

Este projeto de pesquisa recebeu apoio financeiro da:



2007

EUZÉBIO GUIMARÃES BARBOSA

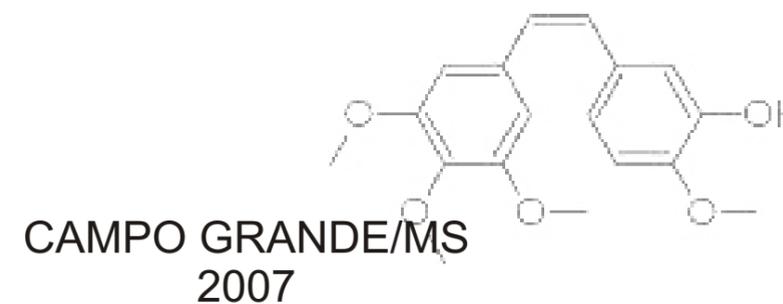
DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR DE LIGANTES FRENTE AO RE
ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA A4 COM GRUPO SEPARADOR ENXOFRE

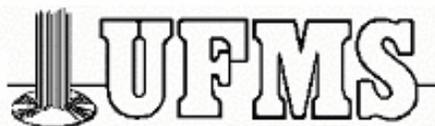


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO - NÍVEL DE MESTRADO EM QUÍMICA

DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR DE LIGANTES FRENTE AO RE & ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA-A4 COM GRUPO SEPARADOR ENXOFRE

EUZÉBIO GUIMARÃES BARBOSA





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Euzébio Guimarães Barbosa

**DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR DE LIGANTES
FRENTE AO RE α
&
ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA-A4 COM GRUPO
SEPARADOR ENXOFRE**

**Campo Grande, MS
2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Euzébio Guimarães Barbosa

**DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR DE LIGANTES
FRENTE AO RE α
&
ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA-A4 COM GRUPO
SEPARADOR ENXOFRE**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica, junto ao programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Dênis Pires de Lima
Co-Orientadora: Profa. Dra. Marcos Serrou do Amaral

Campo Grande, MS
2007

Dedico esse trabalho a minha querida família:

Waldemar Guimarães Barbosa

Olídia Ferreira Barbosa

Oswaldo Guimarães Barbosa

Waldemar Guimarães Barbosa Filho

João Silvério Guimarães Barbosa

Mário Paskoski Guimarães

Agradecimentos

Agradeço os inestimáveis conselhos e incentivos que meu orientador e amigo Prof. Dr. Dênis Pires de Lima, quem fez com que eu acreditasse em mim mesmo e continuasse sempre em frente. Obrigado.

Agradeço imensamente a conflitantes e riquíssimas discussões sobre ciência com o Prof. Dr. Adilson Beatriz.

Agradeço ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery, que me ajudou bastante no laboratório, inclusive dando dicas vitais para o sucesso do meu trabalho.

Agradeço ao meu querido co-orientador Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral por ter me ajudado a enfrentar as dificuldades computacionais que tive.

Agradeço aos alunos de iniciação da época Luiz Augusto Suassuna Bega, Charles Eduardo Mrozinski Zamberlam, Ricardo Vieira de Lima e Jacqueline Marques Petroni pela paciência e companheirismo.

Agradeço imensamente a Felícia Megumi Ito e Prof^ª. Dr^ª. Maria Rita Marques, que me ajudaram a ser uma pessoa melhor, muito obrigado.

Agradeço ao querido Edson dos Santos dos Anjos - que apesar do pavio curto, sempre teve muita paciência comigo no dia a dia do laboratório.

Agradeço as dedicadíssimas trabalhadoras do LP2 que sempre me incentivaram: Ana Camila Micheletti, Aline Siqueira Gianini e Luciana Marçal Ravaglia, sem deixar de mencionar Prof^a. Dr^a. Neli Kika Honda.

E Agradeço à  pelo apoio financeiro. Obrigado.

Índice Geral

Docking e dinâmica molecular de ligantes frente ao RE α	2
Apêndice I	54
Síntese de Análogos da Combretastatina A4	57
Apêndice II	127

Capítulo 1

**Docking e Dinâmica Molecular de Ligantes
frente ao RE α**

Índice

Abreviaturas e Símbolos	5
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução.....	8
1.1 <i>O receptor de estrogênio e o câncer de mama</i>	<i>10</i>
1.2 <i>Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio</i>	<i>12</i>
1.3 <i>Docking Molecular</i>	<i>15</i>
1.4 <i>Dinâmica Molecular.....</i>	<i>17</i>
Uso de docking e dinâmica para o estudos de ligantes no LBD do RE α	20
2. Objetivos	22
3. Material e Métodos.....	24
3.1 Metodologia computacional.....	25
3.2 Ensaio de afinidade do ligante RR02 pelo receptor de estrogênio	28
4. Resultados e Discussão	29
4.1 <i>GW7604.....</i>	<i>31</i>
4.2 <i>GSK5182.....</i>	<i>34</i>
4.3 <i>4-OH-tamoxifeno</i>	<i>35</i>
4.4 <i>RR02</i>	<i>37</i>
4. Considerações Finais e Futuras Perspectivas.....	42
5. Glossário.....	46
6. Referências Bibliográficas	49

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema do RE α , destacando domínios funcionais.	10
Figura 2. Estruturas para do LBD dos RE α e RE β disponíveis no protein databank(Berman, Henrick <i>et al.</i> , 2003). Os RE α aparecem em amarelo e os RE β em azul, ambas as estruturas estão representadas em fitas. Os ligantes são mostrados em vermelho por modelo de espaço preenchido. (A) Complexo formado entre o 17- β -estradiol e o RE α , juntamente com a numeração para as hélices. PDB ID: 1ERE(Brzoowski, Pike <i>et al.</i> , 1997) (B) Complexo formado entre o dietilbestrol (DES) com RE α . PDB ID 3ERD(Shiau, Barstad <i>et al.</i> , 1998). (C) Complexo formado entre a Genisteína e RE β . PDB ID 1X7J(Manas, Xu <i>et al.</i> , 2004). (D) Complexo entre 4-OHT e RE α . PDB ID 3ERT(Shiau, Barstad <i>et al.</i> , 1998). (E) Complexo entre raloxifeno e RE α . PDB ID 1ERR(Brzoowski, Pike <i>et al.</i> , 1997; Shiau, Barstad <i>et al.</i> , 1998). (F) Complexo entre o raloxifeno e RE β . PDB ID 1QKN(Pike, Brzoowski <i>et al.</i> , 1999).....	11
Figura 3. Ligantes do Receptor de Estrogênio: Tamoxifeno, Toremifeno e Raloxifeno e Raloxifeno	13
Figura 4. Posicionamento diferenciado da Hélice 12 (em cinza mais escuro) do LBD que faz com que o RE mobilize correpressores A e coativadores em B.....	14
Figura 5. Interações do 4-OH-tamoxifeno com resíduos chave de interação no LBD do RE alfa.....	15
Figura 6. Estruturas dos ligantes investigados quanto à interação com o LBD do RE α	21
Figura 7. DeepView e a estrutura 3D de cadeias laterais de aminoácidos reconstruídos em róseo.	26
Figura 8. Estruturas sobrepostas dos ligantes GW7604(Azul), GSK5182(Magenta), RR02(Branco) e a estrutura cristalográfica do 4-OH-tamoxifeno(Vermelho).....	30
Figura 9. Valores de RMS para a cadeia principal da proteína e para o ligante durante o período da simulação.....	32
Figura 10. Estruturas 3D que evidenciam a diferença conformacional dos resíduos Asn351 e Lys529 após 600ps de simulação. Em vermelho as coordenadas iniciais da simulação e em magenta as finais.....	33
Figura 11. Valores de RMS para a cadeia principal do RE e do ligante GSK5182 no sítio de ligação.	34
Figura 12. Valores de RMS para a cadeia principal e o ligante 4OHT.	36

Figura 13. Modo de interação energeticamente desfavorável segundo as avaliação de energia do docking molecular.....	37
Figura 14. Conformações mais bem qualificadas pela função escore do AutoDock, cujas conformações se estabeleceram no sítio de ligação do 4OHT (em magenta).	38
Figura 15. Gráficos de valores de RMS para a cadeia principal a esquerda e do ligante no sítio ativo.	39
Figura 16. Interações desforáveis dada a interação de RR02 com o sítio de ligação do 4OHT.....	40
Figura 17. Proposições de modificações estruturais que possivelmente melhorariam a afinidade do ligante RR02 pelo RE α	41

Abreviaturas e Símbolos

4OHT	4-OH-Tamoxifeno
Arg	Arginina
Asp	Asparagina
DBD	Domínio de ligação do DNA
DM	Dinâmica Molecular
E2	Estradiol
Glu	Glutamato
LBD	Domínio de ligação do ligante
RE	Receptor de estrogênio
RE α	Receptor de estrogênio alfa
RE β	Receptor de estrogênio beta
RMS	Desvio quadrático médio
SERM	Modulador seletivo de receptores de estrogênio
AF1	Domínio do Receptor de Estrogênio
GROMACS	Groningen Machine for Chemical Simulations
GROMOS96	Campo de força para gromacs
LIE	Energia de interação linear

Resumo

O receptor de estrogênio é um regulador transcricional ativado por ligantes que media os efeitos fisiológicos dos hormônios ovarianos. Tanto esteróides endógenos como exógenos desempenham um papel importante tanto no desenvolvimento como na progressão do câncer de mama. Os moduladores seletivos de receptores de estrogênio (do inglês: SERMS) são agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento do câncer de mama induzido por hormônios. A compreensão do modo de interação do SERMS análogos ao tamoxifeno com o receptor de estrogênio é de grande importância para o descobrimento de novas estruturas capazes de potencializar essa classe de fármacos. Neste trabalho, apresentamos uma metodologia simples de baixo custo computacional, para estudar a afinidade de ligantes ao receptor de estrogênio alfa ($RE\alpha$). Para o estudo de complexos ligante-receptor e obtenção da energia livre de interação empregou-se, de forma complementar, as metodologias de docking (programa AutoDock) e de dinâmica molecular (programa Gromacs). Em nosso estudo determinamos qualitativamente as energias livres de interação entre os ligantes estudados e $RE\alpha$ e ainda estudamos as peculiaridades dos ligantes relacionados à formação com o complexo no decurso da dinâmica molecular. Pudemos verificar que com o uso do docking e da dinâmica molecular foi possível traçar uma metodologia simples para futuros estudos com intuito de otimizar estruturas de novos ligantes a serem sintetizados.

Abstract

Estrogen receptor is one of the transcriptional regulators activated by ligands that regulate ovarian hormone physiologic effects. Steroids, endogenous and exogenous, play an important role in breast cancer expression and growth. Selective estrogen modulators (SERMs) are agents used to treat breast cancer induced by hormones. In order to know the mode of interaction of SERMs with estrogen receptors is vital to discover novel structures to improve biological activity. In this work we present a simple methodology with low computational cost, to study ligand affinities to estrogen receptor alpha ($RE\alpha$). By combining docking and molecular dynamics, using AutoDock and Gromacs respectively, we managed to carry out simulations to obtain information about the binding site adaptations and free energy of interactions. We managed to identify acceptable free energies of interaction between tamoxifen analogues and $RE\alpha$. In our study we could also expose peculiarities of ligands and binding sites during molecular dynamics simulations. Our methodology is simple enough to be used to further studies on *lead* modifications so as to produce more active compounds against protein targets.

1. Introdução

O receptor de estrogênio (RE) é um regulador transcricional ativado por ligantes que media os efeitos fisiológicos dos hormônio esteroide ovariano 17 β -estradiol (E2). Nos mamíferos, são predominantes os subtipos RE α e RE β , os quais são funcionalmente distintos (Nilsson, Makela *et al.*, 2001). Os hormônios se ligam a porção carboxiterminal dos RE no domínio de ligação de ligantes (LBD, sigla em inglês: *Ligand binding domain*) estabilizam a forma dimérica o que facilita tanto a interação com DNA quanto o recrutamento do aparato de transcrição. Os agonistas do RE induzem ativação da maquinaria basal que se constitui de proteínas ricas em leucina que se ligam ao um sitio de interação específico no LBD dos RE. A interação de antiestrógenos, pelo contrário, faz com que o RE interaja com a maquinaria corressora (Mckenna e O'malley, 2002).

Desde o descobrimento, na década de 1930 que compostos estruturalmente não relacionados ao E2 poderiam mimetizar o seu efeito, os endocrinologistas investigaram a atividade estrogênica de uma vasta gama de compostos naturais e sintéticos. Esses estudos revelaram que inúmeras estruturas podem se ligar ao RE e exercer efeitos agonista e antagonistas. A maioria dos compostos possui um grupo fenol, o qual é um pré-requisito para uma alta afinidade de interação, mas, esses compostos possuem uma variabilidade estrutural bastante diversificada (Fang, Tong *et al.*, 2001). A grande quantidade de estruturas tridimensionais do LBD de alta definição, ligadas a diversos ligantes esteroideais e não-esteroideais, fornece uma nova oportunidade de racionalizar estratégias sintéticas para a produção de novos ligantes.

1.1 O receptor de estrogênio e o câncer de mama

A medida dos efeitos biológicos do estrogênio nos seus tecidos alvo é estimada pela ligação específica às proteínas RE α e RE β (Pearce e Jordan, 2004). A maioria dos compostos da superfamília de receptores hormonais nucleares, os quais incluem receptores de progestinas, glicocorticóides, androgênios, hormônios da tireóide, retinóides e Vitamina D. Assim como outros membros dessa superfamília, RE α e RE β são proteínas modulares, possuindo domínios discretos, os quais carregam funções específicas para suas atividades de fator transcricional regulado por ligantes.

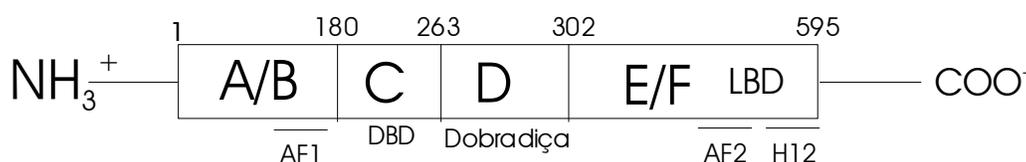


Figura 1. Esquema do RE α , destacando domínios funcionais.

Estudos funcionais e de clonagem indicaram a presença de seis domínios distintos (designados de A até F), os quais são esquematizados na Figura 1. O domínio A/B refere-se à porção amino-terminal a qual se liga a um fator de ativação transcricional independente de hormônios AF1 que está envolvido com interações proteína – proteína e faz a ativação transcricional do gene alvo. O domínio C corresponde ao domínio altamente conservado de ligação ao DNA (DBD, sigla em inglês: *DNA binding domain*) (Schwabe, Chapman *et al.*, 1993). A região D é a região da *dobradiça*, a qual separa o DBD do LBD. A flexibilidade dessa região existe para permitir as mudanças conformacionais na molécula do receptor durante a ativação e dimerização do receptor. A região E/F decodifica o LBD localizado na porção C-terminal dos receptores. Nessa região localiza-se a hélice 12 (H12), que forma um bolso hidrofóbico responsável pela ligação dos E2 ou moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMS, do inglês: *do inglês Selective Estrogen Receptor Modulators*) (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997). O LBD de ambos RE α e RE β também ancora um segundo domínio funcional de ativação transcricional (AF-2), o qual ativa a transcrição dada a ligação do E₂ ou qualquer outro agonista sintético pelo recrutamento e ligação de coativadores pelos receptores (Figura 1,2).

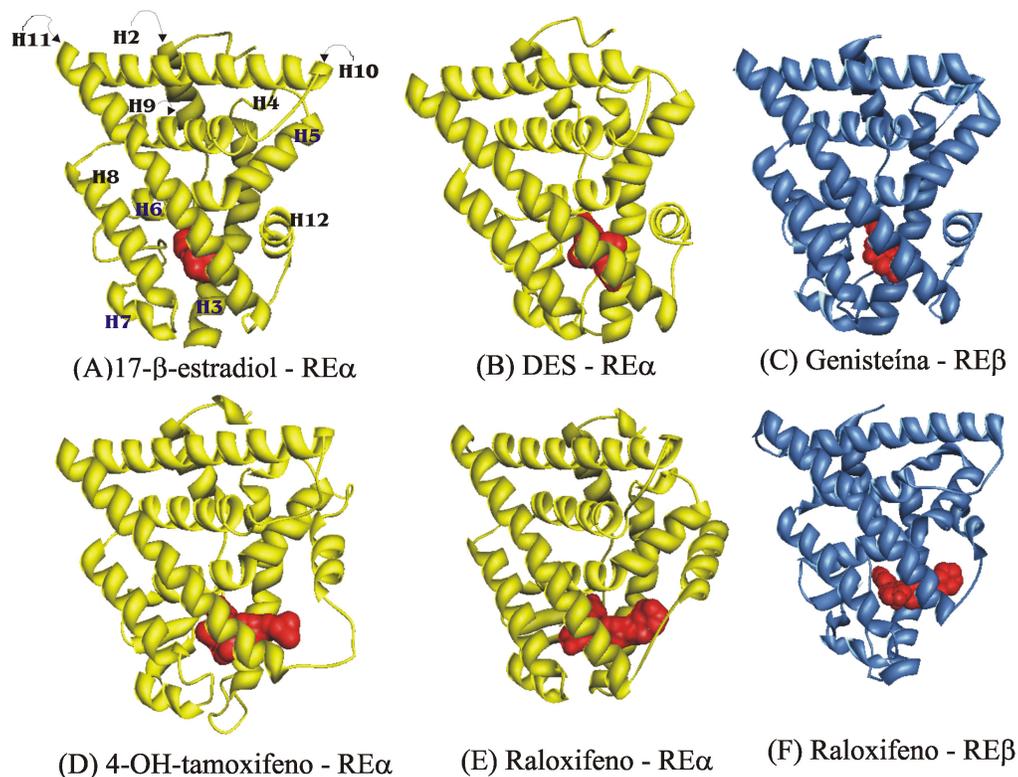


Figura 2. Estruturas para do LBD dos RE α e RE β disponíveis no protein databank (Berman, Henrick *et al.*, 2003). Os RE α aparecem em amarelo e os RE β em azul, ambas as estruturas estão representadas em fitas. Os ligantes são mostrados em vermelho por modelo de espaço preenchido. (A) Complexo formado entre o 17- β -estradiol e o RE α , juntamente com a numeração para as hélices. PDB ID: 1ERE (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997) (B) Complexo formado entre o dietilbestrol (DES) com RE α . PDB ID 3ERD (Shiau, Barstad *et al.*, 1998). (C) Complexo formado entre a Genisteína e RE β . PDB ID 1X7J (Manas, Xu *et al.*, 2004). (D) Complexo entre 4-OHT e RE α . PDB ID 3ERT(Shiau, Barstad *et al.*, 1998). (E) Complexo entre raloxifeno e RE α . PDB ID 1ERR (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997; Shiau, Barstad *et al.*, 1998). (F) Complexo entre o raloxifeno e RE β . PDB ID 1QKN (Pike, Brzozowski *et al.*, 1999).

Existem evidências substanciais de que esteróides ovarianos desempenham um papel importante tanto no desenvolvimento como na progressão do câncer de mama. A probabilidade de desenvolvimento de malignidade é aumentada com a exposição cumulativa a estrógenos endógenos e exógenos (Hankinson e Stampfer, 1997). O câncer de mama foi a primeira doença reconhecida como sendo dependente de estrogênio em 1896, quando o físico britânico George Beatson demonstrou que a ooforectomia induz a redução de tumores mamários num conjunto de mulheres pós-menopausa (Beatson, 1896). Desde então, uma variedade de observações clínicas e epidemiológicas, suportadas por estudos *in vitro* (cultura de células), demonstraram o efeito dos estrógenos no desenvolvimento e progressão da doença (Dorgan, Longcope *et al.*, 1996).

Os estrógenos, por meio de processos mediados pelos RE, estimulam a proliferação de células normais e malignas pela indução da expressão de proteínas envolvidas na síntese de ácidos nucleicos bem como ativam os genes envolvidos na regulação de crescimento. O aumento da proliferação celular pode elevar as chances de erros no reparo do DNA, resultando no aparecimento e acúmulo de mutações. Com o passar do tempo, essas mutações podem contribuir para a transformação de células normais em células neoplásicas. Há evidências de que metabólitos específicos do estrogênio, chamados de catecóis estrógeno-3,4-quinonas são capazes de formar adutos com o DNA os quais podem resultar em mutações que iniciam a formação de tumores (Yue, Santen *et al.*, 2003).

O tumor de mama apresenta uma peculiaridade a qual se refere às estratégias de prevenção e controle. Atualmente visa-se bloquear a ação do estrogênio nas células tumorais por meio de três possibilidades: (a) inibir a ligação do estrogênio ao seu alvo principal, os receptores de estrogênio (RE), usando um antiestrogênio como, por exemplo, o fármaco tamoxifeno (Bezwoda, Derman *et al.*, 1982); (b) prevenir sua síntese usando inibidores de aromatasas (Coombes, Gibson *et al.*, 2003) (c) regulação da expressão gênica dos receptores pela ação de fármacos como o fulvestrant (Robertson, 2002).

1.2 Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio

Os moduladores seletivos de receptores de estrogênio, SERMs, pertencem a uma nova categoria de agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento de doenças tais como osteoporose e câncer de mama (Sadovsky e Adler, 1998). Ao contrário dos estrógenos, os quais são somente agonistas e os antiestrogênos que são uniformemente antagonistas, os SERMs exibem uma farmacologia seletiva não usual: eles são agonistas em alguns tecidos (ossos, fígado e no sistema cardiovascular) e antagonistas em outros (cérebro e mama) e um misto de agonista/antagonista no útero. Na verdade espera-se que os SERMs imitem as benesses dos estrógenos nos ossos e coração mas que ajam como antiestrogênos no útero e mama, conseqüentemente evitando os efeitos danosos nesses tecidos. Três dos mais conhecidos SERMs são o tamoxifeno (Nolvadex®), raloxifeno (Evista®) e toremifeno (Fareston®) como apresentado na Figura 3.

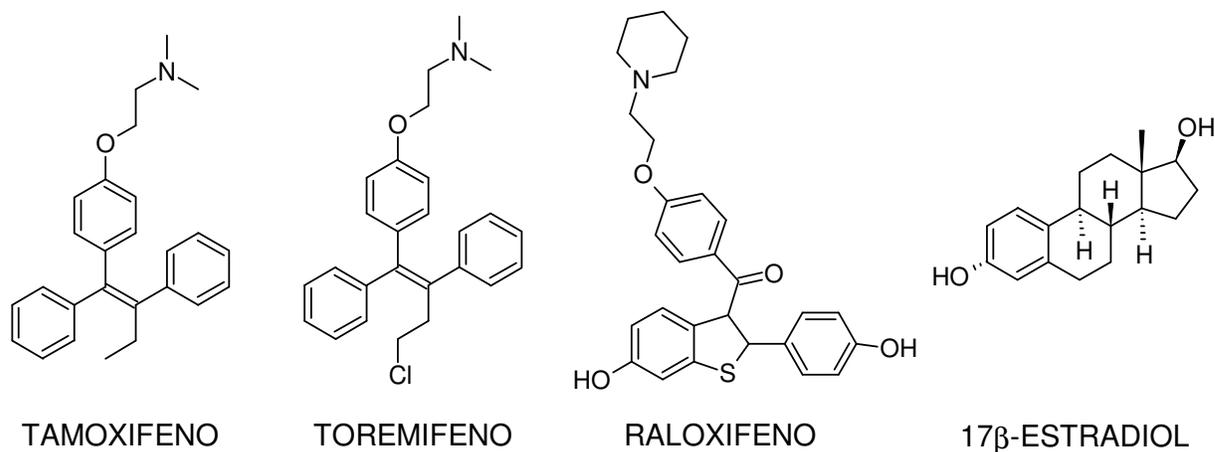


Figura 3. Ligantes do Receptor de Estrogênio: Tamoxifeno, Toremifeno e Raloxifeno e 17β-Estradiol

Pesquisas realizadas com o uso do tamoxifeno mostraram que ele pode aumentar em 10 anos a expectativa de vida de mulheres com câncer de mama cujo *status* dos RE é desconhecido (Group, 1998). Apesar do tamoxifeno ser bem sucedido no tratamento do câncer de mama, ele apresenta efeitos colaterais artificiosos, como eventos tromboembólicos, sintomas vasomotores, e aumento do risco de desenvolvimento de câncer de endométrio e catarata (Bernstein, Deapen *et al.*, 1999). Desde então, vem sendo pesquisados SERMs alternativos sem atividade estrogênica no útero e com menos efeitos colaterais.

Ainda não está totalmente entendido como os SERMs, tais como o tamoxifeno e raloxifeno, podem ser antiestrogênicos em algumas células e estrogênicos em outras. Acredita-se que a maioria dos efeitos farmacológicos dos SERMs pode ser explicada por dois mecanismos interativos: (1) as conformações diferenciadas que o REs assumem ao se associar com ligantes (2) a expressão e ligação diferenciada do RE com proteínas corregulatórias (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997).

Existe a hipótese que SERMs individuais podem induzir mudanças conformacionais específicas e únicas nos receptores, o que corrobora para a ação farmacológica própria em cada tecido alvo (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997). Progressos consideráveis vêm sendo feitos

nos últimos cinco anos no entendimento das conformações moleculares que ocorrem no LBD dos RE α e RE β quando complexados com estrógenos ou SERMs (Figura 4).

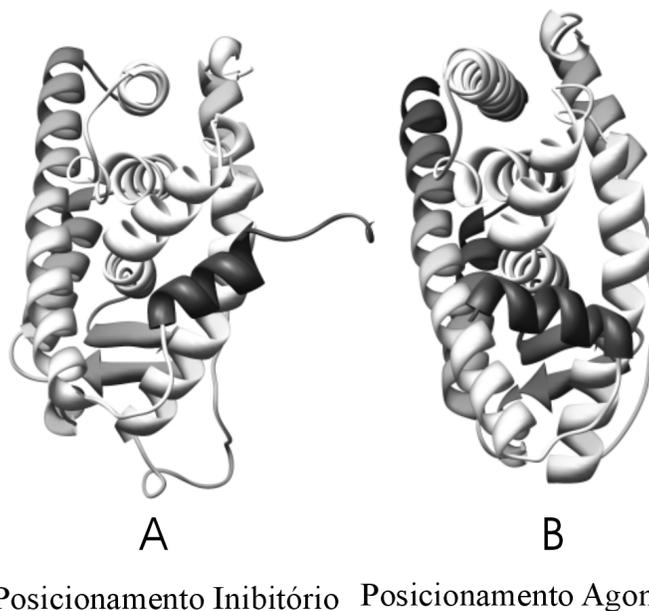


Figura 4. Posicionamento diferenciado da Hélice 12 (em cinza mais escuro) do LBD que faz com que o RE mobilize correpressores A e coativadores em B (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997).

Uma particularidade das estruturas receptoras agonistas estrogênicas é a habilidade do ligante em interagir com um bolso hidrofóbico que está próximo da hélice 12 em um sítio de interação com o ligante do RE α . A maneira como a hélice 12 se posiciona sobre esse bolso hidrofóbico é crucial para o recrutamento de coativadores no sítio AF-2 com subsequente indução da atividade da RNA polimerase. O reposicionamento da hélice 12 depois da ligação do ligante foi proposto como um mecanismo importante para a atividade estrogênica completa no RE α (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997).

Os SERMs bloqueiam a atividade do estrogênio por competir pelo sítio de ligação no receptor, prevenindo conseqüentemente o acesso do estrógeno. Tanto o raloxifeno quanto o 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), metabólito ativo do profármaco tamoxifeno, encaixam-se na cavidade do LBD, projetando a cadeia lateral alquilamino-etoxifenil antiestrogênica prevenindo a reorientação da hélice 12 que deve fixar o ligante dentro do receptor antes que coativadores possam se ligar e produzir um complexo transcricional. Os anéis fenólicos do 4-OHT e do raloxifeno estão localizados no LBD interagindo com os

resíduos análogos aos do anel fenólico A do 17 β -estradiol que interage com Glu353 e Arg394 e a cadeia lateral com Asp351 (Figura 5) (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997).

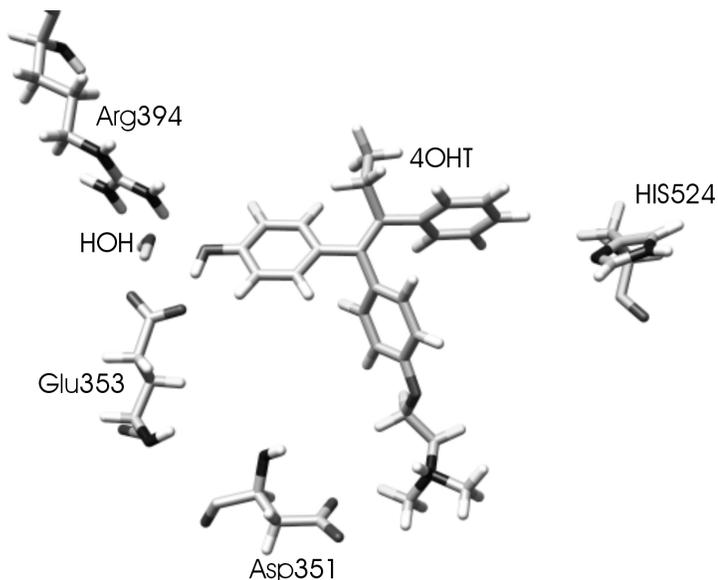


Figura 5. Interações do 4-OH-tamoxifeno (4-OHT) com resíduos chave de interação no LBD do RE alfa.

A compreensão do modo de interação do SERMS análogos ao tamoxifeno com o receptor de estrogênio é de grande importância para o descobrimento de novas estruturas capazes de potencializar os efeitos agonistas benéficos: tratamento da osteoporose (Davidson, 1992) e eliminar os efeitos agonistas indesejáveis como a proliferação celular no útero (Bernstein, Deapen *et al.*, 1999). Para esse fim propomos estudos de docking e dinâmica molecular (DM) a fim de entender e sugerir novas estruturas capazes de interagir com receptores de estrogênio.

1.3 Docking Molecular

O docking molecular é um termo usado para as metodologias computacionais que são usados para encontrar o melhor encaixe entre duas moléculas: ligante e receptor. O desafio do docking molecular pode ser definido como se segue: dadas as coordenadas atômicas das duas moléculas, o programa investiga através da função escore a formação do complexo. Em geral, nenhum dado adicional é fornecido. Na prática, porém, são dadas

informações bioquímicas adicionais; em particular, as características dos sítios de ligação (Halperin, Ma *et al.*, 2002).

Para o docking é necessário essencialmente: (1) representação do sistema, (2) espaço conformacional e (3) classificação das conformações encontradas seguindo parâmetros, geralmente energético, entre a interação da proteína e do ligante.

Existem diversos pacotes de programas para o docking automatizado, nesse projeto foi utilizado o pacote de programas AutoDock 3.0 (Goodsell, Morris *et al.*, 1996). O Autodock foi desenvolvido para fornecer um procedimento automatizado para prever as interações entre ligantes e alvos biomoleculares. Hoje há uma utilização desse pacote computacional para o *designing* de compostos bioativos, em particular aqueles feitos por computador. As estruturas obtidas por cristalografia de raios-X fornecem as estruturas das proteínas e ácidos nucléicos necessários para o processo.

As avaliações a respeito de energias de ligação são conseguidas pelo pré-cálculo dos potenciais de afinidade eletrônica para cada tipo de átomo na molécula do ligante. Com o programa AutoGrid a proteína é embebida na sua estrutura tridimensional por uma grade e um átomo-sonda é colocado em cada ponto da grade. A energia de interação de cada átomo com a proteína é atribuída a cada ponto da grade. As interações eletrostáticas são avaliadas de maneira similar, pela interpolação dos valores de potencial eletrostático baseando-se na eletronegatividade de carga do átomo. O tempo para cálculo de energia é proporcional ao número de átomos do substrato sendo independente do tamanho da proteína. As funções escore do AutoDock e AutoGrid foram baseadas nos princípios do QSAR (relação quantitativa entre estrutura e atividade) e foram parametrizados usando um grande número de complexos de proteína-inibidor para os quais tanto as estruturas e as constantes de inibição K_i eram conhecidas (Goodsell, Morris *et al.*, 1996).

O programa AutoDock tenta encontrar o complexo com a menor energia de interação usando o algoritmo genético Lamarquiano (Morris, Goodsell *et al.*, 1998). Esse algoritmo foi usado para a associação dos ligantes com o receptor. Nesse método os

ligantes são representados como cromossomos e sua translação e orientações em relação ao RE são representadas como genes em um cromossomo. As coordenadas atômicas da proteína em um complexo “ancorado” representam um fenótipo que é analisado por uma função escore que determina a energia de interação e o valor de desvio quadrático médio (RMS) em relação à estrutura inicial gerando assim um ranking de conformações complexadas com a proteína.

O estudo de interações moleculares é um assunto central na bioquímica. O reconhecimento entre ligantes e seus receptores tem papel determinante em todos os processos biológicos. Devido à formidável complexidade combinatória da modelagem da interação entre uma proteína flexível e um ligante flexível, a maioria dos métodos atuais de docking limita suas buscas pela aproximação, fazendo com que os receptores se comportem como corpos rígidos. Essa aproximação limita a aplicabilidade do docking uma vez que não é permitida a adaptação do receptor ao ligante, de acordo como o modelo do encaixe induzido. No intuito de incorporar flexibilidade às proteínas nos métodos de desenho de fármacos, pode-se lançar mão da dinâmica molecular para visualizar, entender e armazenar os aspectos mais relevantes sobre os aspectos dinâmicos da proteína, que influenciam o processo de ligação de ligantes, e assim determinar a afinidade com a qual um fármaco em potencial pode ligar-se ao seu alvo protéico. Isso é muito útil uma vez que não existem técnicas experimentais que permitam a observação das proteínas em escala real de tempo, ao nível atômico, durante o processo de ligação dos ligantes. Nesse sentido será utilizado o pacote computacional GROMACS3.0 (Van Der Spoel, Lindahl *et al.*, 2005), que possui o campo de força para dinâmica molecular GROMOS96.

1.4 Dinâmica Molecular

Dinâmica molecular é procedimento de simulação que consiste do cálculo do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais em sólidos, líquidos ou gases resolvendo numericamente segundo as leis de Newton. As forças que agem sobre os átomos, necessária para simular as movimentações, são geralmente calculadas usando os campos de força da mecânica molecular (Alder e Wainwright, 1957).

As expressões de energia da mecânica molecular (MM) consistem de equações algébricas simples para a energia de um composto. A MM não usa de funções de onda ou da densidade eletrônica. Os parâmetros das equações são obtidos tanto de dados espectroscópicos quanto de cálculos *ab initio*. O conjunto das equações juntamente com suas constantes associadas é chamado de **campo de força**. Um princípio fundamental da mecânica molecular é a transferibilidade de parâmetros, ou seja, uma ligação carbono-carbono tem comportamento muito parecido em quaisquer sistemas análogos. Essas aproximações resultam em cálculos muito mais fáceis que podem ser aplicados a sistemas moleculares grandes, como por exemplo a biomoléculas complexadas a ligantes em solvente água (Alexander, 2004).

Em um campo de força átomos estruturalmente parecidos são denominados por **tipos de átomos**. Isso significa que para carbono sp^3 deve ser descrito por parâmetros diferente dos sp^2 ou sp , o carbono que constitui uma cetona é diferente de um alceno, por exemplo. O campo de força GROMOS96 tem conjuntos de parâmetros pré-estabelecidos para todos os aminoácidos, nucleotídeos e alguns solventes (Van Der Spoel, Lindahl *et al.*, 2005).

As expressões de energia consistem da soma de simples funções clássicas. Essas funções descrevem vários aspectos de uma molécula, tal como o movimento em mola das ligações, flexão e extensão de ângulos e torções, termos de interações eletrostáticas, van der Waals e ligações de hidrogênio. Os campos de força diferem em número de termos na expressão de energia e na complexidade desses termos, e na maneira com que as constantes são obtidas (Tabela 1). Devido ao fato de que o modelo é essencialmente clássico, fenômenos relacionados a processos envolvendo elétrons, como estudos de estados excitados e reações químicas, não podem ser simulados apropriadamente.

Tabela 1. Termos comuns de um campo de força

Nome	Uso	<i>Termo de Energia</i>
Harmônico	Estiramento de ligações	$k \frac{1}{2} (l - l_0)^2$
Harmônico	Flexão de ângulos	$k \frac{1}{2} (\theta - \theta_0)^2$
Co-seno	Torsões	$k[1 + \cos(n\theta)]$
Lenard-Jones 6-12	van der Waals	$4k \left(\frac{A}{r} \right)^{12} - \left(\frac{B}{r} \right)^6$
Lenard-Jones 10-12	van der Waals	$4k \left(\frac{A}{r} \right)^{12} - \left(\frac{B}{r} \right)^{10}$
<i>Coulomb</i>	<i>Eletrostática</i>	$\frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r}$

l – comprimento de ligação, θ – ângulo de ligação, k , A, B – constantes particulares dos elementos num certo estado de hibridização; r – distância não ligada; q - carga (Young, 2001).

O *groningen molecular simulation* (GROMOS96) é o nome do campo de força implementado no programa GROMACS (Van Der Spoel, Lindahl *et al.*, 2005).

A dinâmica molecular é uma das técnicas computacionais mais versátil e aplicável para o estudo das macromoléculas biológicas (Hansson, Oostenbrink *et al.*, 2002). Tais simulações são de grande utilidade para entender o comportamento dinâmico de proteínas em diferentes escalas de tempo, de movimentações internas rápidas bem como de mudanças conformacionais lentas ou até mesmo processo de enovelamento (Snow, Sorin *et al.*, 2005).

O docking pode ser combinado com os métodos de dinâmica molecular para prever com mais precisão os complexos entre ligante e proteína. As técnicas de docking são usadas para explorar o enorme espaço configuracional dos ligantes e a DM pode tratar a

proteína e ligante de forma flexível. Além disso, os efeitos explícitos do solvente podem ser usados diretamente e ainda podem ser obtidos dados sobre a energia livre de interação com grande exatidão. Porém ainda há alguns problemas com a dinâmica molecular, como o grande consumo de tempo para as simulações. Contudo a combinação das duas técnicas em um protocolo onde é usado o docking e dinâmica molecular é uma excelente estratégia para o desenvolvimento de novos ligantes no processo do planejamento de fármacos (Alonso, Bliznyuk *et al.*, 2006).

Uso de docking e dinâmica para o estudos de ligantes no LBD do RE α

Para realizar estudos sobre simulações de docking e dinâmica molecular com ligantes estruturalmente próximos ao tamoxifeno selecionou-se: o GW7604 (Bentrem, Dardes *et al.*, 2001), o GSK5182 (Chaoa, Collinsa *et al.*, 2006) e o próprio 4-OH-tamoxifeno, todos ligantes com afinidades pelo RE α diferenciadas. GSK5182 tem menor afinidade pelo LBD e GW7604 tem maior afinidade quando comparadas ao ΔG do 4OHT (Figura 6).

Juntamente com ligantes GW7604 e GSK5182 e o próprio 4OHT foram realizadas simulações com o ligante RR02 (Figura 6), sintetizado por Rotta e colaboradores (Rotta, 2005). em trabalho anterior com sendo um análogo não fenólico do resveratrol possuindo apenas o mesmo esqueleto estilbênico. Tal composto foi aleatoriamente sugerido para agir de forma semelhante ao resveratrol no RE α .

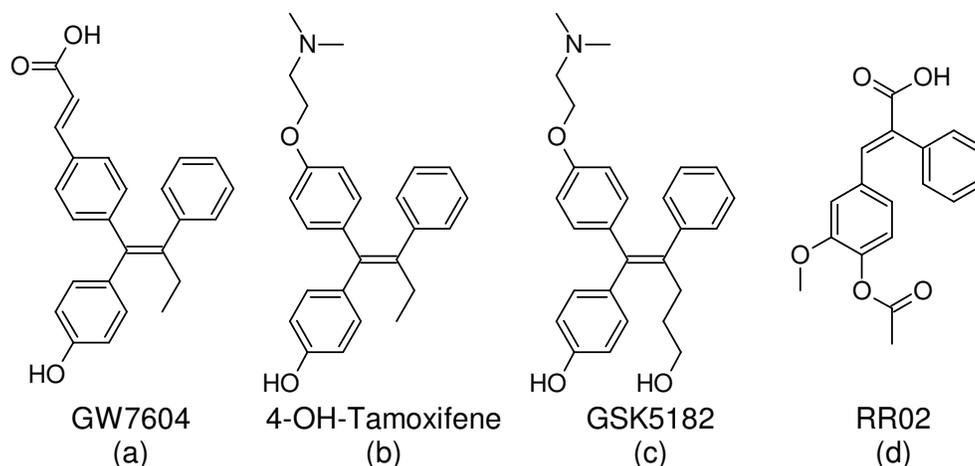


Figura 6. Estruturas dos ligantes investigados quanto à interação com o LBD do RE α

Embora foi constatado que não apresentava atividade sobre células de câncer de mama, e nem RE.(Rotta, 2005), o RR02, contudo, pode ser empregado para testar a metodologia empregada. Dessa forma pode-se constatar a razão da molécula RR02 possuir baixa afinidade pelo RE α e quais seriam as possíveis modificações estruturais que poderiam ser empregadas para melhorar a atividade.

Esse tipo de estudo já vem sendo utilizado para avaliar diversos ligantes agonistas frente ao RE α (Oostenbrink, Pitera *et al.*, 2000; , 2001; Vanlipzig, Terlaak *et al.*, 2004). A metodologia combinada de docking e dinâmica molecular aplicada ao estudo de SERMs nesse sentido de ligação do tamoxifeno ainda não foi realizada pela comunidade científica, sendo assim uma boa oportunidade para avaliar a aplicabilidade do método pelo uso de ligantes distintos, apresentados na figura 6.

2. Objetivos

2.1) Realizar estudos teórico-computacionais, aplicando técnicas de docking e dinâmica molecular voltada para estudos dos mecanismos de interação de ligantes (análogos de tamoxifeno e de resveratrol) frente ao receptor de estrogênio alfa.

2.1) Direcionar a síntese orgânica de novos antiestrógenos, propondo novas estruturas químicas baseando-se nos resultados dos estudos computacionais realizados.

3. Material e Métodos

Metodologia computacional

Para a realização dos estudos de docking e dinâmica molecular, bem como para a criação de modelos para os ligantes e receptores foram utilizadas quatro máquinas Pentium IV do laboratório de modelagem molecular (LAB2M-UFMS), coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral.

As estruturas dos modelos moleculares para os ligantes foram criadas com o programa Ghemical 1.01-2 (Hassinen e Peräkylä, 2001) e otimizadas com o nível de teoria semiempírico AM1 (Dewar, Zoebisch *et al.*, 1985) para que se obtivesse uma melhor representação dos ligantes. A topologia dos ligantes foi definida pelas ferramentas do programa AutoDockTool, usando cargas de Gasteiger. Todos os ligantes foram ancorados à proteína rígida usando o programa AutoDock (Goodsell, Morris *et al.*, 1996). As conformações ancoradas, que apresentaram grande semelhança conformacional com a estrutura do ligantes 4OHT cristalografada foram utilizadas como passo inicial para as simulações de dinâmica molecular. A topologia dos ligantes foram primeiramente criadas utilizando o servidor Dundee Beta (Schuttelkopf e Van Aalten, 2004), e as cargas re-atribuídas baseando-se nos resultados de análise populacional ChelpG (Curt M. Breneman, 1990) encontradas em cálculos de *single point* com o nível de teoria B3LYP/6-31* implementado no programa Gaussian'03 (Frisch, Trucks *et al.*, 2004).

A estrutura do complexo entre o LBD do receptor de estrogênio alfa foi adquirida junto ao *protein databank* (Berman, Henrick *et al.*, 2003) tendo como código 3ERT (Shiau, Barstad *et al.*, 1998). As cadeias não resolvidas ou resíduos de aminoácidos ausentes no modelo foram reconstituídas usando modelagem por homologia por meio do programa DeepView (Guex e Peitsch, 1997). O programa DeepView usa algoritmos de modelagem por homologia para reconstruir segundo a seqüência primária de aminoácidos, a estrutura terciária arquivos de PDB com imprecisões derivadas de estudos de cristalografia de raios-

X. A figura 7 abaixo demonstra em cor róseo resíduos reconstruído pelo programa DeepView.

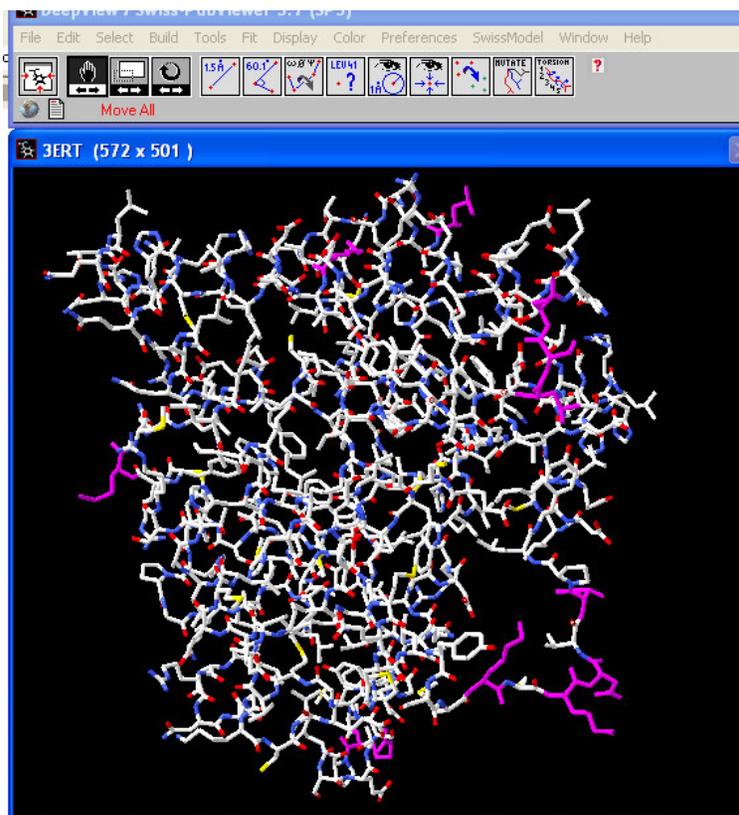


Figura 7. DeepView e a estrutura 3D de cadeias laterais de aminoácidos reconstruídos em róseo.

Os arquivos de PDB 3ERT, sem as coordenadas para os átomos de hidrogênios foram reconstruídos levando em conta padrões de protonação dos resíduos implementados pelo programa DockPrep parte do pacote UCSF Chimera 1.2304 (Pettersen, Goddard *et al.*, 2004). A estrutura editada foi então preparada para o docking com o programa AutoDockTools 3.0.5 (Goodsell, Morris *et al.*, 1996). Após o docking o complexo julgado mais apropriado, entre cada ligante e o RE α , foi usado como ponto de partida para simulações de dinâmica molecular com o campo de força GROMOS96 implementado no programa GROMACS (Van Der Spoel, Lindahl *et al.*, 2005). As trajetórias geradas foram analisadas com o programa VMD (Humphrey, Dalke *et al.*, 1996).

Definidos as estruturas iniciais para a dinâmica molecular, foi realizada a solvatação em caixas cúbicas (500nm³) e condições periódicas de contorno usando modelo de água

SPC/E. As caixas foram otimizadas duas vezes: (1) utilizando o algoritmo *steepest descent* e, em seguida, com (2) o algoritmo *l-bfgs*, para que fosse alcançada a convergência para um mínimo de energia. Depois de otimizado, o sistema foi submetido à uma dinâmica de 100ps (passo do tempo 0,001ps) com as coordenadas dos átomos da proteína com posições restritas para relaxar o sistema, para então ser simulada em 600ps com passo de tempo 0,002ps à 300K com acoplamento térmico de Berendsen usando o tratamento eletrostático do Reaction Field ($\epsilon = 54$), o valor da constante dielétrica de 54 foi sugerida com uma boa alternativa para o tratamento da aproximação de *Reaction Field* por Batista e outros (Batista, Wilter *et al.*, 2006), bem como o uso de raios de *cutoff* de 1,2nm para as interações eletrostáticas e de 1,4nm para interações do tipo Lenard-Jones. Informações com as coordenadas atômicas e velocidades foram armazenados a cada 10ps. Condições semelhantes foram empregadas para a simulação dos ligantes livres em água. (Os arquivos de entrada com os parâmetros dos procedimentos de dinâmica molecular se encontram no Apêndice I).

Depois de finalizadas as simulações as trajetórias foram analisadas para investigar a estabilização do sistema por meio dos valores de desvio quadrático médio (RMSd) das posições da cadeia principal da proteína, bem como dos ligantes no sítio ativo. A partir do ponto de determinação do momento em que o sistema supostamente entra em “equilíbrio” dos valores de RMS para os ligantes nos sítios ativos, as avaliações da energia livre de interação de cada ligante foram obtidas pela metodologia de LIE (do inglês: *Linear Interaction Energy*)(Aqvist, Medina *et al.*, 1994), onde o ΔG pode ser obtido por:

$$\Delta G_{bind} = \alpha(E_{ligado}^{vdW} - E_{livre}^{vdW}) + \beta(E_{ligado}^{elet} - E_{livre}^{elet}) - \gamma, \quad (1)$$

onde ΔG_{bind} é a diferença de energia entre interações eletrostática e hidrofóbicas do ligante em água (na forma livre), e no sítio ativo (em complexo com a proteína). Os valores de α e β forma valores padrão de 0,18 e 0,5 respectivamente. O valor de γ então ajustado ao valor de energia livre do 4OHT, 42 kcal/mol (Van Lipzig, Ter Laak *et al.*, 2004).

Ensaio de afinidade do ligante RR02 pelo receptor de estrogênio

Os testes de avaliação da afinidade de RR02 pelos RE alfa e beta foram realizados por Kathryn Carlson, do departamento de química, fisiologia e biologia estrutural celular da universidade de Illinois, Estados Unidos.

Para determinar a afinidade relativa do ligante RR02 foram usados 10 nM de [³H]estradiol (composto com trítio) e citosol uterino de cabra (contendo principalmente RE α). A incubação foi de 18-24 hora à 0°C. Dextrana-carvão ativo foi usado para adsorver o ligante livre e granuloso por centrifugação e RE-hidroxiapatita foi usado para absorver os complexos, os ligantes livres foram eliminados. A afinidade de ligação é expressa com afinidade de ligação relativa com assumindo para o estradiol 100% (Frasor, Stossi *et al.*, 2004).

4. Resultados e Discussão

Para se otimizar o estudo do ligante RR02 foram realizadas simulações de dinâmica molecular com ligantes muito próximos à estrutura do tamoxifeno: o GW7604 (Bentrem, Dardes *et al.*, 2001) e o GSK5182 (Chaoa, Collinsa *et al.*, 2006) e o próprio 4-OH-tamoxifeno. Estes ligantes têm afinidade pelo RE α diferenciadas, embora as estruturas sejam bastante parecidas com o 4OHT. GSK5182 tem menor afinidade pelo LBD e GW7604 tem maior afinidade quando comparadas ao ΔG_{bind} do 4OHT (Tabela 2).

As estruturas dos ligantes em estudo (Figura 6) foram ancoradas ao LBD do RE α no espaço configuracional, no qual foi calculada a grade de interação, com bastante similaridade à conformação do 4-OH-tamoxifeno mostrado em vermelho na Figura 7. Essas estruturas foram utilizadas como ponto de partida para as simulações de dinâmica molecular.

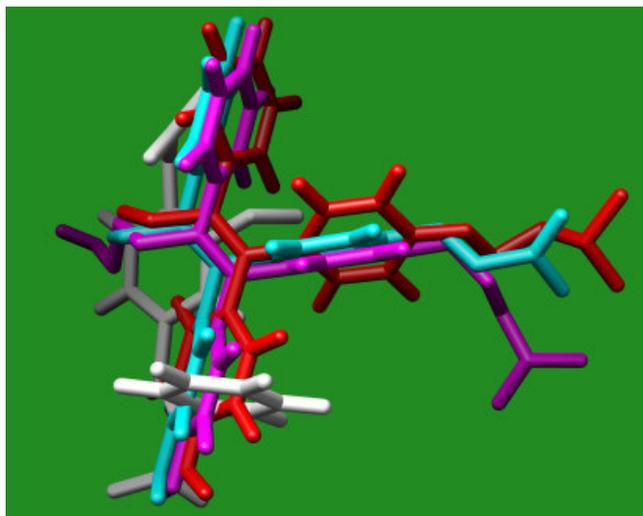


Figura 8. Estruturas sobrepostas dos ligantes GW7604(Azul), GSK5182(Magenta), RR02(Branco) e a estrutura cristalográfica do 4-OH-tamoxifeno(Vermelho).

As energias livres de interação foram obtidas pelo método de LIE e são apresentados na tabela 2. Observa-se uma boa concordância entre os dados experimentais encontrados na literatura. O RR02 seria um mau ligante para o LBD do RE α , dado que foi confirmado experimentalmente com RE α e RE β afinidade de apenas 0,001% em relação ao

17 β -estradiol 100%. São mostradas ainda na tabela as contribuições de energia de van der Waals (E_{livre}^{VdW}) e eletrostática (E_{livre}^{elet}) utilizadas para o cálculo de ΔG .

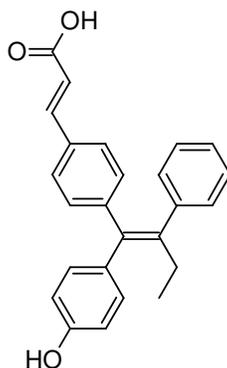
Tabela 2. Energias de van der Waals e Coulomb do solvente e energia livre de interação calculada e experimental para a interação RE α .

Ligante	Média ΔG_{bind} (calculado)*	ΔG_{bind} (experimental)*
RR02	+43.510	Muito grande para determinar
GW7604	-2.622	-3.503
4OHT	-0.246	-0.48
GSK5182	+15.926	+7.68

*Valores em kcal/mol

As simulações com cada um dos ligantes estudados mostraram peculiaridades que notadamente podem ser enumeradas. A seguir é descrito o comportamento dos ligantes no LBD do RE α , destacando o modo de interação diferenciado em relação ao 4OHT e ainda destacando os pontos cruciais de interação determinantes da afinidade pelo RE α ilustrada pelo ΔG_{bind} da Tabela 2.

4.1 GW7604



GW7604 é um produto de síntese e ficou constatado que ele apresenta maior afinidade pelo RE α que o 4OHT (Bentrem, Dardes *et al.*, 2001). Além disso, apresentou uma certa diminuição no caráter estrogênico, sendo alternativa para o problema da proliferação de células endometriais ocasionada pela ação estrogênica do 4OHT (Bernstein, Deapen *et al.*, 1999).

Os valores de desvio quadrático médio (RMS) das posições relativas à estrutura de partida para as simulações de dinâmica molecular foram usados para determinar a estabilização do sistema em que o GW7604 substitui o 4OHT no LBD do RE α . Os gráficos apresentados na Figura 8 mostram que, apesar de não cessar a tendência de aumento dos valores de RMS para a cadeia principal esse valor para o ligante se mantém quase que inalterado durante toda a simulação. Isso mostra que a cavidade na qual GW704 foi ancorado demanda pequena necessidade de adaptação do complexo GW7604-LBD. O valor de ΔG de interação mostrado na Tabela 2, mostra uma boa concordância com o resultado experimental.

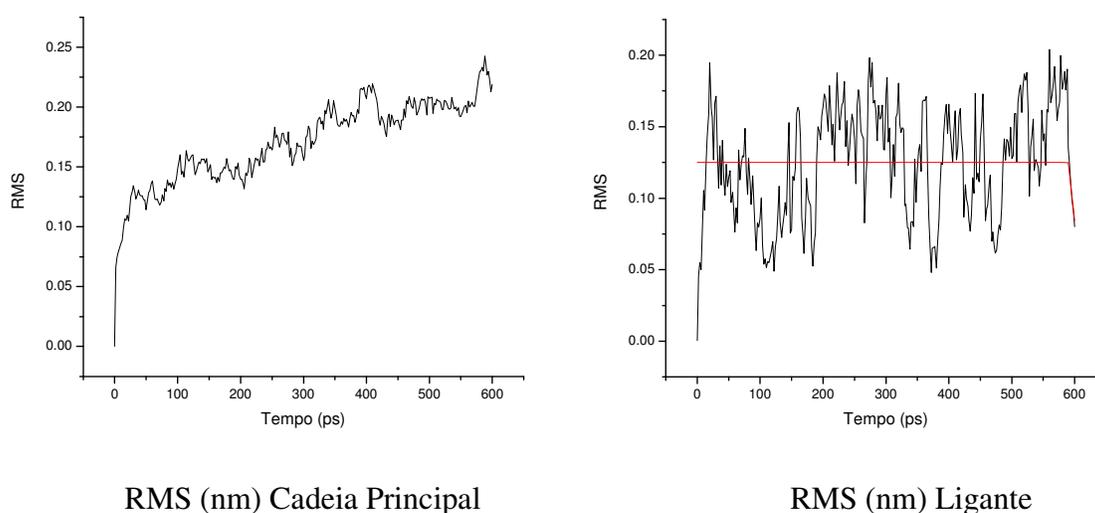


Figura 9. Valores de RMS para a cadeia principal da proteína e para o ligante durante o período da simulação.

O composto GW7604, ao contrário de muitos análogos do tamoxifeno, não possui a cauda alquilamino-etoxifenila. A cadeia lateral carboxílica revelou, a partir de cálculos realizados por seus idealizadores, a capacidade de agir como SERMs, prevenindo o posicionamento da H12 sobre o sítio AF-2 do RE não pela atração do Asn351, mas sim o repelindo e impedindo assim, a atração da hélice H12. De fato, observou-se nas simulações realizadas o afastamento do resíduo Asp351 como já previsto por Bentrem, D. e colaboradores (Bentrem, Dardes *et al.*, 2001). No entanto, observa-se que interessantemente houve a atração, bastante substancial do resíduo Lys529, pertencente ao final da H11. Esse

fenômeno, juntamente com a repulsão de Asp351 pode fornecer alguma pista para elucidar os mecanismos da ação moduladora de GW7604.

A estrutura tem afinidade de ligação pelo RE muito próxima ao 4OHT. Segundo a literatura a substância tem afinidade de interação por RE α puros é cerca de 10 vezes maior (Wijayaratne, Nagel *et al.*, 1999). O que é compatível com o ΔG obtido para esse ligante pelo método LIE (Tabela 2).

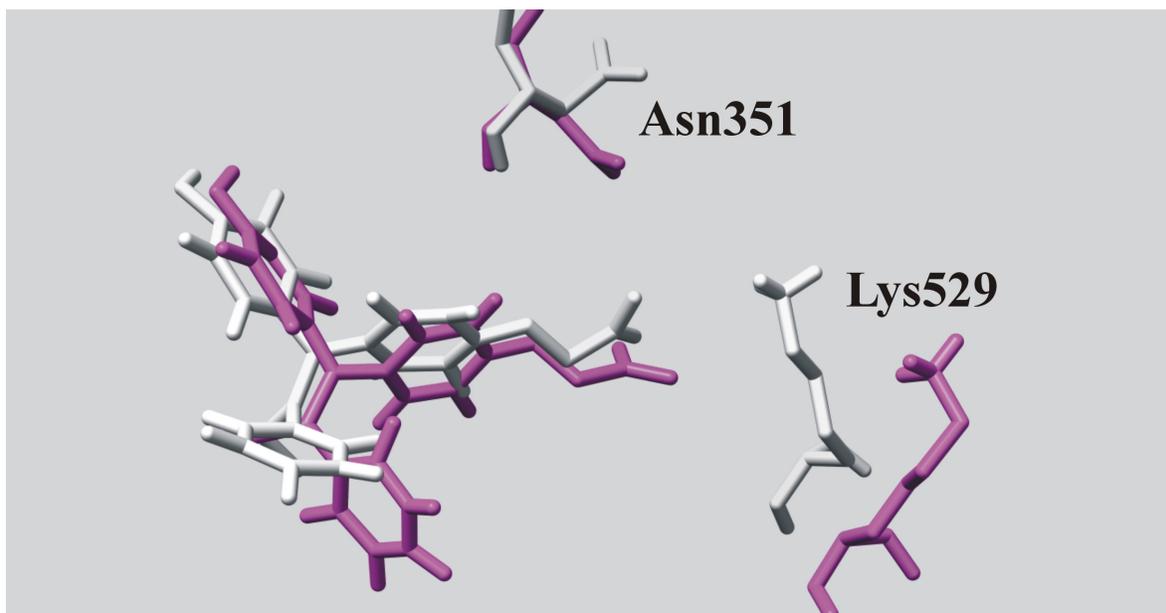
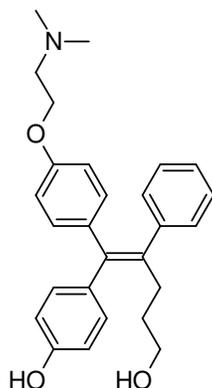


Figura 10. Estruturas 3D que evidenciam a diferença conformacional dos resíduos Asn351 e Lys529 após 600ps de simulação. Em vermelho as coordenadas iniciais da simulação e em magenta as finais.

4.2 GSK5182



O ligante GSK5182 (Chaoa, Collinsa *et al.*, 2006) foi sintetizado para ser um ligante de alta afinidade para o RE γ , um subtipo menos comum, possuindo uma calda com uma hidroxila terminal que foi idealizada para aproveitar as diferenças estruturais em certos resíduos desse receptor em detrimento à RE α . Espera-se, portanto, que GSK5182 apresente energia de interação calculada com o método LIE mais alta. O que de fato é observado (Tabela 2), com energia livre de interação +15.926.

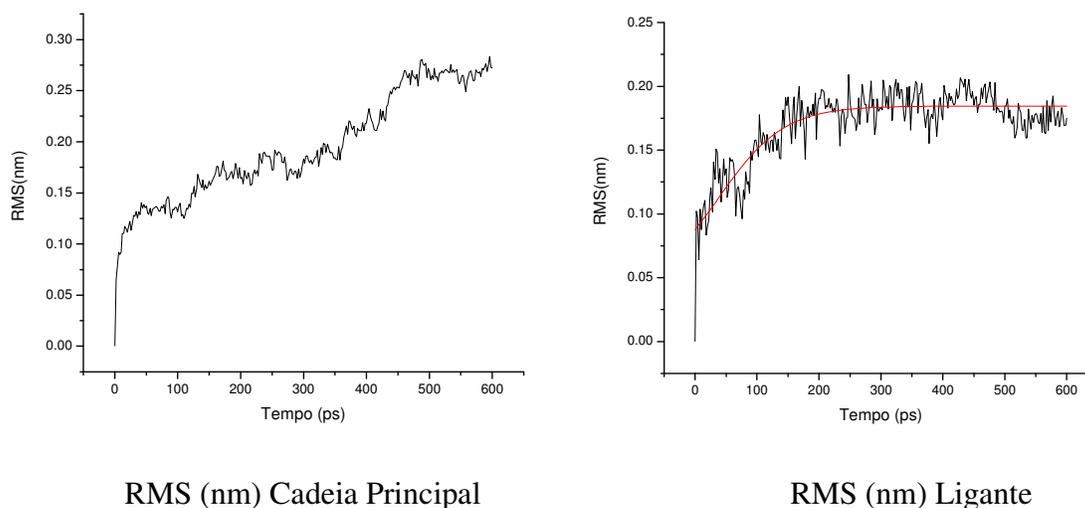


Figura 11. Valores de RMS para a cadeia principal do RE e do ligante GSK5182 no sítio de ligação.

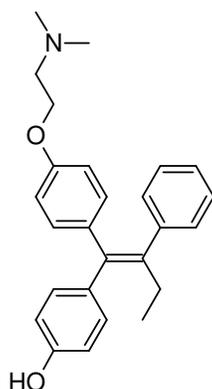
GSK5182 pode realizar ligações de hidrogênio com Tyr326 e Asn346, isso faz com que esse ligante tenha alta afinidade pelo RE γ . Com RE α esse dois resíduos são homólogos à duas fenilalaninas. Dessa forma a hidroxila terminal dessa cadeia não pode efetivamente

realizar interações fortes com essa duas fenilalaninas fazendo com que a energia livre de interação se torne mais elevada que para o 4OHT e GW7604.

O valor de RMS durante a simulação estabilizou após 250ps (Figura 11). A partir desse período é que foram considerados os parâmetros energéticos para a determinação da energia livre, já que os valores de RMS para a cadeia principal não apresentaram tendência de estabilização.

O cálculo da energia livre mostrou que GSK5182 não seria um bom ligante para interagir com RE α e sim para o RE γ , para o qual foi sintetizado.

4.3 4-OH-tamoxifeno



Como era de se esperar os valores de RMS para o ligante no sítio ativo têm apenas um ligeiro aumento de valor (Figura 12), mas mesmo assim menor que os outros ligantes. Os dados necessários para obtenção da energia livre de interação foram obtidos pelo método LIE foram coletados após 300ps de simulação.

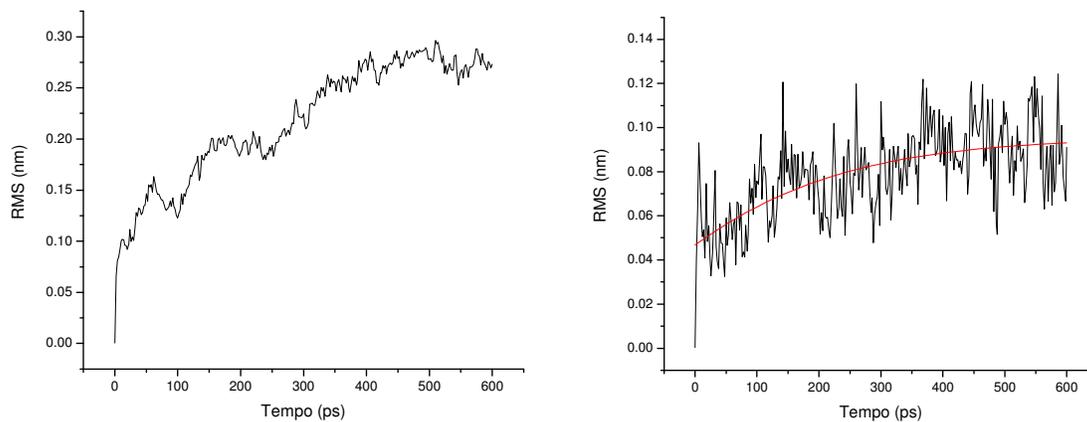
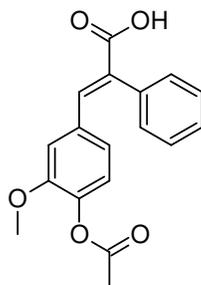


Figura 12. Valores de RMS para a cadeia principal e o ligante 4OHT.

Essa simulação foi usada para obter o valor de γ para equação de LIE usada para determinar os outros valores de ΔG da interação de RE α com os outros ligantes.

4.4 RR02



A investigação do possível modo de interação de RR02 exigiu uma criteriosa avaliação das estruturas ancoradas ao sítio ativo, já que este se trata de um ligante sem as características estruturais que possibilite o imediato reconhecimento do modo de interação. São aceitáveis dois modos de interação (Figura 13), onde o ligante pode aportar o grupo acetil para os resíduos chave de interação, Arg395 e Glu353, e apontando a carboxila para interagir com His524 e vice versa (Figura 14).

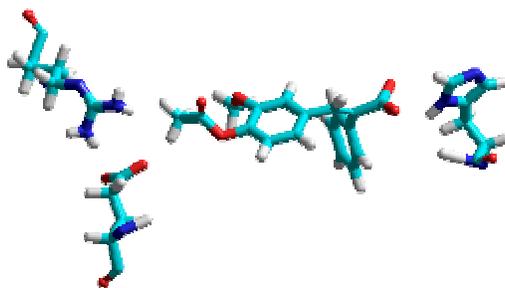
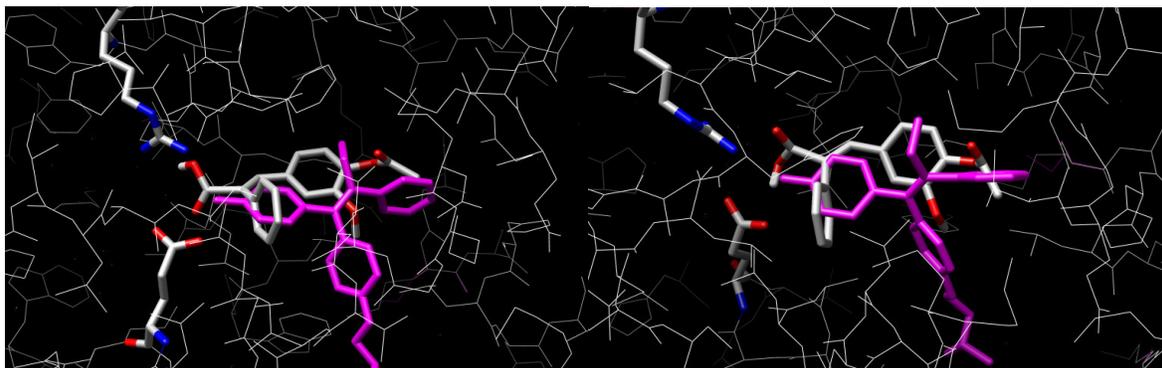


Figura 13. Modo de interação energeticamente desfavorável segundo as avaliação de energia do docking molecular

A conformação mostrada na Figura 13, apesar de ser indicada com uma conformação desfavorável para a interação com os resíduos-chave, foi simulada por dinâmica molecular. As simulações mostraram que o grupo acetila tende a manter-se na conformação mais estável dentro do sítio ativo ocasionando a retração e conseqüentemente a perda do contato com o Arg395 e Glu353.

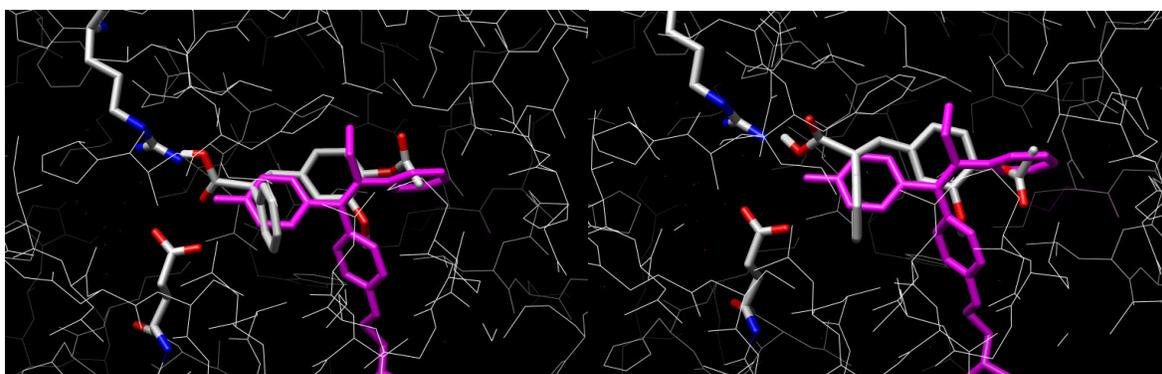
A conformação mais favorável identificada pelo docking molecular foi aquela inversa à apresentada na Figura 14 onde a carboxila aponta para o resíduo de arginina (Figura 14). Diversas conformações muito semelhantes (baixos valores de RMSd) foram encontras para a interação de RR02 no sítio de ligação do 4OHT, a conformação

energeticamente mais favorável foi tomada como o ponto de partida para as simulações de dinâmica molecular.



A. -7.55 kcal/mol

B. -7.50 kcal/mol



C. -5.81

D. -4.58 kcal/mol

Figura 14. Conformações mais bem qualificadas pela função escore do AutoDock, cujas conformações se estabeleceram no sítio de ligação do 4OHT (em magenta).

Na simulação o ligante RR02 mostrou, ao contrário das outras simulações, uma estabilização dos valores de RMS para a cadeia principal da proteína após 250ps, muito provavelmente devido ao fato da ausência da cadeia alquilamino-etoxifenil. Contudo fica claro na Figura 15 que os valores de RMS do ligante no sítio ativo não sofrem, durante o período de 600ps de simulação uma estabilização considerável.

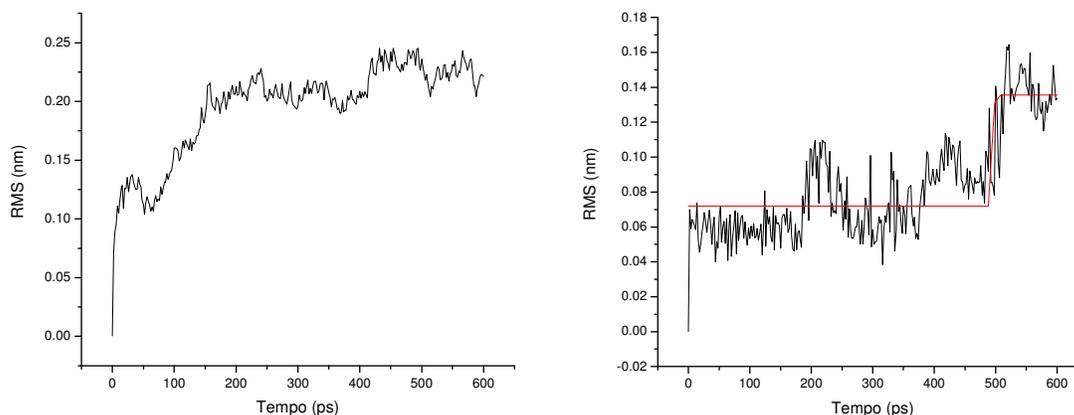


Figura 15. Gráficos de valores de RMS para a cadeia principal a esquerda e do ligante no sítio ativo.

As estabilizações dos valores de RMS para a cadeia principal foram suficientes para constatar que o sistema já havia entrado em equilíbrio. Contudo, durante as simulações de dinâmica molecular os resíduos do interior do sítio ativos sofreram diversas alterações para se adaptar a presença do novo ligante. Um das mudanças mais significativas é aquela acarretada pela repulsão das carbonilas e a coroa de elétrons π (Figura 15), do ligante e do resíduo Glu353. Esse fato já excluiria RR02 de ser candidato a um ligante para interagir com RE α competitivamente a E2.

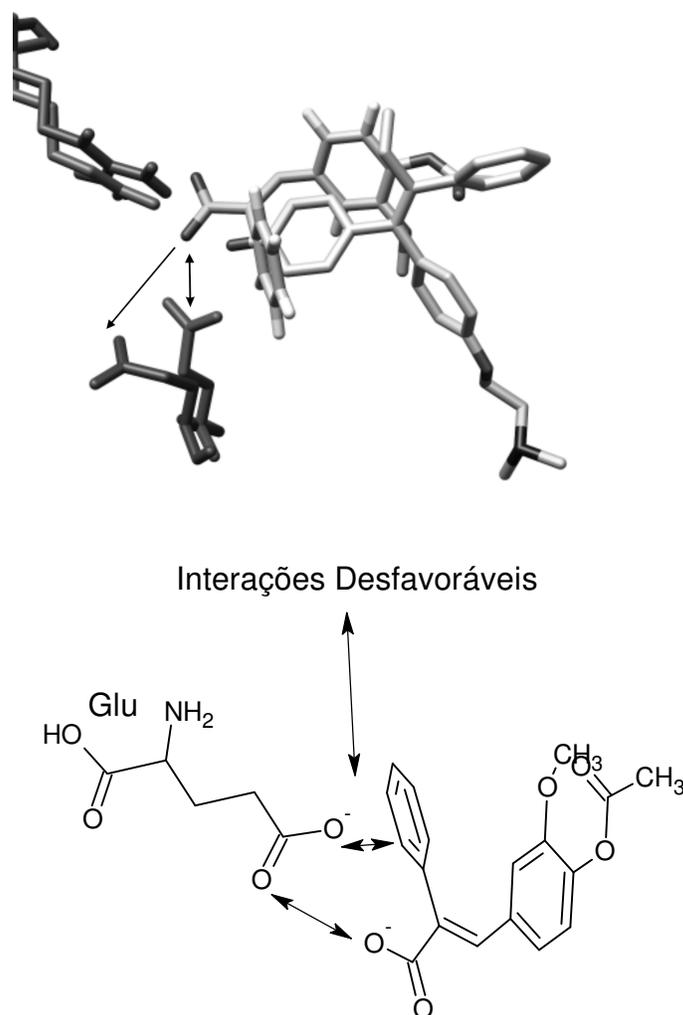


Figura 16. Interações desfavoráveis, dada a interação de RR02 com o sítio de ligação do 4OHT.

A energia livre de interação entre RR02 e o RE α (Tabela 2), mostra que o ligante seria uma péssima opção para a interação com o mesmo sítio de ligação E2, não tendo, como esperado, capacidade de interagir com os RE's. Esse fato foi confirmado pelos estudos de afinidade comparativa com RE α que mostrou que apenas 0.0001% de afinidade em relação ao 17 β -estradiol.

Possíveis alterações que poderiam ser empregadas em RR02 de modo que as interações desfavoráveis com Glu353, como por exemplo à troca da carbonila por um grupo 4-fenol. Tal modificação que é comum a compostos que interagem com RE pode estender a molécula possibilitando a interação da acetila com o resíduo His524 (Figura 5).

O grupo acetila poderia ser trocado ainda por um estrutura carbonílica mais rígida com uma ciclopentanona ou gama lactona (Figura 17).

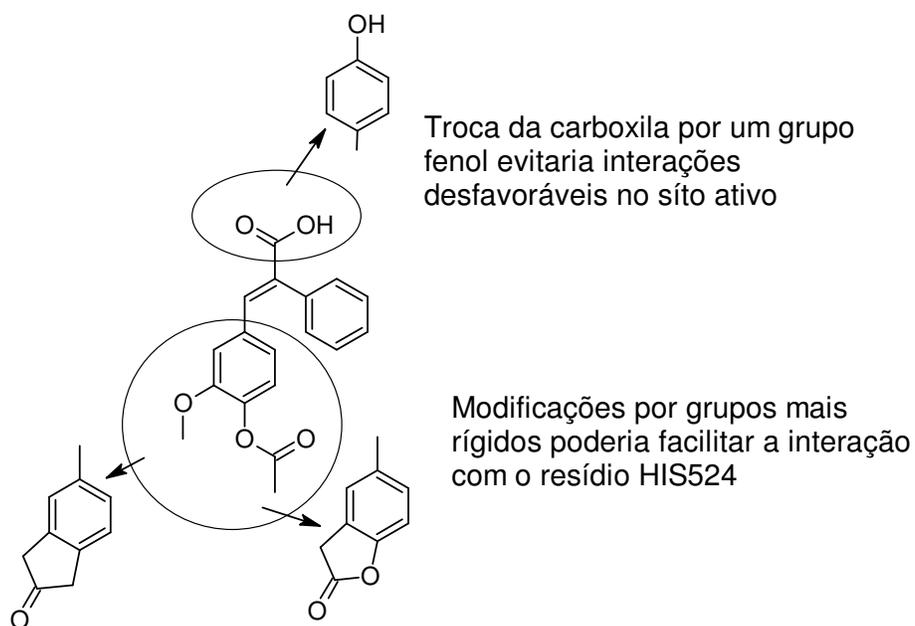


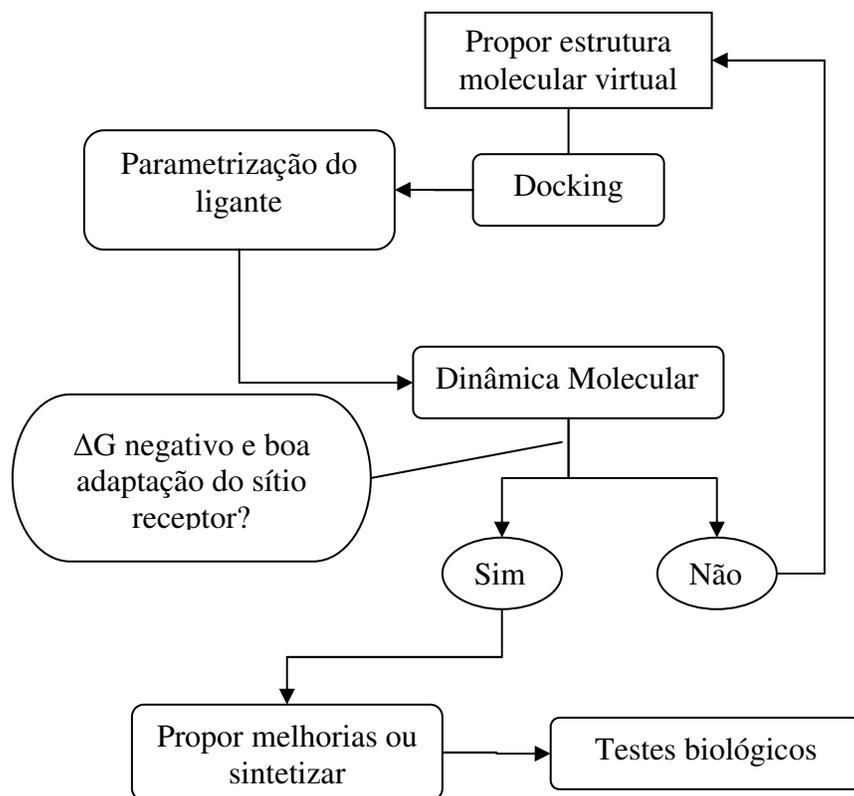
Figura 17. Proposições de modificações estruturais que possivelmente melhorariam a afinidade do ligante RR02 pelo RE α .

4. Considerações Finais e Futuras Perspectivas

O uso de metodologias computacionais para o desenho de fármacos sítio de dirigida é importante para o direcionamento da síntese orgânica no grupo de pesquisas SINTMOLB, UFMS. O estudo da afinidade de estruturas moleculares virtuais, antes que qualquer atividade sintética seja empregada, e pode ainda reduzir custos e obter melhores resultados nos processos sintéticos.

Em nossos estudos preliminares, o emprego de metodologias de docking e dinâmica molecular para simular a interação de ligantes com o RE, foi possível com razoável concordância, estimar a energia livre de interação de ligantes com afinidades diversas em relação ao RE. Pôde-se obter uma boa noção sobre o comportamento do sítio ativo na presença de diversos ligantes, e as implicações na capacidade do mesmo de interagir bem ou não com o sitio receptor.

Esse tipo de estudo pode ser ampliado e usado em maior escala para determinar quais partes da estrutura do ligante beneficiam a interação com receptores. Podem-se propor estruturas para realizar docking e dinâmica molecular, e avaliar os resultados através do comportamento dos resíduos de aminoácido do sítio ativo e da variação da energia livre calculada pelo método LIE. E então refazer o processo até chegar em uma estrutura para síntese orgânica e testes de atividade biológica. O fluxograma abaixo ilustra essa iteração.



Um problema dessa metodologia diz respeito à natureza das simulações que são essencialmente clássicas, ou seja, não levam em conta efeitos eletrônicos. Por exemplo, a polarizabilidade e estados de transição não podem ser bem modelados, por serem fenômenos eletrônicos. A parametrização do campo de força GROMOS para ligantes é sempre necessária. O servidor Dundee (Schuttelkopf e Van Aalten, 2004), cria topologias para parametrização que podem ser otimizadas com os cálculos de minimização de energia com o nível de teoria b3lyp/6-31G(d) da conformação docada pelo AutoDock obtendo as cargas ChelpG, usadas para substituir as cargas geradas pelo servidor DUNDEE.

Seria necessário então futuramente trabalhar com ferramentas de parametrização que trabalha em conjunto com o Gaussian. Existem campos de força como NAMD, (James C. Phillips, 2005) que conta com ferramentas de parametrização no programa VMD. Outra possibilidade, mas que demandaria mais recursos computacionais, seria a implantação do

GROMACS híbrido QM/MM, que atualmente é alvo de pesquisas do Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral (DFI – UFMS).

Portanto, fica necessária a continuidade das pesquisas para determinar metodologia que poderiam ser rápidas e amplamente aplicáveis à síntese orgânica para que continuamente se possa obter compostos ativos contra diversos alvos protéicos.

5. Glossário

Algoritmo *l-bfgs*: Método de otimização de larga escala usada.

Algoritmo *Steepest descent*: O método de *Steepest descente* é uma metodologia de busca de mínimo de funções.

Algoritmos genéticos. Um algoritmo genético (GA) é um método heurístico de encontrar soluções aproximadas para problemas de difícil solução através da aplicação dos princípios da evolução biológica a ciência da computação. Os algoritmos genéticos usam técnicas derivadas da biologia tal como a herança genética, mutações, seleção natural e a recombinação (ou *crossover*) (Head, Smythe *et al.*, 1996).

Campo de força. Campo de força é uma e constantes associadas definem as energia da expressão de energia para cálculos de mecânica molecular.

CHelpG. Do inglês “**CH**arges from **EL**ectrostatic **P**otentials using a **G**rid based method” é uma análise populacional considerada melhor que as cargas de Mülliken. Usadas para simular a cargas de átomos como se a molécula estivesse em água por exemplo (Curt M. Breneman, 1990).

Cristalografia de Raios- x. Em um cristal perfeito, todos os indivíduos de uma molécula estão na mesma conformação e orientação. Quando os raiosX atravessam um cristal de moléculas puras, os raios são ricocheteados pelos átomos em padrões específicos, chamados de padrões de difração. O número de elétrons nos átomos determina a intensidade da difração dos raios. Átomos mais pesados difratam mais efetivamente. Vários padrões de difração são tomados de diversos ângulos. Esses padrões fornecem informação organizacional sobre os componentes da molécula.

Função Escore: Função matemática define a classificação de um conjunto de respostas dadas a um problema.

Mecânica molecular: um método empírico para prever a forma das moléculas e suas interações.

Métodos Híbridos. Métodos de simulação que computacional que junta mecânica molecular e mecânica quântica num mesmo sistema em estudo.

Parametrização de campos de força: Adaptação dos parâmetros de funções do campo de força aos resultados experimentais de determinado problema sendo simulado.

Topologias. Tabela parâmetros de energia do campo de força.

6. Referências Bibliográficas

Alder, B. J. e T. E. Wainwright. Phase Transition for a Hard Sphere System. The Journal of Chemical Physics, v.27, n.5, p.1208-1209. 1957.

Alexander, D. M., Jr. Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. Journal of Computational Chemistry, v.25, n.13, p.1584-1604. 2004.

Alonso, H., A. A. Bliznyuk, *et al.* Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. Med Res Rev, v.26, n.5, Sep, p.531-68. 2006.

Aqvist, J., C. Medina, *et al.* A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. Protein Eng, v.7, n.3, Mar, p.385-91. 1994.

Batista, P. R., A. Wilter, *et al.* Molecular dynamics simulations applied to the study of subtypes of HIV-1 protease common to Brazil, Africa, and Asia. Cell Biochem Biophys, v.44, n.3, p.395-404. 2006.

Beatson, G. ON THE TREATMENT OF INOPERABLE CASES OF CARCINOMA OF THE MAMMA: SUGGESTIONS FOR A NEW METHOD OF TREATMENT, WITH ILLUSTRATIVE CASES. The Lancet, v.148, n.3803, p.162-5. 1896.

Bentrem, D., R. Dardes, *et al.* Molecular mechanism of action at estrogen receptor alpha of a new clinically relevant antiestrogen (GW7604) related to tamoxifen. Endocrinology, v.142, n.2, Feb, p.838-46. 2001.

Berman, H., K. Henrick, *et al.* Announcing the worldwide Protein Data Bank. Nat Struct Biol, v.10, n.12, Dec, p.980. 2003.

Bernstein, L., D. Deapen, *et al.* Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. J Natl Cancer Inst, v.91, n.19, Oct 6, p.1654-62. 1999.

Bezwodna, W. R., D. Derman, *et al.* Treatment of metastatic breast cancer in estrogen receptor positive patients. A randomized trial comparing tamoxifen alone versus tamoxifen plus CMF. Cancer, v.50, n.12, Dec 15, p.2747-50. 1982.

Brzozowski, A. M., A. C. Pike, *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature, v.389, n.6652, Oct 16, p.753-8. 1997.

Chaoa, E. Y. H., J. L. Collinsa, *et al.* Structure-guided synthesis of tamoxifen analogs with improved selectivity for the orphan ERR γ . Bioorg Med Chem Lett, v.16, n.4, p.821-824. 2006.

Coombes, R. C., L. Gibson, *et al.* Aromatase inhibitors as adjuvant therapies in patients with breast cancer. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v.86, n.3-5, p.309-311. 2003.

-
- Curt M. Breneman, K. B. W. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. Journal of Computational Chemistry, v.11, n.3, p.361-373. 1990.
- Davidson, N. E. Tamoxifen--panacea or Pandora's box? N Engl J Med, v.326, n.13, Mar 26, p.885-6. 1992.
- Dewar, M. J. S., E. G. Zoebisch, *et al.* Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model J. Am. Chem. SOC., v.107, n.13, p.3902-3909. 1985.
- Dorgan, J. F., C. Longcope, *et al.* Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.5, n.7, Jul, p.533-9. 1996.
- Fang, H., W. Tong, *et al.* Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. Chem Res Toxicol, v.14, n.3, Mar, p.280-94. 2001.
- Frasor, J., F. Stossi, *et al.* Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. Cancer Res, v.64, n.4, Feb 15, p.1522-33. 2004.
- Frisch, M. J., G. W. Trucks, *et al.* Gaussian 03. I. Gaussian. Wallingford CT 2004.
- Goodsell, D. S., G. M. Morris, *et al.* Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. J Mol Recognit, v.9, n.1, Jan-Feb, p.1-5. 1996.
- Group, E. B. C. T. C. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. The Lancet, v.351, n.9114, p.1451-1467. 1998.
- Guex, N. e M. C. Peitsch. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis, v.18, n.15, Dec, p.2714-23. 1997.
- Halperin, I., B. Ma, *et al.* Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. Proteins, v.47, n.4, Jun 1, p.409-43. 2002.
- Hankinson, S. E. e M. J. Stampfer. Estrogens and breast cancer. Salud Publica Mex, v.39, n.4, Jul-Aug, p.370-8. 1997.
- Hansson, T., C. Oostenbrink, *et al.* Molecular dynamics simulations. Curr Opin Struct Biol, v.12, n.2, Apr, p.190-6. 2002.
- Hassinen, T. e M. Peräkylä. New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field. Journal of Computational Chemistry, v.22, n.12, p.1229-1242. 2001.

Head, R. D., M. L. Smythe, *et al.* VALIDATE: A New Method for the Receptor-Based Prediction of Binding Affinities of Novel Ligands. J. Am. Chem. Soc., v.118, n.16, p.3959-3969. 1996.

Humphrey, W., A. Dalke, *et al.* VMD: visual molecular dynamics. J Mol Graph, v.14, n.1, Feb, p.33-8, 27-8. 1996.

James C. Phillips, R. B. W. W. J. G. E. T. E. V. C. C. R. D. S. L. K. K. S. Scalable molecular dynamics with NAMD. Journal of Computational Chemistry, v.26, n.16, p.1781-1802. 2005.

Manas, E. S., Z. B. Xu, *et al.* Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods. Structure, v.12, n.12, Dec, p.2197-207. 2004.

Mckenna, N. J. e B. W. O'malley. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. Cell, v.108, n.4, Feb 22, p.465-74. 2002.

Morris, G. M., D. S. Goodsell, *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. Journal of Computational Chemistry, v.19, n.14, p.1639-1662. 1998.

Nilsson, S., S. Makela, *et al.* Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev, v.81, n.4, Oct, p.1535-65. 2001.

Oostenbrink, B. C., J. W. Pitera, *et al.* Simulations of the Estrogen Receptor Ligand-Binding Domain: Affinity of Natural Ligands and Xenoestrogens. J. Med. Chem., v.43, n.24, p.4594-4605. 2000.

_____. Simulations of the Estrogen Receptor Ligand-Binding Domain: Affinity of Natural Ligands and Xenoestrogens. J. Med. Chem., v.44, n.7, p.1124-1124. 2001.

Pearce, S. T. e V. C. Jordan. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. Crit Rev Oncol Hematol, v.50, n.1, Apr, p.3-22. 2004.

Pettersen, E. F., T. D. Goddard, *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem, v.25, n.13, Oct, p.1605-12. 2004.

Pike, A. C., A. M. Brzozowski, *et al.* Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. Embo J, v.18, n.17, Sep 1, p.4608-18. 1999.

Robertson, J. F. Estrogen receptor downregulators: new antihormonal therapy for advanced breast cancer. Clin Ther, v.24 Suppl A, p.A17-30. 2002.

Rotta, R. Preparação e Atividade Citotóxica sobre Células Neoplásicas de Análogos do Tamoxifeno e do Resveratrol - Protótipos para Futuras Drogas Contra o Câncer de Mama. Departamento de Química, UFMS, Campo Grande, 2005. 119 p.

Sadovsky, Y. e S. Adler. Selective modulation of estrogen receptor action. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.1, Jan, p.3-5. 1998.

Schuttelkopf, A. W. e D. M. Van Aalten. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v.60, n.Pt 8, Aug, p.1355-63. 2004.

Schwabe, J. W. R., L. Chapman, *et al.* The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. Cell, v.75, n.3, p.567-578. 1993.

Shiau, A. K., D. Barstad, *et al.* The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. Cell, v.95, n.7, Dec 23, p.927-37. 1998.

Snow, C. D., E. J. Sorin, *et al.* How well can simulation predict protein folding kinetics and thermodynamics? Annu Rev Biophys Biomol Struct, v.34, p.43-69. 2005.

Van Der Spoel, D., E. Lindahl, *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. J Comput Chem, v.26, n.16, Dec, p.1701-18. 2005.

Van Lipzig, M. M., A. M. Ter Laak, *et al.* Prediction of ligand binding affinity and orientation of xenoestrogens to the estrogen receptor by molecular dynamics simulations and the linear interaction energy method. J Med Chem, v.47, n.4, Feb 12, p.1018-30. 2004.

Vanlipzig, M. M. H., A. M. Terlaak, *et al.* Prediction of Ligand Binding Affinity and Orientation of Xenoestrogens to the Estrogen Receptor by Molecular Dynamics Simulations and the Linear Interaction Energy Method. J. Med. Chem., v.47, n.4, p.1018-1030. 2004.

Wijayaratne, A. L., S. C. Nagel, *et al.* Comparative analyses of mechanistic differences among antiestrogens. Endocrinology, v.140, n.12, Dec, p.5828-40. 1999.

Young, D. C. Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems: John Wiley & Sons, Inc. 2001

Yue, W., R. J. Santen, *et al.* Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol, v.86, n.3-5, Sep, p.477-86. 2003.

Apêndice I

Arquivos de Entrada para Simulações de dinâmica Molecular:

1. Otimização de geometria – Steep descent

```
cpp                = /usr/bin/cpp
define             = -DFLEX_SPC
constraints        = none
integrator         = steep
nsteps            = 100
;
;      Minimização de energia
;
emtol              = 2000
emstep            = 0.01

nstcomm           = 1
ns_type           = grid
rlist             = 1
rcoulomb          = 1.0
rvdw              = 1.0
Tcoupl            = no
Pcoupl            = no
gen_vel           = no
```

2. Otimização de geometria – l-bfgs

```
cpp                = /usr/bin/cpp
define             = -DFLEX_SPC
constraints        = none
integrator         = l-bfgs
nsteps            = 100
;
;      Minimização lbfgs
;
emtol              = 2000
emstep            = 0.01

nstcomm           = 1
ns_type           = grid
rlist             = 1
rcoulomb          = 1.0
rvdw              = 1.0
Tcoupl            = no
Pcoupl            = no
gen_vel           = no
```

3. Simulação de dinâmica molecular de posições restringidas

```

title           = RE
warnings        = 10
cpp             = /usr/bin/cpp ; location of cpp on linux
define          = -DPOSRES
constraints     = all-bonds
integrator      = md
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 10000 ; total 20.0 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 250 ; output coordinates every 0.5 ps
nstvout        = 1000 ; output velocities every 2.0 ps
nstfout        = 0
nstlog         = 10
nstenergy      = 10
nstlist        = 10
ns_type        = grid
rlist          = 0.9
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 0.9
rvdw          = 0.9
fourierspacing = 0.12
fourier_nx     = 0
fourier_ny     = 0
fourier_nz     = 0
pme_order      = 6
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl         = berendsen
tau_t          = 0.1 0.1 0.1
tc_grps        = protein sol OHT
ref_t          = 300 300 300
; Pressure coupling is on
Pcoupl         = berendsen
pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
; Generate velocities is on at 300 K.
gen_vel        = yes
gen_temp       = 300.0
gen_seed       = 173529

```

4. Simulação de dinâmica molecular

```

title           = RE
cpp             = /lib/cpp ;
constraints     = all-bonds
integrator      = md
dt              = 0.002 ; ps !
nsteps         = 300000 ; total 600 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 1000 ; output coordinates every 10 ps
nstvout        = 0
nstfout        = 0
nstlist        = 10
ns_type        = grid

```

```
rlist          = 0.9
coulombtype    = Reaction-Field
epsilon_rf     = 54
rcoulomb       = 1.2
rvdw           = 1.4
fourierspacing = 0.12
fourier_nx     = 0
fourier_ny     = 0
fourier_nz     = 0
pme_order      = 6
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        = berendsen
tau_t         = 0.1    0.1  0.1
tc-grps       = protein sol  OHT
ref_t         = 300    300  300
; Use Energy group monitoring
energygrps    = protein sol OHT
; Pressure coupling is on
Pcoupl        = berendsen
pcoupltype    = isotropic
tau_p         = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p         = 1.0
; Generate velocities is on at 300 K.
gen_vel       = yes
gen_temp      = 300
gen_seed      = 173529
```

Capítulo 2

**Análogos da Combretastatina A4 com o Grupo
Separador Enxofre**

Índice

Relação de Substâncias	62
Abreviaturas e Símbolos	63
Resumo	64
Abstract	65
1. Introdução.....	66
1.1 <i>Combretastatina A4</i>	69
1.2 <i>Objetivos</i>	73
2. Resultados e Discussão	75
2.1 Etapa i (produto 2)	76
2.2 Etapa ii (produto 5)	79
2.3 Etapa ii (produto 6)	84
2.4 Etapa iii (produto 7)	89
2.5 Etapa iii (produto 8)	93
2.6 Etapa iv (produto 9)	96
2.7 Etapa iv (produto 10)	100
2.9 Resultados dos testes citotóxicos	104
2.10 Resultados dos testes antitubulínicos	105
2.11 Conclusões	109
3. Material e métodos	110
3.1 <i>Procedimentos gerais</i>	111
3.2 <i>Procedimentos Sintéticos</i>	113
3.2.1 5-iodo-1,2,3-trimetoxibenzeno (2)	113
3.2.2 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)tio]benzeno (5)	114
3.2.3 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metilfenil)tio]benzeno (6)	115
3.2.4 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)sulfinil]benzeno (7)	116
3.2.5 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metilfenil)sulfinil]benzeno (8).....	117
3.2.6 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)sulfonil]benzeno (9)	118
3.2.7 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metilfenil)sulfonil]benzeno (10).....	119
3.3 <i>Cálculos teóricos</i>	120
3.4 <i>Testes de atividade citotóxica</i>	121
3.5 <i>Ensaio tubulínicos in vitro</i>	122
3.5.1 Ensaio de ligação à tubulinas	122
3.5.2 Inibição da ligação da Colchicina	122
4. Referências Bibliográficas	123

Índice de Tabelas

Tabela 1. Análogos da CA4 com grupo espaçador (A) não cíclico e sua atividade antitubulínica relativas a CA4.	71
Tabela 2. Comparação entre os deslocamento químicos de (2) e valares de literatura anterior(Banwell, Hamel <i>et al.</i> , 2006).	78
Tabela 3. Atribuições do espectro de RMN ^1H e ^{13}C de (5). Solvente CDCl_3	82
Tabela 4. Atribuições do espectro de RMN ^1H e ^{13}C de (6). Solvente CDCl_3	87
Tabela 5. Atribuições dos espectros de ^1H e ^{13}C para (7)	91
Tabela 6. Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C (8)	94
Tabela 7. Atribuições para dos espectros de ^1H e ^{13}C para (9)	98
Tabela 8. Atribuições dos espectros de ^1H e ^{13}C para (10)	101
Tabela 9. Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H dos diversos estados de oxidação do enxofre.	104
Tabela 10. Percentual de inibição do crescimento celular obtido com as amostras nas 3 (três) diferentes linhagens tumorais em dose única de 5 $\mu\text{g/mL}$	104
Tabela 11. Valores de IC_{50} para a inibição da polimerização das tubulinas e ligação pela colchicina pelos compostos 5-10, CA4 e colchicina.	105
Tabela 12. Testes de deslocamento da colchicina no sitio de ligação na tubulina em diversas concentrações dos análogos produzidos e a CA4.....	106
Tabela 13. Peculiaridades conformacionais de derivados diarílicos. Distância d entre os carbonos ipso, ângulo interno γ formado pelos átomos 1,2,3 e 4 e a ao grupo separador e valores de polarizabilidades(S. h. Hilal, 2003).....	107

Índice de Figuras

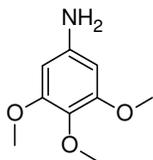
- Figura 1. Estrutura molecular de VDAs de baixo peso molecular. CA4P – combretastatina A4 fosfato, AVE8062A, CA1P – combretastatina A1 fosfato; ZD6126, TZT-1027 e DMXAA..... 68
- Figura 2. Figura mostra parte da estrutura tridimensional da tubulina destacando os dois sítios de ligação complexados com o alcalóide vimblastina e a colchicina.(Gigant, Wang *et al.*, 2005) A combretastatina A4 se liga ao mesmo sítio de ligação da colchicina. 69
- Figura 3. Estrutura da Combretastatina A4 em destaque os grupo essenciais para atividade biológica, bem como partes susceptíveis a modificação estrutural. 70
- Figura 4. Estruturas da combretastatina A4 e fenstatina. 70
- Figura 5. Estruturas análogas da CA4, que contêm enxofre como grupo separador..... 73
- Figura 6. Comparação dos espectros de ¹H das substâncias (5-10) expandidos na região 6-8ppm. Fica evidente o padrão de desproteção causada pelas sucessivas oxidações dos compostos (5), grupo a esquerda, e do composto (6) à direita. 103
- Figura 7. Os diarrilssulfetos oxidados a sulfetos e sulfóxido não têm atividade antitubulínica devido à conformação de energia mínima desses compostos que se diferencia da do núcleo básico da CA4 (o estilbeno) e do composto (5) (diarrilssulfeto), que são ativos por terem a disposição dos anéis propícia para formar interações hidrofóbicas com sítio de ligação da colchicina. 108
- Figura 8. Modo de interação da colchicina no sítio ativo destacando a conformação preferencial para a interação hidrofóbicas com ALA255 e ASN258 (Ravelli, Gigant *et al.*, 2004). 109

Índice de Espectros

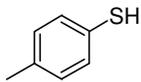
Espectro 1. Espectro de RMN de ^1H de (2).	77
Espectro 2. Espectro de ^{13}C obtido em CCl_4 de (2).	78
Espectro 3. Espectro de RMN de ^1H de (5).	80
Espectro 4. Espectro de ^{13}C de (5).	82
Espectro 5. Espectro de massas modo positivo para o composto (5).	83
Espectro 6. Espectro de RMN de ^1H de (6).	85
Espectro 7. Espectro de ^{13}C para (6) e ampliação para destaque da região de $\delta 128$ a 134 .	87
Espectro 8. Espectro de massa do composto (6).	88
Espectro 9. Espectro de ^1H de (7).	90
Espectro 10. Espectro de ^{13}C de (7).	91
Espectro 11. Espectro de massas de (7).	92
Espectro 12. Espectros de ^1H de (8).	93
Espectro 13. Espectro de ^{13}C de (8).	94
Espectro 14. Espectro de massas de (8).	95
Espectro 15. Espectro de RMN ^1H de (9).	96
Espectro 16. Espectro de ^{13}C de (9).	97
Espectro 17. Espectro de massa de (9).	99
Espectro 18. Espectro de ^1H para (10).	100
Espectro 19. Espectro de 13 de (10).	101
Espectro 20. Espectro de massas de (10).	102
Espectro Bidimensional 1. Espectro HSQC do composto (5).	81
Espectro Bidimensional 2. Espectro de HSQC do composto (8).	86

Relação de Substâncias

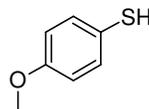
Numeração padrão



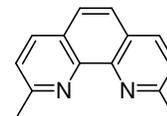
3,4,5-trimetoxianilina
(1)



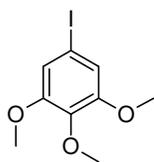
4-metilbenzenotiol
p-Ti cresol
(3)



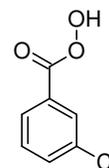
4-metoxibenzenotiol
4-metoxitiófenol
(4)



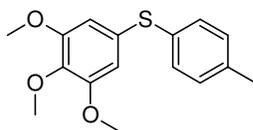
Neocuproina



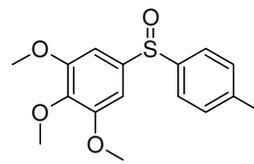
5-iodo-1,2,3-trimetoxibenzeno
(2)



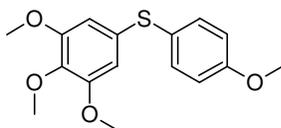
Ácido metacloroperbenzóico
*m*CPBA ou AMCPB



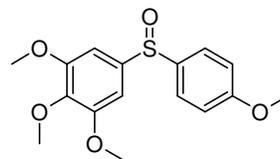
1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metil fenil)tio]benzeno
(6)



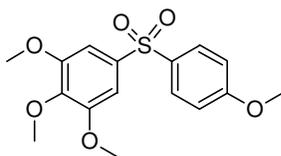
1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metil fenil)sulfinil]benzeno
(8)



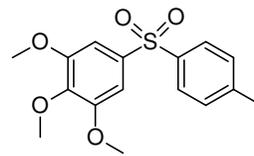
1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)tio]benzeno
(5)



1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)sulfinil]benzeno
(7)



1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)sulfonyl]benzeno
(9)



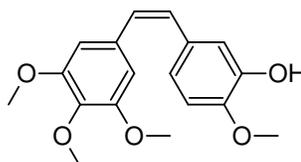
1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metilfenil)sulfonyl]benzeno
(10)

Abreviaturas e Símbolos

CCD	Cromatografia em camada delgada
IV/TF	Infravermelho com transformada de Fourier
ES/MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
RMN – ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN – ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
p.f.	Ponto de Fusão
J	Constante de Acoplamento
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
ppm	Partes por milhão
d	Dubleto
s	Singleto
VDA	<i>Vascular Disrupting Agents</i>
CA4	Combretastatina A4
CA4P	Combretastatina A4 Fosfato
mCPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
CA1P	Combretastatina A1 fosfato

Resumo

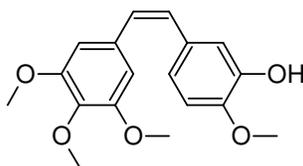
A combretastatina A4 (Figura abaixo) é o inibidor da polimerização de tubulinas mais potente que existe, descoberto a partir da casca da árvore *Combretum caffrum*, se mostrou um excelente agente antiangiogênese. Dada a simplicidade estrutural, diversos análogos foram sintetizados. Interessantemente quando se usam os grupos separadores éter, amina e metileno não há atividade enquanto a presença do grupo cetona produz um análogo tão potente quanto a molécula padrão.



O uso de um tioéter, bem como de formas oxidadas, sulfóxidos e sulfonas foram propostas para estudar a influência da polarizabilidade e conformação dos análogos da combretastatina A4 como grupo separador não cíclico. Um dos análogos obtidos mostrou ser tão ativo quanto a combretastatina A4, com afinidade pelo sítio de ligação da colchicina comparáveis a podofilotoxina, além de apresentar uma grande capacidade de impedir a polimerização de tubulinas. Os demais compostos oxidados, que não foram ativos servem como modelos para o estudo da influência da conformação do sistema de anéis dessa classe de compostos.

Abstract

Combretastatin A4 (Structure shown above) is the most potent inhibitor of tubulin polymerization ever conceived. This natural product isolated from a African tree *Combretum caffrum*, exhibit an great activity against neoformed vascular net. Due its structural simplicity, thousands of analogues were designed and synthesized. Interestingly some of them which hold small noncyclic separation group, ether, amine and methylene have no biological activity, nevertheless, a very similar group, carbonyl moiety is as potent as combretastatin A4.



Tioether usage as novel analogues, alongside with its oxidized forms, sulfoxides and sulfones, were fashioned in order to study conformational and polarizability peculiarities when compared with the mentioned analogues above. One of our analogues have shown to be as active as combretastatin A4 exhibiting colchicine binding site affinity akin to podophilotoxin, and significant tubulin polymerization inhibition capabilities. The remaining oxidized nonnative compounds are good models to study the importance of conformational peculiarities of the ring system of this class of compounds.

1. Introdução

ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA A4 COM GRUPO SEPARADOR
ENXOFRE

A heterogeneidade genética de tumores avançados é um dos grandes desafios para as terapias anticâncer, devido ao aparecimento de resistência à tratamentos quimioterápicos. Terapias contra alvos específicos é atualmente o caminho mais promissor para promover a necrose de tumores das mais variadas etiologias (Pilat e Lorusso, 2006).

A angiogênese tumoral, essencial para o crescimento dos tumores e o espalhamento metastático, é um alvo bastante promissor para o planejamento de novos agentes anticâncer. Várias pesquisas no campo dos antivasculares se focam nos compostos antiangiogênicos, os quais impedem a formação de novos vasos sem, no entanto, afetar os vasos consolidados. Existe porém uma outra vertente de estudos que busca agentes capazes de agir sobre vasos já consolidados, à essa classe de substâncias dá-se o nome VDA(Pilat e Lorusso, 2006) (do inglês *Vascular Disrupting Agents*). Os VDAs causam a obstrução ou destroem seletivamente os vasos sanguíneos pré-existentes que permeiam os tumores, causando a interrupção do fluxo de oxigênio e nutrientes.

Os VDAs podem ser divididos em duas classes: (1) VDAs biológicos ou dirigidos por ligantes. Esse tipo de VDAs utiliza-se de anticorpos ou peptídeos para causar o acúmulo de toxinas nos endotélios tumorais e (2) VDAs de baixo peso molecular (**Figura 1**) que exploram as diferenças que há entre o endotélio normal e o tumoral.

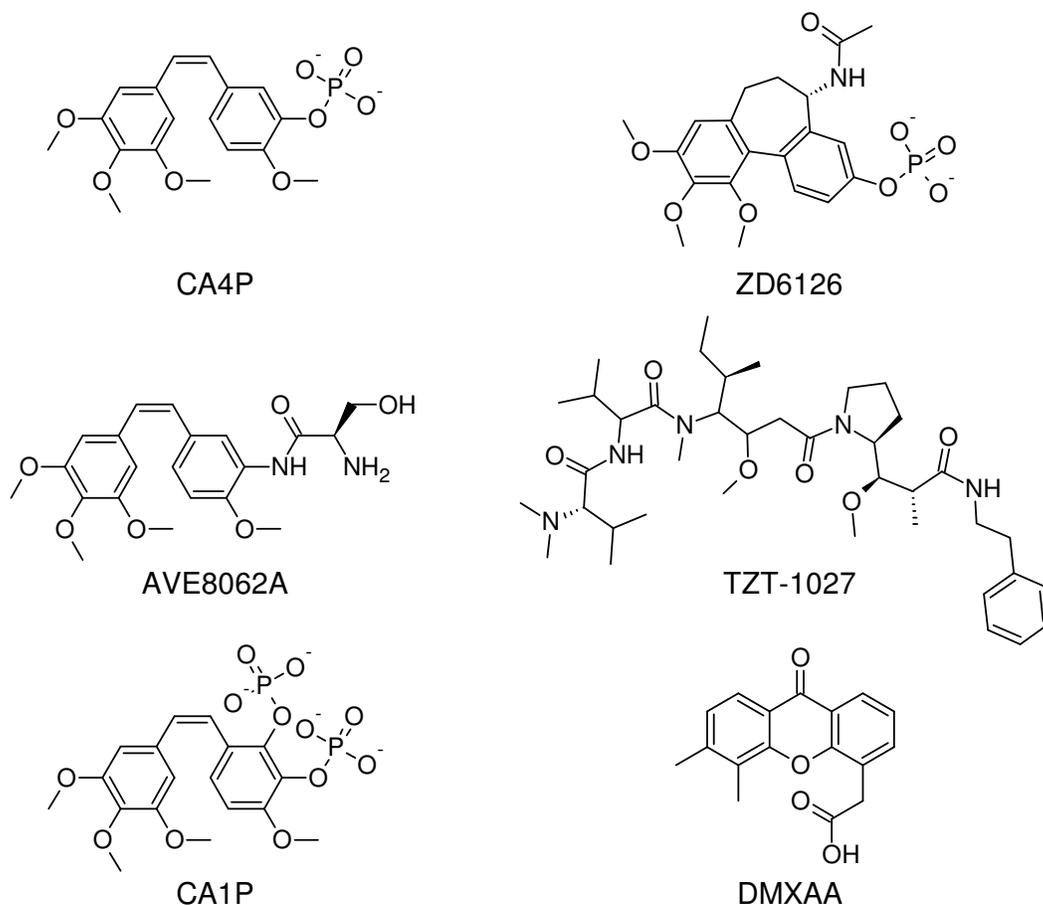


Figura 1. Estrutura molecular de VDAs de baixo peso molecular. CA4P – combretastatina A4 fosfato, AVE8062A, CA1P – combretastatina A1 fosfato; ZD6126, TZT-1027 e DMXAA.

O composto DMXAA, um flavonóide modificado sinteticamente, apresenta atividade sobre o DNA de células endoteliais, prejudicando a síntese protéica. Seu alvo molecular ainda é desconhecido (Ching, Joseph *et al.*, 1991). O composto TZT-1027 que é um derivado da dolastina-10, age sobre o mesmo sítio de ligação da vimblastina na tubulina impedindo sua polimerização (Thomson, Naylor *et al.*, 2006). Mas, dentre esses compostos, os que vêm se destacando mais acentuadamente são os análogos da combretastatina A4 (CA4), quais sejam a CA4P, AVE8062A e CA1P (Andralojc, Ryan *et al.*, 1996; Hori e Saito, 2003; Mandeville, Ng *et al.*, 2007).

O produto natural combretastatina-A4 foi isolado da casca da árvore africana *Combretum cafrum*, e mostrou ser um potente VDA que se liga avidamente ao mesmo sítio de ligação da colchicina na tubulina (Figura 2) (Lin, Singh *et al.*, 1988; Pettit, Singh *et al.*, 1989; Pettit, Temple *et al.*, 1995). A combretastatina-A4 fosfato (Dorr,

Dvorakova *et al.*, 1996) e o derivado A1 (Kirwan, Loadman *et al.*, 2004), pró-fármacos mais solúveis em água já se encontram em fase de estudos clínicos para o tratamento de câncer (Young e Chaplin, 2004). Essas substâncias agem induzindo mudanças morfológicas no citoesqueleto endotelial que acarretam a retração celular de vasos sanguíneos, ocasionando o desligamento *in vivo* de permeabilidade vascular, levando ao aumento da pressão intersticial, acarretando o bloqueio físico dos capilares e conseqüentemente a morte do tumor, devido a falta de vascularização (Griggs, Metcalfe *et al.*, 2001).

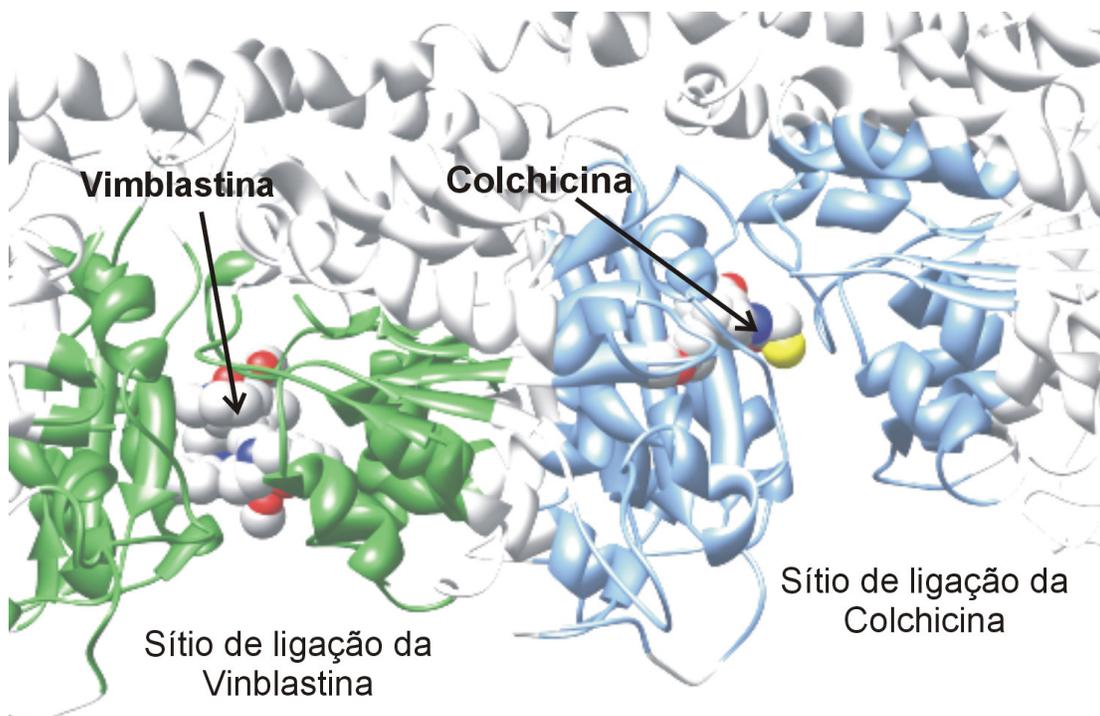


Figura 2. Figura mostra parte da estrutura tridimensional da tubulina destacando os dois sítios de ligação complexados com o alcalóide vinblastina e a colchicina. (Gigant, Wang *et al.*, 2005) A combretastatina A4 se liga ao mesmo sítio de ligação da colchicina.

1.1 Combretastatina A4

Não obstante o baixo peso molecular e a simplicidade estrutural da CA4, esse composto é um dos mais poderosos inibidores da polimerização de tubulinas. Sua estrutura (Figura 3) se constitui de dois anéis aromáticos ligados por uma dupla ligação em configuração *cis*.

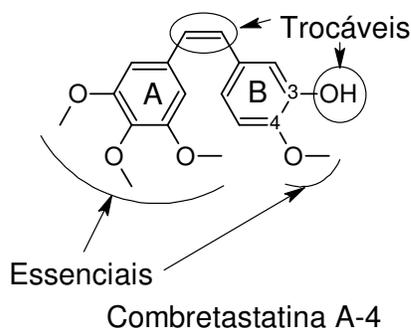


Figura 3. Estrutura da Combretastatina A4 em destaque os grupo essenciais para atividade biológica, bem como partes susceptíveis a modificação estrutural.

Vários esforços foram direcionados para obtenção de análogos com diferentes grupos espaçadores entre os anéis aromáticos da CA4 (substitutos à dupla ligação, Tabela 1). Muitos dos análogos obtidos apresentaram atividade citotóxica e antitubulínica comparáveis com CA4. Substituições isostéricas da dupla ligação espaçadora, no estilbenóide, por metileno, (Getahun, Jurd *et al.*, 1992) ou mesmo por funções amina e éter, (Lawrence, Rennison *et al.*, 2001) acarreta em redução ou perda da atividade citotóxica antitubulínica. Interessantemente, a fenstatina (Figura 4), descoberta por acaso por Pettit e colaboradores em 1998 (Pettit, Toki *et al.*, 1998), que também apresenta um átomo de distância entre os anéis tem uma atividade tubulínica comparável com CA4 e atividade citotóxica ligeiramente menor. Esse fato, aparentemente paradoxal, inspira estudos de fatores estruturais importantes para a atividade biológica do tipo: a distância entre os anéis aromáticos e a afinidade do grupo separador em relação aos resíduos adjacentes do sítio de ligação da colchicina. (Tron, Pirali *et al.*, 2006)

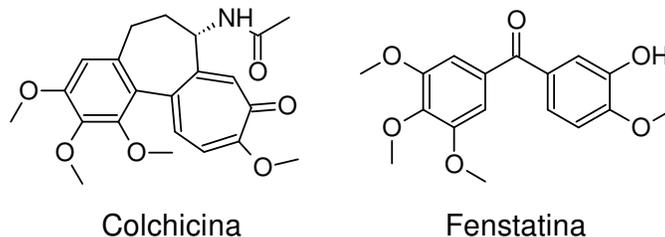
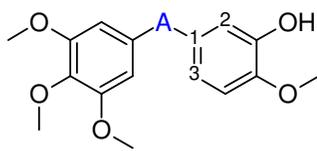
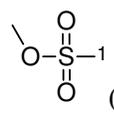
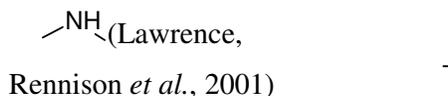
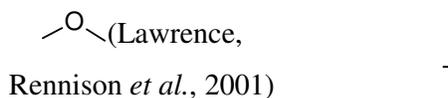


Figura 4. Estruturas da combretastatina A4 e fenstatina.

Tabela 1. Análogos da CA4 com grupo espaçador (A) não cíclico e sua atividade antitubulínica relativas a CA4.



A	Atividade antitubulina
 (Getahun, Jurd <i>et al.</i> , 1992)	-
 (Getahun, Jurd <i>et al.</i> , 1992)	+
 (Pettit, Toki <i>et al.</i> , 1998)	+++
 (Kaffy, Pontikis <i>et al.</i> , 2005)	+++
 (Ducki, Forrest <i>et al.</i> , 1998)	+++
 (Lawrence, Rennison <i>et al.</i> , 2001)	-
 (Lawrence, Rennison <i>et al.</i> , 2001)	+
 (Cushman, Nagarathnam <i>et al.</i> , 1991)	+
 (Nagarathnam, Cushman <i>et al.</i> , 1992)	++



+++ similar a CA4 (IC₅₀ ~ 1,4µM) , ++ (IC₅₀ 3-5µM) moderada, + (IC₅₀ 5-10µM) pouco ativo, - (IC₅₀ > 10µM) inativo

Considerando que ainda não foram sintetizados análogos com grupo separador com átomo de enxofre e nem seus derivados oxidados sulfona e sulfóxido e levando em conta ainda que o volume e polarizabilidade do átomo de enxofre têm valores superiores ao nitrogênio e oxigênio- análogos sem atividade antitubulínica ou citotóxica – (Tabela 1), propusemos a síntese de compostos possuindo esse tipo de esqueleto para realização de testes de atividade citotóxica e antitubulínica.

Os produtos obtidos nesse trabalho (Esquema 1), por motivos de disponibilidade de materiais de partida adequados, não apresentam o grupamento hidroxila na posição 3 do anel B. No entanto, como demonstrado na literatura, a troca dessa hidroxila, por hidrogênio, em análogos da CA4, não afetam a atividade com VDA (Cushman, Nagarathnam *et al.*, 1991). Ainda a substituição do grupo metoxila por uma metila na posição 4 (Figura 4) acarreta apenas na diminuição da atividade citotóxica dos análogos de CA4, sem apresentar uma perda significativa na atividade antitubulínica (Cushman, Nagarathnam *et al.*, 1991). Portanto os compostos obtidos podem, sem prejuízos, demonstrar a utilidade prática do átomo de enxofre (Figura 5) como grupo separador em análogos da CA4.

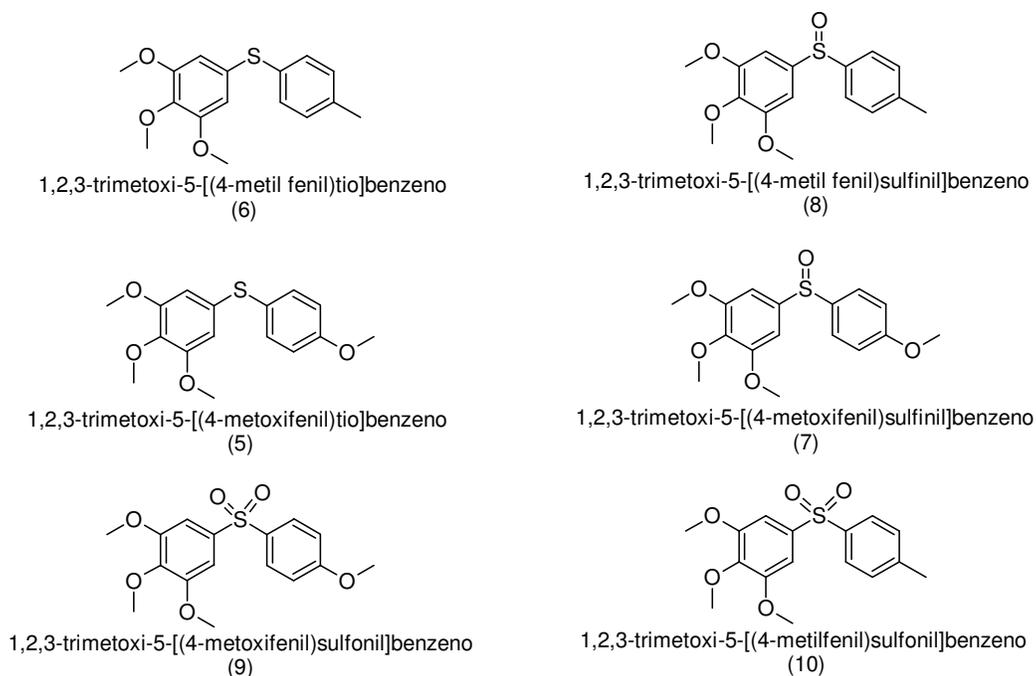
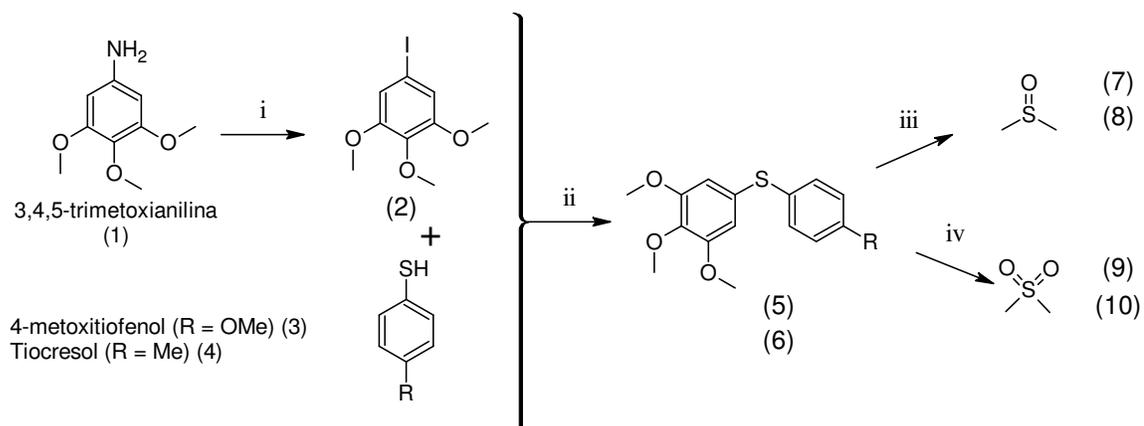


Figura 5. Estruturas análogas da CA4, que contêm enxofre como grupo separador.

1.2 Objetivos

Sintetizar diarilssulfetos análogos à CA4, os quais podem ser facilmente obtidos com bons rendimentos com o auxílio de um procedimento experimental relativamente simples, onde um iodobenzeno e um tiofenol, são acoplados com auxílio de um complexo de Cu^+ e neocuproína (Bates, Gujadhur *et al.*, 2002). As oxidações subsequentes à sulfonas e sulfóxido são realizadas com *m*CPBA : 1 eq para produção de sulfóxidos e 2 eq para sulfonas (Esquema 1) (Clennan e Chen, 1988).

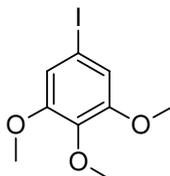


Esquema 1. Reagentes e condições: (i) H_2O , NaNO_2 , HCl , 5°C , e KI (Wright, 1969); (ii) Neocuproína (10 mol %), CuI (10 mol %), $\text{Na-}t$ -butóxido 1.5 eq, Tolueno 110°C (Bates, Gujadhur *et al.*, 2002); (iii) 1 eq mCPBA, CH_2Cl_2 ; (iv) 2 eq. mCPBA (Clennan e Chen, 1988), CHCl_3 , R = OMe (3), (5), (7), (6) e (9); R= Me (4), (6) (8) e (10).

Depois de obtidas as estruturas, foram estudadas a atividade biológica mediante a execução de testes de afinidade pelas tubulinas e ainda a capacidade de inibição da polimerização de tubulinas. Bem como testes de atividade citotóxica com diversas linhagens de células de câncer.

2. Resultados e Discussão

2.1 Etapa i (produto 2)

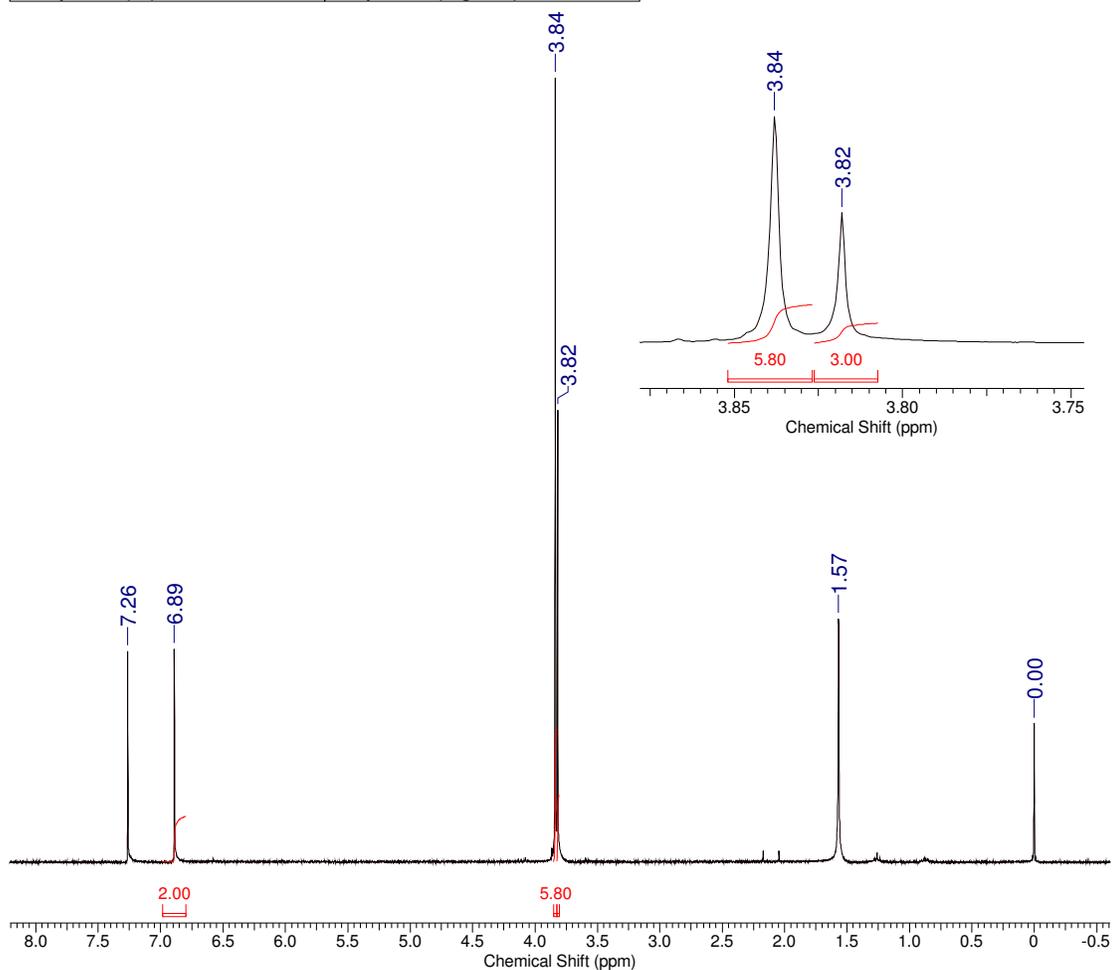


A reação de Sandmeyer foi reproduzida com baixos rendimentos (~22%) (2). Os rendimentos foram ainda menores quando a reação foi executada com maior quantidade do material de partida 3,4,5-trimetoxianilina. Provavelmente isto se deve ao controle ineficiente da temperatura quando se usa um maior volume de mistura reagente.

A separação foi realizada utilizando como fase móvel hexano puro sendo que as primeiras frações continham o produto puro.

O composto (2) foi identificado pela análise dos espectros de RMN -¹H onde um sigleto em δ 6,89 (2H), se mostrou deferente do mesmo sinal do material de partida que aparece em δ 5,93 (Espectro 1). Esse sinal que foi atribuído aos hidrogênios metínicos. As metoxilas foram evidenciadas por dois singletos em δ 3,84 (6H) e 3,82 (3H). Os sinais estão em concordância com referências anteriores (Tabela 2). (Banwell, Hamel *et al.*, 2006)

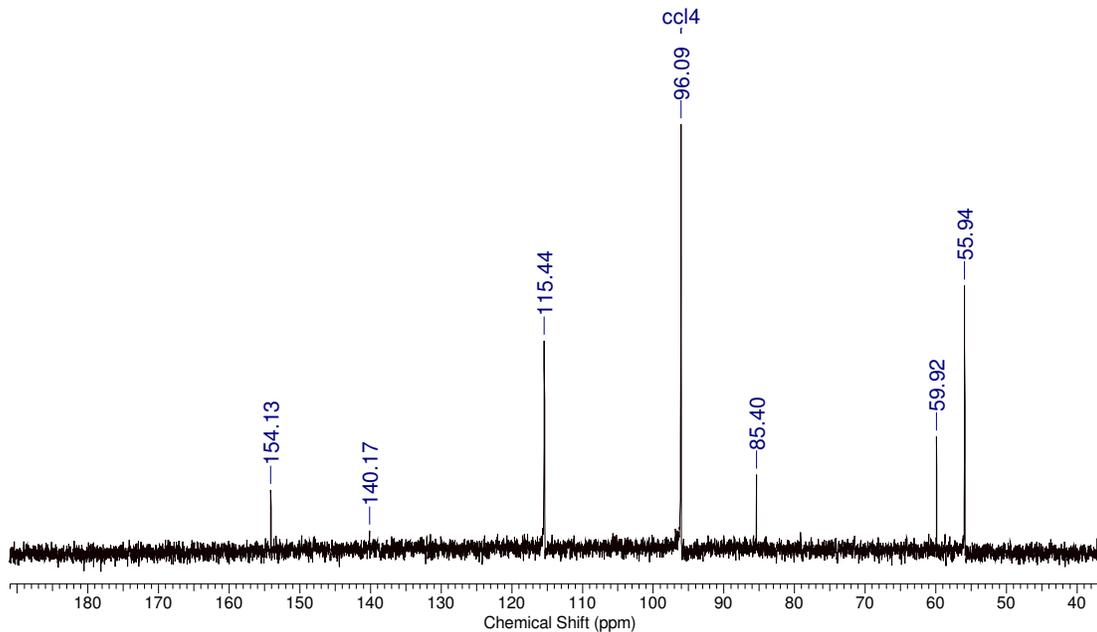
Acquisition Time (sec)	5.3084	Comment	Imported from UXNMR.
Date	22 Sep 2006 16:49:04		
File Name	I:\EGB-Iodo2CF\EGB-Iodo2CF_001000fid	Frequency (MHz)	300.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	8
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Sweep Width (Hz)	6172.84	Temperature (degree C)	27.000
		Original Points Count	32768
		Solvent	CHLOROFORM-D



Espectro 1. Espectro de RMN de ¹H de (2).

No espectro de RMN -¹³C de (2) nota-se claramente um sinal característico de carbono aromático *ipso* ao iodo em δ 85.40. Há ainda dois sinais atribuídos a três metoxilas em δ 59,92 (1C) e 55,94 (2C), um sinal para dois CH em 115,44 ppm e outros dois sinais para os carbonos quaternários em 154,13 (2C) e em 140,17 (1C). Todos os dados estão em concordância com valores da literatura. (Tabela 2).

Acquisition Time (sec)	0.8356	Comment	Imported from UXMNR.		
Date	14 Sep 2006 16:17:04				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\SUBSX\SUBSX_003000fid				
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	13C	Number of Transients	338
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D		Sweep Width (Hz)	19607.84	
Temperature (degree C)	27.000				



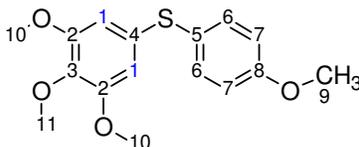
Espectro 2. Espectro de ^{13}C obtido em CCl_4 de (2)

Tabela 2. Comparação entre os deslocamento químicos de (2) e valores de literatura anterior (Banwell, Hamel *et al.*, 2006).

^1H obt	^1H lit	^{13}C obt*	^{13}C lit*
6.89 (s, 2H)	6.89 (s, 2H)	154.13 (2C)	153.7 (2C)
3.84 (s, 6H)	3.84 (s, 6H)	140.17 (C)	138.0 (C)
3.82 (s, 3H)	3.82 (s, 3H)	115.44 (2CH)	114.7 (2CH)
		85.40 (C)	86.0 (C)
		59.92 (CH_3)	60.6 (CH_3)
		55.94 (2CH_3)	56.1 (2CH_3)

* ^{13}C lit em solvente CDCl_3 e o de espectro de (2) obtido em CCl_4 (D_2O)

2.2 Etapa ii (produto 5)

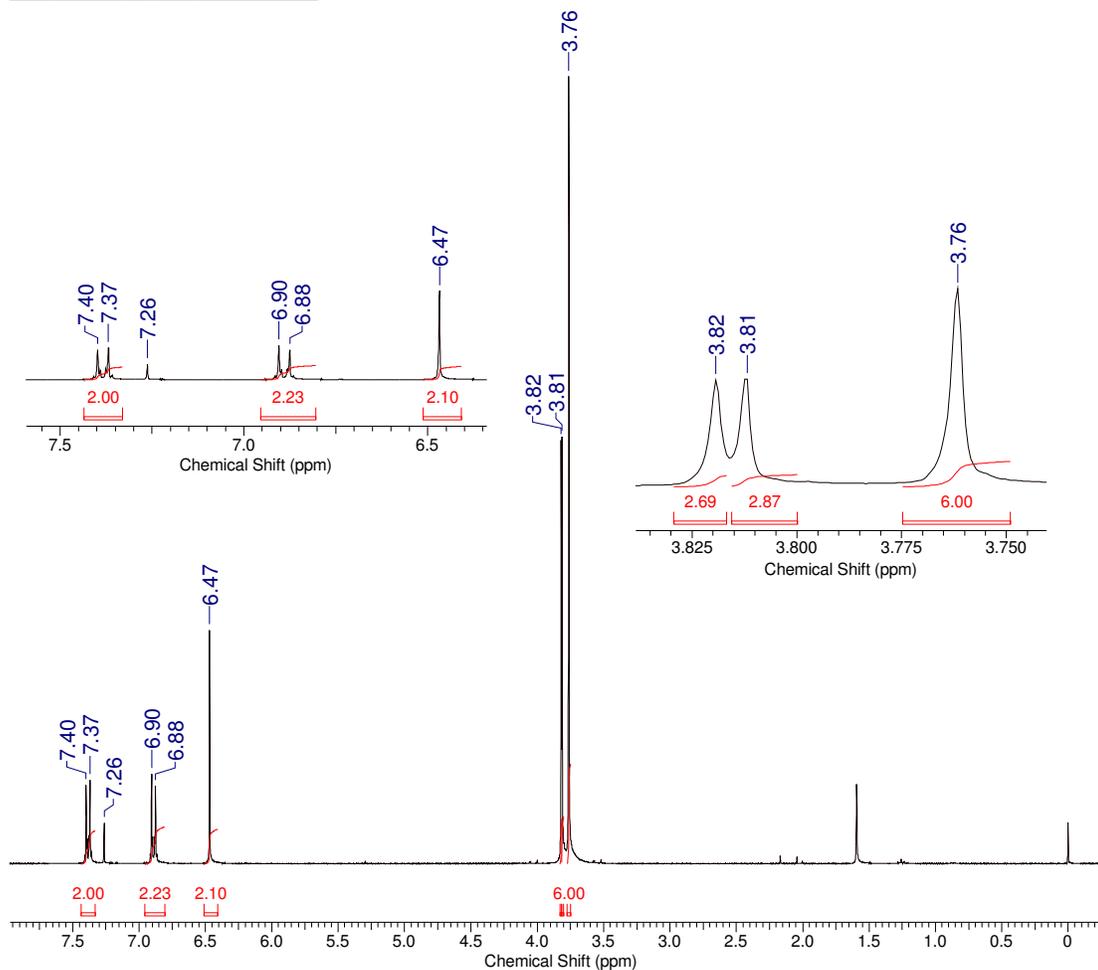


Numeração padrão para discussão de resultados

A reação de acoplamento entre o iodo benzeno (2) e 4-metoxitiofenol (Esquema 1) forneceu em bom rendimento (76%) o produto (5) almejado. A separação conduzida através da filtração da mistura reacional em sílica gel fase normal usando como fase móvel AcOEt puro para que fossem removidos resíduos inorgânicos do complexo Neocuproína-Cu⁺, sendo o filtrado submetido a separação em coluna cromatográfica do tipo flash.

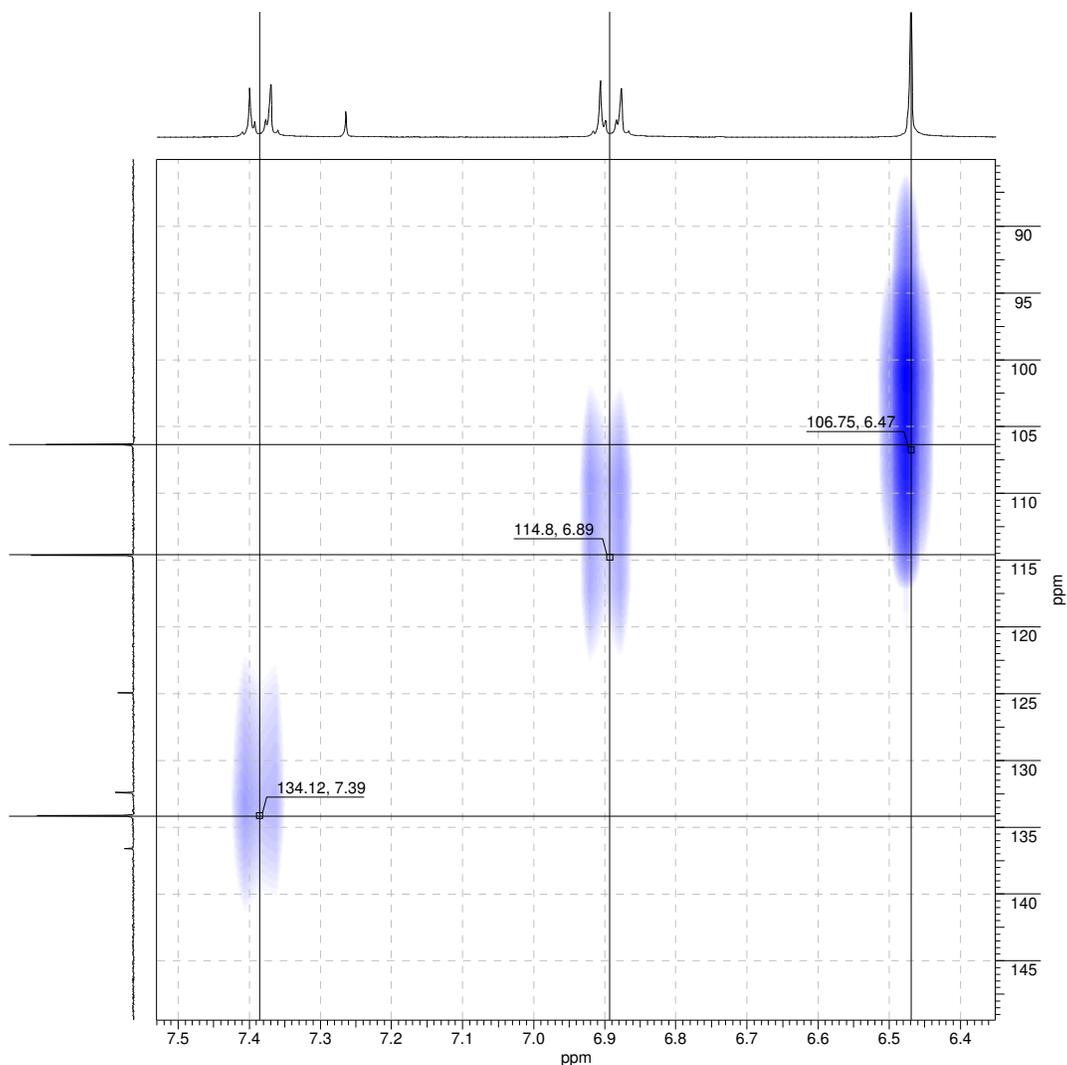
O espectro de RMN-¹H revela o sucesso do acoplamento pela observância dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos característicos do 4-metoxitiofenol os quais aparecem como dois dubletos distorcidos, H7 em δ 6,98 (2H d J_{orto} :8.85Hz) e H6 em δ 7.39 (2H d J_{orto} :8.85Hz) e um singleto em δ 6,47 para H1. Notadamente se observam 3 singletos compatíveis com a presença de quatro metoxilas em δ 3.82 e 3.81 para 3H cada e em δ 3.76 para 6H (Espectro 3).

Acquisition Time (sec)	5.3084	Comment	Imported from UXNMR.	
Date	25 Sep 2006 18:16:32	File Name	I:\EGB101\EGB101_001000fid	
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients 8
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	6172.84	
Temperature (degree C)	27.000			



Espectro 3. Espectro de RMN de ¹H de (5)

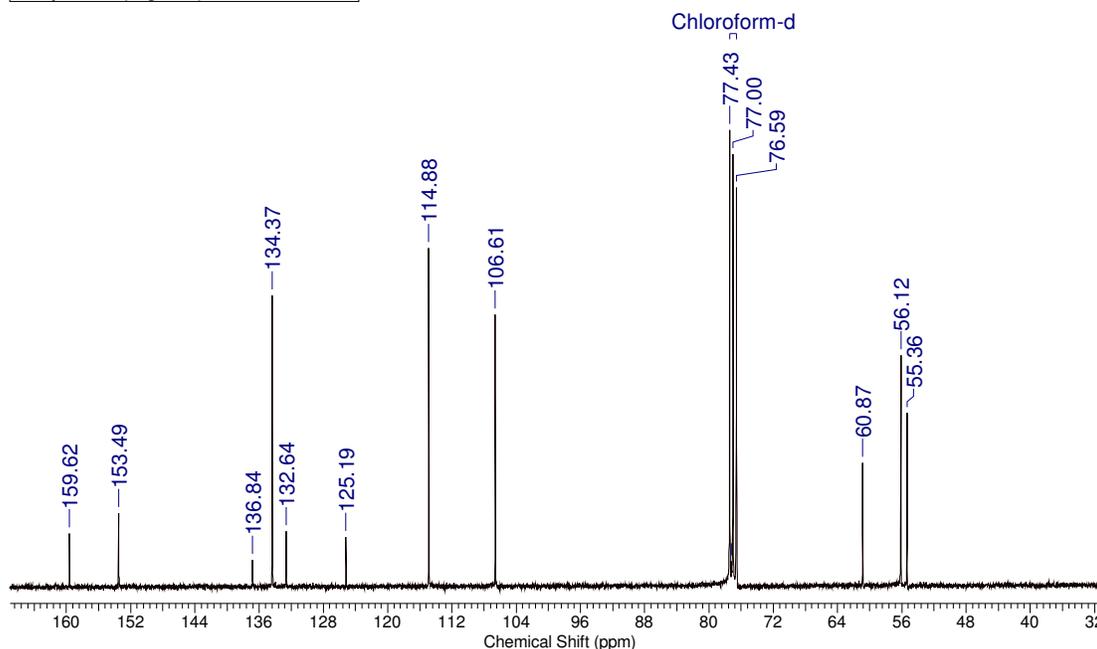
Podemos observar pelo espectro bidimensional para acoplamento J_1 C-H (HSQC) correlações que mostram que H7 6,98 em se correlaciona com os dois C7 aromáticos em 114,9, e ainda outra correlação entre H6 e C6 (7,39;134,4). E, por fim, correlação entre o singlete H1 em 6,27 e C1 em 106,6. (Espectro Bidimensional 1).



Espectro Bidimensional 1. Espectro HSQC do composto (5).

Pela análise do espectro de RMN-¹³C (Espectro 4) podemos observar três sinais para carbonos metínicos C6 δ 134,37, C7 δ 114,88 e C1 δ 106,60 que confirmam a ocorrência da reação de acoplamento. Ainda pode-se observar a presença de três sinais compatíveis com 4 metoxilas em δ 60,87 e 55,35 para um carbono e em δ 56.11 para dois carbonos que podem ser atribuídos respectivamente a C11, C9 e C10. Temos ainda evidenciados quatros outros sinais compatíveis com carbonos quaternários (**Tabela 3**).

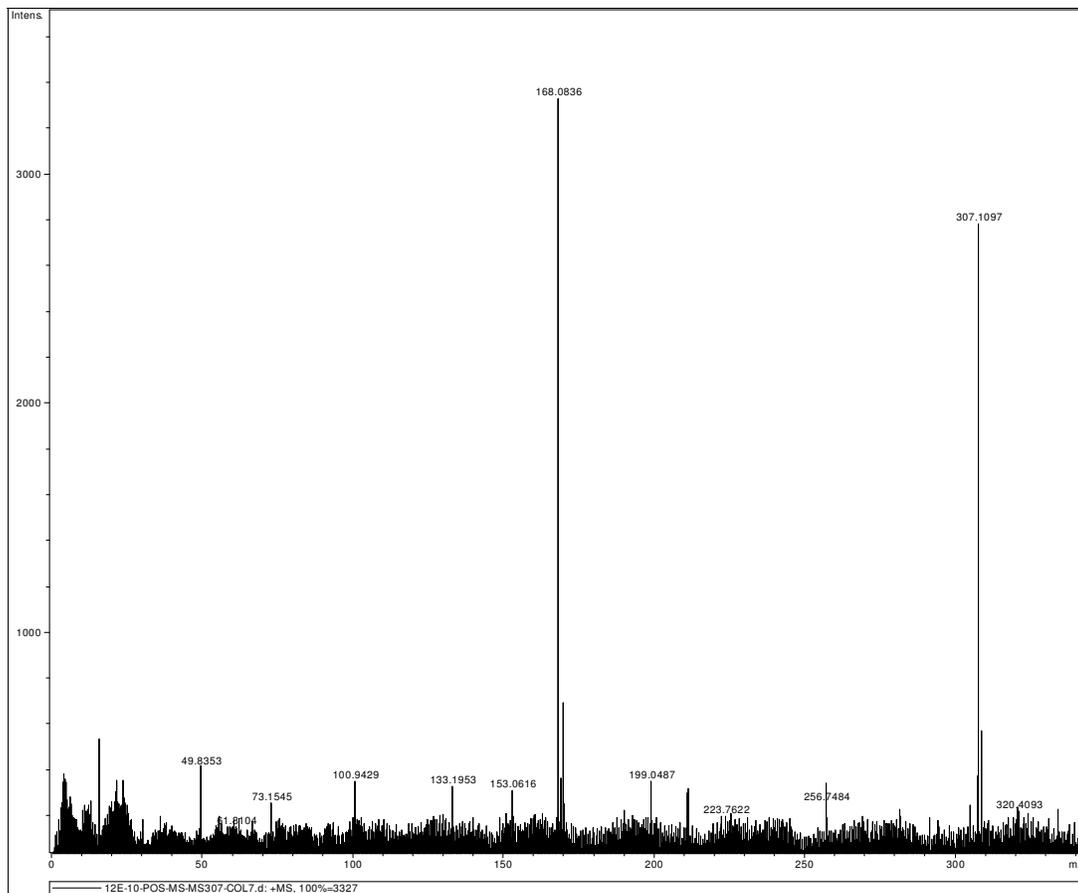
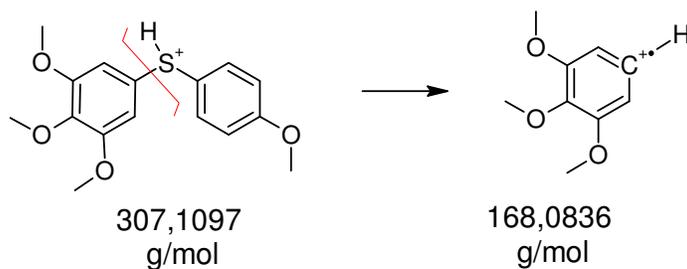
Acquisition Time (sec)	0.8356	Comment	Imported from UXMNR.
Date	23 Oct 2006 14:51:44		
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB101\EGB101_003000fid		
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	¹³ C
Original Points Count	16384	Points Count	16384
Solvent	CHLOROFORM-D	Pulse Sequence	zgpg30
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	19607.84

Espectro 4. Espectro de ¹³C de (5)Tabela 3. Atribuições do espectro de RMN ¹H e ¹³C de (5). Solvente CDCl₃

	¹ H	¹³ C
1	6,47 (s, 2H)	106,61
2	-	153,61
3	-	136,84
4	-	125,18
5	-	132,64
6	7,39 (d J _{orto} :8,85Hz, 2H)	134,37
7	6,98 (d J _{orto} :8,85Hz, 2H)	114,88
8	-	159,61
9	3,81 (s, 3H)	55,35
10	3,76 (s, 6H)	56,11
11	3,82 (s, 3H)	60,87

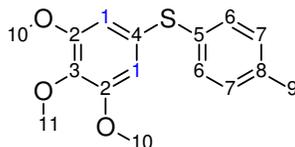
De acordo com espectro de massas por ionização por eletrospray de (5) pode-se evidenciar a presença de um sinal atribuído à molécula na sua forma protonada em m/z + H 307,1097 (C₁₆H₁₈O₄SH⁺). As outras fragmentações se devem a quebra da ligação

entre S-C4 gerando um fragmento, com anel trimetoxilado também protonado em m/z 168,0836 ($C_9H_{11}O_3H^+$) [M-C₇H₇OS + H] (**Espectro 5**).



Espectro 5. Espectro de massas modo positivo para o composto (5).

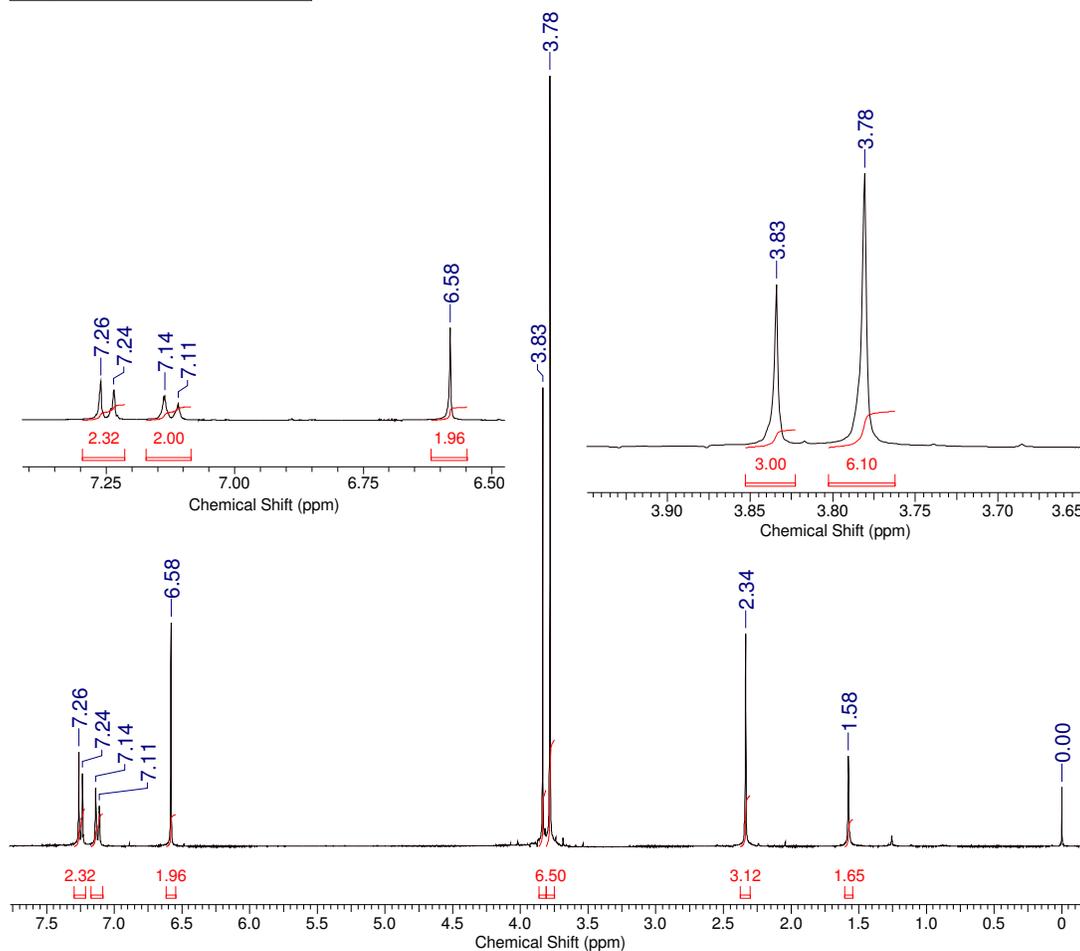
2.3 Etapa ii (produto 6)



O produto (6) foi obtido e purificado seguindo os mesmos procedimentos adotados para a substância (5), embora tenha sido obtido com melhor rendimento (91%).

O espectro de RMN-¹H revela um singlete referente ao hidrogênio de metila aromática em δ 2,34 referente a impureza do tiocresol (**Esquema 1**). Temos o mesmo padrão de sinais na região de aromáticos, dois dubletos para H6 δ 7.25 (2H J_{orto} :7,54) e H7 δ 7.13 (2H J_{orto} :8.48) e um singlete em δ 6.58 para H1. Fica ainda evidenciada a presença de dois sinais característicos de metoxilas em δ 3.78 e 3.83 para seis e três hidrogênios, respectivamente (**Espectro 6**).

Acquisition Time (sec)	5.3084	Comment	Imported from UXNMR.		
Date	23 Oct 2006 11:39:44	File Name	I:\EGB200\EGB200_001000fid		
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	6172.84		
Temperature (degree C)	27.000				

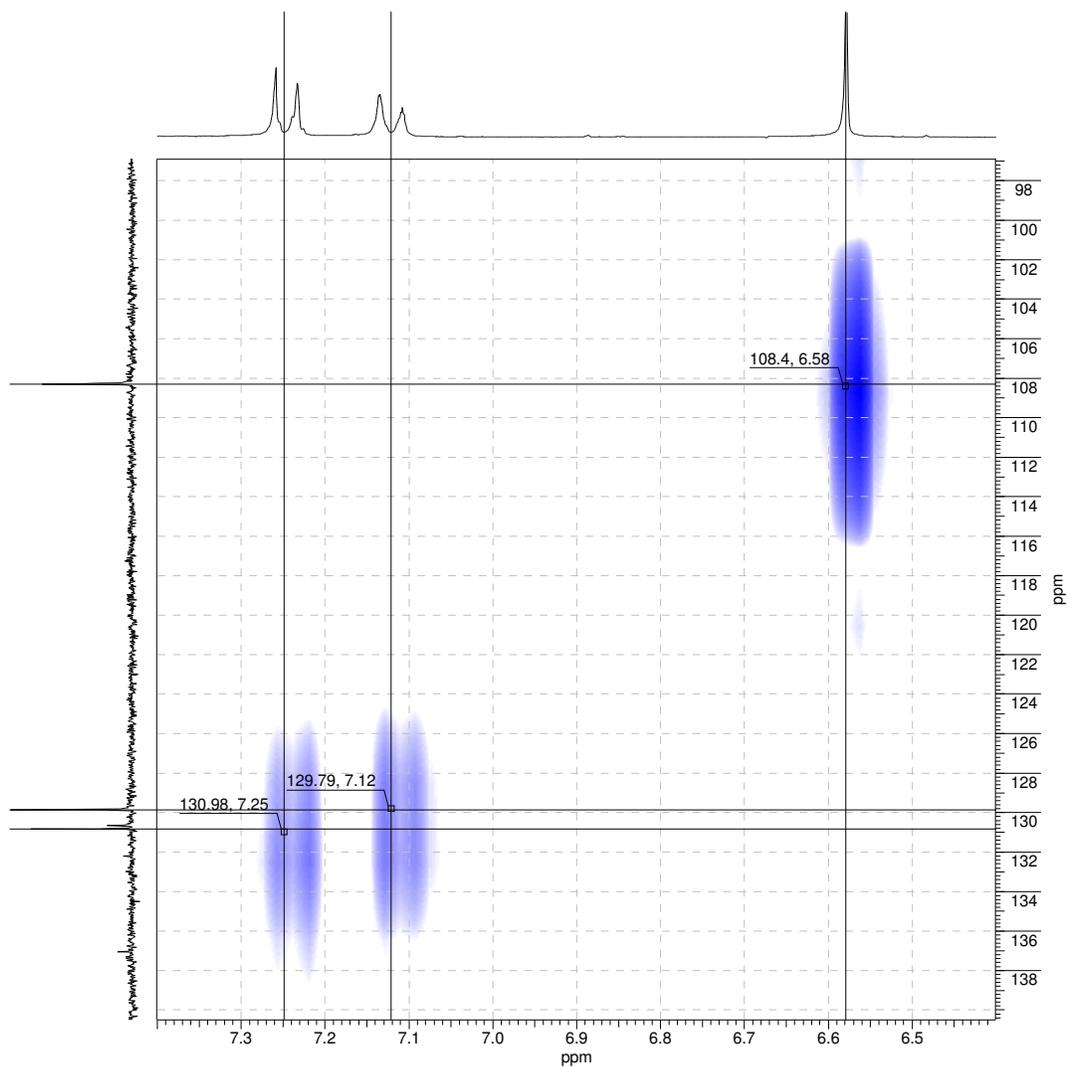


Espectro 6. Espectro de RMN de ^1H de (6).

No espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 7, Tabela 4) os sinais referentes a C8 (CH_3) δ 21,06 e duas metoxilas C3 δ 60,89 e C2 δ 56,16 e ainda 3 sinais para os carbonos metínicos C6 e C7 em δ 130,9 e 129,93 e C1 em δ 108,37 confirmam a ocorrência do acoplamento. A correta atribuição dos sinais dos carbonos quaternários fica dificultada apenas com este experimento.

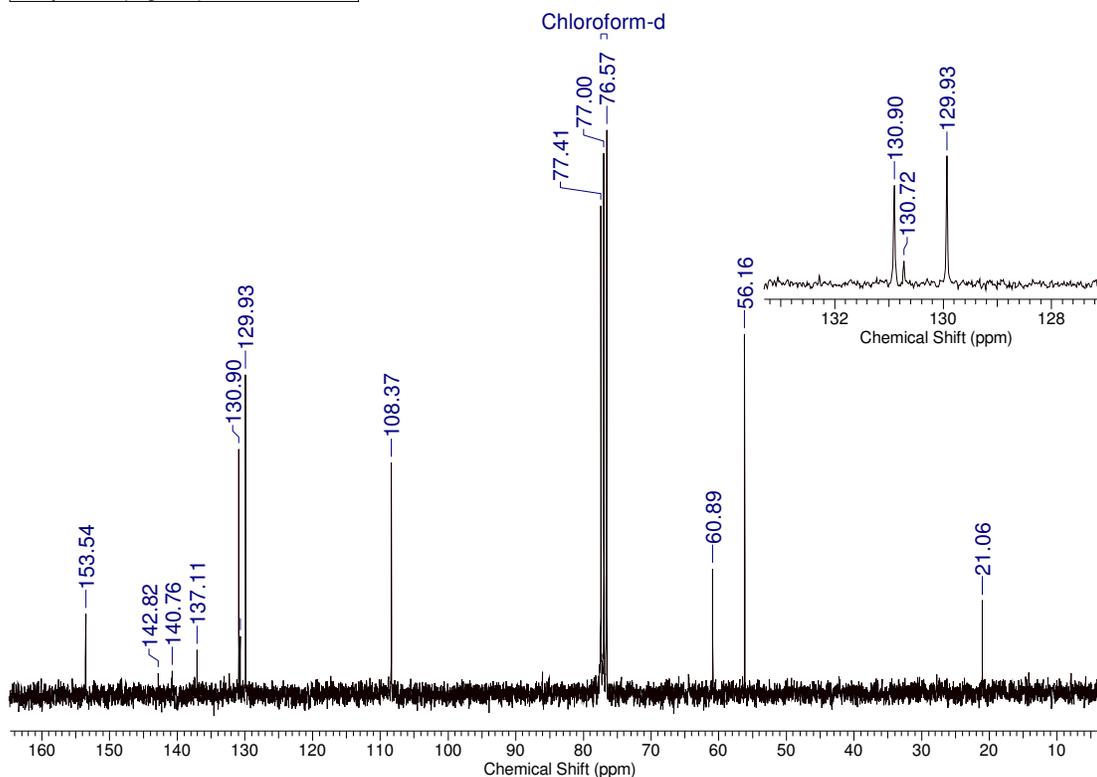
Pelo espectro bidimensional de HSQC (Espectro Bidimensional 2) podemos observar correlações que sugerem os sinais em 7,25 H6 se correlaciona com carbono em 130,9 e para H7 em 7,13 com carbono em 129,9 C7. Apesar das duas correlações estarem muito próximas é possível distinguí-las pela altura relativa a linha base do

espectro. Ainda podemos ver uma correlação do singlete H1 em 6,58 com o carbono C1 em 108,4 ppm.



Espectro Bidimensional 2. Espectro de HSQC do composto (8)

Acquisition Time (sec)	0.8356	Comment	Imported from UXMNR.		
Date	23 Oct 2006 11:44:00				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB200\EGB200_003000fid				
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	13C	Number of Transients	967
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D		Sweep Width (Hz)	19607.84	
Temperature (degree C)	27.000				



Espectro 7. Espectro de ^{13}C para (6) e ampliação para destaque da região de $\delta 128$ a 134 .

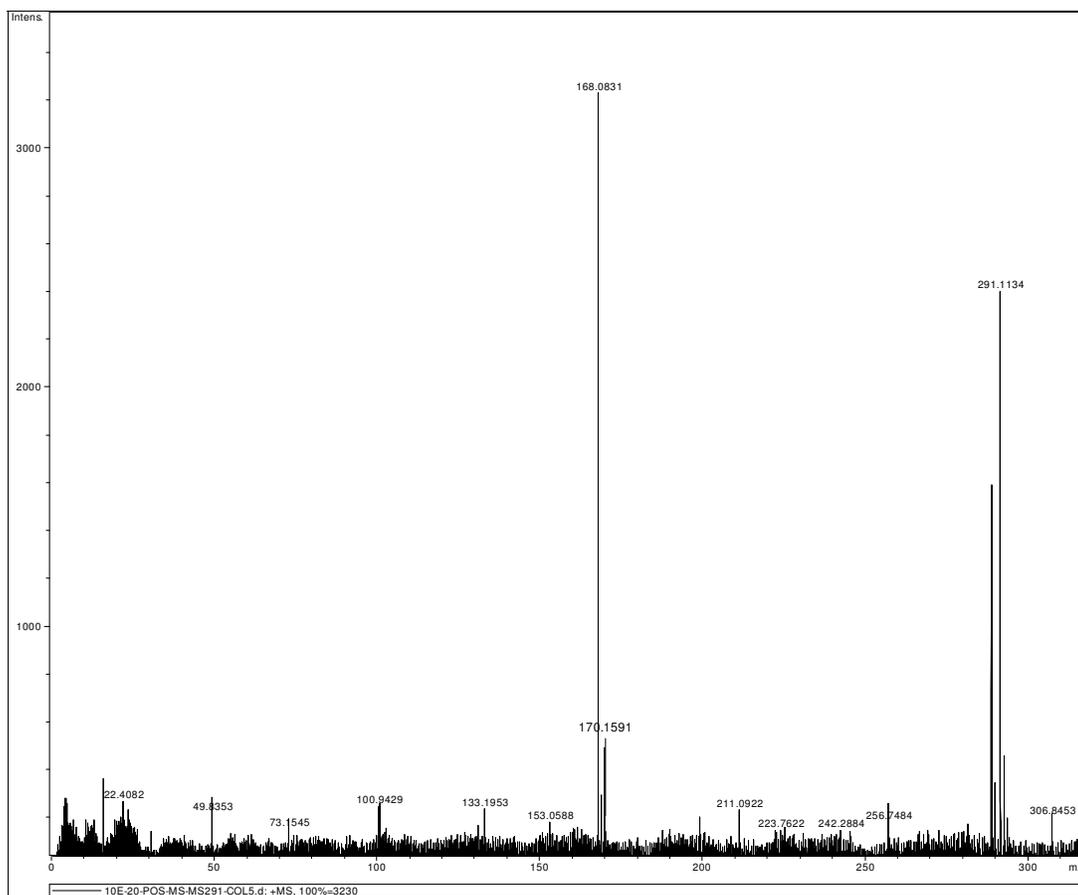
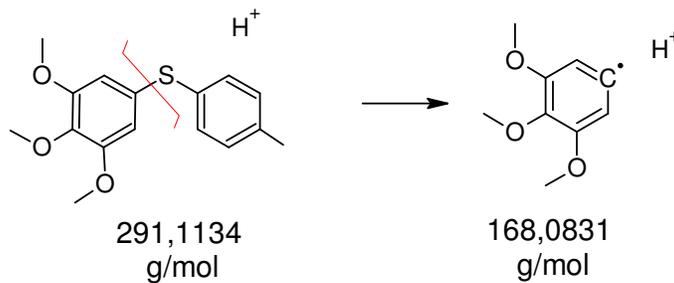
Tabela 4. Atribuições do espectro de RMN ^1H e ^{13}C de (6). Solvente CDCl_3

	^1H	^{13}C
1	6,58 (s, 2H)	108,37
2	-	153,54
3	-	142,82*
4	-	130,72*
5	-	137,11*
6	7,25 (d J_{orto} :7,54Hz, 2H)	130,9
7	7,13 (d J_{orto} :8,85Hz, 2H)	129,93
8	-	140,76*
9	2,34 (s, 3H)	21,06
10	3,78 (s, 6H)	56,16
11	3,83 (s, 3H)	60,89

*Sinais podem estar trocados.

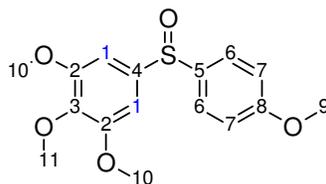
A obtenção de (6) pode ser confirmada pelo espectro de massas que mostra um sinal referente ao pico molecular protonado em $m/z + H$ em 291,1134 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{SH}^+$). A

quebra sinalizada em 168,0831 ($C_9H_{11}O_3H^+$) [$M-C_7H_7OS + H$] pode ser atribuída ao cátion gerado pela liberação do anel trimetoxilado mais um próton (**Espectro 8**).



Espectro 8. Espectro de massa do composto (6)

2.4 Etapa iii (produto 7)



Para que se obtivesse o produto 7 por meio da monoxidação de (5), evitando a formação de sulfonas, varias metodologias foram tentadas. A oxidação por meio de peróxido de hidrogênio catalisada por sulfato de manganês e tampão de carbonato (pH 12) em acetonitrila (Alonso e Nájera, 2002) e uso de aduto de peróxido de hidrogênio e uréia (UHP), em fase sólida (Varma e Kumar, 1999) não foram bem sucedidas.

Uma metodologia bastante eficiente na produção específica de sulfóxidos onde se faz reagir (5) com dióxido de cloro (ClO_2) em acetato de etila obteve-se (7) sem produção de sulfonas, no entanto o ClO_2 deve ser previamente preparado, fazendo reagir clorito de sódio e ácido clorídrico em água segunda a equação (1). (Kutchin, Rubtsova *et al.*, 2001)

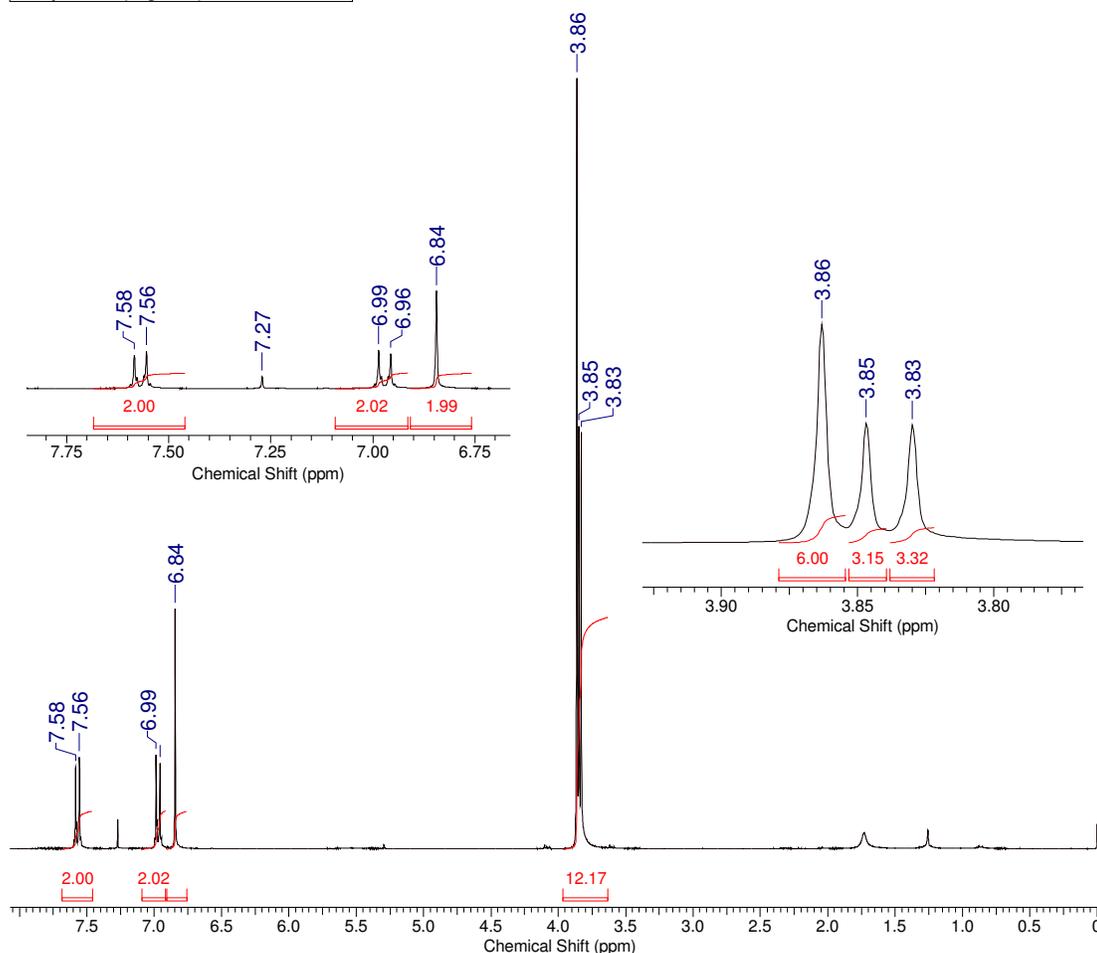


O ClO_2 , gás amarelo, produzido e em solução aquosa é extraído com AcOEt, para então ser submetido à reação de oxidação de (5) a sulfóxido.

Apesar da oxidação ClO_2 ser bastante seletiva para a formação de sulfóxidos, o uso do ácido metacloroperbenzóico (*m*MCPA) em quantidade equimolar ao sulfeto, mostrou ser mais prática, por ter apenas um passo de síntese e ainda levar a um excelente rendimento do produto desejado (7). (Clennan e Chen, 1988)

A formação do composto (7) pôde ser confirmada pelos espectros de RMN- ^1H . A desproteção dos H1 e H6, causada pelo cone da sulfinila é observada. O singlete para o H1 δ 6,84 (s, 2H) desprotegeu 0,37 ppm em relação ao sulfeto (5) e H6 δ 7,57 (d, J:8,67Hz) em 0,18 ppm. Isso confirma a diferenciação do estado de oxidação do átomo de enxofre (**Espectro 9**).

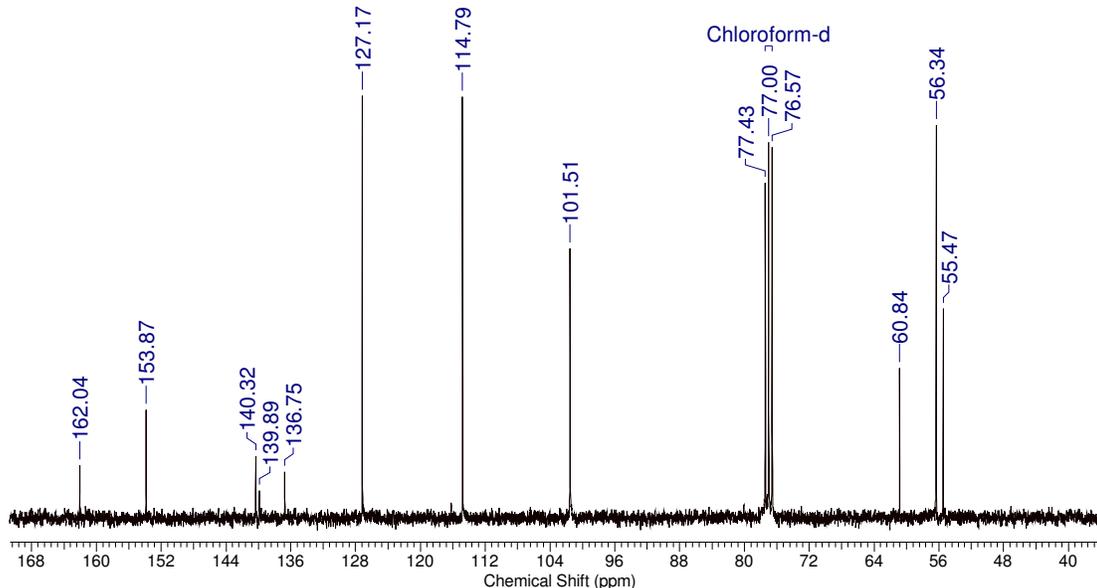
Acquisition Time (sec)	5.3084	Comment	Imported from UXNMR.		
Date	23 Oct 2006 15:21:36				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB120\EGB120_001000fid				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D		Sweep Width (Hz)		6172.84
Temperature (degree C)	27.000				



Espectro 9. Espectro de ¹H de (7)

No espectro de RMN-¹³C (Espectro 10, Tabela 5) observa-se que os deslocamentos sofrem proteções em relação ao sulfeto (5). O sinal referente a C1 de (7) em δ 101.51 sofreu uma proteção de 5,1 ppm e C6 em δ 127,17 foi protegido em 7.17 ppm em relação a sulfeto precursor. A mudança do estado de oxidação do enxofre, de um sulfeto para um sulfóxido não altera contudo o sinal de C7 δ 114,88 ppm em relação à (5) (**Espectro 10**).

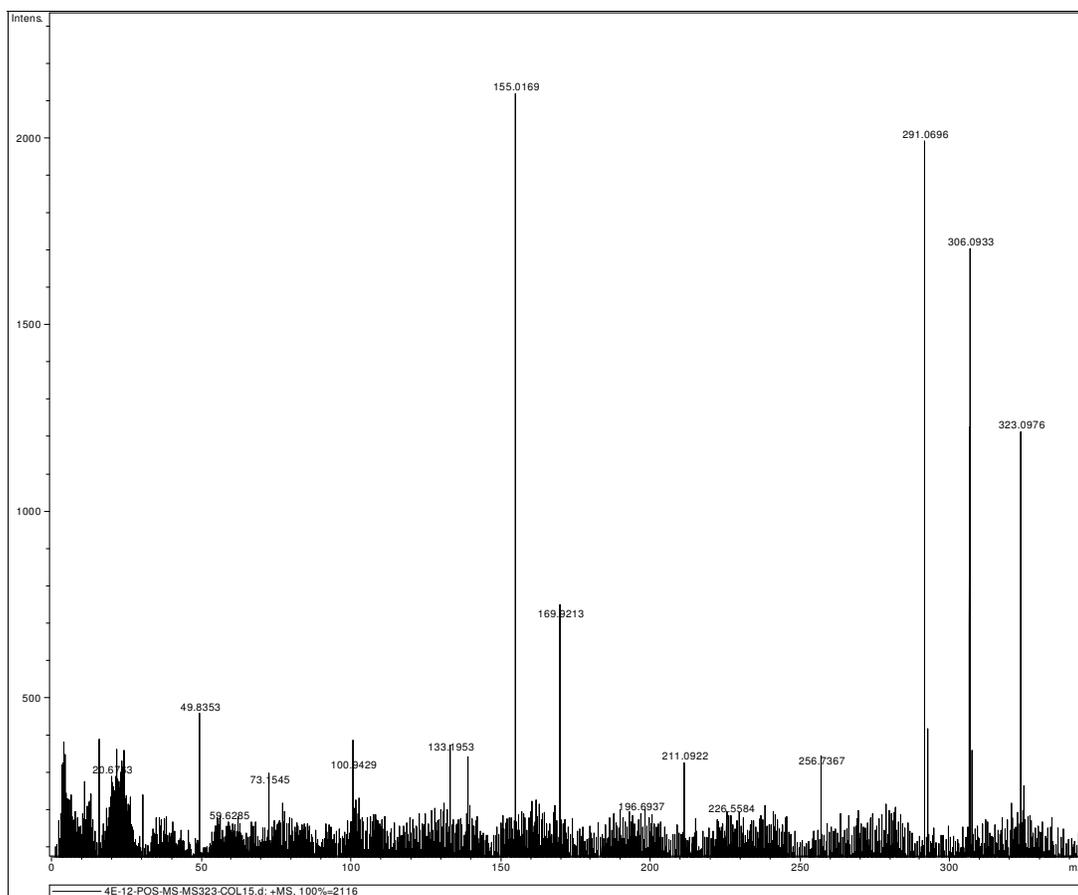
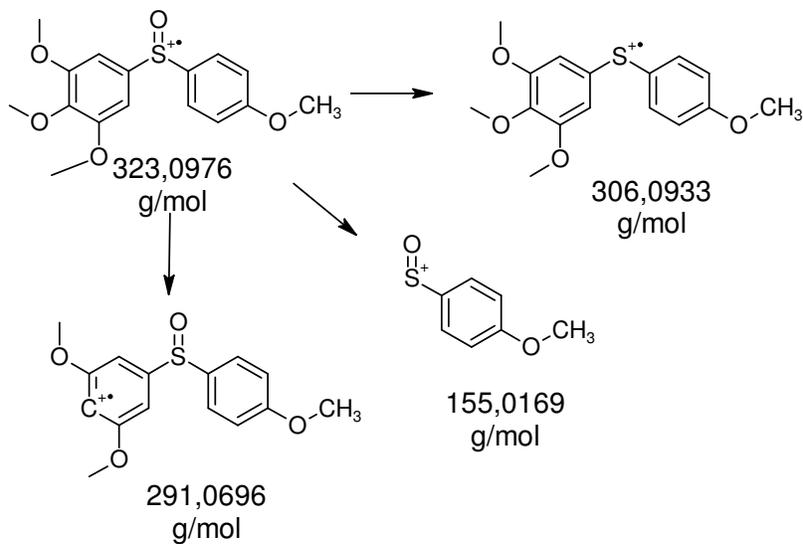
Acquisition Time (sec)	0.8356	Comment	Imported from UXMNR.
Date	23 Oct 2006 15:04:32		
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB120\EGB120_003000fid		
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	¹³ C
Original Points Count	16384	Points Count	16384
Solvent	CHLOROFORM-D	Pulse Sequence	zgpg30
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	19607.84

Espectro 10. Espectro de ¹³C de (7).Tabela 5. Atribuições dos espectros de ¹H e ¹³C para (7)

	¹ H	¹³ C
1	6,84 (s, 2H)	101,51
2	-	153,90
3	-	136,75*
4	-	140,34*
5	-	139,92*
6	7,57 (d J _{orto} :8,67Hz, 2H)	127,20
7	6,98 (d J _{orto} :8,67Hz, 2H)	114,79
8	-	162,07
9	3,83 (s, 3H)	55,49
10	3,86 (s, 6H)	56,37
11	3,85 (s, 3H)	60,87

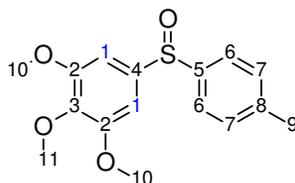
* Valores podem estar trocados

A monoxidação do produto (5) pode ainda ser confirmada pelo espectro de massas onde há um sinal para o íon molecular protonado em $m/z + H$ 323,0976 ($C_{16}H_{18}O_5SH^+$). O sinal em 306,0933 ($C_{16}H_{18}O_4SH^+$) pode ser atribuído ao íon gerado pela perda do oxigênio. O sinal em 291,0696 ($C_{15}H_{15}O_4S$) é compatível com a massa da espécie sem uma das metoxilas. A massa em 155,0169 ($C_7H_7O_2S$) pode ser atribuída ao íon remanescente à perda do anel trimetoxilado.



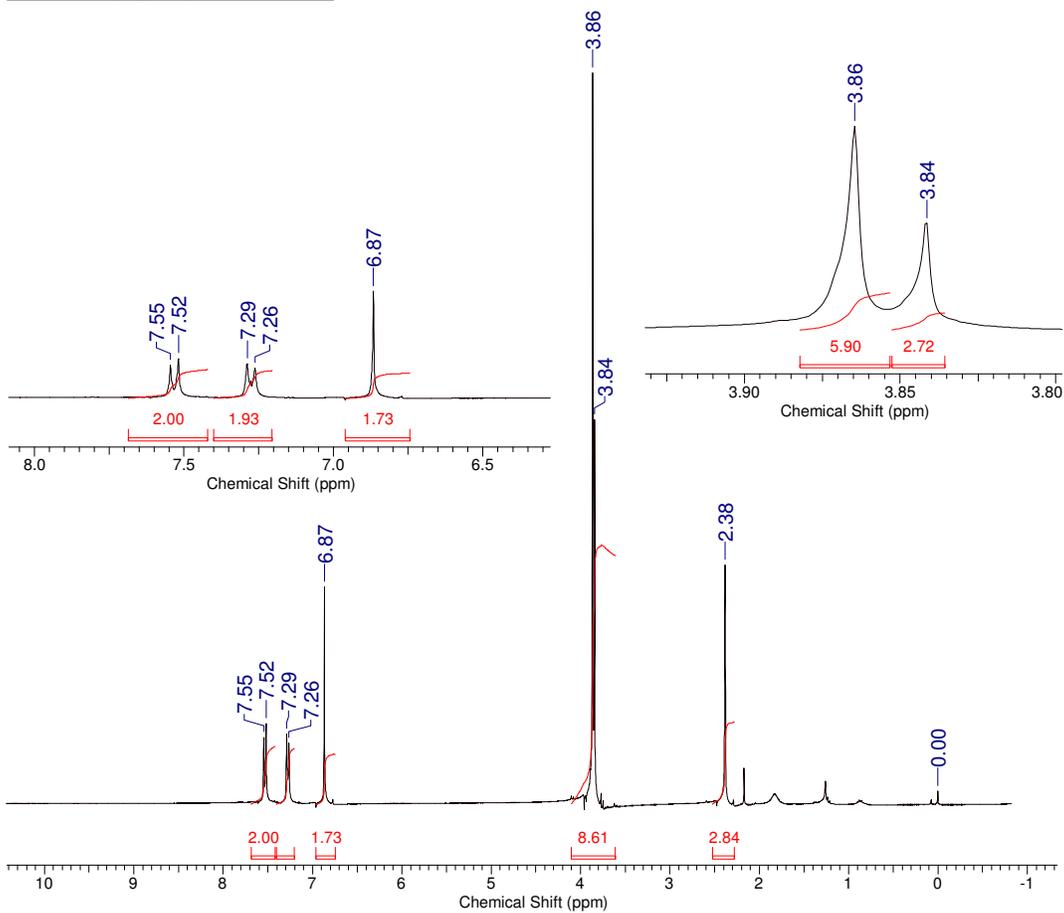
Espectro 11. Espectro de massas de (7)

2.5 Etapa iii (produto 8)



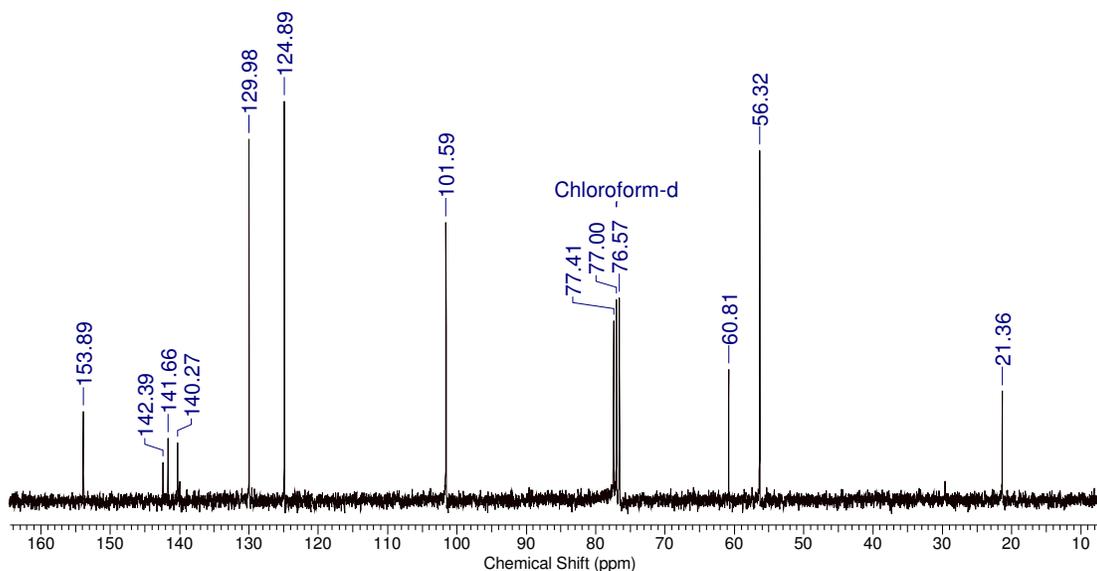
A formação do sulfóxido (8) foi confirmada pelo espectro de RMN-¹H (Espectro 12) que mostra, de forma análoga ao de (7), os mesmos padrões de desproteção dos sinais do H1 e H6. O singlete para H1 δ 7,15 (s, 2H) sofre uma desproteção na ordem de 0,57 ppm em relação o presente em (6) e o H6 δ 7,81 (d, J_{orto} : 8,29Hz, 2H) está desprotegido na ordem de 0,56 ppm.

Acquisition Time (sec)	5.3084	Comment	Imported from UXMNR.		
Date	24 Oct 2006 18:16:32				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EG220\EG220_001000fid				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D			Sweep Width (Hz)	6172.84
Temperature (degree C)	27.000				

Espectro 12. Espectros de ¹H de (8).

No espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 13, Tabela 6) de (8) observa-se comportamento similar ao que ocorre com (7). C1 em δ 101,59 sofre proteção de quase 7 ppm e C6 δ 124,89 sofreu uma proteção de cerca de 5 ppm em relação a (6).

Acquisition Time (sec)	0.8356	Comment	Imported from UXMNR.		
Date	24 Oct 2006 18:18:40				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB220\EGB220_003000fid				
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	609
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zpgpg30
Solvent	Pyr	Sweep Width (Hz)	19607.84	Temperature (degree C)	27.000



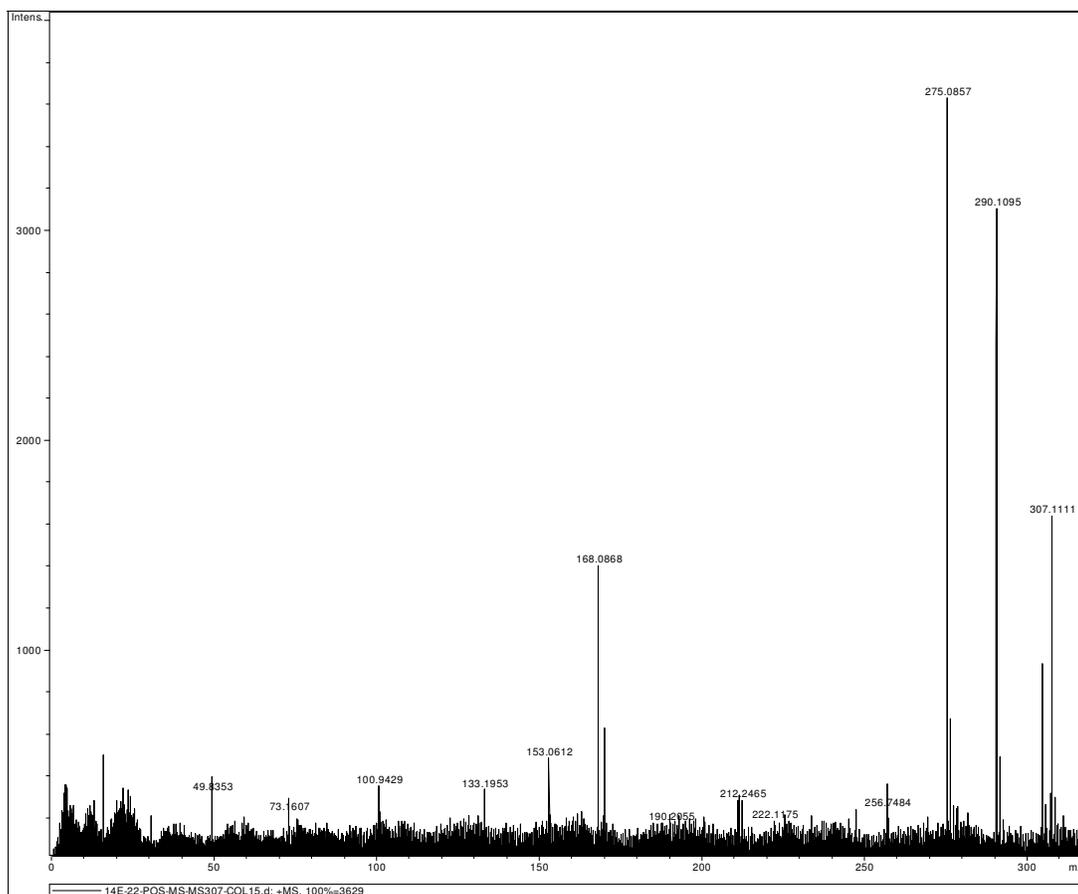
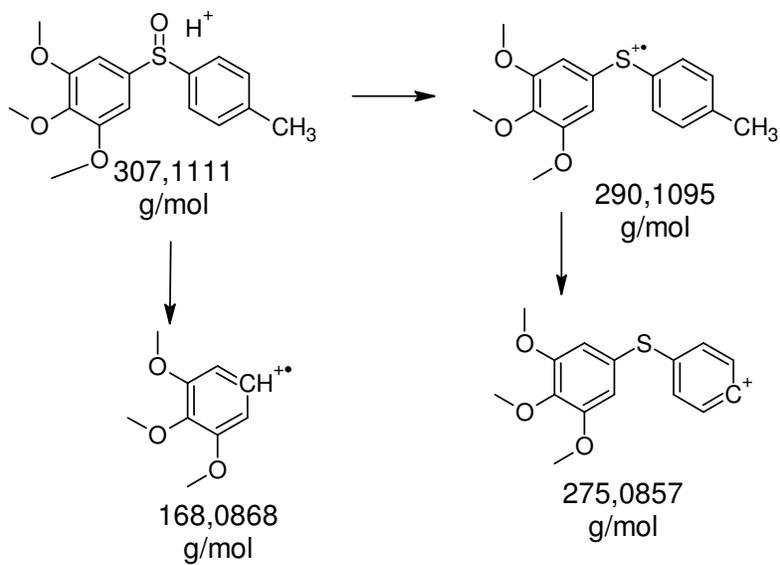
Espectro 13. Espectro de ^{13}C de (8).

Tabela 6. Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C (8)

	^1H	^{13}C
1	6,87 (s, 2H)	101,59
2	-	153,89
3	-	142,39*
4	-	140,27*
5	-	141,66*
6	7,54 (d, J_{orto} :8,10Hz, 2H)	124,89
7	7,28 (d J_{orto} :7.91Hz, 2H)	129,98
8	-	123,03
9	2,38 (s, 3H)	21,36
10	3,86 (s, 6H)	56,32
11	3,84 (s, 3H)	60,81

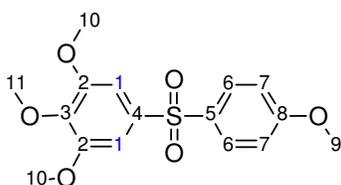
*Valores podem estar trocados. † Valor pode estar sobreposto ou não foi adquirido.

A monoxidação do composto (6) pôde ser confirmada pelo espectro de massas de (8) onde claramente se observa em $m/z + \text{H}$ 307,1111 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{SH}^+$). Ainda registra-se sinais em ($\text{M} + - \text{O}$) 290,1095 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}$) e em 275,0857 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{S}$).



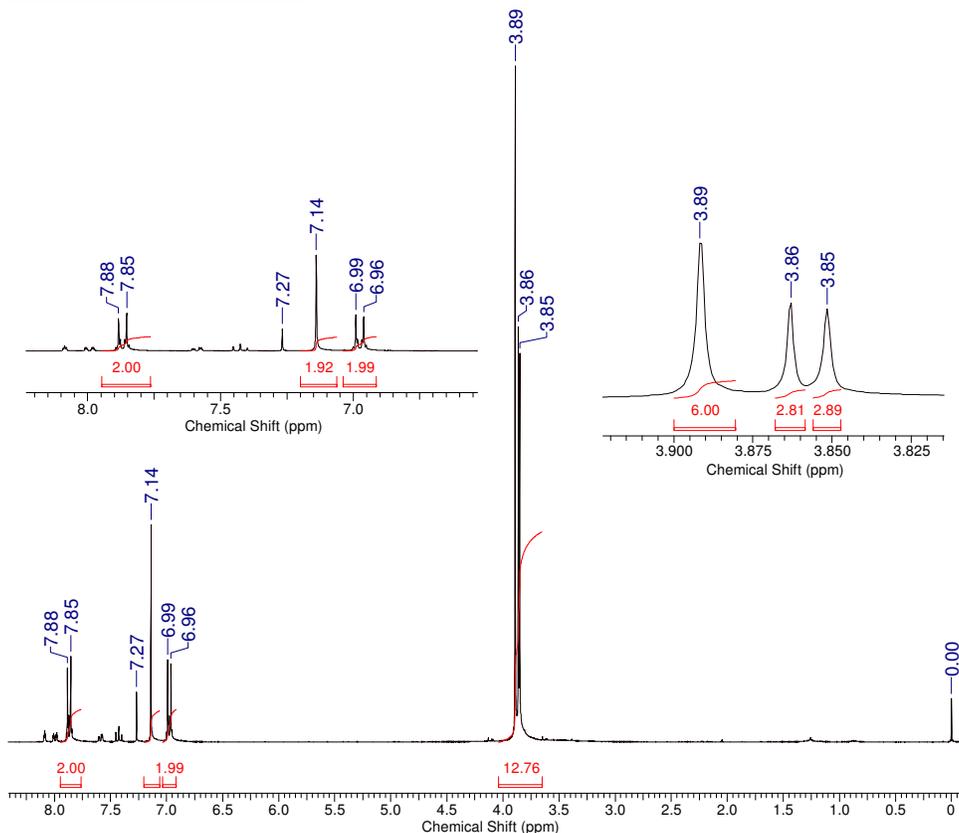
Espectro 14. Espectro de massas de (8)

2.6 Etapa iv (produto 9)



A formação da sulfona (9) a partir de (5) conseguida pelo uso de dois equivalentes de *m*CPBA em clorofórmio levou a rendimentos maiores que 95%. O composto (9) foi identificado pelo espectro de RMN de ^1H (Espectro 15) com sendo um sulfóxido devido a maior proteção dos H1 δ 7,14 (s, 2H) mais desprotegido que o sulfeto em 0,67 ppm, e em relação ao sulfóxido em 0,3 ppm. O fenômeno se assemelha ao que acontece com H6 em δ 7,87 (d, J_{orto} : 9,04Hz, 2H). A **Figura 6, Tabela 9** páginas 96 e 97 mostram claramente o padrão de desproteções acarretado pelas sucessivas oxidações a sulfóxidos e sulfonas.

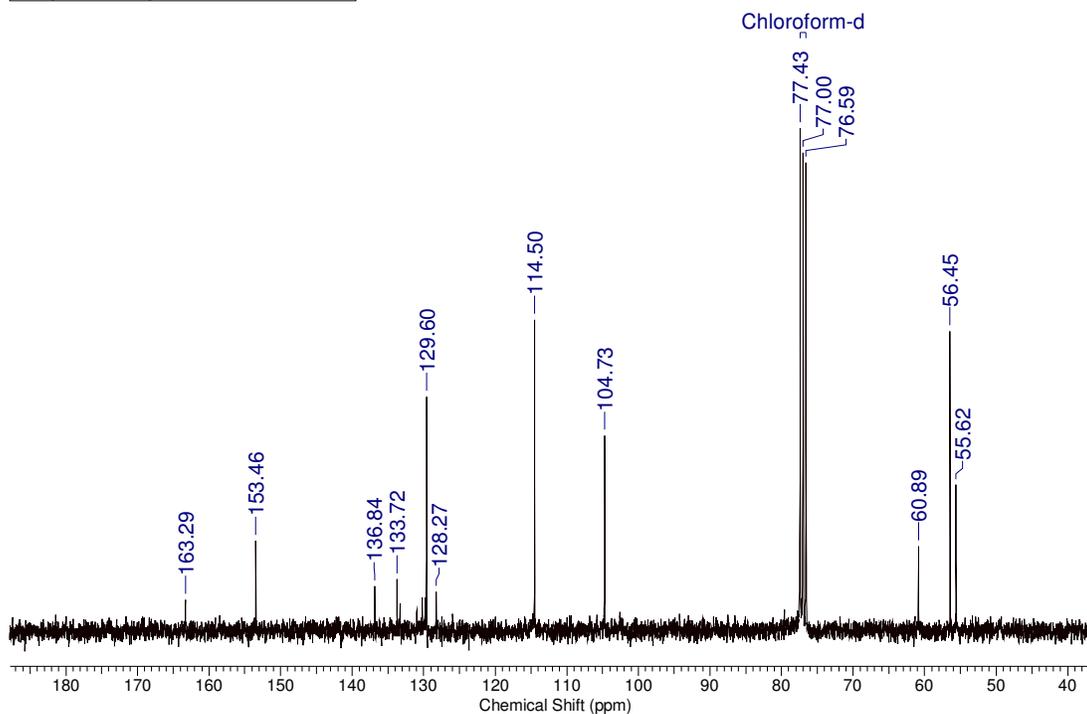
Acquisition Time (sec)	5.3084	Comment	Imported from UXNMR.		
Date	20 Oct 2006 18:01:36				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB-110\EGB-110_001000fid				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	6172.84		
Temperature (degree C)	27.000				



Espectro 15. Espectro de RMN ^1H de (9).

No espectro de RMN-¹³C (Espectro 16, Tabela 7) de (9) nota-se a proteção de C1 em δ 104,73, de aproximadamente 2,0 ppm em relação a (5) e C6 em δ 129,60, por volta de 5,0 ppm em relação aos deslocamentos químicos para esses carbonos no sulfeto (5). Esses mesmos carbonos estão desprotegidos em relação ao sulfóxido (7) de 5,0 a 7,0 ppm. C7 manteve o valor de deslocamento químico por volta de 114,0 ppm em (5), (7) e (9).

Acquisition Time (sec)	0.8356	Comment	Imported from UXMNR.		
Date	20 Oct 2006 18:05:52				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB-110\EGB-110_002000fid				
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	¹³ C	Number of Transients	724
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	19607.84		
Temperature (degree C)	27.000				



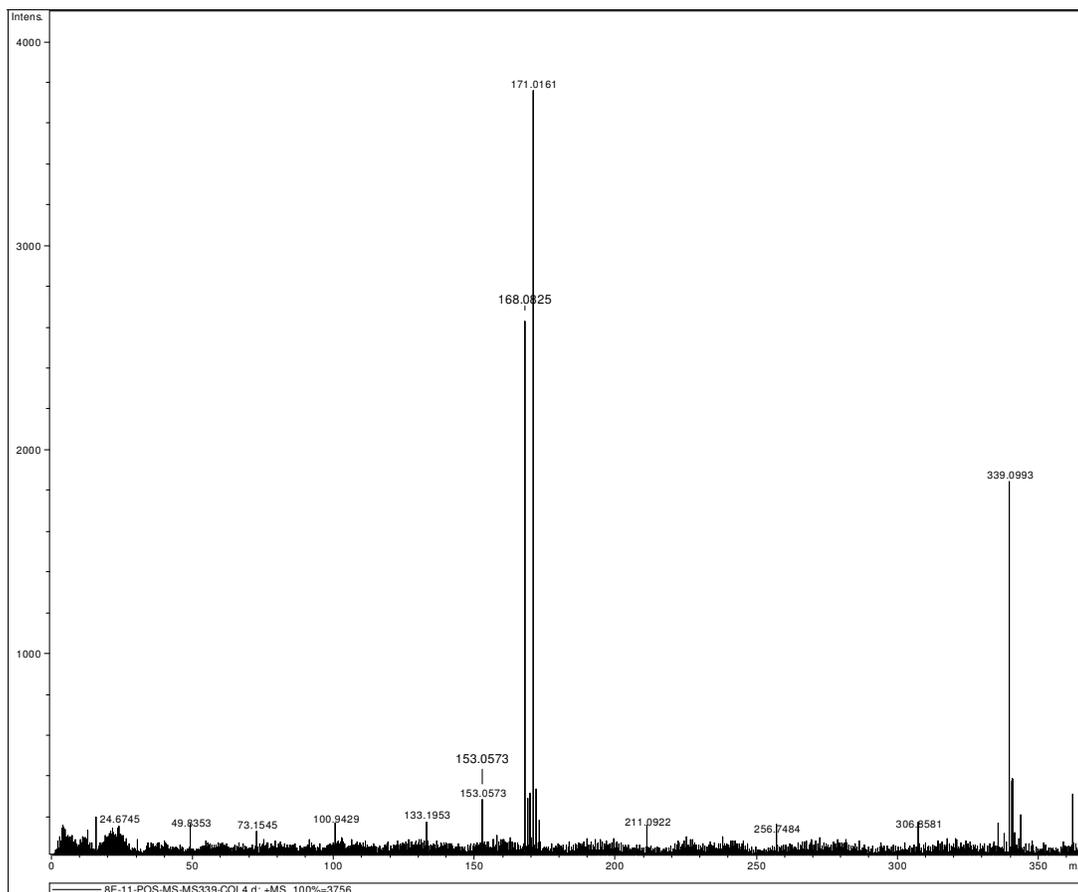
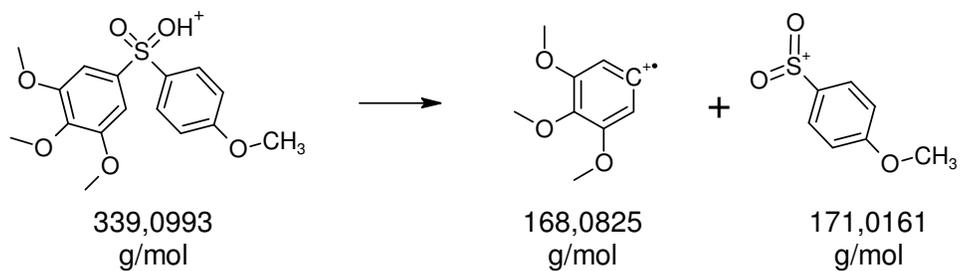
Espectro 16. Espectro de ¹³C de (9)

Tabela 7. Atribuições para dos espectros de ^1H e ^{13}C para (9)

	^1H	^{13}C
1	7.14 (s, 2H)	104,73
2	-	153,46
3	-	136,84*
4	-	133,72*
5	-	128,27*
6	7.87 (d, $J_{\text{orto}}:9,04\text{Hz}$, 2H)	129,6
7	6,98 (d $J_{\text{orto}}:9,04\text{Hz}$, 2H)	114,5
8	-	163,29
9	3,85* (s, 3H)	55,62
10	3,89 (s, 6H)	56,45
11	3,86* (s, 3H)	60,89

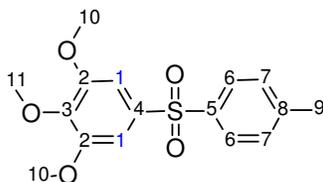
*Valores podem estar trocados

A dupla oxidação do átomo de enxofre pôde ser confirmada pelo espectro de massas que mostra um sinal referente ao íon molecular protonado em 339,0993 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{SH}^+$). Observam-se também outros dois sinais mais intensos em 168,0825 ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3\text{H}^+$) e em 171,0161 ($\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_3\text{S}^+$), referentes aos dois fragmentos gerados pela quebra da ligação S-C4 (Espectro 17).



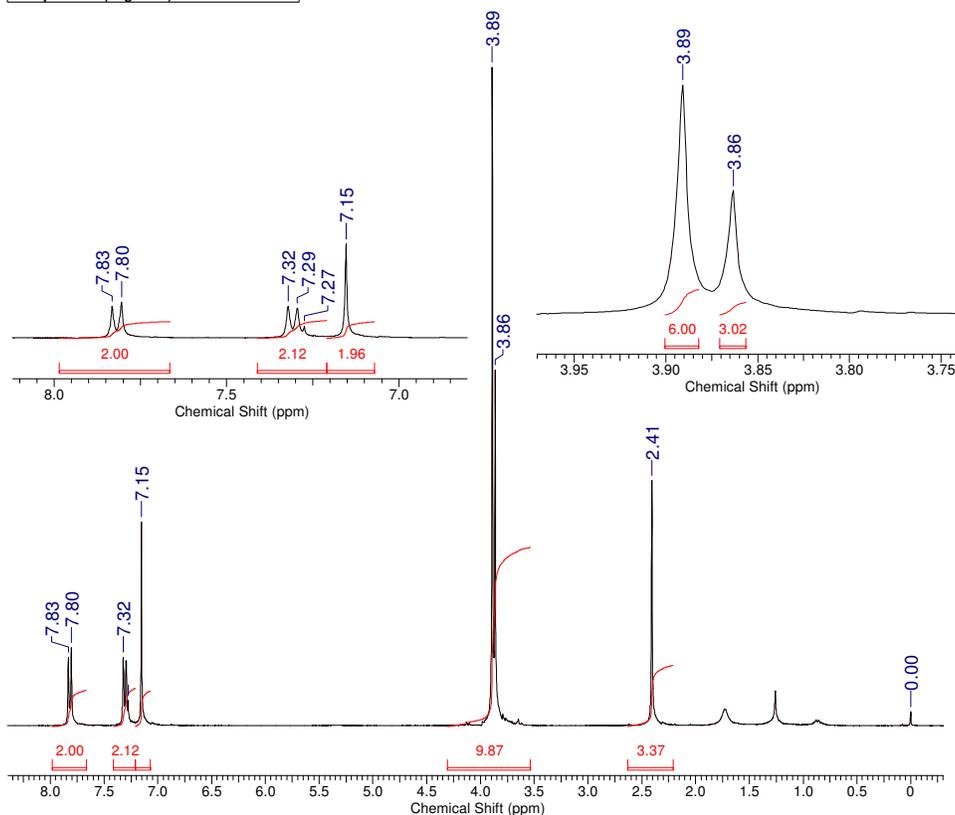
Espectro 17. Espectro de massa de (9)

2.7 Etapa iv (produto 10)



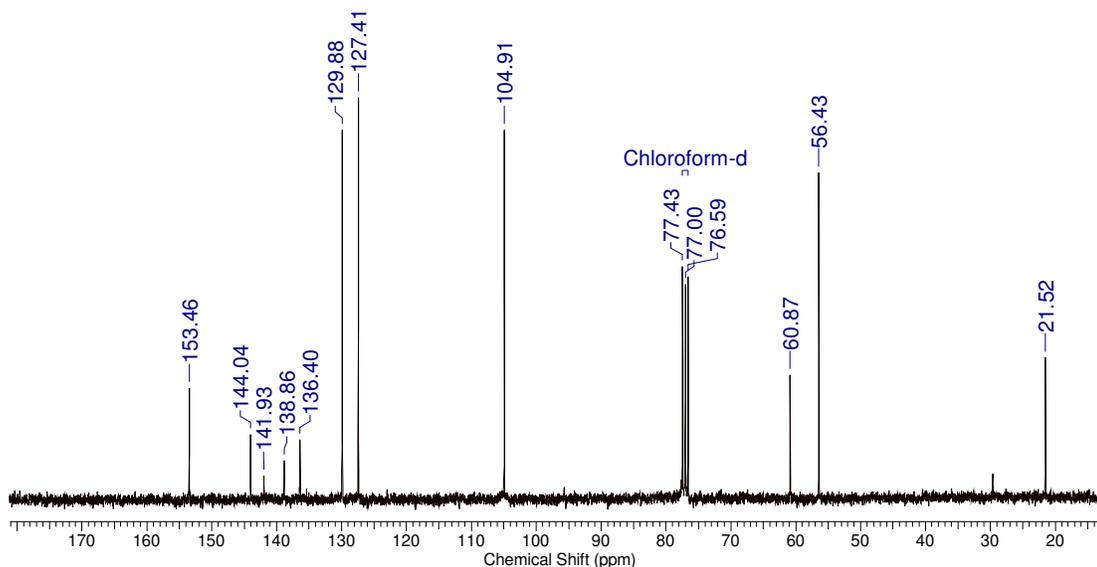
A dupla oxidação do sulfeto (6) foi confirmada pelo espectro de RMN de ^1H (Espectro 18) que mostrou novamente o fenômeno de desproteção mais acentuada quando comparada à (8). O composto (10) apresenta dois dubletos 7,81 ($J_{\text{orto}}:8,29\text{Hz}$, 2H) e 7,31 ($J_{\text{orto}}:8,29\text{Hz}$, 2H) e um singlete em 7,15 (s, 2H). (pf 107,0°C). O hidrogênio ligado a C6 tem uma proteção na ordem de 0,69 ppm em relação ao sulfeto (6) e de 0,28 ppm em relação ao sulfóxido (8). Valores semelhantes podem ser constatados com H1, que desprotege 0,57 ppm e de 0,28 ppm em relação a (6) e (8).

Acquisition Time (sec)	5.3084	Comment	Imported from UXNMR.	
Date	23 Oct 2006 11:07:44			
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB210\EGB210_001000fid			
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	^1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D			Sweep Width (Hz)
Temperature (degree C)	27.000			6172.84

Espectro 18. Espectro de ^1H para (10).

O espectro de RMN-¹³C (Espectro 19 e Tabela 8) mostra que a oxidação teve sucesso pela observação dos sinais que os carbonos C6 e C1 protegidos cerca de 3,5, em relação ao sulfeto precursor, dada a presença da sulfonila. Os mesmos carbonos quando comparados ao sulfóxido (8) estão desprotegidos em 6 ppm.

Acquisition Time (sec)	0.8356	Comment	Imported from UXMNR.		
Date	23 Oct 2006 11:22:40				
File Name	C:\Documents and Settings\ADM\Desktop\dissertação\EGB210\EGB210_003000fid				
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	13C	Number of Transients	919
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D			Sweep Width (Hz)	19607.84
Temperature (degree C)	27.000				



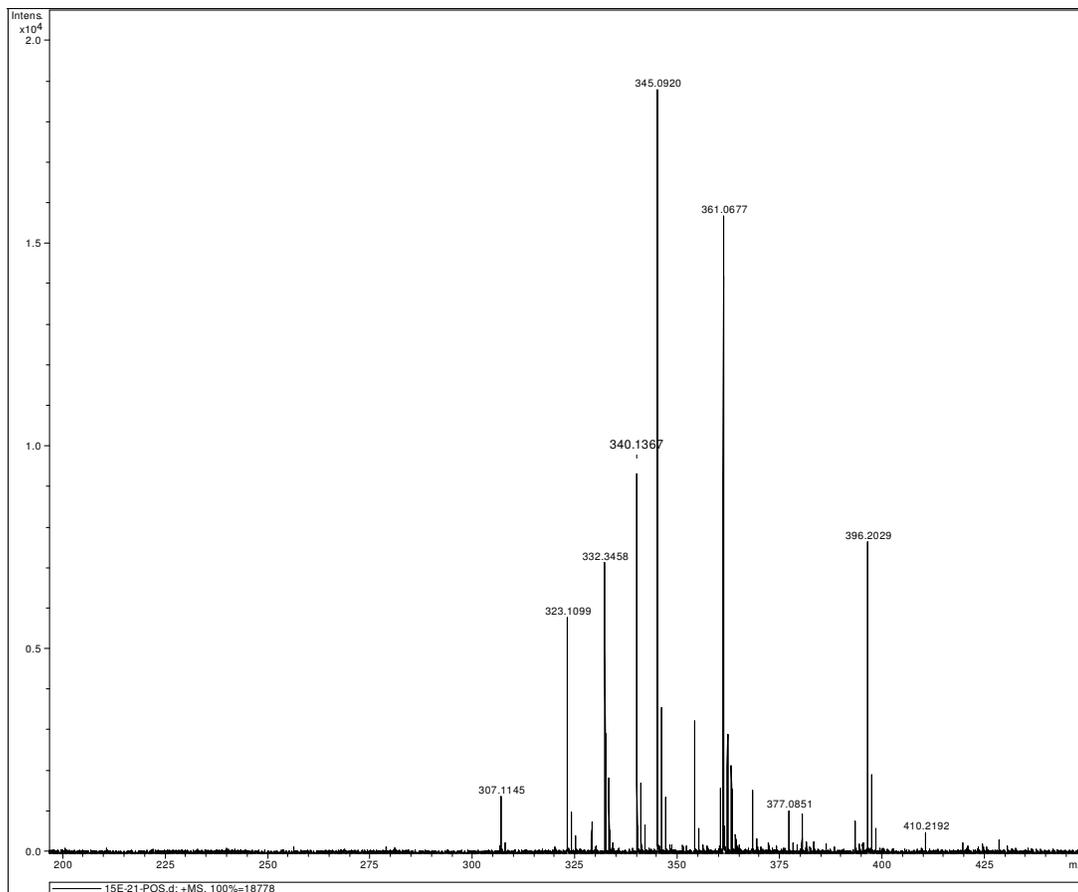
Espectro 19. Espectro de 13 de (10)

Tabela 8. Atribuições dos espectros de ¹H e ¹³C para (10)

	¹ H	¹³ C
1	7,15 (s, 2H)	104,91
2	-	153,46
3	-	144,04*
4	-	141,93*
5	-	138,86*
6	7,81 (d, J _{orto} :8,29Hz, 2H)	127,41
7	7,31 (d J _{orto} :8,29Hz, 2H)	129,88
8	-	136,40*
9	2,41 (s, 3H)	21,52
10	3,89 (s, 6H)	56,43
11	3,86 (s, 3H)	60,87

*Valores podem estar trocados

A ocorrência da oxidação da sulfona de (6) foi confirmada pelo espectro de massas (Espectro 20) onde se observa o íon molecular mais cátion potássio em 361,0677 ($C_{16}H_{18}O_5SK^+$).



Espectro 20. Espectro de massas de (10)

As comparações dos espectros de RMN-¹H na região de 6-8 ppm (**Figura 6**) revelam que as substâncias de 5-10, têm claramente o mesmo padrão de desproteção nas formas oxidadas dos sulfetos, os sulfóxidos e sulfonas.

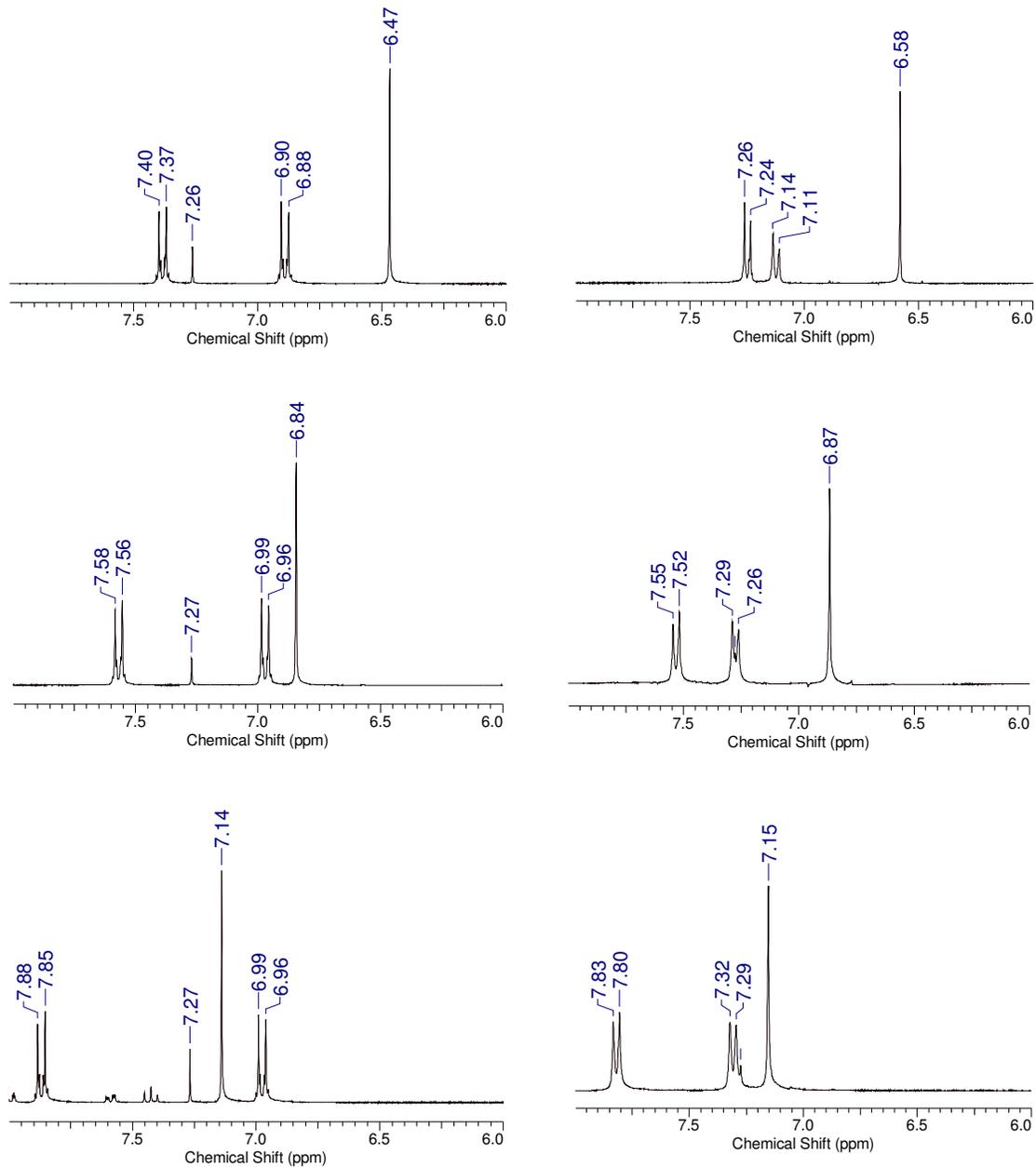
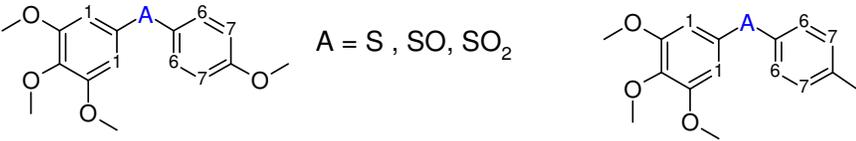


Figura 6. Comparação dos espectros de ^1H das substâncias (5-10) expandidos na região 6-8ppm. Fica evidente o padrão de desproteção causada pelas sucessivas oxidações dos compostos (5), grupo a esquerda, e do composto (6) à direita.

Tabela 9. Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H dos diversos estados de oxidação do enxofre.


A = S, SO, SO₂

Hidrogênio	Sulfeto	Sulfóxido	Sulfona	Hidrogênio	Sulfeto	Sulfóxido	Sulfona
1	6,47	6,84	7,14	1	6,58	6,87	7,15
6	7,39	7,57	7,87	6	7,13	7,54	7,81
7	6,89	6,98	6,98	7	7,25	7,28	7,31

Espectros de infravermelhos apresentados no apêndice I.

2.9 Resultados dos testes citotóxicos

A atividade citotóxica de todas as amostras analisadas está apresentada na **Tabela 10**, com seus respectivos percentuais de inibição. Foram consideradas citotóxicas as substâncias que mostraram percentual de inibição acima de 90% em pelo menos duas linhagens celulares. Segundo os resultados do presente experimento, o composto (5) apresentou moderado potencial citotóxico, revelando valores de inibição aproximados de 90%, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 10. Percentual de inibição do crescimento celular obtido com as amostras nas 3 (três) diferentes linhagens tumorais em dose única de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Amostras	MDA-MB435		HCT-8		SF-295	
	Média	DPM	Média	DPM	Média	DPM
(5)	47,33	4,45	87,15	4,76	86,24	0,83
(7)	58,47	0,56	83,13	0,57	79,23	3,22
(6)	52,31	1,48	81,47	3,84	68,68	1,16
(8)	37,77	0,19	75,39	4,99	69,39	4,16
(10)	65,94	0,37	81,55	0,29	77,62	6,15
(9)	58,07	2,59	41,50	2,47	42,62	6,72

Após análise das 6 amostras em concentração única de 5 $\mu\text{g/mL}$ concluí-se que os resultados indicam moderado poder citotóxico para as substâncias estudadas em um painel de três linhagens tumorais, em especial para o composto (5) para as linhagens

HCT-8 (cólono) e SF-295 (sistema nervoso). Vale salientar que o composto (5) será testado em uma curva no ensaio do MTT para melhor avaliação quanto à atividade citotóxica.

2.10 Resultados dos testes antitubulínicos

2.10.1 Concentração inibitória média

De modo a investigar a capacidade das moléculas sintetizadas de serem usadas como agentes antivasculares, interagindo com o sítio de ligação da colchicina, foram enviadas amostras para o National Cancer Institute em Frederik, Maryland nos EUA, onde foram realizadas testes com a proteína tubulina isolada.

Os testes mostraram que apenas as moléculas (5) e (6) apresentam capacidade de interagir com tubulinas. A substância (5) foi tão ativa quanto a CA4, com valores de IC₅₀ muito semelhantes (Tabela 11). Esses resultados revelam que o uso do enxofre com átomo espaçador entre os dois anéis é uma boa alternativa a dupla ligação da CA4. O composto (6) que difere de (5) apenas pela troca de uma metoxila por uma metila, apresenta atividade antitubulínica muito menor.

Tabela 11. Valores de IC₅₀ para a inibição da polimerização das tubulinas e ligação pela colchicina pelos compostos 5-10, CA4 e colchicina.

Molécula	IC ₅₀ * antitubulina
(5)	1-1.5
(6)	5-10
(7)	20-40
(8)	>40
(9)	20-40
(10)	>40
Combretastatina A4	1.4±0.2
Colchicina	3.2±0.3

*Valores de IC₅₀ em µM.

2.10.2 Inibição competitiva pela ligação com a colchicina

De modo a investigar a capacidade e a afinidade pelo sítio de ligação colchicinico na tubulina isolada, foram realizados testes de inibição competitiva entre a [3H]colchicina e as moléculas sintetizadas nesse trabalho. A tabela 10 ilustra os resultados.

Tabela 12. Testes de deslocamento da colchicina no sítio de ligação na tubulina em diversas concentrações dos análogos produzidos e a CA4.

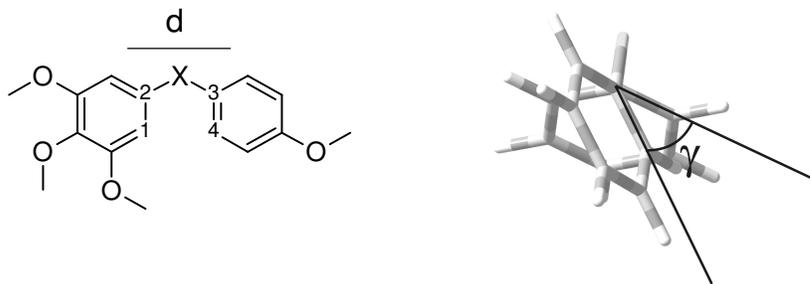
	Concentrações testadas			Deslocamento da [3H]Colchicina %
	1 μ M	5 μ M	50 μ M	
(5)	56	89	95	
(6)	-	34	55	
(7)	-		46	
(8)	-		49	
(9)	-		22	
(10)	-		14	
CA4	80	99		

Observa-se que na tabela 12 que o composto sulfeto (5) e, com menor potência, o composto (6), apresentam capacidade de deslocar a colchicina de seu sítio de ligação, mostrando que esses compostos agem da mesma forma que a CA4. O composto (5) é apenas 10% menos ativo que a CA4 na concentração de 5 μ M, onde 89% da colchicina é deslocada do sítio ativo, tal valor é comparável com a podofilotoxina.(Cortese, Bhattacharyya *et al.*, 1977)

2.10.3 Modo de ligação dos análogos produzidos

Os grupos funcionais sulfinila e sulfonila não são bons substitutos a olefina que separa os dois anéis polimetoxilados da CA4, apesar desses análogos apresentarem valores de polarizabilidade similares a compostos ativos e ainda possibilitar um distanciamento entre os anéis comparáveis a fenstatina (**Tabela 13**).

Tabela 13. Peculiaridades conformacionais de derivados diarílicos. Distância d entre os carbonos ipso, ângulo interno γ formado pelos átomos 1,2,3 e 4 e a ao grupo separador e valores de polarizabilidades(S. h. Hilal, 2003)



	X	$d(\text{Å})^*$	Polarizabilidade	Ângulo Interno γ ^{o*}
(a)	CH=CH	3.294	36	64.771
(b)	C=O	2.613	33.77	50.503
(c)	O	2.403	31.85	67.450
(d)	N	2.537	32.99	40.890
(5)	S	2.827	34.55	76.951
(7)	SO	2.780	34.08	0.009
(9)	SO ₂	2.867	34.52	0.000
(h)	Colchicina			57.933

*Valores calculado com o modelo químico B3LYP/cc-pVDZ

Através de cálculos de otimização de geometria do núcleo básico que constitui os análogos apresentados na Tabela 11, ficou constatada que a conformação de energia mínima do diarrilsulfóxido e diarrilsulfona é bastante diferenciada das demais estrutura. Nessas moléculas há um posicionamento dos anéis aromáticos peculiar (**Figura 7**), onde o ângulo diedro formado pelos átomos 1-2-3-4 é de 0° enquanto os compostos ativos como colchicina, fenstatina e CA4 tem esse valor é maior que 50°.

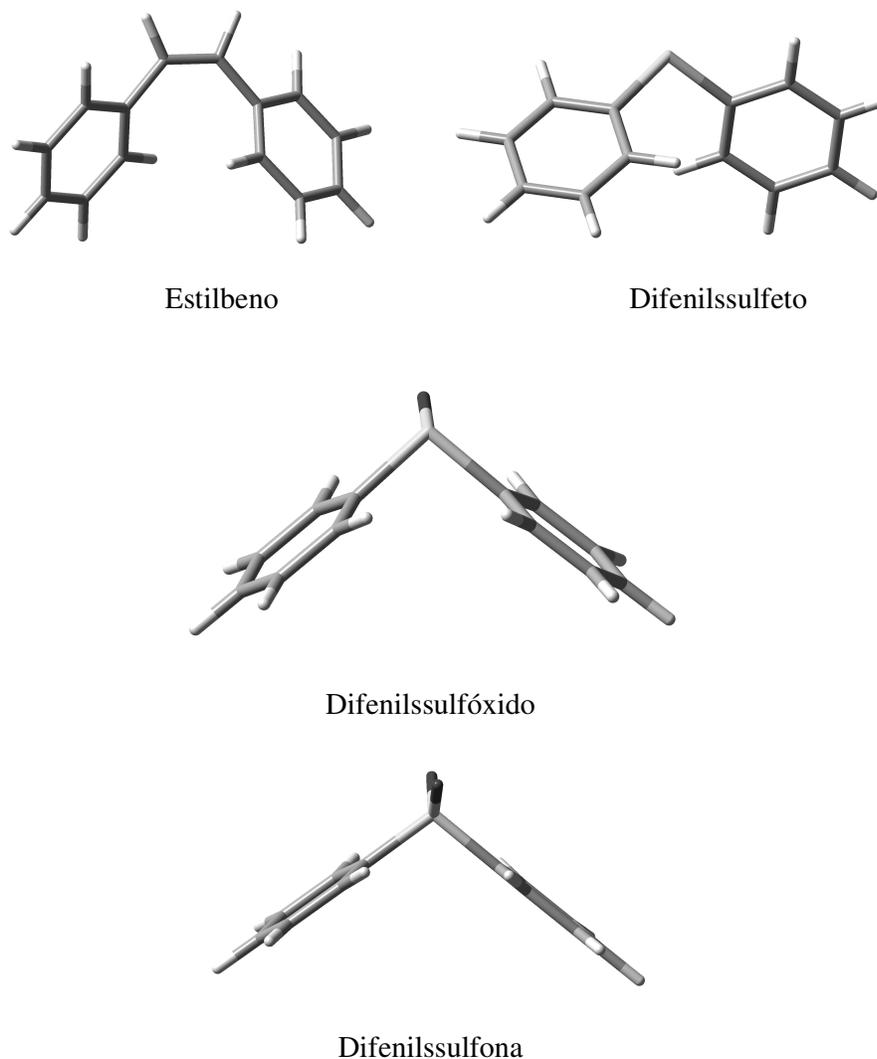


Figura 7. Os diarilssulfetos oxidados a sulfetos e sulfóxido não têm atividade antitubulínica devido à conformação de energia mínima desses compostos que se diferencia da do núcleo básico da CA4 (o estilbeno) e do composto (5) (diarilssulfeto), que são ativos por terem a disposição dos anéis propícia para formar interações hidrofóbicas com sítio de ligação da colchicina.

A conformação diferenciada dos compostos oxidados a sulfóxido e sulfona (Figura 6) acarreta no sítio ativo a perda de grande parte das interações hidrofóbicas necessárias para a interação no sítio de ligação da colchicina da tubulina. As interações com a coroa de elétrons π de ambos anéis aromáticos repeliriam os resíduos de aminoácido ALA255 e ASN258 (Figura 8). Tal fato faz com que sejam estruturalmente inapropriados para interagir com a tubulina.

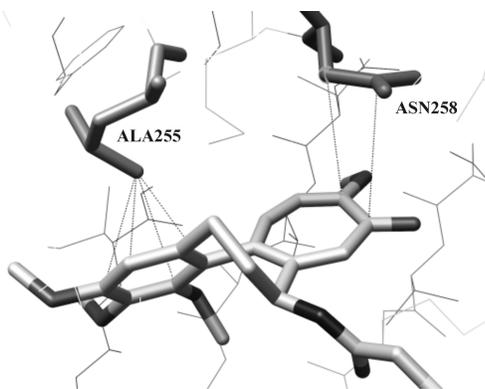


Figura 8. Modo de interação da colchicina no sítio ativo destacando a conformação preferencial para a interação hidrofóbicas com ALA255 e ASN258 (Ravelli, Gigant *et al.*, 2004).

2.11 Conclusões

Nossos estudos indicam que o átomo de enxofre como grupo separador em análogos da CA4 é uma alternativa interessante. Ao contrário dos diariléteres e diarilaminas que não apresentam atividade considerável contra tubulinas, (Lawrence, Rennison *et al.*, 2001) o sulfeto (5) sintetizado é bastante promissor.

Por meio de cálculos teóricos ficou constatado que as formas oxidadas sulfona e sulfóxido apresentam uma conformação de energia mínima diferenciada do precursor enxofre, tal fato acarretou, nos testes realizados que esses análogos não têm boa atividade. Os sulfóxidos e sulfonas derivados do sulfeto (5) não seriam bons candidatos à protótipos de inibição da polimerização de tubulinas, e pois apresentam baixa atividade citotóxica.

A substância (5) portanto é um protótipo bastante promissor para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer, sendo ainda necessárias algumas modificações estruturais adicionais para que a solubilidade em água seja maior. Obviamente a adição de uma hidroxila na posição 7 seguida da produção de um grupo fostato levaria a um composto mais solúvel em água para a realização de testes *in vivo*. Tais modificações serão futuramente realizadas pelo grupo de pesquisas SINTMOLB com intuito de obtenção de patente.

3. Material e métodos

ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA A4 COM GRUPO SEPARADOR
ENXOFRE

3.1 Procedimentos gerais

Os critérios de pureza adotados para as substâncias obtidas foram: a observação de uma única banda em CCD, variando-se ou não o sistema de eluição, o ponto de fusão para as substâncias sólidas e pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

Os espectros de RMN de ^1H (300MHz) e ^{13}C (75MHz) foram adquiridos com um espectrômetro Bruker DPX-300 usando clorofórmio deuterado como solvente como solvente para a maioria dos experimentos.

Espectros de absorção no infravermelho foram obtidos usando pastilhas de KBr um instrumento de IRFT, Perkin Elmer modelo 783-FT.

Foram obtidos os espectros de massa com um aparelho UltroTOF-Q - Electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass spectrometer com ionizador de eletronspray APOLLO como interface. Padrões internos: Cumarina (147 e 169) e monensina (693). Todos os espectros foram obtidos no modo positivo e realizados na Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto.

As análises cromatográficas em camada delgada foram feitas em placas de sílica gel 60GF₂₅₄ da Merck e as separações cromatográficas foram realizadas usando sílica flash gel 60 (230-400 mesh).

Todos os solventes e reagentes comuns foram purificados pelos procedimentos descritos por Perrin e Armarego.(Wright, 1969)

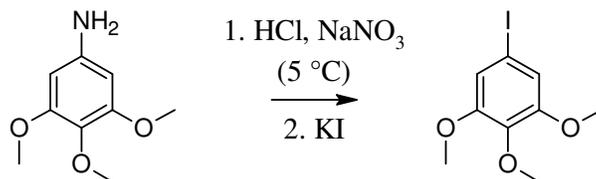
Os pontos de fusão foram determinados usando o equipamento Uniscience do Brasil modelo 498.

Os ensaios de citotoxicidade e atividade antineoplásica e atividade hemolítica foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão da Prof. Cláudia do Ó Pessoa.

Os testes de atividade antitubulínica, e de inibição da ligação da colchicina foram realizados no Núcleo NCI (*Nacional Cancer Insitute*) da cidade de Frederick, Maryland nos Estados Unidos. Sob a supervisão do Prof. Ernest Hamel.

Os cálculos teóricos conformacionais foram realizados no Laboratório Lab2M da UFMS, sob a supervisão do Prof.º Dr. Marcos Serrou do Amaral

3.2 Procedimentos Sintéticos

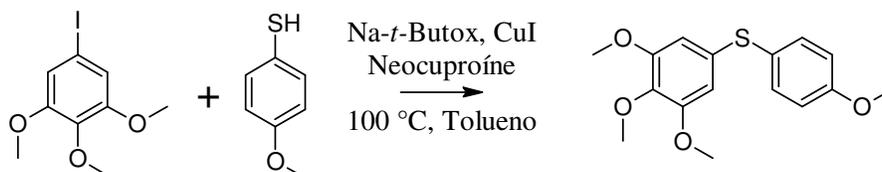


3.2.1 5-iodo-1,2,3-trimetoxibenzeno (2).

Foi adicionada lentamente à uma solução de de HCl (2/2mL de HCl conc.:H₂O), 3,4,5-trimetoxianilina (Aldrich Chemical Co.) (1g, 2,3mmol). Uma outra solução de nitrito de sódio (0.70g, 2,3 mmol), foi adicionada a mistura ácida lentamente mantendo sempre a temperatura menor que 5°C. Após 30min, foi adicionada por cerca de uma hora, gota a gota à solução amarela resultante, uma solução de iodeto de potássio (1,57g em 5.5 mL de H₂O) com a temperatura mantida a 0°. A mistura foi deixada em repouso por uma noite e em seguida a mesma foi extraída com EtOAc (3x50mL) e as frações combinadas foram secadas com MgSO₄ anidro, filtradas e concentradas em rotaevaporador sobre pressão reduzida produzindo um óleo vermelho escuro. O material foi submetido à cromatografia do tipo flash e as frações recolhidas e concentradas em rotaevaporador fornecendo o produto (2), rendimento:~20% (Wright, 1969).

Sólido amorfo branco, ponto de fusão 83-85°C.

3.2.2 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)tio]benzeno (5)



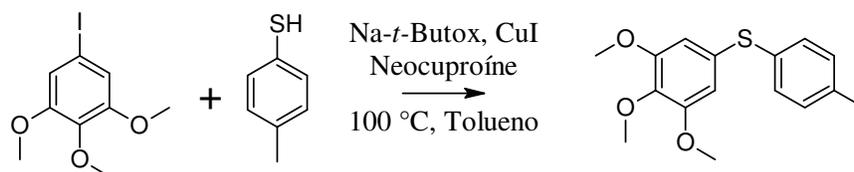
Em um balão equipado com agitador magnético foram colocados 0,186g (1,935 mmol) de *tert*-butóxido de sódio, 0,025g de iodeto de cobre (10 mol% em relação à quantidade do iodobenzeno (2)). O frasco foi selado com um septo de borracha, para então serem adicionados 0,17mL (1,33mol) de 4-metoxitiofenol, 0,38g (1,29 mmol) de (2) e 6 mL de tolueno, todos injetados pelo septo. A mistura for agitada e aquecida a 110° por 24 horas. A mistura reagente foi filtrada e concentrada a vácuo sendo os resíduos purificados em coluna do tipo flash. Rendimento 92% (Bates, Gujadhur *et al.*, 2002).

Sólido amorfo branco, ponto de fusão 119-120°C.

m/z+H: 307,1097 (C₁₆H₁₈O₄SH⁺)

IR	¹ H	¹³ C
3002,89	3,76 (s, 6H)	55,35 (OCH ₃)
2931,53	3,81 (s, 3H)	56,11 (OCH ₃)
2833,17	3,82 (s, 3H)	60,87 (OCH ₃)
1587,27	6,47 (s, 2H)	106,60 (CH)
1577,63	6,98 (d J _{orto} :8,85Hz, 2H)	114,88 (CH)
1498,56	7,39 (d J _{orto} :8,85Hz, 2H)	125,18 (C)
1488,91		132,64 (C)
1448,41		134,37 (CH)
1404,05		136,84 (C)
1309,55		153,61 (C)
1288,33		159,61 (C)
1236,26		
1180,33		
1128,26		
1024,11		
999,04		
524,59		

3.2.3 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metilfenil)tio]benzeno (6).



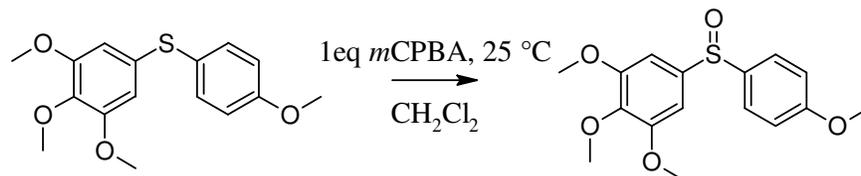
Em um balão equipado com agitador magnético foram colocados 0,186g (1,935 mmol) de *tert*-butóxido de sódio, 0,025g de iodeto de cobre (10 mol% em relação à quantidade do iodobenzeno (2)). O frasco foi selado com um septo de borracha, para então serem adicionados 0,162 g (1,33mol) de *p*-tioresol, 0,38g (1,29 mmol) de (2) e 6 mL de tolueno, todos injetados pelo septo. A mistura for agitada e aquecida a 110° por 24 horas. A mistura reagente foi filtrada e concentrada a vácuo sendo os resíduos purificados em coluna preparativa flash. Rendimento 98% (Bates, Gujadhur *et al.*, 2002).

Sólido amorfo branco, ponto de fusão 87,5-88,0°C

m/z+H: 291,1134 (C₁₆H₁₈O₃SH⁺)

IR	¹ H	¹³ C
505,31	2,34 (s, 3H)	21,06 (CH ₃)
810,03	3,78 (s, 6H)	56,16 (OCH ₃)
1002,89	3,83 (s, 3H)	60,89 (OCH ₃)
1122,47	6,58 (s, 2H)	108,37 (CH)
1228,55	7,13 (d J _{orto} :8,85Hz, 2H)	129,93(CH)
1303,76	7,25 (d J _{orto} :7,54Hz, 2H)	130,72 (C)
1404,05		130,90 (CH)
1446,48		137,11 (C)
1463,84		140,76 (C)
1496,63		142,82 (C)
1577,63		153,54 (C)
2833,17		
2935,39		
3002,89		

3.2.4 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)sulfinil]benzeno (7)



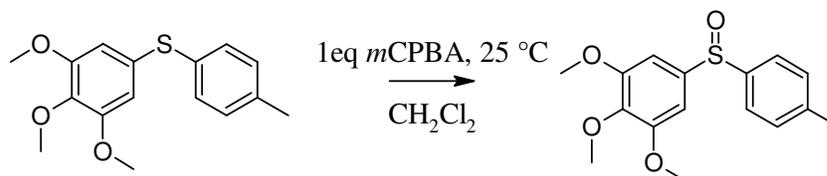
Em uma solução de 5mL de diclorometano e 30mg de (5) à temperatura ambiente foram adicionados lentamente 17,0 mg (1equiv) de ácido metacloroperbenzóico por 3 horas. A mistura foi lavada em uma solução aquosa de carbonato de sódio 10% e extraída com CH_2Cl_2 (3X50mL), as frações foram secadas com MgSO_4 . O solvente foi removido em evaporador rotativo e purificado em coluna do tipo flash. Rendimento 89%.(Clennan e Chen, 1988)

Sólido amorfo branco, ponto de fusão 76°C

$m/z+H$: 323,0976 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{SH}^+$)

IR	^1H	^{13}C
526,52	3,83 (s, 3H)	55,49 (OCH_3)
609,45	3,85 (s, 3H)	56,37 (OCH_3)
827,39	3,86 (s, 6H)	60,87 (OCH_3)
995,18	6,84 (s, 2H)	101,51 (CH)
1043,4	6,84 (s, 2H)	114,79 (CH)
1122,47	6,98 (d J_{orto} :8,67Hz, 2H)	127,20 (CH)
1172,62	7,57 (d J_{orto} :8,67Hz, 2H)	136,75 (C)
1253,62		139,92 (C)
1303,76		140,34 (C)
1458,05		153,90 (C)
1494,7		162,07 (C)
1405,98		
1469,63		
1593,06		
2341,37		
2358,73		
2831,24		
2939,25		
2962,39		
2997,11		
3003,0		

3.2.5 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metilfenil)sulfinil]benzeno (8).



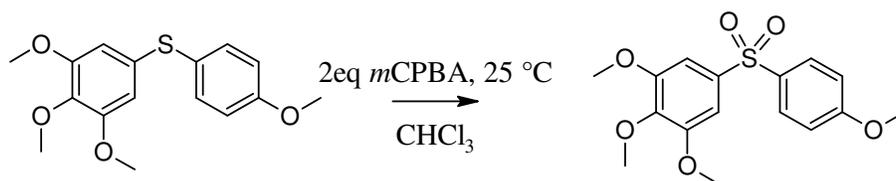
Em uma solução de 5mL de diclorometano e 30mg de (6) a temperatura ambiente foram adicionados lentamente 16 mg (1equiv) de ácido metacloroperbenzóico por 3 horas. A mistura foi lavada com uma solução aquosa de carbonato de sódio 10% e extraída com CH_2Cl_2 (3X50mL), as frações foram secadas com MgSO_4 . O solvente foi removido em evaporador rotativo e purificado em coluna preparativa do tipo flash. Rendimento 87%. (Clennan e Chen, 1988).

Sólido amorfo branco, ponto de fusão $95 - 95,5^\circ\text{C}$

m/z+H: 307,1111 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{SH}^+$)

IR	^1H	^{13}C
586,31	2,38 (s, 3H)	21,36 (CH_3)
675,03	3,84 (s, 3H)	56,32 (OCH_3)
995,18	3,86 (s, 6H)	60,81 (OCH_3)
1101,26	6,87 (s, 2H)	101,59 (CH)
1124,4	7,28 (d Jorto:7,91Hz, 2H)	124,89 (CH)
1149,47	7,54 (d, Jorto:8,10Hz, 2H)	129,98 (CH)
1232,4		140,27 (C)
1313,41		141,66 (C)
1407,91		142,39 (C)
1494,7		† (C)
1459,98		153,89 (C)
1585,34		
2923,82		
2981,68		
3006,75		
3062,68		
3081,97		

3.2.6 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxifenil)sulfonil]benzeno (9)



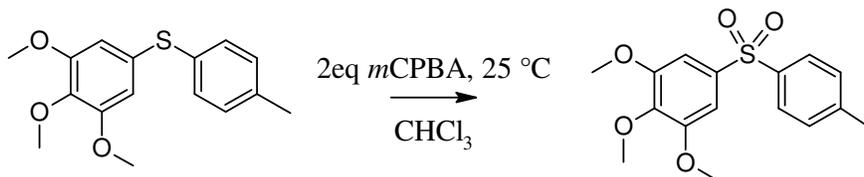
Em uma solução 5mL de clorofórmio e 30mg de (5) a temperatura ambiente foram adicionados 34 mg (2equiv) de *m*CPBA por 6 horas. A mistura foi colocada em uma solução aquosa de carbonato de sódio 10% e extraída com clorofórmio (2x50mL), as frações foram secadas com MgSO_4 . O solvente foi removido em evaporador rotativo e purificado em coluna preparativa flash. Rendimento: 82% (Clennan e Chen, 1988).

Sólido amorfo branco, ponto de fusão $111\text{-}112\text{ }^\circ\text{C}$

$m/z+H$: 339,0993 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{SH}^+$)

IR	^1H	^{13}C
594,0	3,85 (s, 3H)	55,62 (CH_3)
678,88	3,86 (s, 3H)	56,45 (CH_3)
993,25	3,89 (s, 6H)	60,89 (CH_3)
1020,25	6,98 (d J_{orto} :9,04Hz, 2H)	104,73 (CH)
1128,26	7,14 (s, 2H)	114,5 (CH)
1108,97	7,87 (d, J_{orto} :9,04Hz, 2H)	128,27 (C)
1141,76		129,6 (CH)
1263,26		133,72 (C)
1294,12		136,84 (C)
1313,41		153,46 (C)
1411,77		163,29 (C)
1463,84		
1498,56		
1591,13		
1701,06		
2837,03		
2945,03		
2977,82		
3012,54		

3.2.7 1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metilfenil)sulfonyl]benzeno (10).



Em uma solução 5mL de clorofórmio e 30mg de (6) a temperatura ambiente foram adicionados 32,0 mg (2equiv) de *m*CPBA por 6 horas. A mistura foi colocada em uma solução aquosa de carbonato de sódio 10% e extraída com clorofórmio (2x50mL), as frações foram secadas com MgSO_4 . O solvente foi removido em evaporador rotativo e purificado em coluna do tipo flash. Rendimento 79% (Clennan e Chen, 1988).

Sólido amorfo branco, ponto de fusão 107.0°C

$m/z+K$: 361,0677 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{SK}^+$)

IR	^1H	^{13}C
586,31	7.15 (s, 2H)	60,87 (OCH_3)
675,03	3,86 (s, 3H)	56,43 (OCH_3)
995,18	3,89 (s, 6H)	21,52 (OCH_3)
1101,26	2,41 (s, 3H)	104,91 (CH)
1124,4	7,31 (d J_{orto} :8,29Hz, 2H)	127,41 (CH)
1149,47	7,81 (d, J_{orto} :8,29Hz, 2H)	129,88 (CH)
1232,4	7.15 (s, 2H)	136.40 (C)
1313,41		138,86 (C)
1407,91		141,93 (C)
1459,98		144,04 (C)
1494,7		153,46 (C)
1585,34		
2945,03		
2981,68		
3006,75		
3062,68		
3081,97		

3.3 Cálculos teóricos.

Os valores teóricos de polarizabilidade apresentados na **Tabela 10** foram obtidos no servidor SPARC (Karickhoff, Carreira *et al.*, 2006), que implementa metodologias de QSAR (S. h. Hilal, 2003).

Os modelos das estruturas para otimizações de geometria foram criadas com o programa GaussView e otimizadas com nível de teoria semiempírico AM1 e posteriormente com a teoria da funcional da densidade B3LYP usando o conjunto de bases cc-pVDZ implementadas no programa Gaussian'03 (Frisch, Trucks *et al.*, 2004).

3.4 Testes de atividade citotóxica

Células: As linhagens utilizadas, MDA-MB 435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

A Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano.(Skehan, Storeng *et al.*, 1990) É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983),(Mosmann, 1983) tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.(Berridge, Tan *et al.*, 1996)

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e 0,7 x 10⁵cél/mL para a linhagem HCT-8. Os diversos compostos foram acrescidos em concentração única de 25µg/mL As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, adicionou-se 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 590nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi analisada a partir de 2 dois experimentos realizados em triplicata.

3.5 Ensaios tubulínicos *in vitro*.

3.5.1 Ensaio de ligação à tubulinas

A habilidade dos compostos de inibir a polimerização de tubulinas foi avaliada em sistemas tubulínicos com suporte de glutamato. As reações foram conduzidas com tubulina cerebral bovina purificada (1,0 mg/mL; 10 μ M), 0,8M de glutamato monossódico (pH 6,6), 0,4 mM de GTP e 4% (v/v) de DMSO variando a concentração dos compostos testados. As misturas reacionais foram encubadas por 15min à 30°C com GTP para permitir a ligação do ligante. As misturas foram colocadas em gelo, com adição de GTP e a mistura reagente foi então transferida para cuvettes e mantidas à 0°C para estabilização da linha de base. De de estabilizada, a mistura foi aquecida a 30°C, e monitoradas por turbidimetria em espectrofotômetro Beckman DU7400/7500 em 350 nm, equipado com controladores eletrônico de temperatura.(Hamel, 2003)

A CA4, potente inibidor da ligação de colchicina, foi doada generosamente pelo Dr G. R. Pettit, Univesidade do Estado de Arizona, e incluída como controle positivo para os ensaios realizados.

3.5.2 Inibição da ligação da Colchicina

O efeito do composto (5) na ligação da [3H]colchicina a tubulinas purificadas foram avaliadas usando filtros de DEAE-celulose, como descrito previamente. As reações foram conduzidas com concentrações finais de 1 μ M de tubulina cerebral bovina purificada, 5% (v/v) DMSO, 5 μ M de [3H]colchicina, e faixas variadas de concentrações de (5)(Verdier-Pinard, Lai *et al.*, 1998).

4. Referências Bibliográficas

ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA A4 COM GRUPO SEPARADOR
ENXOFRE

- Alonso, D. A. e C. Nájera. Simple, economical and environmentally friendly sulfone synthesis. Tetrahedron Letters, v.43, n.19, 6 May, p.3459-3461 2002.
- Andralojc, P. J., J. E. Ryan, *et al.* 2-Carboxyarabinitol 1-phosphate (CA1P) formation through a phosphate exchange reaction catalysed by the CA1P phosphatase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Biochem J, v.316 (Pt 2), Jun 1, p.389-93. 1996.
- Banwell, M. G., E. Hamel, *et al.* 4,5-Diaryl-1H-pyrrole-2-carboxylates as combretastatin A-4/lamellarin T hybrids: Synthesis and evaluation as anti-mitotic and cytotoxic agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.14, n.13, p.4627-4638. 2006.
- Bates, C. G., R. K. Gujadhur, *et al.* A general method for the formation of aryl-sulfur bonds using copper(I) catalysts. Org Lett, v.4, n.16, Aug 8, p.2803-6. 2002.
- Berridge, M. V., A. S. Tan, *et al.* The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. Biochemica, p.14-9. 1996.
- Ching, L. M., W. R. Joseph, *et al.* Induction of natural killer activity by xanthenone analogues of flavone acetic acid: relation with antitumour activity. Eur J Cancer, v.27, n.1, p.79-83. 1991.
- Clennan, E. L. e X. Chen. Reactions of an Allylic Sulfide, Sulfoxide, and Sulfone with Singlet Oxygen. The Observation of a Remarkable Diastereoselective Oxidation. J. Am. Chem. SOC., v.111, p.5787-5792. 1988.
- Cortese, F., B. Bhattacharyya, *et al.* Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. J Biol Chem, v.252, n.4, Feb 25, p.1134-40. 1977.
- Cushman, M., D. Nagarathnam, *et al.* Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. J Med Chem, v.34, n.8, Aug, p.2579-88. 1991.
- Derby, R. I. e W. S. Hutchinson. Inorganic Syntheses: Willey, v.IV. 1953. 152-158 p.
- Dorr, R. T., K. Dvorakova, *et al.* Antitumor activity of combretastatin-A4 phosphate, a natural product tubulin inhibitor. Invest New Drugs, v.14, n.2, p.131-7. 1996.
- Ducki, S., R. Forrest, *et al.* Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.8, n.9, p.1051-1056. 1998.
- Frisch, M. J., G. W. Trucks, *et al.* Gaussian 03. I. Gaussian. Wallingford CT 2004.
- Getahun, Z., L. Jurd, *et al.* Synthesis of alkoxy-substituted diaryl compounds and correlation of ring separation with inhibition of tubulin polymerization: differential enhancement of inhibitory effects under suboptimal polymerization reaction conditions. J Med Chem, v.35, n.6, Mar 20, p.1058-67. 1992.

- Gigant, B., C. Wang, *et al.* Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. Nature, v.435, n.7041, p.519-522. 2005.
- Griggs, J., J. C. Metcalfe, *et al.* Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4. Lancet Oncol, v.2, n.2, Feb, p.82-7. 2001.
- Hamel, E. Evaluation of antimetabolic agents by quantitative comparisons of their effects on the polymerization of purified tubulin. Cell Biochem Biophys, v.38, n.1, p.1-22. 2003.
- Hori, K. e S. Saito. Microvascular mechanisms by which the combretastatin A-4 derivative AC7700 (AVE8062) induces tumour blood flow stasis. Br J Cancer, v.89, n.7, Oct 6, p.1334-44. 2003.
- Kaffy, J., R. Pontikis, *et al.* Synthesis and biological evaluation of vinylogous combretastatin A-4 derivatives. Org Biomol Chem, v.3, n.14, Jul 21, p.2657-60. 2005.
- Karickhoff, S. W., L. A. Carreira, *et al.* SPARC <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/>. 2006 2006.
- Kirwan, I. G., P. M. Loadman, *et al.* Comparative preclinical pharmacokinetic and metabolic studies of the combretastatin prodrugs combretastatin A4 phosphate and A1 phosphate. Clin Cancer Res, v.10, n.4, Feb 15, p.1446-53. 2004.
- Kutchin, A. V., S. A. Rubtsova, *et al.* Reactions of chlorine dioxide with organic compounds. Selective oxidation of sulfides to sulfoxides by chlorine dioxide. Russian Chemical Bulletin, v.V50, n.3, p.432-435. 2001.
- Lawrence, N. J., D. Rennison, *et al.* Antimetabolic and cell growth inhibitory properties of combretastatin A-4-like ethers. Bioorg Med Chem Lett, v.11, n.1, Jan 8, p.51-4. 2001.
- Lin, C. M., S. B. Singh, *et al.* Interactions of tubulin with potent natural and synthetic analogs of the antimetabolic agent combretastatin: a structure-activity study. Mol Pharmacol, v.34, n.2, Aug, p.200-8. 1988.
- Mandeville, H. C., Q. Ng, *et al.* CA4P and External Beam Radiotherapy in Prostate Cancer with Assessment of Effect by DCE-MRI. Clin Oncol (R Coll Radiol), v.19, n.3, Apr, p.S38. 2007.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.
- Nagarathnam, D., M. Cushman, *et al.* Synthesis and evaluation of analogs of (Z)-1-(4-methoxyphenyl)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethene as potential cytotoxic and antimetabolic agents. J. Med. Chem., v.35, n.12, p.2293-2306. 1992.
- Pettit, G. R., S. B. Singh, *et al.* Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. Experientia, v.45, n.2, Feb 15, p.209-11. 1989.

- Pettit, G. R., C. Temple, Jr., *et al.* Antineoplastic agents 322. synthesis of combretastatin A-4 prodrugs. Anticancer Drug Des, v.10, n.4, Jun, p.299-309. 1995.
- Pettit, G. R., B. Toki, *et al.* Antineoplastic agents. 379. Synthesis of phenstatin phosphate. J Med Chem, v.41, n.10, May 7, p.1688-95. 1998.
- Pilat, M. J. e P. M. Lorusso. Vascular disrupting agents. J Cell Biochem, v.99, n.4, Nov 1, p.1021-39. 2006.
- Ravelli, R. B. G., B. Gigant, *et al.* Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. Nature, v.428, n.6979, p.198-202. 2004.
- S. h. Hilal, S. W. K. L. A. C. Prediction of the Vapor Pressure Boiling Point, Heat of Vaporization and Diffusion Coefficient of Organic Compounds. QSAR & Combinatorial Science, v.22, n.6, p.565-574. 2003.
- Skehan, P., R. Storeng, *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst, v.82, n.13, Jul 4, p.1107-12. 1990.
- Thomson, P., M. A. Naylor, *et al.* Synthesis and biological properties of bioreductively targeted nitrothienyl prodrugs of combretastatin A-4. Mol Cancer Ther, v.5, n.11, Nov, p.2886-94. 2006.
- Tron, G. C., T. Pirali, *et al.* Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. J Med Chem, v.49, n.11, Jun 1, p.3033-44. 2006.
- Varma, R. S. e D. Kumar. Microwave-accelerated solvent-free synthesis of thioketones, thiolactones, thioamides, thionoesters, and thioflavonoids. Org Lett, v.1, n.5, Sep 9, p.697-700. 1999.
- Verdier-Pinard, P., J. Y. Lai, *et al.* Structure-activity analysis of the interaction of curacin A, the potent colchicine site antimetabolic agent, with tubulin and effects of analogs on the growth of MCF-7 breast cancer cells. Mol Pharmacol, v.53, n.1, Jan, p.62-76. 1998.
- Wright, R. G. R. B. A. J. R. Metal ions and complexes in organic reactions. Part X. Effect of methoxy-substituents on copper-catalysed nucleophilic and reductive replacement of halogen in reactions between sodium methoxide and bromo- or iodo-benzene derivatives. Journal of the Chemical Society C: Organic, p.1978 - 1981. 1969.
- Young, S. L. e D. J. Chaplin. Combretastatin A4 phosphate: background and current clinical status. Expert Opin Investig Drugs, v.13, n.9, Sep, p.1171-82. 2004.

Apêndice II – Espectros de Infravermelho

