchicina como controle.

A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, um modelo agressivo de câncer de mama não-dependente de estrogênio, foi utilizada para os ensaios devido ao seu elevado potencial metastático. Inicialmente, os compostos selecionados foram avaliados em altas concentrações (10 μM) através de ensaios de cicatrização celular (do inglês: *wound healing*) (Yarrow *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2010), que se baseia na resposta das células em monocamadas à uma lesão mecânica, proporcionando uma análise prévia da capacidade dos compostos em interferir no processo de migração celular. O composto **52** não demonstrou capacidade de inibir a migração celular de MDA-MB-231, mesmo em concentrações elevadas. Já os 1,3,4-oxadiazóis inibiram esta migração apenas fracamente, na mesma concentração, e nenhum efeito foi observado em valores de concentração de 1 μM . Por outro lado, as acil-hidrazonas 3,4,5-trimetoxifenil-substituídas, **23** e **29**, inibiram de forma eficiente a migração de MDA-MB-231 em concentrações mais baixas, como mostrado na Tabela 12.

A fim de confirmar o efeito sobre a migração celular para os compostos ativos, foi realizado um ensaio de migração quantitativa (Albini *et al.*, 1987; Shan *et al.*, 2005) (Tabela 12). Os valores de IC_{50} obtidos com este ensaio mostram que o composto **29** representou valor melhor que o composto **23**, com uma potência semelhante à da colchicina na inibição da migração de células metastáticas de câncer de mama (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito dos compostos selecionados na migração celular de câncer de mama (MDA-MB-231).

Composto	Cicatrização celular ^a (% inibição a 1 μ M)	Ensaio de migração quantitativa IC ₅₀ (nM) ^b
Colchicina	70 \pm 5	250 \pm 78
23	60 \pm 9	530 \pm 73
29	80 \pm 4	168 \pm 57

^a Estes dados são a média de 3 experimentos independentes. ^b Estes dados são a média de 2 experimentos independentes. * os compostos **52**, **66**, **69** e **70** não apresentaram resultados significativos nestas concentrações.

9.3. Mecanismo de ação

Embora as *N*-acil-hidrazonas e 1,3,4-oxadiazóis tenham sido desenhados como ligantes para o sítio ativo da colchicina, e apresentem o padrão de substituição 3,4,5-trimetoxi-fenil, que parece ser importante para moduladores da tubulina, investigações sobre o mecanismo de ação foram feitas para comprovarmos nossas hipóteses.

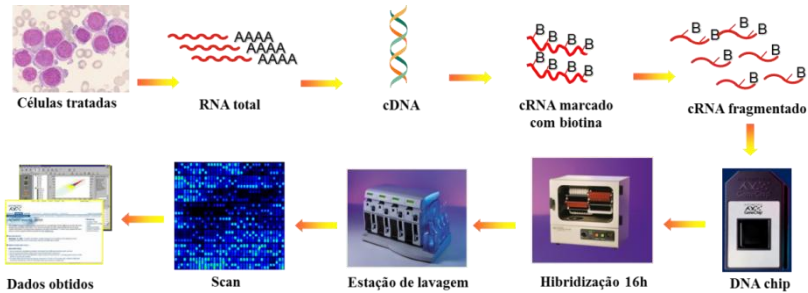
9.3.1. Modulação de transcrição.

9.3.1.1. Chip de DNA

No intuito de determinarmos o mecanismo de ação, selecionamos o composto **29** para análise da expressão gênica, através de ensaios com o biochip de DNA. Os experimentos foram realizados no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP. Estes ensaios geraram um conjunto de dados (algoritmos) que posteriormente foram interpretados através de Mapas de Conectividade (CMap).

O esquema representativo do experimento realizado é apresentado no Esquema 1, que vem reinserido na sequência para melhor visualização. Primeiramente, as células HL-60 (mais comumente usada em bancos de dados de Cmap) foram incubadas durante 12 horas com o composto **29** (no controle foi usado DMSO). Posteriormente, utilizando kits de isolamento de RNA, o RNA total foi extraído e posteriormente seu DNA complementar foi produzido pela transcriptase reversa. Na sequência, o cDNA obtido é colocado para

hibridizar com o DNA contido no chip, por complementaridade de bases, por 16h, com posterior lavagem para eliminação do material não hibridizado. Com uso de leitores a laser (marcados com fluorocromocianina) ou leitores de fósforo (marcado com isótopo ^{33}P) é obtida a imagem com os *spots* fluorescentes e não fluorescentes, que indicam a ativação ou a desativação dos genes.



Esquema 1. Etapas envolvidas no uso dos microarranjos de DNA: (i) Células patogênicas são tratadas com o fármaco, (ii) RNA total é extraído, fragmentado e hibridizado no chip, (iii) com posterior lavagem. O chip é escaneado e os dados obtidos são tratados em softwares adequados (adaptado de Affymetrix HG 1.0 ST).

9.3.1.2. Análise dos mapas de conectividade (CMap)

Para verificarmos os resultados obtidos por análise do microarranjo de DNA, examinamos os níveis de mRNA e de proteínas de expressão envolvidas no ciclo celular. Isto é possível porque os dados encontrados nestes mapas de conectividade associam o padrão de expressão de RNA das células (analisadas via microarranjo de DNA) com outros padrões já estabelecidos de moléculas testadas em diferentes tipos de células.

O trabalho de um mapa de conectividade envolve vários componentes-chave: *i*) uma coleção de perfis pré-construídos de referência de genes de expressão, que servem de base de dados centrais, onde o perfil de cada referência caracteriza um estado biológico bem definido; *ii*) uma lista dos genes mais relevantes e importantes para caracterizar o estado biológico de interesse dos pesquisadores; *iii*) um algoritmo padrão de correspondência ou similaridade métrica, que é definido entre uma assinatura consultada do gene e um perfil de referência de expressão gênica para quantificar a proximidade ou

conexão entre os dois membros biológicos (Figura 16) (Zhang e Gant, 2008; Lamb, 2007).

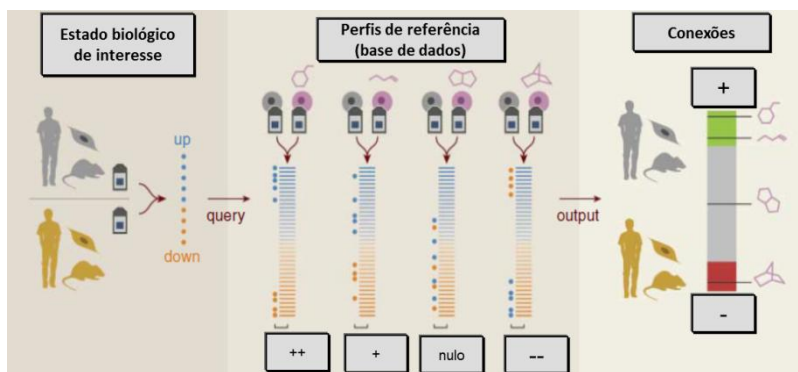


Figura 16. O conceito de Mapa de Conectividade. Genes de expressão representam qualquer célula biológica de interesse (esquerda); Algoritmos de correspondência de cada perfil de referência (centro); Perturbações são classificadas por esta conectividade de pontuação, as que estão no topo (positivo) e inferior (negativo) são funcionalmente relacionados por meio do recurso transitório de alterações comuns à expressão do gene (adaptado de Lamb, 2007).

A abordagem utilizada nos mapas de conectividade dá-se através de um algoritmo padrão de correspondência. A análise de perfil de expressão foi realizada para identificar o mecanismo de ação do composto **29**. O tratamento resultou na baixa regulação de 102 genes (110 conjuntos de teste) e da regulação positiva de 353 genes (367 *probe sets*; $FC > 1.5$, valores- $p < 0.05$; Figura 17).

by name		by name and cell line		by ATC code			
rank	ATC code	mean	n	enrichment	p	specificity	% non-null
1	P02CA	0.404	16	0.511	0.00018	0.0170	68
2	C01AA	0.541	10	0.630	0.00022	0.1852	80
3	N05AC	0.320	24	0.420	0.00026	0.2477	62
4	P01AX	0.415	9	0.638	0.00048	0.0194	77
5	V03AF	-0.532	5	-0.774	0.00106	0.0153	80
6	P02CX	0.585	6	0.724	0.00117	0.0884	83
7	D06BX	-0.386	5	-0.768	0.00124	0.0000	60
8	G04BD	0.354	8	0.597	0.00279	0.0000	62
9	S01GA	0.257	20	0.373	0.00560	0.0148	60
10	G04CB	-0.314	6	-0.642	0.00612	0.1280	50
11	P02CE	0.530	4	0.746	0.00790	0.0000	100
12	S01EX	0.567	3	0.840	0.00803	0.0000	100
13	P02BX	0.513	4	0.733	0.00985	0.0000	100
14	G03CC	0.352	17	0.380	0.01053	0.0500	64
15	P03AA	0.470	5	0.666	0.01093	0.1214	80
16	N05CE	-0.294	4	-0.708	0.01486	0.0422	50
17	R01AA	0.248	16	0.376	0.01544	0.0160	56
18	R01AB	0.248	16	0.376	0.01544	0.0160	56
19	D08AC	-0.455	5	-0.639	0.01568	0.0376	80
20	R02AA	-0.455	5	-0.639	0.01568	0.0376	80

Figura 17. As alterações da expressão gênica provocadas pelo composto **29** são semelhantes à provocada por fármacos classificados no grupo ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) como P02CA (albendazol, mebendazol, fenbendazol, tiabendazol), que são compostos anti-helmínticos que atuam principalmente pela inibição da polimerização da tubulina.

A partir dos resultados obtidos através do Cmap, podemos evidenciar que o mecanismo de ação do composto **29** é altamente correlacionado aos benzimidazóis (mebendazol, tiabendazol e o albendazol), que possuem mecanismo de ação através da ligação à *beta*-tubulina livre, inibindo a sua polimerização e, assim, interferindo na captação de glicose dependente dos microtúbulos.

9.3.1.3. Análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA)

GSEA também é um método computacional utilizado para interpretar os dados obtidos na expressão de genes, a partir de microarranjos de DNA, por exemplo. Este método é focado em grupos de genes que compartilham a mesma função biológica, a mesma localização cromossômica ou a mesma regulação, revelando caminhos biológicos em comum (Subramanian *et al.*, 2005). GSEA é um pacote

de software disponível gratuitamente, com um banco de dados inicial de 1.325 conjuntos de genes biologicamente definidos (www.broadinstitute.org/gsea/).

Resultados de GSEA para o nosso estudo mostraram que o composto **29** regula um conjunto de genes compreendendo genes de tubulina e chaperona-tubulina específicas (Figura 18). Isto pode ser explicado pelo mecanismo de auto-regulação, que ocorre na expressão do mRNA da tubulina. Agentes que despolimerizam a tubulina induzem a diminuição rápida na expressão do mRNA da tubulina, resultando na inibição da síntese da tubulina. De acordo com a hipótese de mecanismo auto-regulador, o aumento de tubulina não polimerizada suprime a formação de mRNA novo e acelera a deterioração do mRNA existente (Cleveland *et al.*, 1981). Além disso, a análise do Cmap mostrado anteriormente, executado com os genes diferencialmente expressos, mostrou que o efeito do composto **29** no transcriptoma foi principalmente associado com o inibidor de Hsp90, tanespimicina (enriquecimento = 0.679, $p < 0.001$). Hsp90 é uma chaperona que interage e colocaliza com a tubulina (Ganier *et al.*, 1998; Redmond *et al.*, 1989; Sanches *et al.*, 1988; Czar *et al.*, 1996), protegendo-a de desnaturação e mantendo-a em um estado organizado (Weis *et al.*, 2010). O tratamento com o composto **29** induziu a baixa regulação dos genes da tubulina e chaperonas tubulina-específicas, semelhantes a efeitos na expressão do gene para a inibição Hsp90, o que sugere que o composto **29** pode afetar o processo de organização da tubulina ou desestabilizar os microtúbulos, em concordância com todos os resultados obtidos até o momento.

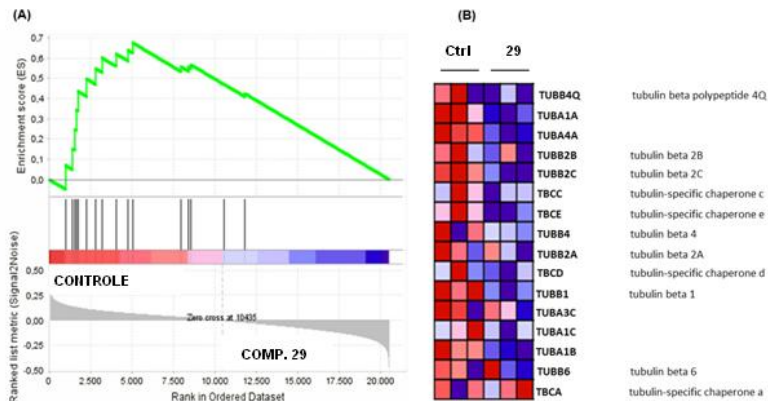


Figura 18. (A) O gráfico de enriquecimento do conjunto de genes mostra o enriquecimento no controle das células não tratadas *versus* células tratadas com o composto **29**. (B) Valores de expressão de 16 genes compreendidos no conjunto de genes; baixa expressão (quadrados azuis) e alta expressão (quadrados vermelhos).

9.4. Ensaios de inibição da tubulina

No intuito de comprovarmos os indicativos para estes compostos, decidimos testá-los na inibição da tubulina. Selecionamos as acil-hidrazonas com ótima, média e baixa atividade antiproliferativa para serem testadas quanto à sua capacidade em inibir os MT, tal como mostrado na Tabela 13. Como podemos observar, os compostos com potências citotóxicas em nanomolar para as células REH e Jurkat (**24**, **29** e **38**) também são inibidores de polimerização dos MT *in vitro*, em concentrações nanomolares. É interessante notar que vários dos compostos avaliados, incluindo o esqueleto geral da série **23**, foram tão potentes ou mais que a colchicina na inibição da tubulina. Já as acil-hidrazonas **35**, **37** e **39** não foram ativas na polimerização dos MT em valores de concentração de 10 μM . De modo geral, e de acordo com os estudos de *docking*, enquanto alguns análogos mono-substituídos no anel B apresentaram aumento da atividade na tubulina (compostos **24**, **33** e **38**), análogos tri-substituídos não foram potentes, provavelmente devido ao impedimento estérico (compostos **27** e **35**) (Jin *et al.*, 2006). Fatores estéricos podem também explicar as atividades diminuídas dos compostos binucleares **30** e **32**, quando em comparação com o composto **29**; os primeiros possuem orientação *beta* e o último orientação *alfa*.

Tabela 13. Efeitos na inibição da polimerização dos MT e análise de alto conteúdo (do inglês *high-content analysis*) de parada mitótica em células HeLa tratadas com as acil-hidrazonas.

Compostos	IC ₅₀ (μM) Inibição da tubulina	IC ₅₀ (nM) Densidade celular de células HeLa	MDEC (nM)		
			Condensação nuclear	Intensidade da tubulina	Índice mitótico
Colchicina	2,3	34,1 ± 1,4	11,6 ± 0,3	3,7 ± 1,1	14,4 ± 0,4
23	1,8	304,8 ± 18,1	89,1 ± 10,4	93,3 ± 8,4	137,2 ± 31,5
24	0,8	113,5 ± 19,4	73,9 ± 11,1	19,9 ± 11,3	98,3 ± 6,2
25	1,5	380,2 ± 52,3	148,7 ± 17,2	199,5 ± 29,6	241,1 ± 35,6
27	5,7	2770 ± 356	1037 ± 60	801,8 ± 121,6	1367 ± 41
29	0,7	36,2 ± 3,5	15,9 ± 2,4	11,8 ± 2,3	17,8 ± 3,7
30	0,9	168,3 ± 43,6	68,8 ± 18,5	50,7 ± 13,4	96,9 ± 23,2
32	1,2	211,0 ± 17,5	80,8 ± 12,8	50,9 ± 11,9	78,9 ± 12,3
33	1,1	121,1 ± 27,0	50,4 ± 8,4	45,4 ± 12,2	52,9 ± 8,7
35	> 10	> 50.000	> 50.000	> 50.000	> 50.000
37	> 10	> 50.000	> 50.000	> 50.000	> 50.000
38	0,5	48,3 ± 1,1	24,8 ± 2,9	19,9 ± 2,2	28,1 ± 1,3
39	> 10	> 50.000	> 50.000	> 50.000	> 50.000

9.5. Ensaios celulares de alto conteúdo.

Caracteristicamente, agentes que interagem com MT provocam interrupção no ciclo celular e perturbações celulares nestes MT (Wang *et al.*, 2007). Para melhor examinarmos as alterações fenotípicas nas células leucêmicas, provocadas pelas acil-hidrazonas selecionadas, realizamos análises multiparamétricas de alto conteúdo. Para esta tarefa, foram avaliados os efeitos de 12 acil-hidrazonas (**23-39**) e da colchicina (Tabela 13) sobre a perturbação dos MT, morfologia apoptótica, interrupção do ciclo celular e fosforilação da histona H3. As células HeLa (com crescimento não-simultâneo - *assíncrono*) foram tratadas durante 18 horas com cada composto ou veículo (DMSO na concentração final de 0,1%), em microplacas de 384 poços, revestidas com colágeno, fixadas e incubadas com os anticorpos primários da tubulina e com o marcador mitótico da proteína fosfohistona H3, seguido pela adição de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e anticorpos secundários Cy3-conjugados, respectivamente. As células foram detectadas pela contra-coloração nuclear com Hoechst 33342, que

também forneceu informações sobre a condensação da cromatina e a densidade celular, como marcadores de morte celular.

Fotomicrografias de fluorescência representativas dos núcleos (azul), tubulina (verde), e fosfohistona H3 (vermelho) demonstraram que, enquanto as células tratadas com veículo organizaram os microtúbulos e tiveram baixa porcentagem de mitose celular, as células tratadas com colchicina (62 nM) desorganizaram estes MT e aumentaram o número de células positivas de fosfohistona H3 (Figura 19). A mesma concentração do composto mais potente **29** (62 nM), e uma concentração mais elevada do composto **23** (312 nM) provocaram desorganização dos microtúbulos e aumento da porcentagem de células em mitose maior que a colchicina. A contra-coloração do núcleo por Hoechst 33342 também revelou a presença de núcleos condensados e fragmentados típicos de apoptose.

Os resultados da avaliação quantitativa da parada mitótica, a morfologia nuclear e a perturbação de microtúbulos são apresentados na Tabela 11 e na Figura 19. Como esperado, as acil-hidrazonas **24**, **29** e **38** foram as mais potentes, tendo o análogo **29** uma melhoria de mais de 8 vezes quando comparado com o composto **23**. O composto **30**, embora não tenha exibido citotoxicidade para as células de leucemia REH e Jurkat, mostrou uma potente atividade sobre a polimerização dos MT e densidade de células HeLa. Em concordância com a avaliação preliminar da citotoxicidade para as células leucêmicas, os análogos **24**, **32** e **33** também foram citotóxicos para as células HeLa. Os demais compostos não apresentaram atividade importante. Exceto os compostos **35**, **37** e **39**, os demais provocaram condensação da cromatina, aumento da porcentagem de células com níveis elevados de fosfohistonas H3 e desorganização celular dos microtúbulos (Tabela 11).

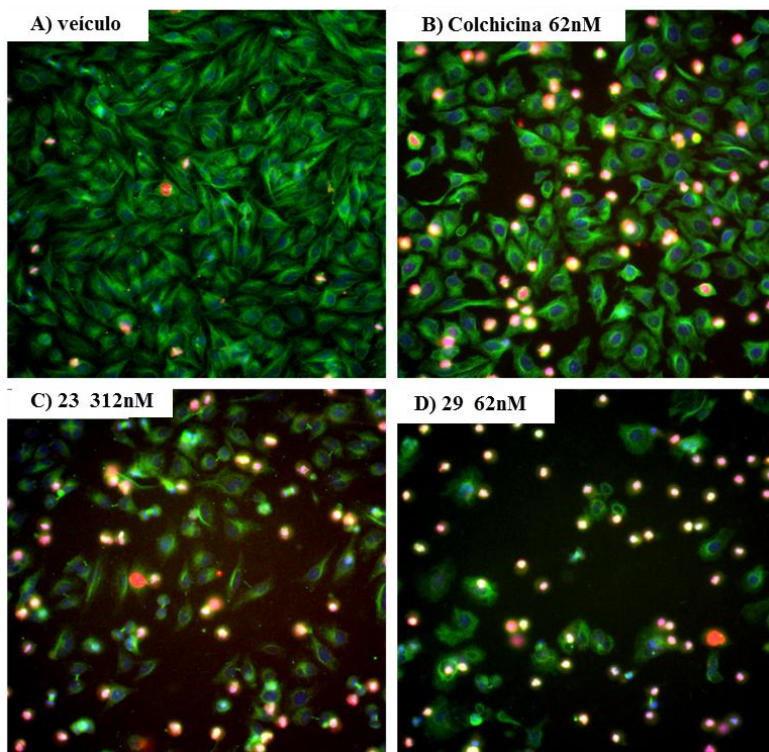


Figura 19. Coloração de imunofluorescência para marcadores de parada mitótica em células HeLa. Células HeLa foram tratadas com: (A) veículo (DMSO 0,1%), (B) colchicina (62 nM), (C) composto **23** (312 nM), ou (D) composto **29** (62 nM), seguida por imunocoloração simultânea de α -tubulina (verde), fosfohistonas H3 (vermelho) e Hoechst 33342 (azul). Células tratadas com o veículo promoveram alta organização dos microtúbulos e uma baixa porcentagem de células mitóticas. A colchicina e as acil-hidrazonas **23** e **29** provocaram uma resposta de desorganização heterogênea da tubulina, aumento do número de fosfohistonas H3, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. As imagens mostradas são representativas, a partir de uma única experiência repetida três vezes com resultados semelhantes.

9.6. Toxicidade seletiva.

Seletividade para o alvo em questão e baixa toxicidade para tecidos normais são requisitos importantes para novos agentes

anticancerígenos. Além disso, os compostos administrados na quimioterapia das leucemias podem ser utilizados no âmbito de alo-transplantes e outros, baseados em imunoterapias celulares e, portanto, os novos compostos desenvolvidos para o tratamento de leucemias não devem provocar efeitos prejudiciais em respostas-imunes (Avila *et al.*, 2011; Licandro *et al.*, 2004).

A toxicidade dos compostos mais potentes foi determinada para linfócitos humanos T não transformados e comparados com os resultados em LLA. A proliferação de linfócitos normais T foi estimulada pelo tratamento com fitohemaglutinina e a sobrevivência das células foi avaliada por meio dos ensaios de redução do MTT em 48h após a adição do composto **29** (Figura 20). Como pode ser visto, o composto **29** foi mais seletivo para as células leucêmicas que para os linfócitos normais, sugerindo que este composto não afeta (ou afeta muito pouco) células não malignas.

A análise do ciclo celular para o composto **29** também foi realizada, e os resultados indicaram que este composto induz parada de ciclo celular em G₂/M e induz a apoptose (Mascarello *et al.*, 2011).

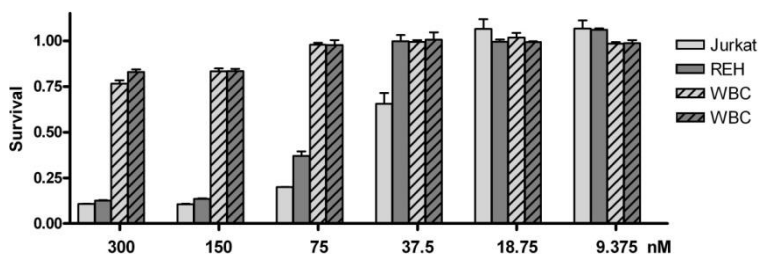
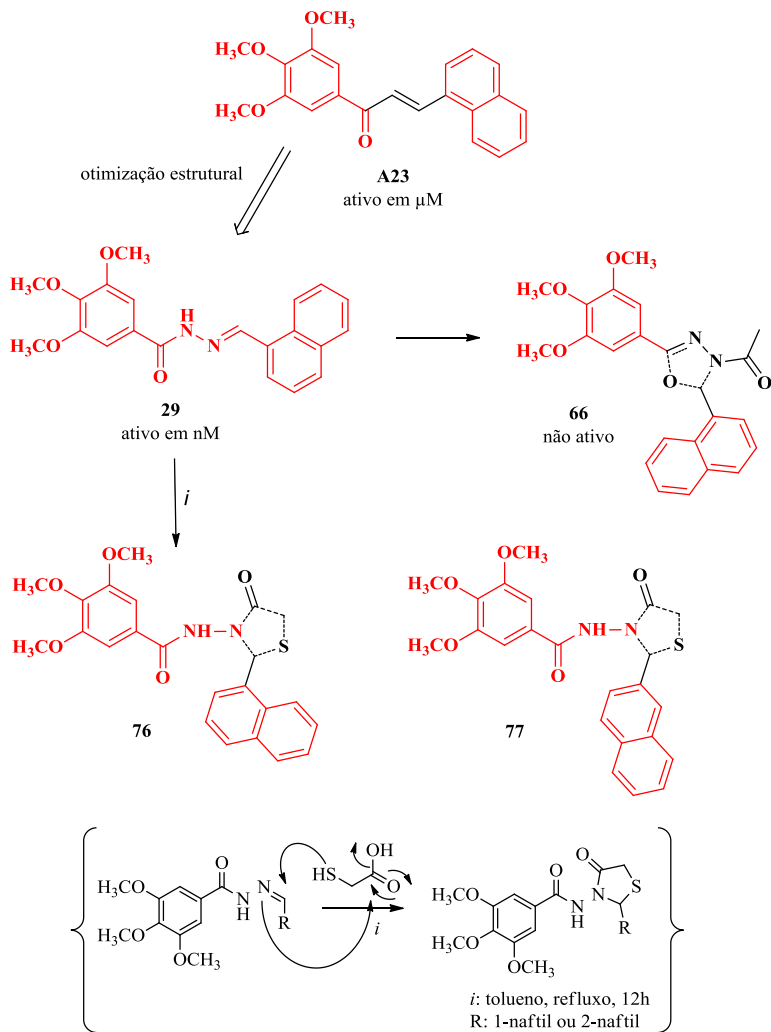


Figura 20. Efeito do composto **29** sobre linfócitos humanos T (WBC) e linhagens celulares Jurkat e REH. Sobrevivência de linfócitos estimulados pela fitohemaglutinina e linhagens celulares em comparação com as células tratadas com DMSO. Redução do MTT em 48h de ensaio após a adição de concentrações crescentes do composto.

9.7. Novas estratégias sintéticas baseadas nos resultados obtidos

A partir dos ótimos resultados obtidos com o composto **29**, novos análogos foram propostos com o intuito de obtermos compostos otimizados a partir do padrão de substituição 3,4,5-trimetoxi-fenil. Para manter a esteoquímica adequada para a posição dos dois anéis aromáticos no sítio ativo, a presença da carbonila ligada ao anel A

parece ser um dos fatores mais importantes na estrutura, estas proposições foram feitas através de *docking* molecular e revelaram também que a presença de um anel de 5 membros entre o anel B e a carbonila pode ser uma característica estrutural importante para a atividade na tubulina (Salum, 2012). Desta forma, derivados substituídos no anel B nestes compostos poderiam levar à análogos mais potentes, pois adotariam uma conformação parecida com a das acil-hidrazonas, como apresentado anteriormente através de Dinâmica Molecular (Figura 13). Desta forma, propomos aqui a síntese da tiazolidinona derivada da acil-hidrazona **29** (**76**) e da tiazolidinona derivada da acil-hidrazona **30** (**77**). Esta última foi sintetizada com o objetivo de analisarmos se a conformação do anel B pode influenciar na atividade antiproliferativa (Esquema 9).



Esquema 9. Proposta e mecanismo de obtenção dos derivados diretos da acil-hidrazona **29**: **66** (oxadiazol não ativo); **76** e **77** (novas tiazolidinonas propostas). (*i*) tolueno, refluxo/Dean-Stark, 12h.

As tiazolidinonas **76** e **77** são estruturas inéditas e foram obtidas pela ciclização das acil-hidrazonas com ácido mercaptoacético, por refluxo em tolueno por 12h. O mecanismo de reação proposto envolvido na obtenção destas estruturas ocorre com o ataque nucleofílico do par de elétrons do enxofre, proveniente do ácido mercaptoacético, que ataca o

carbono parcialmente positivo da dupla ligação na acil-hidrazona. Posteriormente, o par de elétrons do nitrogênio ataca a carbonila do ácido mercaptoacético, promovendo a ciclocondensação, com eliminação de uma molécula de água, para obtenção da tiazolidinona (Esquema 9).

Como podemos ver no espectro de RMN ^1H do composto **77** (Figura 21), a formação do anel de cinco membros pode ser confirmada pela presença dos hidrogênios CH_2 em 4,02-3,98 e 3,74-3,81, em forma de multipletos. O sinal do CH também é um importante informativo do sucesso da reação e apresenta deslocamento em 6,23 ppm. Interessantemente, no caso específico do substituinte 1-naftil na tiazolidinona (composto **76**), o CH é suprimido do espectro (vide espectro em anexo 1), o mesmo efeito têm sido observado para outras tiazolidinonas com este padrão de substituição sintetizadas pelo nosso grupo de pesquisas. Podemos observar também a presença dos 9H das metoxilas em 3,67 ppm (6H) e 3,76 ppm (3H); deslocamentos referentes aos anéis aromáticos em 6,81 (H2, H6); 7,95-7,18 (7H, Ar-H) e um sinal em 9,02 ppm referente ao hidrogênio do NH.

A formação da tiazolidinona **77** pode ser confirmada também por RMN de ^{13}C , pela presença dos sinais característicos do CH_2 em 30,60 ppm e do CH em 63,58 ppm. Outros sinais são observados, como os das metoxilas em 55,97 ppm e 60,69 e dos carbonos aromáticos em 104,55 (C2, C6); 141,30 (C4); 152,68 (C3, C5); 124-133,94 (10C, Ar-C). O carbono da carbonila pertencente ao anel tiazolidínico aparece em 171,86 ppm e da carbonila não-cíclica em 164,79 ppm (vide espectro no Anexo 1).

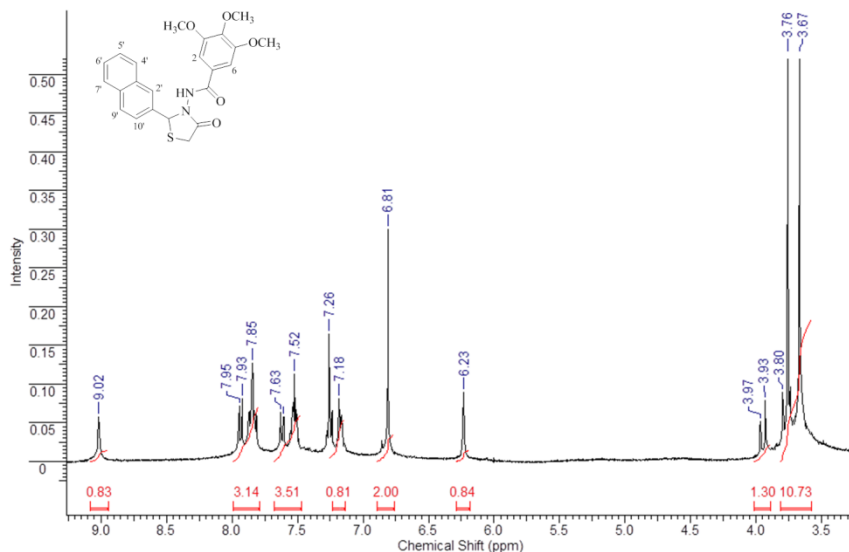


Figura 21. Espectro de RMN ^1H do composto **77**.

Novas acil-hidrazonas também foram sintetizadas, com pequenas modificações na estrutura geral da acil-hidrazona **29**, como mostrado na Figura 22. O composto **80** foi obtido através da reação do anidrido benzóico com a 3,4,5-trimetoxi-hidrazida, e o composto **81** a partir do cloreto de naftoila. Os compostos **78** e **79** foram obtidos como descrito anteriormente para as demais acil-hidrazonas desta tese. Os espectros destes novos compostos estão em concordância com as acil-hidrazonas já apresentadas anteriormente. A caracterização estrutural e os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na seção experimental e no Anexo 1, respectivamente.

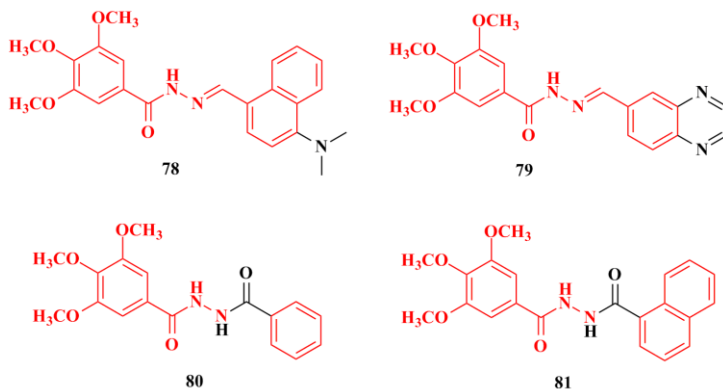
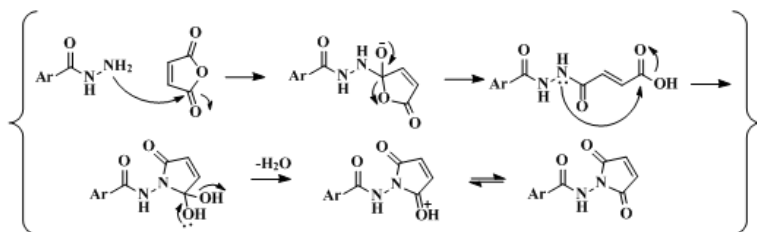
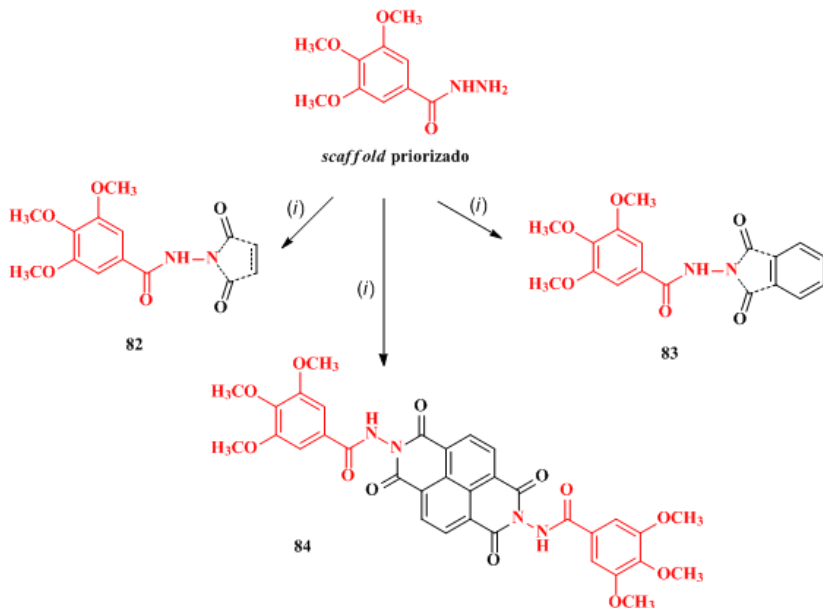


Figura 22. Novas acil-hidrazonas desenhadas a partir do composto mais potente, **29**.

Outra estratégia sintética para obtermos estruturas 3,4,5-trimetoxi-fenil- substituídas foi a obtenção de imidas cíclicas, partindo dos anidridos maleico, ftálico ou dianidrido-naftaleno-tetracarboxílico, que foram mantidos com a 3,4,5-trimetoxi-hidrazida em refluxo em tolueno com uso de Dean-Stark por 3 horas, gerando as imidas inéditas **82**, **83** e **84**, respectivamente (Esquema 10).

O mecanismo proposto para obtenção destas imidas também pode ser explicado pela regras de Balwin (Baldwin, 1976), para fechamento deste tipo de anel, o qual é favorecido em *5-exo-trig*, justificado pelos bons rendimentos obtidos. Este mecanismo envolveria primeiramente, o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio proveniente da acil-hidrazida na carbonila do anidrido, provocando a abertura do anel. Posteriormente, deve ocorrer a ciclização intramolecular, iniciada pelo ataque do par de elétrons do nitrogênio sobre a carbonila da extremidade, seguida da eliminação de uma molécula de água, resultando na imida desejada (Esquema 10).



Esquema 10. Proposta e mecanismo de reação dos novos análogos da acil-hidrazona **29**: imidas cíclicas (**82**, **83** e **84**). (i) anidrido substituído, tolueno, refluxo 3h.

No espectro de RMN de ^1H do composto **82** (Figura 23), a formação da imida cíclica pode ser observada pela presença dos sinais característicos dos hidrogênios 3' e 4' na forma de dois dupletos entre 6,45 e 6,33 ppm. Observam-se também os deslocamentos das metoxilas em 3,73 ppm (3H) e 3,84 ppm (6H), dos hidrogênios aromáticos em 7,24 ppm (H2, H6) e do NH em 10,57 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **82** encontram-se os deslocamentos referentes aos carbonos C4' e C3' em 127,43 e 127,66, respectivamente. As metoxilas aparecem em 56,45 (2C) e 60,56 (1C), e

os carbonos aromáticos em 105,48 (C2, C6); 133,38 (C1); 140,91 (C4); 153,10 (C3, C5). Os sinais das carbonilas são visualizados em 163,69; 165,06; 167,39 (vide espectro no Anexo 1).

No espectro de infravermelho do composto **82**, as absorções características aparecem em 3437 referente ao NH, em 1704 e 1663 referentes às carbonilas, 1590 referente à ligação C=C, em 1126 referente à ligação C-O, e em 991, 851, 773 de aromáticos (vide caracterização na seção experimental).

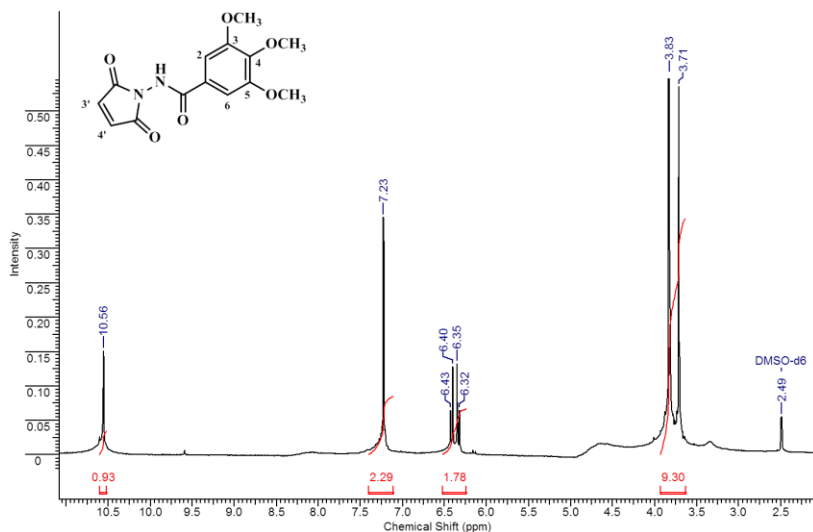


Figura 23. Espectro de RMN de ¹H do composto **82**.

10 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Neste capítulo foram sintetizadas quatro classes de moléculas, compostas por (i) acil-hidrazonas (47 estruturas, sendo 22 inéditas), (ii) oxadiazóis (10 estruturas, sendo 7 inéditas), (iii) imidas cíclicas (3 estruturas, todas inéditas), e (iv) tiazolidinonas (2 estruturas, todas inéditas), baseadas nos fármacos colchicina e combretastatina A-4.

Entre as hidrazonas e os oxadiazóis, encontramos 7 compostos com atividade anti-leucêmica na faixa de nanomolar, sendo **29** o mais potente, com atividade de 15nM frente às células da linhagem Jurkat e de 25nM em células REH. Também determinamos a baixa toxicidade de **29** em células normais, além de seu mecanismo de ação, como inibidor

da tubulina. Os demais compostos foram planejados com base na estrutura do composto **29** e seus potenciais antileucêmicos estão sendo avaliados.

11 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

11.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é, primariamente, uma infecção das vias áreas causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e, segundo o último relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que esta doença vitime cerca de dois milhões de pessoas a cada ano (The Global Pan to stop TB 2011-2015, <http://www.stoptb.org/global/plan/>). Embora potencialmente curativo, o tratamento atual da tuberculose apresenta diversas limitações, entre elas (i) a falta de adesão dos pacientes aos longos regimes prescritos, (ii) o desenvolvimento de resistência às diferentes classes de antimicrobianos, (iii) a toxicidade e inúmeros efeitos adversos (Gelperina *et al.*, 2005; Ruiz-Manzano *et al.*, 2008).

O tratamento convencional contra a tuberculose envolve o emprego de três diferentes tipos de antibacterianos administrados via oral em regimes múltiplos de seis a nove meses. Dentre os fármacos mais utilizados encontram-se a rifampicina, a isoniazida, pirazinamida (Figura 24) e etambutol, fármacos descobertos na década de 60. Combinações múltiplas são necessárias para o sinergismo terapêutico e para a prevenção do surgimento de resistência aos antimicrobianos No Brasil, o tratamento da tuberculose é feito com rifampicina, isoniazida e pirazinamida (esquema terapêutico de primeira linha), este coquetel terapêutico atua como bactericida (rifampicina e isoniazida), com ação intracelular (pirazinamida) ou extracelular (rifampicina e isoniazida) e definida potência antibacilar. Entretanto, a ingestão de três comprimidos diários ocasiona problemas relacionados à falta de adesão ao tratamento, principal causa da falha terapêutica e do surgimento de casos de resistência (Panchagnula *et al.*, 2004). Estes fatores despertam o interesse no desenvolvimento de uma única forma farmacêutica que diminuiria a dose administrada, o número de ingestões diárias para manutenção da concentração terapêutica e, conseqüentemente, dos efeitos adversos associados.

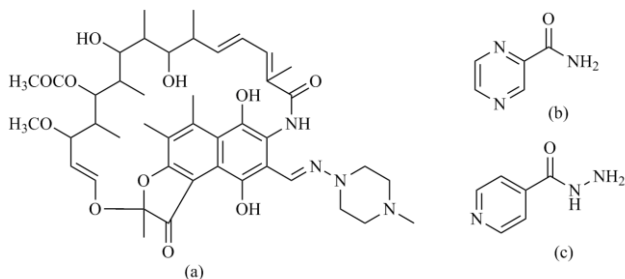


Figura 24: Estrutura química da (a) rifampicina; (b) pirazinamida; (c) isoniazida.

Na década passada, observaram-se muitos avanços no entendimento dos processos metabólicos e intracelulares do *M. tuberculosis* (Mtb), culminado na publicação da seqüência completa do seu DNA genômico (Cole *et al.*, 1998). Estudos comprovaram também que a virulência desta bactéria está associada ao seu mecanismo de invasão celular no hospedeiro, e que a intercomunicação entre a bactéria e os macrófagos é essencial para sua sobrevivência *in vivo* (Hestvick *et al.*, 2003). O conhecimento da biologia molecular desta micobactéria como um todo, permite desenvolver estratégias para a síntese de compostos que possam agir em novos alvos, através de mecanismos de ação diferentes dos fármacos já existentes.

11.2. Proteínas tirosina fosfatases A e B (PtpA e PtpB) de *Mycobacterium tuberculosis*

O Mtb apresenta mecanismos de sobrevivência muito complexos que lhe permitem enfrentar o ambiente hostil que encontra dentro dos macrófagos humanos (Brown *et al.*, 1969; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996), sendo capaz de ativar dentro deles sinais específicos capazes de alterar sua função. Resultados obtidos com outras bactérias patogênicas sugerem que a ação de fosfatases, em particular tirosina fosfatases (PTPs), teriam um papel importante na determinação da patogenicidade das micobactérias, interferindo com a sinalização celular do macrófago mediada por fosforilação/defosforilação de fosfotirosinas (Koul *et al.*, 2000; Bakal e Davies, 2000; Cozzone *et al.*, 2004).

A análise do genoma da Mtb revelou a presença de dois genes MPtpA e MPtpB, fosfotirosinas fosfatases de baixo peso molecular (Cole *et al.*, 1998). Estas duas enzimas têm sido expressas como proteínas recombinantes, apresentando atividade em proteínas

fosfotirosina, porém sendo inativas em proteínas serina e treonina-fosforiladas (Koul *et al.*, 2000). Desde então, sugere-se que o papel dessas proteínas não seja regular o estado de fosforilação de proteínas da bactéria, mas sim modular proteínas tirosinas fosforiladas do hospedeiro.

Estudos recentes provaram que a inativação da PtpA atenua o crescimento de Mtb em macrófagos humanos. Identificou-se o VPS33B, um regulador de fusão de membrana, como um substrato desta proteína. Foi demonstrado que a PtpA consegue ultrapassar a membrana celular do hospedeiro, onde interage com a proteína citoplasmática VPS33B, inibindo fagossomos de fusão (Bach *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2010) (Figura 25).

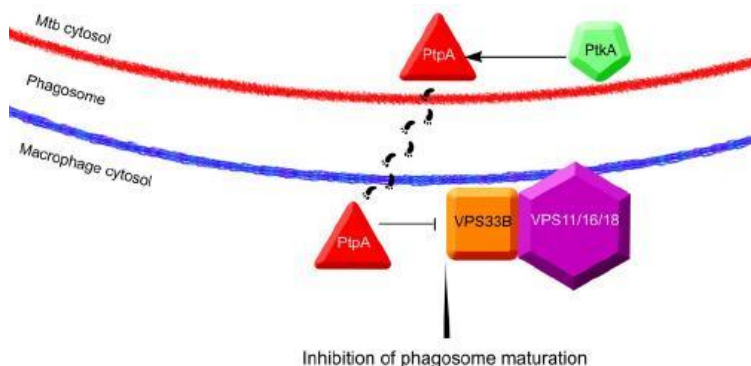


Figura 25. Representação da interação entre a PtpA e a proteína citoplasmática VPS33B do macrófago (adaptado de Chao *et al.*, 2010).

Estes resultados são suportados por outra pesquisa (Teitelbaum *et al.*, 1999), que sugere que proteínas que não excedam 70kDa conseguem transpôr a membrana da micobactéria, contendo fagossomos. Associando estas pesquisas aos estudos que indicam micobactérias livres no citoplasma de macrófagos (Stamm, 2003), ao fato da PtpA possuir 18 kDa e da PtpB possuir 30 kDa, comprovam-se os dados de Bach e col. (2008).

Estudos *in vivo* realizados com macrófagos de cobaias mostraram que a inativação da PtpB provoca a morte celular acelerada do Mtb depois da invasão nos macrófagos (Singh *et al.*, 2003). Mais recentemente, Zhou e col. propuseram que a PtpB promove a sobrevivência microbacteriana pela desregulação extracelular da

proteína quinase ERK1/2 mediada pela produção de interleucina-6 (IL-6) (Zhou *et al.*, 2010) (Figura 26).

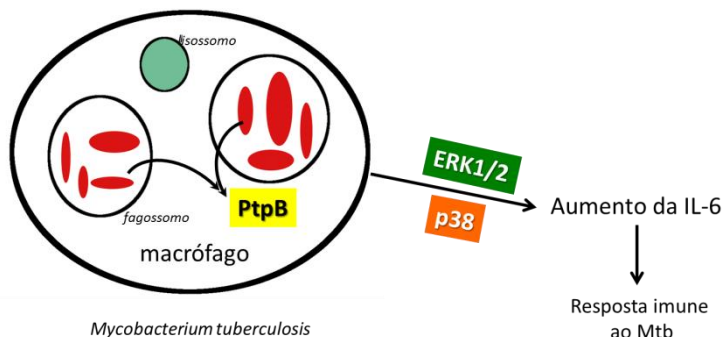


Figura 26. Esquema proposto para a interação entre a PtpB e o meio extracelular (Mascarello, 2012 – baseado em Zhou *et al.*, 2010).

Assim, a inibição de PtpA e PtpB por pequenas moléculas poderia afetar a sobrevivência do Mtb no hospedeiro e abrir caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Particularmente, a localização externa à parede celular da bactéria, torna estas enzimas alvos muito atrativos.

11.3. Inibidores conhecidos da PtpA e da PtpB

Até 2005 não se conhecia nenhum inibidor para as tirosinas fosfatases de Mtb; os pioneiros nestes estudos testaram os produtos naturais estevastatinas, roseofilinas e prodigiosinas, que apresentaram valores de IC_{50} entre 8,8 e 28,7 μM frente à PtpA (Manger *et al.*, 2005). Madhurantakam e col. (2007) identificaram os análogos de fosfato molibdato, ortovanadato e tungstato de sódio como inibidores reversíveis de PtpA, com valores de IC_{50} de 24,5; 28,0 e 30,8 μM , respectivamente. Compostos com esqueleto benzanilida (Rawls *et al.*, 2009) e peptídeos cíclicos (Chandra *et al.*, 2010) também foram identificados como inibidores da PtpA, com valores K_i de 1,4 μM e 8,0 μM , respectivamente (Figura 27).

Alber e col. sintetizaram um inibidor potente, competitivo e seletivo da PtpB, nomeado de OMTS [(oxalylamino-metileno)-tiofeno sulfonamida], com IC_{50} de 0,44 μM , e solucionaram a estrutura cristalina do complexo PtpB-inibidor através de cristalografia de raio-X (Grundner *et al.*, 2007). Outros grupos também identificaram inibidores

de PtpB: derivados indólicos e cicloocta[β]indóis, com índices de seletividade próximos a 100 e IC_{50} de 0,36 μM (Nören-Müller *et al.*, 2006; Nören-Müller *et al.*, 2008); um isoxazol com K_i de 0,22 μM (Beresford *et al.*, 2009); tiazolidinodionas fusionadas com indolinonas com valor de IC_{50} de 1,2 μM (Vintonyak *et al.*, 2011). Também são inibidores da PtpB indol[2,3- α]quinolizidinas (Corrêa *et al.*, 2007) e sulfonamidas (Chen *et al.*, 2010), com de IC_{50} em torno de 1 μM (Figura 27).

Baseados nestas evidências, tanto a PtpA quanto a PtpB têm surgido como um importante alvo para intervenções farmacológicas contra a TB, então novos inibidores são demandados.

Neste sentido, nós investigamos previamente a atividade inibitória de compostos sintéticos análogos a produtos naturais para PtpA e PtpB de *Mtb*. Em nosso primeiro trabalho, testamos uma série de naftilchalconas contra a PtpA, e o composto mais potente exibiu IC_{50} de 8,4 μM (Chiaradia *et al.*, 2008). Na sequência, mostramos que essas chalconas são inibidores competitivos ($K_i = 5$ a 21 μM) e seletivos para PtpA, mostrando um significativo aumento na atividade inibitória de *Mtb* em macrófagos infectados (Mascarello *et al.*, 2010). Também demonstramos as propriedades inibitórias de sulfonil-hidrazonas sintéticas contra a PtpB, com K_i entre 2,5 e 15 μM (Oliveira *et al.*, 2011). Finalmente, em nosso último trabalho, 100 chalconas sintéticas foram testadas contra PtpA e PtpB e seis apresentaram valores de K_i entre 8 e 29 μM (Chiaradia *et al.*, 2012) (Figura 27).

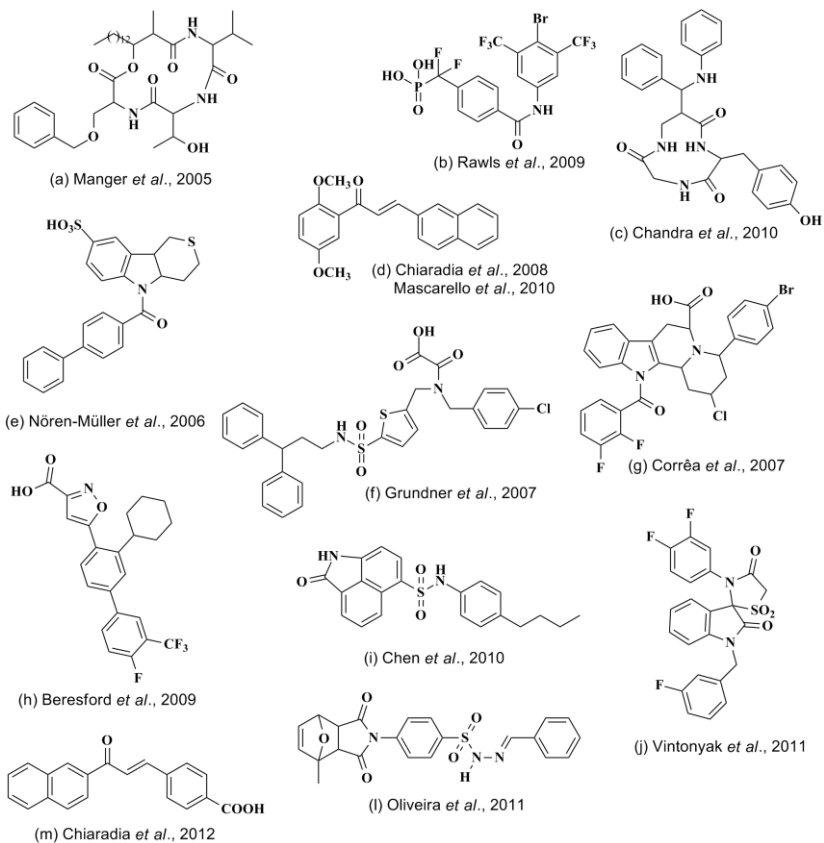


Figura 27. Inibidores da PtpA (a-d) e da PtpB (e-m) de *M. tuberculosis*.

Devido à relevância dos trabalhos anteriores, nesta tese, focamos os estudos na busca por novos inibidores da PtpB de Mtb.

11.4. Novas estratégias na busca de inibidores da PtpB: biblioteca de produtos naturais

O *screening* virtual representa uma base relevante para a priorização de compostos para testes biológicos, e a análise de bibliotecas de compostos naturais é uma escolha inovativa, que emprega o critério de prevalidação biológica e relevância para a natureza. Especialmente, a finalidade biológica e as rotas pelas quais os produtos

naturais (PN) são sintetizados pelos organismos requerem biodisponibilidade e acesso às suas proteínas alvo nos organismos (Lachance *et al.*, 2012). Os PN têm sido reconhecidos como uma fonte importante de agentes terapêuticos efetivos (Harvey *et al.*, 2000), e umas destas razões é a sua composição mais rígida, estruturas tridimensionais não planares que podem positivamente influenciar na probabilidade de sucesso clínico do fármaco (Lovering *et al.*, 2009), podendo oferecer oportunidades sem precedentes na busca de novas estruturas ativas de baixo peso molecular contra uma ampla gama de alvos biológicos. Um exemplo disso são nossos trabalhos prévios, em que fomos pioneiros em testes de bibliotecas de chalconas, análogas à PN (Chiaradia *et al.*, 2008; Mascarello *et al.*, 2010; Chiaradia *et al.*, 2012), encontrando inibidores de PtpA e PtpB, indicando que o estudo com bibliotecas de PN com alta diversidade química é interessante para encontrar estruturas líderes.

Portanto, neste trabalho, avaliamos *in silico* uma biblioteca única de PN através de *docking* molecular com uma estrutura cristalográfica da PtpB depositada no PDB. O *docking* foi realizado no sítio catalítico da PtpB. Os compostos docados foram selecionados de acordo com seus valores de *docking* (*scoring*) e *rescoring*, e as moléculas mais promissoras foram inspecionadas visualmente e testadas *in vitro* frente à PtpB de Mtb. Os resultados obtidos levaram à determinação do mecanismo de inibição, seletividade e modo de interação destes inibidores no sítio ativo da proteína.

12 RESULTADOS E DISCUSSÃO

12.1. A biblioteca de Produtos Naturais (PN)

A biblioteca de PN foi obtida do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química e Tecnologia do Fármaco da *Università di Roma "La Sapienza"* (Roma, Itália). Essa biblioteca única de mais de 800 compostos é composta de diferentes classes, em sua maioria flavonóides, benzofenonas, xantonas, antraquinonas, ferrugininas, alcalóides, esteróides, terpenóides, contendo diferentes substituintes, que têm sido previamente publicados e completamente caracterizados.

Dados físico-químicos de todos os compostos foram previstos com o programa QikProp, (QikProp, 2011) para determinar a biodisponibilidade, bem como determinar se seriam *drug-likeness*. Neste sentido, peso molecular (MW), medidas de lipofilicidade (logP), área de

superfície polar (PSA), número de ligações rotáveis (rotatable), número de doadores de ligação hidrogênio (HBD) e número de aceptores de ligação hidrogênio (HBA) foram calculados e comparados com a de 95% de fármacos comerciais. Nitidamente, 92% desta biblioteca possui características dentro de um limite fixado para 95% dos fármacos comerciais, enfatizando que esta biblioteca única apresenta características de *drug-likeness* e é adequada para a descoberta de novos fármacos aqui proposta (Figura 28).

Depois de analisarmos os possíveis estados de ionização e geração de tautômeros destes compostos nas condições fisiológicas, usando o programa LigPrep, obtivemos 1014 estruturas que foram analisadas através de estudos de *docking*.

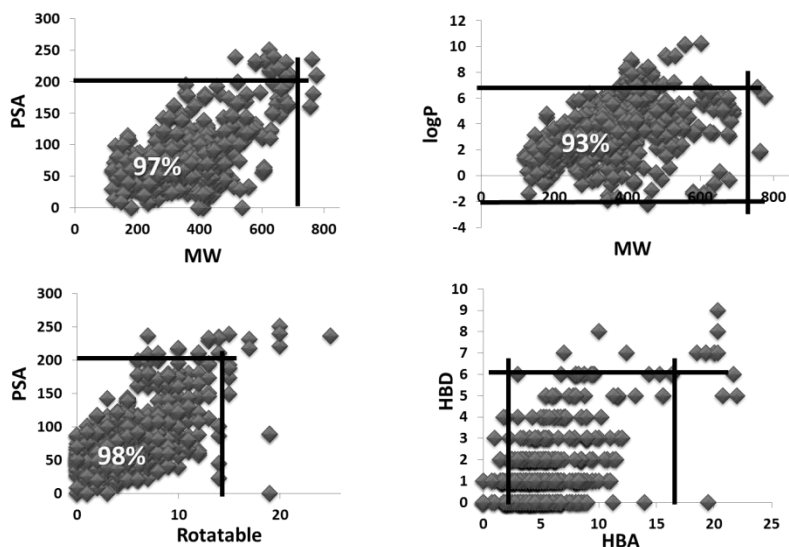


Figura 28. Dados físico-químicos da biblioteca de produtos naturais calculados com o programa QikProp e comparados com 95% dos fármacos comerciais. Peso molecular (*MW*), medidas de lipofilicidade (*logP*), área de superfície polar (*PSA*), número de ligações rotáveis (*Rotatable*), número de doadores de ligação hidrogênio (*HBD*) e número de aceptores de ligação hidrogênio (*HBA*).

12.2. O papel das moléculas de água de cristalização

Baseados na única estrutura cristalográfica disponível para o complexo PtpB:inibidor (PDB 2OZ5 - PtpB:OMTS) nós examinamos o papel das moléculas de água co-cristalizadas dentro do sítio ativo com o ligante (a aproximadamente 1,8 Å de distância da OMTS) (Grundner *et al.*, 2007) (Figura 29). Embora por muito tempo as moléculas de água não fossem consideradas para os cálculos de *docking*, nos últimos anos têm sido reportado que as águas conservadas melhoram significativamente os resultados dos cálculos (Santos *et al.*, 2010; Cappel *et al.*, 2011).

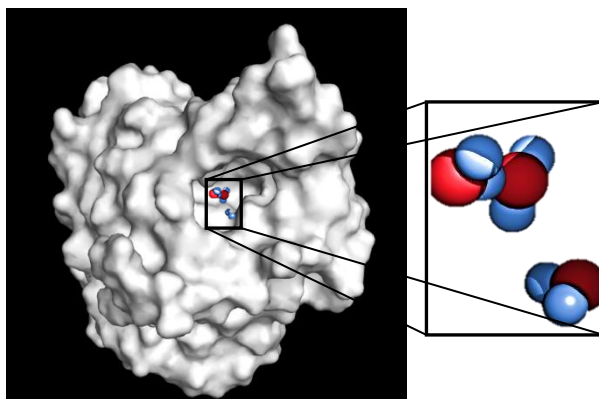


Figura 29. Representação das três moléculas de água presentes no sítio ativo da PtpB.

Neste trabalho, o programa GRID (GRID, versão 22) foi usado para explorar os possíveis sítios de ligação das águas dentro do sítio ativo da PtpB. Os mapas foram gerados pelo uso de *WAT probe* no programa GRID. Uma ótima sobreposição entre as regiões de mínimo de energia e as coordenadas das três moléculas de água presas no sítio ativo da PtpB são observadas na Figura 30. Uma vez que estas águas estão estreitamente próximas da OMTS, e parecem fazer pontes entre a sulfonamida e a PtpB, pode-se especular que elas estabilizem o complexo e mediem interações proteína-ligante, além disso, favorecendo contribuições entrópicas para a energia livre de ligação. Por esta razão, e de acordo com os cálculos de GRID, essas moléculas de água foram incluídas na nossa estrutura do receptor e explicitamente consideradas durante o *docking*. É também interessante ressaltar que já

tem sido reportado melhoria dos resultados de *docking* quando consideramos uma média de 3 ou 4 moléculas de água envolvidas em ligações com a proteína pelo uso do programa GOLD (Beer *et al.*, 2010).

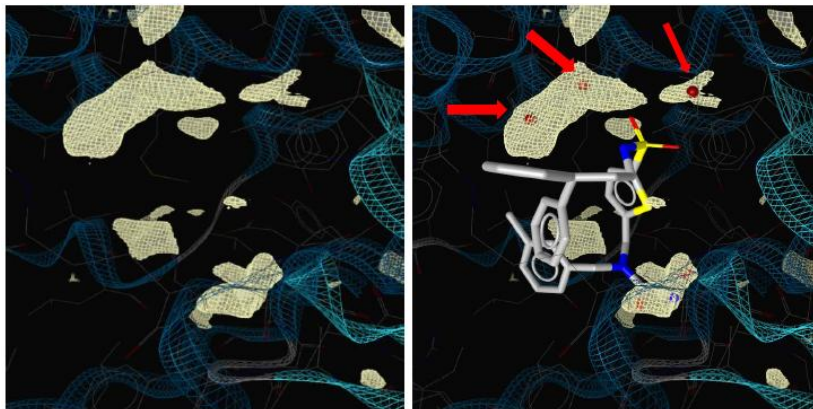


Figura 30. Moléculas de água dentro do sítio ativo da estrutura cristalográfica da PtpB. As moléculas de água cristalográficas são mostradas como esferas vermelhas; Os mapas de potenciais gerados por GRID para *WAT probe* são mostradas como telas em amarelo claro.

12.3. *Docking* com GOLD

O *docking* é um procedimento que consiste de duas partes. A busca pelo espaço dos graus de liberdades configuracionais e conformacionais (que envolve o posicionamento do ligante no sítio ativo), e a atribuição de uma pontuação a essas conformações segundo uma função-*score* (Ramsland, 2001; Brooijmans e Kunts, 2003). Esta função-*score* serve para estimar a afinidade de ligação entre ligantes e macromoléculas, ranqueando assim múltiplos ligantes, e é a função a ser otimizada pelos algoritmos de *docking* molecular.

A habilidade de vários programas de *docking* em reproduzir as conformações de raios-X da OMTS dentro do sítio ativo da PtpB foram preliminarmente checadas. As coordenadas do complexo OMTS:PtpB foram obtidas da estrutura pública PDB: 2OZ5 e docadas para obtenção da menor energia livre (ou *top scoring*) fornecida por cada programa analisado. Enquanto todos os demais programas e funções não foram satisfatórios em reproduzir o complexo cristalino, o *docking* com a função GoldScore do programa GOLD (Verdonk *et al.*, 2005) teve

sucesso. Em particular, a melhor concordância entre os dados de raios-X e os obtidos com o *docking* teve a energia minimizada com AMBER 11 (Case *et al.*, 2012) e incluiu as 3 águas conservadas no sítio, resultando em um RMSD de 0,7441 Å (Figura 31) (Case *et al.*, 2012). Os mesmos conjuntos de parâmetros utilizados para docar OMTS:PtpB foram propostos para o *docking* da biblioteca de PN. Depois do *docking*, uma inspeção visual das melhores conformações do *ranking* de compostos (10% do total analisado) levou à seleção de 106 compostos para um novo filtro de *rescoring*.

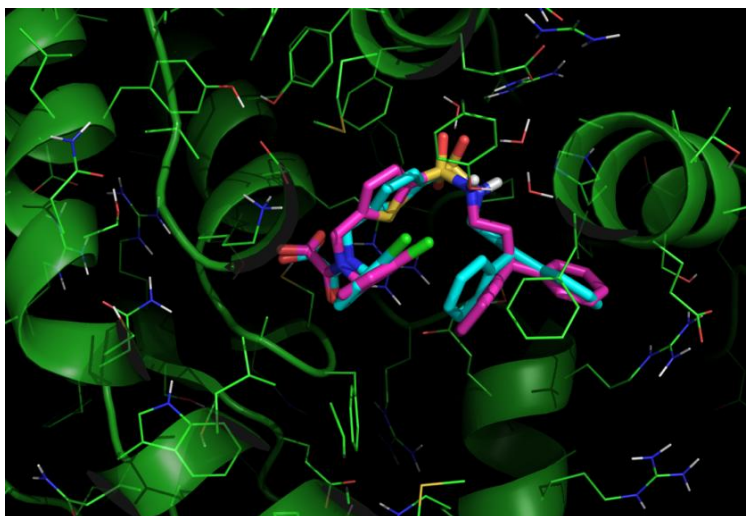


Figure 31. Minimização com Amber e *docking* com Goldscore: a melhor sobreposição entre a estrutura gerada (rosa) e a estrutura de raios-X do complexo (azul).

12.4. *Rescoring* dos resultados de *docking* com MM-GBSA

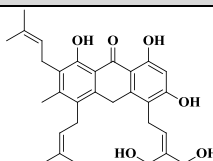
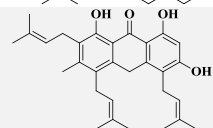
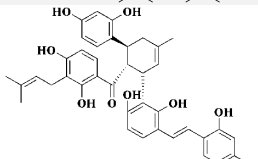
O MMGBSA (do inglês *Molecular Mechanics Combined with Generalized Born and Surface-area Solvation*) é um método que utiliza modelos de solvente implícito para calcular a variação da energia livre decorrentes da solvatação do sistema, diminuindo a quantidade de cálculos de dinâmica molecular necessários para se estimar a afinidade entre uma enzima e um ligante. Este método tem sido utilizado para reavaliar poses produzidas por programas de *docking* molecular com a

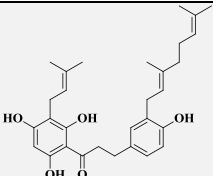
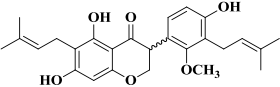
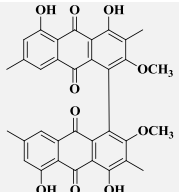
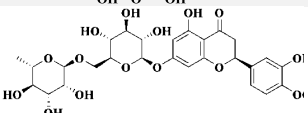
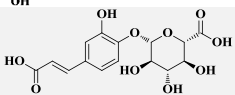
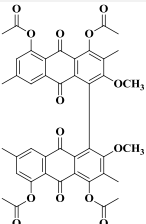
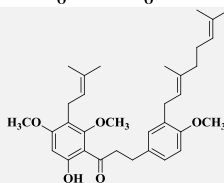
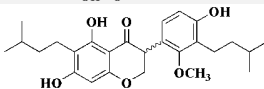
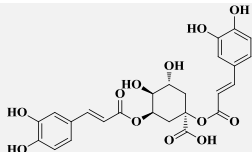
finalidade de melhorar o ordenamento das moléculas pelo *docking*, potencialmente diminuindo o número de falsos positivos/negativos (Rastelli *et al.*, 2009).

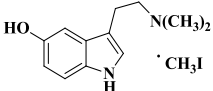
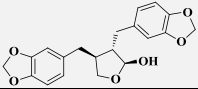
O *rescoring* a partir dos melhores resultados de *docking* é muito usado em química computacional, pois seleciona de maneira mais refinada a energia de ligação entre o ligante e o receptor (O'Boyle *et al.*, 2009). Em estudos prévios, foi avaliada a capacidade do método MM-GBSA no *rescoring* de resultados de *docking* gerados por GOLD, para diferentes sistemas (Mori *et al.*, 2012). Resultados similares foram discutidos também por outros pesquisadores (Hou *et al.*, 2011). Portanto, aqui usamos o método MM-GBSA para o *rescoring* das 106 estruturas selecionadas por *docking*.

Finalmente, baseados no delta de energia de ligação calculado com método MM-GBSA (ΔE), diversidade química e melhor sobreposição com OMTS, selecionamos 14 compostos (Tabela 14).

Tabela 14. Lista dos 14 compostos selecionados por *virtual screening* como possíveis inibidores da PtpB.

Código	Composto	Estrutura	Ref.
$\Delta 3$	1,3,8-trihidroxi, 6-metil, 5,7-diprenil, 4- γ,γ' dihidroxiprenil-antrona		Moura Pinheiro <i>et al.</i> 1984.
PirIII	1,3,8-trihidroxi, 6-metil, 4,5,7-triprenil-antrona		Delle Monache <i>et al.</i> 1979.
KuwE	Kuwanol E		Ferrari <i>et al.</i> 1999.

Egal	4,2',4',6'-tetrahidroxi,3'-prenil,3-geranil-dihidrochalcona		Trani <i>et al.</i> 1997
M2	Isosoforanona		Delle Monache <i>et al.</i> 1977.
6016	Trachipona		Delle Monache <i>et al.</i> 1992.
Hesp	Hesperidina		Wander 1925.
Caf	Ácido cafeico 4-O-glicosilado		Bringmann <i>et al.</i> 1999.
Ac3	Tetra-acetil-trachipona		Delle Monache <i>et al.</i> 1992.
59-triMe	4,2',4'-trimetoxi,6'-hidroxi,3'-prenil,3-geranil-dihidrochalcona		Trani, M <i>et al.</i> 2004.
M2H	Tetra-hidro-isosoforanona		Delle Monache <i>et al.</i> 1977.
Cyn	Cinarina		Noldin <i>et al.</i> 2003

Buf-I	Bufotenina CH ₃ I		Marini-Bettòlo <i>et al.</i> 1964.
α-Cub	α -cubebina		Cuca <i>et al.</i> 1998.

Os resultados obtidos a partir do *docking* e *rescoring* são mostrados na Tabela 15, e claramente indicam que os compostos $\Delta 3$, PirIII, KuwE, Ega1, M2 e 6016 podem ter maior afinidade pela PtpB que os demais. Todos os 14 compostos foram avaliados *in vitro* na PtpB.

Tabela 15. Resultados de *docking* e *rescoring* para os compostos selecionados.

Código	Docking (Goldscore Fitness)[#]	Rescoring (MM-GBSA)[#] \pm DP
$\Delta 3$	67,09	-62,31 \pm 1,09
PirIII	66,75	-55,83 \pm 2,08
KuwE	68,78	-55,26 \pm 1,48
Ega1	69,28	-55,21 \pm 1,59
M2	68,46	-50,53 \pm 1,96
6016	72,02	-50,04 \pm 1,83
Hesp	70,08	-47,85 \pm 3,81
Caf	67,55	-44,79 \pm 2,00
Ac3	73,94	-43,81 \pm 1,51
59-triMe	79,38	-43,11 \pm 4,13
M2H	69,37	-42,73 \pm 1,26

Cyn	79,03	-42,14 ± 5,57
Buf-I	55,00	-33,02 ± 0,48
α-Cub	76,88	-32,18 ± 6,12

#Energia é expressa em kcal/mol. DP é o desvio padrão conformational.

13 AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA

13.1. Atividade inibitória *in vitro* na PtpB

As propriedades inibitórias dos 14 compostos selecionados por *screening* virtual foram avaliados na PtpB, pela metodologia descrita previamente por nosso grupo de pesquisas (Chiaradia *et al.*, 2012) com pequenas alterações (seção experimental). Seis compostos mostraram boa inibição da PtpB ($IC_{50} < 30 \mu M$), dois mostraram moderada atividade ($IC_{50} 30-100 \mu M$) e seis não mostraram atividade ($IC_{50} \geq 100 \mu M$) (Tabela 16). O melhor efeito inibitório da PtpB foi obtido pelo composto Kuwanol E ($IC_{50} = 1,9 \pm 0,5 \mu M$), um aduto do tipo Diels-Alder isolado de cascas e raízes da *Morus nigra* (Ferrari *et al.*, 1999).

As estruturas químicas da maioria das moléculas ativas nos permitem compará-las com a atividade enzimática, delineando assim, aproximativamente, uma relação entre estrutura química e atividade biológica (SAR). Por exemplo, comparando as antronas PirIII ($IC_{50} = 5,4 \pm 0,6 \mu M$) e $\Delta 3$ ($IC_{50} = 26,7 \pm 0,6 \mu M$), a substituição de dois átomos de hidrogênio por dois grupos hidroxila em apenas um grupamento prenila de $\Delta 3$, reduz a atividade inibitória da PtpB. Já entre as isosoforanonas M2 ($IC_{50} = 19,8 \pm 2,3 \mu M$) ed M2H ($IC_{50} = 69,4 \pm 4,5 \mu M$), a hidrogenação dos grupos prenila em M2H reduz a potência inibitória. No entanto, comparando os compostos 6016 ($IC_{50} = 19,2 \pm 6,7 \mu M$) e Ac3 ($IC_{50} = 33,2 \pm 4,9 \mu M$), a acetilação dos quatro grupos hidroxila em Ac3 leva a uma redução da atividade. Resultados similares podem ser observados para as dihidrochalconas: a metilação de três grupos hidroxila em 59-triMe ($IC_{50} > 100 \mu M$) reduziu drasticamente a atividade, quando comparada com Ega1 ($IC_{50} = 13,4 \pm 2,6 \mu M$). Em resumo, verificou-se que, em geral, a metilação não foi importante em dihidrochalconas, nem a hidrogenação nas isosoforanonas; a tetra-acetilação também não melhorou a atividade nas trachiponas, e a presença de grupos prenil não-hidroxilados parece ser muito importante

para a atividade das antronas. Apesar desta biblioteca ser bastante heterogênea, delineamos os dois *scaffolds* presentes nos compostos ativos (Figura 32).

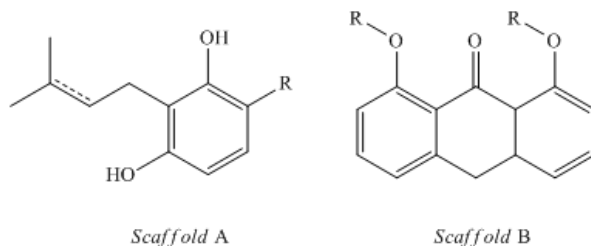


Figura 32. *Scaffolds* presentes nas estruturas dos compostos ativos. (A) presente em KuwE, Ega1, M2 e M2H. (B) presente em PirIII, $\Delta 3$, 6016 e Ac3.

Os demais compostos mono- e poli-hidroxiados não foram ativos (Hesp, Caf, Cyn, Buf-I e α -Cub). A presença de um grupo carboxila livre na OMTS parece ser essencial para as interações com PtpB (Grundner *et al.*, 2007) mas, contrariamente ao esperado, os compostos Caf e Cyn, que apresentam grupos carboxila livres, não foram ativos.

Tabela 16. Valores de IC_{50} das moléculas selecionadas da biblioteca *in-house* frente à PtpB de Mtb e índices de seletividade (IS) frente à PTP1B humana.

Código	IC_{50} (μM) PtpB \pm DP	IC_{50} (μM) PTP1B \pm DP	IS*
$\Delta 3$	26,7 \pm 0,6	14,7 \pm 2,1	0,6
PirIII	5,4 \pm 0,6	11,8 \pm 3,5	2,3
KuwE	1,9 \pm 0,5	9,6 \pm 2,6	5,1
Ega1	13,4 \pm 2,6	20,9 \pm 2,8	1,6
M2	19,8 \pm 2,3	n.d.	n.d.
6016	19,2 \pm 6,7	7,1 \pm 1,4	0,4
Hesp	>100	n.d.	n.d.
Caf	>100	n.d.	n.d.
Ac3	33,2 \pm 4,9	31,2 \pm 2,7	0,9
59-triMe	>100	n.d.	n.d.
M2H	69,4 \pm 4,5	n.d.	n.d.
Cyn	>100	n.d.	n.d.
Buf-I	>100	n.d.	n.d.
α -Cub	>100	n.d.	n.d.

Os resultados são mostrados como a média individual significativa \pm DP (desvio padrão) para 3 experimentos. *IS (Índice de seletividade), dado por $(IC_{50}^{PTP1B}/IC_{50}^{PtpB})$; n.d. = não determinado.

A ordem do *ranking* obtido por *docking* é significativamente diferente daquela obtida por *rescoring*, salientando novamente o grande impacto nas taxas de enriquecimento provadas por protocolos de *screening* virtual (Verdonk *et al.*, 2005). Comparando com os dados experimentais de afinidade obtidos, fica clara a importância do uso do método de MM-GBSA para *rescoring* (Tabela 17).

Tabela 17. Panorama comparativo dos resultados experimentais e teóricos para a biblioteca de PN na PtpB.

	Experimental	Docking	Rescoring
ATIVOS	KuwE	59-triMe	$\Delta 3$
	PirIII	Cyn	PirIII
	Ega1	α -Cub	KuwE
	6016	Ac3	Ega1
	M2	6016	M2
	$\Delta 3$	Hesp	6016
	Ac3	M2H	Hesp
NÃO ATIVOS	M2H	Ega1	Caf
	Hesp	KuwE	Ac3
	Caf	M2	59-triMe
	Cyn	Caf	M2H
	Buf-I	$\Delta 3$	Cyn
	α -Cub	PirIII	Buf-I
	59-triMe	Buf-I	α -Cub

13.2. Estudos Cinéticos

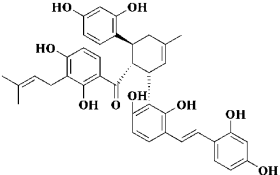
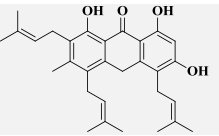
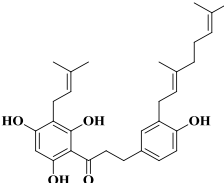
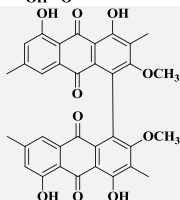
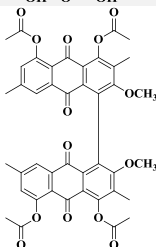
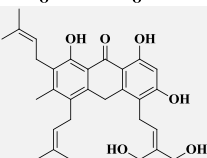
Estudos de cinética enzimática são frequentemente empregados para determinação das propriedades de um inibidor. Os inibidores podem afetar uma reação enzimática de duas formas: (i) *inibidor reversível* – pode ligar-se à enzima e ser liberado em seguida, deixando-a em sua condição original; e (ii) *inibidor irreversível* – reage com a enzima resultando em uma modificação que a torna enzimaticamente inativa, de tal forma que sua atividade original não pode ser regenerada, ou é regenerada muito lentamente (Patrick, 2005).

Dentre os inibidores reversíveis, duas classes podem ser diferenciadas com base na enzima à qual se ligam, os *inibidores competitivos* e os *não-competitivos*. Os primeiros podem ligar-se ao sítio ativo e bloqueiam o acesso do substrato à ele. A segunda classe inclui inibidores que se ligam à enzima em um sítio diferente do sítio ativo e, como resultado desta ligação, provocam uma mudança na estrutura da enzima; assim, o substrato ainda pode ligar-se ao sítio ativo, mas a enzima não pode catalisar a reação (Campbell e Farrel, 2006).

Modificações covalentes de proteínas por fosforilação e desfosforilação reversíveis são mecanismos essenciais para o controle das funções celulares. Uma ampla variedade de processos celulares, como divisão, diferenciação e desenvolvimento celular são controlados por sinalização molecular obtida através de cascatas de fosforilação/defosforilação de proteínas (Hunter, 1995; Tonks e Neel, 1996). PTPases revertem o efeito de tirosinas quinases pela defosforilação do substrato celular de resíduos de proteína tirosina (Hunter, 1995).

Experimentos *in vitro* foram planejados para investigar o modo de inibição das moléculas ativas. Selecionamos os melhores inibidores para analisar seu mecanismo de ação em relação ao substrato artificial das PTPs, o *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP). Os estudos cinéticos revelaram que os compostos KuwE, 6016 e Ac3 são inibidores competitivos da PtpB, com valores de K_i entre 1,6 e 17,1 μM , enquanto PirIII, Egal e $\Delta 3$ são inibidores não-competitivos, com valores de K_i entre 6,6 e 14,5 μM , (Tabela 18). A Figura 33 mostra os gráficos de Lineweaver-Burk dos inibidores da PtpB.

Tabela 18. Valores de K_i e modo de inibição da PtpB provocado pelos inibidores.

Composto	Estrutura	PtpB K_i (μM) \pm DP	IC_{50} / K_i	Tipo de inibição
KuwE		$1,6 \pm 0,1$	1,2	Competitivo
PirIII		$6,6 \pm 2,7$	0,8	Não-competitivo
Ega1		$14,5 \pm 2,3$	0,9	Não-competitivo
6016		$11,5 \pm 1,7$	1,7	Competitivo
Ac3		$17,1 \pm 4,5$	1,9	Competitivo
$\Delta 3$		$13,4 \pm 1,5$	2,0	Não-competitivo

Os valores de K_i são a média individual significativa \pm DP (desvio padrão).

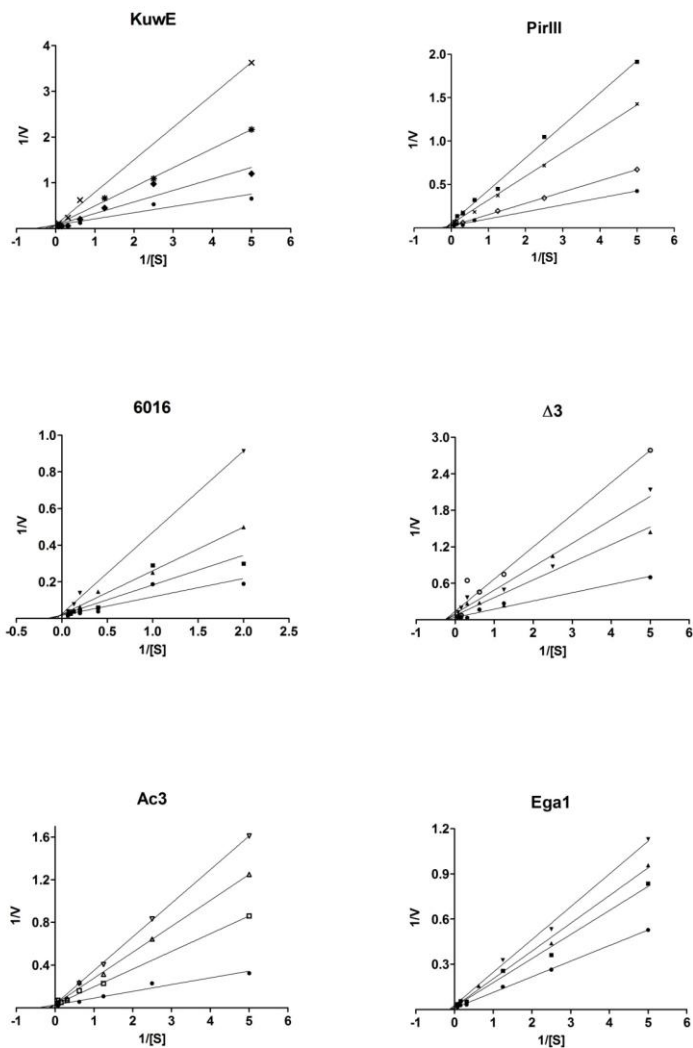


Figura 33. Perfil de inibição dos compostos KuwE, PirIII, Ega1, 6016, Ac3 e $\Delta 3$ frente à PtpB de Mtb. Experimentos cinéticos foram conduzidos na presença de concentrações crescentes dos inibidores: 0 μM (●), 1 μM (◆), 2 μM (◇), 3 μM (*), 6 μM (×), 10 μM (■), 20 μM

(▲), 25 μM (□), 30 μM (▼), 35 μM (△), 40 μM (○), 45 μM (▽); pNPP foi usado como substrato em todos os experimentos.

13.3. Ensaios de seletividade

A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) desempenha um papel crítico na regulação da homeostase glicêmica e do peso corporal por sua ação chave como reguladora de caminhos de sinalização da insulina e leptina (Johnson *et al.*, 2002). Essa enzima é conhecida também por aumentar a sensibilidade à insulina e a resistência à obesidade (Elchebly *et al.*, 1999). A família das proteínas tirosinas fosfatases possui um domínio catalítico característico, com uma sequência invariável HCX₅R; especialmente a PtpB possui uma fenilalanina (F), uma lisina (K) e um resíduo de ácido aspártico (D) conservados que se diferenciam da PTP1B humana (Figura 34), e este pode ser o motivo que determina a seletividade de um inibidor.

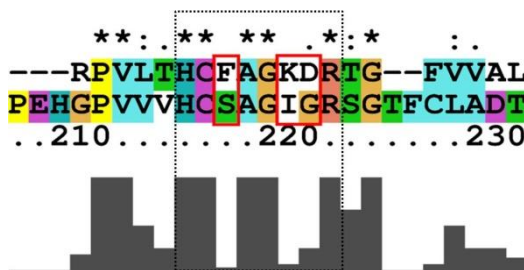


Figura 34. Alinhamento da sequência primária de aminoácidos presentes no sítio catalítico da PtpB de Mtb e da PTP1B humana. Os resíduos de aminoácidos diferentes são destacados em vermelho, e a sequência invariável em pontilhado. A sequência foi obtida usando ClustalX.

Os resultados de seletividade apresentados na Tabela 16 mostram que os compostos mais potentes, KuwE, PirIII e Ega1 são seletivos para PtpB, com índices de seletividade (IS) de 5,1; 2,3 e 1,6, respectivamente em relação à PTP1B. Os demais compostos estudados não exibiram seletividade para PtpB (SI < 1).

13.4. Previsão do modo de ligação de KuwE e indicativos da sua seletividade

O modo de ligação do KuwE, que é o inibidor mais potente e mais seletivo estudado aqui, está representado na Figura 35. Basicamente, os grupos hidroxila do KuwE fazem várias interações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos de Ser 57, Glu60, Tyr110, Arg166 e uma molécula de água conservada no sítio da PtpB (Figura 34). Somente a ligação de hidrogênio com a Arg160 e a molécula de água são comuns com as ligações da OMTS, reveladas por cristalografia de raio-X, embora seja clara a configuração de sobreposição destes inibidores dentro do sítio catalítico. Por outro lado, os anéis aromáticos do KuwE, que estão em uma porção vinílica, estão envolvidos em interações hidrofóbicas com um grupo de resíduos de aminoácidos básicos da PtpB, como Phe98, Leu102, Phe161, Ile203, Ile207 e Leu227, que estão localizados na entrada do sítio catalítico.

Notavelmente, o modo de predição do KuwE mostra um dos resíduos envolvidos na seletividade frente à PTP1B humana mostrado na Figura 34. No detalhe demarcado por um círculo vermelho, o KuwE faz interações hidrofóbicas/aromáticas com a Phe161, que se assemelha a uma interação π -stacking paralelamente deslocada, provando uma possível correlação com a seletividade deste composto. Deste modo, fatores estruturais podem ser explorados para um desenho racional de inibidores ainda mais seletivos para a PtpB, bem como, melhorar a seletividade de inibidores de PtpB já conhecidos através de modificações químicas.

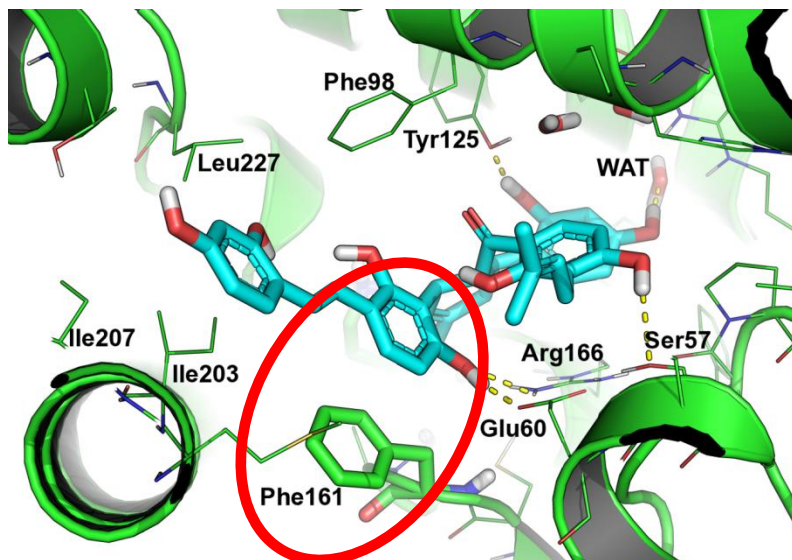


Figura 35. Modo de ligação de KuwE dentro do sítio catalítico de PtpB, proposto por *docking*. O KuwE está em azul e os resíduos de aminoácidos da PtpB em verde. Contatos polares entre o KuwE e a PtpB são representados por pontilhados amarelos. A interação π -stacking da Phe161 com o KuwE está destacada com um círculo vermelho. O número dos resíduos de aminoácidos seguem os apresentados na estrutura cristalográfica, em PDB: 2OZ5.

14 Novas estratégias na busca de inibidores da PtpB: biblioteca de compostos comerciais

Dando continuidade à nossa busca por inibidores potentes da PtpB, e utilizando os mesmos parâmetros de *docking* e *rescoring* apresentados anteriormente para esta proteína, decidimos analisar bibliotecas de compostos disponíveis comercialmente na base de dados do ZINC (<http://zinc.docking.org>). Aplicamos dois tipos de filtros de seleção para a biblioteca escolhida, ambos em função da estrutura do inibidor OMTS: (i) um baseado na sobreposição, utilizando o programa ROCS, (ii) e outro baseado no farmacóforo, utilizando o programa Ligandscout.

O método de sobreposição baseado no *shape* (ROCS) é uma ferramenta de avaliação virtual que permite identificar compostos potencialmente ativos com um *shape* semelhante e características

químicas de compostos líderes conhecidos, que usa volumes de sobreposição como medida de similaridade. Usamos esta ferramenta para identificar compostos que possuam maior semelhança com a OMTS (composto de referência para as simulações), a partir da base de dados ZINC (Figura 36).

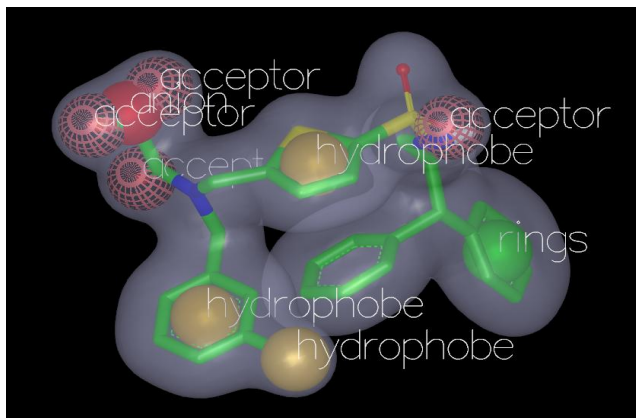


Figure 36. Query gerado pelo programa ROCS a partir dos dados cristalográficos do complexo PtpB:OMTS.

Uma outra ferramenta útil usada em *screenings* virtuais é a geração de modelos farmacofóricos 3D para a identificação dos compostos ativos a partir de dados estruturais de complexos (Wolber e Langer, 2005). O programa Ligandscout identifica as regiões de maior interação entre o composto e a proteína, como por exemplo, regiões hidrofóbicas, hidrofílicas, doadores e aceptores de ligação hidrogênio, entre outras. Este estudo foi realizado para mapearmos as características farmacofóricas da OMTS dentro do sítio da PtpB (Figura 37).

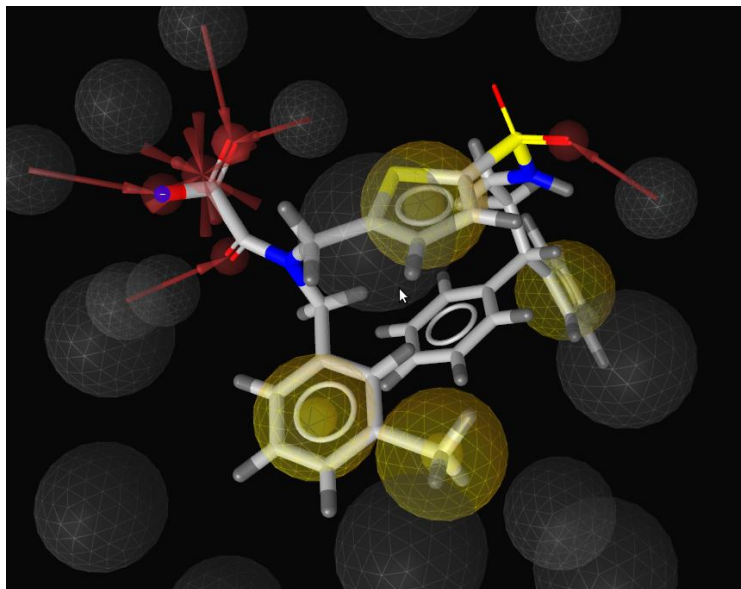


Figure 37. Farmacóforo gerado pelo programa Ligandscout a partir dos dados cristalográficos do complexo PtpB:OMTS. As esferas representam: zonas de exclusão (cinza); regiões hidrofóbicas (amarela); aceptores de ligação hidrogênio (vermelha).

14.1. Aplicação de filtros de seleção

No esforço de identificar novos inibidores da PtpB, realizamos simulações de *docking* com a biblioteca *Drugs-Now* um subconjunto da base de dados ZINC, que possui como características físico-químicas $\log P \leq 5$, $MW >150$ porém ≤ 500 e número de aceptores de ligação hidrogênio ≤ 10 .

Estabelecemos para o *screening* virtual a combinação de estudos farmacofóricos baseados no ligante (com Ligandscout) e a abordagem baseada na similaridade química e no *shape* das estruturas (com ROCS).

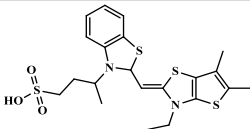
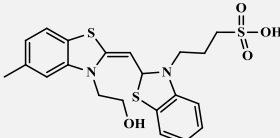
O subconjunto *Drug-Now* constitui-se de 5.717.527 de compostos. Desta forma, usamos um primeiro filtro, baseado na dimensão e distribuição geográfica dos maiores fornecedores envolvidos, o que nos levou a selecionar 1.213.531 de compostos desta biblioteca, os quais foram submetidos ao *screening* com Ligandscout e

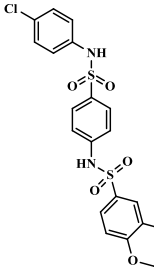
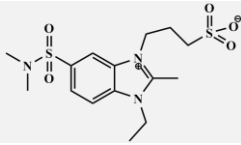
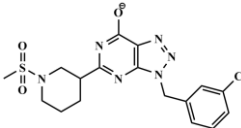
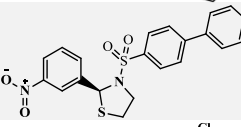
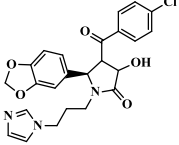
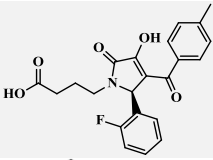
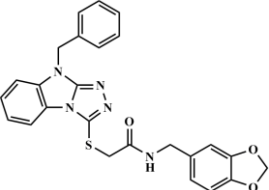
ROCS, através dos parâmetros gerados pelo farmacóforo e pelo *query*, respectivamente (Figuras 35 e 36).

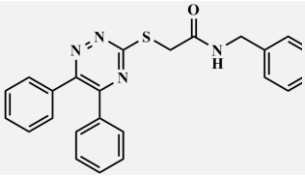
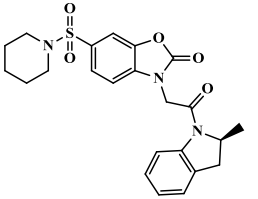
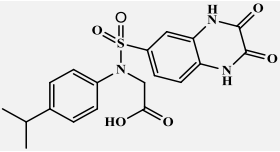
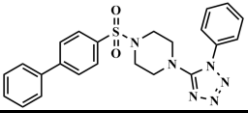
Após a aplicação dos filtros, foram selecionadas 64.389 estruturas com o ROCS e 9.545 estruturas com o Ligandscout 9.545, as quais foram submetidas ao *docking* na PtpB utilizando os mesmos parâmetros usados para a biblioteca de produtos naturais.

A inspeção visual dos melhores 1.500 complexos (PtpB:ligante) classificados pelo *docking* nos levou a selecionar 503 para passarem pelo último filtro de *rescoring*, com minimização dos complexos (utilizando o programa Amber) e cálculo da energia de ligação (utilizando MMGBSA). Por fim, a inspeção visual dos melhores complexos indicados por *rescoring* nos levou a selecionar 13 compostos (Tabela 19) para ensaios biológicos na PtpB (Tabela 20).

Tabela 19. Lista dos 13 compostos selecionados por *virtual screening* como possíveis inibidores da PtpB.

Código	Estrutura	Docking (Goldscor e Fitness)	Rescoring (MM-GBSA) [#] ± DP
	OMTS	110,50	-68,25±9,85
ZINC03656639		109,68	-92,31±2,26
ZINC03639854		106,44	-90,04±1,30

ZINC01167610		104,34	-58,74±1,97
ZINC01950674		104,04	-80,50±1,98
ZINC06173123		91,28	-45,61±5,64
ZINC02483811		90,48	-44,11±7,75
ZINC02501449		89,38	-34,50±1,42
ZINC 04427216		88,04	-42,24±3,66
ZINC01364875		87,45	-41,71±3,46

ZINC00912349		86,74	-40,73±2,97
ZINC06530799		87,85	-49,97±4,0135
ZINC02928570		87,12	-50,67±4,40
ZINC01361417		83,74	-43,50±9,39

DP = desvio padrão.

15 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O *screening* da biblioteca de PN resultou na identificação de vários potentes inibidores da PtpB. Especialmente KuwE e PirIII mostraram excelentes valores de K_i $1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ e $6,6 \pm 2,7 \mu\text{M}$, respectivamente. Os resultados obtidos a partir dos estudos *in silico* mostraram a alta correlação entre os resultados experimentais e resultados de *rescoring*.

Já em relação aos estudos *in silico* realizados com uma base de dados comercial, selecionamos 13 compostos a partir de uma biblioteca de mais de 5 milhões de estruturas, a partir de uma base de dados comerciais, através do uso de diferentes filtros, baseados principalmente no farmacóforo, no *shape* e no volume de sobreposição usando como referência o inibidor OMTS. Deste modo, estes estudos nos levaram a indicar 13 moléculas com ótimos valores de *docking/rescoring*.

16 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CAPÍTULO 1:

Neste capítulo, desenhamos e sintetizamos uma família de sulfonamidas e de sulfonil(tio)uréias, baseadas na estrutura da glibenclamida, aplicando a estratégia de bioisosterismo para obtenção de potenciais agentes hipoglicemiantes, num total de 22 compostos sintetizados, sendo 15 inéditos.

De todos os compostos analisados neste capítulo, a sulfonamida **5** (desenhada a partir do fragmento da glibenclamida), substituída com o grupo *p*-metóxi no anel A, mostrou a mais pronunciada atividade em ambos modelos, *in vitro* e *in vivo*, sendo mais ativa que as próprias sulfonil(tio)uréias (desenhadas a partir da estrutura geral da glibenclamida).

Os resultados obtidos para este composto sugerem que o mecanismo nas ilhotas pancreáticas envolve a diminuição na permeabilidade do K⁺ da membrana de células-β, causando assim uma despolarização e ativando a PKC, que leva a ativação de VDCC e captação de Ca²⁺, que pode culminar na liberação de insulina. Demonstrando que o composto **5** pode contribuir para a homeostase da glicose, uma vez que é equipotente como a glibenclamida, mas sem provocar sobrecarga das células-β nos processos de secreção.

Baseados nestes resultados e, utilizando o Método de Topliss Modificado (Lazzarotto *et al.*, 2005), propomos a síntese de novas sulfonamidas preditas por este Método e que estão sendo sintetizadas pelo nosso grupo como continuação desta tese e que provavelmente terão um poder antihiper-glicêmico ainda maior.

CAPÍTULO 2:

Neste capítulo foram sintetizadas quatro classes de compostos: acil-hidrazonas, oxadiazóis, imidas cíclicas e tiazolidinonas baseadas nos fármacos colchicina e combretastatina A-4, num total de 62 moléculas, sendo 34 estruturas inéditas.

Encontramos 7 compostos com atividade anti-leucêmica na faixa de nanomolar, sendo o **29** o composto mais potente, com atividade de 15nM frente às células da linhagem Jurkat e de 25nM em células REH. Também determinamos a sua baixa toxicidade em células normais, além de seu mecanismo de ação, como inibidor da tubulina.

Este estudo gerou recentemente uma patente ao grupo (PI1107312-8) e atualmente o composto **29** está sendo testado em experimentos *in vivo*.

Os novos compostos sintetizados (**76-84**) estão sendo testados em experimentos *in vitro* para determinarmos seu potencial anti-leucêmico.

CAPÍTULO 3:

Este capítulo trata do primeiro estudo de *screening* virtual de bibliotecas de compostos na PtpB. O *screening* da biblioteca de PN resultou na identificação de vários potentes inibidores da PtpB. Os resultados obtidos a partir dos estudos *in silico* mostraram a alta correlação entre os resultados experimentais dos 7 mais potentes compostos (KuwE, PirIII, Ega1, 6016, M2, Δ3 e Ac3) e respectivos resultados de *rescoring*. Principalmente o inibidor KuwE (K_i , $1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) é atrativo do ponto de vista químico, para futuras otimizações, pois contém um novo *scaffold* para inibidores de PtpB.

Também analisamos uma biblioteca de compostos comerciais de mais de 5 milhões de estruturas. Baseados na estrutura do inibidor OMTS geramos o farmacóforo e o *query* baseado no *shape* e no volume de sobreposição e utilizamos como filtro de seleção para esta biblioteca. Deste modo, estes estudos nos levaram a indicar 13 moléculas com ótimos valores de *docking/rescoring* que estão sendo testadas *in vitro* na PtpB.

17 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

17.1. Caracterização dos compostos

Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck, visualização em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e revelação com pulverização de anisaldeído sulfúrico. Quando necessário, os compostos foram purificados por recristalização com solventes orgânicos como diclorometano, hexano e etanol.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) foram realizados em equipamento VARIAN OXFORD AS-400, tendo como referência o próprio solvente ou TMS. Para todas as amostras foi utilizado dimetilssulfóxido deuterado ou clorofórmio deuterado como solventes. Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos através de um espectrômetro Abb Bomen FTLA 2000, utilizando pastilha de KBr. O ponto de fusão não corrigido dos compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPF-301, Microquímica Equipamento Ltda. Os dados de espectro de massa de alta resolução (HRMS) foram coletados em espectrômetro de massa Bruker micrOTOF-QII, com ionização por eletrospray (ESI-MS) no modo positivo. As análises elementares foram realizadas em equipamento CHNS EA 1110, com variação máxima de 0,4% entre o valor relatado na literatura e o experimental. Os reagentes e solventes utilizados nesta pesquisa foram das marcas comerciais: Aldrich, Merck, Sigma, Fluka e Vetec. A nomenclatura dos compostos encontra-se em Anexo, a numeração utilizada na caracterização foi dada de modo aleatório para atribuição dos sinais.

17.2. SÍNTESES – CAPÍTULO 1 (*Sulfonamidas e sulfonil(tio)uréias*)

17.2.1. Síntese dos intermediários de reação - *Síntese do cloreto de sulfonila*

Para a síntese do cloreto de sulfonila utilizado como reagentes para obtenção da benzenossulfonamida **10**, utilizou-se a metodologia descrita por Andrighetti-Fröhner e col. (2009). Adicionou-se a chalcona sobre 6 equivalentes de ácido clorossulfônico, em banho de gelo. A solução é aquecida em banho-maria até cessar a saída de gás, e a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por uma semana, seguido

da adição de 100 mL de água gelada. O produto formado é filtrado e lavado com água.

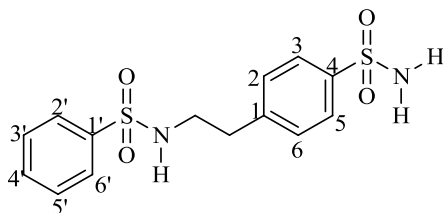
(*E*)-2-METOXI-5-(3-OXO-1-FENILPROPENIL)-(CLOROSSULFONIL)

A massa obtida foi de 2,86g e o rendimento foi de 89%. p.f.: 130-134°C.

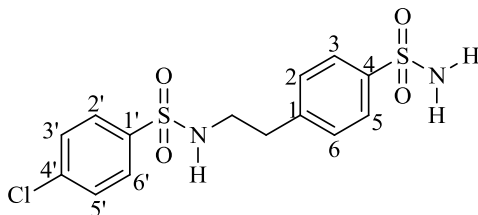
17.2.2. Síntese das sulfonamidas (1-12)

Para a síntese das sulfonamidas intermediárias na reação para obtenção das sulfonyl(tio)uréias foi utilizada metodologia adaptada de Yuriev e col. (2004). Em um balão 250mL adiciona-se o cloreto de sulfonila (5mmol) apropriado a uma solução de 4-(2-aminoetil)benzenossulfonamida (5mmol) em piridina (60mL). A mistura é agitada por 16h. Depois é adicionado gelo picado a reação e solução 20% de ácido clorídrico para acidificar o meio, na sequência o sólido formado é filtrado a vácuo e secado em estufa.

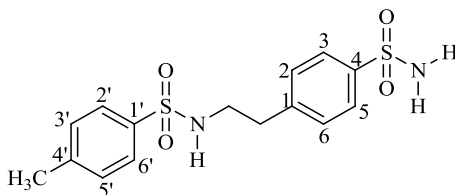
As sulfonamidas **4**, **9**, **10**, **11** e **12** são estruturas inéditas e seus espectros de ^1H e ^{13}C RMN estão no Anexo 1. As demais estruturas já foram previamente publicadas: **1**, **2**, **3** e **7** (Zhang *et al*, 2009), **8** (Borras *et al*, 1999), **5** e **6** (Jalali-Heravi *et al*, 2007). Todas as sulfonamidas estão caracterizadas na sequência.



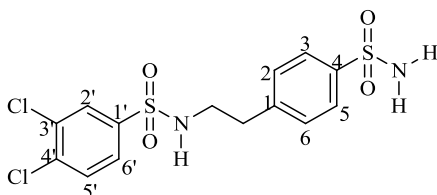
1 - Sólido amarelo claro, p.f. 155-157°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,76 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, t); 2,99 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, q); 7,31 (NH_2 , s); 7,35 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,59 (m, H3', H5'); 7,60 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,65 (m, H4'); 7,72 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H3, H5); 7,77 (t, NH); 7,78 (d, H2', H6'). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 35,56 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 44,25 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 126,32 (C2, C6); 127,12 (C2', C6'); 129,88 (C3, C5, C3', C5'); 133,11 (C4'); 140,93 (C4); 142,84 (C1); 143,59 (C1'). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1643, 1214 (C=O), 1568 (C=C), 1267, 1031 (C-O), 2978, 2945, 2834, 1514, 1469, 1409, 1290, 1198, 1150, 847 (Ar) (KBr). Rend. = 85%.



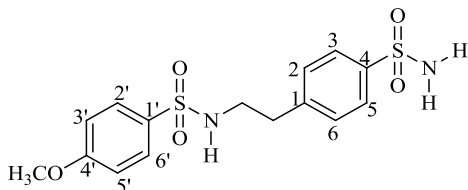
2 – Sólido branco, p.f. 145-146°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,75 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, t); 2,99 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, q); 7,28 (NH_2 , s); 7,34 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,65 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3', H5'); 7,71 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H2', H6'); 7,77-7,74 (m, 2H, H3, H5); 7,83 (t, 1H, NH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 35,36 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 43,96 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 126,10 (C2, C6); 128,89 (C3', C5'); 129,67 (C2', C6'); 129,82 (C3, C5); 137,73 (C4'); 139,60 (C4); 142,64 (C1'); 143,27 (C1). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1643, 1214 (C=O), 1568 (C=C), 1267, 1031 (C-O), 2978, 2945, 2834, 1514, 1469, 1409, 1290, 1198, 1150, 847 (Ar) (KBr). Rend. = 81%.



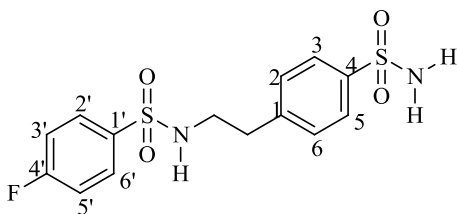
3 – Sólido branco, p.f. 160-161°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,38 (s, CH_3); 2,75 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, t); 2,96 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, q); 7,32 (NH_2 , s); 7,35 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,38 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H3', H5'); 7,65 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2', H6'); 7,66 (t, NH); 7,72 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H3, H5). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 20,96 (CH_3); 34,84 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 43,56 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 125,64 (C2, C6); 126,52 (C2', C6'); 129,21 (C3, C5); 129,65 (C3', C5'); 137,33 (C1'); 142,13 (C4'); 142,68 (C4), 142,97 (C1). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1643, 1214 (C=O), 1568 (C=C), 1267, 1031 (C-O), 2978, 2945, 2834, 1514, 1469, 1409, 1290, 1198, 1150, 847 (Ar) (KBr). Rend. = 69%.



4 – Sólido amarelo claro, p.f. 161-162°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,76 (t, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,03 (q, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 7,28 (s, NH_2); 7,35 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,70 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H6'); 7,71 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3, H5); 7,86 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H5'); 7,94 (s, 1H, H2'); 7,95 (t, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, NH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 35,38 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 43,88 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 126,09 (C2, C6); 127,09 (C6'); 128,74 (C2'); 129,69 (C3, C5); 132,13 (C5'); 132,57 (C3'); 135,93 (C4'); 141,12 (C1'); 142,67 (C4); 143,18 (C1). MS (ESI) m/z 431,0 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$. Rend. = 85%.

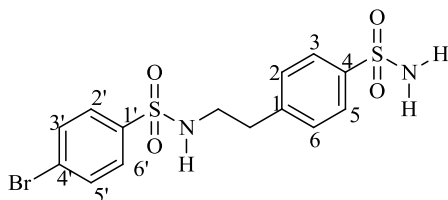


5 – Sólido amarelo claro, p.f. 175-176°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,73 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, t); 2,93 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, q); 3,81 (s, 3H, OCH_3); 7,08 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3', H5'); 7,28 (NH_2 , s); 7,33 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,55 (t, 1H, NH); 7,68 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H2', H6'); 7,71 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3, H5). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 35,53 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 44,25 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 56,27 (OCH_3); 115,02 (C3', C5'); 126,33 (C2, C6); 129,34 (C2', C6'); 129,88 (C3, C5); 132,55 (C1'); 142,83 (C4); 143,69 (C1); 162,79 (C4'). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3386 (NH_2); 32679 (NH); 1335 (SO_2^{as}); 1160 (SO_2^{sym}); 10208; 937; 833; 679 (Ar) (KBr). Rend. = 78%.

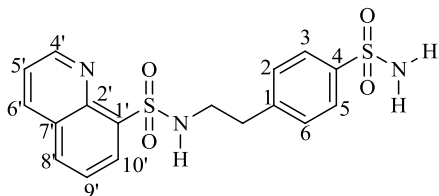


6 – Sólido branco, p.f. 164-165°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,77 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, t); 3,00 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, q); 7,32 (NH_2 , s); 7,36 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,45-7,41 (m, H3', H5'); 7,73 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H3, H5); 7,85-7,79 (m, H1', H6', NH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 35,53 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 44,20 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 117,06 (C3', C5'); 126,32 (C2, C6); 129,91 (C3, C5); 130,11 (C2', C6'); 137,30 (C1'); 142,84 (C4'); 143,57 (C1); 166,01 (C4'). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1643, 1214 (C=O), 1568 (C=C), 1267, 1031 (C=O),

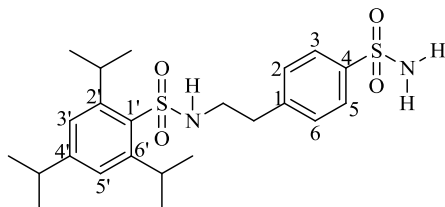
2978, 2945, 2834, 1514, 1469, 1409, 1290, 1198, 1150, 847 (Ar) (KBr).
Rend. = 71%.



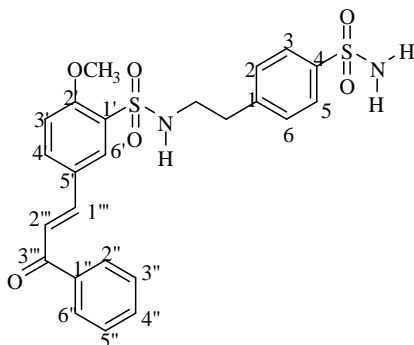
7 – Sólido amarelo claro, p.f. 152-153°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,75 (NH-CH₂-CH₂, t); 2,99 (NH-CH₂-CH₂, q); 7,28 (NH₂, s); 7,34 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H₂, H₆); 7,68 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H_{3'}, H_{5'}); 7,71 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H₃, H₅); 7,79 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H_{2'}, H_{6'}); 7,83 (t, 1H, NH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 35,85 (NH-CH₂-CH₂); 44,18 (NH-CH₂-CH₂); 126,34 (C₂, C₆); 126,90 (C_{4'}); 129,22 (C₃, C₅); 129,90 (C_{2'}, C_{6'}); 133,00 (C_{3'}, C_{5'}); 140,25 (C₄); 142,88 (C₁), 143,50 (C_{1'}). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3380 (NH₂); 3261 (NH); 1344 (SO₂^{as}); 1152 (SO₂^{sym}); 1068; 930; 817; 744 (Ar) (KBr); 1068; 930; 817; 744 (Ar) (KBr). Rend. = 81%.



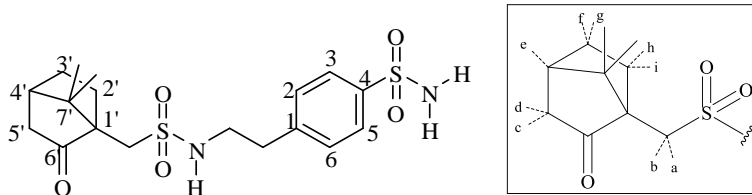
8 – Sólido amarelo claro, p.f. 227-228°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,74 (NH-CH₂-CH₂, t); 3,09 (NH-CH₂-CH₂, q); 7,17 (H_{5'}, t); 7,23 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H₂, H₆); 7,33 (NH₂, s); 7,63 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H₃, H₅); 7,69 (m, H_{9'}); 7,77 (t, NH); 8,30 (d, H_{8'}, H_{10'}); 8,55 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H_{6'}); 8,89 (m, H_{4'}). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 34,68 (NH-CH₂-CH₂); 43,89 (NH-CH₂-CH₂); 122,56 (C_{5'}); 125,57 (C_{10'}); 125,76 (C_{9'}); 129,04 (C₂, C₆); 130,57 (C₃, C₅); 133,71 (C_{7'}); 135,99 (C_{8'}); 137,12 (C_{6'}); 142,09 (C_{1'}); 142,48 (C_{2'}); 142,81 (C₁); 151,25 (C_{4'}). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1643, 1214 (C=O), 1568 (C=C), 1267, 1031 (C-O), 2978, 2945, 2834, 1514, 1469, 1409, 1290, 1198, 1150, 847 (Ar) (KBr). Rend. = 89%.



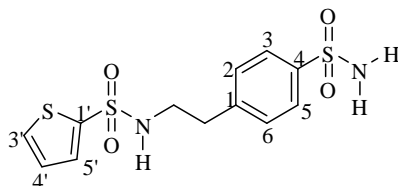
9 – Sólido amarelo, p.f. 198-199°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,17 (d, 12H, $J=8,0\text{Hz}$, CH_3); 1,21 (d, 6H, $J=8,0\text{Hz}$, CH_3); 2,79 (t, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,95-2,88 (m, 1H, CH); 3,07 (q, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 4,16-4,09 (m, 2H, CH); 7,23 (s, NH_2); 7,31 (m, 4H, H2, H6, H3', H5'); 7,67 (t, 1H, NH); 7,71 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3, H5). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 24,13 (2C, CH_3); 25,41 (4C, CH_3); 29,46 (2C, CH); 33,99 (1C, CH); 35,73 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 43,43 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 124,20 (C3', C5'); 126,34 (C2, C6); 129,72 (C3, C5); 133,87 (C1'); 142,85 (C4); 143,61 (C1); 150,32 (C2', C6'); 152,69 (C4'). MS (ESI) m/z 489,2 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$. Rend. = 62%.



10 - Sólido branco, p.f. 194-196°C; ^1H RMN (DMSO-d_6) δ 2,76 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$, t); 3,07 (q, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 3,90 (s, 3H, OCH_3); 7,25 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H5'); 7,27 (NH_2 , s); 7,30 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,43 (t, 1H, H4''); 7,56 (m, 3H, H3'', H5'', H2'); 7,66 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H4''); 7,67 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3, H5); 7,74 (d, $J=16,0\text{Hz}$, 1H, H α); 7,86 (d, $J=16,0\text{Hz}$, 1H, H β); 8,14-8,15 (m, 3H, H2'', H6'', NH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 35,38 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 43,57 ($\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$); 56,93 (OCH_3); 113,18 (C5'); 121,14 (C1'); 126,08 (C2, C6); 127,34 (C α); 127,87 (C2'); 127,34 (C3, C5); 131,00 (C2'', C6''); 132,38 (C3'', C5''); 132,93 (C3'); 134,40 (C4'); 135,67 (C4''); 138,57 (C1''); 142,05 (C4); 143,95 (C1); 144,86 (C β); 158,46 (C6'); 189,00 (C=O). MS (ESI) m/z 523,1 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$. Rend. = 89%.



11 - Sólido branco, p.f. 164-165°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0,78 (CH₃); 0,99 (CH₃); 1,37, 1,50, 1,88, 1,92, 2,03, 2,31, 2,33 (7m, 7H, camphoryl); 2,85 (t, 2H, NH-CH₂-CH₂); 2,88, 3,26 (2m, 2H, CH₂SO₂); 3,26 (q, NH-CH₂-CH₂); 7,13 (1H, NH); 7,29 (NH₂, s); 7,44 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,75 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3, H5). ^{13}C RMN (CDCl₃) δ 19,83 (2C, CH₃); 24,86 (C3'); 26,71 (C2'); 35,94 (NH-CH₂-CH₂); 42,42 (C4', C5'); 44,11 (NH-CH₂-CH₂); 48,07 (C7'); 58,23 (C1', -CH₂SO₂); 126,11 (C3, C5); 129,72 (C2, C6); 142,62 (C4); 143,60 (C1); 215,10 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3397 (NH₂); 3233 (NH); 1348 (SO₂^{as}); 11572 (SO₂^{sym}); 1094; 904; 8657; 736 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 437,1 (M + Na)⁺. Rend. = 61%.

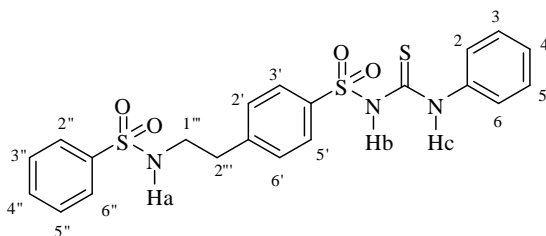


12 - Sólido amarelo claro, p.f. 136-137°C; ^1H RMN (CDCl₃) δ 2,77 (t, NH-CH₂-CH₂); 3,06 (q, NH-CH₂-CH₂); 7,16 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H4'); 7,29 (s, NH₂); 7,35 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 7,55 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H3'); 7,71 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3, H5); 7,90 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H2'); 7,92 (t, NH). ^{13}C RMN (CDCl₃) δ 40,14 (NH-CH₂-CH₂); 49,21 (NH-CH₂-CH₂); 131,10 (C2, C6); 133,16 (C3'); 134,63 (C3, C5); 137,90 (C5'); 146,55 (C4'); 147,61 (C4); 148,32 (C1). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3361 (NH₂); 3269 (NH); 1347 (SO₂^{as}); 1162 (SO₂^{sym}); 1018; 934; 817; 737 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 368,9 (M + Na)⁺. Rend. = 75%.

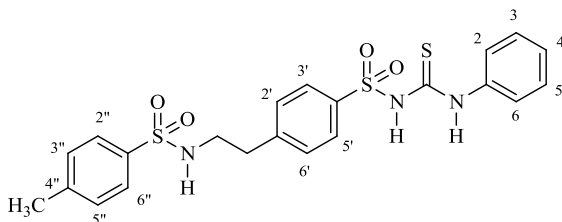
17.2.3. Síntese das sulfonil(tio)uréias (13-22)

As sulfonil(tio)uréias foram preparadas utilizando metodologia adaptada por Yuriev et al (2004) e Zhang et al (2009), em um balão de 250mL a 4-(2-(benzamido)etil)benzenossulfonamida (2mmol) é refluxada com solução de carbonato de potássio anidro (6mmol) em

acetona (25mL) por 2h. Depois é adicionado isotiocianato ou isocianato apropriado (1,6mmol) em acetona (4mL). A mistura resultante é refluxada por 16h. Foi adicionado gelo à mistura reacional e então foi acidificada com solução de ácido clorídrico 20%, obtendo-se um produto viscoso. Os sólidos foram obtidos por meio de adição de éter dietílico à essa mistura viscosa. Os compostos sólidos foram recristalizados com etanol, quando necessário [metodologia adaptada de Yuriev et al, (2004) e Zhang et al (2009)]. Todas as sulfonyl(tio)uréias são compostos inéditos e estão caracterizadas na sequência (vide espectros em Anexo 1).

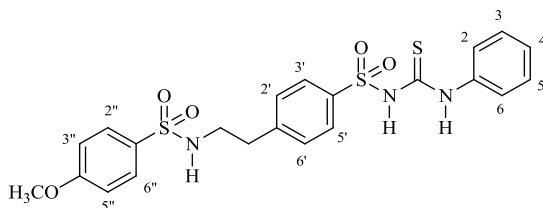


13 – Sólido bege, p.f. 220-223°C; ^1H RMNR (DMSO-*d*) δ 2,67 (NH-CH₂-CH₂, t); 2,94 (NH-CH₂-CH₂, q); 6,83 (t, 1H, NH_a); 7,15-7,11 (m, 4H, Ar-H); 7,77-7,55 (m, 10H, Ar-H); 8,94 (NH-tiourea). ^{13}C RMN (DMSO-*d*) δ 35,75 (NH-CH₂-CH₂); 44,46 (NH-CH₂-CH₂); 120,66 (C2, C6); 121,76 (C4); 127,14 (C2', C6'); 128,11 (C2'', C6''); 128,27 (C3, C5); 128,58 (C3'', C5''); 129,92 (C3', C5'); 133,06 (C4''); 141,01 (C1, C4'), 142,03 (C1''); 144,03 (C1''); 182,80 (C=S). IV (KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$) 3307 (NH); 1327 (SO₂^{as}); 1138 (SO₂^s); 1091 (C=S). Anal. Calcd para C₂₁H₂₁N₃O₄S₃: C 53,03; H 4,45; N 8,84; S 20,23. Exp.: C 52,89; H 4,21; N 8,36; S 19,85. Rend. = 52%.

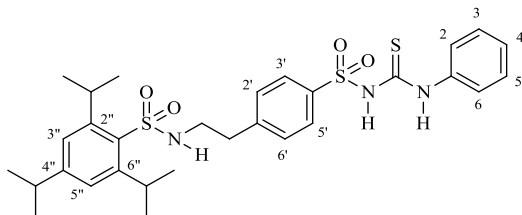


14 – Sólido branco, p.f. 225-227°C; ^1H RMN (DMSO-*d*) δ 2,37 (s, 3H, CH₃); 2,68 (NH-CH₂-CH₂, t); 2,95 (NH-CH₂-CH₂, q); 6,84 (t, 1H, NH_a); 7,12-7,15 (m, 4H, Ar-H); 7,37-7,39 (m, 2H, Ar-H); 7,69-7,62 (m, 7H,

Ar-H); 8,92 (NH-tiouréia). ^{13}C RMN (DMSO-*d*) δ 21,40 (CH_3); 35,45 (NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$); 44,22 (NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$); 120,40 (C6); 121,52 (C2); 126,98 (C2', C6'); 127,83 (C2'', C6''); 128,02 (C3', C5'); 128,35 (C3, C5); 130,10 (C3'', C5'', C4); 137,80 (C1''); 140,78 (C4''); 141,78 (C4'); 143,07 (C1); 143,81 (C1'); 182,59 (C=S). IV (KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$) 3308 (NH); 1313 (SO_2^{as}); 1138 (SO_2^{s}); 1091 (C=S). Anal. Calcd para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_3$: C 53,97; H 4,73; N 8,58; S 19,65. Exp.: C 54,01; H 4,77; N 8,25; S 19,09. Rend. = 59%.

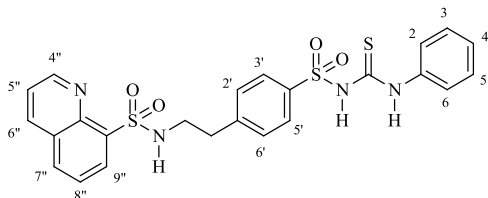


15 – Sólido bege claro, p.f. 146-147°C; ^1H RMN (DMSO-*d*) δ 2,67 (NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$, t); 2,90 (NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$, q); 3,80 (s, 3H, OCH_3); 6,83 (t, 1H, H4); 7,08 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H3'', H5''); 7,13 (m, 4H, H2', H6', H3, H5); 7,57 (t, 1H, NH_a); 7,63 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H2'', H6''); 7,67 (m, 4H, H2, H6, H3', H5'), 8,93 (NH-tiouréia). ^{13}C RMN (DMSO-*d*) δ 35,42 (NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$); 44,22 (NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$); 56,04 (OCH_3); 114,78 (C3'', C5''); 120,55 (C6); 123,69 (C1''); 126,09 (C4); 127,85 (C2', C6'); 128,05 (C2'', C6''); 128,37 (C3, C5); 129,12 (C3', C5', C1); 129,24 (C2); 129,65 (C4'); 132,30 (C1'); 162,51 (C4''); 184,05 (C=S). IV (KBr) ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$) 3283 (NH); 1314 (SO_2^{as}); 1154 (SO_2^{s}); 1088 (C=S). Anal. Calcd para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_3$: C 52,56, H 4,58; N 8,31; S 19,02. Exp.: C 52,16, H 4,29; N 8,02; S 19,44. Rend. = 71%.

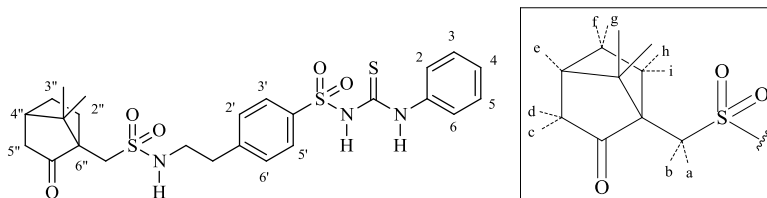


16 – Sólido branco, p.f. 155-157°C; ^1H RMN (DMSO-*d*) δ 1,13 (s, 3H, CH_3); 1,14 (s, 6H, CH_3); 1,16 (s, 3H, CH_3); 1,17 (s, 3H, CH_3); 1,19 (s, 3H, CH_3); 2,81 (t, 2H, NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$); 2,90-2,85 (m, 1H, CH); 3,07 (NH- $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2}$, q); 4,06-4,12 (m, 2H, CH); 7,10-7,81 (m, 12H, Ar-H),

NH_a); 10,08 (NH-tiouréia). ¹³C RMN (DMSO-*d*) δ 23,89 (2C, CH₃); 25,16 (4C, CH₃); 29,22 (2C, CH); 33,75 (1C, CH); 35,48 (NH-CH₂-CH₂); 43,18 (NH-CH₂-CH₂); 123,60 (C5''); 123,99 (C3''); 126,10 (C2', C6'); 128,19 (C5); 128,87 (C3); 128,93 (C6); 129,27 (C2); 129,50 (C3', C5'); 129,67 (C4); 133,60 (C1''); 137,91 (C1); 142,58 (C4'); 143,37 (C1'); 150,06 (C2'', C6''); 152,45 (C4''); 181,46 (C=S). IV (KBr) (ν_{max}/cm⁻¹) 3254 (NH); 1390 (SO₂^{as}); 1140 (SO₂^s); 1085 (C=S). Anal. Calcd para C₃₀H₃₉N₃O₄S₃: C 59,87; H 6,53; N 6,98; S 15,98. Exp.: C 60,04; H 6,74; N 7,01; S 15,50. Rend. = 53%.

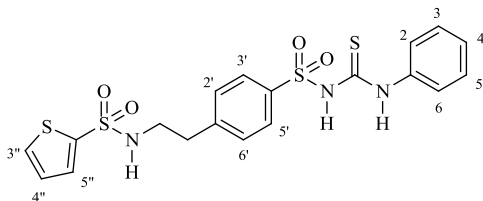


17 – Sólido bege, m.p. 200-202°C; ¹H RMN (DMSO-*d*) δ 2,66 (NH-CH₂-CH₂, t); 3,04 (NH-CH₂-CH₂, q); 6,85 (t, 1H, H₄); 6,98 (d, *J*=8,0Hz, 2H, H₃, H₅); 7,15-8,98 (m, 10H, Ar-H); 7,15 (m, 1H, NH); 7,57 (d, *J*=8,0Hz, 2H, H₂, H₆); 8,89 (NH-tiouréia). ¹³C NMR (DMSO-*d*) δ 35,25 (NH-CH₂-CH₂); 44,69 (NH-CH₂-CH₂); 120,59-151,96 (21C, Ar-C); 182,66 (C=S). IV (KBr) (ν_{max}/cm⁻¹) 3289 (NH); 1387 (SO₂^{as}); 1129 (SO₂^s); 1082 (C=S). Anal. Calcd para C₂₄H₂₂N₄O₄S₃: C 54,73; H 4,21; N 10,64; S 18,27. Exp.: C 54,44; H 4,50; N 10,22; S 18,72. Rend. = 41%.

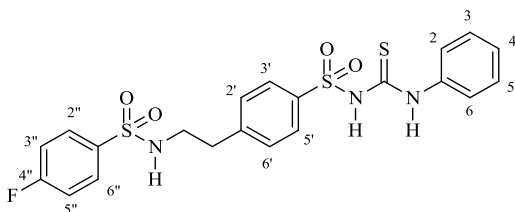


18 – Sólido amarelo claro, p.f. 146-147°C; ¹H RMN (DMSO-*d*) δ 0,77 (s, 3H, CH₃); 0,99 (s, 3H, CH₃); 1,37 (m, 1H, H_f); 1,50 (m, 1H, H_g); 1,87 (m, H_i); 1,92 (m, H_h); 2,02 (t, H_e); 2,30 (m, H_c, H_d); 2,85 (t, 2H, NH-CH₂-CH₂); 2,88 (d, 1H, H_b); 3,25 (NH-CH₂-CH₂, q); 3,29 (d, 1H, H_a); 6,88-7,87 (m, 10H, Ar-H, NH_a); 10,11 (NH-tiouréia). ¹³C RMN (DMSO-*d*) δ 19,74 (2C, CH₃); 24,83 (C3''); 26,70 (C2''); 35,90 (NH-

CH₂-CH₂); 42,39 (C4'', C5''); 44,13 (NH-CH₂-CH₂); 48,07 (C7''); 58,21 (C1'', -CH₂SO₂); 117,24 (C2); 123,69 (C6); 126,10 (C2', C6'); 128,19 (C4); 128,92 (C3); 129,33 (C5); 129,58 (C1); 129,74 (C3', C5'); 142,58 (C4'); 143,61 (C1'); 181,56 (C=S); 215,16 (C=O). IV (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3294 (NH); 1381 (SO₂^{as}); 1134 (SO₂^s); 1087 (C=S). Anal. Calcd para C₂₅H₃₁N₃O₅S₃: C 54,62; H 5,68; N 7,64; S 17,50. Exp.: C 55,00, H 5,88; N 7,67; S 17,69. Rend. = 68%.

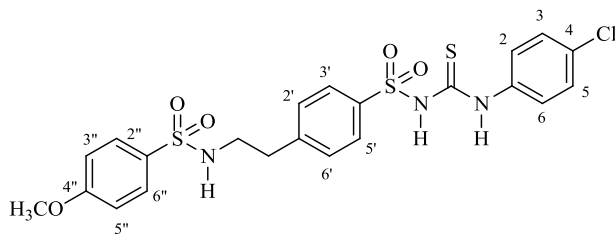


19 - Sólido bege, p.f. 220-222°C; ¹H RMN (DMSO-*d*) δ 2,72 (NH-CH₂-CH₂, t); 3,05 (NH-CH₂-CH₂, q); 6,84 (t, 1H, H4); 7,13-7,18 (m, 5H, H3, H5, H2', H6', NH_a); 7,56 (dd, 1H, H5''); 7,65 (d, *J*=8,0Hz, 2H, H2, H6); 7,68 (d, *J*=8,0Hz, 2H, H3', H5'); 7,89 (dd, 1H, H3''); 8,94 (NH-tiouréia). ¹³C RMN (DMSO-*d*) δ 35,30 (NH-CH₂-CH₂); 44,44 (NH-CH₂-CH₂); 120,50 (C3''); 121,68 (C1''); 127,80 (C2, C6); 128,11 (C2', C6'); 128,20 (C5''); 128,38 (C3', C5', C4); 132,03 (C3); 132,93 (C5); 140,83 (C4''); 141,59 (C4'); 141,76 (C1); 143,82 (C1'); 180,14 (C=S). IV (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3264 (NH); 1318 (SO₂^{as}); 1155 (SO₂^s); 1084 (C=S). Anal. Calcd para C₁₉H₁₉N₃O₄S₄: C 47,38; H 3,98; N 8,72; S 26,63. Exp.: C 47,66; H 3,62; N 8,66; S 26,25. Rend. = 72%.

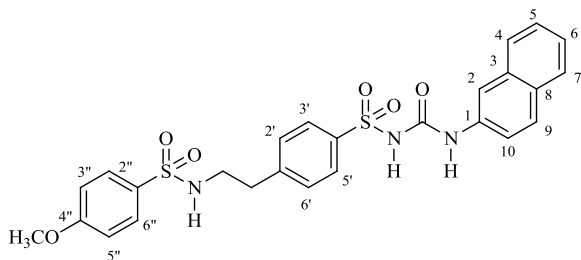


20 - Sólido marrom claro, p.f. 120-122°C; ¹H RMN (DMSO-*d*) δ 2,79 (NH-CH₂-CH₂, t); 3,02 (NH-CH₂-CH₂, q); 7,17 (t, 1H, H4); 7,31-7,85 (m, 14H, Ar-H, NH_a); 10,19 (NH-tiourea). ¹³C RMN (DMSO-*d*) δ 35,28 (NH-CH₂-CH₂); 43,97 (NH-CH₂-CH₂); 116,69 (C5''); 116,91 (C3''); 117,24 (C4); 123,69 (C6); 124,05 (C2); 126,08 (C2', C6'); 128,16 (C2''); 128,90 (C6''); 129,31 (C5); 129,57 (C3); 129,6 (C3', C5');

129,87 (C4'); 129,97 (C1); 142,58 (C1''); 143,32 (C1'); 163,27 (C4''); 181,02 (C=S). IV (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3288 (NH); 1331 (SO₂^{AS}); 1152 (SO₂^S); 1087 (C=S). Anal. Calcd para C₂₁H₂₀FN₃O₄S₃: C 51,10; H 4,08; N 8,51; S 19,49. Exp.: C 51,10; H 4,20; N 8,21; S 19,22. Rend. = 43%.



21 - Sólido amarelo claro, p.f. 152-153°C; ¹H RMN (DMSO-*d*) δ 2,78 (NH-CH₂-CH₂, t); 2,97 (NH-CH₂-CH₂, q); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 7,09 (d, *J*=8,0Hz, 2H, H₂, H₆); 7,41-7,30 (m, 4H, H₃'', H₅'', H₃, H₅); 7,48 (d, *J*=12,0Hz, 2H, H₂', H₆')'; 7,59 (m, 1H, NH_a); 7,70 (d, *J*=8,0Hz, 2H, H₂'', H₆''); 7,84 (d, *J*=8,0Hz, 2H, H₃', H₅')'; 10,18 (NH-tiourea). ¹³C RMN (DMSO-*d*) δ 35,26 (NH-CH₂-CH₂); 44,01 (NH-CH₂-CH₂); 56,04 (OCH₃); 114,77 (C₃'', C₅''); 117,00 (C₆''); 125,65 (C₂''); 126,09 (C₂', C₆')'; 128,18 (C₃); 128,83 (C₅')'; 129,11 (C₃', C₅', C₁); 129,65 (C₄); 129,65 (C₂, C₆); 132,27 (C₁''); 142,55 (C₄')'; 143,46 (C₁')'; 162,54 (C₄''); 180,25 (C=S). IV (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$) 3272 (NH); 1329 (SO₂^{AS}); 1149 (SO₂^S); 1085 (C=S). Anal. Calcd para C₂₂H₂₂ClN₃O₅S₃: C 48,93; H 4,11; N 7,78; S 17,81. Exp: C 48,87, H 4,15; N 7,70; S 17,44. Rend. = 79%.



22 - Sólido branco, p.f. 161-162°C; ¹H RMN (DMSO-*d*) δ 2,75 (NH-CH₂-CH₂, t); 2,95 (NH-CH₂-CH₂, q); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 7,10 (d, *J*=8,0 Hz, 2H, H₃'', H₅''); 7,19 (t, 1H, H₆); 7,40-7,30 (m, 4H, H₅, H₁₀, H₂', H₆')'; 7,74-7,50 (m, 6H, H₄, H₇, H₉, H₃', H₅', NH); 7,89 (d, *J*=8,0 Hz, 2H, H₂'', H₆''); 8,06 (d, 8,0 Hz, 1H, H₂); 8,82 (NH-urea). ¹³C RMN (DMSO-*d*) δ 35,26 (NH-CH₂-CH₂); 44,02 (NH-CH₂-CH₂); 56,05

(OCH₃); 107,85 (C2); 114,77 (C3'', C5''); 115,81 (C4); 122,74-129,65 (12C, Ar-C); 132,27 (C1''); 134,60 (C1); 142,56 (C4'); 143,47 (C1'); 145,09 (C=O); 162,54 (C4''). IV (KBr) (v_{\max}/cm^{-1}) 3305 (NH); 1316 (SO₂^{as}); 1155 (SO₂^s); 1670 (C=O). Anal. Calcd para C₂₆H₂₅N₃O₆S₂. C 57,87; H 4,67; N 7,79; S 11,88. Exp: C 58,04; H 4,57; N 7,77; S 10,98. Rend. = 77%.

17.3. ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICÊMICA E DIABETES

Os estudos da bioatividade dos compostos, em modelo experimental hiperglicêmico *in vivo*, foram realizados no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo grupo de pesquisas coordenado pela Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva.

a) *Animais.*

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos entre 50–54 dias de idade (180-250g), mantidos em gaiolas plásticas com alimento e água à vontade, até o início dos tratamentos. A temperatura da sala é mantida entre 21 ± 2 °C e com ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro. Animais descritos como jejum foram privados de comida por 16 horas, mas com acesso livre à água. Os animais foram mantidos em concordância com as recomendações do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Protocolo PP 0001/CEUA, parecer favorável número 23080.008941/2005-67/UFSC, aprovado na reunião de 06/05/2005/CEUA.

b) *Obtenção das curvas de tolerância à glicose por administração dos compostos via oral e tratamento com insulina via intraperitoneal em animais normais hiperglicêmicos.*

Ratos em jejum foram divididos em grupos de cinco animais cada:

- *Grupo I*, controle, não tratado (normoglicêmico);
- *Grupo II*, hiperglicêmico, recebeu somente glicose (4g/kg de peso corporal);
- *Grupo III*, tratado, recebeu glicose (4g/kg de peso corporal) juntamente com dose de 10 mg/kg de peso corporal dos compostos testados (utilizando óleo de milho como veículo);

- *Grupo IV*, recebeu glicose (4g/kg de peso corporal) e 100 mg/kg de peso corporal de glibenclamida;
- *Grupo V*, recebeu glicose (4g/kg de peso corporal) e insulina lispro 0,05 UI (Humalog®, laboratório Eli Lilly), ou insulina regular 0,5 UI (Biohulin®, laboratório Biobrás).

c) Coleta de sangue e determinação da glicemia.

Todos os animais foram previamente anestesiados em câmara de éter antes da coleta de sangue, realizada nos tempos conforme demonstrado nas respectivas figuras (15, 30, 60, 120 e 180 minutos). O sangue foi coletado por capilaridade pelo plexo retro-orbital em tubos de eppendorf, que foram centrifugados, separando o soro. Alíquotas de 10 µl do soro (em duplicata) foram utilizadas para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (utilizando kit GLICOSE PP da Gold Analisa Diagnóstica LTDA.). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente (25 °C) e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro GBC Scientific Equipment Pty LTDA, em 500 nm. Os resultados são expressos em mg/dL de glicose. Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e as carcaças mantidas em refrigerador até descarte no lixo hospitalar.

d) Determinação da insulina sérica.

Os níveis de insulina séricos dos ratos hiperglicêmicos tratados foram determinados por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), de acordo com as instruções do fabricante. O intervalo de valores detectados pelo ensaio foi de 0,2-10 ng/mL. Os coeficientes de variação intra- e inter- ensaio para a insulina foram, respectivamente, 3,22 e 6,95, com sensibilidade de 0,2 ng/mL. Todos os níveis de insulina foram estimados por médias de leituras colorimétricas a 450 nm em um leitor de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) por interpolação da curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados expressos em ng de insulina sérica/mL.

e) Avaliação do efeito dos compostos nos níveis séricos de glicose de ratos diabéticos.

O diabetes foi induzido através de uma única injeção intravenosa de monohidrato de aloxano 5% em solução fisiológica, na dose de 48 mg/kg de peso corporal, em animais sob anestesia etérea. Três dias após, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos ratos, e os níveis de

glicose foram determinados com auxílio de glicosímetro, para confirmar o desenvolvimento do diabetes. Foram considerados diabéticos animais que apresentavam glicemia entre 350-450 mg/dL.

Ratos em jejum receberam a dose de 10 mg/kg de peso corporal dos compostos diluídos em óleo de milho. Foram coletadas amostras de sangue para a determinação da glicemia nos tempos zero, 1, 2 e 3 horas após o tratamento.

f) Análise estatística.

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média). As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT versão 3.0. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05. Para a análise comparativa entre dois grupos foi utilizado o teste “t” de Student.

17.4. SÍNTESES – CAPÍTULO 2 (acil-hidrazonas, oxadiazóis, tiazolidinonas, imidas)

17.4.1. Sínteses do reagente

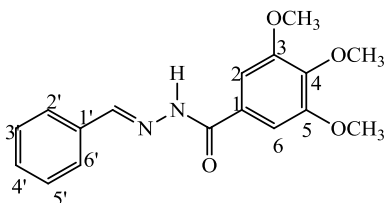
Procedimento geral para a síntese e purificação da 3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (Chida et al, 2001):

Obtenção do éster: A 3,4,5-trimetoxibenzohidrazida foi obtida a partir da mistura de ácido gálico (6 mmol), dimetil sulfato (28 mmol), K₂CO₃ (26 mmol) e iodeto de tetrabutilamônio (TBAI) (0,1 g) em acetona (30 mL). A mistura foi submetida a refluxo durante 12 h, após, o precipitado foi filtrado e lavado com acetona (3x50mL). O éster foi obtido em forma de sólido amorfo de cor creme, com rendimento de 78%; p.f.: 84 °C (lit. p.f.: 82-83 °C, Sugihara *et al.*, 1972). *RMN*¹*H* (CDCl₃): 1,60 (s, 3H, CH₃), 3,92 (s, 9H, OCH₃), 7,33 (s, 2H, Ar).

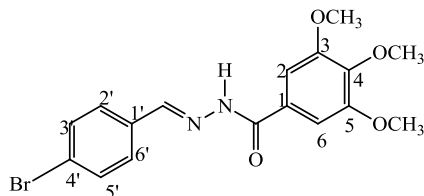
Obtenção da hidrazida: O éster obtido (6 mmol) foi tratado com uma solução de hidrazina hidratada 99% (N₂H₄.H₂O) (4,4 mmol) em metanol (20 mL) e refluxada durante 5 h, e depois mantida à temperatura ambiente *overnight*. O sólido obtido foi filtrado e recristalizado em metanol para se obter o 3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na forma de cristais brancos, com rendimento de 80%; p.f.: 162-163 °C (lit. p.f.: 168 °C, Wang *et al.*, 1999). *RMN*¹*H* (CDCl₃): 3,80 (s, 3H, OCH₃), 3,90 (s, 6H, OCH₃), 7,18 (s, 2H, Ar), 9,55 (NH).

17.4.2. Síntese e purificação das acil-hidrazonas (23-65, 78-80)

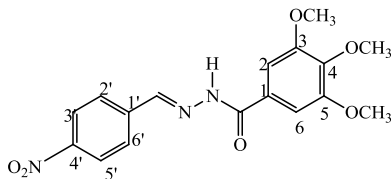
As acil-hidrazonas foram sintetizados a partir da 3,4,5-trimetoxibenzohidrazida ou da hidrazida não-substituída (2 mmol) e o aldeído apropriado (2 mmol) em metanol (15 mL) e refluxada durante 2 h. Após o resfriamento, o produto bruto foi filtrado, lavado e recristalizado em etanol gerando o produto puro de cor branca (Troeberg et al, 2006). Dezoito hidrazonas são compostos inéditos: **26**, **27**, **28**, **37**, **39**, **42-47**, **49**, **51**, **59**, **62**, **63**, **64** e **65** e foram completamente caracterizadas e seus espectros de ^1H e ^{13}C RMN estão no anexo 1. O composto **41** teve sua estrutura cristalografica resolvida e é apresentado na sequência. As hidrazonas não-inéditas foram aqui caracterizadas por ponto de fusão (não divergindo de 2°C do publicado na literatura) e ^1H RMN.



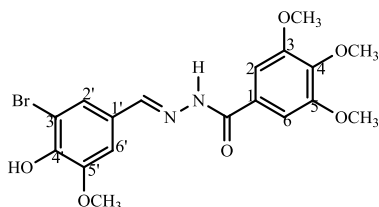
23 - Sólido branco, p.f. 140-141 $^\circ\text{C}$. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,74 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,87 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,25 (s, 2H, H₂, H₆); 7,47 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H_{2'}, H_{6'}); 7,75 (m, 3H, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}); 8,48 (s, 1H, -N=CH); 11,72 (s, 1H, -CONH). Rend.: 91%.



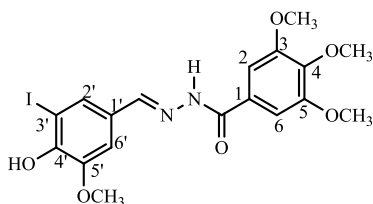
24 - Sólido branco, p.f. 208-209 $^\circ\text{C}$. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,72 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,22 (s, 2H, H₂, H₆); 7,67 (m, 4H, H_{2'}, H_{3'}, H_{5'}, H_{6'}); 8,43 (s, 1H, -N=CH); 11,77 (s, 1H, -CONH). Rend.: 82%.



25 - Sólido branco, p.f. 213-214 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,72 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,86 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,24 (s, 2H, H₂, H₆); 8,00 (m, 2H, H_{3'}, H_{5'}); 8,30 (d, *J*=8,0Hz, H_{2'}, H_{6'}); 8,55 (s, 1H, -N=CH); 12,00 (s, 1H, -CONH). Rend.: 75%.

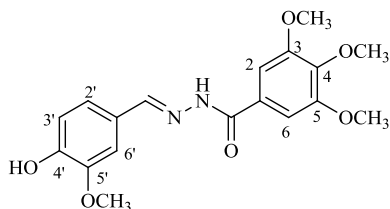


26 - Sólido branco, p.f. 244-250 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,73 (s, 3H, *m*-OCH₃); 3,87 (s, 6H, *m*-OCH₃); 3,90 (s, 3H, *p*-OCH₃); 7,22 (s, 2H, H₂, H₆); 7,33 (s, 1H, H_{2'}); 7,43 (s, 1H, H_{6'}); 8,33 (s, 1H, -N=CH); 10,03 (br, 1H, OH); 11,68 (s, 1H, -CONH); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,78 (2C, OCH₃); 60,81 (2C, OCH₃); 105,85 (C₂, C₆); 108,88 (C_{6'}); 110,03 (C_{3'}); 125,05 (C₁); 127,30 (C_{2'}); 129,29 (C_{1'}); 141,04 (C₄); 146,49 (-N=CH); 147,46 (C_{4'}); 149,32 (C_{5'}); 153,37 (C₃, C₅); 163,16 (-CONH); IV (KBr) (ν_{max} /cm⁻¹) 3364 (N-H), 1646, 1251 (C=O), 1569 (C=N), 1309, 1027 (C-O), 2985, 1505, 1426, 1296, 1143, 1002 (Ar). Anal. Calcd para C₁₈H₁₉BrN₂O₆: C 49,22; H 4,36; N 6,38. Exp.: C 49,14; H 4,99; N 6,08. Rend.: 72%.

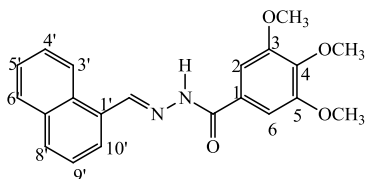


27 - Sólido branco, p.f. 247-248 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 3,86 (s, 3H, *m*-OCH₃); 7,20 (s, 2H, H₂, H₆); 7,32 (s, 1H, H_{6'}); 7,59 (s, 1H, H_{2'}); 8,29 (s, 1H, HC=N); 10,07 (1H, OH); 11,65 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,78 (*m*-OCH₃); 60,81 (*p*-OCH₃); 85,17 (C_{3'}); 105,84 (C₂, C₆); 109,72 (C_{6'});

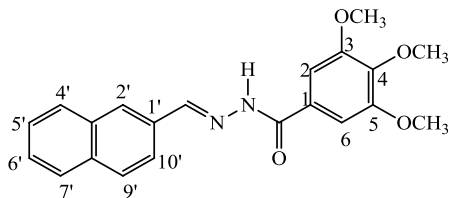
128,28 (C1); 129,31 (C1'); 130,75 (C2'); 141,03 (C4); 147,35 (C=N); 147,97 (C5'); 149,00 (C4'); 153,36 (C3, C5); 163,16 (C=O). IV (KBr) $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3382 (N-H), 1636, 1228 (C=O), 1565 (C=N), 1290, 1045 (C-O), 2999, 2839, 1585, 1490, 1334, 1137, 997 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6$: C 44,46; H 3,94; N 5,76. Exp.: C 44,64; H 3,99; N 5,88. Rend.: 69%.



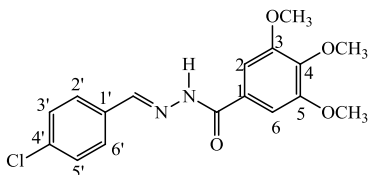
28 - Sólido branco, p.f. 198°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,73 (s, 3H, *m*-OCH₃); 3,84 (s, 6H, *m*-OCH₃); 3,86 (s, 3H, *p*-OCH₃); 6,85 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H3'); 7,09 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H2'); 7,22 (s, 2H, H2, H6); 7,32 (s, 1H, H6'); 8,35 (s, 1H, -N=CH); 9,57 (br, 1H, OH); 11,53 (s, 1H, -CONH); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,25 (1C, OCH₃); 56,77 (2C, OCH₃); 60,81 (1C, OCH₃); 105,78 (C2, C6); 109,64 (C6'); 116,15 (C3'); 122,83 (C2'); 126,36 (C1'); 129,45 (C1); 140,96 (C4); 148,74 (-N=CH); 149,08 (C4'); 149,73 (C5'); 153,37 (C3, C5); 162,99 (-CONH); IV (KBr) $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3418 (N-H), 1664, 1230 (C=O), 1584 (C=N), 1338, 1030 (C-O), 3265, 2885, 1612, 1495, 1411, 1097 (Ar). Anal. Calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$: C 59,99; H 5,59; N 7,77. Exp.: C 59,84; H 5,88; N 7,58. Rend.: 72%.



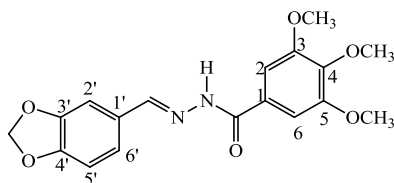
29 - Sólido branco, p.f. 229-230 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,73 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,87 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,28 (s, 2H, H2, H6); 7,58-7,68 (m, 3H, H4', H5', H9'); 7,93 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, H3'); 8,00-8,04 (m, 2H, H8', H10'); 8,88 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, H6'); 9,09 (s, 1H, -N=CH); 11,82 (s, 1H, -CONH).. Rend.: 82%.



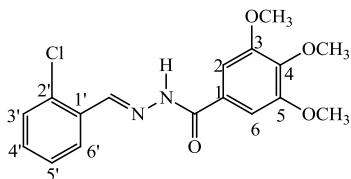
30 - Sólido branco, p.f. 231-232 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,72 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,86 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,25 (s, 2H, H₂, H₆); 7,54-7,57 (m, 2H, H_{9'}, H_{10'}); 7,93-8,01 (m, 4H, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'}, H_{7'}); 8,14 (s, 1H, H_{2'}); 8,60 (s, 1H, -N=CH); 11,81 (s, 1H, -CONH). Rend.: 89%.



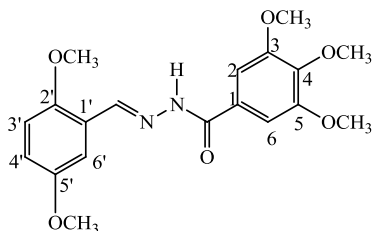
31 - Sólido branco, p.f. 190-192 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,72 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,22 (s, 2H, H₂, H₆); 7,52 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H_{3'}, H_{5'}); 7,75 d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H_{2'}, H_{6'}); 8,45 (s, 1H, -N=CH); 11,17 (s, 1H, -CONH). Rend.: 91%.



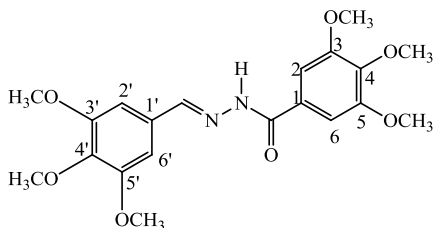
32 - Sólido branco, p.f. 212-214 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,84 (s, 6H, *m*-OCH₃); 6,08 (s, 2H, CH₂); 6,99 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H_{5'}); 7,17 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H_{6'}); 7,21 (s, 2H, H₂, H₆); 7,29 (s, 1H, H_{2'}); 8,36 (s, 1H, -N=CH); 11,60 (s, 1H, -CONH). Rend.: 95%.



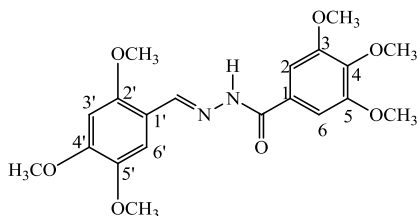
33 - Sólido branco, p.f. 213-214 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,72 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,86 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,24 (s, 2H, H₂, H₆); 7,44 (m, 2H, H_{5'}, H_{4'}); 7,53 (m, 1H, H_{3'}); 8,03 (m, 1H, H_{6'}); 8,84 (s, 1H, -N=CH); 11,95 (s, 1H, -CONH). Rend.: 83%.



34 - Sólido branco, p.f. 209-210 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,75 (s, 3H, *m*-OCH₃); 3,81 (s, 3H, *o*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,00-7,07 (m, 2H, H_{3'}, H_{4'}); 7,24 (s, 2H, H₂, H₆); 7,37 (m, 1H, H_{6'}); 8,78 (s, 1H, -N=CH); 11,71 (s, 1H, -CONH). Rend.: 84%.

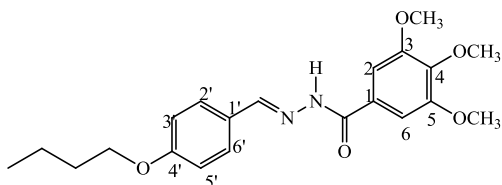


35 - Sólido branco, p.f. 240-241 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,70 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,71 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,83 (s, 6H, *m*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,02 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}); 7,20 (s, 2H, H₂, H₆); 8,39 (s, 1H, -N=CH); 11,68 (s, 1H, -CONH). Rend.: 75%.

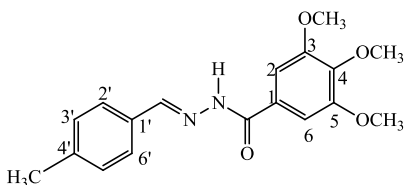


36 - Sólido branco, p.f. 222-223 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,74 (s, 6H, *p*-OCH₃); 3,78 (s, 3H, *o*-OCH₃); 3,88 (s, 9H, *m*-OCH₃); 6,78 (s, 1H,

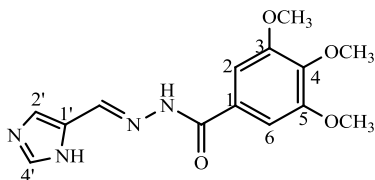
H3'); 7,26 (s, 2H, H2, H6); 7,40 (s, 1H, H6'); 8,76 (s, 1H, -N=CH); 11,60 (s, 1H, -CONH). Rend.: 79%.



37 - Sólido branco, p.f. 119°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 0,93 (t, 3H, CH_3); 1,44 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 1,70 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 3,71 (s, 3H, OCH_3); 3,85 (s, 6H, OCH_3); 4,01 (t, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); 7,01 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H3', H5'); 7,21 (s, 2H, H2, H6); 7,66 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H2', H6'); 8,38 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}$). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 14,38 (CH_3); 19,41 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 31,36 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 56,78 (*m*- OCH_3); 60,83 (*p*- OCH_3); 68,02 ($-\text{O}-\text{CH}_2-$); 105,80 (C2, C6); 115,50 (C3', C5'); 127,37 (C1'); 129,35 (C1); 129,40 (C2', C6'); 148,41 ($-\text{N}=\text{CH}$); 153,37 (C3, C5); 161,03 (C4'); 163,07 (C=O); IV (KBr) $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3236 (N-H), 1652, 1237 (C=O), 1577 (C=N), 1330, 1027 (C-O), 2961, 2875, 1509, 1413, 1237, 1123, 998, 848 (Ar). Anal. Calcd para $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$: C 65,27; H 6,78; N 7,25. Exp.: C 65,14; H 6,81; N 7,38. Rend.: 61%.

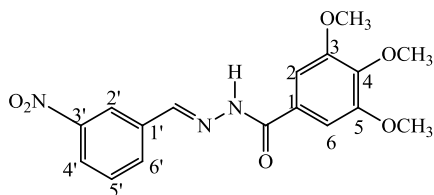


38 - Sólido branco, p.f. 187-188 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 2,37 (s, 3H, CH_3); 3,74 (s, 3H, *p*- OCH_3); 3,88 (s, 6H, *p*- OCH_3); 7,25 (s, 2H, H2, H6); 7,30 (d, $J=8,0$ Hz, H3', H5'); 7,65 (d, $J=8,0$ Hz, H2', H6'); 8,44 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}$); 11,68 (s, 1H, -CONH). Rend.: 79%.

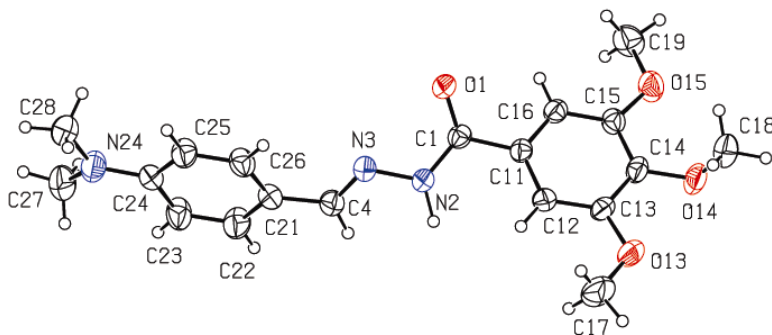


39 - Sólido branco, p.f. 230-231 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,74 (s, 3H, *p*- OCH_3); 3,88 (s, 6H, *m*- OCH_3); 7,23 (s, 2H, H2, H6); 7,53 (s, 1H,

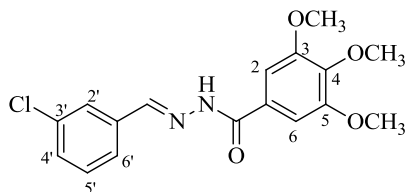
H2'); 7,66 (m, 1H, H4'); 8,02 (s, 1H, NH-imidazoil); 8,43 (s, 1H, HC=N); 11,37 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,60 (*m*-OCH $_3$); 60,81 (*p*-OCH $_3$); 104,92 (C2, C6); 129,51 (C1); 131,94 (C1'); 132,16 (C2'); 135,37 (C4'); 140,93 (C4); 145,42 (C=N); 153,35 (C3, C5); 162,26 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3212 (N-H), 1623, 1234 (C=O), 1580 (C=N), 1280, 1054 (C-O), 2994, 2941, 2838, 1503, 1456, 1411, 1344, 1125, 1006, 844 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C $_{14}$ H $_{16}$ N $_4$ O $_4$: C 55,26; H 5,33; N 18,41. Exp.: C 55,35; H 5,53; N 18,23. Rend.: 75%.



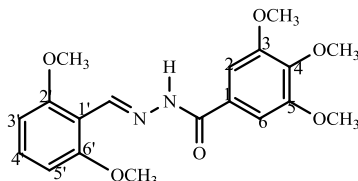
40 - Sólido branco, p.f. 241-242 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,75 (s, 3H, *p*-OCH $_3$); 3,89 (s, 6H, *m*-OCH $_3$); 7,27 (s, 2H, H2, H6); 7,79 (t, 1H, H5'); 8,19 (d, J=8,0Hz, 1H, H4'); 8,30 (d, J=8,0Hz, 1H, H6'); 8,59 (s, 1H, H2'); 8,60 (s, 1H, -N=CH); 12,01 (s, 1H, -CONH). Rend.: 68%.



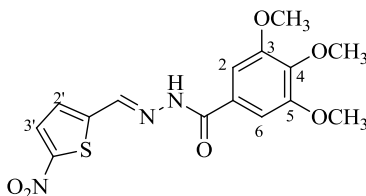
41 - Sólido branco, p.f. 218-219 °C. Rend.: 65%.



42 - Sólido branco, p.f. 184-186°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, *m*-OCH₃); 3,85 (s, *p*-OCH₃); 7,22 (s, 2H, H₂, H₆); 7,49 (dd, 2H, H₄['], H₆[']); 7,68 (m, 1H, H₅[']); 7,77 (s, 1H, H₂[']); 8,43 (s, 1H, HC=N); 11,84 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,16 (*m*-OCH₃); 60,78 (*p*-OCH₃); 106,74 (C₂, C₆); 127,34 (C₂['], C₆[']); 128,59 (C₁); 130,87 (C₅[']); 132,79 (C₄[']); 134,75 (C₃[']); 135,88 (C₁[']); 142,05 (C₄); 146,42 (C=N); 153,61 (C₃, C₅); 163,35 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3207 (N-H), 1632 (C=O), 1579 (C=N), 1230 (C-O), 1441, 1373, 1062, 905, 857, 801, 709 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 371,08 (M + Na)⁺. Rend.: 83%.

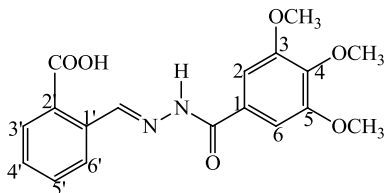


43 - Sólido branco, p.f. 245-246 °C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,79 (s, 6H, *o*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 6,72 (d, $J=8,0$ Hz, 2H, H₃['], H₅[']); 7,23 (s, 2H, H₂, H₆); 7,34 (t, $J=8,0$ Hz, 1H, H₄[']); 8,60 (s, 1H, HC=N); 11,52 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,72 (*m*-OCH₃); 56,78 (*o*-OCH₃); 60,76 (*p*-OCH₃); 105,10 (C₃['], C₅[']); 105,80 (C₂, C₆); 111,75 (C₁[']); 129,37 (C₁); 131,87 (C₄[']); 140,88 (C₄); 143,92 (C=N); 153,31 (C₃, C₅); 159,38 (C₂['], C₆[']); 162,81 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3186 (N-H), 1644, 1240 (C=O), 1586 (C=N), 1258, 1068 (C-O), 3002, 2928, 2838, 1502, 1473, 1417, 1378, 1342, 1121, 1007, 783 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₉H₂₂N₂O₆: C 60,95; H 5,92; N 7,48. Exp.: C 60,56, H 6,10, N 7,55. Rend.: 93%.

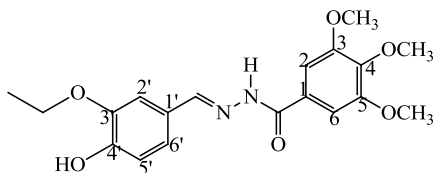


44 - Sólido dourado, p.f. 220-222°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,73 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,22 (s, 2H, H₂, H₆); 7,58 (d, 1H, $J=4,0$ Hz, H₂[']); 8,13 (d, 1H, $J=4,0$ Hz, H₃[']); 8,72 (s, 1H, C=N-H); 12,08 (s, 1H, N-H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,53 (*m*-OCH₃); 60,62 (*p*-OCH₃); 105,74 (C₂['], C₆[']); 128,37 (C₄); 130,10 (C₁[']); 131,01 (C₅); 141,62 (C₄[']); 147,14 (C₃, C₃['], C₅[']); 151,27 (C₁); 153,19 (C=N);

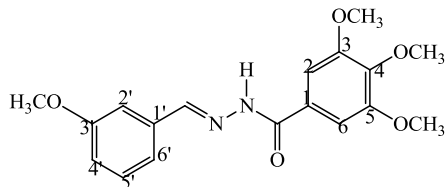
163,31 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3215 (N-H), 1651 (C=O), 1581 (C=N), 1237, 1036 (C-O), 1526, 1329, 851 (NO₂), 2945, 2842, 1505, 1439, 1412, 1361, 1185, 1128, 995, 821, 732 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₅H₁₅N₃O₆S: C 49,31; H 4,14; N 11,50. Exp.: C 49,05; H 4,22; N 11,89. Rend.: 50%.



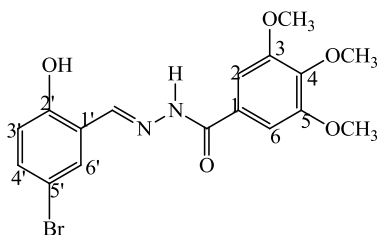
45 - Sólido branco, p.f. 183-184°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3,72 (s, *m*-OCH₃); 3,85 (s, *p*-OCH₃); 7,24 (s, 2H, H₂, H₆); 7,52 (t, 1H, *J*=7,4 Hz, H₅'); 7,64 (t, 1H, *J*=7,8 Hz, H₄''); 7,89-7,90 (d, *J*=7,4 Hz, H₆''); 8,05-8,07 (d, 1H, *J*=7,8 Hz, H₃''); 9,17 (s, 1H, HC=N); 11,93 (s, 1H, NH). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 56,16 (*m*-OCH₃); 60,42 (*p*-OCH₃); 106,03 (C₂, C₆); 127,67 (C₃'); 128,53 (C₁); 129,97 (C₆''); 131,11 (C₄''); 132,93 (C₂''); 134,20 (C₅''); 136,82 (C₁''); 142,39 (C₄); 143,95 (C=N); 153,92 (C₃, C₅); 163,75 (C=O); 167,92 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3439 (OH), 3217 (N-H), 1635 (C=O), 1730 (C=O), 1585 (C=N), 1234 (C-O), 1440, 1377, 1061, 902, 857, 806, 701 (Ar) (KBr). MS (ESI) *m/z* 381,11 (M + Na)⁺. Rend.: 70%.



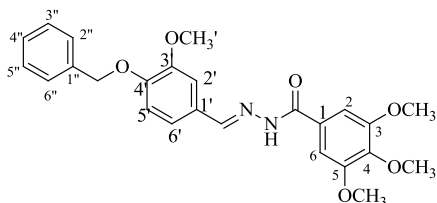
46 - Sólido branco, p.f. 194-195°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 1,35 (t, 3H, CH₃); 3,70 (s, 3H, OCH₃); 3,84 (s, 6H, OCH₃); 4,05 (m, 2H, CH₂); 6,84 (d, *J*=8,0Hz, 1H, H₆''); 7,08 (d, *J*=8,0Hz, 1H, H₅''); 7,20 (s, 2H, H₂, H₆); 7,28 (s, 2H, H₂''); 8,32 (s, 1H, HC=N); 9,48 (BR, 1H, OH); 11,51 (s, 1H, NH). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 15,14 (CH₃); 56,39 (*m*-OCH₃); 60,98 (*p*-OCH₃); 65,29 (CH₂); 105,51 (C₂, C₆); 112,56 (C₂''); 116,70 (C₅''); 122,97 (C₆''); 128,30 (C₁); 130,87 (C₁''); 142,19 (C₄); 146,16 (C=N); 148,33 (C₃''); 151,37 (C₄''); 153,53 (C₃, C₅); 163,75 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3386 (OH), 3212 (N-H), 1646 (C=O), 1585 (C=N), 1232 (C-O), 1435, 1376, 1064, 901, 851, 806, 704 (Ar) (KBr). MS (ESI) *m/z* 375,16 (M + Na)⁺. Rend.: 79%.



47 - Sólido branco, p.f. 181-183°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,71(s, *m*-OCH₃); 3,80 (s, *m*-OCH₃'); 3,85 (s, *p*-OCH₃); 7,22 (s, 2H, H₂, H₆); 7,27 (s, 1H, H₂'); 7,00-7,02 (d, *J*=8,0Hz, 1H, H₄'); 7,27-7,29 (m, 1H, H₆'); 7,35-7,39 (t, *J*=8,0HZ, 1H, H₅'); 8,43 (s, 1H, HC=N); 11,71 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 55,58 (*m*-OCH₃); 56,56 (*m*-OCH₃); 60,78 (*p*-OCH₃); 105,77 (C₂, C₆); 111,92 (C₂'); 129,97 (C₅'); 117,49 (C₄'); 121,05 (C₆'); 127,55 (C₁); 138,94 (C₁'); 142,05 (C₄); 146,75 (C=N); 160,26 (C₃'); 153,36 (C₃, C₅); 163,12 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3184 (N-H), 1637 (C=O), 1568 (C=N), 1231 (C-O), 1431, 1374, 1068, 907, 851, 804, 701 (Ar) (KBr). MS (ESI) *m/z* 367,13 (M + Na)⁺. Rend.: 93%.

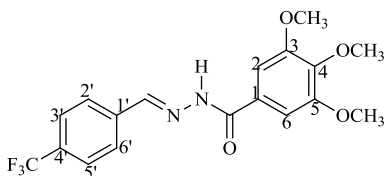


48 - Sólido branco, p.f. 206-208°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,42 (s, *m*-OCH₃); 3,85 (s, *p*-OCH₃); 7,25 (s, 2H, H₂, H₆); 6,88-6,90 (d, *J*=8,6Hz, 1H, H₄'); 7,40-7,43 (d, 1H, *J*=8,6Hz, H₆'); 7,78-7,77 (s, 1H, H₃'); 8,61 (s, 1H, HC=N); 11,71 (s, 1H, NH); 12,01 (br, 1H, OH); Rend.: 93%;

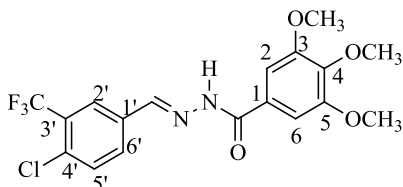


49 - Sólido branco, p.f. 195-196°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, 3H, OCH₃); 3,79 (s, 3H, OCH₃'); 3,84 (s, 6H, OCH₃); 5,13 (s, 2H, CH₂); 7,10-7,17 (m, 2H, H₅', H₆'); 7,20 (s, 2H, H₂, H₆); 7,44 (s, 1H, H₂'); 7,46-7,33 (m, 5H, Ph); 8,38 (s, 1H, HC=N); 11,59 (s, 1H, NH). ^{13}C

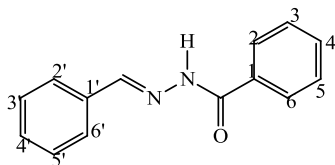
RMN (DMSO- d_6) δ 56,67 (*m*-OCH₃, OCH₃'); 60,98 (*p*-OCH₃); 71,19 (CH₂); 106,29 (C2, C6); 112,49 (C2'); 112,94 (C5'); 122,75 (C6'); 127,10 (C2''); 127,40 (C6''); 128,43 (C4''); 129,08 (C3''); 129,21 (C5''); 129,54 (C1); 131,47 (C1'); 137,36 (C1''); 142,04 (C4); 147,35 (C=N); 148,94 (C4'); 150,34 (C3'); 153,68 (C3, C5); 163,88 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3216 (N-H), 1635 (C=O), 1580 (C=N), 1234 (C-O), 1431, 1371, 1064, 905, 854, 806, 702 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 451,19 (M + H)⁺. Rend.: 93%.



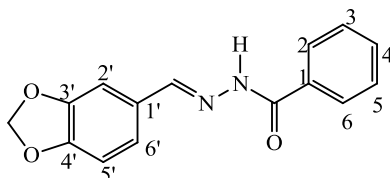
50 - Sólido branco, p.f. 194-195°C; ¹H RMN (DMSO- d_6) δ 3,72 (s, *m*-OCH₃); 3,85 (s, *p*-OCH₃); 7,23 (s, 2H, H2, H6); 7,81 (d, 2H, H3', H5'); 7,94 (d, 2H, H2', H6'); 8,52 (s, 1H, HC=N); 11,90 (s, 1H, NH); Rend.: 91%.



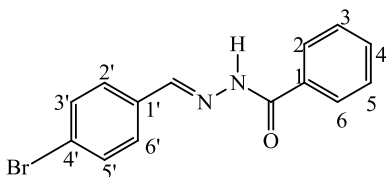
51 - Sólido branco, p.f. 203-204 °C; ¹H RMN (DMSO- d_6) δ 3,72 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,85 (s, 6H, *m*-OCH₃); 7,23 (s, 2H, H2, H6); 7,82 (d, $J=8,6$ Hz, 1H, H5'); 8,02 (d, $J=8,6$ Hz, 1H, H6'); 8,15 (s, 1H, H2'); 8,52 (s, 1H, HC=N); 11,96 (s, 1H, NH). ¹³C RMN (DMSO- d_6) δ 56,65 (*m*-OCH₃); 60,73 (*p*-OCH₃); 105,96 (C2, C6); 124,72 (C4); 126,29 (C2'); 127,67 (C3'); 127,98 (C1'); 128,88 (C1); 132,31 (CF₃); 132,91 (C4'); 133,01 (C5'); 134,82 (C6'); 145,61 (C=N); 153,40 (C3, C5); 163,50 (C=O). IV $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3182 (N-H), 1655, 1242 (C=O), 1587 (C=N), 1269, 1039 (C-O), 3008, 2938, 2838, 1506, 1480, 1417, 1336, 1316, 1173, 1121, 1006, 958, 666 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₈H₁₆ClF₃N₂O₄: C 51,87; H 3,87; N 6,72. Exp.: C 51,70; H 4,05; N 6,74. Rend.: 83%.



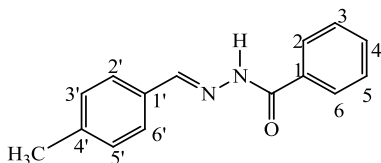
52 - Sólido branco, p.f. 205-207°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,94-7,44 (m, 10H, Ar); 8,47 (s, 1H, C=N-H); 11,88 (N-H). Rend.: 73%.



53 - Sólido branco, p.f. 272-273 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 6,08 (s, 2H, CH₂); 6,98 (d, J=8,0Hz, H5'); 7,15 (d, J=8,0Hz, H6'); 7,29 (s, 1H, H2'); 7,49-7,57 (m, 3H, H3, H4, H5); 7,88 (d, J=8,0Hz, H2, H6); 8,35 (s, 1H, -N=CH); 11,74 (s, 1H, -CONH). Rend.: 92%.

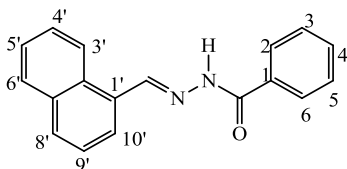


54 - Sólido branco, p.f. 181-182 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,52 (m, 2H, H3', H5'); 7,59 (m, 2H, H3, H5); 7,66 (m, 3H, H2', H4', H6'); 7,90 (d, J=8,0Hz, H2, H6); 8,42 (s, 1H, -N=CH); 11,92 (s, 1H, -CONH). Rend.: 89%.

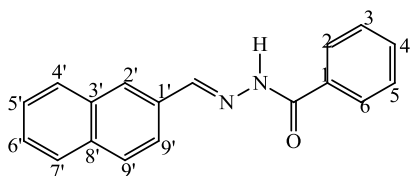


55 - Sólido branco, p.f. 159-160 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 2,3 (s, 3H, CH₃); 7,26 (d, J=8,0Hz, 2H, H3', H5'); 7,49-7,62 (m, 5H, H3, H4, H5,

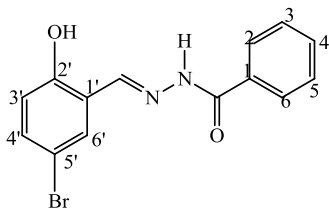
H2', H6'); 7,89 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 8,40 (s, 1H, -N=CH); 11,78 (s, 1H, -CONH). Rend.: 75%.



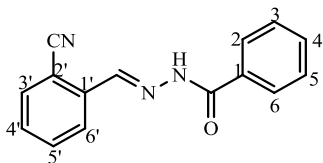
56 - Sólido amarelo, p.f. 177-178 °C. . ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,53-8,87 (m, 12H, Ar-H); 9,11 (s, 1H, -N=CH); 11,94 (s, 1H, -CONH). Rend.: 71%.



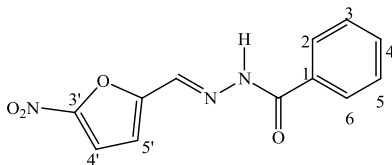
57 - Sólido branco, p.f. 215-217°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,61-7,54 (m, 5H, Ph); 8,03-7,92 (m, 6H, naftil); 8,15 (s, 1H, H2'); 8,62 (s, 1H, C=N-H); 11,96 (N-H). Rend.: 79%.



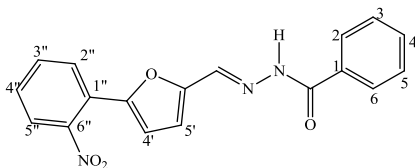
58 - Sólido branco, p.f. 196-198°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 6,89 (d, $J=8,5\text{Hz}$, 1H, H3'); 7,42 (dd, 1H, $J=8,5; 2,0\text{Hz}$, H4'); 7,56 (m, 3H, H2, H4, H6); 7,78 (d, $J=2,0\text{Hz}$, H6'); 7,93 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H3, H5); 8,61 (s, 1H, C=N-H); 11,31 (N-H); 12,20 (s, 1H, OH). Rend.: 83%.



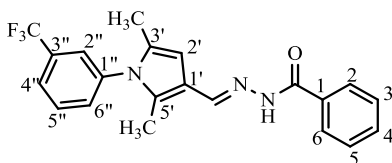
59 - Sólido branco, p.f. 184-186°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,49-8,17 (m, 9H, Ar-H); 8,82 (s, 1H, C=N-H); 12,26 (N-H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 11,32 (C2'); 117,48 (CN); 126,16 (C2, C6); 128,16 (C6'); 128,99 (C3, C5); 130,91 (C4); 132,59 (C3'); 133,27 (C4'); 133,80 (C5'); 134,01 (C1); 137,36 (C1'); 143,65 (HC=N); 163,93 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3219 (N-H), 1630 (C=O), 1581 (C=N), 1460, 1371, 1067, 901, 857, 802, 711 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 272,08 (M + Na) $^+$. Rend.: 83%.



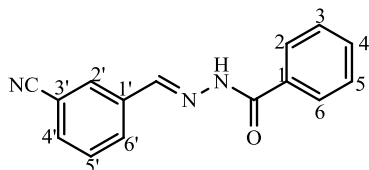
60 - Sólido amarelo, p.f. 220-221 °C. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,09 (dd, 1H, H5'); 7,59 (dd, 1H, H4'); 7,63-7,71 (m, 3H, H3, H4, H5); 8,05 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H2, H6); 8,41 (s, 1H, -N=CH); 11,81 (s, 1H, -CONH). Rend.: 41%.



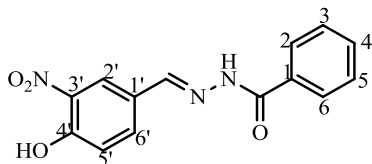
61 - Sólido amarelo, p.f. 186-188°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,04 (d, $J=4\text{Hz}$, H4'); 7,11 (d, $J=4\text{Hz}$, H5'); 7,98-7,52 (m, 9H, Ar); 8,37 (s, 1H, C=N-H); 11,88 (N-H). Rend.: 39%.



62 - Sólido amarelo, p.f. 105-106°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 1,98 (s, 3H, CH_3); 2,09 (s, 3H, CH_3); 6,30 (s, 1H, H5); 7,48 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H6''); 7,50 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H3', H5'); 7,54 (m, 1H, H4'); 7,69 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H4''); 7,78 (t, 1H, $J=8,0$ Hz, H5''); 7,78 (s, 1H, H2''); 7,87 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H2', H6'); 8,43 (s, 1H, C=N-H); 11,38 (N-H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 11,20 (CH_3); 13,02 (CH_3); 105,07 (C5); 116,37 (C2''); 125,47 (C1); 127,83 (C2', C6', CF_3); 128,84 (C3', C5'); 130,21 (C4''); 130,52 (C1'); 130,84 (C4); 131,24 (C6''); 131,80 (C3''); 131,92 (C5''); 132,89 (C4'); 134,34 (C2); 138,44 (C1''); 144,42 (C=N); 162,73 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3229 (N-H), 1645, 1279 (C=O), 1579 (C=N), 1231, 1027 (C-O), 1169 (C-F), 2920, 1610, 1554, 1494, 1454, 1377, 1068, 901, 858, 806, 708 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$: C 65,45; H 4,71; N 10,90. Exp.: C 64,19; H 4,63; N 10,73. Rend.: 41%.

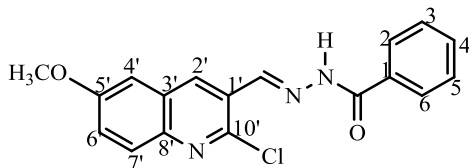


63 - Sólido branco, p.f. 169-171°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,55 (m, 4H, H4', H5', H2', H6'); 7,91 (m, 3H, H3, H4, H5); 8,12 (m, 2H, H2, H6); 8,48 (s, 1H, HC=N); 12,08 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 112,47 (C3'); 118,82 (C \equiv N); 128,15 (C2, C6); 128,94 (C3, C5); 130,51 (C4, C2'); 131,13 (C5'); 131,45 (C1); 132,39 (C1'); 133,69 (C4'); 136,12 (C6'); 145,94 (HC=N); 163,81 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3221 (N-H), 1632 (C=O), 1589 (C=N), 1451, 1379, 1062, 900, 856, 804, 701 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 250,10 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Rend.: 74%.

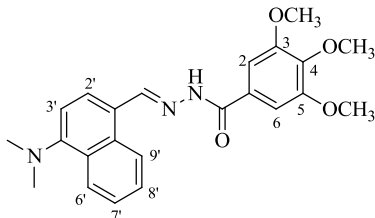


64 - Sólido branco, p.f. 226-228°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7,19 (d, 1H, H5'); 7,53 (m, 3H, H3, H4, H5); 7,91 (m, 3H, H2, H6, H6'); 8,19 (s, 1H, H2'); 8,40 (s, 1H, HC=N); 11,93 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 120,14 (C5'); 124,42 (C2'); 126,30 (C1'); 128,07 (C2, C6); 128,91 (C3, C5); 132,26 (C4); 133,44 (C1); 133,71 (C6'); 137,41 (C3'); 146,25 (HC=N); 153,84 (C4'); 163,74 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3440 (OH); 3213

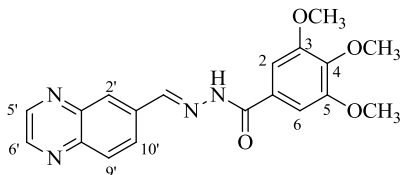
(N-H), 1633 (C=O), 1580 (C=N), 1449, 1375, 1060, 909, 851, 801, 708 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 286,08 (M + H)⁺. Rend.: 82%.



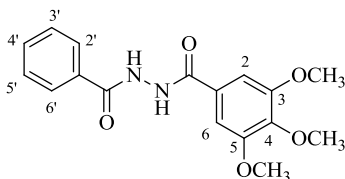
65 - Sólido branco, p.f. 260-262°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3,92 (s, 3H, OCH₃); 7,67-7,46 (m, 5H, Ar-H); 7,98 (d, 2H, *J*=8,0Hz, H6', H7'); 7,88 (d, 1H, H4'); 8,90 (m, 2H, HC=N, H2'); 12,27 (s, 1H, NH). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 56,19 (1C, OCH₃); 107,10 (C4'); 124,65 (C6'); 126,64 (C1'); 128,19 (C2, C6); 128,63 (C3'); 129,00 (C3, C5); 129,49 (C7'); 132,53 (C4); 133,52 (C1); 134,76 (C2'); 143,25 (HC=N); 143,70 (C8'); 146,31 (C10'); 158,53 (C5'); 163,66 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3218 (N-H), 1639 (C=O), 1587 (C=N), 1235 (C-O), 1441, 1370, 1067, 901, 859, 802, 701 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 362,07 (M + Na)⁺. Rend.: 31%.



78 - Sólido amarelo, p.f. 214-215°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,90 (s, 6H, CH₃); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,90 (s, 6H, OCH₃); 7,17 (d, *J*=8Hz, 1H, H3'); 7,30 (s, 2H, H2, H6); 7,58-7,67 (m, 2H, H7', H8'); 7,83 (d, *J*=8,0Hz, H9'); 8,22 (d, *J*=8,0Hz, H6'); 8,97-9,00 (m, 2H, HC=N, H2'); 11,70 (s, 1H, NH). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 45,03 (2C, CH₃); 56,56 (2C, OCH₃); 60,58 (1C, OCH₃); 105,59 (C2, C6); 113,78 (C3'); 123,91 (C1'); 125,23 (C6'); 125,42 (C7'); 125,77 (C8', C2'); 127,51 (C1); 128,26 (C9'); 129,17 (C5'); 129,44 (C10'); 132,09 (C4); 140,80 (CH); 148,66 (C4'); 153,17 (C3, C5); 163,22 (C=O). IV $\lambda_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3454 (NH), 1663 (C=O), 1576 (C=N), 1233 (C-O), 2941, 2833, 1008, 862, 767 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₂₃H₂₅N₃O₄: C 67,80; H 6,18; N 10,31. Exp.: C 67,46; H 6,11; N 10,42. Rend.: 89%;



79 - Sólido amarelo, p.f. 207-208°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,90 (s, 6H, OCH₃); 7,29 (s, 2H, H₂, H₆); 8,17 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 1H, H_{2'}); 8,34 (m, 2H, H_{9'}, H_{10'}); 8,70 (s, 1H, HC=N); 8,99 (d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H, H_{5'}, H_{6'}); 12,02 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,56 (2C, OCH₃); 60,59 (1C, OCH₃); 105,73 (C₂, C₆); 127,39 (C₁); 128,70 (C_{10'}); 129,44 (C_{1'}); 130,29 (C_{2'}, C_{9'}); 136,62 (C₄); 142,91 (C_{5'}, C_{6'}); 143,61 (C_{3'}); 146,55 (C_{8'}); 146,86 (C₃, C₅); 153,16 (CH); 163,22 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3446 (NH), 1663 (C=O), 1576 (C=N), 1233 (C-O), 2941, 2832, 1008, 913, 862, 767 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₉H₁₈N₄O₄: C 62,26; H 4,95; N 15,29. Exp.: C 62,80; H 5,16; N 15,21. Rend.: 83%.

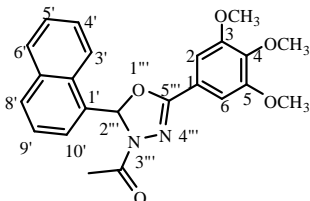


80 - Sólido branco, p.f. 188-189°C; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, 3H, OCH₃); 3,83 (s, 6H, OCH₃); 7,25 (s, 2H, H₂, H₆); 7,50-7,61 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}); 7,91 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H_{2'}, H_{6'}); 10,45 (s, 1H, NH); 10,49 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,45 (2C, OCH₃); 60,57 (1C, OCH₃); 105,39 (C₂, C₆); 127,88 (C_{2'}, C_{6'}); 128,92 (C_{3'}, C_{5'}); 132,66 (C₁); 140,75 (C_{4'}); 148,92 (C_{1'}); 149,80 (C₄); 152,84 (C₃); 152,84 (C₃); 164,96 (C=O); 165,58 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3450 (NH), 1651 (C=O), 1588 (C=O), 1239 (C-O), 1002, 863, 708 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₇H₁₈N₂O₅: C 61,81; H 5,49; N 8,48. Found: C 61,27; H 5,78; N 8,19. Rend.: 88%.

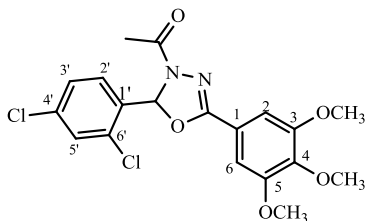
17.4.3. Síntese dos oxadiazóis (66-75)

Os 1,3,4-oxadiazóis foram preparados por ciclicação das acil-hidrazonas obtidas anteriormente com anidrido acético sob refluxo durante 3 h. Após resfriamento, o produto bruto foi filtrado, lavado e recristalizado com acetona/água para dar um sólido branco (Jin *et al*,

2006). Os compostos **66**, **67**, **69**, **70**, **72**, **74** e **75** são estruturas inéditas e foram completamente caracterizados na sequência (vide espectros em Anexo 1). Os demais compostos foram caracterizados por ^1H RMN e ponto de fusão.

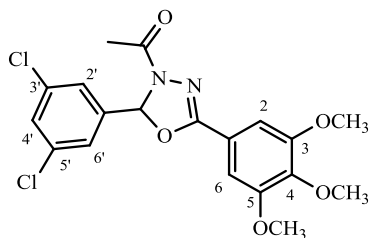


66 – Sólido branco, p.f. 189-192 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,47 (s, 3H, CH_3); 3,87 (s, 9H, OCH_3); 7,08 (s, 2H, H_2 , H_6); 7,48 (t, $J=8,0$ Hz, 1H, H_3'); 7,55 (t, $J=8,0$ Hz, 1H, H_7' , H_8'); 7,62 (t, $J=8,0$ Hz, 1H, H_7'); 7,76 (m, 1H, H_4'); 7,92 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, H_6'); 8,22 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, H_9'). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 21,57 (CH_3); 56,28 (*m*- OCH_3); 60,98 (*p*- OCH_3); 91,17 (C-N); 104,27 (C2, C6); 119,61 (C1); 123,04 (C2'); 125,07 (C9'); 125,20 (C3'); 126,05 (C7'); 126,95 (C8'); 128,95 (C4'); 130,51 (C6'); 130,61 (C10'); 130,79 (C5'); 134,04 (C1'); 141,11 (C4); 153,29 (C3, C5); 155,83 (C=N); 168,26 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1731, 1243 (C=O), 1669, 1587 (C=N), 1254, 1039 (C-O), 1124 (C-N), 2997, 2941, 2827, 1509, 1465, 1416, 1369, 1332, 1191, 1006, 980, 847, 784, 699 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 429,14 (M + Na) $^+$. Rend.: 35%.

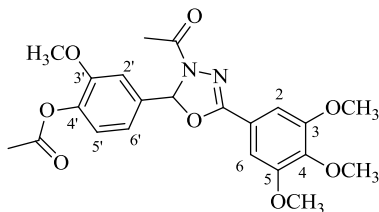


67 - Sólido branco, p.f. 166-167°C; ^1H RMN (DMSO-d_6) δ 2,27 (s, 3H, CH_3); 3,70 (s, 3H, *p*- OCH_3); 3,81 (s, 3H, *m*- OCH_3); 7,06 (s, 2H, H_2' , H_6'); 7,17 (s, 1H, HC-N); 7,54 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H_5 , H_6); 7,72 (m, 1H, H_3). ^{13}C RMN (DMSO-d_6) δ 23,99 (CH_3); 56,20 (*m*- OCH_3); 60,20 (*p*- OCH_3); 89,90 (C-N); 106,40 (C2', C6'); 124,12 (C1'); 126,22 (C3'); 129,42 (C2'); 129,97 (C5'); 131,88 (C4'); 132,64 (C6'); 140,00 (C1); 141,07 (C4); 153,99 (C3, C5); 156,37 (C=N); 169,70 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1765, 1239 (C=O), 1673, 1583 (C=N), 1253, 1034 (C-O), 1183 (C-N), 1135 (C-Cl), 2995, 2941, 1508, 1454, 1419, 1366, 1339,

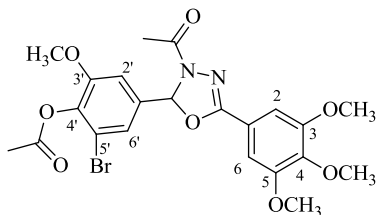
1210, 1100, 999, 846, 796 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para $C_{10}H_{18}Cl_2N_2O_5$: C 53,66; H 4,27; N 6,59. Exp.: C 52,54; H 4,55; N 6,42. Rend.: 25%.



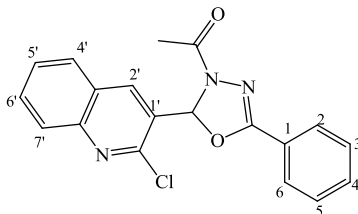
68 - Sólido branco, p.f. 145-146°C; 1H RMN (DMSO- d_6) δ 2,28 (s, 3H, CH_3); 3,72 (s, 3H, OCH_3); 3,83 (s, 6H, OCH_3); 7,05 (s, 2H, H2, H6); 7,32 (s, 1H, HC-N); 7,53 (s, 2H, H2', H6'); 7,77 (s, 1H, H4'). Rend.: 47%.



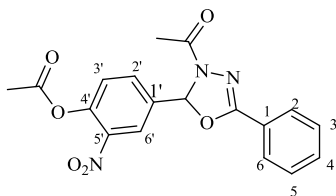
69 - Sólido branco, p.f. 170-172 °C; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 2,37 (s, 3H, CH_3); 2,38 (s, 3H, CH_3); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 3,91 (s, 3H, OCH_3); 3,93 (s, 6H, OCH_3); 6,98-7,07 (m, 3H, H2', H6'); 7,11 (s, 2H, H2, H6); 7,18 (s, 1H, HC-N); 7,45 (m, 1H, H5'). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 20,82 (CH_3); 21,54 (CH_3); 56,27 (*m*- OCH_3); 56,33 (*m*- OCH_3); 61,02 (*p*- OCH_3); 91,14 (C-N); 92,06 (C2'); 104,22 (C2, C6); 119,16 (C5'); 128,09 (C6'); 136,402 (C1', C1); 141,24 (C4'); 141,96 (C4); 151,78 (C3'); 153,42 (C3, C5); 155,60 (C=N); 167,75 (C=O); 168,10 (C=O). IV λ_{max}/cm^{-1} 1767, 1243 (C=O), 1665, 1581 (C=N), 1250, 1043 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1129, 644 (C-Br), 2967, 2945, 2838, 1507, 1466, 1417, 1365, 1036, 1287, 1197, 1083, 997, 958, 861, 699 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 445,14 (M + H) $^+$. Rend.: 25%.



70 - Sólido branco, p.f. 177-179 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.36 (s, 3H, CH_3); 2,38 (s, 3H, CH_3); 3,84 (s, 3H, OCH_3), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,92 (s, 6H, OCH_3), 6,99 (s, 1H, $\text{H}_{2'}$), 7,06 (s, 1H, $\text{H}_{6'}$), 7,11 (s, 2H, H_2 , H_6); 7,17 (s, 1H, HC-N) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 20,68 (CH_3); 21,75 (CH_3); 56,56 (*m*- OCH_3), 61,25 (*p*- OCH_3); 91,52 (C-N); 104,44 (C2, C6); 117,93 (C5'); 119,37 (C2'); 122,52 (C6'); 136,02 (C1', C1); 139,24 (C4'); 141,49 (C4); 152,90 (C3'); 153,64 (C3, C5); 155,84 (C=N); 168,00 (C=O); 168,32 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1766, 1238 (C=O), 1667, 1582 (C=N), 1254, 1047 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1130, 621 (C-Br), 3004, 2941, 2838, 1466, 1416, 1366, 1306, 1190, 998, 858 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 523,07 (M + H) $^+$. Rend.: 30%.

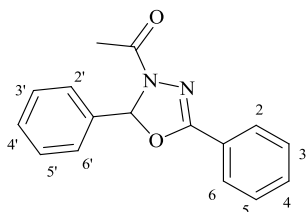


71 - Sólido branco, p.f. 147-148 °C. ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 2,33 (s, 3H, CH_3); 7,47 (HC-N); 7,57-8,16 (m, 9H, Ar-H); 8,64 (s, 1H, C2'). Rend.: 69%.

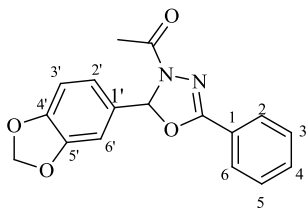


72 - Sólido bege, p.f. 142-143°C; ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 2,27 (s, 3H, CH_3); 2,32 (s, 3H, CH_3); 7,33 (s, 1H, HC-N); 7,52 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H_5); 7,54 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$); 7,60 (t, 1H, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{4'}$); 7,84 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H_2 , H_6); 7,93 (dd, 1H, $J=8,0/2,0$ Hz, H_6); 8,27 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, H_2). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 20,89 (CH_3); 21,59 (CH_3);

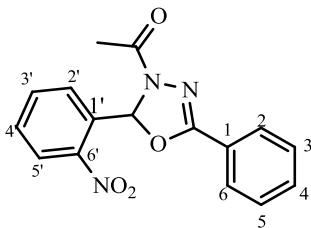
90,58 (C-N); 124,01 (C5'); 124,53 (C2'); 126,62 (C4); 127,15 (C2, C6); 129,60 (C3, C5); 132,60 (C1); 133,77 (C1'); 136,09 (C6'); 142,05 (C3'); 144,42 (C4'); 155,22 (C=N); 167,88 (C=O); 168,96 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3434 (OH), 1784, 1236 (C=O), 1649, 1541 (C=N), 1263, 1061 (C-O), 1181 (C-N), 1528, 1350, 868 (NO₂), 2927, 1631, 1454, 1416, 1307, 1145, 1082, 1008, 773, 692 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₆H₁₃N₃O₅: C 58,72; H 4,00; N 12,84. Exp.: C 58,24; H 4,32; N 11,33. Rend.: 66%.



73 - Sólido bege, p.f. 88-89°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,26 (s, 3H, CH₃); 7,18 (s, 1H, HC-N); 7,85-7,44 (m, 10H, Ar). Rend.: 38%.



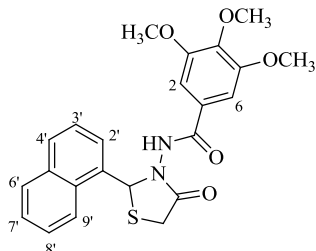
74 - Sólido bege, p.f. 120-122°C; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 1,90 (s, 3H, CH₃); 6,15 (s, 2H, -OCH₂O-); 7,11 (s, 1H, H2); 7,13 (s, 1H, HC-N); 7,31 (d, 1H, *J*=8,0 Hz, H5); 7,47 (t, 1H, *J*=8,0 Hz, H4'); 7,53 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H3', H5'); 7,55 (m, 1H, H6); 7,84 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H2', H6'); 9,79 (s, 1H, NH). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 21,05 (CH₃); 90,43 (C-N); 102,78 (-OCH₂O-); 106,70 (C6); 109,04 (C5); 127,84 (C3', C5'); 128,89 (C2', C6'); 129,06 (C6); 131,91 (C1'); 132,23 (C1); 132,92 (C4'); 148,79 (C3, C4); 153,21 (C=N); 169,00 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1764 (C=O), 1647, 1549 (C=N), 1264, 1037 (C-O), 1156 (C-N), 2838, 2912, 1602, 1577, 1449, 1378, 1009, 927, 810, 690 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₇H₁₄N₂O₄: C 65,80; H 4,55; N 9,03. Exp.: C 65,14; H 4,08; N 9,47. Rend.: 66%.



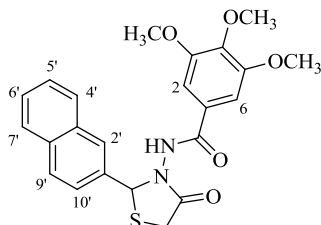
75 - Sólido bege, p.f. 119-120°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 2,26 (s, 3H, CH_3); 7,51 (t, 1H, $J=8,0$ Hz, H_4'); 7,51 (s, 1H, HC-N); 7,57 (m, 2H, H_3' , H_5'); 7,61 (dd, 1H, $J=8,0/1,0$ Hz, H_6); 7,72 (dt, 1H, $J=8,0/1,0$ Hz, H_5); 7,78 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H_2' , H_6'); 7,79 (t, 1H, $J=8,0$ Hz, H_4); 8,08 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H_3'). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 21,50 (CH_3); 88,42 (C-N); 124,06 (C3); 125,36 (C4); 127,04 (C3', C5'); 128,85 (C6); 129,60 (C2', C6'); 130,04 (C4'); 131,84 (C1'); 132,55 (C5); 134,71 (C1); 148,49 (C2); 155,06 (C=N); 167,77 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1778, 1273 (C=O), 1629, 1577 (C=N), 1258, 1063 (C-O), 1164 (C-N), 1531, 1336, 896 (NO_2), 2856, 1450, 1418, 1203, 1026, 973, 772, 688 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$: C 61,73; H 4,21; N 13,50. Exp.: C 60,67; H 4,17; N 13,08. Rend: 39%.

17.4.4. Síntese das tiazolidinonas (76 e 77)

As tiazolidinonas apresentadas nesta tese foram sintetizadas pela adição de 1 mmol da acil-hidrazona e 0,5mL de ácido mercaptoacético em 35mL de tolueno, em refluxo acoplado num sistema Dean-Stark por 16h até a completa remoção da água do sistema. Após o tempo reacional, lavou-se a mistura com solução saturada de NaHCO_3 (3x10mL), a fase orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente evaporado em um rotaevaporador. O produto foi recristalizado em hexano (Neuenfeldt *et al*, 2010). **77** e **78** são estruturas inéditas e estão caracterizadas na sequência (vide espectros em Anexo 1).



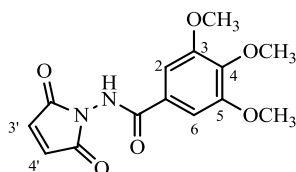
76 - Sólido amarelo, p.f. 114-116°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,67 (s, 6H, OCH_3); 3,76 (s, 3H, OCH_3); 3,76-3,80 (m, 1H, CH_2); 3,93-3,97 (m, 1H, CH_2); 6,80 (s, 2H, H2, H6); 7,91-7,16 (m, 7H, naftil); 9,45 (br, 1H, NH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 30,47 (CH_2); 56,02 (OCH_3); 60,69 (OCH_3); 104,79 (C2, C6); 122,42 (C2'); 125,28 (C8'); 125,38 (C7'); 125,45 (C9'); 125,47 (C4'); 126,15 (C3'); 128,20 (C1); 129,01 (C6'); 129,14 (C10'); 129,17 (C5'); 130,73 (C1'); 141,25 (C4); 152,62 (C3, C5); 165,08 (C=O). IR $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3247 (NH); 1704 (C=O tiazol.); 1668 (C=O); 1235 (C-O); 1126 (C-N); 1414, 1336, 1004, 852, 776 (Ar). Anal. Calcd para $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C 63,00; H 5,06; N 6,39; S 7,31. Exp.: C 62,86; H 5,37; N 6,25; S 7,37. Rend.: 92%.



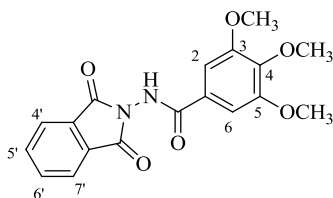
77 - Sólido amarelo, p.f. 107-109°C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 3,67 (s, 6H, OCH_3); 3,76 (s, 3H, OCH_3); 3,74-3,80 (m, 1H, CH_2); 3,97-3,93 (m, 1H, CH_2); 6,23 (s, 1H, CH); 6,81 (s, 2H, H2, H6); 7,95-7,18 (m, 7H, naftil); 9,02 (br, 1H, NH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 30,60 (CH_2); 55,97 (OCH_3); 60,69 (OCH_3); 63,58 (CH); 104,55 (C2, C6); 124,25-133,94 (2-naftil); 141,30 (C4); 152,68 (C3, C5); 164,79 (C=O); 171,86 (C=O). IR $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3252 (NH); 1706 (C=O tiazol.); 1670 (C=O); 1240 (C-O); 1127 (C-N); 1415, 1337, 1003, 852, 806, 747 (Ar). Anal. Calcd para $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C 63,00; H 5,06; N 6,39; S 7,31. Exp.: C 62,97; H 5,41; N 6,24; S 7,58. Rend.: 89%.

17.4.5. Síntese e purificação das imidas (**82**, **83** e **84**)

As imidas foram sintetizadas seguindo a metodologia proposta por Brosse e col., 2003, a partir da reação entre 1mmol da 3,4,5-trimetoxi-hidrazida e 1 mmol do anidrido correspondente (no caso do composto **84** foram utilizados 2 mmol da hidrazida para 1mmol do anidrido) em 50mL de tolueno e a mistura resultante foi refluxada por 3h. Na sequência a solução foi resfriada a 0°C para precipitação do produto que foi recristalizado em Hexano:Acetato de Etila. Todas as imidas sintetizadas neste trabalho (**82**, **83** e **84**) são estruturas inéditas.

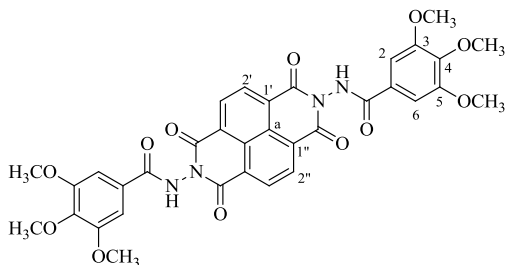


82 - Sólido branco, p.f. 146-147°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,71 (s, 3H, OCH₃); 3,83 (s, 6H, OCH₃); 6,43-6,32 (dd, 2H, H3', H4'); 7,23 (s, 2H, H2, H6); 10,57 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,45 (2C, OCH₃); 60,56 (1C, OCH₃); 105,48 (C2, C6); 127,43 (C4'); 127,66 (C3'); 133,38 (C1); 140,91 (C4); 153,10 (C3, C5); 163,69 (C=O); 165,06 (C=O); 167,39 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3437 (NH), 1704 (C=O), 1663 (C=O), 1590 (C=C), 1126 (C-O), 991, 851, 773 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₁₄H₁₄N₂O₆: C 54,90; H 4,61; N 9,15. Exp.: C 54,32; H 4,22; N 9,06. Rend.: 78%.



83 - Sólido branco, p.f. 198-199°C; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,74 (s, 3H, OCH₃); 3,85 (s, 6H, OCH₃); 7,30 (s, 2H, H2, H6); 7,95-8,02 (m, 4H, H4', H5', H6', H7'); 11,25 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 56,52 (2C, OCH₃); 60,64 (1C, OCH₃); 105,72 (C2, C6); 124,34 (C4', C7'); 126,02 (C1); 129,93 (C2', C3'); 135,88 (C5', C6'); 141,59 (C4); 153,28 (C3, C5); 165,15 (C=O); 165,89 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3441 (NH), 1796 (C=O), 1746 (C=O), 1657 (C=O), 1234 (C-O), 1002, 882, 707 (Ar)

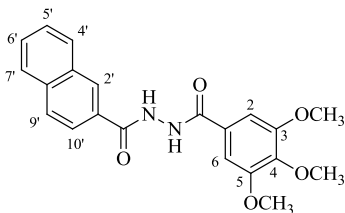
(KBr). Anal. Calcd para $C_{18}H_{16}N_2O_6$: C 60,67; H 4,53; N 7,86. Exp.: C 60,83; H 4,79; N 7,87. Rend.: 73%.



84 - Sólido amarelo, p.f. 255-256°C; 1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,76 (s, 6H, OCH₃); 3,87 (s, 12H, OCH₃); 7,37 (s, 4H, H₂, H₆); 8,82-8,83 (s, 4H, H_{2'}, H_{2''}); 11,46 (s, 1H, NH); 11,50 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,53 (OCH₃); 60,65 (OCH₃); 105,80 (C₂, C₆); 132,14-126,67 (C_{2'}, C_{1'}, C_a, C_{1''}, C_{2''}, C₁); 141,45 (C₄); 153,28 (C₃, C₅); 161,42 (C=O); 165,01 (C=O). IV λ_{max}/cm^{-1} 3427 (NH), 1782 (C=O), 1738 (C=O), 1699 (C=O), 1240 (C-O), 992, 837, 754 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para $C_{34}H_{28}N_4O_{12}$: C 64,96; H 5,77; N 8,91. Exp.: C 64,47; H 5,21; N 8,97. Rend.: 89%.

17.4.6. Síntese e purificação da acil-hidrazona **81**

A acil-hidrazona **81** foi sintetizada a partir da reação entre 1mmol da 3,4,5-trimetoxi-hidrazida e 1 mmol do cloreto de naftoíla na presença de 1mmol de piridina em 50 mL de tolueno, em refluxo por 2,5h. Após o tempo reacional, a solução foi resfriada a 0°C para precipitação do produto que foi recristalizado em hexano, e é uma estrutura inédita.



81 - Sólido branco, p.f. 210-211°C; 1H RMN (DMSO- d_6) δ 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,88 (s, 6H, OCH₃); 7,34 (s, 2H, H₂, H₆); 7,63 (m, 2H, H_{5'}, H_{6'}); 7,69 (d, $J=8,0$ Hz, H_{10'}); 8,01-8,10 (m, 3H, H_{4'}, H_{7'}, H_{9'}); 8,43

(d, $J=8,0\text{Hz}$, H2'); 10,49 (s, 1H, NH); 10,61 (s, 1H, NH). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 56,47 (2C, OCH₃); 60,87 (1C, OCH₃); 105,40 (C2, C6); 125,47 (C10'); 125,94 (C6', C1); 126,90 (C2'); 127,33 (C7'); 127,85 (C5'); 128,66 (C9'); 128,69 (C4'); 130,38 (C8'); 130,73 (C1'); 133,31 (C3'); 133,54 (C4); 153,23 (C3, C5); 165,59 (C=O); 168,58 (C=O). IV $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3445 (NH), 1688 (C=O), 1644 (C=O), 1238 (C-O), 1008, 852, 776 (Ar) (KBr). Anal. Calcd para C₂₁H₂₀N₂O₅: C 66,31; H 5,30; N 7,36. Exp.: C 66,49; H 4,98; N 6,90. Rend.: 91%.

17.5. ATIVIDADE ANTI-LEUCÊMICA

Os estudos de modelagem molecular, ensaios de migração celular, inibição dos MT e ensaios celulares de alto conteúdo foram realizados na Universidade Federal de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, pelo grupo de pesquisas do prof. Adriano Andricopulo e na *University of Pittsburgh Drug Discovery Institute*, de Pittsburgh, coordenado pelo Prof. Andreas Vogt. Já os ensaios antiproliferativos, de toxicidade seletiva, citometria de fluxo, *Western Blotting* e microarranjos de DNA foram realizados no Centro Infantil Boldrini, de Campinas-SP, coordenado pelo Dr. José Andrés Yunes.

a) *Modelagem molecular.*

As estruturas das acil-hidrazonas foram construídas utilizando as ferramentas padrão disponíveis no Sybyl 8.0. Quatro diferentes confôrmeros foram gerados para cada análogo para o quais os valores de energia foram minimizados empregando campo de força de Tripos e cargas de Gasteiger-Hückel. Protocolos de docking foram usados como implementado por GOLD 3.1 (Jones et al, 1997) As estruturas de raios-X dos complexos: (i) tubulina-colchicina, (ii) tubulina-ABT751 e (iii) tubulina-T138067 (PDB IDs 1SA0, 3HKC e 3HKE, respectivamente) foram obtidos a partir do Protein Data Bank (Dorléans et al, 2009; Ravelli et al, 2004). Para os cálculos de *docking*, os ligantes (dos complexos) foram removidos e átomos de hidrogênio foram adicionados utilizando o módulo Biopolymer (Sybyl 8.0). Os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação foram manualmente verificados (estados de protonação, orientação e tautômeros). A cavidade de ligação foi centrada sobre o átomo C22 de DAMA-colchicina e um raio de 10 Å foi considerado nos procedimentos de *docking*, que foram repetidas 10 vezes para cada conformação da acil-hidrazona selecionada.

b) Ensaios antiproliferativo.

Linhagens celulares humanas de leucemia linfoblástica aguda REH e Jurkat foram mantidas em RPMI-1640, suplementadas com FBS a 10% e penicilina/estreptomicina, a 37°C e 5% de CO₂. Para o ensaio citotóxico, os compostos foram dissolvidos em DMSO para se obter uma solução stock de 20 mM. Diluições posteriores foram feitas em meio de cultura imediatamente antes da utilização. As células REH e Jurkat foram colocadas em placas de 30.000 células/poço, em 80 µL de meio. Imediatamente, 20 µL da solução com o composto diluído 10 vezes por diluição seriada foram adicionados em cada poço, em triplicata, em concentrações finais de 0,01 a 100µM. DMSO utilizado como veículo foi incluído como controle, a uma concentração final de 0,5%. Após 48h de cultura, o número de células e viabilidade foram medidos por meio da adição de 20µL de reagente MTT (5mg/mL). Após 4,5 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, os cristais precipitados de formazan foram dissolvidos pela adição de 100µL de uma solução ácida de dodecil sulfato de sódio (SDS a 10%, 0,01 mol/L de HCl). Após incubação overnight, a absorvância foi medida a 570 nm. Os valores de IC₅₀ foram calculados com o software GraphPad Prism 4.

c) Ensaios de migração celular.

Cultura celular. A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 foi gentilmente cedida pela Prof. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo (Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos). As células foram mantidas em frasco de 75 cm² em meio DMEM (Meio Dulbecco's Modified Eagle's), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram incubadas a 37 ° C em atmosfera de 5% de CO₂ humidificada. O teste de exclusão de Trypan Blue foi utilizado para avaliar a viabilidade celular antes de experimentos.

Ensaio de Wound healing. Para a determinação da motilidade celular, as células foram semeadas em placas de 24 poços de cultura de tecido (Becton Dickinson) e desenvolvidas até 80-90%. Após aspirar o meio, o centro das monocamadas de células foram raspadas com uma ponta de micropipeta estéril para criar uma zona “desnuda”. Subsequentemente, os restos celulares foram lavados com DMEM (sem suplemento de FBS) e as células foram incubadas a 37°C com meio de crescimento

contendo diferentes concentrações de compostos durante 22h. Imagens das monocamadas inicialmente feridas foram retiradas aos 0 e 22h, e a porcentagem de fechamento da ferida foi quantificada por Imagem J com software de Java.

Ensaio de migração em câmara de Boyde. Foram feitas migrações celulares com câmaras de Boyden [8,0µm de tamanho de poro, membrana de polietileno tereftalato, inserção de cultura de célula FALCON (Becton-Dickinson)]. Células de MDA-MB-231 foram cultivadas como descrito anteriormente. Para o ensaio de migração, estas células foram “descoladas” com tripsina e ressuspensas em meio isento de soro. Após a contagem das células, 4×10^4 células em meio livre de soro (350 µL) foram adicionadas na câmara superior. Na câmara inferior, a 700 µL de meio de cultura contendo FBS a 10% (quimioatrativa) foram adicionados. Foram incubadas durante 6 horas a 37°C com concentrações diferentes (geralmente 5-6) dos compostos, tanto na parte superior quanto na inferior da câmara. O controle usado foi DMSO. Após a incubação, as células inseridas no interior foram removidas com um *cotton swab* e as células inseridas no lado inferior foram fixadas com metanol e coradas com azul de toluidina (Sigma). Células transmigradas foram contadas num microscópio, utilizando seis regiões aleatórias de membrana. O software NIS Elements (NIKON) foi usado para contar as células. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata para cada composto.

d) A inibição dos MT.

Tubulina cerebral eletroforéticamente homogênea de bovino (concentração final de 10 µM; 1mg / mL) foi pré-incubada com agente de teste dissolvidos em DMSO (1% v / v concentração final) e glutamato monossódico (0,8 M de concentração final) à 30°C em placa de 96 poços. As misturas reacionais foram resfriadas em gelo durante 10min e GTP (0,4 mM de concentração final) foi adicionado. A absorbância a 350 nm foi imediatamente lida por um espectrofotometro. As linhas de base foram estabelecidas e a temperatura foi rapidamente aumentada para 37°C. O valor de turbidez após 20 min a 30°C com 1% de DMSO foi designado como 100%, e para 10 µM de colchicina como 0%. A IC₅₀ foi calculada por regressão não linear dos valores de porcentagem obtidos no mesmo tempo para os agentes testados 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 µM.

e) Ensaios celulares de alto conteúdo

Os efeitos das acil-hidrazonas na parada mitótica, na morfologia nuclear e nos microtúbulos celulares foram estudados como previamente descrito (Vogt et al, 2009; Salum et al, 2012; Wang et al, 2007; Madiraju et al, 2005; Raccor et al, 2008). Células de carcinoma cervical – HeLa (8000/poço) foram colocadas em placas revestidas de colágeno 384 poços e tratadas com veículo (DMSO a 0,1% de concentração final). As células foram incubadas durante 18 horas a 37°C e CO₂ a 5%, fixadas com formaldeído, e marcadas com 10 µg/mL de Hoechst 33342 equilibrada com solução salina de Hank (HBSS). As células foram permeabilizadas com 0,5% (w/w) de Triton-X-100 durante 5 min à temperatura ambiente e incubados com anticorpo primário consistindo de uma solução de HBSS contendo anticorpo anti-fosfohistona H3 policlonal de coelho (Ser10, 1:500, Upstate, Charlottesville, VA, EUA), e anticorpo anti- α -tubulina monoclonal de rato (1:3000, Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguido por uma mistura de FITC-marcado de burro anti-IgG de rato (1:500) e Cy3-marcado de burro anti-IgG de coelho (1:500) como anticorpos secundários. As células foram lavadas uma vez com HBSS e armazenadas a 4°C até as análise. As microplacas foram analisadas com um instrumento ArrayScanII (Cellomics, Pittsburgh, PA, EUA) utilizando o Bioapplication Activation Target (Cellomics, Inc.). Na aplicação, 1000 células individuais em cada poço foram fotografadas em três comprimentos de onda diferentes, utilizando um conjunto de filtro XF93 Omega (Omega Optical, Inc., Brattleboro, VT, EUA) a excitação/emissão de comprimentos de onda de 350/461 nm (Hoechst), 494 / 519 nm (FITC), e 556/573 nm (Cy3). Os parâmetros que se seguem foram usados para a análise de dados: intensidade média nuclear, núcleos por campo, intensidade média nuclear de FITC, e intensidade média Cy3 nuclear. Uma máscara nuclear foi gerada a partir de Hoechst 33342 marcando os núcleos. A densidade dos microtúbulos e a fosforilação da histona H3 foi medida com Cy3 e FITC, respectivamente. Para ilustrar visualmente os efeitos dos compostos testados sobre os microtúbulos celulares e parada mitótica, as placas idênticas de 384 poços foram então utilizadas para obter imagens de alta resolução dos poços selecionados.

f) Toxicidade seletiva.

Células humanas normais mononucleares foram isoladas a partir de

sangue de dois indivíduos saudáveis, utilizando gradiente de Ficoll-Paque. Células mononucleares humanas normais e linhagens celulares de Jurkat e REH foram mantidas em RPMI-1640, suplementado com 10% de FBS e penicilina/estreptomicina, a 37°C a 5% de CO₂. As células foram incubadas durante 12 horas em meio refrigerado antes do experimento, e células normais mononucleares foram previamente tratadas com 25 µL/mL de fitohemaglutinina para induzir a proliferação dos linfócitos T. 3x10⁴ células por poço para as linhagens e 2x10⁵ células por poço para linfócitos-T. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* considerando concentrações crescentes do composto 12 em 48 horas foram avaliados pelo ensaio de redução de MTT. DMSO foi usado como um controle de 100% de sobrevivência.

g) Citometria de fluxo.

As células Jurkat foram mantidas em RPMI-1640, suplementado com FBS a 10% e penicilina/estreptomicina, a 37°C e CO₂ a 5%. As células foram incubadas durante 12 horas em meio refrigerado antes de experimentos. 2x10⁶ células foram tratadas com 125 nM do composto 12 ou DMSO durante 18 horas. Para a análise do ciclo celular, as células foram fixadas em etanol a 70% durante 2 horas, lavadas em PBS e incubadas durante 30 min em PBS 20 µg/mL iodeto de propídio, 80 µg/mL de RNase A e 0,1% de Triton X-100. Para a análise de apoptose, as células foram incubadas com Alexa Fluor® 488 Annexina V conjugado de acordo com o protocolo do fabricante. As células coradas foram lidas de um citometro de fluxo FACSCalibur BD Biosciences.

h) Western Blotting.

As células Jurkat foram mantidas em RPMI-1640, suplementado com FBS a 10% e penicilina/estreptomicina, a 37°C e CO₂ a 5%. As células foram incubadas durante 12 horas em meio refrigerado antes de experimentos. 8x10⁶ células foram tratadas com 125 nM do composto 12 ou DMSO durante 18 horas. As células foram colhidas e lisadas em tampão contendo 50 mM Tris pH 7,7, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Sigma cocktail de inibidores de fosfatase I, 1% Sigma cocktail de inibidores de fosfatase II, 1% Sigma cocktail de inibidores de protease II, 1% Igepal, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato de sódio e 1 mM PMSF. As amostras foram fervidas durante 5 minutos com a adição de β-mercaptoetanol e 100µg de proteína foi utilizado para os géis de poliacrilamida a 10%. As amostras foram então transferidas para

membranas de nitrocelulose 0,45µm. Os processos de incubação foram feitos de acordo com protocolos de Tecnologia de Sinalização Celular (CST). Todos os anticorpos foram obtidos da CST celular. Os anticorpos foram detectados com o Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate.

i) Microarranjos de DNA.

As células Jurkat foram mantidas em RPMI-1640, suplementado com FBS a 10% e penicilina/estreptomicina, a 37°C e CO₂ a 5%. As células foram incubadas durante 12 horas em meio refrigerado antes de experimentos. 2x10⁶ células foram tratadas com 125 nM do composto **29** ou DMSO durante 6h em triplicata. O RNA foi extraído com GE RNAspin mini Kit de Isolamento de RNA e a integridade foi avaliada por electroforese em gel de agarose. Os probes foram obtidos com o kit de síntese e amplificação Affymetrix GeneChip WT cDNA e o perfil de expressão foi feito usando Human Gene 1.0 ST arrays. O conjunto expressão *microarray* está disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> sob número de acesso GSEXXXXX. Os dados foram analisados utilizando a plataforma BioConductor. Valores de expressão foram obtidos com iterPLIER+16. Genes diferencialmente expressos em resposta ao composto **29** foram obtidos por análise de regressão utilizando o pacote LIMMA (FC > 1,5 e p-valor <0,05). Todos os *probesets* HGU-133a correspondentes aos genes expressos diferencialmente foram estudados com *Connectivity Map analysis* (<http://www.broad.mit.edu/cmap/>). Análise de GSEA (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>) foi realizada com 1.000 conjuntos de genes permutados, usando a média de valores de expressão de *probesets*.

17.6. EXPERIMENTAL DO CAPÍTULO 3

a) Screening virtual.

Os estudos de *in silico* desenvolvidos neste capítulo foram desenvolvidos durante parte do período de doutorado-sanduíche realizado na Itália, coordenado pelo Prof. Dr. Bruno Botta (Università La Sapienza, Roma) e Prof. Dr. Maurizio Botta (Università Degli Studi, Siena).

As coordenadas do receptor PtpB utilizadas para os estudos de *docking* foram obtidas a partir do Protein Data Bank, sob código PDB: 2OZ5. Esta estrutura foi resolvida por cristalografia de raios X de 2,00 Å e é a única estrutura complexada na PtpB disponível. As coordenadas do complexo proteína-ligante foram minimizadas com o programa Amber11, utilizando o campo de força ff99bsc0 para a proteína e o campo de força GAFF para a OMTS. A estrutura da proteína gerada foi utilizada como receptor alvo durante os cálculos de *docking* com o Programa GOLD 4.1.2. O centróide do sítio de ligação foi definido no átomo de CD2 de Phe161 e incluiu todos os átomos dentro de 20 Å. A maior precisão do algoritmo genético GOLD (200%) foi utilizada para o *docking* da bibliotecade PN e de 100% para a biblioteca comercial, utilizando a função Goldscore. A MM-GBSA foi usado para calcular o delta de energia entre a enzima e os ligantes. O programa GRID foi utilizado para provar a energia potencial da interação do WAT *probe* dentro do sítio catalítico da PtpB, e o centro em GRID foi colocado em correspondência com Tyr125 e foi de 17,04, 14,40 e 16,50 Å (x, y e z). Os mapas gerados foram então visualizados com Ligandscout 3,0. Os estudos para obtenção do farmacóforo 3D foram realizados com o programa Ligandscout 2.0 (Wolber, 2005) e para obtenção do query baseado no shape da OMTS foi utilizado o programa ROCS a partir do pacote *OpenEye Scientific software*.

b) Testes enzimáticos com a PtpB.

Os testes enzimáticos foram desenvolvidos no Centro de Biologia Molecular Estrutural, CEBIME, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do Prof. Dr. Hernán Terenzi.

i) PtpB de *M. tuberculosis* WT (*wildtype*): expressão e purificação

O vetor de expressão pET28 (QIAGEN), contendo o gene da proteína PtpB de *M. tuberculosis*, foi cedido pelo PhD. Pedro M. Alzari, do Institut Pasteur, Paris. Este vetor foi inserido em *Escherichia coli* BL21(DE3) para produzir proteínas recombinantes com uma cauda de 6 histidinas. As bactérias com o vetor de expressão foram incubadas por 16 horas (*overnight*) em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB), contendo 50 µg/mL de canamicina a 37°C.

Os procedimentos de expressão, purificação e análise da pureza da proteína recombinante PtpB foram idênticos aos descritos para a PtpA. As frações contendo PtpB recombinante foram associadas, concentradas por centrifugação (sem adição de DTT) e armazenadas a -20°C.

ii) PTP1B humana WT (wildtype): expressão e purificação

O plasmídeo pEt-19b que codifica a proteína PTP1B humana WT de 37 kDa, foi cedido pelo Dr. Nicholas K. Tonks (Cold Spring Harbor Laboratory). Esse vetor foi inserido em *E. coli* BL21(DE3). As bactérias contendo o vetor de expressão foram incubadas *overnight*, em 10 mL de meio LB contendo 10 µL de ampicilina (100 mM) a 37°C.

Para a expressão da proteína, 5 mL de cultura *overnight* de *E. coli* BL21(DE3) PTP1B foi transferida para 250 mL de meio LB contendo 250 µL de ampicilina (100 mM), e incubou-se a 37°C com agitação (140 rpm) até a fase de crescimento exponencial, correspondente a uma densidade ótica de 0,85 a 600 nm. Para a indução da síntese da proteína de interesse, adicionou-se 0,6 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As culturas foram incubadas por mais 20 horas à temperatura ambiente, e as células foram recolhidas por centrifugação a 8.000 rpm por 30 min. As etapas seguintes foram realizadas a 4°C. O sedimento resultante foi resuspenso em 40 mL de Tampão A (20 mM imidazol pH=7,5, 1 mM EDTA, 3 mM DTT e 10% glicerol) contendo inibidores de proteases (2 mM benzamidina e 2 µg/mL cada de aprotinina, leupeptina e pepstatina). As células foram lisadas por sonicação e centrifugadas a 40.000 rpm por 30 min.

A purificação foi realizada com uma ligeira modificação do método previamente descrito por Barford e col. (1994). O sobrenadante foi eluído em uma coluna HiTrap™ Q FF de 1 mL a 1,5 mL/min. A coluna foi lavada com Tampão A até que a absorbância de 280 nm estivesse em zero. A proteína foi eluída a 2 mL/min com 100 mL de Tampão A, com concentrações crescentes de NaCl de zero a 0,5 M no tampão A. As frações contendo proteína foram reunidas e dessalinizadas em uma coluna HiPrep™ 26/10 de 35 mL eluída com Tampão B (20 mM bis-Tris pH=6,5, 1 mM EDTA, 3 mM DTT e 10% glicerol). A solução de proteína resultante foi eluída em uma coluna HiTrap™ SP FF de 1 mL a 1,5 mL/min. A coluna foi lavada com Tampão B até que a absorbância de 280 nm estivesse em zero. A proteína foi eluída a 2 mL/min com 150 mL de Tampão B, com concentrações crescentes de

NaCl de zero a 0,5 M no tampão B. A concentração da proteína foi monitorada por UV ($A_{1\text{mg/mL}}^{280\text{nm}} = 1,0 \text{ mg/mL}$) (Bradford, 1976), e o rendimento da PTP1B WT foi 4,5 mg. As frações protéicas foram armazenadas a -20°C .

c) Avaliação da atividade residual das enzimas PtpB e PTP1B.

Os testes de avaliação da inibição enzimática pelos compostos selecionados foram feitos de acordo com metodologia já descrita (Grundner *et al.*, 2007). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, contendo 5 μL do composto diluído a $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ (concentração final de 25 μM), 20 μL de imidazol 200 mM pH=7,0 (concentração final de 20 mM), 10 μL de *p*-nitrofenilfosfato [pNPP] 400 mM (concentração final de 40 mM), água MilliQ q.s.p 198 μL em cada poço, seguidos da adição de 2 μL de proteína recombinante diluída para início da reação. As proteínas foram usadas nas seguintes concentrações: *i*) PtpA 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (diluída 5 vezes para uso em Tampão D, que contém 20 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% glicerol e 5 mM DTT) – concentração de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em cada poço; *ii*) PtpB 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (diluída 2 vezes para uso, em Tampão D) – concentração de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em cada poço; *iii*) PTP1B 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (diluída 10 vezes para uso, em Tampão B, contendo 20 mM bis-Tris pH=6,5, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 10% glicerol e 92 mM NaCl) – concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em cada poço. As enzimas, quando ativas, clivam o substrato (pNPP), liberando *p*-nitrofenol, de cor amarela. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS para placas de ELISA (TECAN), por 10 minutos a 37°C (a 410 nm com leituras a cada 1 minuto). Controles negativos foram feitos na ausência de enzima e compostos, e controles positivos na presença de enzima e DMSO 100% no lugar do composto. O percentual de atividade residual foi calculado pela diferença de Absorbância entre o tempo 6 minutos e 2 minutos, obtido pela média de dois experimentos feitos em triplicata.

d) Determinação dos valores de IC_{50} dos compostos.

A inibição dos compostos foi determinada por cálculos de IC_{50} (concentração necessária para um composto inibir 50% a atividade da enzima original). Os valores de IC_{50} foram determinados usando concentrações crescentes de inibidor (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 65, 80 e 100 μM) *versus* % de inibição, obtidos pela mesma metodologia do

item anterior. A atividade enzimática foi expressa em valores de percentual de atividade residual comparada ao controle sem inibidor. Os dados experimentais foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 7.0 e os valores de IC_{50} determinados graficamente através da regressão linear de melhor ajuste.

e) Cinética enzimática.

Os valores de K_m , K_i e V_{max} , e o mecanismo de inibição dos compostos, foram determinados utilizando concentrações crescentes do substrato pNPP (0,5; 1,5; 3; 6; 8; 10; 15; 25 mM) para cada concentração de composto (ao menos 3 concentrações entre 5 e 60 μM).

Para a construção do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk foram plotados o inverso do valor da velocidade (determinada pela diferença entre a Absorbância dos tempos 6 e 2 minutos) *versus* os valores correspondentes ao inverso da concentração de pNPP. Usou-se o gráfico de Dixon, plotando o inverso da velocidade da reação em função da concentração do inibidor, para determinação das constantes de inibição (K_i), obtidas pela interceptação das linhas. Alternativamente, os valores de K_{Mapp} obtidos para cada concentração de composto, foram plotados *versus* concentração de inibido, e a interceptação da linha no eixo x corresponde a $-K_i$.

Os dados experimentais foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 7.0 e as constantes cinéticas determinadas através do método de regressão linear de melhor ajuste.

18 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberton, E. H. ; Damazio, R. G. ; Cazarolli, L. H. ; Chiaradia, L. D. ; Leal, P. C. ; Nunes, R. J. ; Yunes, R. A. ; Silva, F. R. M. B. . Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. *Chemico-Biological Interactions*, **2008**, 171, 355-362.

Albini, A.; Iwamoto, Y.; Kleinman, H. K.; Martin, G. R.; Aaronson, S. A.; Kozlowski, J. M.; McEwan, R. N., A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* **1987**, 47 (12), 3239-45.

Alonso, H.; Bliznyuk, A. A.; Gready J. E. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Medicinal Research reviews* **2006**, 26 (5), 531-568.

Amaral, A. T.; Montanari, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. *Química Nova*, **2002**, 25(1), 39-44.

American Diabetes Association. *Diabetes Care*, **2004**, 27, 5-10.

Andricopulo, A. D.; Salum, L. B.; Abraham, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2009**, 9(9), 771-790.

Andrighetti-Fröhner, C. R.; de Oliveira, K. N.; Gaspar-Silva, D.; Pacheco, L. K.; Joussef, A. C.; Steindel, M.; Simões, C. M. O.; de Souza, A. M. T.; Magalhaes, U. O.; Afonso, I. F.; Rodrigues, C. R.; Nunes, R. J.; Castro, H. C. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 755.

Avila, C. M.; Lopes, A. B.; Gonçalves, A. S.; da Silva, L. L.; Romeiro, N. C.; Miranda, A. L.; Sant'Anna, C. M.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A., Structure-based design and biological profile of (E)-N-(4-Nitrobenzylidene)-2-naphthohydrazide, a novel small molecule inhibitor of I κ B kinase- β . *Eur J Med Chem* **2011**, 46 (4), 1245-53.

Bach, H.; Papavinasundaram, K. G.; Wong, D.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA

Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B, *Cell Host & Microbe* **2008**, 3, 316–322.

Bain, B. J. *Diagnóstico em leucemias*. Rio de Janeiro: Elsevier, **2003**, Cap. 1, 01-56.

Bakal, C. J.; Davies, J. E. No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. *Trends in Cell Biology*, **2000**, 10(1), 32-38.

Baldwin, J. E. Rules for ring closure. *J.C.S. Chem. Comm.*, **1976**, 734-736.

Baldwin, J.; Cuttingw, J.; Dupont, W.; Cruse, L.; Silbermaannd, L.; Thomas, R. C. 5-Endo- *Trigonal* Reactions : A Disfavoured Ring Closure. *J.C.S. Chem. Comm.*, **1976**, 736-738.

Ball, S. G.; Barber, T. M. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **2003**, 14, 349-355.

Barreiro, E. J. Desenho de Fármacos a partir de Produtos Naturais. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (ed.). *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, **2001**. Cap. 7, p.237-296.

Barreiro, E. L. A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. *Revista Virtual de química*, **2009**, 1 (1), 26-34.

Beer, S. B. A.; Vermeulen, N. P. E.; Oostenbrink, C. The role of water molecules in computational drug design *Curr. Top. In Med. Chem.* **2010**, 10, 55-66.

Beresford, N. J.; Mulhearn, D.; Szczepankiewicz, B.; Liu, G.; Johnson, M. E.; Fordham-Skelton, A.; Abad-Zapatero, C.; Cavet, J. S.; Taberner, L. Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. *J. Antim. Chem.* **2009**, 63, 928-936.

Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M., Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med Res Rev* **2008**, 28 (1), 155-83.

Borchhardt, D. M. ; Mascarello, A. ; Chiaradia, L. D. ; Oliva, G. ; Yunes, R. A. ; Nunes, R. J. ; Andricopulo, A. D. Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazide Derivatives as Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2009**, *21*, 142-150.

Bringmann, G.; Gunther, C.; Jumbam, D. N. Isolation of 4-O- β -D-glucopyranosylcaffeic acid and gallic acid from *Cyathea dregei* KUNZE (Cyatheaceae) Pharmaceutical and Pharmacological Letters **1999**, *9*(2), 41-43.

Brown, C. A.; Draper, P.; Hart, P. D. Mycobacteria and lysosomes: a paradox. *Nature*, **1969**, *221*(5181), 658-60.

Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2003**, *32*, 335-373.

Brosse, N.; Pinto, M. F.; Jamart-Greoire, B. Preparation of multiply protected alkylhydrazine derivatives by Mitsunobu and PTC approaches. *European Journal of Organic Chemistry*. **2003**, 4757-4764.

Calderone, V.; Rapposelli, S.; Martelli, A.; Digiacomio, M.; Testai, L.; Torri, S.; Marchetti, P.; Breschi, M. C.; Balsamo, A. NO-glibenclamide derivatives: Prototypes of a new class of nitric oxide-releasing anti-diabetic drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*(15), 5426-5432.

Calixto, J. B. Estudo Farmacológico Pré-clínico de Plantas Medicinais. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (ed.). *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, **2001**. Cap. 3, p. 78.

Campbell, M. K. E Farrel, S. O. *Bioquímica*. 3ed, Thomsom, **2006**, 158-159 p.

Cao, Xiu-Fang; Wang, Yun-Shen; Li, Shao-Wei; Chen, Chang-Shui; Ke, Shao-Yong. Synthesis and biological activity of a series of novel N-substituted β -lactams derived from natural gallic acid. *Journal of the Chinese Chemical Society (Taipei, Taiwan)* **2011**, *58*(1), 35-40.

Cappel, D.; Wahlstrom, R.; Brenk, R.; Sotriffer, C.A.; Probing the Dynamic Nature of Water Molecules and Their Influences on Ligand Binding in a Model Binding Site. *J Chem Inf Model.* **2011** 51(10), 2581-2594.

Case, D. A.; Darden T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Goetz, A. W.; Kolossvai, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M. J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 11*, University of California, San Francisco, **2012**.

Cave, C.; Galons, H.; Miocque, M.; Rinjard, P.; Tran, G.; Binet, P., Antihypertensive actions of Hydrazidones - Study of acylated dichloroarylhydrazones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1990**, 25 (1), 75-79.

Chan, J. C. N.; Deerochanawong, C.; Shera, A. S.; Toon, K. H.; Adam, J. M. F.; Binh, T. A.; Chan, S. P.; Fernando, R. E.; Horn, L. C.; Khue, N. T.; Litonjua, A. D.; Soegondo, S.; Zimmet, P. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **2007**, 75, 255-266.

Chiaradia, L D; Mascarello, A; Purificacao, M; Vernal, J; Cordeiro, M N S; Zenteno, M E; Villarino, A; Nunes, R J; Yunes, R A; Terenzi, H. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18(23), 6227-6230.

Chiaradia, L. D.; Martins, P. G. A.; Cordeiro, M. N. S.; Guido, R. V. C.; Ecco, G.; Andricopulo, A. D.; Yunes, R. A.; Vernal, J.; Nunes, R. J.; Terenzi, H. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 390-402.

Chida, A.; Vani, P.; Chandrasekharam, M.; Srinivasan, R.; Singh, A., Synthesis of 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzo quinone: A key

fragment in coenzyme-Q series. *Synthetic Communications* **2001**, *31* (5), 657-660.

Ciapetti, P.; Giethlen, B. *Molecular variations based on isosteric replacements*. In: Wermuth, C. G. Ed. *The practice of medicinal chemistry*. 3^a edição. Lodon: Academic Press, **2008**, 290-334.

Cleveland, D. W.; Lopata, M. A.; Sherline, P.; Kirschner, M. W., Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell* **1981**, *25* (2), 537-46.

Chandra, K.; Dutta, D.; Das, A. K.; Basak, A. Design, synthesis and inhibition activity of novel cyclic peptides against protein tyrosine phosphatase A from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*(23), 8365-8373.

Chao, J.; Wong, D.; Zheng, X.; Poirier, V.; Bach, H.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2010**, *1804*, 620-627.

Chen, L.; Zhou, B.; Zhang, S.; Wu, L.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Zhang, Z-Y. Identification and Characterization of Novel Inhibitors of mPTPB, an Essential Virulent Phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 355-359.

Cole, S. T.; Brosch, R.; *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* **1998**, *393*, 537-544.

Concannon, P.; Erlich, H. A.; Julier, C.; Morahan, G.; Nerup, J.; Pociot, F.; Todd, J. A.; Rich, S. S. Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diabetes*, **2005**, *54*(10), 2995-3001.

Cordova, C.A.S. de; Locatelli, C.; Assunção, L.S.; Mattei, B.; Mascarello, A.; Winter, E.; Nunes, R. J.; Yunes, R.A.; Creczynski-Pasa, T. B. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. *Toxicology in Vitro*, **2011**, *25*, 2025-2034.

Corrêa Jr., I. R.; Nören-Müller, A.; Ambrosi, H. D.; Jakupovik, S.; Saxena, K.; Schwalbe, H.; Kaiser, M.; Waldmann, H. Identification of inhibitors for mycobacterial protein tyrosine phosphatase B (MtpB) by Biology-Oriented Synthesis (BIOS). *Chemistry An Asian Journal*, **2007**, *2*, 1109-1126.

Cozzone, A. J.; Grangeasse, C.; Doublet, P.; Duclos, B. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Archives of Microbiology*, **2004**, *181*(3), 171-181.

Cuca, L. E. S; Martinez, J. C. V; Delle Monache, F. Constituyentes quimicos de *Zanthoxylum monophyllum*. *Revista Colombiana de Quimica* **1998**, *27*(2), 17-27.

Czar, M. J.; Welsh, M. J.; Pratt, W. B., Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* **1996**, *70* (4), 322-30.

Damazio, Rosangela Guollo ; Zanatta, Ana Paula ; Cazarolli, Luisa Helena ; Chiaradia, Louise Domeneghini ; Mascarello, Alessandra ; Nunes, Ricardo José ; Yunes, Rosendo Augusto ; Silva, Fátima Regina Mena Barreto . Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, *45*, 1332-1337.

Damazio, Rosangela Guollo ; Zanatta, Ana Paula ; Cazarolli, Luisa Helena ; Mascarello, A. ; Chiaradia, Louise Domeneghini ; Nunes, Ricardo José ; Yunes, Rosendo Augusto ; Silva, Fátima Regina Mena Barreto . Nitrochalcones: Potential in vivo insulin secretagogues. *Biochimie (Paris. Print)*, **2009** *91*, 1493-1498.

Davis S N; Geho B; Tate D; Galassetti P; Lau J; Granner D; Mann S. The effects of HDV-insulin on carbohydrate metabolism in Type 1 diabetic patients. *Journal of diabetes and its complications* **2001**, *15*(5), 227-33.

Delle Monache, F.; D'Albuquerque, I. L.; Chiappeta, A. de A.; De Mello, J. F. A bianthraquinone and 4'-O-methyl-ent-gallo catechin from *Cassia trachypus*. *Phytochemistry* **1992**, *31*(1), 259-261.

Delle Monache, F.; Marquina Mac Quhae, M.; Ferrari, F.; Marini-Bettolo, G. B.; Ferruginin A and B and Ferruanthrone, new triprenylated anthranoids from *Vismia baccifera* var. *Ferruginea*. *Tetrahedron* **1979**, *35*, 2143-2149.

Delle Monache, G.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G. B.; Albuquerque, M. M. F. de; De Mello, J. F.; De Lima, O. G. Flavonoids of *Sophora tomentosa* (Leguminosae). II: Isosophoranone, a new diprenylated isoflavanone. *Gazzetta Chimica Italiana* **1977**, *107*(3-4), 189-193.

Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli, R. B.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossow, M., Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106* (33), 13775-9.

Downing, James R.; Shannon, Kevin M. Acute leukemia: A pediatric perspective. *Cancer Cell* **2002**, *2*(6), 437-445.

Ducki, S., Antimitotic Chalcones and Related Compounds as Inhibitors of Tubulin Assembly. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2009**, *9* (3), 336-347.

Ducki, S.; Rennison, D.; Woo, M.; Kendall, A.; Chabert, J.; McGown, A.; Lawrence, N., Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: Synthesis and biological evaluation of antivasular activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (22), 7698-7710.

Edwards, M.; Stemerick, D.; Sunkara, P., Chalcones - A new class of Antimitotic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **1990**, *33* (7), 1948-1954.

Elchebly, Mounib; Payette, Paul; Michaliszyn, Eva; Cromlish, Wanda; Collins, Susan; Loy, Ailsa Lee; Normandin, Denis; Cheng, Alan; Himms-Hagen, Jean; Chan, Chi-Chung; Ramachandran, Chidambaram; Gresser, Michael J.; Tremblay, Michel L.; Kennedy, Brian P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science (Washington, D. C.)* **1999**, *283*(5407), 1544-1548.

Ferrari, F.; Monacelli, B.; Messina, I. Comparison Between in Vivo and in Vitro Metabolite Production of *Morus nigra*. *Planta Med* **1999**, *65*, 85-87.

Figuroa-Valverde, L.; Diaz-Cedillo, F.; Lopez-Ramos, M.; Garcia-Cervera, E.; Ancona-Leon, J.; Pool-Gomez, J. E. Synthesis of glibenclamide-pregnenolone conjugate and its relationship with physicochemical descriptors log P, π , Rm, Vm, Pc and St. *Asian Journal of Chemistry* **2011**, *23*(9), 3999-4002.

Fugiwara, T.; Horikoshi, H. T. *Life Sciences*, **2000**, *67*, 2405-2416.

Galons, H.; Cave, C.; Miocque, M.; Rinjard, P.; Tran, G.; Binet, P. Antihypertensive hydrazidones: study of acylated 2-chlorobenzylidenehydrazines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1990**, *25*(9), 785-8.

Garnier, C.; Barbier, P.; Gilli, R.; Lopez, C.; Peyrot, V.; Briand, C., Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *250* (2), 414-9.

Gelperina, S.; Kisich, K.; Iseman, M. D. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*, **2005**, *172*(12), 1487-90.

Gerich, John E. Novel insulins: expanding options in diabetes management. *American Journal of Medicine* **2002**, *113*(4), 308-316.

Goetz, A. W.; Kolossvai, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M. J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 11*, University of California, San Francisco, **2012**.

Goodman e Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10ª edição, editora Mc Graw Hill. **2006**.

Grammaticakis, P.; The ultraviolet and visible absorption of pyridine derivatives. II. α -, β -, and γ -Pyridinecarboxaldehydes and their nitrogen derivatives. *Bulletin de la Societe Chimique de France* **1956**, 109-19.

Greaves M F Stem cell origins of leukaemia and curability. *British journal of cancer* **1993**, 67(3), 413-23.

GRID version 22 for LINUX; Molecular Discovery Ltd., Pinner Middlesex HA55NE (UK), <http://www.moldiscovery.com>.

Grundner, C, Perrin, D., Van Huijsduijnen, R. H., Swinnen, D., Gonzalez, J., Gee, C. L., Wells, T. N., Alber, T., Structural basis for selective inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB. *Structure* **2007**, 15(4), 499-509.

Grundner, C.; Cox, J. S.; Alber, T. Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for *Mycobacterium tuberculosis* growth in mice. *FEMS Microbiol Lett.* **2008**, 287(2),181-184.

Grundner, C.; Ng, H.; Alber, T. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. *Structure*, **2005**, 13, 1625-1634.

Grundner, Christoph; Perrin, Dominique; Hooft van Huijsduijnen, Rob; Swinnen, Dominique; Gonzalez, Jerome; Gee, Christine L.; Wells, Timothy N.; Alber, Tom. Structural Basis for Selective Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. *Structure* (Cambridge, MA, United States) **2007**, 15(4), 499-509.

Guido, R. V. C. Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeido-e-fosfato desidrogenase de trypanossoma cruzi: biologia estrutural e quimica medicinal, **2008**. Tese de doutorado. Instituto de Fisica de Sao Carlos, Universidade de Sao Paulo.

Guimaraes, Cristiano Ruch Werneck; Boger, Dale L.; Jorgensen, William L. Elucidation of Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibition by Potent α -Ketoheterocycle Derivatives from Monte Carlo Simulations. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127(49), 17377-17384.
Harvey, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today* **2000**, 5, 294-300.

Hearn, M. J.; Chanyaputhipong, P. Y. Preparation and spectroscopic properties of 3-acyl-1,3,4-oxadiazolines. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1995**, 32(5), 1647-9.

Henquin, Jean-Claude. Pathways in β -cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes* **2004**, 53(Suppl. 3), S48-S58.

Herr I; Debatin K M Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* **2001**, 98(9), 2603-14.

Hestvik, A.L.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. Kinome analysis of host response to mycobacterial infection: A novel technique in proteomics. *Infect Immunology*, **2003**, 71, 5514–5522.

Horner, Leopold; Fernekes, Hans Reaction of hydrazine derivatives and hydrazones with peracetic acid *Chemische Berichte* **1961**, 94, 712-24.

Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. II. The accuracy of ranking poses generated from docking, *Journal of Computational Chemistry*, **2011**, 32, 866-877.

Howard, J. & Hyman, A. A. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2009**, 10, 569-574.

Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* **1995**, 80, 225–236.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>> Acesso em: 23 julho **2012**.

Jin, L.; Chen, J.; Song, B.; Chen, Z.; Yang, S.; Li, Q.; Hu, D.; Xu, R. *Bioorg Med Chem*, **2006**, 16, 5036-5040

Johnson, T. O.; Ermolieff, J.; Jirousek, M. R. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2002, **1**, 696-709.

Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* 1995, **245**, 43-53.

Khalil M. A., El-Sayed, O. A., El-Shamy, H. A. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Novel Oxa(thia)diazolylquinolines and Oxa(thia)diazepino[7,6-*b*] quinolines. *Archiv der Pharmazie (Weinheim, Germany)* 1993, **326** (8), 489-92.

Koul, A.; Choidas A.; Treder M.; Tyagi A. K.; Drlica K.; Singh Y.; Ullrich A. Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**, 5425–5432.

Kumar, Dalip; Sundaree, Swapna; Johnson, Emmanuel O.; Shah, Kavita. An efficient synthesis and biological study of novel indolyl-1,3,4- oxadiazoles as potent anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, **19**(15), 4492-4494.

Kumar, S.; Bawa, S.; Drabu, S.; Kumar, R.; Machawal, L. Synthesis and in vivo anticonvulsant evaluation of 2-chloroquinolinyl hydrazone derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2010, **67**(5), 567-573.

Lachance, H.; Wetzel, S.; Kumar, K.; Waldmann, H. Charting, Navigating, and Populating Natural Product Chemical Space for Drug Discovery. *J. Med. Chem.* 55(13), 5989-6001, 2012.

Lamb J, Crawford ED. The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease *Science* 2006; **313**(29): 1929-1935.

Lamb, Justin. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nature Reviews Cancer* 2007, **7**(1), 54-60.

Lawrence, N. J.; Patterson, R. P.; Ooi, L. L.; Cook, D.; Ducki, S., Effects of alpha-substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, **16** (22), 5844-8.

Lazzarotto, M.; Heinzen, V. E. F.; Yunes, R. A. Optimized modified topliss method: a tool for quantitative structure-activity relationship studies. *Arzneimittelforschung*. **2005**, *5*, 604-615.

Leal, P.C. ; Mascarello, A. ; Derita, M. ; Zuljan, F. ; Nunes, R.J. ; Zacchino, S. ; Yunes, R.A. . Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009** *19*,1793-1796.

Lemke, T. L; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W. **Foye's principles of Medicinal Chemistry**. 6 ed. pp 169. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008.

Lepre, C. A. Library design for NMR-based screening. *Drug Discovery Today*, **2001**, *6*(3), 133-140.

Leszczyniecka, M.; Roberts, T.; Dent, P.; Grant, S.; Fisher, P. B. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacology & Therapeutics* **2001**, *90*(2-3), 105-156.

Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; *98*(1): 31-36.

Licandro, E.; Perdicchia, D., N-acylhydrazines: Future perspectives offered by new syntheses and chemistry. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, (4), 665-675.

Lien, Chia-Ling; Yeh, Shu-Hua; Hsu, Chi-Tung. Lewis acid-mediated nucleophilic addition of dialkylphosphite to C=N double bond of hydrazones. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements* **2009**, *184*(3), 543-549.

LigPrep version 2.5, Maestro version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2011**.

Lindholm, A. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **2002**, *16*, 475-492.

Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, *23*, 3-25.

Liu, Hui Yan; Wang, Hai Ying; Gao, Feng; Lu, Zai Sheng; Niu, De Zhong. 5-Bromosalicylaldehyde benzoylhydrazone. *Acta Crystallographica, Section E: Structure Reports Online* **2006**, *62*(10), 4495-4496.

Locatelli, C.; Carvalho, D.R.; Mascarello, A. ; Cordova, C.A.S.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Pilati, C.; Creczynski-Pasa, T. B. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. *Investigational New Drugs* **2011**.

Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6752–6756.

Luo, Y.; Hradil, V. P.; Frost, D. J.; Rosenberg, S. H.; Gordon, G. B.; Morgan, S. J.; Gagne, G. D.; Cox, B. F.; Tahir, S. K.; Fox, G. B., ABT-751, a novel tubulin-binding agent, decreases tumor perfusion and disrupts tumor vasculature. *Anticancer Drugs* **2009**, *20* (6), 483-92.

Maccioni, E.; Alcaro, S.; Cirilli, R.; Vigo, S.; Cardia, M. C.; Sanna, M. L.; Meleddu, R.; Yanez, M.; Costa, G.; Casu, L. 3-Acetyl-2,5-diaryl-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles: a new scaffold for the selective inhibition of monoamine oxidase B. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, *54*(18), 6394-6398.

Madhurantakam, C.; Chavali, V. R. M.; Das, K. A. Analyzing the catalytic mechanism of MptpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* through site-directed mutagenesis. *Proteins*, **2007**, *71*, 706-714.

Manger, M.; Scheck, M.; Prinz, H.; Von Kries, J. P.; Langer, T.; Saxena, K.; Schwalbe, H.; Fuerstner, A.; Rademann, J.; Waldmann, H. *ChemBioChem*. **2005**, *6*, 1749-1753.

Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet*. **1999** 17, 35,197-202.

Marini-Bettòlo, G. B.; Delle Monache, F; Biocca, E. Sulle sostanze allucinogene dell'Amazônia. *Annali di Chimica* **1964**, 54, 1179-1186.

Marshall, G. R. Introduction to chemioinformatics in drug discovery – A personal view. In: Oprea, T. I. **Chemoinformatics in Drug Discovery**. Weinheim: WILEY-VCH, 2004, p. 1-22

Mascarello, A. Síntese e Avaliação da atividade anti-leishmania de chalconas derivadas do 1-naftaldeído. Florianópolis, **2006**. 52p. *Trabalho de Conclusão de Curso – Química*, UFSC.

Mascarello, A. Síntese e estudos da relação estrutura-atividade de chalconas biologicamente ativas em células de melanoma B16-F10 e na PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*. Florianópolis, **2009**. 89 pp. *Dissertação de Mestrado em Química – Programa de Pós-Graduação em Química*, UFSC.

Mascarello, A; Chiaradia, L D; Vernal, J; Villarino, A; Guido, R V C.; Perizzolo, P; Poirier, V; Wong, D; Martins, P G A; Nunes, R J; Yunes, R A; Andricopulo, A D; Av-Gay, Y; Terenzi, H. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18(11), 3783-3789.

Mascarello, A. ; Nunes, R. J. ; Yunes, R. A. ; Stumpf, T. R.; Leal, P. C. ; Yunes, J. A.; Melo, C. P. S. ; Canevarolo, R. R. ; Chiaradia, L. D. Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA). **2011**, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI1107312-8, data de depósito: 25/11/2011. Instituição financiadora: Universidade Federal de Santa Catarina.

Mansi J L; Gogas H; Bliss J M; Gazet J C; Berger U; Coombes R C Outcome of primary-breast- cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* **1999**, 354(9174), 197-202.

Mauer, A. M.; Cohen, E. E.; Ma, P. C.; Kozloff, M. F.; Schwartzberg, L.; Coates, A. I.; Qian, J.; Hagey, A. E.; Gordon, G. B., A phase II study of ABT-751 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **2008**, 3 (6), 631-6.

Mazzone, G.; Bonina, F.; Puglisi, G.; Panico, A. M.; Arrigo Reina, R. 2,5-Diaryl-substituted 1,3,4-oxadiazoles: synthesis and preliminary pharmacological research. *Farmaco* **1984**, 39(5), 414-20.

MC MURRY, J. **Química Orgânica**. v.1 e 2, 6 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, **2005**.

Mielcke, T.R.; Mascarello, A.; Filippi-Chiela, E.; Zanin, R.F.; Lenz, G.; Leal, P. C.; Chirardia, L. D.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Battastini, A.M.O. ; Morrone, F. B. ; Campos, M. M. Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 48, 255-264.

Moitessier, N.; Englebienne, P.; Lee, D.; Lawandi, J.; Corbeil, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *J Pharmacol.* **2008**, 153(S1): S7–S26.

Molino A; Pelosi G; Micciolo R; Turazza M; Nortilli R; Pavanel F; Cetto G L Bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* **1999**, 58(2), 123-30.

Mori, M.; Manetti, F.; Botta, M. Predicting the Binding Mode of Known NCp7 Inhibitors To Facilitate the Design of Novel Modulators. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 446-454.

Mori, M.; Schult-Dietrich, P.; Szafarowicz, B.; Humbert, N.; Debaene, F.; Sanglier-Cianferani, S.; Dietrich, U.; Mely, Y.; Botta, M. Use of virtual screening for discovering antiretroviral compounds interacting with the HIV-1 nucleocapsid protein. *Virus Research* **2012**, in press.

Musbah M O; Furman B L. In vitro metabolic effects of gliclazide and glibenclamide in the rat. *Journal of pharmacy and pharmacology* **1980**, 32(8), 550-3.

Nam, N. H., Combretastatin A-4 analogues as antimetabolic antitumor agents. *Curr Med Chem* **2003**, *10* (17), 1697-722.

Nauyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Zaharevitz, D. W.; Day, B. W.; Wipf, P.; Hamel, E.; Gussio, R., A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J Med Chem* **2005**, *48* (19), 6107-16.

Navarini, A. L. F. ; Chiaradia, I. D. ; Mascarello, A. ; Fritzen, M. ; Nunes, R. J. ; Yunes, R. A. ; Creczynski Pasa, T. B. Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, *44*, 1630-1637.

Neuenfeldt, Patrícia D. ; Drawanz, Bruna B. ; Siqueira, Geonir M. ; Gomes, Claudia R.B. ; Wardell, Solange M.S.V. ; Flores, Alex F.C. ; Cunico, Wilson . Efficient solvent-free synthesis of thiazolidin-4-ones from phenylhydrazine and 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Tetrahedron Letters*, **2010**, *51*, 3106-3108.

Noldin, V. F; Cechinel, V. F.; Delle Monache, F; Benassi, J. C; Christmann, I. L; Pedrosa, R. C.; Yunes, R. A. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivated in Brazil. *Quimica Nova* **2003**, *26*(3), 331-334.

Nören-Müller, A.; Reis-Corrêa, I. Jr.; Prinzh, H.; Rosenbaum, C.; Saxena, K.; Schwalbe, H. J.; Vestweber, D.; Cagna, G.; Schunk, S.; Schwarz, O.; Schiewe, H.; Waldmann, H. Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2006**, *103*(28), 10606-10611.

Nunes, R. J. The Chemistry and Biological Activity Of Cyclic Imidobenzenesulfonyl Derivatives. Hatfield: Hatfield Polytechnic, **1986**, 212 pp. *Phd Thesis In Organic Chemistry*.

O'Boyle, N. M.; Liebeschuetz, J. W.; Cole, J. C Testing Assumptions and Hypotheses for Rescoring Success in Protein-Ligand Docking. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*(8), 1871–1878.

Oliveira, K. N.; Chiaradia, L. D.; Martins, P. G. A.; Mascarello, A.; Cordeiro, M. N.; Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Yunes, R. A.;

Nunes, R. J.; Vernal, J.; Terenzi, H. Sulfonyl-hydrazones of cyclic imides derivatives as potent inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (PtpB). *MedChemComm* **2011**, 2, 500–504.

Panchagnula, R.; Agrawal, S.; Ashokraj, Y.; Varma, M.; Sateesh, K.; Bhardwaj, V.; Bedi, S.; Gulati, I.; Parmar, J.; Kaul, C. Lal; Blomberg, B.; Fourie, B.; Roscigno, G.; Wire, R.; Laing, R.; Evans, P.; Moore, T. Fixed dose combinations for tuberculosis: Lessons learned from clinical, formulation and regulatory perspective. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **2004**, 26(9), 703-721.

Pandya, G A; Holmes, M M; Sunkara, S; Sparks, A; Bai, Y; Verratti, K; Saeed, K; Jarrahi, B; Fleishmann, R D; Peterson, SN. A bioinformatics filter for improved base-call accuracy and polymorphism detection using the Affymetrix GeneChip whole-genome resequencing platform, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35(21):e148.

Patani, G. A.; Lavoie, E. J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147-3176.

PATRICK, G. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 3ed, New York: Oxford University Press Inc, **2005**, 345p; 213 p.

Pedrini, F. S.; Chiaradia, L. D. ; Licinio, M. A. ; Moraes, A. C. R. ; Curta, J. C. ; Mascarello, A.; Pasa, T. B. C. ; Nunes, R. J. ; Yunes, R. A. ; Santos-Silva, M. C. . Induction of apoptosis and cell cycle arrest in L-1210 murine lymphoblastic leukemia cells by (2E)-3-(2-naphthyl)-1-(3-methoxy-4 -hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one (*in press*). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2010**, 62(9), 1128-36.

Pein F; Vassal G; Sakiroglu C; Tournade M F; Lemerle J Pediatric aspects of anthracycline cardiotoxicity and practical implications for prevention. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **1995**, 2(10), 988-99.

Perfetti, R.; Ahmad, A. *Trends In Endocrinology and Metabolism*, **2000**, 11, 218-223.

Pessin J E; Thurmond D C; Elmendorf J S; Coker K J; Okada S Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. *The Journal of biological chemistry* **1999**, 274(5), 2593-2596.

Pinheiro, R. M.; Marquina Mac Quhae, M.; Marini Bettolo, G. B.; Delle Monache F. Prenylated Anthranoids from *Vismia* species. *Phytochem.* **1984**, *24*, 1737-1740.

Plasschaert, Sabine; Van Der Kolk, Dorina; De Bont, Eveline; Vellenga, Edo; Kamps, Willem; De Vries, Elisabeth. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Acute Leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **2004**, *45*(4), 649-654.

Pol-Fachin, L.; Fraga, C. A.; Barreiro, E. J.; Verli, H., Characterization of the conformational ensemble from bioactive N-acylhydrazone derivatives. *J Mol Graph Model* **2010**, *28* (5), 446-54.

Pouralimardan, O.; Chamayou, A.; Janiak, C.; Hosseini-Monfared, H.. Hydrazone Schiff base-manganese(II) complexes: Synthesis, crystal structure and catalytic reactivity. *Inorganica Chimica Acta*, **2007**, *360*(5), 1599-1608.

QikProp, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2011**.

Ramsland, P. A. Antibodies as Targets and Tools in Combinatorial Chemistry. [In: Comb. Chem. High Throughput Screening, **2001**; 4(5)]

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M; Moore, P. K. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2004**. 703 p.

Rastelli, G.; Degliesposti, G.; Del Rio, A.; Sgobba, M. Binding estimation after refinement, a new automated procedure for the refinement and rescoring of docked ligands in virtual screening. *Chemical biology & drug design* **2009**, *73*(3), 283-6.

Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M., Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428* (6979), 198-202.

Rawls, K. A.; Lang, P. T.; Takeuchi, J.; Imamura, S.; Baguley, T. D.; Grundner, C.; Alber, T.; Ellman, J. A. Fragment-based discovery of selective inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine

phosphatase PtpA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, *19*, 6851-6854.

Redmond, T.; Sanchez, E. R.; Bresnick, E. H.; Schlesinger, M. J.; Toft, D. O.; Pratt, W. B.; Welsh, M. J., Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur J Cell Biol* **1989**, *50* (1), 66-75.

Robinson, B. Fischer indole synthesis. *Chem. Rev.* **1963**, *4*, 373-401.

Rosak Christoph. The pathophysiologic basis of efficacy and clinical experience with the new oral antidiabetic agents. *Journal of diabetes and its complications* **2002**, *16*(1), 123-32.

Ruiz-Manzano, J.; Blanquer R.; Calpe J. L.; Caminero J. A.; Caylà J.; Domínguez J.A.; García J. M.; Vidal R. Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Arch Bronconeumol.* **2008**, *44*(10), 551-566.

Russ, U.; Lange, U.; Löffler-Walz, C.; Hambrock, A.; Quast, U. Interaction of the sulfonylthiourea HMR 1833 with sulfonylurea receptors and recombinant ATP-sensitive K⁺ channels: comparison with glibenclamide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *299*(3), 1049-1055.

Salum, L. B.; Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais, 220 pp.**2012**.

Samus, N. M.; Tsapkov, V. I.; Kuracheva, S. A.; Burdenko, T. A. Synthesis and antimicrobial activity of coordination compounds of 3d-elements with some hydrazones derived by using 5-nitro-2-furaldehyde. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **1994**, *28*(12), 41-44.

Sanchez, E. R.; Redmond, T.; Scherrer, L. C.; Bresnick, E. H.; Welsh, M. J.; Pratt, W. B., Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. *Mol Endocrinol* **1988**, *2* (8), 756-60.

Santos, R.; Hritz, J.; Oostenbrink, C. Role of Water in Molecular Docking Simulations of Cytochrome P450 2D6. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 146-154.

Schneider, S.; Ueberberg, S.; Korobeynikov, A.; Schechinger, W.; Schwanstecher, C.; Schwanstecher, M.; Klein, H. H.; Schirmacher, E. Synthesis and evaluation of a glibenclamide glucose-conjugate: a potential new lead compound for substituted glibenclamide derivatives as islet imaging agents. *Regulatory Peptides* **2007**, 139(1-3), 122-127.

Seo, W. D.; Kim, J. H.; Kang, J. E.; Ryu, H. W.; Curtis-Long, M. J.; Lee, H. S.; Yang, M. S.; Park, K. H. *Bioorg Med Chem Lett*, **2005**, 15(24), 5514-5516.

Shan, D.; Chen, L.; Njardarson, J. T.; Gaul, C.; Ma, X.; Danishefsky, S. J.; Huang, X. Y., Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102 (10), 3772-6.

Shehata, I. A.; Nasr, M. N.; El-Subbagh, H. I.; Gineinah, M. M.; Kheira, S. M.; *Sci. Pharm.* **1996**, 64, 133.

Siemann, D. W.; Chaplin, D. J.; Walicke, P. A., A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). *Expert Opin Investig Drugs* **2009**, 18 (2), 189-97.

Singh, R.; Rao, V.; Shakila, H.; Gupta, R.; Khera, A.; Dhar, N.; Singh, A.; Koul, A.; Singh, Y.; Naseema, M.; Narayanan, P. R.; Paramasivan, C.N.; Ramanathan, V. D.; Tyagi, A. K. Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. *Mol. Microbiol.* **2003**, 50(3), 751-762.

Small et al, Nature reviews molecular cell biology, 3, 12, 957-964, **2002**.

Somogyi, L.. Synthesis, oxidation and dehydrogenation of cyclic N,O- and N,S-acetals. Part III. Transformation of N,O-acetals: 3-acyl-1,3,4-oxadiazolines. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2007**, 44(6), 1235-1246.

Stamm, L. M.; Morisaki J. H.; Gao L. Y.; Jeng R. L.; Mcdonald, R. L.; Roth R.; Takeshita S.; Heuser J.; Welch M. D.; Brown E. J. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility, *Journal of Experimental Medicine*, **2003**, 198, 1361–1368.

Sturgill-Koszycki, S.; Schaible, U.; Russell, D. G. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO Journal*, **1996**, *15*(24), 6960-6968.

Subramanian A, Kuehn H, Gould J, Tamayo P, Mesirov JP. GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics*. **2007**, *23*(23), 3251-3.

Teitelbaum, R.; Cammer M.; Maitland M. L.; Freitag N. E.; Condeelis J.; Bloom B. R *Mycobacterial infection* of macrophages results in membrane-permeable phagosomes, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **1999**, 15190–15195.

The Global Pan to stop TB **2011-2015**, <http://www.stoptb.org/global/plan/>.

Tonks, N. K., E Neel B. G. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* **1996**, *87*, 365–368.

Trani, M.; Carbonetti, A.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. brevipetiolata. *Fitoterapia* **2004**, *75*(1), 99-102.

Trani, M.; Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Yunes, R. A.; Falkenberg, D. Dihydrochalcones and coumarins of *Esembeckia grandiflora* subsp. Grandiflora. *Gazz. Chim. Ital.* **1997**, *127*, 415-418.

Troeberg, Linda; Chen, Xiaowu; Flaherty, Terrence M.; Morty, Rory E.; Cheng, Maosheng; Hua, Huiming; Springer, Clayton; McKerrow, James H.; Kenyon, George L.; Lonsdale-Eccles, John D.; Coetzer, Theresa H. T.; Cohen, Fred E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei* brucei. *Molecular Medicine (New York)* **2000**, *6*(8), 660-669.]

Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A., Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J Med Chem* **2006**, *49* (11), 3033-44.

Tsiani E, Ramlal T, Leiter LA, Klip A, Fantus IG. Stimulation of glucose uptake and increased plasma membrane content of glucose transporters in L6 skeletal muscle cells by the sulfonylureas gliclazide and gliburide. *Endocrinology*. **1995**, *136*(6), 2505-12.

Verdonk, M. L.; Chessari, G.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Nissink, J. W. M.; Taylor, R. D.; Taylor, R. Modeling Water Molecules in Protein-Ligand Docking Using GOLD. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6504-6515.

Viele, C. S. Diagnosis, treatment and nursing care of acute leukemia. *Seminars in Oncology Nursing*, **2003**, *19*(2), 98-108.

Vigneri, Paolo; Frasca, Francesco; Sciacca, Laura; Pandini, Giuseppe; Vigneri, Riccardo. Diabetes and cancer. *Endocrine-Related Cancer* **2009**, *16*(4), 1103-1123.

Vigorita, Maria Gabriella; Ottana, Rosaria; Zappala, Carmela; Maccari, Rosanna; Pizzimenti, Francesco C.; Gabbrielli, Gabriele. Halogenated isoniazid derivatives as possible antimycobacterial and anti-HIV agents - III. *Farmaco* **1994**, *49*(12), 775-81.

Vlaovic, Djordje; Cetkovic, Gordana; Juranic, Ivan; Balaz, Jelica; Lajsic, Stevan; Djokovic, Dejan. The application of levulinic acid and 5-nitro-2-furylmethylene diacetate in the total synthesis of some novel biologically active (5-nitro-2-furyl)azomethines. *Monatshefte fuer Chemie* **1990**, *121*(11), 931-9.

Vogt, A.; McPherson, P. A.; Shen, X.; Balachandran, R.; Zhu, G.; Raccor, B. S.; Nelson, S. G.; Tsang, M.; Day, B. W., High-content analysis of cancer-cell-specific apoptosis and inhibition of in vivo angiogenesis by synthetic (-)-pironetin and analogs. *Chem Biol Drug Des* **2009**, *74* (4), 358-68.

Wander, G. The hesperidin of some plants. *Pharmaceutical Journal* **1925**, *115*, 520.

Wang, R., Lu, Y., Wang, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *Journal Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2287.

Wang, Z.; McPherson, P. A.; Raccor, B. S.; Balachandran, R.; Zhu, G.; Day, B. W.; Vogt, A.; Wipf, P., Structure-activity and high-content imaging analyses of novel tubulysins. *Chem Biol Drug Des* **2007**, *70* (2), 75-86.

Wani, Mansukhlal C.; Taylor, Harold Lawrence; Wall, Monroe E.; Coggon, Philip; McPhail, Andrew T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*(9), 2325-7.

Weis, F.; Moullintraffort, L.; Heichette, C.; Chrétien, D.; Garnier, C., The 90-kDa heat shock protein Hsp90 protects tubulin against thermal denaturation. *J Biol Chem* **2010**, *285* (13), 9525-34.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 3 ed, Amsterdam: Elsevier, 2008.

Westbrook, J., Feng, Z., Chen, L., Yang, H., Berman, H. M. The Protein Data Bank and structural genomics. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 489.

WHO. Disponível em:
<http://who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/index.html>. Acesso em: 23 julho **2012**.

Wolber, G.; Langer, T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 160-169.

Wu Kenneth K. Aspirin and other cyclooxygenase inhibitors: new therapeutic insights. *Seminars in vascular medicine* **2003**, *3*(2), 107-12.

Yarrow, J. C.; Perlman, Z. E.; Westwood, N. J.; Mitchison, T. J., A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol* **2004**, *4*, 21.

Yue, P. Y.; Leung, E. P.; Mak, N. K.; Wong, R. N., A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J Biomol Screen* **2010**, *15* (4), 427-33.

Yunes, R. A.; Cechinel-Filho, V. Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco

segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (ed.). *Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, **2001**. 1, 22-29.

Yuriev, Elizabeth; Kong, David C. M.; Iskander, Magdy N. Investigation of structure-activity relationships in a series of glibenclamide analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 39(10), 835-847.

Zhang Shu-Dong; Gant Timothy W A simple and robust method for connecting small-molecule drugs using gene-expression signatures. *BMC bioinformatics* **2008**, 9, 258.

Zhang, H.B.; Zhang, Y.A.; Wu, G.Z.; Zhou, J.P.; Huang, W.L.; Hu, X.W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1740-1744.

Zhang, Hui-bin; Zhang, Ya-an; Wu, Guan-zhong; Zhou, Jin-pei; Huang, Wen-long; Hu, Xiao-wen. Synthesis and biological evaluation of sulfonylurea and thiourea derivatives substituted with benzenesulfonamide groups as potential hypoglycemic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19(6), 1740-1744.

Zhao, Zhen-dong; Wang, Yu-min; Chen, Yu-xiang; Bi, Liang-wu. (E)-N'-(5-Bromo-2-hydroxybenzylidene)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide *Acta Crystallographica, Section E: Structure Reports Online*, **2008**, 22(64), 2408.

Zhou, B.; He, Y.; Zhang, X.; Xu, J.; Luo, Y.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Yang, Z.; Chan, R. J.; Liu, Y.; Zheng, J.; Zhang, Z. Y. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107(10), 4573-4578.

ANEXOS

ANEXO 1

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos inéditos sintetizados.

ANEXO 2

Nomenclatura dos compostos sintetizados.

ANEXO 3

Certificado de depósito de patente

ANEXO 4

Carta Prof. Bruno Botta (Sapienza – Roma)

ANEXO 5

Lista dos artigos da tese;

Lista dos artigos correlacionados com a tese;

Lista dos demais artigos publicados no período da tese;

Lista de resumos publicados em congressos no período da tese.