

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Síntese e avaliação da atividade biológica de derivados quinolínicos

DENISE DIEDRICH

PORTO ALEGRE, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Síntese e avaliação da atividade biológica de derivados quinolínicos

Tese apresentada por **Denise Diedrich** para a
obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Co-Orientador: Prof. Dr Pierre Van de Wegue

Porto Alegre, 2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14.12.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Paula Duarte de Souza

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Dione Silva Corrêa

Universidade Luterana do Brasil

Profa. Dr. Gloria Narjara Santos da Silva

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Profa. Dr. Josiane Moraes dos Santos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Diedrich, Denise

Síntese e avaliação da atividade biológica de derivados quinolínicos / Denise Diedrich. -- 2018. 236 f.

Orientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.

Coorientadora: Pierre Van de Wegue.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Quinolina. 2. Skraup-Doebner-von Miller. 3. Reação de Heck. 4. Antitumoral. 5. Antifúngico. I. Gnoatto, Simone Cristina Baggio, orient. II. Van de Wegue, Pierre, coorient. III. Título.

Agradecimentos ao CNPq e à Capes pelo financiamento para o desenvolvimento deste trabalho. Agradecimento aos laboratórios que disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos, em especial ao Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica – LaFiS, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Agradecimentos também à Escola de Doutorado e Ciência dos Materiais, da equipe de Produtos Naturais, síntese e química medicinal (PNSCM) - Universidade de Rennes 1, França. Agradecimentos ao Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. Por fim, agradecimentos ao Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Gostaria através destes agradecimentos lembrar de maneira carinhosa as muitas pessoas que colaboraram para que a conclusão desta tese de doutorado se concretizasse.

Agradeço, primeiramente a Deus, pela vida, pelos aprendizados, pelos desafios e, finalmente, pela força para superá-los.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais que fizeram muitos sacrifícios para que eu pudesse estudar e que ao longo dos anos se encheram de orgulho por almejar uma filha “Doutora”. Ao meu querido irmão Volnei, meu exemplo, que muito me ajudou de diversas formas. Ao meu irmão Giovani, minha cunhada Ângela pelo apoio também nas mais diversas formas, seja financeiramente ou na forma de motivação. Ao meu irmão Paulo, pelo exemplo que me deu em minha infância. Aos meus sobrinhos, João, Giovanna e Helena que aquecem meu coração com amor infinito!

Agradeço ao meu noivo Maicon que me motivou sempre, que me incentivou a continuar nesta caminhada, compartilhou minhas angústias, que me deu carinho e amor quando eu precisei.

Agradeço às minhas amadas tias Lara e Elvira que por muitos anos me proporcionaram um lar, aconchego, carinho e mimos que não tenho como agradecer. Obrigada tia Lara pelos conselhos, puxões de orelha e pelos intervalos saudáveis vendo Grey’s Anatomy. Obrigada tia Elvira pelas longas conversas, músicas zens e pequenos agrados como levar um mate quente e chocolate.

Obrigada também às minhas primas Ariana, Daniela, Marina e Luiza, Odete pelo apoio em muitos momentos.

Obrigada aos meus amigos que me apoiaram muito: Francine, Larissa e Angélica. Obrigada aos meus amigos – colegas que além da amizade me apoiaram, ensinaram e me ajudaram diretamente na construção deste trabalho: Nádia, Lucimara, Elenilson, Diego, Bruna, Jéssica, Viviane, Henrique, Rafael, Vianey, Thanh e Thaís. Não é possível colocar nesse espaço tudo que já fizeram por mim pessoal e profissionalmente. Obrigada também aos Pós-docs com os quais convivi e que me ensinaram muitas coisas: Josiane, Marcela e Cedric.

Obrigada à minha terapeuta e amiga Silvana Severo, que me acompanhou durante anos, dando apoio e me fazendo ser uma pessoa melhor em muitos sentidos. Obrigada sempre, nunca poderei retribuir tua atenção e teu amor.

Obrigada aos meus amigos que fiz em Rennes durante o doutorado sanduíche, vocês foram muito importantes para mim: Glênda, Warley, Mariana, Samuel (ainda na barriga da mamãe), Janine, Ederson, Benício, Rodrigo e Mari.

Obrigada à toda a IASD de Rennes pelo carinho, aconchego, amor e paz que me proporcionou, em especial a Samanta, Stacy, Danitza, Morgana, Liliane e Arnold. Agradeço também a IASD da Morada do Vale I, obrigada pelo carinho e amor de todos, em especial à Pâmella, Aureluci, Leonilda, Elvira e Bia.

Agradeço a Liane Speck e a professora Dr^a Ana Bergold pelo apoio em momentos difíceis, pela partilha de fé e orações.

Agradeço aos meus empregadores Daniel Trajano e Carla Gláuçe pela colaboração e flexibilidade nos horários que permitiram finalizar a escrita desta tese.

Agradeço aos professores Dr. Pierre van de Wegue e Dr. Mickael Jean, meus tutores do doutorado sanduíche. Agradeço pelos ensinamentos, desafios e principalmente pela oportunidade concedida.

Agradeço à professora Dr^a Grace Gosmann pelos inúmeros ensinamentos e oportunidades. Agradeço também ao professor Dr. Saulo Andrade pelas diversas dicas de síntese além das colaborações realizadas. Agradeço também à brilhante professora Dr^a Aline Zimmer, uma inspiração para mim.

Agradeço ao professor Dr. Alexandre Fuentefria e sua aluna de doutorado Gabriela Machado pela colaboração estabelecida na avaliação da atividade antifúngica, no Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmacia - UFRGS.

Agradeço ao professor Diogo A. Pilger e sua aluna de mestrado Julia Willing pela colaboração estabelecida na avaliação da atividade antitumoral no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Faculdade de Farmacia - UFRGS.

Por fim e de maneira muito especial, agradeço minha orientadora professora Dr^a Simone Cristina Baggio Gnoatto, que além de uma profissional excelente é uma pessoa maravilhosa, como um coração justo e amoroso.

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

“Education is the most powerful weapon which you can use to change the world.”

Nelson Mandela (1918-2013)

RESUMO

O desenvolvimento de novos fármacos tem sido uma busca constante e progressiva ao longo do tempo. Doenças com alta incidência e deficiências no tratamento como o câncer e infecções causadas por fungos tem alcançado significativa relevância e carecem de pesquisas constantes a fim de desenvolver novos medicamentos para trata-las. Desta maneira, este trabalho buscou desenvolver novas metodologias sintéticas para obtenção de moléculas bioativas baseadas no núcleo quinolínico, assim como avaliar a atividade biológica das mesmas frente a linhagens tumorais e cepas de fungos leveduriformes e dermatófilos. A partir dos resultados é possível concluir que as metodologias desenvolvidas possibilitaram a síntese 9 quinolinas cujas estruturas foram identificadas através de RMN e espectroscopia de massas. As quinolinas estudadas apresentaram atividade antitumoral, levando-se em consideração a potência e eficácia das moléculas testadas. Além disso nos estudos de mecanismo de morte, a maioria das moléculas induziu a morte celular através de apoptose. É possível destacar as quinolinas Q11 e Q12 quanto a atividade citotóxica frente as linhagens tumorais e ótimos índices de seletividade (SI) superiores a 10 para Q11 e entre 1,5-3 para a Q12. Quanto aos valores ADMET, as simulações *in silico* demonstraram que a maioria das quinolinas em estudo tem grande probabilidade de biodisponibilidade oral, permeação da barreira hemato-encefálica sem ser substrato para glicoproteína-P, o que representa características muito desejáveis. Por fim, a partir da avaliação da atividade antifúngica foi possível observar que as quinolinas apresentam atividade antifúngica frente a leveduras e dermatófilos. A quinolina Q11 foi ativa frente a praticamente todas as cepas de cândida testadas com CIM de 50 µg/mL e com SI de 2. Já frente a dermatófilos as quinolinas mais ativas foram a Q13 e Q14 que obtiveram CIM de 12,5 a 25 µg/mL e 50 µg/mL respectivamente. Quanto ao SI as quinolinas Q13 e Q14 também alcançaram resultados excelentes com valores de SI de 12 e 6 respectivamente.

Palavras-chave: Antitumoral, Antifúngico, Quinolina, Heck, Skraup-Doebner-von Miller.

ABSTRACT

The development of new drugs has been a constant and progressive search over time. Diseases with high incidence and deficiencies in treatment such as cancer and fungal infections have reached significant relevance and require constant research in order to develop new drugs to treat them. In this way, this work sought to develop new synthetic methodologies to obtain bioactive molecules based on the quinolinic nucleus, as well as to evaluate the biological activity of the same against tumoral strains and yeast and dermatophile fungi strains. From the results it is possible to conclude that the methodologies developed allowed the synthesis of 9 quinolines whose structures were identified through NMR and mass spectroscopy. The quinolines studied showed antitumor activity. Furthermore, in the death mechanism studies, most molecules induced cell death through apoptosis. It is possible to highlight the Q11 and Q12 quinolines in relation to cytotoxic activity against tumor lines and excellent selectivity indexes (SI) higher than 10 for Q11 and between 1.5-3 for Q12. As for the ADMET values, the *in silico* simulations demonstrated that most of the quinolines under study have a high probability of oral bioavailability, permeation of the blood-brain barrier without being substrate for P-glycoprotein, which represents very desirable characteristics. Finally, from the evaluation of the antifungal activity it was possible to observe that the quinolines present antifungal activity against yeasts and dermatophiles. Quinoline Q11 was active against virtually all strains tested with MIC of 50 μg / mL and SI of 2. Already to dermatophiles the most active quinolines were Q13 and Q14, which obtained MICs of 12.5 to 25 μg / ml and 50 μg / ml respectively. As for SI, quinolines Q13 and Q14 also achieved excellent results with SI values of 12 and 6, respectively.

Keywords: Antitumor, Antifungal, Quinoline, Heck, Skraup-Doebner-von Miller.

RESUMÉ

Le développement de nouveaux médicaments a été une recherche constante et progressive au fil du temps. Les maladies à incidence élevée et les carences de traitement, telles que le cancer et les infections fongiques, ont désormais une pertinence significative et nécessitent des recherches constantes afin de développer de nouveaux médicaments pour les traiter. De cette manière, ces travaux visaient à développer de nouvelles méthodologies de synthèse pour obtenir des molécules bioactives basées sur le noyau quinolinique, ainsi qu'à évaluer l'activité biologique de celles-ci contre les souches tumorales et les souches de champignons de levure et de dermatophiles. A partir des résultats, il est possible de conclure que les méthodologies développées ont permis la synthèse de 9 quinoléines dont les structures ont été identifiées par RMN et spectroscopie de masse. Les quinoléines étudiées ont montré une activité antitumorale. De plus, dans les études sur le mécanisme de la mort, la plupart des molécules ont induit la mort cellulaire par apoptose. Il est possible de mettre en évidence les quinolines Q11 et Q12 en relation avec l'activité cytotoxique contre les lignées tumorales et avec d'excellents indices de sélectivité (IS) supérieurs à 10 pour Q11 et compris entre 1,5 et 3 pour Q12. En ce qui concerne les valeurs ADMET, les simulations in silico ont montré que la plupart des quinoléines étudiées présentaient une probabilité élevée de biodisponibilité orale, de pénétration de la barrière hémato-encéphalique sans constituer de substrat pour la glycoprotéine P, ce qui représente des caractéristiques très souhaitables. Enfin, l'évaluation de l'activité antifongique a permis de constater que les quinoléines présentaient une activité antifongique contre les levures et les dermatophiles. La quinoléine Q11 était active contre pratiquement toutes les souches testées avec une CMI de 50 µg / mL et une IS de 2. Déjà pour les dermatophiles, les quinoléines les plus actives étaient les Q13 et Q14, qui obtenaient des CMI de 12,5 à 25 µg / ml et de 50 µg / ml respectivement. En ce qui concerne l'IS, les quinolines Q13 et Q14 ont également obtenu d'excellents résultats avec des valeurs d'IS de 12 et 6, respectivement.

Mots-clés: antitumor, antifongique, quinoléine, Heck, Skraup-Doebner-von Miller.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do núcleo quinolínico (1).	33
Figura 2. Estrutura da quinina (2).....	37
Figura 3. Alcalóide quinolínico Camototecina (3) e seus derivados: Irinotecan (4) e Topotecan (5)...	38
Figura 4. Estrutura da papaverina, alcalóide isoquinolínico extraído do ópio.	38
Figura 5. Principais atividades biológicas atribuídas a moléculas com núcleo quinolínico.	39
Figura 6. Fármacos disponíveis na terapêutica que apresentam o núcleo quinolínico	42
Figura 7. Número de publicações encontradas nos últimos 20 anos com as palavras-chaves "quinoline" and "cancer"..	46
Figura 8. Fármacos antitumorais com núcleo quinolínico: Exatecana (28).e Tipifarnibe (29).....	47
Figura 9. Quinolinas inibidoras da topoisomerase sob investigação clínica.....	49
Figura 10. Inibidores da quinase à base de quinolina que estão sob pesquisa clínica	50
Figura 11. Número de publicações encontradas nos últimos 20 anos com as palavras-chaves "quinoline" and "antifungal"	51
Figura 12. Estrutura da 8-hidroxiquinolina e seus derivados com atividade antifúngica.	52
Figura 13. Estrutura no Quinoxifen®, um fungicida com núcleo quinolínico.	52
Figura 14. 8-Hidroxiquinolinas e seus derivados com atividade antifúngica.	53
Figura 15. Esqueleto quinolínico (66) com promissora atividade antifúngica.....	53
Figura 16. Estrutura dos derivados da lavendamicina e estreptonitrina com potente atividade antifúngica.	54
Figura 17. Fases de desenvolvimento de um fármaco.....	55
Figura 18. Novas aprovações de fármacos (pontos), e despesas com P & D farmacêutica nos Estados Unidos de 1963 a 2008..	56
Figura 19. Esquema resumido demonstrando a biodisponibilidade oral em humanos	57
Figura 20. Estratégias de desenvolvimento de novos fármacos com foco na otimização da potência (a) e na otimização da potência, concomitante às propriedades ADME (b).....	58
Figura 21. (A) Correlação entre a atividade biológica e lipofilicidade. (B) Correlação entre o logP calculado (cLogP) e o logP predito. (C) Distribuição do logP calculado nos principais fármacos disponíveis.....	60

Figura 22. Morfologia do trato gastrointestinal humano e valores de pH em diferentes partes.....	61
Figura 23. (A) Distribuição do logS estimado entre os principais fármacos disponíveis. (B) correlação entre o logS estimado e experimental.	62
Figura 24. Diferentes tipos de aceptores e doadores de Michael, e seus respectivos adutos.....	77
Figura 25. Espectro de ¹ H RMN da 6-Br-4-metilquinolina.....	84
Figura 26. Espectro de RMNq de ¹ H. As áreas destacadas em verde correspondem aos sinais relativos ao padrão DNB. As áreas destacadas em laranja representam os sinais relativos à quinolina.	93
Figura 27. Espectro de RMNq de ¹ H. As áreas destacadas em verde correspondem aos sinais relativos ao padrão TMB. As áreas destacadas em amarelo representam os sinais relativos à quinolina.	94
Figura 28. Espectro de C ¹³ RMN do bruto reacional que demonstra o sinal característico do produto de Heck.....	121
Figura 29. Principal causa de mortes prematuras (antes dos 70 anos) em 91 países.....	140
Figura 30. Infográfico com as estimativas de novos casos de câncer em 2018 e 2040.....	140
Figura 31. Patogênese do HPV no câncer cervical.....	142
Figura 32. equação utilizada para calcular o índice de seletividade.....	148
Figura 33. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem Hela sob tratamento de quinolinas.....	151
Figura 34. Gráfico indicador da área corresponde aos compostos mais ativos frente a linhagem Hila.	153
Figura 35. Gráfico que demonstra o perfil de morte celular das quinolinas avaliadas.	154
Figura 36. Histogramas que demonstram o perfil de morte celular causada pelas quinolinas.....	155
Figura 37. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem Me-180 sob tratamento de quinolinas.....	156
Figura 38. Gráfico indicador da área corresponde aos compostos mais ativos frente a linhagem Me-180.	157
Figura 39. Gráfico que demonstra o perfil de morte celular das quinolinas avaliadas.	158
Figura 40. Histogramas que demonstram o perfil de morte celular causada pelas quinolinas.....	159

Figura 41. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem K562 sob tratamento de quinolinas.	160
Figura 42. Gráfico com as curvas dose-resposta da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem K562.	161
Figura 43. Gráfico que demonstra o perfil de morte celular das quinolinas avaliadas frente a linhagem K562.	163
Figura 44. Histogramas que demonstram o perfil de morte celular causada pelas quinolinas na linhagem K562.....	164
Figura 45. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem B16F10 sob tratamento de quinolinas.	165
Figura 46. Gráfico com as curvas dose-resposta da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem B1610.	165
Figura 47. Gráficos que ilustram a dose-resposta da linhagem Vero frente as quinolinas estudadas.	167
Figura 48. Esquema demonstrativo das propriedades ADMET das quinolinas avaliadas..	171
Figura 49. Diagrama BOILED-Egg.....	172
Figura 50. Estruturas químicas dos polienos Nistatina e Anfotericina B.	187
Figura 51. Mecanismo de ação dos antifúngicos polienos.	188
Figura 52. Estrutura das equinocandinas: Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina.....	189
Figura 53. Mecanismo de ação das equinocandinas, dando destaque para a caspofungina.....	190
Figura 54. Linha do tempo que descreve os principais fármacos azólicos, suas estruturas e período de surgimento.....	191
Figura 55. Mecanismo de ação do fluconazol, um fármaco antifúngico da classe dos azólicos.....	192
Figura 56. Estrutura dos fármacos da classe alilamina: terbinafina e naftifina.....	192
Figura 57. Equação utilizada para calcular o Índice de seletividade (SI).	197
Figura 58. Espectro de ¹ H RMN da molécula 4-metil, 6-bromo-quinolina (CDCl ₃ , 300 MHz).	223
Figura 59. Espectro de ¹ H RMN da molécula t-butil (2-bromofenil)carbamato (CDCl ₃ , 300 MHz).	224
Figura 60. Espectro de ¹ H RMN da molécula t-butil (2-iodofenil)carbamato (CDCl ₃ , 300 MHz).	225
Figura 61. Espectro de ¹ H RMN da molécula (E)-6-fenilhex-3-en-2-ona (CDCl ₃ , 300 MHz).	226
Figura 62. Espectro de ¹ H RMN da molécula (E)-hex-3-en-2-ona (CDCl ₃ , 300 MHz).	227

Figura 63. Espectro de ^1H RMN da molécula (E)-t-butil (2-(3-oxobut-1-en-1-il)fenil)carbamato (CDCl_3 , 300 MHz).	228
Figura 64. Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metilquinolina (CDCl_3 , 300 MHz).....	229
Figura 65. Figura 49. Espectro de ^1H RMN da molécula 4-metilquinolina (CDCl_3 , 300 MHz):	230
Figura 66. Espectro de ^1H RMN da molécula 2,4-difenilquinolina (Acetona d_6 , 300 MHz):	231
Figura 67. Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-etil-quinolina. (CDCl_3 , 300 MHz).	232
Figura 68. Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-etilfenil-quinolina. (CDCl_3 , 300 MHz):.....	234
Figura 69. .Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-fenil-quinolina. (CDCl_3 , 300 MHz):	235
Figura 70. Espectro de ^1H RMN característico da molécula trimetoxibenzeno.	236

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese de Skraup, realizada através do aquecimento de uma anilina na presença de glicerol, ácido sulfúrico e um agente oxidante.	34
Esquema 2. Métodos sintéticos clássicos para a síntese de quinolinas baseados em aminas aromáticas simples.....	35
Esquema 3. Métodos sintéticos clássicos para a síntese de quinolinas baseados em anilinas substituídas.	36
Esquema 4 Mecanismo de reação de Skraup para a obtenção da quinolina a partir de anilina e glicerol.	71
Esquema 5. Mecanismos propostos para a reação de Skraup-Doebner- von Miller	73
Esquema 6. Esquema geral da adição de Michael. Onde EWG = grupo retirador de elétrons..	75
Esquema 7. Mecanismo geral da reação de Michael entre um β -ceto éster e uma cetona α , β -insaturada.....	76
Esquema 8. Esquema geral para síntese de quinolinas baseada na estratégia de Skraup-Doebner-von Miller.	80
Esquema 9. Equação usada para calcular o rendimento (%) através de qRMN.	81
Esquema 10. Esquema sintético baseado no mecanismo de Skraup and Doebner-von Miller.	83
Esquema 11. Condições ideais para síntese de quinolinas utilizando metodologia baseada em Skraup e Doebner-von Miller.	94
Esquema 12. Esquema demonstrativo das tentativas de sintetizar o núcleo quinolínico usando a metodologia proposta.....	95
Esquema 13. Esquema demonstrativo da possível causa das limitações da proposta sintética baseada em Skraup Doebner von-Miller.....	95
Esquema 14. Exemplos de acoplamentos organometálicos cruzados.....	106
Esquema 15. Esquema geral da reação de Heck.....	107
Esquema 16. Mecanismo geral para reação de Heck.....	108
Esquema 17. Antagonista do receptor de tromboxanos utilizando a reação de Heck.	109
Esquema 18. Etapas sintéticas da sertralina que utilizam a reação de Heck..	110
Esquema 19. Síntese do cetoprofeno baseada na reação de Heck.....	111
Esquema 20. Proposta reacional descrita por Cho & Kim	114

Esquema 21. Reação clássica de Heck foi realizada reagindo o iodobenzeno com a uma chalcona.	114
Esquema 22. Proteção da anilina substituída pelo grupamento BOC.	115
Esquema 23. Síntese de cetonas α,β -insaturadas através de reação de HWE.	116
Esquema 24. Esquema geral para síntese de quinolinas baseada na reação de Heck.....	117
Esquema 25. Esquema geral proposto inicialmente para síntese do núcleo quinolínic.	119
Esquema 26. Esquema de reação teste da reação de Heck descrita por Cho & Kim.....	120
Esquema 27. Reação de proteção da anilina.	121
Esquema 28. Reação de Heck utilizando a metilvinilcetona como material de partida.	122
Esquema 29. Adição do TFA diretamente ao meio reacional afim de obter-se a quinolina diretamente.	124
Esquema 30. Adição de HCl diretamente no meio reacional utilizando dioxano como solvente.	125
Esquema 31. Esquema geral de reação desenvolvido para obtenção de quinolinas.	126
Esquema 32. Síntese de cetonas α,β -insaturadas através de reação de Wittig.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação dos ácidos de Bronsted e Lewis e suas concentrações.	86
Tabela 2. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: Variação das anilinas e na concentração do catalisador.	88
Tabela 3. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação do número de eq. de MVK.	89
Tabela 4. Parâmetros avaliados na síntese de quinquininas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação dos solventes utilizados.	90
Tabela 5. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação da temperatura reacional em função do rendimento obtido.	91
Tabela 6. Diferentes condições testadas na tentativa de reproduzir o estudo de (CHO; KIM, 2007). 120	
Tabela 7. Reação de Heck utilizando a 2-bromo anilina protegida.	122
Tabela 8. Esquema de desproteção da anilina, posterior ciclização e obtenção do 2-metilquinolina. 123	
Tabela 9. Reação de Heck realizada com diferentes solventes.	124
Tabela 10. Obtenção da quinolina após a adição de ácido na reação Heck bruta.	125
Tabela 11. Diferentes quinolinas obtidas a partir do modelo geral de reação de Heck proposto.	127
Tabela 12. proteção da anilina substituída pelo grupamento BOC através de 3 diferentes metodologias e seus rendimentos.	128
Tabela 13. estrutura química de quinolinas avaliadas quanto a atividade antitumoral.	147
Tabela 14. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem Hila.....	152
Tabela 15. Avaliação do tipo de morte celular causado pelas quinolina mais ativas frente a linhagem celular Hela.....	154
Tabela 16. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem Me-180.....	157
Tabela 17. Avaliação do tipo de morte celular causado pelas quinolina mais ativas frente a linhagem celular Me-180.....	158
Tabela 18. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem K562.....	161

Tabela 19. Avaliação do tipo de morte celular causado pelas quinolinas mais ativas frente a linhagem celular K562.....	162
Tabela 20. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem B1610.....	166
Tabela 21. Índice de seletividade das quinolinas testadas.....	168
Tabela 22. Parâmetros ADMET calculados <i>in silico</i> para as quinolinas estudadas.....	169
Tabela 23. Tabela com os valores preditivos de parâmetros toxicológicos calculados <i>in silico</i>	173
Tabela 24. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quinolinas expressa em µg/mL frente a cepas de <i>Candida</i> spp.....	199
Tabela 25. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Quinolinas expressa em µg/mL frente aos isolados de dermatófitos.....	200
Tabela 26. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quinolinas expressa em µg/mL frente às cepas de <i>Candida</i> spp.....	201
Tabela 27. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quinolinas expressa em µg/mL frente aos isolados de dermatófitos testados.....	202

LISTA DE ABREVIações

- ® - Marca Registrada
- AA – Astrocitoma Anaplásico
- APE-1 – Apurinic/apirimidinic endonuclease 1
- Au – Ouro
- BOC - Tert-butylcarbonato
- BOC₂O – Di-tert-butyl dicarbonato
- Br – Bromo
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado
- Cl – Cloro
- CSA – Ácido canforsulfônico
- d – dubleto
- dd – duplo dubleto
- ddd – duplo duplo dubleto
- DMA – Dimetilacetamida
- DMF – Dimetilformamida
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- Dt – duplo tripleto
- Eq. Equivalente Molar
- FDA – Food and Drug Administration
- GBM- Glioblastoma Multiforme
- I – Iodo
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- m – multipleto
- MTIC - 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida
- NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
- NaOAc – Acetato de sódio
- NET₃ – Trietilamina
- Ni – Níquel
- OTf - Triflato
- Pd – Paládio

Pt – Platina

q – quarteto

Rh – Ródio

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

s – simpleto

sl – simpleto alargado

SNC – Sistema Nervoso Central

t – tripleto

TFA – Ácido trifluoro-acético

TMS- Tetrametilsilano

TsOH – Ácido *p*-toluenosulfônico

UV – Ultra-violeta

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	29
2 OBJETIVO GERAL	31
3 REVISÃO GERAL	33
3.1 Núcleo quinolínico	33
3.1.1 Síntese do núcleo quinolínico	33
3.1.2 Compostos quinolínicos provenientes de fontes naturais	36
3.1.3 Atividades biológicas do núcleo quinolínico	38
3.2 Propriedades físico-químicas relacionadas aos processos ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade)	54
3.2.1 Lipofilicidade	59
3.2.2 Solubilidade	61
3.2.3 Regra de Lipinski	63
3.2.4 Predição de parâmetros toxicológicos	63
CAPÍTULO 1 – Skraup e Doebner-von Miller	65
1 INTRODUÇÃO	67
2 OBJETIVO GERAL	69
2.1 Objetivos específicos	69
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	71
3.1 Síntese de quinolinas através de Skraup e Doebner-von Miller	71
3.1.1 Síntese de Skraup	71
3.1.2 Síntese de Doebner-von Miller	72
3.2 Química verde e a síntese de quinolinas	73
3.3 Adição de Michael	74
3.4 Proposta de síntese One Pot/ Tandem de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller	77
4 MATERIAIS E MÉTODOS	79
4.1 Procedimentos experimentais gerais	79

4.2 Síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller.....	79
4.2.1 Ressonância magnética nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq- ¹ H)	81
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1 Proposta de síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller.....	83
5.1.1 Variação dos ácidos de Bronsted e Lewis e suas concentrações ..	83
5.1.2 Variação das anilinas	87
5.1.3 Concentração do aceptor de Michael	88
5.1.4 Variação do solvente utilizado.....	89
5.1.5 Variação da temperatura e tempo.....	90
5.1.6. Condições reacionais padrões	92
6. CONCLUSÃO	97
CAPÍTULO 2 – CATÁLISE por PALÁDIO	99
1 INTRODUÇÃO.....	101
2 OBJETIVO GERAL.....	103
2.1 Objetivos específicos	103
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	105
3.1 Acoplamentos organometálicos cruzados	105
3.1 Reação de Heck	106
3.1.2 Reações de Heck na síntese de fármacos: exemplos da literatura	109
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	113
4.1 Procedimento experimental geral	113
4.2 Proposta de síntese de quinolinas a partir da reação de Heck	113
4.2.1 Reação de Heck clássica	114
4.2.2 Proteção das anilinas	114
4.2.3 Síntese das cetonas- α,β -insaturadas.....	116
4.2.4 Síntese baseada na reação de Heck para obtenção de quinolinas	117

5 Resultados e Discussão	119
5.1 Proposta de síntese de quinolinas a partir da reação de Heck	119
5.2.2 Proteção das anilinas	128
5.2.3 Síntese das cetonas α,β -insaturadas	128
6 CONCLUSÃO.....	131
CAPÍTULO 3 - Avaliação da atividade antitumoral.....	133
1 INTRODUÇÃO	135
2 OBJETIVO GERAL	137
2.1 Objetivos específicos	137
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	139
3.1 Câncer.....	139
3.1.1 Me-180 e Hela – Câncer cervical	141
3.1.2 K562 - Leucemia Mielóide Crônica	142
3.1.3 B16F10 - Melanoma.....	143
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	145
4.1 Procedimento experimental geral	145
4.1.1 Cultivo celular	145
4.1.2 Avaliação da viabilidade celular	145
4.1.3 Moléculas avaliadas	146
4.1.4 Ensaio de modo de ação: apoptose e necrose	147
4.1.5 Cálculo do Índice de Seletividade (SI)	148
4.1.6 Parâmetros <i>in silico</i> - ADMET	148
4.2.7 Análise Estatística	149
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	151
5.1 Avaliação da atividade citotóxica	151
5.1.1 Linhagem Hela	151
5.1.2 Linhagem Me-180	155
5.1.3 Linhagem K562	160
5.1.4 Linhagem B16F10	164

5.1.5 Linhagem Vero	166
5.1.6 Cálculo do Índice de Seletividade (IS)	167
5.2 Parâmetros <i>in silico</i> ADMET	168
6 CONCLUSÃO	175
CAPÍTULO 4 – Avaliação da atividade antifúngica.....	177
1 INTRODUÇÃO.....	179
2 OBJETIVO GERAL	181
2.1 Objetivos específicos	181
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	183
3.1 Infecções fúngicas	183
3.1.1 Infecções fúngicas superficiais.....	185
3.1.2 Infecções fúngicas invasivas.....	185
3.1.3Fármacos antifúngicos	186
4 Materiais e métodos.....	195
4.1 Avaliação da atividade antifúngica.....	195
4.1.1 Cepas selecionadas	195
4.1.2 <i>Screening</i> de atividade antifúngica	195
4.1.3 Ensaio de citotoxicidade em células Vero.....	196
4.1.4 Cálculo do Índice de Seletividade (SI)	197
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	199
5.1 Avaliação da atividade antifúngica.....	199
5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	199
5.2 Ensaio de viabilidade celular Vero e índice de seletividade	203
6 CONCLUSÃO	205
7. CONCLUSÃO GERAL.....	207
8 REFERÊNCIAS GERAIS.....	209
9ANEXOS.....	223
9.1 Anexo 1- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	223

1 INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de novos medicamentos é uma ciência milenar cuja demanda aumenta, progressivamente, com o aumento da população mundial, assim como o aumento da expectativa de vida, surgimento de novas doenças ou ainda resistência aos fármacos disponíveis para o tratamento das mesmas.

Nas últimas décadas a descoberta de novos medicamentos tem acontecido em um ritmo mais lento quando comparado à velocidade que este processo obteve no século XX, além disso o custo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármaco tem aumentado progressivamente. Soma-se a isso o interesse seletivo de muitas indústrias no desenvolvimento de classes terapêuticas mais “rentáveis” fato que torna a disponibilidade terapêutica para o tratamento de muitas doenças difícil e ineficiente.

Neste sentido doenças com alta incidência e deficiências no tratamento como o câncer tem alcançado significativa relevância. Segundo a OMS somente em 2018 são previstos em torno de 18 milhões de novos casos de câncer mundialmente, assim como 9 milhões de mortes. Só no Brasil são previstos 600 mil novos casos no biênio 2018-2019. Tratamentos para este conjunto de doenças são, muitas vezes, escassos, ineficientes ou com excessivos efeitos colaterais.

Da mesma forma, doenças causadas por microorganismos como os fungos tem se tornado outro problema de saúde pública mundial. Estas doenças causam anualmente cerca de 1,5 milhões de mortes. Da mesma maneira que o câncer, infecções fúngicas dispõem de tratamento escasso, resistência aos antibióticos e efeitos colaterais exagerados.

Desta maneira, fica sobressalente a necessidade de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos antitumorais e antifúngicos. Neste sentido, este trabalho buscou desenvolver novas metodologias sintéticas para obtenção de moléculas bioativas baseadas no núcleoquinolínico. Tal estrutura química básica chamada de núcleoquinolínico, vem sendo estudado há mais de 100 anos e é um esqueleto considerado privilegiado na química medicinal, estando relacionado à atividades biológicas diversas incluído antitumoral e antifúngica.

2 OBJETIVO GERAL

Obter derivados quinolínicos através de metodologia sintética diferenciada e avaliar suas atividades biológicas, bem como falar sobre as propriedades físico-químicas.

3 REVISÃO GERAL

3.1 Núcleo quinolínico

A quinolina (**1**) ou 1-azanaftaleno é uma molécula aromática azotada que apresenta dois anéis fundidos, dos quais um é benzênico e o outro piridínico (Figura 1).

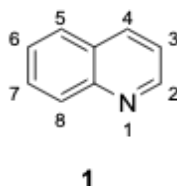


Figura 1. Estrutura do núcleo quinolínico (**1**).

Os compostos heterociclos nitrogenados desempenham um papel fundamental na química medicinal e desenvolvimento de novos fármacos. O núcleo quinolínico (**1**) é considerado um núcleo privilegiado, neste sentido, uma vez que é um dos principais elementos na construção de compostos com atividade biológica.

As quinolinas constituem uma das classes de heterociclos nitrogenados de maior importância, levando-se em consideração seu emprego na indústria química e farmacêutica, além da sua ampla presença em produtos naturais principalmente na forma de alcaloides (BRÄSE, 2015).

Compostos quinolínicos também encontram aplicação em agroquímicos e produtos químicos como corantes e inibidores de corrosão. O desenvolvimento de novos métodos para sua síntese é, portanto, uma área de interesse contínuo considerável. (HORN et al., 2008; LI et al., 2011; BRÄSE, 2015).

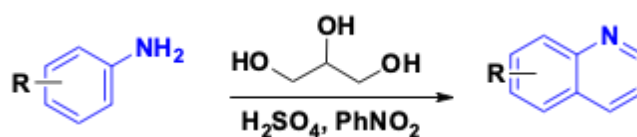
3.1.1 Síntese do núcleo quinolínico

A quinolina (**1**) foi isolada pela primeira vez a partir do alcatrão de carvão em 1834 por Friedlieb Ferdinand Runge. Na mesma época Charles Frédéric Gerhart obteve a quinolina a partir da decomposição do alcaloide Cinchonidina (proveniente da Cinchona) que nomeou a estrutura química como quinolina. A quinolina pode ser

obtida de muitas fontes naturais e sintéticas, mas o alcatrão continua sendo a principal fonte comercial desta molécula (PRAJAPATI et al., 2014; BRÄSE, 2015).

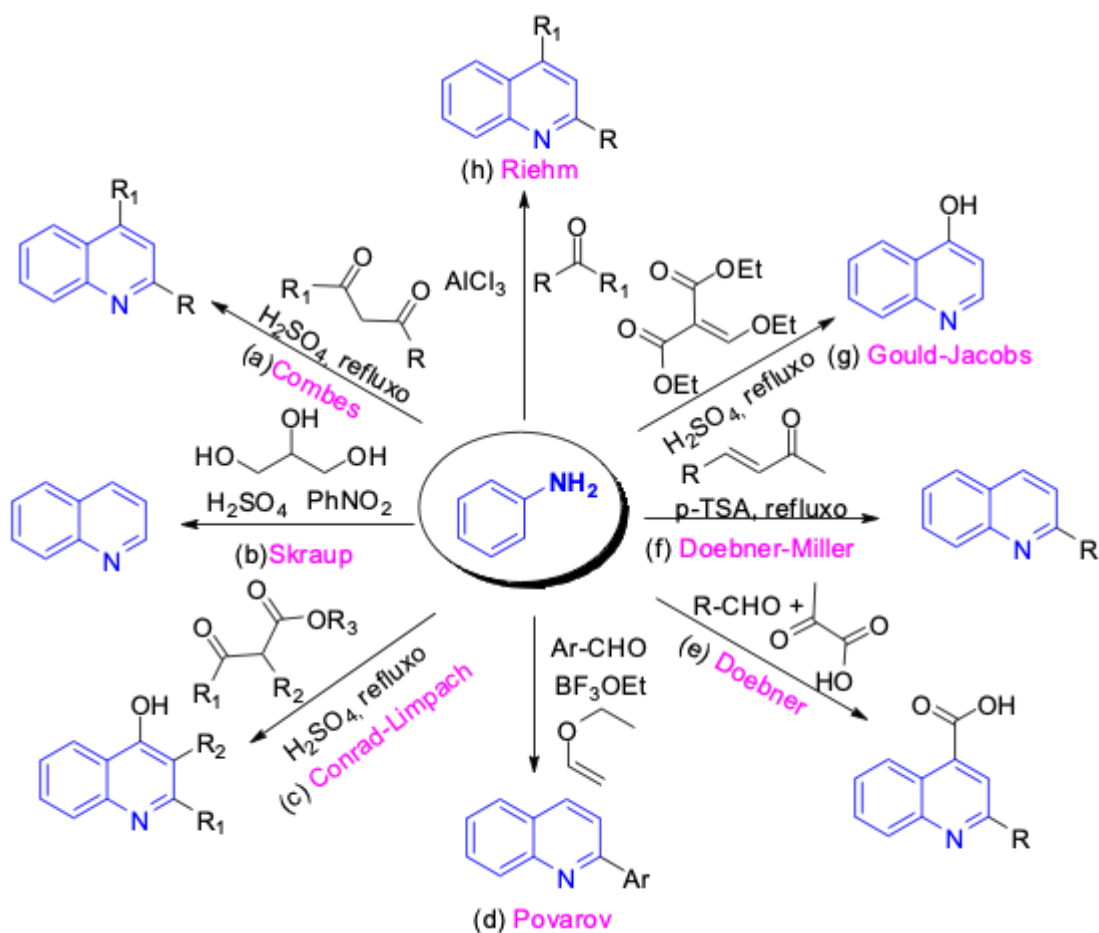
O primeiro relato sobre a síntese da quinolina foi em 1879 quando Koenigs através da passagem de vapor de etilanilina e outras alquilanilinas sobre óxido de chumbo aquecido teria chegado a sintetizar quinolinas. Em 1880, Koenigs em um outro método teria sintetizado quinolinas aquecendo o produto da adição de acroleína à anilina (MANSKE; KULKA, 2004; YAMASHKIN; ORESHKINA, 2006; BLACK et al., 2014).

Nesta mesma época, Skraup (1880) publicou sua metodologia clássica que envolve uma série de reações provocadas por aquecimento de uma amina aromática primária na presença de glicerol, ácido sulfúrico e um agente oxidante. O produto é uma quinolina contendo apenas os substituintes que estavam originalmente presentes na amina aromática esquema1 (MANSKE; KULKA, 2004; YAMASHKIN; ORESHKINA, 2006; DENMARK; VENKATRAMAN, 2006; WU et al., 2006).



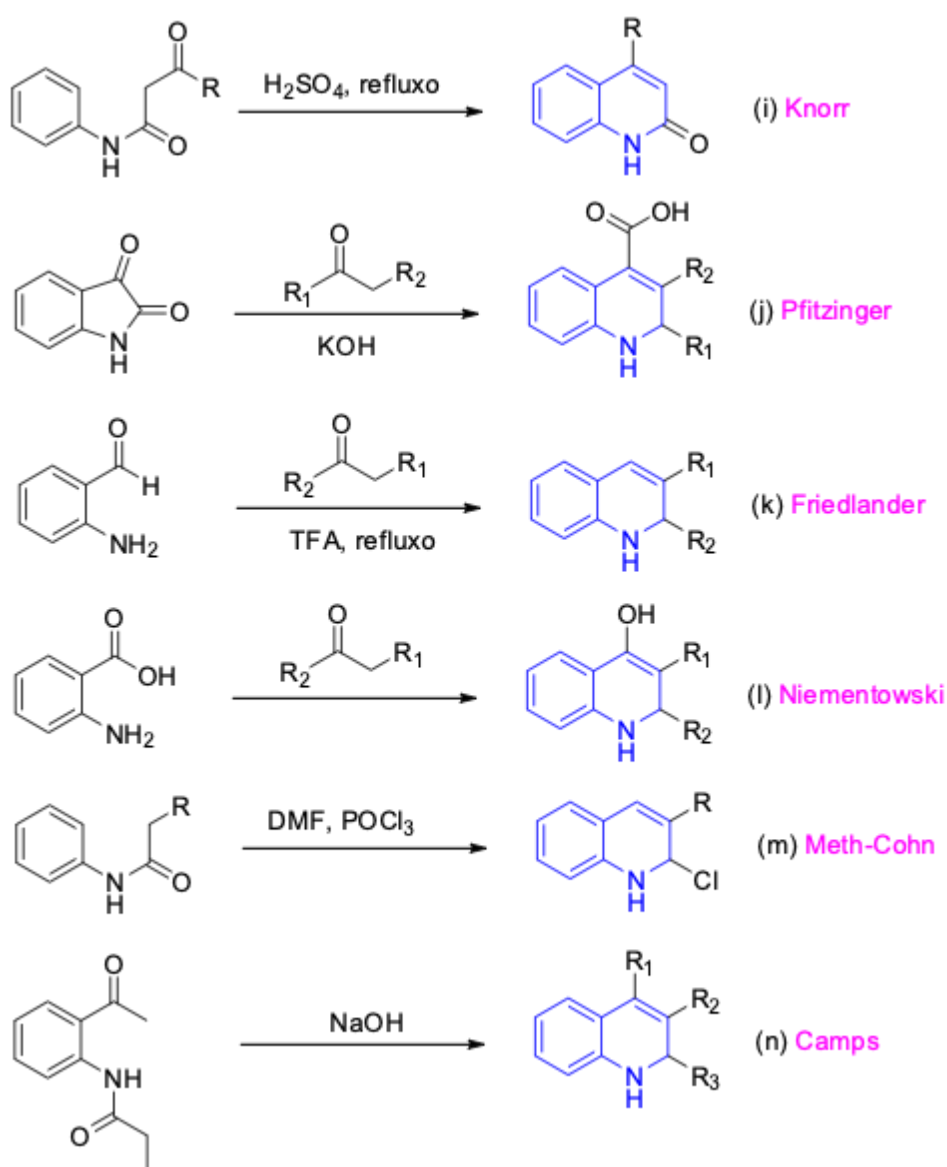
Esquema 1. Síntese de Skraup, realizada através do aquecimento de uma anilina na presença de glicerol, ácido sulfúrico e um agente oxidante.

Devido a sua importância e versatilidade, ao longo dos anos diversos métodos sintéticos foram desenvolvidos visando obter uma diversidade de substituintes no núcleoquinolínico buscando da mesma forma diferentes atividades biológicas (GONEC et al., 2012; PRAJAPATI et al., 2014). Resumidamente, vários métodos clássicos são descritos para a síntese de quinolinas. A maioria dos métodos envolve aminas aromáticas simples como material de partida. Como exemplos de tais reações é possível incluir a reação de Combes (a), Skraup (b), Conrad-Limpach (c), Povarov (d), Doebner (e), Doebener-Miller (f), Gould-Jacobs (g) e Reihm (h) conforme esquema 2.



Esquema 2. Métodos sintéticos clássicos para a síntese de quinolinas baseados em aminas aromáticas simples.

Além destas reações, é importante citar as metodologias sintéticas que partem de anilinas substituídas ou seu substratos, dentre as quais é possível citar: Síntese de Knorr (i), Reação de Pfitzinger (j), síntese de Friedländer (k), Niementowski (l), síntese de Meth-Cohn (m) e Síntese de Camps (n) conforme descrito no esquema 3 (BHARATE et al., 2015).



Esquema 3. Métodos sintéticos clássicos para a síntese de quinolinas baseados em anilinas substituídas.

3.1.2 Compostos quinolínicos provenientes de fontes naturais

Conforme descreve a literatura a quinolina (1) foi extraída pela primeira vez do alcatrão em 1834 por Friedlieb Ferdinand Runge e esta fonte natural ainda constitui a principal fonte de quinolina comercialmente disponível (PRAJAPATI et al., 2014; BHARATE et al., 2015).

É possível acrescentar, ainda, os inúmeros compostos quinolínicos que são extraídos de fontes naturais tanto na área química, como na área farmacêutica. Um

dos exemplos mais conhecidos é o alcalóide com atividade antimalárica quinina extraído das cascas de *Cinchona spp.* conforme figura 2.

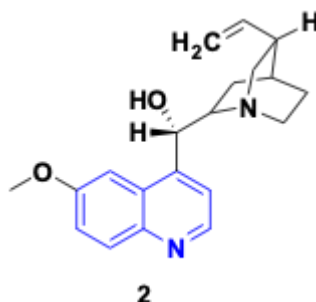


Figura 2. Estrutura da quinina (2).

Há relatos da utilização terapêutica da quinina há mais de 350 anos. Sua estrutura é conhecida por ser eficaz contra o *Plasmodium spp.*, o qual é o parasita causador da malária. Seu mecanismo de ação não é completamente elucidado, mas acredita-se estar ligado a intercalação com o DNA do parasita, interação com os ácidosgraxoseritrocitários e alcalinização dos vacúolos digestivos do parasita (KUHLMANN; FLECKENSTEIN, 2017).

A camptotecina (3) é outro alcalóidequinolínico de elevada relevância para a química medicinal descoberto em 1966, quando foi isolada a partir do caule da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* por Wall e Wani. Esta molécula apresenta-se como um poderoso agente antiumoral, especialmente contra câncer de cólon, mama, pulmão, ovário e estômago. Seu desenvolvimento como fármaco foi prejudicado devido a sua baixa solubilidade, no entanto esta molécula levou ao desenvolvimento de análogos, hoje, comercialmente disponíveis: irinotecan (4) e topotecan (5) conforme figura 3 (SRIRAM et al., 2005; PINHEIRO et al., 2013; SIMÕES et al., 2016; LI et al., 2017).

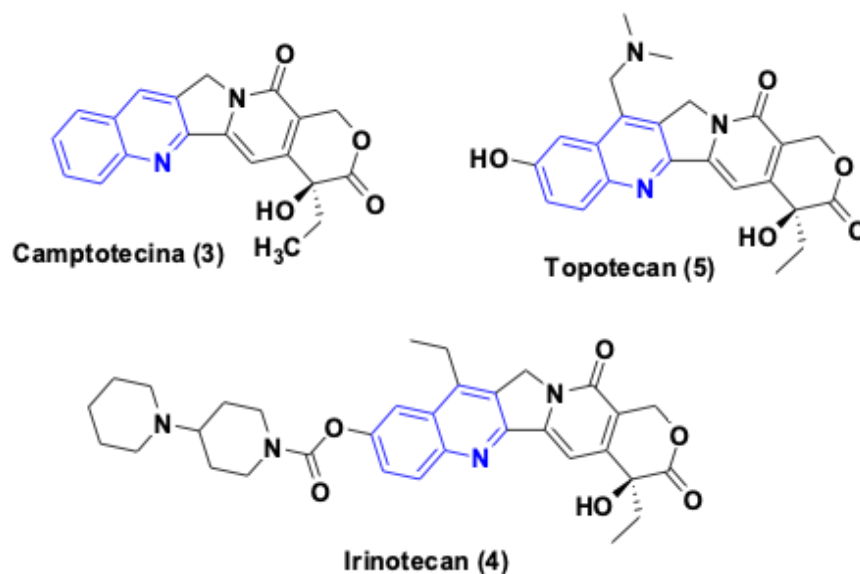


Figura 3. Alcalóidequinolínico Camototecina (3) e seus derivados: Irinotecan (4) e Topotecan (5).

É possível citar, ainda, a papaverina (6) um alcalóide isoquinolínico descoberto em 1948, como um dos constituintes do ópio, que é obtido a partir de extratos da papoula (*Papaver somniferum*). Esse alcalóide é um antiespasmódico de ação direta na musculatura lisa, sendo utilizado no tratamento da disfunção erétil e como vasodilatador (RÄTSCH; HOFMANN, 2005; VIEIRA, 2012; PINHEIRO et al., 2013).

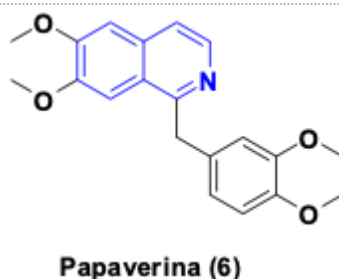


Figura 4. Estrutura da papaverina, alcalóide isoquinolínico extraído do ópio.

3.1.3 Atividades biológicas do núcleo quinolínico

Na química medicinal o núcleoquinolínico têm sido relatado como um dos esqueletos mais importantes dentre os heterociclos por seu potencial farmacológico (HOOTS et al., 2013; BHARATE et al., 2015; BRÄSE, 2015; YAAKOV et al., 2017).

Moléculas com núcleoquinolínico têm sido relatadas com diversas atividades biológicas como: atividade antitumoral, antimalárica, antifúngica, anti-obesidade, antidiabética, anti-inflamatória, anti-colinesterásica, anti-protozoária, antiviral, no tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, tuberculose, doenças auto-imunes, entre outras, conforme quadro abaixo conforme figura 5 (KUMAR; GUPTA, 2009; KAUR et al., 2010; LEE, 2011; BONGARZONE; BOLOGNESI, 2011; GONEC et al., 2012; GOPAUL et al., 2015; KAMAL et al., 2015; PATEL et al., 2015; AFZAL et al., 2015; VANDEKERCKHOVEb; D'HOOGHE, 2015; COA et al., 2015; HUSSAINI, 2016; YAAKOV et al., 2017; GU et al., 2017).

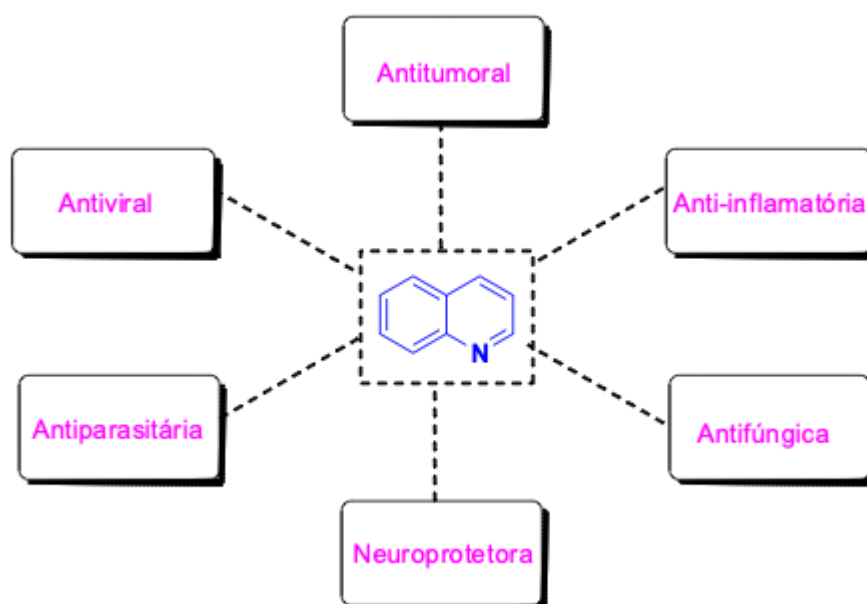


Figura 5. Principais atividades biológicas atribuídas a moléculas com núcleoquinolínico.

A importância do núcleoquinolínico pode ser evidenciada pelo grande número de fármacos, comercialmente, disponíveis que contêm esse núcleo em sua estrutura. Em uma busca rápida no banco de dados Drugbank.ca utilizando o núcleoquinolínico como estrutura básica é possível encontrar 61 fármacos aprovados para o uso em humanos. Somando-se a isso, quando esta busca é ampliada para moléculas em caráter experimental ou em fase investigativa é possível encontrar 195 moléculas com núcleoquinolínico em suas estruturas (DRUGBANK, 2018). Na figura 9 é possível observar diferentes fármacos que são utilizados como tratamento em diversas patologias.

Compostos quinolínicos apresentam diferentes atividades biológicas, como já foi supracitado (LEE, 2011). Dentre estes compostos podemos destacar algumas moléculas aprovadas para humanos (figura 6), como por exemplo os fármacosantimaláricos derivados da quinina (2), cloroquina (11), mefloquina (8), amodiaquina (12) e primaquina (14) (KAUR et al., 2010). Estas moléculas representaram um importante avanço no tratamento da malária no século XX e ainda desempenham, atualmente, importante papel em terapias combinadas com outros fármacos a fim de evitar a manifestação de resistência. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; TINDALL et al., 2018).

A atividade antimicrobiana também é sobressalente entre os derivados quinolínicos, podemos citar diversos fármacos utilizados na terapêutica que possuem em sua estrutura o núcleoquinolínico. Dentre os quais podemos mencionar a bedaquilina (7) que após 50 anos sem a aprovação de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose foi aprovada em 2012 pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) (FERNANDES et al., 2017).

A proflavina (15) é um derivado quinolínico com ação bacteriostática, desinfetante contra muitas bactérias gram-positivas (figura 6). Proflavina encontra uma ampla gama de aplicações em pesquisa clínica, terapêutica e industrial. Esta molécula apresenta muitas aplicações destacando-se como um agente antimicrobiano e muitas vezes usado como um agente tópico, desnaturando o DNA bacteriano levando ao rompimento celular destes microorganismos. Devido à sua propriedade intercalante, afeta o DNA do hospedeiro, que tem chances potenciais de induzir câncer de pele e outras malignidades. Espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas pela proflavina desempenham um papel crucial na desnaturação do DNA hospedeiro e, portanto, um dos mecanismos de ação desta molécula (GATASHEH et al., 2017).

A Proflavina (15) pode penetrar além das estruturas epidérmicas e dérmicas e acumular-se nos núcleos das células. Embora tenha atividades antimicrobianas interessantes, a toxicidade revelada sobre mamíferos, atualmente, concentra suas aplicações em diagnósticos terapêuticos e em pesquisa (GATASHEH et al., 2017).

A cloroxina (16), por sua vez, é um composto antibacteriano sintético, usado em alguns xampus para o tratamento da caspa e dermatite seborreica do couro cabeludo (figura 6). A cloroxina tem ação antibacteriana, inibindo o crescimento de organismos gram-positivos e gram-negativos. Além disso, a cloroxina (16)

demonstrou atividade antifúngica contra certos dermatófitos e leveduras (MAO; SCHIMMER, 2008; CHATURVEDI et al., 2011; EJIM et al., 2011).

A nitroxolina (18), uma molécula com atividade antibacteriana contra organismos gram-positivos e gram-negativos comumente encontrados em infecções do trato urinário, além da atividade antibiofilme formado por colônias de *Pseudomonas aeruginosa* (SOBKE et al., 2012; WAGENLEHNER et al., 2013; ABOUELHASSAN et al., 2014). A nitroxolina (figura 6) ainda desempenha significativa atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes tumores, mostrando ser um potencial agente antiangiogênico (SHIM et al., 2010; JIANG et al., 2011).

O dequalinium (19) é um cátion de amônio quaternário que contém duas unidades quinolinicas quaternárias ligadas por uma cadeia de 10 carbonos alifáticos (figura 6). Esta molécula é um agente antisséptico e desinfetante com ampla atividade bactericida e fungicida comumente disponível como um sal dicloreto, mas também está disponível como vários outros sais. É usado em curativos e infecções bucais, infecções bacterianas vaginais e na formulação de bacteriostáticos tópicos. Foi estudado para uso no tratamento da malária e leucemia promielocítica aguda. (HUGO, 2012; BRAUN-FALCO et al., 2013; MENDLING et al., 2016).

É possível destacar, ainda, entre os fármacos antimicrobianos com núcleo quinolínico o clioquinol (20), molécula utilizada para tratar várias infecções fúngicas e protozoárias no início do século XX. No entanto, este fármaco foi diretamente relacionado à neurotoxicidade quando usado cronicamente em altas doses (BAREGGI; CORNELLI, 2010; YOU et al., 2018). Após sua retirada do mercado, o clioquinol tem sido usado para tratar várias infecções fúngicas cutâneas (figura 6).

O clioquinol (20) atua como agente quelante de zinco e cobre. Tal mecanismo faz desta molécula uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento das doenças de Alzheimer e Parkinson, levando-se em consideração que o zinco e cobre estão envolvidos com o desenvolvimento destas doenças. Além disso, os quelantes de zinco também podem atuar como agentes anticancerígenos como é demonstrado por estudos *in vitro* e *in vivo* nos quais o clioquinol reduziu a viabilidade de diversas linhagens tumorais humanas e inibiu o crescimento tumoral de xenotransplantes em camundongos (DING et al., 2005; DING; LIND, 2009; FRANKLIN et al., 2016; YAAKOV et al., 2017; LU et al., 2018).

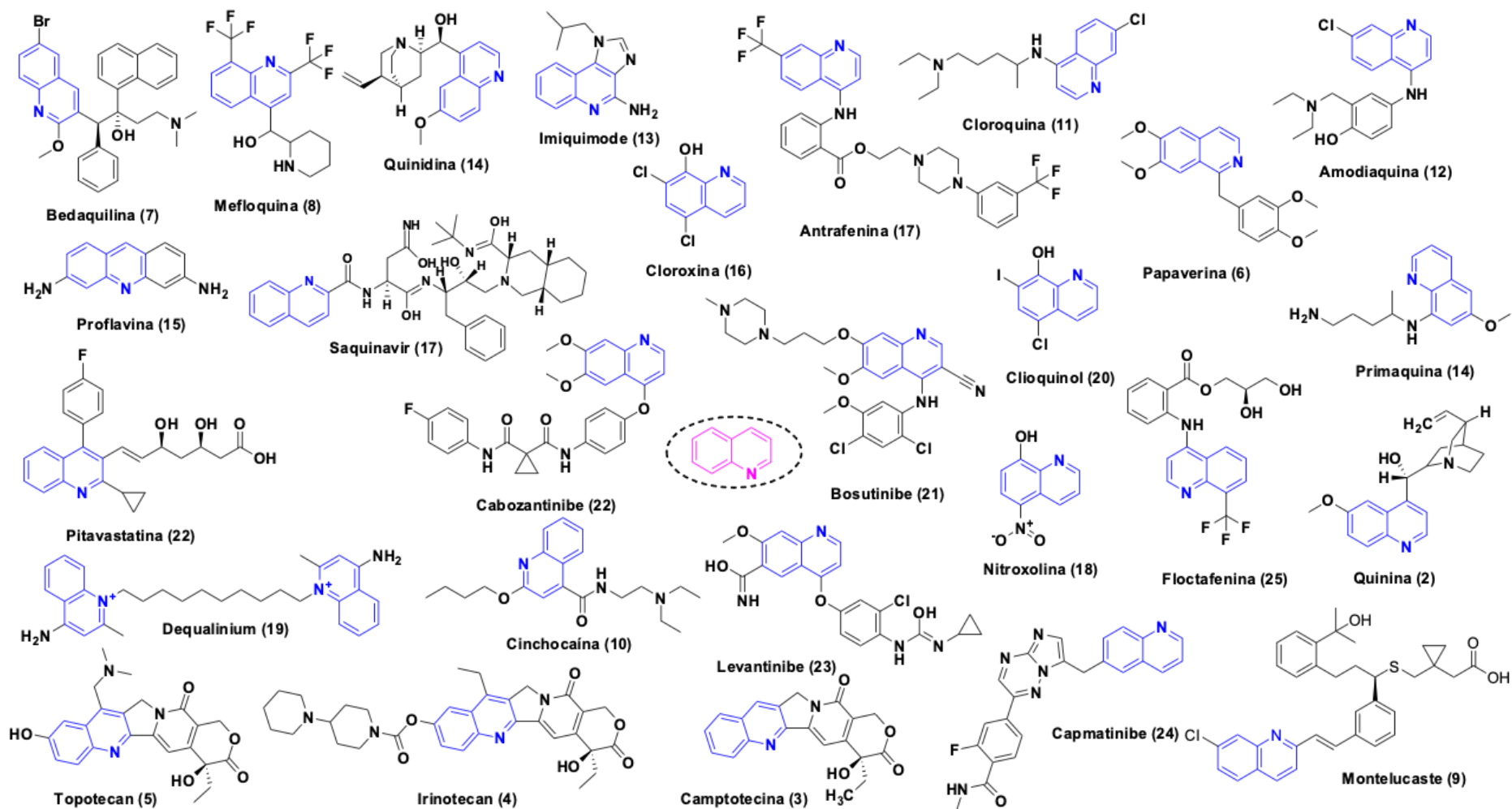


Figura 6. Fármacos disponíveis na terapêutica que apresentam em sua estrutura o núcleo quinolínico. Fonte: www.drugbank.ca

O Montelukaste de sódio (**9**), por sua vez, é um anti-inflamatório de núcleoquinolínico utilizado na clínica médica para tratar uma série de condições patológicas, incluindo asma, broncoespasmo induzido pelo exercício, rinite alérgica, dismenorreia primária e urticária (figura 6). O montelukaste é um antagonista dos receptores dos leucotrienos, geralmente administrado por via oral. Este fármaco bloqueia a ação do receptor de leucotrieno nos pulmões e nos tubos bronquiais, reduzindo a broncoconstrição causada pelo leucotrieno e diminuindo a inflamação. (CHAVAN et al., 2013; KUBAVAT et al., 2013; OKUBO et al., 2016).

A Cinchocaina (**10**) é um importante fármaco anestésico local do tipo amida geralmente usado para anestesia de superfície. É um dos mais potentes e tóxicos dos anestésicos locais de ação prolongada e seu uso parenteral é restrito à raquianestesia (figura 6). É indicado em inflamações retais, tais como hemorroidas assim como para aliviar o prurido, inflamação de queimaduras pequenas, cortes, picadas de inseto e dermatites de contato. Seu mecanismo é através do bloqueio da condução nervosa, por diminuir a permeabilidade da membrana neuronal para íons de sódio reversivelmente. Em formulações tópicas apresenta ação rápida, em aproximadamente 15 minutos, com pico de ação durando entre 2 e 4 horas (FROEHNER JUNIOR et al., 2014; DIAS et al., 2017).

O Imiquimode (**13**) é um fármaco imidazoquinolínico imunomodulador que possui atividades antivirais e antitumorais (figura 6). Estudos *in vitro* demonstraram que o imiquimode não tem atividade antiviral direta. Entretanto, a droga exibe efeito antiviral e antitumoral *in vivo*. Este fármaco é utilizado para tratar condiloma acuminado (verrugas externas, genitais e anais), uma doença sexualmente transmissível causada pelo vírus HPV (*Human Papilomavirus*), ceratoses actínicas clinicamente típicas, no couro cabeludo em adultos além de tratar carcinoma basocelular e molusco contagioso (DIAS et al., 2018; SMITH; CHAN, 2019).

Um alcalóide também utilizado na clínica médica é a quinidina (**14**), um fármaco isômero ótico da quinina (**2**) que é extraído das cascas da Cinchona (figura 6). Esta molécula diminui a excitabilidade dos músculocardíacos e esqueléticos, bloqueando as correntes de sódio e potássio através das membranas celulares, prolongando o potencial de ação celular e diminuindo a automaticidade. A quinidina também bloqueia a neurotransmissão muscarínica e alfa-adrenérgica, um anticonvulsivante usado isoladamente ou com fenobarbital ou outros anticonvulsivantes para controlar convulsões tônico-clônicas, convulsões

psicomotoras, síndromes de dor neuropática incluindo neuropatia diabética e arritmias cardíacas. A quinidina age sobre os canais de sódio na membrana celular neuronal, limitando a disseminação da atividade convulsiva e reduzindo a propagação das convulsões. As ações antiarrítmicas são mediadas por efeitos nos canais de sódio das fibras de Purkinje (BEARDEN et al., 2014; LUO et al., 2017; MULLEN et al., 2018).

A antrafenina (**17**) é um fármaco que age como analgésico e anti-inflamatório com eficácia similar ao naproxeno (figura 6). Não é amplamente utilizado, pois foi largamente substituído por novos medicamentos, sendo retirado do mercado em muitos países pelos seus efeitos colaterais. Seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado, entretanto, sua capacidade de inibir a síntese de prostaglandinas pode estar envolvida no efeito antiinflamatório. Acredita-se que a antrafenina esteja associada à inibição da atividade das ciclooxigenases COX-1 e COX-2 (DUNN et al., 1984; WANG et al., 2014).

O saquinavir (**26**) é um inibidor peptidomimético da protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Este fármaco (figura 6) liga-se ao sítio ativo da protease e inibe a atividade da enzima, evitando a clivagem das poliproteínas virais resultando na formação de partículas virais não infecciosas imaturas. Em 1995, o saquinavir tornou-se o primeiro inibidor da protease do vírus HIV aprovado para o tratamento da infecção pelo HIV-1 e foi subsequentemente aprovado em combinação com doses baixas de ritonavir. A biodisponibilidade oral do saquinavir é limitada pelo extenso metabolismo de primeira passagem, mediado principalmente pela enzima citocromo P450. A co-administração de doses baixas de ritonavir, outro inibidor da protease que é também um potente inibidor do CYP3A4 aumenta a biodisponibilidade e a exposição ao saquinavir, melhorando assim a eficácia terapêutica (LV et al., 2015; BOFFITO et al., 2015).

A pitavastatina (**22**) é a mais nova estatina disponível no Brasil, esta molécula foi desenvolvida no Japão em 2003 e aprovada nos EUA em 2009 (figura 6). As estatinas são potentes inibidores da biossíntese de colesterol no fígado, a pitavastatina, por sua vez, é uma estatina sintética e lipofílica que tem farmacodinâmica e farmacocinética com propriedades distintas de outras estatinas. Este fármaco é indicado como terapia adjunta à dieta para reduzir os níveis elevados de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteína B, triglicérides e para aumentar os níveis de lipoproteína de alta densidade em pacientes adultos com

hiperlipidemia primária ou dislipidemia mista (ANTONIO DE ALMEIDA; OZAKI, 2014; MILLER et al., 2016; ADAMS et al., 2017).

Além destes, pode-se citar dentre os derivados quinolínicos utilizados na clínica a floctafenina (**25**). Floctafenina (figura 6) é um antiinflamatório não esteroidal que inibe a síntese de prostaglandinas, com ação similar à aspirina. Com propriedades analgésicas e antiinflamatórias é indicada no tratamento de dores agudas e crônicas de diversas etiologias (HEGAZY et al., 2005; MAENTHAISONG et al., 2013).

3.1.3.1 Atividade antitumoral do núcleo quinolínico

O núcleoquinolínico desempenha um importante papel no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (LEE, 2011; BRÄSE, 2015; AFZAL et al., 2015; HUSSAINI, 2016). Uma rápida busca na base de dados "Web of Science", por exemplo, com as palavras-chaves "*quinoline*" and "*cancer*" demonstra o grande número de publicações nesse escopo, além do recente aumento das publicações e citações com estas palavras-chave.

Derivados da quinolina têm sido usados para projetar várias classes de compostos antitumorais e, conseqüentemente, vários mecanismos de ação diferentes têm sido relatados. Vários relatos têm sido publicados sobre o aspecto "ionofórico" da atividade antiproliferativa das quinolinas, bem como outras atividades inespecíficas, como a permeabilização de organelas por derivados de cloroquina (DING; LIND, 2009; PRACHAYASITTIKUL et al., 2015; MUSIOL, 2017).

Nos últimos 50 anos foram registradas mais de 1200 publicações que relacionam moléculas com núcleoquinolínico e atividade antitumoral. Na figura 10 é possível observar que nos últimos anos, mais especificamente na última década o número de publicações correlacionando às quinolinas e câncer aumentou mais de 100%. Tais dados reforçam ainda mais o potencial farmacológico do esqueleto quinolínico, especialmente frente à atividade antitumoral (LEE, 2011; WEB OF SCIENCE™, 2018).

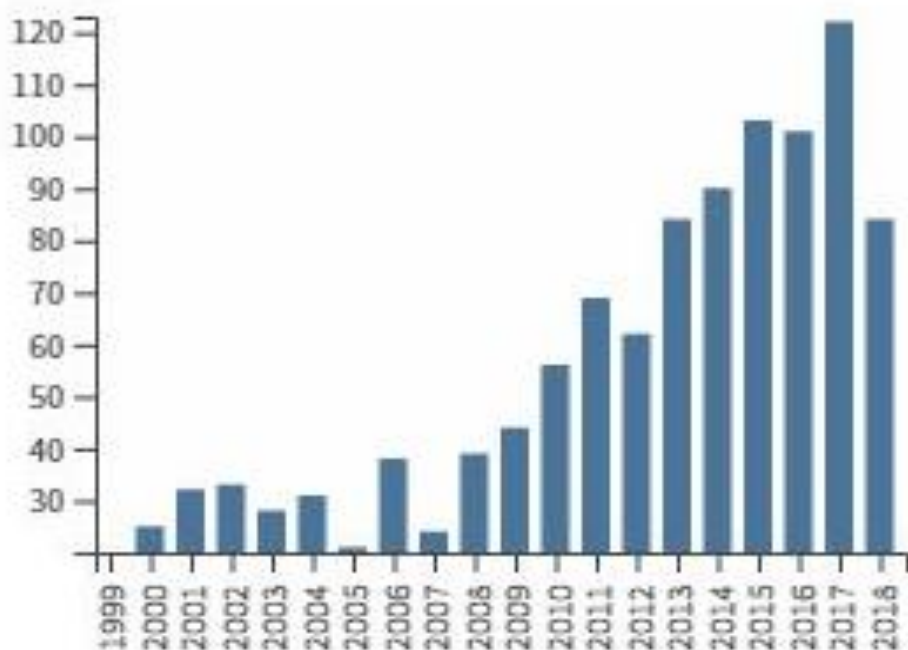


Figura 7. Número de publicações encontradas nos últimos 20 anos com as palavras-chaves "quinoline" and "cancer". Gráfico gerado pela plataforma "Web of Science™" (WEB OF SCIENCE™, 2018).

Alguns derivados quinolínicos já demonstram excelentes resultados através de diferentes mecanismos de ação. Tais como inibidores do ciclo celular, apoptose, inibição da angiogênese, interrupção da migração celular, além de modulação da resposta dos receptores nucleares. Tais resultados têm sido evidenciados frente a diversas linhagens tumorais (BRÄSE, 2015; AFZAL et al., 2015; HUSSAINI, 2016).

Como exemplos de fármacos já aprovados ou que estão em estudos avançados de fase clínica com núcleoquinolínicos podemos citar o alcalóide natural Camptotecina (**3**) e seus análogos semissintéticos Topotecana (**5**), Irinotecana (**4**) e Exatecana (**28**). Recentemente, três inibidores da proteína quinase: Bosutinibe (**21**), Lenvatinibe (**23**) e Cabozantinibe (**27**) e um inibidor da farnesiltransferase o Tipifarnibe (**29**) foram introduzidos como agentes antitumorais conforme as figuras 10 e 11 (BRUNTON et al., 2012; BRÄSE, 2015; AFZAL et al., 2015; HUSSAINI, 2016).

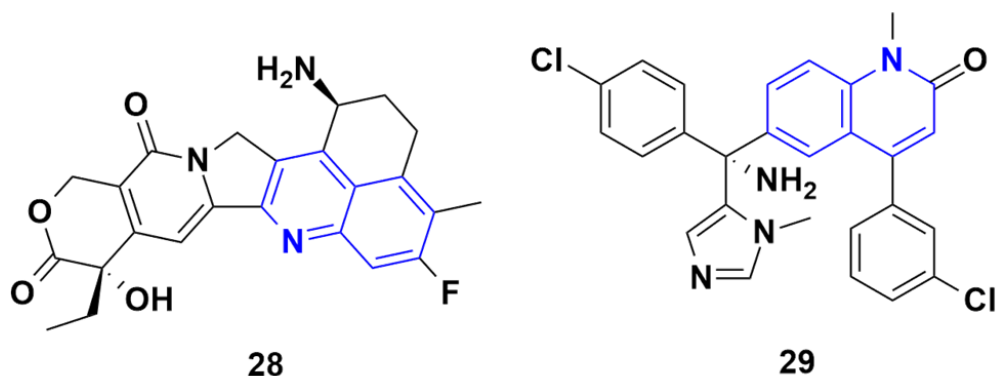


Figura 8. Fármacos antitumorais com núcleo quinolínico: Exatecana (28).e Tipifarnibe (29).

A Camptotecina (**3**) foi isolada em 1966 da árvore chinesa *Camptotheca acuminata*. Diversos esforços foram feitos a fim de desenvolver um composto na forma de sal sódico, mas estes estudos foram comprometidos pelo aparecimento de toxicidade. Após estudos mais aprofundados de mecanismo de ação e propriedades da Camptotecina foram desenvolvidos análogos mais solúveis e menos tóxicos: a irinotecana (**4**) e a topotecana (**5**) que atualmente são aprovados para uso clínico em cânceres colorretais, de ovário e pulmão. Seus mecanismos de ação estão baseados na inibição da religação do DNA depois da quebra mediada pela topoisomerase I (POMMIER, 2006; BRUNTON et al., 2012).

O Bosutinibe (**21**) é um inibidor da tirosina quinase e foi aprovado em 2012 pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de leucemia mielóide crônica em adultos com resistência a tratamentos anteriores (FDA, 2012a). Outro inibidor da tirosina quinase é o Lenvatinibe (**23**) aprovado em 2015 pela FDA para o tratamento de câncer de tireóide e em 2016 para tratamento de carcinoma de células renais avançado. Este fármaco atua mais especificamente inibindo as VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 quinases (FDA, 2015; HUSSAINI, 2016).

O cabozantinibe (**27**) foi aprovado pela FDA, em 2012, para o uso clínico no tratamento de câncer medular metastático progressivo da tireoide(figura 6). Já em 2016 teve seu uso aprovado para o tratamento de carcinoma de células renais avançado. Este fármaco tem demonstrado inibir a atividade das tirosinas quinases do RET, MET, VEGFR-1, -2 e -3, KIT, TrkB, FLT-3, AXL e TIE-2. Estas quinases estão envolvidas em processos patológicos, tais como a oncogênese, metástase, angiogênese tumoral, e a manutenção do microambiente tumoral (FDA, 2012b, 2016).

O Tipifarnibe (**29**), por sua vez, foi aprovado pela FDA em 2005 para o tratamento de leucemia mielóide aguda (FDA, 2005; THOMAS; ELHAMRI, 2007). É uma quinolina não peptidiomimética com potencial atividade antineoplásica que está sendo investigada para tratamento de câncer colorretal, leucemia, câncer de pâncreas e tumores sólidos. Tipifarnib liga-se e inibe a enzima farnesiltransferase, uma enzima envolvida no processamento de proteínas para a transdução de sinal. Ao inibir a farnesilação de proteínas, esse agente impede a ativação dos oncogenes Ras, inibe o crescimento celular, induz a apoptose e inibe a angiogênese (FDA, 2005; THOMAS; ELHAMRI, 2007; PATNAIK et al., 2017).

Capmatinib (**24**) é um inibidor oralmente biodisponível do proto-oncogene c-Met (também conhecido como receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR)) com potencial atividade antineoplásica. O capmatinib liga-se selectivamente a c-Met, inibindo assim a fosforilação de c-Met e interrompendo as vias de transdução de sinal de c-Met, desempenhando um papel fundamental na proliferação de células tumorais, sobrevivência, invasão, metástase e angiogênese tumoral. O capmatinibe tem sido utilizado em estudos para o tratamento de melanoma, câncer de pulmão, gliossarcoma, tumores sólidos, câncer colorretal e comprometimento hepático, entre outros (LIU et al., 2011; SHAKER et al., 2016; NCI, 2018).

Os derivados quinolínicos têm sido usados para desenvolver diferentes classes de compostos antitumorais e, conseqüentemente, diferentes mecanismos de ação têm sido relatados. Vários trabalhos foram publicados sobre o aspecto ionofórico da atividade antiproliferativa de quinolinas, bem como outras atividades inespecíficas, como a permeabilização de organelas por derivados da cloroquina. Além disso, há um grupo relativamente grande de inibidores de proteínas quinases e que atuam sobre as topoisomerasas ou diretamente intercalam o DNA. Esses dois últimos grupos de compostos tiveram uma maior significância na química medicinal com vários medicamentos no mercado ou sob investigação clínica como podemos demonstrar nas figuras 9 e 1 (DING; LIND, 2009; LIU et al., 2011; SHAKER et al., 2016; PASCOLO, 2016; LI et al., 2017; MUSIOL, 2017).

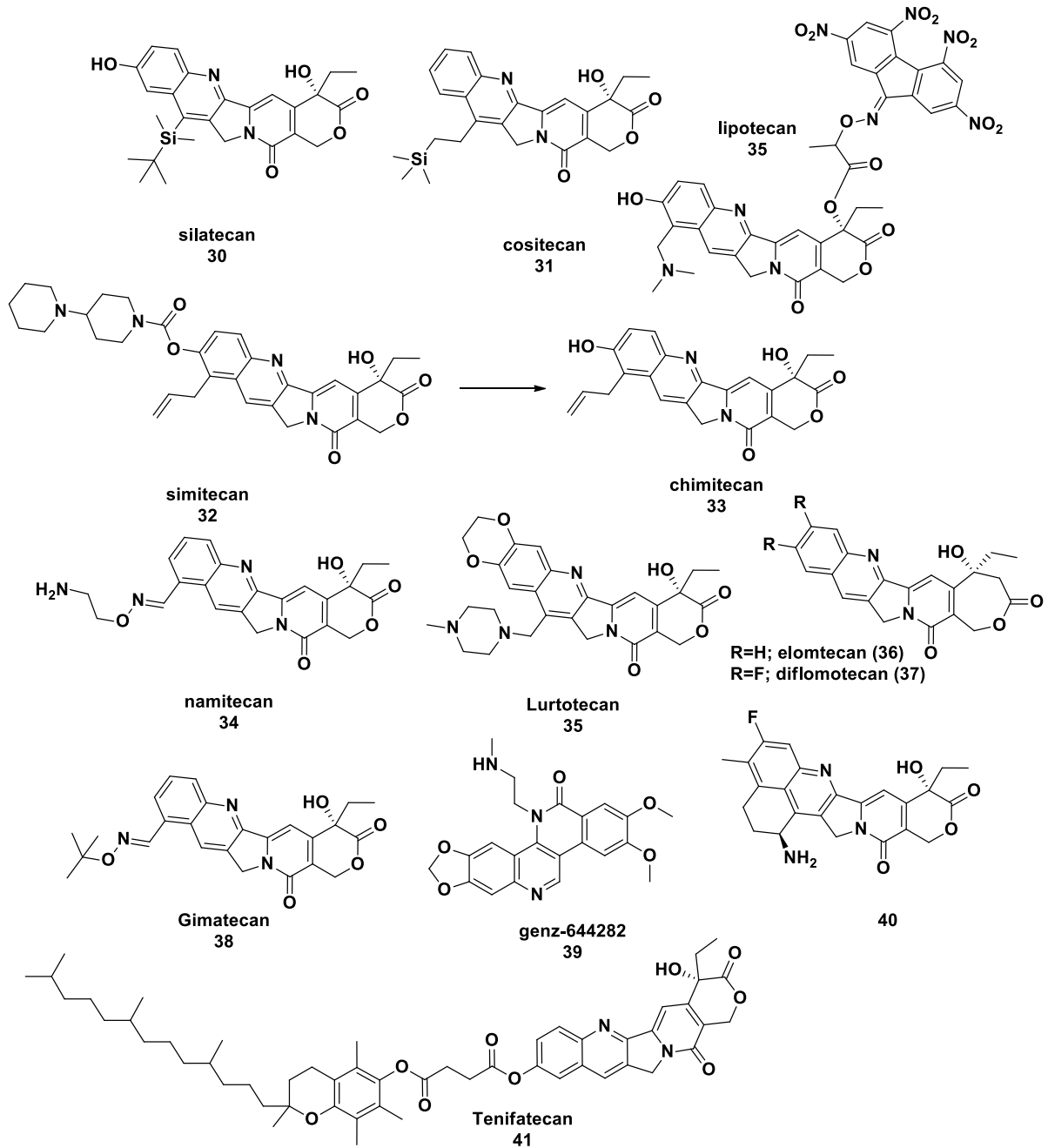


Figura 9. Quinolinas inibidoras da topoisomerase sob investigação clínica.

na base de dados "Web of Science", por exemplo, com as palavras-chaves "quinoline" and "antifungal" onde é possível demonstrar um número considerável e crescente de publicações conforme figura 11.

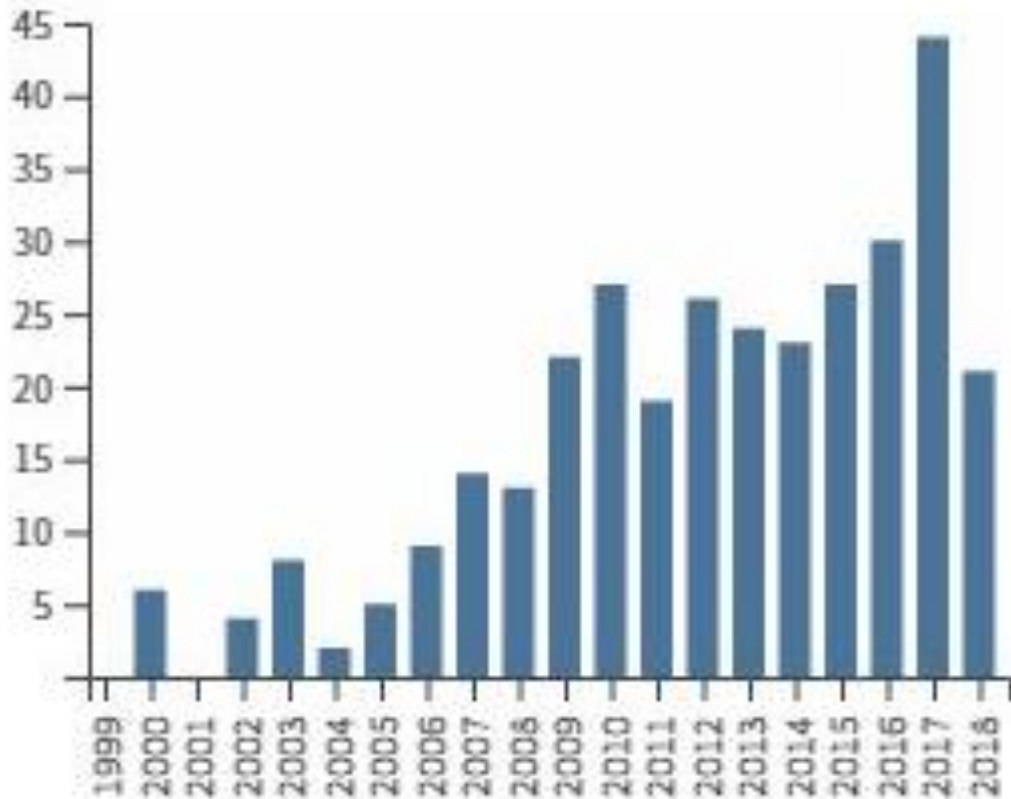


Figura 11. Número de publicações encontradas nos últimos 20 anos com as palavras-chaves "quinoline" and "antifungal". Gráfico gerado pela plataforma "Web of Science™ (WEB OF SCIENCE™, 2018)

O uso do núcleo quinolínicico como uma interessante estrutura base para a síntese de novos fármacos é bastante conhecida no meio científico. Soma-se a isto o fato de que alguns estudos sugerem que a quinolina não modificada apresenta baixa toxicidade, enquanto sua atividade frente algumas cepas de fungos é relativamente alta, o que demonstra ser uma inicial vantagem no contexto de desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos (MUSIOL, R et al., 2010).

É possível descrever alguns fármacos que são utilizados como antifúngicos na clínica médica assim como muito outros em diferentes fases de estudo. O clioquinol por exemplo, foi aprovado para o tratamento de várias infecções fúngicas e protozoárias no início do século XX, porém este fármaco foi diretamente relacionado à neurotoxicidade quando usado cronicamente em altas

doses, retirada do mercado e hoje é utilizado para tratar infecções fúngicas cutâneas. (BAREGGI; CORNELLI, 2010; YOU et al., 2018).

Além disso, compostos com núcleo quinolínico tem sido estudados a fim de obter novos fármacos antifúngicos, como por exemplo, os derivados da 8-hidroxiquinolina (55) demonstrados na figura 12. Estudos de Yaakov e colaboradores com mais de 40.000 moléculas em busca de antifúngicos que agissem por mecanismos não interativos com o metabolismo humano. Neste estudo demonstrou-se que a molécula do bromoquinol (56) foi ativo frente ao fungo *Aspergillus fumigatus* tanto nos ensaios *in vitro* com *in vivo* (YAAKOV et al., 2017).

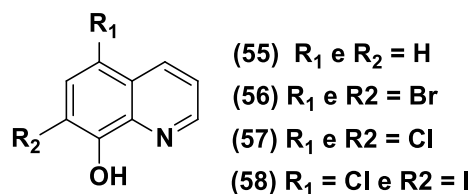


Figura 12. Estrutura da 8-hidroxiquinolina e seus derivados com atividade antifúngica.

Ainda neste contexto da 8-hidroxiquinolina, uma simples modificação da 8-hidroxiquinolina pode fornecer um fungicida interessante, uma vez que a atividade fungistática deste composto e seus complexos metálicos são conhecidos desde o início do século XX e esses compostos ainda são amplamente usados na agricultura e cuidados de saúde. Outra derivatização de quinolina relativamente simples, alquilação ou cloração foi amplamente estudada na busca por melhor atividade em agentes antifúngicos mono e dicloroquinolínicos ainda estão em aplicação (Quinoxifen®) para proteção de cultivos conforme figura 13 (MUSIOL, R. et al., 2010).

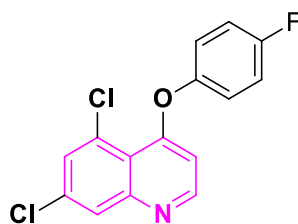


Figura 13. Estrutura no Quinoxifen®, um fungicida com núcleo quinolínico.

No mesmo viés os ácidos 8-hidroxiquinolina-sulfônicos também foram extensivamente investigados buscando atividades antifúngicas. Estas modificações melhoraram a solubilidade dos compostos, fazendo-se relevantes tanto para os fármacos como para os fungicidas agrícolas conforme figura 14.

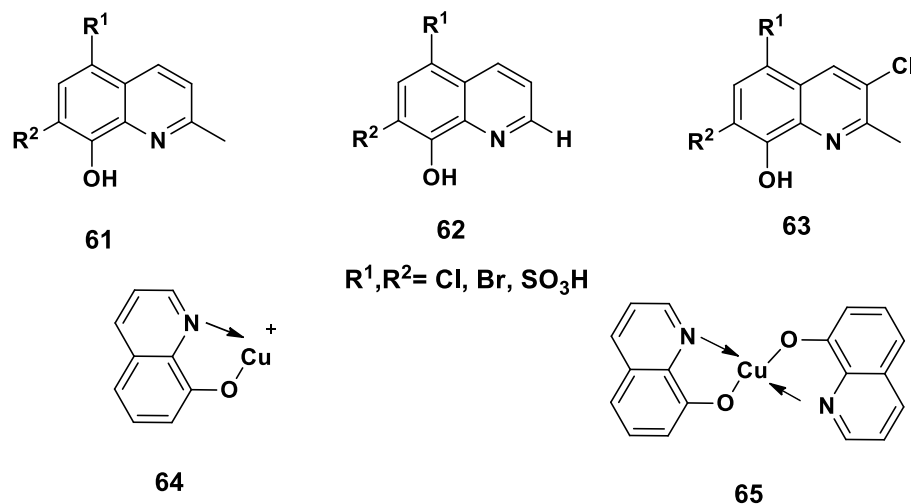


Figura 14. 8-Hidroxiquinolinas e seus derivados com atividade antifúngica.

Segundo Musiol e colaboradores, o núcleo quinolínico substituídos na posição 2 por grupamentos arilas e heteroarilas apresentaram significativa atividade frente a diferentes micro-organismos incluindo fungos. Conforme os estudos publicados é possível observar um esqueleto promissor para o amplo escopo das atividades biológicas como, por exemplo, frente a bactérias Gram-positivas e negativas e cepas fúngicas como *C. Albicans* conforme figura 15(MUSIOL, R. et al., 2010).

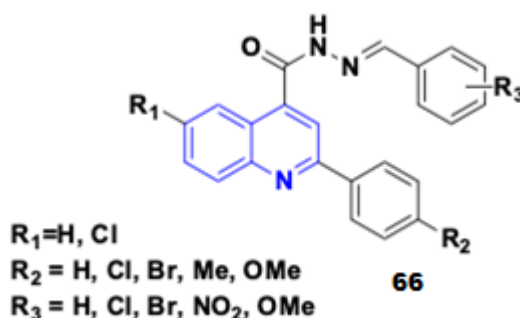


Figura 15. Esqueleto quinolínico (66) com promissora atividade antifúngica.

Derivados da lavendamicina (68) e estreptonitrina (67), originalmente, isolados a partir do caldo fermentado de *Streptomyces lavendulae* foram encontrados descritos como potentes antifúngicos. O núcleo heterocíclico da lavendamicina foi usado como estrutura principal para modificações estruturais e obtenção dos derivados que, por sua vez, foram testados frente *Candida albicans*,

Aspergillus niger, *Tricophyton mentagrophytes* conforme figura 16. Alguns dos compostos sugeriram ter atividade dez vezes superior ao fluconazol ou a grizofulvina (MUSIOL, R. et al., 2010).

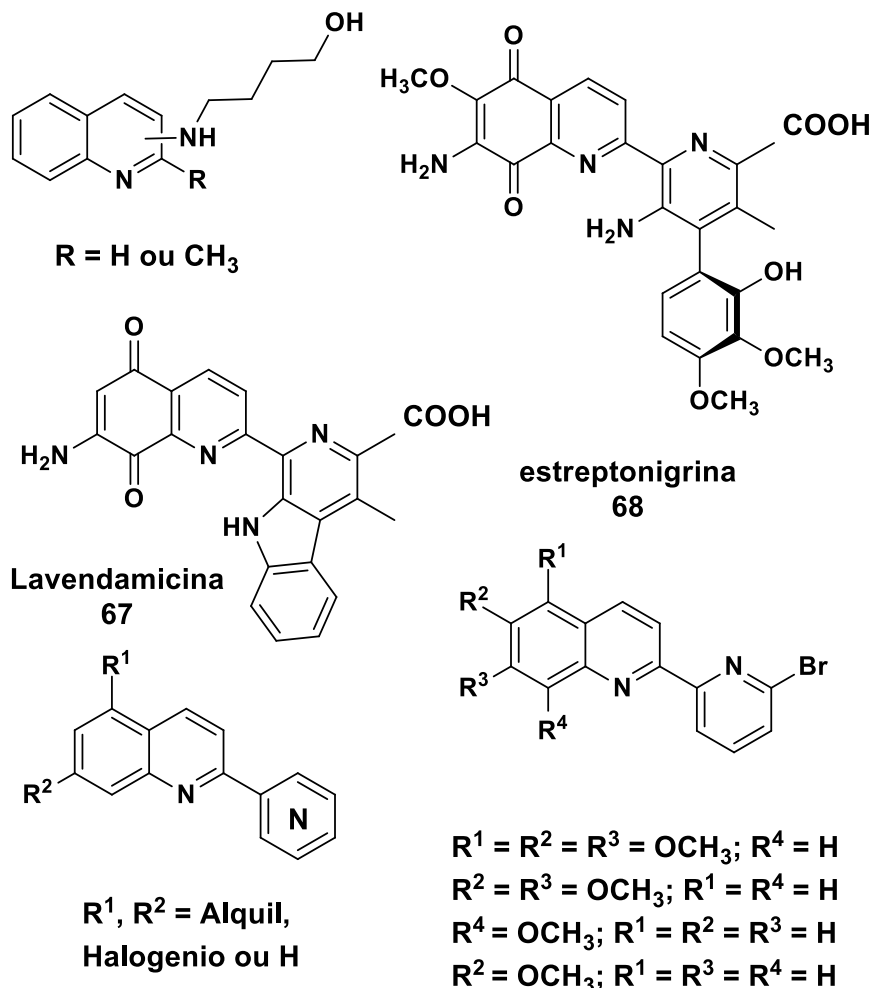


Figura 16. Estrutura dos derivados da lavendamicina e estreptonitrina com potente atividade antifúngica.

3.2 Propriedades físico-químicas relacionadas aos processos ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade)

O processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos normalmente é longo e oneroso podendo levar em média de 10 a 15 anos e custar em torno de 500 milhões a 1 bilhão de dólares, envolvendo equipes altamente qualificadas e multidisciplinares conforme ilustra a figura 17. Esses números, no entanto, podem variar de acordo com a complexidade da molécula e, também, com a complexidade da doença a ser tratada (TAVARES, 2009; SILBER, 2010; MOHS; GREIG, 2017).

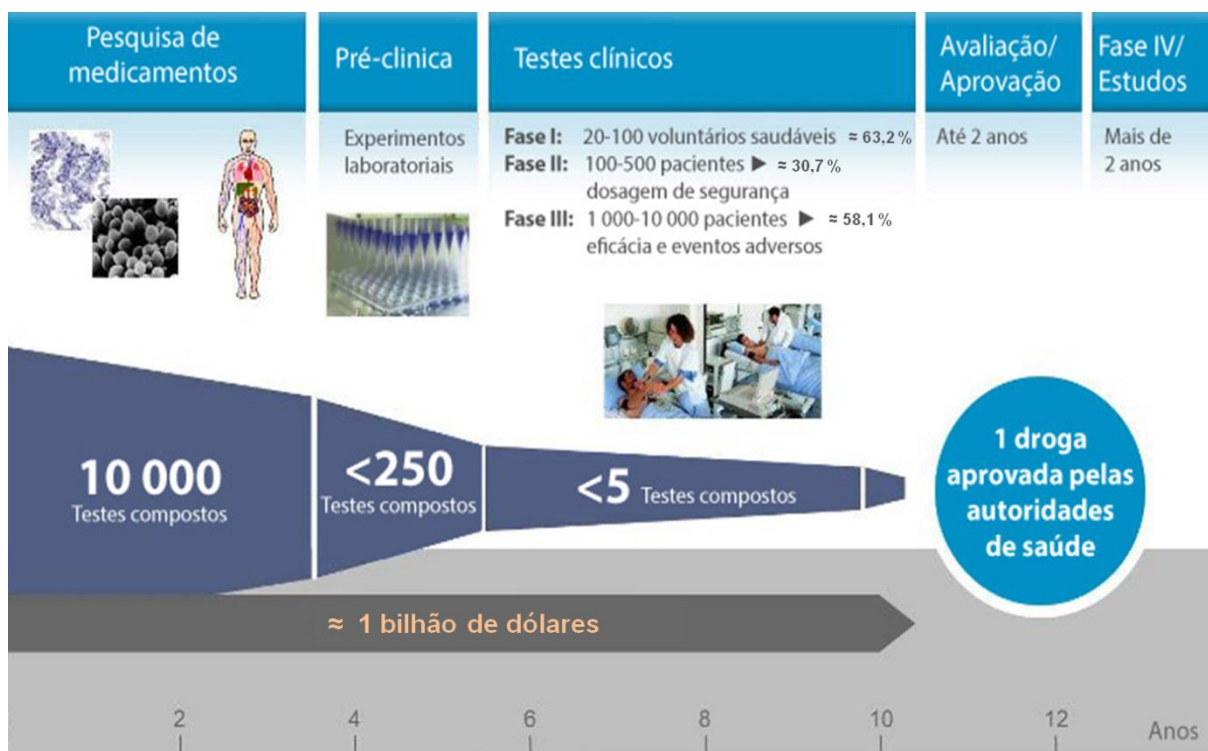


Figura 17. Fases de desenvolvimento de um fármaco. Adaptado de (ROBUCK; WURZELMANN, 2005; HAY et al., 2014).

A química medicinal neste contexto tem evoluído constantemente e a busca por estratégias que diminuam o tempo e custo do desenvolvimento, assim como aumenta eficiência deste processo tem sido constante. Estas novas tecnologias tem contribuído significativamente para o aumento da qualidade de vida população mundial através do eficiente desenvolvimento de fármacos a partir do século XX (BARREIRO; FRAGA, 2014; FERNANDES et al., 2017).

Neste sentido os métodos de bioinformática representam ser uma ferramenta de grande validade para o planejamento e desenvolvimento de fármacos. O emprego destes métodos inicia-se desde a identificação, seleção e otimização de moléculas com elevado potencial terapêutico candidatas a novos fármacos. O uso integrativo e multidisciplinar destes métodos com a pesquisa química e biológica torna o processo de desenvolvimento de novos medicamentos mais eficiente (MODA, 2007; SILBER, 2010; BARREIRO; FRAGA, 2014).

Durante o desenvolvimento de um novo fármaco existem 2 grandes fases: estudos pré-clínicos e clínicos. Na fase pré-clínica são realizados inúmeros estudos de pesquisa básica como a seleção do alvo, desenvolvimento de estratégias *in silico*, síntese e caracterização de moléculas, ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo*

(modelos animais), avaliação toxicológica básica, análise de mercado farmacêutico e documentação legislatória por exemplo. Já nos ensaios clínicos são realizadas pesquisas avançadas no desenvolvimento dos candidatos a fármacos em humanos, além de avaliadas a segurança e eficácia dos candidatos (MODA, 2007; BARREIRO; FRAGA, 2014).

Este processo é de alto risco para a indústria farmacêutica, levando-se em consideração a longa duração dos estudos e o alto custo envolvido. Segundo Kaitin (2010) ao longo dos últimos 50 anos o número de novos fármacos aprovados tem diminuído e os custos relativos ao seu desenvolvimento tem aumentado demonstrando que o processo de desenvolvimento de novos fármacos é lento, ineficiente, arriscado e caro (figura 18) (KAITIN, 2010).

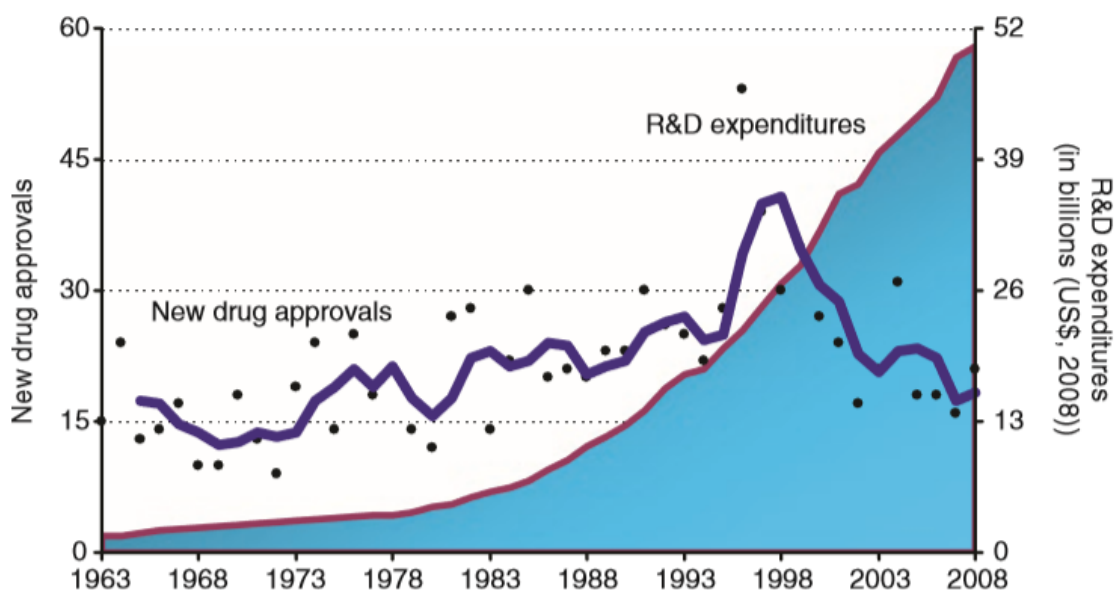


Figura 18. Novas aprovações de fármacos (pontos), representadas no eixo vertical esquerdo, e despesas com P & D farmacêuticas (área sombreada), representadas no eixo vertical direito, nos Estados Unidos de 1963 a 2008. As despesas com P & D são apresentadas em termos de valor constante em 2008. A linha de tendência é uma média móvel de 3 anos. Adaptado de (KAITIN, 2010).

Durante o desenvolvimento de medicamentos, a maioria das falhas ocorre durante os ensaios clínicos de fase II (quando até 70% dos candidatos a medicamentos param de progredir) e fase III (quando 50% param de progredir). Como resultado, o candidato é abandonado devido à eficácia inadequada, questões de segurança inaceitáveis ou outras razões. Falhas na fase I de desenvolvimento,

que é focado na farmacocinética e segurança de doses únicas e múltiplas, são estimadas em cerca de 25% dos candidatos conforme figura 17 (SILBER, 2010).

Estudos farmacocinéticos avaliam os aspectos relativos à velocidade ou ao tempo que uma molécula interage dentro do corpo humano. Estes aspectos envolvem os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Os parâmetros farmacocinéticos são derivados da medição da concentração do fármaco livre ou ligado no sangue ou tecidos. Na fase clínica de estudos a farmacocinética é realizada normalmente na fase I (SILBER, 2010; RANG et al., 2015).

A maioria dos medicamentos é administrada oralmente por razões de conveniência e conformidade. Normalmente, um medicamento dissolve-se no trato gastrointestinal, é absorvido através da parede do intestino. A porcentagem da dose que atinge a circulação sanguínea é chamada de biodisponibilidade. A partir daí, o medicamento será distribuído para vários tecidos e órgãos do corpo. A extensão da distribuição dependerá da estrutura e propriedades físico-químicas do composto. Finalmente, o medicamento se ligará ao seu alvo molecular, por exemplo, um receptor ou canal iônico, e exercer sua ação desejada conforme ilustra a figura 19 (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; RANG et al., 2015).

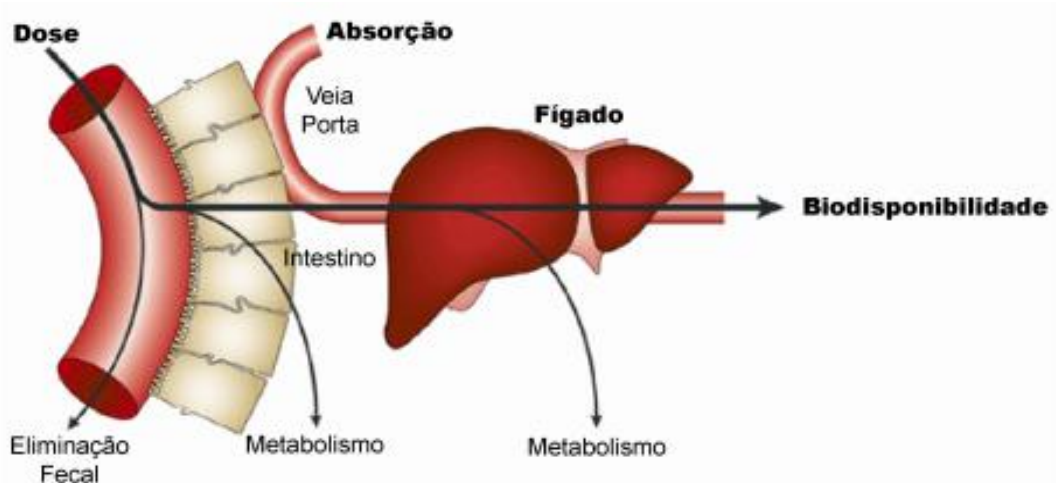


Figura 19. Esquema resumido demonstrando a biodisponibilidade oral em humanos. Adaptado de (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003)

Ao longo dos anos, o principal requisito para que uma molécula avançasse nas fases de estudo pré-clínico eram os resultados na farmacodinâmica, ou seja, os novos candidatos a fármacos deveriam ser potentes e seletivos. No entanto, os

efeitos farmacológicos observados que resultam na atividade terapêutica dos fármacos são também estão relacionados à biodisponibilidade desta molécula por determinado período de tempo nos sítios de ação. Neste sentido, o planejamento e novos fármacos integrando os estudos de múltiplas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas pode promover um significativo aumento na eficiência no processo de desenvolvimento de novos fármacos conforme figura 20 (MODA, 2007; BARREIRO; FRAGA, 2014).

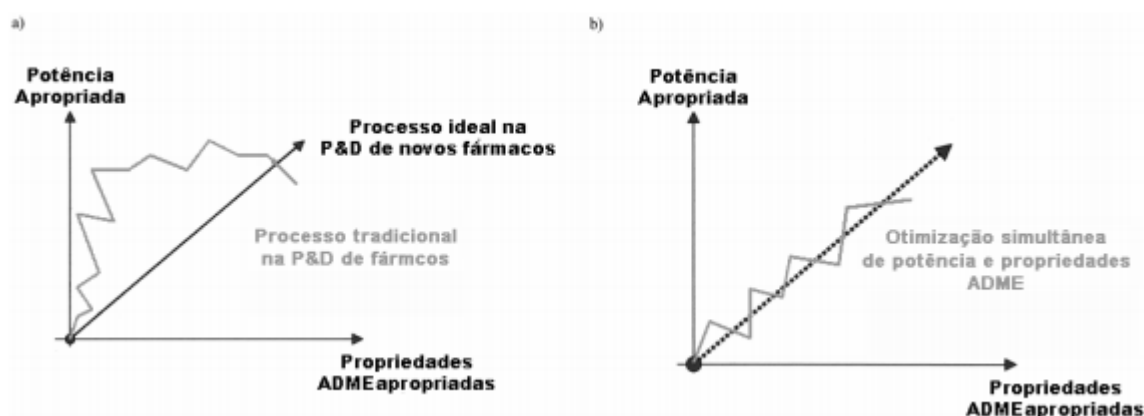


Figura 20. Estratégias de desenvolvimento de novos fármacos com foco na otimização da potência (a) e na otimização da potência, concomitante às propriedades ADME (b). Adaptado de (MODA, 2007).

Estão disponíveis diversos softwares de bioinformática que podem contribuir na fase de planejamento molecular e simulação de propriedades físico-químicas de moléculas candidatas a novos fármacos como, por exemplo, a massa molecular, lipofilicidade, volume molecular ou número de ligações. Estas ferramentas integradas aos ensaios *in vitro* e *in vivo*, podem reduzir significativamente o tempo e os altos custos envolvidos, maximizando a probabilidade de sucesso no desenvolvimento de novos fármacos (RODRIGUES et al., 2012; BARREIRO; FRAGA, 2014).

Muitas propriedades físico-químicas estão diretamente ligadas à farmacocinética das moléculas em estudos. A avaliação em conjunto da farmacodinâmica e farmacocinética das moléculas é um estratégia inteligente e moderna para acelerar e otimizar o processo conforme demonstra a figura 19.

Neste sentido, a busca por técnicas de triagem virtual constitui um dos maiores progressos na atual era de planejamento de fármacos. Tal ferramenta através de diferentes estratégias é capaz de prever o comportamento de moléculas

com características químicas diferentes frente à farmacodinâmica ou farmacocinética (RODRIGUES et al., 2012; BARREIRO; FRAGA, 2014).

3.2.1 Lipofilicidade

A obtenção de informações sobre as características físico-químicas de fármacos nas primeiras fases de seu desenvolvimento é de essencial importância. Levando-se em consideração que a baixa solubilidade e permeabilidade nas membranas biológicas estão entre as principais causas de retirada de candidatos a novos fármacos de estudos biológicos (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Dentre os parâmetros físico-químicos, a lipofilicidade pode ser considerada um dos mais relevantes devido ao seu direto envolvimento com os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), além de interações com o alvo de ação. O fluxo de massa de uma molécula neutra na interface de dois solventes imiscíveis é determinado pela sua lipofilia. A medição quantitativa da lipofilicidade é feita, na forma mais usual, através do coeficiente de partição P (normalmente utilizado na forma logaritmo como logP) em um sistema de octanol-água (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; BARREIRO; FRAGA, 2014).

Desta forma o valor do LogP de uma molécula, pode ser interpretado como sendo a somatória de dois fatores: um relacionado com volume (espacial) e o outro com interações intermoleculares (interações dipolo-dipolo e ligações por hidrogênio). Portanto, a compreensão destes fatores é uma ferramenta indispensável para prever o comportamento farmacocinético e farmacodinâmico de candidatos a fármacos (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; BARREIRO; FRAGA, 2014).

Estudos realizados por Musiol e colaboradores em 2010 demonstraram que a correlação entre a atividade biológica e lipofilicidade são geralmente muito fortes. Neste estudo, foi calculada a lipofilicidade descrita por log P de um pequeno número de quinolinas com baixo peso molecular e plotado em gráfico simples frente os valores de atividade respectivos (figura 21-A). A correlação é nítida levando-se em consideração a curva observada e o R^2 de 0,937. Esta correlação fica mais forte no grupo congênico de estruturas e diminui com o aumento do número de substituintes, assim como seu volume (MUSIOL, R. et al., 2010).

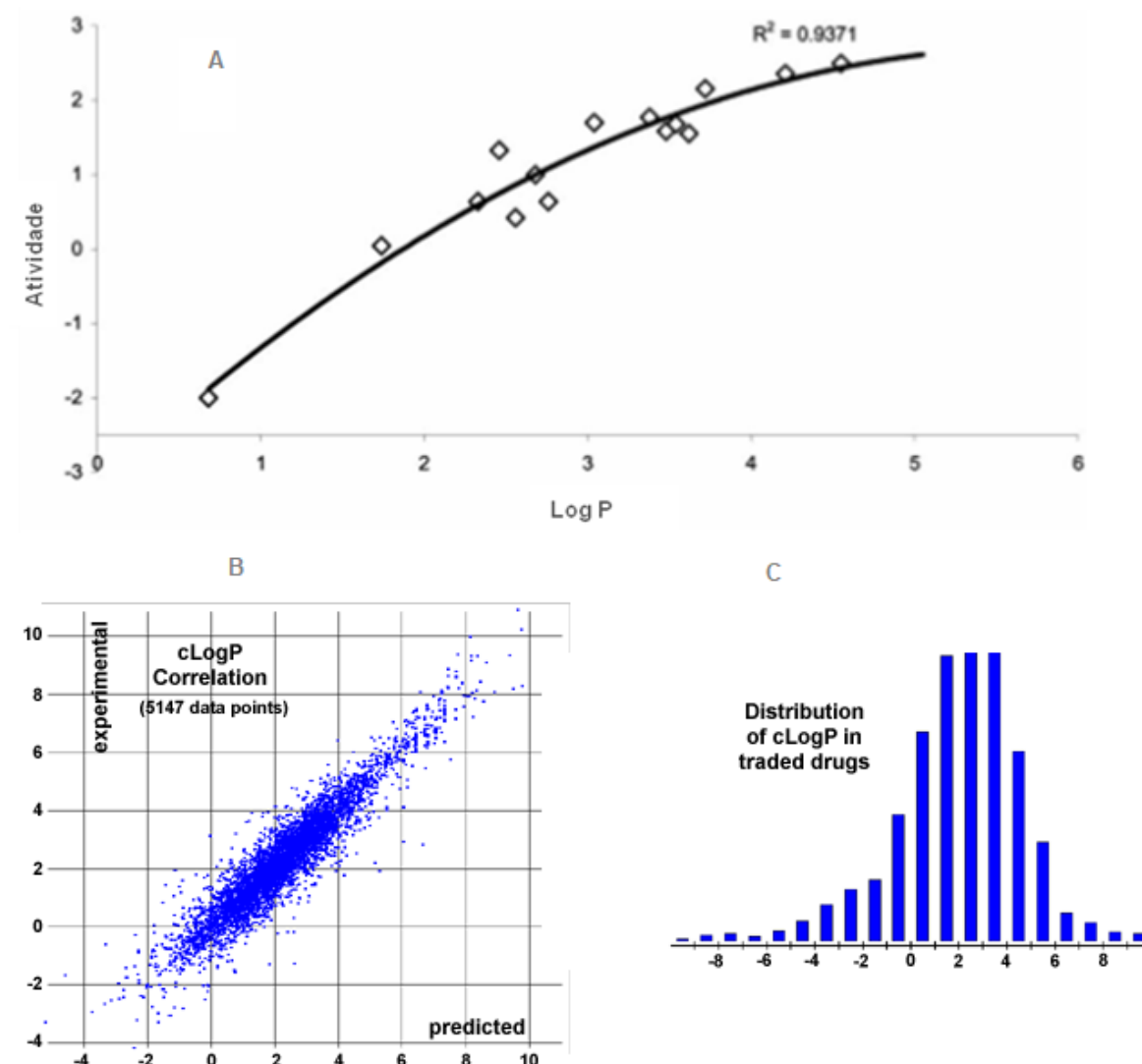


Figura 21. (A) Correlação entre a atividade biológica e lipofilicidade, Log P calculados. Adaptado de (MUSIOL, R. et al., 2010). (B) Correlação entre o logP calculado (cLogP) e o logP predito. (C) Distribuição do logP calculado nos principais fármacos disponíveis adaptado de (ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018).

Além disso, na figura 21-B é possível observar ainda, a correlação entre o logP calculado e experimental, demonstrando que as estimativas *in silico* são uma boa estratégia para prever parâmetros farmacocinéticos e dinâmicos. É possível observar ainda na figura 21-C, a faixa de logP onde a maior parte dos fármacos comercialmente disponíveis está localizada (logP de 0-5) (LAURA D. HUGHES et al., 2008; ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018).

Por outro lado, os valores de logP são uma primeira estimativa de lipofilicidade de um composto em um ambiente biológico. Para compostos com potencial de ionização, o soluto pode exibir uma variedade de espécies diferentes em cada pH determinado. Para processos de partição no corpo humano, a forma

mais utilizada de avaliação quantitativa é coeficiente D de partição octanol-água (normalmente usado na forma logarítmica de $\log D$) no qual um tampão pH 7,4 (pH fisiológico do sangue) ou 6,5 (pH intestinal) é usado na determinação experimental. Este coeficiente fornece uma descrição mais fidedigna da lipofilicidade, especialmente tratando-se de fármacos ou moléculas desenvolvidas para tal finalidade (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; BHAL, 2009).

Neste sentido, lipofilicidade está correlacionada com a permeabilidade *in vivo* levando-se em consideração a mudança nos ambientes de pH que um composto administrado por via oral provavelmente encontrará no trato gastrointestinal (GI) conforme figura 22.

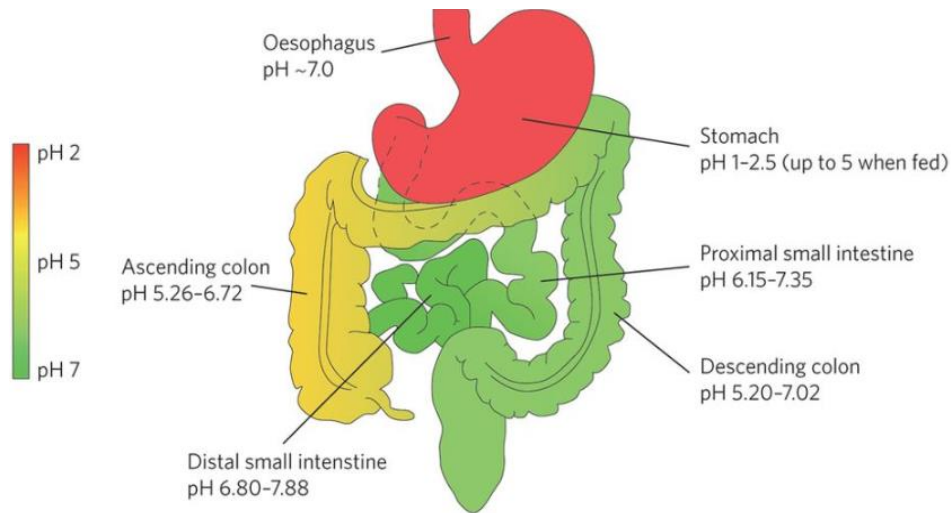


Figura 22. Morfologia do trato gastrointestinal humano e valores de pH em diferentes partes. Adaptado de (KHUTORYANSKIY, 2015).

3.2.2 Solubilidade

Durante o processo de absorção de um medicamento a solubilidade do mesmo no sistema digestivo é fundamental para o desempenho da atividade biológica. Neste processo (absorção oral), é necessário que a forma farmacêutica se desintegre e dissolva o princípio ativo no meio biológico. Em geral, baixa solubilidade oral (ou baixa dissolução) está diretamente relacionada à alta lipofilicidade, porém, moléculas muito hidrofílicas podem apresentar problemas de permeabilidade, levando a uma absorção insuficiente. O equilíbrio entre os coeficientes de solubilidade e lipofilicidade é de fundamental importância para o êxito

de novos fármacos em desenvolvimento (PALMER et al., 2008; DI et al., 2009; WILLIAMS et al., 2013).

Desta forma, tem havido amplo consenso sobre o fato de que é extremamente necessária (em termos de dinheiro, tempo e trabalho) a determinação em estágios precoces de desenvolvimento da solubilidade dos compostos. Refletindo essa necessidade, ao longo dos anos houveram esforços significativos voltados ao desenvolvimento de modelos computacionais como ferramentas de baixo custo para prever a solubilidade de moléculas em estudo (DI et al., 2009; THAPA et al., 2017; GANESAN; BARAKAT, 2017).

A maioria dos métodos desenvolvidos para predição *in silico* calcula a solubilidade intrínseca para a molécula estudada. A solubilidade intrínseca de uma molécula é a concentração em equilíbrio com a fase sólida que se dissolveu na solução em análise. O logaritmo natural, $\log S$, é usado por conveniência na literatura, onde S é a solubilidade a uma temperatura de 20-25 ° C em mol / L. Na figura 23-A é possível observar que mais de 80% dos medicamentos no disponíveis no mercado têm um valor de $\log S$ (estimado) maior que -4. Ainda é possível observar a correlação entre o $\log S$ estimado e experimental na figura 23-B (LAURA D. HUGHES et al., 2008; PALMER et al., 2008; ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018).

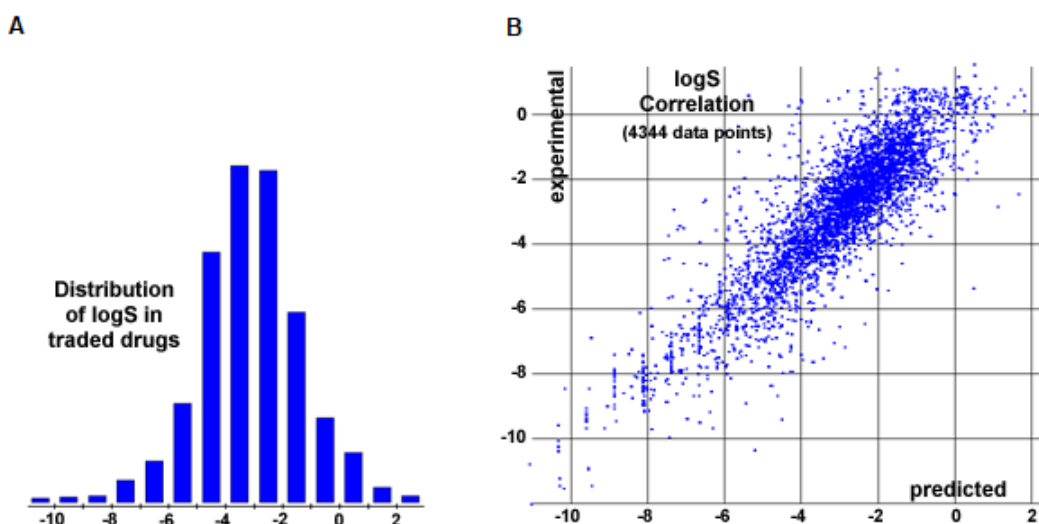


Figura 23. (A) Distribuição do $\log S$ estimado entre os principais fármacos disponíveis. (B) correlação entre o $\log S$ estimado e experimental. Adaptado de (ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018).

A solubilidade aquosa é quase exclusivamente dependente nas interações intermoleculares entre a molécula-molécula, molécula-água e água-água. Desta forma, a solubilidade de um composto é dependente por muitos fatores moleculares, incluindo o tamanho e forma, a polaridade e hidrofobicidade e a capacidade fazer ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Por tal motivo, a correlação observada entre o logS calculado e observado experimentalmente muitas vezes não encontra-se dentro de valores desejáveis (figura 23-B) (JUNMEI WANG et al., 2007; PALMER et al., 2008; ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018).

3.2.3 Regra de Lipinski

Ao longo de décadas estudos tem sido realizados na tentativa de encontrar o perfil dos fármacos disponíveis no mercado em relação à absorção e permeabilidade no trato gastrointestinal. Um dos estudos mais conhecidos e aceito é o de Lipinski e colaboradores, também conhecido como a "Regra dos cinco". Neste estudo foram observadas cerca de 2250 moléculas e estabeleceu-se de forma pioneira uma relação entre os parâmetros avaliados e uma boa perspectiva farmacocinética. No contexto da descoberta de um novo fármaco, a regra de Lipinski prevê que para uma molécula apresentar absorção ou permeabilidade satisfatória, parâmetros que são determinantes para o sucesso, a mesma deve demonstrar as seguintes características (LIPINSKI et al., 2001; LIPINSKI, 2004; BENET et al., 2016):

- No máximo 5 doadores de ligação de hidrogênio (NH, OH);
- Um máximo de 10 aceptores de ligação de hidrogênio (O, N);
- $\text{Log } P \leq 5$;
- Massa molecular inferior a 500 g/mol.

A partir das correlações estabelecidas por Lipinski e colaboradores, diversos outros estudos foram realizados no intuito de caracterizar outras propriedades moleculares relevantes no estudo de novos fármacos. Uma das importantes inclusões foi a atribuição da área de superfície polar (PSA) como um dos fatores importantes na permeabilidade celular, com valor ideal estabelecido: $\text{PSA} \leq 140 \text{ \AA}^2$ (LIPINSKI, 2004; BENET et al., 2016).

3.2.4 Predição de parâmetros toxicológicos

A avaliação da toxicidade de compostos químicos faz-se necessária para identificar seus possíveis efeitos nocivos em humanos, animais, plantas e no meio ambiente. No desenvolvimento de novos fármacos, a avaliação da segurança é um dos principais passos e é de relevância elevada (LEI et al., 2016).

Modelos *in vitro* e *in vivo* têm sido usados ao longo dos anos para testes de toxicidade. No entanto, estes testes podem apresentar desvantagens como a demora no processo, problemas com considerações éticas e encargos financeiros elevados. Além disso, a sociedade contemporânea tem tolerado cada vez menos os testes em animais. Na Europa, por exemplo, desde 2003 a avaliação *in vivo* de produtos cosméticos é proibida e a venda de cosméticos e ingredientes testados em animais é proibida desde 2013 (CRUNKHORN, 2007a; ALVES et al., 2018).

Em face disso, as legislações, diretrizes e práticas de experimentos com animais têm buscado implementar princípios para reduzir, refinar e substituir animais usados em testes laboratoriais. Desta forma, as metodologias computacionais que visam estimar a toxicidade de compostos químicos tem sido consideradas cada vez mais úteis dentro do contexto atual de desenvolvimento e regulação de medicamentos, cosméticos e outros produtos químicos (CRUNKHORN, 2007b; RAIES; BAJIC, 2016).

A toxicologia *in silico* é um tipo de avaliação de toxicidade que utiliza métodos computacionais para analisar, simular, visualizar ou prever a toxicidade de substâncias químicas. Estas análises tem como intuito prever características tóxicas, orientar possíveis testes de toxicidade em etapas futuras de desenvolvimento e minimizar a presença falhas no estágio final de desenvolvimento de novos fármacos. Neste sentido, a análise toxicológica *in silico* de novos candidatos a medicamentos torna-se etapa primordial afim de alcançar eficiência neste processo (RAIES; BAJIC, 2016; ALVES et al., 2018).

CAPÍTULO 1 – SKRAUP E DOEBNER-VON MILLER

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a busca por novos métodos sintéticos é de extrema relevância para a química orgânica e medicinal. Dentro deste contexto, o núcleo quinolínico tem sido extensivamente descrito como um esqueleto privilegiado no escopo da química medicinal. A presença de milhares de publicações correlacionando este núcleo básico a diversas atividades biológicas, assim como sua presença em dezenas de fármacos utilizados na clínica médica demonstra a relevância desta estrutura.

Desta forma métodos sintéticos tem sido desenvolvidos e aperfeiçoados constantemente no ambiente da síntese orgânica a fim de obter tanto o núcleo quinolínico assim como seus derivados funcionalizados de forma eficiente, diversificada e segura para o meio ambiente.

Além de apresentar significativa importância ao desenvolvimento de fármacos o núcleo quinolínico também alcança grande relevância econômica no âmbito da indústria química e agrícola, servindo como matéria-prima básica para diversos matérias e aditivos agrícolas.

Skraup e Doebner-von Miller foram pioneiros nos métodos sintéticos da quinolina e suas metodologias trouxeram avanços na época em que foram desenvolvidos. No entanto suas metodologias apresentam diversas limitações e no contexto atual de faz-se necessária à melhoria e aperfeiçoamento de métodos sintéticos para o núcleo quinolínico. Neste sentido, a busca por novos métodos sintéticos da quinolina, assim com o aperfeiçoamento dos já existentes é de grande importância tanto para química medicinal, indústria a química e agricultura.

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia sintética para o núcleo quinolínico baseando-se na tradicional estratégia de síntese publicada por Skraup e Doebner-von Miller.

2.1 Objetivos específicos

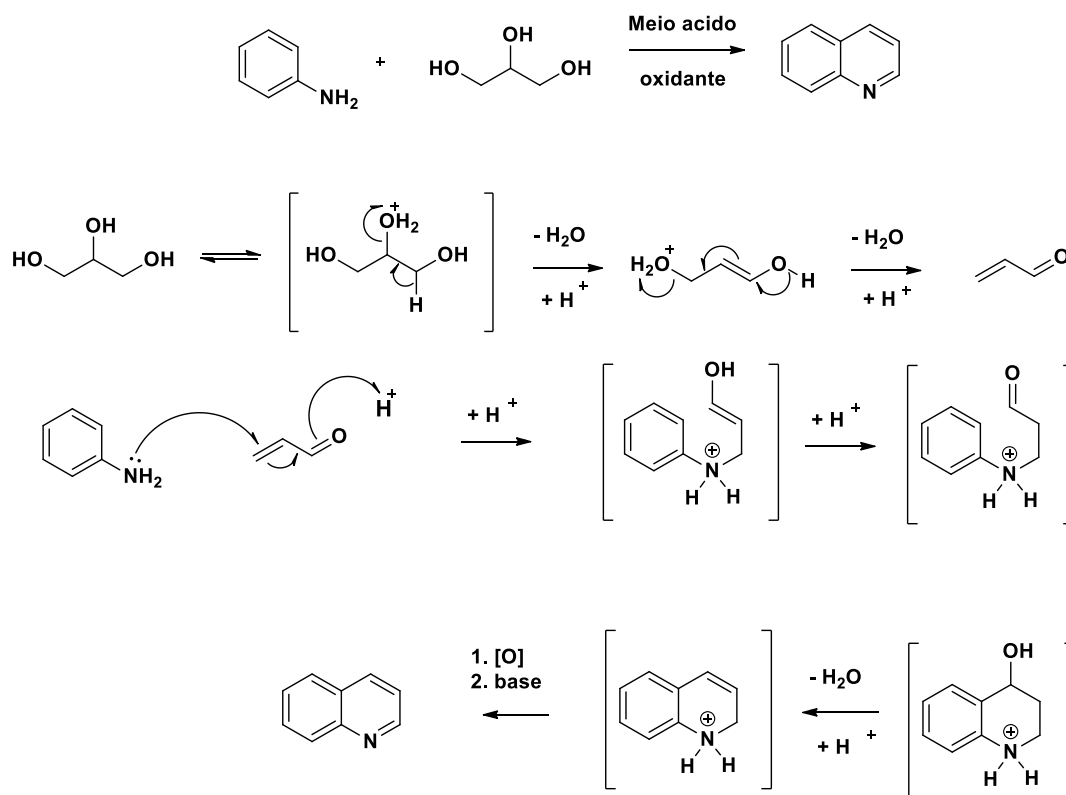
- Avaliar a formação do núcleo quinolínico sob diferentes condições reacionais;
- Desenvolver um rápido e eficiente método de quantificação do rendimento das quinolinas obtidas;
- Estabelecer um algorítmico reacional que ofereça melhores condições e rendimentos para o núcleo quinolínico;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Síntese de quinolinas através de Skraup e Doebner-von Miller

3.1.1 Síntese de Skraup

Skraup foi um dos pioneiros na síntese do núcleo quinolínico tão relevante para a química medicinal. Em 1880, Skraup publicou sua metodologia clássica que envolve uma série de reações provocadas por aquecimento de uma amina aromática primária, em que pelo menos uma posição orto em relação ao grupo amino não é substituída, na presença de glicerol, ácido sulfúrico e um agente oxidante (MATTOS; MARZORATI, 1999; CLAYDEN et al., 2012). O produto é uma quinolina contendo apenas os substituintes que estavam originalmente presentes na amina aromática conforme esquema 4.

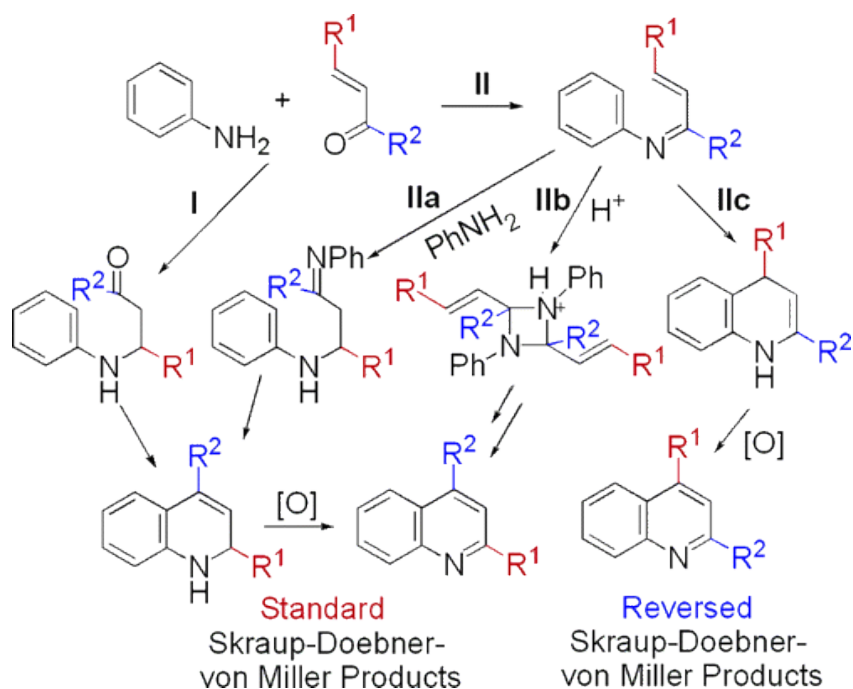


Esquema 4 Mecanismo de reação de Skraup para a obtenção da quinolina a partir de anilina e glicerol.

Na síntese de Skraup (esquema 4), a anilina (**2**) atua como uma espécie nucleofílica reagindo com a acroleína (**7**) em meio ácido. A acroleína polimeriza com facilidade sob aquecimento na presença de ácido sulfúrico, desta forma a reação poderia ser realizada com glicerol (**6**), o qual em meio ácido desidrata, gerando a acroleína *in situ*. A anilina realiza a adição 1,4 de Michael na acroleína formada, levando ao intermediário aberto carregado. Posteriormente acontece a ciclização deste intermediário através de substituição eletrofílica aromática intermolecular. Após a desidratação um intermediário carregado é formado e oxidado para formar a quinolina (**1**) (MANSKE; KULKA, 2004; YAMASHKIN; ORESHKINA, 2006; DENMARK; VENKATRAMAN, 2006; WU et al., 2006).

3.1.2 Síntese de Doebner-von Miller

Uma dupla de pesquisadores, Doebner e von Miller desenvolveram logo após Skraup, em 1881, uma metodologia parecida com a de seu antecessor. Ao reagir anilinas com compostos carbonílicos α,β -insaturados (aceptores da reação de Michael), foram obtidas quinolinas substituídas na parte piridínica do esqueleto. Além é claro das possíveis substituições no anel benzênico já desenvolvidas por Skraup. Este tipo de reação apresenta mecanismo parecido à reação de Skraup, assim ela também é denominada reação de Skraup-Doebner-Miller (WANG, 2010; HERAVI et al., 2014). No entanto não há um consenso na literatura sobre o exato mecanismo, várias propostas foram descritas conforme esquema 5 (EISCH; DLUZNIEWSKI, 1989; LI, 2004; YAMASHKIN; ORESHKINA, 2006; WU et al., 2006; WANG, 2010; RAMANN; COWEN, 2015).



Esquema 5. Mecanismos propostos para a reação de Skraup-Doebner- von Miller (WU et al., 2006).

Além da vantagem de derivados mais substituídos, há vantagens também em relação às condições reacionais quando comparadas a metodologia descrita por Skraup. A reação de Doebner e von Miller pode ser promovida por ácidos de Bronsted como ácido perclórico ou ácido *p*-toluenossulfônico, ou ainda por ácidos de Lewis como tricloreto de índio (HERAVI et al., 2014; SAMOILICHENKO et al., 2017).

3.2 Química verde e a síntese de quinolinas

Embora muitos destes métodos sejam eficazes, muitas vezes são utilizadas condições reacionais extremas como por exemplo meios ácidos fortes, reagentes com baixa compatibilidade, produção de quantidade exagerada subprodutos e longos tempos de reação. Desta forma tornou-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias sintéticas que visam amenizar ou solucionar os problemas supracitados (PRAJAPATI et al., 2014).

Dentre as propostas encontradas na literatura estão alguns princípios básicos da química verde como, por exemplo, abordagens sintéticas com o mínimo de desperdício, baixo consumo de energia, menos perigosas, que utilize reagentes e

materiais renováveis, com economia de átomos elevados, uso de catalisadores verdes que melhoram a eficiência da reação (PRAJAPATI et al., 2014).

Levando em consideração estes princípios são descritas metodologias sintéticas na literatura que buscam colocar em prática de maneira eficiente alguns destes princípios (PRAJAPATI et al., 2014):

- Meios reacionais alternativos como líquidos iônicos, água, polietilenoglicol ou reações sem solvente;
- Fontes de energia alternativas como micro-ondas, ultrassom e luz solar/UV;
- Catalisadores que podem ser reciclados ou reutilizados.

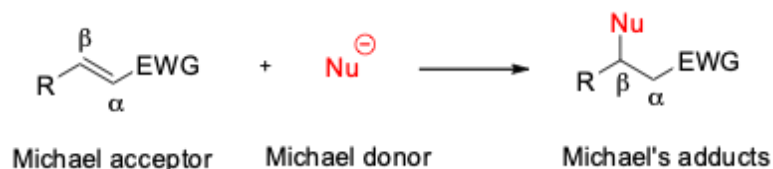
Em face disso, é possível observar a importância do núcleo quinolínico levando em consideração vários esforços em desenvolver metodologias sintéticas mais eficientes e limpas. No entanto, ainda são necessários mais estudos a fim de desenvolver metodologias que possibilitem funcionalizar o núcleo quinolínico com maior facilidade e variabilidade química, o qual pode colaborar com o avanço no desenvolvimento de novos fármacos por exemplo.

3.3 Adição de Michael

A reação de Michael ou também chamada adição de Michael foi descoberta por Komenos e Claisen, mas foi Arthur Michael quem efetivamente desenvolveu e relatou esta reação em uma série de artigos em 1887, nomeando assim esta reação. Sua versatilidade de substratos, condições reacionais suaves, alta tolerância a grupos funcionais, variabilidade de solventes e temperaturas, uso em reações de polimerização e altas taxas de conversões permitem a síntese de estruturas sofisticadas em condições em que outros processos de reação não funcionariam, assim, a adição de Michael é uma das reações mais utilizadas na formação de ligações simples carbono-carbono. (MATTOS; MARZORATI, 1999; POON et al., 2002; BRUICE, 2004; MATHER et al., 2006).

A reação de Michael faz parte das adições conjugadas e é, convencionalmente, caracterizada pela adição de nucleófilos (doadores de Michael) a olefinas ativadas (aceptores de Michael) conforme esquema 6, no entanto, ao longo dos anos, o escopo dessa reação aumentou significativamente para incluir

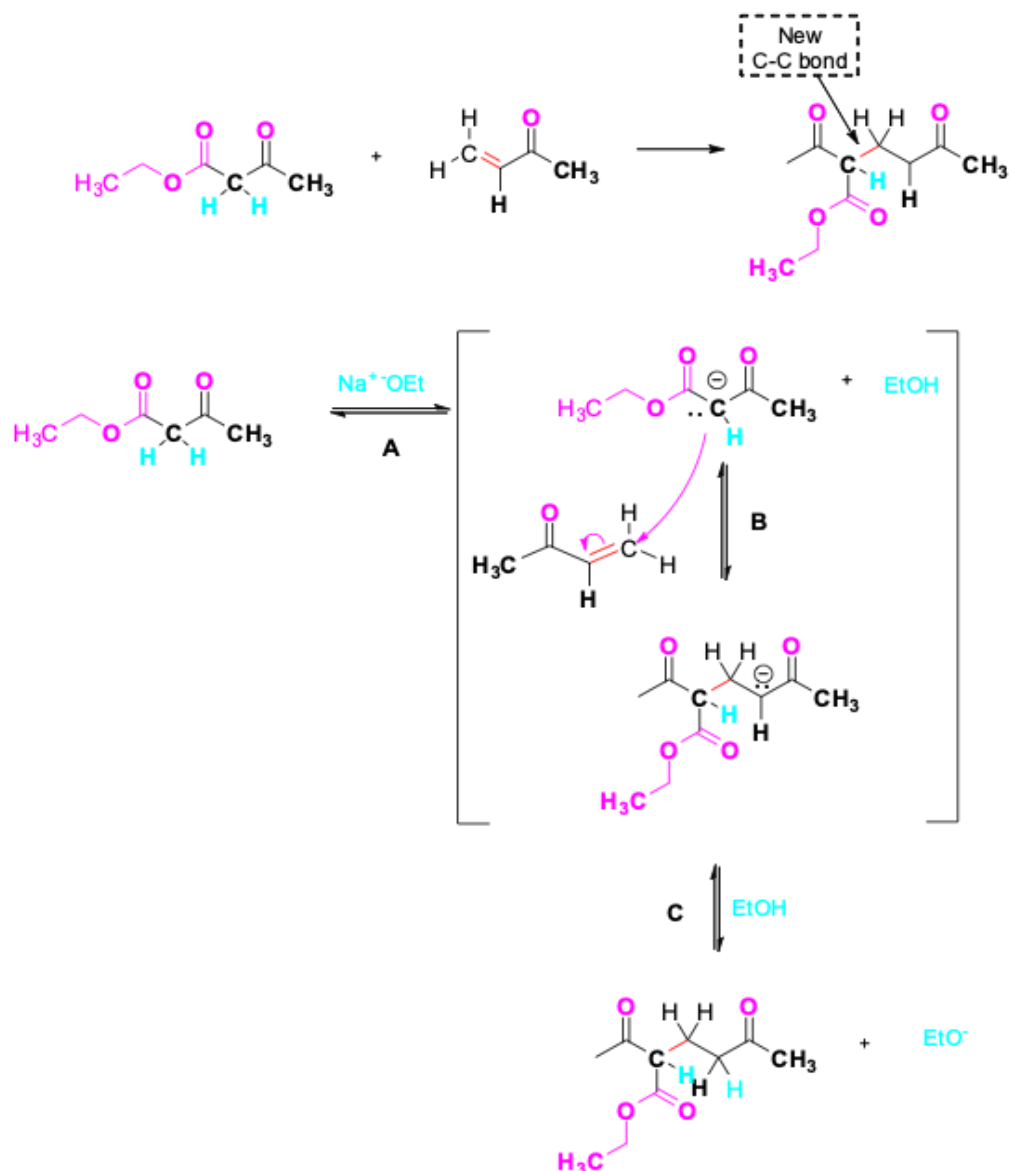
uma ampla gama de aceptores e doadores de Michael (MATTOS; MARZORATI, 1999; BRUICE, 2004; MATHER et al., 2006; CLAYDEN et al., 2012).



Esquema 6. Esquema geral da adição de Michael. Onde EWG = grupo retirador de elétrons. Adaptado de (CLAYDEN et al., 2012).

Embora a reação de Michael seja normalmente catalisada por bases, é possível realizar a catálise também através de ácidos de Lewis. Esta reação é diferenciada das reações de alquilação, justamente por regenerar a base no meio reacional, possibilitando o uso, muitas vezes, de quantidades catalíticas da mesma.

O mecanismo geral para a reação de Michael está descrito no esquema 7, esta reação ocorre através da adição nucleofílica de um carbânion ou outro nucleófilo a um composto carbonílico α , β -insaturado. Segundo a esquema7: A) A base remove um hidrogênio ácido do alfa-cetoéster para gerar um nucleófilo (doador de Michael) de íon enolato estabilizado; B) O nucleófilo reage com o eletrófilo (aceptor de Michael), uma cetona α , β -insaturada, atacando o carbono alfa da mesma numa reação de Michael, gerando, desta forma, um novo enolato como produto; C) O enolato formado na etapa anterior, extrai um hidrogênio ácido, seja do solvente ou base, para produzir o produto final da adição de Michael com a base regenerada. (MATTOS; MARZORATI, 1999; CLAYDEN et al., 2012; MCMURRY, 2012)..



Esquema 7. Mecanismo geral da reação de Michael entre um β -ceto éster e uma cetona α, β -insaturada. A reação é uma adição conjugada de um íon enolato ao composto carbonílico insaturado. Adaptado de (BRUICE, 2004; MCMURRY, 2012).

A reação de Michael ocorre com uma variedade de compostos carbonílicos α, β -insaturados, não apenas cetonas conjugadas. Aldeídos insaturados, ésteres, tioésteres, nitrilas, amidas e compostos nitro podem atuar como o componente aceptor nas reações de Michael. Da mesma forma, uma variedade de diferentes doadores pode ser usada, incluindo β -dicetonas, β -cetoésteres, ésteres malônicos, β -acetonitrilas e nitro compostos (Figura 24) (CLAYDEN et al., 2012; MCMURRY, 2012).

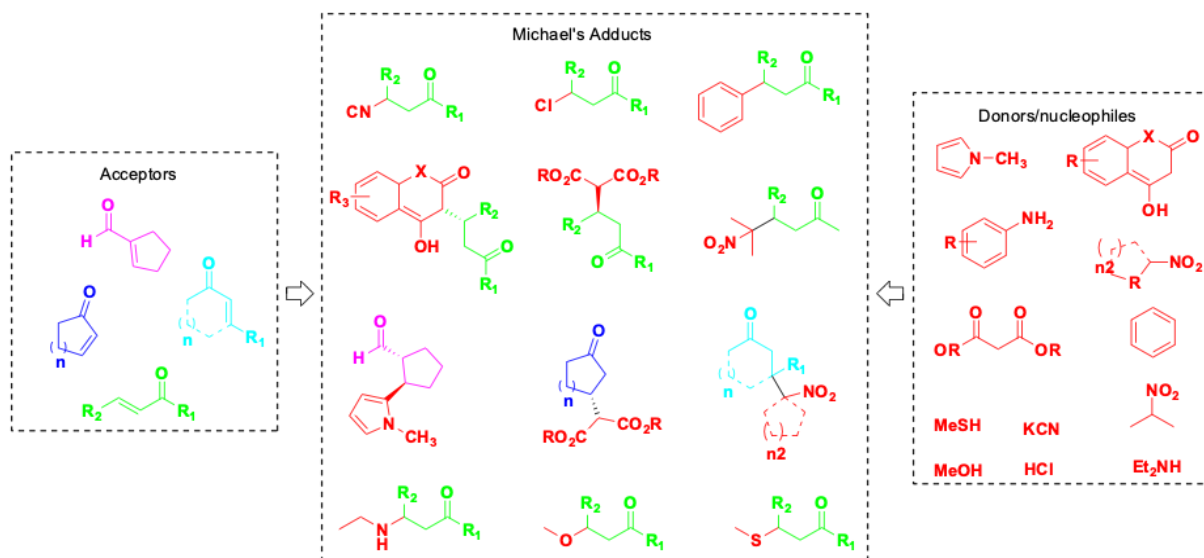


Figura 24. Diferentes tipos de aceptores e doadores de Michael, assim como seus respectivos adutos. Adaptado de (CLAYDEN et al., 2012; MCMURRY, 2012).

3.4 Proposta de síntese One Pot/ Tandem de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller

A partir da revisão realizada na literatura pela busca de inovações na síntese de derivados quinolínicos foi elaborada a proposta de síntese One Pot/Tandem de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller. Esta nova metodologia seria inédita para o núcleo quinolínico, obtendo-se assim novos derivados, utilizando condições reacionais mais brandas e com maiores rendimentos, condições estas de extrema importância quando trata-se da síntese de derivados complexos e com grupamentos químicos sensíveis.

Com o objetivo de encontrar as melhores condições reacionais e rendimentos, diferentes parâmetros e condições foram avaliados como temperatura, tempo reacional, concentração dos reagentes e métodos de quantificação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

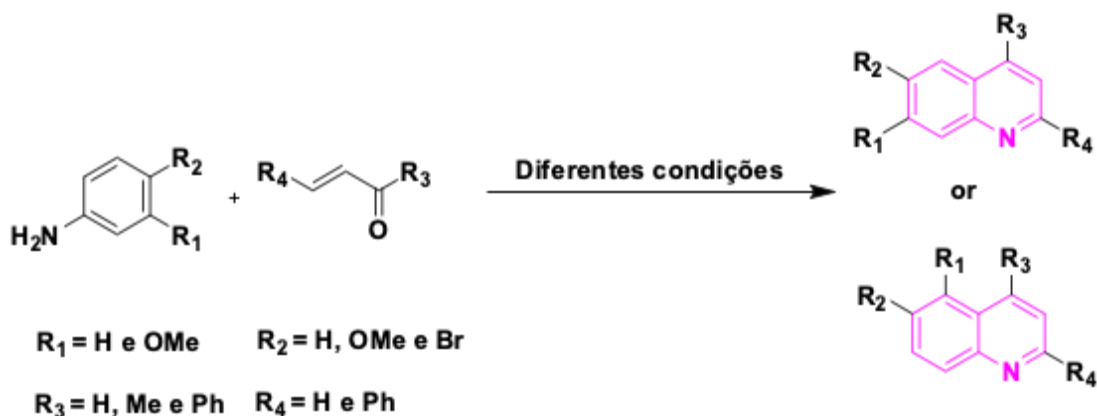
4.1 Procedimentos experimentais gerais

Os produtos químicos e reagentes foram adquiridos a partir de fornecedores comerciais e utilizados conforme indicação do fabricante. Os solventes foram destilados sob atmosfera de nitrogênio quando necessário. As reações que requereram condições anidras foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio ou argônio. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em placas 0,2 milímetro pré-revestidos de sílica gel (Merck) e visualizados, por pulverização com diferentes reveladores (anisaldeído sulfúrico, ácido fosfomolibdico e permanganato de potássio) sob aquecimento, além de observação sob luz UV. A evaporação e concentração dos solventes foi feita no evaporador rotativo usando bomba de vácuo. Os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN foram medidos em Equipamento Bruker® 300 e 400 MHz, usando SiMe_4 (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) são dados em ppm e as constantes de acoplamentos (J) são dadas em Hertz. O solvente deuterado utilizado foi CDCl_3 . Padrões de desdobramento foram designados como segue: s = simpleto, sl = simpleto alargado, d = duplete, dd = duplo duplete, ddd = duplo duplo duplete, t = tripleto, dt = duplo tripleto, q = quarteto, m = multiplete. As purificações foram realizadas através de cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (malha 70–200 e malha 40-60) ou utilizando sílica gel 60 PF254 para cromatografia preparativa em camada fina. Éter de petróleo (PE) foi usado nas purificações, com a fração de baixo ponto de ebulição (40-60).

4.2 Síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller

A síntese de quinolinas baseada na metodologia de Skraup e Doebner-von Miller foi realizada reagindo anilinas, substituídas ou não, com cetonas α , β -insaturadas conforme esquema geral descrito na esquema 8. A fim de encontrar as melhores condições reacionais diversas condições foram variadas como; solvente,

temperatura, ácidos de Bronsted e Lewis e suas concentrações, tempo reacional, atmosfera (aberta, N₂ ou O₂), presença de agente oxidante e método de quantificação (isolamento ou qRMN).



Esquema 8. Esquema geral para síntese de quinolinas baseada na estratégia de Skraup-Doebner-von Miller.

De modo geral, primeiramente foram adicionados ao tubo reacional os reagentes sólidos, seguidos do respectivo solvente e por último da cetona alfa, beta-insaturada. As anilinas foram pesadas e adicionadas ao tubo reacional na proporção de 1 equivalente molar (1 eq.) e 0,5 mMol. Logo em seguida, os ácidos de Bronsted e Lewis foram adicionados em associação ou não na proporção variável de 1 a 0,1 eq. Em seguida foram adicionados de 1 a 2 ml de solvente. Por fim, a cetona alfa, beta-insaturada foi adicionada nas proporções variáveis de 1,2 a 2,4 eq.

A maioria das reações foi realizada sob atmosfera inerte (N₂ ou Ar), mas, ocasionalmente, a fim de testar esta necessidade foi utilizada atmosfera aberta ou sob gás oxigênio. As reações foram realizadas em tubo selado da marca Pirex[®], com volume total de 10 ml. Foram mantidas sob sistema fechado e monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD), a fim de observar o consumo do reagente limitante da reação (anilinas). O tratamento reacional foi realizado com a evaporação do solvente sob pressão reduzida, seguido de partição em funil de separação com éter dietílico e solução saturada de bicarbonato de sódio

Após a extração a fase orgânica foi reservada e o solvente retirado através da evaporação sob pressão reduzida, obtendo-se o resíduo bruto da reação. Uma pequena alíquota desta reação bruta (10-20 mg) era solubilizada em solvente deuterado, normalmente clorofórmio, para análise de ressonância magnética nuclear

(RMN). Caso fossem detectados sinais diagnósticos do produto desejado, a reação bruta era purificada através de cromatografia em coluna ou placas preparativas. Após o isolamento e identificação por RMN da respectiva quinolina o rendimento da reação era calculado levando-se em consideração como reagente limitante a respectiva anilina utilizada.

4.2.1 Ressonância magnética nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq-¹H)

Parte das reações foram avaliadas quanto ao rendimento através de RMNq-¹H. Como padrão interno utilizamos o composto 1,4-dinitrobenzeno e o 1,3,5-trimetoxibenzeno, adicionados juntamente aos reagentes sólidos na fase de adição de produtos de partida no meio reacional em proporções de 0,25 e 0,33 eq. respectivamente, afim de fazer equivalência ao número de hidrogênios. Para a quantificação, foi levada como referência a área do sinal característico do padrão interno assim como seu número de hidrogênio relativo conforme o esquema 9. (SANTOS; COLNAGO, 2013).

$$R = \frac{I_q \times 100\%}{I_p}$$

Esquema 9. Equação usada para calcular o rendimento (%) através de qRMN. Onde R = rendimento (%), I_q = Valor absoluto da integral do sinal quinolínico e I_p = valor absoluto da integral do sinal do padrão interno.

Após finalizar o tratamento da reação bruta, uma alíquota reacional (10-20 mg) era adicionada a um tubo de RMN limpo e seco, adicionando-se posteriormente 400 µl de clorofórmio deuterado. As amostras foram analisadas no equipamento de RMN Bruker® 300 MHz, usando SiMe₄ (TMS).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Proposta de síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller

Nesta tese, uma proposta sintética baseada no mecanismo de Skraup e Doebner-von Miller foi desenvolvida. Esta metodologia de síntese para o núcleo quinolínico permite a obtenção de novos derivados utilizando condições reacionais mais brandas e com maiores rendimentos, condições estas de extrema importância quando trata-se da síntese de derivados complexos e com grupamentos químicos sensíveis conforme esquema 10.



Esquema 10. Esquema sintético baseado no mecanismo de Skraup and Doebner-von Miller.

Com o objetivo de encontrar as melhores condições reacionais e rendimentos, diferentes parâmetros e condições foram avaliados como temperatura, tempo reacional e concentração dos reagentes, conforme será discutido a seguir.

5.1.1 Variação dos ácidos de Bronsted e Lewis e suas concentrações

Em uma primeira etapa foram avaliadas reações utilizando 1 equivalente molar (Eq.) de 4-Br-anilina em reação com a 2-butenona (2,4 Eq.) catalisadas por ácidos de Bronsted, ácidos de Lewis isolados ou em associação em sistema fechado sob refluxo utilizando dicloroetano como solvente (temperatura de 84 °C) conforme tabela 1. As reações foram mantidas sob aquecimento *overnight*. Após o aquecimento ser retirado e o solvente evaporado, a reação foi tratada através uma extração simples com solução saturada de $NaHCO_3$ e acetato de etila.

O isolamento da 6-Br-4-metilquinolina foi realizado através de cromatografia em camada delgada utilizando placas preparativas de sílica. A estrutura foi confirmada por análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H conforme figura 25. Conforme o espectro abaixo é possível observar os sinais característicos dos hidrogênios da molécula analisada. Espectro de ^1H RMN da molécula 4-metil, 6-bromo-quinolina (300 MHz, CDCl_3): H_2 (8,76 ppm; d, $J = 3,0$ Hz, 1H), H^5 (8,12 ppm; d, $J = 2,2$ Hz, 1H), H_8 (7,94 ppm; d, $J = 9,0$ Hz, 1H), H_7 (7,74; dd, $J = 9,0$ e $2,2$ Hz, 1H), H_3 (7,25 ppm; d, $J = 3,0$ Hz, 2H) e CH_3 (2,66 ppm; s, 3H).

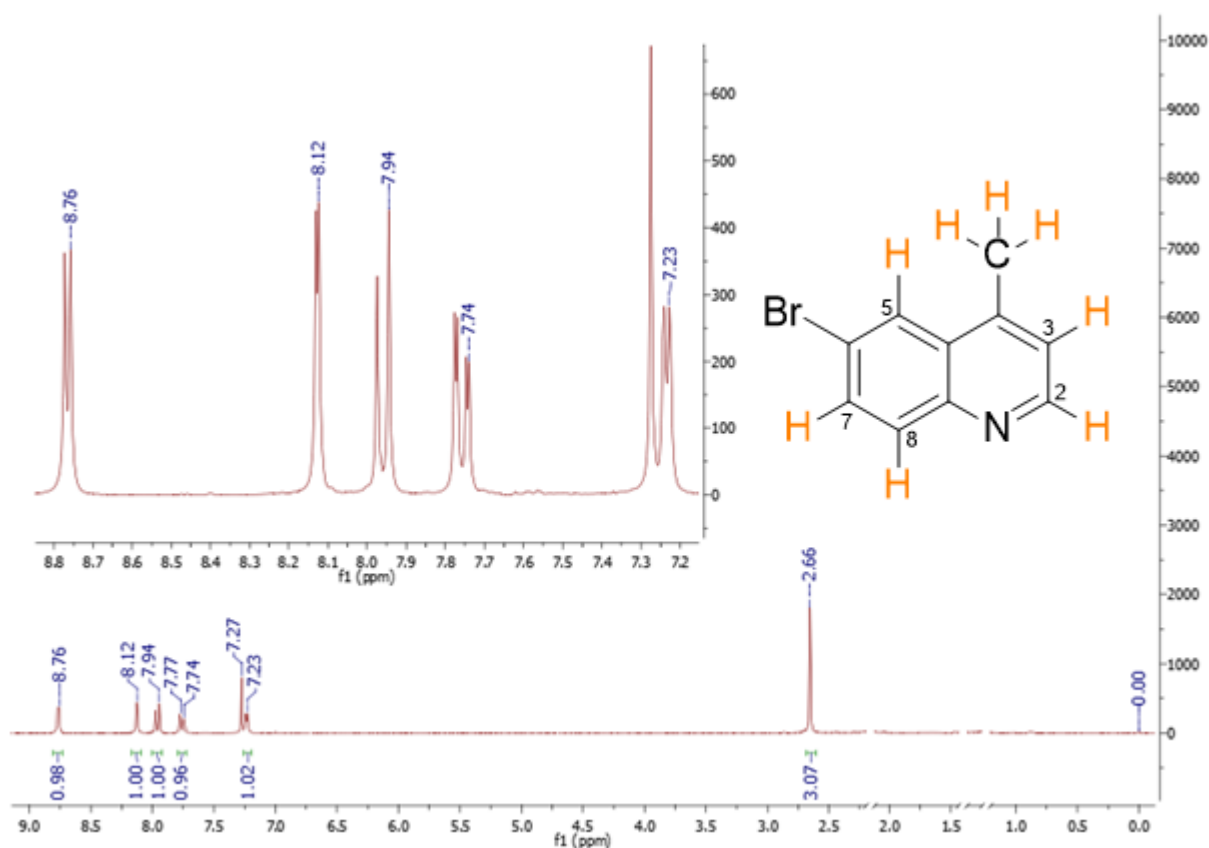


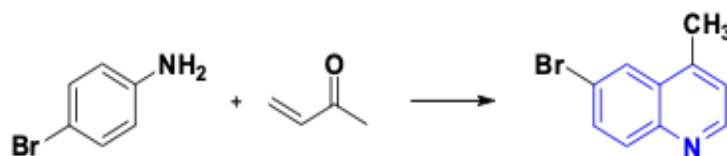
Figura 25. Espectro de ^1H RMN da 6-Br-4-metilquinolina.

Através desta primeira etapa, foi possível verificar que realizar a reação sem o auxílio de um catalisador não levava a formação de quinolina como é possível observar na entrada número 1 da tabela 1. A partir daí foram avaliadas a presença de 2 ácidos de Bronsted isolados: o ácido canforsulfônico (CSA) e ácido *p*-tolueno sulfônico ($\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$) nas entradas 2-4. Numa comparação direta, embora o TsOH tenha catalisado a formação da quinolina tanto em dicloetano (31%), como em metanol (37%), os rendimentos alcançados foram inferiores aos do CSA (42%) conforme entradas 2 e 3.

Por outro lado, quando analisamos a catálise isolada dos ácidos de Lewis MgBr_2 , CeCl_3 e InCl_3 observamos que os rendimentos são baixos (18% e 15%) ou inexistentes quanto a formação da quinolina desejada conforme entradas 5, 6 e 7 respectivamente (Tabela 1). Uma hipótese teórica para a observação dos resultados anteriores é de que ácidos de Lewis, em certas condições reacionais, podem favorecer a adição 1,2 de Michael, na etapa do ataque nucleofílica da anilina, o que desfavoreceria diretamente a formação da quinolina desejada (HERAVI et al., 2014).

Ainda neste contexto, foi avaliada a associação de ácidos de Bronsted e Lewis nas entradas 8-11. Os resultados demonstraram novamente, que o uso de ácido de Lewis desfavorece a formação de quinolinas nas condições avaliadas em contrapartida dos ácidos de Bronsted, conforme já descrito na literatura em estudos comparativos catalíticos destas espécies (WABNITZ; SPENCER, 2003).

Tabela 1. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação dos ácidos de Bronsted e Lewis e suas concentrações.



Reação	Ácido de Bronsted (eq.)	Ácido de Lewis (eq.)	Solvente	Tempo (H)	Isolamento (%)	RMNq (%)
1	-	-	DCE	15	N.E.	
2	TsOH.H ₂ O (1)	-	DCE	18	31	
3	TsOH.H ₂ O (1)	-	MeOH	18	37	
4	CSA (1)	-	DCE	19	42	
5	-	MgBr ₂ (1)	DCE	18	25	
6	-	CeCl ₃ (1)	DCE	15	N.E.	
7	-	InCl ₃ (1)	DCE	15	N.E.	
8	TsOH.H ₂ O (1)	MgBr ₂ (1)	DCE	15	42	
9	TsOH.H ₂ O (0,1)	MgBr ₂ (0,1)	DCE	18	N.E.	
10	CSA (1)	InCl ₃ (1)	DCE	18	N.E.	
11	CSA (1)	MgBr ₂ (1)	DCE	21	40	43

Onde N.E. significa não detectado por isolamento e si significa padrão interno de rmnq. As reações foram realizadas utilizando 2,4 eq de MVK, na temperatura de 84 °C, exceto a reação 3 que foi realizada a 64 °C. .

Deste modo, em uma segunda etapa passamos a utilizar somente o CSA como catalisador, alterando outros parâmetros como temperatura, número de equivalentes dos reagentes, tempo e diferentes anilinas.

Na tentativa de tornar mais rápidos os processos de quantificação dos rendimentos das reações foram introduzidas análises de RMN quantitativo (RMNq), utilizando com padrão interno o 1,4-dinitrobenzeno (DNB). Esta técnica está bem descrita e é utilizada para facilitar processos sintéticos e de identificação de impurezas sem a necessidade do isolamento das mesmas (BHARTI; ROY, 2012).

Neste contexto, é possível observar na reação entrada 11, da tabela 1, o rendimento do produto quinolínico foi obtido através de isolamento e RMNq com resultados de 40 e 43% respectivamente. Foi realizada uma análise inicial dos resultados de quantificação e a proximidade dos rendimentos detectados por isolamento e qRMN demonstrou ser promissora, levando-se em consideração a agilidade de processamento no caso do qRMN quando comparado ao isolamento. Em face disso, a partir deste estágio da pesquisa os rendimentos foram calculados através de qRMN utilizando como padrão interno o 1,4-dinitrobenzeno (DNB).

5.1.2 Variação das anilinas

Nesta etapa da padronização da reação foram selecionadas anilinas com grupos ativadores e desativadores do anel através de diferentes substituintes (tabela 2). Ao utilizar diferentes tipos de anilinas substituídas, nas mesmas condições reacionais já padronizadas no item 5.1.1, foi possível observar interessantes resultados como pode ser observado na tabela 2.

As reações que utilizaram anilinas substituídas com grupamentos ativadores do anel (entradas 3 e 4, tabela 2), assim como a própria anilina (entrada 1, tabela 2) obtiveram excelentes rendimentos 90, 94 e 100 % respectivamente, o quais foram obtidos até o momento através RMNq. Já a utilização da anilina substituída por um átomo de bromo na posição *para* do anel levou a obtenção do produto com rendimento razoável (42%).

Este resultado pode ser explicado tendo em vista uma etapa crucial para a formação do núcleo quinolínico: a ciclização. Esta etapa ocorre via adição nucleofílica aromática ao carbono ligado à carbonila. Assim, o efeito retirador de elétrons que o átomo de bromo promove sobre o anel benzênico, desativa o mesmo e dificulta esta etapa essencial para a formação do núcleo quinolínico. Por outro lado, as anilinas metoxiladas nas posições *para* e *meta* promovem a ativação do anel devido ao seu efeito indutivo moderado, facilitando o ataque nucleofílico e a consequente ciclização (DENMARK, SCOTT E.; VENKATRAMAN, 2006; WANG, 2010; TUMMATORN et al., 2015).

Tabela 2. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: Variação das anilinas e na concentração do catalisador.

Reação	R ₁	R ₂	Ácido de Bronsted (eq.)	Tempo (H)	Rendimento RMN q (%)
1	H	H	CSA (1)	15	100
2	H	Br	CSA (1)	15	55
3	H	O-Me	CSA (1)	15	90
4	O-Me	H	CSA (1)	15	94
5	H	H	CSA (0,1)	22	50
6	H	Br	CSA (0,1)	22	19
7	H	O-Me	CSA (0,1)	22	15
8	O-Me	H	CSA (0,1)	22	90
9	H	O-Me	CSA (0,1)	64	100
10	H	H	CSA (0,1)	64	100

As reações foram realizadas utilizando-se 1 eq. da anilina correspondente e 2,4 eq. de MVK em dicloroetano sob refluxo (84°C).

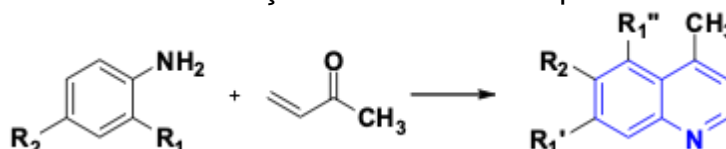
É possível observar, ainda, que a concentração do catalisador CSA utilizado na proporção de 0,1 e 1 eq. molar proporciona diferentes rendimentos quando comparamos reações com o mesmo produto de partida. Esta observação foi relevante a fim de definir se concentrações catalíticas do ácido de bronsted seriam suficientes para obter rendimentos aceitáveis. Desta forma, ficou evidente que concentrações catalíticas 0,1 eq. em comparação com 1 eq, são menos eficientes e que o uso de 1 equivalente molar do ácido de bronsted mostrava-se necessário.

5.1.3 Concentração do acceptor de Michael

Ainda, a fim de avaliar a importância do número de equivalentes molar do acceptor de Michael - MVK (2-butenona), foram realizadas reações com diferentes concentrações de MVK conforme demonstra a tabela 3. A partir dos resultados

obtidos foi possível afirmar que o uso de uma menor concentração da 2-butenona prejudica o rendimento das reações. Estes resultados corroboram com a hipótese de que por tratar-se de um componente volátil o MVK necessita de uma concentração aumentada no sistema reacional.

Tabela 3. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação do número de eq. de MVK.



Reação	R ₁	R ₂	MVK (eq.)	Ácido de Bronsted (eq.)	Tempo (H)	qNMR (%)
1	H	H	1,2	CSA (1)	19	60
2	H	O-Me	1,2	CSA (1)	19	10
3	O-Me	H	1,2	CSA (1)	19	65
4	H	H	2,4	CSA (1)	16	60
5	H	O-Me	2,4	CSA (1)	16	60
6	O-Me	H	2,4	CSA (1)	16	93

As reações foram realizadas utilizando-se 1 eq. da anilina correspondente em dicloroetano sob refluxo (84°C). O rendimento foi calculado através RMNq usando 0,25 eq. do padrão interno DNB.

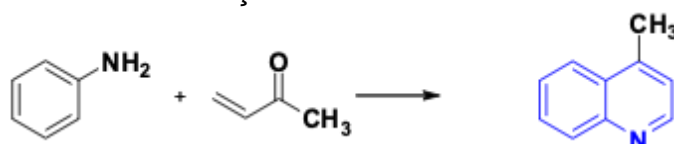
5.1.4 Variação do solvente utilizado

No intuito de melhorar ainda mais as condições para a síntese de quinolinas utilizando a metodologia baseada em Skraup e Doebner-von Miller buscou-se avaliar o rendimento frente a utilização de diferentes solventes, conforme tabela 4. A variação do solvente acarretou variação na temperatura de reação, pois as mesmas foram mantidas sob refluxo.

O solvente pode influenciar na mobilidade dos reagentes, permitindo uma colisão efetiva para a formação dos produtos. É importante ressaltar que a interação complexa entre o solvente e o soluto pode resultar em uma modificação da atividade dos reagentes, suas energias livres, e, conseqüentemente, suas reatividades (CLAYDEN et al., 2012).

É possível observar na tabela 4 que os melhores rendimentos foram obtidos utilizando o dicloroetano (DCE) como solvente reacional, alcançando 40 % de rendimento.

Tabela 4. Parâmetros avaliados na síntese de quinquininas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação dos solventes utilizados.



Reação	MVK (eq.)	Acido de Bronsted (eq.)	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (H)	RMNq (%)
1	2,4	CSA (1)	DCE	84	16	40
2	2,4	CSA (1))	Tolueno	110	16	35
3	2,4	CSA (1)	Metanol	65	18	17
4	2,4	CSA (1)	THF	66	18	14

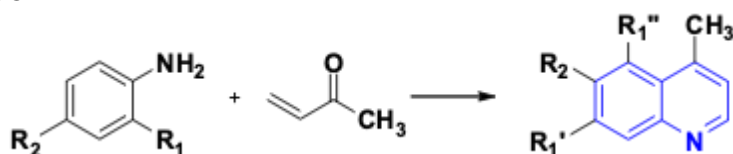
As reações foram realizadas utilizando-se 1 eq. da anilina em seus solventes correspondentes sob refluxo. O rendimento foi calculado através RMNq usando 0,25 eq. do padrão interno DNB. Onde THF corresponde ao solvente tetrahidrofurano.

5.1.5 Variação da temperatura e tempo

A fim de avaliar os efeitos da variação de temperatura sobre os rendimentos das reações e consequente formação de quinolinas foram realizadas reações em temperatura ambiente e a 84 °C conforme descreve a tabela 5 nas reações de 1-6.

É possível observar que a temperatura reacional influenciou fortemente no resultado da reação, embora utilizando as condições já padronizadas, com exceção da temperatura ambiente, as reações 4-6 (tabela 5) obtiveram baixos rendimentos quando comparadas como às reações 1-3 (refluxo à 84°C). A relação entre a temperatura e a velocidade reacional é claramente conhecida e descrita, tendo em vista que o aquecimento é fonte energética para a reação (CLAYDEN et al., 2012).

Tabela 5. Parâmetros avaliados na síntese de quinolinas a partir da metodologia de Skraup e Doebner-von Miller: variação da temperatura reacional em função do rendimento obtido.



Reação	R ₁	R ₂	Ácido de Bronsted (eq.)	Temperatura (°C)	Tempo (H)	RMNq (%)
1	H	H	CSA (1)	84 °C	15	100
2	H	O-Me	CSA (1)	84 °C	15	90
3	O-Me	H	CSA (1)	84 °C	15	94
44	O-Me	H	CSA (1)	R.T.	44	56
5	H	O-Me	CSA (1)	R.T.	44	0
6	H	H	CSA (1)	R.T.	44	20
7	H	H	CSA (1)	84 °C	2	100
8	O-Me	H	CSA (1)	84 °C	2	80
9	H	H	CSA (1)	84 °C	1	65
10	O-Me	H	CSA (1)	84 °C	1	65

O rendimento foi calculado através RMNq usando 0,25 eq. do padrão interno o DNB. R.T. = temperatura ambiente. As reações foram realizadas utilizando-se 1 eq. da anilina correspondente e 2,4 eq. de MVK em dicloroetano.

O que buscamos saber nas reações descritas na tabela 5 (reações 1-6) é se neste caso fazia-se necessário o uso de temperaturas mais altas, o que ficou evidente quando observamos os rendimentos observados. Desta forma, nas reações de otimização consecutivas foi definido utilizar banho de óleo a 84 °C .

Além disso, na tabela 5 estão descritas, ainda, as reações 7-10 que trazem informações adicionais sobre a variação do tempo reacional influenciando nos resultados. Em ensaios anteriores períodos de até 72 horas foram avaliados, nos quais o tempo exacerbado não influenciou positivamente no rendimento reacional. Foram realizadas reações com 2 tipos distintos de anilina, cujos substituítes são

ativadores do anel. As reações foram realizadas nos tempos de 1 e 2 horas. Como resultados constatou-se que em 120 minutos a formação das quinolinas correspondente alcançava os rendimentos desejáveis.

5.1.6. Condições reacionais padrões

É possível afirmar que o processo de otimização das reações de obtenção das quinolinas levou ao estabelecimento de condições reacionais ideais baseando-se em rendimentos obtidos através de isolamento (nas reações iniciais da padronização) ou através de RMNq (nas reações posteriores). No entanto, foi verificado que o DNB não era o padrão interno ideal para as quantificações de rendimento através RMNq. Esta conclusão foi obtida, quando se observou que as áreas dos sinais no espectro de RMN 1H característicos da quinolina em questão (destacados em laranja na figura 41) alcançavam valores superiores a 1.

Neste tipo de avaliação de rendimento na integral do sinal de referência do padrão interno é sempre atribuído o valor absoluto de 1. Já os outros sinais pertencentes ao padrão interno ou às outras moléculas a serem avaliadas são relativos ao sinal padrão escolhido. Desta forma, o valor da integral do sinal correspondente ao composto a ser avaliado é diretamente proporcional à concentração do mesmo no meio conforme figura 26. Se a integral do composto avaliado for igual a 1, então teremos um rendimento de 100%, por exemplo. Conforme nossas análises, o rendimento seria de mais de 100% o que matematicamente e quimicamente está incorreto.

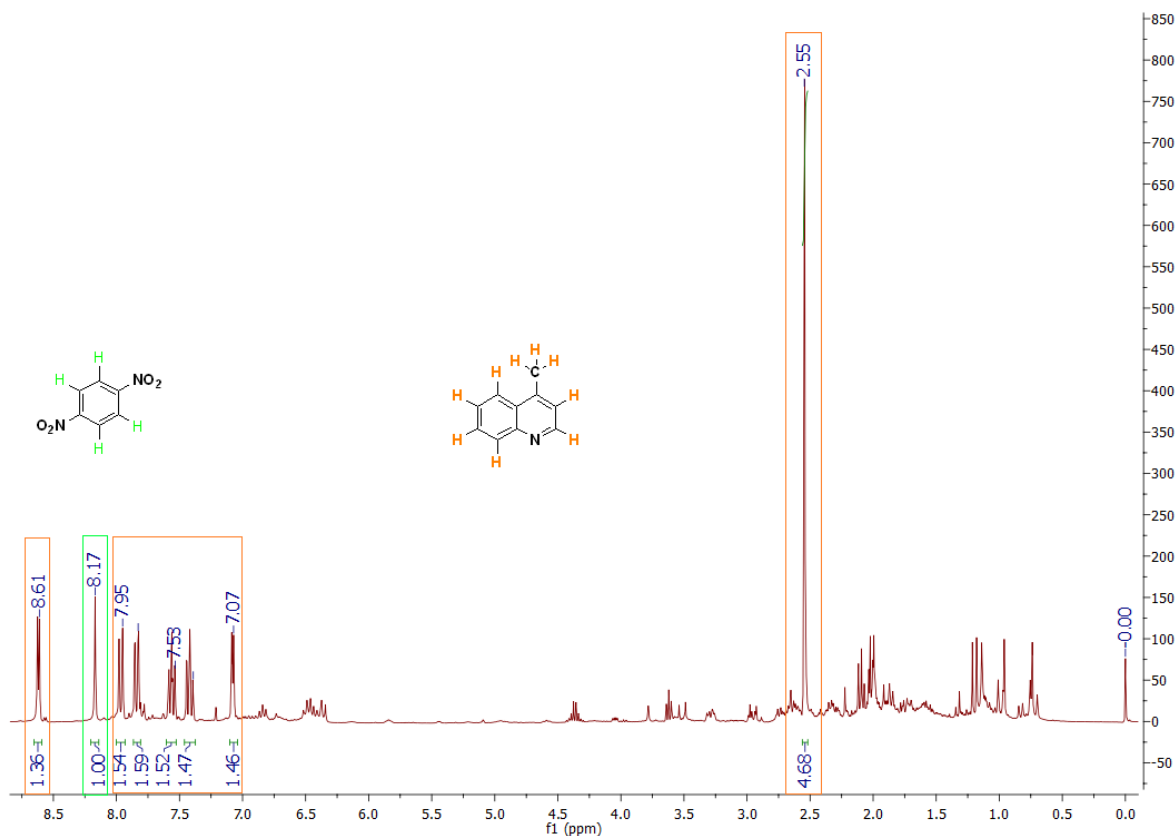


Figura 26. Espectro de RMNq de ¹H. As áreas destacadas em verde correspondem aos sinais relativos ao padrão DNB. As áreas destacadas em laranja representam os sinais relativos à quinolina.

O DNB é conhecido por ser usado com padrão interno em quantificações por RMNq. No entanto, esta molécula também é conhecida por atuar como agente oxidante em reações químicas, incluído reações cujos produtos são quinolinas (LIU et al., 2017; DONG et al., 2018). Assim, uma das hipóteses a ser considerada é de que o DNB tenha sido reduzido no meio reacional, diminuindo assim sua área proporcional no espectro de RMNq. Neste tipo de alteração, teríamos um aumento errôneo e proporcional da área dos sinais da quinolina no espectro de RMN, levando a um resultado “falso-positivo” conforme é possível observar na figura 27.

Desta forma buscamos encontrar outro padrão interno que atendesse aos requisitos mínimos para a avaliação por RMNq. Esta busca levou ao uso e padronização do 1,3,5-trimetoxibenzeno – TMB como padrão interno para RMNq de ¹H. Para chegar a esta conclusão as reações foram submetidas ao uso de TMB e o rendimento foi calculado através de isolamento e RMNq (HANNA; LAU-CAM, 2001; GUIDO F. PAULI et al., 2004).

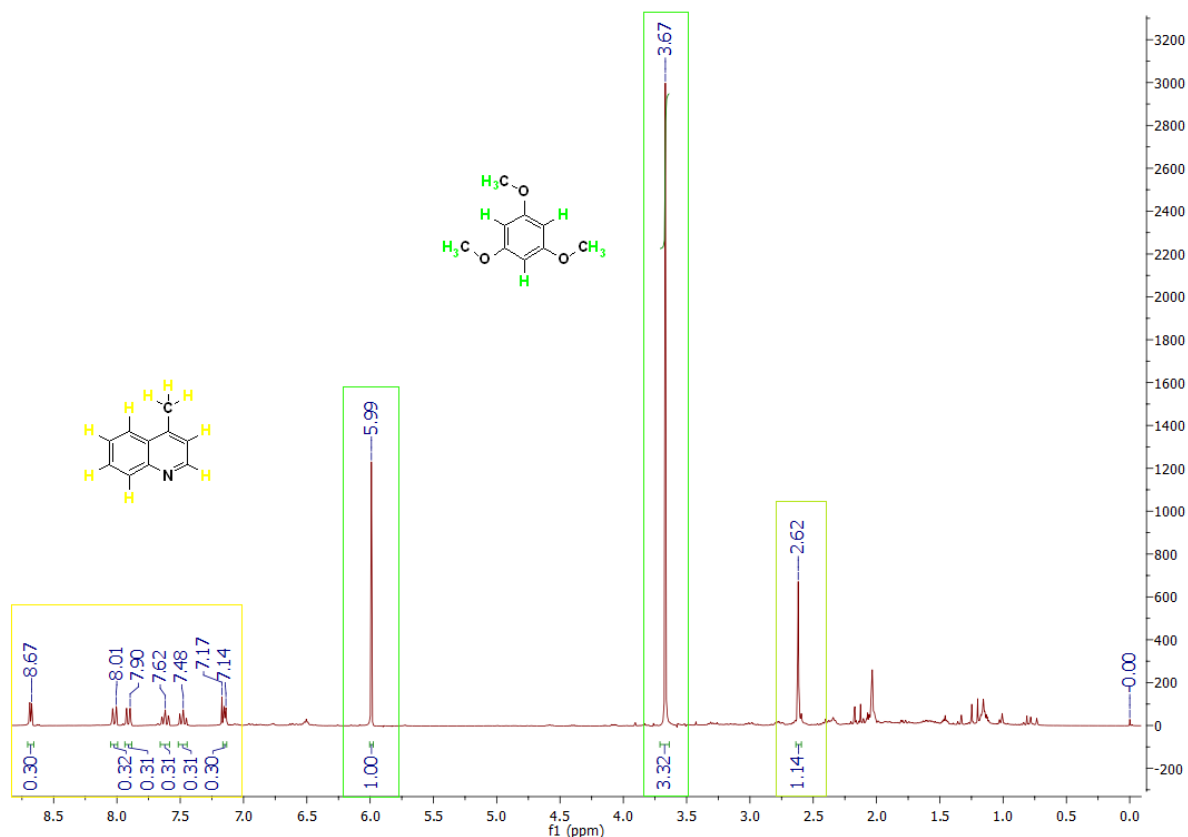
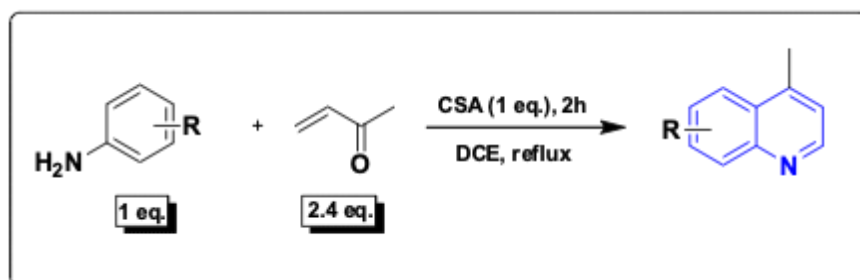


Figura 27. Espectro de RMNq de ^1H . As áreas destacadas em verde correspondem aos sinais relativos ao padrão TMB. As áreas destacadas em amarelo representam os sinais relativos à quinolina.

A partir deste ponto as principais condições reacionais testadas anteriormente foram repetidas experimentalmente, mas desta vez utilizando o TMB como padrão interno. Desta forma chegamos às condições ideais para reação, conforme demonstra a esquema 11.

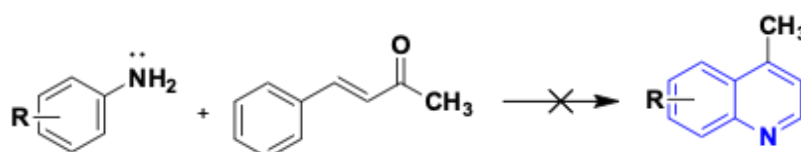


Esquema 11. Condições ideais para síntese de quinolinas utilizando metodologia baseada em Skraup e Doebner-von Miller.

Embora os resultados demonstrados tenham sido promissores permitindo a síntese de novos derivados quinolínicos por metodologia adaptada, através de

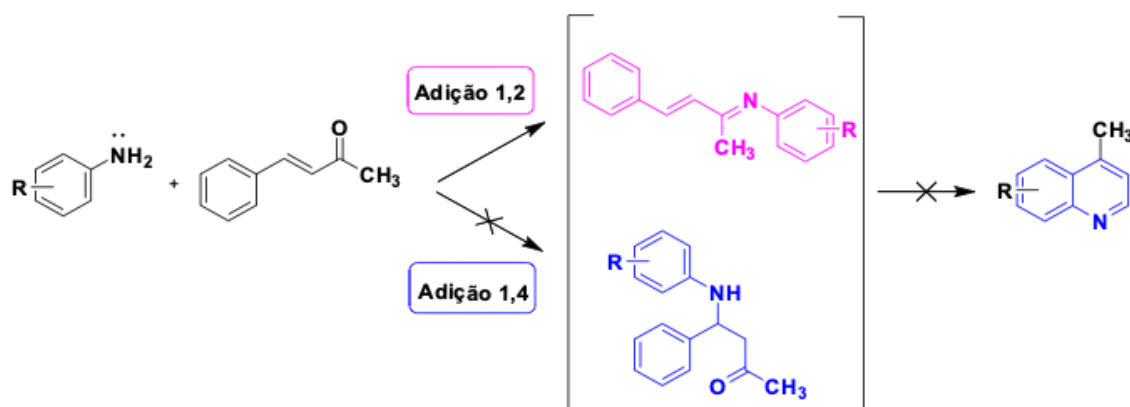
dados experimentais e posteriormente em dados da literatura encontramos algumas limitações do método proposto.

Enquanto utilizamos a 2-butenona (MVK) como acceptor de Michael as reações aconteceram com rendimentos razoáveis em torno de 40% em média. No entanto, quanto utilizamos cetonas α,β -insaturadas substituídas no carbono β , sob as mesmas condições reacionais, não ocorria a formação da quinolina respectiva (esquema 12).



Esquema 12. Esquema demonstrativo das tentativas de sintetizar o núcleo quinolínico usando a metodologia proposta.

Segundo dados publicados por Calow e colaboradores que fizeram um estudo investigando a preferência pela adição conjugada 1,2 ou 1,4 de Michael, os pesquisadores demonstraram que a metilvinilcetona é uma exceção dentre as cetonas α,β -insaturadas. Em moléculas que apresentam substituintes tanto no carbono α quanto no β , a configuração *trans*, normalmente a mais estável, favorece a adição 1,2 de Michael, o que resulta no ataque nucleofílico ao carbono da carbonila e não ao carbono β da insaturação. Em tais condições há formação de uma imina fato que não permite a formação de quinolinas usando a nossa estratégia inicial conforme esquema 12 e 13 (CALOW et al., 2014).



Esquema 13. Esquema demonstrativo da possível causa das limitações da proposta sintética baseada em Skraup Doebner von-Miller.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados expostos é possível concluir que a metodologia baseada em Skraup e Doebner-von Miller não obteve o êxito desejado, embora tenha possibilitado a síntese de 4 quinolinas substituídas a partir de anilinas simples e cetonas α , β -insaturadas. O fator limitante desta reação é de que a mesma se baseia na adição 1,4 de Michael. Com a substituição do acceptor de Michael há o favorecimento da formação do produto 1,2 de Michael, impossibilitando a obtenção de quinolinas nas condições testadas. Desta forma, nesta tese buscamos outra metodologia que pudesse permitir sintetizar quinolinas a partir de anilinas simples, conforme está descrito no capítulo seguinte.

CAPÍTULO 2 – CATÁLISE POR PALÁDIO

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a humanidade vive em uma era de crescentes inovações e avanços nas mais variadas áreas. A necessidade do desenvolvimento de novos compostos químicos é crescente seja para o uso como medicamentos na área da saúde, como insumos agrícolas ou agroquímicos na agricultura ou ainda na indústria química em geral.

A química orgânica, em geral, busca constantemente novas metodologias mais eficazes e seguras para a construção de moléculas orgânicas complexas. Neste contexto, a formação de ligações entre carbonos (C-C) é de extrema importância para a formação de cadeias carbônicas utilizadas das mais variadas formas pela indústria química e farmacêutica. Esta importância está refletida, por exemplo, pelas premiações com o Nobel de Química para Reação de Grignard (1912), Reação de Diels-Alder (1950), Reação de Wittig (1979), Metátese de Olefinas (2005) e recentemente acoplamentos cruzados catalisados por Paládio em 2010 (BROCKSON et al., 2010; VICTOR et al., 2016).

As reações de acoplamento cruzado, em especial a reação Mizoroki-Heck, representam uma classe de reações de grande importância na síntese orgânica, por permitirem a formação de novas ligações C-C, possibilitando a exploração de um novo patamar de pesquisas, principalmente nas áreas de Síntese Total de Produtos Naturais, Química Medicinal e Nanotecnologia.

Neste trabalho tem sido descrita a importância do núcleo quinolínic e sua extensiva descrição como um esqueleto privilegiado na química medicinal, em especial para descoberta de novos fármacos antitumorais e antifúngicos. Nesta ótica, o uso das reações de acoplamento cruzado para obtenção mais eficaz de novos compostos quinolínicos torna-se um estratégia inteligente e inovadora.

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova metodologia sintética para o núcleo quinolínico utilizando a catálise de Paládio através das reações de Heck.

2.1 Objetivos específicos

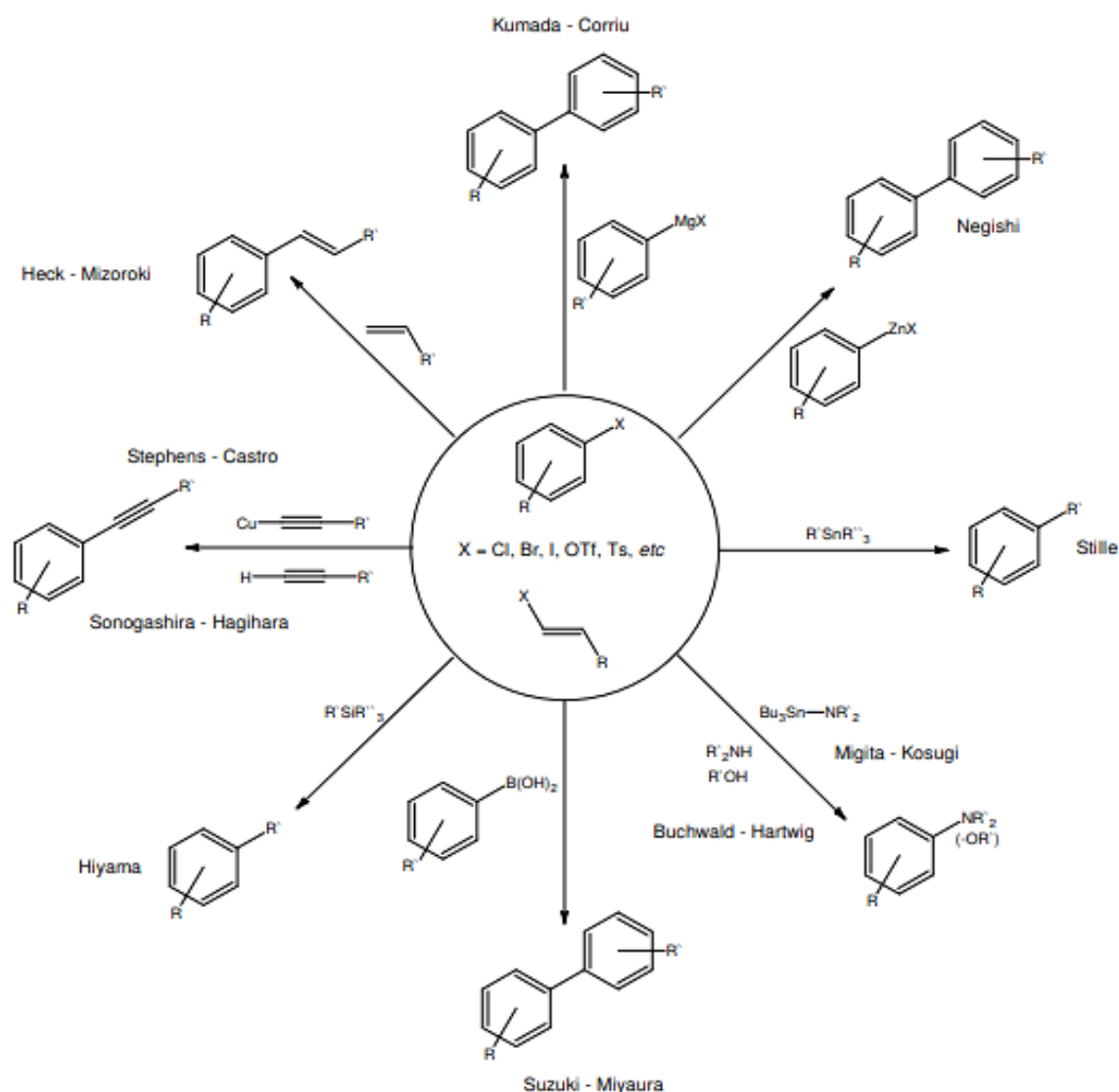
- Avaliar a formação do núcleo quinolínico sob diferentes condições reacionais e catalizadores;
- Estabelecer um algorítmico reacional que ofereça melhores condições e rendimentos para o núcleo quinolínico;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Acoplamentos organometálicos cruzados

O acoplamento organometálico cruzado é denominado como uma reação orgânica entre duas moléculas diferentes na qual é criada uma nova ligação carbono-carbono mediada por átomos de metais de transição como paládio (Pd), platina (Pt), ouro (Au), níquel (Ni), zinco (Zn), ródio (Rh), dentre outros. Essa estratégia sintética proporcionou uma perspectiva mais abrangente à química orgânica sendo o paládio (Pd) o agente catalítico mais utilizado. Neste caso a criação direta de uma ligação entre carbonos sp^2 e sp^2 ou sp , em que não se observa reatividade iônica, radicalar ou pericíclica como em outros tipos de reação, faz-se necessário o uso de catálise por metais de transição (BROCKSOM et al., 2010; BATALHA et al., 2014).

Os acoplamentos organometálicos cruzados são de extrema relevância na química orgânica devido a sua potencialidade e possibilidades reacionais conforme demonstra o esquema 14. A formação de ligações carbono-carbono está entres os processos químicos mais importantes da atualidade. O controle dessas reações ampliou significativamente a variedade de rotas sintéticas na construção de compostos complexos a partir de precursores simples. Devido a isto em 2010 o Prêmio Nobel de Química foi dado a três pesquisadores renomados no estudo das reações de acoplamentos organometálicos cruzados. A Academia Sueca laureou o químico norte-americano Richard F. Heck (Delaware University, Estados Unidos) e os químicos japoneses Ei-ichi Negishi (Purdue University, Estados Unidos) e Akira Suzuki (Universidade de Hokkaido, Japão) “por acoplamentos cruzados catalisados por paládio, em síntese orgânica” (BROCKSOM et al., 2010; FELPIN et al., 2011; BATALHA et al., 2014).

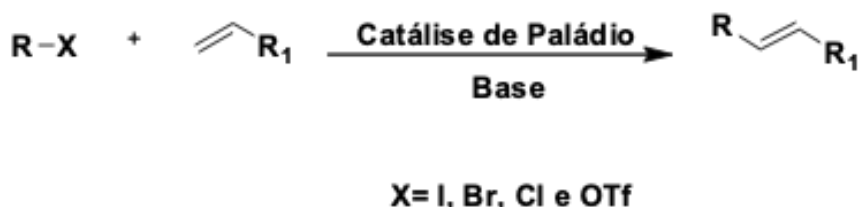


Esquema 14. Exemplos de acoplamentos organometálicos cruzados. Adaptado de Speziali, 2012.

3.1 Reação de Heck

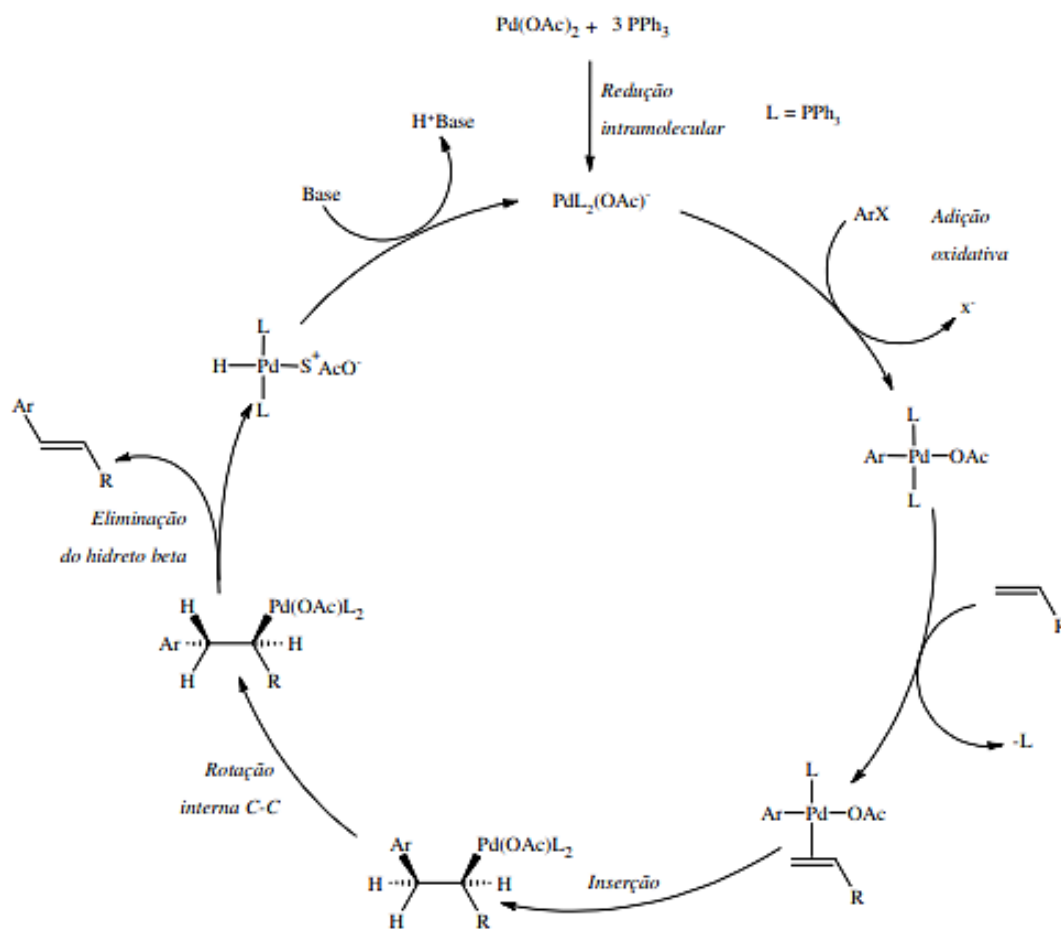
A Reação de Heck é uma das mais importantes reações de acoplamento cruzado levando-se em consideração sua aplicabilidade na química fina, na síntese de polímeros e fármacos, com elevada seletividade e tolerância a presença de diferentes grupos funcionais. A reação de Heck ou reação de Heck-Mizoroki foi primeiramente descrita de forma independente por Mizoroki e Heck no início da década de 70 quando ambos reagiram iodo-arilas com olefinas em presença de paládio (OESTREICH, MARTIN, 2009; MARTINS; ALVAREZ, 2010; FELPIN et al., 2011).

Atualmente a reação de Heck é descrita como o acoplamento de haletos de arila, vinila e benzila com olefinas catalisadas pela presença de fontes homogêneas ou heterogêneas de paládio (esquema 15). Além disso, muitas variações desta reação podem ser realizadas usando triflatos (OTf) de arila. Também foi observado experimentalmente que a ordem de reatividade normalmente é I>OTf>Br>Cl. Diferentes fontes de paládios e ligantes auxiliares podem ser empregados nesta reação. A maioria utiliza temperaturas elevadas, solventes apróticos como DMF (dimetilformamida) e DMA (dimetilacetamida), além de bases com a trietilamina (NET₃) e acetato de sódio (NaOAc), possibilitando o uso de aril- ou vinil-olefinas funcionalizadas com altos rendimentos (OESTREICH, MARTIN, 2009; MARTINS; ALVAREZ, 2010; FELPIN et al., 2011).



Esquema 15. Esquema geral da reação de Heck

Quanto ao mecanismo reacional, em geral são aceitos dois estados de oxidação do paládio no ciclo catalítico, Pd(0) e Pd(II), mas também é possível encontrar relatos de Pd(II)-Pd(IV). A Reação de Heck pode ser catalisada tanto por complexos de paládio contendo ligantes fosfinas, como por complexos livres de fosfinas. Dentre outras funções, as fosfinas estabilizam os átomos zerovalentes de paládio cataliticamente ativos para a reação. No esquema 16 é possível observar o ciclo catalítico geral e mais tradicional para o acoplamento de Heck contendo as etapas principais da reação (OESTREICH, M, 2009; MARTINS; ALVAREZ, 2010; FELPIN et al., 2011).



Esquema 16. Mecanismo geral para reação de Heck. Adptado de speziali, 2012.

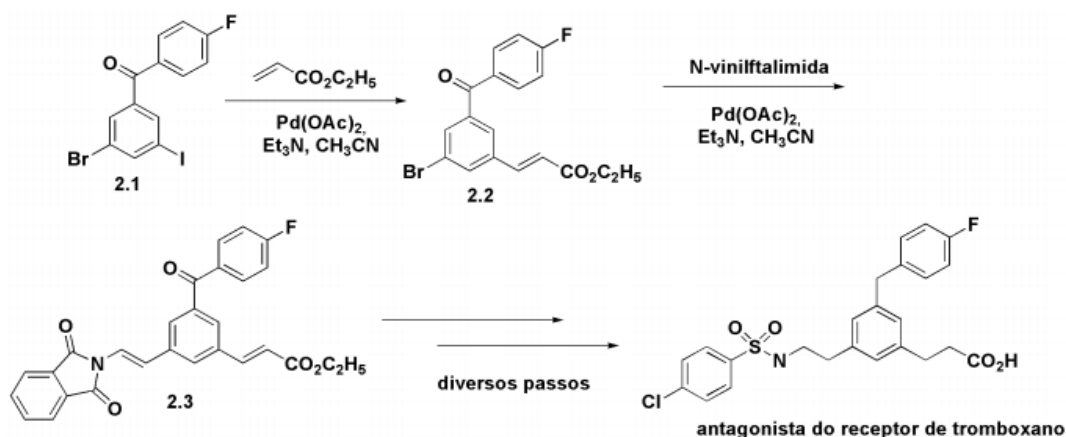
A reação é iniciada com a redução intramolecular (pré-ativação) do catalisador, isto é, geração dos complexos de Pd(0) cataliticamente ativos para a reação através da redução de espécies de Pd(II) e de mecanismos de múltiplas trocas de ligantes. Em seguida, o agente de arilação (AR-X) se adiciona gerando uma espécie de Pd(II). Esta etapa é denominada adição oxidativa, devido ao aumento do número de oxidação do paládio. Depois desta etapa, segue-se a troca de um ligante L pela olefina, que forma um complexo com paládio. A seguir ocorre a inserção migratória de uma molécula de ligante fazendo com que a ligação carbono-carbono aconteça. Em seguida, ocorre a β -eliminação de hidrogênio e formação do produto almejado. A base presente na reação remove o hidrogênio do complexo gerado na etapa anterior, regenerando o Pd(0) para o novo ciclo catalítico (OESTREICH, M, 2009; MARTINS; ALVAREZ, 2010; FELPIN et al., 2011; MARCELO GOMES SPEZIALI, 2012).

Apesar das etapas descritas na figura 35 serem básicas das reações organometálicas de um modo geral, várias incógnitas e opiniões divergentes sobre os mecanismos específicos perduram no meio científico e permanecem sem uma resposta definitiva até o momento. A interação complexa entre os efeitos causados pelas diferentes bases, fontes de paládio, solvente, etc. constitui-se uma tarefa difícil de prever com precisão, onde pequenas e sutis modificações podem alterar drasticamente a reatividade do sistema (MARCELO GOMES SPEZIALI, 2012).

3.1.2 Reações de Heck na síntese de fármacos: exemplos da literatura

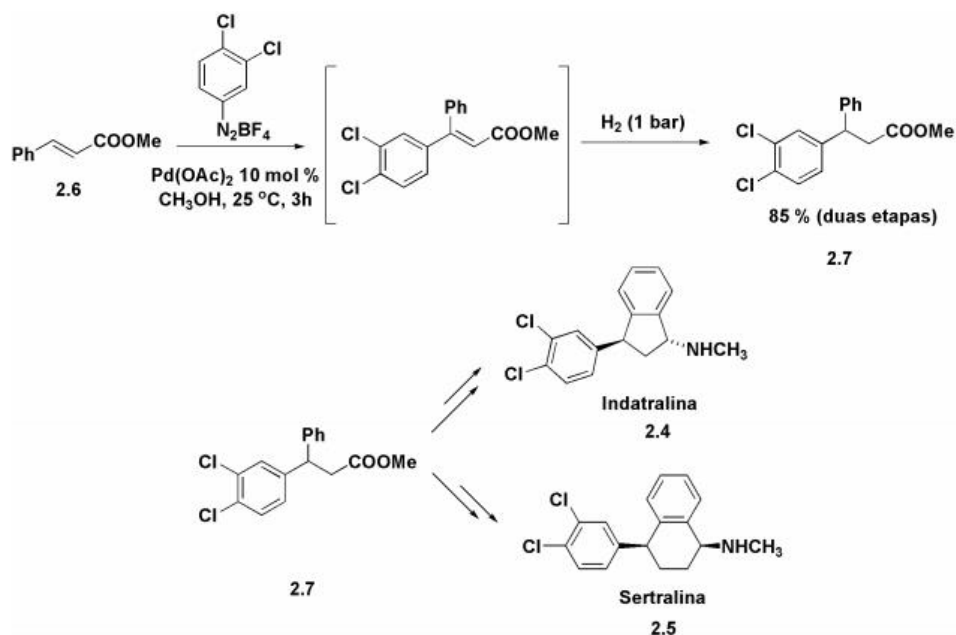
É possível encontrar na literatura inúmeros trabalhos que abordam a aplicação da reação de Heck na síntese de fármacos, estas reações têm sido largamente utilizadas na síntese de compostos bioativos. No texto abaixo serão abordados alguns exemplos nos quais a reação de Heck apresenta-se essencial na síntese da molécula ativa.

Um antagonista do receptor de tromboxanos (esquema17) foi sintetizado em larga escala pela Pfizer em 1998 utilizando a reação de Heck. Na primeira etapa foi realizada a reação entre o iodeto de arila substituído com o acrilato de metila (esquema 17), utilizando acetato de paládio e trietilamina como base. Posteriormente, os autores relataram utilizar o mesmo sistema com brometo de *n*-vinilftalimida, obtendo 58% de rendimento em um sistema sem fosfina (CHEN; PULLARKAT, 2012; LIMBERGER, 2012; MPUNGOSE et al., 2018).



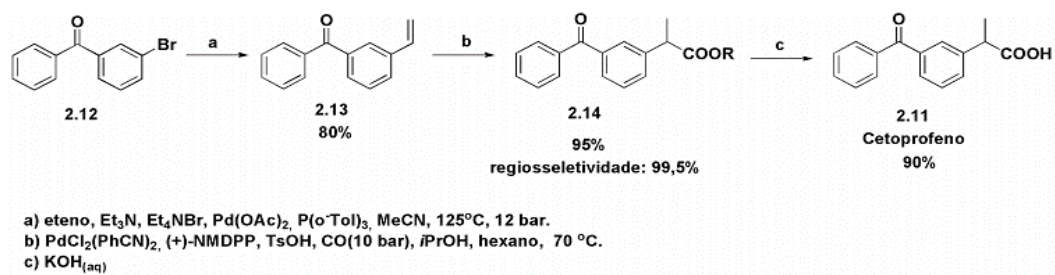
Esquema 17. antagonista do receptor de tromboxanos utilizando a reação de Heck. Adaptado de Limberger, 2012.

É possível encontrar na literatura publicações que demonstram a utilização da reação de Heck como etapa crucial na síntese da sertralina. A síntese foi realizada fazendo o acoplamento entre sais de diazônio e o ninamato de metila (esquema 18). Desta forma o intermediário na síntese da sertralina foi sintetizado com 85% de rendimento.



Esquema 18. Etapas sintéticas da sertralina que utilizam a reação de Heck. Adaptado de Limberger, 2012.

Ainda é possível descrever a síntese do fármaco antiinflamatório cetoprofeno, síntese na qual é descrita a reação de Heck como uma de suas estratégias sintéticas essenciais a fim de obter uma olefina intermediária no processo conforme esquema 19. Nesta rota sintética, a reação de Heck é realizada reagindo 3-bromobenzofenona e o eteno (etapa chave) formando uma olefina intermediária a qual é submetida a uma metoxycarbonilação levando a formação de um éster com 99,5% de regioseletividade. Posteriormente, uma hidrólise alcalina do éster leva a formação do cetoprofeno com 90% de rendimento em 4 etapas conforme esquema 19 (LIMBERGER, 2012; MPUNGOSE et al., 2018).



Esquema 19. síntese do cetoprofeno baseada na reação de Heck.

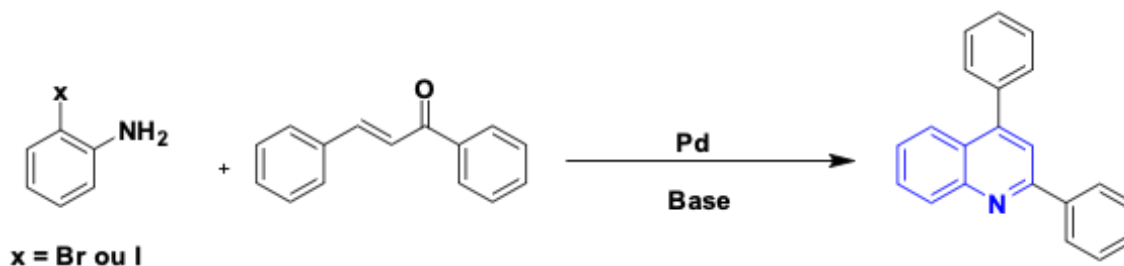
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedimento experimental geral

Os produtos químicos e reagentes foram adquiridos a partir de fornecedores comerciais e utilizados conforme indicação do fabricante. Os solventes foram destilados sob atmosfera de nitrogênio quando necessário. As reações que requereram condições anidras foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio ou argônio. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em placas 0,2 milímetro pré-revestidos de sílica gel (Merck) e visualizados, por pulverização com diferentes reveladores (anisaldeído sulfúrico, ácido fosfomolibdico e permanganato de potássio) sob aquecimento, além de observação sob luz UV. A evaporação e concentração dos solventes foi feita no evaporador rotativo usando bomba de vácuo. Os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN foram medidos em Equipamento Bruker® 300 e 400 MHz, usando SiMe_4 (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) são dados em ppm e as constantes de acoplamentos (J) são dadas em Hertz. O solvente deuterado utilizado foi CDCl_3 . Padrões de desdobramento foram designados como segue: s = simpleto, sl = simpleto alargado, d = duplete, dd = duplo duplete, ddd = duplo duplo duplete, t = tripleto, dt = duplo tripleto, q = quarteto, m = multiplete. As purificações foram realizadas através de cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (70–200 mesh e 40-60 mesh) ou utilizando sílica gel 60 PF254 para cromatografia preparativa em camada fina. O éter de petróleo (EP) foi usado nas purificações (ponto de ebulição 40-60 °C).

4.2 Proposta de síntese de quinolinas a partir da reação de Heck

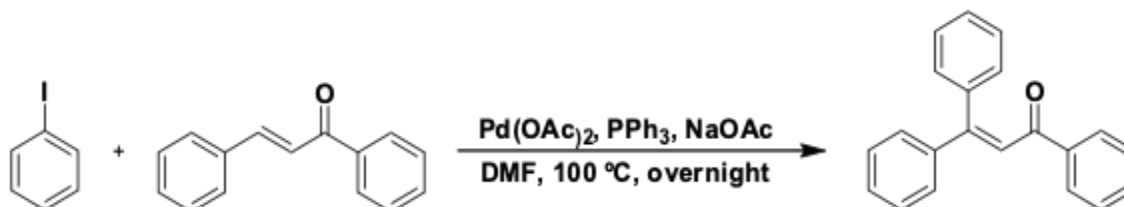
Inicialmente foi proposta a reação descrita por Cho & Kim (CHOA; KIM, 2007) reagindo as anilinas orto substituídas por Iodo ou Bromo com uma cetona α,β -insaturada sob diferentes condições, utilizando Paládio como catalizador em meio básico conforme o esquema abaixo:



Esquema 20. proposta reacional descrita por Cho & Kim (CHOA; KIM, 2007)

4.2.1 Reação de Heck clássica

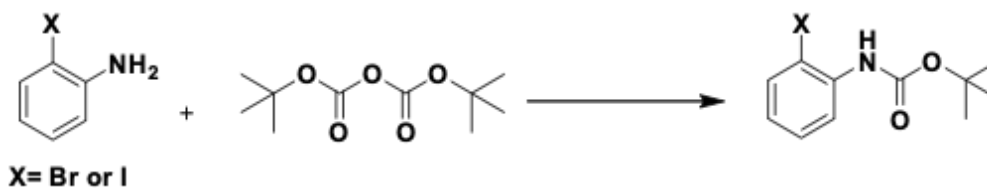
A reação clássica de Heck foi realizada reagindo o iodobenzeno com uma chalcona. Foi adicionado a um balão de fundo redondo 1 eq. de iodobenzeno (0,5 mmol), 0,1 eq. de acetato de paládio (0,05 mmol), 0,2 eq. de trifenilfosfina (0,1mmol), 6 eq. de acetato de sódio anidro (3 mmol), 2 eq. da 1,3-difenil-2-propenona (1mmol) em 5 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) anidra. A reação foi mantida sob atmosfera de argônio e a 100°C durante 18 horas conforme esquema 21.



Esquema 21. reação clássica de Heck foi realizada reagindo o iodobenzeno com a uma chalcona.

4.2.2 Proteção das anilinas

Três metodologias foram testadas a fim de proteger as anilinas orto substituídas por Br e I com o grupamento di-terc-butildicarbonato (BOC₂O) conforme esquema 22 abaixo.



Esquema 22. proteção da anilina substituída pelo grupamento BOC.

Na reação baseada na metodologia de Sutou e colaboradores (2008) (SUTOU et al., 2008) foram adicionados em um balão de fundo redondo 1 eq. (5 mmol) da 2-Br-anilina, 2 eq. de BOC₂O (10 mmol), 0,1 eq. de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e 15 ml de tetrahidrofurano anidro (THF). A reação foi mantida sob refluxo e atmosfera inerte por 24 horas. Após este período a reação foi interrompida com a adição de 50 ml de água destilada ao balão reacional. A mistura foi submetida ao processo extrativo em funil de separação sendo extraída através de 4 x 20 ml do solvente diclorometano. A fase orgânica foi seca por sulfato de sódio anidro, filtrada em algodão e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo bruto resultante desse processo foi alicotado e submetido a análise de RMN, além de posterior purificação em coluna cromatográfica com sistema eluente 9:1 de éter de petróleo e acetato de etila.

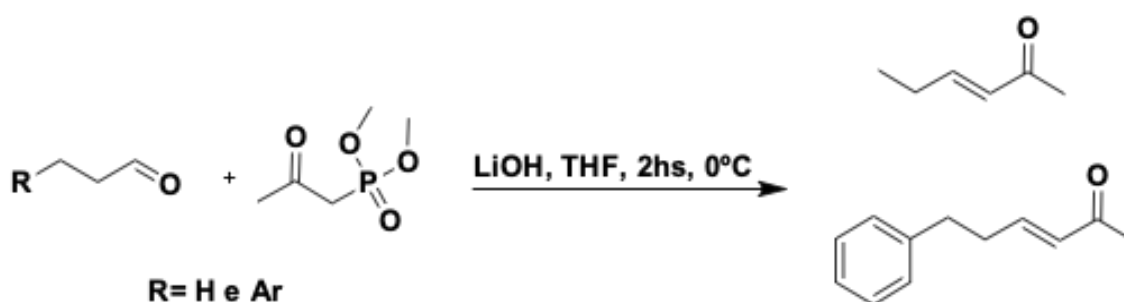
Na reação baseada na publicação de Colobert e colaboradores (COLOBERT et al., 2009) foram adicionados em um balão de fundo redondo 1 eq. (5 mmol) da 2-Br-anilina, 1,1 eq. de hidreto de sódio (5,5mmol) e 15 ml de THF anidro, sob atmosfera inerte. Esta mistura foi, então, resfriada para a adição lenta e sob agitação de 1,2 eq. de BOC₂O (6 mmol). A reação foi mantida sob refluxo e atmosfera inerte por 15 horas. Após este período a reação foi, novamente, resfriada e interrompida com a adição de 50 ml de água destilada ao balão reacional. A mistura foi extraída com éter dietílico (3x50ml). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de amônio e bicarbonato de sódio. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada em algodão e evaporada sob pressão reduzida afim de se obter o resíduo bruto da reação. Este resíduo foi submetido a análise de RMN e posterior purificação em cromatografia de coluna com sistema eluente na proporção 20:1, éter de petróleo:éter etílico.

Na reação baseada em Denis e colaboradores (2015) (DENIS et al., 2015) foram adicionados a um balão de fundo redondo 1 eq. (5 mmol) da 2-Br-anilina, 1,6 eq. de BOC₂ (8 mmol) e 15 ml de THF anidro. A reação foi mantida sob refluxo e

atmosfera inerte por 4 dias. Após este período a reação foi interrompida com a adição de 50 ml de água destilada ao balão reacional. A mistura foi extraída com éter dietílico (3x50ml). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada em algodão e evaporada sob pressão reduzida afim de se obter o resíduo bruto da reação. Este resíduo foi submetido a análise de RMN e posterior purificação em cromatografia de coluna com sistema eluente na proporção 95:5, éter de petróleo:éter etílico.

4.2.3 Síntese das cetonas- α,β -insaturadas

Algumas cetonas α,β -insaturadas encontram-se indisponíveis comercialmente, portanto foi necessário sintetizá-las em laboratório. Para tal, utilizamos a metodologia de Horner–Wadsworth–Emmons (HWE) conforme esquema abaixo (DUDZIŃSKI et al., 2012).

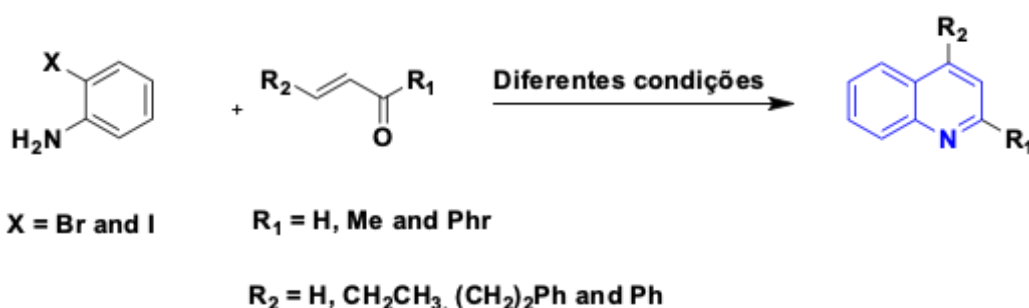


Esquema 23. Síntese de cetonas α,β -insaturadas através de reação de HWE.

Em balão de fundo redondo foram adicionados 1,13 eq. de Hidróxido de lítio (13,56 mmol) a uma solução de THF seco (30 ml) contendo 1 eq. do aldeído respectivo (12 mmol), juntamente com 1,2 eq. do 2-oxometilfosfanato (14,4 mmol) a 0°C. A mistura foi mantida sob agitação durante 2 horas a 0°C. Após este período a reação foi interrompida com a adição de solução saturada de cloreto de amônio e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi reservada e a fase aquosa foi diluída com água e extraída com acetato de etila. As duas fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de magnésio e tiveram o solvente retirado através de evaporação sob pressão reduzida. O óleo residual foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando com eluentes éter etílico e éter de petróleo.

4.2.4 Síntese baseada na reação de Heck para obtenção de quinolinas

A síntese de quinolinas baseada na reação de Heck foi realizada reagindo anilinas orto substituídas por Br ou I, previamente, protegidas com o grupamento BOC, com cetonas α,β -insaturadas variáveis conforme o esquema geral 24. A fim de encontrar as melhores condições reacionais, diversas condições foram testadas como: solvente, temperatura, complexos de Paládio e suas concentrações, tempo reacional, atmosfera (aberta, N_2 ou O_2), presença de agente oxidante e método de quantificação (isolamento ou qRMN).



Esquema 24. Esquema geral para síntese de quinolinas baseada na reação de Heck.

De modo geral, primeiramente foram adicionados ao tubo reacional os reagentes sólidos, seguidos do respectivo solvente e por último da cetona α,β -insaturada. As anilinas foram pesadas e adicionadas ao tubo reacional na proporção de 1 equivalente molar (1 eq.), juntamente com 1 a 2 ml do solvente na concentração de 0,5 mMol. Logo em seguida, os complexos de Paládio foram adicionados na proporção variável de 1 a 0,1 eq. Em seguida, foram adicionadas as respectivas bases e cetonas α,β -insaturadas nas proporções variáveis de 1,2 a 2,4 eq.

A maioria das reações foi realizada sob atmosfera inerte (N_2 ou Ar), mas, ocasionalmente, a fim de testar esta necessidade foi utilizada atmosfera aberta ou sob gás oxigênio. As reações foram realizadas em tubo selado com volume total de 10 ml. As reações foram mantidas sob sistema fechado e monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD), a fim de observar o consumo do reagente limitante da reação (anilinas). O tratamento reacional foi realizado com a evaporação do solvente sob pressão reduzida, seguido de partição em funil de separação com éter dietílico e solução saturada de bicarbonato de sódio.

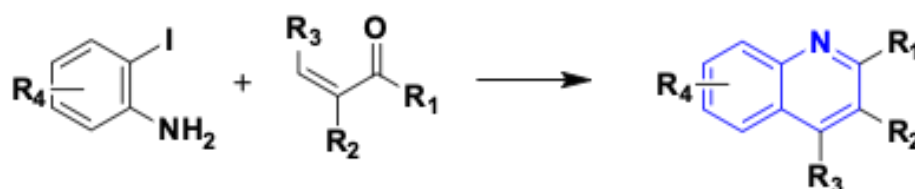
Após a extração, e o solvente orgânico foi retirado através da evaporação sob pressão reduzida, obtendo-se o resíduo bruto da reação. Uma pequena alíquota deste (10-20 mg) foi solubilizada em solvente deuterado para análise de ressonância magnética nuclear (RMN). Caso fossem detectados sinais diagnósticos do produto desejado, a reação bruta era purificada através de cromatografia em coluna ou placas preparativas. Após o isolamento e identificação por RMN da respectiva quinolina o rendimento da reação era calculado levando-se em consideração como reagente limitante a respectiva anilina utilizada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Proposta de síntese de quinolinas a partir da reação de Heck

Levando em consideração as limitações sintéticas do método de Skraup e Doebner-von Miller, trabalhamos para encontrar um novo método sintético para o núcleo quinolínico viável química e economicamente.

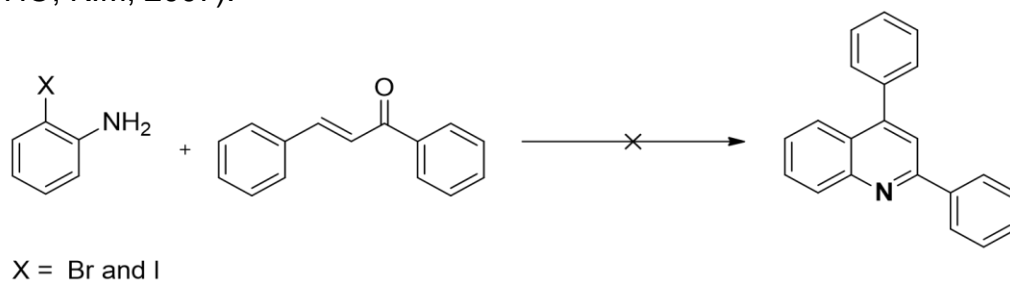
Após ampla revisão na literatura foi verificado que seria possível propor um método inédito para síntese de quinolinas como descrito no esquema 25.



Esquema 25. Esquema geral proposto inicialmente para síntese do núcleo quinolínico.

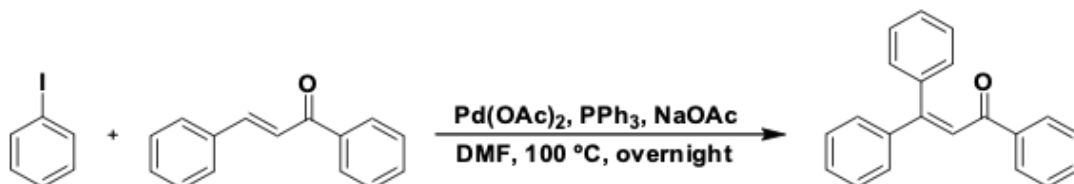
No entanto, acabamos encontrando uma publicação de Cho & Kim onde um método parecido foi descrito em 2007 (CHO; KIM, 2007). Desta forma, inicialmente, tentamos reproduzir as condições descritas na publicação sem sucesso conforme demonstrado Tabela 6.

Tabela 6. Diferentes condições testadas na tentativa de reproduzir o estudo de (CHO; KIM, 2007).



Catalysis	Base	Solvent	Temperature (°C)	Time (hours)
Pd(OAc) ₂ /PPh ₃	NaOAc	DMF	100	15
Pd(OAc) ₂ /PPh ₃	NaOAc	DMF	100	72
Pd(PPh ₃) ₄	NaOAc	DMF	100	15
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	NaOAc	DMF	100	15
Pd(dba) ₂ /DPPF	NaOC(CH ₃) ₃	Toluene	100	15

Após não conseguir reproduzir as condições descritas no artigo de Cho & Kim, decidiu-se testar a mesma metodologia, mas utilizando o iodobenzeno em substituição a 2-iodo e 2-bromoanilina conforme esquema 26.



Esquema 26. Esquema de reação teste da reação de Heck descrita por Cho & Kim.

A reação com iodobenzeno foi efetiva permitindo a obtenção do produto de Heck conforme espectro de C¹³RMN descrito na figura 28, onde é possível observar o surgimento de sinal característico de carbono quaternário em 154,7 ppm, possibilitando, desta forma concluir que a reação de Heck estava funcionando e que os dados publicados por Cho & Kim necessitam ser investigados mais profundamente afim de que se comprove as informações publicadas. Além disso, o resultado positivo descrito na figura 28 possibilitou propor modificações no esquema reacional inicial afim de chegar ao êxito na reação de Heck empregando as anilinas (CHO; KIM, 2007).

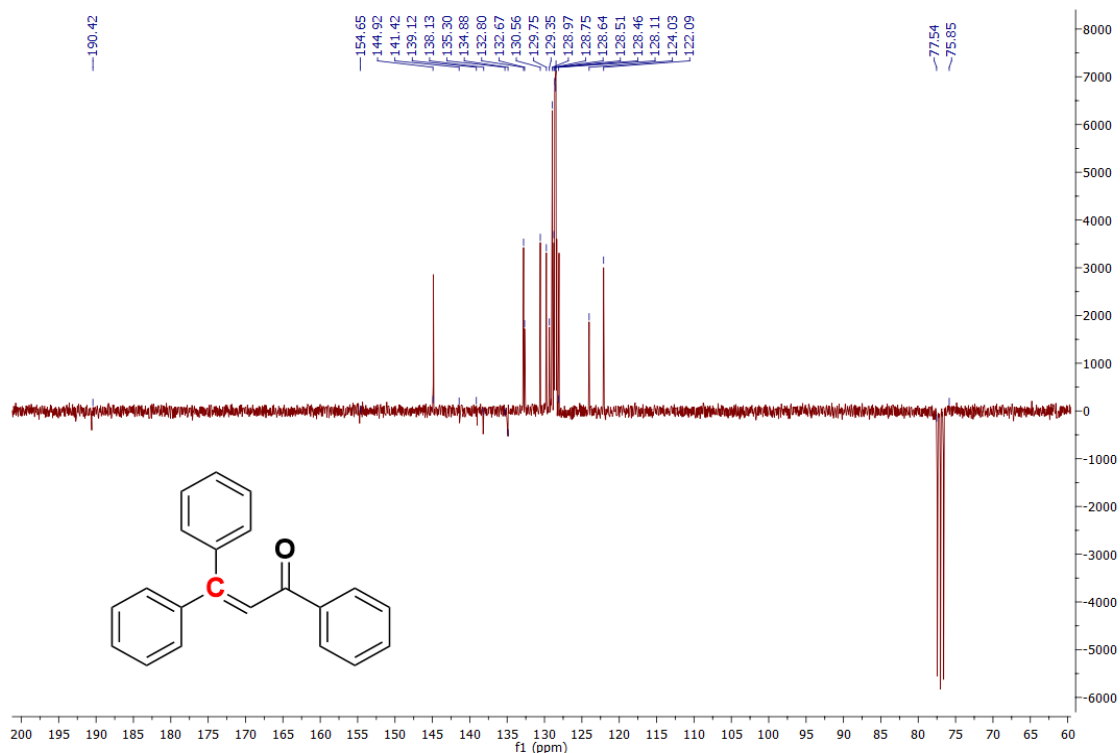
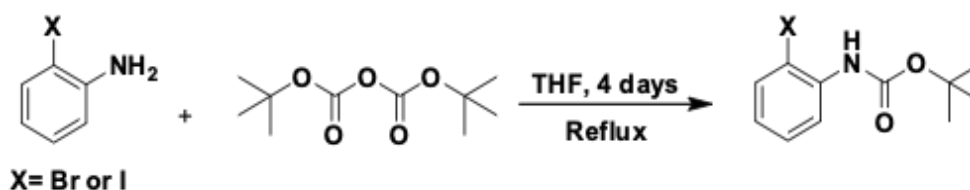


Figura 28. espectro de C^{13} RMN do bruto reacional que demonstra o sinal característico do produto de Heck.

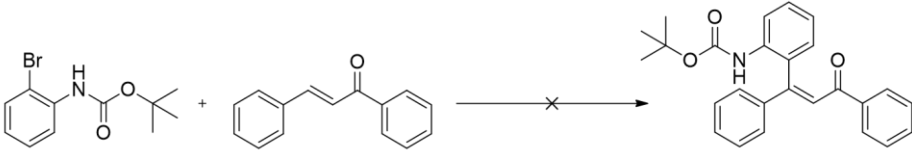
Assim, foi proposta a proteção da anilina com o grupamento di-terc-butil dicarbonato (BOC_2O) conforme esquema 27. Nesta reação utilizamos como solvente tetrahydrofurano (THF) sob refluxo por 4 dias, chegando, após a purificação, a 50% de rendimento em virtude de uma possível complexação com Pd.



Esquema 27. Reação de proteção da anilina.

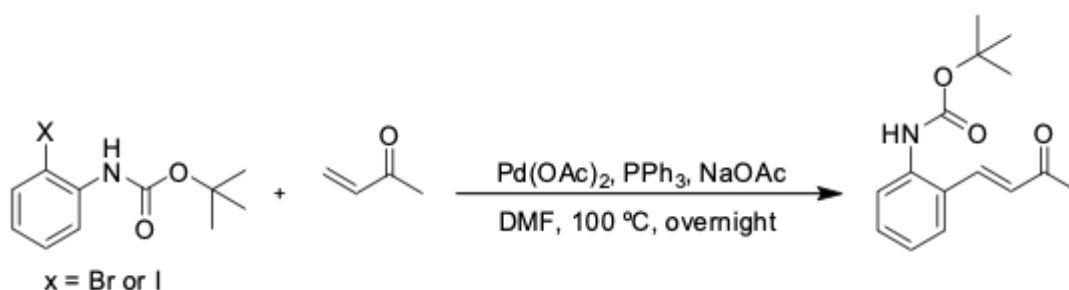
Depois da proteção da anilina com o grupamento BOC repetimos a reação de Heck nas mesmas condições, previamente, testadas conforme a tabela 7. Em nossa primeira tentativa utilizamos a 2-bromoanilina protegida afim de obter o produto de Heck. No entanto, o resultado observado foi negativo. Não ocorreu, portanto, a formação do produto de Heck nas diferentes condições diferentes testadas.

Tabela 7. Reação de Heck utilizando a 2-bromo anilina protegida.



Catalysis	Base	Solvent	Temperature (°C)	Time (hours)
Pd(OAc) ₂ /PPh ₃	NaOAc	DMF	100	15
Pd(OAc) ₂ /PPh ₃	Bu ₄ N ⁺ Cl ⁻ / DIPEA	DMF	100	72

Uma das hipóteses levantadas para o não funcionamento da reação foi o impedimento espacial causado pelo grupamento BOC acoplado à anilina, juntamente com os dois grupamentos aromáticos presentes na cetona α,β -insaturada. Levando em consideração estas informações, decidimos testar a cetona α,β -insaturada mais simples em termos de substituição e número de carbonos: a metilvinilcetona (MVK). Esta reação foi realizada nas mesmas condições anteriormente testadas conforme esquema 28.



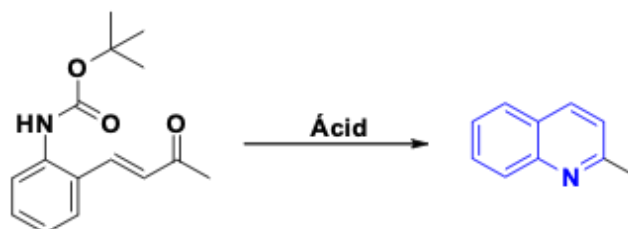
Esquema 28. Reação de Heck utilizando a metilvinilcetona como material de partida.

Os resultados alcançados a partir do uso da metilvinilcetona como material de partida foram bastante promissores. Para a 2-bromoanilina protegida foi isolado o produto de Heck com 71% de rendimento. Já na reação com a 2-iodoanilina protegida o rendimento do produto de Heck isolado foi de 98%. A partir destes resultados foi possível observar o importante papel dos substituintes na olefina, assim como a natureza do halogênio presente na posição orto da anilina protegida. Fica evidente que a 2-iodoanilina é mais apropriada para realizar os acoplamentos de Heck devido a maior reatividade deste halogênio em comparação direta com o bromo.

Tais resultados corroboram com as afirmações já publicadas por Richard Heck em uma revisão que discutia a versatilidade da sua própria reação. Nesta revisão é demonstrado que iodetos têm mais reatividade que brometos de arila. Outra informação importante é a natureza da substituição da olefina que podem ser mono, di ou trissubstituídas. No entanto quanto menos substituídas mais rápida é a reação de acoplamento (HECK, 1979, 1982; WATSON, 2016).

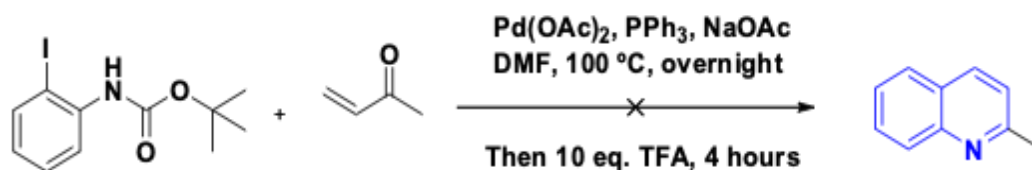
Após obtermos o produto de Heck isolado, testamos duas condições diferentes afim de fazer a retirada do grupamento BOC, deixando a anilina livre pra ciclizar em reação de ataque ao carbono da carbonila da olefina conforme tabela 8.

Tabela 8. Esquema de desproteção da anilina, posterior ciclização e obtenção do 2-metilquinolina.



Ácid	Solvent	Temperature	Time (Hours)	Yield (%)
TFA	CH ₂ Cl ₂	r. t.	4	72
HCl	MeOH	r. t.	2,5	36

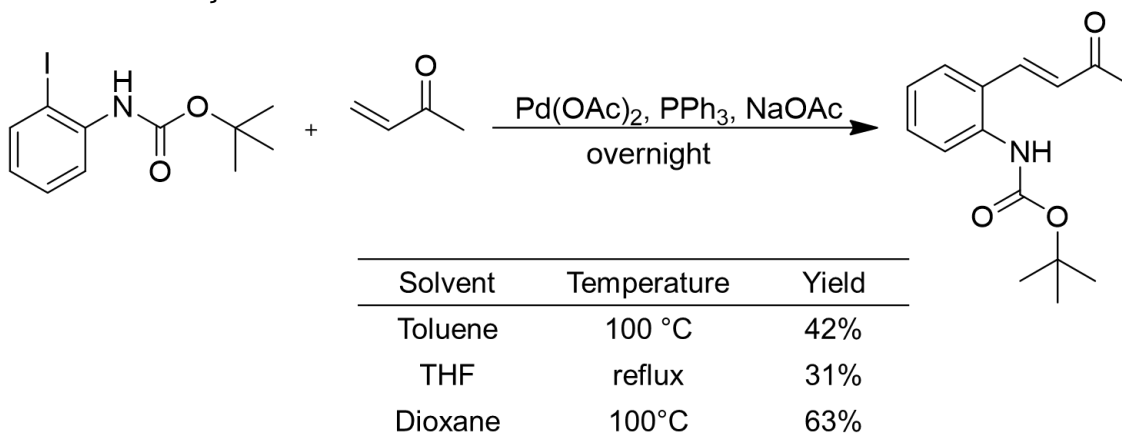
Os resultados exibidos na tabela 8 demonstram que o ácido trifluoroacético (TFA) teve um desempenho melhor quando comparado ao ácido clorídrico na função de retirar o grupamento BOC e assim permitir a ciclização. Deste modo, propomos adicionar o TFA diretamente ao meio reacional depois da formação do produto de Heck conforme esquema 29. Desta forma, uma etapa de purificação seria evitada, possibilitando, provavelmente o aumento do rendimento final da reação.



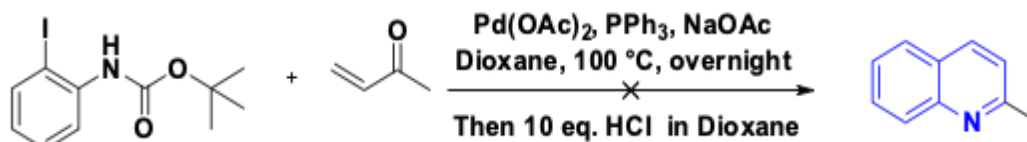
Esquema 29. Adição do TFA diretamente ao meio reacional afim de obter-se a quinolina diretamente.

Conforme observado no esquema 29 a tentativa de adicionar o TFA diretamente no meio reacional não funcionou adequadamente pois o grupamento BOC não foi removido. Nossa hipótese para tal resultado seria a incompatibilidade do solvente utilizado na reação, a N,N-dimetilformamida (DMF), o qual apresenta características polares. Desta maneira testamos a reação de Heck em diferentes solventes (tabela 9) afim de saber se seria possível usar outro ácido para remover o grupamento BOC.

Tabela 9. Reação de Heck realizada com diferentes solventes.



A reação de Heck mostrou-se eficaz com outros solventes como os testados na tabela 9. O melhor rendimento observado foi com o solvente dioxano, obtendo-se um rendimento final do produto de Heck de 63%. Assim, decidimos testar a adição de ácido clorídrico já disposto em uma solução comercial de dioxano na tentativa de chegar a desproteção do grupamento BOC da anilina diretamente no meio reacional, obtendo-se assim a quinolina. Esta tentativa está ilustrada no esquema 30.

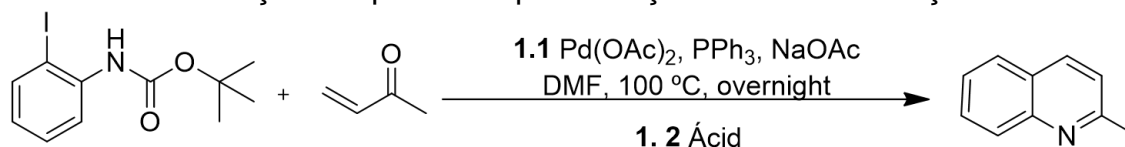


Esquema 30. Adição de HCl diretamente no meio reacional utilizando dioxano como solvente.

Conforme é possível observar no esquema 30, a adição de HCl diretamente no meio reacional após a reação de Heck não funcionou, não ocorrendo a formação da respectiva quinolina.

A partir destes resultados voltou-se a pensar na utilização de TFA como nosso agente desprotetor evitando a purificação do produto intermediário de Heck. Assim, foi testada uma partição da reação de Heck bruta com uma solução saturada de NaHCO_3 , utilizando como solvente orgânico o éter etílico, afim de facilitar que o DMF ficasse retido na solução aquosa. Após a partição, secagem com sulfato de magnésio anidro, filtração e evaporação do solvente, a reação bruta de Heck foi submetida a dois sistemas diferentes de desproteção: HCl em metanol e TFA em diclorometano conforme é possível observar na tabela 10.

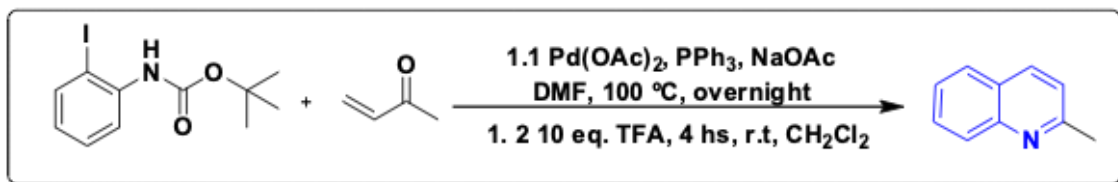
Tabela 10. Obtenção da quinolina após a adição de ácido na reação Heck bruta.



Ácid	Solvent	Eq.	Yield
HCl	Methanol	5	45%
TFA	CH_2Cl_2	10	88%

Os resultados da tabela 10 demonstram que TFA, mais uma vez, foi mais eficiente na função de desproteger o grupamento BOC, favorecendo a ciclização e consequente formação da quinolina respectiva. Em comparação com a desproteção empregando HCl, a reação utilizando TFA demonstrou praticamente o dobro de rendimento na conversão do produto de Heck em sua quinolina respectiva. Estes experimentos demonstraram, também, que não se faz necessário isolar o produto de

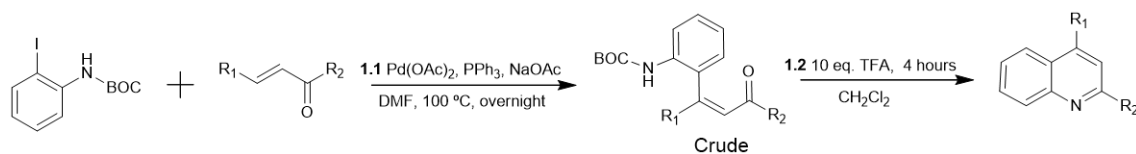
Heck após sua formação. O fato de evitar um processo de purificação é muito vantajoso pois há um retorno direto em economia de tempo, reagentes e aumento do rendimento. Desta forma chegou-se a um modelo geral de reação utilizando a reação de Heck para obter-se quinolinas conforme exposto esquema 31.



Esquema 31. Esquema geral de reação desenvolvido para obtenção de quinolinas.

A partir deste novo modelo reacional desenvolvido foi proposto variar as olefinas afim de verificar o real funcionamento do modelo conforme demonstrado na tabela 11.

Tabela 11. Diferentes quinolinas obtidas a partir do modelo geral de reação de Heck proposto.



R1	R2	Product	Yield (%)
-H	-CH ₃		70
-CH ₂ CH ₃	-CH ₃		77
-(CH ₂) ₂ -Ar	-CH ₃		37
-Ar	-CH ₃		17
-Ar	-Ar		14

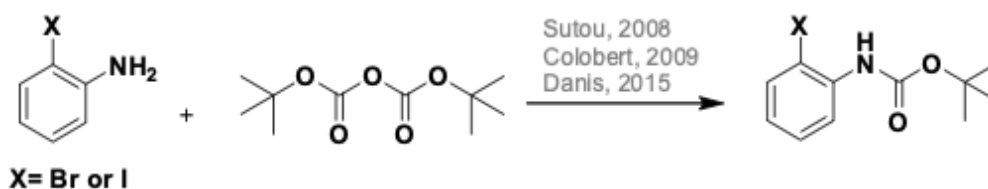
A partir dos resultados demonstrados tabela 11 foi possível verificar rendimentos bons a baixos. A utilização de olefinas substituídas por grupamentos metílicos e etílicos conduziu aos melhores rendimentos 70 e 77% respectivamente. Já o emprego de olefinas substituídas por grupamentos aromáticos levou a obtenção de rendimentos menores, sugerido que grupamentos volumosos desfavorecem a obtenção de quinolinas, seja devido ao impedimento estérico ou fatores eletrônicos.

Tais resultados demonstram o potencial da metodologia inédita desenvolvida para a síntese do núcleo quinolínico com interessantes posições de substituições, tanto do ponto de vista químico como de planejamento de novas moléculas.

5.2.2 Proteção das anilinas

Três metodologias foram testadas afim de proteger as anilinas orto substituídas por Br e I com o grupamento di-terc-butildicarbonato (BOC₂) e alcançar os melhores resultados possíveis conforme esquema tabela 12 abaixo.

Tabela 12. proteção da anilina substituída pelo grupamento BOC através de 3 diferentes metodologias e seus rendimentos.



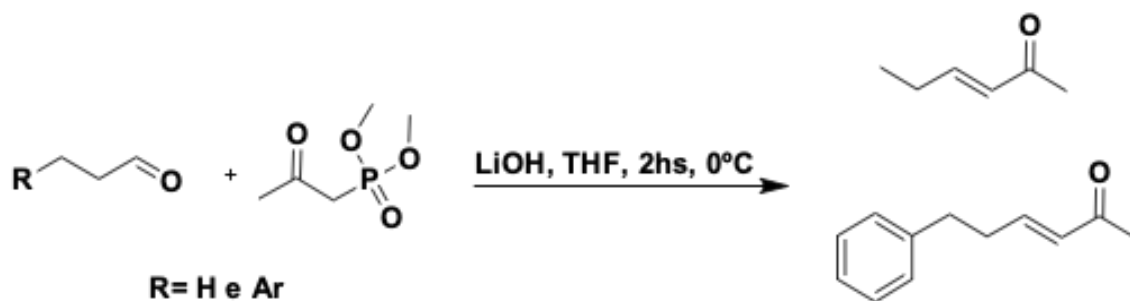
Metodologia	Anilina eq.	BOC ₂ eq.	Catalisador eq.	Tempo	Rendimento %
Sutou, 2008	1	2	DMAP - 0,1	24	25
Colobert, 2009	1	1,2	NaH - 1,1	15	11
Denis, 2015	1	1,6	-	96	51

Conforme é possível observar na tabela 12, a metodologia que ofereceu melhores rendimentos, e mais simples em função da quantidade de reagentes, foi a baseada em Denis e colaboradores (2015) com um respectivo rendimento médio de 51%.

5.2.3 Síntese das cetonas α,β -insaturadas

Algumas cetonas α,β -insaturadas encontram-se indisponíveis comercialmente, portanto foi necessário sintetizá-las em laboratório. Para tal

utilizamos a metodologia de HWE conforme esquema abaixo (DUDZIŃSKI et al., 2012).



Esquema 32. síntese de cetonas α,β -insaturadas através de reação de Wittig.

. Os produtos foram isolados na forma de óleos com rendimentos de 56% para 3-hexenona e 87% para a 6-aryl-3-hexenona conforme demonstrado no esquema 32

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados acima demonstrados é possível concluir que estabeleceu-se uma nova metodologia sintética para o núcleo quinolínico através de catálise organometálica de paládio utilizando a reação de Heck. A metodologia desenvolvida utiliza apenas 2 etapas reacionais e oferece subsídio para futuras modificações estruturais no núcleo quinolínico. Foram sintetizadas 5 quinolinas através desta metodologia, cujas estruturas foram identificadas através de RMN e espectroscopia de massas.

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um nome genérico dado a um conjunto de mais de 100 doenças, as quais possuem a característica geral do crescimento desordenado de células mutadas do próprio organismo. Esta doença tem se tornado um problema de saúde pública mundial, alcançando mais de 18 milhões de novos casos em 2018 e 29 milhões de novos casos estimados para 2040 (INCA, 2018a; WHO, 2018a).

O tratamento, de um modo geral, inclui radioterapia, quimioterapia e intervenção cirúrgica que visam eliminar ou diminuir ao máximo a extensão do tumor e suas possíveis metástases. Neste sentido, diversas variáveis, tanto do paciente como dos recursos envolvidos, estão relacionadas ao êxito deste tratamento que busca em alguns casos a extinção dos tumores ou aumento da sobrevivência dos pacientes.

O tratamento quimioterápico é um dos fatores mais importantes quando levamos em consideração a busca pelo máximo desempenho em prol da saúde do paciente. No entanto, em muitos casos a variabilidade de fármacos é limitada ou ainda os fármacos disponíveis apresentam baixa eficácia e muitos efeitos colaterais, trazendo sérias limitações ao tratamento.

O desenvolvimento de novos fármacos antitumorais é, portanto, de extrema relevância e necessidade a fim de alcançar a qualidade e eficácia máxima nos tratamentos de câncer. Neste sentido, este trabalho buscou sintetizar novas moléculas, mais especificamente quinolinas, que possam tratar diferentes tipos de tumores com eficácia e segurança.

2 OBJETIVO GERAL

Este capítulo teve por objetivo geral avaliar atividade antitumoral de 6 quinolinas frente a linhagens tumorais e não tumorais.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar a atividade tumoral *in vitro* das quinolinas sintetizadas frente as linhagens tumorais de melanoma, carcinoma cervicale leucemia;

- Avaliara a atividade tumoral *in vitro* das quinolinas sintetizadas frente a linagem não tumoral *Vero*;
- Estabelecer o índice de seletividade para cada molécula;
- Avaliar os possíveis mecanismo de morte celular;
- Estabelecer uma relação estrutura atividade biológica/toxicológica;
- Calcular os parâmetros *in silico* ADMET.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Câncer

Câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de 100 doenças que podem afetar diversas partes do corpo humano, também pode ser denominado por outros termos como tumores malignos e neoplasias. A principal característica deste grupo de doenças é um distúrbio de crescimento celular iniciado a partir de uma única célula e sua progênie clonal. Estas células cancerígenas apresentam uma vantagem de sobrevivência e crescimento frente as células normais do organismo, resultando em proliferação excessiva. A partir deste crescimento desordenado as células podem invadir tecidos e órgãos, ou ainda se disseminar por outras partes do corpo, processo chamado de metástase cuja ocorrência é uma das principais causas de morte por câncer.(WHO, 2018a).

As doenças não-transmissíveis (DNTs) são, atualmente, responsáveis pela maioria das mortes globais, sendo que o câncer é a segunda maior causa de mortes entre as doenças não-transmissíveis e a sexta maior causa de morte globalmente. Dados de 2016 afirmam que o câncer foi responsável por cerca de 22% (9 milhões) das mortes por doenças não-transmissíveis, além disso é espera-se que o câncer seja a principal causa de morte e uma dos obstáculos mais importantes para aumentar a expectativa de vida em todos os países do mundo no século XXI. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmam que o câncer é a principal causa de mortes prematuras (antes dos 70 anos) em 91 países do 172 avaliados mundialmente em 2016 conforme figura 29(WHO, 2018a, 2018b; BRAY et al., 2018).

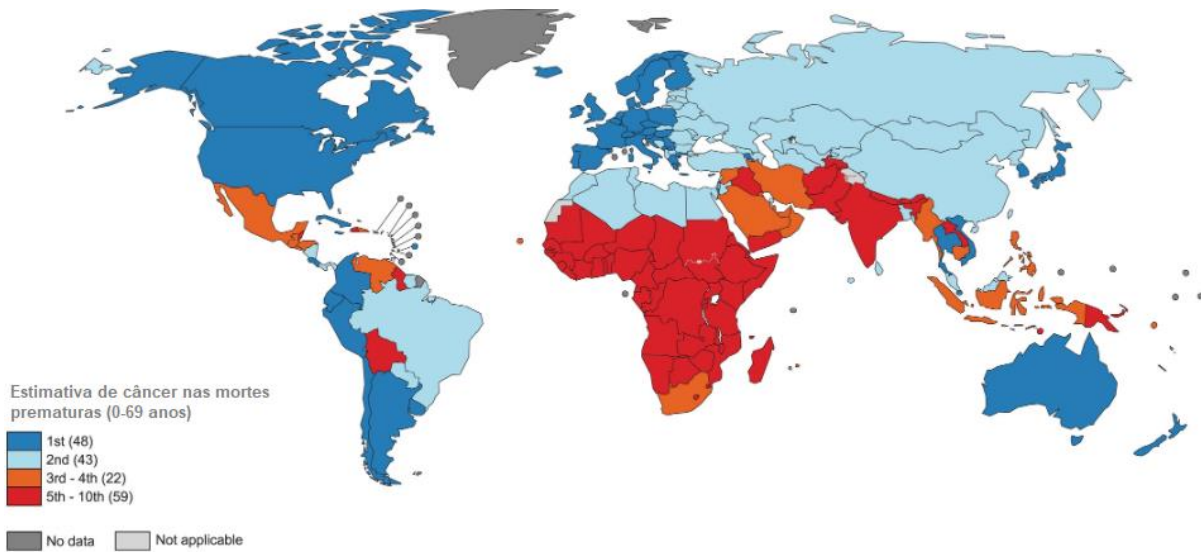


Figura 29. Principal causa de mortes prematuras (antes dos 70 anos) em 91 países. Adaptado de WHO, 2018.

Nas últimas décadas o câncer tem aumentado rapidamente a sua incidência, tornando-se evidente problema de saúde pública mundial. A doença está entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, somente em 2018 são estimados no total cerca de 18,1 milhões de novos casos (9,6 milhões de mortes), já em 2040 a estimativa aumenta para cerca de 29,5 milhões de novos casos conforme figura 30 (IARC, 2018; WHO, 2018b; BRAY et al., 2018).

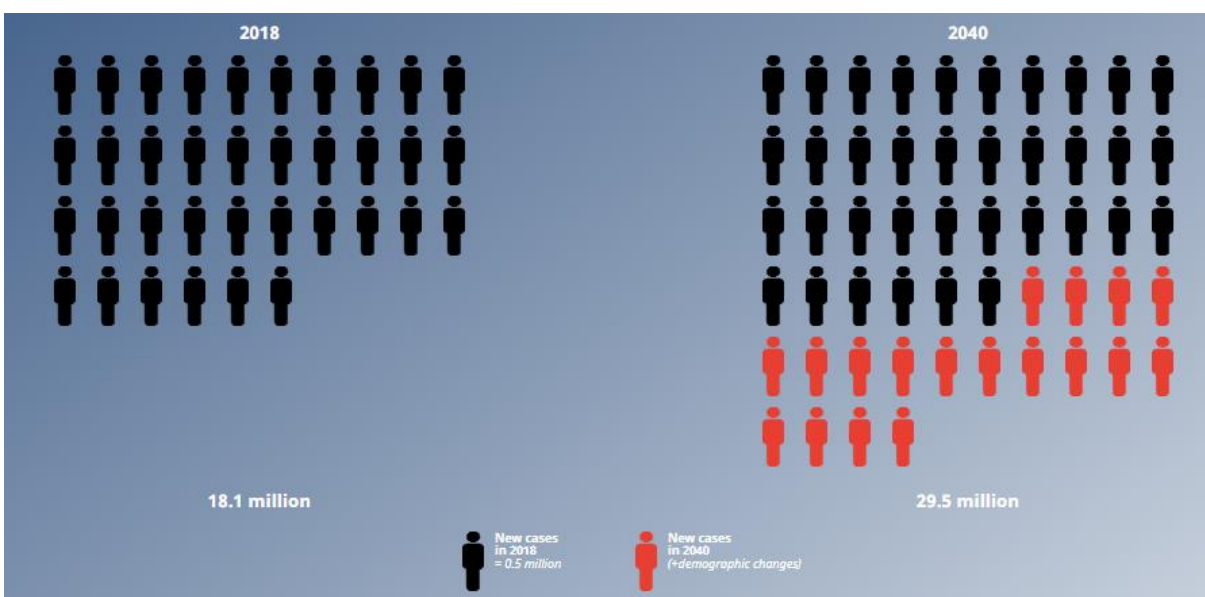


Figura 30. Infográfico com as estimativas de novos casos de câncer em 2018 e 2040. Adaptado de IARC, 2018.

Além das perdas humanas causadas pelas mortes decorrentes do câncer, o custo financeiro é significativo e representa um grande desafio, especialmente para o sistema de saúde pública, além do sistema privado ou suplementar. O câncer caracteriza-se por ser uma doença multifatorial, onde seu tratamento envolve o atendimento de profissionais de áreas multidisciplinares, infraestrutura física complexa e fármacos de alto custo. Todos estes fatores fazem do câncer uma doença altamente onerosa, o custo econômico anual do câncer em 2010 foi estimado em aproximadamente 1,16 trilhão de dólares (WHO, 2014).

Além disso, os países em desenvolvimento são os que mais serão atingidos por esta doença. Embora a incidência seja semelhante ou até mesmo menor que em países desenvolvidos, a mortalidade é maior nos países em desenvolvimento. Uma possível causa para estes dados está no diagnóstico da doença em estádios mais avançados, além do difícil acesso ao tratamento da doença. É possível observar a existência de um perfil na incidência de determinados tipos de câncer em países em desenvolvimento que é semelhante ao perfil de países desenvolvidos, principalmente com relação aos cânceres de próstata, mama e intestino. Entretanto, ainda são mais encontrados os cânceres relacionados com condições socioeconômicas menos favoráveis, como o do colo do útero e o do estômago (WHO, 2014; INCA, 2018a).

No Brasil a estimativa para o biênio 2018-2019, prevê a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer para cada ano. O perfil epidemiológico observado é semelhante ao da América Latina e Central, onde estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2018a).

3.1.1 Me-180 e Hela – Câncer cervical

As linhagens celulares Me-180 e Hela são linhagens tumorais relacionadas ao câncer cervical. Esta doença também chamada de câncer do colo do útero ocorre na parte inferior uterina (colo do útero), a qual conecta-se à vagina (SHRESTHA et al., 2018). O câncer cervical é causado em sua maioria pela infecção local pelo HPV (Papiloma vírus humano), na qual algumas cepas oncogênicas (16 e 18 em 70% dos

casos) causam lesões às células epiteliais da cérvixuterina, levando a formação do tumor ao longo dos anos conforme figura 31(SCHROETER et al., 2017; INCA, 2018b; STARK; ŽIVKOVIĆ, 2018).

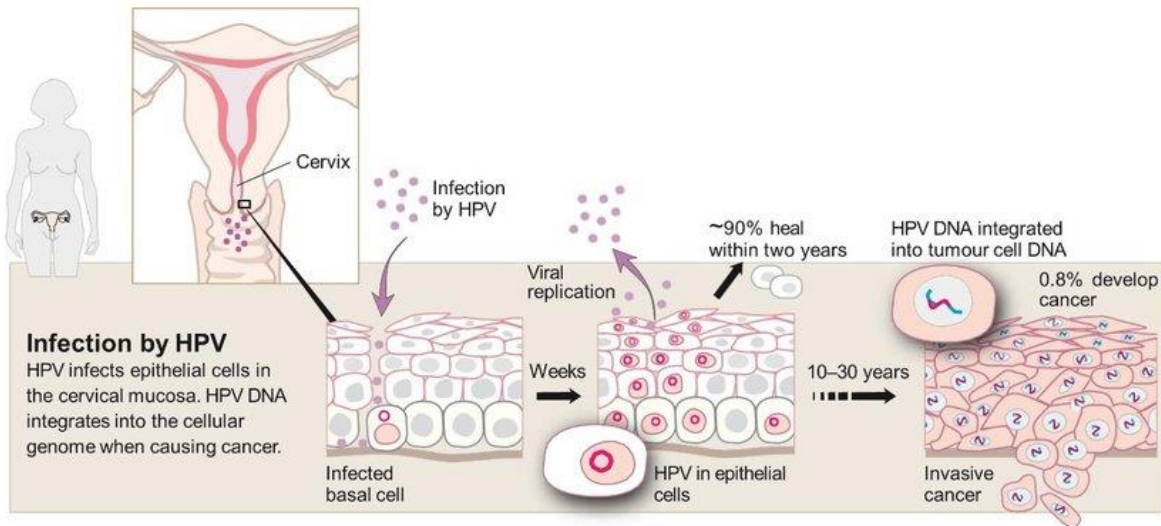


Figura 31. Patogênese do HPV no câncer cervical. Adaptado de (STARK; ŽIVKOVIĆ, 2018).

Segundo a literatura o câncer cervical está intimamente ligado às condições socioeconômicas da população avaliada. As estimativas são de cerca de 570.000 casos e 311.000 mortes somente em 2018 no mundo, esta doença está classificada como o quarto câncer mais diagnosticado e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres(IARC, 2018). O câncer cervical está em segundo lugar quanto a maior incidência e mortalidade, atrás apenas do câncer de mama em regiões com índice de desenvolvimento humano (IDH) baixo (BRAY et al., 2018).

No Brasil, apenas em 2018, são estimados cerca de 16,4 mil casos novos e 5,4 mil mortes causadas pelo câncer cervical. Neste sentido, novos tratamentos para o tratamento desta doença são de significativa relevância tanto para a saúde pública mundial como para a brasileira (INCA, 2018a, 2018b).

3.1.2 K562 - Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença clonal da célula progenitora hematopoiética (stemcell) de medula óssea, que apresenta uma translocação recíproca entre os pares cromossomos 9 e 22 o que leva

ao encurtamento dos braços longos de um dos cromossomos 22. O cromossomo anormal resultante $t(9,22)(q34;q11)$ é denominado Cromossomo Filadélfia o qual leva a expressão e consequente tradução de uma oncoproteína com atividade tirosina-quinase aumentada (DE et al., 2002; SOSSELA et al., 2017).

A LMC é uma neoplasia hematológica que corresponde de 15% a 20% de todas as leucemias. Segundo relatório da WHO, são estimados no total para 2018 cerca de 440 mil novos casos de leucemia para 2018, sendo que é estimada a incidência de 2 casos para cada 100 mil indivíduos (DE et al., 2002; INCA, 2018a; BRAY et al., 2018).

Na maioria dos casos, o tratamento da LMC inclui transplante de medula óssea, hidroxiuréia e esquemas terapêuticos baseados em Interferon-alfa (IFN- α), sendo hoje o fármaco Imatinibe o tratamento quimioterápico de primeira escolha, embora haja limitações como o desenvolvimento de resistência ao tratamento (LOPES et al.; DE et al., 2002; SOSSELA et al., 2017).

3.1.3 B16F10 - Melanoma

O melanoma cutâneo humano é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina) e tem predominância em adultos brancos. Melanoma é o câncer mais frequente no Brasil e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no País, podendo ser um dos mais graves devido à sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2018a). O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estágios iniciais. Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor (INCA, 2018a).

Segundo a WHO são estimados cerca de 290 mil novos casos de melanoma em 2018 mundialmente, além de quase 61 mil mortes causadas por esta doença. No Brasil, são esperados cerca de 6,2 mil novos casos em 2018, além da estimativa de 1,5 mil mortes (INCA, 2016; BRAY et al., 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedimento experimental geral

4.1.1 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo HeLa (adenocarcinoma cervical humano - HPV-18), Me-180 (carcinoma epidermóide metastático cervical humano –(HPV-68)e B16F10 (melanoma murino) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC - Rockville, MD, EUA). As linhagens K562 (leucemia mielóide crônica humana) e Vero foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

As células foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10% - 20% (v / v) de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, EUA) dependendo da linhagem celular, a 37 °C e atmosfera úmida (5% CO₂). As linhagens celulares HeLa foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma) de baixa glicose, Me-180 em RPMI 1640 (Sigma, St Louis, EUA), B16F10, K562 e células Vero em DMEM com alta glicose (Sigma, St Louis, EUA).

4.1.2 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade dos compostos nas linhas celulares (HeLa, Me-180, K562, B16F10 e Vero) foi realizada utilizando o ensaio MTT. Este método baseia-se na redução do sal tetrazólio MTT em um produto pigmentado chamado formazan, por atividade de desidrogenases mitocondriais (principalmente)(BERRIDGE et al., 2005). O tratamento das células tumorais foi realizado para estimar a potência e eficiência dos compostos como agentes anticancerígenos e o tratamento com células Vero foi realizado para avaliar o índice de selectividade (IS) de modo a avaliar quão seletivos são os compostos em comparação com linhagem não tumoral.

4.1.2.1 Linhagens aderentes

Cada linhagem celular foi semeada em placas de 96 poços (6 x 10³ células em células cancerígenas e 2 x 10⁴ em células Vero, por poço) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após atingir a semi-confluência, as células foram tratadas com os compostos a 50µM num rastreio preliminar e incubadas durante 48 horas. Os compostos que obtiveram inibição > 50% foram selecionados para avaliar sua dose-resposta usando 6 concentrações variando de 5 a 100 µM.

Após 48 h, o meio contendo o tratamento foi removido e as células incubadas com solução de MTT (0,5 mg/ml) por 3 horas a 37 °C, na ausência de luz. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO e quantificados por absorvância em 570 e 630nm medida em espectrofotômetro de placas (Spectramax M2e, SoftMax Pro Software Interface 5.4.1, EUA). Os resultados foram expressos em médias de IC₅₀ relativa (50% de concentração inibidora) e comparados com o controle (veículo DMSO a 0,5%).

4.1.2.2 Linhagens não-aderentes (K562)

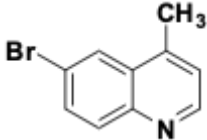
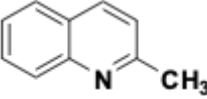
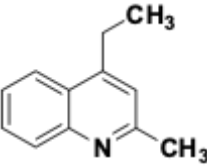
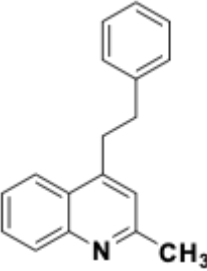
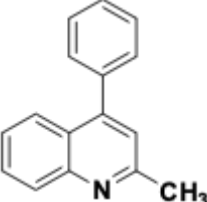
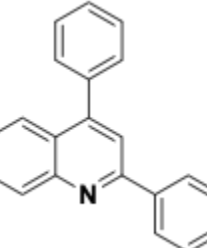
A linhagem celular K562 foi semeada em placas de 96 poços (6 x 10⁴ por poço) e incubada a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com os compostos a 50µM num rastreio preliminar e incubadas durante 48 horas. Os compostos que obtiveram inibição > 50% foram selecionados para avaliar sua dose-resposta usando 6 concentrações variando de 5 a 100 µM.

Após 48 h, a contagem de células viáveis foi realizada pelo citômetro de fluxo FACSVersé, equipado com laser azul de 488 nm e sensor de fluxo BD Biosciences (San Jose, CA, EUA) (Software BD FacSuite™). Os resultados foram expressos em médias de IC₅₀ relativa (50% de concentração inibidora) e comparados com o controle (veículo DMSO a 0,5%).

4.1.3 Moléculas avaliadas

As 6 quinolinas avaliadas foram sintetizados através das metodologias de Skraup Doener von-Miller (Q2 – capítulo 1) e Heck (Q10, Q11, Q12, Q13, Q14 – capítulo 2) (Tabela 13). Os compostos apresentavam alto grau de pureza observados pelas técnicas de H¹RMN, C¹³RMN e espectroscopia de massas (EM).

Tabela 13. estrutura química de quinolinas avaliadas quanto a atividade antitumoral.

;	Estrutura	Peso Molecular g/mol
Q2		222,08
Q10		143,19
Q11		171,24
Q12		247,33
Q13		219,28
Q14		281,35

4.1.4 Ensaios de modo de ação: apoptose e necrose

A indução da apoptose foi quantificada pelo kit conjugado de isotiocianato de anexina V-fluoresceína (Quatro G, Porto Alegre, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Células tumorais foram tratadas em placas de 24 poços com 2 concentrações: uma igual ao IC₅₀ e outra com o dobro do valor encontrado no IC₅₀, e incubadas por 48 h. Após esse período, as células foram transferidas para tubos, tripsinizadas e centrifugadas por 5min a 1500 rpm. Os pellets foram produzidos e os sobrenadantes foram descartados. Posteriormente, 5µl de anexina V e 5µl de iodeto de propídio (PI) foram adicionados aos tubos e aguardada a reação por 15 min em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

O índice apoptótico foi determinado em citômetro de fluxo FACSVerse, equipado com laser azul de 488nm e sensor de fluxo BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). As células (exceto K562) foram também tratadas com cisplatina a 2,5µl durante 48 h, que foi aplicada como um controle positivo da indução de apoptose e Triton que foi utilizado como controle positivo de necrose. No caso da linhagem K562 o procedimento foi efetuado da mesma forma com exceção do fármaco usado como padrão comparativo de indução de apoptose: 6 µM de Imatinib por 48 horas. Os dados foram expressos em porcentagem dos eventos contados ± DP (desvio padrão) e comparados ao controle (DMSO 0,5%).

4.1.5 Cálculo do Índice de Seletividade (SI)

O cálculo do índice de seletividade foi realizado através de uma simples relação entre a razão do IC₅₀ da linhagem não tumoral pelo IC₅₀ das respectivas linhagens tumorais conforme equação demonstrada na figura 32.

$$SI = \frac{\text{IC}_{50} \text{ da linhagem não tumoral}}{\text{IC}_{50} \text{ das respectivas linhagens tumorais}}$$

Figura 32. equação utilizada para calcular o índice de seletividade.

4.1.6 Parâmetros *in silico* - ADMET

O cálculo dos parâmetros foi realizado de uma ferramenta web chamada *SwissADME* que oferece acesso livre a um conjunto de modelos preditivos rápidos, porém robustos, para propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas (ZOETE et al., 2016; DAINA et al., 2017). Parâmetros de toxicidade foram calculados utilizando o software livre denominado DataWarrior® (SANDER et al., 2015).

4.2.7 Análise Estatística

As comparações entre as médias foram realizadas através da ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism® versão 7.01.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade citotóxica

5.1.1 Linhagem HeLa

Os resultados obtidos para a linhagem tumoral HeLa (adenocarcinoma cervical humano - HPV-18) demonstraram que as moléculas Q2, Q10 e Q13 não obtiveram resultados significativos ($IC_{50} > 100 \mu M$) quando comparados ao controle negativo, não demonstrando portanto atividade antitumoral frente esta linhagem.

Já as quinolinas Q11, Q12 e Q14 apresentam um boa atividade dando destaque para a quinolina Q11 que alcançou um IC_{50} de $15,13 \mu M$ conforme é possível observar na figura 33. A molécula Q12 apresentou um IC_{50} de $25,33 \mu M$ e a Q14 alcançou um IC_{50} de $44,64 \mu M$.

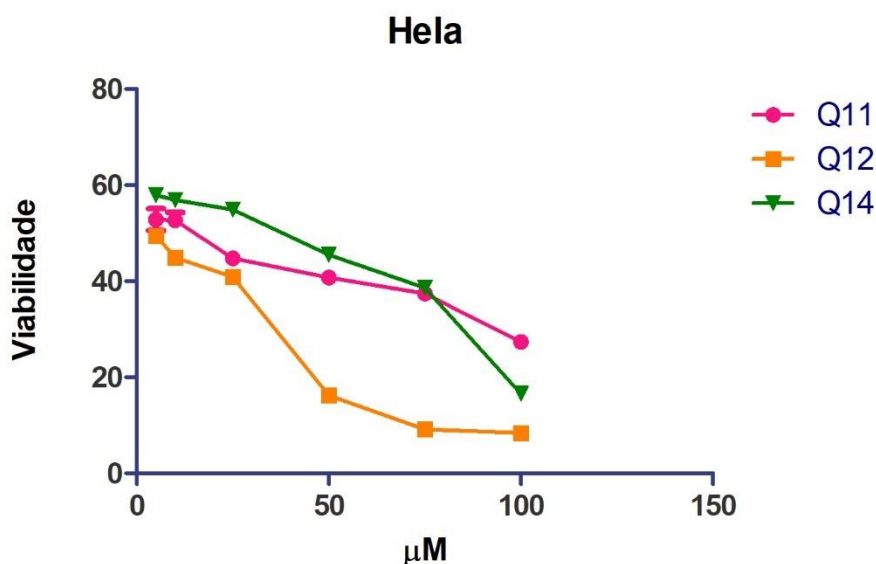


Figura 33. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem HeLa sob tratamento de quinolinas.

É importante dizer que a análise em grande escala da resposta celular a drogas antitumorais normalmente se concentra na variação da potência (IC_{50}), assumindo que este parâmetro é o mais importante quando classificamos as novas moléculas entre drogas eficazes e ineficazes ou células sensíveis e resistentes. Um

estudo de Sichani e colaboradores (2013) fez uma abordagem multiparamétrica envolvendo a análise da inclinação da curva dose-resposta, a área sob a curva (AUC) e o efeito máximo (E_{max}). Neste trabalho constatou-se que alguns desses parâmetros variam sistematicamente com a linhagem celular e outros com classe de fármacos, concluindo-se que outros parâmetros além da potência devem ser considerados na análise comparativa da resposta do fármaco, particularmente em concentrações clinicamente relevantes, perto e acima do IC_{50} (FALLAHI-SICHANI et al., 2013).

Em face disso, analisamos também neste trabalho não só o parâmetro indicador de potência (IC_{50}), assim como os parâmetros indicadores de eficácia (E_{max}) e a área sobre a curva (AUC) a qual correlaciona os efeitos de potência e eficácia associados (FALLAHI-SICHANI et al., 2013).

Na tabela 14 é possível observar os diferentes valores de IC_{50} , E_{max} e AUC das quinolinas mais ativas Q11, Q12 e Q14. Como é possível observar na tabela 14, embora a Q11 apresente um menor IC_{50} que as outras quinolinas avaliadas, seu E_{max} e AUC são superiores à Q12. Uma análise levando em consideração não só o IC_{50} mas também o E_{max} e a AUC revela que a Q12 foi a molécula mais ativa frente a linhagem Hila, apresentando uma eficácia de quase 92% de eliminação células tumorais na concentração de 100 μ M (E_{max}). Tais dados corroboram com o valor da AUC encontrada, no caso da Q11 o menor valor encontrado entre as 3 quinolinas mais ativas, ou seja, a melhor relação potência e eficácia observada foi para Q12 (FALLAHI-SICHANI et al., 2013).

Tabela 14. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem Hila.

	Q11	Q12	Q14
IC_{50} (μ M)	15,13	25,33	44,64
E_{max} (% de viabilidade)	27,34	8,44	16,53
AUC	59,09	43,2	65,48

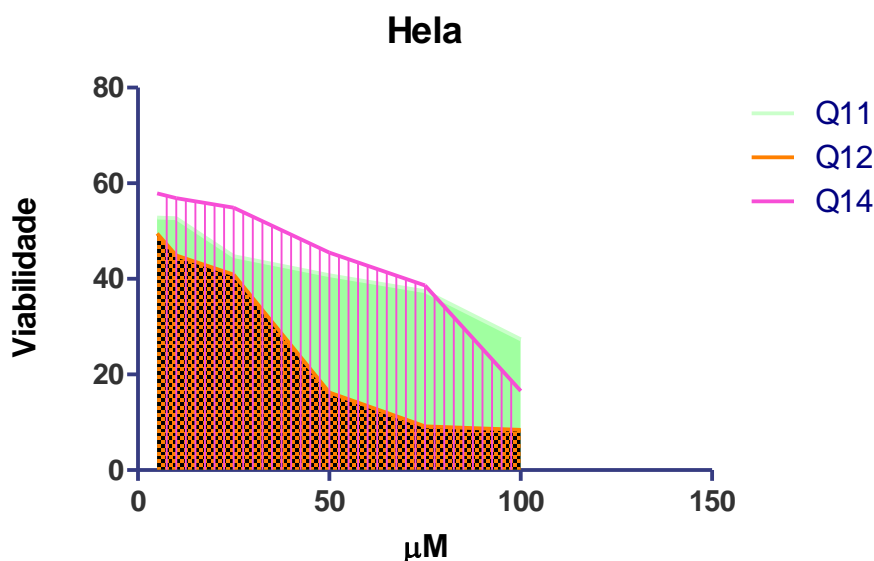


Figura 34. Gráfico indicador da área corresponde aos compostos mais ativos frente a linhagem Hela.

A partir destes resultados foi realizado um estudo sobre o tipo de morte celular provocada pelas quinolinas mais ativas a linhagem Hela. Desta forma, as quinolinas Q11, Q12 e Q14 foram avaliadas quanto ao tipo de morte através do ensaio com iodeto de propídio e anexina conforme descrito na tabela 14.

É possível observar que as células apresentam majoritariamente o perfil de morte por apoptose tardia, principalmente aquelas tratadas com as quinolinas Q12 e Q14. E, mesmo, utilizando-se concentrações superiores em até 2x o IC_{50} , não observa-se mais que 6% de morte causada por necrose. Já a quinolina Q11 causa o percentual de 16,62% de morte por necrose ainda na concentração de IC_{50} e 29,72% no dobro desta concentração. Quanto à apoptose, Q11 atinge valores semelhantes às quinolinas Q12 e Q14, como é possível observar na tabela 14.

A partir destes resultados é possível dizer que o modo de morte majoritariamente encontrado é a apoptose tardia, cuja ocorrência em ensaios iniciais de candidatos a fármacos antitumorais é tida como mais promissora que a morte celular por necrose. Esta afirmação leva em consideração inúmeros fatores envolvidos, o quais creditam, de um modo geral, a apoptose como uma morte celular “limpa” e a necrose um morte celular “suja” levando-se em consideração o extravasamento celular de organelas e processo inflamatório envolvido que pode afetar células e tecidos adjacentes (GRIVICICH et al., 2007; ALBERTS et al., 2010).

Tabela 15. Avaliação do tipo de morte celular causado pelas quinolina mais ativas frente a linhagem celular Hela.

	Concentração	Viabilidade	Apoptose	Apoptose Tardia	Necrose
Controle		94,21%	1,43%	2,45%	2,19%
Triton		3,21%	0,01%	0,63%	92,30%
Cisplatina		30,84%	8,52%	52,72%	3,12%
Q11	[15,13 µM]	71,26%	3,48%	8,64%	16,62%
Q11	[30,26 µM]	24,74%	3,04%	42,50%	29,72%
Q12	[25,33 µM]	80,05%	3,87%	11,77%	3,10%
Q12	[50,66 µM]	47,08%	9,32%	30,54%	5,90%
Q14	[44,64 µM]	62,78%	11,06%	20,38%	5,78%
Q14	[89,28 µM]	26,84%	17,92%	51,88%	3,36%

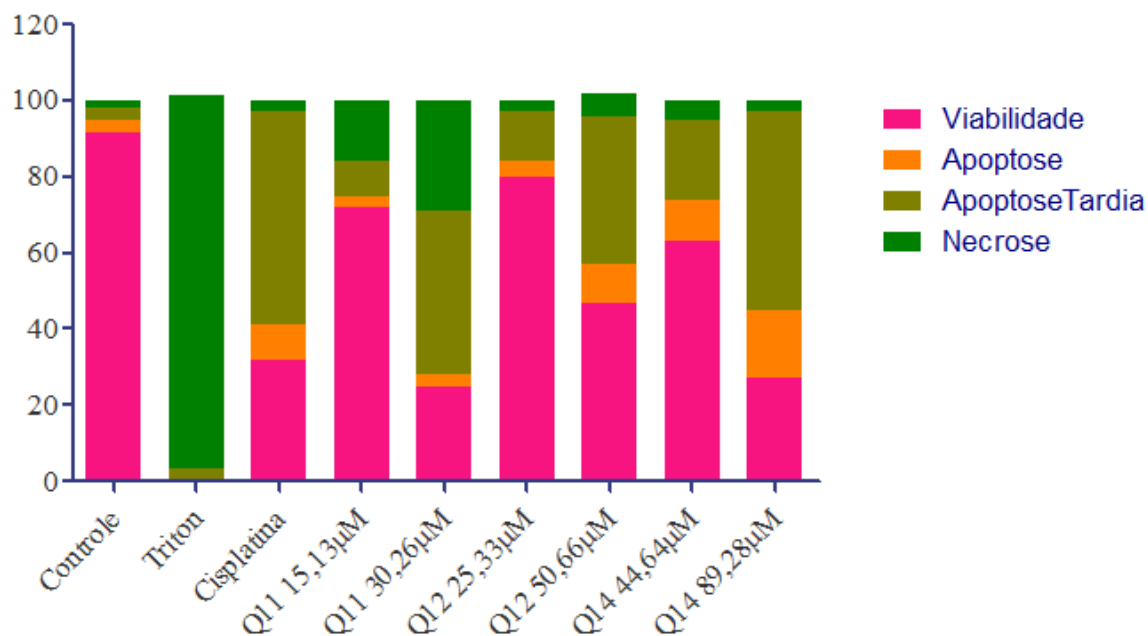


Figura 35. Gráfico que demonstra o perfil de morte celular das quinolinas avaliadas.

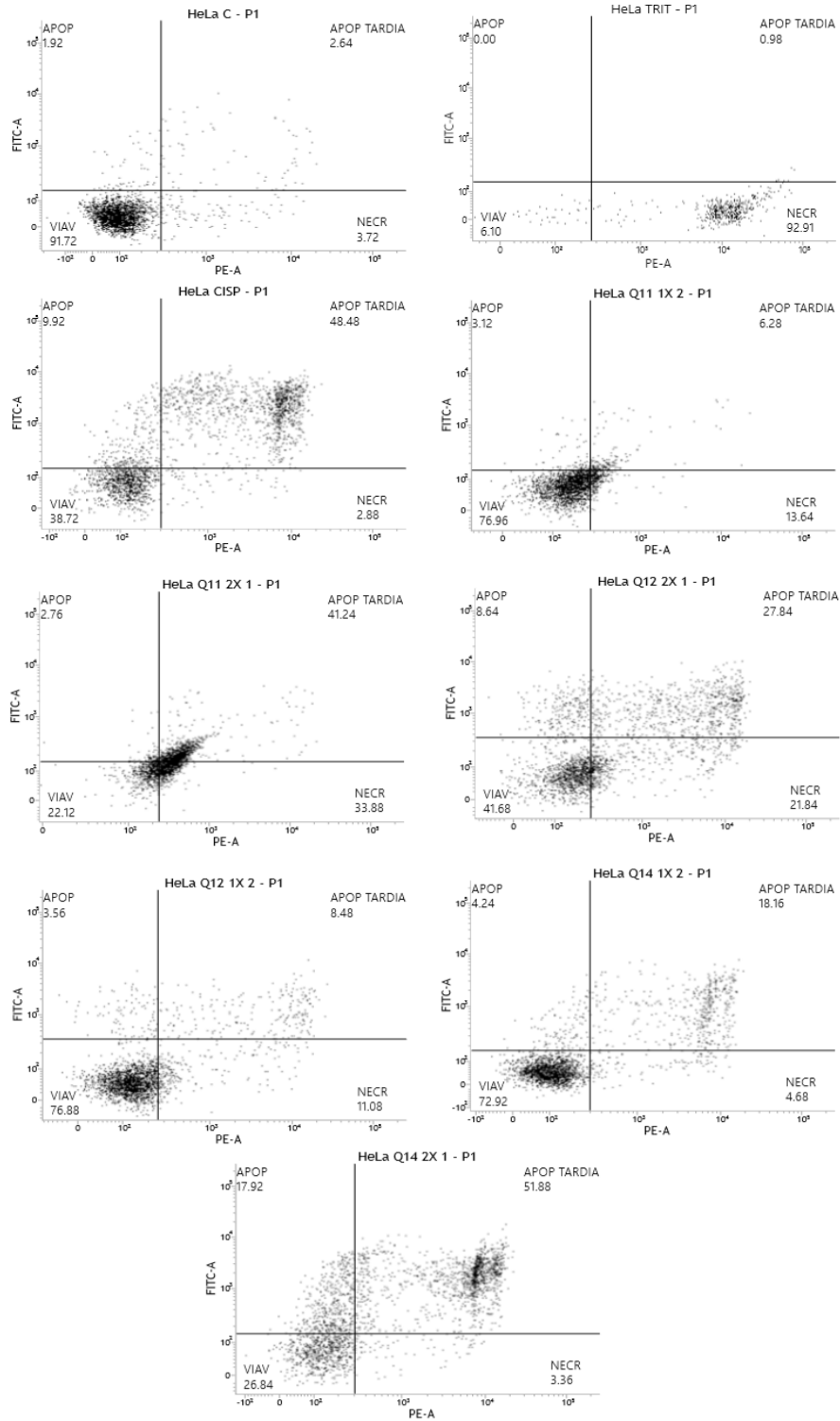


Figura 36. Histogramas que demonstram o perfil de morte celular causada pelas quinolinas.

5.1.2 Linhagem Me-180

Os resultados obtidos para a linhagem tumoral Me-180 (carcinoma epidermóide metastático cervical humano) demonstraram que as moléculas Q2, Q10 e Q13 não diferiram significativamente do controle negativo ($IC_{50} > 100 \mu M$), não demonstrando portanto atividade antitumoral significativa frente esta linhagem.

Já as quinolinas Q11, Q12, e Q14 apresentam uma significativa atividade citotóxica, as quais alcançaram IC_{50} de $46,90 \mu M$, $51,35 \mu M$ e $48,02 \mu M$ respectivamente conforme é possível observar na figura 37.

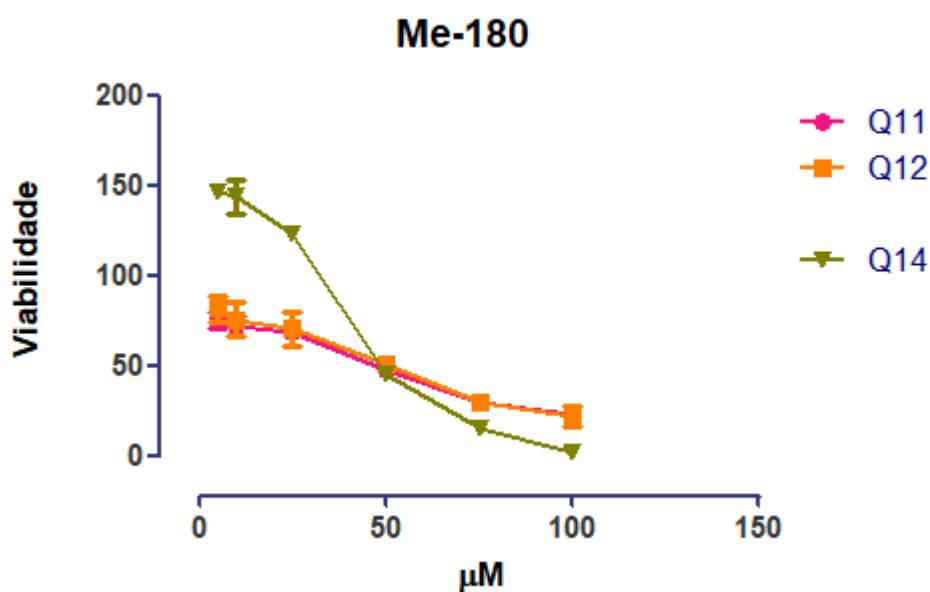


Figura 37. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem Me-180 sob tratamento de quinolinas.

Quanto a avaliação da eficácia a molécula Q14 alcançou o melhor resultado de inibição das células tumorais com um E_{max} de 1,8 %, ou seja, quase 98% de morte das células tumorais na maior concentração testada ($100 \mu M$). Quando é levado em consideração o E_{max} e a AUC as moléculas Q11 e Q12 alcançam resultados semelhantes com uma AUC significativamente menor que a Q14, embora esta última tenha alcançado melhor eficácia conforme demonstram a figura 38 e a tabela 16 abaixo.

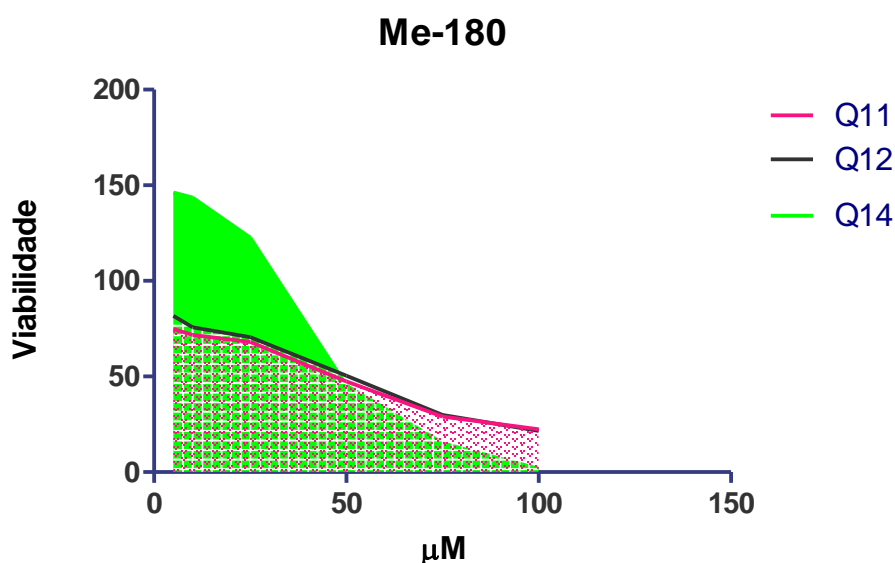


Figura 38. Gráfico indicador da área corresponde aos compostos mais ativos frente a linhagem Me-180.

Tabela 16. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem Me-180.

	Q11	Q12	Q14
IC₅₀ (μM)	46,90	51,35	48,02
E_{max} (% de viabilidade)	22,45	21,65	1,8
AUC	77,27	81,37	128,02

Os ensaios sobre o mecanismo de morte celular na linhagem Me-180 demonstraram, semelhantemente à linhagem Hela, que as quinolinas com atividade relevante levaram a morte celular majoritariamente através de apoptose como é possível observar na tabela 16 e nas figuras 37 e 38.

Desta forma, é importante destacar novamente a relevância dos resultados que demonstram um mecanismo de morte cuja busca é preferida em detrimento a outros mecanismo de morte como a necrose (GRIVICICH et al., 2007; ALBERTS et al., 2010).

Além disso outro aspecto interessante passível de destaque é a similaridade dos modos de morte encontrados e a atividade relevante das mesmas quinolinas para as linhagens Me-180 e Hela, cujas patologias são relacionadas.

Tabela 17. Avaliação do tipo de morte celular causado pelas quinolinas mais ativas frente a linhagem celular Me-180.

	Concentração	Viabilidade	Apoptose	Apoptose Tardia	Necrose
Controle		95,58%	1,62%	1,59%	2,65%
Triton		2,52%	0,03%	0,37%	97,17%
Cisplatin a		16,41%	3,55%	64,18%	19,50%
Q11	[46,90 μ M]	3,35%	0,02%	96,30%	2,24%
Q11	[93,80 μ M]	0,75%	0,07%	91,80%	7,39%
Q12	[51,35 μ M]	75,70%	0,92%	10,48%	12,90%
Q12	[102,70 μ M]	7,35%	0,26%	96,72%	3,10%
Q14	[48,02 μ M]	43,26%	6,87%	36,15%	6,57%
Q14	[96,04 μ M]	11,98%	4,13%	70,36%	10,97%

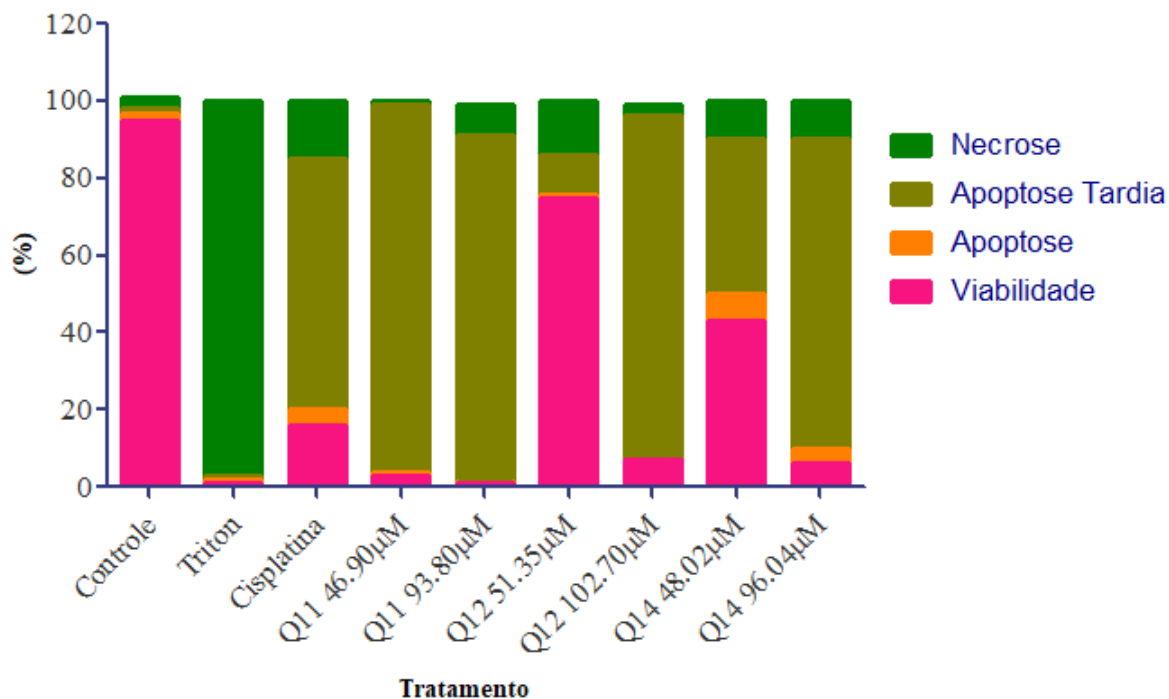


Figura 39. GRÁFICO que demonstra o perfil de morte celular das quinolinas avaliadas.

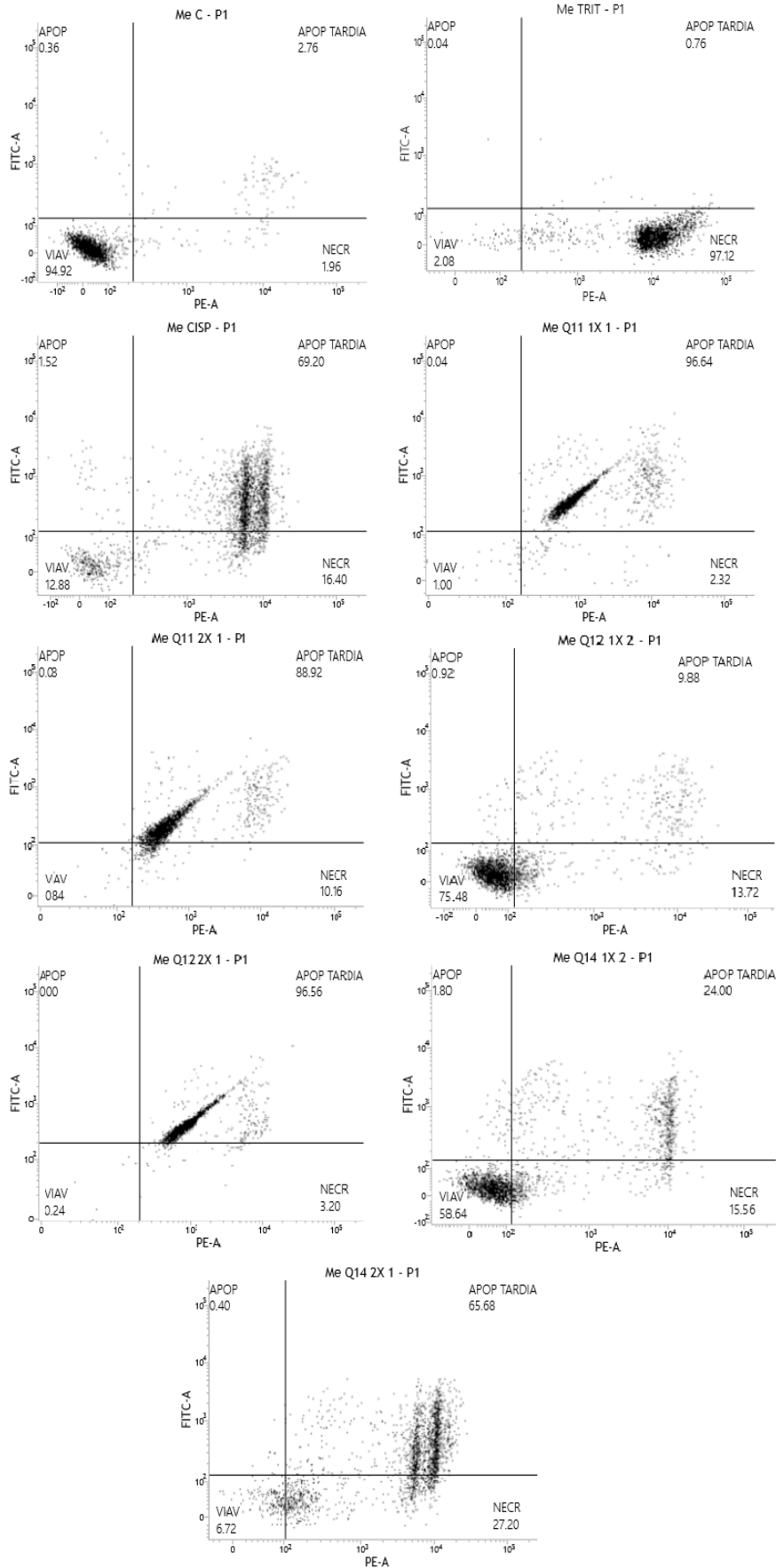


Figura 40. Histogramas que demonstram o perfil de morte celular causada

5.1.3 Linhagem K562

Os resultados obtidos para a linhagem tumoral K562 demonstraram que as moléculas Q2, Q10 e Q13 não diferiram significativamente do controle ($IC_{50} > 100 \mu M$), não demonstrando portanto atividade antitumoral significativa frente a esta linhagem.

Já as quinolinas Q11, Q12, e Q14 apresentam uma significativa atividade citotóxica, as quais alcançaram IC_{50} de $49,15 \mu M$, $23,40 \mu M$ e $41,62 \mu M$, respectivamente, conforme é possível observar na figura 41.

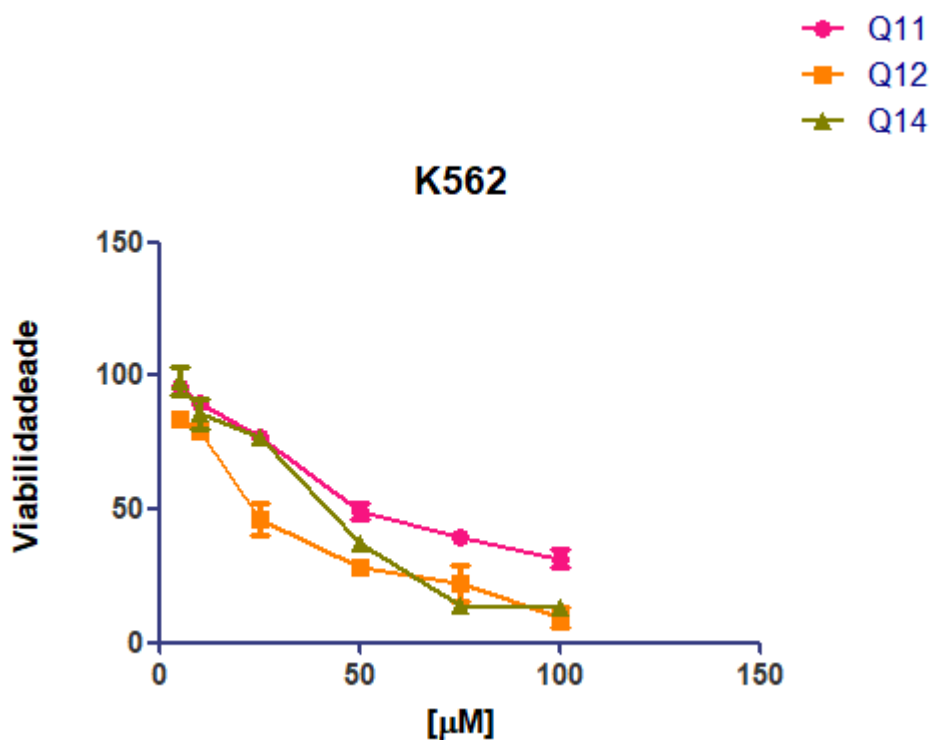


Figura 41. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem K562 sob tratamento de quinolinas.

Quando a atividade citotóxica é analisada observando-se o Emax e AUC, a molécula Q12 continua apresentando melhor desempenho, tendo em vista que sua efeito máximo apresenta quase 91% de citotoxicidade frente a linhagem tumoral na maior concentração testada ($100 \mu M$), além disso a AUC também foi a menos encontrada entre as 3 quinolinas mais ativas, demonstrando portanto uma melhor relação potência/eficácia conforme figura 42 e tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem K562.

	Q11	Q12	Q14
IC₅₀ (μM)	49,15	23,40	41,62
E_{max} (% de viabilidade)	31,54	9,47	12,88
AUC	92,29	67,27	83,39

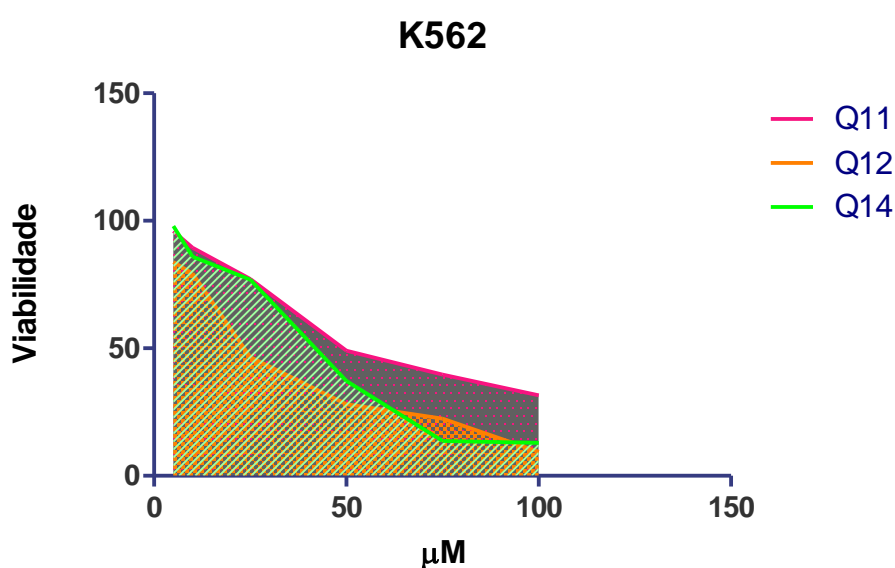


Figura 42. Gráfico com as curvas dose-resposta da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem K562.

Os ensaios sobre o modo de morte celular na linhagem K562 demonstraram que as quinolinas com atividade relevante levaram a morte celular tanto através de necrose quanto através de apoptose, como é possível observar na tabela 19 e nas figuras 43 e 44.

Desta forma, são necessários mais estudos investigativos, levando-se em consideração a discrepância entre a viabilidade celular demonstrada nos ensaios preliminares e estudos de modo de ação, especialmente nas quinolinas Q12 e Q14.

Outro ponto importante a ser observado é que o fármaco antitumoral utilizado como controle na indução de apoptose apresentou baixa citotoxicidade em comparação com as quinolinas Q11, Q12 e Q14. Este fato leva ao questionamento da efetividade deste padrão antitumoral ou ainda sobre buscar as razões não

evidentes destas incoerências. De qualquer forma mais estudos são necessários a fim de afirmar conclusivamente o correto mecanismo de ação das quinolinas avaliadas frente a esta linhagem.

Tabela 19. Avaliação do tipo de morte celular causado pelas quinolinas mais ativas frente a linhagem celular K562.

	Concentração	Viabilidade	Apoptose	Apoptose Tardia	Necrose
Controle		91,44%	3,40%	3,20%	1,96%
Triton		0,36%	0,00%	3,20%	99,32%
Imatinibe		72,16%	8,96%	7,80%	11,08%
Q11	[49,15 µM]	5,00%	0,08%	39,96%	54,96%
Q11	[98,30 µM]	0,66%	0,02%	90,46%	8,86%
Q12	[23,40 µM]	89,88%	0,96%	3,20%	5,96%
Q12	[46,80 µM]	82,36%	0,62%	4,52%	12,50%
Q14	[41,62 µM]	92,60%	0,16%	2,16%	5,08%
Q14	[83,24 µM]	75,90%	1,38%	7,46%	15,26%

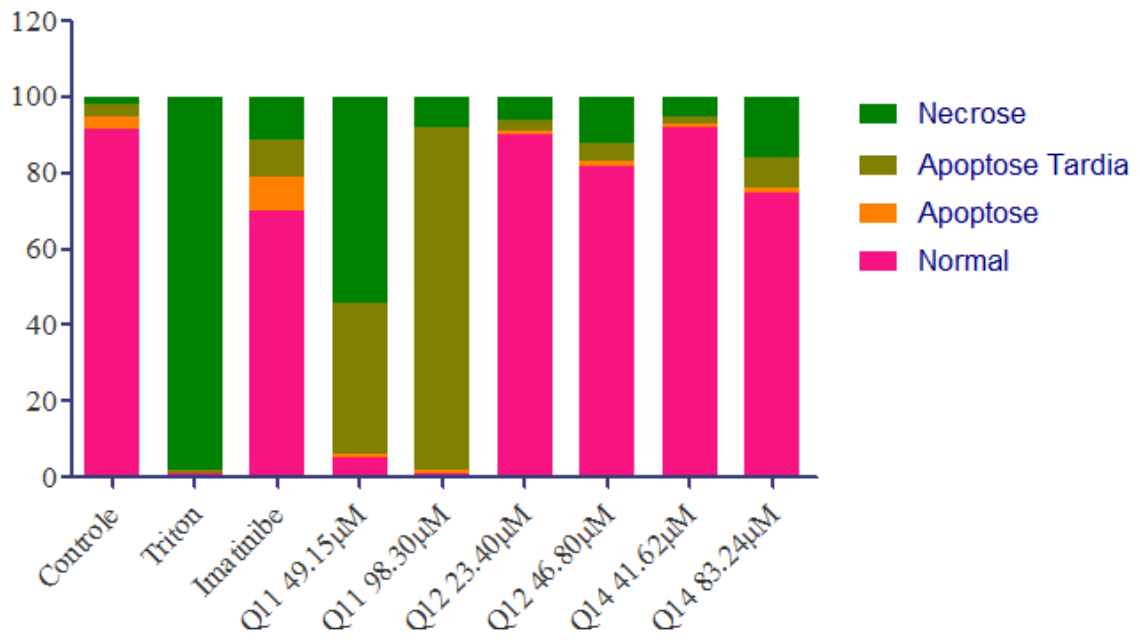


Figura 43. Gráfico que demonstra o perfil de morte celular das quinolinas avaliadas frente a linhagem K562.

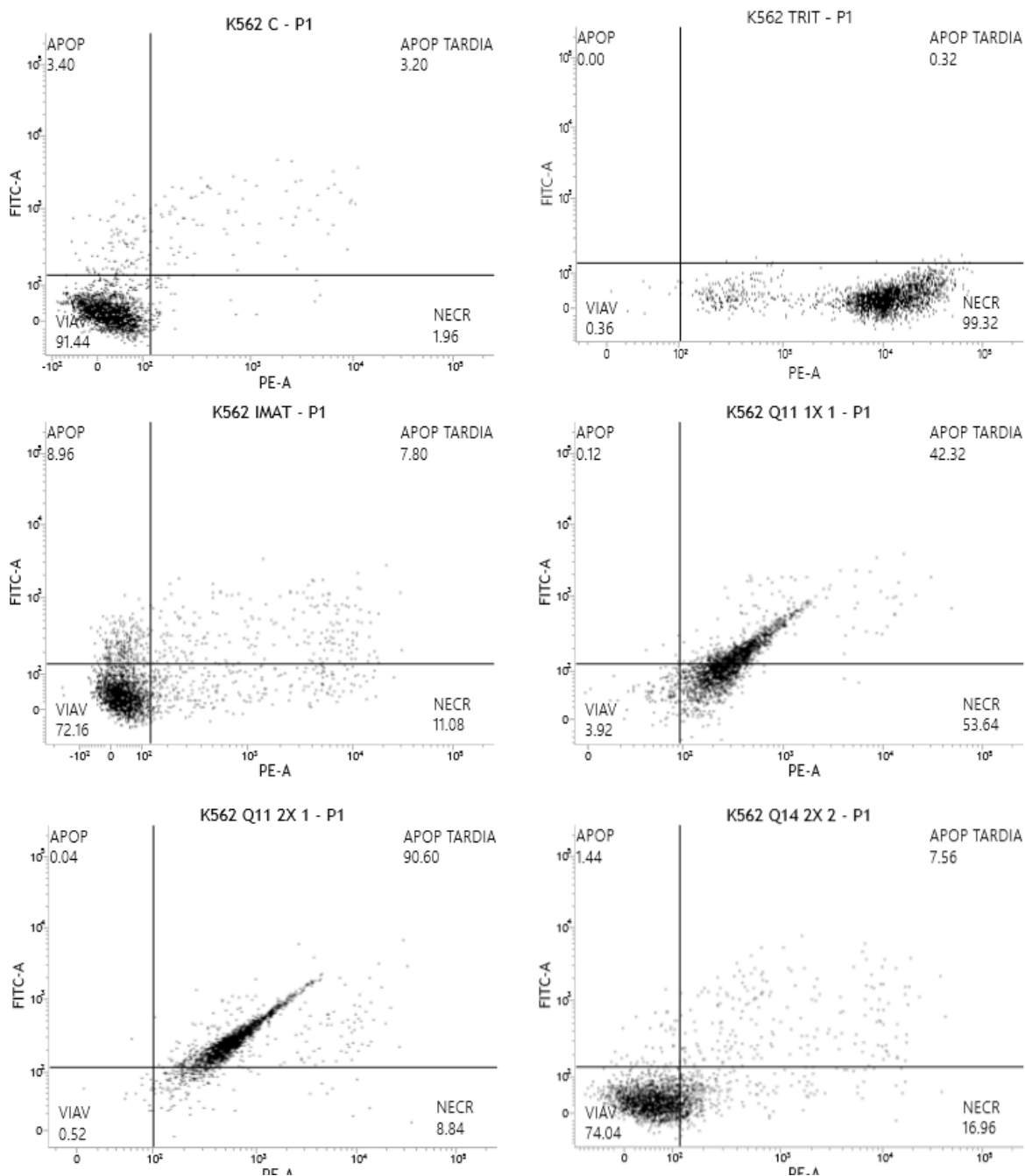


Figura 44. Histogramas que demonstram o perfil de morte celular causada pelas quinolinas na linhagem K562.

5.1.4 Linhagem B16F10

Os resultados obtidos para a linhagem tumoral B16F10 demonstraram que as moléculas Q2, Q10, Q13 e Q14 não obtiveram resultados significativos ($IC_{50} > 100 \mu M$) quando comparados ao controle, não demonstrando portanto atividade antitumoral significativa frente a esta linhagem. Já as quinolinas Q11, Q12,

apresentam uma melhor atividade citotóxica significativa, alcançando IC₅₀ de 20.94µM e 68,60µM, respectivamente, conforme é possível observar na figura 45.

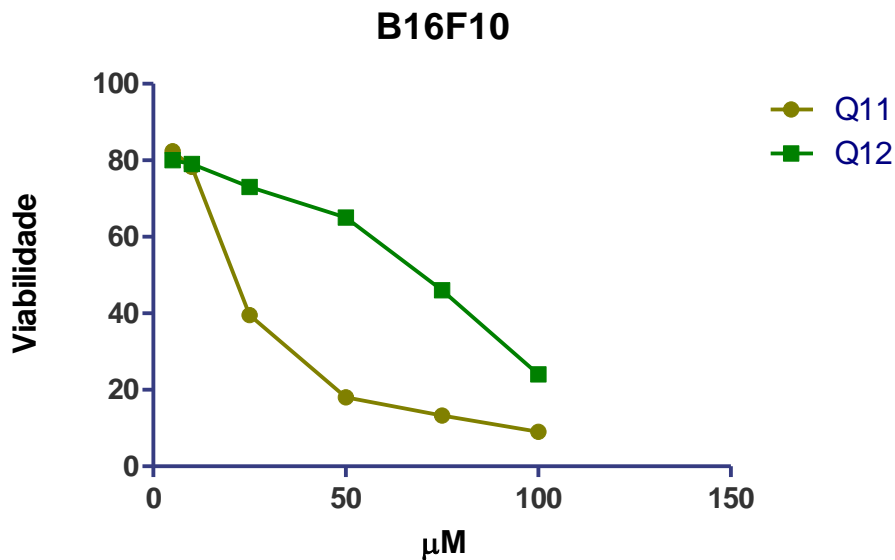


Figura 45. Curva dose resposta que a viabilidade celular da linhagem B16F10 sob tratamento de quinolinas.

Quanto a avaliação da eficácia através do Emax e AUC (figura 46 e tabela 20) a quinolina Q11 também alcançou melhores resultados levando a morte de mais de 90% das células tumorais na maior concentração testada, além de apresentar a menor AUC entre as 2 quinolinas.

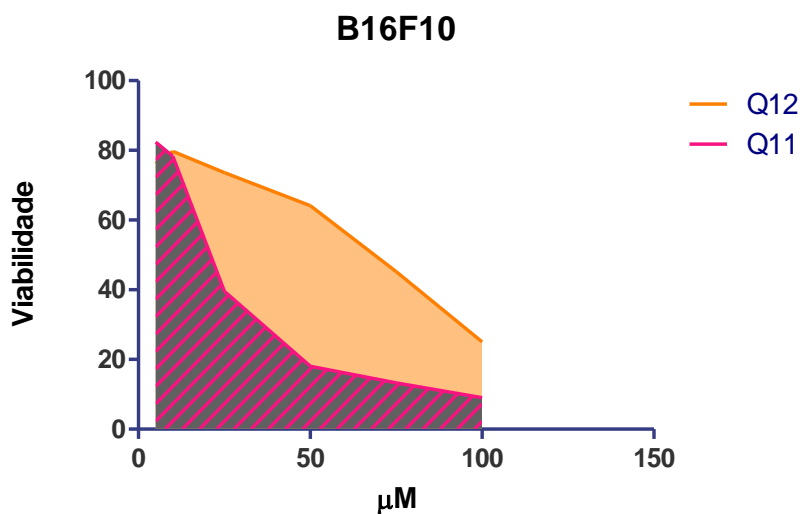


Figura 46. Gráfico com as curvas dose-resposta da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem B16F10.

Tabela 20. Parâmetros demonstrativos da atividade antitumoral das quinolinas mais ativas frente a linhagem B1610.

	Q11	Q12
IC ₅₀ (µM)	20,94	68,60
E _{max} (% de viabilidade)	9,01	25,01
AUC	60,45	88,74

A linhagem B16F10 não teve seu modo de morte estudado em virtude dos resultados que demonstraram uma menor atividade das quinolinas estudadas frente a esta linhagem no screening inicial.

5.1.5 Linhagem Vero

A viabilidade celular da linhagem Vero frente às 6 quinolinas em estudos foi analisada afim de conhecer a seletividade destes compostos quando comparamos células normais e sadias.

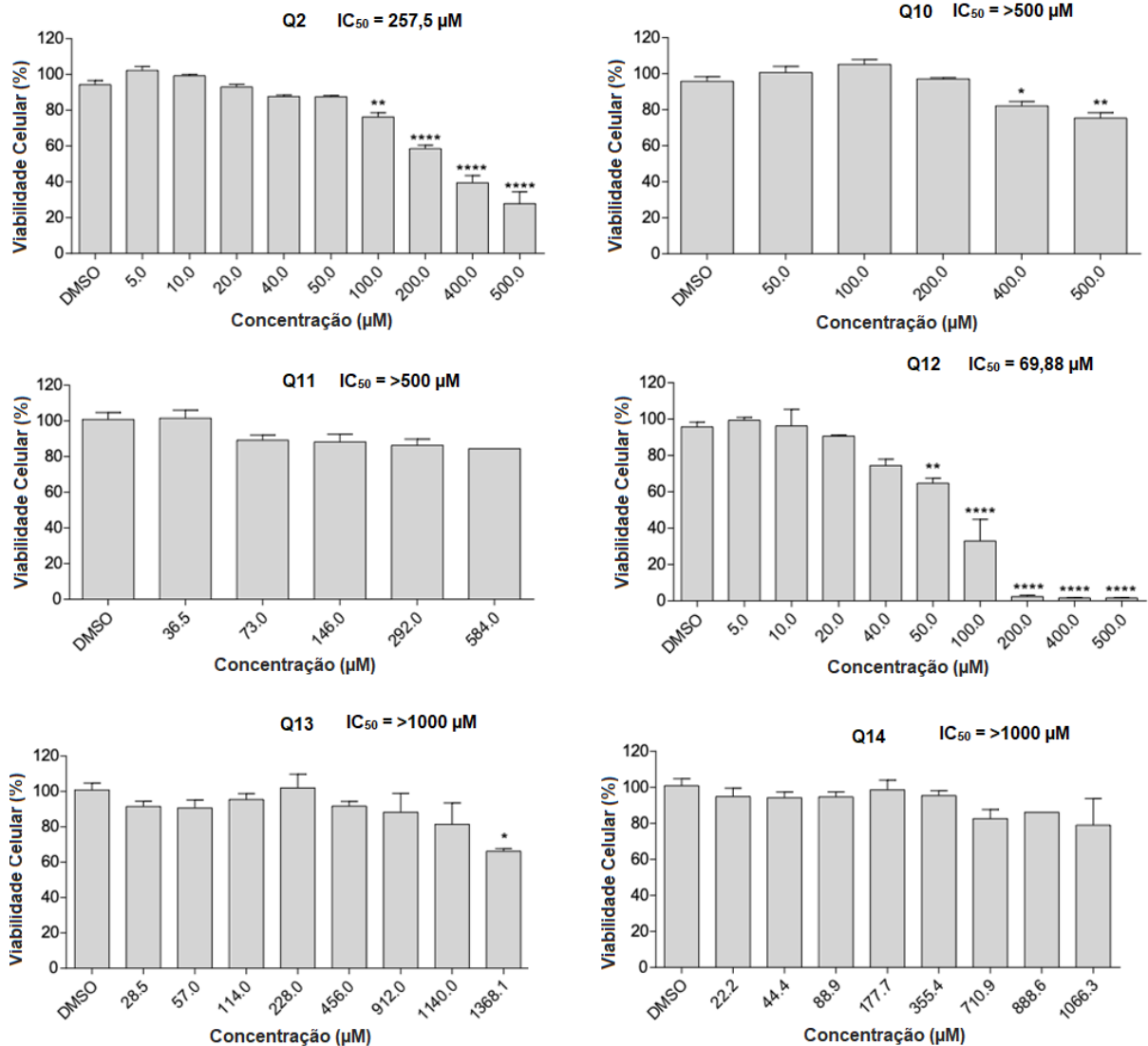


Figura 47. Gráficos que ilustram a dose-resposta da linhagem Vero frente as quinolinas estudadas.

Como é possível observar na figura 47, as quinolinas apresentaram baixa citotoxicidade frente a linhagem não tumoral Vero. Os IC₅₀ encontrados variaram de 69,88µM (Q12) até superior a 1000 µM (Q13 e Q14). Tais resultados podem ser considerados muito positivos quando comparamos a atividade citotóxica das quinolinas nas linhagens tumorais, indicando uma seletividade para as células tumorais.

5.1.6 Cálculo do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) foi calculado através da razão entre as atividades frente a linhagem não tumoral e tumorais. Como é possível observar na tabela 21, as quinolinas avaliadas apresentaram elevados IS, fato este que indica segurança e seletividade de toxicidade para linhagens tumorais.

O valor absoluto do IS encontrado para as quinolinas variou de 1,01 até $\geq 33,05$, onde 1 significa que a molécula testada tem igual preferência pela linhagem tumoral quanto pela não tumoral (Vero). Ainda neste sentido, um IS de 33,05 significa que a quinolina em questão é 33,05 mais seletiva para a linhagem tumoral, alcançando alta seletividade.

É importante destacar que a molécula Q12 apresenta uma seletividade baixa quando comparada as outras quinolinas. Apesar desta molécula demonstrar nos estudos anteriormente descritos neste trabalho boa atividade citotóxica frente a linhagens tumorais, quando foi analisada a seletividade frente a células não tumorais esta quinolina está em desvantagem comparada às demais.

Tabela 21. Índice de seletividade das quinolinas testadas.

	Vero - IC ₅₀	Hela	Me-180	K562	B16
Índice de seletividade					
Q2	257,5 μ M	$\leq 2,57$	$\leq 2,57$	$\leq 2,57$	$\leq 2,57$
Q10	>500 μ M	≤ 5	≤ 5	≤ 5	≤ 5
Q11	>500 μ M	$\geq 33,05$	$\geq 10,66$	$\geq 10,17$	$\geq 23,87$
Q12	69,88 μ M	2,76	1,36	2,98	1,01
Q13	>1000 μ M	≤ 10	≤ 10	≤ 10	$\leq 6,66$
Q14	>1000 μ M	$\geq 22,40$	$\geq 20,80$	$\geq 24,02$	≤ 10

5.2 Parâmetros *in silico* ADMET

O cálculo de parâmetros ADMET *in silico* através de ferramentas digitais é uma estratégia difundida e recomendada a fim de acelerar o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Neste trabalho, foi realizada a predição *in silico* de diversos parâmetros ADMET das 6 quinolinas avaliadas anteriormente frente a atividade citotóxica em linhagens celulares tumorais.

Diversos pesquisadores trabalham no estudo da relação entre os parâmetros ADMET e eficiência no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Um dos pesquisadores mais conhecidos nesta área é Christopher A. Lipinski, que estabeleceu uma relação entre as propriedades físico-químicas de fármacos e sua biodisponibilidade oral a famosa “Rule of 5”. Neste contexto, uma molécula pode apresentar apenas 1 violação a um destes parâmetros para ser considerado um bom candidato a fármaco (LIPINSKI et al., 1997, 2001).

Como é possível observar na tabela 22, das 6 quinolinas avaliadas nenhuma demonstra apresentar violações às regras de Lipinski, estando dentro dos limites aceitáveis para um bom candidato a fármaco. Com base nesses resultados é possível prever que as quinolinas em estudo apresentam boa disponibilidade oral, fato este que é muito positivo em terapias antitumorais (FERNANDES, 2017).

Tabela 22. Parâmetros ADMET calculados *in silico* para as quinolinas estudadas.

	Q2	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14
PM	220,09	143,0	171,10	247,14	219,10	281,36
LogP	3,08	2,45	3,09	4,29	3,84	4,87
HBA	1	1	1	1	1	1
HBD	0	0	0	0	0	0
LR	0	0	1	3	1	2
PSA (Å²)	12,89	12,89	12,89	12,89	12,89	12,89
LogS	-3.25	-2.51	-3.34	-4.81	-4.20	-5.51
LogD	3,03	2,26	3,21	4,79	3,91	5,81
%ABS	>100	>100	>100	>100	>100	>100
BHE	+	+	+	+	+	-
S-GP	-	-	-	-	-	+
LogKp	-5,31	-5,33	-4,94	-4,39	-4,64	-4,13

Onde LR = n° de ligações rotacionáveis (<10). PM = peso molecular < 500. Log P (<5,0). HBA = n° de aceptores de ligação de hidrogênio (<10). HBD n° de doadores de ligação de hidrogênio (<5). PSA = área superficial polar (Å²) <140. Log S (> -4). Log D (pH = 7,4). BHE = Permeação da barreira hemato

encefálica. S-GP = substrato da glicoproteína P. LogKp = logaritmo da permeabilidade cutânea. Parâmetros calculados através de plataforma online SwissADME.

Ainda avaliando a tabela 21, outros fatores simulados *in silico* corroboram com a predição de que as quinolinas em estudo possam apresentar boa disponibilidade oral. A área superficial polar (PSA) é um dos fatores importantes nesta discussão e conforme dados da tabela 21 as quinolinas em estudo estão dentro dos parâmetros desejados neste quesito.

Os fatores como lipofilicidade e solubilidade aquosa também foram preditos *in silico* para as quinolinas em estudo. De um modo geral, todas as 6 quinolinas apresentam LogP compatível com uma boa biodisponibilidade oral, destacando-se a molécula Q14 considerada a mais lipossolúvel. Ainda neste sentido, a predição do LogS também corrobora com a afirmação de boa disponibilidade oral das quinolinas.

O percentual de absorção oral (%ABS) foi calculado através de uma equação simples onde $\%ABS = 109 - (0,345 \times PSA)$ (ZAHEER et al., 2016). A partir deste cálculo todas as 6 quinolinas apresentam o %ABS >100, dados que corroboram novamente com os parâmetros já avaliados.

Na simulação *in silico* da permeação da barreira hemato-encefálica (BHE), todas as quinolinas exceto a Q14, foram descritas como capazes de permear BHE, um fator muito significativo quando se estuda a seletividade de alvos ou para o desenvolvimento de fármacos para o sistema nervoso central (SNC). Da mesma forma, na avaliação da ligação com GP, todas as quinolinas exceto a Q14, foram descritas como não-substrato da GP, a qual esta diretamente envolvida em processos de resistência medicamentosa (figura 48). Este é, portanto, um fator positivo em relação a estas moléculas, no âmbito de permeabilidade celular (Azeredo 2009 e Huber 2010).

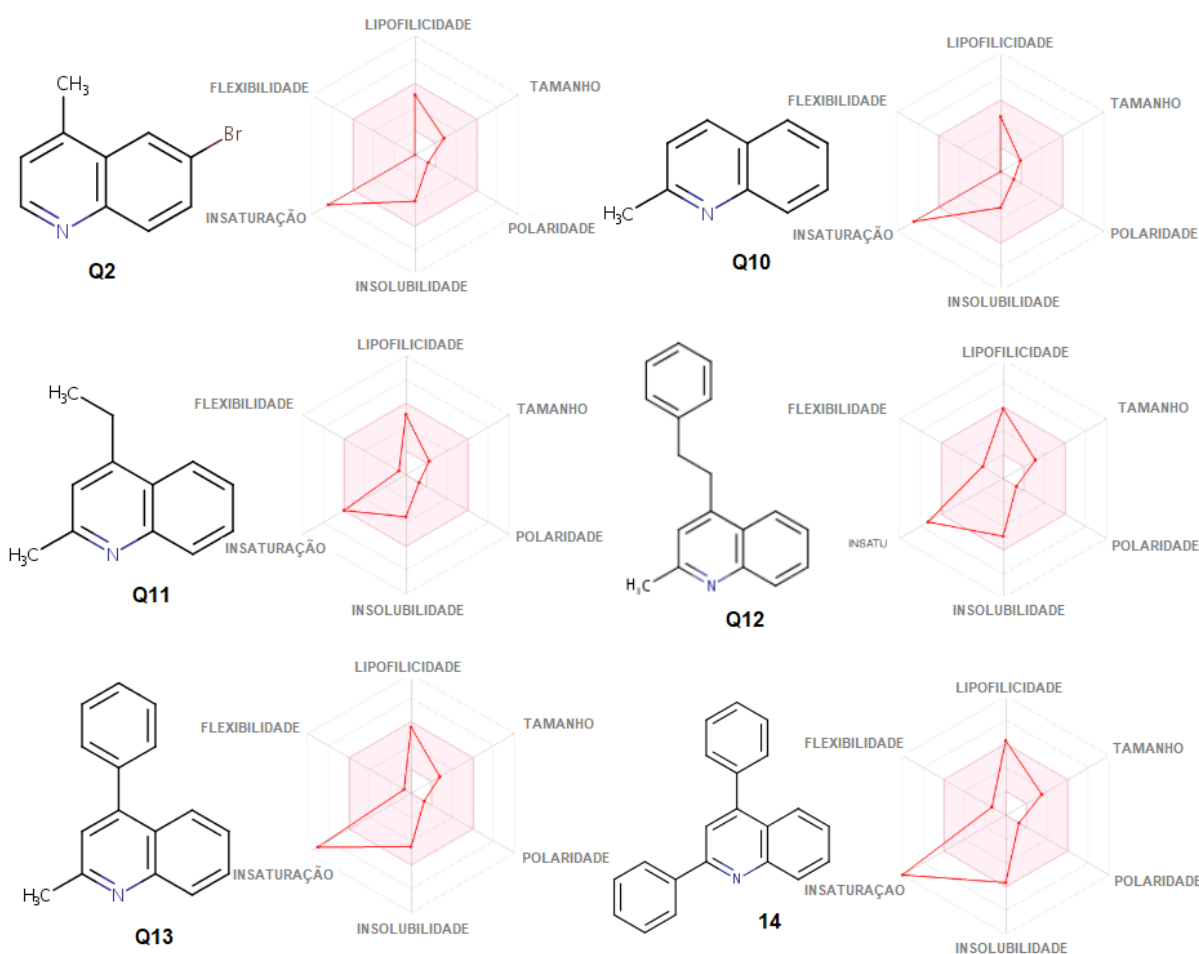


Figura 48. Esquema demonstrativo das propriedades ADMET das quinolinas avaliadas. A área rosa representa a faixa ótima para cada propriedade (lipofilicidade: LogP entre -0,7 e +5,0, tamanho: PM entre 150 e 500 g/mol, polaridade: PSA entre 20 e 130 Å², solubilidade: LogS não maior que 6, saturação: fração de carbonos na hibridação sp³ não inferior a 0,25 e flexibilidade: não mais do que 9 ligações rotáveis. Parâmetros calculados através de plataforma online SwissADME.

Além disso, na figura 49 está demonstrado um diagrama chamado em inglês de “BOILED-Egg”, o qual consiste principalmente em um método intuitivo para prever simultaneamente dois parâmetros chave de ADMET, isto é, a absorção gastrointestinal passiva (HIA) e permeação cerebral (BBB). Embora, conceitualmente, muito simples, por depender apenas de dois descritores físico-químicos (LogP e PSA, por lipofilicidade e aparente polaridade), esse modelo de classificação foi construído com extremo cuidado quanto à significância estatística e robustez (referencia swissADME).

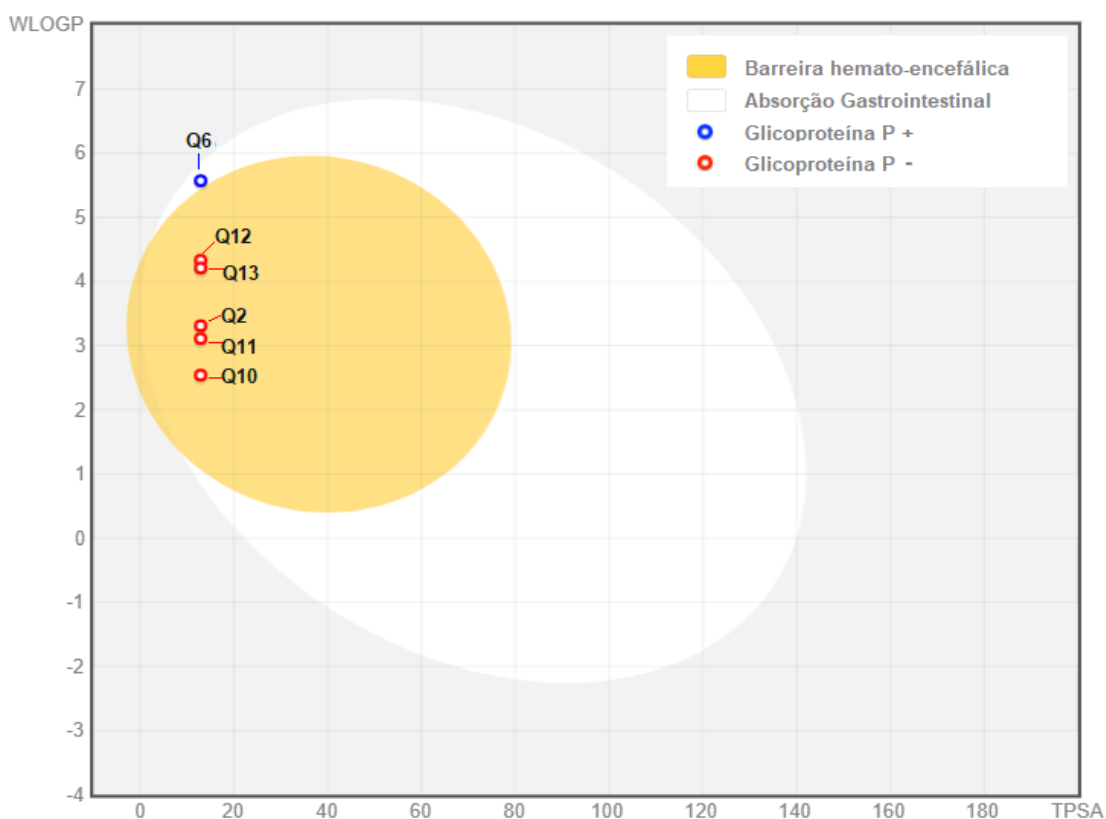


Figura 49. Diagrama BOILED-Egg Parâmetros calculados através de plataforma online SwissADME.

Conforme está mostrado na figura 49 o diagrama de classificação em forma de ovo inclui a gema (isto é, o espaço físico-químico para permeação BHE altamente provável) e o branco (isto é, o espaço físico-químico para uma absorção de HIA altamente provável). Ambos os compartimentos não são mutuamente exclusivos e a região cinzenta exterior representa moléculas com propriedades que implicam baixa absorção prevista e penetração cerebral limitada.

Na avaliação das quinolinas pelo diagrama BOILED-Egg (figura 49) foi possível fazer uma interpretação a respeito da absorção passiva (dentro / fora do branco), acesso cerebral passivo (dentro / fora da gema) e efluxo ativo do SNC ou do lúmen gastrointestinal por coloração codificação: pontos azuis para substratos da GP (PGP+) e pontos vermelhos para o não-substrato da GP (PGP-). Todas as quinolinas, exceto a Q14, encontram-se localizadas nas áreas correspondentes a ótimas absorções intestinais, permeação da BHE e como não substratos da GP.

Além disso, foram calculados *in silico* alguns parâmetros preditivos de toxicidade utilizando o software DataWarrior®. Nesta simulação os valores das

DL₅₀ encontrados correspondem a moléculas com baixa toxicidade, sendo superiores a 1000mg/kg, sendo classificados toxicologicamente como classe 4, onde numa escala de 1-5, 5 corresponde a menor toxicidade conforme tabela 23.

Quanto aos efeitos mutagênico, cancerígeno, irritante e toxicidade reprodutiva, nenhuma quinolina avaliada apresentou correlação com estes fatos, exceto a quinolina Q10, a qual teve alta correlação como mutagênica e irritante conforme tabela 23. Tais resultados corroboram com os resultados *in vitro* já descrito nos itens anteriores quanto a citotoxicidade em células não tumorais e altos IS alcançados.

Tabela 23. Tabela com os valores preditivos de parâmetros toxicológicos calculados *in silico*.

	DL ₅₀ mg/kg	Classe Toxicológica	Mutagênico	Tumorogênico	Irritante	Toxicidade Reprodutiva
Q2	1230	4	N	N	N	N
Q10	1230	4	Alta	N	Alta	N
Q11	1020	4	N	N	N	N
Q12	1020	4	N	N	N	N
Q13	1230	4	N	N	N	N
Q14	1000	4	N	N	N	N

Onde DL₅₀ corresponde a dose letal para 50% dos indivíduos expostos. N = negativo. Obtidos através do software DataWarrior®.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que as quinolinas estudadas apresentam boa atividade antitumoral, levando-se em consideração a potência e eficiência das moléculas testadas. Além disso nos estudos de mecanismo de morte, a maioria das moléculas induziu a morte celular majoritariamente através de apoptose. É possível destacar as quinolinas Q11 e Q12 quanto a atividade citotóxica frente as linhagens tumorais e ótimos índices de seletividade superiores a 10 para Q11 e entre 1,5-3 para a Q12. Quanto aos valores ADMET, as simulações *in silico* demonstraram que a maioria das quinolinas em estudo tem grande probabilidade de biodisponibilidade oral, permeação da barreira hemato-encefálica sem ser substrato para glicoproteína-P, o que representa características muito desejáveis. Por fim, pode-se dizer que as quinolinas em estudo são muito promissoras quanto a atividade antitumoral, embora sejam necessários mais estudos a fim de finalizar os estudo de mecanismo de ação e relação da estrutura química com a atividade biológica (REA).

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

1 INTRODUÇÃO

O reino fungi compreende a um conjunto de organismo uni e pluricelulares que convivem com plantas, animais e em especial com os seres humanos há milhares de anos. Muitas espécies fúngicas são de interesse econômico, cultural e medicinal como fonte de diversos recursos para a humanidade e o meio ambiente em equilíbrio.

No entanto, cerca de 300 espécies de fungos podem causar infecções em seres humanos , das quais 30 espécies são as mais recorrentes ao causar patologias. As infecções fúngicas podem ser consideradas um problema de saúde pública mundial levando-se em consideração a ampla abrangência, prejuízos econômicos e dificuldades de tratamento.

Ao longo dos anos, o número de infecções graves causadas por fungos tem aumentado, enquanto o arsenal terapêutico disponível não é considerado vasto, além da demora em desenvolver e colocar no mercado novos fármacos antifúngicos. Soma-se a isso o inconveniente fato da resistência desenvolvida por diversos organismos fúngicos aos fármacos atualmente disponíveis na terapêutica, tornando o tratamento ainda mais difícil e ineficaz.

Outro fato relevante sobre as infecções fúngicas é que as mesmas podem ser consideradas também como doenças negligenciadas devido a sua alta prevalência em regiões pouco desenvolvidas socio-economicamente no planeta. Este triste fato piora ainda mais a atual situação das doenças fúngicas pois soma as dificuldades já encontradas no tratamento usual com as dificuldades de recursos básicos como diagnóstico precoce e acesso ao tratamento adequado.

Neste sentido, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos é de extrema relevância à saúde pública mundial e brasileira. Com base nessas informações, este trabalho buscou desenvolver novas moléculas, quinolinas, que possam tratar diferentes infecções fúngicas.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de quinolinas frente a cepas de dermatófilos e leveduras.

2.1 Objetivos específicos

- Fazer o *screening* da atividade antifúngica das quinolinas Q2, Q10, Q11, Q12, Q13 e Q14 frente 4 cepas de leveduras e 4 cepas de dermatófilos;
- Avaliar a atividade citotóxica das quinolinas frente a linhagem celular Vero;
- Calcular o índice de seletividade das 6 quinolinas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Infecções fúngicas

Os fungos são microrganismos uni ou pluricelulares com características peculiares às plantas, animais, bactérias e vírus. Ao longo dos anos os fungos já tiveram diversas classificações e atualmente são agrupados em um reino à parte, o reino Fungi. Os fungos existem na terra há milhões de anos e convivem com os humanos ao longo da sua história. Existem aproximadamente 2 milhões de espécies diferentes de fungos na Terra que vivem ao ar livre no solo, em plantas, árvores, animais, mamíferos, bem como em muitas superfícies internas e na pele humana (HIBBETT et al., 2007; MCCONNAUGHEY, 2014; MONEY, 2016).

Ao longo da história os fungos tem sido utilizados e manipulados em diversas atividades como culinária, agricultura e na medicina popular. Alguns destes microorganismo possuem metabólitos secundários de extrema relevância para a humanidade, como os que são fontes de antibióticos e antitumorais (KAVANAGH, 2005). No entanto, algumas espécies de fungos podem tornar-se patogênicas tanto para humanos como para animais e plantas. Estima-se que 270.000 espécies de fungos estão associadas a doenças vegetais e cerca de 300 são conhecidas por infectar humanos, também chamadas de micoses (KAVANAGH, 2005).

Os fungos são, atualmente, os agentes causadores de bilhões de infecções em todo o mundo, resultando em aproximadamente 1,5 milhões de mortes por ano. Neste grupo, 25 milhões de pessoas estão sob risco de morte ou perda de visão. As estimativas mais recentes – consideradas subestimadas – sugerem que haja 1,6 milhão de mortes humanas por ano em decorrência de micoses graves. (GIACOMAZZI et al., 2016; “Stop neglecting fungi,” 2017; CDC, 2018; REVIE et al., 2018).

No Brasil, estimativas de 2016 sugerem que mais de 3,8 milhões de indivíduos sofreram de alguma doença fúngica grave. Além disso, as doenças fúngicas no Brasil representam um sério problema econômico. Segundo estudo da Universidade Federal do Paraná publicado em junho de 2018, o custo do tratamento de doenças fúngicas pode superar R\$ 400 mil por paciente (SANGLARD, 2016; GIACOMAZZI et al., 2016; CDC, 2018; BORBA et al., 2018).

Espécies de *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* são as agentes causadores predominantes de infecções fúngicas em humanos, representando mais de 90% dos de mortes por micose. *Candida albicans* é um membro natural da microbiota da mucosa humana, mas nos últimas décadas também serviu como o principal agente causador de infecções invasivas com risco de vida na América do Norte e na Europa, com taxas de mortalidade próximas a 40%, apesar do tratamento.

Houve também um forte aumento nas infecções causadas por espécies de *Candida* que são intrinsecamente resistente aos antifúngicos azólicos (classe a ser discutida a seguir), incluindo *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida auris*.

A Criptococose que é uma doença causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, tem infectado mais de 1 milhão de pessoas anualmente, com altas taxas de mortalidades nos países em desenvolvimento, além de apresentar resistência a mais nova classe de antifúngicos: as equinocandinas (discutidas a seguir), limitando, assim, as opções terapêuticas (ROBBINS et al., 2017; REVIE et al., 2018).

Por fim, a espécie fúngica *Aspergillus fumigatus* é uma causa significativa de infecção para indivíduos submetidos a transplante e aqueles pacientes que sofrem de neutropenia. Mais de 200.000 casos de aspergilose invasiva são relatados a cada ano, com altíssimas taxas de mortalidade, caso não sejam tratadas. (ROBBINS et al., 2017; REVIE et al., 2018).

Por outro lado, a descoberta da penicilina em 1929 e o desenvolvimento dos primeiros agentes antifúngicos nistatina e anfotericina B na década de 1950 possibilitaram o controle de doenças infecciosas pela primeira vez na história. A capacidade de tratar infecções causadas por microorganismos patogênicos foi revolucionária na prática médica e trouxe muitos benefícios aos pacientes. Contudo, nas últimas décadas, cepas patogênicas de fungos apresentaram resistência à maioria, ou a todos, antimicrobianos disponíveis, dificultando o controle eficaz das infecções fúngicas e criando uma necessidade urgente de novos tratamentos para estas doenças (PERLIN et al., 2017; ROBBINS et al., 2017; REVIE et al., 2018).

Além disso, muitas pessoas em risco e sofrendo de doenças fúngicas vivem em locais com recursos limitados, onde o diagnóstico e o tratamento dessas infecções podem ser desafiadores. Essas áreas do mundo muitas vezes carecem da infraestrutura laboratorial necessária para diagnosticar doenças fúngicas, e a disponibilidade limitada de medicamentos antifúngicos significa que alguns pacientes

que têm doenças fúngicas não são capazes de receber os tratamentos necessários(NUCCI; MARR, 2005; “Stop neglecting fungi,” 2017; CDC, 2018).

Considerando os dados apresentados acima para prevalência das doenças fúngicas, fica clara a necessidade de investimentos na geração de ferramentas que permitam diagnóstico, tratamento e prevenção eficientes para as doenças causadas por fungos. Esta necessidade é particularmente aguda para a terapêutica antifúngica, uma vez que atualmente existem apenas poucas classes de medicamentos aprovados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Essa escassez de antimicrobianos exige um esforço concertado para a descoberta de novas terapias para doenças infecciosas.

3.1.1 Infecções fúngicas superficiais

A literatura científica relata que infecções fúngicas superficiais em humanos são muito comuns, podendo afetar 25% da população mundial (~1,7 bilhão de pessoas) em algum momento da vida. Infecções fúngicas nas unhas e cabelos são causadas principalmente por fungos dermatófitos, os quais originam condições patológicas bem conhecidas, como pé de atleta, micose do couro cabeludo e infecção das unhas(BROWN et al., 2012; TABANA et al., 2017).

Infecções da mucosa oral e tratos genitais também são comuns, especialmente candidíase vulvovaginal(ou sapinho). De fato, 50 a 75% das mulheres em idade fértil sofrem de pelo menos um episódio de vulvovaginite e 5 a 8% (~ 75 milhões mulheres) têm pelo menos quatro episódios por ano. As infecções orais também são comuns em bebês, usuário de próteses, usuários de corticóides sistêmicos, transplantados, pacientes com HIV/AIDS ou imunossuprimidos por outras causas. Essas infecções superficiais são causadas com mais frequência por várias espécies de *Candida*, que é o segundo mais numeroso agente de infecção fúngica em todo o mundo(NUCCI; MARR, 2005; BROWN et al., 2012; TABANA et al., 2017).

3.1.2 Infecções fúngicas invasivas

Infecções fúngicas invasivas têm uma incidência muito menor que infecções superficiais, mas as doenças invasivas são mais preocupantes levando-se em consideração as taxas de mortalidade altas. Muitas espécies de fungos são responsáveis por infecções invasivas, as quais matam cerca de um milhão e meio de pessoas todos os anos (NUCCI; MARR, 2005; BROWN et al., 2012; TABANA et al., 2017).

Os principais gêneros envolvidos nas infecções fúngicas sistêmicas são os *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus*. No entanto, dados epidemiológicos para infecções fúngicas são notoriamente pobres porque infecções fúngicas podem frequentemente ser diagnosticadas erroneamente ou ainda não notificadas (NUCCI; MARR, 2005; BROWN et al., 2012; TABANA et al., 2017).

3.1.3 Fármacos antifúngicos

A disponibilidade e variedade de fármacos antifúngicos pode ser considerada limitada quando comparada a outras classes terapêuticas no âmbito da química medicinal. Atualmente, os fármacos antifúngicos disponíveis na clínica médica concentram-se basicamente em algumas poucas classes como os polienos, equinocandinas, azólicos e alilaminas conforme serão descritos a seguir (SANGLARD, 2016).

3.1.3.1 Polienos

Os polienos são compostos macrocíclicos que contêm várias ligações duplas conjugadas e regiões lipofílicas e hidrofílicas distintas - contendo carbonilas, hidroxilas e açúcares. A nistatina e anfotericina B (figura 50) são os exemplos mais conhecidos desta classe. Desde sua descoberta na década de 1950, os polienos têm sido empregados como importantes agentes fungicidas contra várias espécies de *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* (MCCARTHY et al., 2017; REVIE et al., 2018).

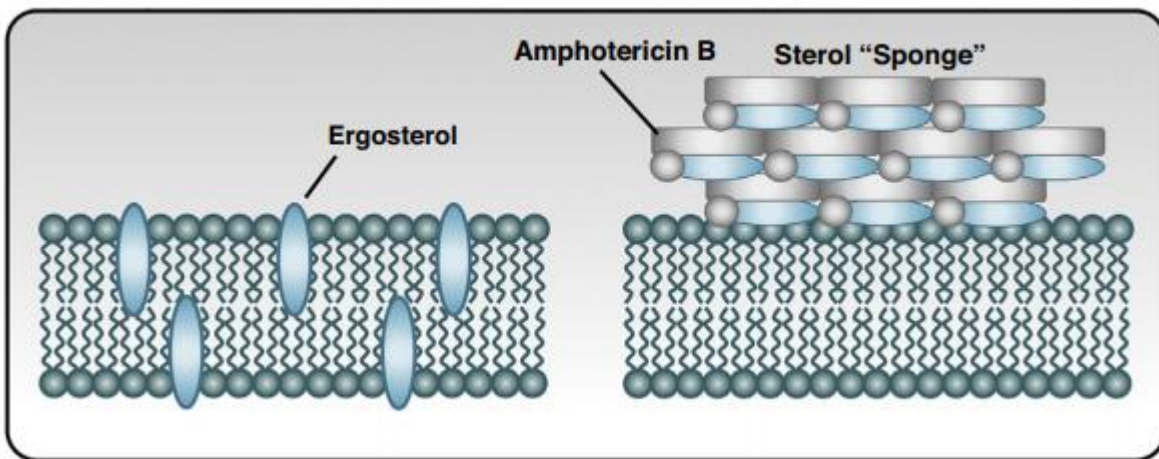


Figura 51. Mecanismo de ação dos antifúngicos polienos. adaptado de Revie e colaboradores, 2018

A resistência clínica aos polienos é extremamente rara, no entanto são relatados efeitos tóxicos no hospedeiro, devido à similaridade do ergosterol (fungos) e o colesterol nas membranas dos mamíferos, tendo em vista que a região lipofílica dos polienos interage com os esteróis via interações hidrofóbicas. Além disso, fármacos desta classe, normalmente, não são absorvidos quando administrados por via oral, por isso são usados para tratar infecções fúngicas do trato gastrointestinal, como candidíase oral. Para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, precisam ser administradas por via intravenosa (MCCARTHY et al., 2017; REVIE et al., 2018).

3.1.3.2 Equinocandinas

A mais recente classe de antifúngicos a chegar na clínica médica são as equinocandinas, que incluem a micafungina, caspofungina e anidulafungina (figura 52). As equinocandinas são grandes moléculas lipopeptídicas semi-sintéticas que inibem não competitivamente a síntese dos principais biopolímeros (inibindo a β -D-Glucano sintase) da parede celular, resultando na perda da integridade da mesma e conferindo stress à parede celular no fungo conforme figura 53 que ilustra este mecanismo de ação (REVIE et al., 2018).

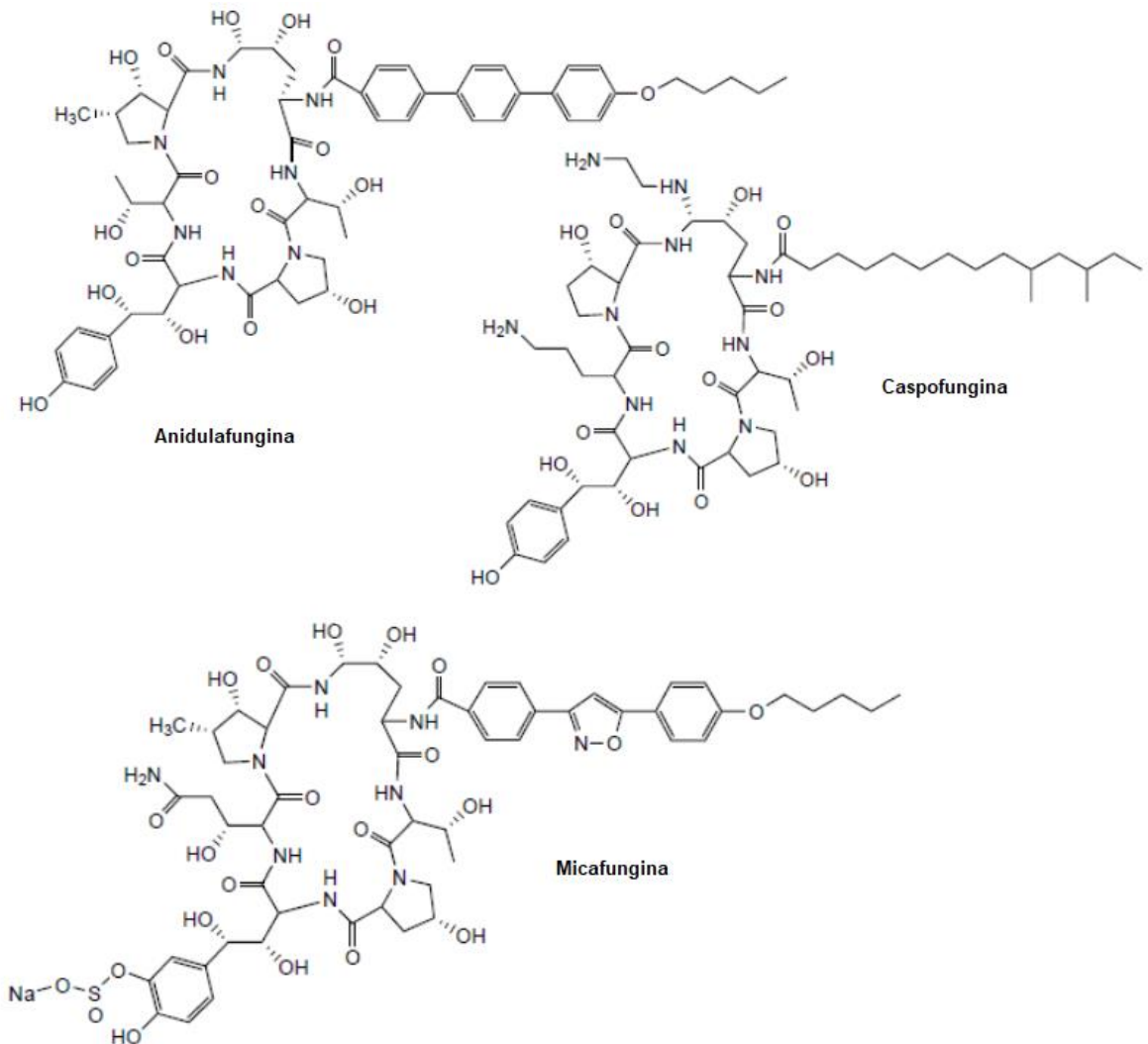


Figura 52. Estrutura das equinocandinas: Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina.

As equinocandinas são fungicidas contra a maioria das espécies de *Candida*, além de exibir atividade fungicida ou fungistática contra *A. fumigatus*. Apesar de a resistência às equinocandinas ser baixa, o uso indiscriminado para profilaxia e regimes de tratamento prolongado resultaram num aumento da incidência de resistência, como têm sido relatado para a espécie *C. glabrata* ultimamente. Além disso, as equinocandinas têm baixa biodisponibilidade oral e, portanto, muitas vezes são utilizadas por via endovenosa (REVIE et al., 2018).

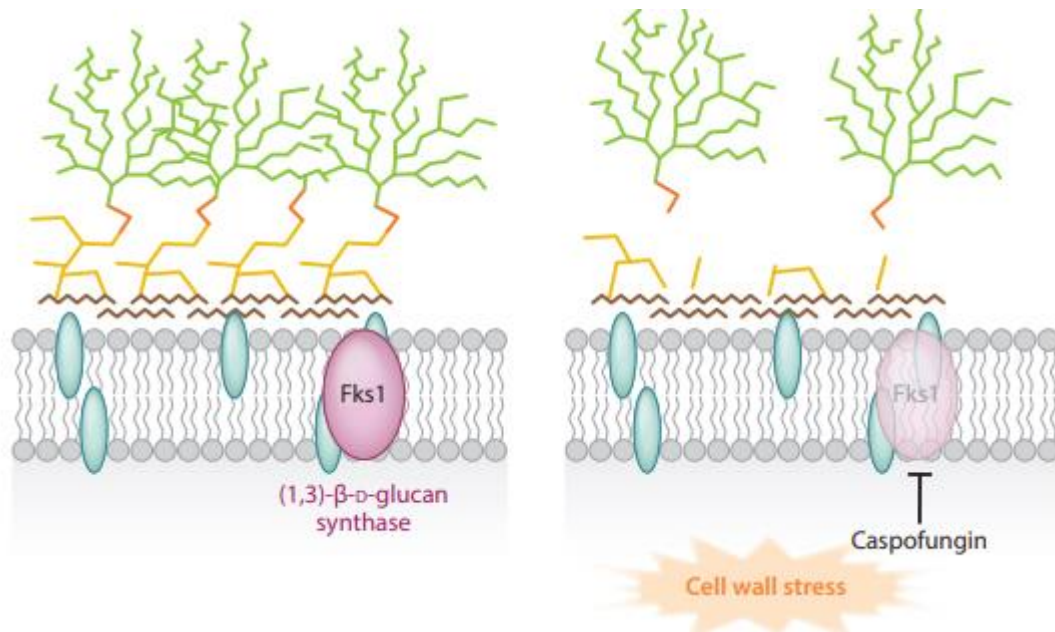


Figura 53. mecanismo de ação das equinocandinas, dando destaque para a caspofungina. adaptado de Ruvie e colaboradores 2018.

3.1.3.3 Azólicos

A classe de fármacos azólicos corresponde aos antifúngicos heterociclos que apresentam um anel de 5 membros nitrogenado: imidazóis contêm dois nitrogênios, enquanto os triazóis contêm três nitrogênios. A introdução do fármacos azólicos na década de 1960 através do miconazol e clotrimazol foi o primeiro passo para o desenvolvimento desta classe. Em seguida, na década de 1980, o surgimento do cetoconazol marcou o início de uma era de melhorias em relação às terapias antifúngicas. Após quase uma década de uso, o cetoconazol foi rapidamente substituído pelos triazóis fluconazol e itraconazol devido a melhorias significativas no perfil farmacocinético, espectro de atividade e segurança. Os triazóis posaconazol e voriconazol seguiram e foram mais conhecidos por seu espectro adicional, especificamente contra infecções por fungos emergentes, com uma farmacocinética mais previsível e com menos efeitos adversos conforme linha do tempo descrita na figura 54 (ROBBINS et al., 2017; REVIE et al., 2018).

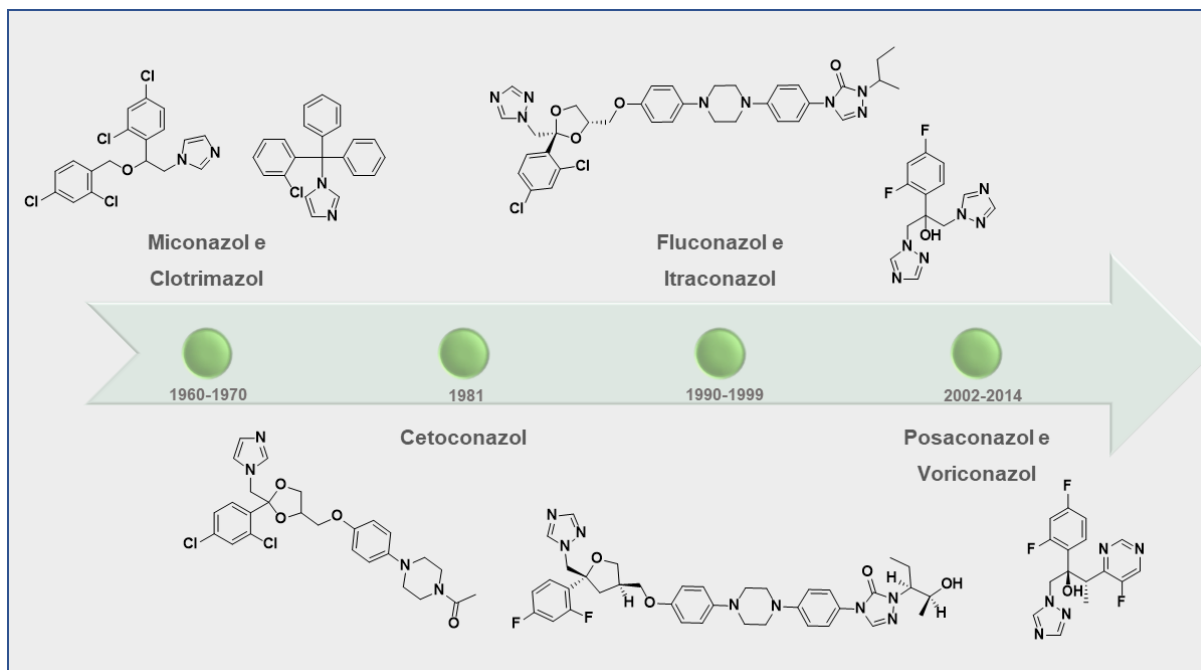


Figura 54. Linha do tempo que descreve os principais fármacos azólicos, suas estruturas e período de surgimento.

O mecanismo de ação dos fármacos azólicos é através do bloqueio da biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima lanosterol 14- α -demetilase. A inibição da enzima resulta na depleção do ergosterol e no acúmulo de um esteroide tóxico ao organismo fúngico, prejudicando sua proliferação (figura 55). Esta classe de fármacos pode exercer atividade fungicida ou fungistática. Este último mecanismo permite a sobrevivência de populações fúngicas que juntamente com o extenso uso de azóis na profilaxia resulta em resistência generalizada a esta classe (JAMPILEK, 2016; REVIE et al., 2018).

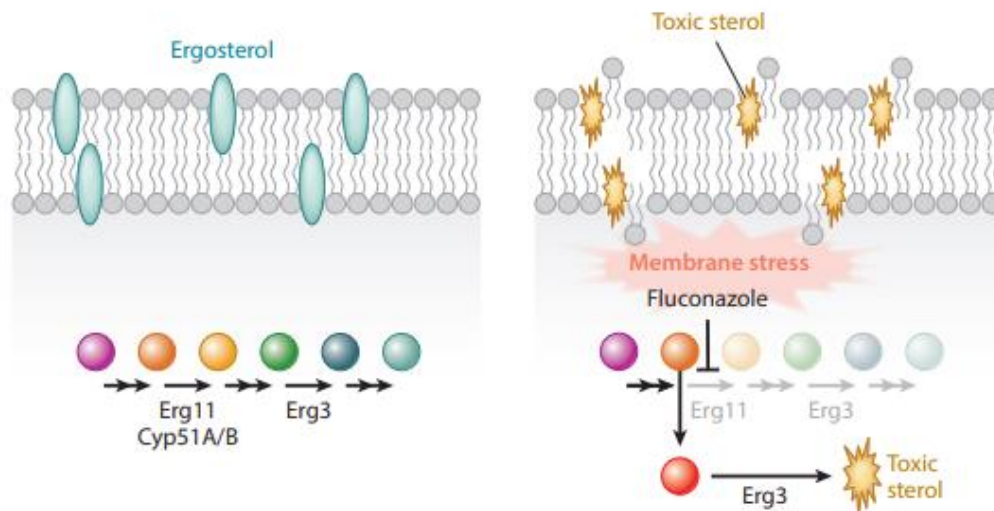


Figura 55. Mecanismo de ação do fluconazol, um fármaco antifúngico da classe dos azólicos. Adaptado de Ravie e colaboradores 2018.

3.1.3.4 Alilaminas

Antifúngicos da classe alilamina (terbinafina e naftifina) atuam inibindo a enzima esqualeno epoxidase. Como consequência da inibição, o conteúdo de ergosterol da membrana celular fúngica diminui, o que leva a propriedades físico-químicas alteradas da membrana fúngica, resultando no mau funcionamento de proteínas ligadas a membranas. A inibição da esqualeno-epoxidase também leva a um acúmulo de esqualeno, que é tóxico para as células fúngicas em grandes quantidades (RYDER; MIETH, 1992; MUSIOL et al., 2010).

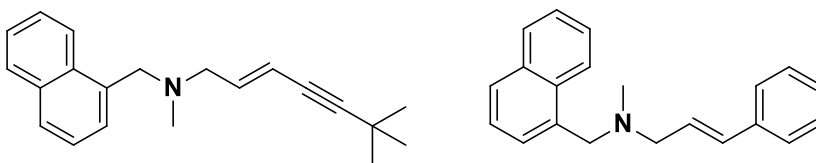


Figura 56. estrutura dos fármacos da classe alilamina: terbinafina e naftifina.

A terbinafina (figura 56) é um antifúngico sintético, altamente lipofílico cuja tendência é se acumular na pele, unhas e tecidos adiposos. É utilizada para o tratamento de infecções dermatofíticas da unha causada por fungos suscetíveis. Também é utilizada para o tratamento de *Tinea capitis* (micose do couro cabeludo) e

Tinea corporis (micose no corpo) ou *Tinea cruris* (pé de atleta)(RYDER; MIETH, 1992; MUSIOL et al., 2010).

A naftifina (figura 56), por sua vez é um agente sintético de amplo espectro, antifúngico e derivado de alilamina para o tratamento tópico de *Tinea pedis*, *Tinea cruris* e *Tinea corporis*, além de infecções causadas por *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*(RYDER; MIETH, 1992; MUSIOL et al., 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliação da atividade antifúngica

4.1.1 Cepas selecionadas

Neste estudo, um total de 9 cepas foram testadas, das quais, 5 cepas de *Candida* spp.: *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (CG RL24), *C. krusei* (CK 02), *C. parapsilosis* (CP RL13) e *C. tropicalis* (CT 07), juntamente com 4 cepas de dermatófitos: *Microsporum canis* (MCA 01), *M. gypseum* (MGY 42), *Trichophyton mentagrophytes* (TME 16) e *T. rubrum* (TRU 51). As cepas de *Candida* foram analisadas fenotipicamente em Vitek® *Yeast Biochemical Card*. Todas as cepas são provenientes da micoteca do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) e originadas do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). A cepa padrão ATCC 18804 foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA*) e utilizada como controle.

4.1.2 *Screening* de atividade antifúngica

A avaliação de possível atividade antifúngica dos derivados de quinolinas foi realizada através de um *screening* inicial. Soluções de cada composto foram preparadas em 2% de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o restante do volume completado com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) obtendo-se uma concentração final de 100 µg/mL. A preparação das suspensões contendo os inóculos fúngicos seguiu o preconizado pelos documentos M27-A3

(CLSI, 2008), para leveduras e M38-A2 (CLSI, 2008) para espécies dermatofíticas. As suspensões fúngicas contendo as leveduras de *Candida* spp. foram lidas em espectrofotômetro (GT7220, Global Trade Technology) em comprimento de onda de 530 nm a fim de obter uma turbidez equivalente a 0,5 da escala Mcfarland (90% de transmitância), contendo aproximadamente 1 a 5×10^6 UFC/mL. Após leitura, as suspensões fúngicas foram diluídas 1:50 em salina estéril e, a partir desta, uma diluição 1:20 em meio RPMI 1640 foi preparada, obtendo-se um inóculo com 1 a 5×10^3 UFC/mL para cada cepa. Os inóculos com diluição 1:20 foram utilizadas no experimento. As suspensões contendo os inóculos com as cepas dermatofíticas seguiram as mesmas condições já descritas. Porém, as suspensões fúngicas apresentaram 80-82% de transmitância em comprimento de onda de 530 nm. Em seguida, essas suspensões foram homogeneizadas em Vortex e decantadas por 5 min para a remoção do sobrenadante. Por fim, uma diluição 1:50 contendo 5×10^4 UFC/mL para cada cepa foi preparada em meio RPMI 1640, a qual foi utilizada no ensaio antifúngico. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços onde foram adicionados 100 μ L de meio RPMI 1640 juntamente com 100 μ L de inóculo fúngico representante de cada cepa. Como controle de crescimento fúngico, 100 μ L de inóculo de cada cepa foram adicionados à 100 μ L de meio RPMI 1640. As microplacas foram incubadas a 35°C por 48 h e a 32°C por 96 h para as cepas de *Candida* spp. e dermatofíticas, respectivamente. A presença de atividade antifúngica foi determinada quando os compostos avaliados foram capazes de inibir 100% de crescimento fúngico quando comparado ao controle positivo e através de leitura visual.

4.1.3 Ensaio de citotoxicidade em células Vero

A linhagem celular Vero, utilizada neste estudo, foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10% - 20% (v / v) de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA), a 37 °C e atmosfera úmida (5% CO₂). A linhagem celular foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma) de alta glicose (Sigma, St Louis, EUA).

A citotoxicidade dos compostos foi realizada utilizando o ensaio de MTT (BERRIDGE et al., 2005). As células foram em placas de 96 poços (2 x 10⁴ por poço) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após atingir a semi-confluência, as células foram tratadas com os compostos a 50µM num rastreio preliminar e incubadas durante 48 horas. Os compostos que obtiveram inibição > 50% foram selecionados para avaliar sua dose-resposta usando 6 concentrações variando de 5 a 500 µM.

Após 48 h, o meio contendo o tratamento foi removido e as células incubadas com solução de MTT (0,5 mg/ml) por 3 horas a 37 °C, na ausência de luz. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO e quantificados por absorbância em 570 e 630nm medida em espectrofotômetro de placas (Spectramax M2e, SoftMax Pro Software Interface 5.4.1, EUA).

4.1.4 Cálculo do Índice de Seletividade (SI)

O cálculo do índice de seletividade foi realizado através de uma simples relação entre a citotoxicidade encontrada em células Vero pelo CIMnas respectivas cepas de fungos conforme figura57.

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ da linhagem não tumoral}}{IC_{50} \text{ das respectivas linhagens fúngicas}}$$

Figura 57. Equação utilizada para calcular o Índice de seletividade (SI).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade antifúngica

5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração avaliada dos composto químico capaz de inibir o crescimento de um determinado microorganismo (ANDREWS, 2001), no caso deste trabalho cepas fúngicas de dermatófilos e leveduras. A tabela 24 a seguir demonstra os valores de CIM obtidos para cada quinolina frente às cepas de *Candida* spp.

Tabela 24. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quinolinas expressa em µg/mL frente a cepas de *Candida* spp.

Cepas/Quinolinas	Q 2	Q 10	Q 11	Q 12	Q 13	Q 14
CA ATCC 18804	R	1,56	25	12,5	R	R
CG RL24	R	50	25	R	R	R
CP RL13	R	R	R	R	R	R
CK 02	R	R	R	R	R	R
CT 07	R	R	R	R	R	R

C. albicans (ATCC 18804), *Candida glabrata* (CG RL 24), *C. parapsilosis* (CP RL13), *C. krusei* (CK 02) e *C. tropicalis* (CT 07); R: cepas resistentes para concentração testada (CIM > 50 µg/mL).

Conforme é possível observar na Tabela xxx as moléculas Q2, Q13 e Q14 não foram ativas a nenhuma das cepas testadas. As moléculas Q10 e Q11

demonstraram eficácia frente às cepas CA ATCC 18804 e CG RL24, com CIM variando entre 1,56 e 50 µg/mL. Já a molécula Q12 foi eficaz somente frente à cepa CA ATCC 18804 (CIM 12,5 µg/mL).

Quanto a avaliação da atividade antifúngica frente a dermatófilos a tabela 25a seguir demonstra os valores de CIM obtidos para as quinolinas frente aos isolados de dermatófitos:

Tabela 25. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Quinolinas expressa em µg/mL frente aos isolados de dermatófitos.

Isolados/Quinolinas	Q 2	Q 10	Q 11	Q 12	Q 13	Q 14
MCA 01	R	R	R	R	25	50
MGY 42	R	R	R	R	25	50
TME 16	R	R	R	R	25	50
TRU 51	R	R	R	R	50	50

Microsporum canis (MCA 01), *Microsporum gypseum* (MGY 42), *Trichophyton mentagrophytes* (TME 16), e *Trichophyton rubrum* (TRU 51); R: isolados resistentes para concentração testada (CIM > 50 µg/mL).

A partir dos resultados expostos na tabela 2 podemos observar que as moléculas Q13 e Q14 demonstraram atividade antifúngica frente a todos isolados (CIM 25 e 50 µg/mL. Para as demais moléculas, todos os isolados foram resistentes frente à concentração testada (CIM > 50 µg/mL).

Ao compararmos a eficácia das quinolinas frente a todos os micro-organismos testados, podemos afirmar que essas moléculas possuem atividade seletiva. Visto que, Q10, Q11 e Q12 foram ativas frente às leveduras de *Candida* spp., enquanto que Q13 e Q14 apresentaram eficácia somente frente aos dermatófitos.

Após os resultados apresentados, as moléculas mais eficazes (menores CIM's), foram reavaliadas novamente, a fim de ampliar o espectro de ação para três isolados de cada espécie. Dessa forma, as quinolinas foram testadas frente a doze

isolados de dermatófitos e quinze cepas de *Candida* spp. A determinação da CIM foi realizada da mesma maneira e a concentração utilizada para cada molécula continuou sendo 100 µg/mL (caindo 50 µg/mL na microplaca). Na tabela a seguir, tem-se a avaliação da atividade antifúngica para as quinolinas Q10 e Q11 frente a isolados de *Candida* spp.:

Tabela 26. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quinolinas expressa em µg/mL frente às cepas de *Candida* spp.

Cepas/Quinolinas	Q10	Q11
CA 01	R	50
CA 05	R	R
CA 17	R	50
CG RL24	R	50
CG RL34	R	R
CG RL49	R	50
CK 02	R	R
CK 03	R	50
CK Den43	25	50
CP RL13	R	50
CP RL38	R	R
CP RL52	R	R
CT 72A	R	50
CT 72P	50	50
CT (ATCC 750)	R	50

Candida albicans (CA 01, CA 02 e CA 17); *C. glabrata* (CG RL24, CG RL 34 e CG RL49); *C. krusei* (CK 02, CK 03 e CK Den43); *C. parapsilosis* (CP RL13, CP RL38 e CP RL52); *C. tropicalis* (CT 72A, CT 72P e ATCC 750). R: isolados resistentes para concentração testada (CIM > 50 µg/mL).

A molécula Q 10 apresentou atividade somente frente às cepas CK 43 (CIM 25 µg/mL) e CT 72P (CIM 50 µg/mL). Porém, o mesmo não foi observado para Q11, a qual foi eficaz frente à maioria das cepas de *Candida* spp. testadas (CIM 50 µg/mL).

Quanto a avaliação da atividade antifúngica frente as cepas de dermatófilos podemos observar os valores da CIM para as quinolina Q13 e Q14 na tabela 27 a seguir.

Tabela 27. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quinolinas expressa em µg/mL frente aos isolados de dermatófitos testados.

Isolados/Quinolinas	Q13	Q14
MCA 01	25	50
MCA 29	25	50
MCA 40	25	R
MGY 42	12,5	25
MGY 50	12,5	50
MGY 58	12,5	50
TME 32	25	50
TME 40	12,5	R
TME 60	25	R
TRU 43	25	50
TRU 47	25	50
TRU 51	R	R

Microsporum canis (MCA 01, MCA 29 e MCA 40); *Microsporum gypseum* (MGY 42, MGY 50 e MGY 58); *Trichophyton mentagrophytes* (TME 32, TME 40 e TME 60);

Trichophyton rubrum (TRU 43, TRU 47 e TRU 51). R: isolados resistentes para concentração testada (CIM > 50 µg/mL).

É possível observar que tanto a Q13 quanto a Q14 foram eficazes frente à maioria dos isolados de dermatófitos testados. Somente o isolado TRU 51 foi resistente às moléculas na concentração testada (CIM > 50 µg/mL). A molécula Q13 (CIM entre 12,5 e 25 µg/mL) foi mais eficaz frente aos dermatófitos quando comparada a molécula Q14 (CIM entre 25 e 50 µg/mL).

5.2 Ensaio de viabilidade celular Vero e índice de seletividade

A partir dos resultados expostos anteriormente, as moléculas mais eficazes (Q11, Q13 e Q14) foram encaminhadas para avaliação da citotoxicidade em células Vero, a qual foi realizada em triplicata e com um *n* de três repetições em dias diferentes.

A amostra Q11 demonstrou citotoxicidade acima de 100 µg/mL, enquanto que Q13 e Q14 foram tóxicas somente acima de 300 µg/mL. Esses resultados são muito promissores, uma vez que, a CIM dessas moléculas é ≤ 50 µg/mL.

Para finalizar a avaliação da citotoxicidade ainda é preciso repetir mais uma vez o ensaio, a fim de obter a curva de morte para as três moléculas. A obtenção da IC₅₀ não foi possível, pois, em maiores concentrações, as amostras continham uma concentração mais elevada de DMSO do que o limite tolerado pelas células Vero. Tal fato inviabilizou a obtenção da IC₅₀ de maneira confiável.

Por conseguinte, o índice de seletividade foi calculado através da razão entre a citotoxicidade encontrada nas células Vero pela CIM nos respectivos fungos. No caso das leveduras, a Q11 foi a molécula mais ativa com índice de seletividade de 2, o que significa que esta quinolina é 2 vezes mais seletiva para as leveduras do que para células Vero. Os dermatófilos, por sua vez, tiveram duas quinolinas com boa atividade antifúngica: Q13 e Q14. A quinolina Q13 alcançou um índice de seletividade de 12, o que ressalta a seletividade desta molécula para o organismo fúngico. Já a molécula Q14, teve seu índice de seletividade calculado em 6, menos seletiva que a Q13, porém muito seletiva ainda, com 6 vezes mais tendência a causar danos às leveduras do que para células Vero.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados expostos é possível concluir que as quinolinas apresentam atividade antifúngica frente a leveduras e dermatófilos. A quinolina Q11 foi ativa frente a praticamente todas as cepas de cândida testadas com CIM de 50 ug/mL e com SI de 2. Já frente a dermatófilos as quinolinas mais ativas foram a Q13 e Q14 que obtiveram CIM de 12,5 a 25 ug/mL e 50ug/mL respectivamente. Quanto ao SI as quinolinas Q13 e Q14 também alcançaram resultados excelentes com valores de SI de 12 e 6 respectivamente. Por fim, são necessários ainda estudos de mecanismo de ação afim de elucidar o mecanismo de ação dessas quinolinas frente às cepas de fungos testadas.

7. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que as metodologias desenvolvidas possibilitaram a síntese 9 quinolinas cujas estruturas foram identificadas através de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massas. As quinolinas estudadas apresentaram atividade antitumoral, levando-se em consideração a potência e eficácia das moléculas testadas. Além disso nos estudos de mecanismo de morte, a maioria das moléculas induziu a morte celular através de apoptose. É possível destacar as quinolinas Q11 e Q12 quanto a atividade citotóxica frente as linhagens tumorais e ótimos índices de seletividade (SI) superiores a 10 para Q11 e entre 1,5 - 3 para a Q12. Quanto aos valores ADMET, as simulações *in silico* demonstraram que a maioria das quinolinas em estudo tem grande probabilidade de biodisponibilidade oral, permeação da barreira hematoencefálica sem ser substrato para glicoproteína-P, características desejáveis no planejamento de fármacos. Além disso, a partir da avaliação da atividade antifúngica foi possível observar que as quinolinas apresentam atividade antifúngica frente a leveduras e dermatófilos. A quinolina Q11 foi ativa frente a praticamente todas as cepas de cândida testadas com CIM de 50 µg/mL e com SI de 2. Já frente a dermatófilos as quinolinas mais ativas foram a Q13 e Q14 que obtiveram CIM de 12,5 a 25 µg/mL e 50 µg/mL respectivamente. Quanto ao SI as quinolinas Q13 e Q14 também alcançaram resultados excelentes com valores de SI de 12 e 6 respectivamente. No entanto, tanto na avaliação da atividade tumoral quanto da atividade antifúngica são necessários mais ensaios a fim de concluir definitivamente sobre os resultados, assim como sobre os possíveis mecanismos de ação. Como perspectivas deste trabalho estão o planejamento e síntese de novas quinolinas utilizando a abordagem sintética desenvolvida. Também é prevista a publicação de pelo menos 3 artigos científicos em revistas relevantes das áreas temáticas.

8 REFERÊNCIAS GERAIS

ABOUELHASSAN, Y.; GARRISON, A. T.; BURCH, G. M.; et al. Discovery of quinoline small molecules with potent dispersal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a scaffold hopping strategy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 21, p. 5076–5080, 2014.

ADAMS, S. P.; ALAEILKHCHI, N.; WRIGHT, J. M. Pitavastatin for lowering lipids. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, , n. 7, 2017.

AFZAL, O.; KUMAR, S.; HAIDER, M. R.; et al. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 871–910, 2015.

ALVES, V.; BRAGA, R.; MURATOV, E.; et al. Development of Web and Mobile Applications for Chemical Toxicity Prediction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 982–988, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. RISING GLOBAL CANCER EPIDEMIC. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/documents/image/acspc-043784.pdf>>. Acesso em: 5/1/2017.

ANTONIO DE ALMEIDA, E.; OZAKI, M. R. O Efeito da Pitavastatina na Reatividade Vascular em Coelhos Hipercolesterolêmicos Effect of Pitavastatin on Vascular Reactivity in Hypercholesterolemic Rabbits. , 2014.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl_1, p. 5–16, 2001.

BAREGGI, S. R.; CORNELLI, U. Cloiquinol: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 18, n. 1, p. 41–46, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal - 3.Ed.: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014.

BATALHA, P. N.; SAGRILLO, F. S.; GAMA, I. L. Acoplamento Cruzado C-C: Novas Metodologias, Aplicações e Descobertas ao Longo dos Últimos Anos. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 494–550, 2014.

BEARDEN, D.; STRONG, A.; EHNOT, J.; et al. Targeted treatment of migrating partial seizures of infancy with quinidine. **Annals of Neurology**, v. 76, n. 3, p. 457–461, 2014.

BENET, L. Z.; HOSEY, C. M.; URSU, O.; OPREA, T. I. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. **Advanced drug delivery reviews**, v. 101, p. 89–98, 2016.

BHAL, S. K. **Lipophilicity Descriptors: Understanding When to Use LogP & LogD**. Toronto, ON, Canada, 2009.

BHARATE, J. B.; VISHWAKARMA, R. A.; BHARATE, S. B. Metal-free domino one-pot protocols for quinoline synthesis. **RSC Advances**, v. 5, n. 52, p. 42020–42053, 2015.

BLACK, D.; ALVAREZ, M.; BERGSTRÄSSER, U.; IHMELS, H.; JOULE, J. A. **Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 15: Six-**

Membered Hetarenes with One Nitrogen or Phosphorus Atom. Thieme, 2014.

BLOOM, D. E.; CAFIERO, E. T.; E., J.-L.; et al. **The Global Economic Burden of Non-communicable Diseases.** Geneva, 2011.

BOFFITO, M.; JACKSON, A.; POZNIAK, A.; et al. Effect of a Modified Saquinavir/Ritonavir Dosing Regimen with Lower Dose Lead-In Phase on QTc Interval, Pharmacokinetics, Antiviral Activity and Safety in Treatment-Naïve HIV-1-Infected Patients. **Drugs in R&D**, v. 15, n. 1, p. 141–153, 2015.

BONGARZONE, S.; BOLOGNESI, M. L. The concept of privileged structures in rational drug design: focus on acridine and quinoline scaffolds in neurodegenerative and protozoan diseases. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 251–268, 2011.

BRÄSE, S. **Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation.** Royal Society of Chemistry, 2015.

BRAUN-FALCO, O.; PLEWIG, G.; WOLFF, H. H.; WINKELMANN, R. K. **Dermatology.** Springer Berlin Heidelberg, 2013.

BROCKSOM, T. J.; ALVES, L. DE C.; WULF, G. D.; DESIDERÁ, A. L.; OLIVEIRA, K. T. DE. O Prêmio Nobel de Química em 2010. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, v. 32, n. 4, 2010.

BRUICE, P. Y. **Organic Chemistry.** Pearson/Prentice Hall, 2004.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed.:** .McGraw Hill Brasil, 2012.

BORBA, H. H. L.; STEIMBACH, L. M.; RIVEROS, B. S.; et al. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. **Mycoses**, v. 61, n. 10, p. 754–763, 2018.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

CDC. Doenças Fúngicas. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/index.html>>. Acesso em: 28/11/2018.

CHEN, K.; PULLARKAT, S. A. A tandem Heck-aza-Michael addition protocol for the one-pot synthesis of isoindolines from unprotected amines. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 32, p. 6600–6606, 2012.

CALOW, A. D. J.; CARBÓ, J. J.; CID, J.; FERNÁNDEZ, E.; WHITING, A. Understanding α,β -Unsaturated Imine Formation from Amine Additions to α,β -Unsaturated Aldehydes and Ketones: An Analytical and Theoretical Investigation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 5163–5172, 2014.

CHATURVEDI, S.; RAJKUMAR, S. S.; LI, X.; et al. Antifungal Testing and High-Throughput Screening of Compound Library against *Geomyces destructans*, the Etiologic Agent of Geomycesis (WNS) in Bats. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17032, 2011.

CHAVAN, R. C.; SONAWANE, R. O.; PANDE, V. V.; ZAWAR, L. R.; JADE, P. B. Design Development and Evaluation of oral thin films of Montelukast Sodium. **American journal of pharmtech research**, v. 3, n. 4, 2013.

CHO, C. S.; KIM, J. U. An approach for quinolines via palladium-catalyzed Heck coupling followed by cyclization. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 3775–3778, 2007.

CHOA, C. S.; KIM, J. U. An approach for quinolines via palladium-catalyzed Heck coupling followed by cyclization. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 3775–3778, 2007.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. OUP Oxford, 2012.

COA, J. C.; CASTRILLÓN, W.; CARDONA, W.; et al. Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activity of quinoline-hydrazone hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 746–753, 2015.

COLOBERT, F.; VALDIVIA, V.; CHOPPIN, S.; et al. Axial Chirality Control During Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions: The *tert*-Butylsulfinyl Group as an Efficient Chiral Auxiliary. **Organic Letters**, v. 11, n. 22, p. 5130–5133, 2009.

CRUNKHORN, S. Drug development: Predicting toxicity. **Nature Reviews Drug Discovery** 2007 6:12, 2007a.

CRUNKHORN, S. Predicting toxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 12, p. 956–956, 2007b.

DENIS, J. G.; FRANCI, G.; ALTUCCI, L.; et al. Synthesis of 7-alkylidene-7,12-dihydroindolo[3,2-d]benzazepine-6-(5H)-ones (7-alkylidene-paullones) by N-cyclization–oxidative Heck cascade and characterization as sirtuin modulators. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2800–2810, 2015.

DENMARK, S. E.; VENKATRAMAN, S. On the Mechanism of the Skrap–Doebner–Von Miller Quinoline Synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 1668–1676, 2006.

DE, J.; DOBBIN, A.; INEZ, M.; GADELHA, P. **Mesilato de Imatinibe para Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica Imatinib Mesylate in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia**. 2002.

DI, L.; KERNS, E.; CARTER, G. Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 19, p. 2184–2194, 2009.

DIAS, M. F.; FIGUEIREDO, B. C. P. DE; TEIXEIRA-NETO, J.; et al. In vivo evaluation of antitumoral and antiangiogenic effect of imiquimod-loaded polymeric nanoparticles. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1107–1114, 2018.

DIAS, R.; DAVE, N.; TULLU, M. S.; DESHMUKH, C. T. Local anaesthetic systemic toxicity following oral ingestion in a child: Revisiting dibucaine. **Indian journal of anaesthesia**, v. 61, n. 7, p. 587–589, 2017.

DING, W.-Q.; LIND, S. E. Critical Review Metal Ionophores-An Emerging Class of Anticancer Drugs. **Life**, v. 61, n. 11, p. 1013–1018, 2009.

DING, W.-Q.; LIU, B.; VAUGHT, J. L.; YAMAUCHI, H.; LIND, S. E. Anticancer Activity of the Antibiotic Clotrimazole. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3389 LP-3395, 2005.

DONG, J.-W.; LI, X.-J.; SHI, J.-Y.; LIU, K.-Q. Application of a proton quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy method for the determination of actinodaphnine in *Illigera aromatica* and *Illigera henryi*. **Journal of Natural Medicines**, p. 1–6, 2018.

DRUGBANK.2018. DRUGBANK. ca

DUDZIŃSKI, K.; PAKULSKA, A. M.; KWIATKOWSKI, P. An Efficient Organocatalytic Method for Highly Enantioselective Michael Addition of Malonates to Enones Catalyzed by Readily Accessible Primary Amine-Thiourea. **Organic Letters**, v. 14, n. 16, p. 4222–4225, 2012.

DUNN, C. J.; PROUTEAU, M.; DELAHAYE, M.; PURCELL, T.; BRANCENI, D. Antrafenine: Anti-inflammatory activity with respect to oedema and leucocyte infiltration in the rat. **Agents and Actions**, v. 14, n. 2, p. 296–299, 1984.

EISCH, J. J.; DLUZNIIEWSKI, T. Mechanism of the Skraup and Doebner-von Miller Quinoline Syntheses: Cyclization of α , β -Unsaturated N-Aryliminium Salts via 1,3-Diazetidinium Ion Intermediates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 54, p. 1269–1274, 1989.

EJIM, L.; FARHA, M. A.; FALCONER, S. B.; et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 348, 2011.

FALLAHI-SICHANI, M.; HONARNEJAD, S.; HEISER, L. M.; GRAY, J. W.; SORGER, P. K. Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 11, p. 708–714, 2013.

FDA. **Tipifarnib (ZARNESTRA) for the Treatment of Elderly Patients With Newly Diagnosed Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia**. 2005.

FDA. Bosutinib tablets. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm318203.htm>>. Acesso em: 20/1/2017a.

FDA. Cabozantinib. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm330213.htm>>. Acesso em: 20/1/2017b.

FDA. Lenvatinib in combination with Everolimus. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm501070.htm>>. Acesso em: 20/1/2017.

FDA. Cabozantinib (CABOMETYX). Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm497483.htm>>. Acesso em: 20/1/2017.

FELPIN, F.-X.; NASSAR-HARDY, L.; CALLONNEC, F. LE; FOUQUET, E. Recent advances in the Heck–Matsuda reaction in heterocyclic chemistry. **Tetrahedron**, v. 67, n. 16, p. 2815–2831, 2011.

FERNANDES, G. F. DOS S.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. DOS. POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE. **Química Nova**, 2017.

FRANKLIN, R. B.; ZOU, J.; ZHENG, Y.; NASLUND, M. J.; COSTELLO, L. C. Zinc Ionophore

(Clioquinol) Inhibition of Human ZIP1-Deficient Prostate Tumor Growth in the Mouse Ectopic Xenograft Model: A Zinc Approach for the Efficacious Treatment of Prostate Cancer. **International journal of cancer and clinical research**, v. 3, n. 1, p. 37, 2016.

FROEHNER JUNIOR, I.; KOTZE, P. G.; ROCHA, J. G.; et al. Postoperative topical analgesia of hemorrhoidectomy with policresulen and cinchocaine: a prospective and controlled study. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n. 2, p. 92–98, 2014.

GANESAN, A.; BARAKAT, K. Solubility: a speed-breaker on the drug discovery highway. **MOJ Bioequivalence & Bioavailability**, v. 3, n. 3, p. 1–0, 2017.

GATASHEH, M. K.; KANNAN, S.; HEMALATHA, K.; IMRANA, N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 3, n. 4, p. 272–278, 2017.

GONEC, T.; BOBAL, P.; SUJAN, J.; et al. Investigating the Spectrum of Biological Activity of Substituted Quinoline-2-Carboxamides and Their Isosteres. **Molecules**, 2012.

GOPAUL, K.; SHINTRE, S. A.; KOORBANALLY, N. A. A Review on the Synthesis and Anti-cancer Activity of 2-substituted Quinolines. **Anticancer Agents Medicinal chemistry**, v. 15, n. 5, p. 631–646, 2015.

GOSS, P. E.; LEE, B. L.; BADOVINAC-CRNJEVIC, T.; et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 5, p. 391–436, 2013.

GU, W.; JIN, X.-Y.; LI, D.-D.; et al. Design, synthesis and in vitro anticancer activity of novel quinoline and oxadiazole derivatives of ursolic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 4128–4132, 2017.

GUIDO F. PAULI, *,†,‡; BIRGIT U. JAKI, ‡ AND; LANKIN†, D. C. Quantitative 1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis§. , 2004.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.

HANNA, G. M.; LAU-CAM, C. A. A stability-indicating proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for the analysis of propantheline bromide in pharmaceutical samples. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 9, p. 700–3, 2001.

HAY, M.; THOMAS, D. W.; CRAIGHEAD, J. L.; ECONOMIDES, C.; ROSENTHAL, J. Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 40–51, 2014.

HECK, R. F. Palladium-catalyzed reactions of organic halides with olefins. **Accounts of Chemical Research**, v. 12, n. 4, p. 146–151, 1979.

HECK, R. F. Palladium-Catalyzed Vinylation of Organic Halides. **Organic Reactions**. p.345–390, 1982.

HEGAZY, G. H.; TAHER, A.; EL-ZAHER, A. A. Synthesis of Some Floctafenine Derivatives of Expected Anti-inflammatory/Analgesic Activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 338, n. 8, p. 378–384, 2005.

HERAVI, M. M.; ASADI, S.; AZARAKHSHI, F. Recent Applications of Doebner, Doebner-von Miller and Knoevenagel-Doebner Reactions in Organic Syntheses. **Current Organic**

Synthesis, v. 11, p. 701–731, 2014.

HOOTS, B. E.; PETERMAN, T. A.; TORRONE, E. A.; et al. A Trich-y Question: Should Trichomonas vaginalis Infection be Reportable? **Sexually Transmitted Diseases**, v. 40, n. 2, p. 113–116, 2013.

HORN, J.; MARSDEN, S. P.; NELSON, A.; HOUSE, D.; WEINGARTEN, G. G. Convergent, Regiospecific Synthesis of Quinolines from o-Aminophenylboronates. **Organic Letters**, v. 10, n. 18, p. 4117–4120, 2008.

HUGO, W. **Inhibition and Destruction of the Microbial Cell**. Elsevier Science, 2012.

HUSSAINI, S. M. A. Therapeutic significance of quinolines: a patent review (2013-2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 10, p. 1201–1221, 2016.

HYEDA, A.; COSTA, É. S. M. DA. Uma análise preliminar dos custos em quimioterapia ambulatorial no sistema de saúde suplementar. **Jornal brasileiro de economia da saúde**, v. 7, n. 2, 2015.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 2007.

INCA. Estimativa 2016, Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=1>>. Acesso em: 5/1/2017.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018a.

INCA. Controle do câncer do Colo do Útero. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/fatores_risco>. Acesso em: 28/11/2018b.

JIANG, H.; TAGGART, J. E.; ZHANG, X.; et al. Nitroxoline (8-hydroxy-5-nitroquinoline) is more a potent anti-cancer agent than clioquinol (5-chloro-7-iodo-8-quinoline). **Cancer Letters**, v. 312, n. 1, p. 11–17, 2011.

JUNMEI WANG, *,†; GEORGE KRUDY, †; TINGJUN HOU, ‡; et al. Development of Reliable Aqueous Solubility Models and Their Application in Druglike Analysis. , 2007.

JAMPILEK, J. Potential of agricultural fungicides for antifungal drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.

KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. Wiley, 2005.

KAITIN, K. I. Deconstructing the Drug Development Process: The New Face of Innovation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 3, p. 356–361, 2010.

KAMAL, A.; RAHIM, A.; RIYAZ, S.; et al. Regioselective synthesis, antimicrobial evaluation and theoretical studies of 2-styryl quinolines. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1347–1357, 2015.

KAUR, K.; JAIN, M.; REDDY, R. P.; JAIN, R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3245–3264, 2010.

KHUTORYANSKIY, V. V. Longer and safer gastric residence. **Nature Materials**, v. 14, n. 10,

p. 963–964, 2015.

KNUST, R. E. **Estimativa dos custos diretos da assistência oncológica do câncer de pulmão não pequenas células avançado em um hospital público de referência.** 2015.

KUBAVAT, A. H.; KHIPPAL, N.; TAK, S.; et al. A Randomized, Comparative, Multicentric Clinical Trial to Assess the Efficacy and Safety of Zileuton Extended-Release Tablets With Montelukast Sodium Tablets in Patients Suffering From Chronic Persistent Asthma. **American Journal of Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 154–162, 2013.

KUHLMANN, F. M.; FLECKENSTEIN, J. M. 157 - Antiparasitic Agents. In: J. Cohen; W. G. Powderly; S. M. B. T.-I. D. (Fourth E. Opal (Eds.); . p.1345–1372.e2, 2017.

KUMAR, S.; GUPTA, S. B. AND H. Biological Activities of Quinoline Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2009.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças.** Elsevier Brasil, 2015.

LAURA D. HUGHES, †; DAVID S. PALMER; FLORIAN NIGSCH, AND; MITCHELL*, J. B. O. Why Are Some Properties More Difficult To Predict than Others? A Study of QSPR Models of Solubility, Melting Point, and Log P. , 2008.

LIMBERGER, J. **Acoplamentos de Heck, Suzuki e Ullmann em compostos vinílicos: desenvolvimento de sistemas catalíticos e aplicação na síntese de fármacos.** 2012. 241 f. UFRGS. 2012.

LOPES, N. R.; THERESA, M.; ABREU, C. L.; CERÁVOLO, M. T.; ABREU, L. **Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica Tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA.**

LEE, V. R. S. AND H. Quinoline as a Privileged Scaffold in Cancer Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, 2011.

LEI, T.; LI, Y.; SONG, Y.; et al. ADMET evaluation in drug discovery: 15. Accurate prediction of rat oral acute toxicity using relevance vector machine and consensus modeling. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 6, 2016.

LI, F.; JIANG, T.; LI, Q.; LING, X. Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? **American journal of cancer research**, v. 7, n. 12, p. 2350—2394, 2017.

LI, H.; XU, X.; YANG, J.; et al. Iron-catalyzed cascade reaction of ynone with o-aminoaryl compounds: a Michael addition–cyclization approach to 3-carbonyl quinolines. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 4, p. 530–533, 2011.

LI, J. J. **Name Reactions in Heterocyclic Chemistry.** Wiley, 2004.

LIMBERGER, J. **Acoplamentos de Heck, Suzuki e Ullmann em compostos vinílicos: desenvolvimento de sistemas catalíticos e aplicação na síntese de fármacos.** 2012. 241 f. UFRGS. 2012.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

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**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 2001.

LIU, J.; LIU, Y.; DAI, Z.; HE, L.; MA, S. Structural and Quantitative Analysis of Three C-Glycosylflavones by Variable Temperature Proton Quantitative Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2017, p. 4934309, 2017.

LIU, X.; WANG, Q.; YANG, G.; et al. A novel kinase inhibitor, INCB28060, blocks c-MET-dependent signaling, neoplastic activities, and cross-talk with EGFR and HER-3. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 22, p. 7127–38, 2011.

LU, S.; KE, Y.; WU, C.; et al. Radiosensitization of clioquinol and zinc in human cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 448, 2018.

LUO, C.; WANG, K.; ZHANG, H.; LIU, Y.; XIA, Y. Effects of Quinidine on Short QT Syndrome Variant 2 in the Human Ventricles: a Modelling Study. , 2017.

LV, Z.; CHU, Y.; WANG, Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. **HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)**, v. 7, p. 95–104, 2015.

MAENTHAISONG, R.; TACCONELLI, S.; SRITARA, P.; et al. Clinical Pharmacology of Cyclooxygenase Inhibition and Pharmacodynamic Interaction with Aspirin by Floctafenine in Thai Healthy Subjects. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 403–417, 2013.

MANSKE, R. H. F.; KULKA, M. The Skraup Synthesis of Quinolines. **Organic Reactions**, 2004.

MCCARTHY, M.; O'SHAUGHNESSY, E. M.; WALSH, T. J. Amphotericin B: Polyene Resistance Mechanisms. **Antimicrobial Drug Resistance**. p.387–395, 2017.

MCCONNAUGHEY, M. B. T.-R. M. IN B. S. Physical Chemical Properties of Fungi☆. , 2014.

MONEY, N. P. Chapter 1 - Fungal Diversity. In: S. C. Watkinson; L. Boddy; N. P. B. T.-T. F. (Third E. Money (Eds.); . p.1–36, 2016.

MPUNGOSE, P.; VUNDLA, Z.; MAGUIRE, G.; et al. The Current Status of Heterogeneous Palladium Catalysed Heck and Suzuki Cross-Coupling Reactions. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1676, 2018.

MUSIOL, R.; SERDA, M.; POLANSKI, S. H.-B. AND J. Quinoline-Based Antifungals. **Current Medicinal Chemistry**, 2010.

MAO, X.; SCHIMMER, A. D. The toxicology of Clioquinol. **Toxicology Letters**, v. 182, n. 1–3, p. 1–6, 2008.

MARCELO GOMES SPEZIALI. **NOVOS SISTEMAS DE ACOPLAMENTOS CRUZADOS EM FASE HOMOGÊNEA E HETEROGÊNEA PARA A SÍNTESE DE PRODUTOS DE QUÍMICA FINA**. 2012. 126 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL . 2012.

MARTINS, D. L.; ALVAREZ, H. M. Cloretos de Ácidos Carboxílicos como Agentes de Aрилаção em Reações de Heck Catalisadas por Paládio – A Reação de Blaser. **Revista**

Virtual de Química, v. 2, n. 4, p. 280–297, 2010.

MATHER, B. D.; VISWANATHAN, K.; MILLER, K. M.; LONG, T. E. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 5, p. 487–531, 2006.

MATTOS, M. C. DE; MARZORATI, L. Aspectos mecanísticos da adição de Michael. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 710–714, 1999.

MCMURRY, J. Organic Chemistry, 8th Edition. **Belmont, CA: Brooks Cole/Cengage Learning, 2012.**, p. 1376, 2012.

MENDLING, W.; WEISSENBACHER, E. R.; GERBER, S.; PRASAUSKAS, V.; GROB, P. Use of locally delivered dequalinium chloride in the treatment of vaginal infections: a review. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 293, n. 3, p. 469–484, 2016.

MILLER, P. E.; MARTIN, S. S.; JOSHI, P. H.; et al. Pitavastatin 4 mg Provides Significantly Greater Reduction in Remnant Lipoprotein Cholesterol Compared With Pravastatin 40 mg: Results from the Short-term Phase IV PREVAIL US Trial in Patients With Primary Hyperlipidemia or Mixed Dyslipidemia. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 3, p. 603–609, 2016.

MODA, T. L. **Desenvolvimento de modelos in silico de propriedades de ADME para a triagem de novos candidatos a fármacos.** 27. Feb. 2007. 97 f. Universidade de São Paulo. 27. Feb. 2007.

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)**, v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017.

MULLEN, S. A.; CARNEY, P. W.; ROTEN, A.; et al. Precision therapy for epilepsy due to KCNT1 mutations. **Neurology**, v. 90, n. 1, p. e67 LP-e72, 2018.

MUSIOL, R. An overview of quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 6, p. 583–597, 2017.

MUSIOL, R.; SERDA, M.; HENSEL-BIELOWKA, S.; POLANSKI, J. Quinoline-Based Antifungals. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 1960–1973, 2010.

MUSIOL, R.; SERDA, M.; POLANSKI, S. H.-B. AND J. Quinoline-Based Antifungals. **Current Medicinal Chemistry**, 2010.

NCI. Capmatinib. Disponível em: <<https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCIThesaurus&code=C90564>>. Acesso em: 25/10/2018.

NOBREGA, C. R.; LIMA, A. F. C. Custo de procedimentos tratamento quimioterápico ambulatorial de mulheres portadoras de câncer de mama. **Revista da escola de enfermagem da USP**, v. 48, n. 5, p. 698–705, 2014.

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging Fungal Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 521–526, 2005.

OESTREICH, M. **The Mizoroki-Heck Reaction.** Wiley, 2009.

OKUBO, K.; INOUE, Y.; NUMAGUCHI, H.; et al. Montelukast in the treatment of perennial allergic rhinitis in paediatric Japanese patients; an open-label clinical trial. **Journal of Drug Assessment**, v. 5, n. 1, p. 6–14, 2016.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. logS Calculation - Osiris Property Explorer. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/logS.html>>. Acesso em: 6/11/2018.

PALMER, D. S.; LLINÀS, A.; MORAO, I.; et al. Predicting Intrinsic Aqueous Solubility by a Thermodynamic Cycle. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 266–279, 2008.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

PASCOLO, S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 139–144, 2016.

PATEL, S. R.; GANGWAL, R.; SANGAMWAR, A. T.; JAIN, R. Synthesis, biological evaluation and 3D QSAR study of 2,4-disubstituted quinolines as anti-tuberculosis agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 511–522, 2015.

PATNAIK, M. M.; SALLMAN, D. A.; SEKERES, M. A.; et al. Preliminary Results from an Open-Label, Phase 2 Study of Tipifarnib in Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). **Blood**, v. 130, n. Suppl 1, 2017.

PINHEIRO, A. C.; BISPO, M. L. F.; SOUZA, M. V. N. A Importância do Núcleo Quinolínico e seus Derivados no Desenvolvimento de Fármacos. **Revista Fitos Eletrônica**; v. 5, n. 03 (2010), 2013.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 10, p. 789–802, 2006.

POON, T.; MUNDY, B. P.; SHATTUCK, T. W. The Michael Reaction. **Journal of Chemical Education**, v. 79, n. 2, p. 264, 2002.

PRACHAYASITTIKUL, V.; CHAN-ON, W.; NGUYEN THI BICH, H.; et al. Quinoline-based clioquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 2033, 2015.

PRAJAPATI, S. M.; PATEL, K. D.; VEKARIYA, R. H.; PANCHAL, S. N.; PATEL, H. D. Recent advances in the synthesis of quinolines: a review. **RSC Advances**, v. 4, n. 47, p. 24463–24476, 2014.

RAIES, A. B.; BAJIC, V. B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science**, v. 6, n. 2, p. 147–172, 2016.

RAMANN, G. A.; COWEN, B. J. Quinoline synthesis by improved Skraup–Doebner–Von Miller reactions utilizing acrolein diethyl acetal. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 46, p. 6436–6439, 2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale's Pharmacology**. Elsevier Health Sciences, 2015.

REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70–76, 2018.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 753–775, 2017.

RYDER, N. S.; MIETH, H. Allylamine Antifungal Drugs BT - Current Topics in Medical Mycology. In: M. Borgers; R. Hay; M. G. Rinaldi (Eds.); . p.158–188, 1992.

RÄTSCH, C.; HOFMANN, A. **The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and Its Applications**. Inner Traditions/Bear, 2005.

ROBUCK, P. R.; WURZELMANN, J. I. Understanding the Drug Development Process. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. S1, p. S13–S16, 2005.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; ALMEIDA, J. R. DE; et al. Virtual Screening Strategies in Drug Design. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, 2012.

SAMOILICHENKO, Y.; KONDRATENKO, V.; EZERNITSKAYA, M.; et al. A mechanistic study of the Lewis acid–Brønsted base–Brønsted acid catalysed asymmetric Michael addition of diethyl malonate to cyclohexenone. **Catalysis Science & Technology**, v. 7, n. 1, p. 90–101, 2017.

SANTOS, M. DA S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.

SHAKER, M. E.; ASHAMALLAH, S. A.; EL-MESERY, M. The novel c-Met inhibitor capmatinib mitigates diethylnitrosamine acute liver injury in mice. **Toxicology Letters**, v. 261, p. 13–25, 2016.

SHIM, J. S.; MATSUI, Y.; BHAT, S.; et al. Effect of Nitroxoline on Angiogenesis and Growth of Human Bladder Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 24, p. 1855–1873, 2010.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens .**Frontiers in Medicine** , 2016.

SCHROETER, F.; SOELLNER, J.; STRASSNER, T. Cross-Coupling Catalysis by an Anionic Palladium Complex. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 4, p. 3004–3009, 2017.

SHRESTHA, A. D.; NEUPANE, D.; VEDSTED, P.; KALLESTRUP, P. Cervical Cancer Prevalence, Incidence and Mortality in Low and Middle Income Countries: A Systematic Review. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 19, n. 2, p. 319–324, 2018.

SOSSELA, F. R.; ZOPPAS, B. C. DE A.; WEBER, L. P. Chronic Myeloid Leukemia: clinical aspects, diagnosis and main changes observed in complete blood count. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 2, 2017.

STARK, H.; ŽIVKOVIĆ, A. HPV Vaccination: Prevention of Cervical Cancer in Serbia and in Europe. **Acta Facultatis Medicinae Naissensis**, v. 35, n. 1, p. 5–16, 2018.

Stop neglecting fungi. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 17120, 2017.

TABANA, Y.; AL-MANSOUB, M.; SANDAI, D. **Development of Antifungal Drugs Against Candidiasis: Discovery and Resistance**. 2017.

SILBER, B. M. Driving drug discovery: the fundamental role of academic labs. **Science**

translational medicine, v. 2, n. 30, p. 30cm16, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Artmed, 2016.

SMITH, G. P.; CHAN, E. S. L. Immunomodulating Pharmaceuticals. **Clinical Immunology**, p. 1177–1184.e1, 2019.

SOBKE, A.; KLINGER, M.; HERMANN, B.; et al. The Urinary Antibiotic 5-Nitro-8-Hydroxyquinoline (Nitroxoline) Reduces the Formation and Induces the Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Che. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6021 LP-6025, 2012.

SRIRAM, D.; YOGEE SWARI, P.; THIRUMURUGAN, R.; RATAN BAL, T. Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential. **Natural Product Research**, v. 19, n. 4, p. 393–412, 2005.

SUTOU, N.; KATO, K.; AKITA, H. A concise synthesis of (-)-indolmycin and (-)-5-methoxyindolmycin. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, n. 15, p. 1833–1838, 2008.

TAVARES, L. C. **Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos: os primeiros passos do Brasil**. São Paulo, 2009.

THAPA, R. K.; CHOI, H.-G.; KIM, J. O.; YONG, C. S. Analysis and optimization of drug solubility to improve pharmacokinetics. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 47, n. 2, p. 95–110, 2017.

THOMAS, X.; ELHAMRI, M. Tipifarnib in the treatment of acute myeloid leukemia. **Biologics : Targets & Therapy**, v. 1, n. 4, p. 415–424, 2007.

TINDALL, S. M.; VALLIÈRES, C.; LAKHANI, D. H.; et al. Heterologous Expression of a Novel Drug Transporter from the Malaria Parasite Alters Resistance to Quinoline Antimalarials. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2464, 2018.

VANDEKERCKHOVE, S.; D'HOOGHE, M. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 5098–5119, 2015.

VICTOR, M. M.; SILVA, G. S. B. DA; VICTOR, M. M.; SILVA, G. S. B. DA. TOTAL SYNTHESIS IN BRAZIL EMPLOYING PALIADIUM CROSS-COUPPLING AS KEY STEP. **Química Nova**, v. 39, n. 7, p. 859–875, 2016.

VIEIRA, R. M. **Raízes históricas da medicina ocidental**. SciELO - Fap-Unifesp, 2012.

WABNITZ, T. C.; SPENCER, J. B. A General, Brønsted Acid-Catalyzed Hetero-Michael Addition of Nitrogen, Oxygen, and Sulfur Nucleophiles. , 2003.

WAGENLEHNER, F. M. E.; MÜNCH, F.; PILATZ, A.; et al. Urinary concentrations and antibacterial activity of Nitroxoline 250mg versus Trimethoprim 200mg against uropathogens in healthy volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** , 2013.

WANG, Y.; LAW, W.-K.; HU, J.-S.; et al. Discovery of FDA-Approved Drugs as Inhibitors of Fatty Acid Binding Protein 4 Using Molecular Docking Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 11, p. 3046–3050, 2014.

WANG, Z. Doebner-Miller Reaction. **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**, 2010.

WATERBEEMD, H. VAN DE; GIFFORD, E. ADMET IN SILICO MODELLING: TOWARDS PREDICTION PARADISE? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192–204, 2003.

WATSON, D. A. Legacy of Richard Heck. **Organometallics**, v. 35, n. 9, p. 1177–1178, 2016.

WEB OF SCIENCE™. Relatório de citações. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=1E1IXaw2NN4u6GKCC3x&page=1&cr_pqid=25&viewType=summary&colName=WOS>. Acesso em: 8/3/2018.

WHO. **World cancer report**. Lion, 2014.

WHO. **World cancer report 2014**. Geneva, 2014.

WHO. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 26/11/2018a.

WHO. **World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Genebra, 2018b.

WILLIAMS, H. D.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, S. A.; et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 1, p. 315–499, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2016**. Geneva, 2016.

WU, Y.-C.; LIU, L.; LI, H.-J.; WANG, D.; CHEN, Y.-J. Skraup–Doebner–Von Miller Quinoline Synthesis Revisited: Reversal of the Regiochemistry for γ -Aryl- β,γ -unsaturated α -Ketoesters. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 17, p. 6592–6595, 2006.

YAAKOV, D. BEN; SHADKCHAN, Y.; ALBERT, N.; KONTOYIANNIS, D. P.; OSHEROV, N. The quinoline bromoquinol exhibits broad-spectrum antifungal activity and induces oxidative stress and apoptosis in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2263–2272, 2017.

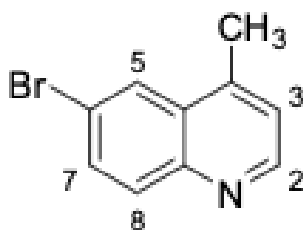
YAMASHKIN, S. A.; ORESHKINA, E. A. Traditional and modern approaches to the synthesis of quinoline systems by the Skraup and Doebner-Miller methods. (Review). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 42, n. 6, p. 701–718, 2006.

YOU, Z.; RAN, X.; DAI, Y.; RAN, Y. Clioquinol, an alternative antimicrobial agent against common pathogenic microbe. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 3, p. 492–501, 2018.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

4-metil, 6-bromo-quinolína



Espectro de ^1H RMN da molécula 4-metil, 6-bromo-quinolína (300 MHz, CDCl_3): H2 (8,78; d, $J = 3,0$ Hz, 1H), H5 (8,15; d, $J = 2,2$ Hz, 1H), H8 (7,97; d, $J = 9,0$ Hz, 1H), H7 (7,77; dd, $J = 9,0$ e $2,2$ Hz, 1H), H3 (7,25; d, $J = 3,0$ Hz, 2H) e CH_3 (2,68; s, 3H).

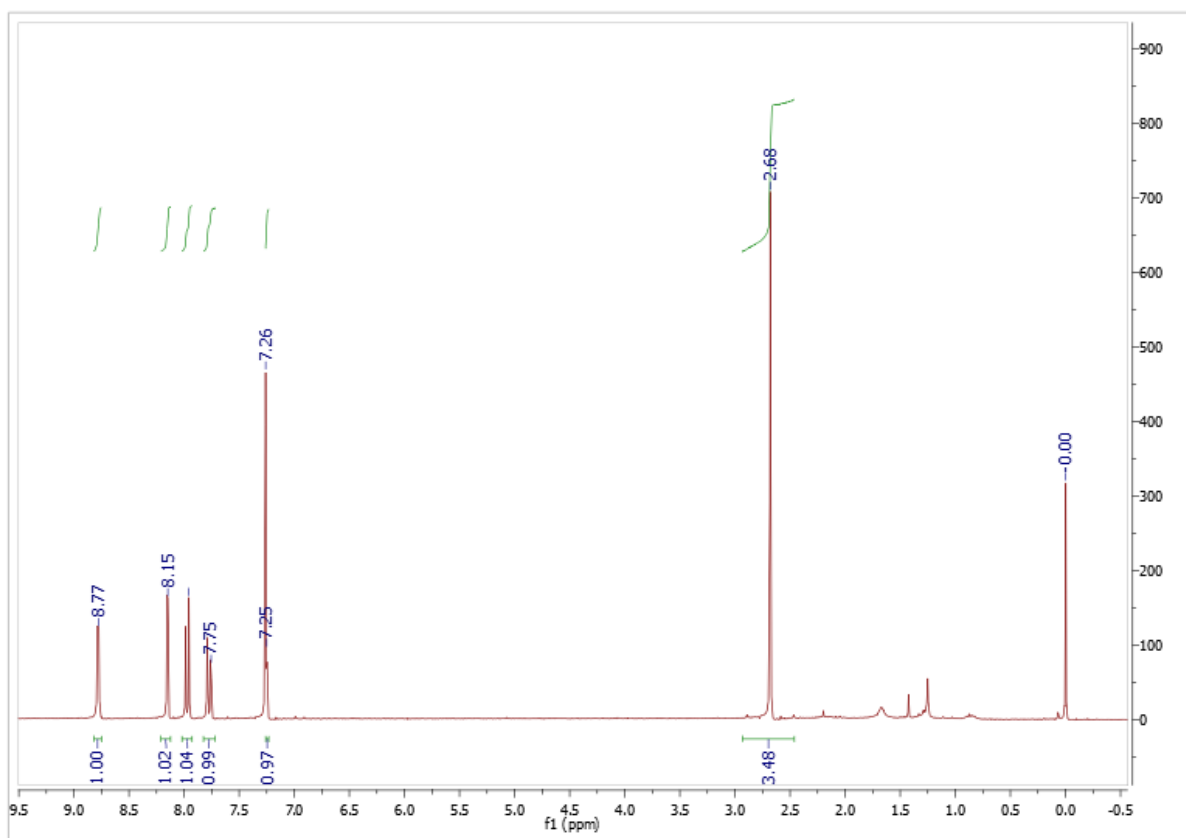
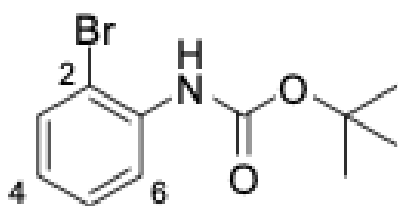


Figura 58. Espectro de ^1H RMN da molécula 4-metil, 6-bromo-quinolína (CDCl_3 , 300 MHz).

t-butil (2-bromofenil)carbamato



Espectro de ^1H RMN da molécula t-butil (2-bromofenil)carbamato(300 MHz, CDCl_3): H6 (8,13; dd, $J = 8,3$ e $1,4$ Hz, 1H), H3 (7,49; dd, $J = 8,0$ e $1,5$ Hz, 1H), H5 (7,29; ddd, $J = 7,6$; $8,3$ e $1,5$ Hz, 1H), NH (7,00; sl, 1H), H4 (6,90; ddd, $J = 7,6$; $8,0$ e $1,5$ Hz, 1H) e Me-BOC (1,54; s, 9H).

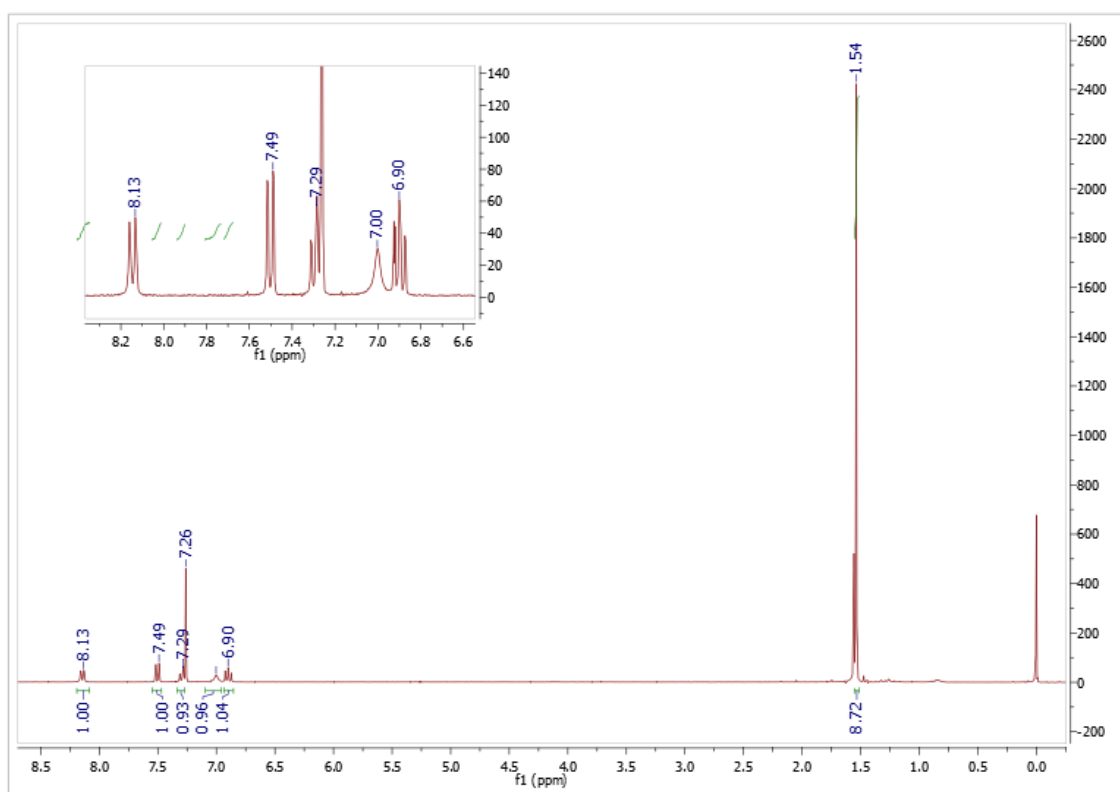
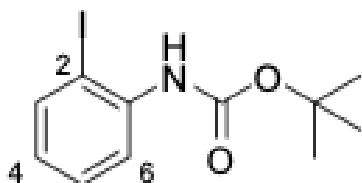


Figura 59. Espectro de ^1H RMN da molécula t-butil (2-bromofenil)carbamato (CDCl_3 , 300 MHz).

t-butil (2-iodofenil)carbamato

Espectro de ^1H RMN da molécula t-butil (2-iodofenil)carbamato (300 MHz, CDCl_3):
 H6 (8,05; dd, $J = 8,3$ e $1,4$ Hz, 1H), H3 (7,74; dd, $J = 7,9$ e $1,6$ Hz, 1H), H5 (7,30; ddd, $J = 8,3$; $7,4$ e $1,6$ Hz, 1H), NH (6,82; s, 1H), H4 (6,7; ddd, $J = 7,9$; $7,4$ e $1,4$ Hz, 1H) e Me-BOC (1,54; s; 9H).

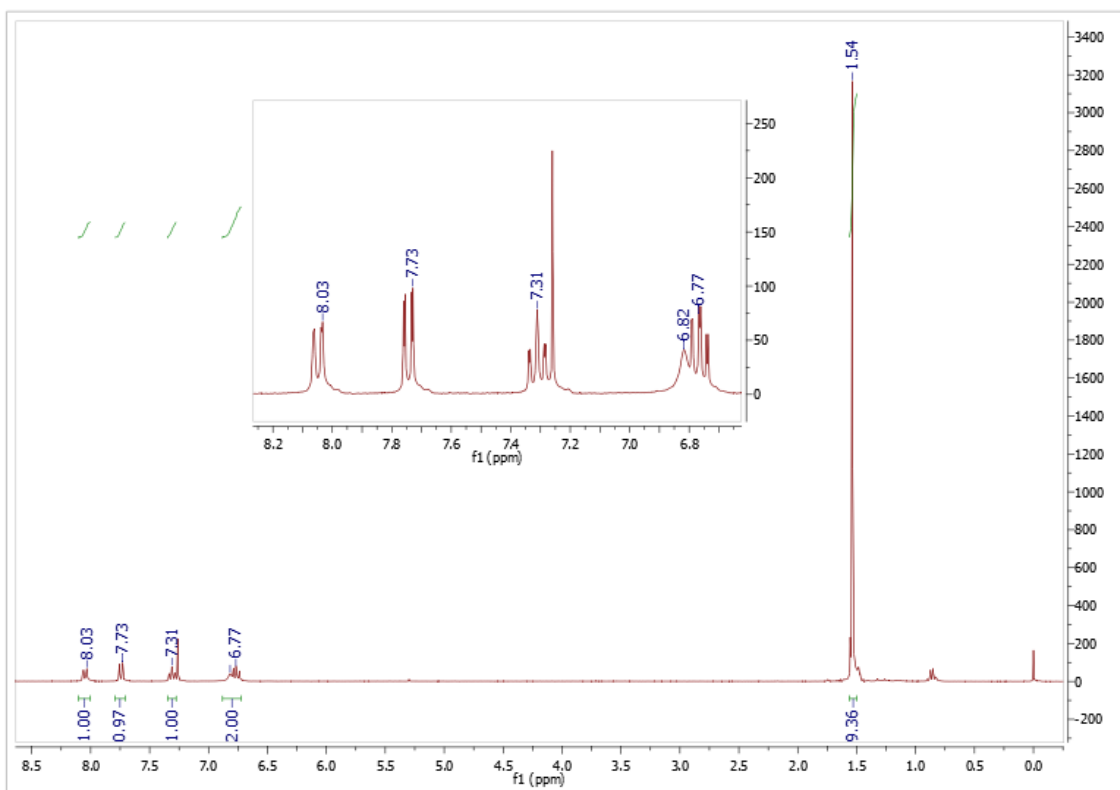
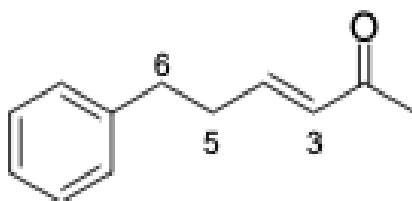


Figura 60. Espectro de ^1H RMN da molécula t-butil (2-iodofenil)carbamato (CDCl_3 , 300 MHz).

(E)-6-fenilhex-3-en-2-ona

Espectro de ^1H RMN da molécula (E)-6-fenilhex-3-en-2-ona: Hidrogênios fenila (7,33 – 7,17; m, 5H), H4 (6,79; dt, $J = 16,0$ e 6,8 Hz, 1H), H3 (6,12; dt, $J = 16,0$ e 1,5 Hz, 1H), H6 (2,80 – 2,75; m, 2H), H5 (2,57 – 2,50; m, 2H) e CH_3 (2,23; s, 3H).

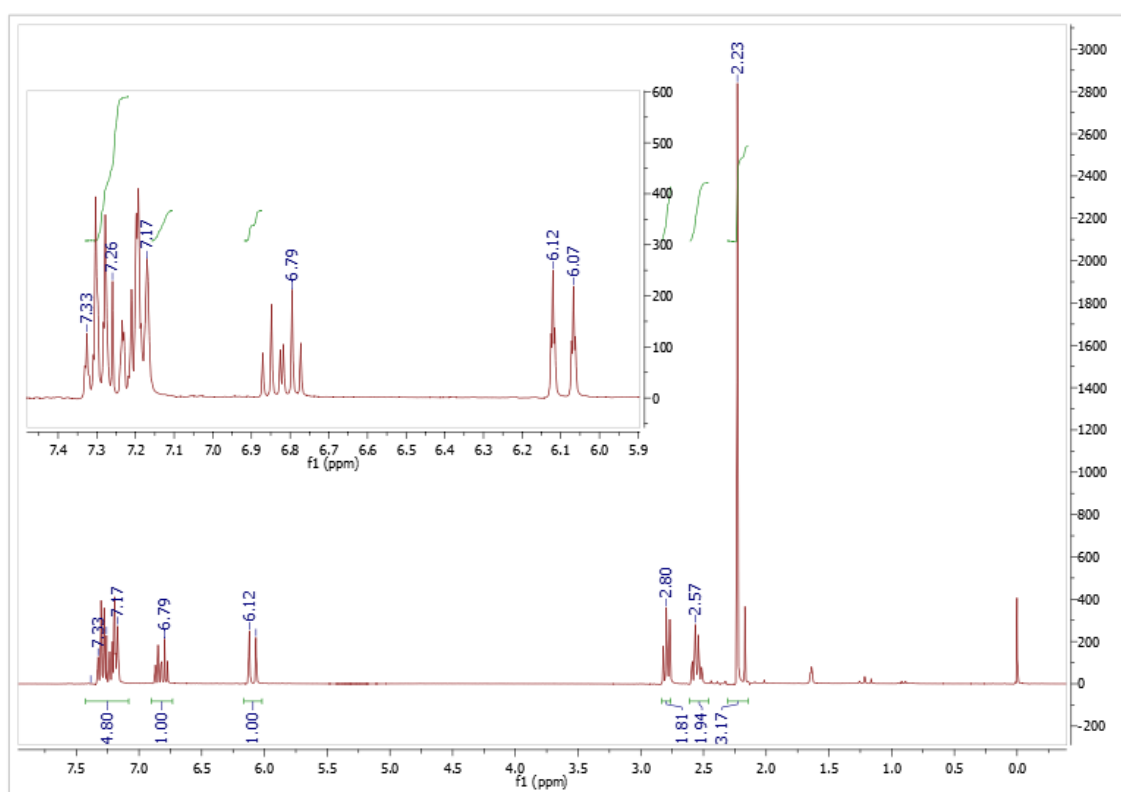
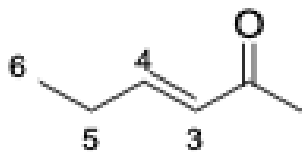


Figura 61. Espectro de ^1H RMN da molécula (E)-6-fenilhex-3-en-2-ona (CDCl_3 , 300 MHz).

(E)-hex-3-en-2-ona

Espectro de ^1H RMN da molécula (E)-hex-3-en-2-ona: H4 (6.83; dt, $J = 16.0, 6.3$ Hz, 1H), H3 (6.10; d, $J = 16.0$ Hz, 1H), Me-1 e H5 (2.32 – 2.19; m, 5H), Me-6 (1.09, t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

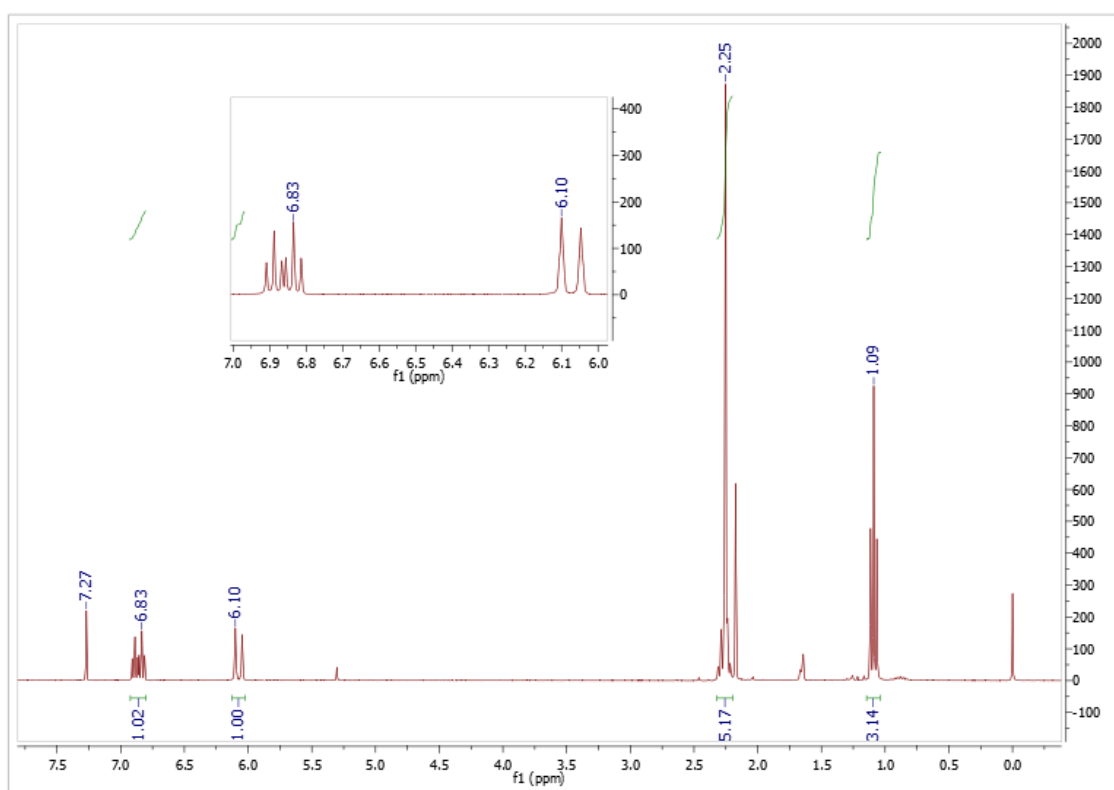
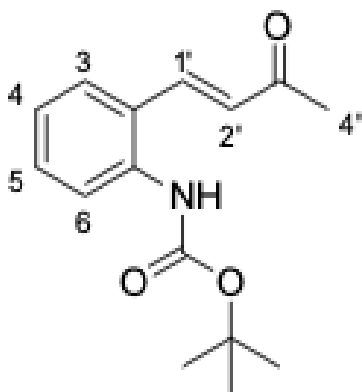


Figura 62. Espectro de ^1H RMN da molécula (E)-hex-3-en-2-ona (CDCl_3 , 300 MHz).

(E)-T-BUTIL (2-(3-OXOBUT-1-EN-1-IL)FENIL)CARBAMATO

Espectro de ^1H RMN da molécula (E)-t-butil (2-(3-oxobut-1-en-1-il)fenil)carbamato: H1' (7,67; d, $J = 16$ Hz, 1H), H6 (7,67; m, 1H), H3 (7,54; d, $J = 7,9$ Hz, 1H), H5 (7,38; m, 1H), H4 (7,15; m, 1H), H2' (6,67; d, $J = 16$ Hz, 1H), NH (6,51, sl, 1H), Me-4' (2,39; s, 3H) e Me-BOC (1,53, s, 9H).

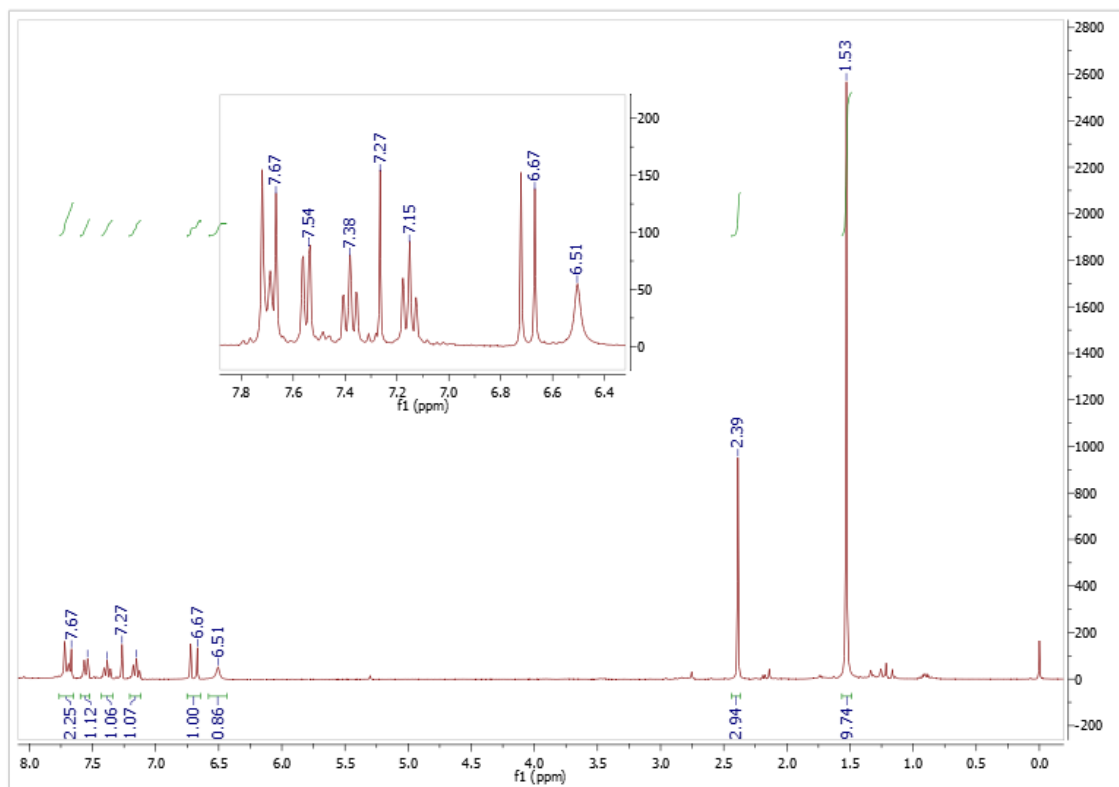
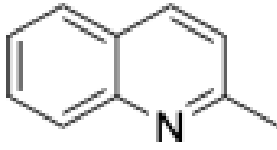


Figura 63. Espectro de ^1H RMN da molécula (E)-t-butil (2-(3-oxobut-1-en-1-il)fenil)carbamato (CDCl_3 , 300 MHz).

2-metilquinolina



ESPECTRO DE ^1H RMN DA MOLÉCULA 2-METILQUINOLINA: H4 E H5 (8,02; T, $J = 8,0$ HZ, 2H), H8 (7,76; D, $J = 8,5$ HZ, 1H), H7 (7,66; DDD, $J = 8,5; 7,0$ E 1.4 HZ, 1H), H6 (7. – 7.42; M, 1H), H3 (7,29; D, $J = 8.1$ HZ, 1H). E CH_3 (2,75; S, 3H).

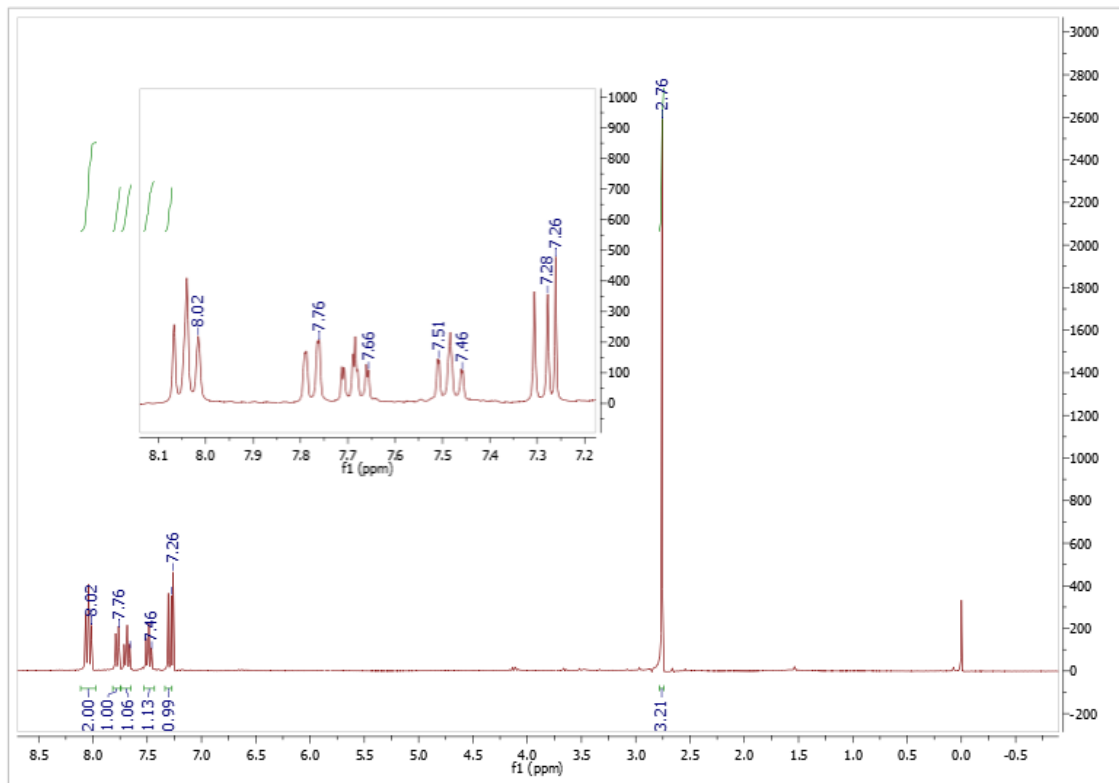
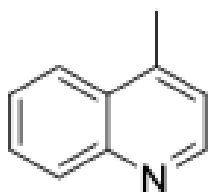


Figura 64. Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metilquinolina (CDCl_3 , 300 MHz).

4-metilquinolina



ESPECTRO DE ^1H RMN DA MOLÉCULA 4-METILQUINOLINA: H2 (8,77; D, $J = 4,3$ HZ, 1H), H5 (8,09; DD, $J = 8,4$ E $0,6$ HZ, 1H), H8 (7,98; DD, $J = 8,4$, $1,0$ HZ, 1H), H7 (7,68; DDD, $J = 8,4$; $6,9$ E $1,4$ HZ, 1H), H6 (7,53; DDD, $J = 8,2$; $6,9$ E $1,3$ HZ, 1H), H3 (7,22; D, $J = 5,0$ HZ, 1H) E CH_3 (2,7, S, 3H).

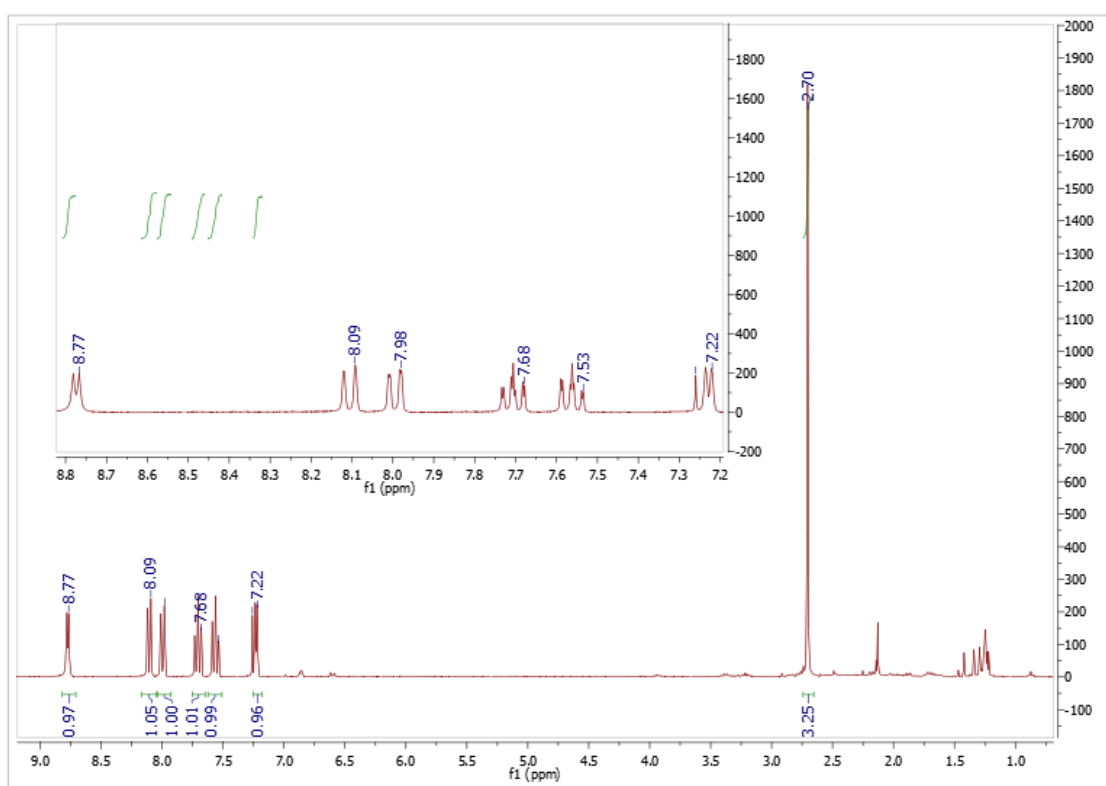
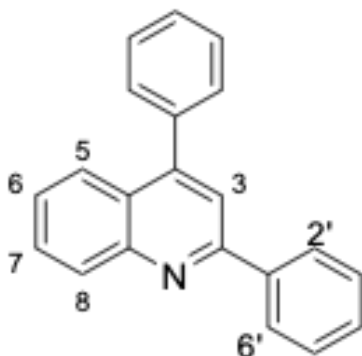


Figura 65. Figura 49. Espectro de ^1H RMN da molécula 4-metilquinolina (CDCl_3 , 300 MHz):

2,4-difenilquinolina



Espectro de ^1H RMN da molécula 2,4-difenilquinolina: H2' e H6' (8,37; dd, $J = 8,0$ e 1,3 Hz, 2H), H5 (8,21; d, $J = 8,3$ Hz, 1H), H3 (8,05; s, 1H), H8 (7,93; dd, $J = 8,4$ e 1,0 Hz, 1H), H7 (7,84, t, $J = 7,0$ Hz, 1H) e Hidrogênios aromáticos restantes (7,68-7,52; m, 9H).

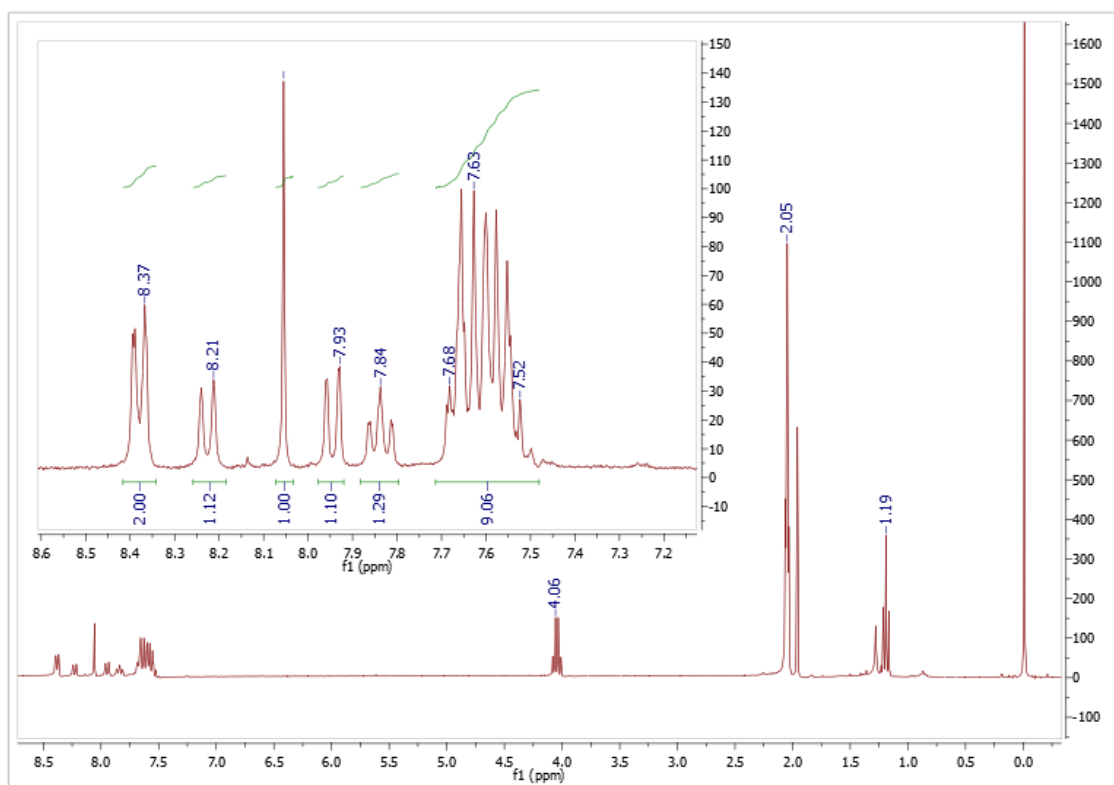
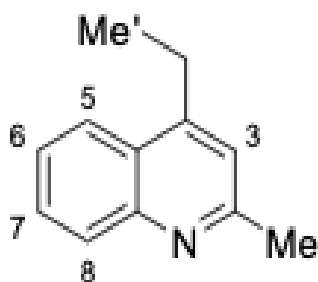


Figura 66. Espectro de ^1H RMN da molécula 2,4-difenilquinolina (Acetona d_6 , 300 MHz):

2-metil-4-etil-quinolina



Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-etil-quinolina. H5 (7,99; dd, $J = 7,6$ e $1,8$ Hz, 1H), H8 (7,85; dd, $J = 7,7$ e $1,9$ Hz, 1H), H6 e H7 (7,54-7,45; m, 2H), CH₂ (3,05; q, 2H), Me (2,66; s, 3H), Me' (1,27; s, 3H).

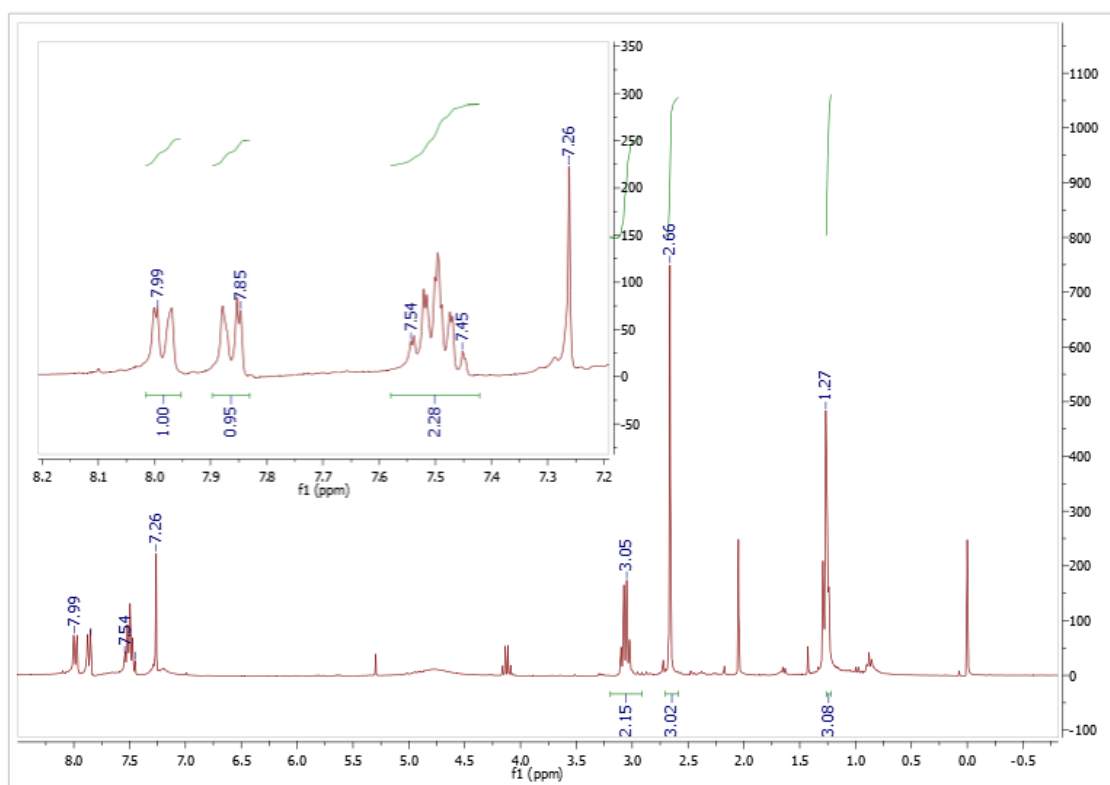
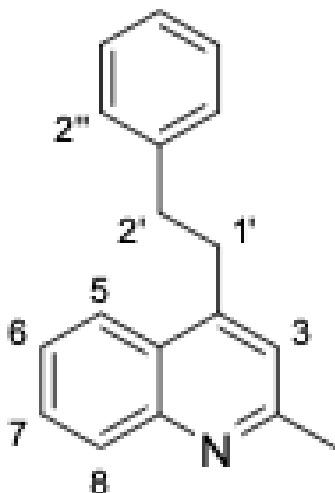


Figura 67. Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-etil-quinolina. (CDCl_3 , 300 MHz).

2-metil-4-etilfenil-quinolina



Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-etilfenil-quinolina: H5 (8,06; dd, $J = 8,4$ e $0,6$ Hz, 1H), H8 (8,00; dd, $J = 8,4$ e $1,0$ Hz, 1H), H7 (7,70; ddd, $J = 8,4$; $7,00$ e $1,4$ Hz, 1H), H6 (7,48; ddd, $J = 8,2$; $7,00$ e $1,4$ Hz, 1H), Fenil(7,35-7,20; m, 5H), H3 (7,80: s, 1H), H1' (3,33; dd, $J = 9,6$ e $6,6$ Hz, 2H), H2' (3,05; dd, $J = 9,6$ e $6,6$ Hz, 2H) e Me (2,69; s, 3H).

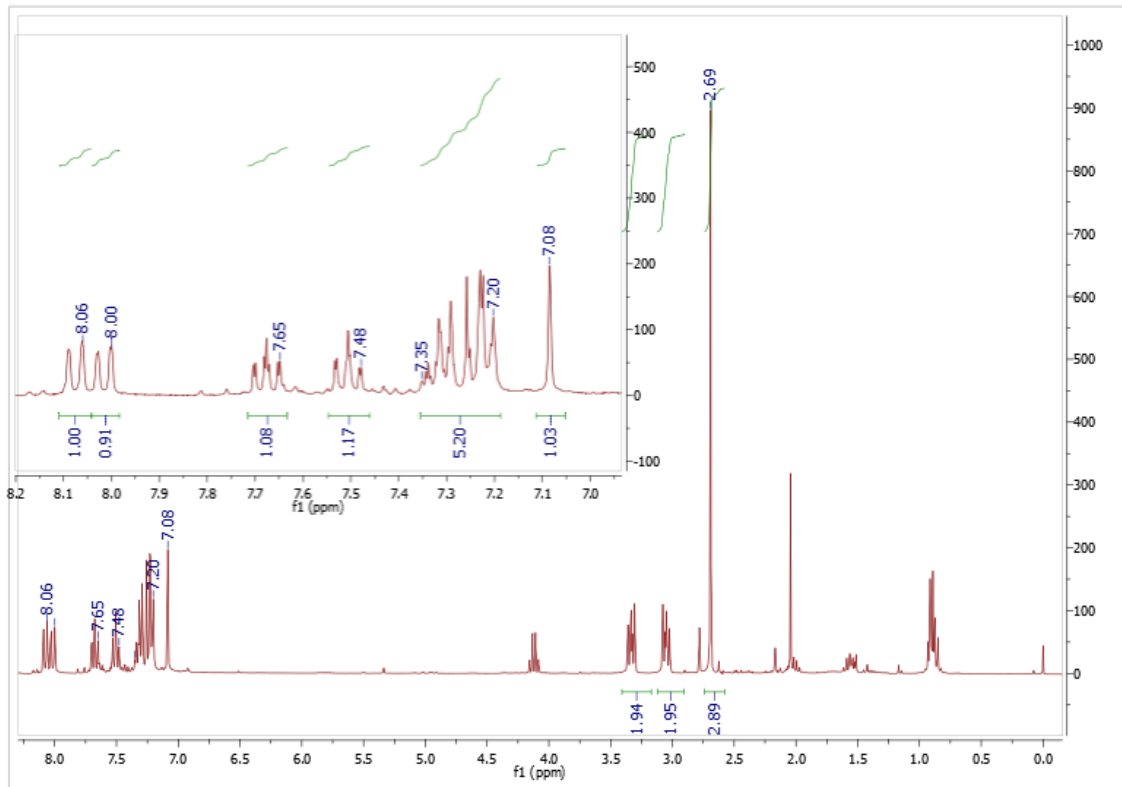
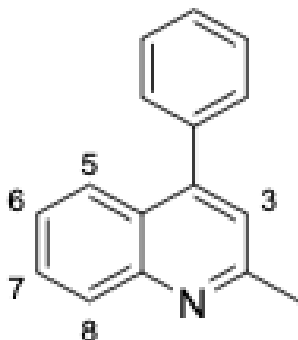


Figura 68. Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-etilfenil-quinolina. (CDCl_3 , 300 MHz):

2-metil-4-fenil-quinolina



Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-fenil-quinolina: H5 (8,08; d, $J = 8,4$; 1H), H8 (7,85; dd, $J = 8,4$ e $0,9$ Hz, 1H), H7 (7,66; ddd, $J = 8,4$; 7,00 e $1,4$ Hz 1H), Hidrogênios fenil e H6 (7,56-7,39; m, 6H), H3 (7,24; s, 1H), Me (2,78; s, 3H).

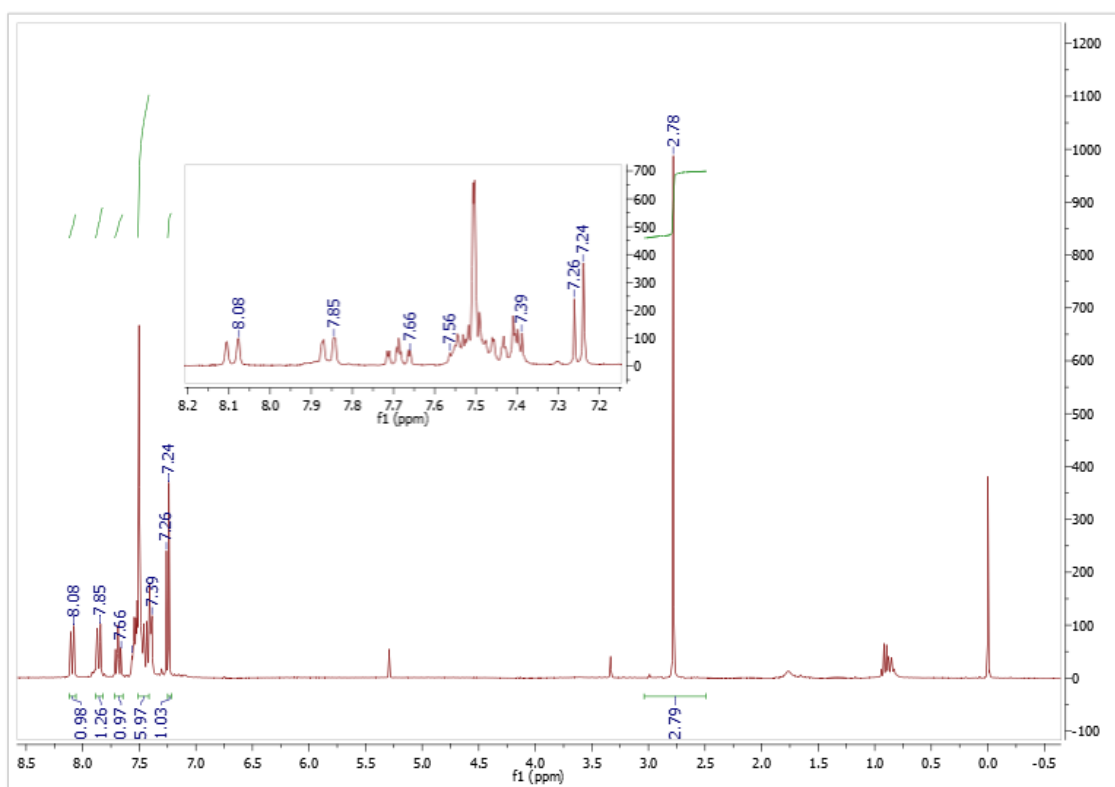
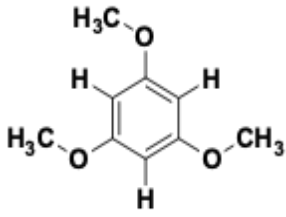


Figura 69. .Espectro de ^1H RMN da molécula 2-metil-4-fenil-quinolina. (CDCl_3 , 300 MHz):



J1-DD-TMB
trimetoxibenzeno
1H CDCl3 (C:\DONNEES-RMN) denise 11

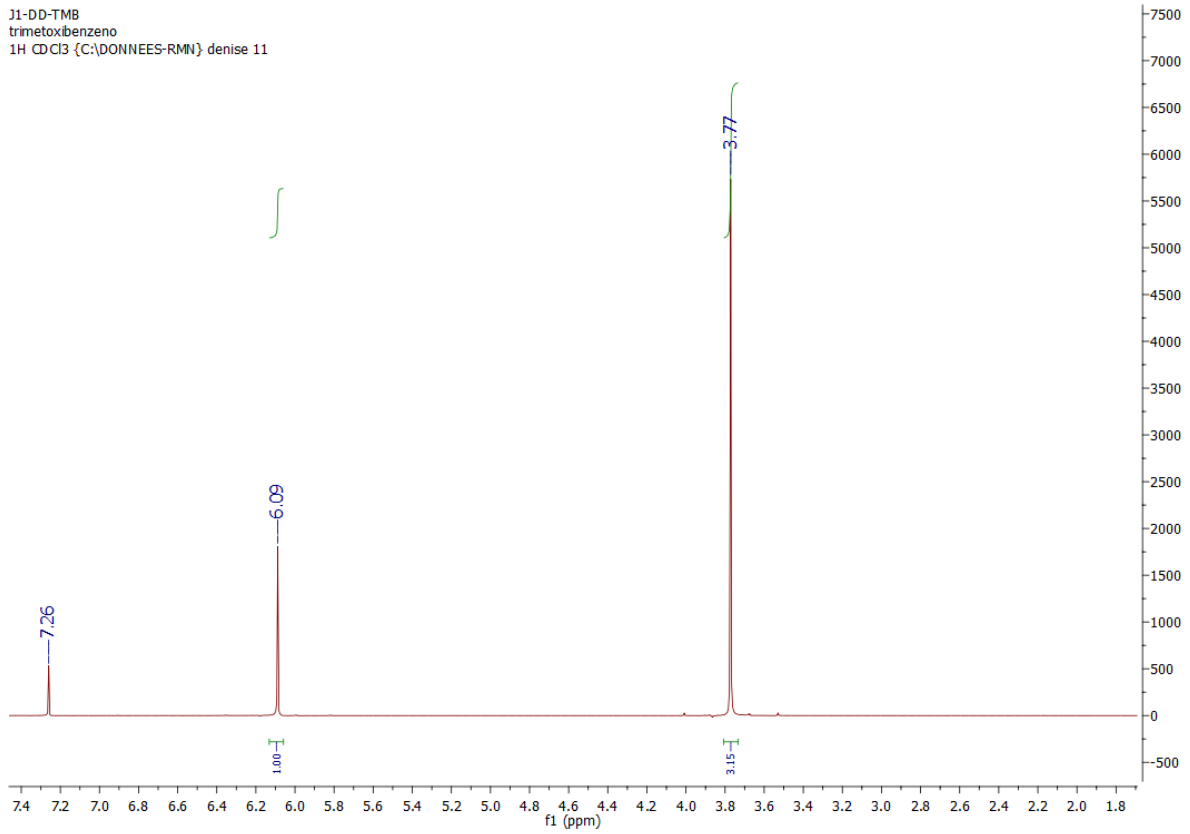


Figura 70. Espectro de ^1H RMN característico da molécula trimetoxibenzeno.