



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E  
TECNOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO  
SENSU EM CIÊNCIAS MOLECULARES

WANDERSON COSTA DE SOUZA

**DERIVADOS N-ACILHIDRAZONAS COMO AGENTE  
ANTINEOPLÁSICOS NA INIBIÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE  
ÁCIDOS NUCLEICOS E A PROTEÍNA hnRNP K**

Anápolis-GO

2015

WANDERSON COSTA DE SOUZA

**DERIVADOS N-ACILHIDRAZONAS COMO AGENTE  
ANTINEOPLÁSICOS NA INIBIÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE  
ÁCIDOS NUCLEICOS E A PROTEÍNA hnRNP K**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino.

Co-orientador: Prof. Dr(a). Giuliana Muniz Vila Verde

Anápolis-GO

2015

## RESUMO

O câncer é definido como uma doença multicausal crônica, caracterizado pelo crescimento anormal de células transformadas. Alterações em diversos genes, denominados, proto-oncogenes, acarretam no desenvolvimento de cânceres denominados neoplasias. A quimioterapia é o método mais utilizado para o tratamento de neoplasias. São usados compostos que interferem no processo de crescimento e na divisão das células transformadas, porém eles destroem tanto células doentes quanto saudáveis. A proteína hnRNP K é conhecida por seu papel em vários processos como expressão gênica, organização da cromatina, tradução do mRNA, estabilidade do RNA e *splicing*, principalmente, através da ligação de seus domínios KH a nucleotídeos. A ativação inadequada da hnRNP K tem relação direta com a gênese de alguns tipos de câncer. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi planejar, sintetizar e avaliar a atividade antineoplásica de uma série de N-acilidrazonas que possuem similaridade estrutural com o composto **17**, oriundo da triagem virtual feita por Silva em 2010, e que possivelmente podem estabelecer interações com o domínio KH3 da proteína hnRNP K. A atividade antineoplásica foi avaliada *in vitro* por ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) para testar a interação proteína-DNA na presença dos compostos. Dentre os 14 compostos sintetizados e avaliados, apenas o composto **5** apresentou capacidade de se ligar ao domínio KH3 e inibir a proteína hnRNP K, sendo identificados, após a análise dos resultados de *docking*, três possíveis modos de ligação entre a proteína e o composto.

**Palavras Chaves:** Câncer, proteína hnRNP K, N-acilidrazonas, *docking*.

## **ABSTRACT**

Cancer can be defined as a chronic multifactorial disease, characterized by abnormal growth of transformed cells. Changes in sundry genes called proto-oncogenes, results in the development of cancers called neoplasms. Chemotherapy is the most used method for neoplasms treatment. Uses chemical substances which interfere on growth process and transformed cells division, but they destroy both cancer cells as the healthy ones. The hnRNP K protein is known for their role in several processes such as gene expression, chromatin organization, translation of the mRNA, RNA splicing and stability, mainly by linking of KH domains to nucleotides. The inadequate activation of hnRNP K has direct relation with the genesis of some cancers. In this context, the aim of this study was to plan, synthesize and evaluate the anticancer activity of a series of N-acylhydrazones which have structural similarity with the compound 17, originally from virtual screening done by Silva in 2010, and can possibly establish interactions with the KH3 domain from protein hnRNP K. The antineoplastic activity was evaluated in vitro by assaying electrophoretic mobility shift (EMSA) for testing protein-DNA interactions in presence of the compounds. Among the 14 compounds synthesized and evaluated, only compound 5 have showed capability to bond to and inhibit KH3 hnRNP K protein being identified after analyzing the *docking* results, three possible modes of connection between the protein and compound.

**Key Words:** Cancer, protein hnRNP K, N- acylhydrazones, docking

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me abençoar, capacitar e me inspirar a cada dia.

Ao meu orientador neste trabalho, Prof. Dr. Gilberto Lucio Benedito de Aquino pelo apoio, dedicação, conselhos e severidade nas palavras.

A Prof. Giuliana Muniz Vila Verde que sempre me deu bons conselhos e me inspirou a sempre ser dedicado e esforçado no meu trabalho.

Aos meus colegas e amigos do lab. de Enzimologia: Francisco (Chikão), Danilo, Leonardo, Cindy, Isabela (Bela), Suzane pelos muitos momentos em que passamos juntos em constante aprendizagem e pela amizade que todos esses anos se solidificou.

Aos professores da USP, Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino, prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, Prof. Dra. Carmem Lúcia Cardoso e da PUC-GO Prof. Dr. Vinicius Barreto da Silva por sua colaboração.

Aos Professores da UEG que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos técnicos dos laboratórios que sempre foram gentis e me atenderam bem.

A CAPES pelo apoio financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2014, por sexo.	19
<b>Figura 2:</b> Quimioterápicos mais utilizados em no tratamento do câncer	24
<b>Figura 3.</b> Estrutura do domínio KH3 da proteína hnRNP K	28
<b>Figura 4:</b> principais etapas de docking.	32
<b>Figura 5.</b> Compostos selecionados por Silva através de triagem virtual e adquiridos para testes <i>in vitro</i> com a proteína hnRNP K.	34
<b>Figura 6.</b> Modo de ligação das orientações 1 (A), 2 (B) e 5 (C) para o composto <b>11</b> .	35
<b>Figura 7.</b> Modo de ligação da orientação 1 para o composto 17.	35
<b>Figura 8:</b> Estruturas do imazodam, pimobedam e dantroleno.	36
<b>Figura 9:</b> Possíveis interações dos derivados NAH com os receptores hipotéticos.	40
<b>Figura 10:</b> Mecanismos de aquecimento por micro-ondas.	42
<b>Figura 11:</b> Planejamento de N-acilidrazonas por similaridade estrutural com o composto <b>17</b> .	56
<b>Figura 12:</b> Gel A: ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e composto	65
<b>Figura 13:</b> Gel B: Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e composto.	66
<b>Figura 14:</b> Gel C: ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e composto.	68

<b>Figura 15:</b> Estrutura do complexo (domínio KH3-sequência oligonucleotídica TCCC). Átomos de carbono da sequência nucleotídica estão em amarelo e os átomos de carbono do domínioKH3 estão em verde.	71
<b>Figura 16:</b> Conformação da estrutura do composto 5 e as dez orientações calculadas.	72
<b>Figura 17:</b> (I) Modo de interação da orientação 1 obtido por docking para o composto 5 no sitio ligante do domínio KH3, com destaque para as ligações de hidrogênio com o resíduo A40. (II) interações no sito ativo representadas em 2D.	74
<b>Figura 18:</b> (I) Modo de interação da orientação 9B obtido por docking para o composto 5 no sitio ligante do domínio KH3, com destaque para a ligação de hidrogênio com o resíduo I47. (II) interações no sito ativo representadas em 2D.	76
<b>Figura 19:</b> (I) Modo de interação da orientação 3C obtido por docking para o composto 5 no sitio ligante do domínio KH3, com destaque para a ligação de hidrogênio com o resíduo A59. (II) interações no sito ativo representadas em 2D.	78
<b>Figura 20:</b> Espectro na região do IV do composto <b>1</b> (4000-400 cm <sup>-1</sup> ).	96
<b>Figura 21-a:</b> Espectro de RMN 1H do composto <b>1</b> (DMSO-d6, 500 MHz).	97
<b>Figura 21-b:</b> Região expandida do espectro de RMN 1H do composto <b>1</b> (DMSO-d6, 500 MHz).	98
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>1</b> (DMSO-d6, 125 MHz).	99
<b>Figura 23:</b> Espectro na região do IV do composto <b>2</b> (4000-400 cm <sup>-1</sup> ).	101
<b>Figura 24:</b> Espectro de massas do composto <b>2</b>	102
<b>Figura 25-a:</b> Espectro de RMN 1H do composto <b>2</b> (DMSO-d6, 500 MHz).	103
<b>Figura 25-b:</b> Região expandida do espectro de RMN 1H do composto <b>1</b> (DMSO-d6, 500 MHz).	104
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>2</b> (DMSO-d6, 125 MHz).	105

<b>Figura 27:</b> Espectro na região do IV do composto <b>3</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	107
<b>Figura 28:</b> Espectro de massas do composto <b>3</b>	108
<b>Figura 29-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	109
<b>Figura 29-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	110
<b>Figura 30:</b> Espectro na região do IV do composto <b>4</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	112
<b>Figura 31:</b> Espectro de massas do composto <b>4</b>	113
<b>Figura 32-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>4</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	114
<b>Figura 32-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>4</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	115
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>4</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	116
<b>Figura 34:</b> Espectro na região do IV do composto <b>5</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	118
<b>Figura 35:</b> Espectro de massas do composto <b>5</b> .	119
<b>Figura 36-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	120
<b>Figura 36-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	121
<b>Figura 37:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	122
<b>Figura 38:</b> Espectro na região do IV do composto <b>6</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	124
<b>Figura 39-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>6</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	125
<b>Figura 39-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>6</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	126
<b>Figura 40:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>6</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	127
<b>Figura 41:</b> Espectro na região do IV do composto <b>7</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	129
<b>Figura 42:</b> Espectro de massas do composto <b>7</b> .	130
<b>Figura 43-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>7</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	131
<b>Figura 43-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>7</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	132
<b>Figura 44:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>7</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	133

<b>Figura 45:</b> Espectro na região do IV do composto <b>8</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	135
<b>Figura 46-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>8</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	136
<b>Figura 46-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>8</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	137
<b>Figura 47:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>8</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	138
<b>Figura 48:</b> Espectro na região do IV do composto <b>9</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	140
<b>Figura 49:</b> Espectro de massas do composto <b>9</b> .	141
<b>Figura 50-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>9</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	142
<b>Figura 50-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>9</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	143
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>9</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	144
<b>Figura 52:</b> Espectro na região do IV do composto <b>10</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	146
<b>Figura 53-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>10</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	147
<b>Figura 53-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>10</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	148
<b>Figura 54:</b> Espectro na região do IV do composto <b>11</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	150
<b>Figura 55-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>11</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	151
<b>Figura 55-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>11</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	152
<b>Figura 56:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>11</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	153
<b>Figura 57:</b> Espectro na região do IV do composto <b>12</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	155
<b>Figura 58-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>12</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	156
<b>Figura 58-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>12</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	157
<b>Figura 59:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>12</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	158

<b>Figura 60:</b> Espectro na região do IV do composto <b>13</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	160
<b>Figura 61-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>13</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	161
<b>Figura 61-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>13</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	162
<b>Figura 62:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>13</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	163
<b>Figura 63:</b> Espectro na região do IV do composto <b>14</b> (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ).	165
<b>Figura 64-a:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>14</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	166
<b>Figura 64-b:</b> Região expandida do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>14</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	167

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Síntese geral de formação de hidrazonas com destaque para o grupo azometino formado	36
<b>Esquema 2:</b> Síntese geral de formação de N-acilidrazonas com destaque para o grupo N-acilidrazona formado.	36
<b>Esquema 3:</b> reações de N-acilidrazonas.	37
<b>Esquema 4:</b> Síntese do metil 4-hidroxibenzoato	46
<b>Esquema 5:</b> Síntese da 4-Hidroxibenzohidrazida	47
<b>Esquema 6:</b> Síntese da série A	48
<b>Esquema 7:</b> Síntese do metil 4-(benziloxi)benzoato	49
<b>Esquema 8:</b> Síntese do 4-(benziloxi)-benzohidrazida	49
<b>Esquema 9:</b> Síntese da série B	50
<b>Esquema 10:</b> Síntese da série C	51
<b>Esquema 11:</b> Proteção do grupo hidroxila do ácido carboxílico	58
<b>Esquema 12:</b> Reação de hidrazinólise.	59
<b>Esquema 13:</b> Síntese de N-acilidrazonas via condensação entre benzaldeídos substituídos e hidrazidas.	60
<b>Esquema 14:</b> Síntese de Williamson para formação do éter.	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características principais dos oncogenes e genes supressores de tumor.	22
<b>Tabela 2:</b> Bases de dados e subcoleções usadas na triagem virtual por Silva.	33
<b>Tabela 3:</b> Equipamentos, fórmula química e grau de pureza dos compostos utilizados.	45
<b>Tabela 4:</b> Compostos formados na série A e suas respectivas porcentagem de conversão.	61
<b>Tabela 5:</b> Compostos formados na série B e suas respectivas porcentagem de conversão.	62
<b>Tabela 6:</b> Compostos formados na série C e suas respectivas porcentagem de conversão.	63
<b>Tabela 7:</b> Valores obtidos para as 10 orientações de alto escore nas simulações de docking flexível com a estrutura do complexo 1J5K.	73

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Relação entre oligonucleotídeo livre após reação com a proteína hnRNP K e oligonucleotídeo livre após a inibição da proteína hnRNP K. 69

## LISTA DE ABREVIATURAS

INCA	Instituto Nacional Do Câncer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
hnRNPs	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins
ssDNA	Fita Simples de DNA
dsDNA	Fita dupla de DNA
KH	<i>K homology</i>
SBDD	Structure Based Drug Design
EMSA	Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
PDB	Banco de Dados de Proteína
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
IV	Infravermelho
RMN <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13
FCFRP/USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ Universidade São Paulo
G	Glicina
S	Serina
I	Isoleucina
L	Lisina
A	Arginina
T	Tirosina
NAH	N-acilidrazona
s	singleto

d	dupleto
t	tripleto
dd	duplo dupleto
TMS	Tetrametilsilano

## SUMÁRIO

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de figuras**

**Lista de esquemas**

**Lista de tabelas**

**Lista de gráficos**

**Lista de abreviaturas e siglas**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2. REFERENCIA TÉORICO</b>	<b>19</b>
2.1 Câncer	19
2.2 Proteína hnRNP K	25
2.3 Planejamento rotacional de fármaco	29
2.4 N-acilidrazonas	36
2.5 Síntese via micro-ondas	40
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>45</b>
4.1 Reagentes utilizados para síntese das N-acilidrazonas	45
4.2 Síntese de análogos	46
4.2.1 Síntese do metil 4-hidroxibenzoato	46
4.2.2 Síntese do composto 4-Hidroxibenzohidrazida	47
4.2.3 Síntese de N-acilidrazonas	47
4.3 Ensaio de ligação com a proteína hnRNP K humana	51
4.3.1 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA)	51
4.3.1.1 Preparação do gel de poliacrilamida DNA 7%	51

<b>4.3.1.2</b>	<b>Preparação das amostras</b>	<b>52</b>
<b>4.3.1.3</b>	<b>Ensaio</b>	<b>52</b>
<b>4.3.1.4</b>	<b>Revelação do gel</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Docking</b>	<b>53</b>
<b>4.5</b>	<b>Métodos analíticos</b>	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b>Elucidação das estruturas</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Planejamento de novos compostos</b>	<b>56</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Síntese de análogos N-acilidrazônicos.</b>	<b>57</b>
<b>5.1.1.1</b>	<b>Síntese das N-acilidrazonas</b>	<b>58</b>
<b>5.2</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i> de ligação da proteína hnRNP K humana recombinante purificada com DNA fita simples</b>	<b>64</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise do complexo hnRNP K KH3 – ssDNA</b>	<b>69</b>
<b>5.4</b>	<b>Simulação de docking com o composto 5</b>	<b>72</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Modo de ligação A</b>	<b>73</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Modo de ligação B</b>	<b>75</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Modo de ligação C</b>	<b>77</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>82</b>
	<b>ANEXOS</b>	

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer é provavelmente a doença mais temível em todo o mundo, pois além das altas taxas de mortalidade, carrega consigo o estigma de dor e sofrimento, mesmo quando há chances de cura (CARVALHO; CRISTÃO, 2012).

O aumento do número de casos da doença está diretamente ligado ao crescimento e a longevidade das populações atuais, constituindo-se um importante problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos, como naqueles em desenvolvimento, sendo necessário o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes contra o câncer (URRUTICOECHEA *et al.*, 2010; SIMARD, 2012).

O tratamento para o câncer restringe-se ao estágio de desenvolvimento da doença. Basicamente, três opções são usadas mais frequentemente: cirurgia, quimioterapia e radioterapia (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Na busca por novos candidatos a fármacos capazes de suprimir a formação e o desenvolvimento de câncer, vários compostos têm sido estudados. Recentemente, Silva (2011) utilizando estratégias de triagem virtual, selecionou a partir de bases de dados vários compostos com potencial de se ligarem ao domínio KH3 da proteína hnRNP K, identificada como superexpressa em diversos tipos de câncer.

O objetivo principal desse estudo foi planejar e sintetizar moléculas com similaridade estrutural as moléculas selecionadas por Silva (2011), avaliar a atividade antineoplásica desses compostos e propor possíveis modos de ligação entre esses compostos e a proteína.

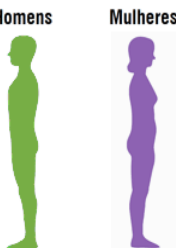
## 2. REFERENCIAL TÉORICO

### 2.1 Câncer

O aumento da expectativa de vida e a diminuição das taxas de natalidade trouxeram mudanças demográficas significativas. O envelhecimento da população, associado as transformações nas relações entre as pessoas e seu ambiente levaram a uma distorção importante do perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando o câncer como o centro de atenção dos problemas de óbito por doenças (INCA, 2014). No Brasil, o câncer representa a segunda maior causa de óbito na população ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (GARÓFOLO *et al.*, 2004).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA), em estimativa para os anos de 2014 e 2015, aponta para o surgimento de 576 mil novos casos de câncer no Brasil. Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, o número de casos de câncer chega a 395 mil, sendo os mais comuns em homens cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide ( Figura 1) (INCA, 2014).

**Figura 1.** Tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2014, por sexo.

Localização primária	casos novos	%		Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%		Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%

**Fonte:** adaptado de INCA, 2014.

A palavra câncer é usada para descrever cerca de 200 tipos de doenças que afetam órgãos ou sistemas pelo corpo todo. O câncer é definido como uma enfermidade multicausal crônica, caracterizado pelo crescimento descontrolado de células transformadas (ALMEIDA, 2005).

Pesquisas realizadas nos últimos anos tem buscado relacionar fatores genéticos-ambientais, pelo qual pessoas com determinada predisposição genética podem ser mais suscetíveis aos efeitos relacionados a exposição de fatores de riscos ambientais, como exposição à radiação solar, às toxinas no ar ou nos alimentos, contatos com vírus, consumo de drogas e etc., que causam câncer (CLAPP, 2005).

Ao relacionar o câncer com a alteração dos genes envolvidos no controle do crescimento celular, para designar uma doença, utiliza-se o termo “neoplasia” que significa novo crescimento (AMORIM, 2002). Mais de 100 genes já foram identificados como pertencentes a categoria de genes causadores de neoplasias humanas, embora estime que muitos outros existam (FARIA E RABENHORST, 2006). Os genes ligados a formação de neoplasias são, principalmente, os que em células normais estão envolvidos em processos como o controle do ciclo celular, reparação de DNA danificado e apoptose (LOPES, OLIVEIRA E PRADO, 2002).

O conjunto de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação é responsável pelo estabelecimento de neoplasias. Todavia, a alteração em alguns genes, denominados proto-oncogenes, com papel central em múltiplos canais regulatórios revela o potencial impacto de uma única desordem molecular na formação de neoplasia (FARIA E RABENHORST, 2006).

Os proto-oncogenes estão relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação de células normais. Eles também codificam fatores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA. Quando sofrem uma

mutação, eles são chamados de oncogene. A ativação inadequada desses genes contribui diretamente para o desenvolvimento de neoplasias humanas o que pode ser causado, por exemplo, por translocações cromossômicas, permitindo que um proto-oncogene seja inserido próximo a um gene frequentemente transcrito, levando a sua superexpressão, amplificação genica, pelo aumento do número de cópias dos genes (LOPES *et al.*, 2002).

Células normais possuem a capacidade de suprimir a formação de neoplasias através de genes de supressão tumoral. Esses genes tem a função de reprimir a divisão das células, como uma maneira de controlar sua multiplicação. Quando esses genes tem sua função perdida ou alterada eles também podem contribuir para o desenvolvimento do câncer (BORGES-OSÓRIO, 2013).

Para que uma célula normal dê origem a um câncer não basta apenas que essa se multiplique continuamente. Ela precisa também ignorar restrições de crescimento impostas pelas diferentes partes do organismo. Evidências experimentais demonstram como certos fatores e mecanismos atuam na carcinogênese, possibilitando a uma célula transpor essas restrições e se tornar um câncer maligno (BELIZÁRIO, 2002).

O processo de formação de neoplasias a partir de uma célula normal tem por origem a ativação de oncogenes (proto-oncogenes transformados) ou a inativação de genes supressores de tumor, fatores que contribuem para o crescimento descontrolado das células ao produzirem alterações a níveis como: fatores de crescimento, reguladores de ciclo celular (proteína p53, MDM2, c-Myc e quinases dependentes de ciclina), mecanismos de apoptose (morte celular programada) e expressão da telomerase (SILVA, 2007).

A tabela 1 ilustra as principais diferenças entre oncogenes e genes supressores de tumor.

**Tabela 1:** Características principais dos oncogenes e genes supressores de tumor.

<b>Características</b>	<b>Oncogenes</b>	<b>Supressores de tumor</b>
Mutação	Dominante (ganho de função)	Recessiva (perda de função)
Mecanismo de ativação/inativação	Mutação pontual, translocação, amplificação gênica e inserção viral	Mutação pontual, perda alélica, metilação e inserção viral
Eventos mutacionais necessários	1 evento	2 eventos
Associação com câncer hereditário	Raramente	Frequentemente
Funções das proteínas codificadas	Fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, proteínas de transdução de sinal	Proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, reparo do DNA e na indução da apoptose
Exemplos	ABL1, MYC, K-RAS, RET	RB1, TP53, BRCA1, MLH1

**Fonte:** adaptado de GUEMBAROVSKI E CÓLUS, 2008.

As neoplasias são decorrências de interações entre fatores genéticos e ambientais. Em quase todos os casos, um modelo geral de 3-estágios pode ser associado a carcinogênese (ALMEIDA *et al.*, 2005)..

No primeiro estágio, denominado iniciação, ocorrem as mudanças genéticas iniciais no DNA, elas podem ser adquiridas através da ação de carcinogênicos químicos, agentes infecciosos ou físicos. Esse primeiro estágio requer não apenas a modificação no DNA, mas a fixação da mutação após o reparo, o que pode ocorrer após algumas divisões celulares. Exemplos de substâncias carcinogênicas: sulfato de dimetila, metilnitrossuréia, cloreto de vinila, aflatoxinas, dimetilnitrosoamina e benzopireno.

No segundo estágio, denominado promoção, o DNA geneticamente alterado sofre efeito dos agentes oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna de forma lenta e gradual. É necessário uma longa exposição aos agentes oncopromotores para que ocorra uma transformação. Entre os agentes oncopromotores, estão hormônios, como os androgênios, ligados ao câncer de próstata, e estrogênios, ligados ao câncer de mama e útero. Alguns compostos presentes na fumaça de cigarro são considerados carcinogênios completos, atuando tanto na iniciação quanto na promoção.

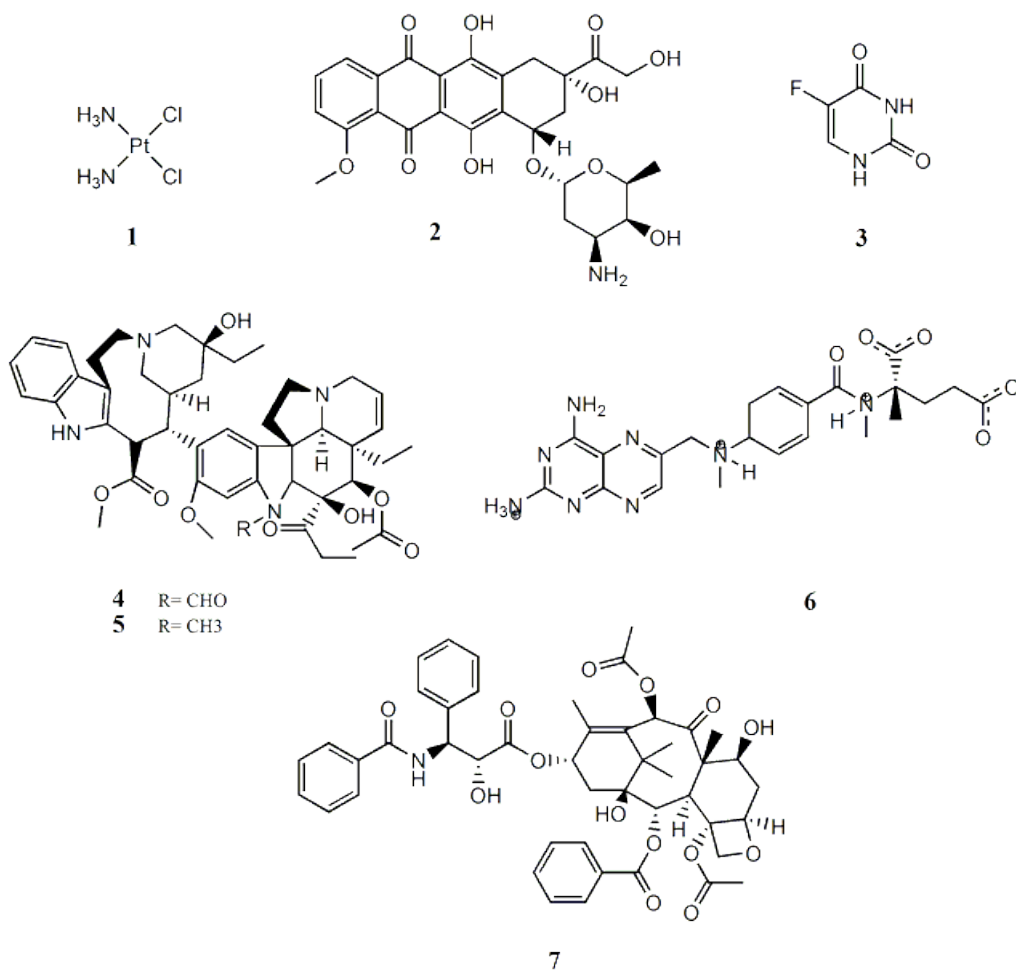
No terceiro e último estágio, denominado progressão, ocorre com a transformação de uma lesão pré-maligna em maligna. Esse estágio envolve mudanças adicionais no DNA e é, normalmente acompanhado de um rápido crescimento celular, sendo irreversível o processo (SALVADOR, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005).

O tratamento contra neoplasias incluem métodos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia que podem ser empregados de forma isolada, embora seja mais comum ter-se a combinação de dois ou mais tipos de métodos no tratamento. Existem ainda métodos envolvendo terapia hormonal e biológica (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A quimioterapia antineoplásica é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, de forma isolada ou em combinação. Esses compostos interferem no processo de crescimento e divisão celular, destruindo as células tumorais, mas também agredindo as células normais que possuem características semelhantes. Porém, o corpo recupera-se dessas agressões após o tratamento (ANJOS E ZAGO, 2006). Em nível celular, esses compostos criam condições adversas que impedem o crescimento e a replicação celular. Estes mecanismos consistem no distúrbio da produção das enzimas essenciais; na inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas e no impedimento da mitose celular (SCHULZE, 2007).

Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento do câncer estão a cisplatina (1), doxorubicina (2), fluoruracil (3), vincristina (4), vimblastina (5), metotrexato (6) e plactaxel (7) (Figura 2) (ALMEIDA, 2005).

**Figura 2:** Quimioterápicos mais utilizados no tratamento do câncer.



## 2.2 Proteína hnRNP K

As hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) são formadas por um conjunto de proteínas, com cerca de 30 membros, cuja estrutura de muitas delas já foram resolvidas, tanto por ressonância magnética quanto por cristalografia (CARPENTER *et al.*, 2006). Elas contêm um ou mais domínios de ligação ao RNA e, pelo menos, um domínio adicional de ligação com outras proteínas. Além disso, elas possuem uma estrutura modular (LODISH, 2005). Outra importante característica desse conjunto de proteínas é a existência de isoformas, originadas por *splicing* alternativo, e modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, fosforilação e metilação (QUARESMA, 2008). Essas proteínas estão presentes em etapas como a biogênese do telômero, reparo de DNA, sinalização celular, e regulação da expressão em nível transcricional e traducional (CARPENTER *et al.*, 2006).

A hnRNP K é uma proteína de ligação da família das hnRNPs encontrada no núcleo, citoplasma, mitocôndrias e membrana plasmática (QIU *et al.*, 2014). Essa proteína está envolvida em várias etapas da expressão de genes, organização da cromatina, tradução do mRNA, estabilidade do RNA e *splicing* (BARBORO *et al.*, 2009; BOMSZTYK, DENISENKO, & OSTROWSKI, 2004; DINH, DAS, FRANCO, & PATTNAIK, 2013).

Estudos relatam que a superexpressão dessa proteína foi encontrada em células tumorais de diversos cânceres como câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de esôfago, câncer de boca (epidermóide) e câncer do colo-retal (HATAKEYAMA *et al.*, 2006; KLIMEK-TOMCZAK *et al.*, 2006; OSTROWSKI & BOMSZTYK, 2003).

Várias funções celulares indicam que a hnRNP K está envolvida na tumorigênese. A expressão de diversos genes envolvidos na tumorigênese é

regulada pela hnRNP K, tais como os oncogenes c-Myc, eIF4E, c-Src, BRCA1 e BRCA2. (ZHOU, 2010). Outra importante observação implica no fato da hnRNP K ser regulada por diversas quinases oncogênicas (WEN *et al.*, 2010).

O oncogene c-Myc é um importante fator de transcrição que regula a expressão de vários genes essenciais envolvidos na tumorigênese. A proteína hnRNP K forma um complexo com a cadeia rica em pirimidina elemento CT presente no promotor P1 da c-Myc (LEVENS, 1995; TAKIMOTO *et al.*, 1993). A superexpressão da hnRNP K desregula e aumenta a expressão do promotor do gene c-Myc que leva a ativação inadequada deste gene e a formação de neoplasias em seres humanos (ADOLPH, 2007).

O oncogene eIF4E é uma fator de tradução de iniciação que desempenha um papel fundamental na regulação da proliferação celular. A hnRNP K liga-se ao núcleo polipirimidina no promotor eIF4E e regula positivamente a sua transcrição. A superexpressão de hnRNP K aumenta a iniciação da tradução, levando a um crescimento da divisão celular e formação de neoplasias (LYNCH *et al.*, 2005).

A hnRNP K se liga especificamente e ativa c-Src. O oncogene c-Src medeia a fosforilação da tirosina de hnRNP K e a inibição ou diminuição da sua afinidade por ácidos nucleicos. Além disso, c-Src quinase regula especificamente as funções hnRNP K. Estudos apontam para um papel específico de c-Src na regulação pós-transcricional via hnRNP K (OSTARECK-LEDERER *et al.*, 2002).

Poucos motivos de ligação ao RNA já foram descritos na literatura. Entre eles estão o domínio RNP (ribonucleoproteína), RGG boxes, zinc fingers e o domínio KH sendo este último, originalmente identificado na proteína hnRNP K, encontrado com maior frequência e presente em inúmeras proteínas (SILVA, 2007).

A hnRNP K é uma proteína de 65kDa composta por 464 resíduos de aminoácidos. Essa proteína, como todas da família hnRNPs, possui três domínios KH, altamente conservados, que realizam interações da proteína com ácidos nucleicos: RNA, ssDNA e dsDNA (BRADDOCK, 2002; TANG *et al.*, 2014).

Dois dos domínios KH, KH1 (resíduos 32-112) e KH2 (resíduos 142-217), estão localizados na região amino-terminal da proteína. O terceiro domínio KH3 (resíduos 379-463) está localizado na região carboxi-terminal separado do domínio KH2 por 172 resíduos de aminoácidos, onde se encontra o domínio KI. Este domínio, contendo outros três domínios em si (GRGG, SH3 e domínio de ligação de quinases), é responsável por interações do tipo proteína-proteína, bem como interações de proteínas contendo o domínio SH3 envolvidas em diversas vias de tradução, incluindo a classe Scr de tirosina quinase e proto-oncoproteína Vav ricas em prolina (BACKE, 2005; LEOPOLDINO *et al.*, 2007; MIKULA E OSTROWSKI, 2009; SILVA, 2007).

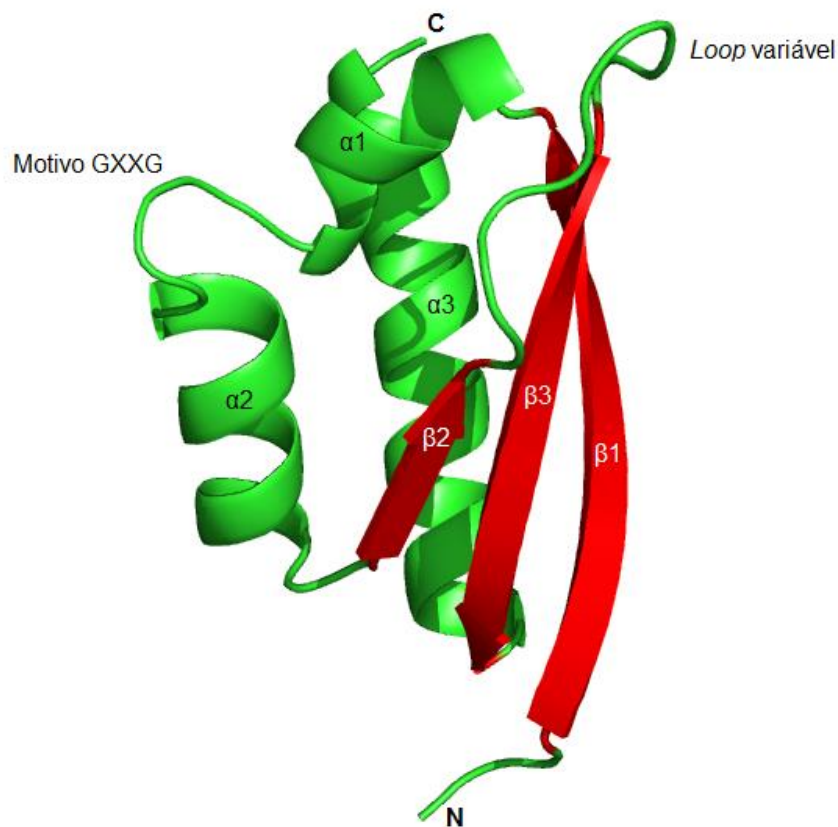
A interação proteína-ácido nucleico é possível devido à alta afinidade entre os 3 domínios existentes na hnRNP K. Embora, com menor afinidade, o domínio KH3 também apresenta a capacidade de se ligar ao ácido nucleico como um domínio isolado (PAZIEWSKA, 2004).

A proteína hnRNP K apresenta duas isoformas (a e b) originadas por *splicing* alternativo, cuja diferença estrutural está presente na região carboxi-terminal, onde se localiza o domínio KH3. As diferentes funções dessas isoformas, se as houver, continua a ser definida. Os demais domínios apresentam a mesma estrutura (LEOPOLDINO *et al.*, 2007; MIKULA E OSTROWSKI, 2009).

O domínio KH3 da proteína hnRNP K (Figura 3) é compreendido por três  $\alpha$ -hélices (resíduos 396-402, 407-415 e 440-454) que se ligam a três folhas  $\beta$  antiparalelas (resíduos 387-395, 419-424 e 432-439), dispostas em um uma

arranjo típico  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\alpha 3$ . As hélices  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  são ligadas entre si por um curto motivo GXXG invariável (resíduos 404-407), ao passo que as folhas  $\beta 2$  e  $\beta 3$  são ligadas por um *loop* variável (resíduos 425-431). Um resíduo de glicina altamente conservada, no final da hélice  $\alpha 2$  permite estericamente a ligação entre hélice  $\alpha 2$  e a folha  $\beta 2$ . A ligação entre a hélice  $\alpha 3$  e a folha  $\beta 3$  também é possível devido a outro resíduo de glicina altamente conservada localizado no final da folha  $\beta 3$  (BABER, , 1999; BACKE *et al.*, 2005; BRADDOCK *et al.*, 2002).

**Figura 3.** Estrutura do domínio KH3 da proteína hnRNP K.



**Fonte:** protein data bank (PDB).

## 2.3 Planejamento rotacional de fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é bastante complexo e tem suas origens profundamente ligadas as áreas de tecnologia e ciência (GUIDO & ANDRICOPULO, 2008).

Devido a multiplicidade de fatores, tais como biodisponibilidade, toxicidade e metabolismo que envolvem o planejamento molecular de novos compostos que apresentem efeitos farmacológicos, o tempo para formulação de um novo fármaco se torna longo e envolve altos custos, podendo levar de 12 a 15 anos e chegando em alguns casos a cifras superiores a US\$ 1 bilhão (BARREIRO, 2002; GUIDO & ANDRICOPULO, 2008).

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é dividido em duas grandes etapas, etapa pré-clínica, também denominada fase da descoberta e etapa clínica conhecida como fase de desenvolvimento do fármaco. Nos primeiros estágios do processo de descoberta, as pesquisas se concentram na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de modular a atividade do alvo macromolecular (Proteína, DNA ou RNA) eleito para o processo de planejamento. A validação do alvo macromolecular selecionado permite a seleção ou síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sitio de ligação (DIAS, 2013; SILVA, 2011).

Na fase pré-clínica o planejamento de compostos mais ativos pode ser feito com o auxílio de técnicas eficientes para otimizar a potência e o perfil farmacológico desses novos compostos, levando a síntese de produtos com maior biodisponibilidade, atóxicos e metabolismo adequado. Dentre as técnicas, o planejamento baseado na estrutura do receptor é amplamente utilizada (GUIDO & ANDRICOPULO, 2008).

A técnica de desenho de fármacos baseado na estrutura do alvo terapêutico ou em inglês “*structure-based drug design*” (SBDD), é baseada nas informações sobre a estrutura topológica do receptor (proteínas, enzimas e etc.). O conhecimento dessas informações, especialmente do sítio de interação do receptor, permite o desenho de compostos mais específicos (inibidores ou antagonista/agonista) para uma determinada função. A aquisição dessas informações é feita através da análise da estrutura obtida por cristalografia de Raio X, estudos de RMN ou modelagem por homologia (BARREIRO, 2002; GUIDO E ANDRICOPULO, 2008; GUIDO E ANDRICOPULO, 2012).

O método mais usado em SBDD é o *docking*. Este método busca prever as possíveis conformações que determinada estrutura de um ligante pode adquirir no sítio de interação de um receptor, seguida da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto. Em particular, o *docking* de complexos proteína-ligante ocupa um lugar muito especial na docagem molecular, devido as suas aplicações na medicina (SOUSA, 2006; MORRIS E LIM-WILBY, 2008).

Métodos de *docking*, em geral, envolvem o uso de funções de *scoring*. Essas funções possuem dupla tarefa. Em primeiro lugar, elas são usadas para diferenciar as diversas orientações que um único ligante pode adotar no sítio de ligação de um receptor. Em segundo lugar, elas são usadas para estimar a afinidade do complexo receptor-ligante formado e ranquear de forma ordenada esses compostos. Os métodos de *docking* envolvem parâmetros como hidrofóbicos, van der Waals, ligações de hidrogênio, estéricos, interações eletrostáticas e efeitos de solvatação que contribuem para a ligação do ligante. Sendo assim, o estudo de *docking* pode ser descrito como uma combinação de uma função contendo algoritmos de busca conformacional e uma função de score (REDDY, 2007).

Os algoritmos de busca, são formados por um conjunto de parâmetros cujo objetivo é explorar a flexibilidade da estrutura dos ligantes no sitio receptor. Após determinar as orientações dos ligantes em relação ao sitio receptor, através dos algoritmos de busca, os programas usam funções de escore para estimar a afinidade de uma dada posição no sitio receptor (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Os programas usados para docking são inúmeros, dentre eles destacam-se DOCK, GOLD, FlexX, GLIDE, AUTODOCK e Surflex-Dock por apresentarem melhores modos de ligação e estimativa de afinidade (GUIDO *et al.*, 2008).

O método de *docking* mais usado trata o receptor como um sistema rígido e considera somente o espaço conformacional do ligante, porém o ideal seja considerar também a flexibilidade do receptor (KITCHEN, 2004).

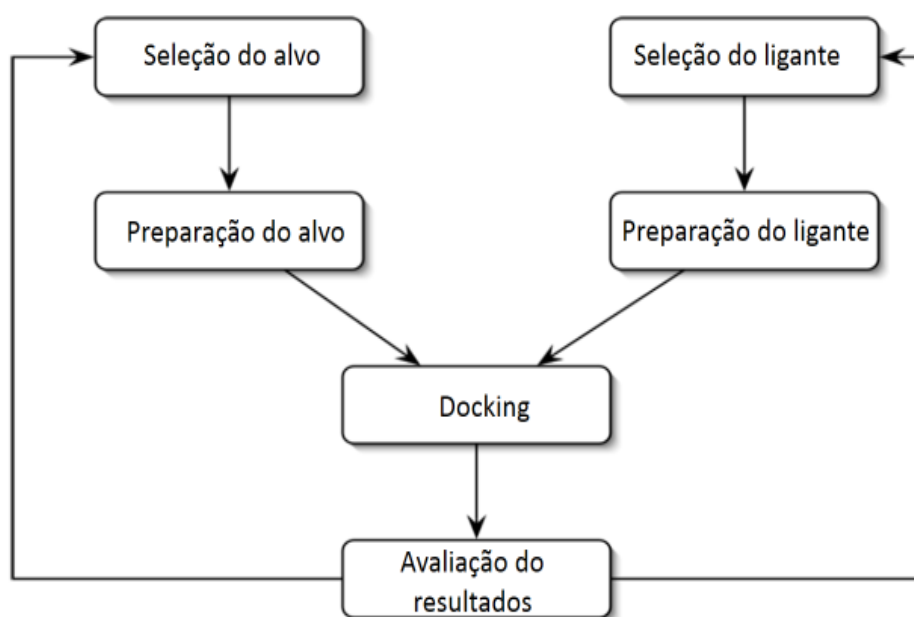
O *docking* é a principal técnica utilizada em triagem virtual, cujo objetivo central é predizer, a partir de uma base de dados, quais compostos são capazes de interagir com o sitio receptor de uma macromolécula e ordenar esses compostos por grau de afinidade com o sitio receptor, selecionando ligantes promissores e possíveis candidatos a testes biológicos (GRIFFITH, GARNER E KELLER, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2012).

As estratégias de triagem virtual dividem-se em duas abordagens: a triagem baseada na estrutura do alvo molecular e a triagem baseada em ligantes. A triagem baseada em ligantes, utiliza compostos com atividade biológica já comprovada, sem levar em conta qualquer receptor. Utilizando essa estratégia é possível selecionar, a partir de uma base de dados (biblioteca de compostos), compostos estruturalmente semelhantes e que podem vir a apresentar atividades biológicas semelhantes. Parte-se do princípio que compostos que possuem semelhança estrutural tendem a possuírem atividade biológica semelhante (princípio de

similaridade). Essa estratégia é considerada simples e com menor gasto computacional (RODRIGUES *et al.*, 2012; WILLETT, 2003).

A figura 4 mostra as principais etapas seguidas na realização de *docking*.

**Figura 4:** Principais etapas de *docking*.



**Fonte:** Adaptado de MORRIS E LIM-WILBY, 2008.

Silva (2011) utilizando estratégias de triagem virtual selecionou a partir de uma série da base de dados (Tabela 2) vários compostos com potencial de se ligarem ao domínio KH3 da proteína hnRNP K (código 1J5K, complexo da isoforma b com a sequência de ssDNA TCCCT). As bases de dados utilizadas possuem estruturas de moléculas de fármacos, substâncias ativas e/ou moléculas com propriedades “drug-like”.

O software “GOLD” foi escolhido para as simulações de docking flexível utilizando algoritmos genéticos. Foram selecionadas apenas as orientações de

melhor escore das 30 melhores estruturas filtradas pelo software para cada uma das coleções ou subcoleções de compostos. Os compostos selecionados foram novamente submetidos as simulações de docking, de maneira individual e de caráter mais refinado, sendo que algumas estruturas foram descartadas após essa etapa. Dessa forma, apenas 18 compostos com interações favoráveis no sítio ligante do domínio KH3 foram selecionados por Silva (Figura 5). Sendo observado nestes um *consensus* estrutural com a sequência de ssDNA TCCCT.

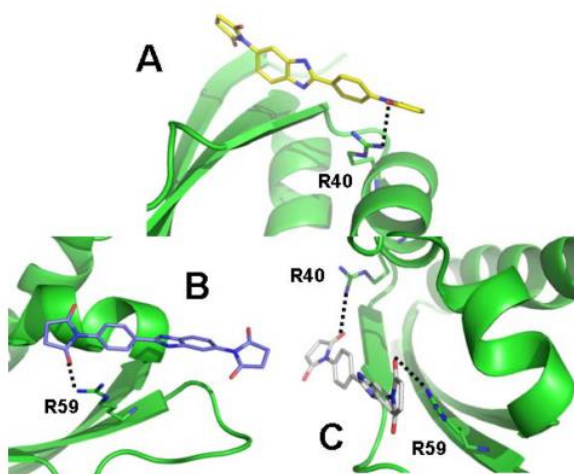
**Tabela 2.** Bases de dados e subcoleções usadas na triagem virtual por Silva.

<b>BASES DE DADOS</b>		
<b>Ilibdiverse</b>	<b>IResearch library</b>	<b>Chembridge</b>
1200 estruturas de fármacos e substâncias ativas.	<b>Archive 01:</b> 100.000 estruturas diversas com propriedades moleculares “drug-like”	<b>Diverset:</b> 50.000 estruturas; <b>MWset:</b> 30.000 estruturas; <b>CNset:</b> 50.000 estruturas

Os compostos selecionados usando técnica de *docking* foram escolhidos para realização de ensaios biológicos *in vitro*. Os ensaios de ligação *in vitro* com a proteína hnRNP K foram realizados com o objetivo de verificar se os compostos eram capazes de inibir a ligação natural da hnRNP K ao DNA. Os ensaios foram realizados utilizando método de ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) que busca observar a migração de um oligonucleotídeo (sequência de ssDNA TCCCT) específico para a proteína. Dentre os compostos selecionados para os ensaios de ligação, apenas os compostos **11** e **17** apresentaram capacidade de se ligar a proteína impedindo sua ligação natural ao ssDNA.



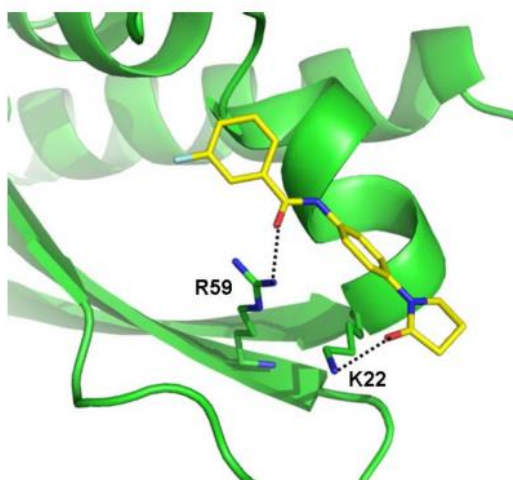
**Figura 6.** Modo de ligação das orientações 1 (A), 2 (B) e 5 (C) para o composto **11**.



**Fonte:** SILVA, 2011.

Para o composto **17** foi observado apenas uma orientação (1) favorável dentre as quatro obtidas nas simulações de docking (Figura 7). Essa orientação apresentou duas ligações de hidrogênio. Sendo uma com o resíduo R59 e outra com o resíduo K22.

**Figura 7.** Modo de ligação da orientação 1 para o composto **17**.



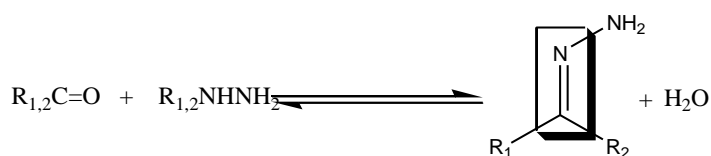
**Fonte:** SILVA (2011).

Os compostos **11** e **17** se mostraram interessantes protótipos para o desenvolvimento de fármacos que atuam inibindo a proteína hnRNP K sendo identificados como ligantes desse alvo. O estudo de compostos similares aos compostos apresentados por Silva, parece ser promissor e representa uma boa estratégia para direcionamento de sínteses de compostos com possíveis atividades biológicas.

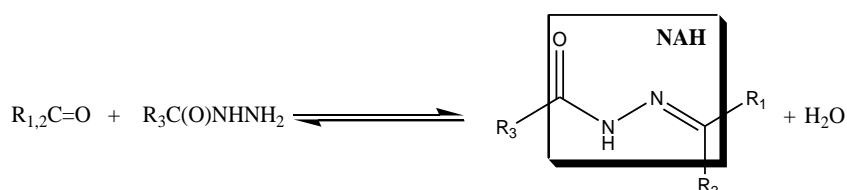
## 2.4 N-acilidrazonas

A formação de um hidrazona (Esquema 1) passa pela condensação entre uma cetona ou aldeído com uma hidrazina. Quando essa hidrazina é uma N-acilidrazina/hidrazida o composto formado é uma N-acilidrazona (NAH) (Esquema 2), um composto azometino (SUGIURA E KOBAYASHI, 2005).

**Esquema 1:** Síntese geral de formação de hidrazonas com destaque para o grupo azometino formado

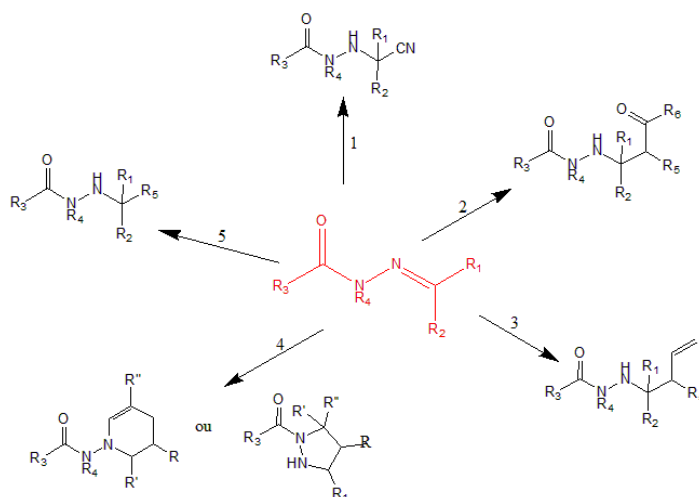


**Esquema 2:** Síntese geral de formação de N-acilidrazonas com destaque para o grupo N-acilidrazona formado.



Avaliando a estrutura geral de uma N-acilidrazona é possível perceber presença do grupo azometino que confere maior estabilidade as N-acilidrazonas. Estruturalmente mais simples, as hidrazonas sintetizadas por Figueredo (2013) apresentam substituição bioisotérica da carbonila por C=N, o que leva a formação de compostos menos estáveis, e conseqüentemente, a formação de dímeros. O par de elétrons livre no nitrogênio é conjugado à ligação dupla (C=N), levando o carbono a adquirir caráter menos positivo e, conseqüentemente, ser menos susceptível a ataques nucleofílicos. A presença de um grupo carbonila ligado a um nitrogênio torna carbono imínico mais eletrofílico na presença de ácidos de Lewis. Compostos N-acilidrazônicos podem ainda sofrer modificações através de reações como cianação (1), reação de Mannich (2), alilação (3), cicloadição (4) e radicalar (5) (Esquema 3) (BELSKAYA, DEHAEN E BAKULEV, 2010; SUGIURA E KOBAYASHI, 2005).

**Esquema 3:** Reações de N-acilidrazonas.



A síntese de N-acilidrazona é geralmente realizada via catálise ácida. Dependendo do solvente empregado há a possibilidade da exclusão de adição do

ácido, uma vez que baixas concentrações do íon hidrônio já são suficientes (RAITZ, 2012).

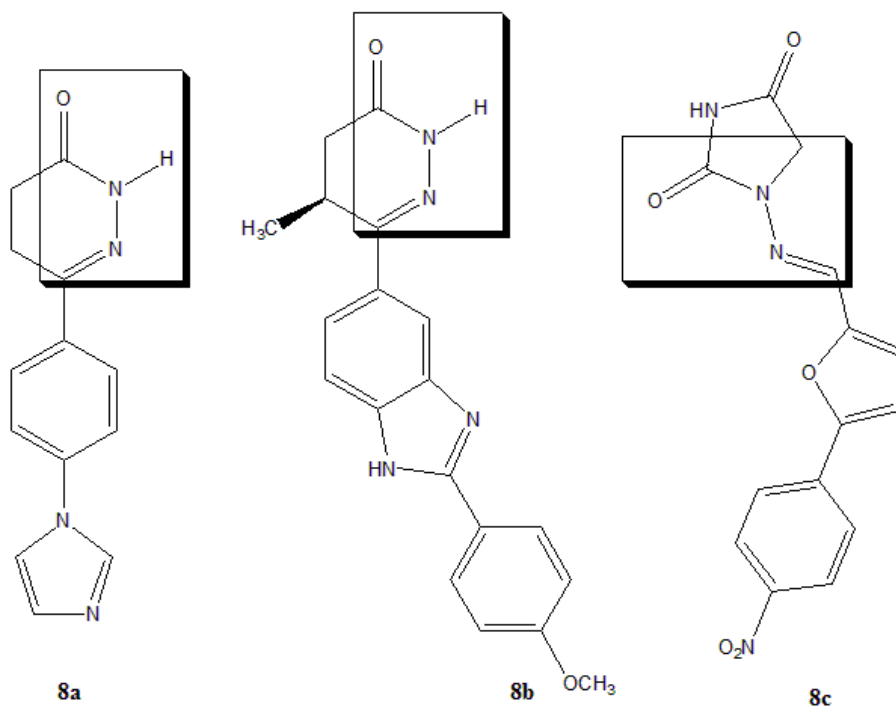
O grupamento N-acilidrazonas (NAH) constitui um importante grupo farmacofórico devido a sua relação com diversas atividades biológicas dentre as quais se destacam, mas não se limitam a estas, as atividades antileishmaniose, anti-inflamatórios, cardioativa, antitrombóticos, antimicrobianos, antibacterianos e analgésicas (LANNES, 2010).

O padrão estrutural característico das N-acilidrazonas é observado em inibidores da fosfodiesterase PDE3, constituído, entre outros, por vários derivados sintéticos, como imazodam (Figura **8a**) e pimobendam (Figura **8b**), relatados como os primeiros derivados piridazinônicos sintéticos descritos com propriedades inibidoras da isoformas PDE3 e identificados como fármacos cardiotônicos (BARREIRO, 2002; WOICICKOSKI, 2008).

Bernardino (2006) relata o potencial leishmanicida de derivados N-acilidrazônicos comparados com drogas de referência, como o cetoconazol, a pentamidina, o alopurinol e o benzonidazol.

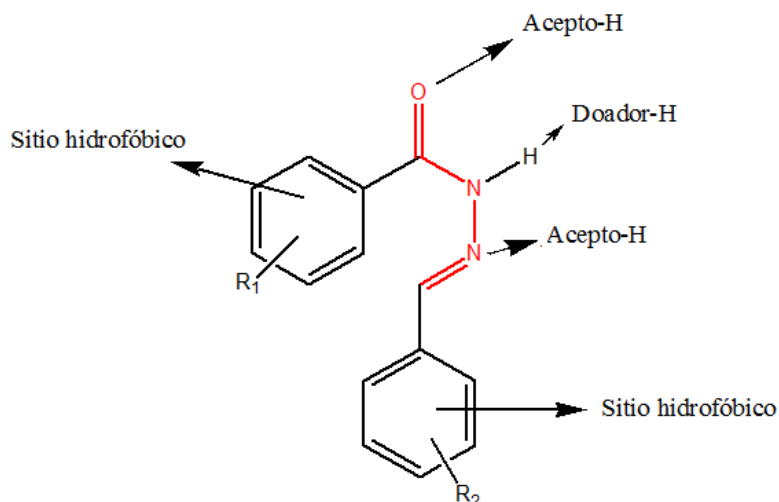
Charret (2002) demonstrou em estudos que derivados N-acilidrazônicos que apresentam a subunidade imíno demonstram potente atividade biológica, sendo esta subunidade ressaltada como vital para atividade dos compostos funcionando como ancora hidrofóbica que potencialmente se liga a proteases. Barreiro (2002) relata que a supressão da insaturação imímica reduz fortemente a atividade desses compostos.

A regulação dos canais de cálcio intramolecular também é mecanismo de ação de alguns derivados do grupamento NAH como, por exemplo, o dantroleno (Figura **8c**), cujo grupamento NAH está parcialmente inserido no anel da molécula (BARREIRO, 2002).

**Figura 8:** Estruturas do imazodam, pimobendama e dantroleno.

Estudos buscando a compreensão dos fatores estruturais envolvidos em respostas analgésicas de diversos derivados N-acilidrazônicos buscaram investigar a contribuição da carbonila da função NAH. Esses estudos identificaram esse grupo como sendo capaz de interagir com os receptores por meio de ligações de hidrogênio. Além disso, o grupamento N-H é identificado como doador de ligações de hidrogênio podendo também interagir com diversos receptores (Figura 9) (BARREIRO *et al.* 2002).

**Figura 9:** Possíveis interações dos derivados NAH com os receptores hipotéticos.



Fonte: BARREIRO *et al.* (2002).

## 2.5 Síntese via micro-ondas

Os primeiros relatos de sínteses orgânicas conduzidas em fornos de micro-ondas domésticos surgiram em 1986 em dois trabalhos independentes de Gedye e Guigere. Foi observada uma notável redução no tempo de reação e alguns casos rendimentos superiores ao método de aquecimento clássico. Devido ao fato de as primeiras experiências serem conduzidas em sistemas domésticos sem qualquer controle de pressão foram também observados os primeiros relatos de acidentes. Alguns fatores como má distribuição das micro-ondas, reatores pequenos e fechados, controles de reação inadequados ou inexistentes, dosagem de pulso não existentes e falta de proteção no caso de explosões levaram à resultados inconsistentes devido à dificuldade de avaliação da reatividade e cinética química (SANSEVERINO, 2002).

Resultado direto da análises desses acidentes levaram a construção reatores comerciais de micro-ondas para a condução de reações orgânicas com sistemas

de controle de pressão, temperatura e possibilidade de utilização de refluxo que garantem não apenas a segurança como também a reprodutibilidade das reações (SANSEVERINO, 2002).

As principais vantagens da utilização de energia de micro-ondas sobre os aquecimentos convencionais (manta, chapas de aquecimento, banhos de óleo) para uma reação de síntese, destacam-se como:

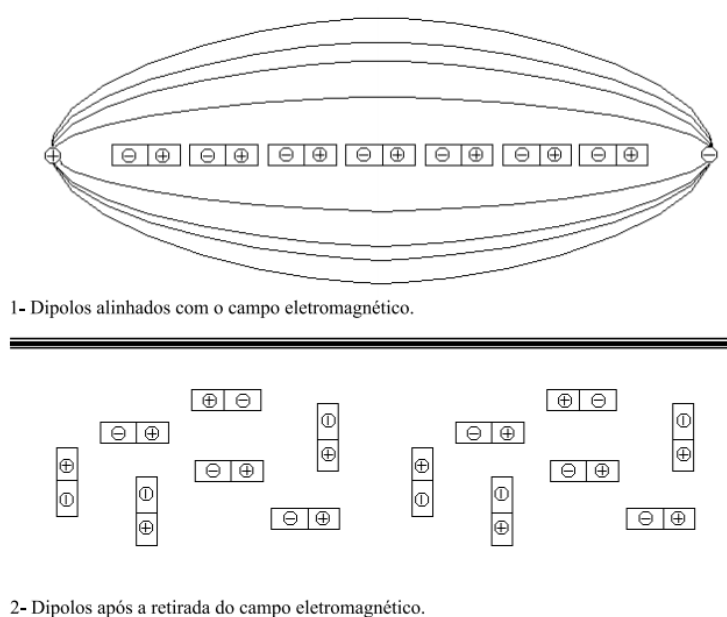
- As taxas de aquecimento em uma reação onde alguma substância (solvente ou um reagente) absorva micro-ondas são muito maiores que os convencionais;
- O reator ou recipiente da reação pode ser transparente à micro-ondas, então a energia é absorvida somente pelos reagentes ou solvente (ou até seletivamente por apenas um dos constituintes da reação);
- A energia é transferida diretamente para a amostra não havendo contato físico com a fonte de aquecimento;
- Possibilidade de maiores rendimentos, maior seletividade e menor decomposição térmica.
- Possibilidade do não uso de solventes ou pouco solvente em reações, seguindo os princípios da química verde;
- Reagentes sólidos podem ser fundidos com o aquecimento ou solubilizados em água apresentando ótimos rendimentos.

O método de micro-ondas se destaca dos outros métodos por que possui mecanismos que aquecimento diferentes que transformam a energia eletromagnética em calor.

O primeiro deles é chamado rotação de dipolo e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Estes movimentos das moléculas excitadas perturbam as

outras moléculas, não excitadas, de modo que o conjunto é aquecido através das colisões geradas. O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado através de perdas por fricção, que acontecem através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético (figura 10) (BRAGA, 2012; SANSEVERINO, 2002).

**Figura 10.** Mecanismos de aquecimento por micro-ondas.



**Fonte:** adaptado de SANSEVERINO (2002).

Trabalhos como os de Sanseverino (2002), Leadbeater (2014) e Wathey (2002) relatam o potencial do uso de micro-ondas em sínteses orgânicas. O método releva um ganho não apenas no tempo reacional mas também em termos de rendimentos quando comparados com o método tradicional de aquecimento. A possibilidade de sínteses de novos compostos ou compostos já existentes em tempos mais curtos, uso de pouco ou nenhum solvente e em alguns casos uma maior seletividade induzida por micro-ondas são algumas das grandes

contribuições abordadas nesses trabalhos. Reações de acoplamentos, funcionalização, cicloadições (Diels-Alder), rearranjos (Claisen; Newman-Kart), sínteses orgânicas em fase solidas e condensações são citadas por Leadbeater (Leadbeater, 2014). O uso de reatores possibilita ainda reações usando catalisadores e gás inerte. Além disso, a possibilidade de reações seguras a altas pressões é mais uma das vantagens que esse método possui (LEADBEATER, 2014; SANSEVERINO, 2002; WATHEY, 2002).

A síntese de 28 derivados N-acilidrazonas com rendimentos entre 87 e 95% é relatada por Ahmad e colaboradores (AHMAD, 2011). Quando comparado os tempos reacionais entre o método assistido por micro-ondas e o método convencional as reações sob micro-ondas foram mais eficazes com uma redução de 6 a 8 horas de tempo reacional para poucos minutos. Não apenas uma redução no tempo de reação, mas também um ligeiro aumento nas taxas de rendimento pode ser observado entre os dois métodos.

Reddy e colaboradores (2007) relatam vantagens significativas utilizando micro-ondas na síntese de oito derivados N-acilidrazônicos. Notou-se diminuição drástica nos tempos reacionais que chegavam a 13 horas em reações convencionais e que com o uso do micro-ondas reduziram para no máximo 2,5 minutos. Houve não apenas um ganho no tempo de reação mais também uma diminuição notável no uso de solventes orgânicos prejudiciais para o ambiente.

As N-acilidrazonas sintetizadas nesse trabalho possuem grupos substituintes ligados aos anéis aromáticos. A introdução de grupos com diferentes perfis de contribuição estereoeletrônica se mostra importante na síntese de novos compostos. A natureza dos grupos substituintes foi eleita em função de suas propriedades eletrônicas e hidrofóbicas, de maneira a permitir que se avaliasse suas distintas contribuições para o perfil de atividade desejado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Planejar, sintetizar e avaliar a atividade antineoplásica de análogos de N-acilidrazona.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Planejar a série de compostos a ser sintetizada baseando no método de similaridade estrutural.
- Sintetizar os compostos.
- Avaliar a atividade antineoplásica dos compostos obtidos.
- Realizar ensaios de *docking* para determinar o modo de interação dos compostos que apresentam atividade com a proteína hnRNP K.

## 4 METODOLOGIA

A Tabela 3 contém equipamentos, fórmulas químicas e o grau de pureza dos reagentes utilizados.

### 4.1 Reagentes utilizados para a síntese das N-acilidrazonas

**Tabela 3.** Equipamentos, fórmula química e grau de pureza dos compostos utilizados.

Reagente e Equipamentos	Formula química	Marca/Grau de pureza
3,4,5 -Trimetoxibenzaldeído	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Acros organics 99%
4-Metilbenzaldeído	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	Sigma aldrich 98%
4-Metoxibenzaldeído	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Sigma aldrich 98%
4-Hidroxibenzaldeído	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Sigma aldrich 98%
4-Etilbenzaldeído	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	Sigma aldrich 98%
4-Clorobenzaldeído	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> ClO	Sigma aldrich 98%
Benzaldeído	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	Acros Organics 99%
3,5-Dimetoxi,4-hidroxibenzaldeído	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Sigma aldrich 98%
4-Hidroxi-acidobenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Sigma aldrich 99%
Brometo de benzila	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br	Sigma aldrich 99%
1-(bromometil)-3-fluorobenzeno	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> BrF	Sigma aldrich 99%
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	Dinâmica P.A
Hidrazina 80%	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Merk
Ácido clorídrico	HCl	Merk p.a
Carbonato de potássio	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Synth
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Merk P.A
Ácido sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Synth
Acetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Dinâmica PA
IV	----	PerkinElmer
RMN	----	Bruker
CG/EM	----	PerkinElmer
Rota-evaporador	----	IKA
Chemidoc XRS	----	Bio-rad

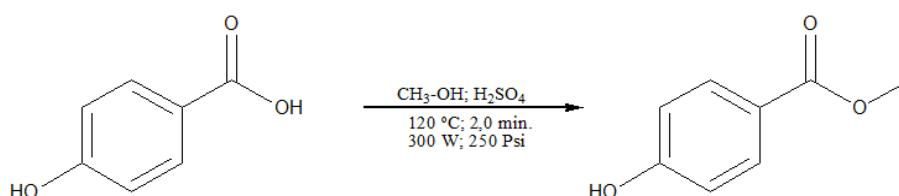
## 4.2 Síntese de análogos

Todas as sínteses foram realizadas nos laboratórios de enzimologia e análise instrumental da Universidade Estadual de Goiás.

### 4.2.1 Síntese do composto metil 4-hidroxibenzoato

Para a síntese do metil 4-hidroxibenzoato, foram adicionados em um tubo de reação cinco gramas de 4-hidroxi ácido benzoico, com 8 mL de metanol e gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. A mistura foi aquecida em reator de micro-ondas Discover DC-7196, marca CEM Corporation por 2,0 minutos a  $120^\circ\text{C}$ . A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e após verificar formação do produto a reação foi resfriada e o solvente removido por sistema de rota- evaporação a vácuo usando evaporador rotativo da IKA, modelo RV10 DS40 (Esquema 4). Rendimento: 98%.

**Esquema 4:** Síntese do metil 4-hidroxibenzoato.

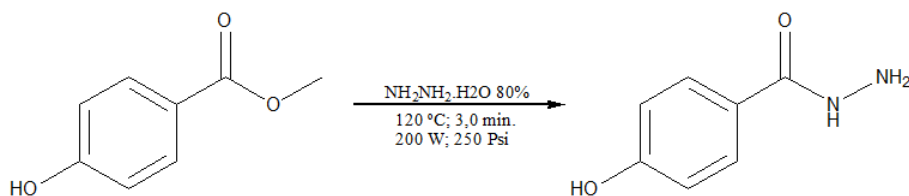


Formula molecular:  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$  ( $152,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

### 4.2.2 Síntese do composto 4-Hidroxibenzohidrazida

Para a síntese do 4-Hidroxibenzohidrazida, foram adicionados em um tubo de reação quatro gramas de metil 4-hidroxibenzoato. Em seguida, foi adicionado ao tubo de reação 2 mL de  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  80%. A mistura foi aquecida em reator de micro-ondas em dois ciclos de 1,5 minutos a  $120^\circ\text{C}$ . A reação foi acompanhada por CCD e após verificar formação do produto foi resfriada e o precipitado filtrado e lavado com  $\text{H}_2\text{O}$  gelada (Esquema 5). Rendimento: 68%.

**Esquema 5:** Síntese da 4-Hidroxibenzohidrazida.

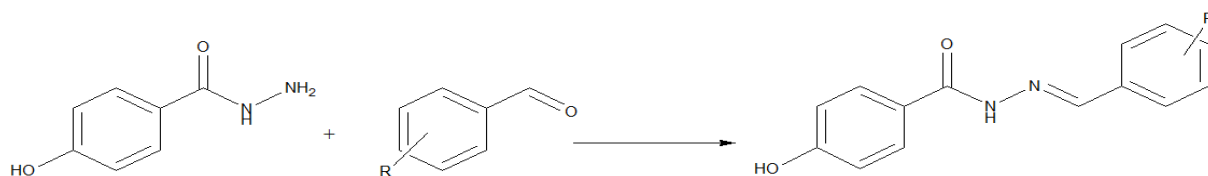


Formula molecular:  $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$  ( $152,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

### 4.2.3 Síntese de N-acilidrazonas

#### Procedimento para síntese da série A

Para a síntese da série **A**, um mmol de 4-Hidroxibenzohidrazida foi adicionado em 2 mL de metanol, seguido pela adição de um mmol de um benzaldeído substituído e uma gota de  $\text{HCl}_{\text{conc}}$ . A mistura foi aquecida em Reator de micro-ondas em dois ciclos de 1,5 min a  $150^\circ\text{C}$ . A reação foi acompanhada por CCD e após verificar formação do produto a reação foi resfriada e o solvente removido por sistema de rota-evaporação a vácuo (Esquema 6).

**Esquema 6: Síntese da série A.**

Para a série A, R:

4-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**6**)

4-CH<sub>3</sub> (**11**)

3,4,5-OCH<sub>3</sub> (**12**)

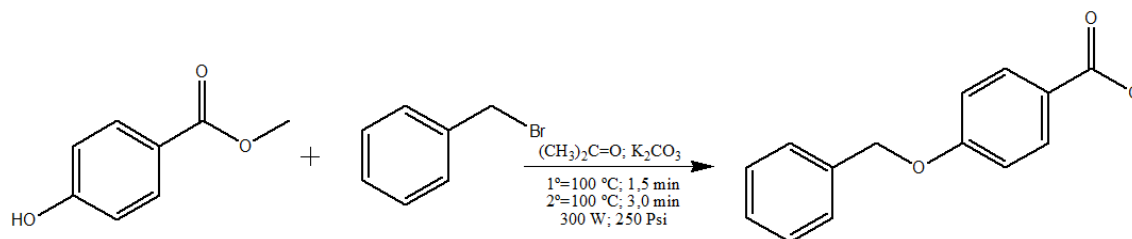
### Procedimento para síntese da série B (4-9)

Os compostos da série B foram preparados em três etapas.

1º Etapa- síntese do composto metil 4-(benziloxi)-benzoato:

Na primeira etapa, 4 gramas de metil 4-hidroxibenzoato foram solubilizados em 6 mL de acetona e adicionados em um tubo de reação. Em seguida, quantidades equimolares de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foram adicionadas a solução. A mistura foi aquecida em reator de micro-ondas por 1,5 minutos a 100°C. Posteriormente, foram adicionados no tubo de reação quantidades equimolares de brometo de benzila. A mistura foi novamente aquecida em reator de micro-ondas em dois ciclos de 1,5 min a 100 °C. A reação foi acompanhada por CCD e após verificar formação do produto a reação foi resfriada e o solvente foi removido por sistema de rota-evaporação a vácuo (Esquema 7). Rendimento: 60%.

**Esquema 7: Síntese do metil 4-(benziloxi)benzoato**

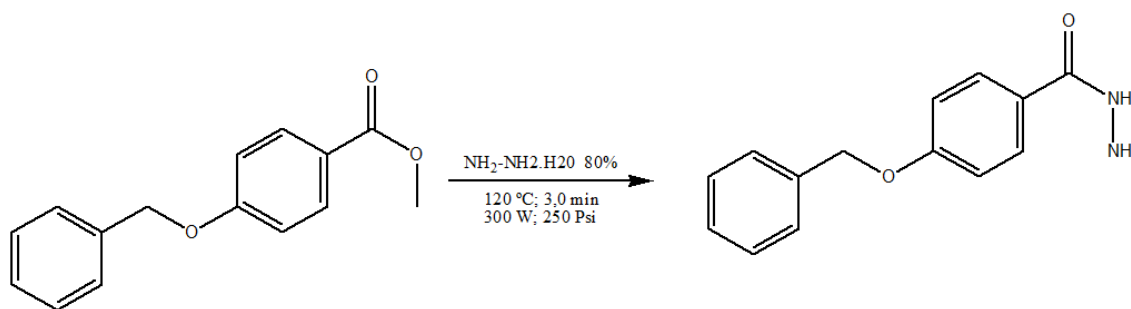


Formula molecular:  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$  ( $242,26\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

**2º Etapa- síntese do composto 4-(benziloxi) benzohidrazida**

Na segunda etapa, dois gamas de metil 4-(benziloxi)-benzoato foram adicionados em um tubo de reação. Em seguida, foi adicionado 2 mL de  $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  80%. A mistura foi aquecida em reator de micro-ondas em dois ciclos de 1,5 minutos a  $120^\circ\text{C}$ . A reação foi acompanhada por CCD e após verificar formação do produto a reação foi resfriada e o precipitado filtrado e lavado com  $\text{H}_2\text{O}$  gelada (Esquema 8). Rendimento: 58%.

**Esquema 8: Síntese do 4-(benziloxi)-benzohidrazida**

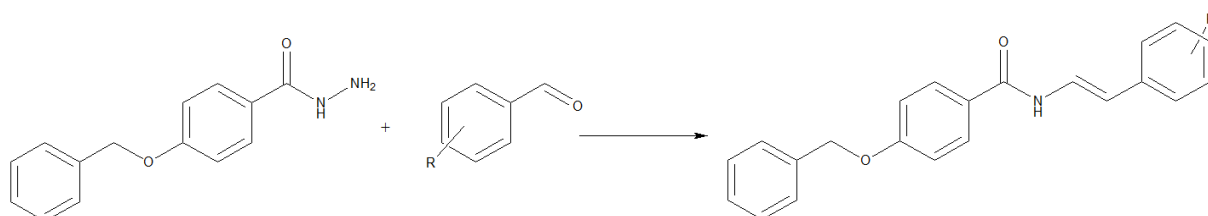


Formula molecular:  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $242,26\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

### 3º etapa- síntese das N-acilidrazonas

Na terceira etapa, um mmol de 4-(benziloxi) benzohidrazida foi adicionado em 2 mL de metanol, seguido pela adição de um mmol de um benzaldeído substituído e uma gota de  $\text{HCl}_{\text{conc}}$ . A mistura foi aquecida em reator de micro-ondas em dois ciclos de 1,5 min a 150 °C. A reação foi acompanhada por CCD e após verificar a formação do produto a reação foi resfriada e o solvente removido por sistema de rota-evaporação a vácuo (Esquema 9).

**Esquema 9:** Síntese da série B.



Para a série B, R:

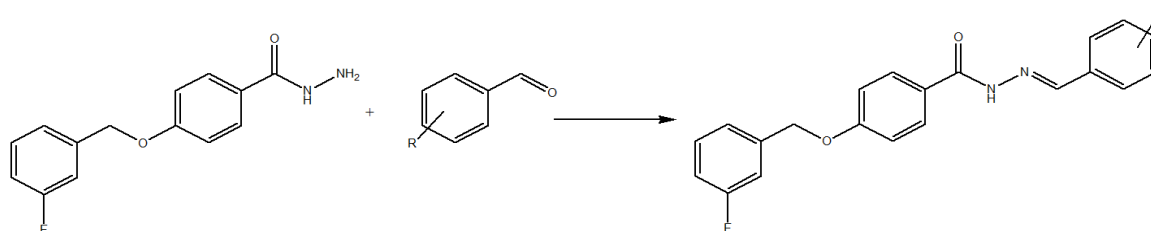
3,4,5-OCH <sub>3</sub> (1)	4-CH <sub>3</sub> (2)
4-Piridina (3)	4-OCH <sub>3</sub> (4)
4-OH (5)	4-Cl (7)

### Procedimento para síntese da série C (10-14)

Para síntese da série C foi realizada uma modificação na primeira etapa descrita na série B na qual o brometo de benzila foi substituído por 1-(bromometil)-3-fluor-benzeno, com essa modificação foi formado ao final da segunda etapa o composto 4-[(3-fluorobenzil)oxi] benzohidrazida. Em seguida, um mmol de 4-[(3-fluorobenzil)oxi] benzohidrazida foi adicionado em 2 mL de metanol, seguido pela adição de um mmol de um benzaldeído substituído e uma gota de  $\text{HCl}_{\text{conc}}$ . A mistura foi aquecida em Reator de micro-ondas em dois

ciclos de 1,5 min a 150 °C. A reação foi acompanhada por CCD e após verificar formação do produto a reação foi resfriada e o solvente removido por sistema de rota-evaporação a vácuo (Esquema 9).

**Esquema 10:** Síntese da série C.



Para a série C, R:

- |                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 4-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (8) | 4-H (9)   |
| 4-OH- 3,5-OCH <sub>3</sub> (10)       | 4-OH (13) |
| 4-OCH <sub>3</sub> (14)               |           |

### 4.3 Ensaios de ligação com a proteína hnRNP K humana.

#### 4.3.1 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA)

##### 4.3.1.1 Preparação do gel de poliacrilamida DNA 7%

Cada gel de poliacrilamida foi preparado adicionando-se 10,02 mL de H<sub>2</sub>O mili-Q autoclavada, 4,2 mL de acrilamida a 30%, 3,6 mL de tampão TBE\* 5X, 1,8 mL de glicerol 100%, 180 µL de persulfato de amônio e 18 µL de TEMED. A solução preparada foi adicionada rapidamente ao sistema de placas de vidro, previamente montado e mantido em repouso até a polimerização do gel.

\*Tampão TBE 5X: 13,5 g Tris base, 6,87 g ácido bórico, 5 mL de EDTA (0,5 molar, pH 0,8). Completar o volume para 250 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

### 4.3.1.2 Preparação das amostras

As reações com os compostos foram preparadas com a adição de 1,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo CT2-30 (67,5 ng), 1,5  $\mu\text{L}$  da proteína hnRNP K purificada (645 ng), 1,0  $\mu\text{L}$  de cada composto em sua respectiva concentração, 2  $\mu\text{L}$  do tampão de ligação EMSA\*\* 5X e 4  $\mu\text{L}$  de água de mili-Q. O controle da reação oligonucleotídeo-proteína foi preparado com a adição 1,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo CT2-30, 1,5  $\mu\text{L}$  da proteína hnRNP K purificada, 2  $\mu\text{L}$  do tampão de ligação EMSA 5X e 5  $\mu\text{L}$  de água de mili-Q. O controle da proteína foi preparado com a adição de 1,5  $\mu\text{L}$  da proteína hnRNP K purificada, 2  $\mu\text{L}$  do tampão de ligação EMSA 5X e 6,5  $\mu\text{L}$  de água de mili-Q. Em seguida, as reações foram incubadas por 20 minutos.

\*\*Tampão EMSA 5X: 750 mM de KCl, 50 mM de EDTA, 50 mM de Tris em pH 7,4 e 0,5 mM de DTT (ditiotretitol). Adicionados somente quando as reações forem transferidas para a placa.

### 4.3.1.3 Ensaio

Após a polimerização do gel, as placas foram transferidas para a cuba de eletroforese. Em seguida, o tampão de EMSA 5X foi adicionado em cada reação mais os controles e posteriormente, foram transferidos para diferentes canaletas no gel, sendo que a primeira canaleta do gel B fora preenchida com o peso molecular. A cuba então foi imersa em tampão de corrida TBE 1X e submetida a uma voltagem de 90 V durante 80 minutos.

#### 4.3.1.4 Revelação do gel

Após o fim do ensaio, o gel foi retirado da cuba e imerso em uma solução de 50 mL de TBE 1X contendo 5  $\mu$ L de SYBR gold. O gel foi mantido em agitação por 20 minutos e, por fim, revelado em luz ultravioleta no aparelho Chemidoc XRS (Bio-rad).

#### 4.4 Docking

Inicialmente os compostos foram desenhados utilizando o software Chemdraw ultra 8.0. Posteriormente, as estruturas 3D e as cargas foram geradas usando o programa Discovery Studio 3.5 Client e salvas no formato mol2.

A estrutura do domínio KH3 da proteína hnRNP K foi obtida através do *Protein Data Bank* (PDB), com o código 1J5K.

Os estudos de *docking* foram realizados no Laboratório Computacional de Química Farmacêutica (LCQF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP), em colaboração com o prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva. A análise dos resultados foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Vinicius Barreto da Silva.

As simulações de docking foram realizadas com o software Gold 5.2.2 (VERDONK *et al*, 2003). Dentre os parâmetros disponíveis para o programa, foi utilizada uma população equivalentes a 100 conformeros, 10.000 operações, 95 mutações e 95 crossovers. Os cálculos de docking foram realizados dentro de uma esfera de 12 angstroms, tendo como centro de origem as orientações X=20.665, Y=26.06, Z=27,39. A estrutura do domínio KH3 proteína hnRNP K foi resolvida por RMN e as orientações de seus átomos de hidrogênio foram consideradas para realização das simulações.

As 10 melhores poses de maior escore para cada composto foram selecionadas através da função chemPLP. Essa função classifica as orientações das moléculas avaliadas de acordo com um padrão de afinidade (escore), do ponto de vista de estabilidade energética, em relação ao sítio ligante da proteína. Os resultados do docking foram visualizados e analisados usando o software PyMOL v0.99.

#### **4.5 Métodos analíticos**

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 160 HF254 da Merck, visualizando em luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  e  $360$  nm) e usando iodo como agente revelador. As reações também foram acompanhadas por cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas (CG/EM) em equipamento QP-2010 Ultra da SHIMADZU.

Quando necessária, a purificação dos compostos foi realizada por recristalização e separação por coluna cromatográfica, utilizando sistemas de solventes em proporções diferentes (9:1, 8:2, 7:3 e 6:4) de HEX/Ac. Etila. Além disso, foi determinada a faixa de fusão dos compostos usando aparelho Microquímica MQAPF-301.

#### **4.6 Elucidação das estruturas**

Para confirmar a estrutura dos compostos foram utilizadas técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ), espectrometria de massas (EM) e Infravermelho (IV).

As análises de RMN foram realizadas no laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião.

Os espectros foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance 500 operando a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), com DMSO- $d_6$  como solvente. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS). A visualização dos espectros foi realizada por meio dos programas ACD LABS 12.0 e Mestrenova 10.0.1.

Os espectros de massas e infravermelho foram obtidos no laboratório de análise instrumental da Universidade Estadual de Goiás em CG/EM. As amostras para análise CG/EM de foram solubilizadas em metanol.

Os espectros no infravermelho foram obtidos a partir de pastilhas de KBr em equipamento FT-IR PERKIN-ELMER modelo Spectrum frontier. Os dados foram transportados em formato ASCII pelo programa Origin<sup>TM</sup> versão 8.6.

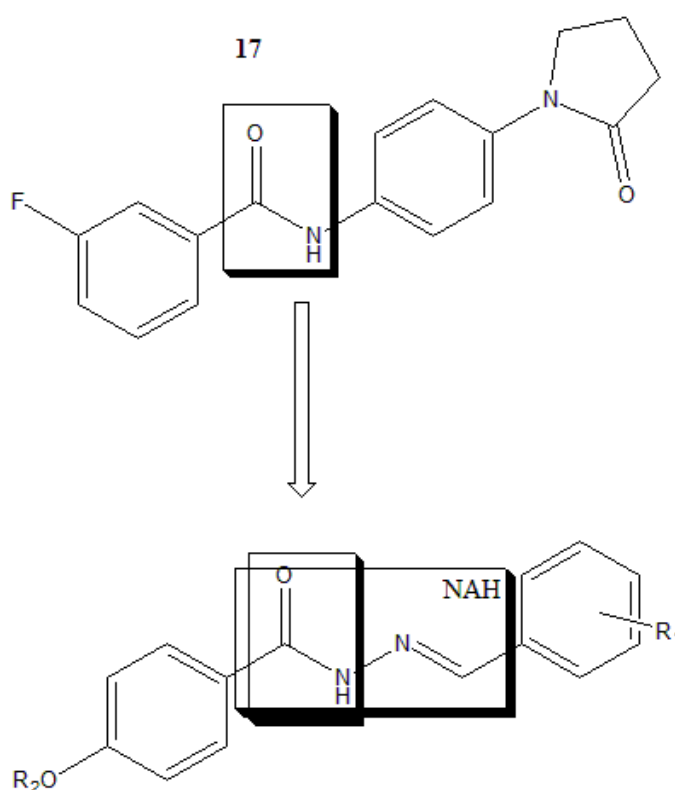
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Planejamento de novos compostos.

A necessidade de novos compostos com estruturas capazes de realizarem interações com o domínio KH3 da proteína hnRNP K levaram ao planejamento, síntese e avaliação da atividade antineoplásica de uma série de N-acilidrazonas.

Esses compostos foram planejados, com base na estratégia de similaridade estrutural, a partir da estrutura do composto **17**, composto identificado como ligante do domínio KH3 da proteína hnRNP K (Figura **11**).

**Figura 11:** Planejamento de N-acilidrazonas por similaridade estrutural com o composto **17**.



Analisando a estrutura do composto **17** é possível perceber a presença de estruturas cíclicas e espaçadores polares entres os anéis, capazes de realizar interações com o sítio receptor. Esse padrão estrutural mimetiza os anéis nucleotídicos de pirimidina com espaçadores que contem grupos fosfato, como, por exemplo, na sequência oligonucleotídica TCCC.

O planejamento e a síntese de derivados N-acilidrazônicos (NAH) é de grande interesse para a área de planejamento de fármacos. A presença de funções do tipo carbonílicos  $\alpha\beta$ -insaturados e azometina (N=C), ambas ligados a anéis aromáticos, torna esses compostos interessantes. Frequentes relatos de atividades farmacológicas, tais como ação antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, anticonvulsante, analgésica, anti-inflamatória e antiproliferativa de células tumorais estão relacionadas a presença desses grupos funcionais (BARREIRO, 2002; COCCO, 2006; KÜÇÜKGÜZEL, 2003; METWALLY, 2006; ROMEIRO *et al.*, 2009; SAVINI *et al.*, 2004; VARACHE-LEMBE, 2002; VOGEL *et al.*, 2008).

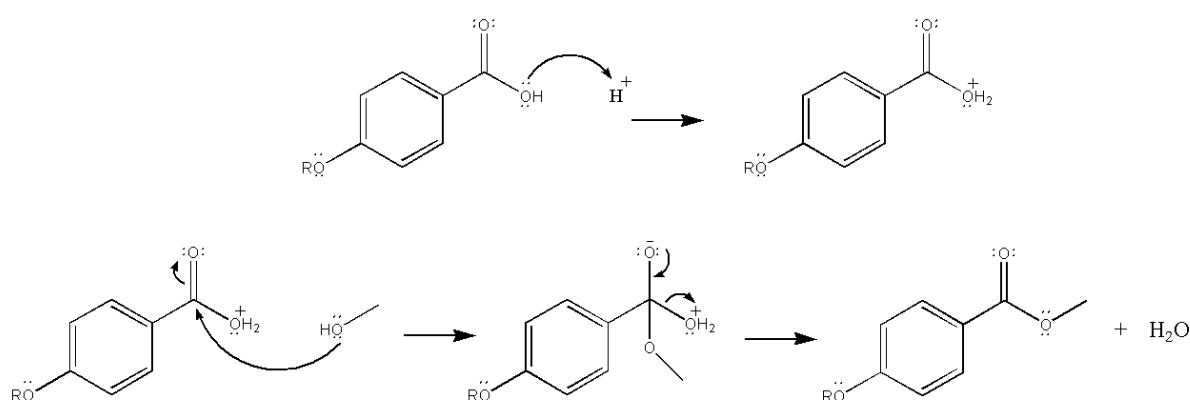
### 5.1.1 Síntese de análogos N-acilidrazônicos

Foram sintetizadas 14 N-acilidrazonas com diferentes grupos substituintes. Os compostos foram divididos em três séries. Na primeira, a função hidroxila foi fixada em um dos anéis e variou-se os grupos substituintes do segundo anel. Na segunda, houve a inserção de um terceiro anel na estrutura e variou-se os grupos substituintes no segundo anel. Na terceira série, o terceiro anel inserido na estrutura da N-acilidrazona possui um átomo de flúor na posição *meta*, nessa etapa também variou-se os grupos substituintes no segundo anel.

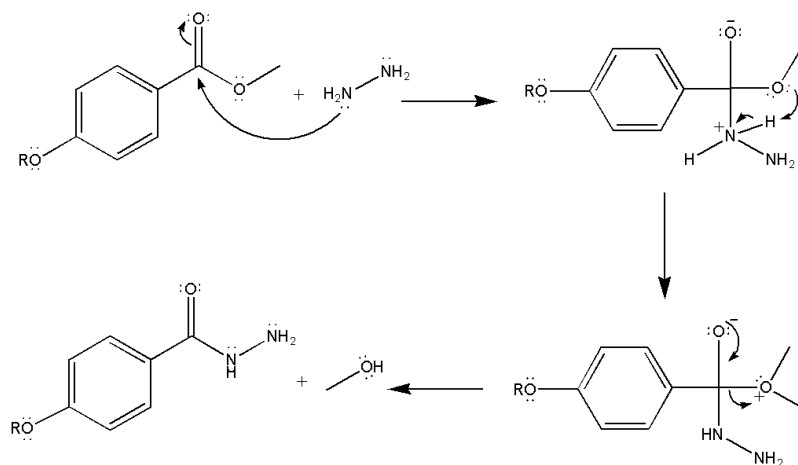
### 5.1.1.1 Síntese das N-acilidrazonas

Conforme demonstrado no esquema **11**, essa reação ocorre entre o grupo hidroxila do ácido carboxílico e o álcool metílico usado como solvente em meio ácido, gerando um grupo éster na molécula. Essa reação é realizada para evitar que essa hidroxila reaja com outros compostos gerando subprodutos como, por exemplo, ésteres oriundos da reação de haletos de alquila com o ácido carboxílico.

**Esquema 11:** Proteção do grupo hidroxila do ácido carboxílico.

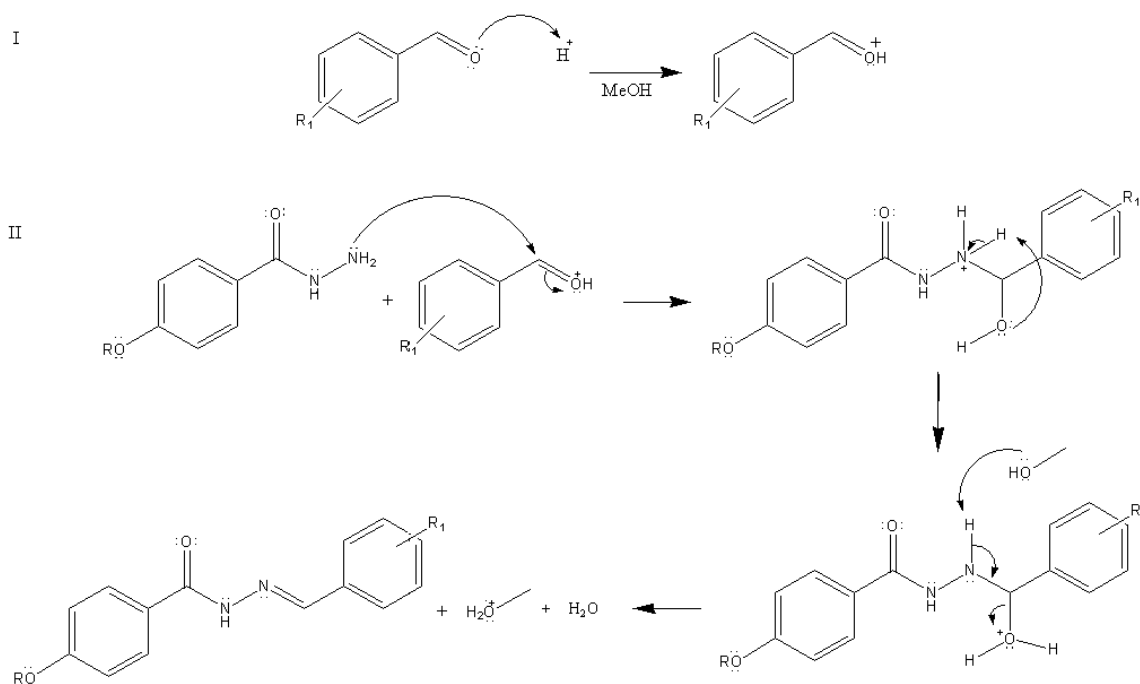


O esquema **12** mostra a segunda etapa da síntese, nessa etapa ocorre a hidrazinólise do grupo éster com hidrato de hidrazina (NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 80%), levando a formação da hidrazida. Essa reação se desenvolveu sem a presença de solvente ou catalisador. Reações de hidrazinólise podem ser desenvolvidas em uma ampla variedade de solventes orgânicos sendo relatadas em meio aquoso com condições favorecidas pelo uso de micro-ondas (CACHIBA *et al.*, 2012).

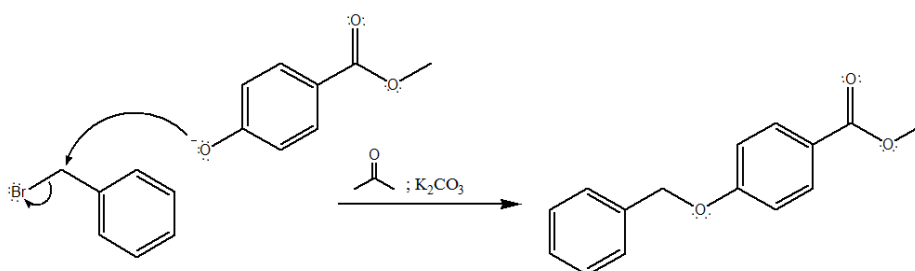
**Esquema 12:** Reação de hidrazinólise.

Na terceira etapa da síntese (esquema **13**), a hidrazida formada foi condensada com diferentes benzaldeídos substituídos, levando a formação de N-acilidrazonas com diferentes grupos substituintes.

**Esquema 13.** Mecanismo de síntese de N-acilidrazonas via condensação entre benzaldeídos substituídos e hidrazidas.



O esquema **14** mostra a etapa da síntese onde há a inserção do terceiro anel na estrutura da hidrazida. Nessa etapa, foi utilizada uma síntese de Williamson para formação do éter. Essa reação ocorre entre um haleto de alquila primário e um íon alcóxido preparado antes da reação com a adição de  $K_2CO_3$  ao meio reacional. Essa etapa da reação foi realizada antes da etapa de hidrazinólise pois o solvente utilizado possui um grupo carbonila e pode reagir com a hidrazina, levando a formação de subprodutos no meio reacional. Reações de síntese de éteres de Williamson são largamente usadas tanto em sínteses laboratoriais quanto em industriais, sendo o método mais simples e popular para obtenção de éter.

**Esquema 14:** Síntese de Williamson para formação do éter.*Síntese da série A (1-3):*

Para a síntese da série A, foram utilizadas quantidades equimolares da hidrazida e benzaldeídos substituídos conforme descrito no procedimento para síntese da série A. As taxas de conversão, obtidos por CG/EM, são apresentados na tabela 4.

**Tabela 4:** Compostos formados na série A e suas respectivas porcentagens de conversão.

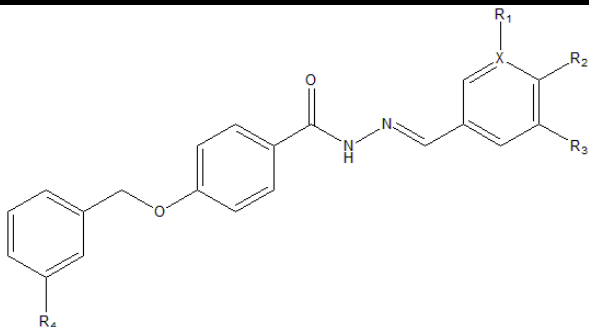
Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X	% Conversão
<b>6</b>	MeO-	MeO-	MeO-	H	CH	*
<b>11</b>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH	*
<b>12</b>	H	CH <sub>3</sub> - CH <sub>2</sub> -	H	H	CH	*

\*CG/EM não disponível devido à baixa solubilidade do composto em solventes que podem ser usados na injeção de amostras no equipamento.

### Síntese da série B (4-9):

Para a síntese da série B, foram utilizadas quantidades equimolares da hidrazida sintetizada e benzaldeídos substituídos conforme descrito no procedimento para síntese da série B. As taxas de conversão, obtidos por CG/EM, são apresentados na tabela 5.

**Tabela 5:** Compostos formados na série B e suas respectivas porcentagens de conversão.



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X	% Conversão
7	H	Cl	H	H	CH	32,30
5	H	OH	H	H	CH	45,30
2	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH	42,40
1	MeO-	MeO-	MeO-	H	CH	*
3	H	H	H	H	N	42,40
4	H	MeO-	H	H	CH	41,66

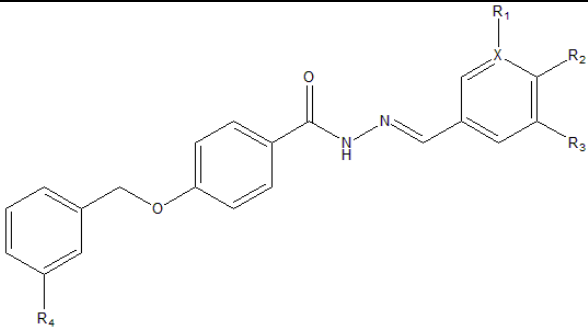
\* CG/EM não disponível devido à baixa solubilidade do composto em solventes que podem ser usados na injeção de amostras no equipamento.

### Síntese da série C (10-14):

Para a síntese da série C, foram utilizadas quantidades equimolares da hidrazida e benzaldeídos substituídos conforme descrito no procedimento para

síntese da série C. As taxas de conversão, obtidos por CG/EM, são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6:** Composto formado na série C.



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X	% Conversão
8	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -	H	F	CH	*
9	H	H	H	F	H	34,42
10	MeO-	HO-	MeO-	F	CH	*
13	H	HO-	H	F	CH	*
14	H	CH <sub>3</sub> O-	H	F	CH	*

\* CG/EM não disponível devido à baixa solubilidade do composto em solventes que podem ser usados na injeção de amostras no equipamento.

De forma geral, a série B apresentou maiores percentuais de conversão quando comparada com a série C. Pode-se notar que a presença de grupos substituintes doadores de elétrons influencia a reação entre os reagentes de partida gerando produtos com maiores percentagens de conversão. Quando esses grupos doadores são substituídos por grupos cujo esse efeito é menor há uma redução na percentagem de conversão.

A presença do grupo flúor na estrutura também parece diminuir a reatividade dos reagentes. Esse fato se nota quando se avalia a percentagem de conversão entre as séries. A presença do grupo flúor na posição *meta* nos

compostos da série C parece diminuir a reatividade dos compostos levando a diminuição na conversão dos reagentes.

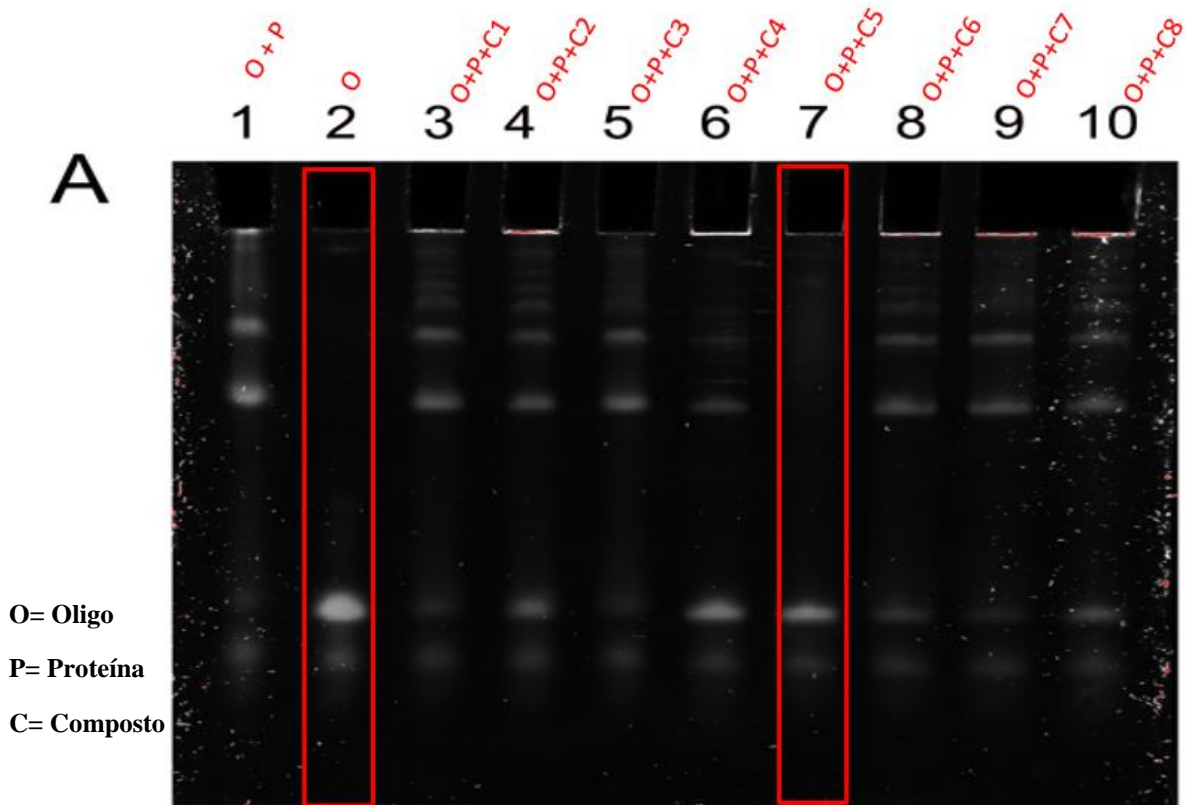
## **5.2 Ensaios in vitro de ligação da proteína hnRNP K humana recombinante purificada com DNA fita simples**

Inicialmente foi realizada uma varredura com os 14 compostos para verificar quais compostos apresentavam capacidade de ligar-se a proteína hnRNP K e impedir a ligação natural da proteína ao DNA fita simples (oligonucleotídeo). O ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) foi utilizado para testar a interação proteína-DNA na presença dos compostos. O protocolo de EMSA foi o mesmo descrito por Almeida e colaboradores (ALMEIDA *et al.*, 2014). A mudança na mobilidade eletroforética do oligonucleotídeo em gel de poliacrilamida se altera quando há ligação da proteína ao ácido nucléico (LIN & BARBOSA, 2002). Os ensaios de ligação com a proteína hnRNP K purificada, foram realizados no laboratório de “Marcadores moleculares, sinalização celular e alvos terapêuticos no câncer” da FCFRP/USP, em colaboração com a Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino e com a aluna de doutorado Renata Nishida Goto.

O gel A (Figura 12) apresenta as reações de ligação da proteína hnRNP K com o DNA fita simples (ssDNA) na presença dos compostos de 1 a 8. A canaleta 1 demonstra a reação entre a proteína hnRNP K com o oligonucleotídeo específico (controle positivo). Nota-se que a formação do complexo oligonucleotídeo-proteína (hnRNP K-ssDNA) leva ao aparecimento de uma banda retida na região superior da canaleta no gel. Na canaleta 2, onde há apenas o oligonucleotídeo livre a banda aparece na região inferior da canaleta. O complexo oligonucleotídeo-proteína formado apresenta, em geral, uma mobilidade eletroforética mais lenta

quando comparada com o a mobilidade do oligonucleotídeo livre (LIN E BARBOSA, 2002). No ensaio de mobilidade eletroforética nota-se que no gel **A**, apenas na canaleta 7 (Composto **5**) foi verificado um perfil de mobilidade semelhante ao da canaleta 2, evidenciando que o composto **5** foi capaz de se ligar a proteína hnRNP K, impedindo a formação do complexo hnRNP K-ssDNA, deixando o oligonucleotídeo livre. Para os demais compostos (canaletas 3-6; 8-10) foi verificada a formação de banda no gel com as mesmas características da banda evidenciada na canaleta 1.

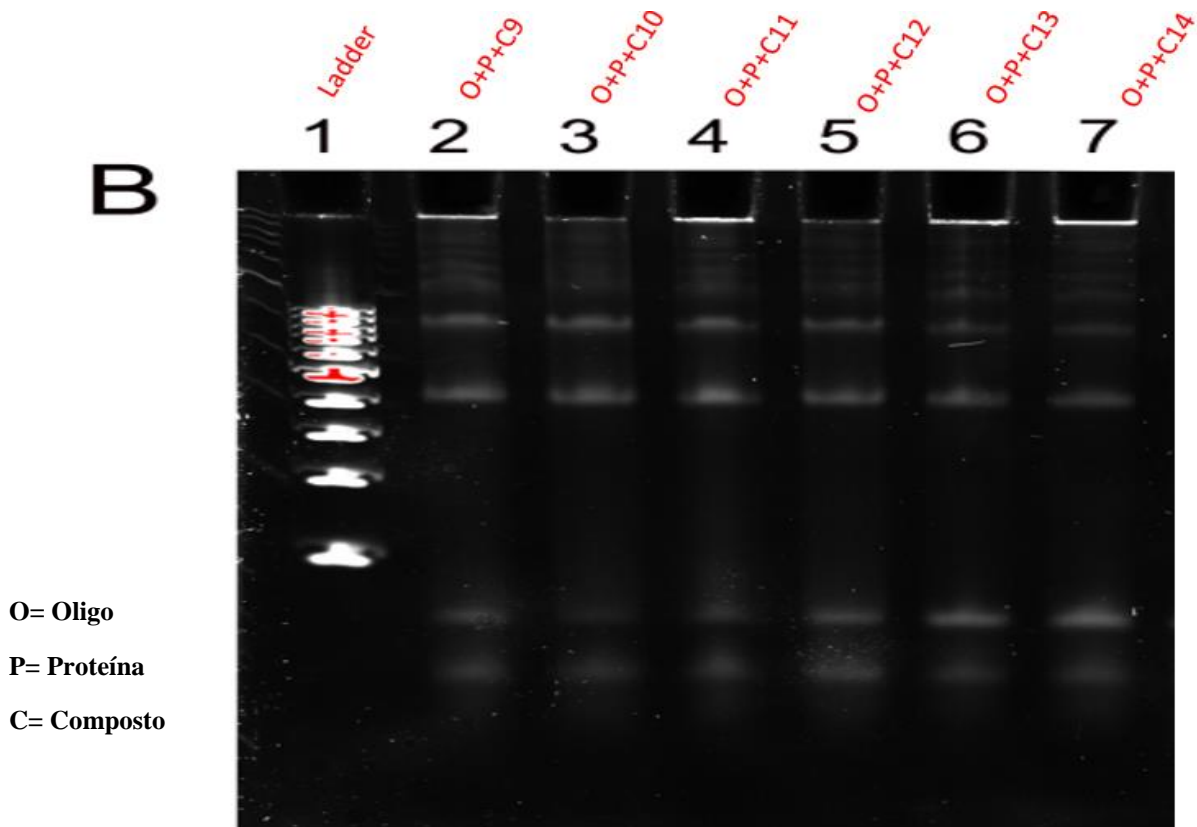
**Figura 12:** Gel A: ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e composto.



Legenda: **Gel A:** Canaletas 1- oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu\text{L}/67,5\text{ng}$ ) + hnRNP K (1,5  $\mu\text{L}/645\text{ng}$ ); 2- oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu\text{L}/67,5\text{ng}$ ); 3 a 10- compostos 1-8 (5 mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu\text{L}/67,5\text{ng}$ ) + hnRNP K (1,5  $\mu\text{L}/645\text{ng}$ ). A visualização das bandas de DNA (oligonucleotídeo) foi feita usando o dye SYBR®Gold (uma molécula que se liga ao DNA fita simples e quando excitado pela luz UV emite fluorescência na cor verde).

O gel **B** (Figura 13) apresenta as reações de ligação proteína hnRNP K-ssDNA com os compostos de **9** a **14**. Na canaleta 1 foi adicionado o marcador de peso molecular (*ladder*: 100 pares de bases). Marcadores de peso molecular são fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos e variados, que são aplicados em um poço no gel no início do processo para servir de indicador de tamanho para os outros fragmentos do gel. A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação, é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel (CARRILHO, 2009). No gel **B** nenhum dos compostos (Canaletas de 2-8) foi capaz de impedir a formação do complexo hnRNP K-ssDNA. Observa-se o mesmo padrão de bandas na região superior do gel, comparando-se com o mesmo perfil apresentado pelo controle positivo da reação (oligonucleotídeo + proteína hnRNP K) canaleta 1 no gel A.

**Figura 13:** Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e composto.

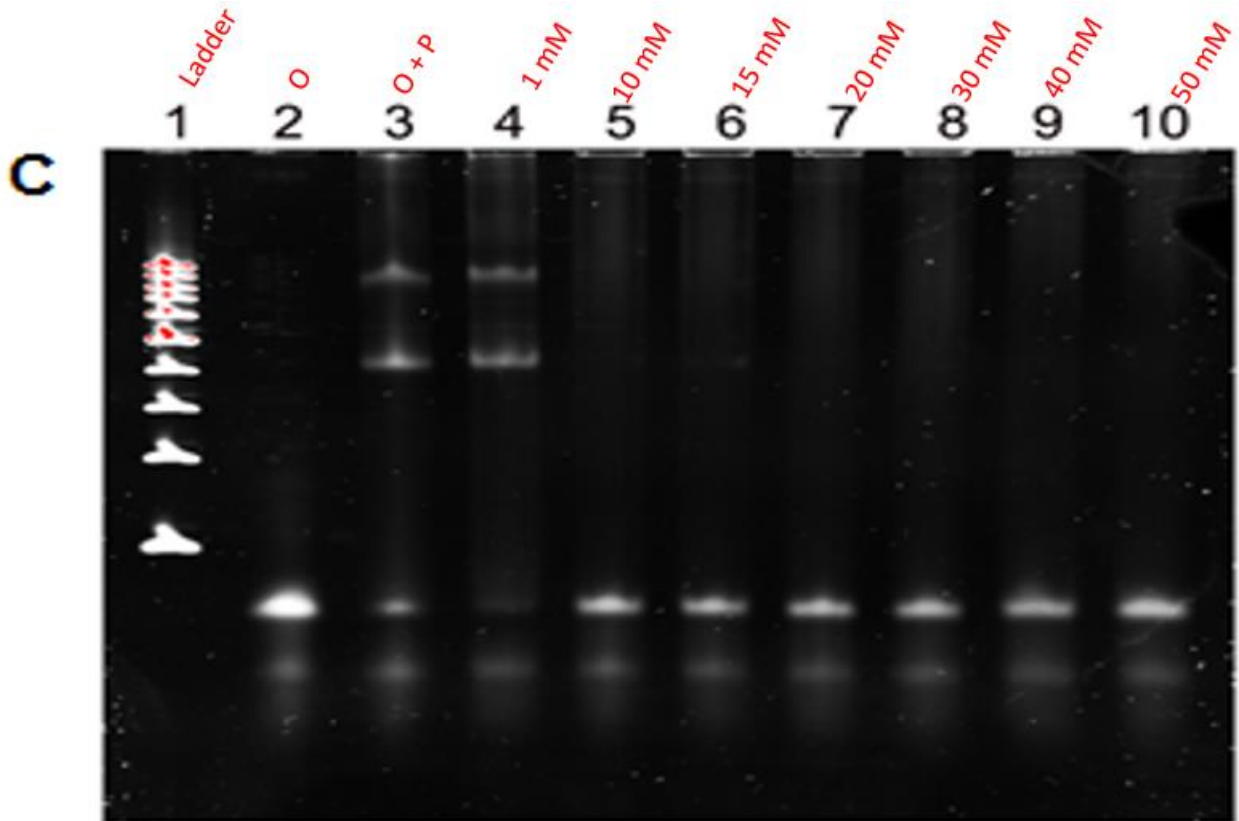


Legenda: **Gel B**: Canaletas 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2 a 7- compostos 9-14 (5 mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5 µL/67,5ng) + hnRNP K (1,5 µL/645ng). A visualização das bandas de DNA (oligonucleotídeo) foi feita usando o dye SYBR®Gold (uma molécula que se liga ao DNA fita simples e quando excitado pela luz UV emite fluorescência na cor verde).

Dos 14 compostos testados, apenas o composto **5** demonstrou ser capaz de impedir a ligação natural da proteína hnRNP K ao oligonucleotídeo e evitar a formação do complexo hnRNP K-ssDNA. Este foi então separado e o ensaio foi novamente realizado variando-se as concentrações do composto selecionado (Figura **14**). Na canaleta 1 foi adicionado o marcador de peso molecular (*ladder*). Na canaleta 2 há apenas o oligonucleotídeo e na canaleta 3 é demonstrada a reação entre a proteína hnRNP K e o oligonucleotídeo (controle positivo). Na presença apenas do composto **5**, em sete concentrações diferentes (Canaletas 4-10), é possível observar uma alteração consistente em relação ao deslocamento e mobilidade do oligonucleotídeo quando na presença deste.

Apenas na canaleta 4, com uma concentração pequena, o composto **5** não foi capaz de impedir a formação do complexo hnRNP K-ssDNA, esse fato é evidente quando se nota a banda localizada na região superior da canaleta. As demais concentrações testadas apresentaram resultados positivos, pois em todas as canaletas a banda foi visualizada somente na região inferior do gel. Estes resultados confirmam que em todas as demais concentrações testadas o composto **5** impediu a formação do complexo hnRNP K-ssDNA. Dessa forma, o composto **5** foi identificado como ligante da proteína hnRNP K *in vitro*.

**Figura 14:** Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e composto.



**O= Oligo**

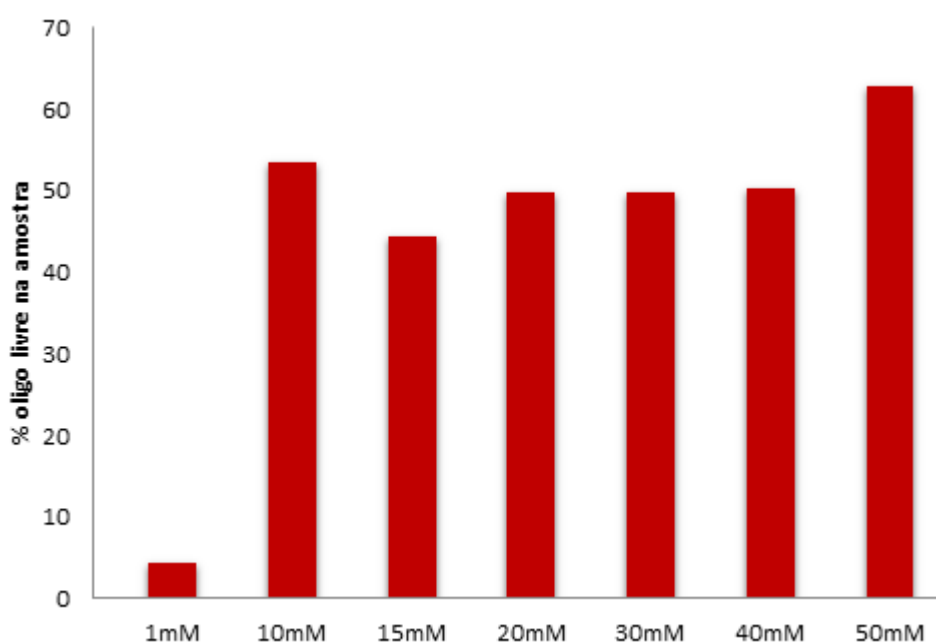
**P= Proteína**

Legenda: **Gel C:** Canaletas 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng); 3- oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng); 4- Composto 5 (100 $\mu$ M) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng); 5- Composto 5 (1mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng); 6- Composto 5 (1,5mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng); 7- Composto 5 (2mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng); 8- Composto 5 (3mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng); 9- Composto 5 (4mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng); 10- Composto 5 (5mM) + oligonucleotídeo CT2-30 (1,5  $\mu$ L/67,5ng) + hnRNP K (1,5  $\mu$ L/645ng).

O gráfico 1 mostra a porcentagem de oligonucleotídeo livre em cada condição testada usando como referência a canaleta 2 (no qual há somente o oligonucleotídeo ssDNA) usando para análise de densitometria a imagem do gel mostrado na figura 13. Este resultado revela que a porcentagem de oligonucleotídeo livre, devido a inibição da proteína hnRNP K pelo composto 5 a

partir de 10 mM, foi de mais de 50%. Este resultado reforça o resultado anterior de que o composto **5** inibe a proteína hnRNP K, impedindo a formação do complexo hnRNP K-ssDNA. Os dados foram gerados por densitometria usando a contagem de pixels em uma pequena área demarcada com o auxílio do programa imageJ, considerado assim um método semi-analítico.

**Gráfico 1.** Relação entre oligonucleotídeo livre após reação com a proteína hnRNP K e oligonucleotídeo livre após a inibição da proteína hnRNP K.



### 5.3 Análise do complexo hnRNP K KH3 – ssDNA.

Partindo da hipótese que o mecanismo de ação ocorra no domínio KH 3, o composto **5** que se mostrou ativo foi selecionado e submetido a ensaios de ligação usando *docking* tendo por objetivo propor um modo de ligação entre a proteína hnRNP K e o ssDNA.

Previamente às simulações de *docking* entre a proteína hnRNP K e o composto **5**, foi realizada a análise visual entre uma sequência específica de um oligonucleotídeo (TCCC) e o domínio KH3 da proteína hnRNP K (Figura **15**). Esta análise tem por objetivo a identificação espacial dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ligante do domínio e assim propor possíveis modos de ligação.

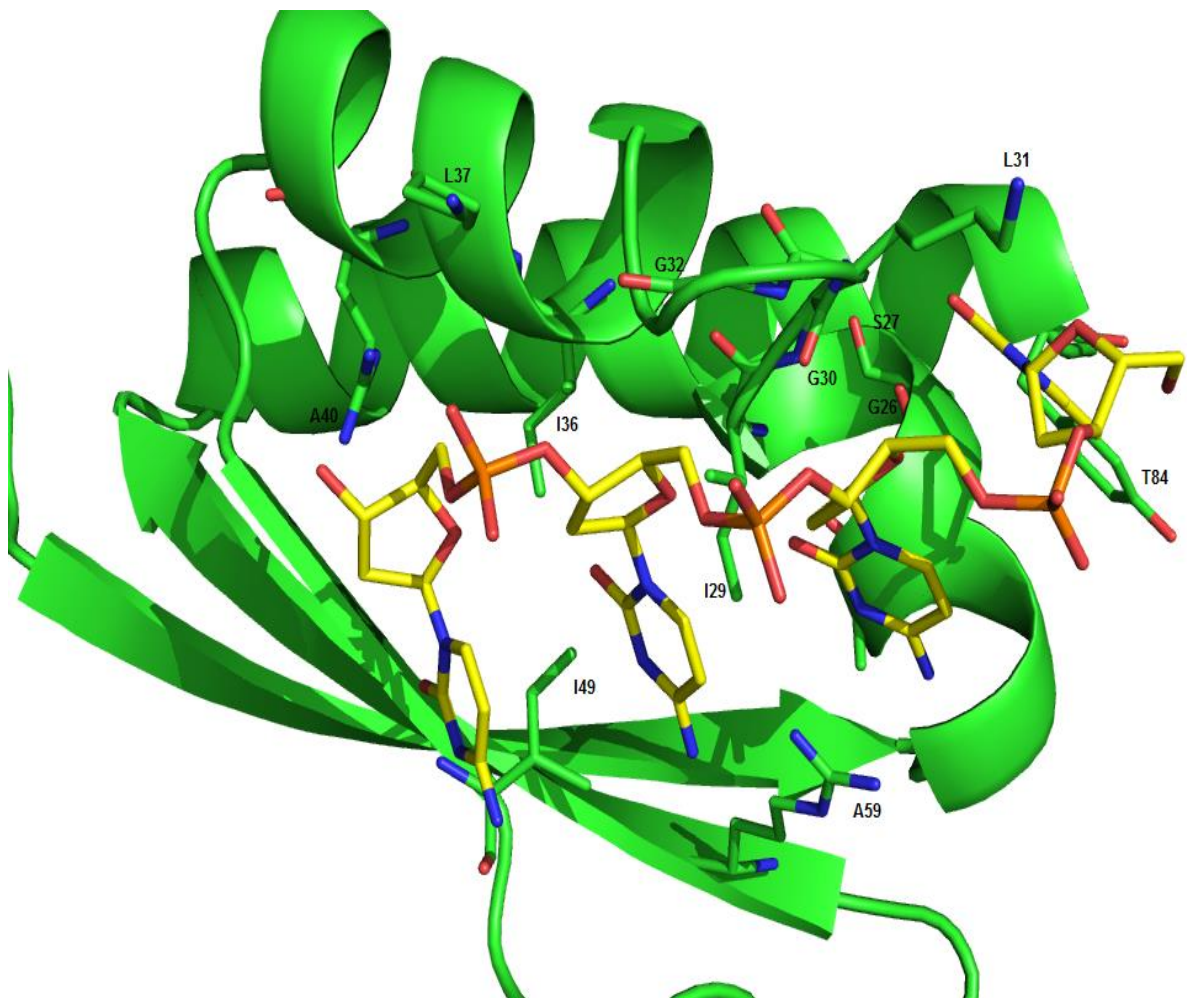
A sequência oligonucleotídica a ser usada foi escolhida com base nos estudos de campos de interação molecular, realizados por Silva em 2007. Silva considerou grupos químicos de prova diferentes (hidrofóbicos, oxigênio da carbonila e nitrogênio de amida) para definir, a partir de grupos com características químicas consideradas importantes na interação de ligantes com a proteína, sítios receptores virtuais no sítio ligante do domínio KH3 (Silva, 2007). A estrutura do complexo utilizada para tal análise se encontra depositada no PDB com o código 1J5K. Apesar de existirem duas isoformas dessa proteína a região onde ocorre interação com o ligante é a mesma para ambas (OSTROWSKI E BOMSZTYK, 2003)

Dentre os vários resíduos de aminoácidos alguns destacaram-se como importantes para a realização e manutenção de interações, levando ao reconhecimento da sequência oligonucleotídica (Silva, 2007). Os grupos que mais se destacaram nessa análise visual são: G26, S27, I29, G30, L31, G32, I36, L37, A40, I49, A59 e T84.

Esses resíduos apresentam em sua grande maioria interações do tipo ligação de hidrogênio com as bases nitrogenadas do oligonucleotídeo. Os grupos metila dos resíduos I29, I36 e I49 estabelecem esse tipo de ligação com os átomos de N e O das bases. Interações de hidrogênio também podem ser observadas entre a base e o grupo guanidina do resíduo A59. Além das interações, por ligação de hidrogênio, com as bases nitrogenadas, existem quatro interações eletrostáticas

que envolvem os grupos fosfato com o grupo amida de G32 e as cadeias laterais dos resíduos L31, L37 e A40. O oligonucleotídeo participa ainda de interações hidrofóbicas com os grupos metileno dos resíduos de G26, G30 e S27 e o anel aromático do resíduo T84 (BRADDOCK *et al.*, 2002).

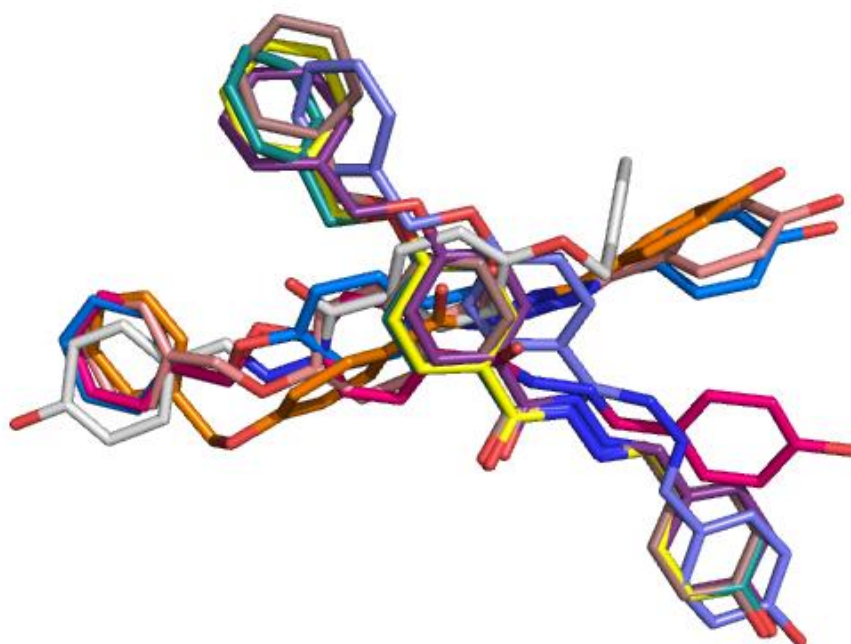
**Figura 15:** Estrutura do complexo (domínio KH3-sequência oligonucleotídica TCCC). Átomos de carbono da sequência nucleotídica estão em amarelo e os átomos de carbono do domínio KH3 estão em verde.



## 5.4 Simulação de docking com o composto 5

Os ensaios de docking realizados com o composto **5** revelaram três modos de ligação distintos (A, B e C) dentre as dez orientações de maior escore obtidos. Para cada conjunto de modos de ligação apenas o de maior escore (Amarelo, prata e azul) foram selecionados para análise (Figura 16).

**Figura 16.** Conformação da estrutura do composto 5 e as dez orientações calculadas.



Os valores de escore obtidos com a simulação são apresentados na tabela 7 para as 10 orientações de maior escore.

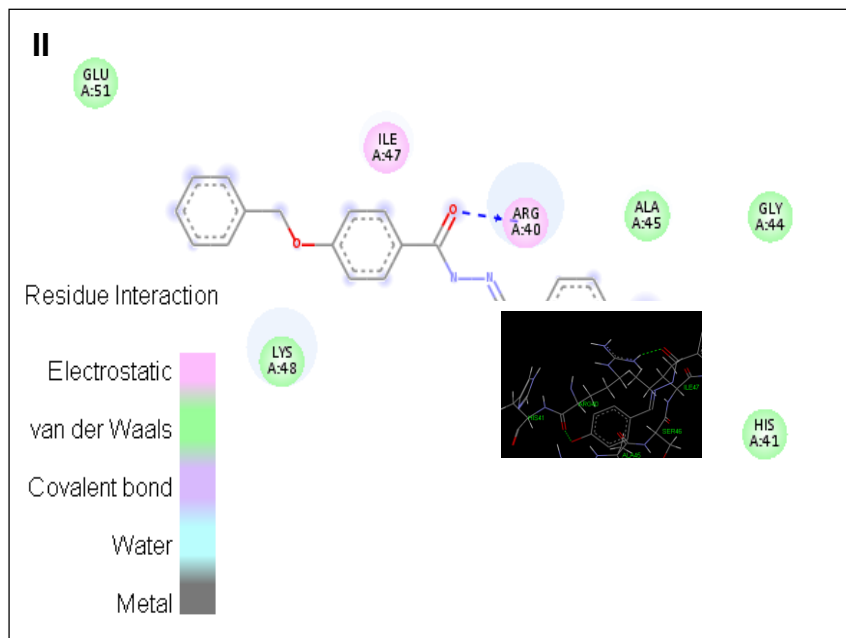
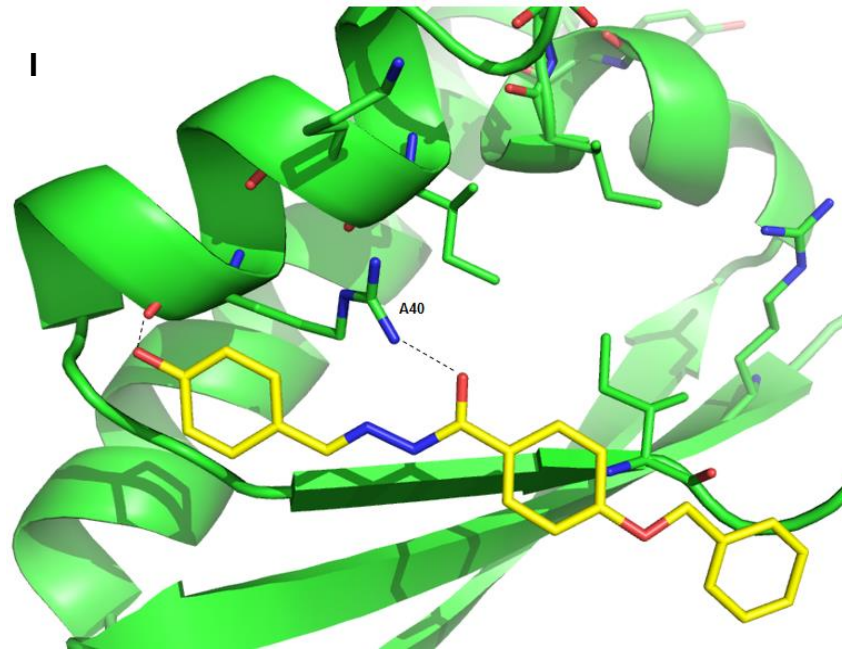
**Tabela 7:** Valores obtidos para as 10 orientações de alto escore nas simulações de docking flexível com a estrutura do complexo 1J5K.

<b>Orientações</b>	<b>Cor</b>	<b>Escore</b>
1A	Amarelo	<b>52.87</b>
2B	Rosa	50.05
3C	Prata	<b>50.84</b>
4A	Azul escuro	45.00
5B	Laranja	44.18
6A	Marrom claro	51.78
7A	Verde	51.43
8B	Rosa escuro	48.24
9B	Azul	<b>50.87</b>
10A	Roxo	51.32

#### 5.4.1 Modo de ligação A

Para o modo de ligação A, foram observadas cinco orientações (1A, 4A, 6A, 7A e 10A) muito semelhantes entre si sendo consideradas equivalentes. A orientação 1A (orientação de maior escore) foi escolhida para ser apresentada (Figura 17).

**Figura 17:** (I) Modo de interação da orientação 1 obtido por docking para o composto 5 no sítio ligante do domínio KH3, com destaque para as ligações de hidrogênio com o resíduo A40. (II) interações no sítio ativo representadas em 2D



O modo de ligação mais favorável e sugerido para o modo de ligação A apresenta duas ligações de hidrogênio. O interessante nesse modo de ligação é que o composto 5 sugere efetuar duas ligações de hidrogênio no mesmo resíduo (A40), localizado em  $\alpha 2$ . Esse resíduo se mostra muito importante no reconhecimento de fitas simples de DNA (BACKE *et al.*, 2005).

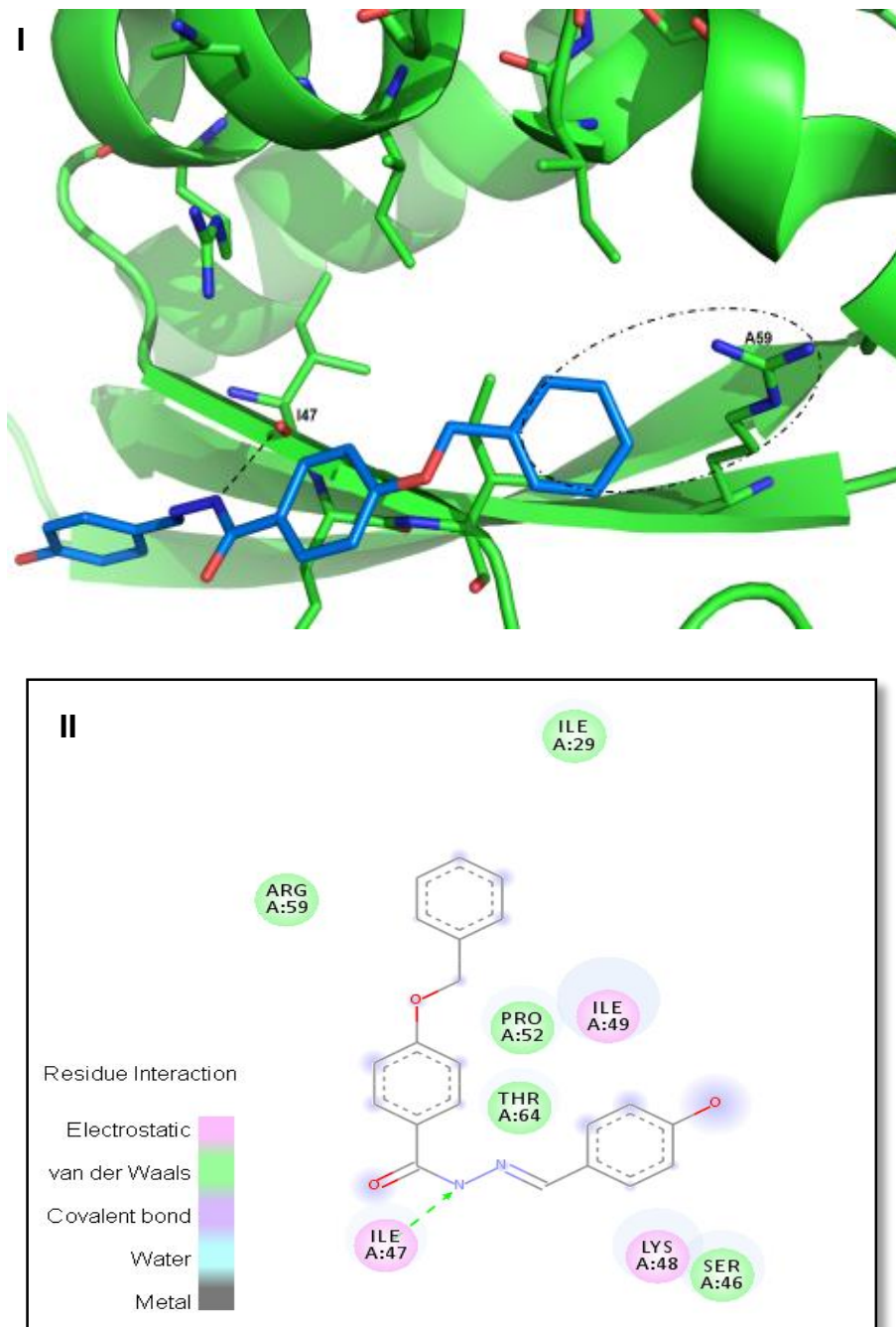
É possível observar ainda uma interação eletrostática entre o grupo carboxila e o aminoácido I47, situado em  $\beta 2$ . Podem ser observadas também algumas interações hidrofóbicas, entre o composto e os resíduos de aminoácido, ao longo da cadeia.

#### **5.4.2 Modo de ligação B**

Para o modo de ligação B foram observadas quatro orientações (2B, 5B, 8B e 9B) muito semelhantes entre si sendo consideradas equivalentes. A orientação 9B (orientação de maior escore) foi escolhida para ser apresentada (Figura 18).

**Figura 18:** (I) Modo de interação da orientação 9B obtido por docking para o composto 5 no sítio ligante do domínio KH3, com destaque para a ligação de hidrogênio com o resíduo I47.

(II) interações no sítio ativo representadas em 2D.



O modo de ligação B sugere uma interação de ligação de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo amida e a carbonila do resíduo I47, situado em  $\beta 2$ . Podem

ainda ser observadas interações eletrostáticas entre o composto 5 e os resíduos I49 e L48, localizados no final de  $\beta 2$  início do *loop variável*.

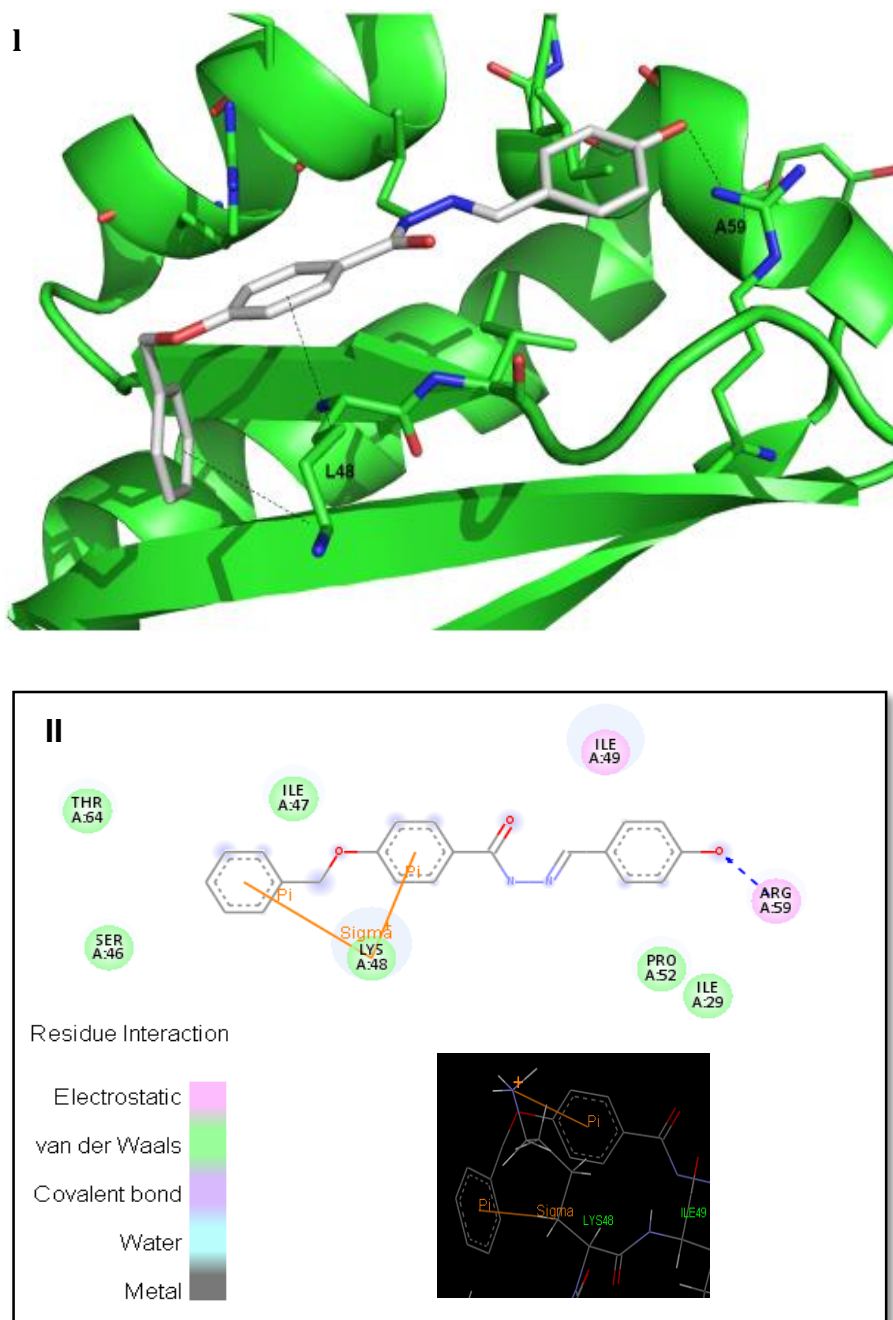
Pode-se observar uma interação do tipo cátion- $\pi$  entre o anel III do composto 5 e o resíduo guanidina do resíduo A59, situado em  $\beta 3$ . Braddock (2002) e Backe (2005) relatam o resíduo A59 como uma importante chave no reconhecimento de bases nitrogenadas presentes nos oligonucleotídeos.

É possível observar também interações de Van der Waals, ao longo de toda a cadeia, com diversos resíduos de aminoácido (I29, P52, T64 e S46). Interações hidrofóbicas entre o composto 5 e os resíduos de aminoácidos também podem ser observadas ao longo da cadeia.

### **5.4.3 Modo de ligação C**

Para o modo de ligação C foi observado apenas a orientação 3C. Essa orientação apresenta uma inversão em relação ao modo de ligação B, pois o grupo hidroxila se apresenta invertido. Além disso, um dos anéis se apresenta de forma diferente em relação as demais estruturas (Figura 19).

**Figura 19:** (I) Modo de interação da orientação 3C obtido por docking para o composto 5 no sítio ligante do domínio KH3, com destaque para a ligação de hidrogênio com o resíduo A59. (II) interações no sítio ativo representadas em 2D.



O modo de ligação C sugere uma interação por ligação de hidrogênio com o resíduo A59, o qual é considerado importantíssimo no reconhecimento de

oligonucleotídeos (BACKE *et al.*, 2005; BRADDOCK *et al.*, 2002). Há ainda uma interação eletrostática com o resíduo I49.

É possível observar também uma interação do tipo sigma- $\pi$  (hidrofóbica) entre o anel I e a cadeia lateral do resíduo L48. Além disso, pode ser observado uma interação cátion- $\pi$  entre o mesmo resíduo L48 e o anel II do composto **5**. Interações cátion- $\pi$  são da mesma ordem de magnitude de ligações de hidrogênio fortes e desempenham papel importante no reconhecimento molecular (GUIMARÃES, 2012). Ainda pode-se observar interações hidrofóbicas e de Van der Waals, estendendo-se por toda a cadeia, com outros resíduos.

Os modos de interação observados para o composto **5** em relação aos modos de ligação observados para o composto **17** estudado por Silva (2011), mostraram-se diferentes. Apenas o modo de interação C mostra uma interação como resíduo A59 idêntica à observada por Silva (2011). Os demais modos de interação sugerem outras possíveis interações para o composto **5** com o domínio KH3 da proteína hnRNP K. Porém, os outros modos de interação não podem ser descartados, uma vez que estes também demonstras interagir com resíduos importantes do domínio.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estratégia de síntese baseado na similaridade dos compostos N-acilidrazônicos com o composto **17** descrito por Silva (2011), levou a síntese de 14 novos compostos.

Dentre todos os compostos sintetizados nenhum apresentou tempo de reação superior a 10 minutos de reação somando todas as etapas. A utilização de micro-ondas no processo de síntese desses compostos apresentou resultados significativos com boas taxas de rendimento e tempo curto de reação.

Entre os 14 compostos sintetizados e testados, o composto **5** foi o único capaz de inibir a ligação natural do oligonucleotídeo a proteína hnRNP K. Os demais compostos não apresentaram atividade mesmo em concentrações altas, sendo considerados como não ligantes ao domínio KH3 da proteína hnRNP K.

A atividade antineoplásica *in vitro* dos compostos foi avaliada através de ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) para testar a interação proteína-DNA na presença dos compostos.

O composto **5** identificado como ligante da proteína hnRNP K se mostrou promissor sendo escolhido para próxima fase de testes em células tumorais. Os testes continuam a ser realizados no laboratório de “Marcadores moleculares, sinalização celular e alvos terapêuticos no câncer” da FCFRP/USP, em colaboração com a Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino e com a aluna de doutorado Renata Nishida Goto.

A proposição do modo de ligação do composto **5** no domínio KH3 da proteína hnRNP K foi realizada através de simulações de *docking*. Foram

sugeridos 3 modos de ligação distintos para o composto **5**, porém, não foi possível definir um modo de ligação único entre ele e o domínio KH3.

O composto **5** apresentou modos de ligação diferentes aos encontrados por Silva.

## REFERÊNCIAS

ADOLPH, D., FLACH, N., MUELLER, K., OSTARECK, D. H., OSTARECK L, A. Deciphering the cross talk between hnRNP K and c-Src: the c-Src activation domain in hnRNP K is distinct from a second interaction site. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, p.1758–70, 2007.

AHMAD, N., ZIA-UR-REHMAN, M., SIDDIQUI, H. L., ULLAH, M. F., & PARVEZ, M. Microwave assisted synthesis and structure-activity relationship of 4-hydroxy-N<sup>7</sup>-[1-phenylethylidene]-2H/2-methyl-1,2-benzothiazine-3-carbohydrazide 1,1-dioxides as anti-microbial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p. 2368–77, 2011.

ALMEIDA, V. L. DE, LEITÃO, A., BARRETT, C., ALBERTO, C., & LUIS, C. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v.28, p.118–129, 2005.

ALMEIDA, L. O. et al. Accumulated SET protein up-regulates and interacts with hnRNPK, increasing its binding to nucleic acids, the Bcl-xS repression, and cellular proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 1, p. 196-202, 2014.

AMORIM, A. R. Genética do câncer. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitario de Brasília. Brasília , 2002.

ANJOS, A. C. Y. DOS, & ZAGO, M. M. F. A experiência da terapêutica quimioterápica oncológica 1 na visão do paciente. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, p.33–40, 2006.

BABER, J. L., LIBUTTI, D., LEVENS, D., & TJANDRA, N. High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor. **Journal of Molecular Biology**, v.289, p. 949–62, 1999.

BACKE, P. H., MESSIAS, A. C., RAVELLI, R. B. G., SATTLER, M., & CUSACK, S. X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. **Structure**, v.13, p.1055–67. 2005.

BARBORO, P., REPACI, E., RUBAGOTTI, A, SALVI, S., BOCCARDO, S., SPINA, B.; BALBI, C. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v.100, p.1608–16. 2009.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova** , v. 25, p.1172–1180, 2002.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., MIRANDA, A. L. P., & RODRIGUES, C. R. A química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v.25, p.129–148, 2002.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., MIRANDA, A. L. P., & RODRIGUES, C. R. (2002). A química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos

de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química nova**, v. 25(1), p. 129–148, 2002.

BELIZÁRIO, J. E. (2002). O Próximo Desafio: Reverter o Câncer. **Ciência Hoje**, v.31, p.51-57, 2002.

BELSKAYA, N. P., DEHAEN, W., & BAKULEV, V. A. Synthesis and properties of hydrazones bearing amide, thioamide and amidine functions. **ARKAT USA**. p. 275–332, 2010.

BERNARDINO, A. M. R., GOMES, A. O., CHARRET, K. S., FREITAS, A. C. C., MACHADO, G. M. C., CANTO-CAVALHEIRO, M. M., AMARAL, V. F. Synthesis and leishmanicidal activities of 1-(4-x-phenyl)-n'-[(4-y-phenyl)methylene]-1h-pyrazole-4-carbohydrazides. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41(1), p. 80–87, 2006.

BOMSZTYK, K., DENISENKO, O., & OSTROWSKI, J. (2004). hnRNP K : One protein multiple processes. **Bioessays**, v.26 p.629–638, 2004.

BORGES-OSÓRIO, M. R., ROBINSON, W. M. Genética Humana. 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 278 – 299, 2013.

BRADDOCK, D. T., BABER, J. L., LEVENS, D., & CLORE, G. M.. Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains : solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. **The EMBO Journal**, v.21, p. 3476–3485, 2002.

BRAGA, A. N. S., SIMÕES, V. N., NEIVA, L. S., & GAMA, L. Síntese de zeólitas pelo método hidrotérmico assistido por micro-ondas : Uma revisão da literatura, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.7.3 p.215 –220, 2012.

CACHIBA, T. H., DEMARTINI, B., TEIXEIRA, D., SILVA, M., MG, A., CUSINATO, M., GABRIEL, R. **Química Nova**, v. 35, p.1566-1569, 2012.

CARPENTER, B., MACKAY, C., ALNABULSI, A., MACKAY, M., TELFER, C., MELVIN, W. T., & MURRAY, G. I. (2006). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1765, p.85–100, 2006.

CARRILHO, A. F. C.. **Diagnóstico da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano a partir de urinas colhidas em papel de filtro**. (2009). Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã-Portugal, 2009.

CARVALHO, J.M.S.; CRISTÃO, A.S.M. O valor dos cuidados de enfermagem no homem submetido à prostatectomia radical. **Revista de Enfermagem Referência**. Coimbra. nº 7, v. 3, p. 103-112, 2012.

CHARRET, K. S., RODRIGUES, R. F., BERNARDINO, A. M. R., GOMES, A. O., CARVALHO, A. V, CANTO-CAVALHEIRO, M. M., AMARAL, V. F. Effect of oral treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives against murine infection by leishmania amazonensis. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80(4), p.568–573, 2009.

CLAPP, R., SC, D., HOWE, G., & LEFEVRE, M. J. Environmental and Occupational Causes of Cancer A Review of Recent Scientific Literature. **Boston University School of Public Health and the Environmental Health Initiative, University of Massachusetts Lowell** p. 50. 2005

COCCO, M. T., CONGIU, C., LILLIU, V., & ONNIS, V. (2006). Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazinopyrimidine-5-carbonitrile derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.366–72, 2006

DIAS, L. C., DESSOY, M. A., GUIDO, R. V. C., OLIVA., G., & ANDRICOPULO, A. D. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS: UMA NOVA ERA DE DESAFIOS E OPORTUNIDADES. **Química Nova**, v.36, p.1552–1556, 2013.

DINH, P. X., DAS, A., FRANCO, R., & PATTNAIK, A. K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K supports vesicular stomatitis virus replication by regulating cell survival and cellular gene expression. **Journal of Virology**, v.87, p.10059–69, 2013.

FARIA, M. H. G., & RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, p.165–171, 2006.

FIGUEREDO, A. S. **Planejamento, síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de análogos de piperina. Dissertação** (Mestrado em Ciências Moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

GARÓFOLO, A., AVESANI, C. M., KÁTIA, G., Regina, S., Silva, J., Augusto, L.J., & Carrazedo, D. A. Dieta e câncer : um enfoque epidemiológico Diet and cancer : An epidemiological view. **Revista de Nutrição**, v.17, p. 491–505, 2004.

GRIFFITH, R., GARNER, J. A., & KELLER, P. A. Combining Structure-Based Drug Design and Pharmacophores Combining Structure-Based Drug Design and Pharmacophores. **J Mol Graph Model**. v.23, p.439-46. 2005.

GUEMBAROVSKI, R. L., & CÓLUS, I. M. DE S. Câncer : uma doença genética, **Genética**.v. 7, p. 4–7, 2008.

GUIDO, R. V. C., & ANDRICOPULO, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, v.4, p.24–36, 2008.

GUIDO, R. V. C., OLIVA, G., & ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, p. 37–46,2008.

GUIDO, R. V. C., OLIVA, G., & ANDRICOPULO, A. D. Structure- and ligand-based drug design approaches for neglected tropical diseases. **Pure and Applied Chemistry**, v.84, p.1857–1866, 2012.

GUIMARÃES, C. R. W). As Múltiplas Contribuições para a Complexação Proteína-Ligante : Consequências em Drug Design As Múltiplas Contribuições para a Complexação Proteína-Ligante : Consequências em Drug Design. **Revista Virtual de Química**, v.4,p. 348–364,2012.

HATAKEYAMA, H., KONDO, T., FUJII, K., NAKANISHI, Y., KATO, H., FUKUDA, S., & HIROHASHI, S. Protein clusters associated with carcinogenesis , histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer. **Proteomics**, v. 6, p.6300–6316, 2006.

INCA. (2014). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro, 2014.

KITCHEN, D. B., DECORNEZ, H., FURR, J. R., & BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews*. **Drug Discovery**, v.3, p.935–49, 2004

KLIMEK-TOMCZAK, K., MIKULA, M., DZWONEK, A, PAZIEWSKA, A, KARCZMARSKI, J., HENNIG, E. OSTROWSKI, J. Editing of hnRNP K protein

mRNA in colorectal adenocarcinoma and surrounding mucosa. **British Journal of Cancer**, v.94, p.586–92, 2006

KÜÇÜKGÜZEL, S. G., MAZI, A., SAHIN, F., ÖZTÜRK, S., & STABLES, J. Synthesis and biological activities of diflunisal hydrazide–hydrazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p.1005–1013., 2003.

LANNES, A. C . **Cepas bacterianas: suscetibilidade a derivados da classe acilhidrazona em amostras do hospital universitário antônio**. Dissertação (Pós-graduação em patologia humana e veterinária )- Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2010.

LEADBEATER, N. E. *Comprehensive Organic Synthesis II*. Elsevier. p. 234–286, 2014.

LEOPOLDINO, M., CARREGARO, F., SILVA, C. H. T. P., FEITOSA, O., MANCINI, U. M., FREITAS, J. M., & TAJARA, E. H. Sequence and transcriptional study of HNRPK pseudogenes , and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms. **Genome** v.462, p.451–462, 2007.

LEVENS, T. T. AND D. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Is a DNA-binding Transactivator. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.4875–4881, 1995.

LIN, C. J., & BARBOSA, A. S. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, p.330–340, 2002.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSSKY, S.L.; DARNELL, J. *Biologia Celular e Molecular*. 5 ed. Porto Alegre: **ArtMED**, 2005.

LOPES, A. A., OLIVEIRA, A. M., & PRADO, C. B. C. (2002). Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de biologia e ciências da terra**, v.2, p.1-7, 2002.

LYNCH, M., CHEN, L., RAVITZ, M. J., MEHTANI, S., KORENBLAT, K., PAZIN, M. J., & SCHMIDT, E. V. hnRNP K Binds a Core Polypyrimidine Element in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E ( eIF4E ) Promoter , and Its Regulation of eIF4E Contributes to Neoplastic Transformation. **Molecular and cellular biology**, v.25, p. 6436–6453, 2005.

METWALLY, K. A, ABDEL-AZIZ, L. M., LASHINE, E.-S. M., HUSSEINY, M. I., & BADAWEY, R. H. Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides: synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.8675–8682, 2006.

MIKULA, M., & OSTROWSKI, & J. Hnrnpk: Mus musculus heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, **Transcription Factor Encyclopedia**, p.1–4, 2009.

MORRIS, G. M., & LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Methods in Molecular Biology**, v.443, p.365–82. 2008.

OSTARECK-LEDERER, A., OSTARECK, D. H., CANS, C., NEUBAUER, G., BOMSZTYK, K., SUPERTI-FURGA, G., & HENTZE, M. W. c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs. **Molecular and Cellular Biology**, v.22, p.4535–4543, 2002.

OSTROWSKI, J., & BOMSZTYK, K. Nuclear shift of hnRNP K protein in neoplasms and other states of enhanced cell proliferation. **British Journal of Cancer**, v.89, p.1493–1501. 2003.

PAZIEWSKA, A., WYRWICZ, L. S., BUJNICKI, J. M., BOMSZTYK, K., & OSTROWSKI, J. Cooperative binding of the hnRNP K three KH domains to mRNA targets. **FEBS Letters**, v.577, p.134–140, 2004.

QIU, J., CHEN, S., SU, L., LIU, J., XIAO, N., OU, T.-M., ... LI, D.. Cellular nucleic acid binding protein suppresses tumor cell metastasis and induces tumor cell death by downregulating heterogeneous ribonucleoprotein K in fibrosarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, p.2244–2252, 2014.

QUARESMA, A. J. C. **Estudos funcionais e estruturais da proteína humana hnRNP Q/NSAP1. Universidade Estadual de Campinas. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas-SP , 2008**

REDDY, A S., PATI, S. P., KUMAR, P. P., PRADEEP, H. N., & SASTRY, G. N. Virtual screening in drug discovery a computational perspective. **Current Protein & Peptide Science**, v.8, p.329–351, 2007.

RODRIGUES, R. P. ., MANTOANI, S. P. ., ALMEIDA, J. R. ., PINSETTA, F. R. ., SEMIGHINI, E. P. ., SILVA, V. B. ., & SILVA, C. H. P. Artigo Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v.4, p.739–776, 2012.

ROMEIRO, N. C., AGUIRRE, G., HERNÁNDEZ, P., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H., ALDANA, I., ... LIMA, L. M.. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.641–652, 2009.

SALVADOR, M; HENRIQUES, J. A. P. Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo. 1º ed. Canoas, **ULBRA**, P. 69- 70, 2004

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, p.660–667, 2002.

SAVINI, L., CHIASSERINI, L., TRAVAGLI, V., PELLERANO, C., NOVELLINO, E., COSENTINO, S., & PISANO, M. B. New alpha-(N)-heterocyclichydrazones: evaluation of anticancer, anti-HIV and antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p.113–122, 2004.

SCHULZE, M. M. Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v.4, p.17–23, 2007.

SILVA, V. B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SILVA, V. B. **Modelagem molecular , síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais antineoplásicos com a proteína hnRNP K e culturas de células tumorais**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

SIMARD, E. P; WARD, E. M; SIEGEL R; JEMAL, A. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. **American Cancer Society**. nº 2, v. 62, p. 118–128, 2012.

SOUSA, F., FERNANDES, P. A., & JOA, M. Protein – Ligand Docking : Current Status and Future. **interscience**, v. 65, p. 15–26, 2006.

SUGIURA, M., & KOBAYASHI, S. N-acylhydrazones as versatile electrophiles for the synthesis of nitrogen-containing compounds. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 44, p. 5176–5186, 2005.

TAKIMOTO, M., TOMONAGA, T., MATUNIS, M., AVIGAN, M., KRUTZSCH, H., DREYFUSS, G., & LEVENS, D. Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 18249–18258, 1993.

TANG, F., LI, W., CHEN, Y., WANG, D., HAN, J., & LIU, D. Downregulation of hnRNP K by RNAi inhibits growth of human lung carcinoma cells. **Oncology Letters**, v.7, p.1073–1077, 2014.

URRUTICOECHEA, A; ALEMANY, R; BALART, J; VILLANUEVA, A; VIÑALS, F; CAPELLÁ, G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**. v. 16, p. 3-10, 2010.

VARACHE-LEMBE, M., FALL, D., NEVEU, A., VERCAUTEREN, J., & NUHRICH, A. synthesis and fungistatic activity against *Candida* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 237–253, 2002.

VERDONK, M. L., COLE, J. C., HARTSHORN, M. J., MURRAY, C. W., & TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, p. 609–623, 2003.

VOGEL, S., KAUFMANN, D., POJAROVÁ, M., MÜLLER, C., PFALLER, T., KÜHNE, S., VON ANGERER, E. Aroyl hydrazones of 2-phenylindole-3-carbaldehydes as novel antimitotic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16(12), p. 6436–6447, 2008.

WATHEY, B., TIERNEY, J., LIDSTRÖM, P., & WESTMAN, J.. The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.7, p. 373–380, 2002.

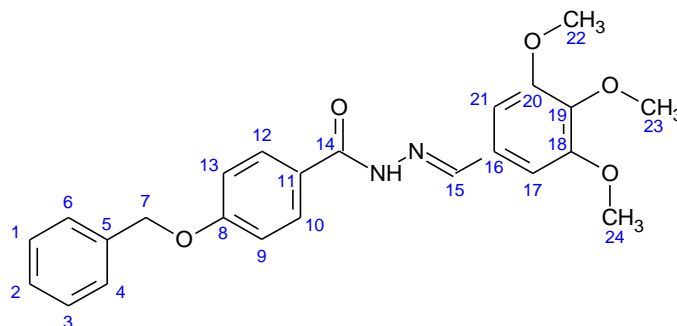
WEN, F., SHEN, A., SHANAS, R., BHATTACHARYYA, A., LIAN, F., HOSTETTER, G., & SHI, J. Higher expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k in melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v.17, p. 2619–2627, 2010.

WILLETT, P. Structural Biology in Drug Metabolism and Drug Discovery Similarity-based approaches to virtual screening. **Biochemical Society Structural**, v. 31, p. 24–25, 2003.

ZHOU, R. SHANAS, R. NELSON, M. A. BHATTACHARYYA, A. SHI, J. Increased Expression of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K in Pancreatic Cancer and its Association with the Mutant p53. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 395–404, 2010.

# ANEXOS

**Síntese da 4-(benziloxi)-[(E)-(3,4,5-trimetoxifenil)metilideno]benzohidrazida (1)**



Foram utilizados 196 mg (1 mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzaldeído e 242 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série A. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (420,45 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 196,1 – 197,5°C

Rendimento: 64,6%

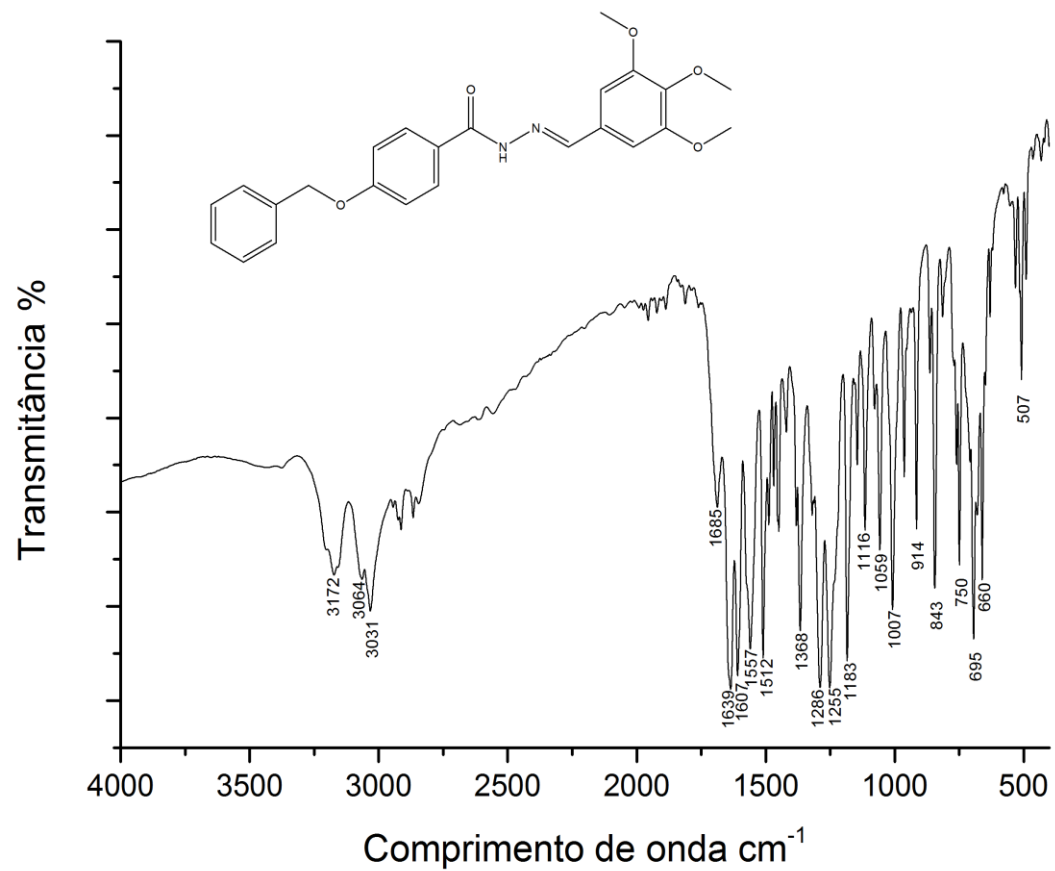
**Dados espectroscópicos:**

IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1183 e 1255; (C=N) 1557; (C=O) 1639; N-H (3172).

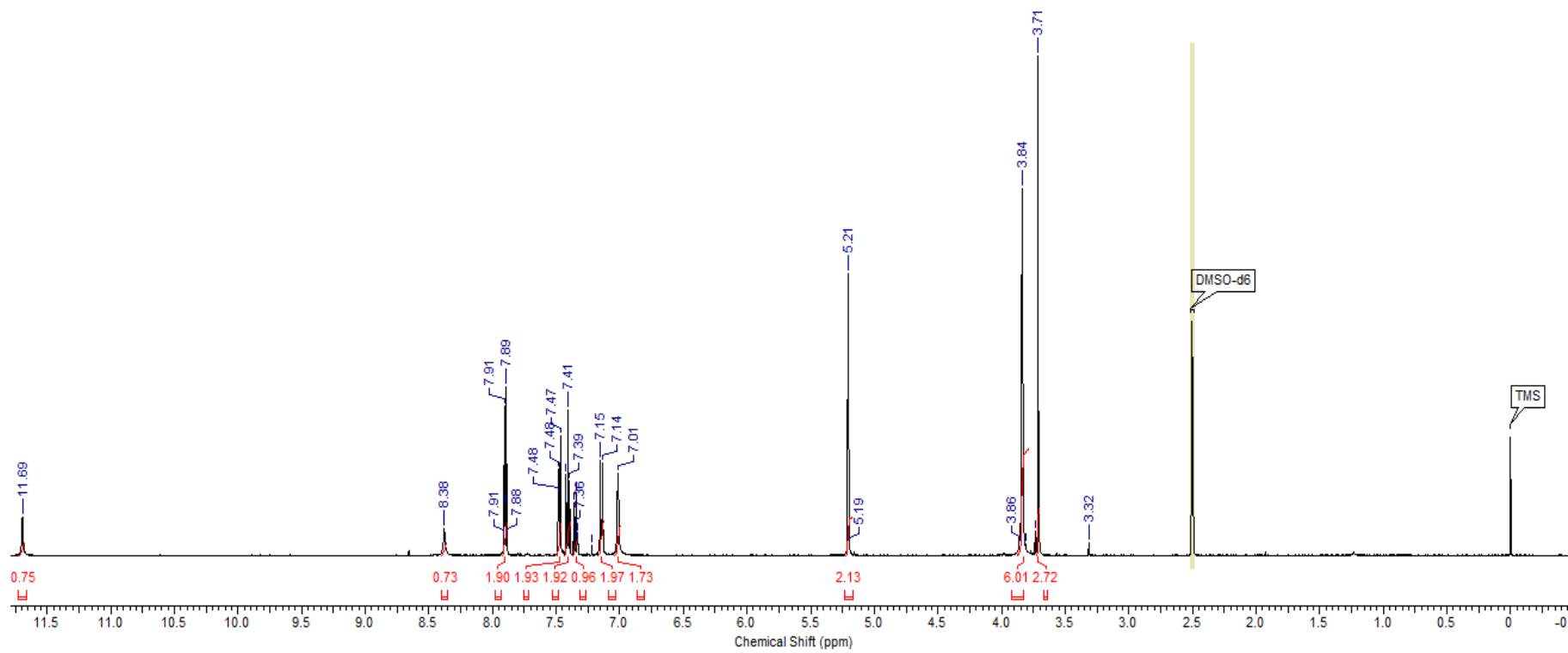
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,71 (s, 3H – 23) δ 3,84 (s, 6H – 22 e 24) δ 5,21 (s, 2H – 07) δ 7,01 (s, 2H - 21 e 17) δ 7,15 (d, 2H - 9 e 13) δ 7,36 (m, 1H – 2) δ 7,41 (m, 2H – 1 e 3) δ 7,48 (m, 2H – 6 e 4) δ 7,91 (d, 2H – 10 e 12) δ 8,38 (s, 1H - 15) δ 11,69 (s, 1H-NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): δ 55,92 (C-22 e 24) 60,08 (C-23) 69,38 (C-7) 104,21 (C-17 e 21) 114,53 (C- 9 e 13) 125,72 (C-11) 127,71 (C- 4 e 6) 127,92(C-2) 128,43 (C-16) 129,47 (C10 e 12) 129,94 (C-1 e 3) 136,61 (C-5) 139,13 (C-19) 147,20 (C-15) 153,16 (C-20 e 18) 161,00 (C-14) 162,47 (C-8).

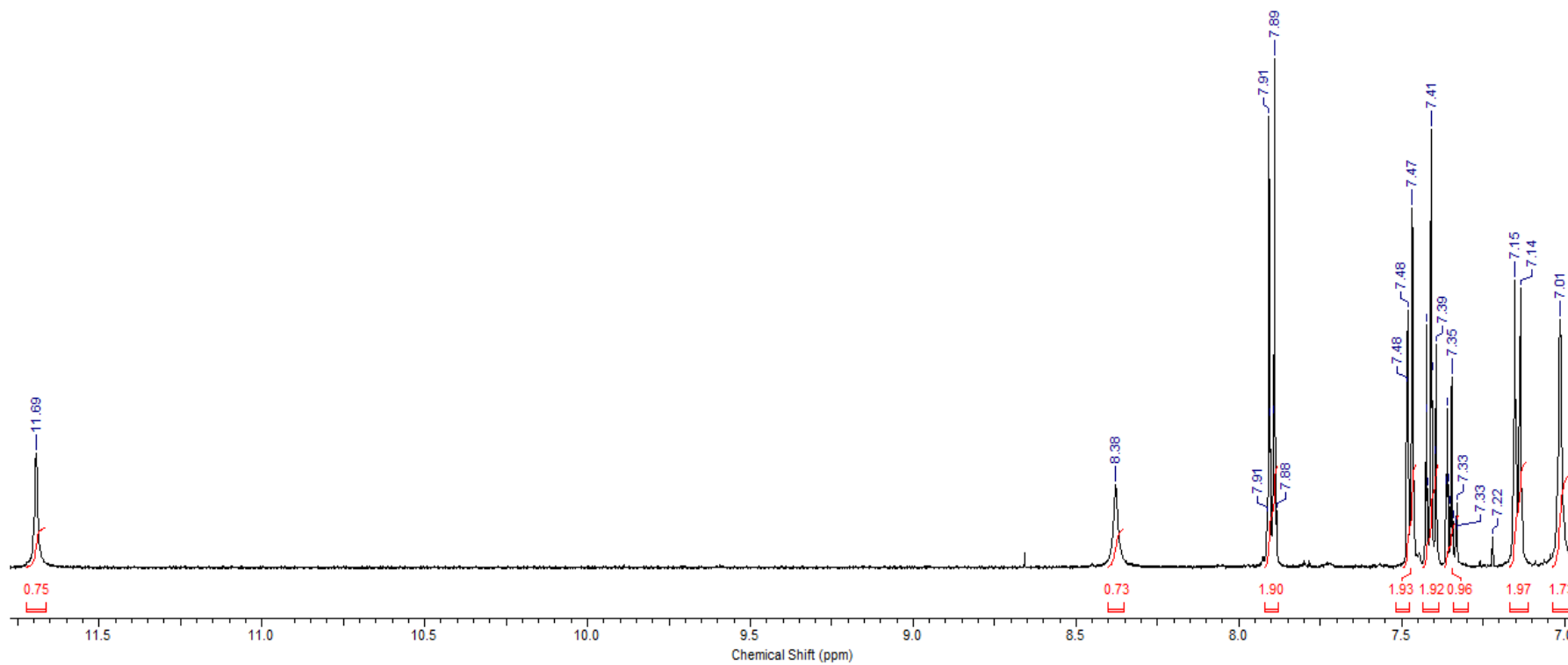
**Figura 20:** Espectro na região do IV do composto **1** ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ).



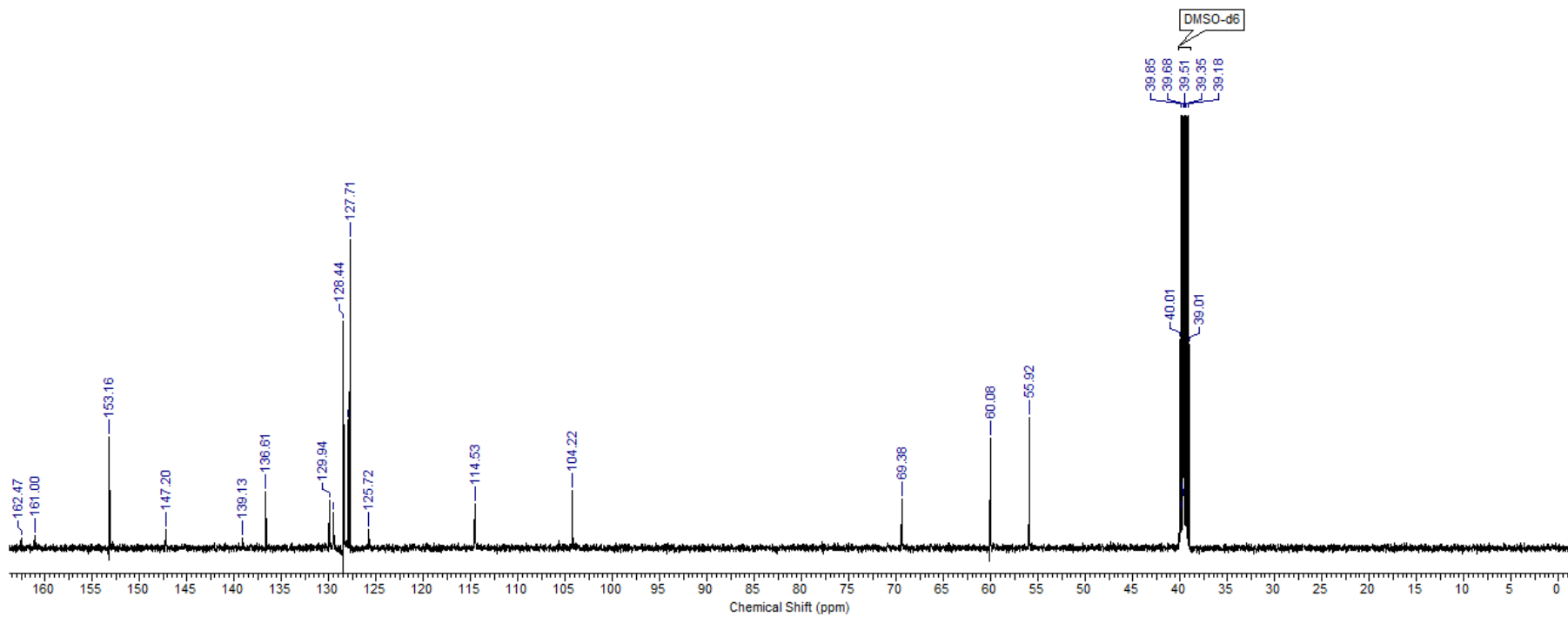
**Figura 21-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **1** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 21-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **1** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

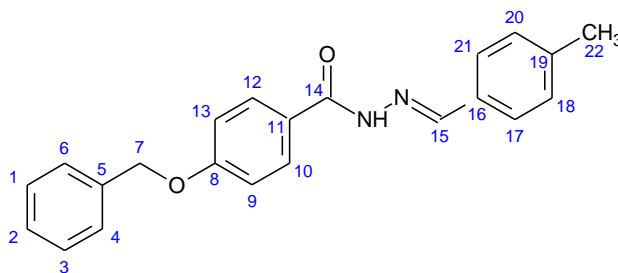


**Figura 22:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **1** (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz).





## Síntese da 4-(benziloxi)-[(*E*)-(4-metilfenil)metilideno]benzohidrazida (2)



Foram utilizados 120 mg (1 mmol) de 4-metilbenzaldeído e 242 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série B. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (344,40 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 196,3 – 197,2°C

Rendimento: 55,3%

### Dados espectroscópicos:

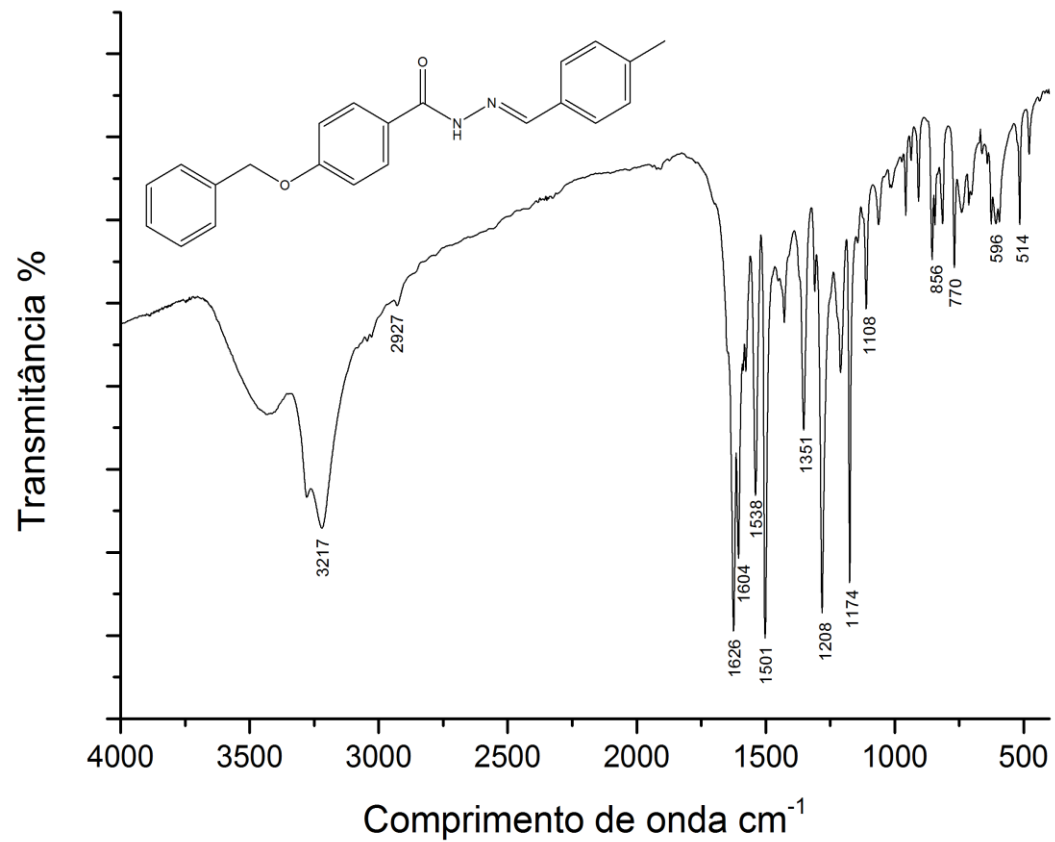
IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1174 e 1208; (C=N) 1538; (C=O) 1626; (CH<sub>3</sub>) 2927; (N-H) 3217.

EM (m/z): [M<sup>+</sup>] 344; Fragmentos: 253; 227; 211; 133; 91.

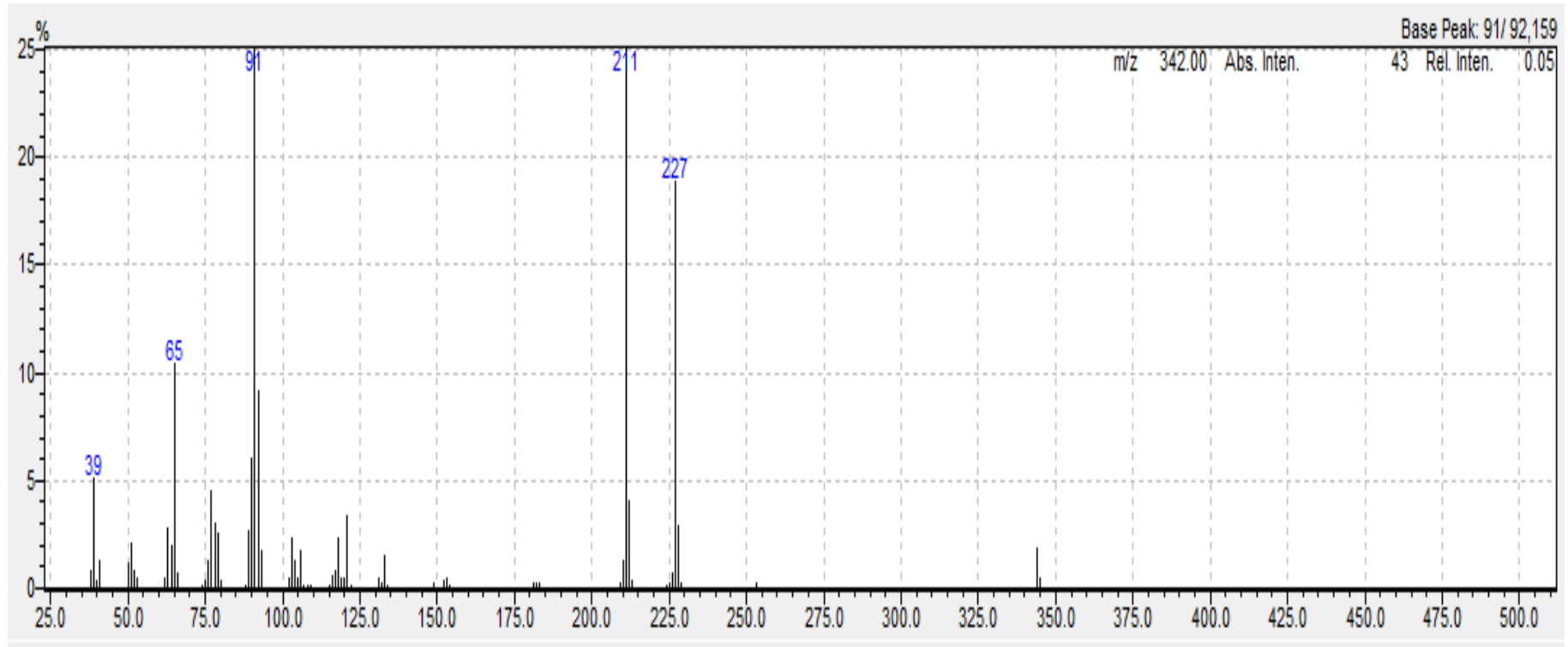
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,33 (s, 3H – 22) δ 5,20 (s, 2H – 07) δ 7,14 (d, 2H – 9, 13) δ 7,26 (d, 2H – 18 e 20) δ 7,34 (m, 1H – 2) δ 7,41 (m, 2H – 1 e 3) δ 7,48 (m, 2H – 6 e 4) δ 7,62 (d, 2H – 17 e 21) δ 7,92 (d, 2H – 10 e 12) δ 8,44 (s, 1H - 15) δ 11,70(s,1H-NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): δ 20,96 (C-22) 69,37 (C-7) 114,48 (C-9 e 13) 125,75 (C- 11) 126,92 (C-17 e 21) 127,69 (C- 4 e 6) 127,89 (C-2) 128,42 (C- 1 e 3) 129,36 (C10 e 12) 129,45 (C-18 e 20) 131,74 (C-16) 136,61 (C-5) 139,64 (C-19) 147,22 (C-15) 161,10 (C-14) 162,42 (C-8).

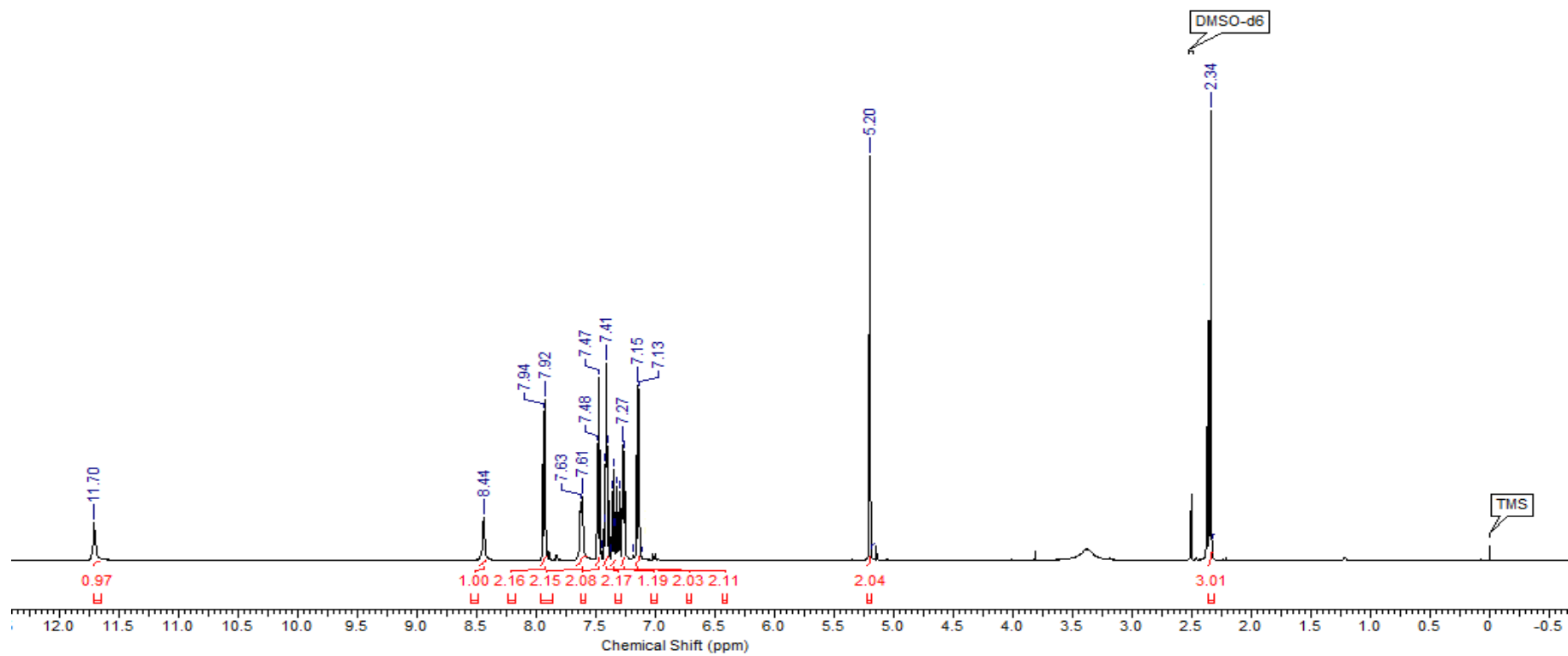
**Figura 23:** Espectro na região do IV do composto **2** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



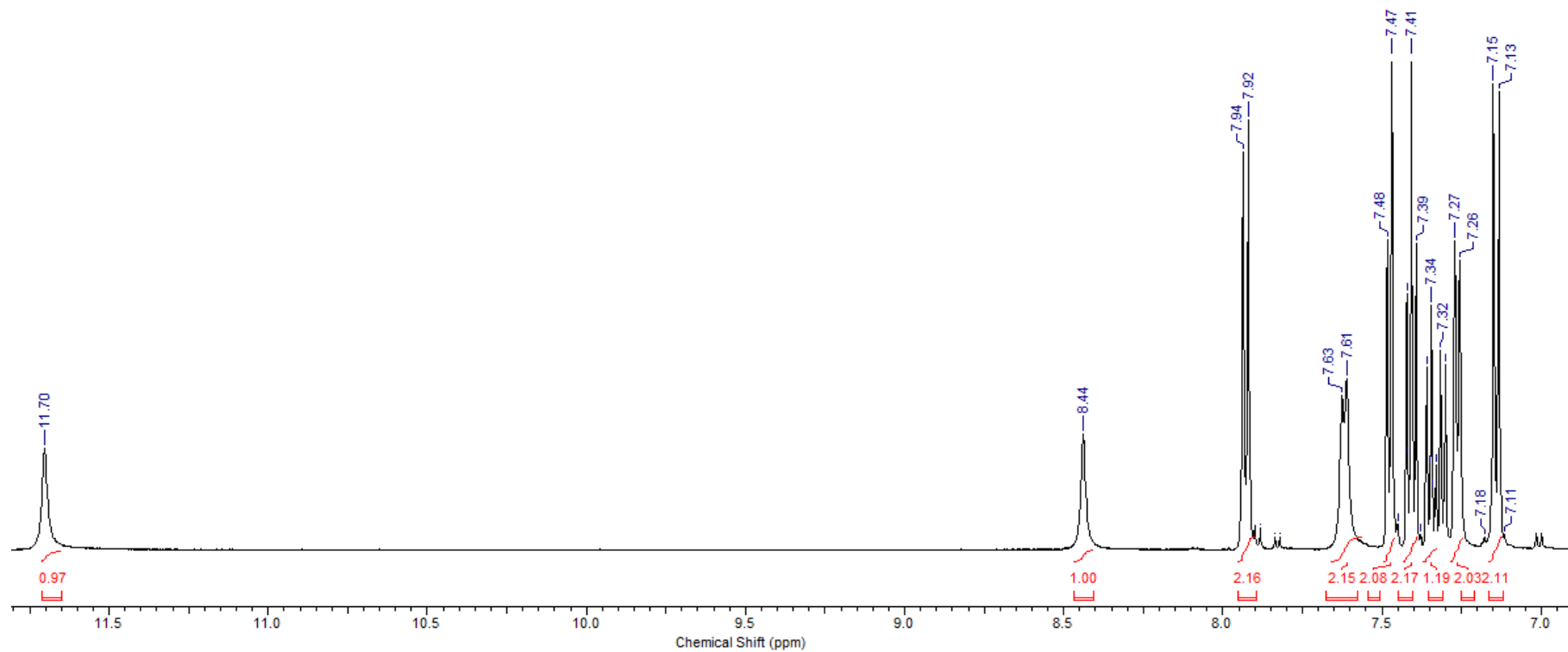
**Figura 24:** Espectro de massas do composto 2.



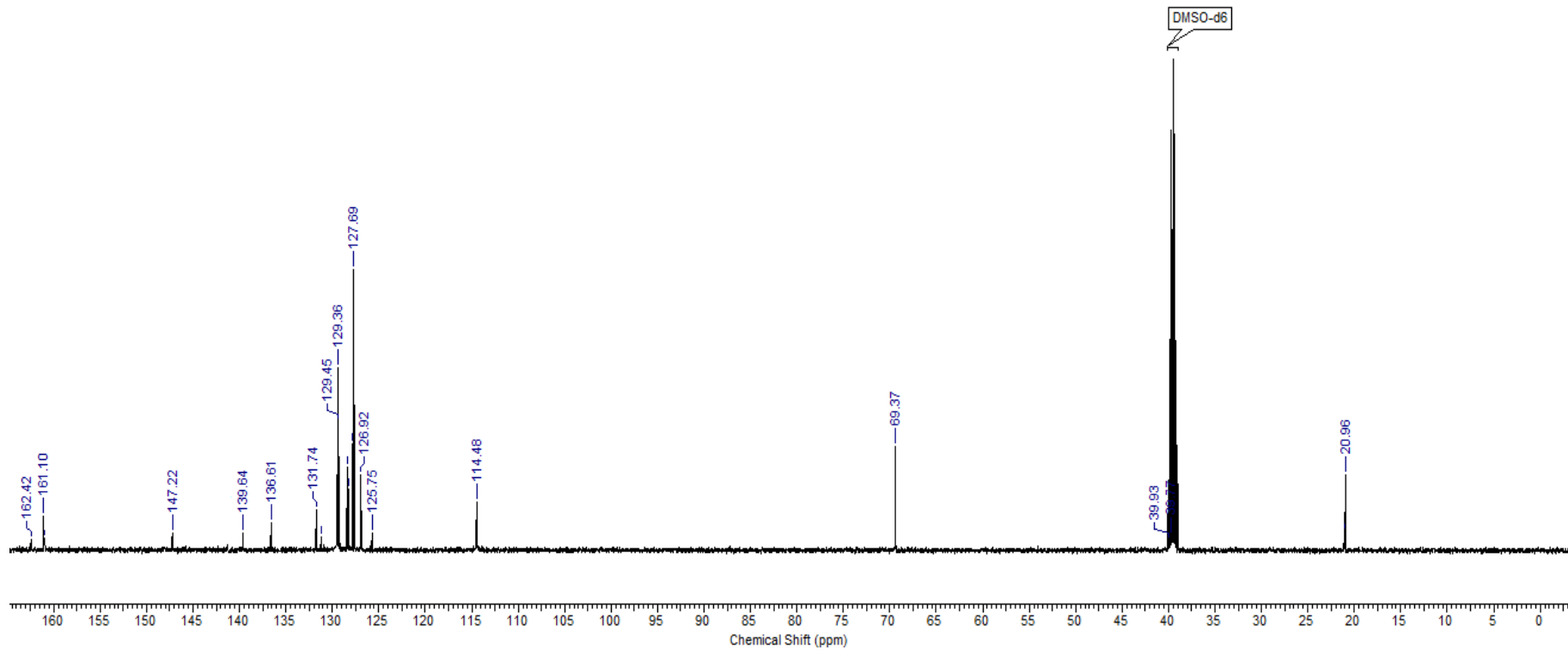
**Figura 25-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **2** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).



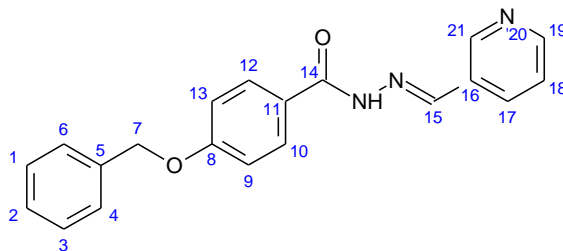
**Figura 25-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **2** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 26:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **2** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).



### Síntese da 4-(benziloxi)-[(*E*)-(piridina-3-metilideno)]benzohidrazida (3)



Foram utilizados 107 mg (1 mmol) de piridina-3-carbaldeído e 242 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série B. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (331,36 g/mol)

Coloração: laranja

Faixa de fusão: 232,1 – 233,4°C

Rendimento: 58,5%

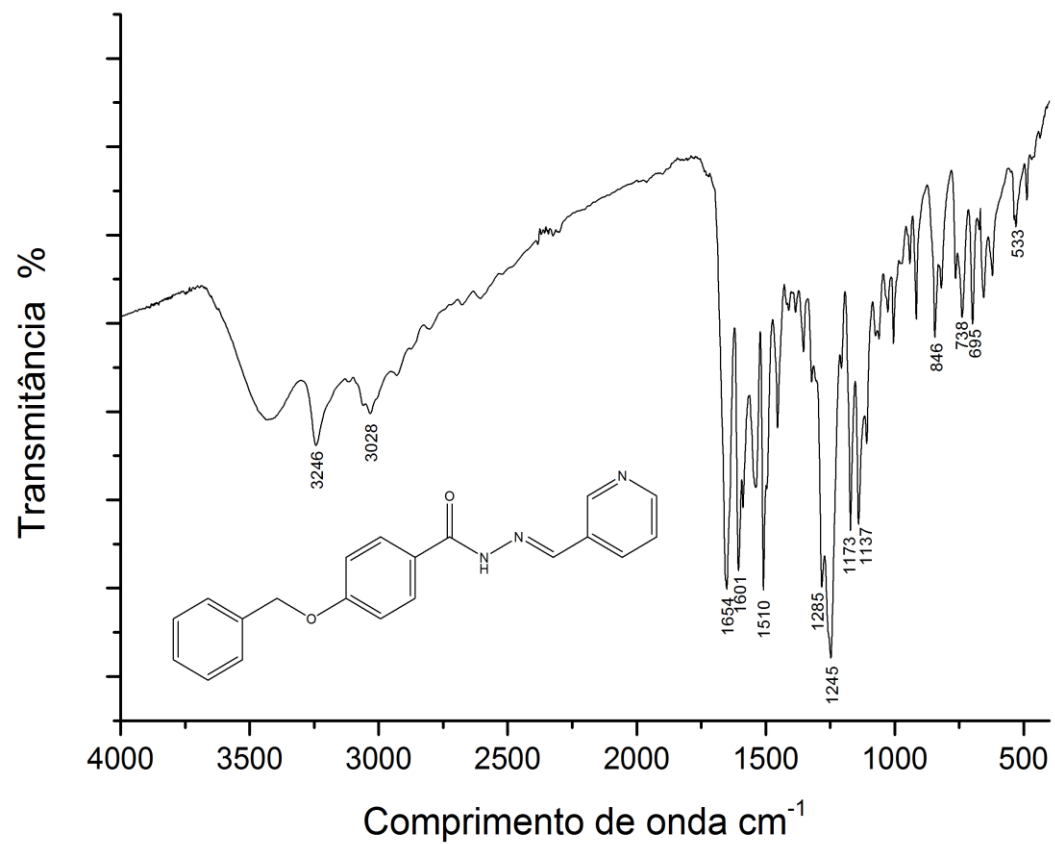
#### Dados espectroscópicos:

IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1173 e 1245; (C=N) 1510; (C=O) 1654; (N-H) 3246.

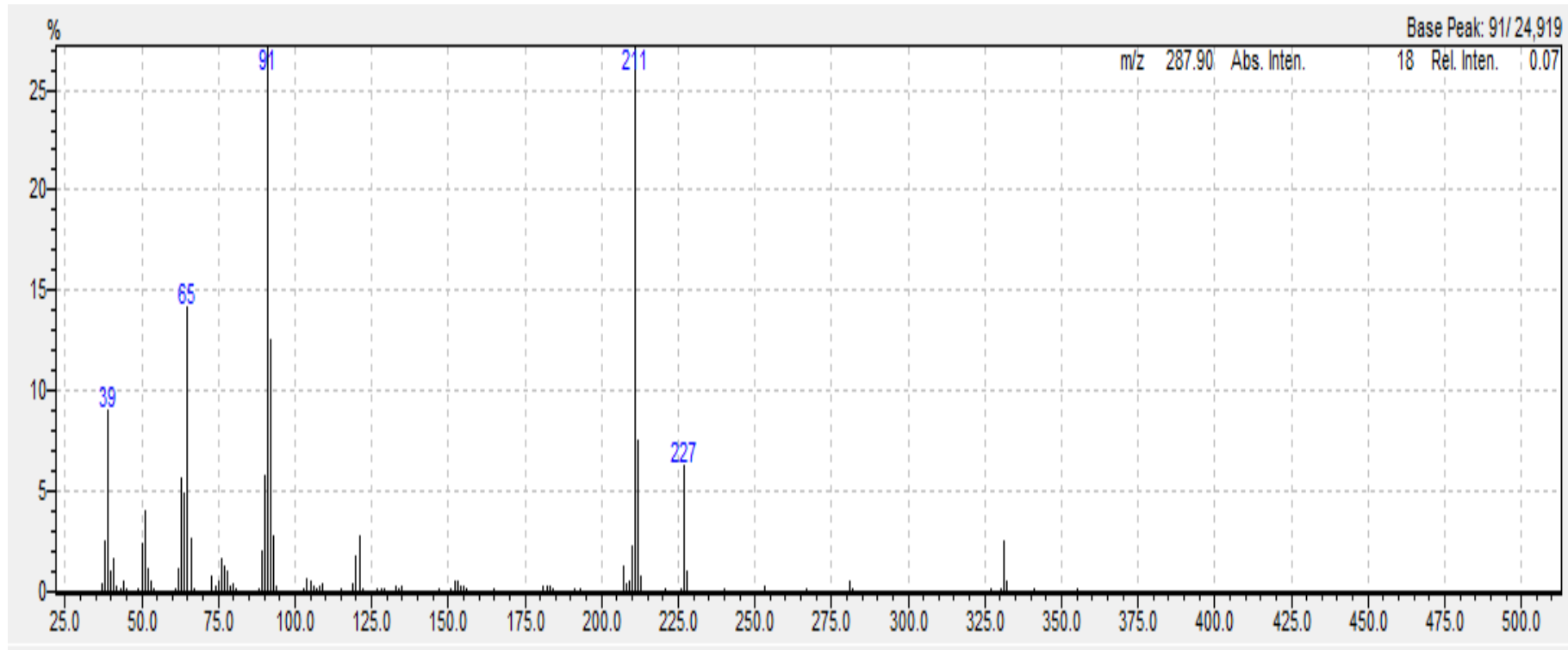
EM (m/z): [M<sup>+</sup>] 331; Fragmentos: 283; 227; 211; 120; 91.

RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5,21 (s, 2H – 07) δ 8,9 (d, 2H – 9 e 13) δ 7,34 (m, 1H – 2) δ 7,41 (m, 2H – 1 e 3) δ 7,47 (m, 2H – 6 e 4) δ 7,66 (d, 2H – 17 e 19) δ 7,92 (d, 2H – 10 e 12) δ 8,42 (m, 1H - 18) δ 8,66 (d, 2H – 15 e 21) δ 11,99 (s, 1H- NH).

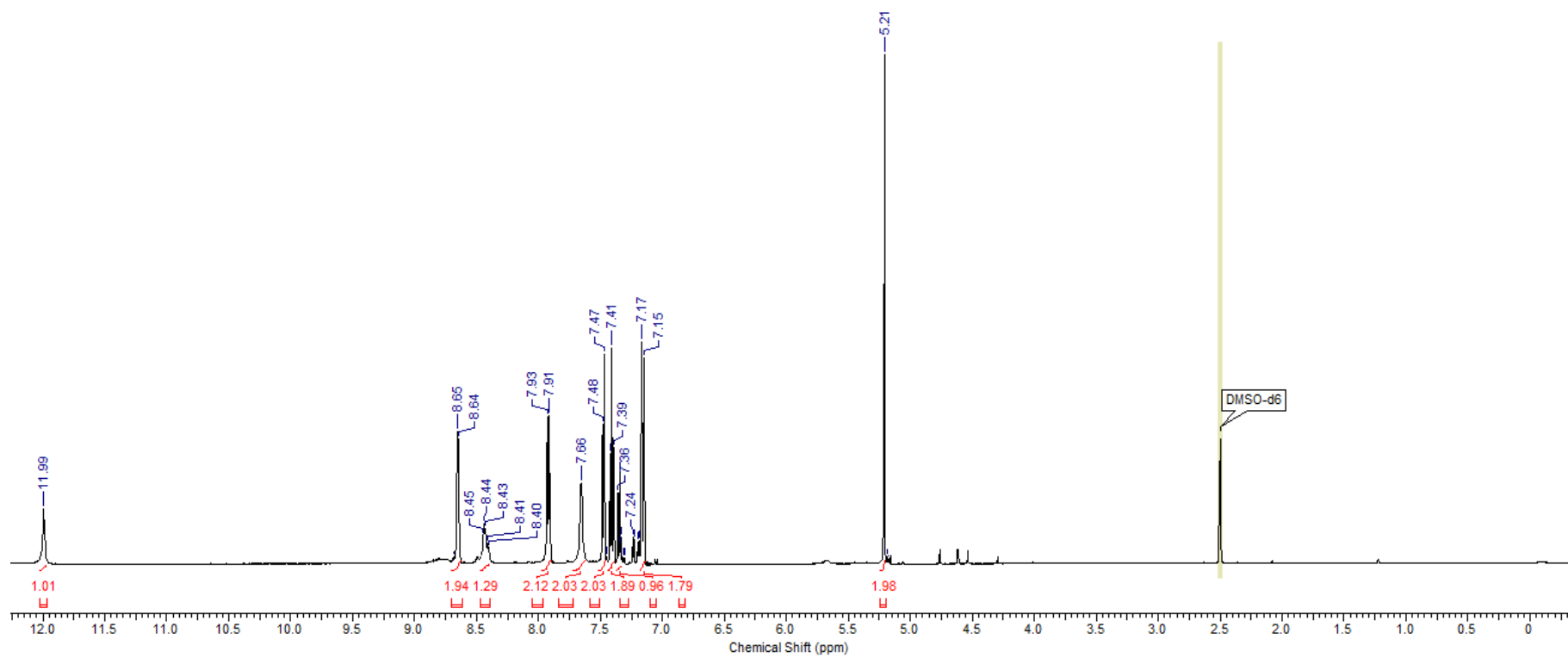
**Figura 27:** Espectro na região do IV do composto **3** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



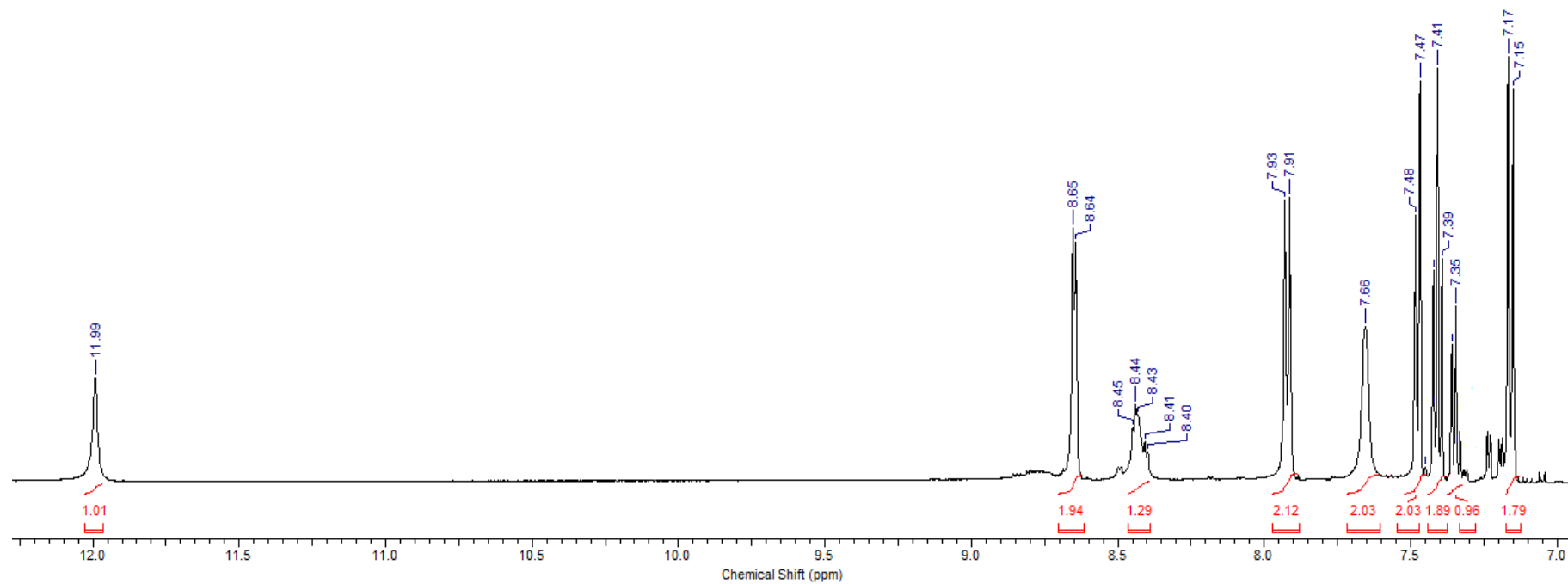
**Figura 28:** Espectro de massas do composto **3**.



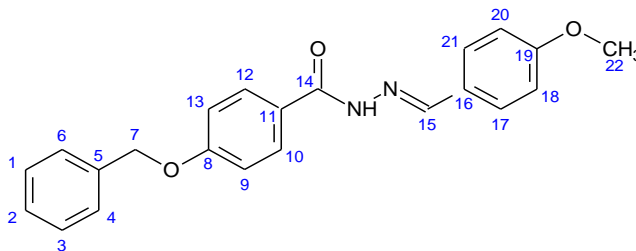
**Figura 29-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 29-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



## Síntese da 4-(benziloxi)-[(*E*)-(4-metoxifenil)metilideno]benzohidrazida (**4**)



Foram utilizados 136 mg (1 mmol) de 4-metoxibenzaldeído e 242 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série B. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (360,40 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 175,9 – 176,8°C

Rendimento: 70,1%

### Dados espectroscópicos:

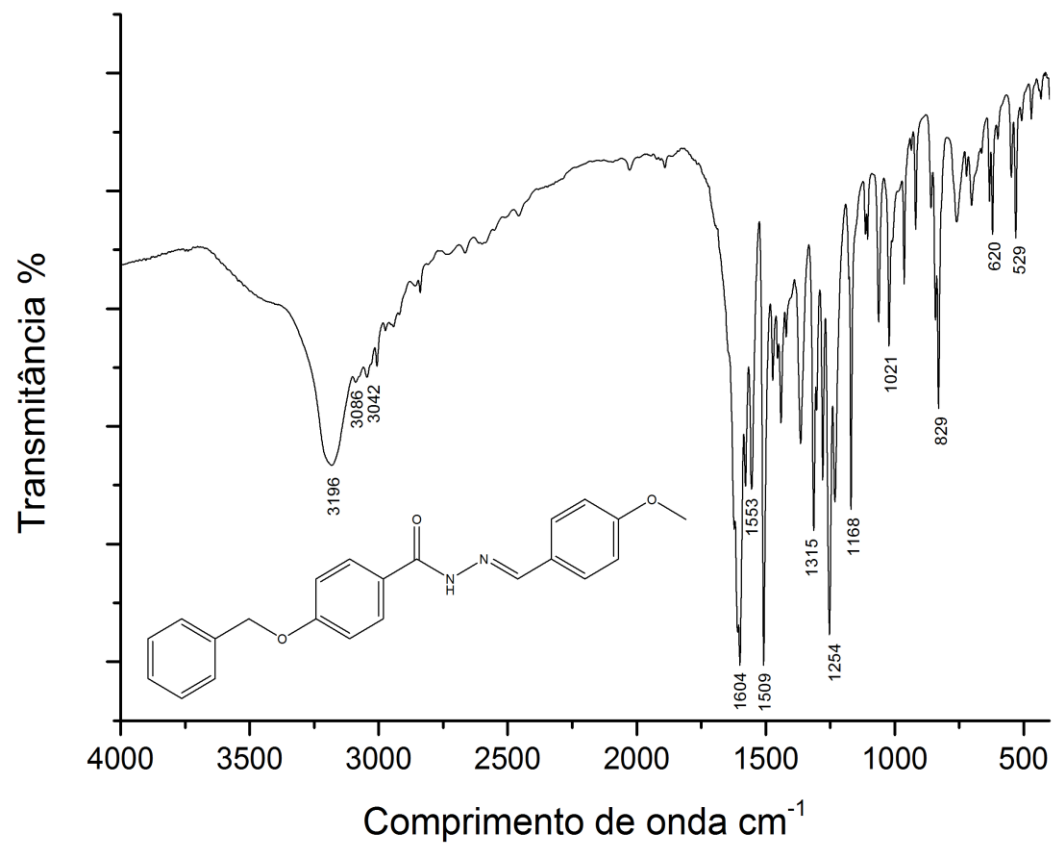
IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1168 e 1254; (C=N) 1509; (C=O) 1654; (CH<sub>3</sub>) 3042; (N-H) 3196.

EM (m/z): [M<sup>+</sup>] 360; Fragmentos: 269; 227; 211; 149; 91.

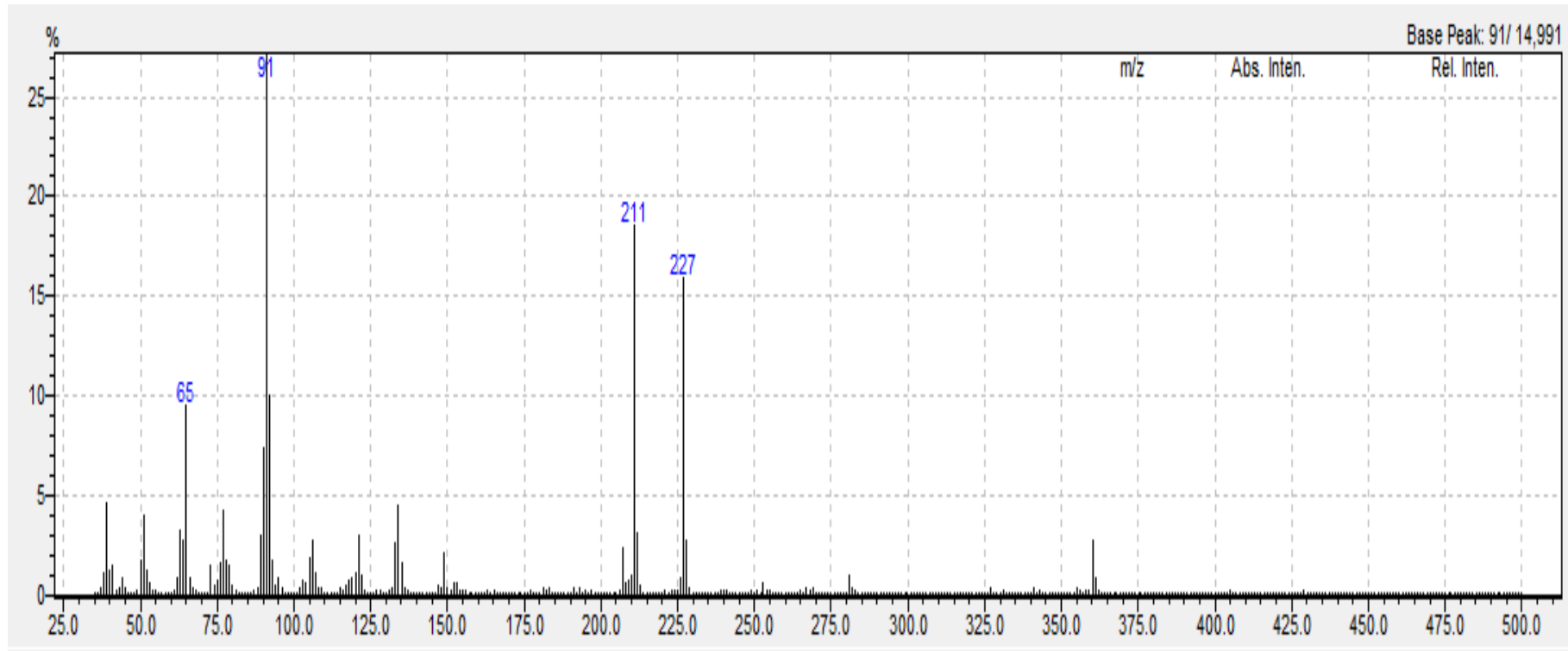
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,82 (s, 3H – 22) δ 5,20 (s, 2H – 07) δ 7,02 (d, 2H – 9, 13) δ 7,13 (d, 2H – 18 e 20) δ 7,35 (m, 1H – 2) δ 7,41 (m, 2H – 1 e 3) δ 7,48 (m, 2H – 6 e 4) δ 7,68 (d, 2H – 17 e 21) δ 7,93 (d, 2H – 10 e 12) δ 8,42 (s, 1H - 15) δ 11,61 (s, 1H-NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): δ 55,22 (C-22) 69,37 (C-7) 114,27 (C-9 e 13) 125,84 (C- 18 e 20) 127, 01(C- 11) 127,67 (C-16) 127,87 (C- 4 e 6) 128,40 (C-2) 128,52 (C- 1 e 3) 129,40 (C-17 e 21) 131,72 (C-10 e 12) 136,61 (C-5) 147,09 (C-15) 160,69 (C-19) 160,94 (C-14) 162,35 (C-8).

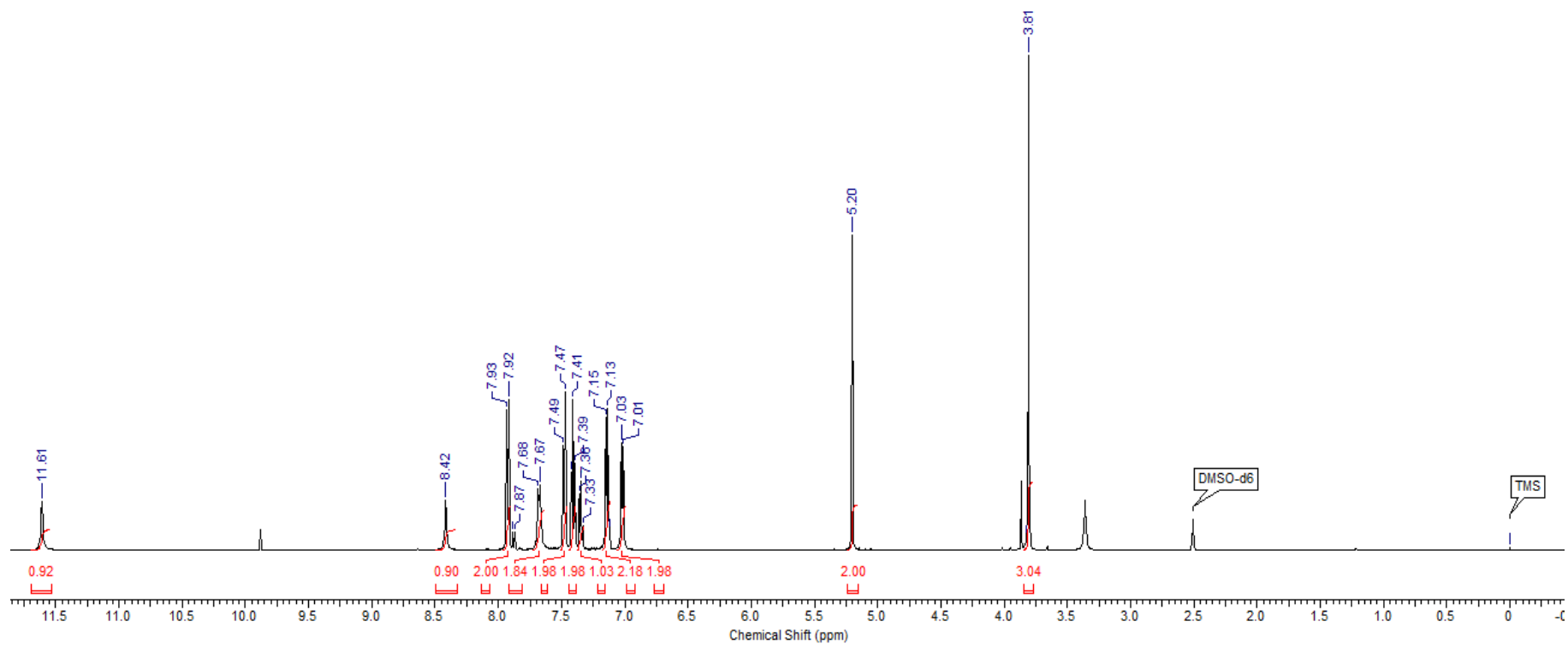
**Figura 30:** Espectro na região do IV do composto **4** ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ )



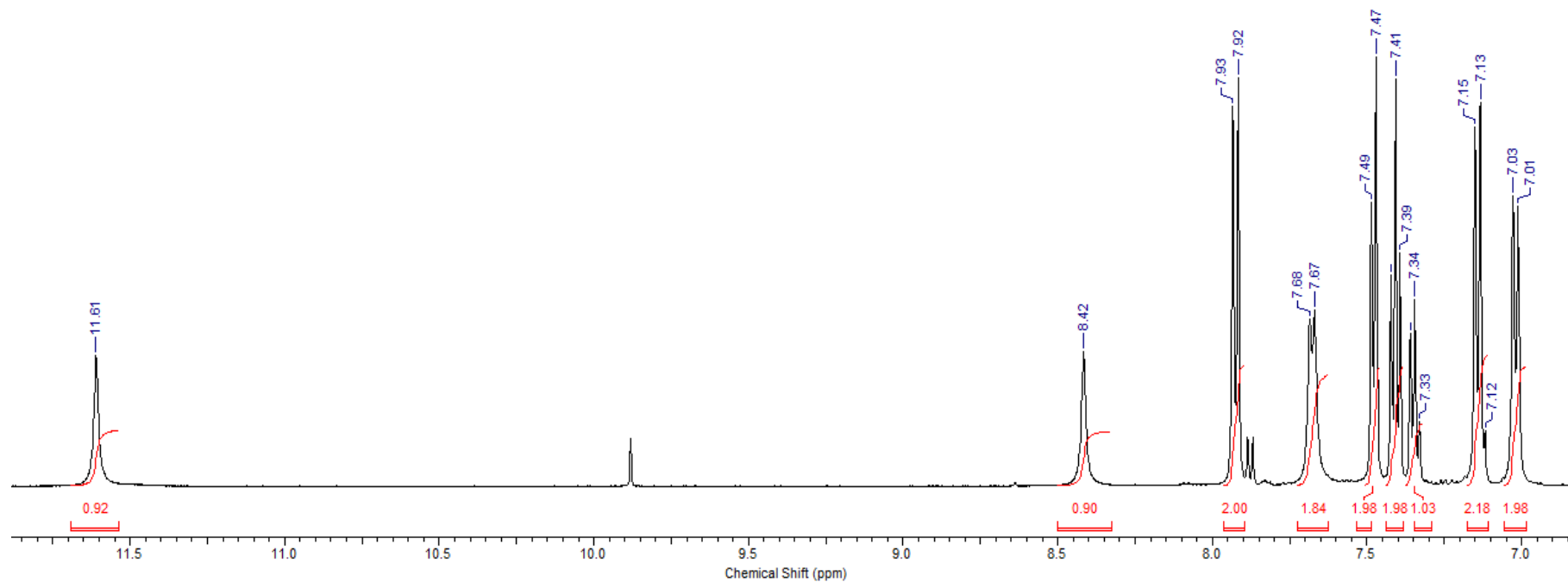
**Figura 31:** Espectro de massas do composto **4**.



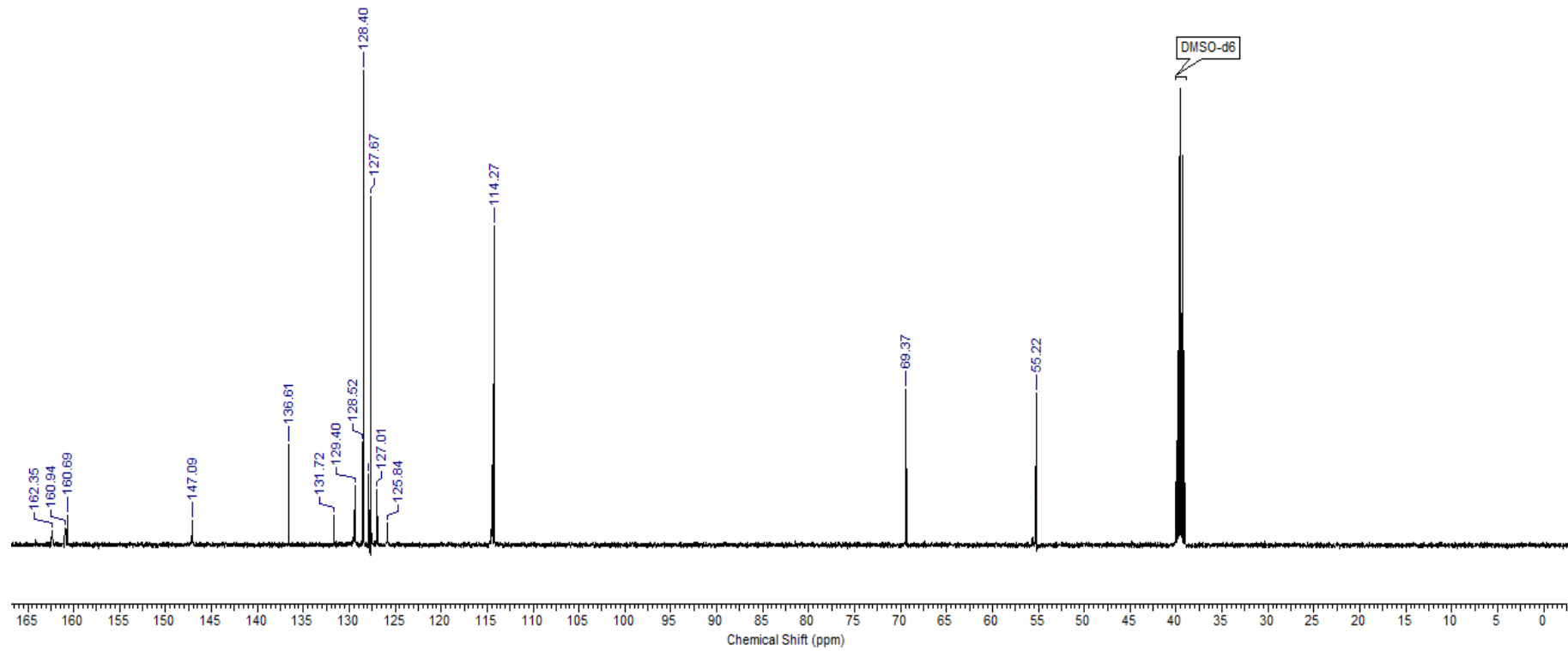
**Figura 32-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **4** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



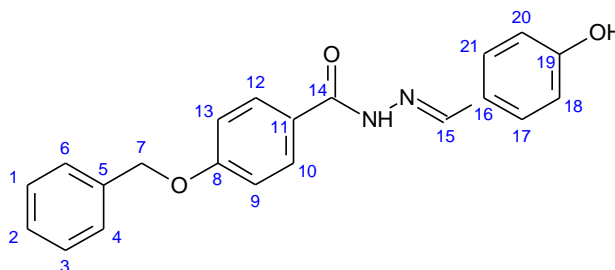
**Figura 32-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **4** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 33:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **4** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).



## Síntese da 4-(benziloxi)-[(*E*)-(4-hidroxifenil)metilideno]benzohidrazida (5)



Foram utilizados 122 mg (1 mmol) de 4-hidroxibenzaldeído e 242 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série B. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (346,37 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 212,7 – 213,9°C

Rendimento: 48,3%

### Dados espectroscópicos:

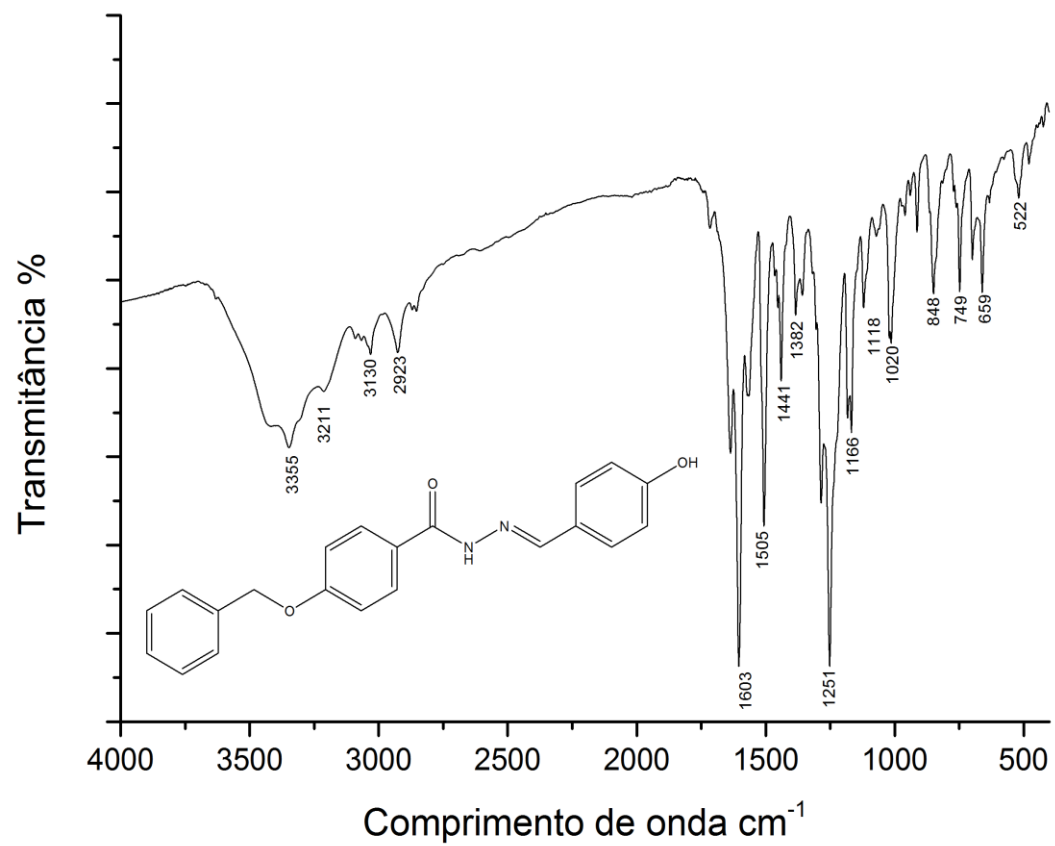
IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1166 e 1251; (C=N) 1505; (C=O) 1603; (N-H) 3211; (OH) 3355.

EM (m/z): [M<sup>+</sup>] 346; Fragmentos: 255; 227; 211; 135; 91.

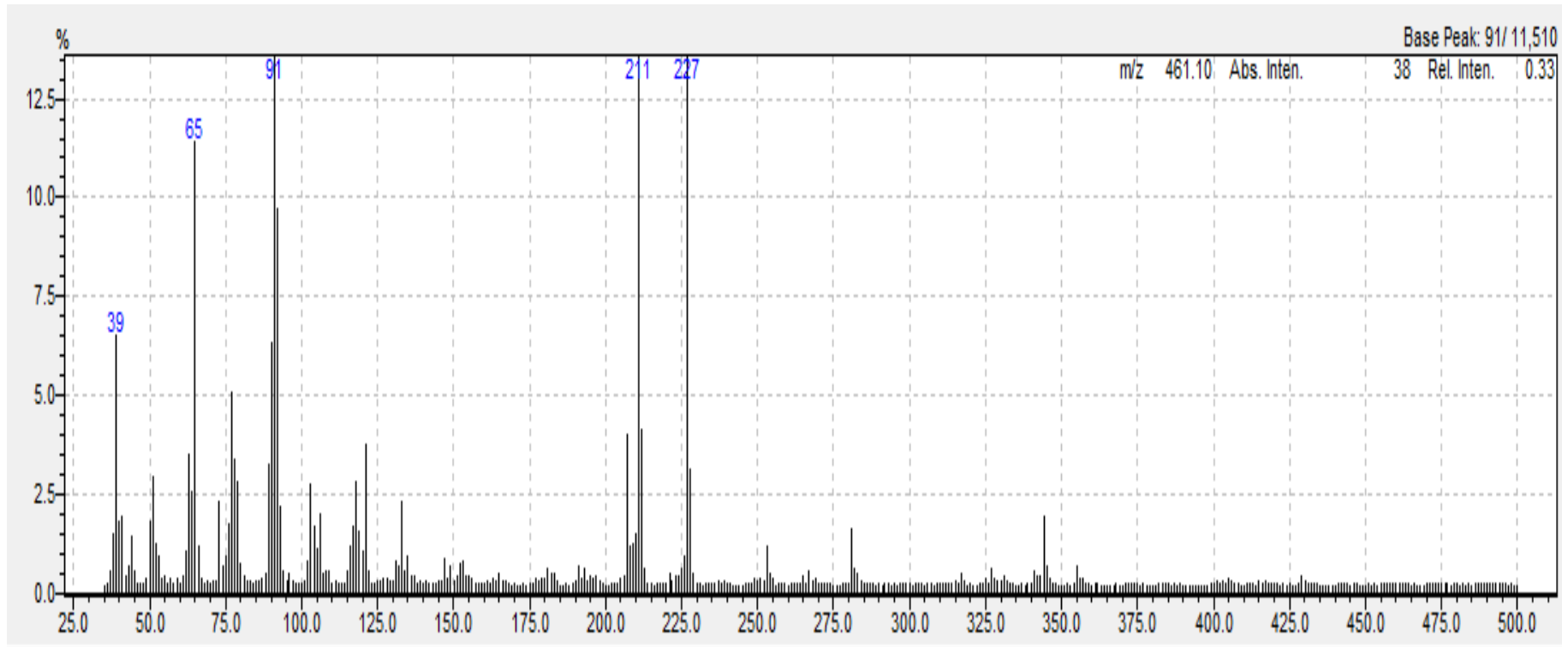
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5,20 (m, 3H – 7) δ 6,84 (d, 2H – 18 e 20) δ 7,13 (d, 2H – 9 e 13) δ 7,35 (m, 1H - 2) δ 7,41 (m, 2H - 1 e 3) δ 7,47 (m, 2H – 4 e 6) δ 7,55 (d, 2H – 17 e 21) δ 7,9 (m, 2H – 12 e 10) δ 8,34 (s, 1H – 15) δ 9,9 (s, 1H – OH) δ 11,52 (s, NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 69,38 (C-7) 114,49 (C16) 114,80 (C-17 e 21) 115,67 (C- 18 e 20) 125,42 (C-11) 127,79 (C- 4 e 6) 127,92 (C-2) 128,45 (C-10, 12) 128,71 (C- 1 e 3) 130,5 (C-17 e 21) 131,31 (C-5) 136,66 (C-15) 147,53 (C-19) 159,29 (C-14) 160,31(C-8).

**Figura 34:** Espectro na região do IV do composto **5** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



**Figura 35:** Espectro de massas do composto **5**.



**Figura 36-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

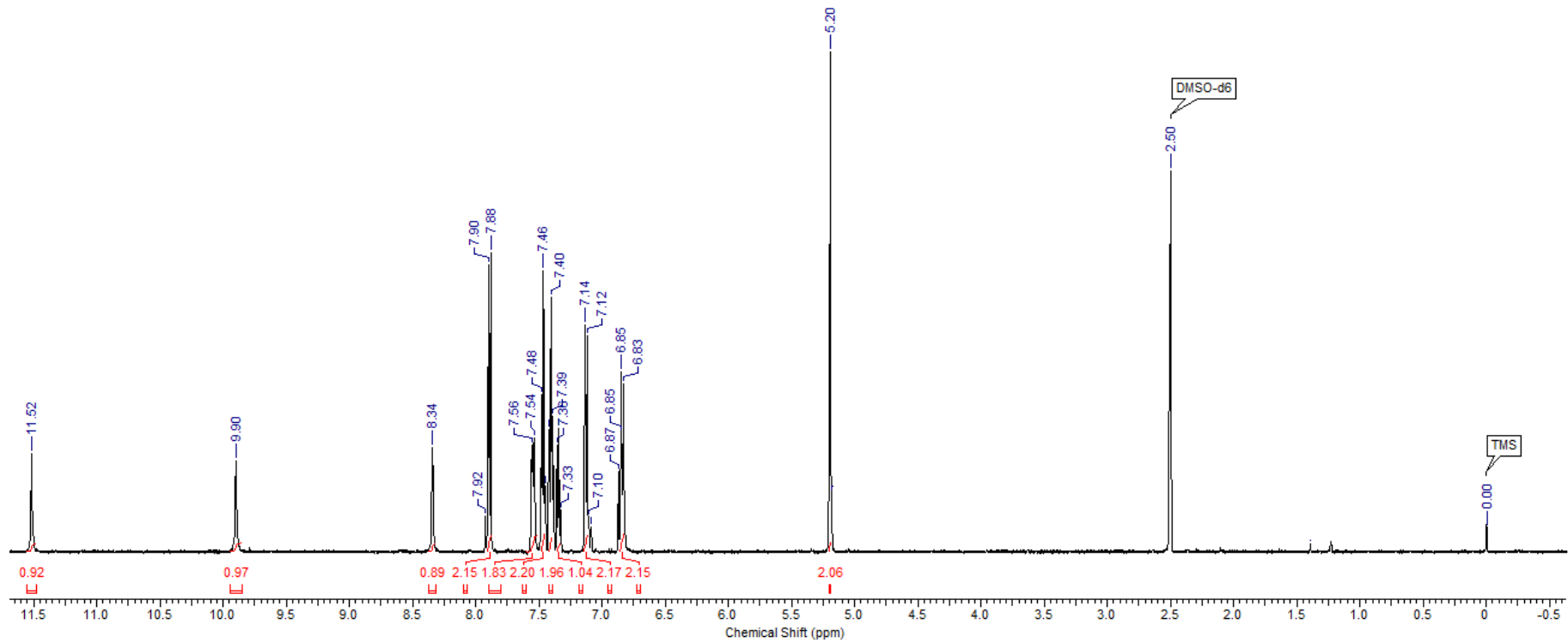
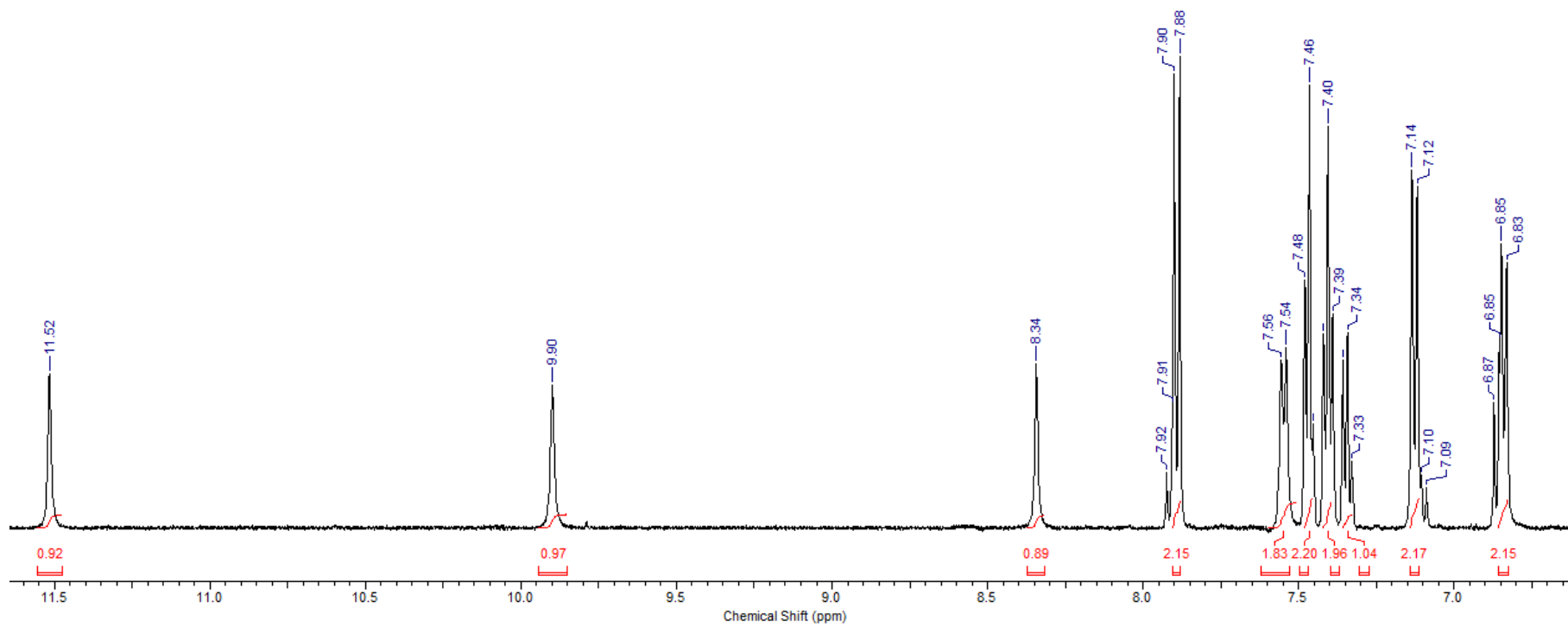
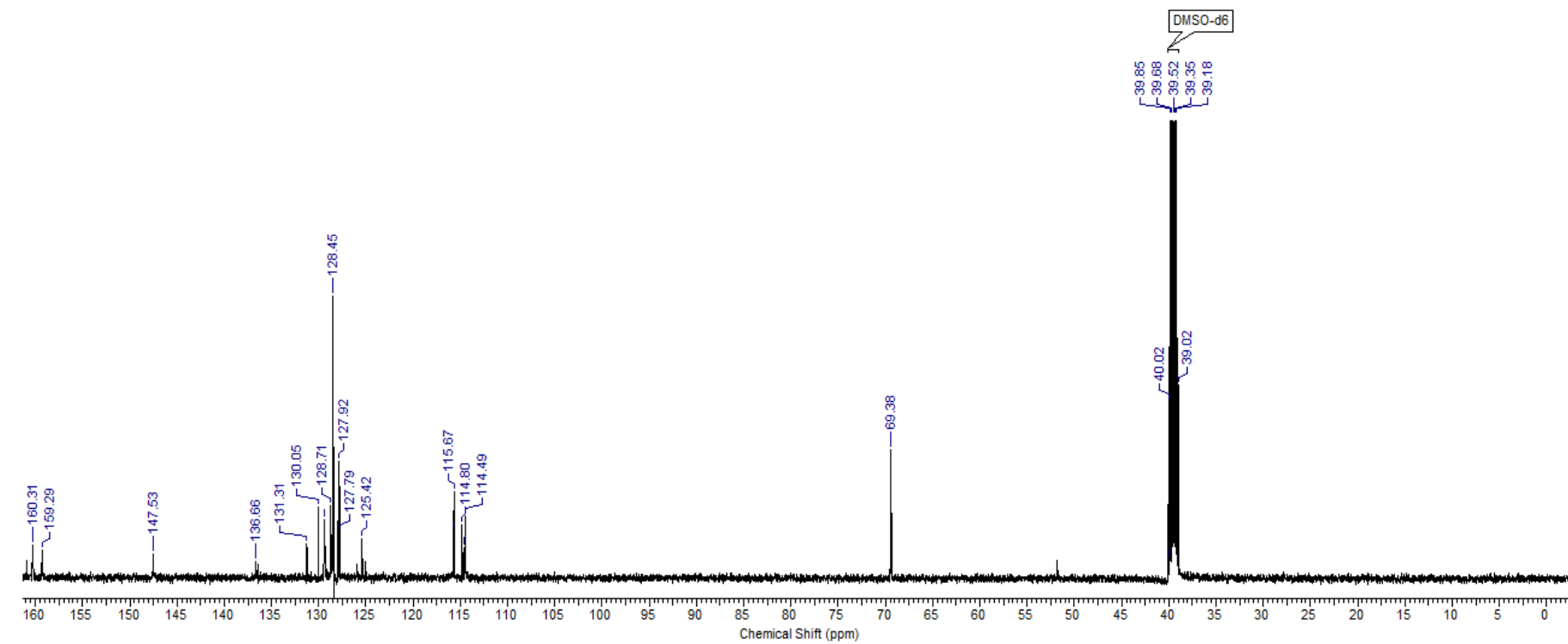


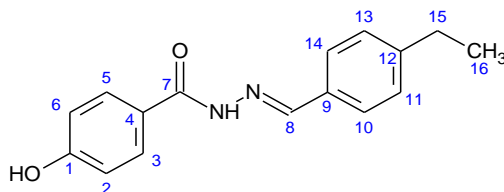
Figura 36-b: Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 37:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **5** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).



## Síntese da [(*E*)-(4-etilfenil)metilideno]-4-hidrozigibenzohidrazida (6)



Foram utilizados 134 mg (1 mmol) de 4-etilbenzaldeído e 152,15 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série A. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (268,31 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 186,1 – 188,7°C

Rendimento: 67,8%

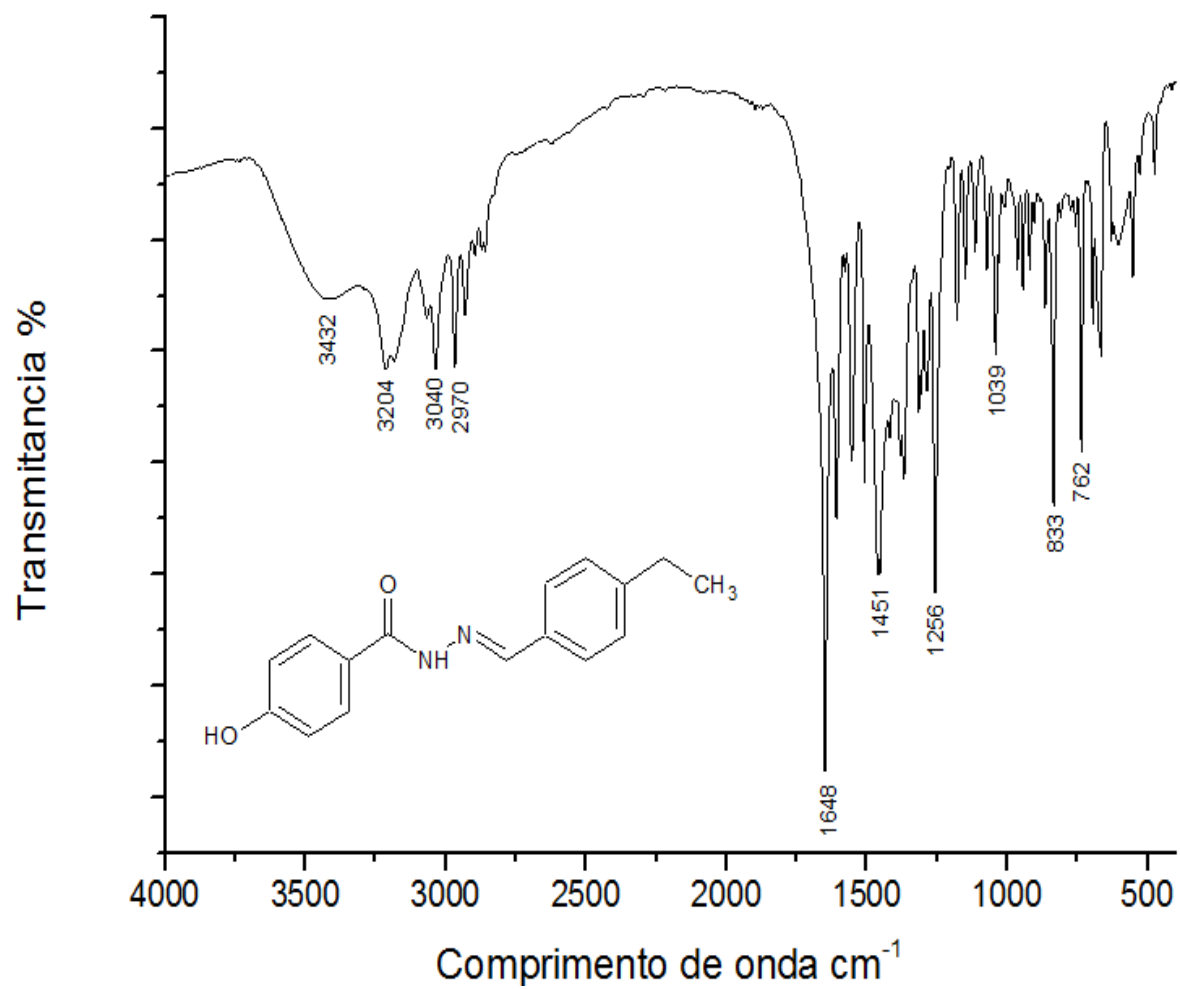
### Dados espectroscópicos:

IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1256; (C=N) 1451; (C=O) 1648; (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) 2970 e 3040; (N-H) 3204, (O-H) 3432.

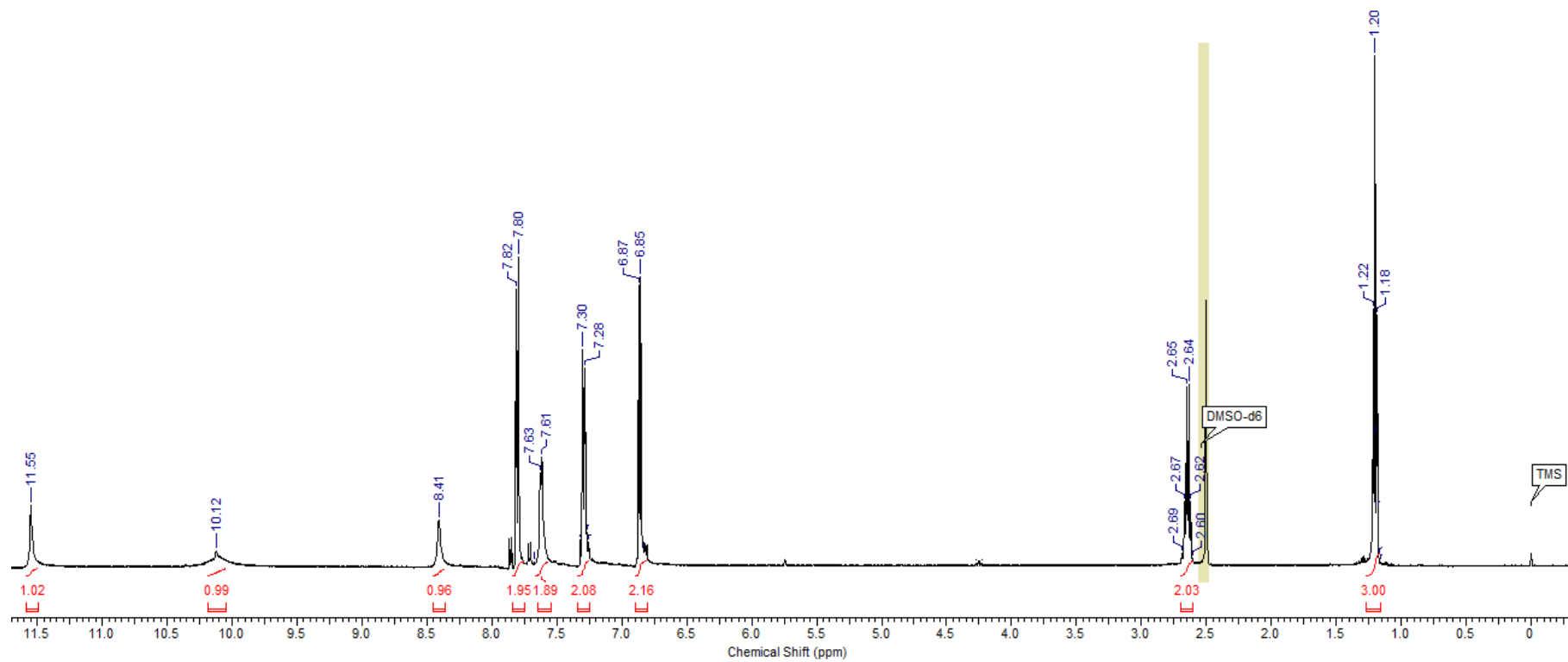
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,19 (t, 3H – 16) δ 2,64 (q, 2H – 15) δ 6,84 (d, 2H – 2 e 6) δ 7,29 (d, 2H – 11 e 13) δ 7,62 (d, 2H – 10 e 14) δ 7,81 (d, 2H – 3 e 5) δ 8,41 (s, 1H – 11) δ 10,12 (s, 1H – OH) δ 11,55 (s, NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): 15,24 (C-16) 28,01 (C-15) 114,92 (C-2 e 6) 123,93 (C-4) 126,95 (C-10 e 14) 128,16 (C-11 e 13) 129,07 (C-3 e 5) 129,56 (C-9) 132,04 (C-12) 145,78 (C-8) 146,85 (C-1) 160,54 (C-7).

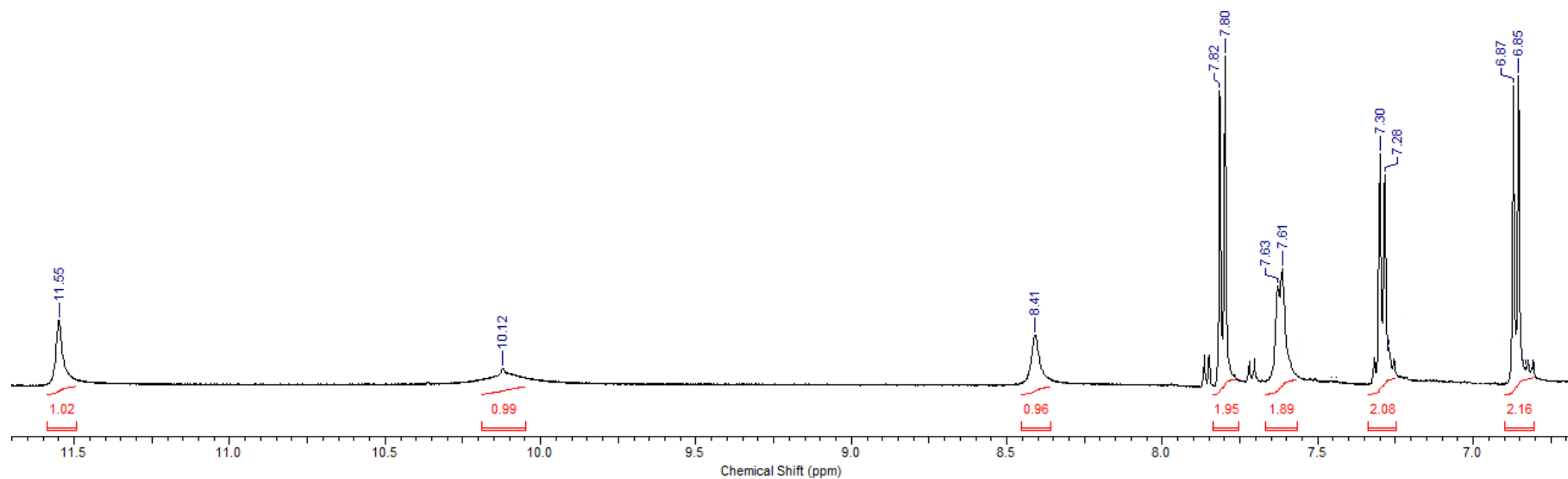
**Figura 38:** Espectro na região do IV do composto **6** ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ )



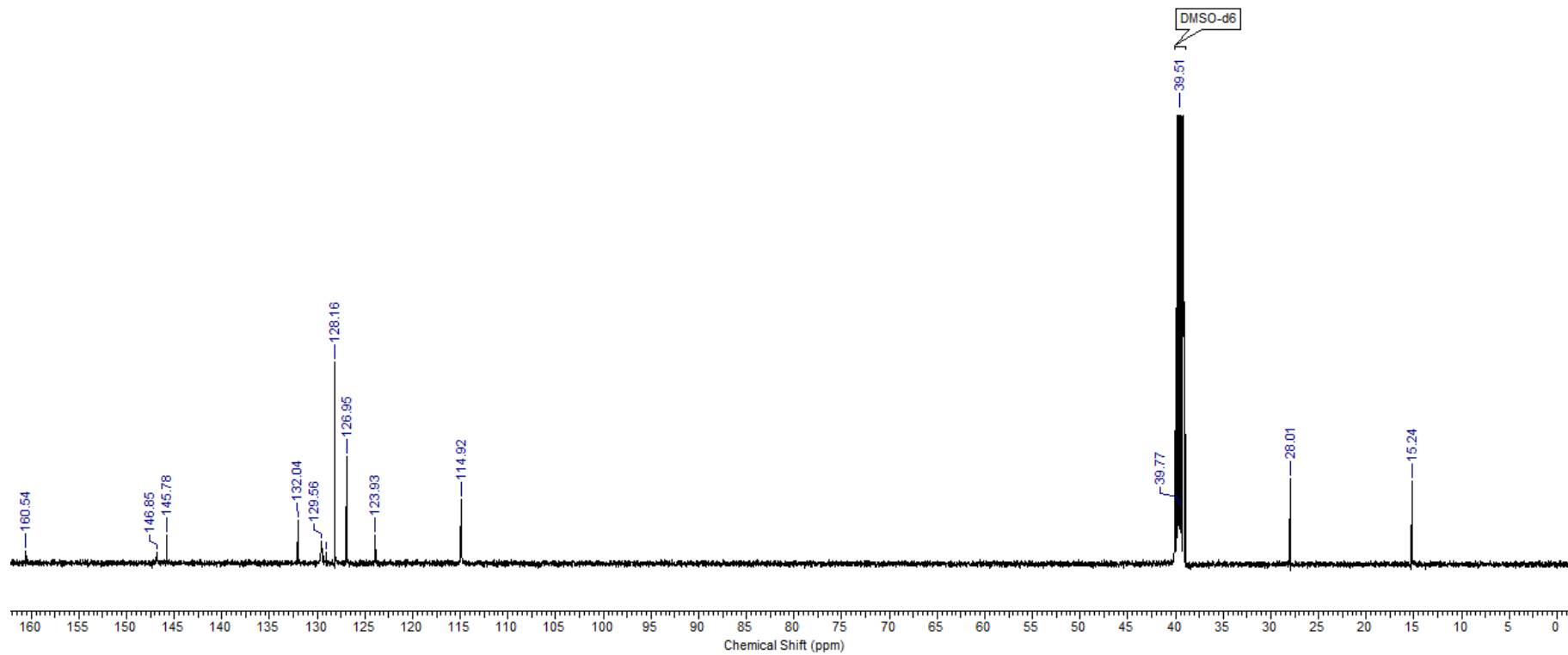
**Figura 39-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **6** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



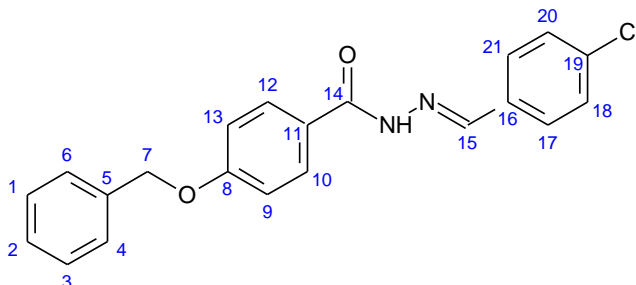
**Figura 39-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **6** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 40:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **6** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).



## Síntese da 4-(benziloxi)-[(*E*)-(4-clorofenil)metilideno]benzohidrazida (7)



Foram utilizados 140 mg (1 mmol) de 4-clorobenzaldeído e 242 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série B. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (364,83 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 212,1,1 – 214,3°C

Rendimento: 46%

### Dados espectroscópicos:

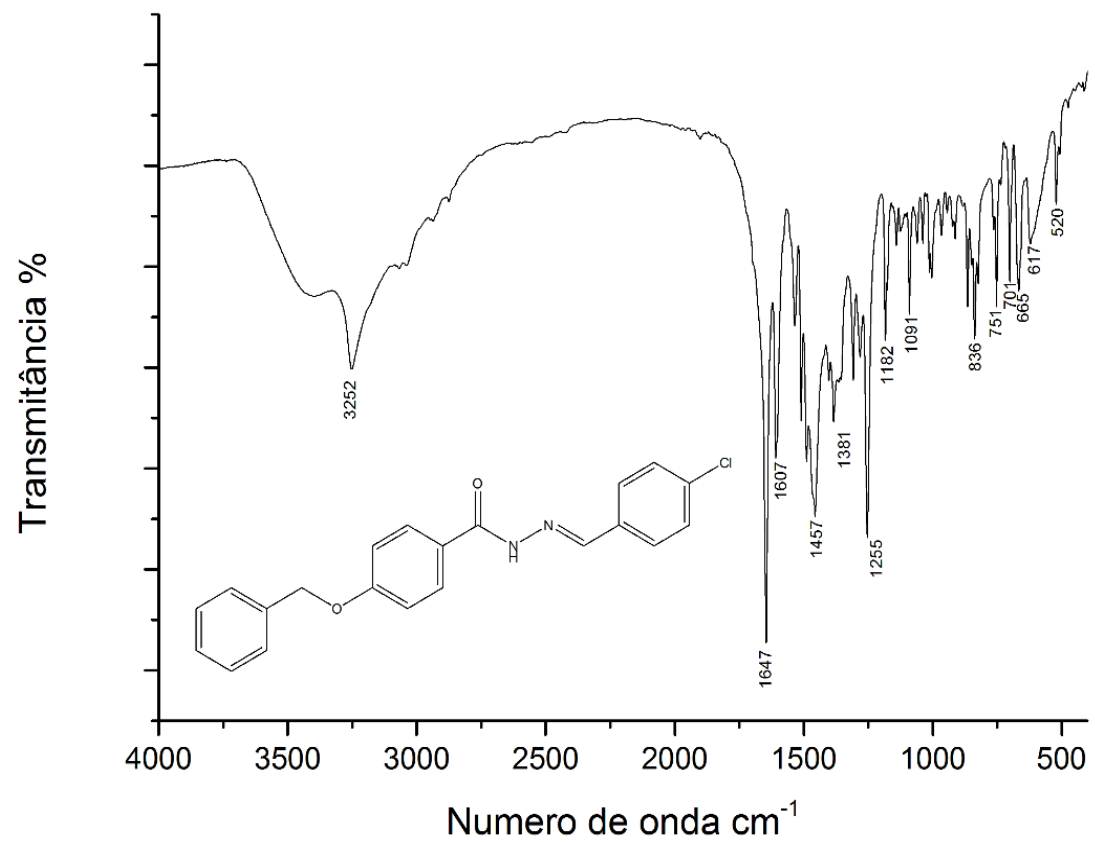
IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1182 e 1255; (C=N) 1607; (C=O) 1647; (N-H) 3252.

EM (m/z): [M<sup>+</sup>] 364; Fragmentos: 273; 227; 211; 153; 91.

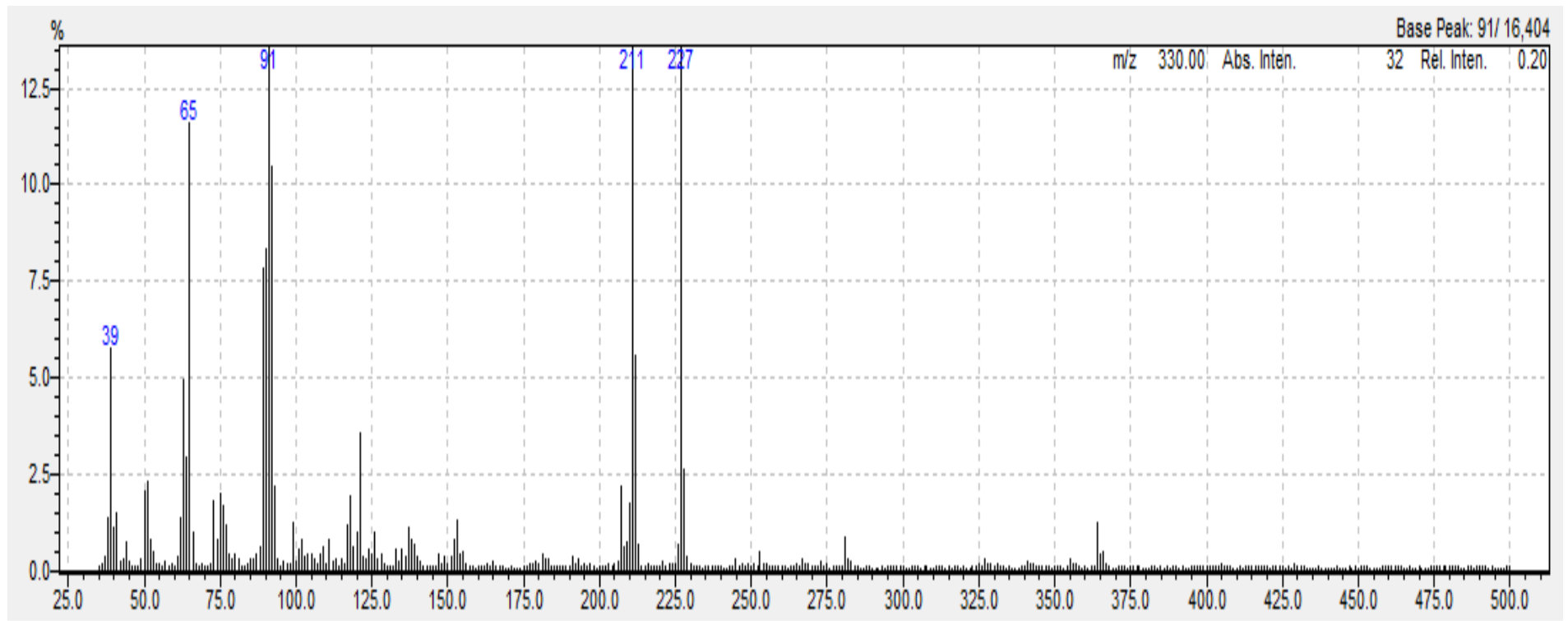
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5,20 (s, 2H – 7) δ 7,14 (d, 2H – 9 e 13) δ 7,34 (m, 1H - 2) δ 7,41 (m, 2H – 1 e 3) δ 7,47 (m, 2H – 4 e 6) δ 7,52 (d, 2H – 18 e 20) δ 7,91 (d, 2H – 17 e 21) δ 8,43 (s, 1H - 15) δ 11,76 (s, 1H- NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): 69,39 (C-7) 114,53 (C- 9 e 13) 125,53 (C-11) 127,68 (C- 4 e 6) 127,90 (C-2) 128,41 (C- 1 e 3) 128,55 (C17 e 21) 128,85 (C-18 e 20) 129,49 (C-10 e 12) 133,37 (C-16) 134,28 (C-5) 136,57 (C-20 e 18) 145,78 (C-15) 161,07 (C-14) 162,54 (C-8).

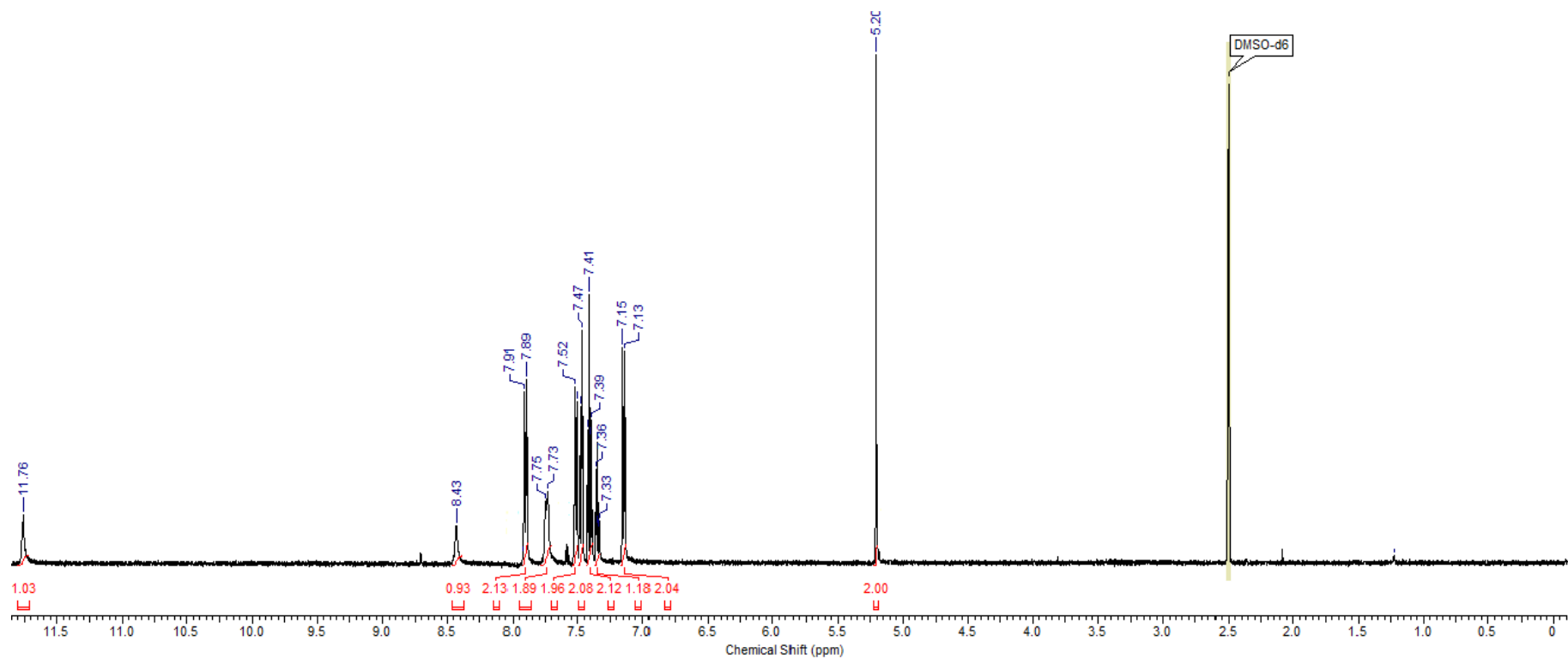
**Figura 41:** Espectro na região do IV do composto **7** ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ )



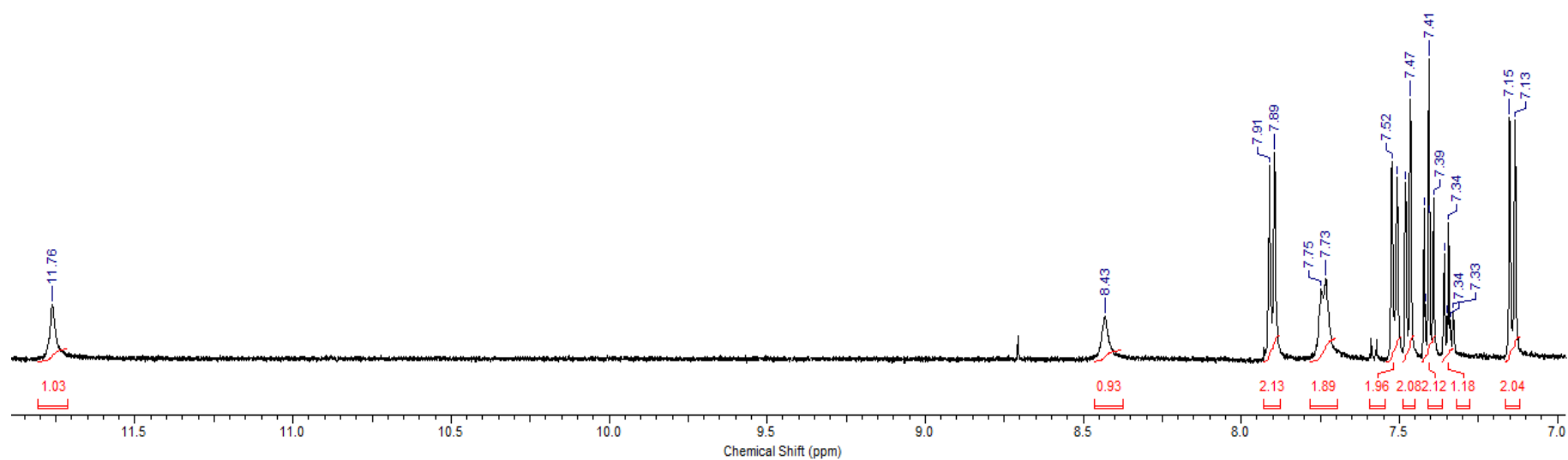
**Figura 42:** Espectro de massas do composto 7.



**Figura 43-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **7** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



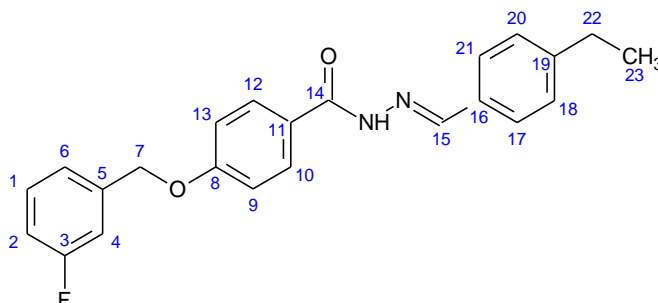
**Figura 43-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **7** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 44:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **7** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).



**Síntese da [(E)-(4-etilfenil)metilideno]-4-[(3-fluorobenzil)oxy]benzohidrazida (8)**



Foram utilizados 134 mg (1 mmol) de 4-clorobenzaldeído e 260 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (376,42 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 187,9 – 189,7°C

Rendimento: 52,7%

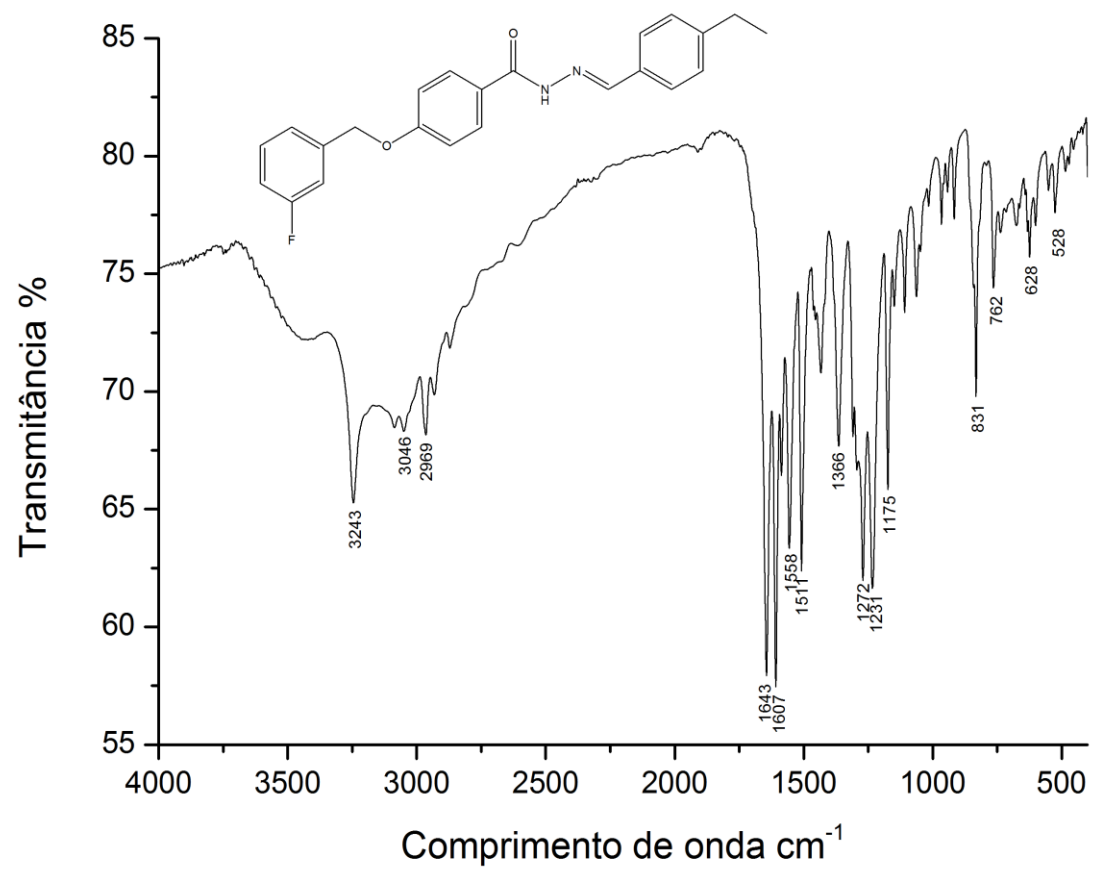
**Dados espectroscópicos:**

IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1175 e 1272; (C-F) 1366; (C=N) 1558; (C=O) 1643; (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) 2969 e 3046; (N-H); 3243.

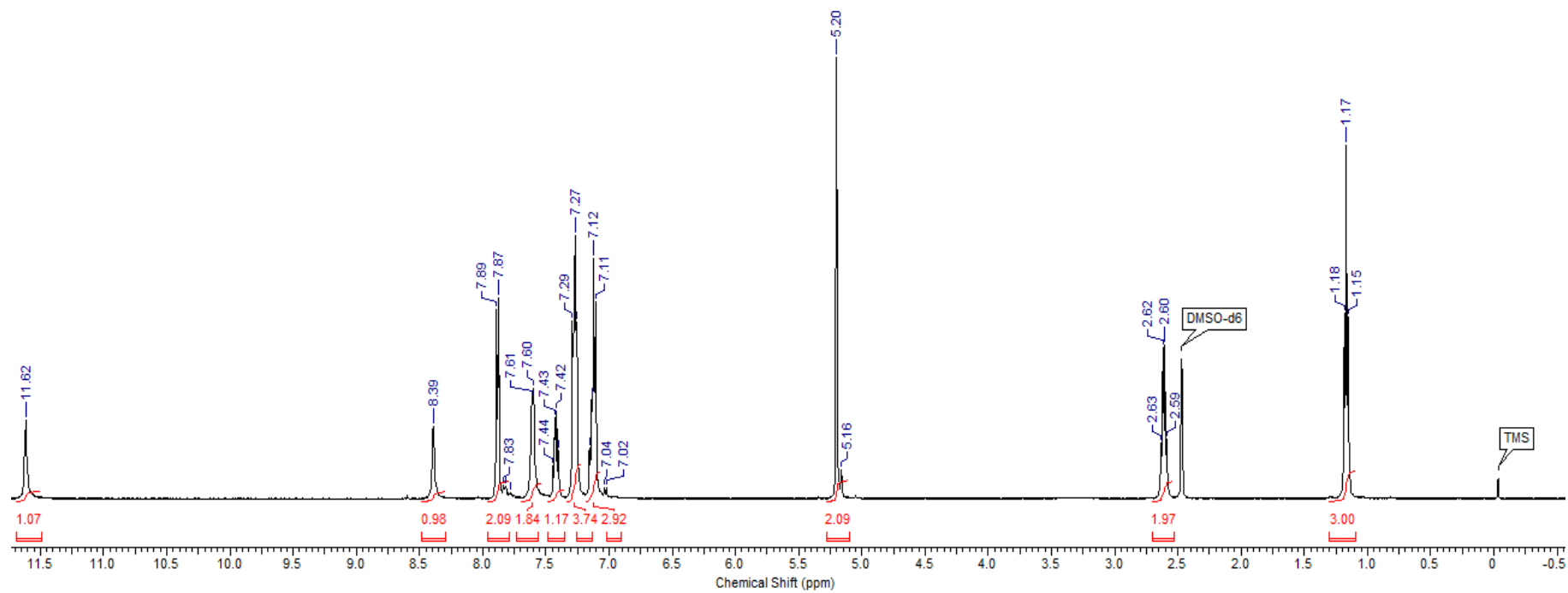
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,17 (t, 3H – 23) δ 2,61 (q, 2H – 22) δ 5,20 (s, 2H – 07) δ 7,13 (m, 3H – 6, 9 e 13) δ 7,27 (m, 4H – 2, 4, 18 e 20) δ 7,42 (m, 1H – 1) δ 7,61 (d, 2H – 17 e 21) δ 7,88 (d, 2H – 10 e 12) δ 8,39 (s, 1H - 15) δ 11,62 (s, 1H- NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): δ 15,24 (C-23) δ 28,01 (C-22) 68,49 (C-7) 114,15 (C-2) 114,31 (C-4) 114,54 (C-9) 114,71 (C-13) 123,52 (C- 6) 127, 01(C- 11) 128,18 (C- 17 e 21) 129,46 (C- 18 e 20) 130,42 (C-10 e 12) 130,50 (C- 1) 131,95 (C-16) 139,54 (C- 5) 139,60 (C-19) 145,91 (C-15) 147,26 (C-3) 161,19 (C-14) 163,14 (C-8).

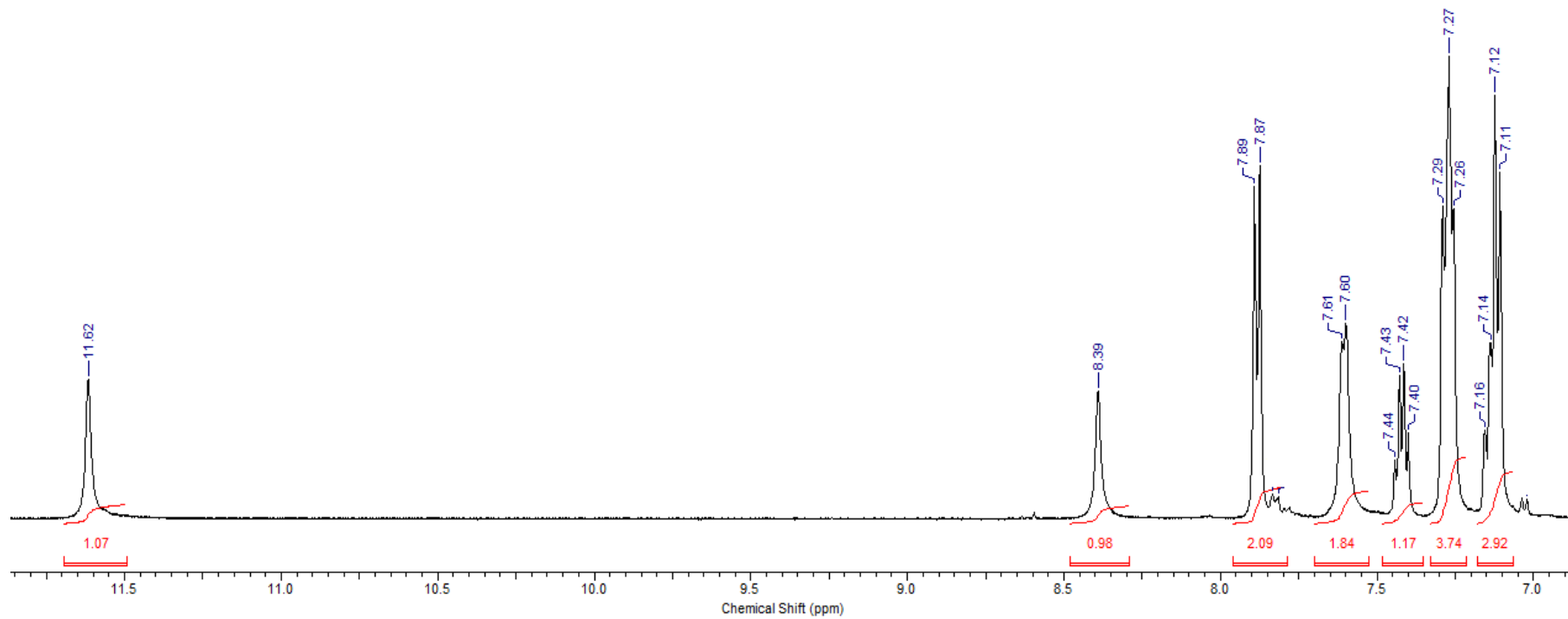
**Figura 45:** Espectro na região do IV do composto **8** ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ )



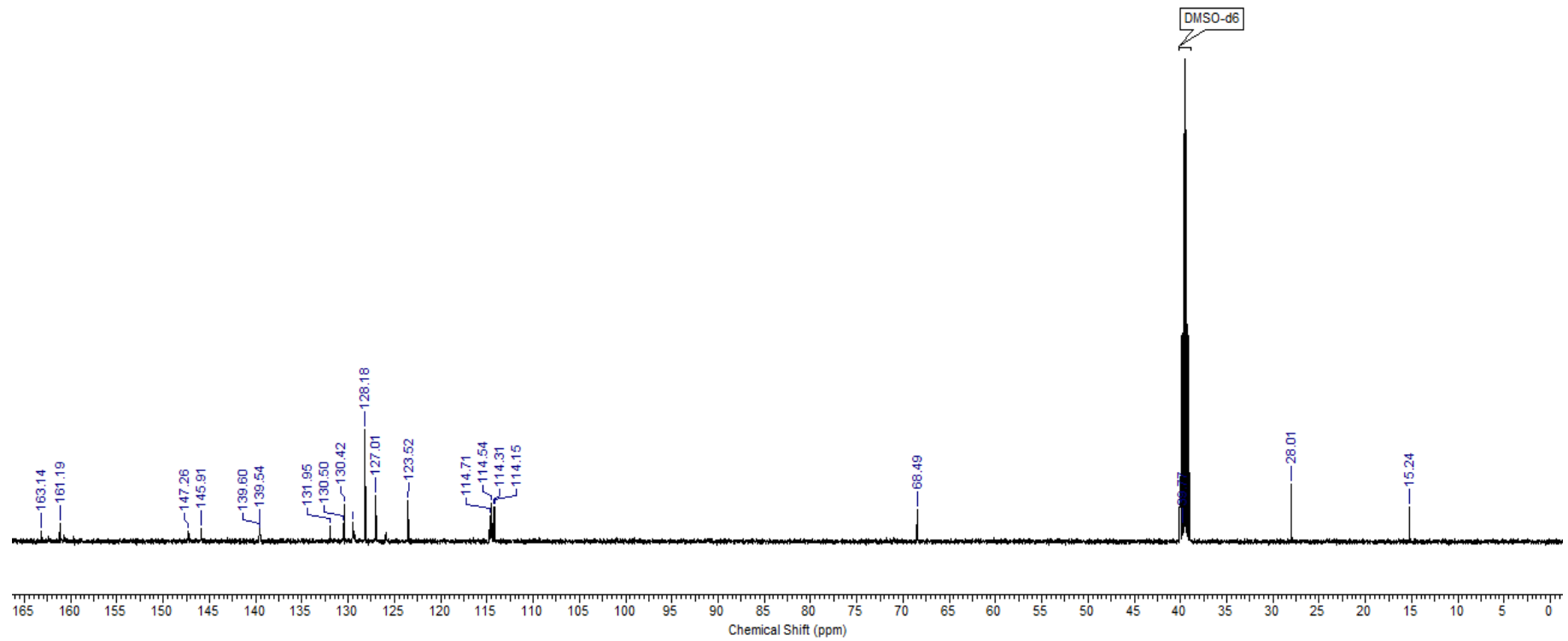
**Figura 46-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **8** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



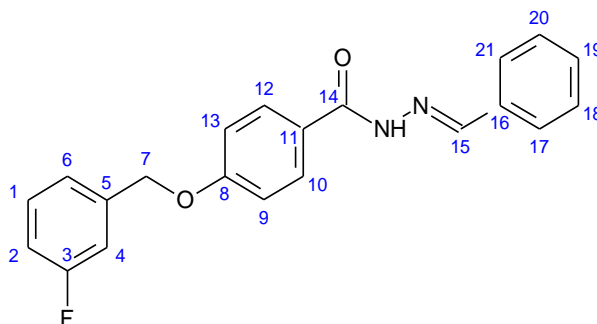
**Figura 46-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **8** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 47:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **8** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).



## Síntese da 4-[(3-fluorobenzil)oxi]-[(*E*)-fenilmetilideno]benzohidrazida (9)



Foram utilizados 106 mg (1 mmol) de benzaldeído e 260 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (348,37 g/mol)

Coloração: bege

Faixa de fusão: 181,7 – 182,5°C

Rendimento: 76%

### Dados espectroscópicos:

IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1183 e 1251; (C-F) 1363; (C=N) 1532; (C=O) 1642; (N-H); 3254.

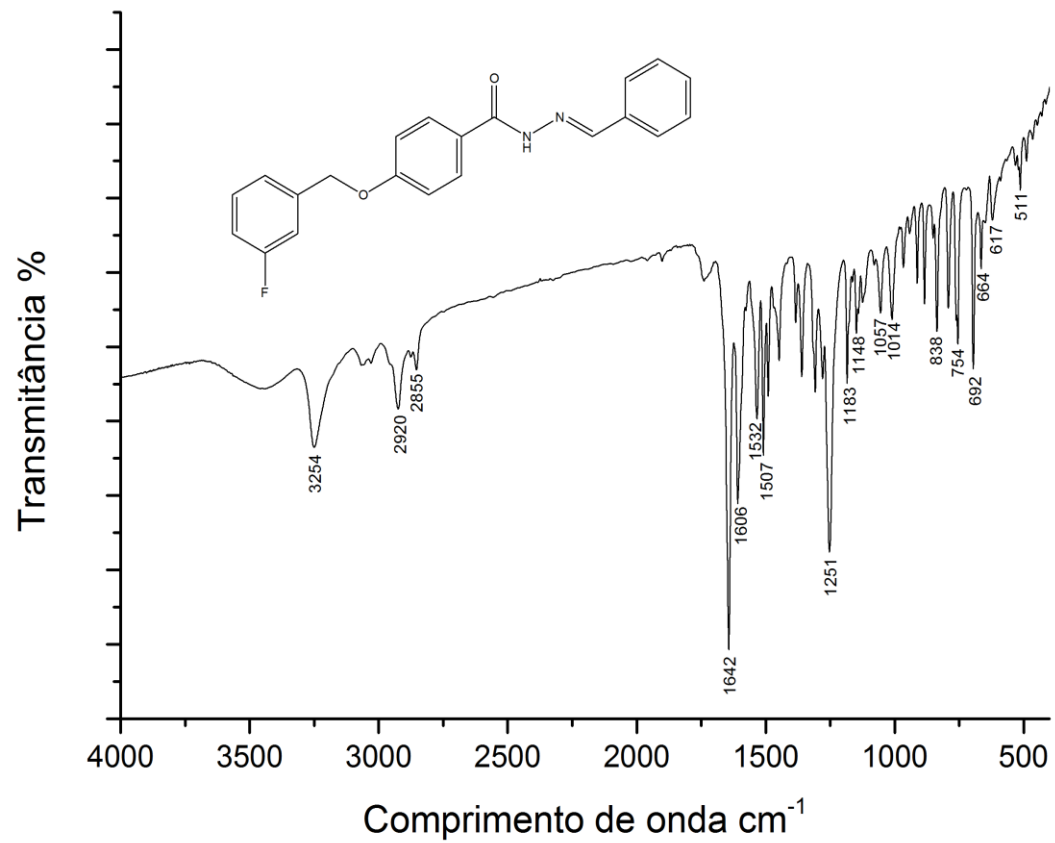
EM (m/z): [M<sup>+</sup>] 348; Fragmentos: 239; 229; 119; 109.

RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5,23 (s, 2H – 7) δ 7,15 (m, 3H – 2, 9 e 13) δ 7,32 (d, 2H – 6 e 4) δ 7,45 (m, 4H – 1, 18, 19 e 20) δ 7,72 (d, 2H – 17 e 21) δ 7,91 (d, 2H – 10 e 12) δ 8,45 (s, 1H – 15) δ 11,74 (s, 1H – NH).

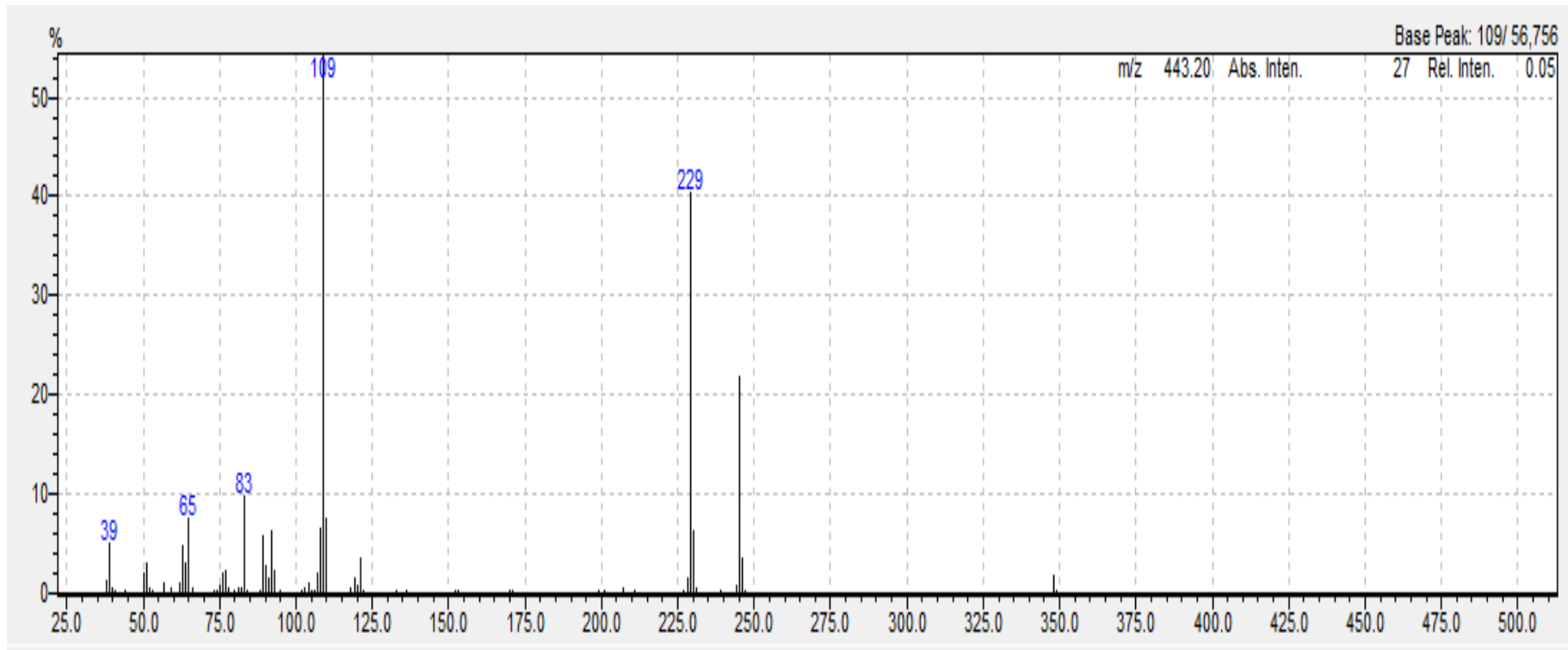
RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): 99,67 (C-7) 105,77 (C-2, 4, 9 e 13) 107,35 (C- 6) 107,99 (C- 11) 109,26 (C-17 e 21) 111,93 (C- 18 e 20) 115,20 (C-10 e 12) 115,72 (C-1) 121,92 (C-19) 122,13 (C-16) 122,41 (C-5) 134,80 (C-15) 135,07 (C-3) 143,58 (C-14) 151,69(C-8).



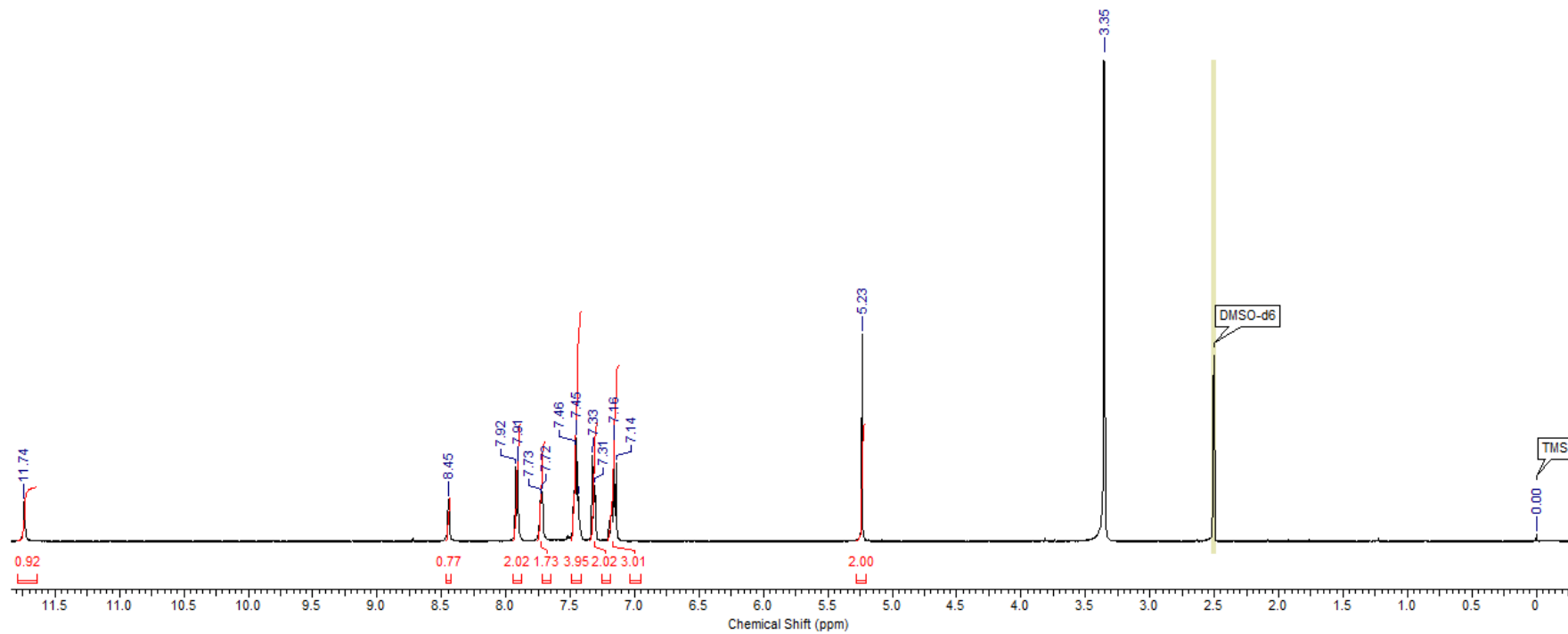
**Figura 48:** Espectro na região do IV do composto **9** ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ )



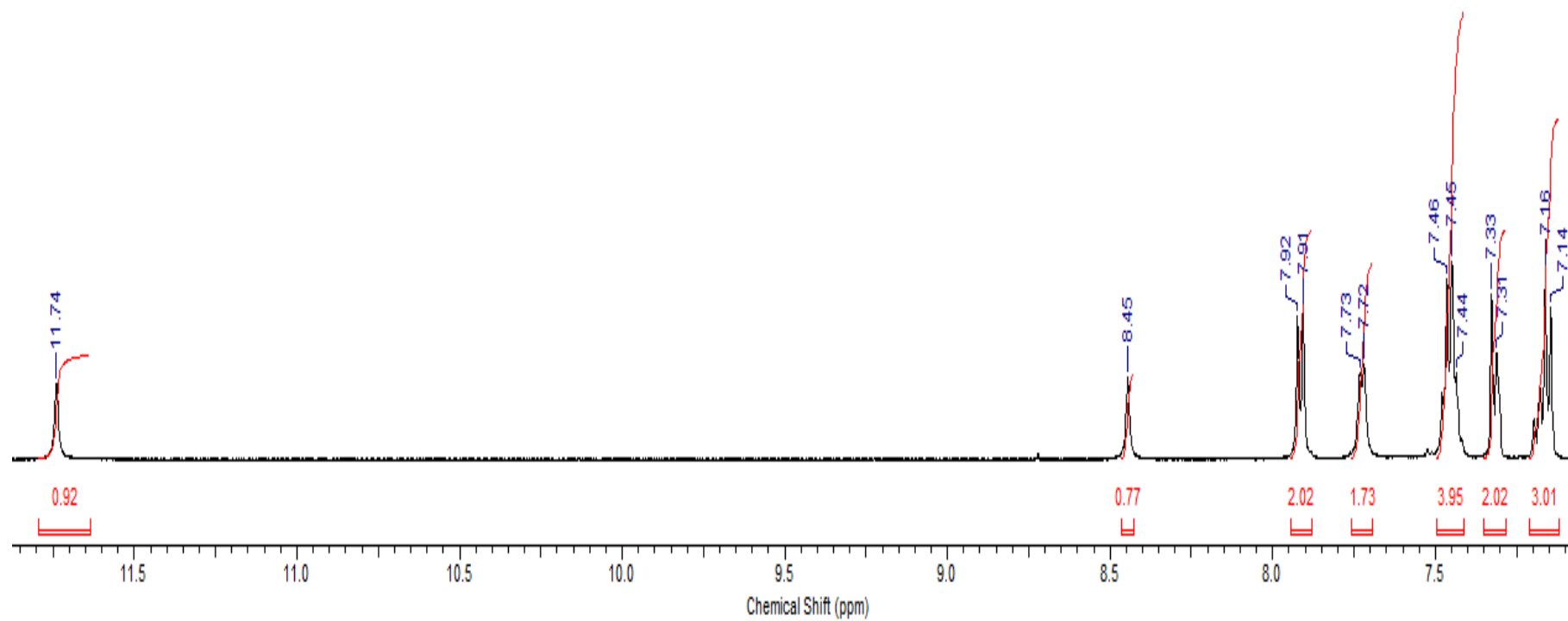
**Figura 49:** Espectro de massas do composto **9**.



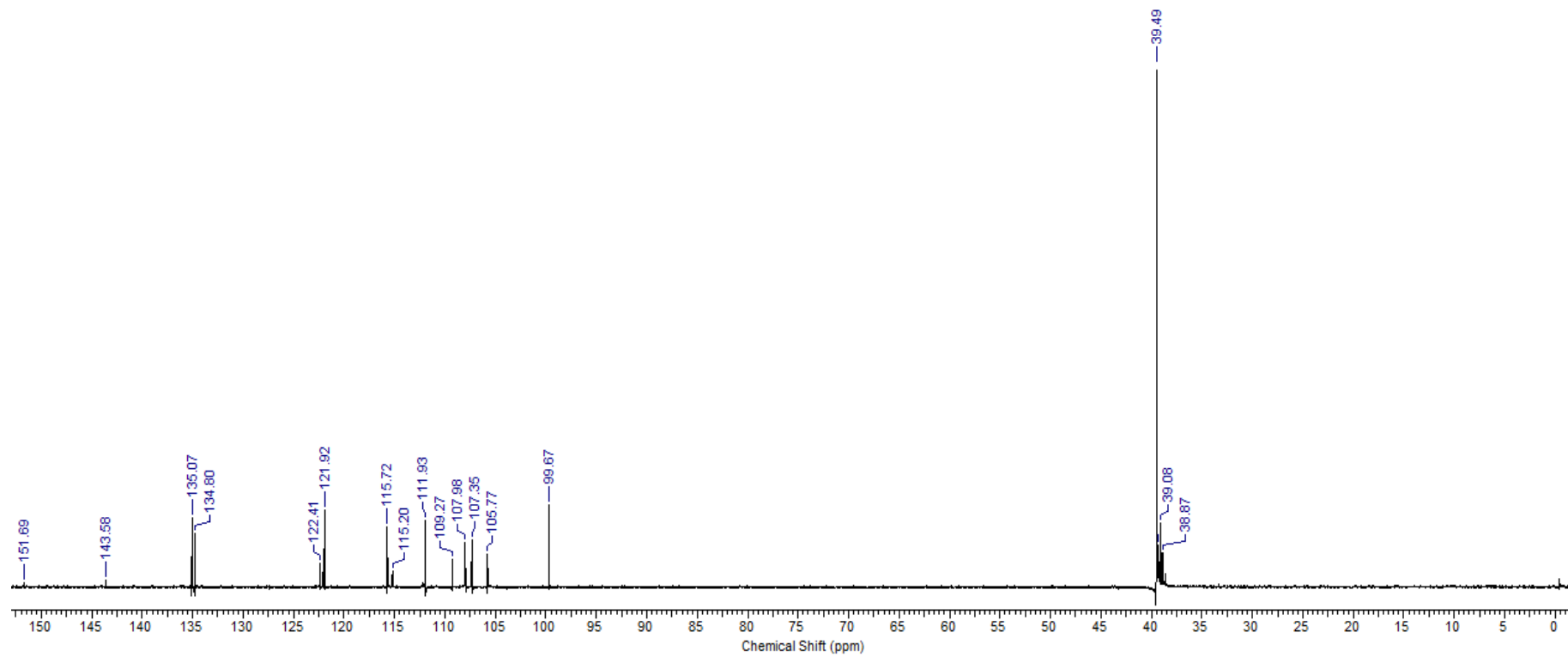
**Figura 50-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 50-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 51:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **9** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).





**Figura 52:** Espectro na região do IV do composto **10** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )

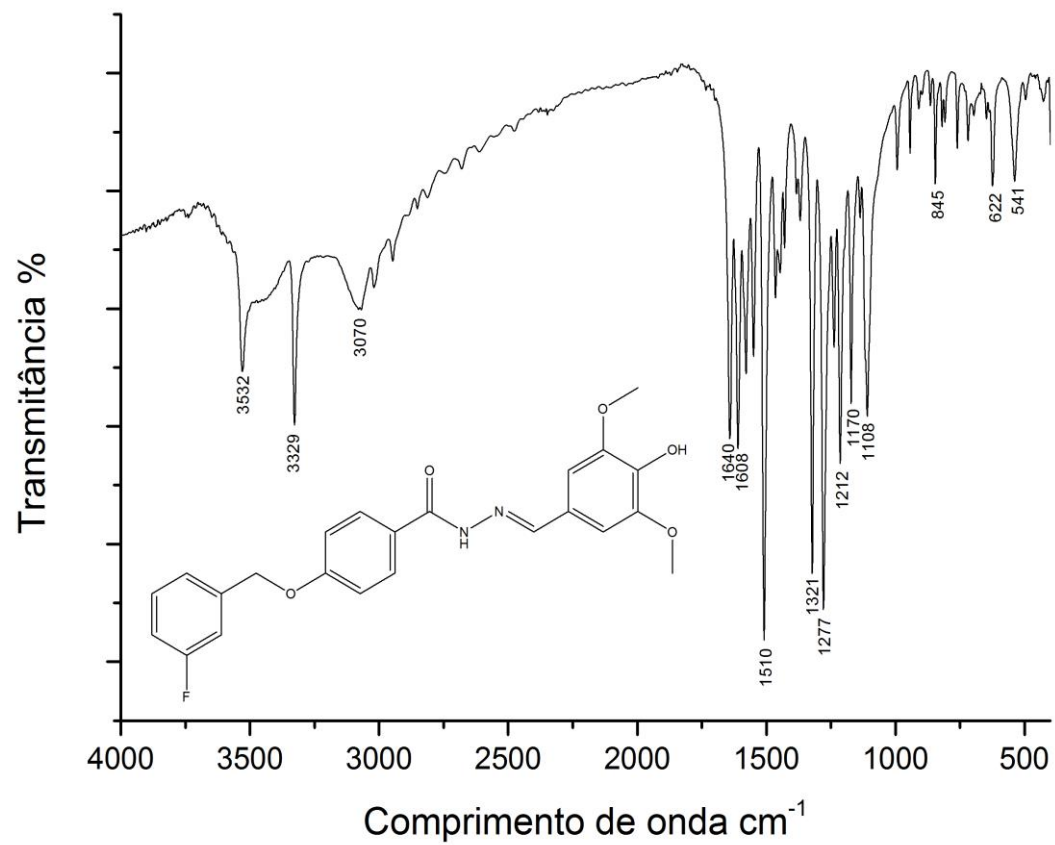
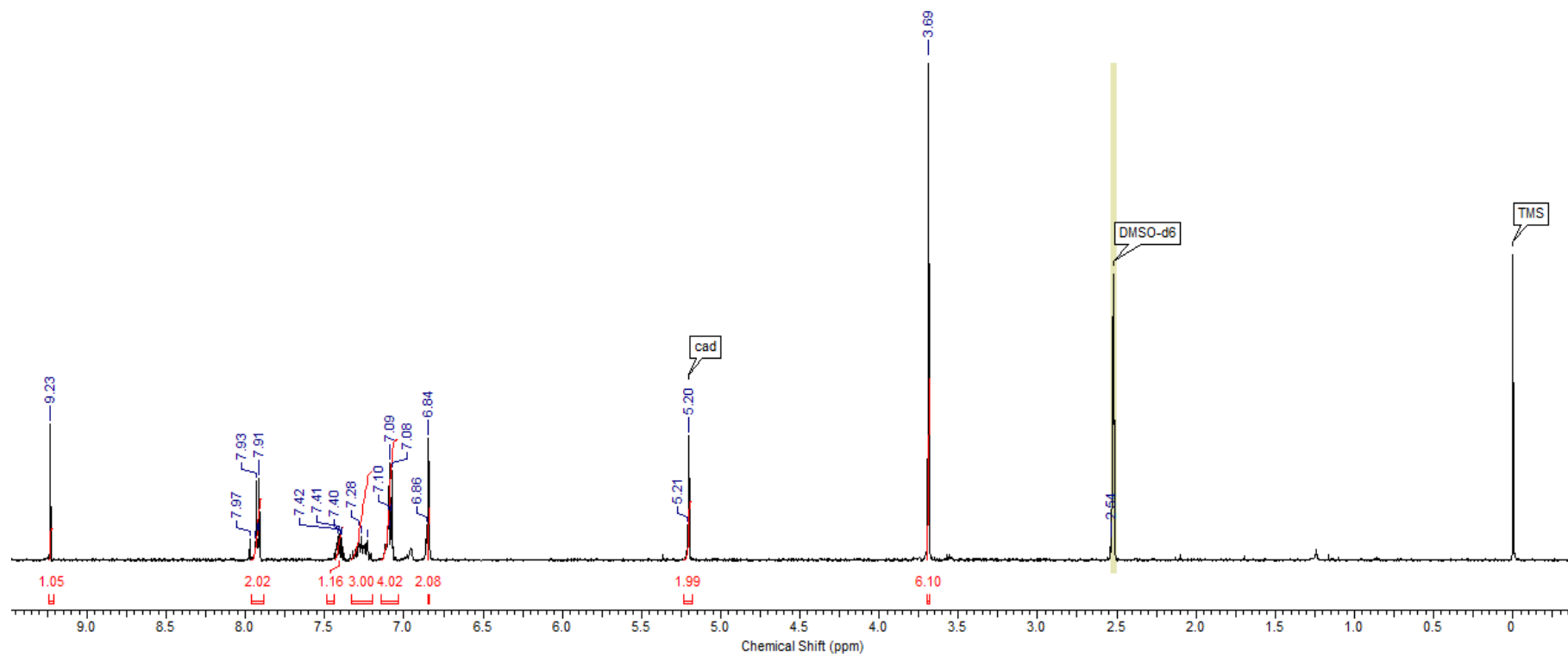
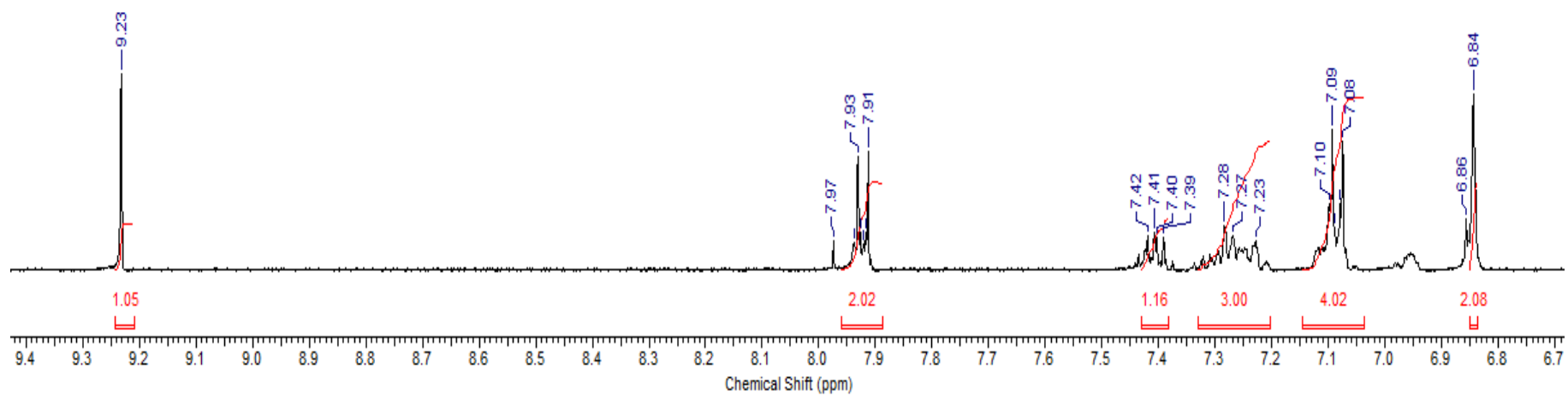


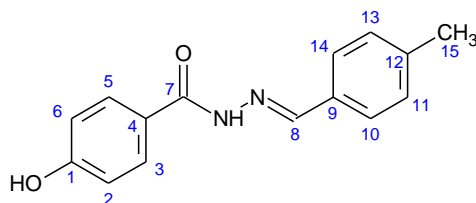
Figura 53-a: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **10** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 53-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **10** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



## Síntese da 4-[(3-fluorobenzil)oxi]-[(E)-(4-metilfenil)metilideno]benzohidrazida (11)



Foram utilizados 120 mg (1 mmol) de 4-metilbenzaldeído e 152,15 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série A. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (254,28 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 201,2 – 202,5°C

Rendimento: 61,3%

### Dados espectroscópicos:

IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1170 e 1280; (C=N) 1542; (C=O) 1626; (N-H) 3221; (OH) 3442.

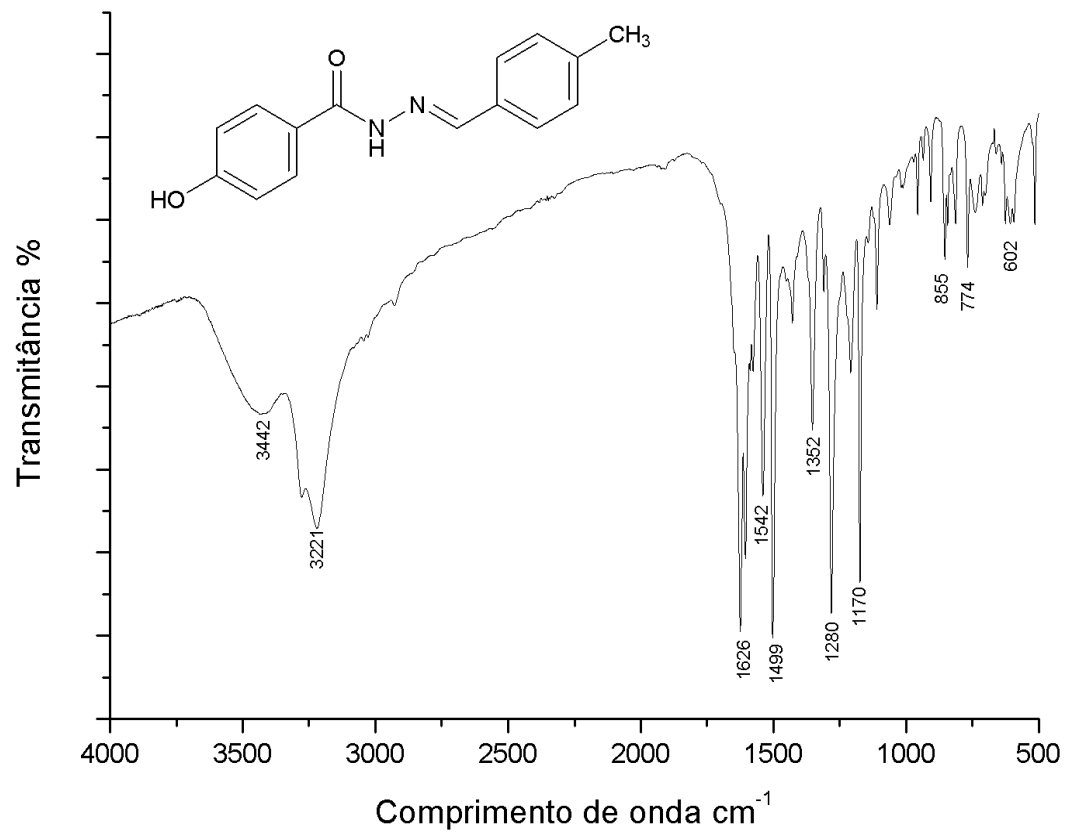
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,34 (s, 3H – 15) δ 6,85 (d, 2H – 2 e 6) δ 7,25 (d, 2H – 11 e 13) δ 7,60 (d, 2H - 10 e 14) δ 7,81 (d, 2H – 3 e 5) δ 8,41 (s, 1H – 8) δ 10,10 (s, 1H – OH) δ 11,55 (s, NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): δ 20,26 (C-15) 114,92 (C-2 e 6) 123,93 (C-4) 126,87 (C- 10 e 14) 129,33 (C-11 e 13) 129,37 (C-3 e 5) 131,45 (C-9) 131,80 (C-12) 139,56 (C-8) 146,89 (C-1) 160,57 (C-7).

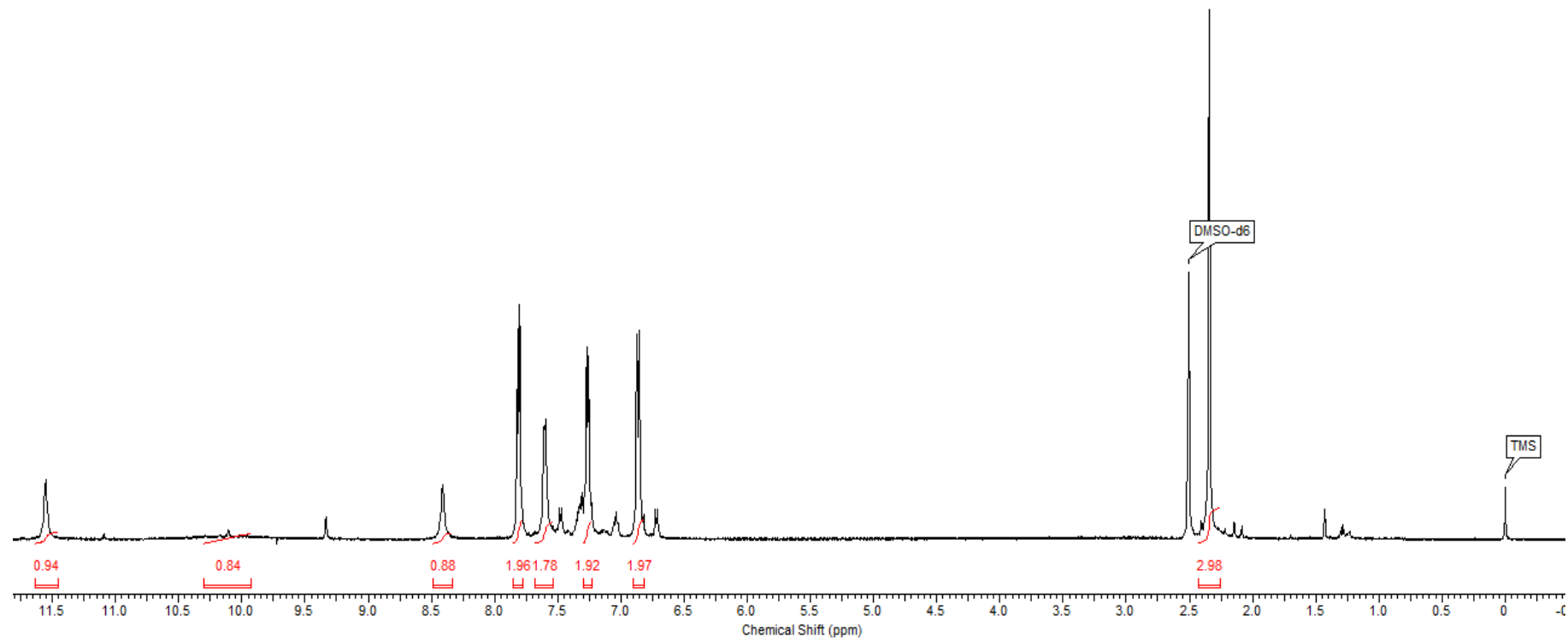




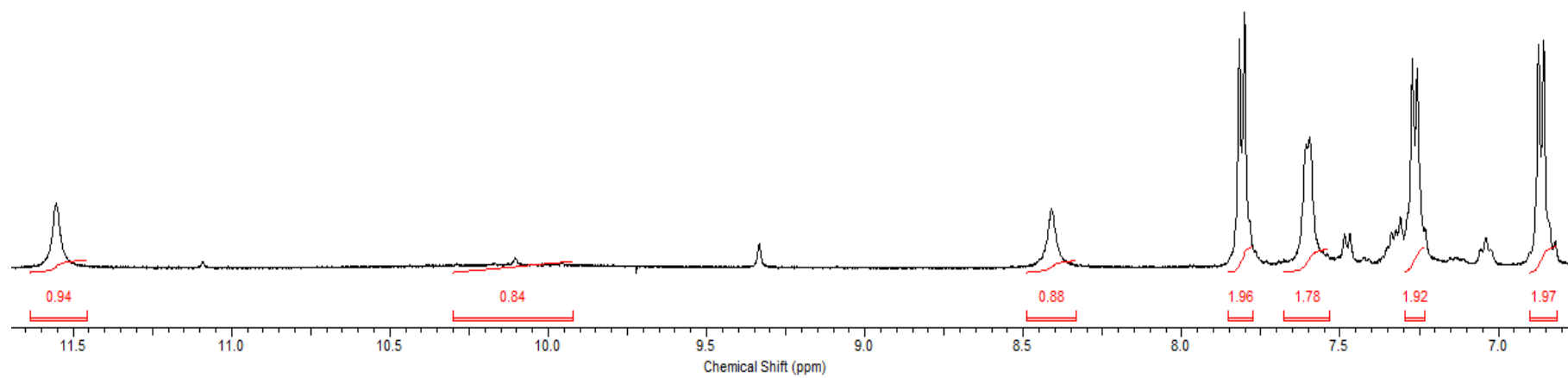
**Figura 54:** Espectro na região do IV do composto **11** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



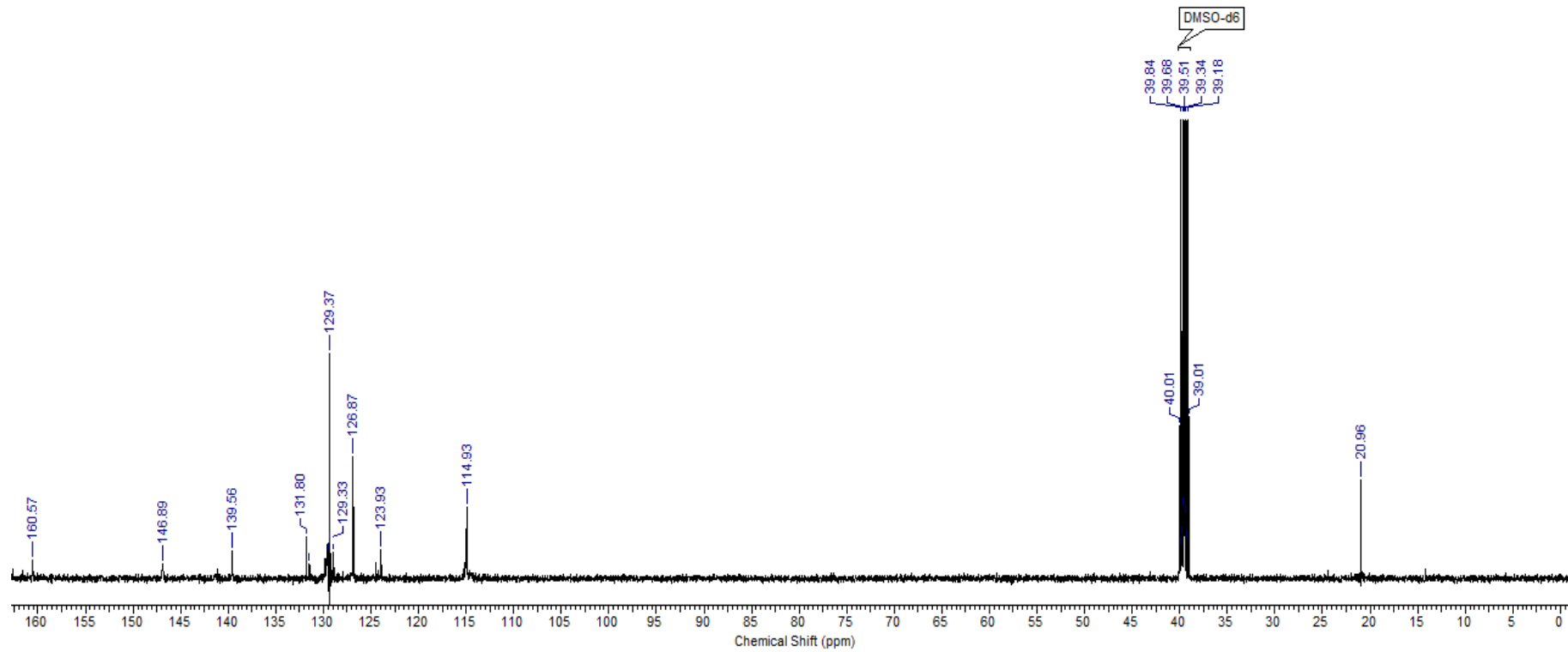
**Figura 55-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **11** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



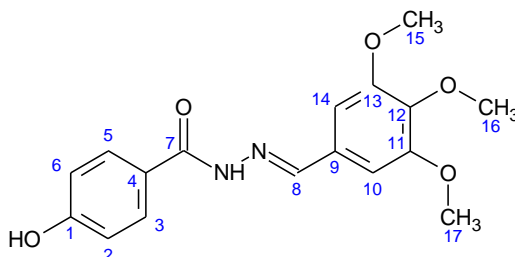
**Figura 55-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **11** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 56:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **11** (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz).



## Síntese da 4-hidroxi-[(*E*)-(3,4,5-trimetoxifenil)metilideno]benzohidrazida (12)



Foram utilizados 196 mg (1 mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzaldeído e 152,15 mg (1 mmol) da 4-hydroxi-benzohidrazida, conforme procedimento para síntese da série A.

Características do sólido obtido:

Formula molecular: C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (330,34 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 193,1 – 194,8°C

Rendimento: 48,2%

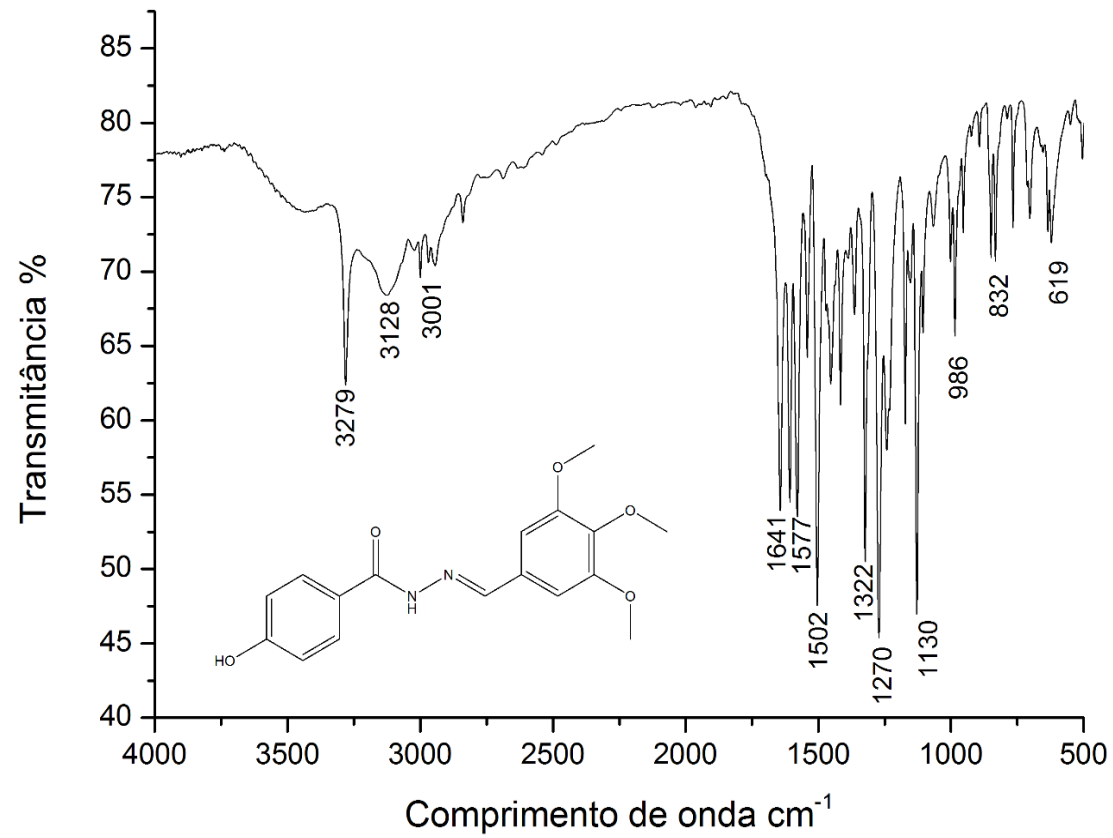
### Dados espectroscópicos:

IV (4000-400 cm<sup>-1</sup>): (C-O) 1130 e 1270; (C-F) 1322; (C=N) 1577; (C=O) 1641; (N-H) 3279.

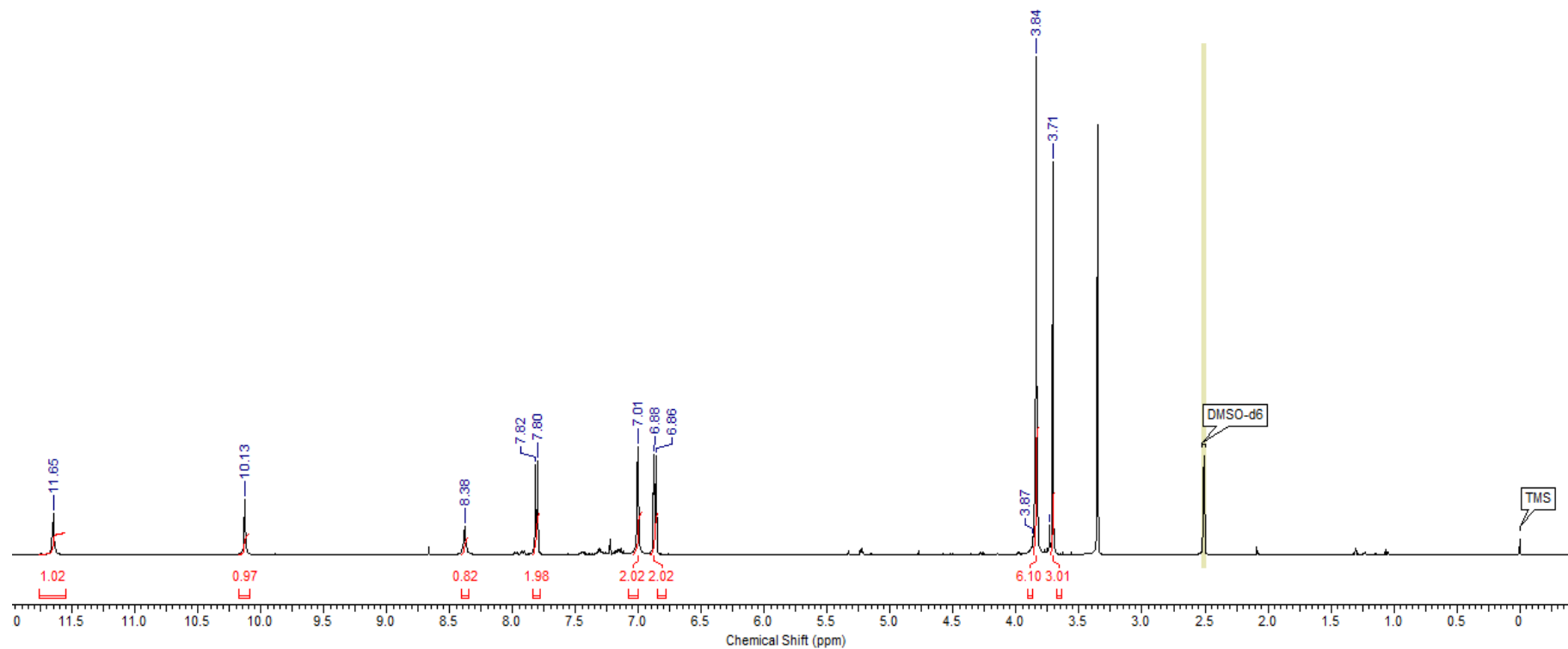
RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,71 (s, 3H – 16) δ 3,84 (s, 6H – 15 e 17) δ 6,87 (d, 2H – 2 e 6) δ 7,01 (s, 2H – 10 e 14) δ 7,81 (d, 2H – 3 e 5) δ 8,38 (s, 1H – 8) δ 10,13 (s, 1H – OH) δ 11,65 (s, 1H – NH).

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-6d): 56,2 (C-16) 60,18 (C-15 e 17) 104,3 (C- 10 e 14) 115,08 (C- 2 e 6) 123,94 (C-4) 129,7 (C- 3 e 5) 130,1 (C-9) 131,25 (C-12) 139,15 (C-8) 147,01 (C-11 e 13) 153,24 (C-1) 160,7 (C-7).

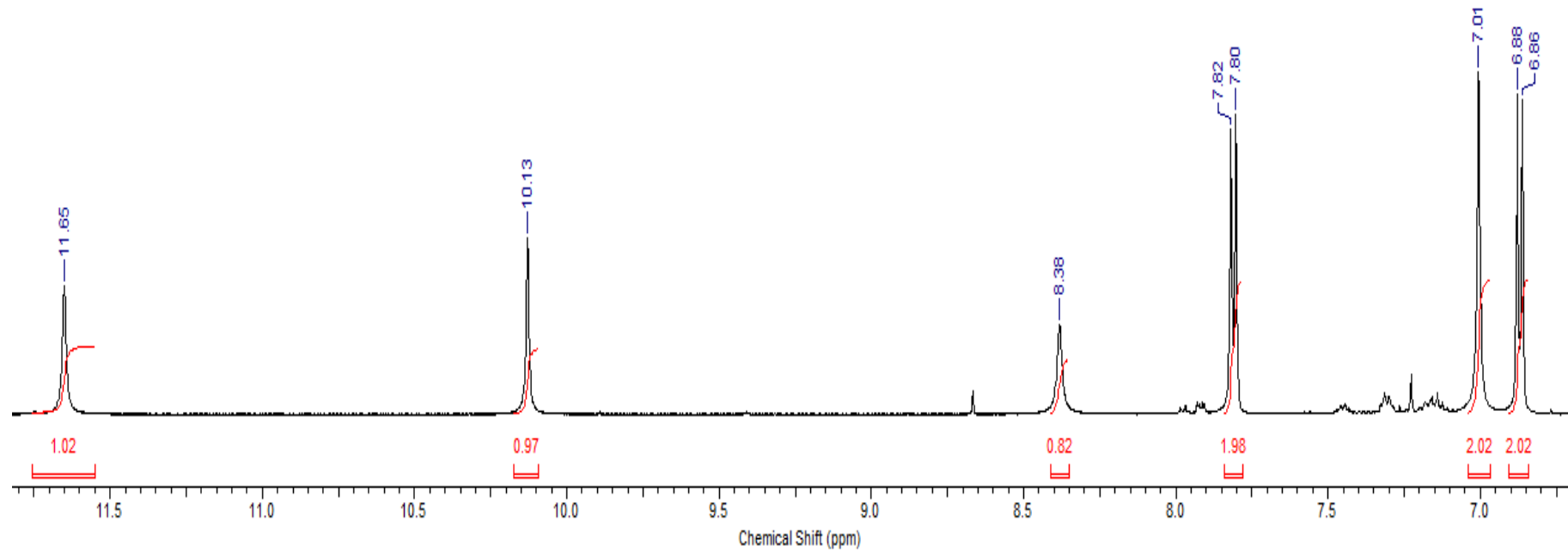
**Figura 57:** Espectro na região do IV do composto **12** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )



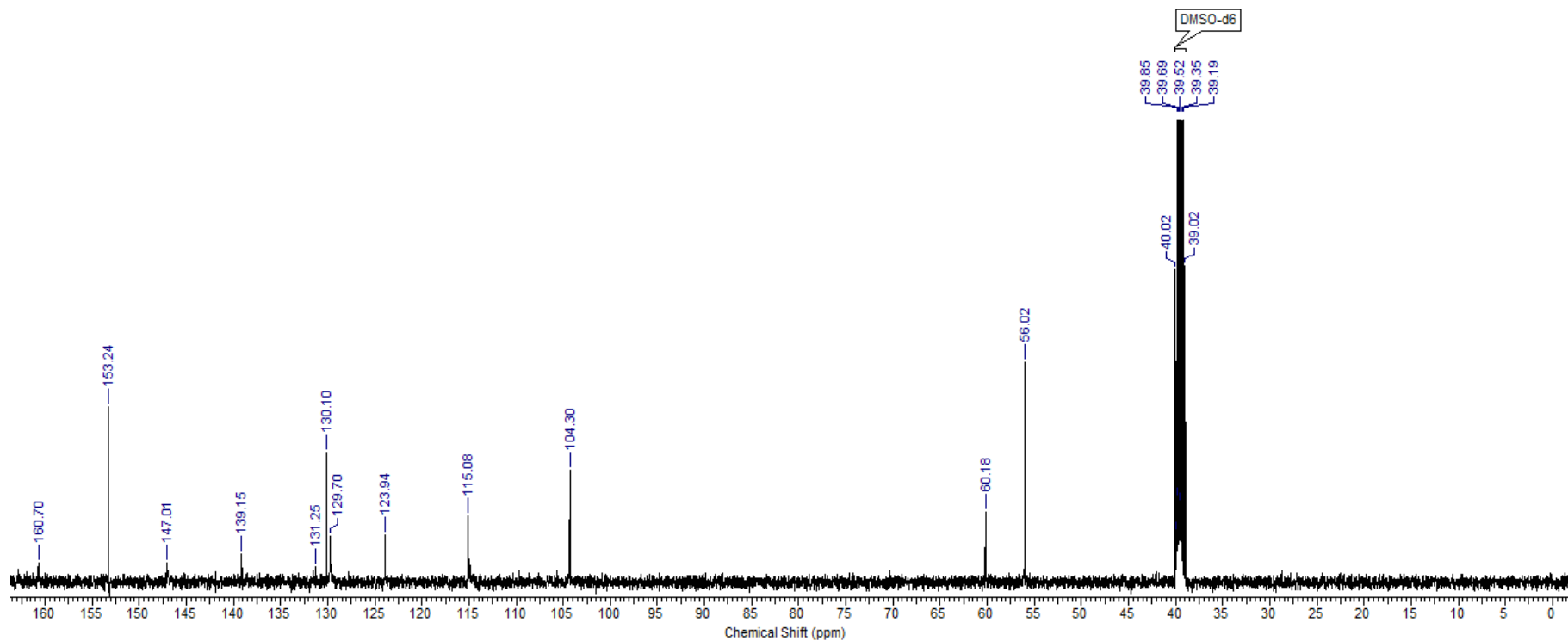
**Figura 58-a:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **12** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



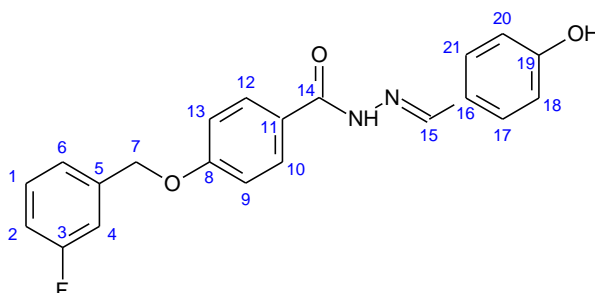
**Figura 58-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **12** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 59** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **12** (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz).



**Síntese da 4-[(3-fluorobenzil)oxi]-[(E)-(4-hidroxifenil)metilideno]benzohidrazida (13)**



Foram utilizados 122 mg (1 mmol) de 4-hidroxibenzaldeído e 260 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento para síntese da série C. Características do sólido obtido:

Formula molecular:  $C_{21}H_{17}FN_2O_3$  (364,36 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 201,9 – 203,6°C

Rendimento: 42,3%

**Dados espectroscópicos:**

IV (4000-400  $cm^{-1}$ ): (C-O) 1185 e 1245; (C-F) 1363; (C=N) 1505; (C=O) 1643; (N-H) 3249; (OH) 3372.

RMN de  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5,23 (s, 2H – 07)  $\delta$  6,85 (d, 2H – 18 e 20)  $\delta$  7,18 (m, 3H – 2, 9 e 13)  $\delta$  7,31 (m, 2H – 4 e 6)  $\delta$  7,45 (m, 1H – 1)  $\delta$  7,55 (d, 2H – 17 e 21)  $\delta$  7,90 (d, 2H – 10 e 12)  $\delta$  8,34 (s, 1H - 15)  $\delta$  9,9 (d, 1H – OH)  $\delta$  11,5 (s, 1H- NH).

RMN de  $^{13}C$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  68,48 (C-7) 114,13 (C-18) 114,48 (C-20) 115,65 (C-2) 115,78 (C-4) 123,49 (C- 9 e 13) 125, 40 (C- 6) 126,08 (C-11) 128,39 (C- 16) 128,68 (C-10) 129,37 (C-12) 130,42 (C- 1) 132,01 (C-17 e 21) 139,55 (C-5) 147,54 (C-15) 159,25 (C-19) 160,63 (C-3) 162,19 (C-14) 163,12 (C-8).

**Figura 60:** Espectro na região do IV do composto **13** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )

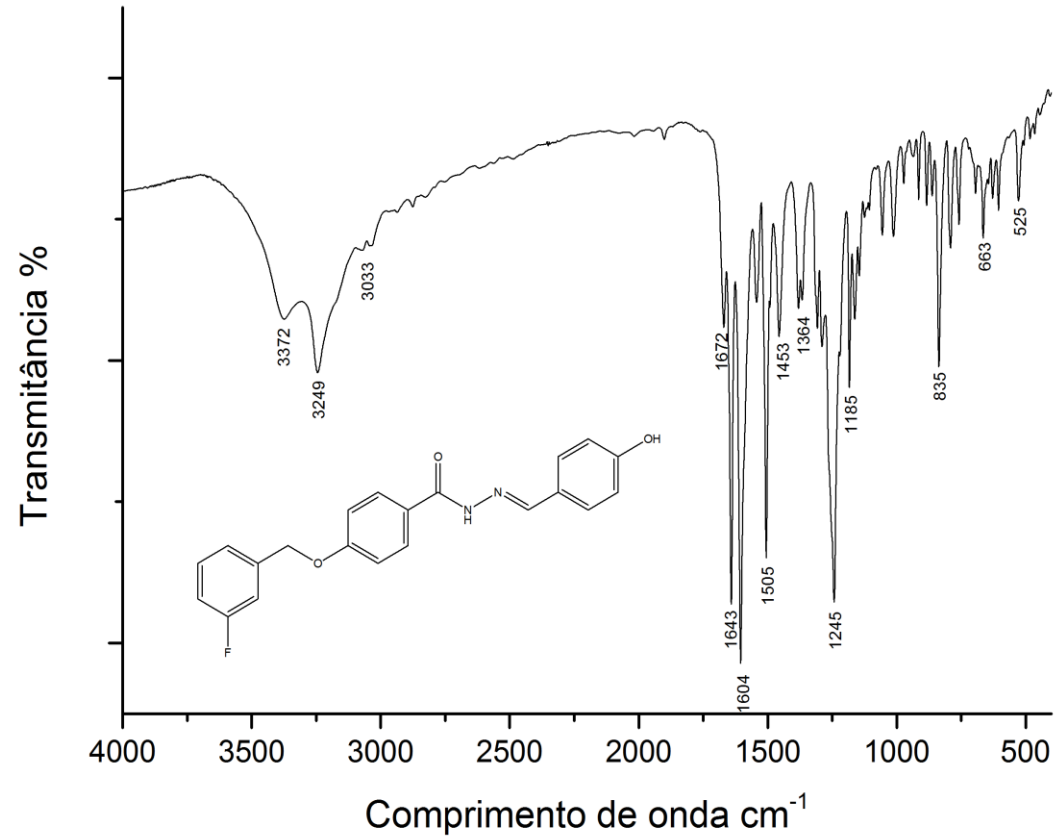
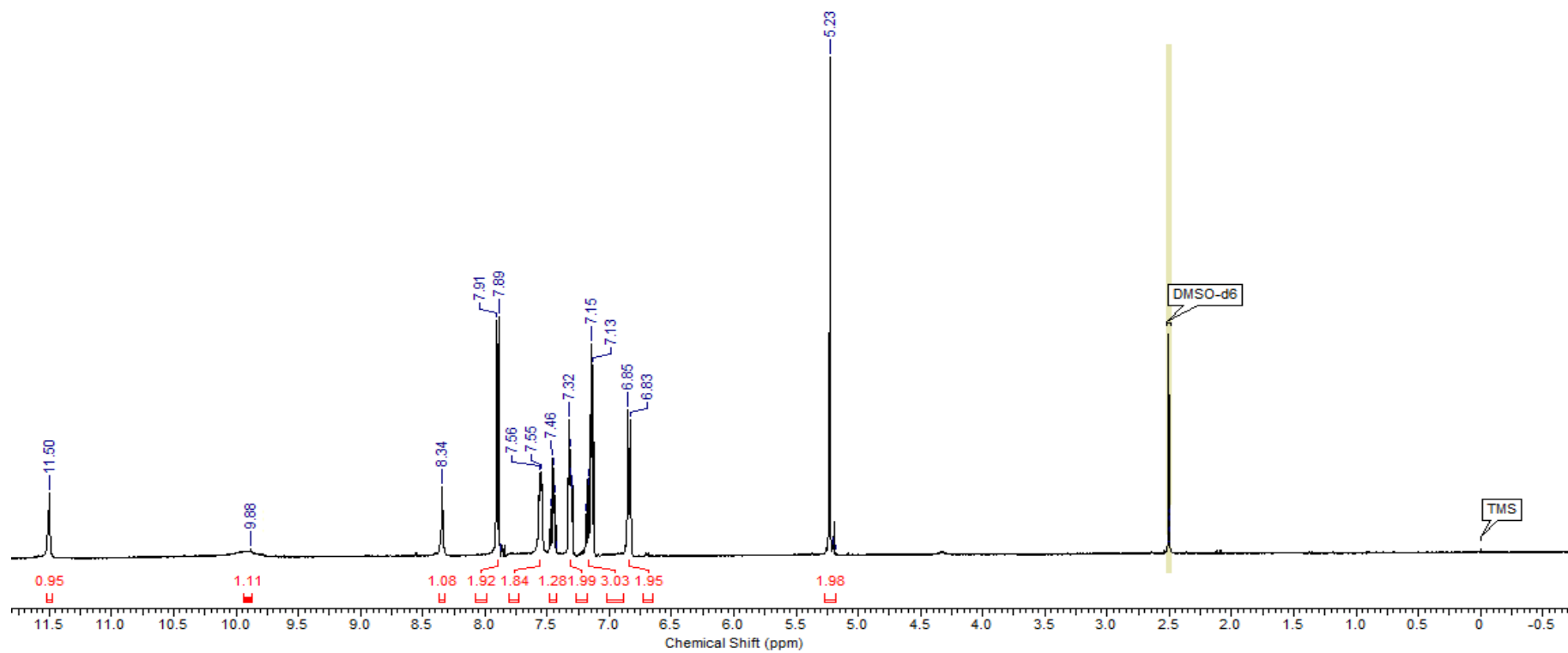
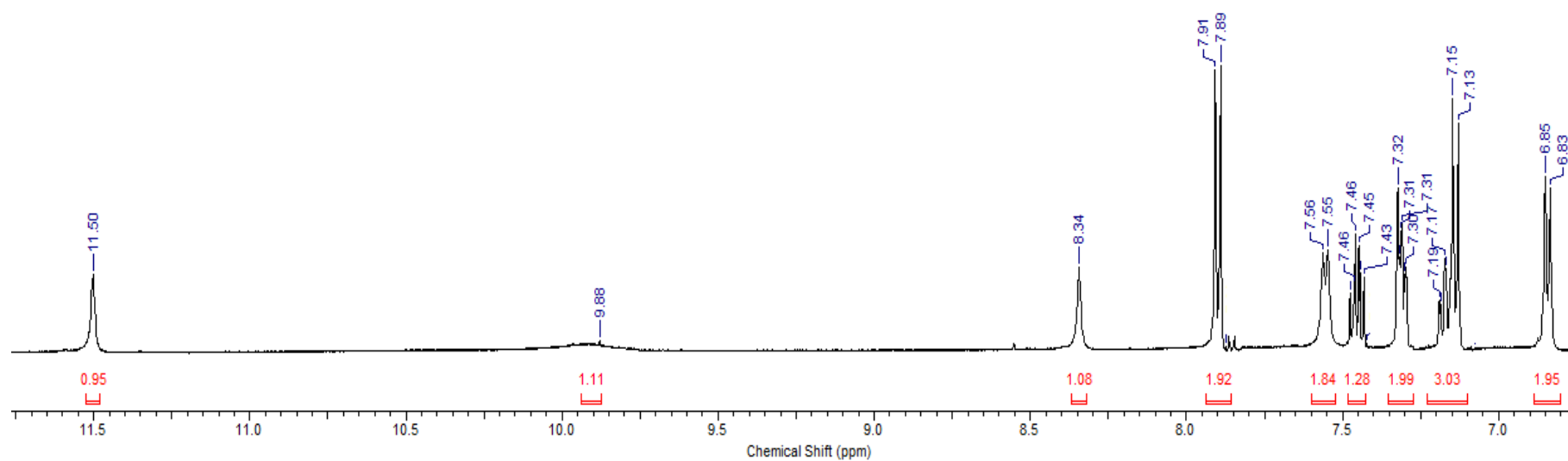


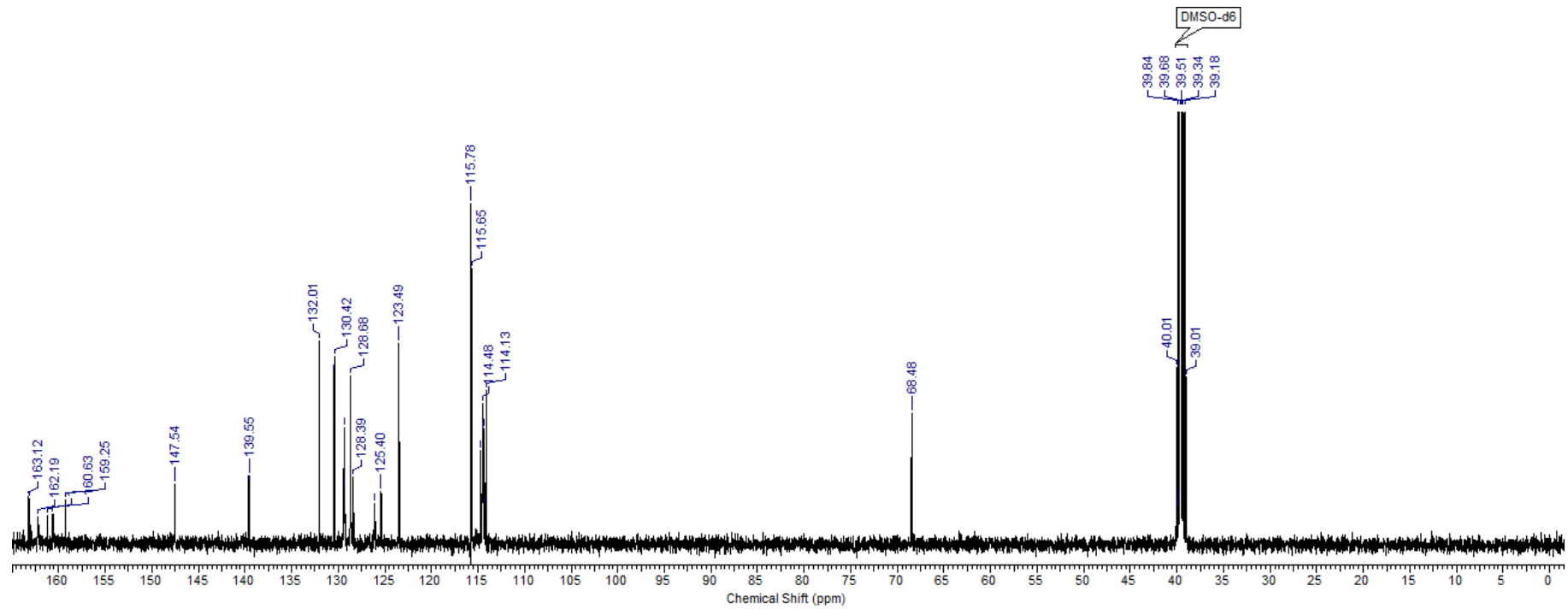
Figura 61-a: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **13** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



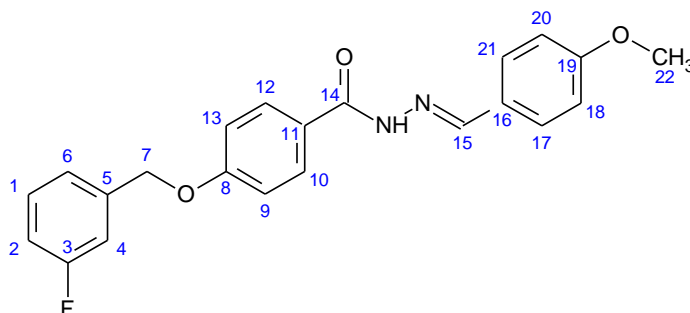
**Figura 61-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **13** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 62:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **13** (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz).



**Síntese da 4-[(3-fluorobenzil)oxi]-[(E)-(4-metoxifenil)metilideno]benzohidrazida (14)**



Foram utilizados 136 mg (1 mmol) de 4-hidroxibenzaldeído e 260 mg (1 mmol) da hidrazida, conforme procedimento 3.1.5. Características do sólido obtido:

Formula molecular:  $C_{22}H_{19}FN_2O_3$  (378,39 g/mol)

Coloração: branco

Faixa de fusão: 184,3 – 185,5°C

Rendimento: 44%

**Dados espectroscópicos:**

IV (4000-400  $cm^{-1}$ ): (C-O) 1171 e 1253; (C-F) 1312; (C=N) 1509; (C=O) 1648; (N-H) 3238.

RMN de  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,81 (s, 3H – 22)  $\delta$  5,22 (s, 2H – 7)  $\delta$  7,01 (d, 2H – 9 e 13)  $\delta$  7,12 (d, 2H – 18 e 20)  $\delta$  7,17 (m, 1H - 6)  $\delta$  7,31 (m, 2H – 2 e 4)  $\delta$  7,45 (m, 1H – 1)  $\delta$  7,63 (m, 2H – 17 e 21)  $\delta$  7,91 (d, 2H – 10 e 12)  $\delta$  8,31 (s, 1H – 15)  $\delta$  8,38 (s, NH).

**Figura 63:** Espectro na região do IV do composto **14** (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ )

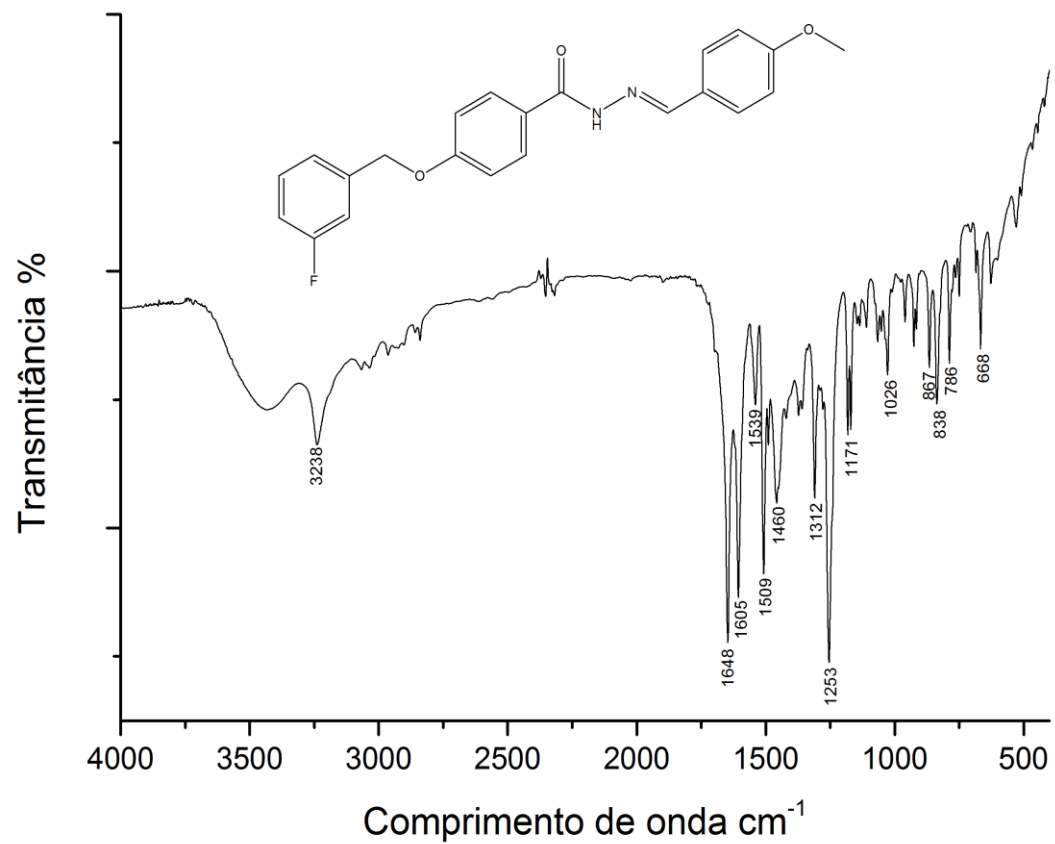
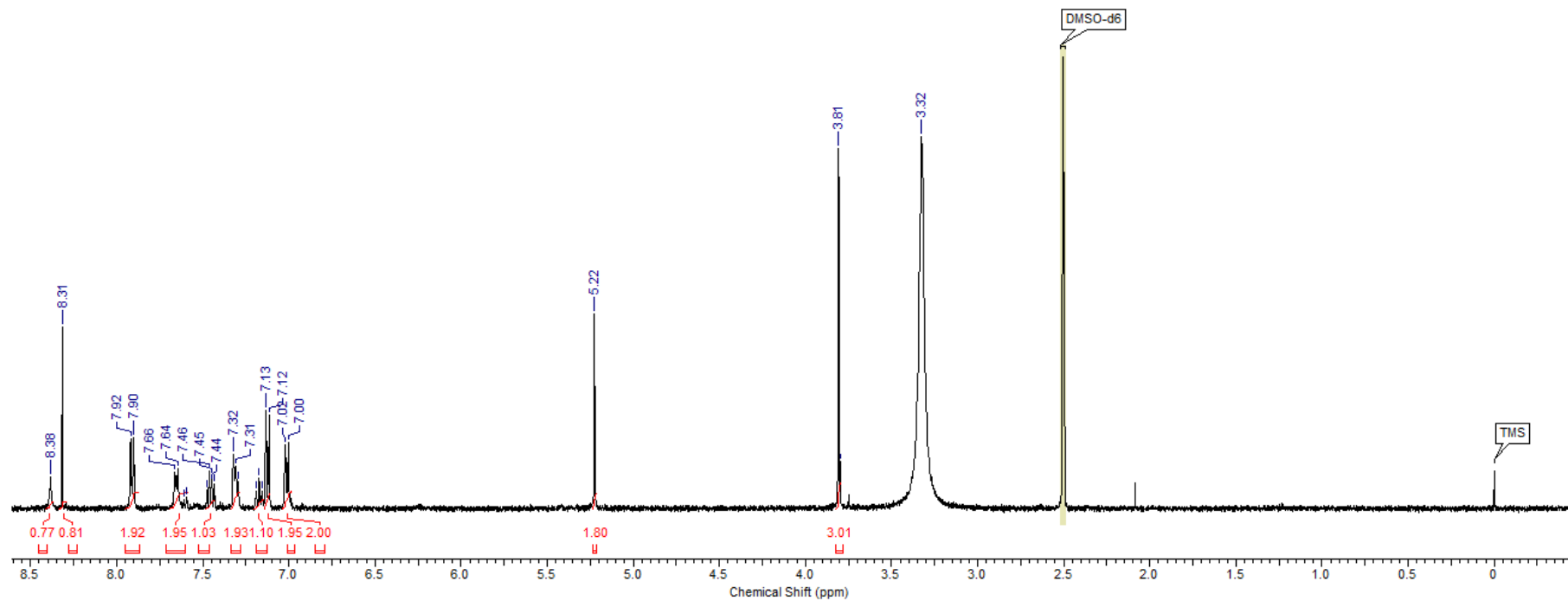


Figura 64-a: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **14** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 64-b:** Região expandida do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **14** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

