



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

DANIARA CRISTINA FERNANDES

**TRIAGEM BIOLÓGICA, SÍNTESE E PLANEJAMENTO DE NOVOS AGENTES
QUIMIOTERÁPICOS PARA A TERAPIA DO CÂNCER**

**CAMPINAS
2016**

DANIARA CRISTINA FERNANDES

**TRIAGEM BIOLÓGICA, SÍNTESE E PLANEJAMENTO DE NOVOS AGENTES
QUIMIOTERÁPICOS PARA A TERAPIA DO CÂNCER**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Química da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutora em Ciências**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Santos Coelho
Coorientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA DANIARA CRISTINA FERNANDES, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
FERNANDO ANTONIO SANTOS COELHO**

**CAMPINAS
2016**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

F391t Fernandes, Daniara Cristina, 1981-
Triagem biológica, síntese e planejamento de novos agentes
quimioterápicos para a terapia do câncer / Daniara Cristina Fernandes. –
Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Fernando Antonio Santos Coelho.
Coorientador: Adriano Defini Andricopulo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Morita-Baylis-Hillman. 2. Tubulina. 3. Atividade antitumoral. 4. Química
farmacêutica. I. Coelho, Fernando Antonio Santos, 1956-. II. Andricopulo,
Adriano Defini. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biological screening, synthesis and design of new
chemotherapeutic agents for cancer therapy

Palavras-chave em inglês:

Morita-Baylis-Hillman

Tubulin

Antitumor activity

Pharmaceutical chemistry

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Fernando Antonio Santos Coelho [Orientador]

Roberto Parise Filho

Ivone Carvalho

Fábio Cesar Gozzo

Júlio Cezar Pastre

Data de defesa: 07-12-2016

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho (Orientador)

Profa. Dra. Ivone Carvalho (FCFRP-USP)

Prof. Dr. Roberto Parise Filho (FCFRP-USP)

Prof. Dr. Júlio Cezar Pastre (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **DANIARA CRISTINA FERNANDES**, aprovada pela Comissão Julgadora em 07 de dezembro de 2016.

Dedico esta tese à minha família...

***Mãe**, seu cuidado, carinho e dedicação foi que
deram, em alguns momentos, a esperança para seguir!*

***Pai**, sua presença significou segurança e
certeza de que não estou sozinho nessa caminhada!*

***Minhas irmãs**, vocês fizeram parte disto. Sou
mais feliz com vocês na minha vida!*

***Marco e Bernardo**, com vocês me sinto
mais viva. Obrigada por sempre me trazer a paz!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, autor de meu destino e meu guia.

À minha família pelo amor incondicional, pelo incentivo e por me mostrar que as fases ruins um dia passam.

Aos meus cunhados Hernandez e Leandro e às minhas sobrinhas Sofia e Tainá. Como é bom ter uma família como vocês!

Ao professor Fernando Coelho, o orientador mais humano e cordial que eu tive a sorte de trabalhar. Saiba que graças as grandes oportunidades de aprendizado e de apoio, eu consegui chegar até aqui. Agradeço pela confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho e ainda, pela sua seriedade, humildade e tranquilidade, que me guiaram para os caminhos corretos e compensadores. Agradeço por ter despertado em mim o amor pela Síntese Orgânica. Obrigada!

Ao professor Adriano Defini Andricopulo, pela co-orientação neste trabalho multidisciplinar. Obrigada por me ensinar a ter foco e disciplina.

Ao meu amigo Ricardo N. Santos por me aguentar nas madrugadas fazendo os intermináveis ensaios, pelas conversas e por estar sempre apto a me ajudar.

À Wanessa Altei (USP), à Luma (USP) e ao Paulo (UNESP) pelos ensaios biológicos e pela paciência na discussão dos resultados.

À professora Quézia Cass e a Dra. Juliana Barreiro (UFSCar) pela separação cromatográfica quiral.

Ao amigo Jorge S. K. Monteiro pelas medidas do raio-X e ao Rafael Gaspar pela amizade de longa data.

As minhas amigas do laboratório Rose, Marília, Lucimara, Érica e Laís, por terem me ensinado muito sobre suas experiências em Síntese Orgânica. Sou grata pelas informações que produziram atalhos e pelo apoio emocional que me fortaleceu durante a caminhada.

Ao meu amigo Manoel, pelo seu esmero e dedicação na pesquisa e transmissão de conhecimentos científicos agregados a valores éticos. Obrigada por me direcionar e me orientar.

Aos “chatos” do Ralph e Capretz, saibam que admiro muito vocês! Minha jornada no laboratório com vocês por perto foi muito mais divertida. Ralph obrigada por toda ajuda que você me deu neste projeto!

Ao Lucas Zeoly pelas medidas de massas e análise no CLAE. Você é único, uma pessoa diferenciada! Muito, muito obrigada!

Aos amigos Zé Tiago, Guidotti, Hugo, Rodrigo e João Paulo. Obrigada pela amizade e bom convívio.

Aos amigos do laboratório dos professores Pilli, Roque e Dias, por todos os cafés que pude participar e me aventurar nas conversas sobre síntese.

Às minhas amigas inseparáveis Alessandra, Adriana, Sheila, Patrícia Cardoso, Patrícia Dametto, Carol, Elaine e Marília, por me ajudarem sempre, me acolherem e me ouvirem. Por tudo que vivemos juntas desde a graduação até hoje, amigas verdadeiras que quero sempre em minha vida, mesmo longe.

Aos professores, membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela oportunidade e infraestrutura e a todos os servidores pela disponibilidade e companheirismo.

Ao IFSP por me proporcionar incentivo e condições para a realização deste sonho.

E à FAPESP, em especial, ao programa CEPID, pelo apoio financeiro ao projeto.

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la.”

Augusto Cury

RESUMO

Câncer é uma doença caracterizada por uma descontrolada proliferação com crescimento e migração de células tumorais para outros órgãos do corpo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2012 o câncer foi responsável por 8,2 milhões de mortes e, estima-se que em 2030 o número aumente em cerca de 70%. Este panorama indica a urgência por novos candidatos a fármacos com ação antitumoral. Assim, o presente trabalho de doutoramento visou à identificação, o planejamento e a síntese de novas moléculas com atividade anticancerígena. Os estudos de modelagem molecular e ensaios bioquímicos permitiram identificar a classe dos derivados ciclopenta[*b*]indóis como potentes inibidores da polimerização da tubulina, além de mostrar interessante inibição da migração celular, com destaque para os derivados indólicos **49** e **51**, que apresentaram valores de IC₅₀ igual a 25 e 24 μM, respectivamente. O ensaio de citotoxicidade MTS utilizando fibroblastos de gengiva humana saudáveis para tais compostos mostrou que os valores de EC₅₀ estão acima de 100 μM e por meio do teste hemolítico com cultura de eritrócitos humanos para o composto **51**, comprovou-se que tal substância apresenta valores quase nulos de citotoxicidade. Um modelo de mecanismo molecular baseado em um ensaio competitivo foi proposto, confirmando que os ciclopenta[*b*]indóis são capazes de se ligar ao sítio da colchicina (**11**) em um modo de interação competitivo. Em uma segunda parte do trabalho, realizou-se o planejamento racional e a síntese de 27 novos análogos (**76-102**) para serem testados em ensaios antitumorais. Um interessante resultado com 87% de inibição da polimerização da tubulina e um IC₅₀ igual 5 μM foi obtido para o composto **88**, mostrando que a interação entre o grupo dioxolano e o resíduo Asn256β no sítio da colchicina (**11**), pode ser a responsável pelo aumento na atividade. Para finalizar, os enantiômeros *RR* e *SS* da mistura racêmica **51** foram analisados por docagem molecular e os resultados mostraram que o enantiômero *SS* possui uma maior afinidade pelo sítio da colchicina (**11**). Assim, foi realizada a resolução de **51** por meio da cromatografia quiral, o que permitiu a obtenção dos derivados ciclopenta[*b*]indólicos enantiomericamente puros **51a** e **51b**.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled proliferation with growth and migration of tumor cells to other organs. According to the World Health Organization in 2012 cancer was responsible for 8.2 million deaths, and it is estimated that by 2030 the number will increase by about 70%. This picture indicates the urgency for new drug candidates with antitumor action. Thus, this work aimed the identification, planning and synthesis of new molecules with anticancer activity. Studies of molecular modeling and biochemical assays have identified the class of cyclopenta[*b*]indoles derivatives as potential inhibitors of tubulin polymerization, in addition to showing interesting inhibition of cell migration, especially indole derivatives **49** and **51**, with values of IC₅₀ equal to 25 and 24 μM, respectively. MTS cytotoxicity assay using healthy human gingival fibroblasts of these compounds showed that the EC₅₀ values are above 100 μM and with the hemolytic test with human erythrocytes culture for compound **51** proved that such substance do not present cytotoxicity. A molecular mechanism model has been proposed based in a competitive assay, confirming that the cyclopenta[*b*]indoles are capable of binding to the colchicine site in a competitive interaction manner. In a second part of the work, there was the rational design and synthesis of 27 new analogues (**76-102**) to be tested in anti-tumor tests. An interesting result in 87% inhibition of tubulin polymerization and IC₅₀ equal to 5 μM was obtained for compound **88**, showing that the interaction between the dioxolane group and the Asn256β residue at the colchicine site may be responsible for the increase in activity. Finally, the *RR* and *SS* enantiomers of the racemic mixture **51** were analyzed by molecular docking and the results showed that the *SS* enantiomer has a higher affinity for the colchicine site. Thus, the resolution of **51** was performed by chiral chromatography, which allowed the preparation of the enantiomerically pure cyclopenta[*b*]indole derivatives **51a** and **51b**.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para 2016-2017, exceto câncer de pele não melanoma.....	30
Figura 2. Ciclo de replicação celular composto pelos períodos de interfase G ₁ , S e G ₂ , o período divisional de mitose e os pontos de checagem.	31
Figura 3. Estruturas de alguns antineoplásicos usados no tratamento do câncer....	33
Figura 4. Representação do processo de polimerização dos microtúbulos.....	35
Figura 5. Estruturas químicas de compostos que apresentam atividade anticancerígena pela modulação de microtúbulos.	36
Figura 6. Principais sítios de ligação de moduladores da polimerização de tubulina. Figura gerada pela sobreposição de diversas estruturas cristalográficas contendo os compostos: vimblastina (PDB ID: 1Z2B), colchicina (PDB ID: 4O2B) e paclitaxel (PDB ID: 1JFF).	36
Figura 7. Ligantes do sítio da colchicina (11), combretastatina A-4 (14) e YHH0895 (15).....	37
Figura 8. Grupos farmacofóricos importantes para a desestabilização dos microtúbulos via sítio da colchicina (11). Azul (sistema indol), rosa (grupo trimetóxfenil), verde (restrição conformacional).....	37
Figura 9. Relação estrutura atividade (SAR) da colchicina (11).....	38
Figura 10. Substâncias sintetizadas no LSPNF a partir de adutos de Morita-Baylis-Hillman.	40
Figura 11. Derivados indólicos (30 , 31 e 32) e ftalídeos (33 , 34 e 35) sintetizados a partir de adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	41
Figura 12. β -cetoésteres (36 e 37), espirocicloexadienonas (38 e 39), 1,2-aminoalcóois (40 e 41) e aciloínas (42 e 43) sintetizados a partir de adutos de Morita-Baylis-Hillman.....	42
Figura 13. Análise da complementaridade de três ligantes selecionados entre os mais bem pontuados nos procedimentos de docagem molecular. (A) 1,8-Naftiridina 4 (B) Espirocicloexadienona 9 e (C) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 7	44
Figura 14. Procedimento da triagem virtual realizado para identificar novos moduladores da proteína tubulina.	45

Figura 15. Ensaio de polimerização da tubulina baseado em fluorescência com as três fases de polimerização indicadas por I (nucleação), II (crescimento) e III (equilíbrio).....	46
Figura 16. Ensaio de polimerização da tubulina baseado em espalhamento com as três fases de polimerização indicadas por I (nucleação), II (crescimento) e III (equilíbrio).....	47
Figura 17. Resultados dos ensaios de polimerização de tubulina na presença de (A) Derivado Indólico 7 , (B) 1,8-Naftiridina 4 , (C) Espirocicloexadienona 9 e (D) Aduto de Morita-Baylis-Hillman 41	48
Figura 18. Estruturas dos ciclopenta[<i>b</i>]indóis testados no ensaio de Quantificação de Polimerização da Tubulina por Fluorescência.....	49
Figura 19. Resultados dos ensaios de polimerização de tubulina na presença dos ciclopenta[<i>b</i>]indóis selecionados. Todos os compostos foram testados em triplicata com uma concentração de 250 µM. (A) Ensaio padrão na presença de colchicina (11), paclitaxel (12) e na ausência de ligantes (controle contendo somente DMSO) (B) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 44 (C) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 46 (D) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 47 (E) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 48 (F) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 49 (G) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 52 (H) Ciclopenta[<i>b</i>]indol 53	50
Figura 20. (A) Ensaio em que o composto teste se liga ao sítio da colchicina (11), apresentando uma competitividade pelo sítio, que leva a uma diminuição do sinal de emissão em comparação ao ensaio padrão (B).....	54
Figura 21. Resultado obtido para o ensaio de competição frente ao sítio da colchicina (11).....	54
Figura 22. Proposta da conformação de interação dos compostos 49 (A) e 51 (B) no sítio da colchicina (11) (programa AutoDock, PDB: 4O2B).....	56
Figura 23. Imagem de microscopia confocal evidenciando o efeito do padrão colchicina (11) (1 e 5 µM) e dos compostos 49 e 51 (10, 50 e 100 µM) na organização dos microtúbulos em células MDA-MB-231 com um aumento de 63x.	58
Figura 24. Ensaio celular <i>wound healing</i> (MDA-MB-231) na presença dos compostos 49 , 50 e 51 (50 µM).....	59
Figura 25. Ensaio de citotoxicidade MTS utilizando fibroblastos de gengiva (células saudáveis, linhagem FGH) e células humanas de câncer de mama (linhagem MDA-MB-231) para os compostos (A) 49 e (B) 51	60
Figura 26. Etapas do processo de descoberta de um novo protótipo.....	65

Figura 27. Processo de docagem molecular.	67
Figura 28. Estruturas químicas dos híbridos benorilato e acetaminossalol.	70
Figura 29. Homólogos monoalquilados de 1-metil-1,2,3,4-tetraidropiridilpirazinas...71	71
Figura 30. Simplificação sucessiva da estrutura da morfina.....	72
Figura 31. Antagonistas do receptor H ₂ com propriedades antiulcerosas obtidos pela ferramenta do bioisosterismo.	73
Figura 32. Estruturas de alcaloides ciclopenta[<i>b</i>]indólicos.	73
Figura 33. Exemplos de derivados indólicos bioativos.	74
Figura 34. Versatilidade sintética dos adutos de MBH.	76
Figura 35. Parâmetros utilizados no planejamento de novos análogos dos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos.	79
Figura 36. Planejamento de um novo análogo ciclopenta[<i>b</i>]indólico utilizando a ferramenta de Homologação.	81
Figura 37. Planejamento de um novo análogo ciclopenta[<i>b</i>]indólico utilizando a ferramenta de Simplificação Molecular.	81
Figura 38. Planejamento de um novo análogo ciclopenta[<i>b</i>]indólico utilizando a ferramenta de Bioisosterismo.....	81
Figura 39. Novos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos planejados e sintetizados a partir do composto 51 . A síntese dos compostos 103-110 será descrita no item 5.2.1	92
Figura 40. Substâncias selecionadas para cálculo de IC ₅₀ e análise da sua relação-estrutura atividade (SAR).	93
Figura 41. Curva de dose-resposta e determinação do valor de IC ₅₀ do composto 88 em ensaios de polimerização de microtúbulos baseados em fluorescência.	94
Figura 42. Proposta da conformação de interação do composto 88 (A) no sítio da colchicina (11) e sua sobreposição com os compostos 49 e 51 (B) (programa AutoDock, PDB: 4O2B).....	95
Figura 43. Substâncias submetidas ao ensaio <i>wound healing</i>	96
Figura 44. Substâncias submetidas para o teste hemolítico.	97
Figura 45. Relação estrutura atividade observada para os ciclopenta[<i>b</i>]indóis mais potentes 49 e 51	99
Figura 46. Novos análogos de ciclopenta[<i>b</i>]indóis sintetizados.....	100
Figura 47. Relação estrutura atividade observada para o ciclopenta[<i>b</i>]indol planejado 88	100
Figura 48. Resposta biológica da enzima <i>D</i> -aminoácido oxidase.	102

Figura 49. (A) Imagens de crianças afetadas pelo uso da mistura racêmica da talidomida. (B) Isômeros da talidomida.	103
Figura 50. Resolução de uma mistura racêmica de ácidos utilizando uma amina quiral.	105
Figura 51. Esquema de separação de enantiômeros utilizando fase estacionária quiral.	106
Figura 52. Fase quiral derivada de fenilcarbamato de amilose utilizada para separação dos enantiômeros do composto 80	114
Figura 53. Separação cromatográfica analítica dos enantiômeros dos compostos (A) 80 e (B) 91 . Os cromatogramas foram realizados com uma coluna Chiralpak ID, fase móvel 8:2 (Hex:AcOEt) e $\lambda=230$ nm.	115
Figura 54. Estruturas das moléculas planejadas (DR-1 a DR-82).	119
Figura 55. (A) Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 400x em 0 h e 24 h após a incubação. (B) Fórmula para o cálculo da porcentagem de inibição do composto teste.	191
Figura 56. Estrutura molecular do ciclopenta[<i>b</i>]indol 93 com elipsoides de 50% de probabilidade.	212

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de câncer e fatores de risco extrínsecos.....	29
Tabela 2. Classe estrutural e estruturas moleculares do conjunto de dados utilizados para os estudos de modelagem molecular.....	43
Tabela 3. Classificação geral dos compostos após triagem virtual realizada em três programas: GOLD, Surflex e AutoDock e em três sítios bioativos da tubulina: vimblastina (9), colchicina (11) e paclitaxel (12).....	45
Tabela 4. Inibição da polimerização da tubulina por Fluorescência e Espalhamento.	51
Tabela 5. Valores da docagem (log K_d) para os derivados indólicos 49 e 51	55
Tabela 6. Avaliação da citotoxicidade por MTS dos compostos mais ativos 49 e 51 . .	60
Tabela 7. Parâmetros utilizados no planejamento racional de novos análogos dos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos.....	81
Tabela 8. Condições e rendimentos obtidos na reação de MBH.	85
Tabela 9. Condições e rendimentos obtidos na reação de oxidação e adição de indol.	86
Tabela 10. Condições e rendimentos obtidos na reação de ciclização para formação dos ciclopenta[<i>b</i>]indóis.	88
Tabela 11. Condições e rendimentos obtidos na reação de desproteção do grupo benzil.....	89
Tabela 12. Condições e rendimentos obtidos na reação de hidrólise.....	90
Tabela 13. Condições e rendimentos obtidos na síntese das amidas 101 e 102	91
Tabela 14. Inibição da polimerização da tubulina por Fluorescência.....	94
Tabela 15. Ensaio celular <i>wound healing</i> (MDA-MB-231) na presença dos novos derivados indólicos sintetizados.	97
Tabela 16. Avaliação da citotoxicidade por hemólise dos derivados indólicos 51 , 77 , 80 , 82 , 83 , 87 , 91 , 92 , 93 e 94	98
Tabela 17. Condições utilizadas na reação de hidrólise ácida e básica.	108
Tabela 18. Condições utilizadas na resolução utilizando um álcool quiral.....	113

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese da colchicina fluorescente (CF).....	53
Esquema 2. Síntese de derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos por meio da indolização de Fischer.	74
Esquema 3. Síntese de derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos por meio da reação intramolecular de Friedel-Crafts.	74
Esquema 4. Síntese de derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos por meio da reação de Heck.	74
Esquema 5. Esquema geral para síntese dos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos.....	75
Esquema 6. Proposta de mecanismo para síntese dos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos.	75
Esquema 7. Reação de MBH.	76
Esquema 8. Etapas envolvidas no mecanismo da reação de MBH proposta por Hill e Isaacs.....	77
Esquema 9. Novas propostas de mecanismo da reação de MBH.....	78
Esquema 10. Preparação do aduto de MBH 60	85
Esquema 11. Preparação do α -metilindol- β -cetoéster 68	86
Esquema 12. Preparação do β -hidroxi-éster indol.....	87
Esquema 13. Preparação do ciclopenta[<i>b</i>]indol 76	88
Esquema 14. Preparação das amidas 99 e 100	91
Esquema 15. Condições utilizadas para resolução da mistura racêmica do ciclopenta[<i>b</i>]indol 91 . Os cromatogramas foram realizados em CLAE Shimatzu, coluna sílica Water, fluxo 1mL/min, fase móvel 7:3 (Hex:AcOEt), $\lambda=254$ nm.	107
Esquema 16. Proposta sintética para finalização da resolução enantiomérica e obtenção dos produtos opticamente puros.	108
Esquema 17. Etapas da rota sintética alternativa à hidrólise clássica.....	109
Esquema 18. Síntese de <i>N</i> -alquil- <i>N</i> -nitrosoamidas.	109
Esquema 19. Decomposição dependente do pH para <i>N</i> -alquil- <i>N</i> -nitrosoamidas. ...	110
Esquema 20. Fragmentação Retro-Ritter de metilbenzil amidas.....	111
Esquema 21. Rota alternativa para prevenção da reação tipo Retro-Ritter em metilbenzil amidas.....	111
Esquema 22. Rota sintética para conversão da metilbenzil amida 103 em éster...	111

Esquema 23. Alquilação da (S)-(-)-(α)-metilbenzilamina seguida da reação com o ácido 91 para formação de amidas terciárias. Sistema de eluição para cromatoplaça (Hex:AcOEt, 8:2, 6x).	112
Esquema 24. Resolução da mistura racêmica 91 utilizando álcoois quirais.....	112
Esquema 25. Condições utilizadas para síntese de amidas 103-110	113
Esquema 26. Resolução do derivado indólico 80 para obtenção dos enantiômeros originais 51a e 51b	115

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 60	123
Espectro 2. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 60	124
Espectro 3. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 61	125
Espectro 4. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 61	125
Espectro 5. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 62	126
Espectro 6. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 62	127
Espectro 7. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 63	128
Espectro 8. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 63	128
Espectro 9. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 64	129
Espectro 10. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 64	130
Espectro 11. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 65	131
Espectro 12. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 65	131
Espectro 13. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do indol metilado.	133
Espectro 14. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do indol metilado.	133
Espectro 15. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 68	135
Espectro 16. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 68	135
Espectro 17. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 69	136
Espectro 18. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 69	137
Espectro 19. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 70	138
Espectro 20. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 70	138
Espectro 21. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 71	139
Espectro 22. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 71	140
Espectro 23. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 72	141
Espectro 24. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 72	141
Espectro 25. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 73	142
Espectro 26. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 73	143
Espectro 27. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 74	144
Espectro 28. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 74	144
Espectro 29. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 75	145
Espectro 30. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 75	146
Espectro 31. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 76	148
Espectro 32. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 76	148

Espectro 33. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 77	149
Espectro 34. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 77	150
Espectro 35. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 78	151
Espectro 36. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 78	151
Espectro 37. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 79	152
Espectro 38. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 79	153
Espectro 39. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 80	154
Espectro 40. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 80	154
Espectro 41. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 81	155
Espectro 42. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 81	156
Espectro 43. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 82	157
Espectro 44. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 82	157
Espectro 45. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 83	158
Espectro 46. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 83	159
Espectro 47. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 84	160
Espectro 48. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 84	161
Espectro 49. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 85	162
Espectro 50. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 85	162
Espectro 51. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 86	163
Espectro 52. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 86	164
Espectro 53. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 87	165
Espectro 54. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 87	165
Espectro 55. RMN de ^1H (600 MHz, acetona D_6) do composto 88	166
Espectro 56. RMN de ^{13}C (150 MHz, acetona D_6) do composto 88	167
Espectro 57. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 89	168
Espectro 58. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 89	169
Espectro 59. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 90	170
Espectro 60. RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD) do composto 90	170
Espectro 61. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 91	171
Espectro 62. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 91	172
Espectro 63. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 92	173
Espectro 64. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 92	173
Espectro 65. RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do composto 93	174
Espectro 66. RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) do composto 93	175

Espectro 67. RMN de ^1H (600 MHz, MeOD) do composto 94	176
Espectro 68. RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD) do composto 94	176
Espectro 69. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 95	177
Espectro 70. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, MeOD) do composto 95	178
Espectro 71. RMN de ^1H (600 MHz, MeOD) do composto 96	179
Espectro 72. RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD) do composto 96	179
Espectro 73. RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do composto 97	180
Espectro 74. RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) do composto 97	181
Espectro 75. RMN de ^1H (600 MHz, MeOD) do composto 98	182
Espectro 76. RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD) do composto 98	182
Espectro 77. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 99	184
Espectro 78. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 99	184
Espectro 79. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 100	185
Espectro 80. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 100	186
Espectro 81. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 101	187
Espectro 82. RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD) do composto 101	188
Espectro 83. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 102	189
Espectro 84. RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD) do composto 102	189
Espectro 85. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 103	194
Espectro 86. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 103	194
Espectro 87. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 104	195
Espectro 88. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 104	196
Espectro 89. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 105	197
Espectro 90. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 105	198
Espectro 91. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 106	199
Espectro 92. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 106	199
Espectro 93. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 107	201
Espectro 94. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 107	201
Espectro 95. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 108	202
Espectro 96. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 108	203
Espectro 97. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 109	204
Espectro 98. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 109	205
Espectro 99. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 110	206
Espectro 100. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 110	206

Espectro 101. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 51a	208
Espectro 102. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 51a	209
Espectro 103. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 51b	210
Espectro 104. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 51b	210

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- δ** Deslocamento químico
- μM** MicroMolar
- 786-0** Linhagem tumoral de células de rim
- AcOEt** Acetato de etila
- Boc** *t*-Butiloxicarbonil
- (Boc)₂O** Di-*t*-butil dicarbonato
- CCD** Cromatografia em camada delgada
- CDI** *N,N*-Carbonil-di-Imidazol
- CF** Colchicina fluorescente
- CLAE** Cromatografia líquida de alta eficiência
- d** Duplete
- dd** Duplo duplete
- ddd** Duplo duplo duplete
- DABCO** 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano
- DAPI** 4',6-Diamidino-2-fenilindol
- DBU** 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
- DCC** *N,N*-Diciclohexilcarbodiimida
- DEAE** Dietilaminoetil
- DMAP** *N,N*-dimetilaminopiridina
- DMEM** Dulbecco's modified Eagle's medium
- DMF** *N,N*-Dimetilformamida
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DNA** Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
- dt** Duplo triplete
- EC₅₀** Concentração que induz metade do efeito máximo
- EDC.HCl** Etilcarbodiimida hidrociorado
- E.M** Espectrometria de massas
- Equiv.** Equivalente
- ESI** Ionização por electrospray
- EWG** Electron withdrawing group (Grupo retirador de elétrons)
- FDA** Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Fármacos)

FGH Fibroblastos humanos saudáveis

GDP Guanosina difosfato

GTP Guanosina 5'-trifosfato

HDL High Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)

HEX Hexano

HOBt Hidroxibenzotriazol

HRMS High resolution mass spectrometry (Espectrometria de massas de alta resolução)

HT-29 Linhagem tumoral de células de cólon

Hz Hertz

IBX Ácido 2-iodoxibenzóico

IC₅₀ Concentração necessária para inibição de 50% *in vitro*

INCA Instituto Nacional do Câncer

IV Espectroscopia no infravermelho

J Constante de acoplamento

K562 Linhagem tumoral de células de leucemia

LBDD Ligand-Based Drug Design (Planejamento baseado na estrutura do ligante)

Lop P Coeficiente de partição

m Multiplete

m/z Razão massa/carga

MBH Morita-Baylis-Hillman

MDA-MB-231 Linhagem tumoral de células de mama

MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

NCI-ADR/RES Linhagem tumoral de células de ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas

NCI-H460 Linhagem tumoral de células de pulmão

nm Nanômetro

nM Nanomolar

OVCAR-3 Linhagem tumoral de células de ovário

PC-3 Linhagem tumoral de células de próstata

PDB Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas)

ppm Partes por milhão

qd Quarteto de duplete

QSAR Quantitative Structure-Activity Relationships (Relações quantitativas entre estrutura e atividade)

RMN Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ¹H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s Singleto

SAR Structure activity relationships (Relação estrutura atividade)

SBDD Structure-Based Drug Design (Planejamento baseado na estrutura do receptor)

SFB Soro fetal bovino

sl Singleto largo

t Tripleto

t.a. Temperatura ambiente

TFA Ácido Trifluoroacético

THF Tetraidrofurano

TMS Trimetilsililano

U251 Linhagem tumoral de células de glioma de sistema nervoso central

UACC-62 Linhagem tumoral de células tipo melanona

UV Luz ultravioleta

WHO World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	28
1.1. Câncer e o panorama atual.....	28
1.2. Câncer e o ciclo celular	30
1.3. Terapia do câncer	32
1.4. Planejamento de Fármacos Anticancerígenos.....	34
2. MOTIVAÇÃO.....	40
2.1. Conjunto de dados e estudos de docagem molecular.....	42
2.2. Ensaio bioquímicos	45
2.3. Determinação do mecanismo de ação dos ciclopenta[<i>b</i>]indóis.....	52
2.4. Ensaio biológicos.....	56
2.4.1. Ensaio de imunofluorescência.....	57
2.4.2. Ensaio celular <i>wound healing</i>	57
2.4.3. Ensaio de redução do sal tetrazólio (MTS).....	59
3. OBJETIVOS GERAIS	63
4. PLANEJAMENTO, SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS NOVOS DERIVADOS CICLOPENTA[<i>B</i>]INDÓLICOS	65
4.1. Introdução	65
4.1.1. O processo de planejamento racional	65
4.1.2. Docagem molecular.....	67
4.1.3. Modificação Molecular de Fármacos	69
4.1.4. Síntese dos novos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos	73
4.1.4.1. A Reação de Morita-Baylis-Hillman	76
4.2. Resultados e Discussão.....	79
4.2.1. Planejamento dos novos análogos ciclopenta[<i>b</i>]indólicos.....	79
4.2.2. Síntese dos novos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos	84
4.2.3. Ensaio bioquímicos dos novos análogos ciclopenta[<i>b</i>]indólicos.....	92
4.2.4. Ensaio biológicos dos novos análogos ciclopenta[<i>b</i>]indólicos	95
4.2.4.1. Ensaio celular <i>wound healing</i>	95
4.2.4.2. Teste hemolítico.....	97
4.3. Conclusão	98
5. RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA DOS DERIVADOS CICLOPENTA[<i>B</i>]INDÓLICOS	102
5.1. Introdução	102
5.2. Resultados e discussão	107
5.2.1. Resolução enantiomérica dos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos por meio de agentes quirais.....	107
5.2.2. Resolução enantiomérica dos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos por meio da cromatografia quiral	114
5.3. Conclusão	116
6. EXPERIMENTAL	118

6.1. Parte experimental do tópico 4 “Planejamento, síntese e atividade biológica dos novos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos”	118
6.1.1. Estudos de docagem molecular	118
6.1.2. Síntese dos novos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos	121
6.1.2.1. Procedimento geral de preparação dos adutos de MBH	122
6.1.2.2. Procedimento para preparação do indol metilado: 5-(benzilóxi)-1-metil-1H-indol	132
6.1.2.3. Procedimento geral de preparação dos β -cetoésteres	134
6.1.2.4. Procedimento geral de preparação dos ciclopenta[<i>b</i>]indóis	146
6.1.2.5. Procedimento geral de desproteção dos ciclopenta[<i>b</i>]indóis	159
6.1.2.6. Procedimento geral de hidrólise dos ciclopenta[<i>b</i>]indóis	167
6.1.2.7. Procedimento geral de preparação das amidas protegidas	183
6.1.2.8. Procedimento geral de preparação das amidas desprotegidas	186
6.1.3. Ensaio bioquímico dos novos análogos ciclopenta[<i>b</i>]indólicos	190
6.1.4. Ensaios biológicos dos novos análogos ciclopenta[<i>b</i>]indólicos	191
6.1.4.1. Ensaio celular <i>wound healing</i>	191
6.1.4.2. Teste hemolítico	191
6.2. Parte experimental do tópico 5 “Resolução enantiomérica dos derivados ciclopenta[<i>b</i>]indólicos”	192
6.2.1. Procedimento geral para obtenção dos diastereômeros 103 e 104	192
6.2.2. Procedimento geral para obtenção das amidas 105 e 106	196
6.2.3. Procedimento geral para obtenção das amidas 107 e 108	200
6.2.4. Procedimento geral para obtenção das amidas 109 e 110	203
6.2.5. Procedimento geral para separação dos enantiômeros em cromatografia quiral	207
6.2.6. Procedimento geral para obtenção dos enantiômeros 51a e 51b	207
6.3. Obtenção dos cristais e dados cristalográficos	211
7. REFERÊNCIAS	213

1-Introdução Geral



1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. *Câncer e o panorama atual*

Diante das questões que desafiam globalmente, o câncer tem enorme impacto econômico e social, constituindo-se uma ameaça crescente à saúde pública devido às mortes prematuras e aos anos de vida e de produtividade perdidos pela incapacidade gerada pela doença. Em 2012, o câncer foi responsável por 8,2 milhões de mortes e, estima-se que em 2030 o número aumente em cerca de 70%.¹ Atualmente, o problema tem-se deslocado para os países menos desenvolvidos, que representa cerca de 57% dos casos e 65% das mortes em todo mundo. Em grande parte, a dificuldade da adoção de um estilo de vida saudável, as infecções concorrentes e a falta de tecnologia explicam essa mudança de paradigma.^{2,3}

Câncer é uma doença caracterizada por uma descontrolada proliferação com crescimento e migração de células tumorais para outros órgãos do corpo. Dependendo dos efeitos gerados no organismo do hospedeiro, a neoplasia pode ser classificada como benigna ou maligna. Os tumores benignos são de crescimento lento, expansivo e são bem tolerados pelo organismo. Os tumores malignos têm crescimento rápido, do tipo invasivo e produzem efeitos nocivos que frequentemente levam à morte.^{4,5}

Sua origem ainda gera muitas controvérsias, com múltiplas etapas relacionadas principalmente com as classes de genes reguladores do crescimento, que em configurações normais, dirigem o ciclo celular em uma entrelaçada sequência de eventos para as células crescerem e se dividirem. Os genes supressores de tumor inibem o crescimento celular e os proto-oncogenes estimulam os processos de divisão celular. Outros genes que participam desse processo são os genes que condicionam a morte celular programada (apoptose), a mobilidade celular e os genes responsáveis pela produção de fatores de crescimento. Esses genes em questão, quando expostos a alguma anomalia, são os principais responsáveis pela proliferação descontrolada encontrada nos cânceres em humanos.^{6,7}

As macromoléculas também podem ser danificadas por agentes exógenos relacionados ao meio ambiente, aos hábitos sociais ou culturais⁸. Pelo menos 35% dos casos de câncer a nível mundial são ocasionados por uma dieta incorreta e esse número sobe para 80%, no caso do câncer de cólon. Exposição solar, falta de

atividade física, tabagismo ou uso de álcool, faz com que a progressão do câncer seja ainda maior. Há também os fatores biológicos (vírus do grupo do herpes simples e o vírus do papiloma humano, por exemplo) que também já foram identificados como responsáveis por alguns tipos de câncer no homem.⁹

Para mostrar a relação dos fatores extrínsecos com o aparecimento do câncer, Wu e colaboradores, através do número total de células em processo de divisão celular tecidual, propuseram uma análise bem recente entre os fatores de risco e alguns tipos mais comuns de câncer. Pode-se observar na **Tabela 1** que estes fatores estão presentes em 60-90% na disposição da doença e que em muitos casos, os cânceres podem ser evitáveis com mudanças simples de estilo de vida.¹⁰

Tabela 1. Tipos de câncer e fatores de risco extrínsecos.


<i>Tipos de câncer</i>	<i>Riscos extrínsecos</i>	<i>Exemplos</i>
Mama	Substancial	Uso de contraceptivo, estilo de vida (alimentação, cigarro, álcool, obesidade)
Próstata	Substancial	Alimentação, obesidade, cigarro
Pulmão	> 90%	Cigarro, poluição
Melanoma	65-86%	Exposição solar
Cabeça e Pescoço	75%	Cigarro, álcool
Tireoide	> 72%	Dieta pobre em iodo, radiação
Rim	> 58%	Cigarro, obesidade, exposições no local de trabalho
Intestino	> 61%	Alimentação, cigarro, álcool

(fonte: modificada da referência 10)

No Brasil, as estimativas para o biênio 2016-2017, apontam a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer. Os tumores mais incidentes para o sexo masculino serão o câncer de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (**Figura 1**). Tratando-se da incidência dos dois cânceres mais comuns no Brasil (próstata para os homens e mama para as mulheres), a idade é o fator de risco mais pronunciado, com sobrevida de cinco anos após o diagnóstico da doença. Para os homens, a maioria dos cânceres de próstata é diagnosticada acima dos 65 anos e para mulheres, o câncer de mama é diagnosticado acima de 50 anos.¹¹

Os registros de câncer do Brasil fornecem informações importantes sobre a mortalidade da doença nas comunidades. Esse monitoramento deve-se configurar uma rotina da gestão da saúde com informações cabíveis e de qualidade, essencial para o estabelecimento de ações de prevenção e controle do câncer e de seus fatores de risco.

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para 2016-2017, exceto câncer de pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens		Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

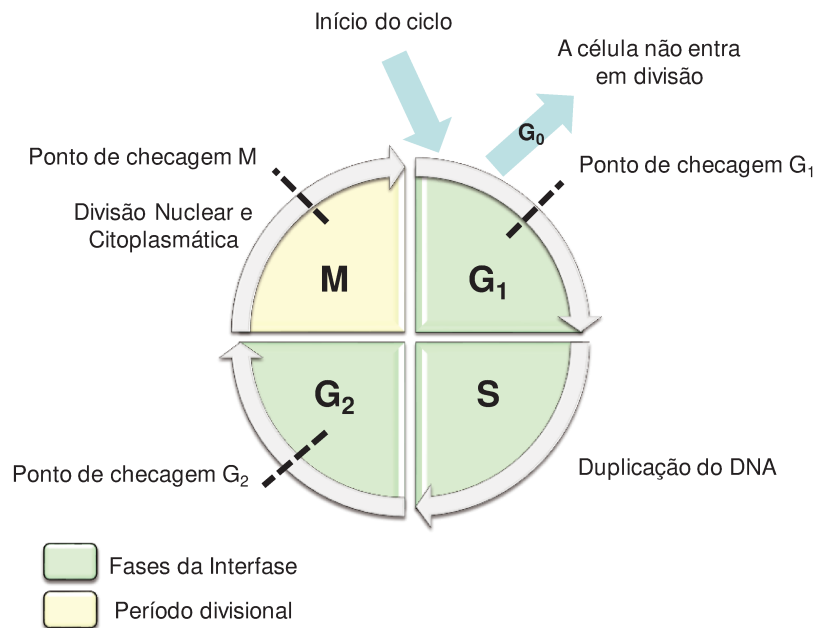
(fonte: Instituto Nacional de Câncer¹¹)

1.2. Câncer e o ciclo celular

Grande parte dos fármacos utilizados na quimioterapia antineoplásica exerce sua ação sobre as células que se localizam no ciclo celular. Este, pode ser dividido em quatro fases: G₁, S, G₂ e M (**Figura 2**). As três primeiras fases são, no seu conjunto, designadas por interfase, ocupando cerca de 90% do ciclo celular e a fase M (mitose) é a fase de divisão nuclear no qual ocorre a segregação de cromossomos e a divisão citoplasmática. A célula que não está replicando (estado quiescente) encontra-se na fase G₀ por tempo indeterminado. Os neurônios e as hemácias são tipos de células que se encontram permanentemente nesta fase.¹²

A fase G₁ (*do inglês gap, intervalo*) é caracterizada pela transcrição gênica, síntese de proteínas e preparação para a formação do DNA, que ocorrerá na fase S (*do inglês synthesis, síntese*). Ocorrem, nesta fase, diversos mecanismos que regulam a multiplicação celular. O gene supressor de tumor p53, por exemplo, encontrado com alteração em 50% dos tumores humanos, é responsável pela morte celular programada (apoptose) e pela resposta intracelular no ponto de checagem. Quando ocorre a perda da expressão dessa proteína, a progressão do ciclo celular sofre um atraso e a célula continua a se dividir mesmo com dano no DNA, ocasionando a formação de células anômalas.¹³

Figura 2. Ciclo de replicação celular composto pelos períodos de interfase G_1 , S e G_2 , o período divisional de mitose e os pontos de checagem.



A fase G_2 corresponde ao intervalo entre o fim da replicação do DNA e o começo da mitose. O ponto crítico desta fase é a separação das cromátides irmãs que, uma vez separadas, um mecanismo de reparo se torna quase impossível. Para minimizar os riscos, a célula utiliza no ponto de checagem, as proteínas quinases e fosfatases que fazem cessar o ciclo caso o DNA esteja danificado ou com uma replicação incompleta. Nesta fase, a célula ainda trabalha na síntese de componentes para a mitose, na duplicação dos centríolos e na formação das proteínas do citoesqueleto. Todo esse processo resulta em um aumento de volume e tamanho celular.^{14,15}

Na fase mitótica ocorre a citocinese e a divisão cromossômica, no qual o citoplasma é dividido em dois no período da telófase e o material genético é segregado entre as duas células-filhas, respectivamente. Os eventos na mitose são desencadeados pelas proteínas reguladoras das quinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês *cyclin-dependent kinases*), que são ativadas após a fase S estar finalizada. A condensação dos cromossomos e a reorganização dos microtúbulos incide, via de regra, quando as condições estiverem favoráveis no ponto de checagem e não houver nenhum defeito nas fases anteriores.¹⁶

Infelizmente, qualquer anomalia em algumas destas fases decorrentes das mutações dos genes faz com que o ciclo celular fique desregulado, promovendo a

ocorrência desordenada de divisões celulares e o surgimento de células cancerígenas.

1.3. Terapia do câncer

Grandes descobertas na área de agentes antitumorais ocorreram na metade do século XX, com a observação de que agentes quimioterápicos podiam ser utilizados em alvos cancerígenos com alta taxa de proliferação. No entanto, apesar desses avanços, a terapia do câncer está associada a muitos efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo e baixa imunidade, além de limitar-se somente a certos tipos de fenótipos.¹⁷

A terapia do câncer geralmente requer o uso combinado de tratamentos que pode ter intenção curativa ou paliativa. Os procedimentos cirúrgicos são eficazes, porém no caso de metástase ou leucemia é necessária também o transplante de medula e/ou radioterapia e quimioterapia.¹⁸

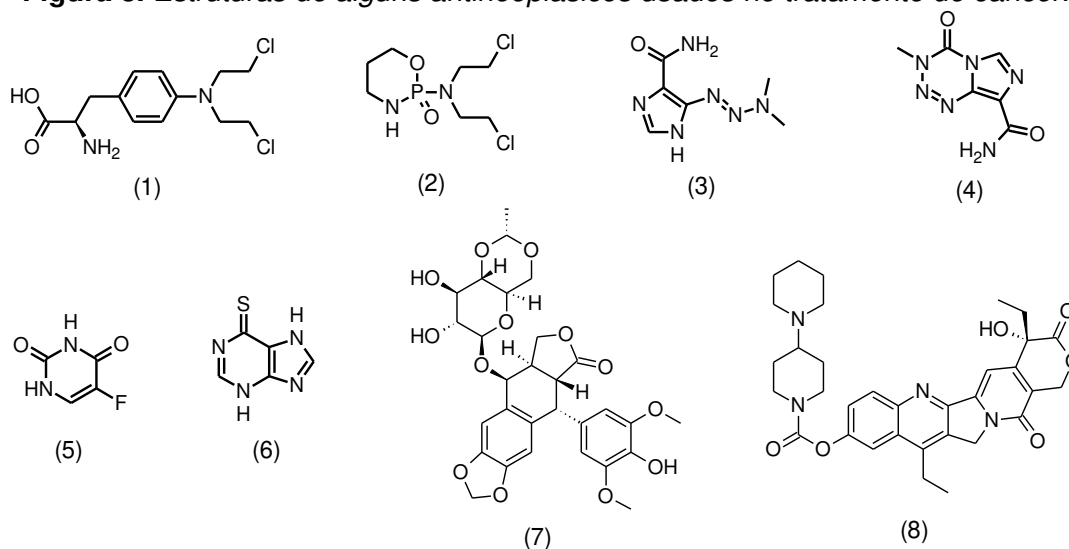
A radioterapia faz uso das radiações ionizantes (raios-X, por exemplo) para destruir um tumor ou impedir que suas células se multipliquem. A radiosensibilidade das células varia de acordo com sua posição no ciclo celular, sendo que o tratamento é maximizado durante as fases G₂ e mitose. Embora a técnica apresente severas limitações decorrentes da agressão do tecido hematopoético e do sistema trato gastrointestinal, dois em cada três pacientes são submetidos ao tratamento, e mesmo isoladamente, a radioterapia ainda é uma metodologia antineoplásica muito empregada.¹⁹

A quimioterapia é um tratamento que utiliza medicamentos específicos para destruir células neoplásicas, atuando principalmente no processo de divisão celular.²⁰ Embora a compreensão dos mecanismos celulares com a descoberta de novos medicamentos tenha sofrido uma revolução nas últimas décadas, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-seletiva, lesando tanto as células malignas quanto as normais, particularmente células de rápido crescimento como as capilares, as do sistema imunológico e as do sistema gastrointestinal.²¹ Além disso, a dose cumulativa do agente quimioterápico pode causar dano no DNA aumentando o risco dos pacientes com câncer iatrogênico. Certamente, esta preocupação também existe na radioterapia, porém, a natureza localizada da dose administrada, em

comparação com a terapia sistêmica com agentes quimioterápicos, limita o risco global desta última.²²

Conforme a atuação sobre o ciclo celular, os quimioterápicos podem ser classificados em agentes pertencentes ao *ciclo-inespecífico*, que são aqueles que agem nas células independentemente de estarem no ciclo proliferativo ou de estarem em repouso na fase G₀; agentes pertencentes ao *ciclo-específico*, que necessitam da proliferação celular para exercer seus efeitos citotóxicos e os de *fase-específica*, que atuam somente em uma determinada fase do ciclo celular. Há ainda a classificação em relação ao mecanismo de ação, que incluem os *agentes alquilantes*, como as mostardas nitrogenadas **1** (Melfalam[®]) e **2** (Endoxan[®]) e os triazenos **3** (Asercit[®]) e **4** (Termodal[®]). Os *agentes antimetabólitos* abrangem os análogos das pirimidinas, como é o caso da fluorouracila **5** (Utoral[®]) e das purinas, no caso de **6** (Purinethol[®]). Os *produtos naturais* também integram um outro grupo de agentes antineoplásicos bastante eficientes. Entre os exemplos, pode-se citar a etoposida (**7**) (Toposar[®]), derivada semi-sintética da podofilotoxinae e o irinotecano (**8**) (Camptosar[®]) utilizado no tratamento de câncer de cólon e reto (**Figura 3**).^{23,24}

Figura 3. Estruturas de alguns antineoplásicos usados no tratamento do câncer.



Até recentemente, o tratamento medicamentoso do câncer baseava-se principalmente nos fármacos citados acima. Hoje, novas abordagens vêm sendo estudadas para a obtenção de fármacos com um perfil genético específico para cada tumor, como o uso de agentes que induzem a alteração da expressão gênica e os que inibem a transdução de sinal. No caso de metástase, o uso da imunoterapia com a proteína PD-1 tem produzido boas respostas clínicas, pois permite que o corpo

produza linfócitos T, responsáveis por algumas respostas biológica efetoras de imunidade.²⁵

1.4. Planejamento de Fármacos Anticancerígenos

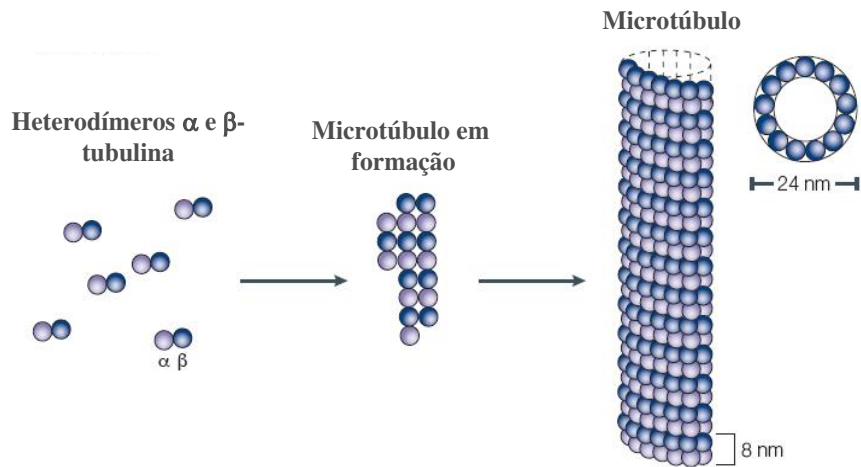
As células eucarióticas possuem uma complexa rede citoplasmática chamada de citoesqueleto, responsável por manter a forma das células e a posição de suas organelas. Três tipos de filamentos protéicos formam o citoesqueleto: actina, filamentos intermediários e microtúbulos.

Desde a descoberta em 1971 do paclitaxel, um dos mais importantes fármacos para o tratamento do câncer até os dias de hoje, diversas classes de compostos que interferem com o processo de divisão celular pela interação com microtúbulos foram descobertos, variando quanto à forma de modulação e quanto aos sítios de ligação às unidades de tubulina.²⁶

Os microtúbulos são polímeros longos e rígidos que se estendem por todo o citoplasma e coordenam a localização intracelular das organelas e de outros componentes celulares. Estruturalmente, os microtúbulos são formados por duas subunidades, α -tubulina e β -tubulina, proteínas semelhantes que possuem aproximadamente 440 aminoácidos e peso molecular de 50 kD cada.²⁷

Na presença de Mg^{2+} e guanosina 5'-trifosfato (GTP), α e β -tubulina agregam-se formando protofilamentos com as subunidades α e β alternadas. Um microtúbulo normal é composto por 13 protofilamentos e tem um diâmetro aproximadamente de 24 nm (**Figura 4**). O GTP ligado à tubulina é hidrolisado a GDP durante ou imediatamente após a polimerização, o que enfraquece a afinidade de ligação da tubulina a moléculas adjacentes e favorece a despolimerização contribuindo para o comportamento dinâmico dos microtúbulos. Esse processo de polimerização e despolimerização promove uma instabilidade dinâmica que é particularmente crítica na remodelação do citoesqueleto durante a mitose.

Figura 4. Representação do processo de polimerização dos microtúbulos.

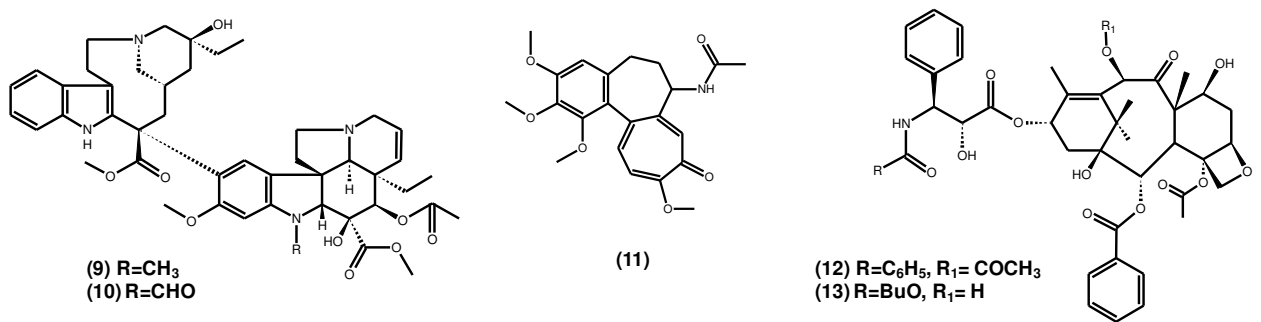


(fonte: modificada da referência 26)

Os fármacos que interferem na função microtubular podem ser divididos em duas categorias: aqueles que desestabilizam os microtúbulos, como é o caso dos produtos naturais vimblastina (**9**) (Vincapan[®] da Rhône- Poulenc), vincristina (**10**) (Oncovin[®] ou Velban[®] da Eli Lilly, Vincristina[®] da Asofarma) e colchicina (**11**) (Colcrys[®]) e aqueles que estabilizam os microtúbulos, tais como os taxanos paclitaxel (**12**) (Taxol[®], da Bristol-Myers Squibb) e docetaxel (**13**) (Taxotere[®]) (**Figura 5**).²⁸

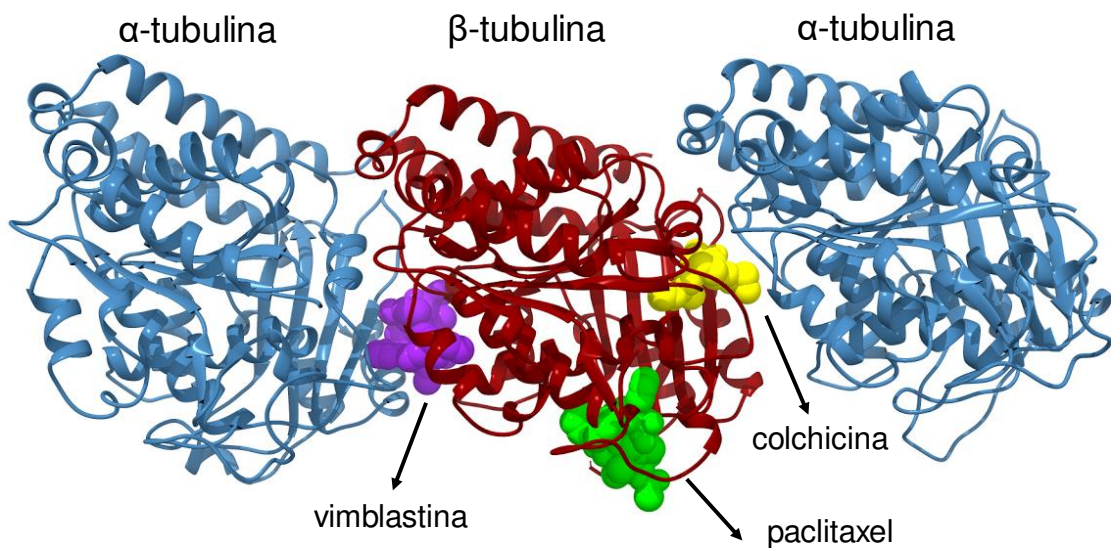
Vimblastina (**9**) e vincristina (**10**), conhecidos como alcaloides de vinca, foram os primeiros agentes antimitóticos utilizados na terapia do câncer obtidos de *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*) e é o princípio ativo utilizado clinicamente para o tratamento de leucemias, linfomas e alguns tumores sólidos. Colchicina (**11**), principal alcaloide extraído de *Colchicum autumnale*, é um medicamento antiinflamatório clássico para o tratamento de gota. Paclitaxel (**12**) é um produto natural isolado originalmente de *Taxus brevifolia* e atualmente é produzido em escala semi-sintética. Docetaxel (**13**) é um análogo semissintético do paclitaxel (**12**) e é utilizado no tratamento de câncer de ovário, mama e pulmão.

Figura 5. Estruturas químicas de compostos que apresentam atividade anticancerígena pela modulação de microtúbulos.



O sítio dos alcaloides de vinca está localizado entre α e β -tubulina, o sítio dos taxanos reside em uma profunda bolsa hidrofóbica em uma interface lateral entre adjacentes protofilamentos e o sítio da colchicina (11) está localizado na interface intra-dímero entre β e α -tubulina (Figura 6).²⁹

Figura 6. Principais sítios de ligação de moduladores da polimerização de tubulina. Figura gerada pela sobreposição de diversas estruturas cristalográficas contendo os compostos: vimblastina (PDB ID: 1Z2B), colchicina (PDB ID: 4O2B) e paclitaxel (PDB ID: 1JFF).

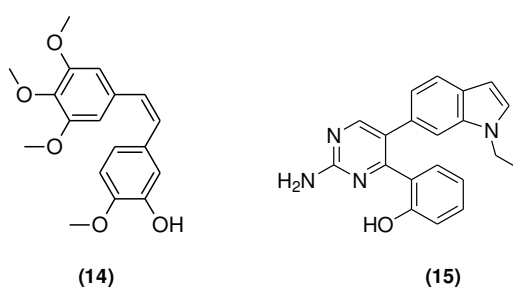


A colchicina (11) teve um papel fundamental na elucidação das propriedades físicas e funções biológicas do sistema tubulina/microtúbulos, porém, apesar de sua importância histórica e de apresentar eficaz propriedade citostática, essa substância não está incluída entre os fármacos comercialmente disponíveis para a terapia do câncer. A busca intensiva para diminuir sua elevada neurotoxicidade, juntamente com a facilidade da síntese quando comparadas aos taxanos e aos

alcaloides de vinca, faz com que o sítio da colchicina (**11**) seja um atrativo para muitos grupos de pesquisa.³⁰

Um exemplo é a combretastatina A-4 (**14**)³¹ e o derivado pirimídico YHHU0895 (**15**)³², que apresentam estruturas bem simples e baixa resistência por efluxo provocado pela glicoproteína-P (frequentemente envolvida na resistência das células de câncer aos agentes antitubulina) (**Figura 7**).

Figura 7. Ligantes do sítio da colchicina (**11**), combretastatina A-4 (**14**) e YHHU0895 (**15**).



Muitos trabalhos de otimização de ligantes para o sítio da colchicina (**11**) apresentam o núcleo indol (**16**) como esqueleto central da desestabilização de microtúbulos, alguns deles potentes inibidores da proliferação de tumores resistentes ao paclitaxel (**12**).³³ Outros mostram a importância do grupo trimetóxiifenil (**17**) e a restrição na conformação da molécula (**18**) para aumentar a especificidade do ligante ao sítio (**Figura 8**).^{34,35,36} A relação estrutura atividade (SAR) da colchicina (**11**)³⁷ está sumarizada na **Figura 9**.

Figura 8. Grupos farmacofóricos importantes para a desestabilização dos microtúbulos via sítio da colchicina (**11**). Azul (sistema indol), rosa (grupo trimetóxiifenil), verde (restrição conformacional).

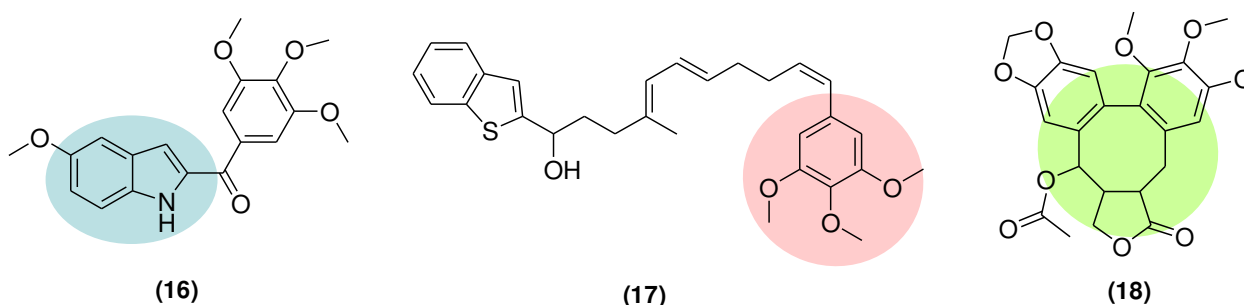
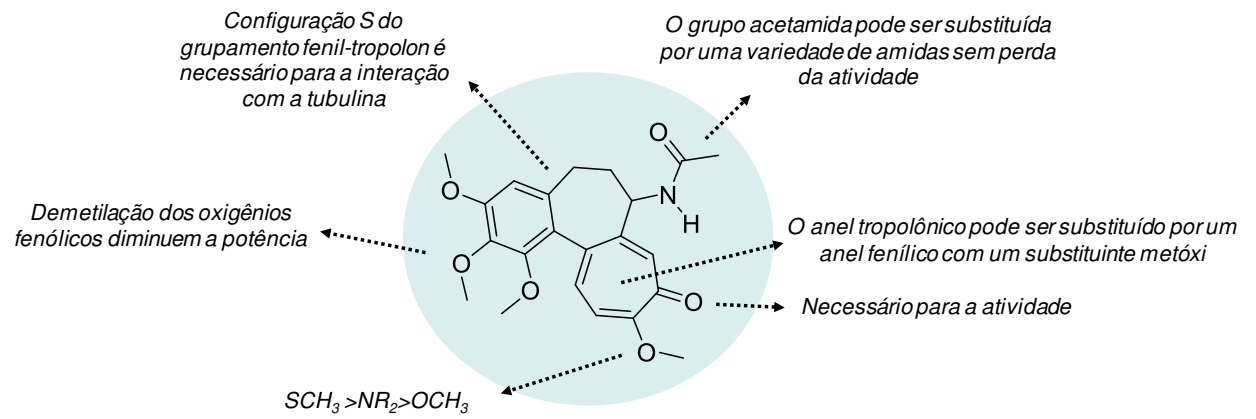


Figura 9. Relação estrutura atividade (SAR) da colchicina (**11**).



2- Motivação

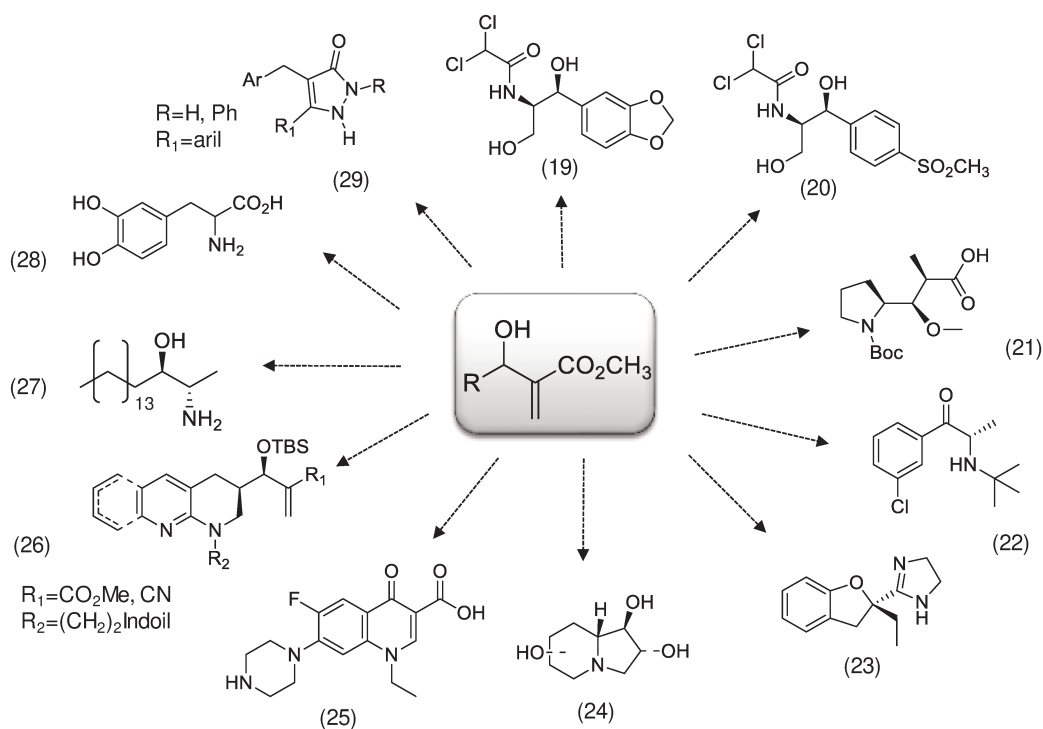


2. MOTIVAÇÃO

O Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos (LSPNF) do Instituto de Química da UNICAMP tem contribuído de forma significativa para o desenvolvimento de novas metodologias em reações de Morita-Baylis-Hillman (MBH) e seu emprego na síntese de novas substâncias bioativas com grande aplicabilidade na área farmacêutica e medicinal. Essa reação, conhecida desde 1968³⁸, está incluída na classe de reações que apresenta maior eficiência de átomos e grande versatilidade sintética.

A síntese de derivados do cloranfenicol³⁹ (**19** e **20**), da *N*-Boc-dolaproina⁴⁰ (**21**), da bupropiona⁴¹ (**22**), do (+)-efaroxan⁴² (**23**), da pirrolizidina trihidroxilada⁴³ (**24**), do norfloxacino⁴⁴ (**25**), da 1,8-naftiridina⁴⁵ (**26**), da espisulosina⁴⁴ (**27**), do DOPA⁴⁶ (**28**) e da pirazolona substituída⁴⁷ (**29**), são alguns exemplos de substâncias obtidas recentemente pelo grupo que ilustram a potencialidade da reação de MBH no campo da síntese orgânica (**Figura 10**).

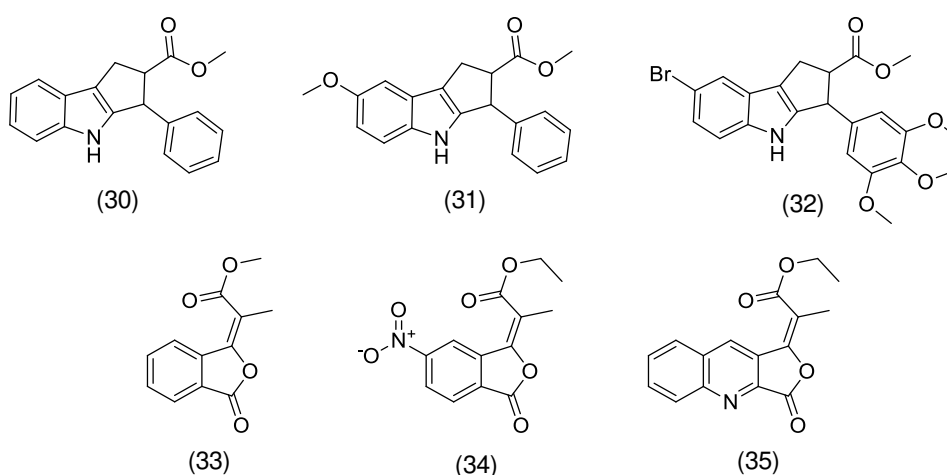
Figura 10. Substâncias sintetizadas no LSPNF a partir de adutos de Morita-Baylis-Hillman.



Algumas classes de substâncias obtidas a partir de adutos de MBH apresentaram atividade antitumoral promissora em certos tipos de linhagens tumorais

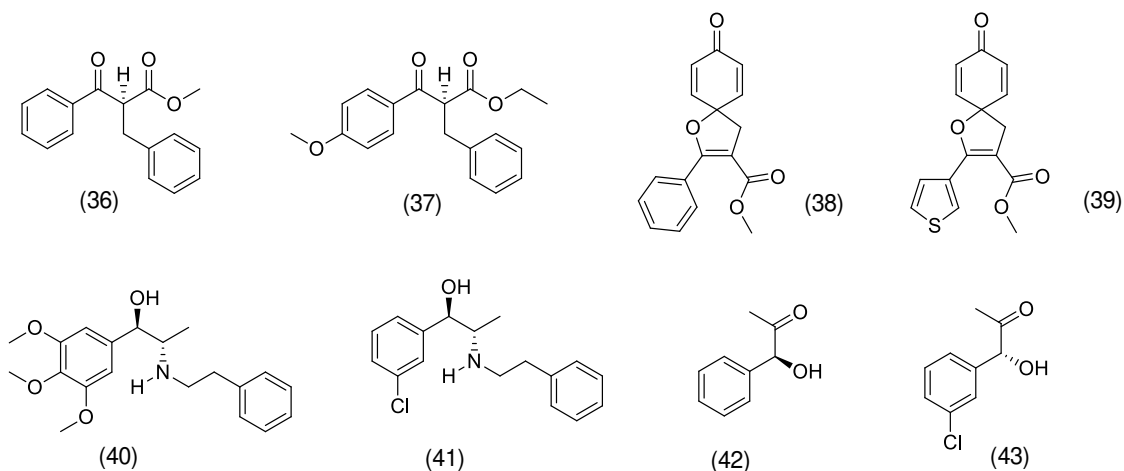
humanas [K562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário), U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanona), NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata) e HT-29 (cólon)]. Os derivados indólicos **30**, **31** e **32** mostraram significativo efeito antiproliferativo para as linhagens K562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário) e NCI-ADR/RES (ovário multiresistente) com destaque para o composto **31**, 100 vezes mais potente que o controle doxorrubicina, além de ser seletivo para a linhagem K562. Os ftalídeos **33**, **34** e **35** também foram estudados em relação a atividade citotóxica e em uma análise qualitativa da relação entre a estrutura e atividade (SAR) pôde-se mostrar que a presença da dupla ligação exocíclica e de grupos retiradores de elétrons no anel aromático são essenciais para uma potente atividade antitumoral⁴⁸ (**Figura 11**).

Figura 11. Derivados indólicos (**30**, **31** e **32**) e ftalídeos (**33**, **34** e **35**) sintetizados a partir de adutos de Morita-Baylis-Hillman.



Outras classes de substâncias como β -cetoésteres (**36**, **37**), espirocicloexadienonas (**38**, **39**), 1,2-aminoalcoóis (**40**, **41**) e aciloínas (**42**, **43**) foram sintetizadas e a análise dos resultados em ensaios antibacterianos, inibidores de glicosidase, parasitários e antiproliferativos estão em andamento (**Figura 12**).

Figura 12. β -cetoésteres (**36** e **37**), espirocicloexadienonas (**38** e **39**), 1,2-aminoalcóóis (**40** e **41**) e aciloínas (**42** e **43**) sintetizados a partir de adutos de Morita-Baylis-Hillman.

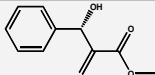
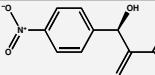
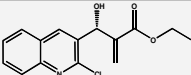
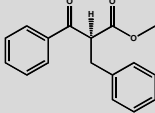
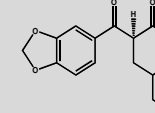
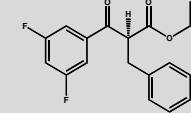
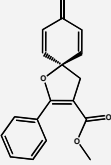
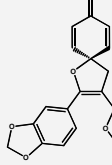
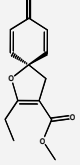
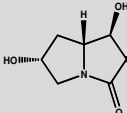
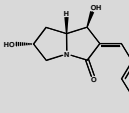
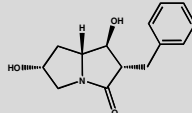
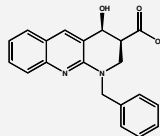
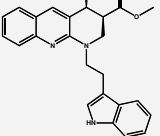
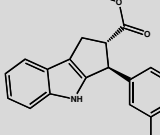
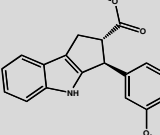
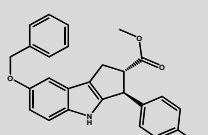
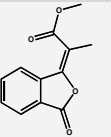
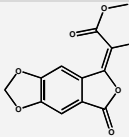
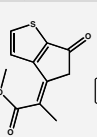
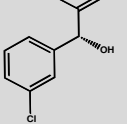
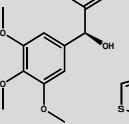
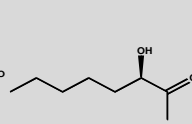
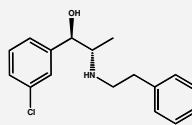
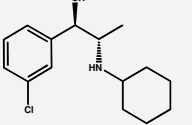
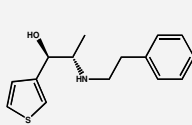


A motivação do trabalho para o Planejamento e Síntese de novos análogos para a terapia do câncer utilizando os adutos de MBH, deu-se em paralelo aos resultados obtidos durante uma parceria com o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Adriano Defini Andricopulo do Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). Os resultados desta parceria estão publicados na Tese de Doutorado do aluno Ricardo N. dos Santos⁴⁹ e serão discutidos sucintamente nos itens abaixo.

2.1. Conjunto de dados e estudos de docagem molecular

A primeira parte da parceria consistiu na organização de uma base de dados (2D e 3D) a partir de substâncias sintetizadas no nosso laboratório. As substâncias sintetizadas a partir dos adutos de MBH foram agrupadas de acordo com a classe estrutural, sendo divididas em 9 grupos (**A-I**), totalizando 258 estruturas. As classes estão mostradas abaixo, juntamente com as representações de algumas de suas estruturas (**Tabela 2**). A triagem virtual foi baseada na estrutura do receptor, utilizando como alvo molecular a proteína tubulina. Durante o processo de docagem e escolha da estrutura, levou-se em consideração os parâmetros estruturais, a seletividade do sítio ativo frente ao conjunto de dados e a resolução cristalográfica.

Tabela 2. Classe estrutural e estruturas moleculares do conjunto de dados utilizados para os estudos de modelagem molecular.

Classe estrutural	Estrutura		
A- Adutos de Morita-Baylis-Hillman			
B- β-Cetoésteres			
C- Espirocicloexadienonas			
D- Pirrolizidinonas e Pirrolizidinas substituídas			
E- 1,8-Naftiridinas Substituídas			
F- Ciclopenta[b]indóis			
G- Ftalídeos			
H- Aciloínas			
I- 1,2-Aminoalcoóis			

A estrutura cristalográfica da tubulina ligada a vimblastina (**9**), colchicina (**11**) e paclitaxel (**12**) foi acessada a partir do PDB com os respectivos códigos 1Z2B, 1SA0 ou 4O2B e IJFF, respectivamente. A docagem molecular foi realizada nos três sítios bioativos da proteína e utilizando três programas distintos: GOLD, Surflex e AutoDock. O resultado final foi uma lista com a pontuação de energia combinada dos vários programas.

Foram selecionadas as primeiras 50 moléculas que apresentaram boa pontuação em no mínimo dois programas. Posteriormente, após uma avaliação mais detalhada das energias previstas, das geometrias das poses e da complementaridade

dos ligantes (**Figura 13**) foram escolhidas 25 moléculas para avaliação bioquímica, que permitiu não somente identificar novos moduladores da tubulina, mas também permitiu a validação do modelo de interação virtual (**Figura 14, Tabela 3**).

Figura 13. Análise da complementaridade de três ligantes selecionados entre os mais bem pontuados nos procedimentos de docagem molecular. (A) 1,8-Naftiridina **4** (B) Espirocicloexadienona **9** e (C) Ciclopenta[*b*]indol **7**.

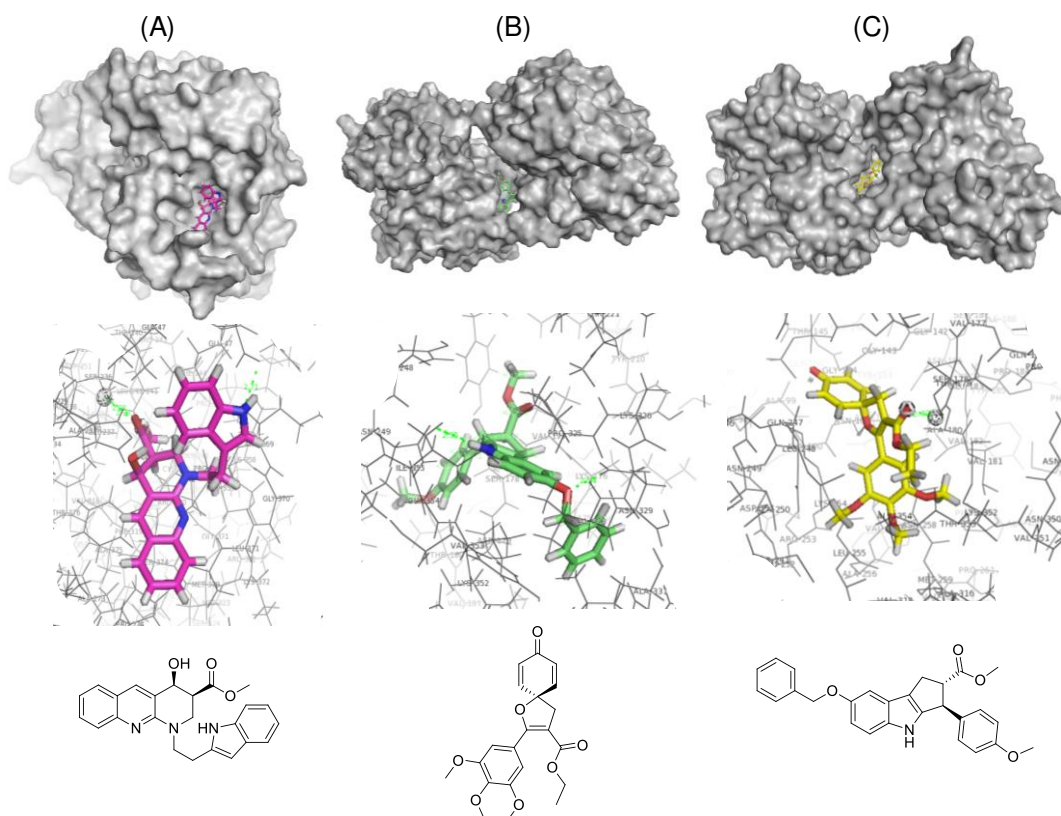


Figura 14. Procedimento da triagem virtual realizado para identificar novos moduladores da proteína tubulina.

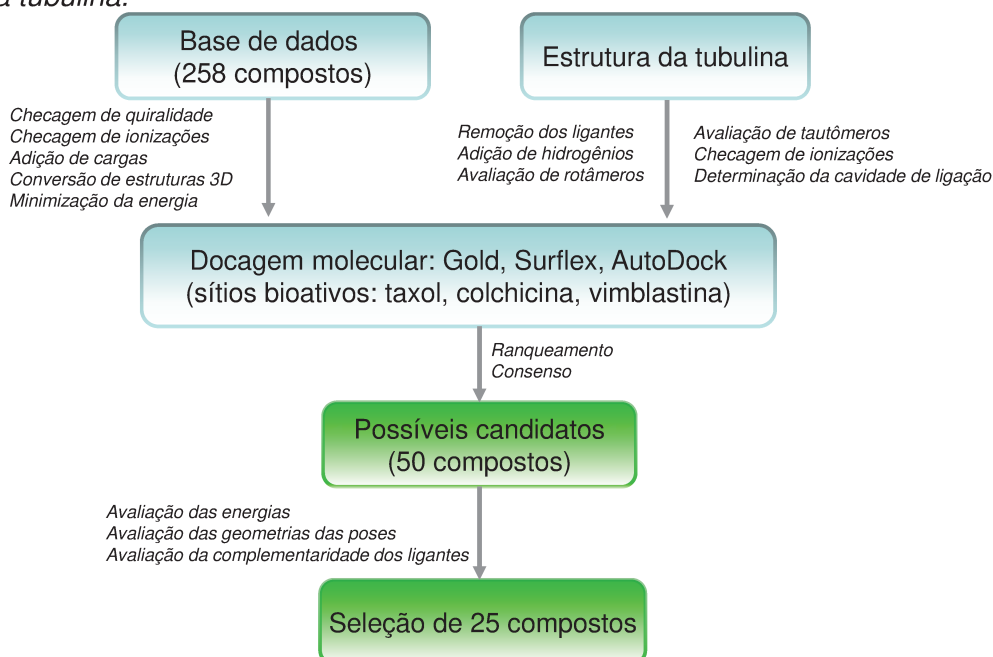


Tabela 3. Classificação geral dos compostos após triagem virtual realizada em três programas: GOLD, Surflex e AutoDock e em três sítios bioativos da tubulina: vimblastina (9), colchicina (11) e paclitaxel (12).

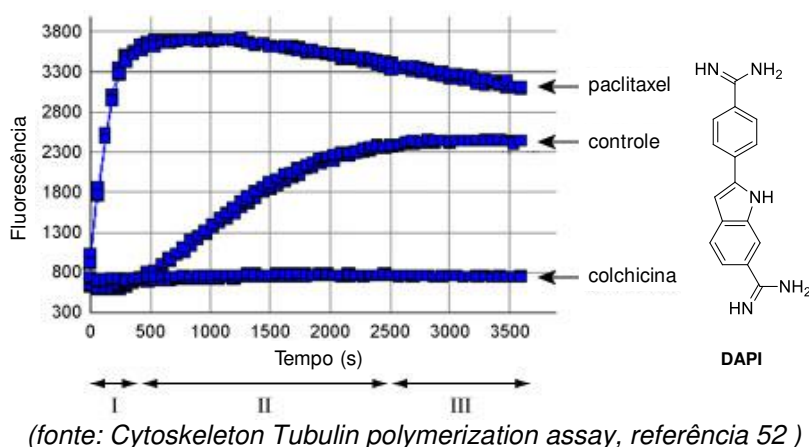
Classificação	Substâncias
1	Ciclopenta[b]indol 7
2	1,8-Naftiridina 4
3	1,8-Naftiridina 9
4	1,8-Naftiridina 3
5	1,8-Naftiridina 7
6	1,8-Naftiridina 11
7	1,8-Naftiridina 10
8	Ciclopenta[b]indol 5
9	Ciclopenta[b]indol 4
10	Ciclopenta[b]indol 3
11	Ciclopenta[b]indol 8
12	Ciclopenta[b]indol 15
13	Ciclopenta[b]indol 6
14	Ciclopenta[b]indol 1
15	Ciclopenta[b]indol 14
16	Aduto de Morita-Baylis-Hillman 41
17	β -Cetoester 17
18	β -Cetoester 22
19	Espisulosina
20	β -Cetoester 23
21	Espirocicloexadienona 9
22	β -Cetoester 24
23	β -Cetoester 25
24	Ciclopenta[b]indol 2
25	Ciclopenta[b]indol 11

2.2. Ensaios bioquímicos

Dois métodos bioquímicos para quantificação da polimerização da tubulina foram utilizados: quantificação por Fluorescência e por Espalhamento.

Na quantificação de polimerização da tubulina através da Fluorescência, o composto repórter fluorescente DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) é adicionado à reação de polimerização de tubulina.^{50,51} Esse composto possui a capacidade de se incorporar a microtúbulos (e não a dímeros livres de tubulina) e apresenta a característica de absorver e emitir luz com máximos de comprimento de onda em 360 nm e 420 nm, respectivamente. Desta forma, durante a polimerização da tubulina na presença de DAPI é possível observar um aumento de emissão de luz no comprimento de 420 nm devido à incorporação do repórter fluorescente nos microtúbulos à medida que os mesmos são polimerizados. O processo de polimerização é caracterizado por três fases distintas. Na fase I, conhecida como *nucleação*, centros de associação de dímeros surgem, formando protofilamentos e folhas de tubulina. Na fase II, denominada de *crescimento*, os microtúbulos que surgem a partir do fechamento das folhas de tubulina começam a crescer continuamente pela adição de dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. Esta etapa é caracterizada pelo aumento de sinal devido ao número crescente de moléculas repórter associadas aos microtúbulos. A fase III é conhecida como *fase de equilíbrio*, em que um equilíbrio entre as taxas de polimerização e despolimerização é estabelecido, o qual depende principalmente da concentração de tubulina e da temperatura do ambiente.⁵² O paclitaxel (**12**) estabiliza e a colchicina (**11**) desestabiliza os microtúbulos (**Figura 15**).

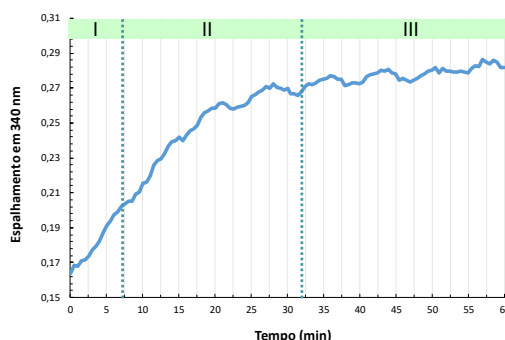
Figura 15. Ensaio de polimerização da tubulina baseado em fluorescência com as três fases de polimerização indicadas por I (*nucleação*), II (*crescimento*) e III (*equilíbrio*).



No ensaio de polimerização por meio do Espalhamento, mede-se a absorbância quando ocorre aumento da turbidez do meio devido à formação de microtúbulos. A medida é feita em um comprimento de onda de 340 nm e o

espalhamento de luz correspondente à polimerização apresenta, assim como na fluorescência, as fases de nucleação, crescimento e equilíbrio (**Figura 16**). Os padrões colchicina (**11**), paclitaxel (**12**) e DMSO (controle) são utilizados como referência para o ensaio.⁵³

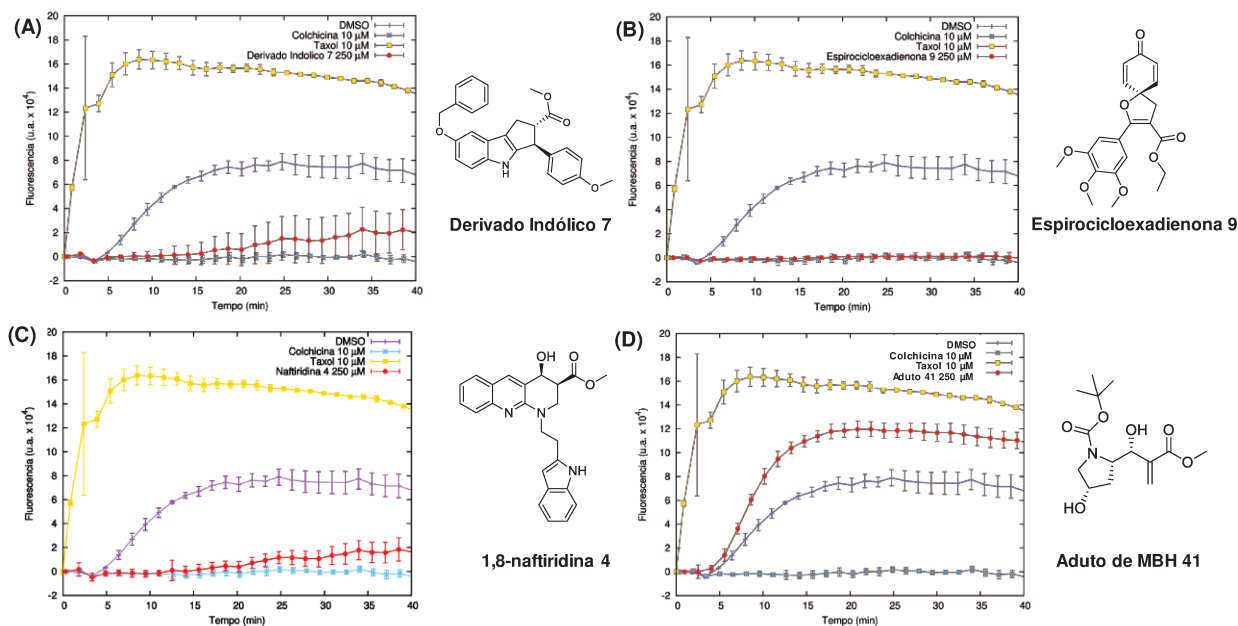
Figura 16. Ensaio de polimerização da tubulina baseado em espalhamento com as três fases de polimerização indicadas por I (nucleação), II (crescimento) e III (equilíbrio).



Os compostos selecionados a partir das estratégias de docagem molecular foram avaliados experimentalmente no ensaio de polimerização em uma concentração única de 250 μM (curva vermelha). O ensaio controle com 1% de DMSO está representado pela curva roxa, o ensaio padrão com 20 μM de colchicina (**11**) está representado pela curva azul e o ensaio padrão com 20 μM de paclitaxel (**12**) está representado pela curva amarela (**Figura 17**).

A análise dos resultados indicou uma diminuição considerável na taxa de polimerização da tubulina na presença do ciclopenta[*b*]indol **7**, 1,8-naftiridina **4** e espirocicloexadienona **9**, efeito semelhante encontrado para colchicina (**11**). O Aduto de Morita-Baylis-Hillman **41** mostrou um efeito contrário, sendo expressivo no aumento da taxa de polimerização da tubulina, semelhante ao paclitaxel (**12**) (**Figura 17**).

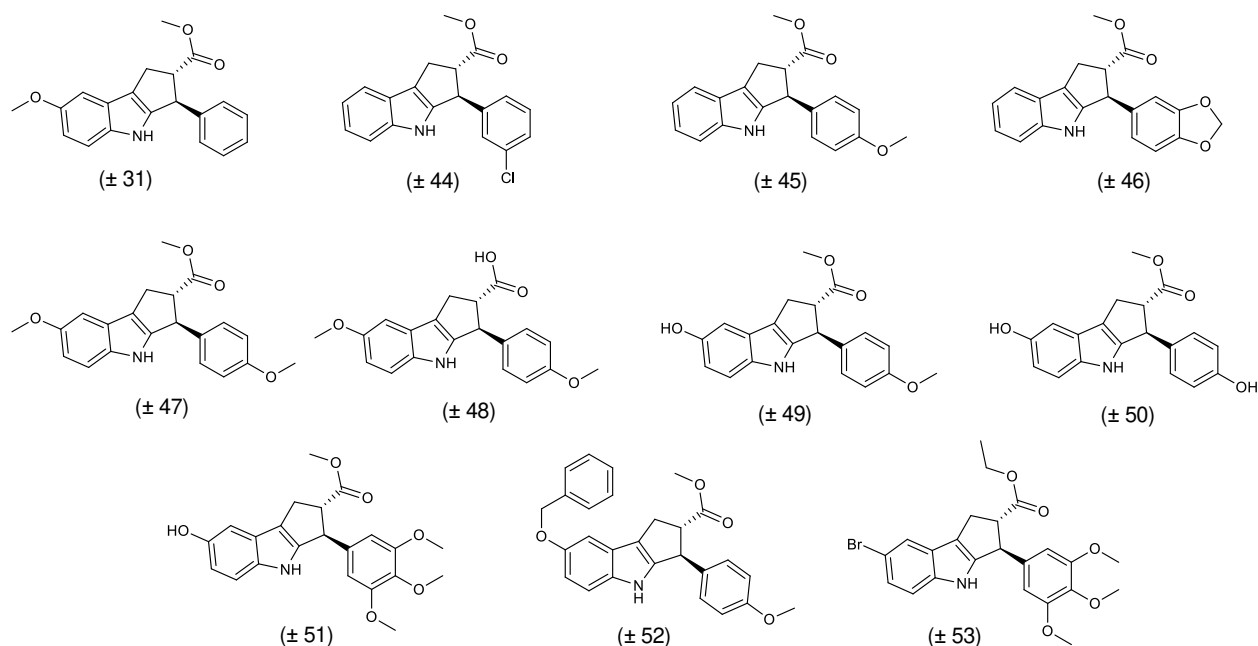
Figura 17. Resultados dos ensaios de polimerização de tubulina na presença de (A) Derivado Indólico 7, (B) 1,8-Naftiridina 4, (C) Espirocicloexadienona 9 e (D) Aduto de Morita-Baylis-Hillman 41.



Dentre estes compostos, os ciclopenta[*b*]indóis foram escolhidos inicialmente para dar prosseguimento aos ensaios, por apresentarem em seu esqueleto características estruturais semelhantes a alguns agentes desestabilizadores de microtúbulos já relatados na literatura e ainda, por ter uma massa viável de diferentes análogos para serem testados.

Os ciclopenta[*b*]indóis **31**, **44-49** e **52-53** mostrados na **Figura 18** foram testados inicialmente em concentração única de 250 μM. Os compostos **31** e **45** apresentaram baixa solubilidade na concentração testada. A análise do gráfico mostrado na **Figura 19E** indicou que o composto **48** não apresenta efeito sobre a modulação da tubulina. Os compostos **47** e **53** apresentaram uma pequena diminuição no sinal de fluorescência ao longo do tempo (**Figuras 19D** e **19H**) em comparação aos ensaios padrão (sem composto, **Figura 19A**), porém para os compostos **44**, **46** e **52** o efeito foi mais pronunciado (**Figuras 19B**, **19C** e **19G**) seguindo praticamente o mesmo padrão encontrado para a colchicina (**11**). Neste mesmo seguimento, o destaque maior se deu para o composto **49**, que resultou numa curva que coincidiu com a obtida na presença de 20 μM de colchicina (**11**), inibindo quase que totalmente a formação de microtúbulos (**Figura 19F**). Curiosamente, este era o único a apresentar uma hidroxila no esqueleto do indol.

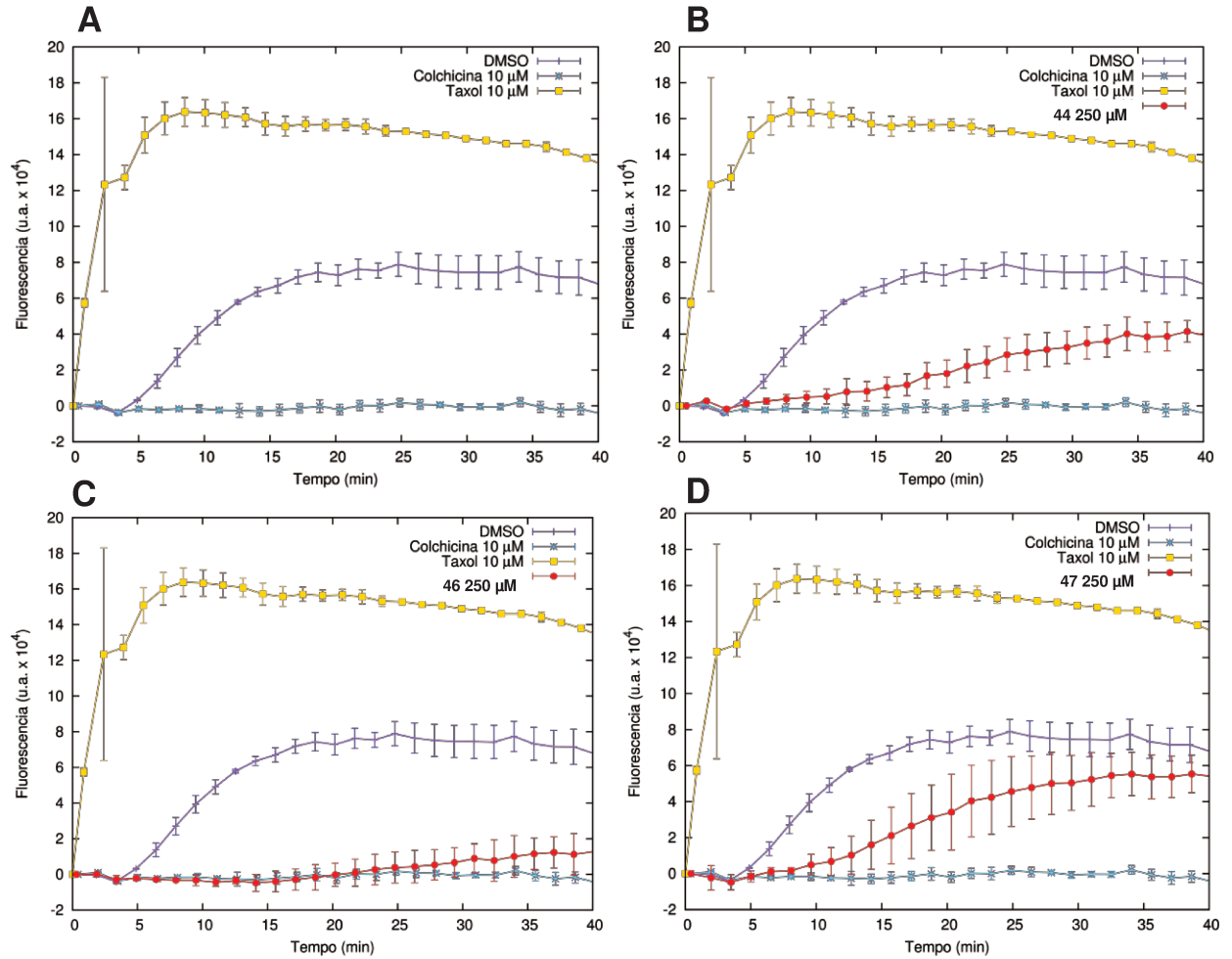
Figura 18. Estruturas dos ciclopenta[b]indóis testados no ensaio de Quantificação de Polimerização da Tubulina por Fluorescência.

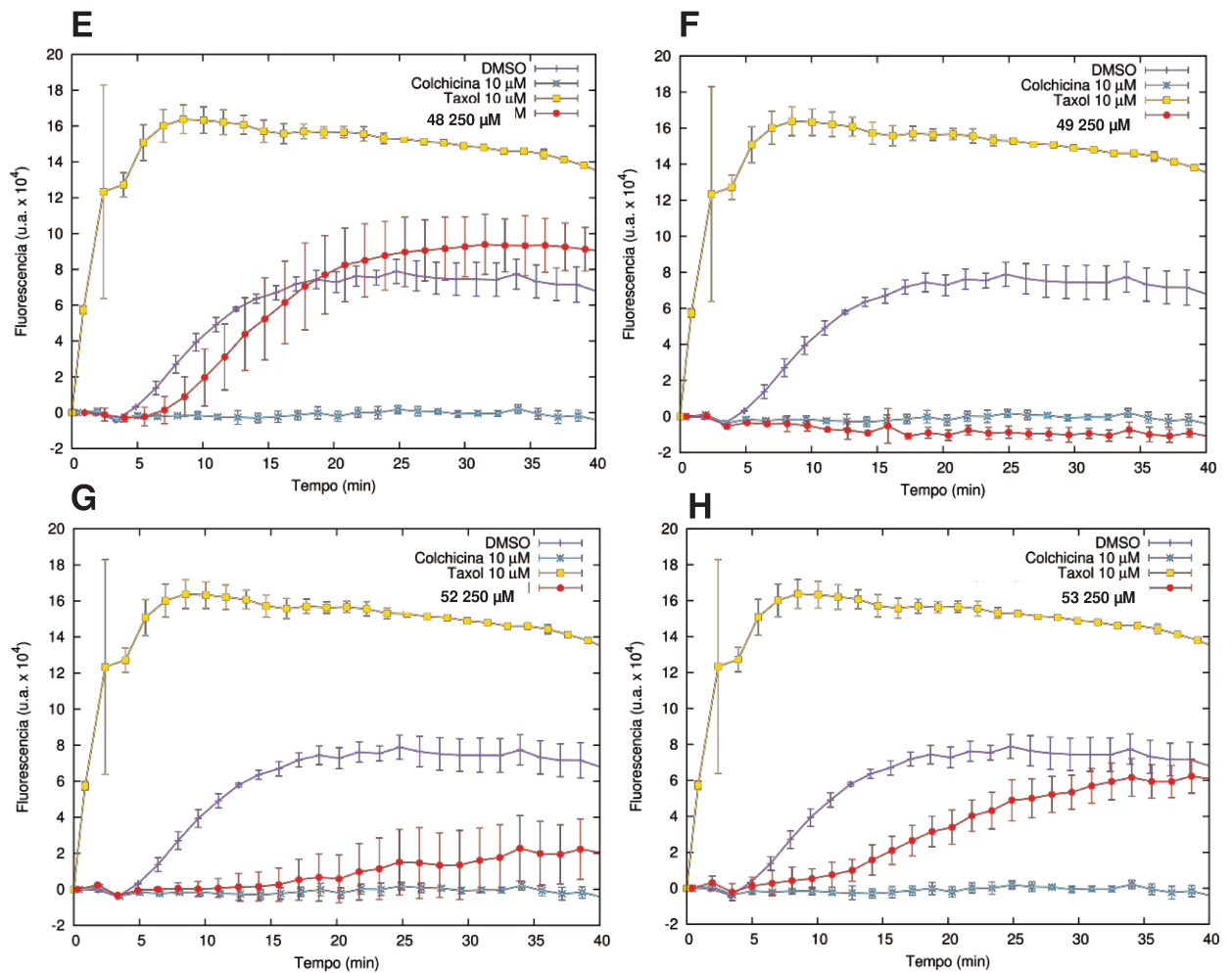


Dois novos compostos (**50** e **51**) foram então delineados com tal proposta de substituição e submetidos ao ensaio de Fluorescência e Espalhamento para cálculo do IC₅₀ (**Tabela 4**).

De acordo com o ensaio, nota-se que a ausência do grupo hidroxila no indol, como no caso do composto **31**, ou a ausência do grupo metóxi no substituinte fenílico, como no caso do composto **50**, resulta em perda de atividade. Os compostos **49** e **51** confirmam esta hipótese apresentando valores satisfatórios de inibição com valores de IC₅₀ de 25 e 24 μ M, respectivamente. Em 100 μ M observou-se total inibição da polimerização da tubulina para ambos estes compostos. Os compostos **44**, **45**, **46** e **52** apresentaram um perfil interessante de inibição em 1 μ M, porém a solubilidade destes compostos diminuiu consideravelmente em altas concentrações, dificultando o cálculo do IC₅₀.

Figura 19. Resultados dos ensaios de polimerização de tubulina na presença dos ciclopenta[b]indóis selecionados. Todos os compostos foram testados em triplicata com uma concentração de 250 μM . (A) Ensaio padrão na presença de colchicina (11), paclitaxel (12) e na ausência de ligantes (controle contendo somente DMSO) (B) Ciclopenta[b]indol 44 (C) Ciclopenta[b]indol 46 (D) Ciclopenta[b]indol 47 (E) Ciclopenta[b]indol 48 (F) Ciclopenta[b]indol 49 (G) Ciclopenta[b]indol 52 (H) Ciclopenta[b]indol 53.





Cabe mencionar que embora os valores de IC_{50} dos compostos **49** e **51** sejam maiores que os da colchicina (**11**), estes compostos apresentam menor toxicidade (ver item 2.4.3) e o planejamento de novos análogos se torna indispensável na busca de melhores inibidores da tubulina.

Tabela 4. Inibição da polimerização da tubulina por Fluorescência e Espalhamento.

Compostos	Inibição da polimerização da tubulina (%)	
	Fluorescência IC_{50} (μM)	Absorbância 25 μM
31	> 250	1 ± 11
44	> 50*	84 ± 10
45	> 50*	67 ± 7
46	> 50*	32 ± 6
49	25 ± 8	38 ± 8
50	> 250	9 ± 7
51	24 ± 4	60 ± 2
52	> 50*	47 ± 6
Colchicina (11)	2.0 ± 0.2	$100 \pm 9^{**}$

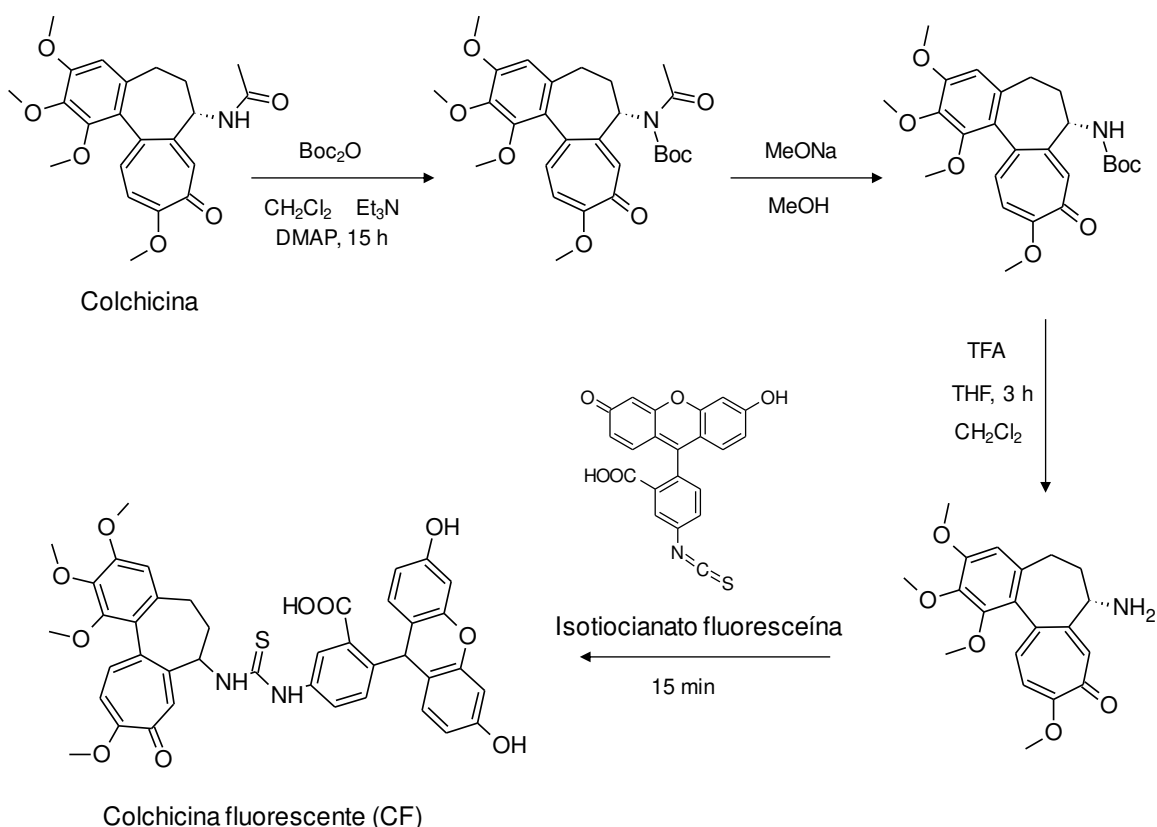
* Insolúvel em 50 μM . ** Testada em uma concentração de 5 μM . Os valores das atividades foram definidos com um desvio padrão de três experimentos independentes.

2.3. *Determinação do mecanismo de ação dos ciclopenta[b]indóis*

Em uma segunda parte da parceria, foi proposto um modelo de mecanismo molecular, na tentativa de mostrar o modo de interação entre os derivados ciclopenta[b]indólicos e a tubulina.

Há vários métodos disponíveis para determinar sítios de ligação à tubulina, que inclui tanto métodos radioativos quanto métodos não-radioativos. Este último pode ser realizado por espectrometria de massas⁵⁴, por cromatografia com DEAE-celulose ou por cromatografia de exclusão.⁵⁵ Devido à simplicidade, a um maior grau de sensibilidade e a adequação no laboratório, o ensaio competitivo por exclusão utilizando a colchicina fluorescente (CF) foi escolhido para monitorar a ligação ao sítio da colchicina (**11**).

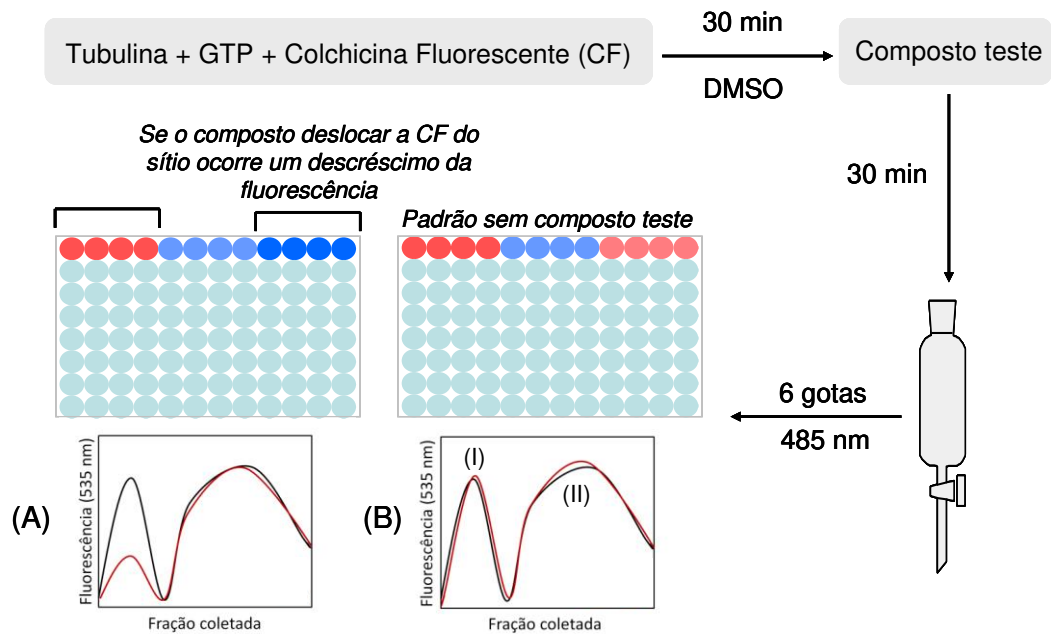
Para isso, foi necessário realizar a síntese da CF em nosso laboratório (**Esquema 1**), que, devido a sua fácil degradação, a mesma não estava disponível comercialmente. Assim, o composto de partida (colchicina, **11**) foi protegido com Boc (*t*-butiloxicarbonil) na presença de diclorometano (CH₂Cl₂), trietilamina (Et₃N) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP). A deacetilação foi feita com metóxido de sódio (MeONa) em metanol e, após, foi feita a desproteção do grupo Boc pela adição de TFA em THF/CH₂Cl₂. A adição de isotiocianato de fluoresceína levou a síntese da CF, devidamente caracterizada por RMN de ¹H, ¹³C e espectrometria de massas. Sendo o produto muito instável, este foi utilizado imediatamente após sua síntese e purificação.⁵⁶

Esquema 1. Síntese da colchicina fluorescente (CF).

Após a obtenção da CF, seguiu-se a metodologia do ensaio competitivo por exclusão, no qual comparando-se a fluorescência obtida na presença do ligante e na ausência do mesmo, monitorou-se a emissão em 535 nm após excitação a 485 nm.⁵⁷

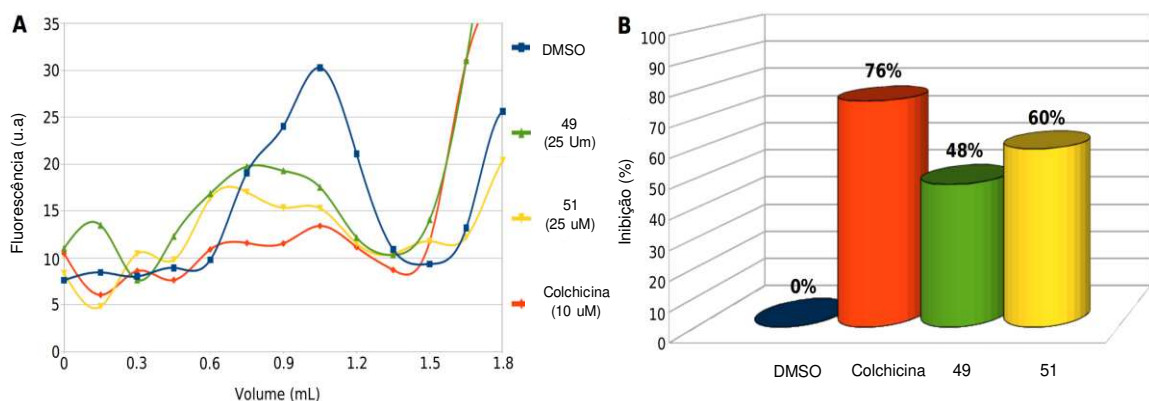
A **Figura 20** ilustra de forma sucinta cada etapa do ensaio. Sem a presença do composto teste, a curva obtida apresenta um pico de emissão (indicado por **I** na **Figura 20B**) no qual a colchicina fluorescente está ligada a tubulina. Nas frações seguintes, a colchicina fluorescente não-ligada é eluída e então, um segundo pico (indicado por **II** **Figura** na **20B**) é verificado. Para um ligante incapaz de se ligar ao sítio da colchicina (**11**), a curva do ensaio apresenta o mesmo perfil que o ensaio padrão. Porém, se o composto possuir a capacidade de se ligar ao sítio da colchicina (**11**), ocorrerá uma diminuição do sinal de emissão do primeiro pico por causa do deslocamento da colchicina fluorescente do sítio (**Figura 20A**).

Figura 20. (A) Ensaio em que o composto teste se liga ao sítio da colchicina (11), apresentando uma competitividade pelo sítio, que leva a uma diminuição do sinal de emissão em comparação ao ensaio padrão (B).



Como pode ser observado na **Figura 21A**, a presença dos compostos **49** e **51** fizeram com que houvesse uma diminuição no sinal de emissão correspondente ao pico I da curva de fluorescência. O gráfico da **Figura 21B** mostra uma comparação destes compostos com o padrão colchicina (**11**). Para o composto **49**, a uma concentração de 25 μM , houve uma redução de aproximadamente 48% no sinal de emissão (barra verde), enquanto que para o composto **51** (com a mesma concentração), observou-se uma diminuição de 60% do sinal (barra amarela). Este resultado está próximo ao valor encontrado quando a tubulina é incubada com a colchicina não fluorescente (barra laranja), confirmando que os ciclopenta[*b*]indóis são capazes de se ligar ao sítio da colchicina (**11**) em um modo de interação competitivo.

Figura 21. Resultado obtido para o ensaio de competição frente ao sítio da colchicina (**11**).



A identificação do sítio de ligação dos derivados ciclopenta[*b*]indólicos levou a um estudo computacional mais aprofundado em relação as conformações e interações com o sítio bioativo. Uma vez que a síntese de tais compostos produz majoritariamente um único diastereoisômero com uma estereoquímica 1,2-*trans* (configuração relativa confirmada por cristalografia de Raios-X⁵⁸, **Figura 56**) e conseqüentemente, há presente uma mistura racêmica dos enantiômeros *RR* e *SS*, considerou-se ambos estereoisômeros dos compostos **49** e **51** para o estudo de docagem.

Os valores das docagens utilizando o programa GOLD 5.1 e o modelo cristalográfico para tubulina/colchicina PDB 1SA0 sugeriram que o enantiômero *SS* tem uma maior contribuição para a atividade observada *in vitro* na inibição dos microtúbulos para ambos os compostos (**Tabela 5**).

Tabela 5. Valores da docagem ($\log K_d$) para os derivados indólicos **49** e **51**.

Derivado indólico	49		51	
	$\log K_d$		$\log K_d$	
Rodada	<i>RR</i>	<i>SS</i>	<i>RR</i>	<i>SS</i>
1	-8,2	-9,2	-9,5	-8,1
2	-8,9	-9,2	-8,3	-9,8
3	-9,2	-9,1	-9,5	-9,7
4	-9,3	-9,2	-8,3	-9,7
5	-8,4	-9,4	-9,5	-8,0
6	-9,2	-9,2	-7,9	-9,8
7	-9,0	-9,2	-9,5	-9,7
8	-9,2	-9,2	-8,7	-9,7
9	-9,3	-9,2	-8,0	-8,0
10	-7,7	-7,8	-7,9	-7,2
Média	-8,84	-9,07	-8,71	-8,97

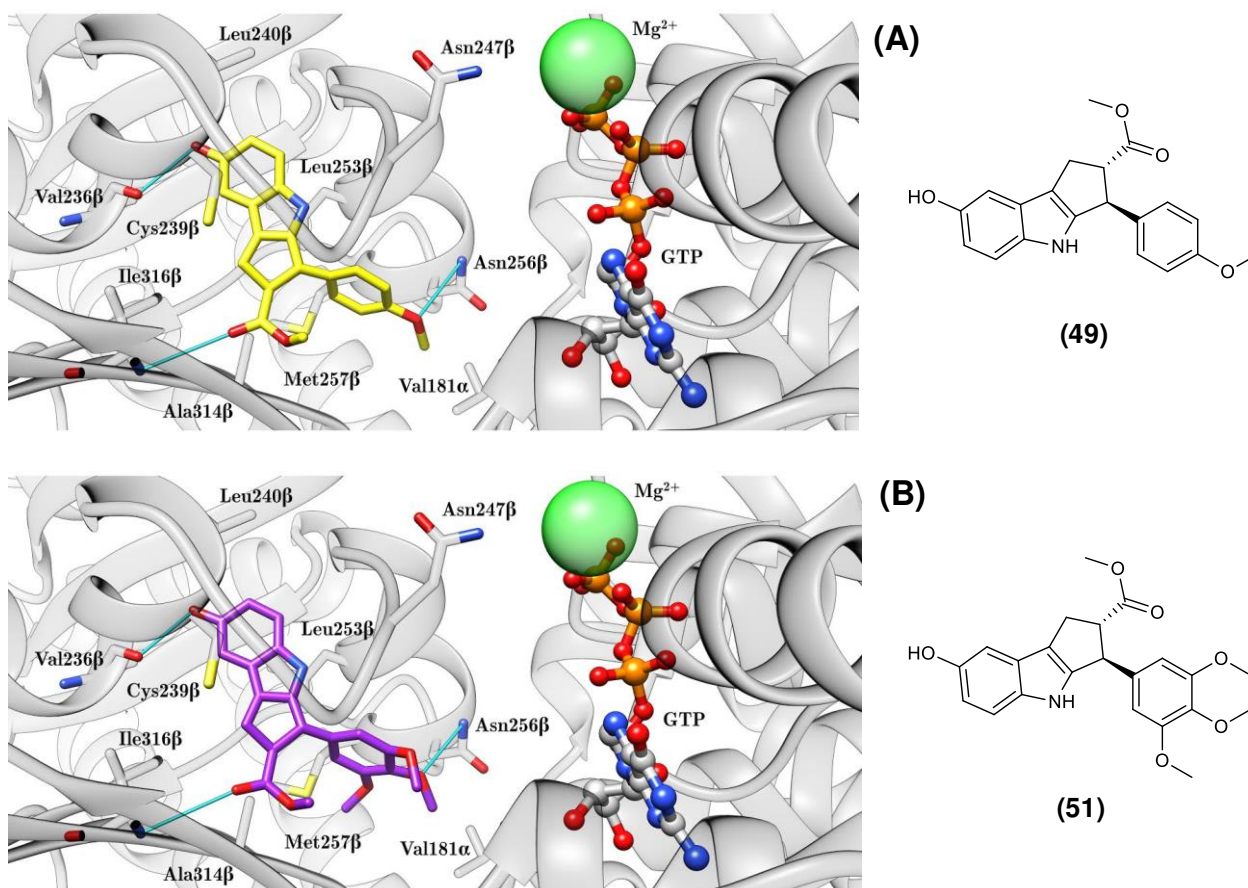
Programa GOLD 5.1 e estrutura cristalográfica PDB 1SA0.

A proposta da conformação de interação (utilizando o programa AutoDock e estrutura cristalográfica PDB:4O2B) entre os compostos **49** e **51** no sítio da colchicina (**11**) mostrou que a estabilização ocorre na porção β -tubulina, com a hidroxila do indol do ligante inserida em um bolsão hidrofóbico da β -tubulina formado principalmente pelo resíduo Val236 β (**Figura 22**).

No modelo proposto também pôde-se confirmar que os grupamentos metóxi na porção fenílica dos derivados **49** e **51** são necessários para a atividade observada, com uma interação entre estes ligantes e o resíduo Asn256 β , além da interação do oxigênio do grupamento éster com o resíduo Ile316 β , mostrando que essa porção também é importante para atividade de modulação da tubulina.

Cabe notar ainda, que as conformações de ligação propostas para os compostos **49** (Figura 22A) e **51** (Figura 22B) estão muito próximas, indicando que este padrão estrutural é essencial para a atividade.

Figura 22. Proposta da conformação de interação dos compostos **49** (A) e **51** (B) no sítio da colchicina (**11**) (programa AutoDock, PDB: 4O2B).



2.4. Ensaios biológicos

Os resultados nos ensaios biológicos também nos motivaram na busca de novos análogos dos ciclopenta[*b*]indóis. Estes, foram realizados em conjunto com as alunas de doutorado Luma G. Magalhães e Wanessa F. Altei, sendo que uma parte dos resultados estão publicados na Tese de Doutorado⁵⁹ da última, com orientação do Professor Dr. Adriano Defini Andricopulo.

2.4.1. Ensaio de imunofluorescência

No ensaio de imunofluorescência, alguns anticorpos se ligam à tubulina e permitem uma visualização da desorganização provocada nos filamentos do citoesqueleto, frente à exposição a compostos testes.⁶⁰

Os derivados indólicos **49** e **51** foram submetidos à técnica de imunofluorescência juntamente com as células de adenocarcinoma mamário humano MDA-MB-231.

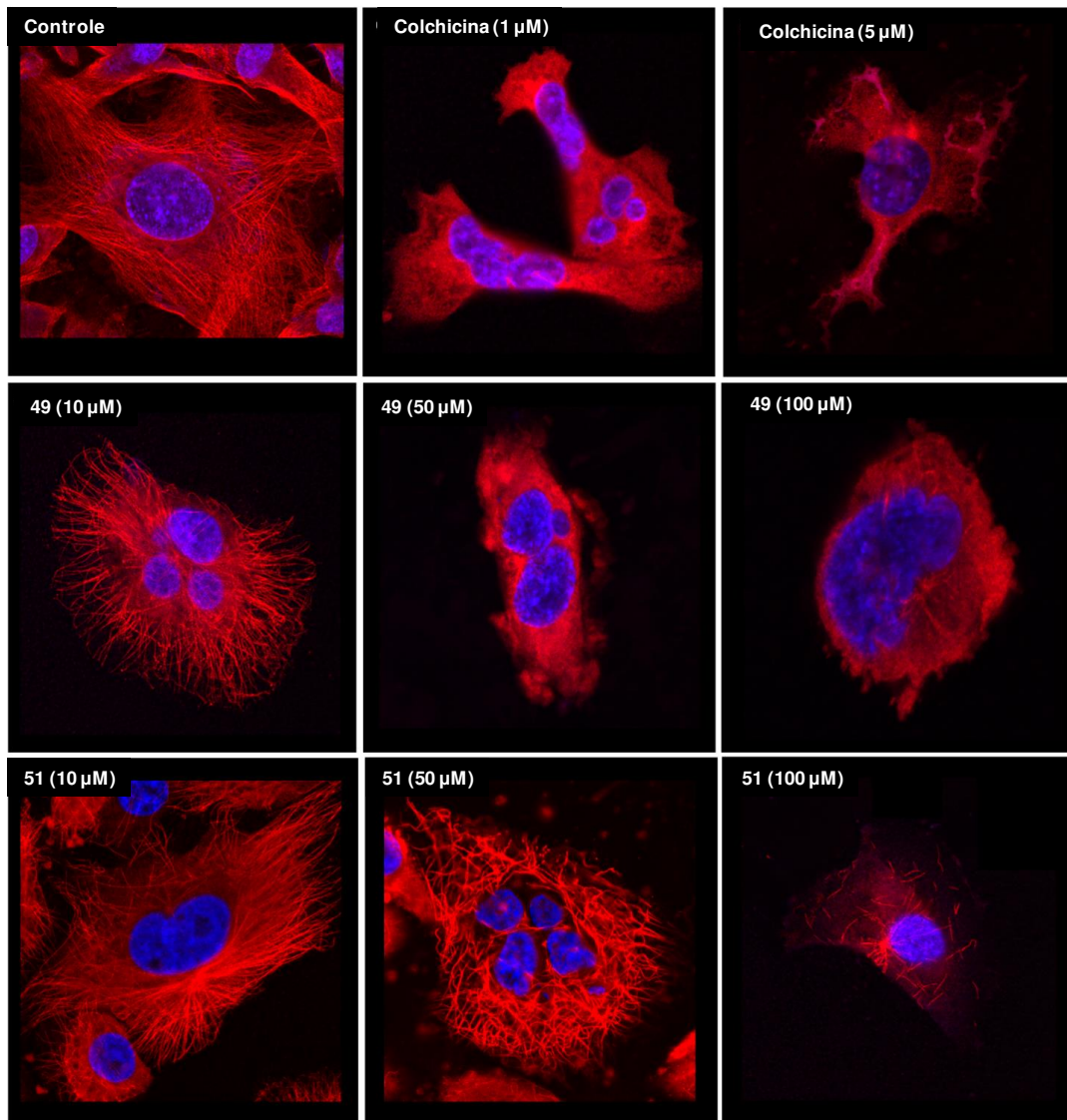
A célula controle exibiu uma rede de microtúbulos organizada e bem desenvolvida (em vermelho), assim como o núcleo (marcado com DAPI em azul), que apresentou-se, denso e uniforme. Quando as células foram tratadas com colchicina (**11**) a 1 e 5 μM houve uma redução na densidade celular e uma desorganização na rede do citoesqueleto. Esse mesmo perfil foi notado para o tratamento com os compostos **49** e **51**, em que ambos promoveram uma notável redução da rede de microtúbulos em concentrações na faixa de micromolar (10, 50 e 100 μM) (**Figura 23**).

2.4.2. Ensaio celular wound healing

A análise qualitativa da capacidade de inibição da migração celular foi realizada com células MDA-MB-231 cultivadas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos **49**, **50** e **51** em concentrações variáveis. Após a cultura se tornar confluenta, realizou-se uma lesão na camada unicelular com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho da placa de cultura. As imagens obtidas do experimento em 0 h e 24 h foram avaliadas medindo-se a área da fenda em cada uma e transformando-a na porcentagem de migração mostrada na **Figura 24**.

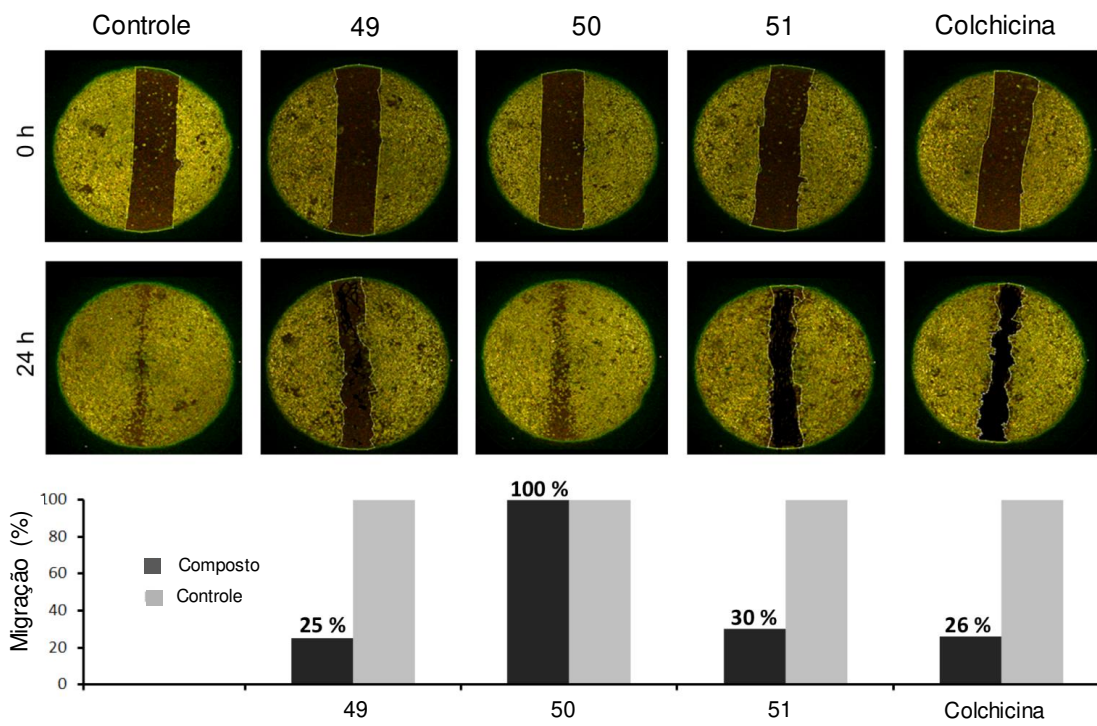
Os resultados observados mostraram que os compostos **49** e **51** apresentaram um perfil de fenda semelhante à colchicina (**11**), com valores de atividade anti-migratória de 75% e 70%, respectivamente. O composto **50**, sem o grupamento metoxifenílico, não apresentou tal comportamento, corroborando ainda mais a importância deste grupo na estrutura dos derivados indólicos.

Figura 23. Imagem de microscopia confocal evidenciando o efeito do padrão colchicina (**11**) (1 e 5 μM) e dos compostos **49** e **51** (10, 50 e 100 μM) na organização dos microtúbulos em células MDA-MB-231 com um aumento de 63x.



(fonte: referência 59)

Figura 24. Ensaio celular wound healing (MDA-MB-231) na presença dos compostos **49**, **50** e **51** (50 μ M).



(fonte: referência 59)

2.4.3. Ensaio de redução do sal tetrazólio (MTS)

As substâncias mais ativas **49** e **51** também foram submetidas ao ensaio de redução do sal tetrazólio (MTS) nas linhagens celulares de MDA-MB-231 (câncer de mama) e de FGH (fibroblastos humanos saudáveis).

O método MTS mede a viabilidade de uma cultura celular pela análise espectrofotométrica da absorvância do composto tetrazólio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazólio) à medida que ele sofre redução por meio das células em cultura. A quantidade de MTS incorporada pelas células é diretamente proporcional ao número de células viáveis do sistema.⁶¹

O efeito destes derivados e da colchicina (**11**), utilizada como controle, é mostrado na **Figura 25** e **Tabela 6**. Como pode-se notar por meio dos valores de EC_{50} , a colchicina (**11**) possui uma toxicidade bem alta (na faixa de nanomolar) tanto em células saudáveis quanto em células cancerígenas, enquanto que os derivados indólicos apresentam uma toxicidade relevante somente para as células

cancerígenas, com valor de EC_{50} igual a $27 \mu\text{M}$ para o composto **49** e $8 \mu\text{M}$ para o composto **51**.

Apesar destes valores serem maiores que os da colchicina (**11**) para células do tipo MDA-MB-231, a baixa toxicidade justifica o estudo com essa classe de compostos indólicos e incentiva a busca de um novo protótipo com um perfil mais seletivo para doenças neoplásicas.

Figura 25. Ensaio de citotoxicidade MTS utilizando fibroblastos de gengiva (células saudáveis, linhagem FGH) e células humanas de câncer de mama (linhagem MDA-MB-231) para os compostos (A) **49** e (B) **51**.

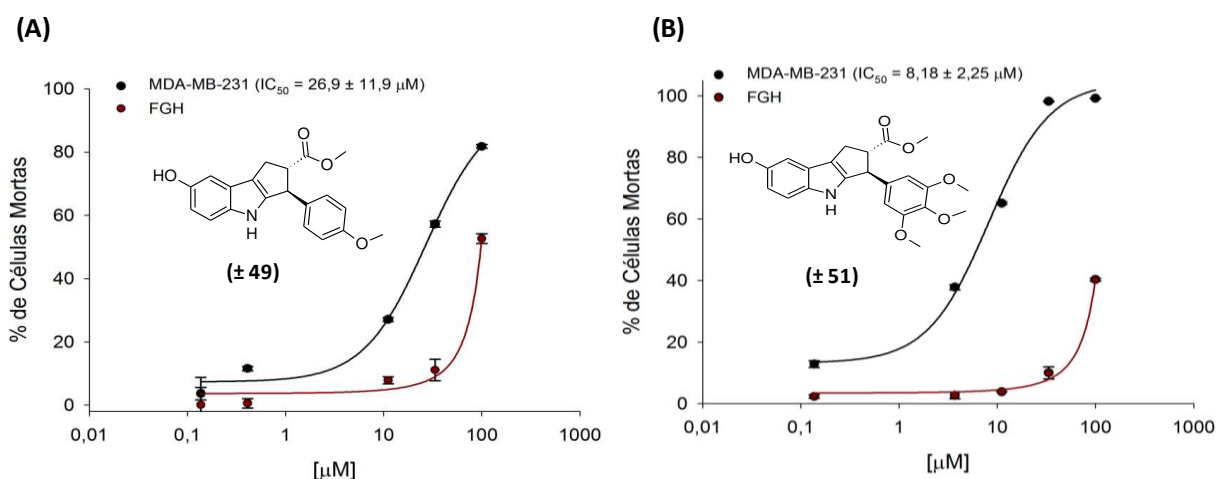
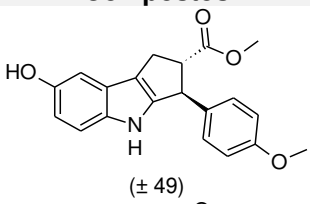
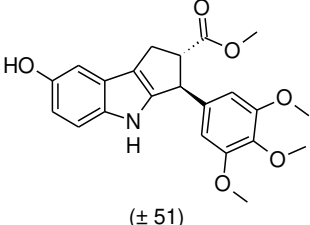


Tabela 6. Avaliação da citotoxicidade por MTS dos compostos mais ativos **49** e **51**.

Compostos	EC_{50} MDA-MB-231 (μM)	EC_{50} FGH (μM)
 (± 49)	27 ± 12	> 100
 (± 51)	8 ± 2	> 100
Colchicina (11)	$0,014 \pm 0,001$	$< 0,02$

Experimento realizado em triplicata.

Com um acervo promissor de resultados frente a patologia do câncer, os derivados indólicos (principalmente os compostos **49** e **51**) nos incentivaram a buscar novos análogos com uma melhor potência bioquímica e biológica, atentando-se para algumas condições de biodisponibilidade e toxicidade. Algumas ferramentas clássicas

da Química Medicinal foram utilizadas como hibridização molecular, homologação, bioisosterismo e simplificação molecular, além de algumas predições físico-químicas como coeficiente de partição ($\log P$), volume e solubilidade.

A integração do nosso grupo de pesquisa com o Laboratório de Química Medicinal coordenado pelo Professor Adriano Defini Andricopulo, nos proporcionou as bases científicas apropriadas para o desenvolvimento das atividades científicas planejadas, com pleno êxito.

3-Objetivos Gerais

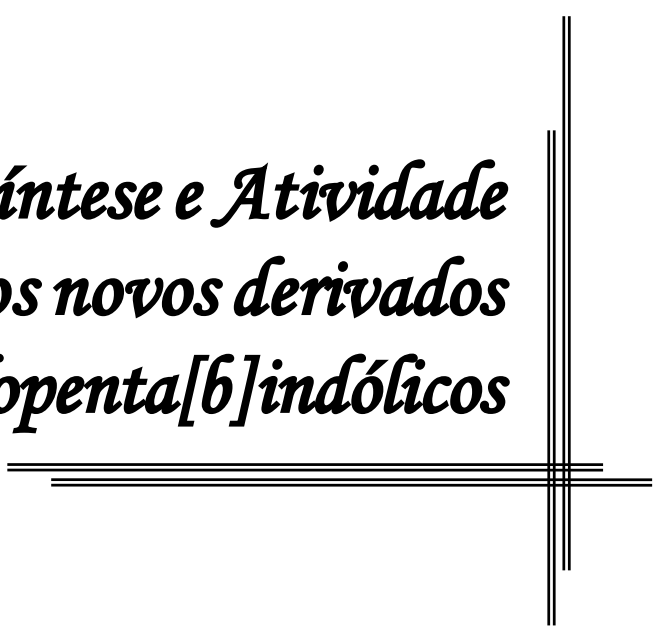


3. OBJETIVOS GERAIS

A integração dos métodos computacionais ao trabalho químico e biológico é um requerimento essencial para síntese de novas moléculas bioativas otimizadas. Assim, para alcançar a máxima integração entre a Química Medicinal e a Síntese Orgânica, tendo em vista as propriedades farmacológicas interessantes e promissoras já apresentada pelos derivados indólicos, os objetivos deste trabalho envolvem:

- (a) Utilização e aplicação de modelagem molecular baseados na estrutura do ligante e do receptor para a seleção de candidatos mais ativos no sítio da tubulina;
- (b) Avaliação bioquímica dos compostos sintéticos empregando a proteína tubulina;
- (c) Avaliação biológica dos compostos sintéticos empregando células de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231) através do ensaio de *wound healing*;
- (d) Análise das relações entre a estrutura química e atividade (SAR) empregando os dados gerados;
- (e) Planejamento e síntese de novos ligantes com atividade anticancerígena.

*4- Planejamento, Síntese e Atividade
Biológica dos novos derivados
ciclopenta[6]indólicos*



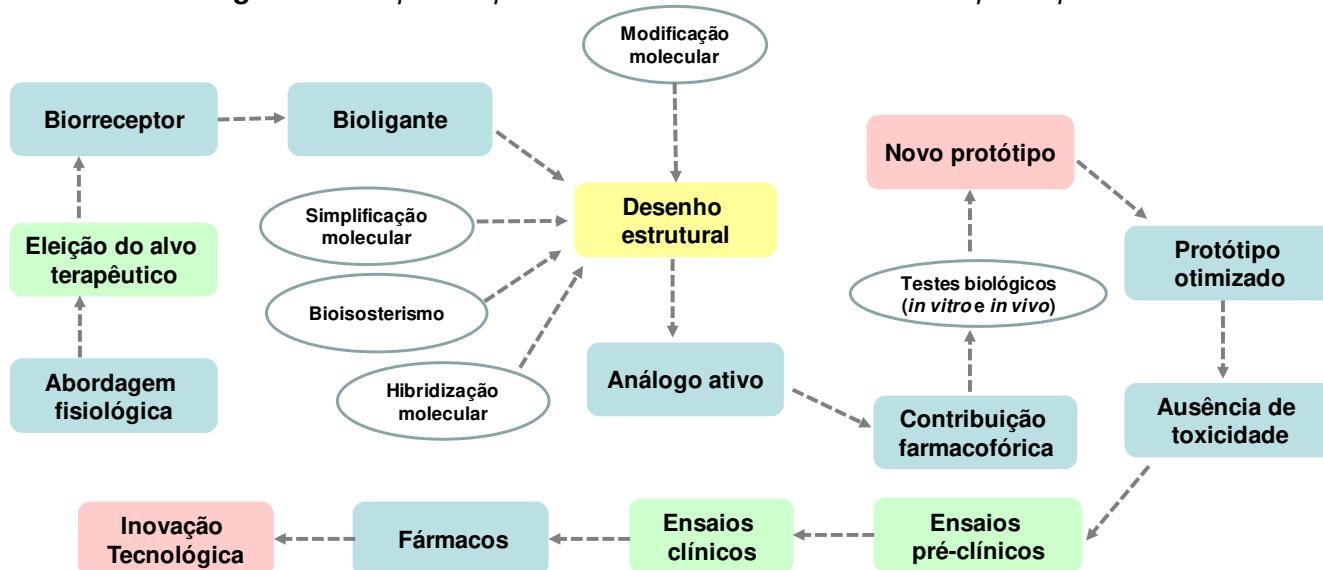
4. PLANEJAMENTO, SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS NOVOS DERIVADOS CICLOPENTA[B]INDÓLICOS

4.1. Introdução

4.1.1. O processo de planejamento racional

A descoberta de novos fármacos compreende, em um primeiro momento, o conhecimento dos alvos moleculares e o mecanismo de ação dos compostos biologicamente ativos durante o reconhecimento nos sistemas biológicos. Após, ocorre o desenvolvimento do fármaco, pelo qual estão envolvidos testes rigorosos e otimização dos compostos escolhidos. Testes em células (*in vitro*) e em animais (*in vivo*) são requeridos para validar o conceito terapêutico do alvo eleito e prever as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas do fármaco. Ao atingir um resultado satisfatório, os testes são realizados em humanos (fase clínica) e então submetido à aprovação do órgão de saúde responsável (**Figura 26**).⁶²

Figura 26. Etapas do processo de descoberta de um novo protótipo.



(fonte: modificada da referência 62)

Uma análise das fontes de novos medicamentos antineoplásicos no período de 1981 a 2014 mostrou que 60% das novas entidades químicas são sintéticas, 28% são constituídas por compostos semi-sintéticos e 13% são considerados puramente naturais. Dos 60% dos compostos ditos sintéticos, 10%

correspondem a estruturas químicas inspiradas em farmacóforos de produtos naturais com atividade biológica.^{63,64}

Embora os produtos naturais exibam importante papel no desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos, um processo de otimização é requerido para melhorar propriedades como potência, afinidade e seletividade, além das propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A diversidade estrutural obtida pela remoção, modificação e/ou introdução de grupos funcionais ou estereocentros explica os numerosos exemplos de medicamentos com propriedades terapêuticas otimizadas através desta concepção.^{63,65,66} Assim, fica evidente a relação entre a síntese, a química medicinal e os produtos naturais como estratégia útil de descoberta de novos fármacos.

Na aplicação de estratégias de planejamento, as triagens virtuais ganham especial destaque quando se deseja buscar ligantes capazes de interagir e modular as funções biológicas dos alvos selecionados (enzimas, proteínas de membrana ou DNA).⁶⁷

A triagem virtual é um método *in silico* que faz uso de modelos computacionais a fim de filtrar e priorizar compostos para posterior ensaios experimentais. Essa estratégia é orientada pelo conhecimento de alguma informação estrutural, seja ela a respeito das moléculas bioativas ou do próprio alvo de interesse.

No primeiro caso, o ensaio virtual é fundamentado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) e a estratégia mais utilizada é a QSAR (do inglês *quantitative structure-activity relationships*). Os estudos de QSAR têm por objetivo quantificar as diferenças observadas na atividade biológica de uma série de compostos com diferentes estruturas moleculares, criando modelos estatísticos com capacidade preditiva externa.⁶⁸

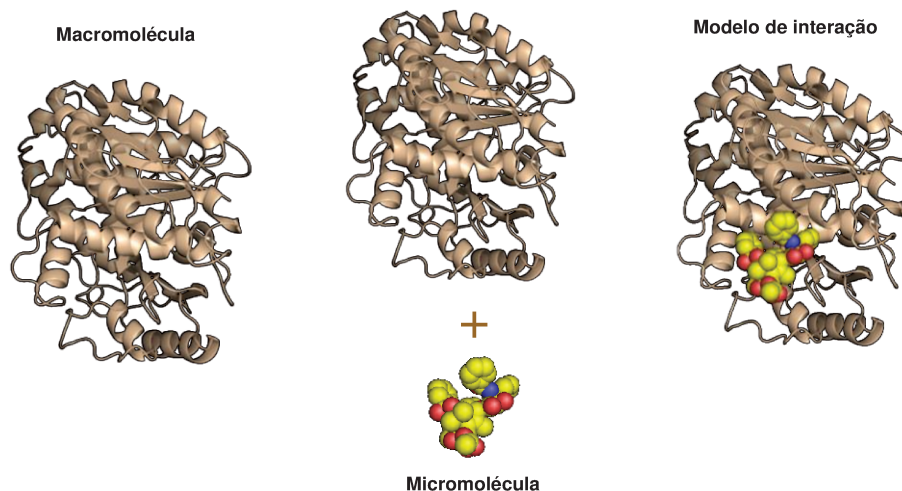
Quando a estrutura do alvo é conhecida, o ensaio virtual é baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*), que pode ser conhecida diretamente por cristalografia de raios X ou estudos de RMN, ou indiretamente, geralmente através da modelagem por homologia.^{69,70} Dentre as ferramentas utilizadas destaca-se a docagem molecular, que investiga as possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante do biorreceptor.⁷¹ Esta tem contribuído significativamente tanto na fase de descoberta de novas moléculas bioativas, quanto na fase de otimização de compostos líderes em relação a uma série de propriedades.⁷²

4.1.2. Docagem molecular

A docagem molecular consiste na predição da conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (enzima, receptor, DNA ou RNA) (**Figura 27**), seguida da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto. A interação do fármaco ao receptor é um problema complexo, visto que inúmeras forças estão envolvidas (eletrostáticas, eletrodinâmicas e estéricas), ao mesmo tempo que ocorre interação com o solvente de um modo não estático.^{71,73}

Os programas de docagem molecular, em geral, geram um grande número de orientações e conformações do ligante através de um elemento chamado algoritmo de busca e então geram uma função matemática que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de escores de energia. Este processo ocorre em duas etapas: (a) identificação da conformação bioativa e (b) predição e classificação da afinidade do ligante pelo sítio.⁷⁴

Figura 27. Processo de docagem molecular.



Uma dificuldade durante a *identificação da conformação bioativa* é que muitas moléculas não possuem estruturas rígidas sugeridas pelas fórmulas moleculares tradicionais. Durante a interação, o grande número de graus de liberdade apresentado por estruturas flexíveis faz com que o complexo receptor-ligante sofra mudanças conformacionais. Assim, vários algoritmos de busca são utilizados a fim de se aumentar a precisão na identificação da conformação que melhor corresponde à estrutura do receptor.

As ferramentas mais comuns tratam o receptor como rígido e atribuem flexibilidade à molécula do ligante através da variação dos seus ângulos torsionais. Os métodos de amostragem frequentemente utilizados com este propósito são classificados em três categorias: *Métodos Sistemáticos* (Construção Incremental, Amostragem Conformacional, Databases), *Métodos Aleatórios* ou *Estocásticos* (Método de Monte Carlo, Algoritmo Genético, busca tabu) e *Métodos de Simulação* (Dinâmica Molecular e Minimização de Energia).⁷²

Os algoritmos de busca sistemática geram todas as conformações possíveis de uma molécula, mas alguns deles operam incrementando o ligante dentro do sítio do alvo, reduzindo com isso o elevado custo computacional. Dois programas que fazem uso desta metodologia são os programas DOCK 4.0⁷⁵ e FlexX.⁷⁶ O fragmento base (núcleo rígido) é docado dentro do sítio e em seguida as partes flexíveis do ligante são adicionadas de maneira incremental, restringindo a busca conformacional somente para as conformações que mais se ajustam no sítio de interesse. O programa Surflex-Dock⁷⁷ utiliza um método de amostragem conformacional, no qual é feito um mapeamento do sítio de ligação do alvo criando uma representação computacional chamada de Protomol. Para tal fim, a superfície da proteína é revestida com três tipos de sondas: CH₄ para identificar potenciais regiões de interações hidrofóbicas, NH para identificar regiões favoráveis de interações com átomos doadores de ligação de hidrogênio e C=O para identificar regiões favoráveis de interações com átomos aceptores de ligação de hidrogênio.^{78,79}

Nos métodos aleatórios, as conformações dos ligantes são amostradas, docadas e pontuadas num primeiro momento aleatoriamente. Os melhores resultados são utilizados como configurações de entrada para a próxima sequência de docagem e pontuação até que o número de passos estabelecidos seja alcançado. Programas como GOLD⁸⁰ e AutoDock⁸¹ empregam o algoritmo genético para a docagem do ligante na proteína e proporcionam flexibilidade rotacional para aceptores de hidrogênio, flexibilidade total do ligante, além de proporcionar alguma flexibilidade para proteína em questão.

O método de amostragem de simulação tem a vantagem de tanto o alvo quanto o ligante ser tratado como flexível. A Dinâmica Molecular é o método mais popular, porém sua simulação é incapaz de ultrapassar barreiras conformacionais muito altas, podendo somente acomodar ligantes em mínimos locais de energia de superfície.⁸² Em contraste com a Dinâmica Molecular, os Métodos de Minimização de

energia são raramente utilizados como algoritmos de busca, mas muitas vezes completam outros métodos de pesquisa, como por exemplo, Monte Carlo.

A etapa de *predição da afinidade do ligante pelo sítio de ligação* é realizada baseada em funções de pontuação desenvolvidas para avaliar e classificar o modo de interação proposto na etapa anterior. Vários requerimentos são necessários para se ter uma boa função de pontuação, entre eles, ser capaz de discriminar os modos de interação com precisão e rapidez e distinguir entre prováveis ligantes e moléculas inativas.

As funções de pontuação utilizadas podem ser agrupadas em três categorias básicas: *Campos de Força*, geralmente baseados em métodos de mecânica molecular, quantificam a energia proveniente das interações entre o ligante e receptor e a energia interna do ligante; *Empíricas*, são funções baseadas no ajuste teórico de dados experimentais através do emprego de equações (regressão linear) e *Funções Baseadas no Conhecimento*, que utilizam dados estatísticos dos potenciais de pares atômicos de interação, os quais são derivados de conjuntos de dados proveniente de complexos cristalográficos entre proteínas e ligantes.^{83,84}

Existem muitos programas de docagem molecular, mas para a escolha de um bom método, alguns fatores devem ser levados em consideração como as quantidades de compostos disponíveis, a precisão desejada e a capacidade de cálculo do programa. Essa escolha pode ser facilitada com a utilização de diversos programas ou variadas funções de pontuação dentro do mesmo programa. Os valores de interação obtidos através destes diferentes programas podem, então, ser reordenados de acordo com os maiores escores de energia e resultar em uma estimativa com valores mais precisos e confiáveis.

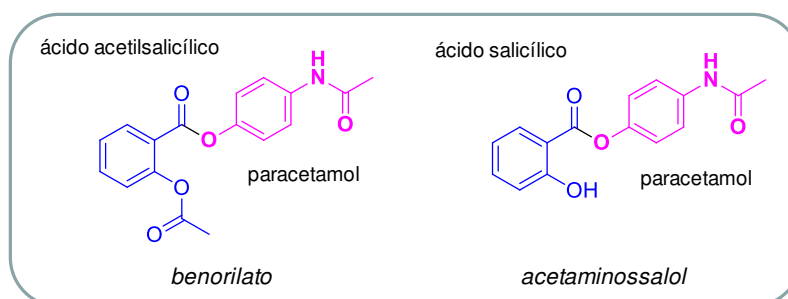
4.1.3. Modificação Molecular de Fármacos

Apesar das inúmeras técnicas e ferramentas consideradas modernas e utilizadas atualmente na descoberta de novos fármacos, a modificação molecular é considerada uma das técnicas mais promissoras quando se deseja anular efeitos indesejáveis dos fármacos utilizados ou introduzir/retirar grupos químicos para potencializar a atividade biológica. Diversas estratégias podem ser utilizadas, tais como hibridização molecular, homologação, simplificação molecular e/ou bioisosterismo.

A hibridização molecular é uma estratégia de conjugação de estruturas de compostos bioativos com o intuito de se obter um novo composto protótipo. O método faz uma analogia entre a evolução biológica proposta por Darwin e a evolução química das moléculas. Assim, moléculas-mãe dão origem a uma variedade de moléculas-filha híbridas, resultantes de combinações de subunidades estruturais.⁸⁵ Ela pode ser baseada na junção da estrutura completa ou na junção de grupos farmacofóricos de fármacos que atuam em alvos bioquímicos distintos. Nos dois casos, a nova molécula produzida apresenta maior afinidade e eficácia que os compostos que lhe deram origem, sendo por isso, considerada uma alternativa terapêutica muito interessante para determinadas fisiopatologias multifatoriais.

Muitos são os exemplos de fármacos obtidos via esta ferramenta, como é o caso da síntese do benorilato, fármaco anti-inflamatório, analgésico e antipirético, obtido pela junção do esqueleto do paracetamol e do ácido acetilsalicílico e também do acetaminossalol, híbrido com as mesmas ações farmacológicas, sintetizado a partir do paracetamol e do ácido salicílico (**Figura 28**).³⁷

Figura 28. Estruturas químicas dos híbridos benorilato e acetaminossalol.

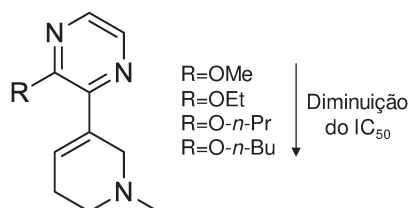


A homologação molecular consiste em uma importante estratégia quando se deseja inserir grupos metilênicos para produzir homólogos superiores com diferentes características dimensionais ou conformacionais. O conceito de séries homólogas foi introduzido em 1853 por Gerhardt e, até hoje, estuda-se o papel que os grupos adicionais assumem quando são inseridos em algum composto bioativo. Ao se aumentar o número de grupamentos metilênicos, por exemplo, pode-se atingir uma conformação mais estável entre o composto e o alvo biorreceptor ou melhorar a penetração do fármaco nas membranas com o aumento da natureza lipofílica.

Como exemplo de uma série homóloga, pode-se citar o trabalho de Ward e colaboradores, no qual avaliaram o efeito da atividade agonista M-muscarínica dos

homólogos de 1-metil-1,2,3,4-tetraidropiridilpirazinas ao receptor M₁.⁸⁶ A variação dos valores de IC₅₀ para a sequência de OMe para O-*n*-Bu (850 nM para 17 nM, respectivamente) mostrou a importância na atividade quando se faz a homologação numa série congênere (**Figura 29**).

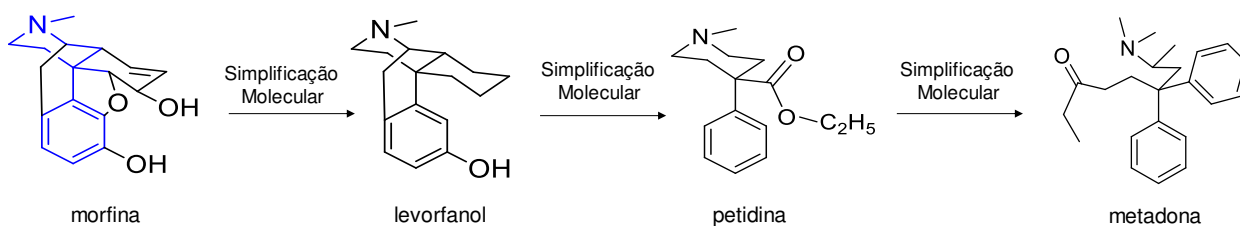
Figura 29. Homólogos monoalquilados de 1-metil-1,2,3,4-tetraidropiridilpirazinas.



Outro método de modificação racional é a simplificação molecular. Esta técnica consiste em obter análogos estruturalmente mais simples a partir de protótipos ativos, estruturalmente complexos. Atualmente, os avanços observados no estudo da relação entre a estrutura química e a atividade permitem preservar de forma rápida e racional as sub-unidades farmacofóricas previamente identificadas no composto-protótipo eleito (seja ele natural ou sintético), responsáveis pela atividade biológica.⁸⁷ Um exemplo clássico é o desenho de análogos obtidos a partir do alcaloide morfina, uma substância natural analgésica com estrutura complexa e que apresenta efeitos colaterais expressivos, tais como: depressão do centro respiratório, constipação, euforia, náuseas, tolerância e dependência. Na tentativa de anular ou, pelo menos, minimizar os efeitos adversos, a estrutura foi avaliada em relação aos grupos farmacofóricos (coloração azul na estrutura da morfina) responsáveis pelo efeito analgésico e a partir disso, planejou-se uma estrutura mais simples e viável para síntese em grande escala. O resultado foi a obtenção do levorfanol, da petidina e da metadona. O levorfanol apresenta uma potência cinco vezes maior que a morfina, além de poder ser administrado por via oral; a petidina tem a característica de agir mais rapidamente (embora tenha uma duração mais curta) e a metadona tem a vantagem de causar menos dependência.⁸⁸

Estes fármacos foram os precursores de vários outros analgésicos da classe da 4-fenilpiperidinas usados até hoje para alívio da dor, ilustrando significativamente o sucesso da estratégia de simplificação molecular sucessiva de protótipos promissores (**Figura 30**).

Figura 30. Simplificação sucessiva da estrutura da morfina.



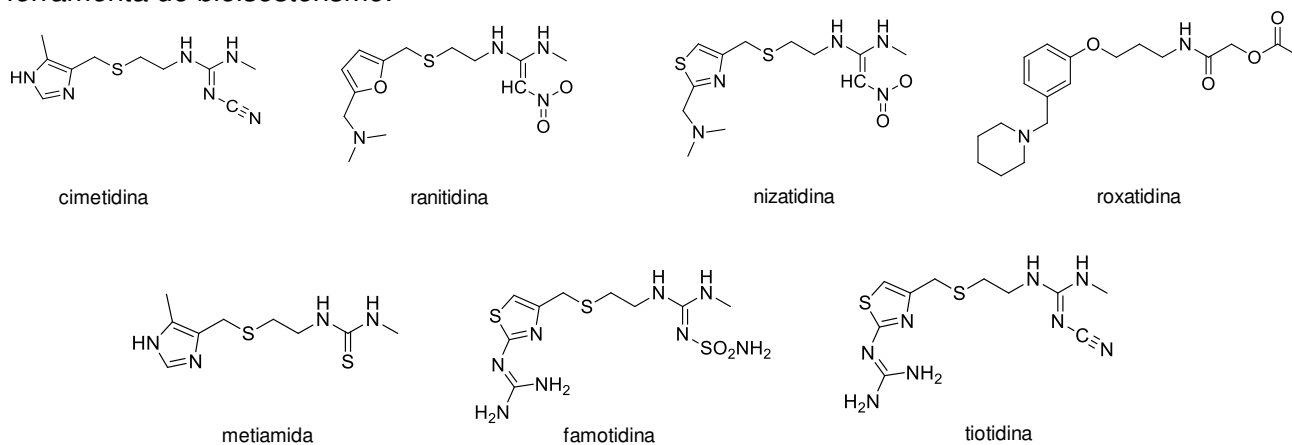
Por fim, os análogos também podem ser planejados através da substituição de um substituinte já existente na estrutura por um novo grupamento, utilizando-se o conceito de bioisosterismo. O bioisosterismo é resultado da aplicação de princípios do isosterismo desenvolvido por Langmuir⁸⁹ em 1919, pesquisador que estudava o comportamento químico e a reatividade de determinadas substâncias que continham o mesmo número de átomos, mesma conectividade e disposição no espaço, mesmo número de elétrons de valência e as mesmas características físico-químicas.⁹⁰ Em 1951, Friedman⁹¹ introduziu o conceito de bioisosterismo para descrever o fenômeno observado entre substâncias estruturalmente relacionadas que apresentavam propriedades similares no mesmo sítio receptor, podendo inclusive apresentar atividade antagônica à inicial.

A aplicação do bioisosterismo pode estar relacionada à modulação das propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação ou estar relacionada com a otimização das propriedades farmacodinâmicas.⁹² Especificamente, o bioisosterismo permite variar o tamanho e a forma da molécula, a distribuição eletrônica (polarizabilidade, efeitos indutivos, carga ou dipolos), a lipossolubilidade e a hidrofiliabilidade, o pKa e os fatores conformacionais, incluindo a capacidade de formar ligações de hidrogênio diferentes (intra- e intermolecular) nos bioisómeros em estudo.⁹³

Podem ser citados vários exemplos de análogos obtidos por meio do conceito de bioisosterismo⁹⁰. Um deles foi o desenvolvimento de antagonistas do receptor H₂ (histamina) após o impacto terapêutico que se deu com a descoberta da cimetidina no tratamento da úlcera péptica. O bioisosterismo clássico de anéis foi utilizado na construção das novas moléculas, primeiramente, com a troca do anel imidazol por um anel furano no caso da ranitidina, por um anel tiazolítico no caso da nizatidina e finalmente, por um anel fenila no caso da roxatidina. Pode-se observar ainda, o bioisosterismo da uréia com diferentes substituintes (no caso da metiamida,

famotidina e tiotidina)⁹⁴, mostrando a variedade de análogos obtidos com sucesso através da substituição bioisostérica (**Figura 31**).

Figura 31. Antagonistas do receptor H_2 com propriedades antiulcerosas obtidos pela ferramenta do bioisosterismo.



4.1.4. Síntese dos novos derivados ciclopenta[b]indólicos

Os derivados ciclopenta[b]indólicos possuem um padrão de substituição frequentemente encontrado em compostos alcaloídicos, tais como paxilina (**54**), penitrem (**55**) e yuechukeno (**56**) (**Figura 32**). Algumas substâncias com funções biológicas de regulação de hormônios femininos e HDL colesterol (**57**)^{95,96}, atividade antioxidante (**58**)⁹⁷, antialérgica (**59**)⁹⁸, dentre outras, estão fazendo com que tais derivados (**Figura 33**) se tornem um importante foco para síntese e funcionalização de novos compostos biologicamente ativos.^{99,100}

Figura 32. Estruturas de alcaloides ciclopenta[b]indólicos.

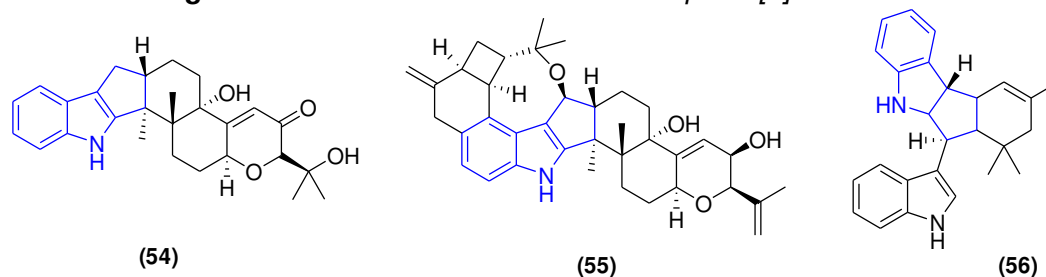
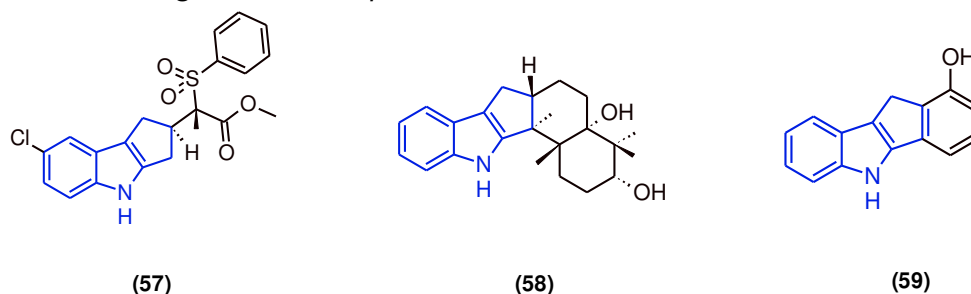
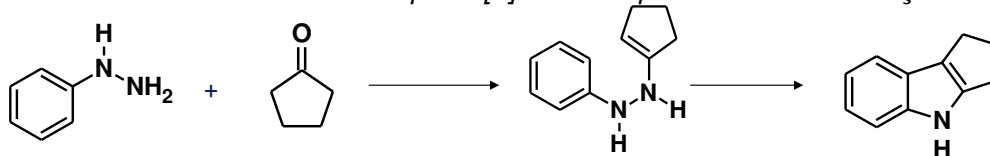
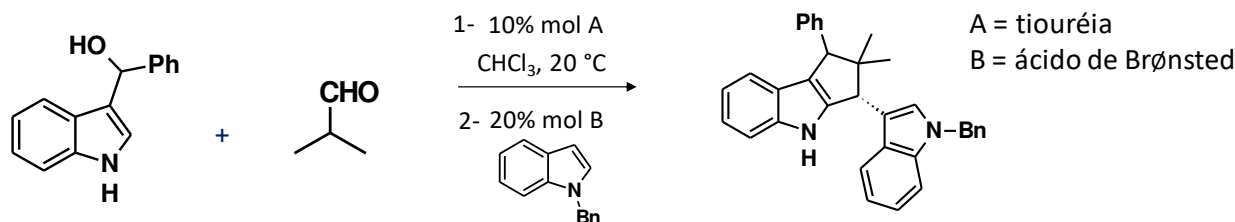
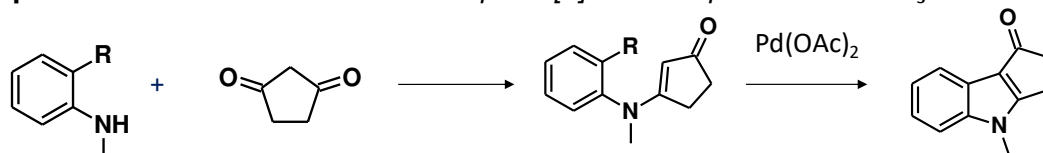


Figura 33. Exemplos de derivados indólicos bioativos.

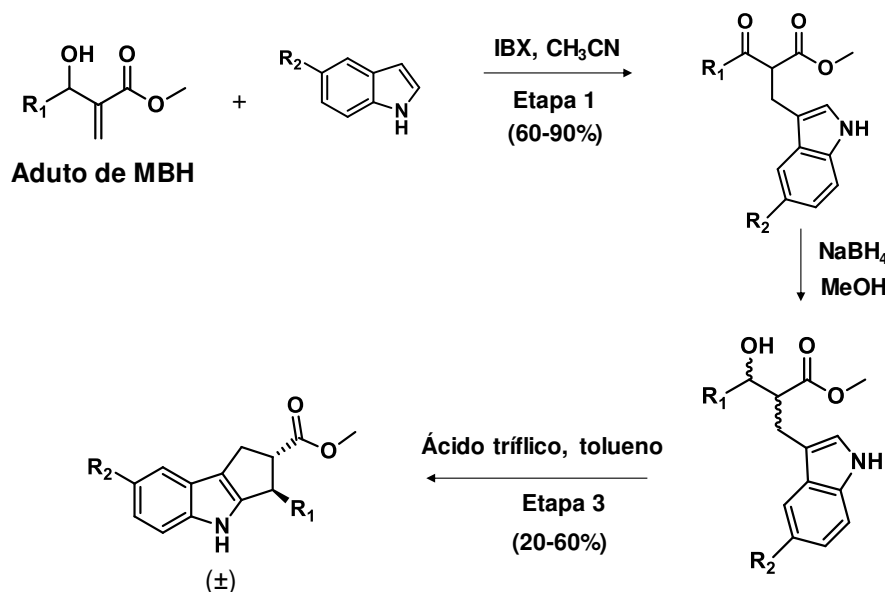
Embora muitas rotas sintéticas para síntese dos ciclopenta[*b*]indóis tenham sido relatadas, tais como indolização de Fischer (**Esquema 2**)¹⁰¹, reação intramolecular de Friedel-Crafts (**Esquema 3**)⁹⁹ e ciclização catalisada por paládio (**Esquema 4**)¹⁰², muito delas possuem baixo rendimento e baixa estereosseletividade.

Esquema 2. Síntese de derivados ciclopenta[*b*]indólicos por meio da indolização de Fischer.**Esquema 3.** Síntese de derivados ciclopenta[*b*]indólicos por meio da reação intramolecular de Friedel-Crafts.**Esquema 4.** Síntese de derivados ciclopenta[*b*]indólicos por meio da reação de Heck.

Assim, diante da experiência do nosso grupo de pesquisa em aspectos mecanísticos da reação de Morita-Baylis-Hillman¹⁰³ e na aplicação de seus produtos na síntese de produtos naturais e fármacos, foi proposta a síntese dos ciclopenta[*b*]indóis utilizando adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH). Esta foi relatada pela primeira vez pela aluna Marília S. Santos em sua dissertação de mestrado¹⁰⁴, sendo baseada na oxidação *one-pot* dos adutos de MBH com ácido 2-iodoxibenzóico

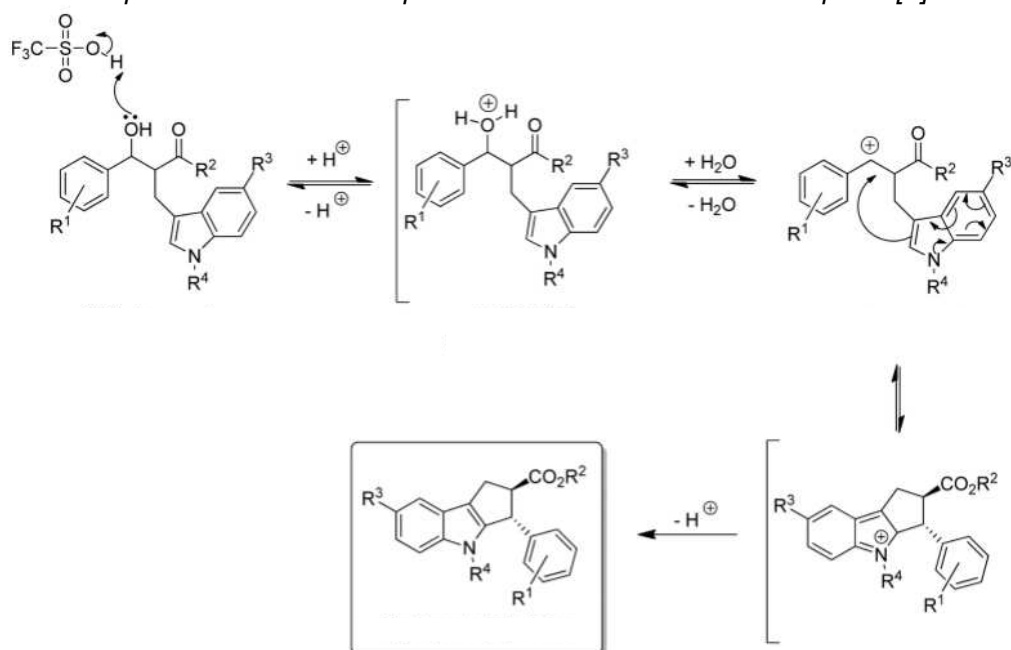
(IBX) seguida da adição de Michael do indol. Os substratos 1,3-dicarbonilados β -substituídos são então reduzidos seletivamente na presença de NaBH_4 e tratados com ácido trifílico para ocorrer a ciclização (**Esquemas 5 e 6**) com uma excelente diastereosseletividade (>99:1 em *trans*).¹⁰⁵

Esquema 5. Esquema geral para síntese dos derivados ciclopenta[b]indólicos.



(fonte: referências 104 e 105)

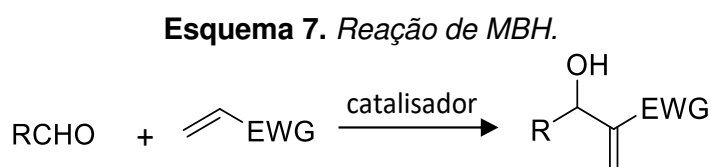
Esquema 6. Proposta de mecanismo para síntese dos derivados ciclopenta[b]indólicos.



(fonte: referências 104 e 105)

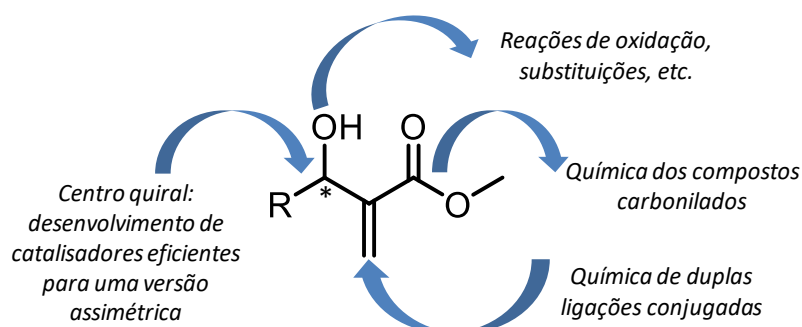
4.1.4.1. A Reação de Morita-Baylis-Hillman

A reação de MBH pode ser definida como uma condensação entre um aldeído ou uma imina e uma substância α,β -insaturada portando um grupo retirador de elétrons (EWG), **Esquema 7**. O catalisador mais empregado é o 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO).^{38,106}



Esta reação, nas versões inter e intramolecular, tem atraído considerável atenção por ser régio, quimio e estereosseletiva. Além disso, apresenta uma elevada economia de átomos, já que todos os átomos que compõem os reagentes estão incorporados no produto de condensação. A reação requer condições brandas, os materiais de partida estão disponíveis comercialmente, a reação é apropriada para a produção em larga escala e através de sucessivas interconversões de grupos funcionais, permite a formação de moléculas polifuncionalizadas que podem se tornar importantes intermediários em rotas sintéticas (**Figura 34**).^{107,108}

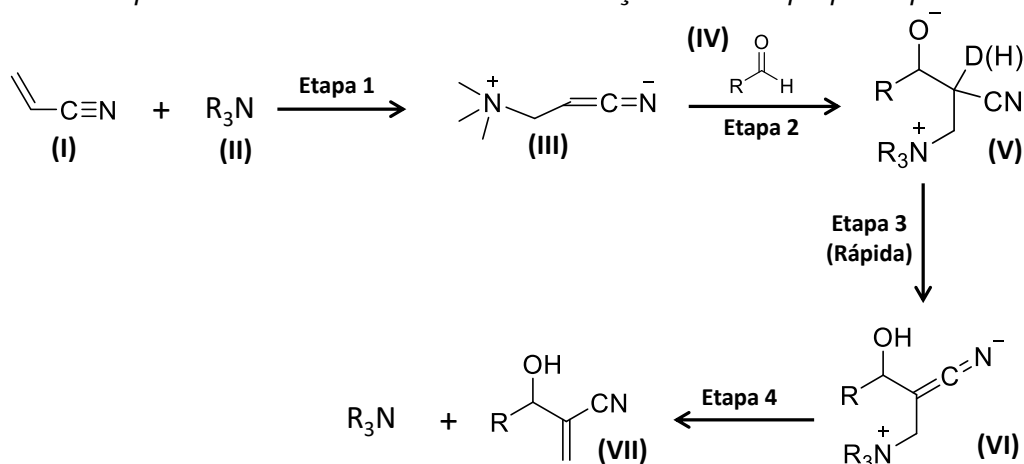
Figura 34. Versatilidade sintética dos adutos de MBH.



O mecanismo comumente aceito para a reação de MBH foi proposto pela primeira vez por Hoffmann¹⁰⁹, apoiado por dados cinéticos estudados por Hill e Isaacs.¹¹⁰ Utilizando acrilonitrila (I), acetaldeído (IV) e uma amina terciária (II) os autores propuseram que inicialmente ocorreria a adição de Michael do catalisador ao sistema α,β insaturado (I) formando o *zwitterion* (III). A condensação aldólica entre III e o aldeído IV leva ao alcóxido V, que sofre uma transferência de próton, fornecendo

o enolato VI. O aduto de MBH (VII) seria obtido a partir da eliminação do catalisador que posteriormente retornaria ao processo. A etapa 2 foi inicialmente considerada a etapa determinante da reação, devido ao baixo efeito isotópico cinético encontrado para a abstração do próton em posição α -nitrila (kH/kD $1,03 \pm 0,1$) (**Esquema 8**).

Esquema 8. Etapas envolvidas no mecanismo da reação de MBH proposta por Hill e Isaacs.



(fonte: modificada das referências 107 e 110)

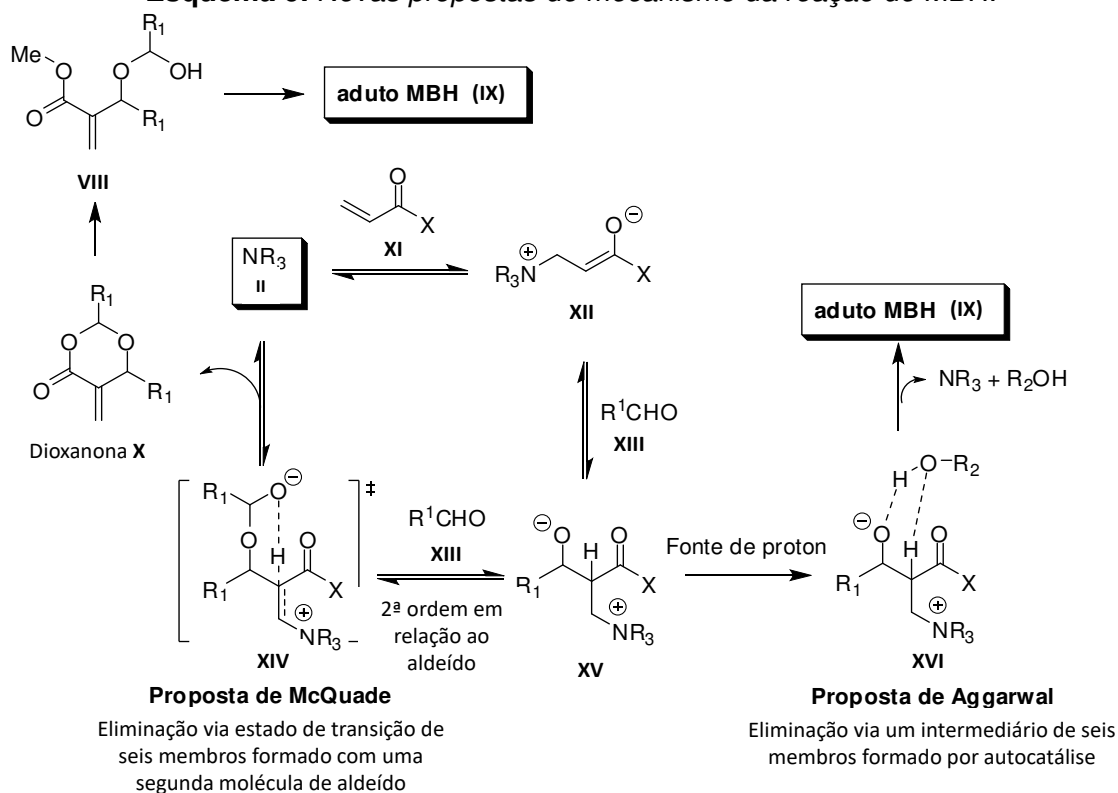
Em 2005, McQuade e colaboradores^{111,112} propuseram uma nova interpretação para o mecanismo da reação de MBH. Através de estudos cinéticos e teóricos, eles observaram que a reação era de segunda ordem em relação ao aldeído e que um valor significativo do efeito isotópico cinético para a abstração do próton em posição α -carbonila (kH/kD $5,2 \pm 0,6$) sugeria que a etapa determinante era a abstração deste próton, proposta contrária à sugerida por Hill e Isaacs.

Aggarwal também propôs que a etapa determinante da velocidade era a transferência de prótons, porém até apenas 20% de formação do aduto de MBH, após, este funcionaria como fonte de próton através de um intermediário de seis membros e a reação se tornaria auto-catalítica.¹¹³ Segundo Aggarwal, dois mecanismos ocorreriam na etapa de transferência de próton. A adição de uma segunda molécula de aldeído formaria o alcóxido XIV que abstrairia o hidrogênio da hidroxila secundária do aduto de MBH, levando a formação de um novo alcóxido. Esse novo alcóxido agora abstrairia o próton α -carbonílico do aduto gerando o intermediário XVI através de um estado de transição cíclico de seis membros. Os cálculos teóricos realizados mostram que o intermediário de seis membros formado é de baixa energia e bastante

favorecido, podendo também explicar o efeito autocatalítico sugerido acima (**Esquema 9**).

Em estudos utilizando espectrometria de massas de ionização por electrospray (ESI), Coelho e colaboradores investigaram informações complementares sobre o mecanismo da reação de MBH. Eles observaram a presença das duas espécies propostas por McQuade e Aggarwal no ciclo catalítico da reação, proporcionando uma forte evidência experimental de que ambos os mecanismos podem ser possíveis.^{106,115}

Esquema 9. Novas propostas de mecanismo da reação de MBH.



(fonte: modificada das referências 107, 112 e 113)

Recentemente, Plata e Singleton¹¹⁴ empregaram uma combinação de sondas mecanísticas e medições termodinâmicas/cinéticas (para a reação principal e secundária), para definir um perfil de energia livre mecanicista experimental de um protótipo de Morita Baylis-Hillman. Com a incorporação isotópica do solvente (metanol), o mecanismo de reação é de uma forma simples explicado por meio de uma reação ácido-base, mostrando que o experimental acoplado ao computacional é necessário para tecer fundamentos importantes e insubstituíveis.

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1. Planejamento dos novos análogos ciclopenta[*b*]indólicos

A utilização da modelagem molecular juntamente com os métodos clássicos de modificação estrutural da Química Medicinal constitui-se uma ferramenta muito importante quando se deseja buscar substâncias ativas com baixa toxicidade, biodisponibilidade satisfatória e metabolismo adequado ao seu emprego terapêutico.

Valendo-se desta concepção e utilizando os parâmetros mostrados na **Figura 35**, novos análogos de derivados ciclopenta[*b*]indólicos foram planejados e submetidos ao processo de modelagem molecular.

Figura 35. Parâmetros utilizados no planejamento de novos análogos dos derivados ciclopenta[*b*]indólicos.



Para o planejamento, fez-se uso da hibridização molecular, da homologação, da simplificação molecular e do bioisosterismo. Alguns exemplos de construção e planejamento estão mostrados nas **Figuras 36, 37 e 38**.

A *homologação*, por exemplo, foi utilizada para adicionar grupos metilênicos na cadeia do éster do ciclopenta[*b*]indol **51**, com o objetivo de adequar o volume da molécula ao sítio biotivo da tubulina. Neste exemplo, há ainda a possibilidade do ligante interagir com os grupamentos hidrofóbicos dos resíduos do sítio, aumentando a estabilidade do complexo (**Figura 36**). A inserção de um grupamento OH no final da cadeia faz com que essa porção polar interaja com os resíduos presentes na cavidade do sítio.

A *simplificação molecular* foi usada na tentativa de se obter análogos mais simples que o protótipo de origem. A modificação mostrada na **Figura 37** compreende a modificação do grupamento trimetoxifenílico do composto **51** para um grupamento dimetoxifenílico.

E por fim, o *bioisosterismo* foi utilizado na troca da espécie monovalente OH, por um átomo de F, com o intuito de se gerar substâncias estruturalmente relacionadas com uma melhor atividade terapêutica (**Figura 38**).

Após o planejamento das moléculas (ver estruturas na Seção Experimental, **Figura 54**), foi feito o cálculo das propriedades físico-químicas, o qual foi levado em consideração os valores de IC₅₀, o coeficiente de partição (log P), o volume da molécula em comparação à colchicina (**11**, padrão) e a viabilidade sintética dos análogos em questão. Para o cálculo do log P e volume da molécula foi utilizado o servidor Molinspiration.¹¹⁵

Alguns parâmetros da Regra de Lipinski também foram levados em consideração. Esta regra é um conjunto simples de propriedades físico-químicas no qual o candidato a fármaco administrado oralmente deve possuir para atingir a fase II em ensaios clínicos. Lipinski sugeriu que o protótipo em estudo deve possuir menos de 5 átomos doadores de hidrogênio, menos de 10 aceptores de hidrogênio, um peso molecular inferior a 500 Da e um log P menor que 5. O objetivo desta regra é destacar possíveis problemas de biodisponibilidade se duas ou mais regras são violadas.^{116,117} Tomando por base este conceito, foram selecionadas as moléculas cujo valores de log P estivessem abaixo de 5, massa molar abaixo de 500 Da e número de ligação de hidrogênio abaixo de 5.

Todas as moléculas, bem como seus possíveis estereoisômeros (*cis* e *trans*), foram submetidas ao processo de docagem molecular e as 50 moléculas com um perfil mais promissor em comparação com as informações virtuais obtidos para os compostos mais potentes **49**, **51** e a colchicina (**11**), foram dispostas e organizadas na **Tabela 7**. De acordo com os resultados e a viabilidade sintética, estas foram encaminhadas para a fase sintética.

Figura 36. Planejamento de um novo análogo ciclopenta[b]indólico utilizando a ferramenta de Homologação.



Figura 37. Planejamento de um novo análogo ciclopenta[b]indólico utilizando a ferramenta de Simplificação Molecular.

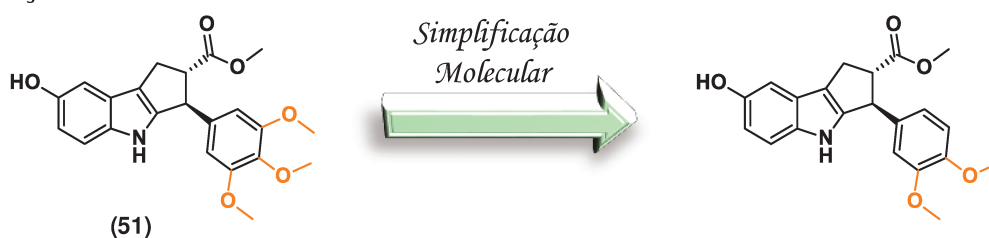


Figura 38. Planejamento de um novo análogo ciclopenta[b]indólico utilizando a ferramenta de Bioisosterismo.



Tabela 7. Parâmetros utilizados no planejamento racional de novos análogos dos derivados ciclopenta[b]indólicos.

Código	Log P ^a	Volume ^a	Docking ^b		Estrutura
			Enantiômero	Posição no Ranking (°)	
DR2	5,68	389,69	DR2_SS	10	
			DR2_RR	12	
DR4	5,00	372,17	DR4_RR	23	
DR6	4,81	424,88	DR6_SS	20	
			DR6_RR	41	
DR7	5,42	442,41	DR7_RR	14	
			DR7_SS	22	

Continuação Tabela 7

DR12	5,23	373,79	DR12_SS	11	
DR14	5,44	416,86	DR14_RR	3	
			DR14_SS	29	
DR16	4,82	399,33	DR16_RR	1	
			DR16_SS	43	
DR18	5,79	365,77	DR18_RR	32	
			DR18_SS	42	
DR20	5,18	348,24	DR20_RR	13	
DR23	2,93	395,09	DR23_RR	27	
			DR23_SS	31	
DR28	3,36	370,17	DR28_SS	26	
DR30	5,15	424,88	DR30_SS	35	
			DR30_RR	39	
DR34	5,83	416,86	DR34_SS	5	
			DR34_RR	36	
DR36	5,22	399,33	DR36_SS	17	
			DR36_RR	40	
DR38	5,81	416,86	DR38_SS	15	
DR40	5,19	399,33	DR40_SS	4	
			DR40_RR	21	
DR42	4,94	365,00	DR42_SS	19	

Continuação Tabela 7

DR45	2,10	381,56	DR45_SS	25	
DR46	3,53	337,82	DR46_RR	28	
DR49	2,98	443,92	DR49_SS	2	
			DR49_RR	18	
DR50	3,17	428,70	DR50_RR	6	
			DR50_SS	7	
DR51	2,46	392,19	DR51_SS	8	
			DR51_RR	24	
2	3,63	339,16	DR52_SS	33	
DR56	0,38	393,02	DR56_RS	45	
			DR56_SR	50	
DR58	3,61	389,16	DR58_SS	37	
DR60	2,91	373,45	DR60_SS	44	
DR64	3,12	388,77	DR64_SS	47	
DR73	2,44	329,96	DR73_SS	48	
DR74	1,07	360,91	DR74_SS	46	
			DR75_SS	9	
DR75	1,04	412,00	DR75_RR	30	

Continuação **Tabela 7**

DR76	0,09	412,00	DR76_SS	49	
DR77	4,49	444,88	DR77_SS	16	
DR79	3,61	387,93	DR79_SS	34	
			DR79_RR	38	
49	3,72	302,14	derivado_49_RR	91	
			derivado_49_SS	124	
51	3,29	353,23	derivado_51_SS	81	
			derivado_51_RR	148	
Colchicina (11)	1,10	363,15		153	

^aPara o cálculo do log P e volume da molécula foi utilizado o servidor Molinspiration. ^bOs valores das docagens foi realizado utilizando o programa GOLD 5.1 e o modelo cristalográfico para tubulina/colchicina PDB 1SA0.

4.2.2. Síntese dos novos derivados ciclopenta[b]indólicos

A primeira etapa da rota sintética consistiu na obtenção dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH). Estes foram sintetizados tratando-se aldeídos comerciais com acrilato de metila e DABCO, à temperatura ambiente em banho ultrassom. O **Esquema 10** exemplifica a reação de formação do aduto de MBH a partir do aldeído comercial benzaldeído. Os adutos **60-65** foram obtidos com bons rendimentos, com exceção dos adutos **66** e **67**, fato que pode ser explicado pelo impedimento estérico do aldeído 2,6 dimetóxi e pela alta polaridade do aldeído fenólico, respectivamente (**Tabela 8**).

A formação dos adutos foi comprovada por meio da análise dos espectros de absorção na região do IV, de RMN de ¹H, de RMN de ¹³C e de espectrometria de massas.

Em relação a caracterização por RMN, os adutos de MBH apresentam sinais característicos em seu esqueleto básico e, apesar das variações estruturais

entre os aldeídos e eletrófilos, estes sinais nos mostram claramente a formação destes adutos pela condensação entre os dois substratos. No espectro de hidrogênio da substância **60 (Espectro 1)**, por exemplo, observa-se a presença de dois sinais entre δ_H 5,5-6,5 correspondentes aos hidrogênios da dupla ligação, um dubleto em δ_H 5,5 referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico e um sinal entre δ_H 3,0-3,5 referente ao hidrogênio da hidroxila. No espectro de RMN de ^{13}C observa-se o sinal em δ_C 73,2 correspondente ao carbono carbinólico, o sinal em δ_C 126,6 correspondente ao carbono α -carbonila e o sinal em δ_C 142,0 correspondente ao carbono metilênico, evidenciando a formação do aduto de MBH **60 (Espectro 2)**.

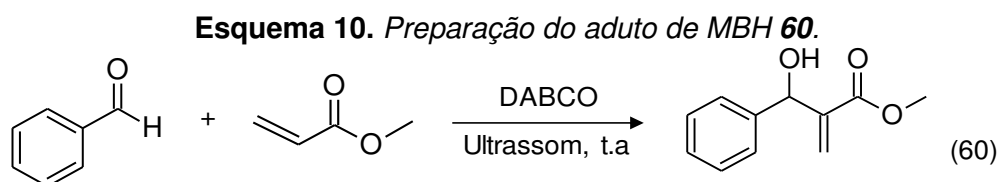


Tabela 8. Condições e rendimentos obtidos na reação de MBH.

Aldeído de partida	Aduto de MBH	Rendimento^a
		91%
		70%
		70%
		70%
		73%
		65%
		0%
		0%

^aRendimentos isolados após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel.

Posteriormente, reproduziu-se a metodologia de Yadav¹¹⁸, utilizando indol juntamente com os adutos de MBH (**60-65**) na presença de 1,2 equivalentes de IBX em acetonitrila (sob refluxo) para fornecer os α -metilindol- β -cetoésteres **68-75** em bons rendimentos (**Tabela 9**). O **Esquema 11** exemplifica a reação de oxidação pelo IBX e adição do 5-(Benziloxi)indol para a formação do α -metilindol- β -cetoésteres **68**.

A formação de todos os compostos foi comprovada por meio da análise dos espectros de absorção na região do IV, de RMN de ¹H, de RMN de ¹³C e de espectrometria de massas.

No espectro de RMN de ¹H da substância **68** (**Espectro 15**), observa-se a presença de um tripleto em δ_H 4,77 referente ao hidrogênio α -carbonila da molécula e um sinal em δ_H 3,48 atribuído ao hidrogênio metilênico referente ao acoplamento do indol no aduto. Além destes, destaca-se no espectro de RMN de ¹³C o sinal em δ_C 70,9 atribuído ao carbono metilênico, corroborando a estrutura proposta (**Espectro 16**).

Esquema 11. Preparação do α -metilindol- β -cetoéster **68**.

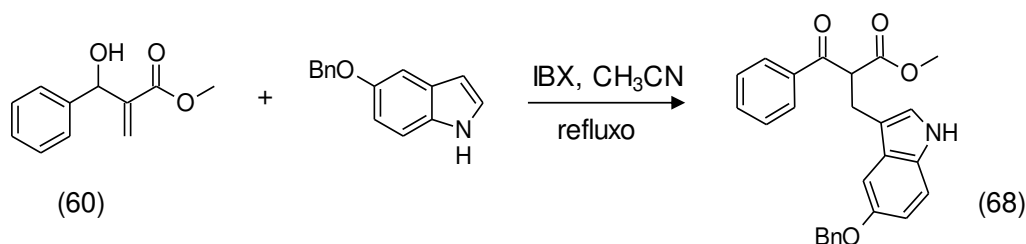
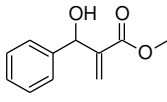
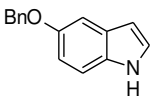
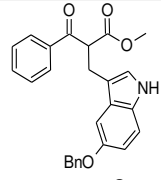
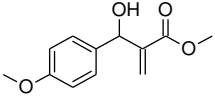
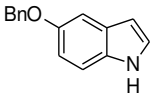
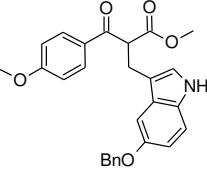
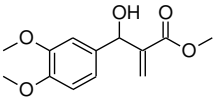
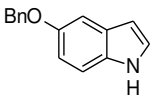
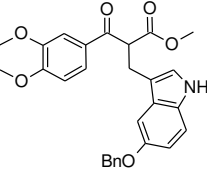
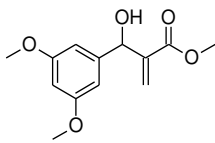
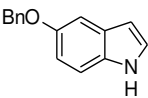
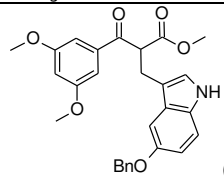
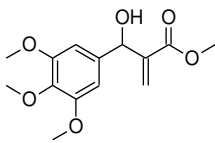
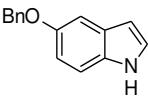
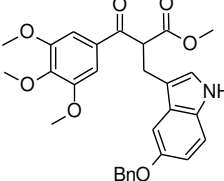
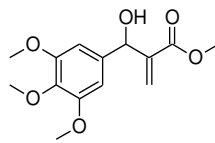
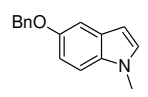
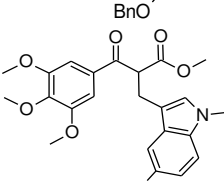
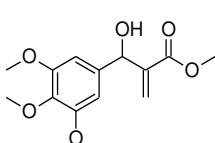

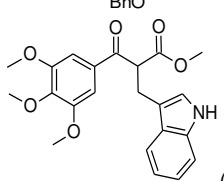
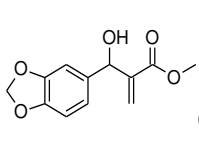
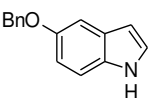
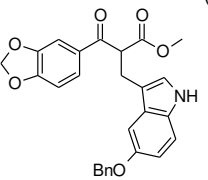


Tabela 9. Condições e rendimentos obtidos na reação de oxidação e adição de indol.

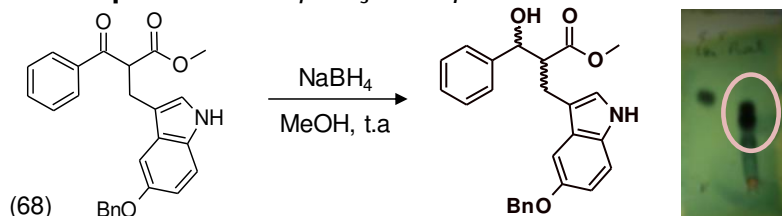
Aduto de MBH	Indol	α -metilindol- β -cetoésteres	Tempo de reação	Rendimento ^a
 (60)		 (68)	5 h	55%
 (61)		 (69)	8 h	72%
 (62)		 (70)	8 h	53%

Continuação **Tabela 9**

			4 h	75%
			8 h	89%
			12 h	65%
			8 h	71%
			8 h	69%

^aRendimentos isolados após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel.

Após a adição do indol foi feita a redução da carbonila utilizando-se NaBH₄ em pequenas porções em MeOH a 0°C. Depois de 1 h de reação, à temperatura ambiente, uma mistura de diastereoisômeros β-hidroxi-ésteres indólicos foi formada (**Esquema 12**) e esta foi utilizada sem purificação prévia como substrato para a reação de ciclização.

Esquema 12. Preparação do β-hidroxi-éster indol.

Na última etapa, a adição de ácido trifílico à mistura diastereoisomérica diluída com tolueno em atmosfera inerte e temperatura ambiente (**Esquema 13**) permitiu a formação dos núcleos ciclopenta[*b*]indólicos de interesse **76-83** com rendimento moderados (**Tabela 10**). Para o composto **78**, devido as condições do meio reacional, foi obtido o derivado indólico desprotegido.

A confirmação estrutural desses derivados foi realizada inequivocamente através de RMN de ^1H e ^{13}C mono e bidimensional, de espectrometria de massas, IV e raios-X.

No espectro de RMN de ^1H para o composto **76** (**Espectro 31**), observa-se a presença de três multipletos entre δ_{H} 3,10 e 3,63 e um dubleto em δ_{H} 4,81 referentes ao núcleo ciclopentílico formado e, no espectro de ^{13}C (**Espectro 32**) há a presença dos sinais em δ_{C} 28,8 e entre δ_{C} 48,5-58,3, confirmando a ciclização.

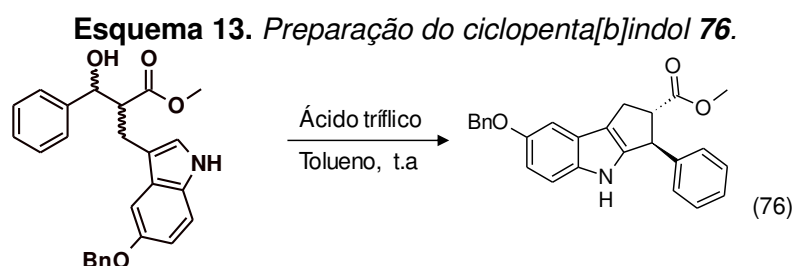
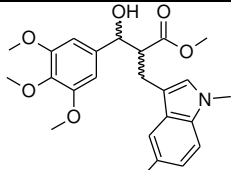
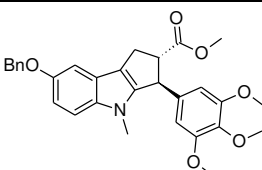
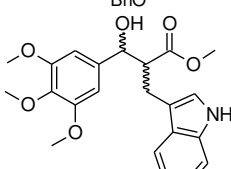
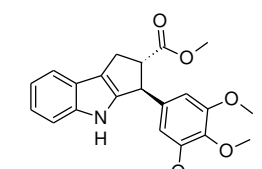
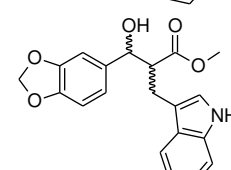
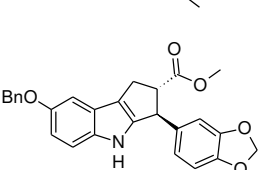


Tabela 10. Condições e rendimentos obtidos na reação de ciclização para formação dos ciclopenta[b]indóis.

β -hidroxi-éster indol	Ciclopenta[b]indol	Tempo de reação	Rendimento ^a
		12 h	35%
		5 h	53%
		6 h	58%
		8 h	50%
		6 h	75%

Continuação Tabela 10

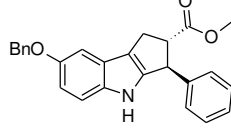
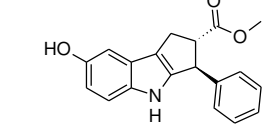
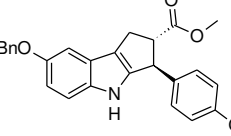
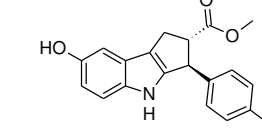
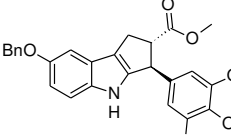
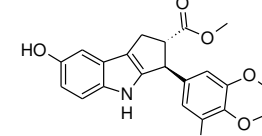
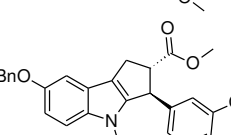
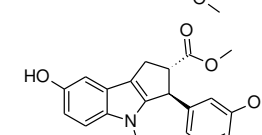
		4 h	70%
		6 h	50%
		6 h	55%

^aRendimentos isolados após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel.

A partir de reações nas cadeias laterais foram obtidos novos análogos dos derivados ciclopenta[*b*]indóis. As derivatizações foram realizadas através de desproteção por hidrogenólise do grupo benzil e hidrólise do grupo éster com KOH.

Para desproteção do grupo benzil, os derivados ciclopenta[*b*]indólicos protegidos **76**, **77**, **80**, **81** e **83** foram dissolvidos em MeOH e em seguida adicionado Pd/C à temperatura ambiente e atmosfera de H₂ para fornecer os compostos **84-88**. O tempo de reação e os rendimentos estão indicados na **tabela 11**.

Tabela 11. Condições e rendimentos obtidos na reação de desproteção do grupo benzil.

Ciclopenta[<i>b</i>]indol protegido	Ciclopenta[<i>b</i>]indol desprotegido	Tempo de reação	Rendimento ^a
		2 h	78%
		5 h	60%
		1,5 h	77%
		1 h	81%

Continuação **Tabela 11**

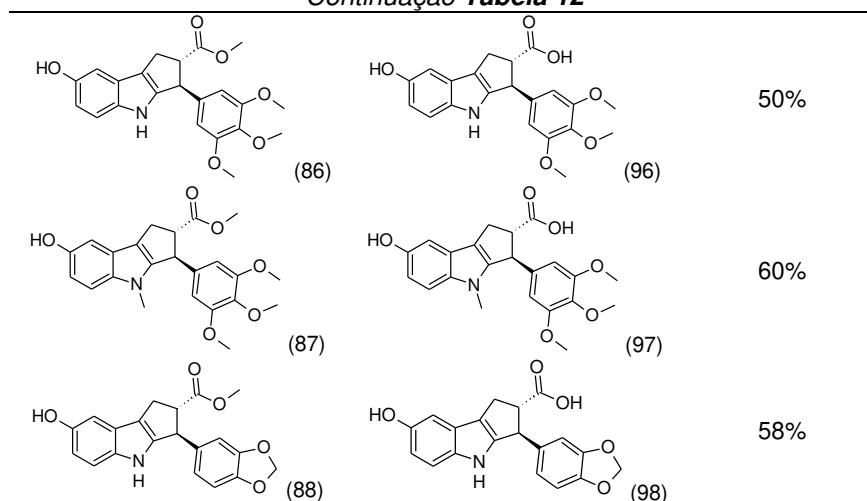
		1 h	72%
(83)	(88)		

^aRendimentos isolados após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel.

Os compostos **77**, **78**, **80**, **81**, **82**, **83**, **85**, **86**, **87** e **88** foram submetidos à reação de hidrólise de éster catalisada por base. Eles foram dissolvidos numa mistura de MeOH:H₂O e KOH e deixados sob agitação magnética (temperatura ambiente) por 3 dias para dar origem aos ácidos **89-98** conforme a **tabela 12**.

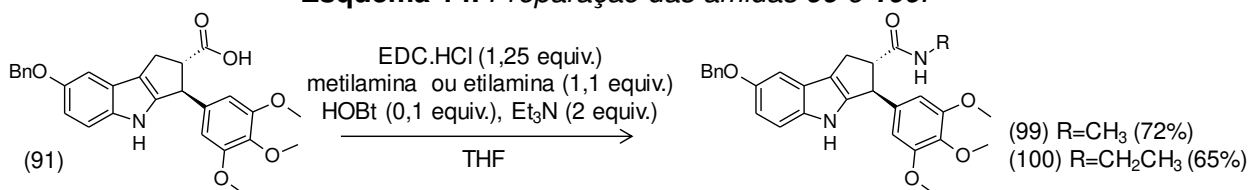
Tabela 12. Condições e rendimentos obtidos na reação de hidrólise.

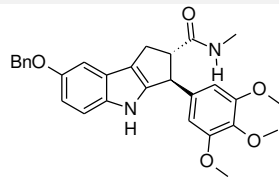
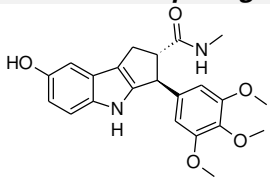
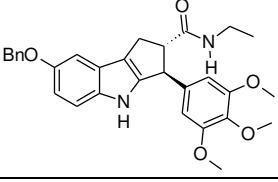
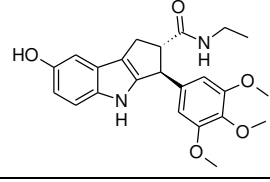
Ciclopenta[b]indol	Ácido Ciclopenta[b]indol	Rendimento ^a
		65%
(77)	(89)	
		62%
(78)	(90)	
		93%
(80)	(91)	
		55%
(81)	(92)	
		75%
(82)	(93)	
		53%
(83)	(94)	
		50%
(85)	(95)	

Continuação **Tabela 12**

^aRendimentos isolados após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel.

O ácido gerado **91** foi utilizado como material de partida na síntese das amidas secundárias **99** e **100**, conforme o **Esquema 14**. Assim, o ácido foi dissolvido em THF anidro e adicionado em uma solução anidra de EDC.HCl, metilamina ou etilamina, HOBt, Et₃N e THF, com atmosfera de N₂ em temperatura ambiente por 1 h. As amidas **99** e **100** foram obtidas com rendimentos de 72 e 65%, respectivamente. Após hidrogenólise utilizando-se MeOH e Pd/C à temperatura ambiente e atmosfera de H₂, essas amidas deram origem as amidas desprotegidas **101** e **102**, com rendimentos de 65 e 60%, respectivamente (**Tabela 13**).

Esquema 14. Preparação das amidas 99 e 100.**Tabela 13. Condições e rendimentos obtidos na síntese das amidas 101 e 102.**

Amidas	Amidas desprotegidas	Rendimento ^a
		65%
(99)	(101)	
		60%
(100)	(102)	

^aRendimentos isolados após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel.

4.2.3. Ensaios bioquímicos dos novos análogos ciclopenta[b]indólicos

Na tentativa de identificar novos análogos com perfis farmacodinâmicos superiores aos já identificados e descritos na “*Motivação*” deste trabalho, os novos derivados ciclopenta[b]indólicos sintetizados (**Figura 39**) foram submetidos ao ensaio de Fluorescência para quantificação de polimerização da tubulina.

Primeiramente, todas as substâncias foram avaliadas em uma concentração única de 250 μM e, após análise das curvas e dos resultados, as substâncias mais promissoras mostradas na **Figura 40** foram submetidas ao ensaio com concentrações menores.

Figura 39. Novos derivados ciclopenta[b]indólicos planejados e sintetizados a partir do composto **51**. A síntese dos compostos **103-110** será descrita no item **5.2.1**.

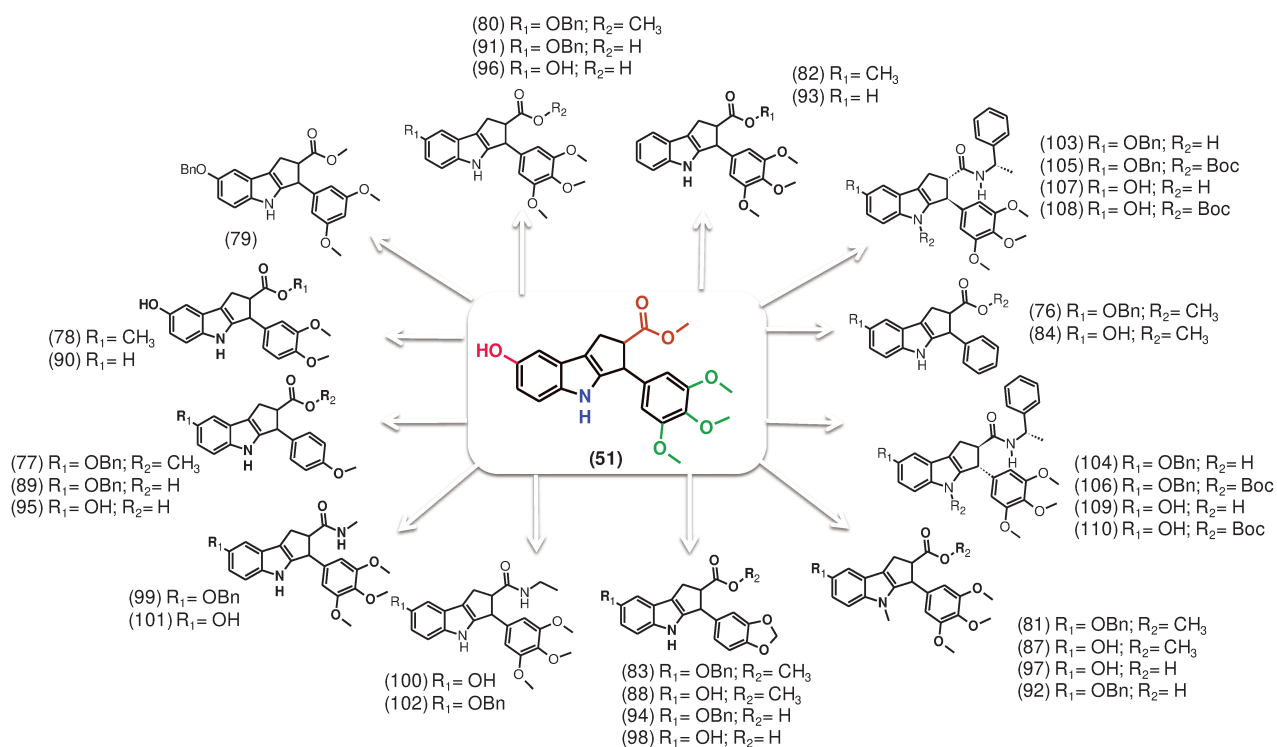
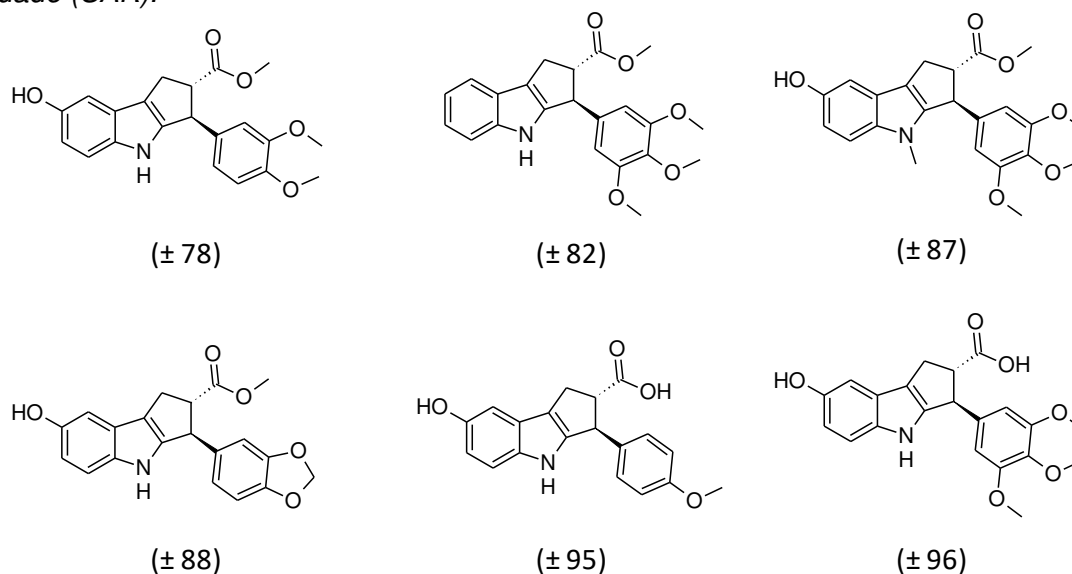


Figura 40. Substâncias selecionadas para cálculo de IC_{50} e análise da sua relação-estrutura atividade (SAR).



De acordo com o ensaio (**Tabela 14**), nota-se que a ausência do grupo hidroxila no indol, como no caso do composto **82**, resulta em grande perda de atividade, com apenas 10% de inibição da polimerização da tubulina. Esta observação confirma a hipótese para o modelo de ligação dos derivados indólicos no sítio da colchicina (**11**), em que a hidroxila é fundamental para estabilizar os complexos por meio de sua interação com o resíduo Val236 β .

A substituição do grupamento éster do composto **51** pelo grupamento ácido no composto **96**, também faz com que ocorra perda de atividade, com valor de inibição da polimerização da tubulina de 35%. Da mesma forma para o composto **95**, que além desta característica, possui menor quantidade de grupos metóxi na porção fenólica.

A troca do grupo -NH do indol por um grupo -NCH₃, verificada no composto **87**, não alterou a atividade já apresentada pela substância **51** em estudos anteriores. O valor encontrado de 65% de inibição, apesar de ser relativamente maior que os demais, sugere que a desativação do grupo indol, não tem alteração significativa no perfil de polimerização. Este resultado também está de acordo com o modelo de ligação predito pelos estudos de docagem molecular, em que não se observa uma interação ativa entre o nitrogênio do indol e os resíduos do sítio da colchicina (**11**).

Tabela 14. *Inibição da polimerização da tubulina por Fluorescência.*

Compostos	% inibição a 50 μM^a
78	42 \pm 3
82	10 \pm 6
87	65 \pm 4
88	87 \pm 4
95	32 \pm 2
96	35 \pm 3

a= valor médio observado em ensaios em triplicata.

Um interessante resultado (87% de inibição da polimerização da tubulina) foi obtido para o composto **88**, no qual fez-se a inserção de um grupamento dioxolano na porção fenólica e manteve-se as substituições originais do composto **51**. Visando uma investigação mais criteriosa, esse composto foi submetido ao ensaio de dose-resposta para determinação do valor de IC_{50} . Os dados mostrados na **Figura 41** indicam uma melhora significativa na atividade bioquímica de inibição da polimerização (com um valor de IC_{50} igual a 5 μM) quando comparado ao composto **51**, que apresentava um IC_{50} igual a 24 μM .

De acordo com modelo de ligação obtido pelo programa AutoDock para este composto (**Figura 42A**), a presença de dois átomos de oxigênios unidos por um grupo metileno promove uma restrição conformacional e, uma consequente diminuição da flexibilidade da molécula. Essa propriedade faz com que aumente a força de interação com o resíduo Asn256 β , tornando o conjunto ligante/proteína mais estável e justificando o resultado bioquímico encontrado. Nota-se ainda, uma sobreposição total entre o composto **88** e os compostos **49** e **51** (**Figura 42B**), afirmado principalmente pela interação entre o resíduo Val236 β e a hidroxila do indol do ligante e entre o resíduo Ile316 β e o oxigênio do grupamento éster.

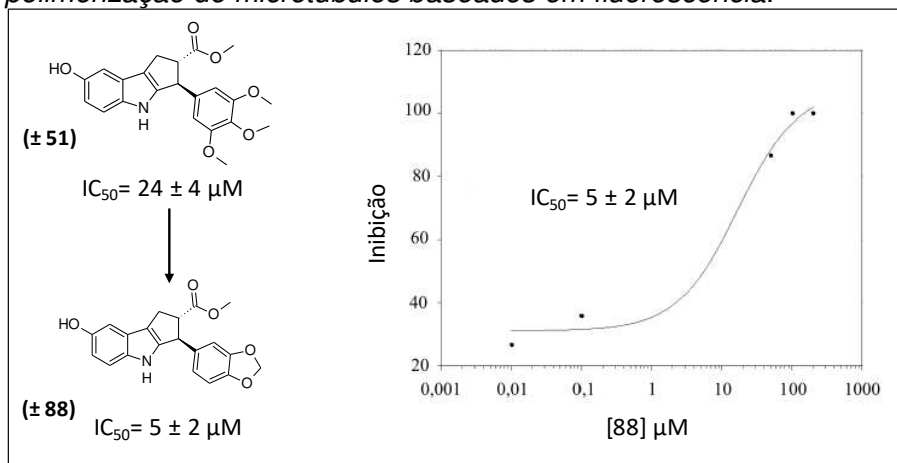
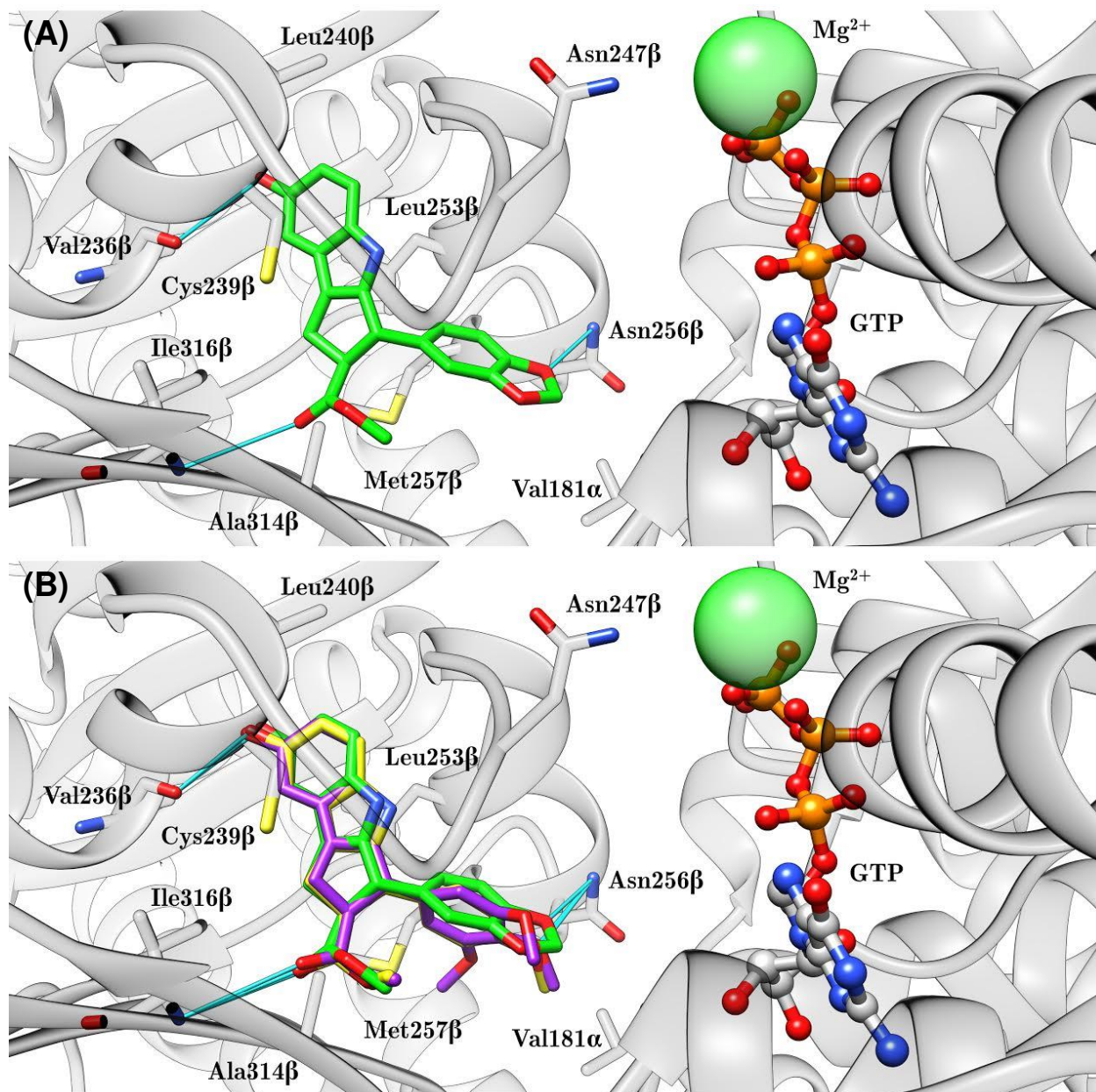
Figura 41. *Curva de dose-resposta e determinação do valor de IC_{50} do composto 88 em ensaios de polimerização de microtúbulos baseados em fluorescência.*

Figura 42. Proposta da conformação de interação do composto **88** (A) no sítio da colchicina (11) e sua sobreposição com os compostos **49** e **51** (B) (programa AutoDock, PDB: 4O2B).



4.2.4. Ensaios biológicos dos novos análogos ciclopenta[b]indólicos

4.2.4.1. Ensaio celular wound healing

A análise qualitativa da capacidade de inibição da migração celular foi realizada em parceria da aluna de doutorado Luma G. Magalhães (USP) sob orientação do professor Adriano Defini Andricopulo.

Para tal, os compostos **78**, **83**, **88**, **90**, **95**, **96**, **99** e **103** foram incubados com células MDA-MB-231 em placas de 24 poços e analisados em diversas concentrações quanto ao efeito de inibição da migração celular (**Figura 43**).

Os resultados observados na **Tabela 15** mostraram que os compostos **95** e **96** apresentaram um resultado menos satisfatório quando comparado aos compostos mais ativos **49** e **51**, anteriormente testados (com valores de inibição de 75% e 70%, respectivamente). Esse dado nos confirma que a função éster é importante para a atividade, visto que em tais compostos a função éster foi substituída por um grupo carboxílico. Da mesma forma, os compostos **83**, **99** e **103** (com um grupamento benzílico no anel do indol) apresentaram um valor baixo de inibição, reforçando que a hidroxila livre no anel do indol contribui de forma significativa para a atividade anticancerígena. Os resultados obtidos para os compostos **78** e **90** (grupamento dimetóxi na porção fenílica) foram relativamente melhores, com valores de inibição de 51 e 57%. Porém, o resultado mais promissor foi obtido para o composto **88**, que possui um grupamento dioxolano na porção fenílica. Quando comparado aos resultados encontrado para os compostos ativos **49** e **51**, os valores são praticamente iguais e, embora não tenha ocorrido uma melhora na inibição, este composto possui uma maior atividade bioquímica, com um modelo de ligação bem adequado para justificar a interação substrato/proteína.

Figura 43. *Substâncias submetidas ao ensaio wound healing.*

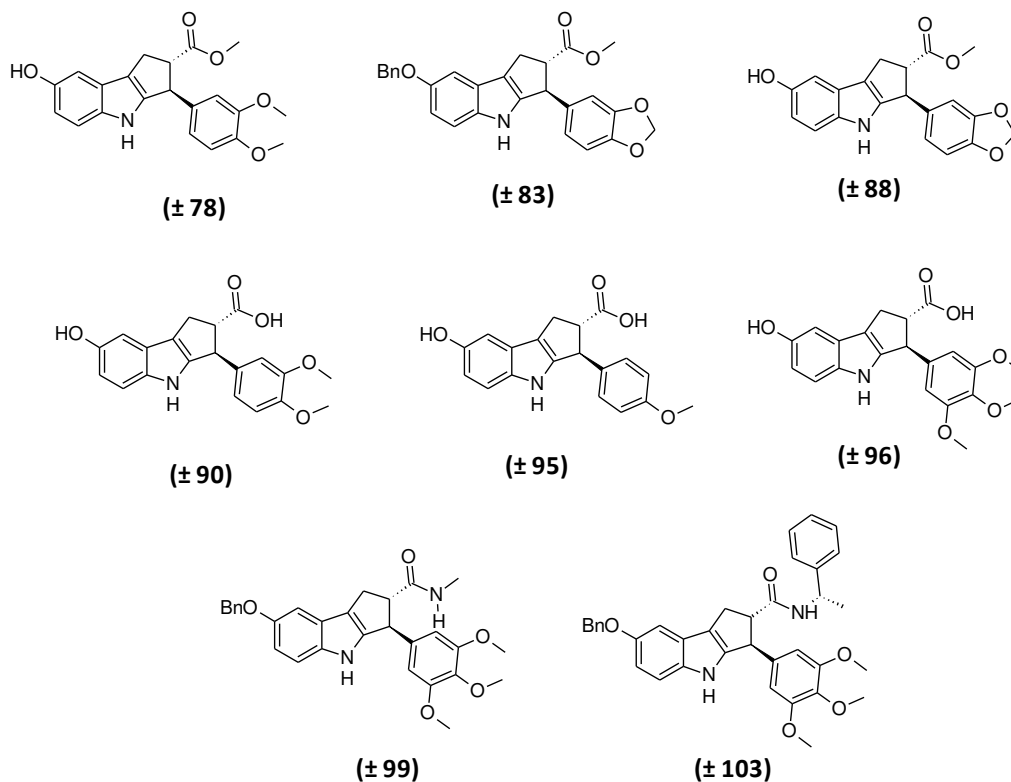


Tabela 15. Ensaio celular wound healing (MDA-MB-231) na presença dos novos derivados indólicos sintetizados.

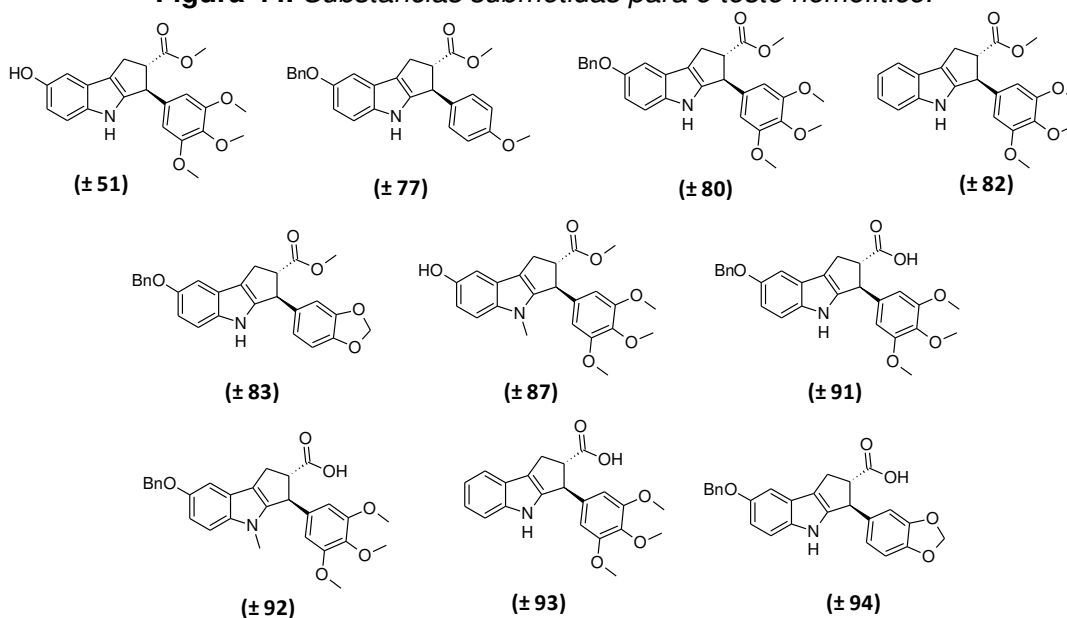
Composto (50 μ M)	% de Inibição
78	51 \pm 6
83	29 \pm 3
88	75 \pm 5
90	57 \pm 2
95	Inativo
96	34 \pm 3
99*	Inativo
103	Inativo
Colchicina (11)	79 \pm 6

Experimento realizado em triplicata. Colchicina (11) foi utilizada em uma concentração de (10 μ M). *Baixa solubilidade.

4.2.4.2. Teste hemolítico

A citotoxicidade dos derivados indólicos **51**, **77**, **80**, **82**, **83**, **87**, **91**, **92**, **93** e **94** foi avaliada em cultura de eritrócitos humanos pela técnica de hemólise. Inicialmente, os eritrócitos foram separados do plasma para, em seguida, serem adicionados a uma solução contendo os compostos testes em diferentes concentrações (**Figura 44**).

Figura 44. Substâncias submetidas para o teste hemolítico.



Todos os compostos na concentração de 50 μ M apresentaram valores quase nulos de citotoxicidade e, mesmo em uma concentração superior de 100 μ M, esses valores se mantiveram constantes, mostrando que as substâncias não danificam as células sanguíneas humanas (**Tabela 16**).

Tabela 16. Avaliação da citotoxicidade por hemólise dos derivados indólicos **51**, **77**, **80**, **82**, **83**, **87**, **91**, **92**, **93** e **94**.

Compostos	% Hemólise	
	50 μM	100 μM
51	0	0,53
77	0	0
80	0,37	0,27
82	0	0,1
83	0,17	0,03
87	0,43	0,83
91	0	0
92	1,6	0
93	0,4	0
94	0,2	0,76

As análises foram realizadas em duplicata em dois eventos.

4.3. Conclusão

Baseando-se em estudos de modelagem molecular a partir da base de dados do LSPNF, a classe dos ciclopenta[*b*]indóis foi identificada com considerável capacidade de modular a polimerização de tubulina, além de mostrar interessante ação de desestruturação dos filamentos dos microtúbulos e inibição da migração celular. O ensaio de citotoxicidade MTS utilizando fibroblastos de gengiva humana saudáveis para os compostos mais ativos **49** e **51** mostrou que os valores estão acima de 100 μM e por meio do teste hemolítico com cultura de eritrócitos humanos para o composto **51** comprovou-se que tal substância não tem a propriedade de danificar as células sanguíneas humanas, mostrando valores quase nulos de citotoxicidade. Um modelo de mecanismo molecular baseado em um ensaio competitivo com colchicina fluorescente foi proposto e, a partir deste resultado, propôs-se uma possível explicação para o modo de interação entre a tubulina e os compostos em questão. Os resultados mostraram que é necessário a presença da hidroxila livre no sistema indólico, a presença dos grupamentos metóxi na porção fenólica e a presença da função éster, para se ter um aumento na atividade (**Figura 45**).

Figura 46. Novos análogos de ciclopenta[b]indóis sintetizados.

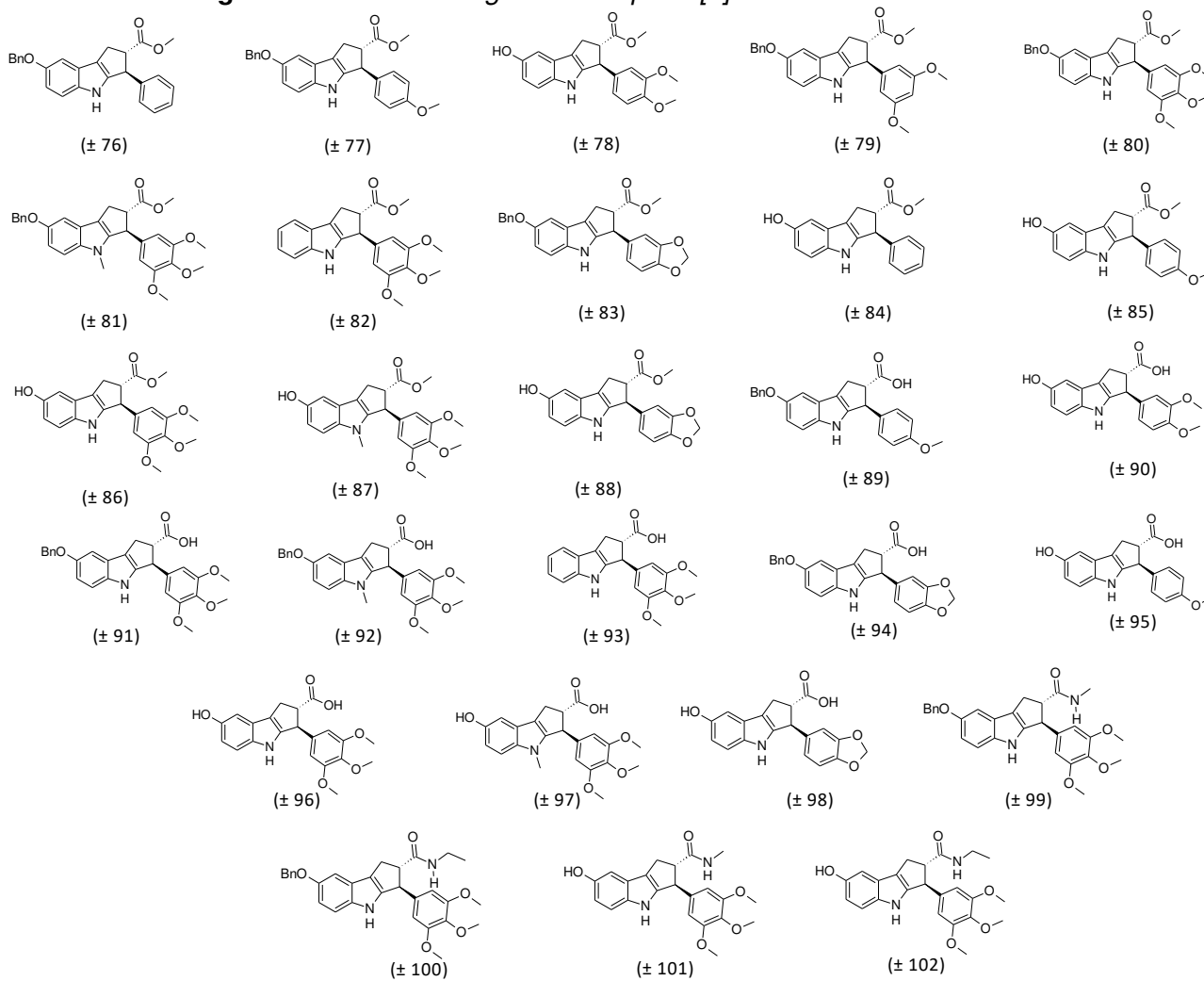
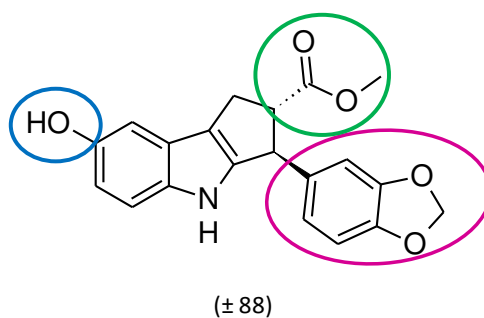


Figura 47. Relação estrutura atividade observada para o ciclopenta[b]indol planejado 88.



*5- Resolução enantiomérica dos
derivados ciclopenta[6]indólicos*



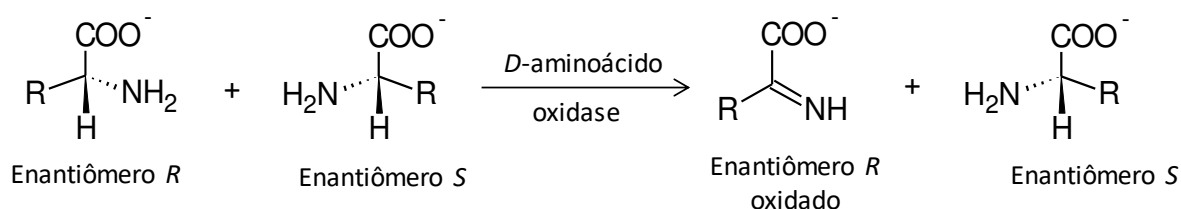
5. RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA DOS DERIVADOS CICLOPENTA[B]INDÓLICOS

5.1. Introdução

A quiralidade molecular é um fenômeno indispensável na natureza, estando presente nos processos biológicos naturais nos quais a maioria dos seres vivos são capazes de diferenciar pares de enantiômeros.¹¹⁹

A enzima *D*-aminoácido oxidase, por exemplo, catalisa somente reações do enantiômero *R* e deixa o enantiômero *S* intacto¹²⁰ (**Figura 48**).

Figura 48. Resposta biológica da enzima *D*-aminoácido oxidase.



(fonte: referência 120)

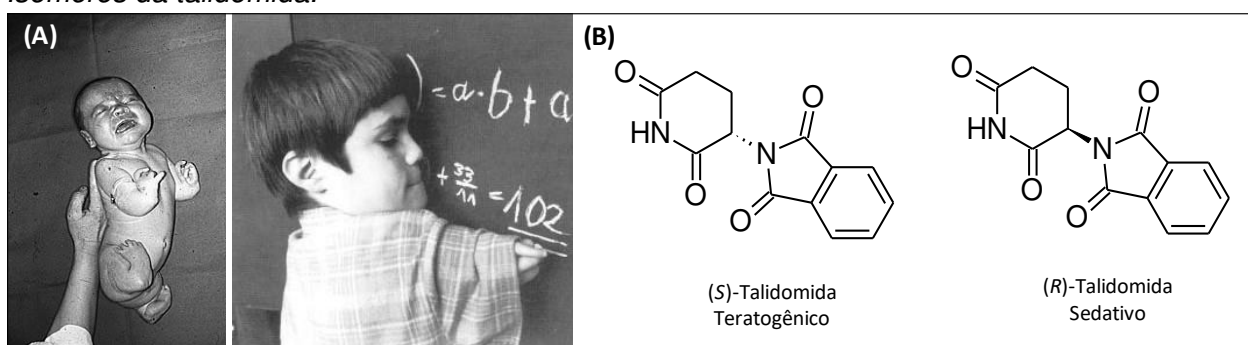
As enzimas responsáveis pelo metabolismo como as P₄₅₀, atuam de modo a formar dois complexos diastereoisoméricos. Dois estados de transição com energias diferentes se desenvolvem, levando a uma velocidade de metabolização e a uma meia-vida diferente para cada enantiômero.¹²¹

A glicoproteína presente na membrana celular, responsável pelo transporte ativo de substâncias para o interior da célula, também é um exemplo da discriminação dos enantiômeros nos diversos níveis de interação com o sistema biológico. Quando a molécula a ser transportada é quiral, o reconhecimento acontece de maneira distinta, fazendo com que ela seja absorvida com velocidades e permeabilidades diferentes.^{122,123}

Uma vez que nos seres vivos existem tantos compostos químicos quirais, não é estranho que os fármacos usados para curar ou aliviar sintomas de doença também o devam ser. Até 1961, a maioria dos fármacos comercializados com tal característica, era tido como uma mistura em que um dos enantiômeros era responsável pela ação e o outro inativo. O caso dramático da talidomida abriu uma nova concepção a este respeito. Esta, era utilizada como uma mistura racêmica por

mulheres grávidas no início da gestação, porém não se sabia que enantiômero *S* apresentava uma atividade teratogênica levando a má formação congênita (**Figura 49**). Isso levou ao nascimento de milhares de pessoas com gravíssimos defeitos físicos, sem contar os bebês mortos antes do nascimento. Hoje, a talidomida é usada com restrições para o tratamento de lepra e melanomas, contudo, já se sabe que ambos os seus isômeros podem apresentar propriedades teratogênicas, em função da epimerização *in vivo* do centro assimétrico.^{124,125}

Figura 49. (A) Imagens de crianças afetadas pelo uso da mistura racêmica da talidomida. (B) Isômeros da talidomida.



(fonte <http://www.terrywiles.20m.com/photo4.html>)

Em 1992, o FDA estabeleceu uma política que encorajava as companhias farmacêuticas a usar os avanços recentes em técnicas de síntese e separação para desenvolver drogas com um único enantiômero. Agora um fármaco não pode ser comercializado sem antes passar por minuciosos ensaios clínicos e toxicológicos.¹²⁶

Existe uma série de vantagens da comercialização de enantiômeros puros sobre a comercialização da mistura racêmica, tais como: redução da dose e da carga no metabolismo; restrições menos rígidas na dosagem; melhor controle da cinética da dosagem; redução da variabilidade da resposta dos pacientes; maior confiança na padronização da dosagem; redução nas interações com outros fármacos de uso comum e redução de efeitos colaterais.¹²⁷

Enantiômeros puros podem ser obtidos por síntese assimétrica no qual através de um reagente pró-quiral há a formação de produtos quirais de forma enantiosseletiva. Uma vez que o primeiro centro quiral é introduzido, as etapas posteriores são de natureza diastereosseletiva. Quando se utiliza um auxiliar quiral covalentemente ligado ao substrato, o processo inicialmente diastereosseletivo torna-se enantiosseletivo a partir do momento que o auxiliar é removido. Também pode-se

usar produtos naturais opticamente puros como matéria-prima incorporada na estrutura da molécula em questão. Neste caso, a fonte de quiralidade não é reciclada e a síntese é diastereosseletiva.¹²⁸

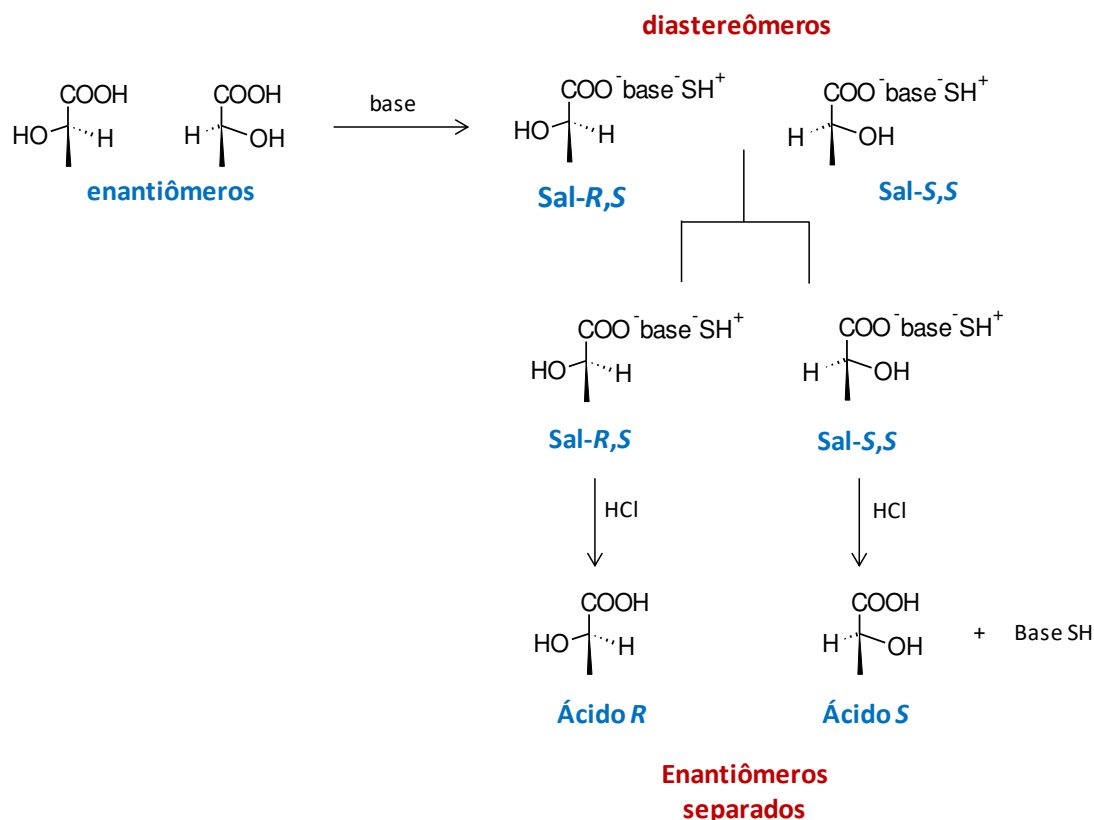
Além da síntese assimétrica pode-se obter enantiômeros puros por meio de uma resolução química, resolução enzimática ou por meio da cromatografia quiral.¹²⁹

A resolução química consiste em reagir a mistura de enantiômeros com um composto opticamente puro, formando derivados diastereoisoméricos que possuem propriedades físicas diferentes, o que permite a separação por métodos clássicos (destilação fracionada, cromatografia ou cristalização fracionada) sem a necessidade de colunas cromatográficas quirais. A decomposição, em seguida, de cada diastereoisômero separadamente, dará o enantiômero individual da forma racêmica original. É preciso fazer uma escolha cuidadosa do agente de resolução. Ele deve proporcionar um alto rendimento dos produtos e, além disso, os diastereômeros resultantes devem ser separáveis e o agente utilizado para resolução deve ser facilmente removido, de modo a regenerar os enantiômeros originais.¹³⁰

Uma reação extensivamente usada é a reação ácido-base¹²⁰, que se processa com rapidez e usualmente gera sais capazes de serem separados por cristalização fracionada. Se a amina é a forma racêmica a ser resolvida, a reação é feita com um ácido quiral para dar os sais diastereoisoméricos. A separação dos sais, seguida pelo tratamento de cada um com hidróxido de sódio, por exemplo, produz os enantiômeros da amina. Da mesma forma, uma mistura de ácidos pode ser resolvida com o uso de uma base quiral, como é mostrado na **Figura 50**.

A resolução enzimática faz uso de enzimas específicas, no qual a diferença de energia entre os estados de transição diastereoisoméricos proporciona a estereosseletividade verificada. Dentre as principais enzimas utilizadas, destacam-se as lipases que, naturalmente, apresentam uma grande versatilidade catalítica como hidrólises, esterificações, transterificações, amidações e epoxidações.¹³¹

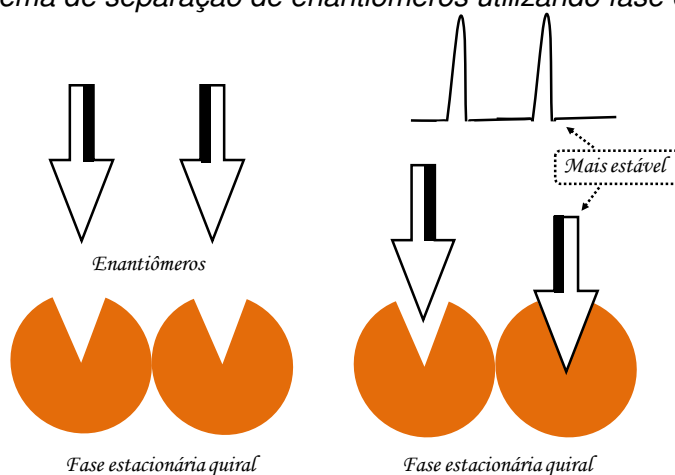
Figura 50. Resolução de uma mistura racêmica de ácidos utilizando uma amina quiral.



(fonte: referência 120)

Enantiômeros também podem ser resolvidos por cromatografia através de procedimentos indiretos ou diretos. No procedimento indireto, a derivação com um reagente quiral leva à formação de diastereoisômeros que podem ser separados empregando colunas de fases estacionárias aquirais, como sílica e C18. Já no modo direto, faz-se uso de aditivos quirais na fase móvel, como a β -ciclodextrina, ou faz-se uso de fases estacionárias quirais em que, devido a um conjunto de interações entre o soluto e as moléculas quirais, ocorre a formação de um complexo diastereoisomérico transitório. O complexo mais estável possuirá um tempo de retenção maior, ocorrendo a separação (**Figura 51**).¹³²

Figura 51. Esquema de separação de enantiômeros utilizando fase estacionária quiral.



Dentre as fases estacionárias quirais, aquelas que se mostraram mais promissoras para fármacos quirais e seus metabólitos são baseadas em derivados de polissacarídeos e em proteínas.¹³³ Polissacarídeos como a celulose e a amilose apresentam limitada capacidade de resolução quiral. Por outro lado, são facilmente convertidos a uma variedade de derivados como tris-benzoatos e tris-fenilcarbamatos, criando novos sítios para o reconhecimento quiral. As fases estacionárias quirais baseadas em proteínas apresentam enantiosseletividade para um grande número de compostos. Uma desvantagem é a baixa capacidade, a menor estabilidade das colunas e o limitado entendimento dos mecanismos de separação.¹³⁴

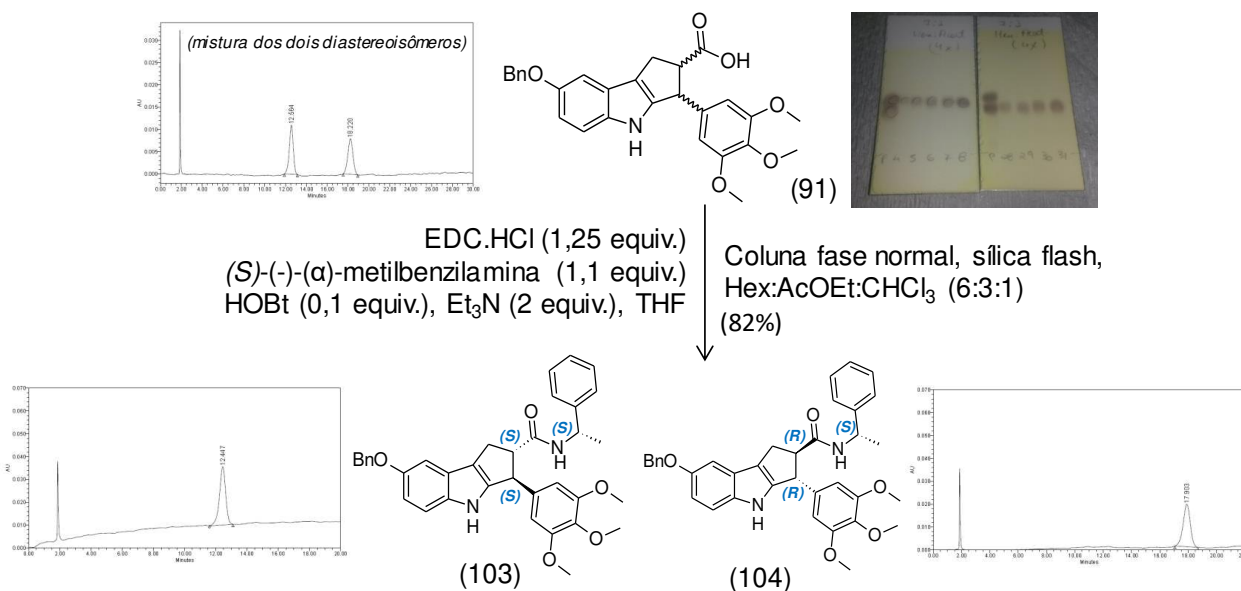
5.2. Resultados e discussão

5.2.1. Resolução enantiomérica dos derivados ciclopenta[b]indólicos por meio de agentes quirais

Os valores de docagem mostrados no **item 2.3** para os enantiômeros dos compostos **49** e **51** (mais potentes nos ensaios biológicos) sugeriram que ambos os enantiômeros com configuração *SS* tem uma maior contribuição na atividade observada, nos levando a propor o isolamento das substâncias quirais por resolução, inicialmente, com uma amina opticamente pura.

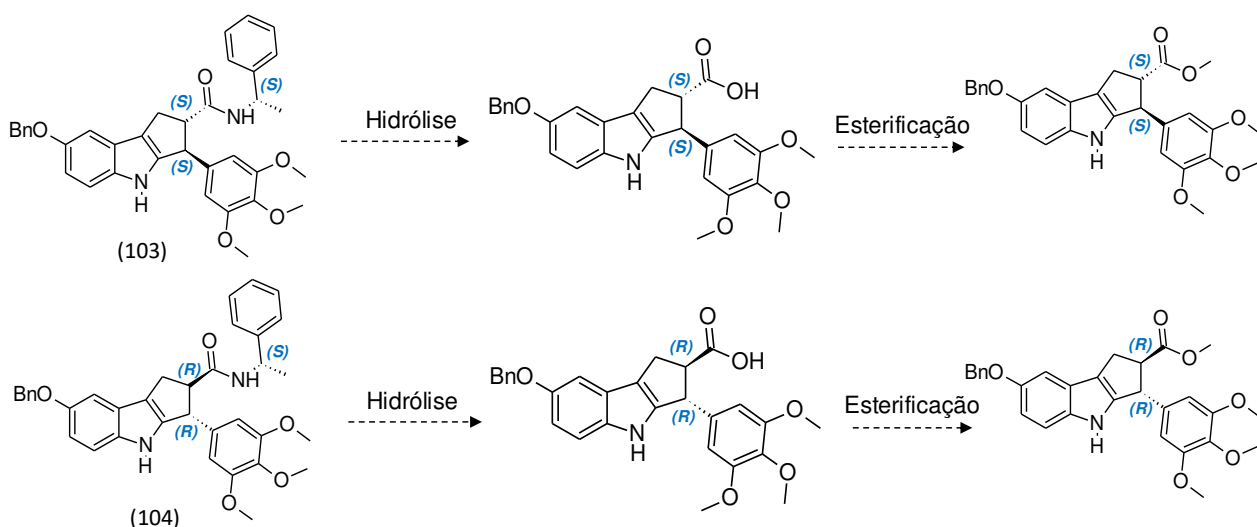
O ácido ciclopenta[b]indol **91** foi dissolvido em THF anidro e adicionado em uma solução anidra de EDC.HCl, (*S*)-(-)-(α)-metilbenzilamina, HOBT, Et₃N e THF, com atmosfera de N₂ em temperatura ambiente. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 1 h para formação dos compostos **103** e **104**. Estes foram separados por métodos convencionais de cromatografia (coluna de fase normal, sílica flash, Hex:AcOEt:CHCl₃ (6:3:1) (**Esquema 15**).

Esquema 15. Condições utilizadas para resolução da mistura racêmica do ciclopenta[b]indol **91**. Os cromatogramas foram realizados em CLAE Shimadzu, coluna sílica Water, fluxo 1 mL/min, fase móvel 7:3 (Hex:AcOEt), $\lambda=254$ nm.



As amidas sintetizadas foram submetidas à hidrólise com HCl:H₂O para, em seguida, serem convertidas nos produtos ativos originais através de uma reação de esterificação (**Esquema 16**).

Esquema 16. Proposta sintética para finalização da resolução enantiomérica e obtenção dos produtos opticamente puros.



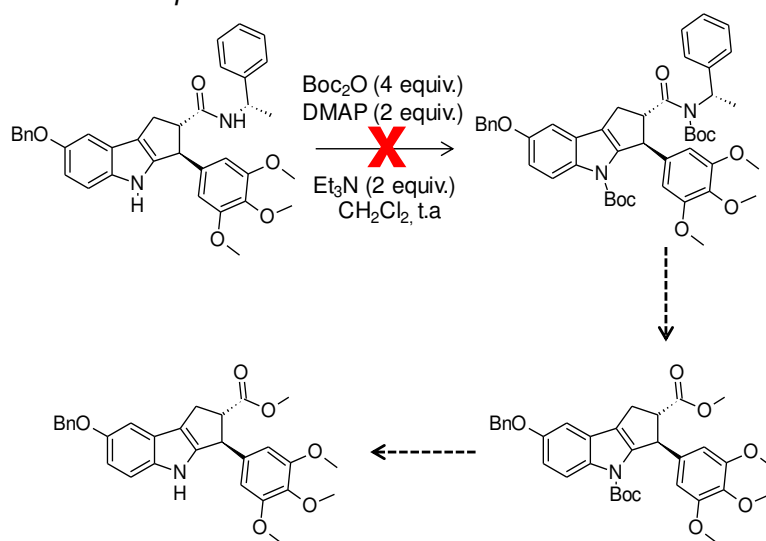
No entanto, não se obteve sucesso na etapa de hidrólise, pois utilizando-se de metodologias clássicas ácidas e básicas (**Tabela 17**), as condições drásticas de temperatura e pH fizeram o produto degradar-se. Algumas rotas alternativas foram utilizadas a fim de utilizar temperaturas menores, como no caso de cloreto de tionila (**Tabelas 17**, entrada **6**) e peróxido de sódio (**Tabela 17**, entradas **12** e **13**), porém a reação procedeu-se sem nenhum consumo do material de partida.

Tabela 17. Condições utilizadas na reação de hidrólise ácida e básica.

Entradas	Ácido/Base	Temperatura	Tempo reacional
1	HCl 6M	100 °C	24 h
2	HCl 6M	25 °C	1 semana
3	HCl conc. (37,5%)	100 °C	24 h
4	MeOH.HCl	65 °C	24 h
5	H ₂ SO ₄ e MeOH	65 °C	24 h
6	SOCl ₂ e MeOH	65 °C	24 h
7	KOH 4 equiv. e H ₂ O	100 °C	24 h
8	NaOH 4 equiv. e H ₂ O	100 °C	24 h
9	NaOH 8 equiv. e H ₂ O	25 °C	1 semana
10	NaOH 8 equiv. e MeOH	100 °C	24 h
11	KOH 10 equiv. e H ₂ O:MeOH	25 °C	1 semana
12	Na ₂ O ₂ 1 equiv.	25 °C	1 semana
13	Na ₂ O ₂ 1 equiv.	45° C	1 semana

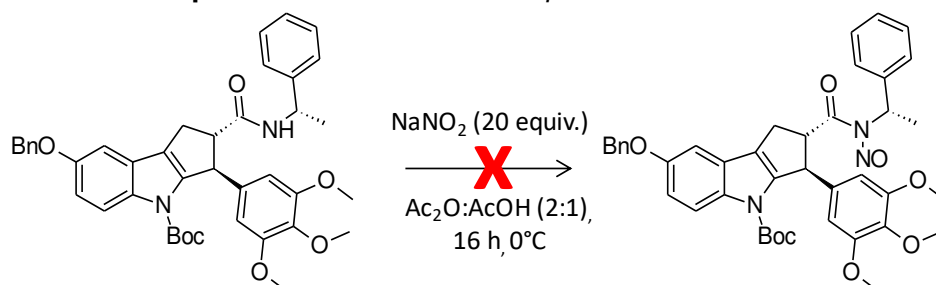
Visando a utilização de métodos mais brandos optou-se pela derivatização da amida secundária com um grupo protetor.¹³⁵ No caso, a reação com (Boc)₂O (4 equiv.), DMAP (2 equiv.), Et₃N (2 equiv.) em CH₂Cl₂ à temperatura ambiente formaria uma amida mais reativa na presença do nucleófilo metóxido (**Esquema 17**). O produto formado apresentou uma polaridade menor que o reagente, sugerindo o sucesso da reação, porém o grupamento protetor deu-se somente no sítio do indol e não como o esperado, no nitrogênio amídico. Outras bases foram utilizadas como DBU e butil lítio, porém sem sucesso.

Esquema 17. *Etapas da rota sintética alternativa à hidrólise clássica.*



Seguindo a proposta de Evans, uma alternativa a essa etapa inicial seria a formação de *N*-alquil-*N*-nitrosoamidas usando nitrito de sódio em excesso em uma solução de acetato de sódio e ácido acético (2:1) a 0°C por 16 h.¹³⁶ A reação novamente não foi bem sucedida (**Esquema 18**).

Esquema 18. *Síntese de N-alquil-N-nitrosoamidas.*

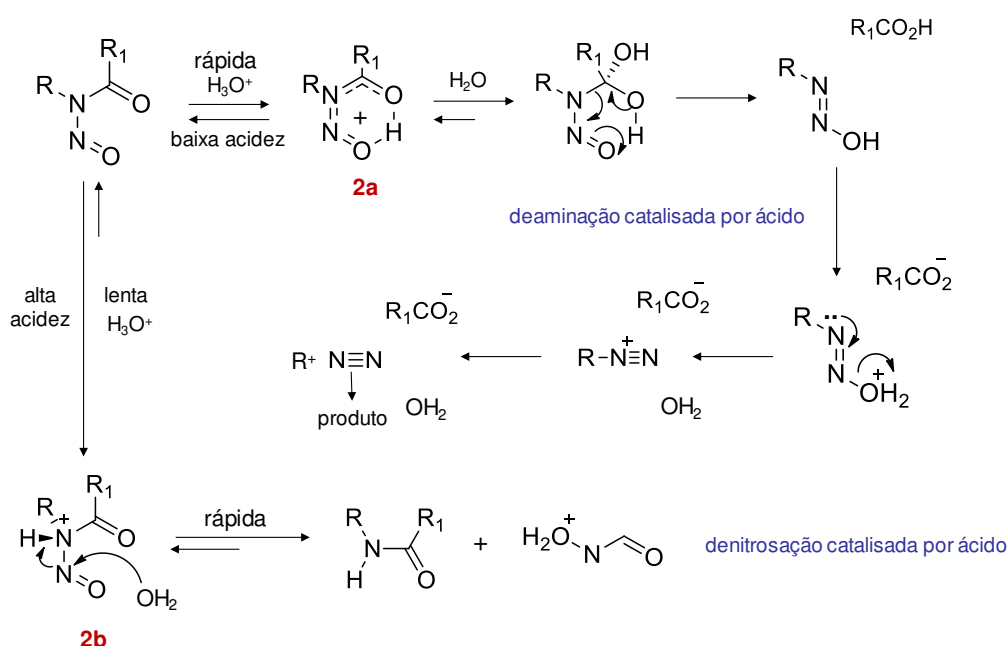


Uma possível explicação proposta por Darbeau em 2001¹³⁷ seria que em meio levemente ácido a protonação não ocorreria no nitrogênio amídico e sim no grupamento acil ou no oxigênio nitrosílico. A deaminação prosseguiria a partir da

espécie **2a** até a eliminação de uma molécula de nitrogênio. Se o meio estiver muito ácido a protonação poderia ocorrer no nitrogênio amídico como mostrado em **2b** resultando na sua decomposição rápida para formação de um equivalente de ácido nitroso e a correspondente amida (**Esquema 19**).

Em ambos os casos, o processo de *N*-nitrosação é prejudicado pela variação não ideal no pH, o que pôde justificar o insucesso da reação mostrado no **Esquema 18**.

Esquema 19. Decomposição dependente do pH para *N*-alquil-*N*-nitrosoamidas.



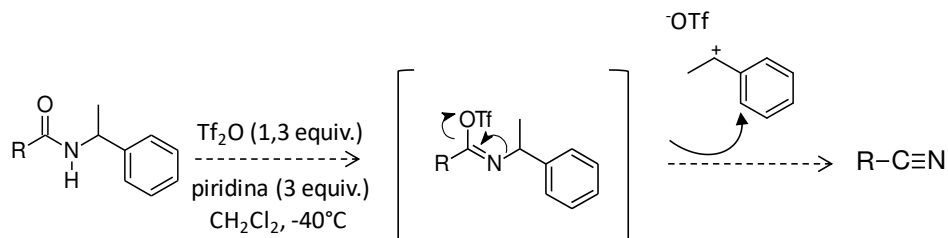
(fonte: modificada da referência 137)

Um interessante artigo publicado em 1998 mostra com eficiência a conversão direta (*one-pot*) de amidas secundárias para ésteres, utilizando anidrido trifílico, piridina e álcool, em baixas temperaturas e condições neutras de pH. Para amidas terciárias a reação ocorre em apenas uma etapa, porém no caso de amidas secundárias, especificamente para metilbenzil amidas, podem ocorrer reações paralelas tipo Retro-Ritter, com a formação de nitrilas (**Esquema 20**).¹³⁸

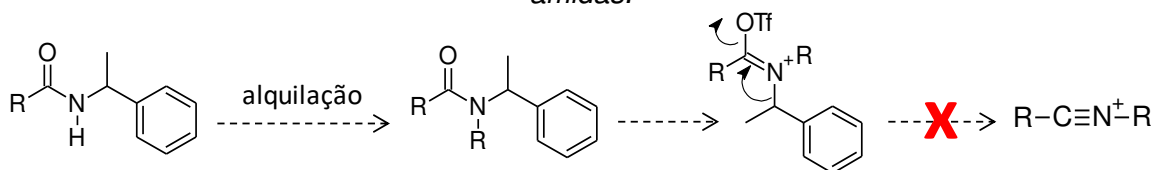
Uma alternativa a este mecanismo seria a conversão da amida secundária em uma terciária via alquilação, para em seguida, prosseguir a reação com o anidrido trifílico. A alquilação faz com que o cátion nitrilium formado seja muito instável e nas condições utilizadas (temperaturas baixas e pH próximo ao neutro) dificilmente

permanecerá em solução, formando necessariamente o éster desejado (**Esquema 21**).

Esquema 20. Fragmentação Retro-Ritter de metilbenzil amidas.

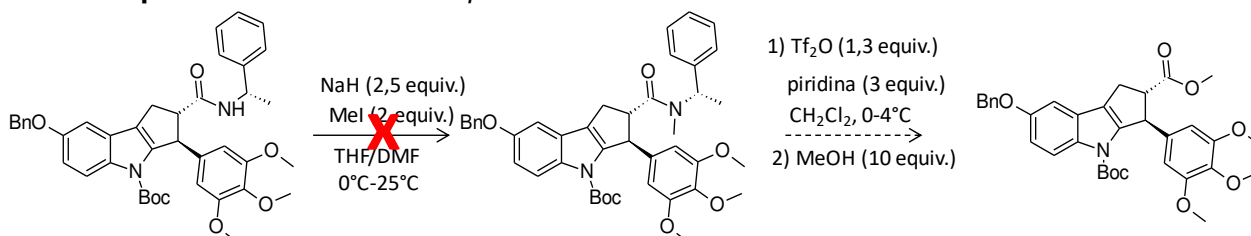


Esquema 21. Rota alternativa para prevenção da reação tipo Retro-Ritter em metilbenzil amidas.



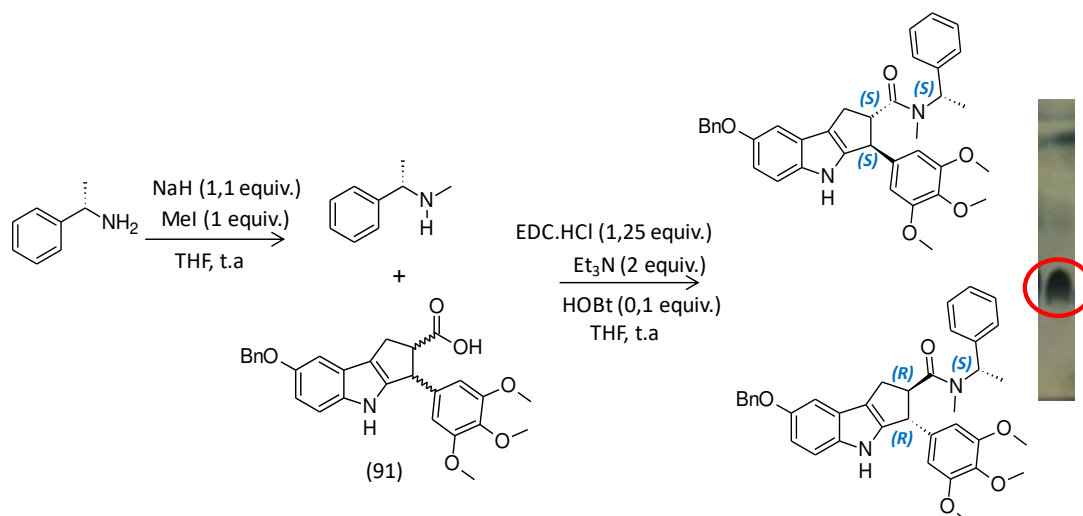
Seguindo esta proposta, reagiu-se a amida **103** (protegida com Boc no nitrogênio do indol) com NaH (2,5 equiv.) e MeI (2,0 equiv.) em uma solução de THF/DMF a temperatura ambiente, mas novamente não se obteve sucesso na reação, mesmo utilizando outras bases, como DBU e butil lítio (**Esquema 22**).

Esquema 22. Rota sintética para conversão da metilbenzil amida **103** em éster.



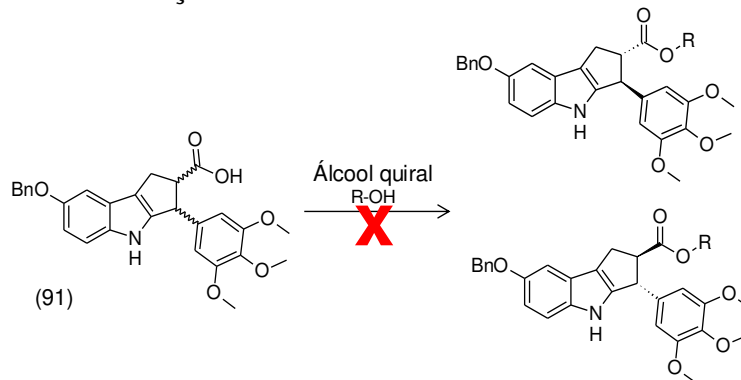
Devido a diversas tentativas sem sucesso de desproteção da amida, talvez ocasionado pelo impedimento estérico dos substituintes, optou-se pela metilação da (S)-(-)-(α)-metilbenzilamina antes do processo da resolução. Deste modo, a amina foi dissolvida em THF anidro e então adicionada em uma solução de NaH (1,1 equiv.) e MeI (1,0 equiv.) a temperatura ambiente sob agitação magnética e atmosfera de N₂. Após a metilação, reagiu-se a amina secundária com o ácido ciclopenta[*b*]indol **91** para a obtenção das amidas terciárias mostradas no **Esquema 23**. A reação foi bem sucedida, porém não se obteve sucesso na separação cromatográfica dos dois diastereomêros formados, visto que a mistura era vista como única mancha na cromatoplaca, mesmo após várias formas de eluição.

Esquema 23. Alquilação da (*S*)-(-)-(α)-metilbenzilamina seguida da reação com o ácido **91** para formação de amidas terciárias. Sistema de eluição para cromatoplaça (Hex:AcOEt, 8:2, 6x).



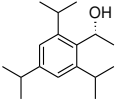
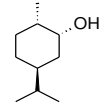
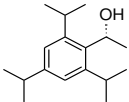
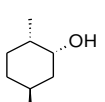
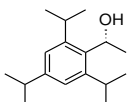
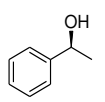
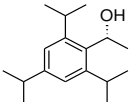
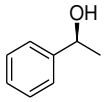
Diante das dificuldades encontradas no trabalho com a amina, optou-se pelo uso de um álcool quiral¹³⁹, dando início a rota sintética ilustrada no **Esquema 24**. Apesar da variedade de álcoois e condições testadas (**Tabela 18**), não se obteve êxito na formação do éster desejado a partir do ácido **91**.

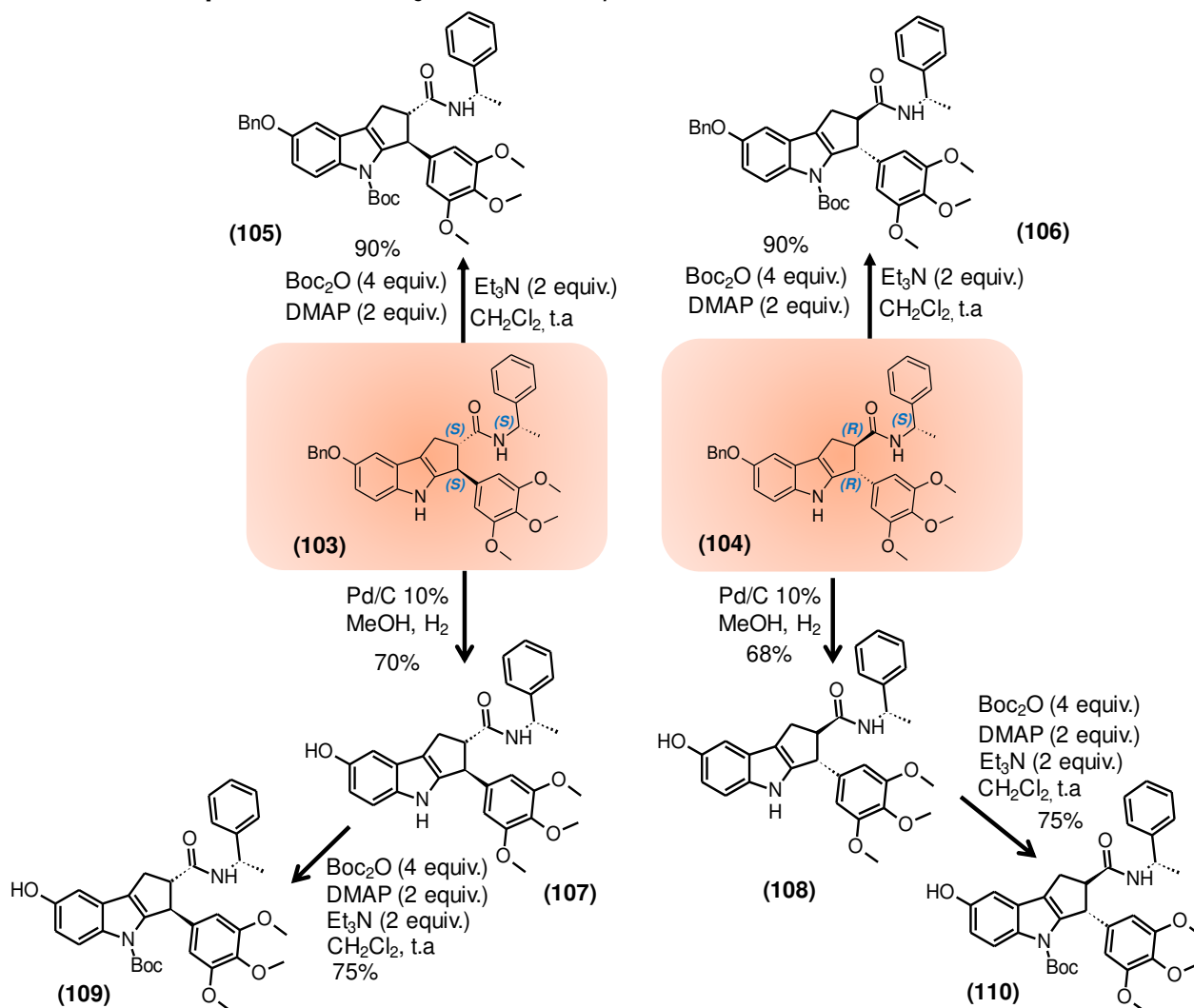
Esquema 24. Resolução da mistura racêmica **91** utilizando álcoois quirais.



Apesar dos insucessos obtidos com a resolução utilizando álcool e amina quiral, os produtos amídicos sintetizados possuem uma variedade estrutural interessante para serem submetidos a ensaios biológicos e bioquímicos. Deste modo e aproveitando os resultados, foram obtidas por meio de desproteção e adição do grupo Boc seis amidas estruturalmente diferentes, como é apresentado no **Esquema 25**.

Tabela 18. Condições utilizadas na resolução utilizando um álcool quiral.

Álcool quiral	Condições	Álcool quiral	Condições
 1,1 equiv.	EDC.HCl (1,25 equiv.), HOBT (0,1 equiv.), Et ₃ N (2 equiv.), THF	 4 equiv.	EDC.HCl (1,25 equiv.), HOBT (0,1 equiv.), Et ₃ N (2 equiv.), THF
 1 equiv.	EDC.HCl (2 equiv.), DMAP (0,5 equiv.), Et ₃ N (1 equiv.), THF:CH ₂ Cl ₂	 6 equiv.	DCC (1,2 equiv.), DMAP (1,2 equiv.), CH ₂ Cl ₂
 5 equiv.	DCC (1,2 equiv.), HOBT (1,2 equiv.), DMF	 2 equiv.	EDC.HCl (1,5 equiv.), DMAP (0,1 equiv.), Et ₃ N (1 equiv.), CH ₂ Cl ₂
 4 equiv.	DCC (1,2 equiv.), DMAP (1,2 equiv.), CH ₂ Cl ₂	 2 equiv.	CDI (1 equiv.), Et ₃ N (1 equiv.), CH ₂ Cl ₂

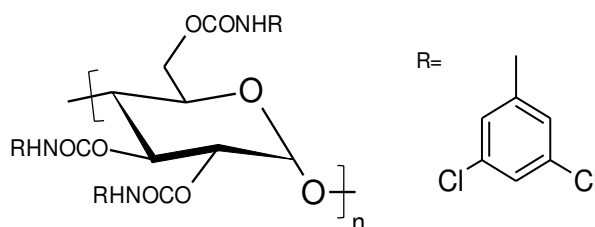
Esquema 25. Condições utilizadas para síntese de amidas **103-110**.

5.2.2. Resolução enantiomérica dos derivados ciclopenta[b]indólicos por meio da cromatografia quiral

Embora o início do processo de resolução, utilizando como agente quiral a amina (S)-(-)-(α)-metilbenzilamina, tenha sido realizado com sucesso (**Esquema 15**), a segunda etapa, que consistia na hidrólise do grupo amida, foi dificultada pela estabilidade do grupamento amídico secundário gerado. Da mesma forma ocorreu com a utilização de um álcool quiral, porém o insucesso se deu pela não formação do éster já na primeira etapa da resolução.

Uma solução encontrada foi realizar a separação por meio da cromatografia quiral em parceria com a Prof^a Quézia Bezerra Cass da UFSCar, utilizando como fase estacionária, derivados de fenilcarbamatos de amilose (**Figura 52**). Esse tipo de separação com derivados de polissacarídeos normalmente ocorre, pela interação entre os enantiômeros e os grupos carbamatos localizados no interior da estrutura helicoidal e também pelas interações π-π com os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente da cadeia polissacarídea.^{134,140}

Figura 52. Fase quiral derivada de fenilcarbamato de amilose utilizada para separação dos enantiômeros do composto **80**.

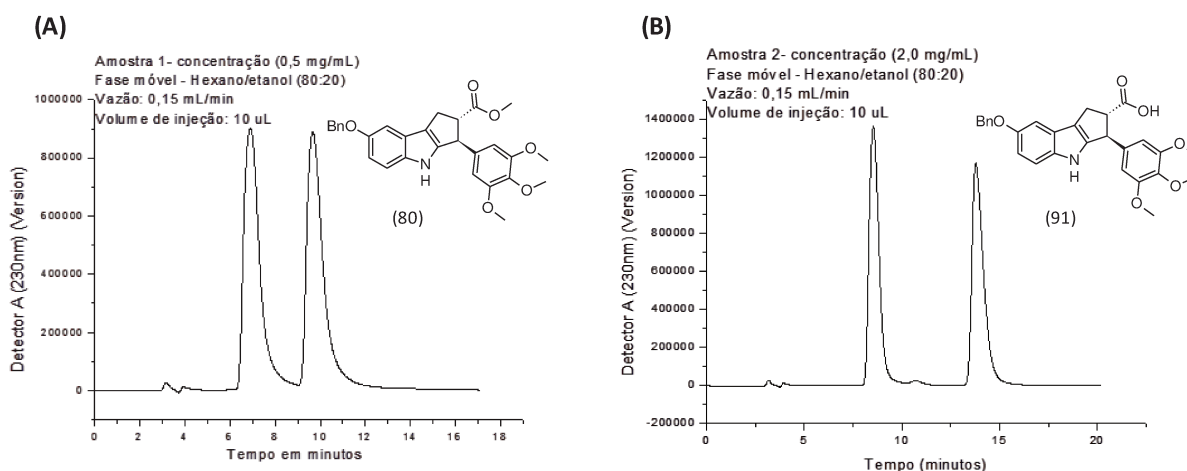


Assim, os compostos **80** (**Figura 53A**) e **91** (**Figura 53B**) foram utilizados para otimização da condição cromatográfica primeiramente em uma escala analítica, para em seguida, serem submetidos à separação em uma coluna semipreparativa. A melhor condição encontrada foi uma fase móvel de Hex:EtOH em proporção 8:2.

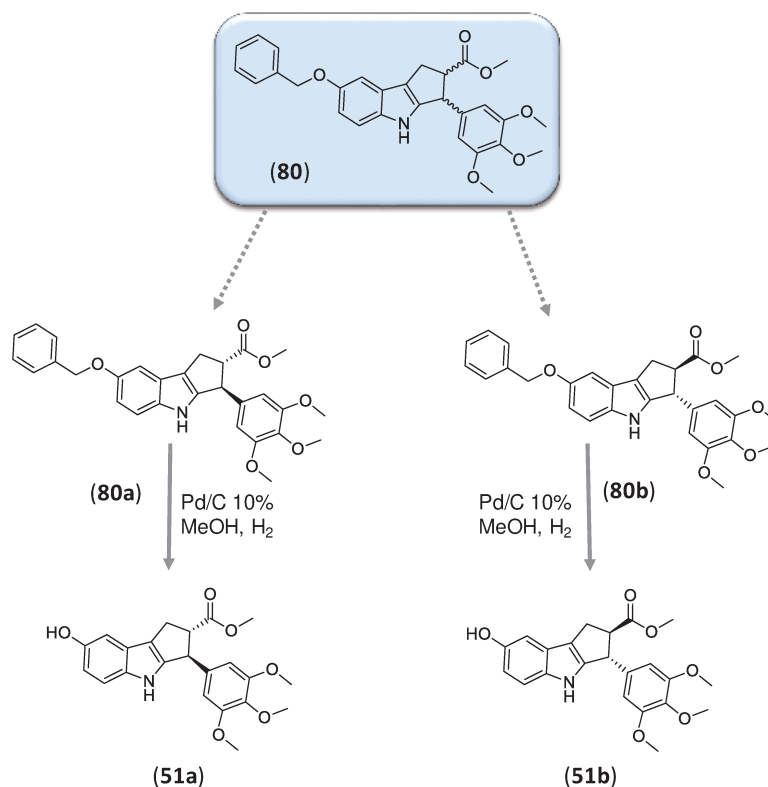
Como pode-se observar na **Figura 53**, a resolução foi obtida com um alto poder de discriminação quiral e uma boa separação cromatográfica. Ao final do processo para a mistura racêmica **80**, pôde-se obter uma quantidade de massa razoável (5,0 mg para o enantiômero **80a** e 6,0 mg para o enantiômero **80b**) para a etapa de desproteção do grupamento benzílico e realização dos ensaios bioquímicos e biológicos.

A desproteção do grupo benzil foi realizada utilizando Pd/C sob temperatura ambiente e atmosfera de H₂ (**Esquema 26**) e, após 2 h de reação, obtiveram-se os compostos enantiomericamente puros **51a** (3,0 mg) e **51b** (3,5 mg). Estes foram caracterizados por meio da análise dos espectros de RMN de ¹H, de RMN de ¹³C, de espectrometria de massas e por rotação óptica.

Figura 53. Separação cromatográfica analítica dos enantiômeros dos compostos (A) **80** e (B) **91**. Os cromatogramas foram realizados com uma coluna Chiralpak ID, fase móvel 8:2 (Hex:AcOEt) e λ=230 nm.



Esquema 26. Resolução do derivado indólico **80** para obtenção dos enantiômeros originais **51a** e **51b**. Os compostos foram obtidos como um óleo, e portanto, ainda não foi possível determinar a configuração absoluta de cada enantiômero. A representação foi feita de maneira aleatória.



5.3. Conclusão

Os enantiômeros *RR* e *SS* das duas substâncias mais potentes nos ensaios anticancerígenos (**49** e **51**) foram analisados por docagem utilizando os programas GOLD 5.1 e AutoDock (PDB 1SA0 e 4O2B). Os valores sugeriram que o enantiômero *SS* tem uma maior contribuição na atividade observada, sendo proposto o isolamento das duas substâncias quirais por resolução com uma amina e um álcool opticamente puros. Diversas metodologias foram aplicadas, porém não obteve-se sucesso em nenhuma delas. A separação foi obtida com sucesso por meio da cromatografia quiral, em que derivados de fenilcarbamatos de amilose, foram utilizados como fase estacionária, permitindo a separação e obtenção dos derivados ciclopenta[*b*]indólicos enantiomericamente puros **51a** e **51b**.

Esses resultados representam um importante passo na busca de um novo protótipo com atividade melhorada e baixa toxicidade, além de oferecer um caminho seguro para a indústria farmacêutica no que diz respeito aos ensaios clínicos e toxicológicos utilizando a mistura racêmica e os enantiômeros puros.

Como uma conclusão final, considerando o cenário mundial de alta incidência de câncer e fatores como resistência e diversidade fenotípica, os resultados obtidos neste trabalho foram bastante relevantes, pois permitiram ampliar o número de moléculas ativas no sítio da colchicina (**11**) com uma toxicidade quase nula, sendo portanto, um passo importante para o desenvolvimento de novos candidatos a agentes quimioterápicos contra o câncer.

6- Experimental



6. EXPERIMENTAL

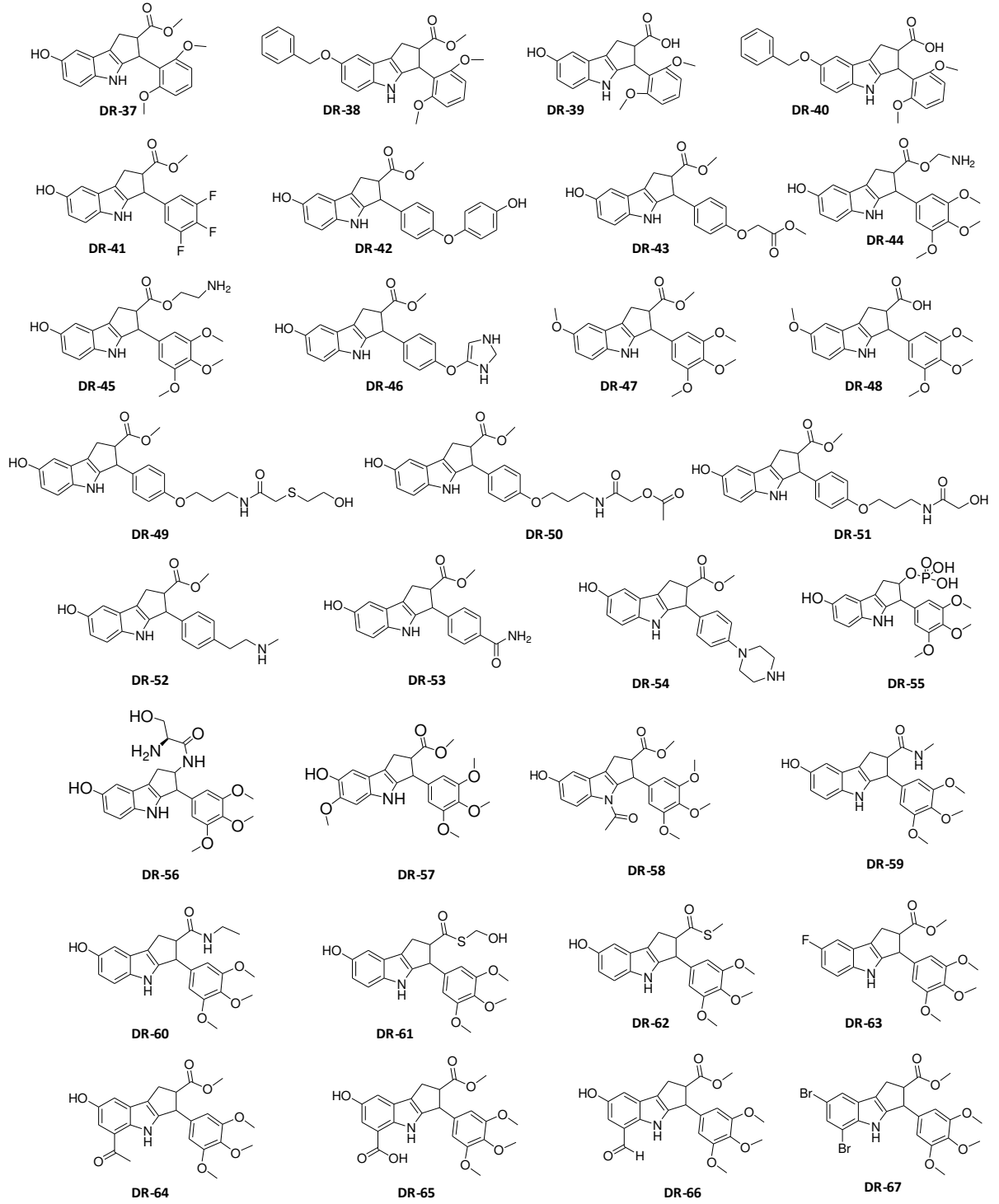
6.1. Parte experimental do tópico 4 “Planejamento, síntese e atividade biológica dos novos derivados ciclopenta[b]indólicos”

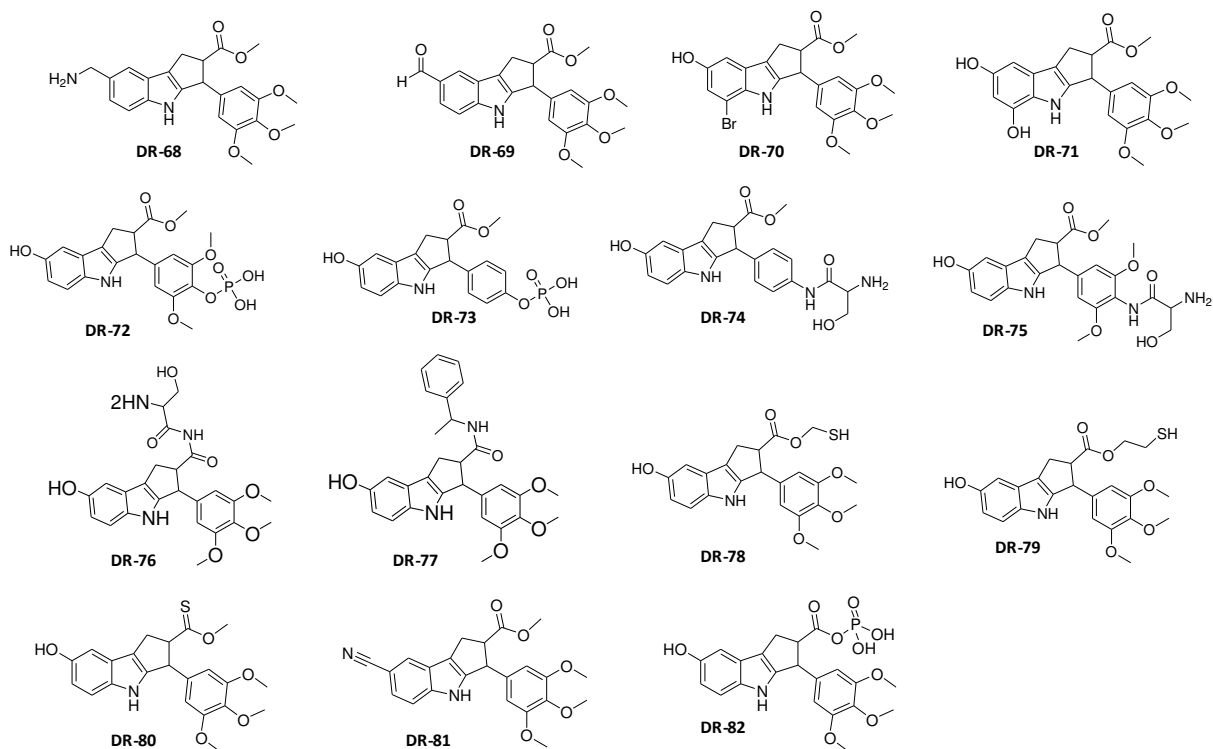
6.1.1. Estudos de docagem molecular

Todas as fases de construção, avaliação das moléculas de água, adição de átomos de hidrogênio, verificação de possíveis rotâmeros e tautômeros e análise das docagens foram feitas utilizando o conjunto de programas da plataforma SYBYL 8.0 (Tripos, St.Louis, USA) em computadores com o sistema operacional Linux Red Hat versão 3.4.6. As estruturas dos ligantes foram obtidas através do programa padrão de construção de moléculas do SYBYL 8.0. As conformações finais de cada molécula foram obtidas pela minimização de energia com otimização geométrica empregando o campo de força Tripos e o método de Powell. As cargas parciais de cada molécula foram calculadas a partir do método de Gasteiger-Hückel.

Para identificar o padrão correto de interações das substâncias avaliadas com o sítio de ligação foram utilizados três diferentes tipos de programas: GOLD 3.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre), SURFLEX (pacotes implementados no SYBYL 8.0) e AUTODOCK 3.0⁸¹.

O centro do local de ligação compreendeu um raio de 8 Å e a busca conformacional foi ajustada para fornecer 10 soluções para cada um dos compostos com a eficiência máxima de pesquisa (200%). A estrutura da colchicina (**11**) foi usada para validar a metodologia de ligação com um erro de 1.9 Å no método dos mínimos quadrados.





6.1.2. Síntese dos novos derivados ciclopenta[b]indólicos

Os aldeídos utilizados nas reações de MBH foram adquiridos comercialmente da Aldrich e os demais reagentes e solventes foram obtidos através das marcas Merck, Acros, Aldrich e/ou Fluka. Todos os solventes anidros foram tratados previamente, seguindo procedimentos específicos para cada tipo de solvente, imediatamente antes do uso. A trietilamina (Et_3N), o clorofórmio (CHCl_3) e o diclorometano (CH_2Cl_2) foram destilados sob hidreto de cálcio. O tetraidrofurano (THF) foi inicialmente destilado sob hidreto de cálcio e redistilado na presença de fitas de sódio metálico/benzofenona.

As reações foram realizadas sob agitação magnética em placas com aquecimento da marca Coming ou Fisaton. Para as reações sensíveis à umidade e ao oxigênio, a vidraria foi seca em estufa a $150\text{ }^\circ\text{C}$, resfriada em dessecadores contendo sílica gel e então expostas a atmosfera de nitrogênio, em balão previamente flambado.

As purificações dos produtos foram realizadas em coluna de sílica gel 60-230 μ (Merck) e o acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatoplaças Merck, utilizando solução reveladora de fosfomolibdato de amônio 5% em etanol e lâmpada de UV.

As caracterizações por espectroscopia de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram realizados nos espectrofotômetros Varian Inova 500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C) ou Bruker Avance DPX 250 (250 MHz para ^1H e 62,5 MHz para ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) utilizando o sinal padrão do tetrametilsilano (TMS) em $\delta=0$ para o ^1H e ^{13}C ou o sinal do clorofórmio deuterado (CDCl_3) em $\delta=7,27$ para o ^1H e $\delta=77,0$ para o ^{13}C . A constante de acoplamento (J) foi dada em Hertz (Hz).

Os espectros no infravermelho (IV) foram adquiridos no aparelho Thermo Nicolet 6700 FT-IR (modo ATR - amostra pura ou solução), no qual as amostras foram aplicadas como filme, diretamente sobre o cristal de germânio entre 4.000 e 650 cm^{-1} (resolução de 8.0) ou em um aparelho Thermo Scientific com as amostras aplicadas em uma pastilha de KBr.

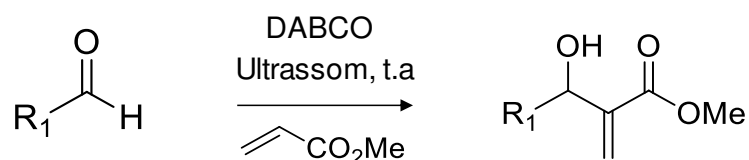
Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro de massas Waters XEVO Q-TOF (ESI) e em um espectrômetro de massas Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS.

Os pontos de fusão foram medidos nos equipamentos Electrothermal 9100 ou Perkin Elmer 341.

A rotação óptica ($[\alpha]_D^{20}$) dos compostos foi medida no polarímetro Perkin Elmer 341 em uma concentração de $1\text{g}/100\text{mL}$.

A nomenclatura dos compostos foi feita utilizando-se o programa MarvinSketch 5.5.0.1. correspondendo à nomenclatura oficial da IUPAC.

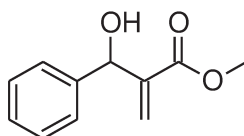
6.1.2.1. Procedimento geral de preparação dos adutos de MBH



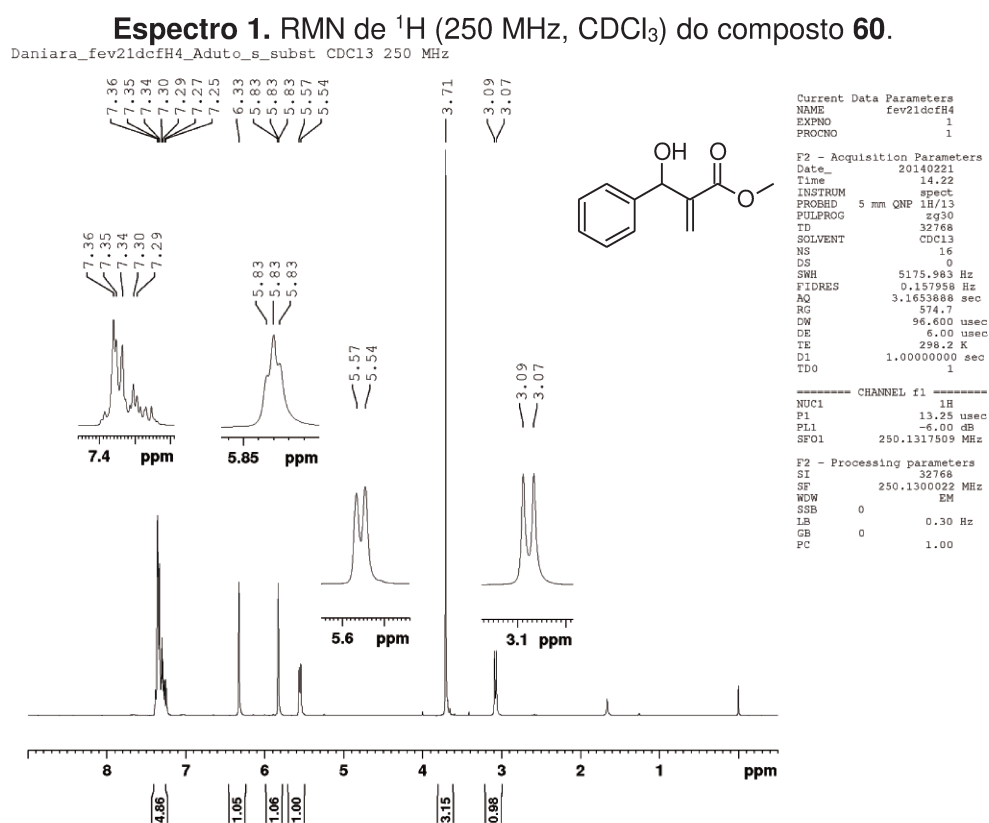
O aldeído de partida (10 a 30 mmol) foi dissolvido em um balão com acrilato de metila (5 equiv.) e DABCO (0,65 equiv.). A reação foi submetida ao ultrassom e o avanço foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD). Após o término da reação, o excesso da mistura de acrilato de metila foi evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi redissolvido em acetato de etila (30 mL) e a fase orgânica foi extraída com solução saturada de cloreto de sódio (50 mL). A fase

orgânica foi separada, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada em papel de filtro e concentrada sob pressão reduzida. Os produtos **60-65** foram submetidos à purificação por coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (80:20).

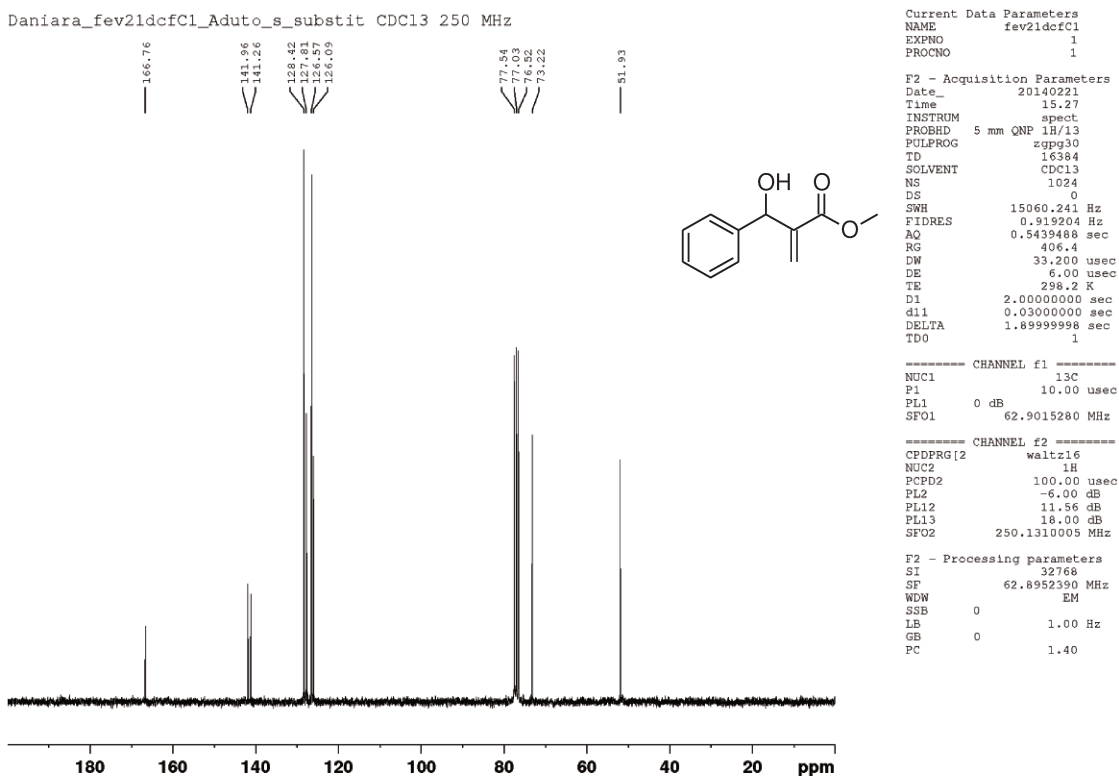
Composto 60: 2-[hidróxi(fenil)metil]prop-2-enoato de metila



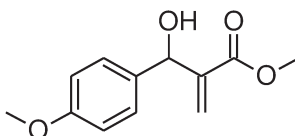
Rendimento: 91%; **Característica:** óleo viscoso incolor; **IV (filme):** 3428, 3032, 1683, 1156 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,08 (d, $J=5,5$ Hz, 1H); 3,71 (s, 3H); 5,56 (d, $J=5,3$ Hz, 1H); 5,83 (t, $J=1,1$ Hz, 1H); 6,33 (s, 1H); 7,29-7,36 (m, 5H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 51,9; 73,2; 126,1; 126,6; 127,8; 128,4; 141,3; 142,0; 166,8.



Espectro 2. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto **60.**



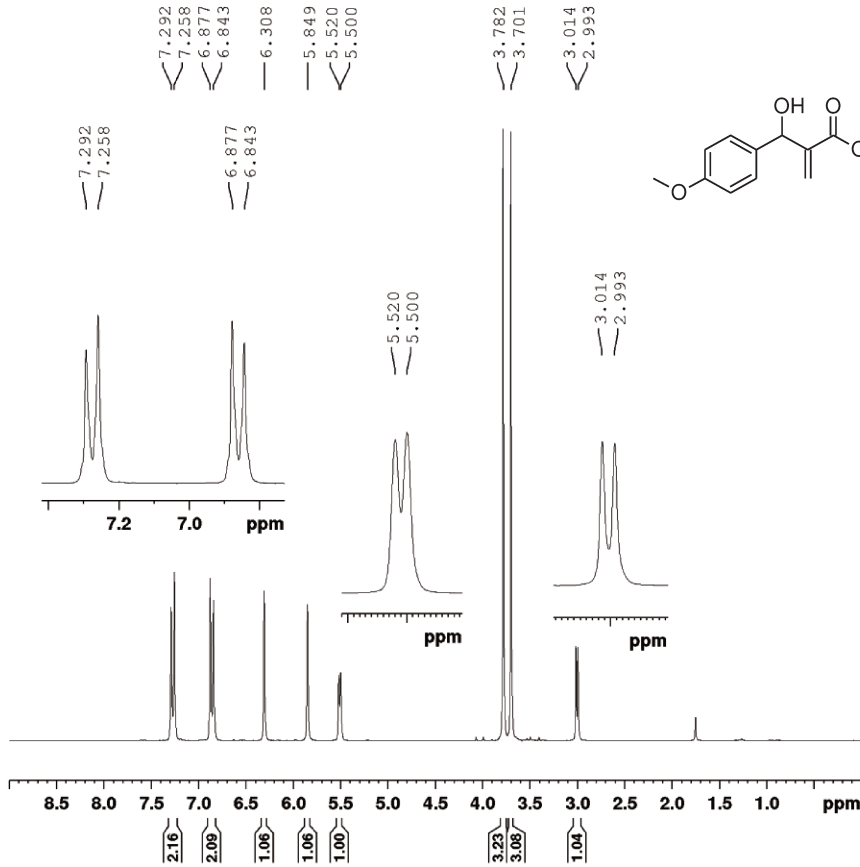
Composto 61: 2-[hidroxi(4-metóxfenil)metil]prop-2-enoato de metila



Rendimento: 70%; **Característica:** sólido branco; **IV (filme):** 3480, 2950, 2835, 1721, 1149, 830 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,00 (d, $J=5,3$ Hz, 1H); 3,70 (s, 3H); 3,78 (s, 3H); 5,51 (d, $J=5,0$ Hz, 1H); 5,85 (s, 1H); 6,31 (s, 1H); 6,86 (d, $J=8,5$ Hz, 2H); 7,28 (d, $J=8,5$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 51,9; 55,2; 72,7; 113,8; 125,5; 127,9; 133,5; 142,2; 159,2; 166,8; **P.F:** 62°C.

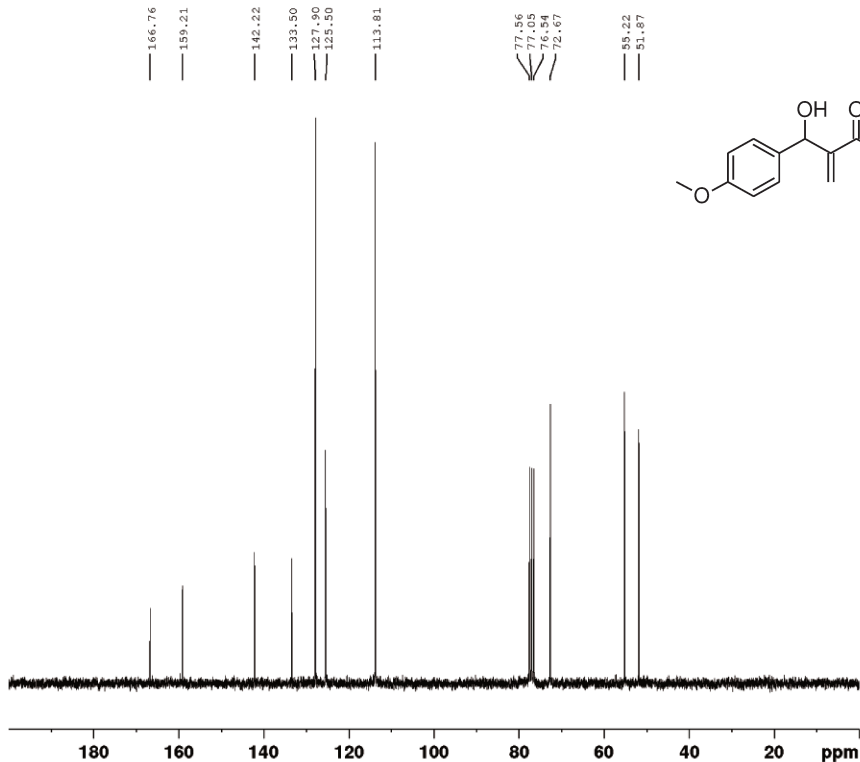
Espectro 3. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 61.

ago06dcfH2_Aduto p-metox_Daniara ClC13 250 MHz

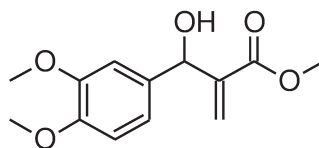


Espectro 4. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 61.

ago06dcfC2_Aduto p-metox_Daniara ClC13 250 MHz



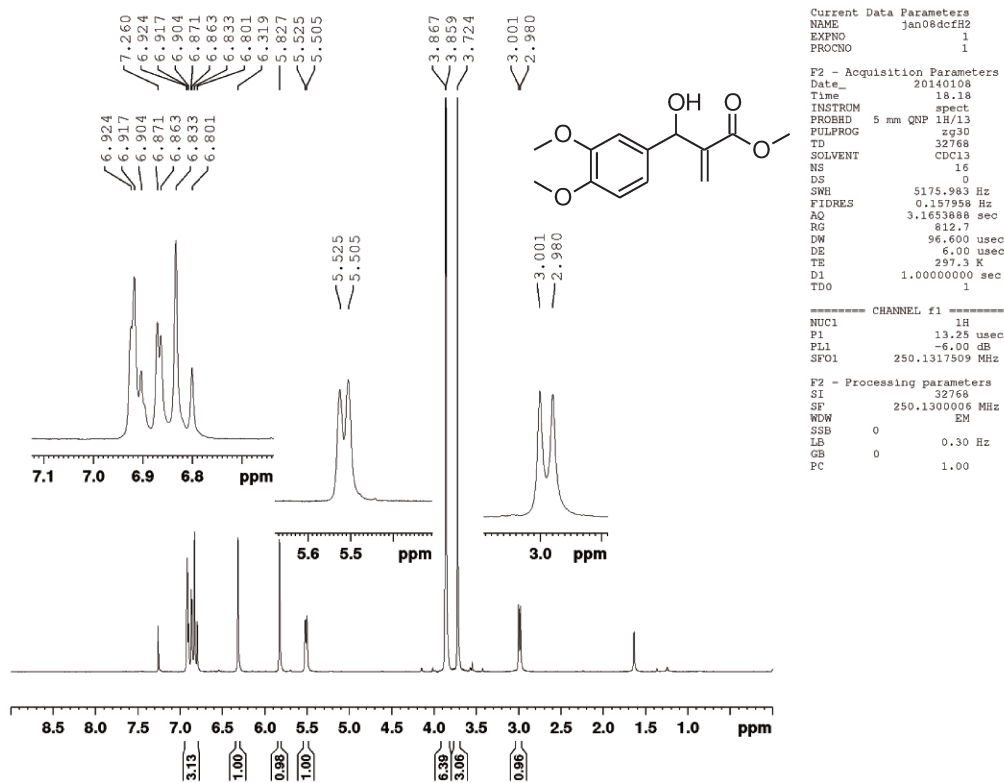
Composto 62: 2-[(3,4-dimetoxifenil)(hidróxi)metil]prop-2-enoato de metila

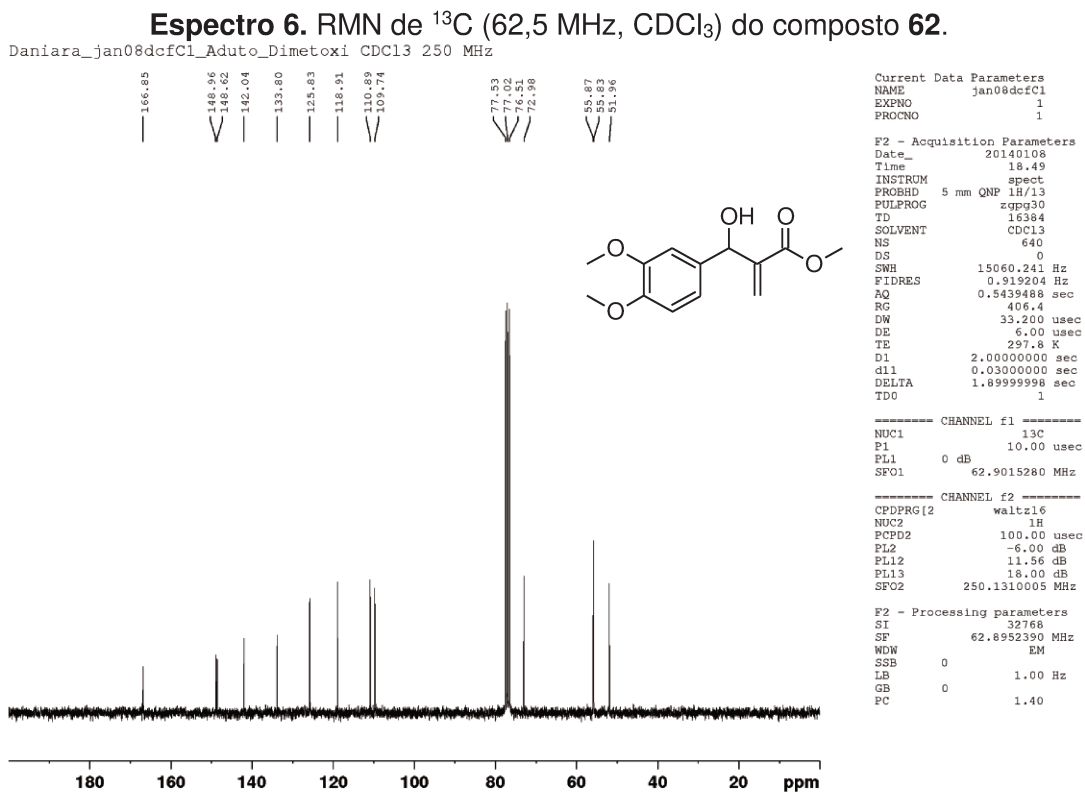


Rendimento: 70%; **Característica:** óleo amarelo claro; **IV (filme):** 3447, 2954, 1717, 1261, 815; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 2,99 (d, $J=5,3$ Hz, 1H); 3,72 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 3,87 (s, 3H); 5,52 (d, $J=5,0$ Hz, 1H); 5,83 (s, 1H); 6,32 (s, 1H); 6,80-6,92 (m, 3H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 52,0; 55,8; 55,9; 73,0; 109,7; 110,9; 118,9; 125,8; 133,8; 142,0; 148,6; 149,0; 166,9.

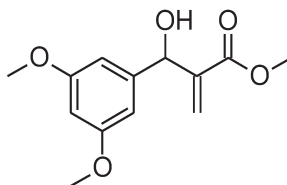
Espectro 5. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 62.

Daniara_jan08dcfH2_Aduto_Dimetoxi CDCl_3 250 MHz





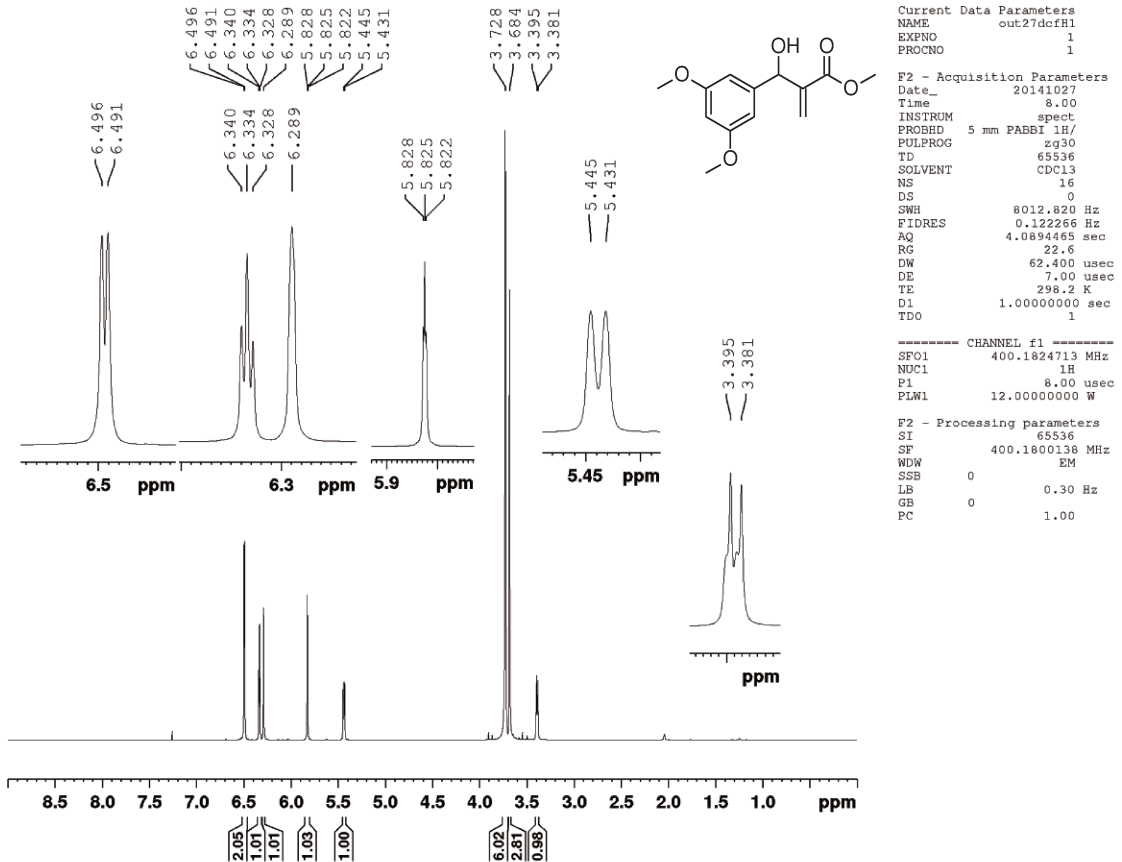
Composto 63: 2-[(3,5-dimetoxifenil)(hidróxi)metil]prop-2-enoato de metila



Rendimento: 70%; **Característica:** óleo amarelo claro; **IV (filme):** 3448, 1630, 1090 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 3,39 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H); 3,68 (s, 3H); 3,73 (s, 6H); 5,44 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H); 5,82 (m, 1H); 6,29 (s, 1H); 6,33-6,34 (m, 1H); 6,49 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 51,9; 55,3; 72,9; 99,7; 104,6; 126,2; 141,8; 143,9; 160,8; 166,8.

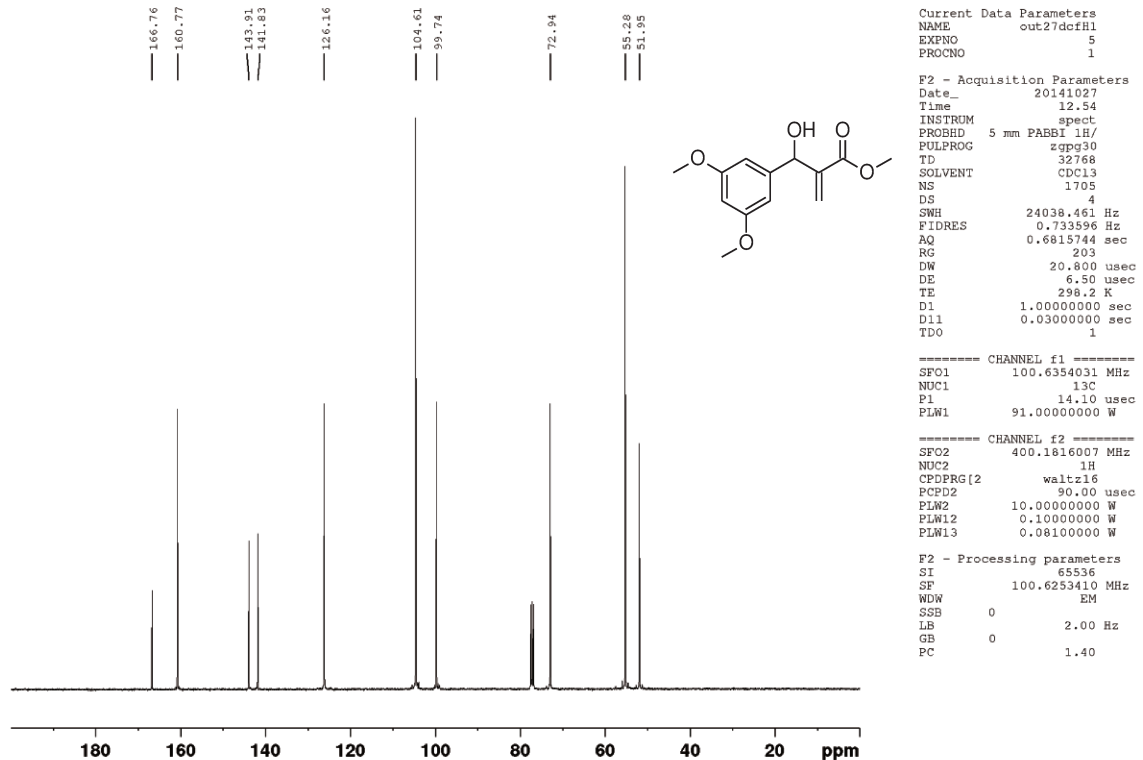
Espectro 7. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **63**.

Daniara - Aduto 3.5 Dimetoxi - CDCl_3 - Avance 400 MHz - out27dcfH1 - ^1H

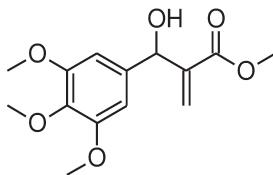


Espectro 8. RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **63**.

Daniara - Aduto 3.5 Dimetoxi - CDCl_3 - Avance 400 MHz - out27dcfH1 - ^{13}C



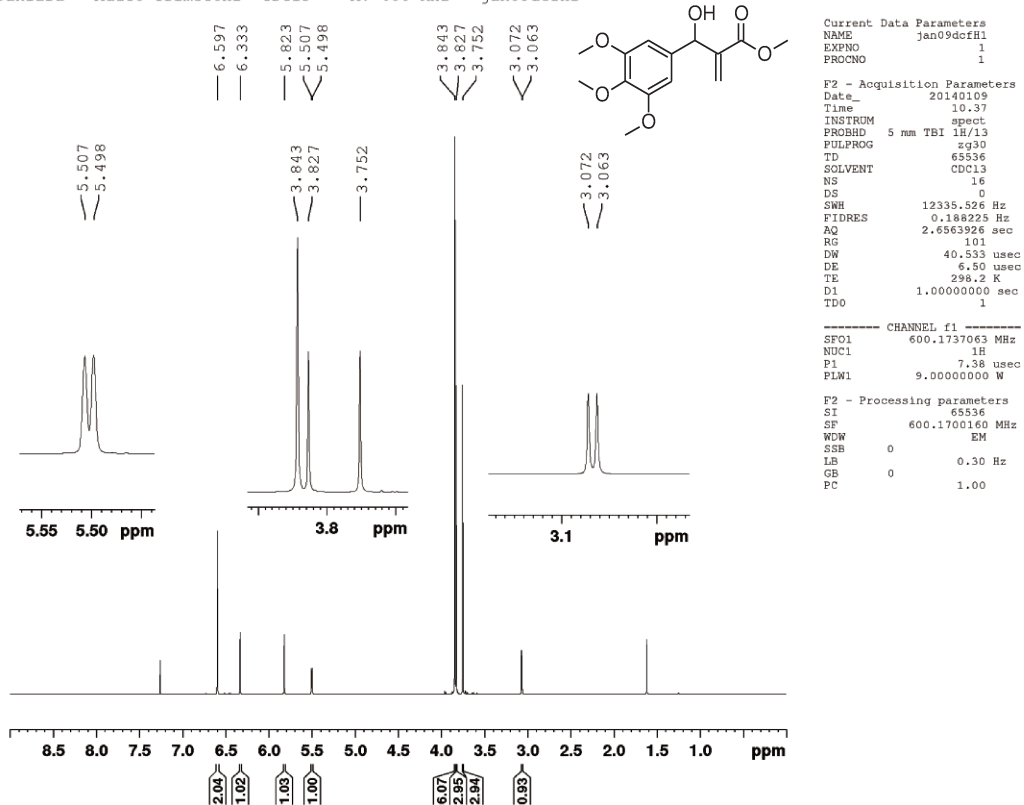
Composto 64: 2-[(3,4,5-trimetoxifenil)(hidróxi)metil]prop-2-enoato de metila

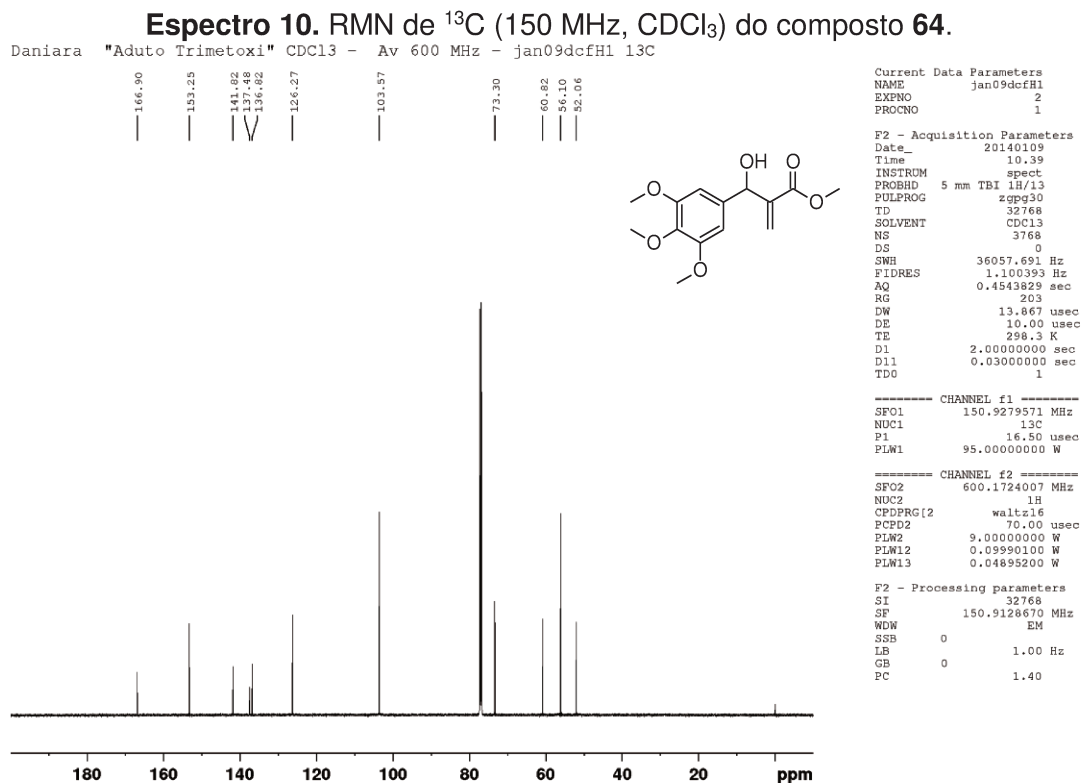


Rendimento: 73%; **Característica:** óleo amarelo claro; **IV (filme):** 3445, 2941, 2839, 1728, 1462, 1228, 1058, 817 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3):** δ 3,07 (d, $J= 5,4$ Hz, 1H); 3,75 (s, 3H); 3,83 (s, 3H); 3,84 (s, 6H); 5,50 (d, $J= 5,4$ Hz, 1H); 5,82 (s, 1H); 6,33 (s, 1H); 6,60 (s, 2H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3):** δ 52,1; 56,1; 60,8; 73,3; 103,6; 126,3; 136,8; 137,5; 141,8; 153,3; 166,9.

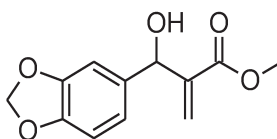
Espectro 9. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 64.

Daniara "Aduto Trimetoxi" CDCl_3 - Av 600 MHz - jan09dcfH1



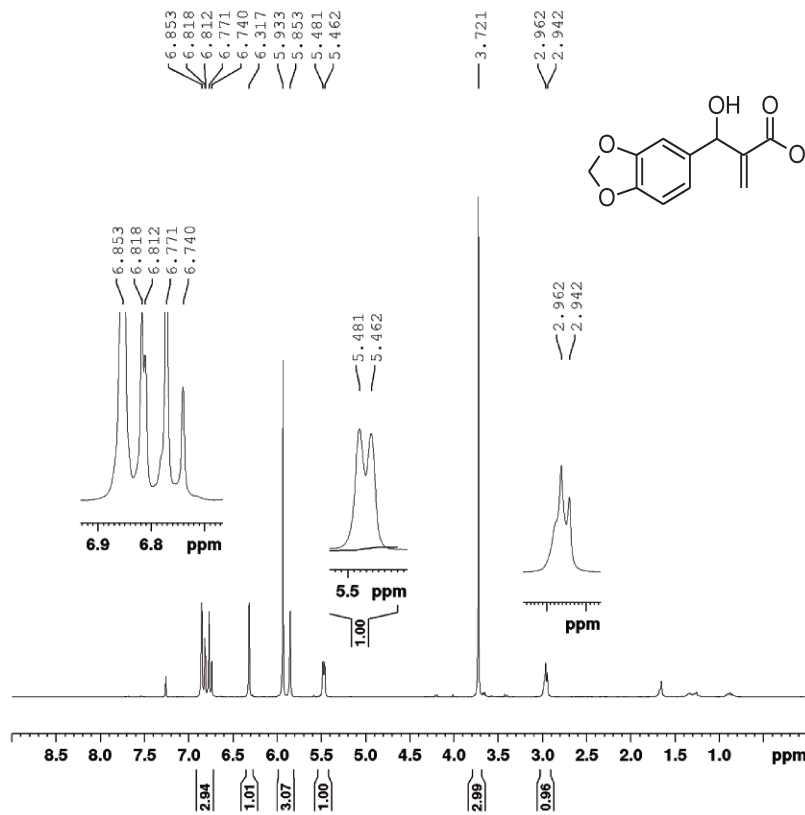


Composto 65: 2-[(2H-1,3-benzodioxol-5-il)(hidróxi)metil]prop-2-enoato de metila



Rendimento: 65%; **Característica:** óleo incolor; **IV (filme):** 3449, 2901, 1719, 1629, 1441, 1248, 1038, 815 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 2,95 (d, $J= 5,0$ Hz, 1H); 3,72 (s, 3H); 5,47 (d, $J= 4,8$ Hz, 1H); 5,85 (s, 1H); 5,93 (s, 2H); 6,32 (s, 1H); 6,74-6,85 (m, 3H). **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 51,9; 72,9; 101,1; 107,2; 108,1; 120,2; 125,8; 135,3; 142,0; 147,2; 147,7; 166,7.

Espectro 11. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto **65**.

ago23dcfH4 Aduto piperonal ClCl_3 250 MHz

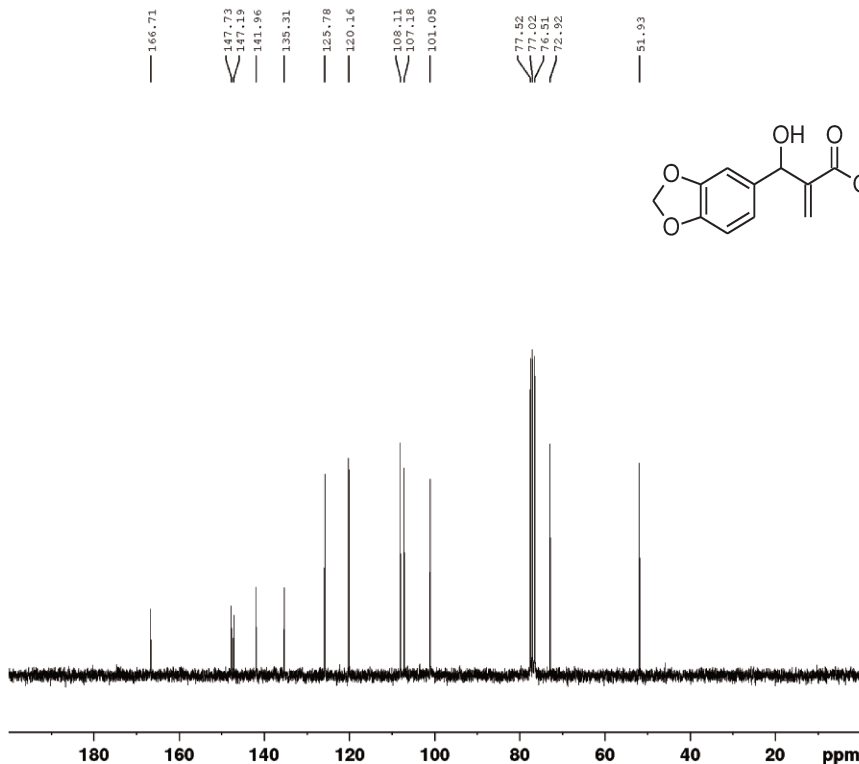
Current Data Parameters
 NAME ago23dcfH4
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130823
 Time 15.37
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl_3
 NS 16
 DS 0
 SWH 5175.983 Hz
 FIDRES 0.157958 Hz
 AQ 3.1653888 sec
 RG 645.1
 DW 96.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 13.25 usec
 PLL -6.00 dB
 SFO1 250.1317509 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 250.1300005 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 12. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto **65**.

ago23dcfC1 Aduto piperonal ClCl_3 250 MHz

Current Data Parameters
 NAME ago23dcfC1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

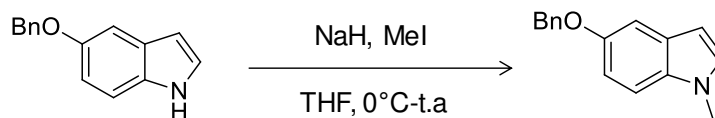
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130823
 Time 16.04
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 16384
 SOLVENT CDCl_3
 NS 52
 DS 0
 SWH 15060.241 Hz
 FIDRES 0.919204 Hz
 AQ 0.5439488 sec
 RG 574.7
 DW 33.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PL1 0 dB
 SFO1 62.9015280 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG[2] waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PL12 11.56 dB
 PL13 18.00 dB
 SFO2 250.1310005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 62.8952390 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

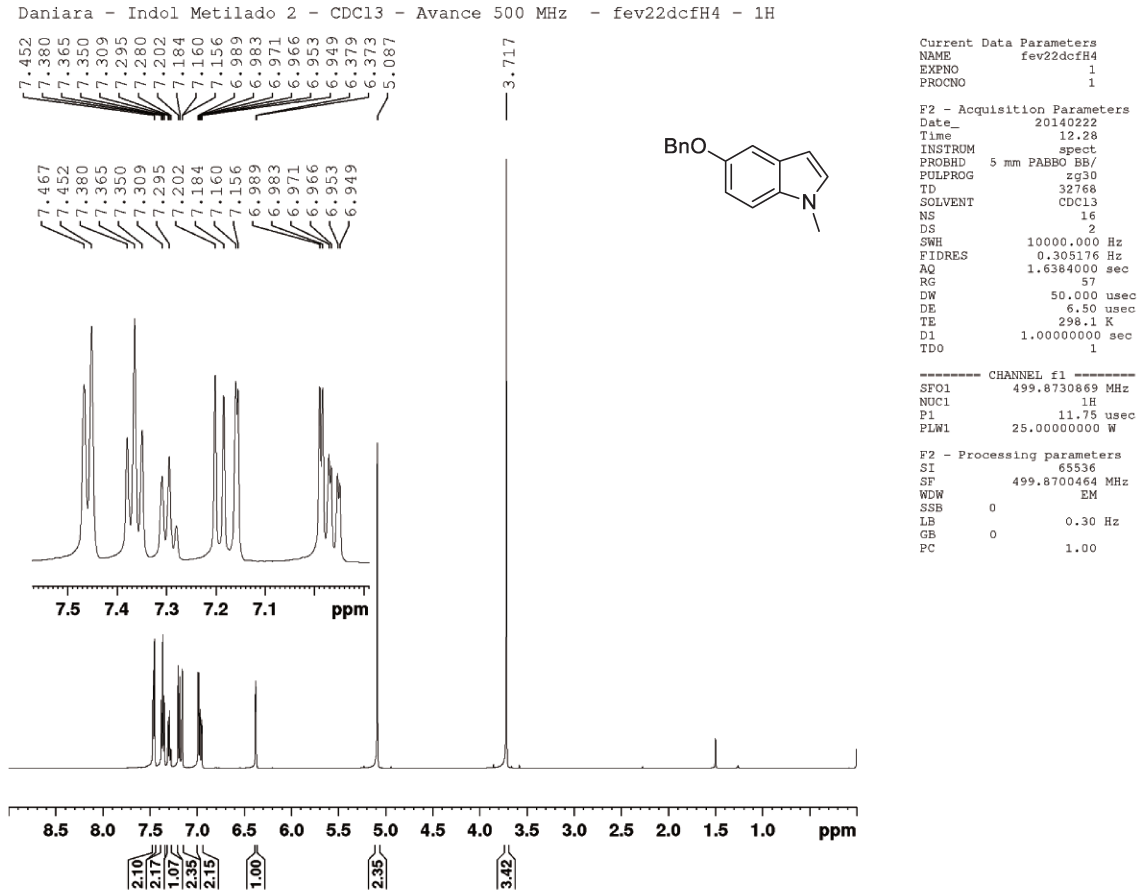
6.1.2.2. Procedimento para preparação do indol metilado: 5-(benzilóxi)-1-metil-1H-indol



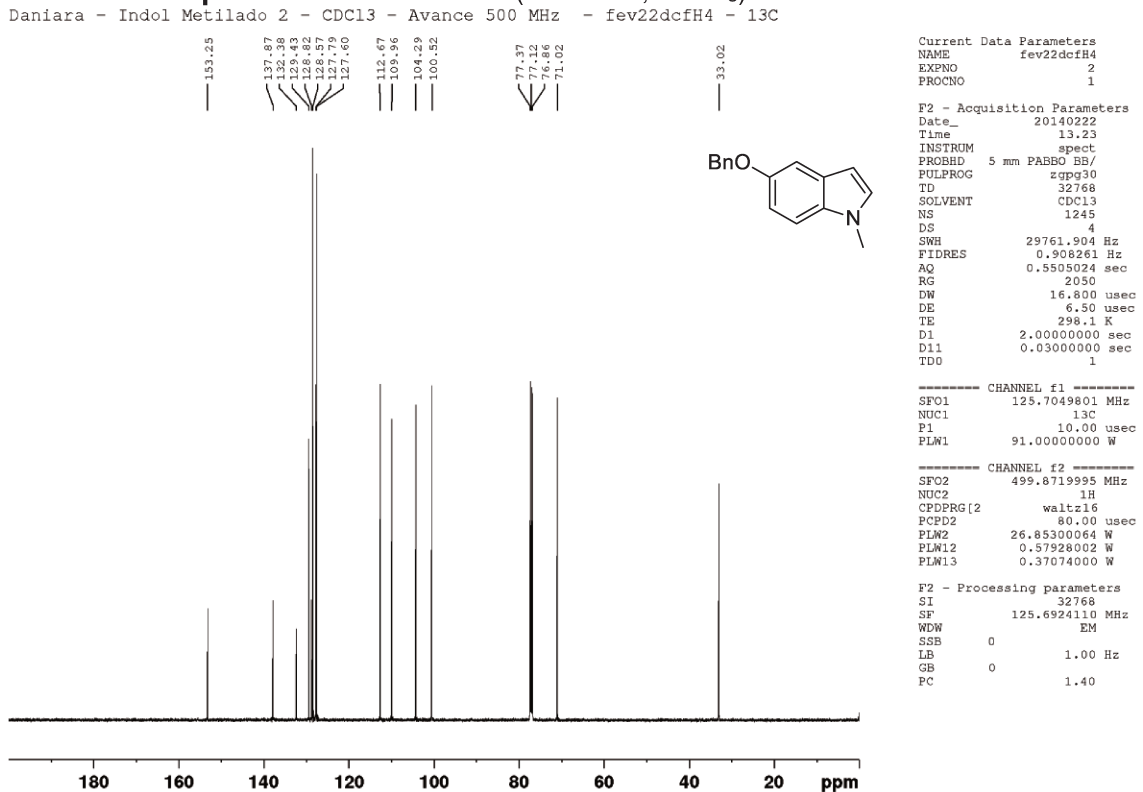
A uma solução do indol comercial (50 equiv.) em THF anidro (50 mL) foi adicionado NaH (75 equiv., 60% dispersão em óleo mineral) a uma temperatura de 0°C. A mistura foi deixada por 15 min e após a temperatura chegar a temperatura ambiente, a mesma foi mantida sob agitação magnética por mais 1 hora. A mistura foi tratada com iodeto de metila (67 equiv.) a uma temperatura de 0°C e deixada sob agitação magnética por 30 min. O solvente foi evaporado e o bruto foi dissolvido em uma solução saturada de NH₄Cl (200 mL) e extraída com acetato de etila (3 x de 50 mL). A fase orgânica foi seca sob Na₂SO₄ anidro e o solvente foi retirado sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (90:10).

Tempo reacional: 2 h; **Rendimento:** 80%; **Característica:** sólido amarelo; **IV (filme):** 1491, 1235, 1150, 800, 722, 696; **RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃):** δ 3,72 (s, 3H); 5,09 (s, 2H); 6,37 (d, *J*= 3,0 Hz, 1H); 6,96 (dd, *J*= 9,0 e 2,5 Hz, 1H); 6,98 (d, *J*= 3,0 Hz, 1H); 7,16 (d, *J*= 2,2 Hz, 1H); 7,19 (d, *J*= 8,7 Hz, 1H); 7,28-7,47 (m, 5H); **RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃):** δ 33,0; 71,0; 100,5; 104,3; 110,0; 112,7; 127,6; 127,8; 128,6; 128,8; 129,4; 132,4; 137,9; 153,3; **P.F:** 115°C.

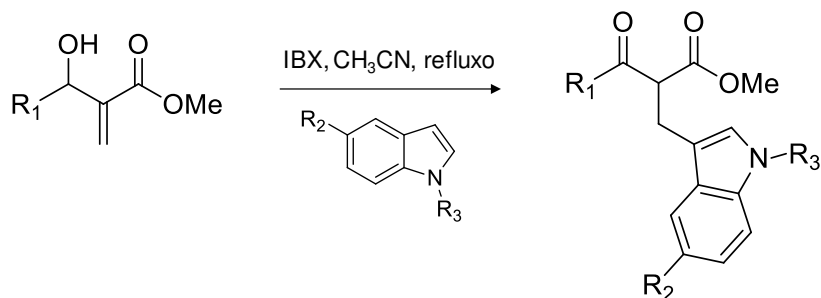
Espectro 13. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do indol metilado.



Espectro 14. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do indol metilado.

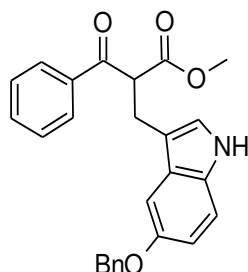


6.1.2.3. Procedimento geral de preparação dos β -cetoésteres



Os adutos de MBH **60-65** (1 equiv.) foram dissolvidos em acetonitrila (5 mL) e em seguida 1,2 equiv. de ácido 2-iodóxi-benzóico (IBX) foram adicionados à solução. A mistura resultante foi refluxada sob agitação magnética a 70°C durante 8-14h. O monitoramento foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD). Ao término da reação, a mesma foi resfriada a temperatura ambiente, filtrada em papel filtro e concentrada sob pressão reduzida. Os produtos **68-75** foram purificados em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (80:20).

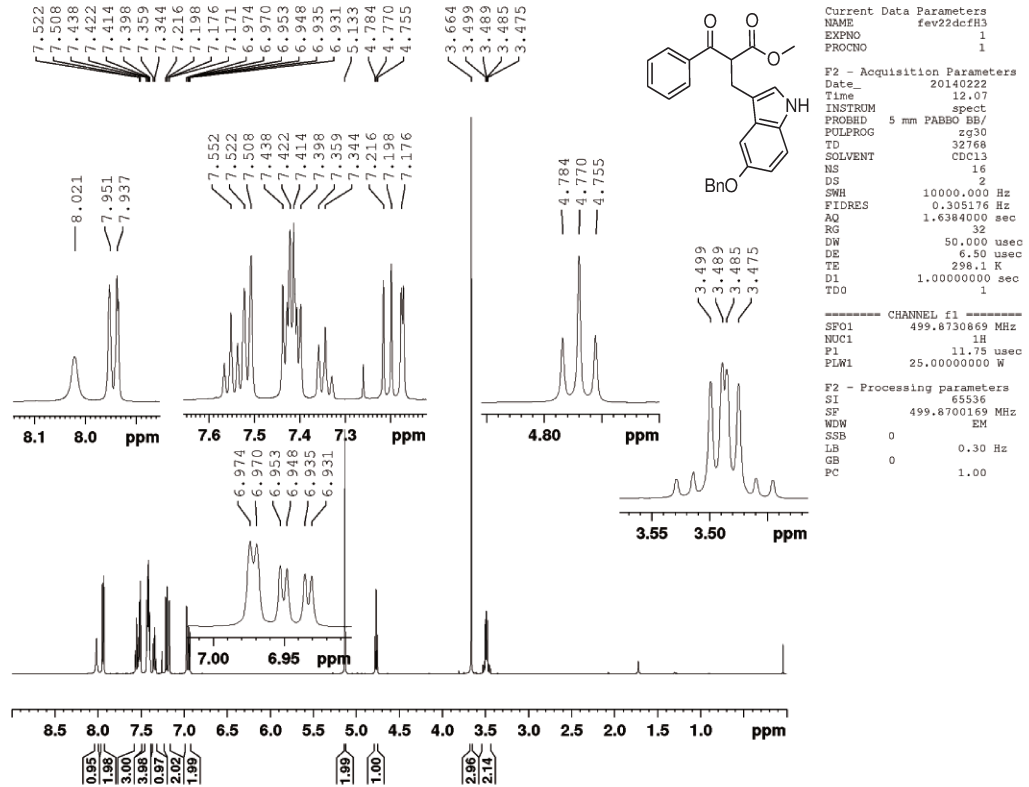
Composto 68: 2-[[5-(benzilóxi)-1H-3-il]metil]-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila



Tempo reacional: 5 h; **Rendimento:** 55%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3428, 3032, 2951, 1683, 1456, 1022, 797; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,48 (m, 2H), 3,66 (s, 3H); 4,77 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 5,13 (s, 2H); 6,94 (dd, $J = 2,5$ e 9,0 Hz, 1H); 6,97 (d, $J = 2,0$, 1H); 7,17 (d, $J = 2,5$, 1H); 7,20 (d, $J = 9,0$, 1H); 7,34–7,55 (m, 8H); 7,94 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 8,02 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 24,8; 52,5; 54,6; 70,9; 102,0; 112,0; 112,1; 112,9; 123,7; 127,5; 127,6; 127,8; 128,5; 128,6; 128,7; 131,5; 133,5; 136,2; 137,6; 153,2; 170,2; 195,2; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 436,1525, encontrado: 436,1573.

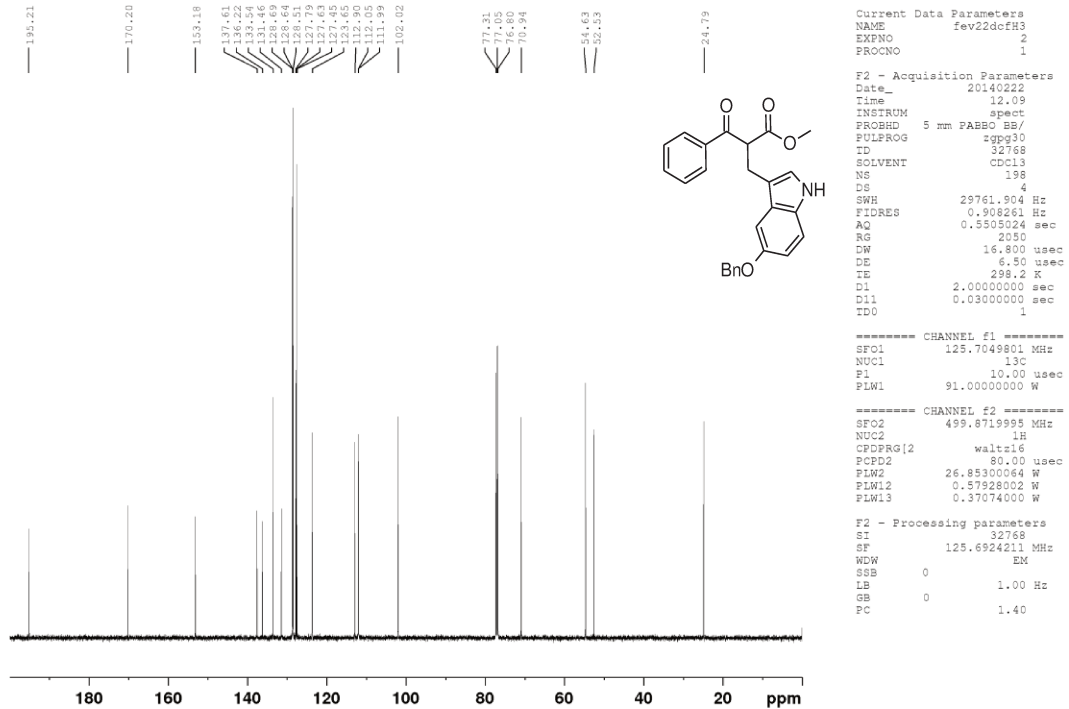
Espectro 15. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 68.

Daniara - IBX Aduto S/Substit - CDCl_3 - Avance 500 MHz - fev22dcfH3 - 1H

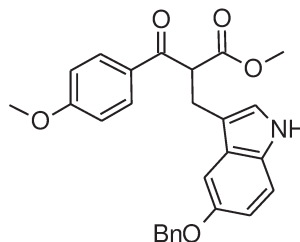


Espectro 16. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 68.

Daniara - IBX Aduto S/Substit - CDCl_3 - Avance 500 MHz - fev22dcfH3 - 13C



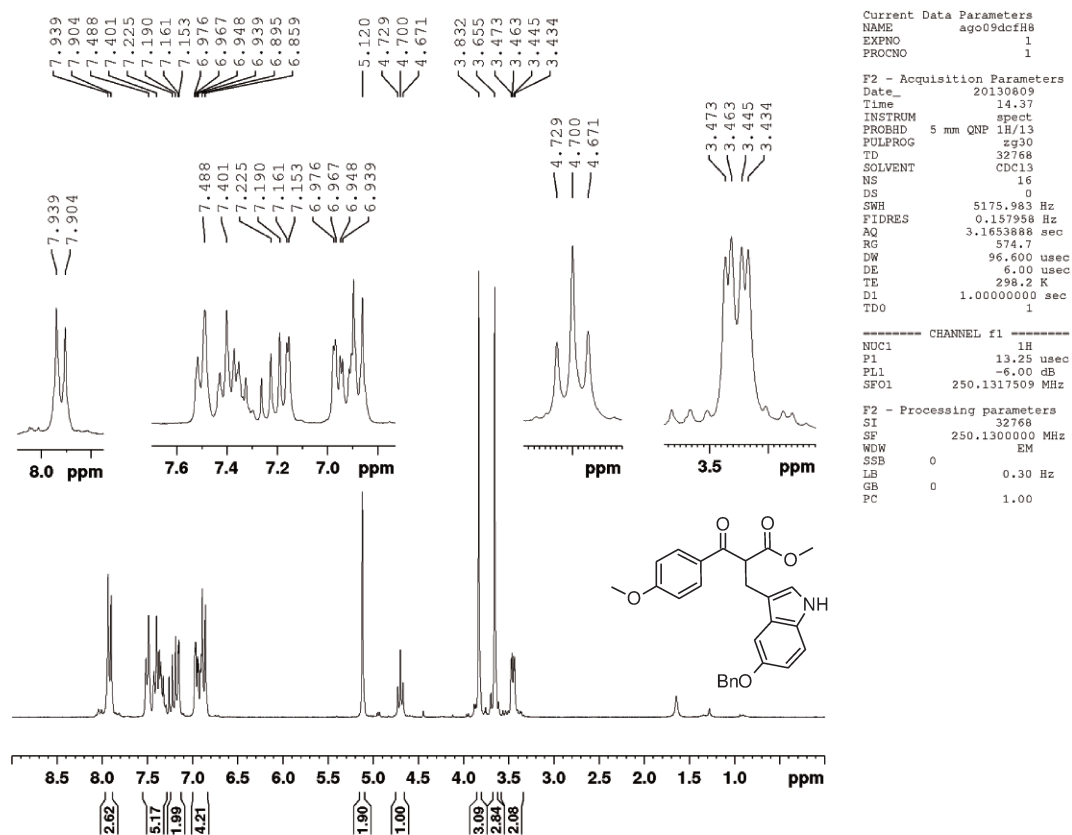
Composto 69: 2-[[5-(benzilóxi)-1H-indol-3-il]metil]-3-(4-metoxifenil)-3-oxopropanoato de metila

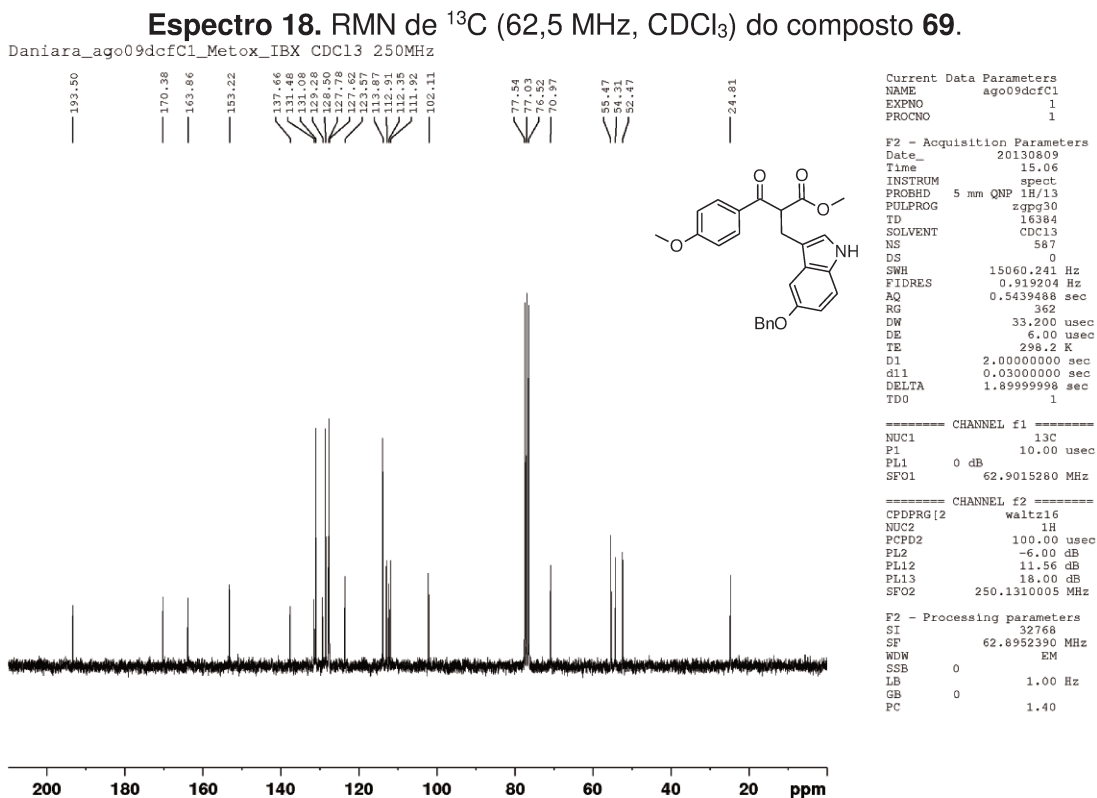


Tempo reacional: 8 h; **Rendimento:** 72%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3410, 1736, 1673, 1265, 1175, 737 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,45 (dd, $J = 2,5$ e $7,3$ Hz, 2H); 3,66 (s, 3H); 3,83 (s, 3H); 4,70 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H); 6,86–6,98 (m, 4H); 7,15–7,49 (m, 7H); 7,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 24,8; 52,5; 54,3; 55,5; 71,0; 102,1; 111,9; 112,4; 112,9; 113,9; 123,6; 127,6; 127,8; 128,5; 129,3; 131,1; 131,5; 137,7; 153,2; 163,9; 170,4; 193,5; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 466,1630, encontrado: 466,1633.

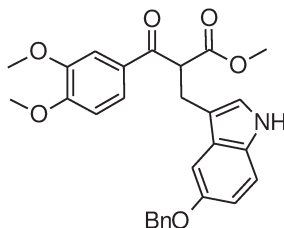
Espectro 17. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 69.

Daniara_ago09dcfH8_Metox_IBX CDCl_3 250MHz





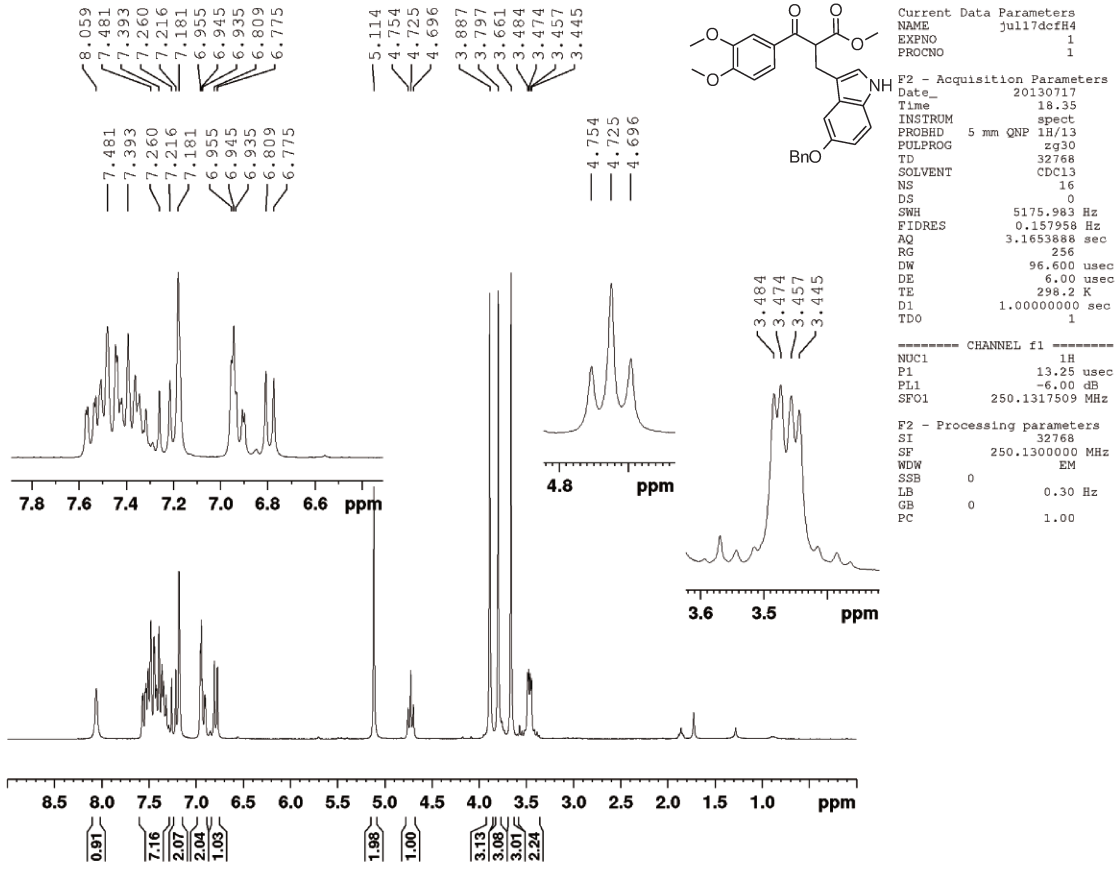
Composto 70: 2-[[5-(benzyloxi)-1H-indol-3-il]metil]-3-(3,4-dimetoxifenil)-3-oxopropanoato de metila



Tempo reacional: 8 h; Rendimento: 53%; Característica: óleo marrom; IV (filme): 3245, 1736, 1675, 1440 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,46 (dd, $J = 2,5$ e 6,8 Hz, 2H); 3,66 (s, 3H); 3,80 (s, 3H); 3,89 (s, 3H); 4,73 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 5,11 (s, 2H); 6,79 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 6,94-6,96 (m, 2H); 7,18-7,48 (m, 9H); 8,06 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 25,0; 52,5; 54,2; 55,8; 56,1; 71,0; 102,2; 110,1; 110,7; 112,0; 112,1; 112,8; 123,5; 123,7; 127,5; 127,6; 127,8; 128,5; 129,5; 131,6; 137,6; 149,1; 153,2; 153,7; 170,4; 193,8; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 496,1731, encontrado: 496,1727.

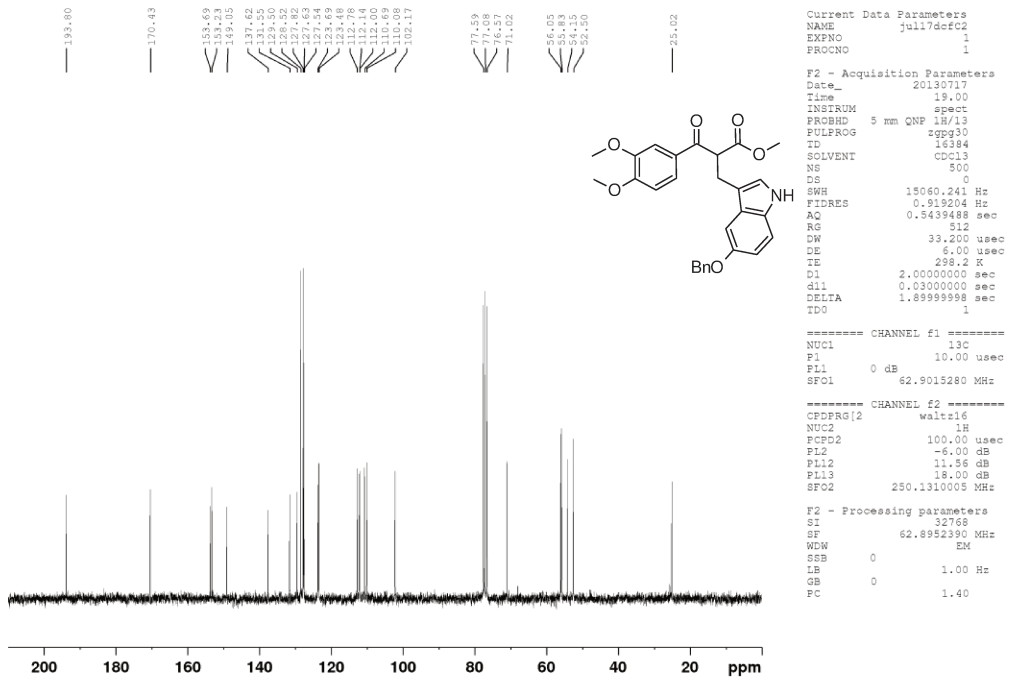
Espectro 19. RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto 70.

Daniara_IBX_Dimetox_jul17dcfH4_CDCl3 250MHz

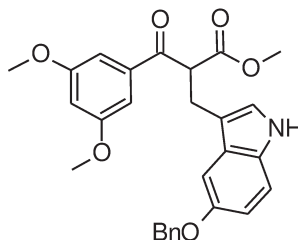


Espectro 20. RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do composto 70.

Daniara_IBX_Dimetox_jul17dcfC2_CDCl3 250MHz



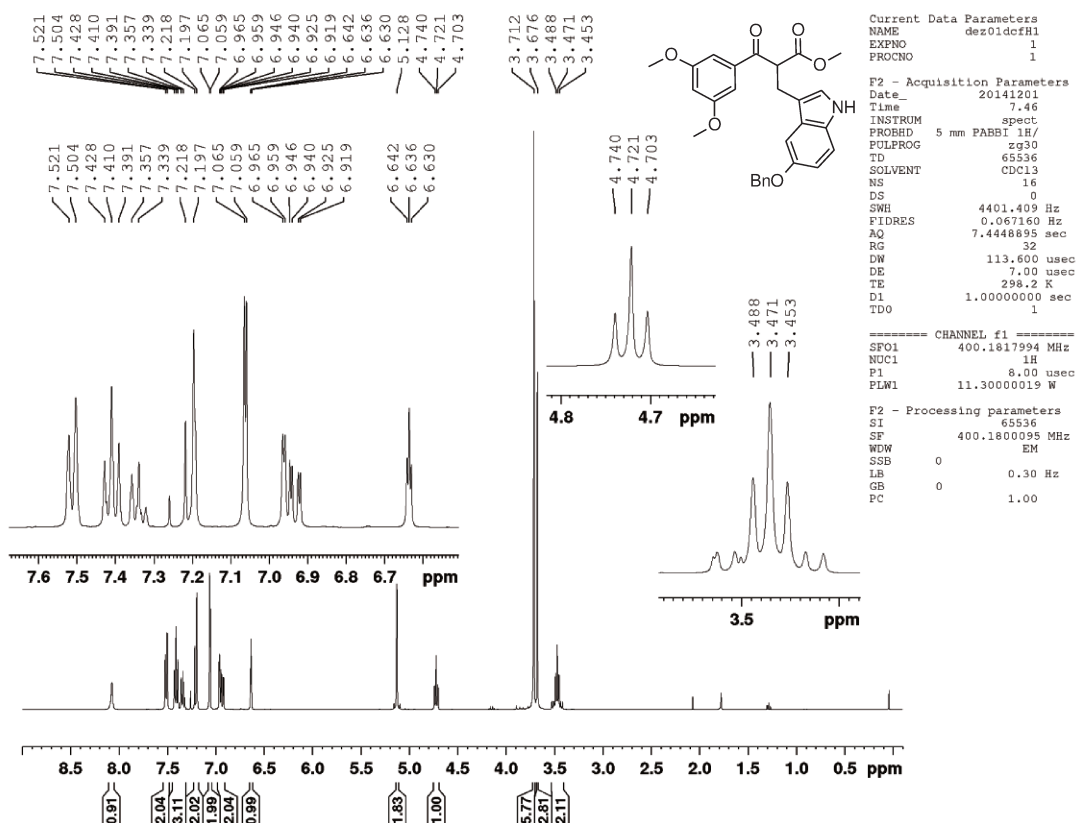
Composto 71: 2-[[5-(benzilóxi)-1H-indol-3-il]metil]-3-(3,5-dimetoxifenil)-3-oxopropanoato de metila

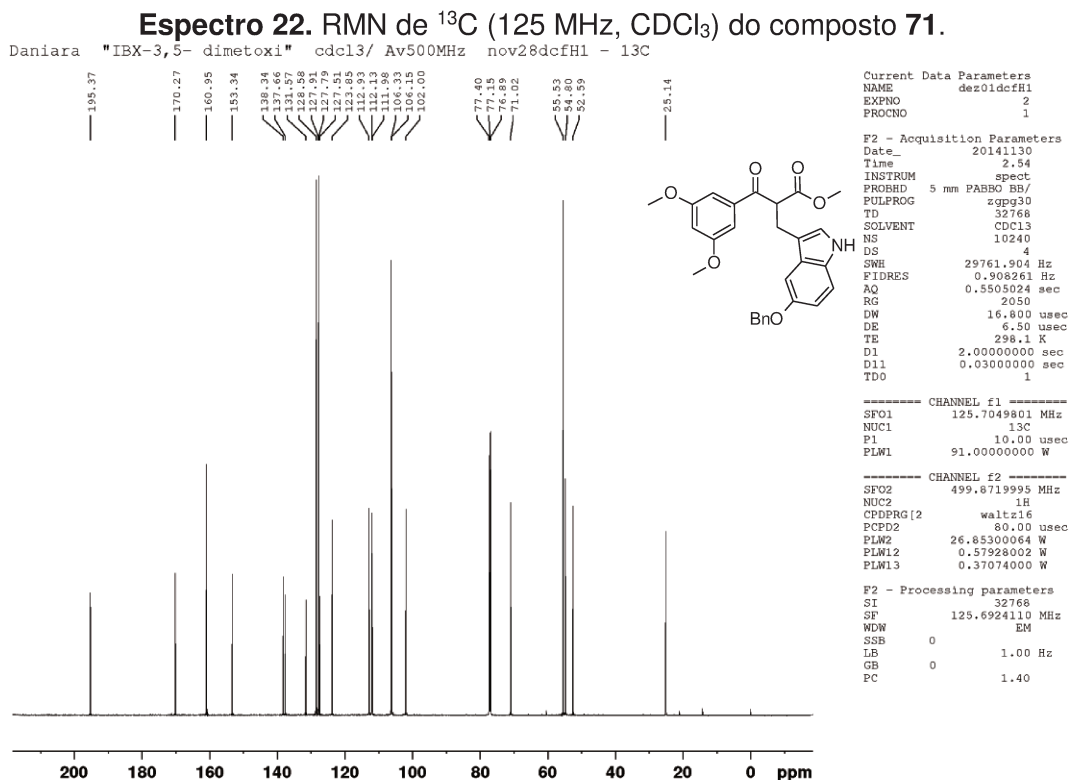


Tempo reacional: 4 h; **Rendimento:** 75%; **Característica:** óleo marrom; **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 3,45-3,49 (m, 2H); 3,68 (s, 3H); 3,71 (s, 6H); 4,72 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 5,13 (s, 2H); 6,64 (m, 1H); 6,93 (dd, $J = 2,4$ e 8,4 Hz, 1H); 6,96 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,06 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H); 7,20-7,52 (m, 7H); 8,10 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 25,1; 52,6; 54,8; 55,5; 71,0; 102,0; 106,2; 106,3; 112,0; 112,1; 112,9; 123,9; 127,5; 127,8; 127,9; 128,6; 131,6; 137,7; 138,3; 153,3; 161,0; 170,3; 195,4.

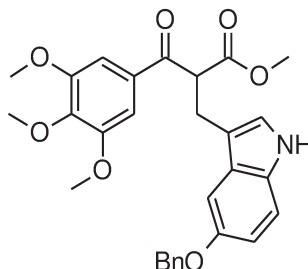
Espectro 21. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 71.

Daniara - IBX 3.5 Dimetoxi - CDCl_3 - Avance 400 MHz - dez01dcfH1 - 1H





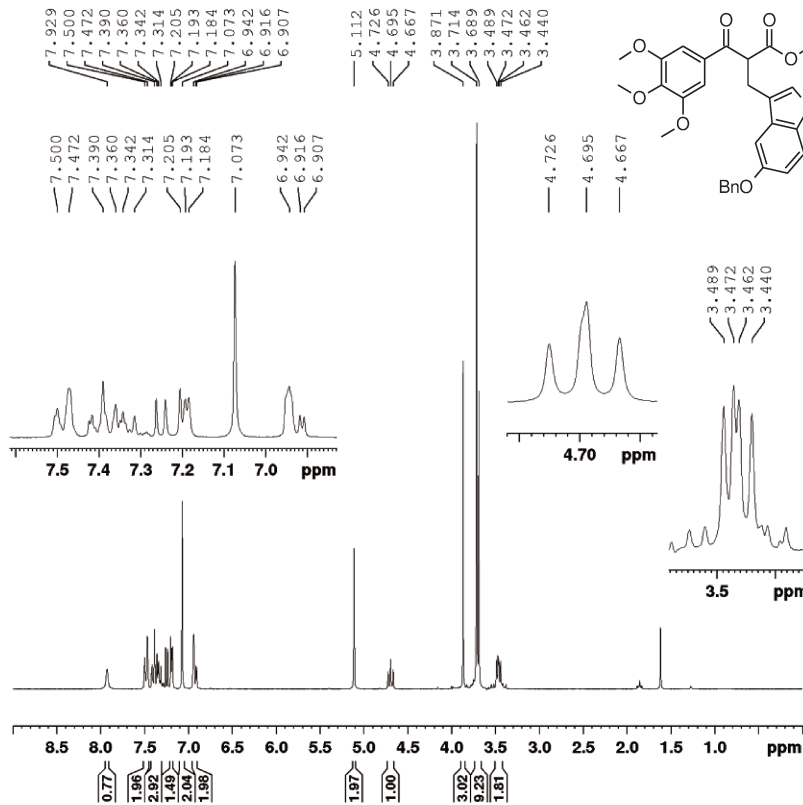
Composto 72: 2-[[5-(benzilóxi)-1H-indol-3-il]metil]-3-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoato de metila



Tempo reacional: 8 h; **Rendimento:** 89%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3442, 1730, 1680, 1123, 731 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3.44-3.49 (m, 2H); 3.69 (s, 3H); 3,71 (s, 6H); 3,87 (s, 3H); 4.70 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H); 5.11 (s, 2H); 6.91-6.94 (m, 2H); 7.07 (s, 2H); 7.18-7.50 (m, 7H); 7,93 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 25,2; 52,5; 54,3; 56,1; 60,9; 71,1; 102,3; 106,0; 111,9; 112,0; 112,7; 123,7; 127,5; 127,6; 127,9; 128,5; 131,6; 131,7; 137,5; 142,8; 153,0; 153,4; 170,3; 194,6; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 504,2022, encontrado: 504,1997.

Espectro 23. RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto 72.

Daniara-jull16dcfH2_IBX_Trimetox CDCl3 250MHz



Current Data Parameters
 NAME jull16dcfH2
 EXPNO 1
 PROCNO 1

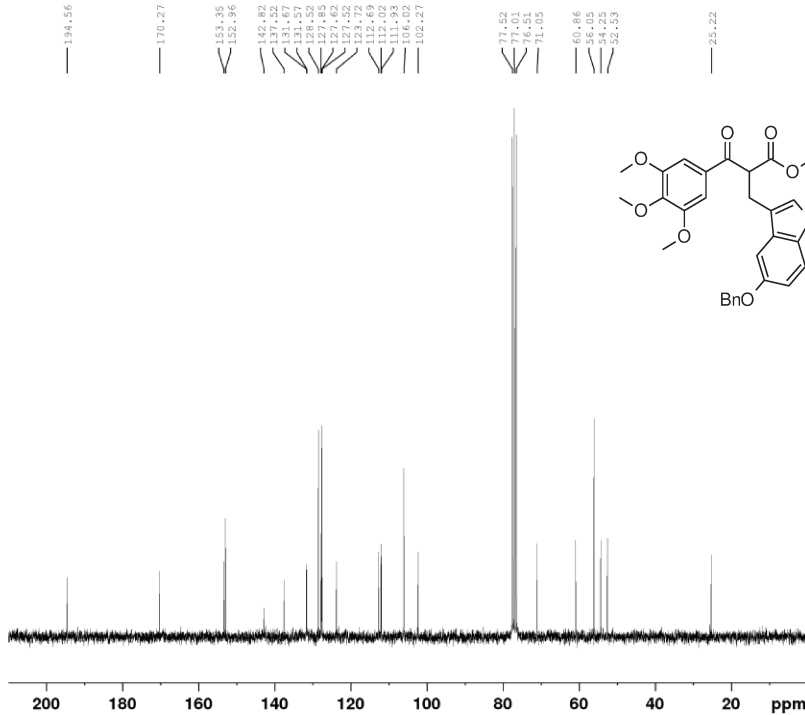
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130716
 Time 13.36
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 5175.983 Hz
 FIDRES 0.157958 Hz
 AQ 3.1653888 sec
 RG 812.7
 DW 96.600 usec
 DE -6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 13.25 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 250.1317509 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 250.130000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 24. RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do composto 72.

Daniara-jull16dcfC2_IBX_Trimetox CDCl3 250MHz



Current Data Parameters
 NAME jull16dcfC2
 EXPNO 1
 PROCNO 1

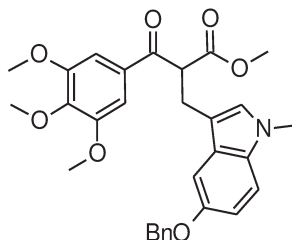
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130716
 Time 13.51
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 16384
 SOLVENT cdcl3
 NS 800
 DS 0
 SWH 15060.241 Hz
 FIDRES 0.919204 Hz
 AQ 0.5439488 sec
 RG 512
 DW 33.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13c
 P1 10.00 usec
 PL1 0 dB
 SFO1 62.9015280 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG[2] waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PL12 11.56 dB
 PL13 18.00 dB
 SFO2 250.1310005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 62.8952390 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

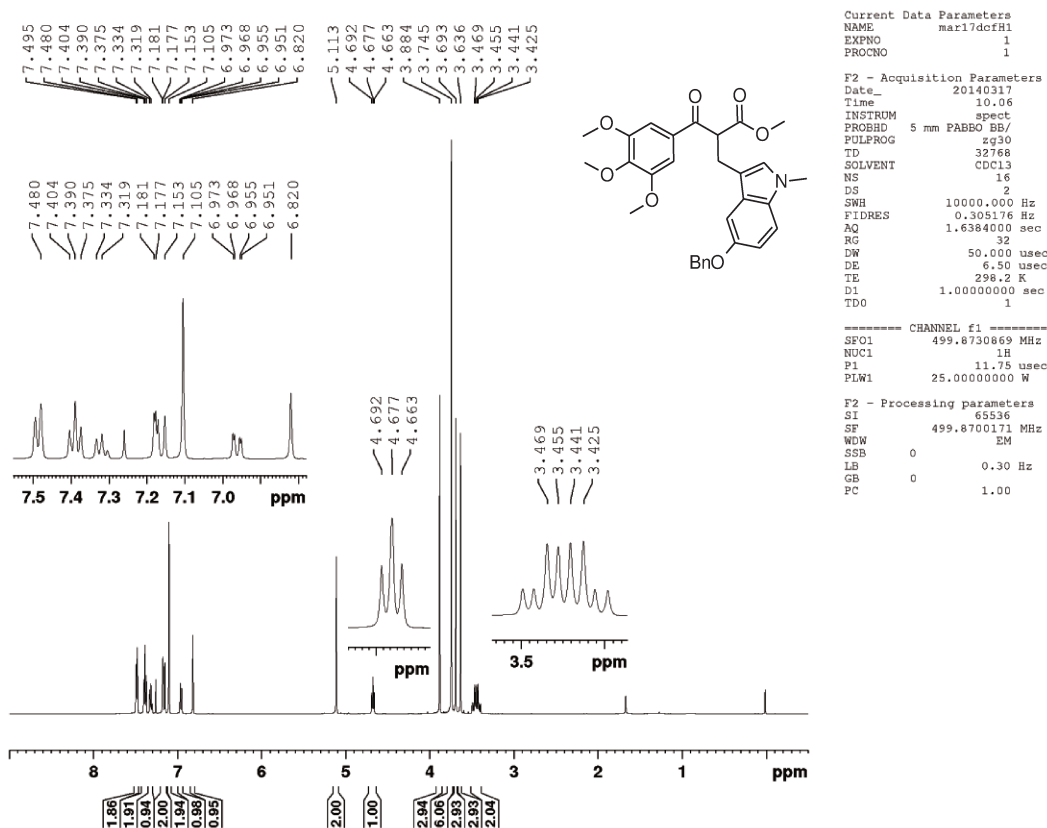
Composto 73: 2-[[5-(benzilóxi)-1-metil-1H-indol-3-il]metil]-3-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoato de metila

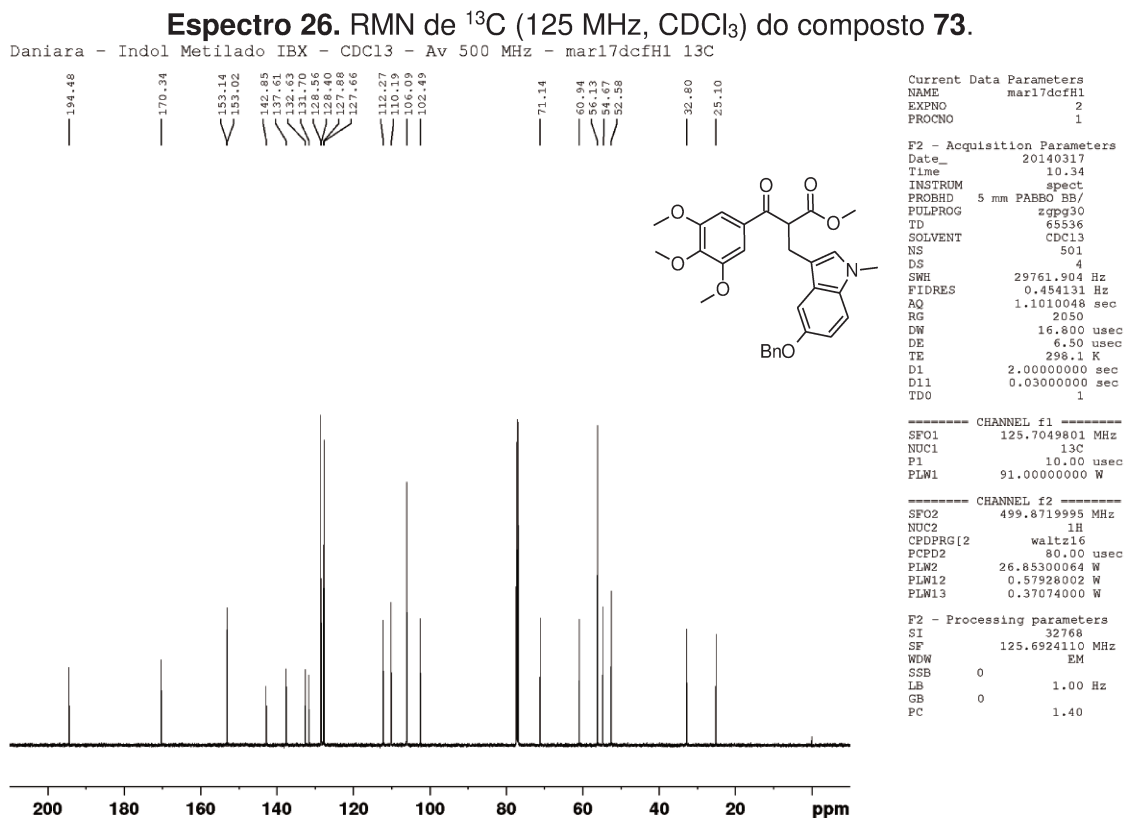


Tempo reacional: 12 h; **Rendimento:** 65%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3443, 1732, 1672, 1582, 1127, 730 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,45 (qd, $J = 14,0$ e $7,2$ Hz, 2H); 3,64 (s, 3H); 3,69 (s, 3H); 3,75 (s, 6H); 3,88 (s, 3H); 4,68 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H); 5,11 (s, 2H); 6,82 (s, 1H); 6,96 (dd, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz, 1H); 7,11 (s, 2H); 7,15-7,18 (m, 1H); 7,32-7,50 (m, 6H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 25,1; 32,8; 52,6; 54,7; 56,1; 60,9; 71,1; 102,5; 106,1; 110,2; 112,3; 127,7; 127,9; 128,4; 128,6; 131,7; 132,6; 137,6; 142,9; 153,0; 153,1; 170,3; 194,5; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{NO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 540,1998, encontrado: 540,1987.

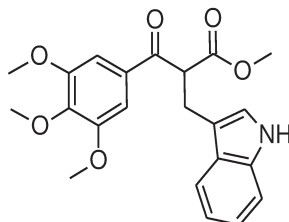
Espectro 25. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 73.

Daniara - Indol Metilado IBX - CDCl_3 - Av 500 MHz - mar17dcfH1





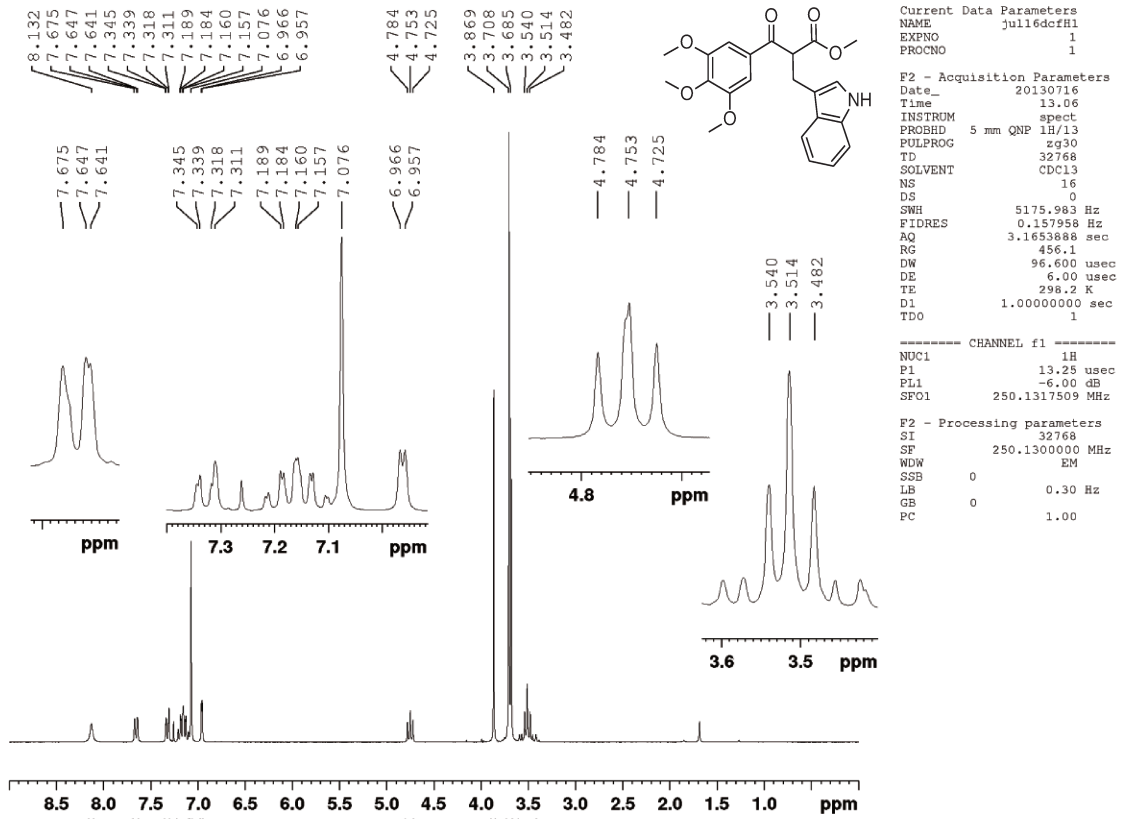
Composto 74: 2-[(1H-indol-3-il)metil]-3-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)propanoato de metila



Tempo reacional: 8 h; Rendimento: 71%; Característica: óleo marrom; IV (filme): 3447, 1728, 1669, 1588, 1127 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,48–3,54 (m, 2H); 3,69 (s, 3H); 3,71 (s, 6H); 3,87 (s, 3H); 4,75 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H); 6,96 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H); 7,08 (s, 2H); 7,16–7,19 (m, 2H); 7,31–7,35 (m, 1H); 7,67 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H); 8,13 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 25,2; 52,5; 54,4; 56,0; 60,9; 106,0; 111,4; 112,1; 118,3; 119,6; 122,1; 123,0; 127,1; 131,7; 136,2; 142,8; 153,0; 170,3; 194,6; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 420,1418, encontrado: 420,1408.

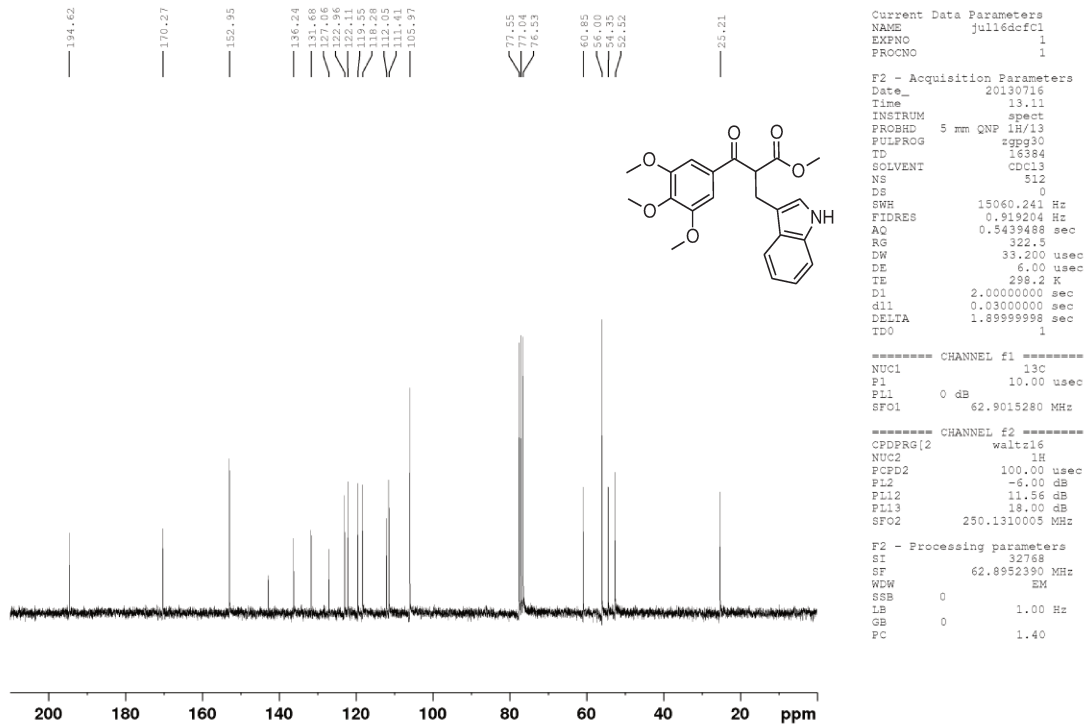
Espectro 27. RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto 74.

Daniara-jull16dcfH1_IBX_Trimetox_s/subst CDCl₃ 250MHz

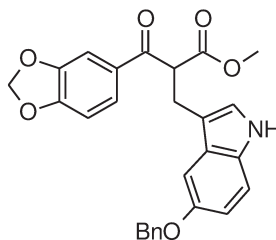


Espectro 28. RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do composto 74.

Daniara-jull16dcfC1_IBX_Trimetox_s/subst CDCl₃ 250MHz

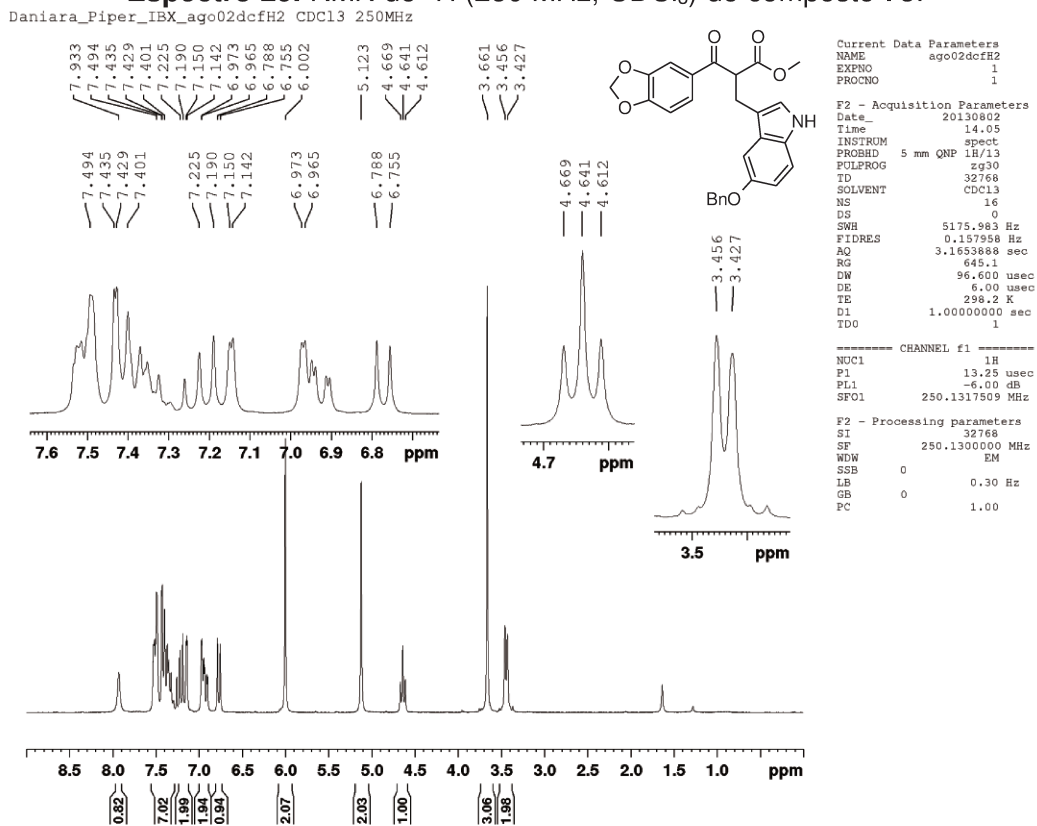


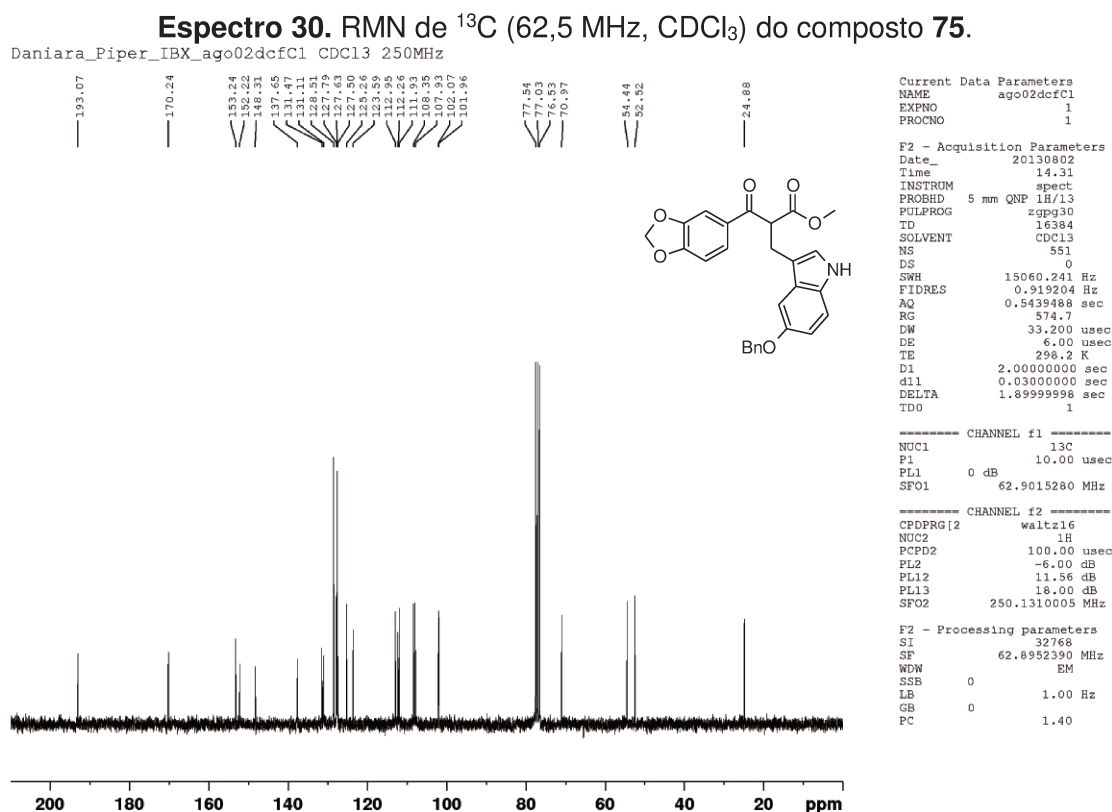
Composto 75: 3-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)-2-[[5-(benziloxi)-1H-indol-3-il]metil]-3-oxopropanoato de metila



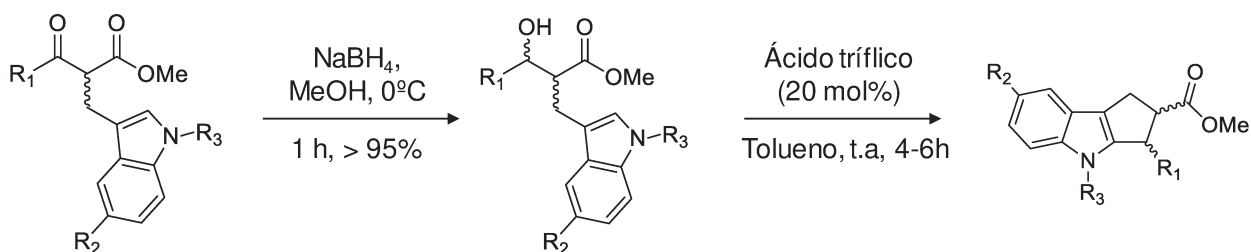
Tempo reacional: 8 h; **Rendimento:** 69%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3407, 1734, 1672, 1443, 1258, 743 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,44 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H); 3,66 (s, 3H); 4,64 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H); 6,00 (s, 2H); 6,77 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 6,97 (m, 2H); 7,14-7,23 (m, 2H); 7,40-7,49 (m, 7H); 7,93 (s, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 24,9; 52,5; 54,4, 71,0; 102,0; 102,1; 107,9; 108,4; 111,9; 112,3; 113,0; 123,6; 125,3; 127,5; 127,6; 127,8; 128,5; 131,1; 131,5; 137,7; 148,3; 152,2; 153,2; 170,2; 193,1; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 458,1604, encontrado: 458,1614.

Espectro 29. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 75.





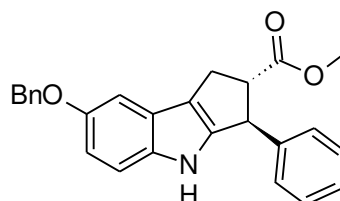
6.1.2.4. Procedimento geral de preparação dos ciclopenta[b]indóis



A uma solução do derivado indólico (0,5 equiv.) em MeOH (10 mL) foi adicionado NaBH_4 (1,5 equiv.) em pequenas porções a $0\text{ }^\circ\text{C}$. A reação foi mantida sob agitação magnética por 1h a temperatura ambiente e, em seguida, concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi dissolvido em acetato de etila (30 mL) e lavado sucessivamente com solução saturada de NH_4Cl (20 mL), H_2O (2 x 20 mL) e solução saturada de NaCl (20 mL). A fase orgânica foi seca sob Na_2SO_4 anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida para obtenção do álcool β -hidroxiéster, utilizado sem purificação prévia na próxima etapa. Para tal, o álcool obtido foi dissolvido em 15 mL de tolueno sob atmosfera inerte e agitação magnética. O sistema foi resfriado a $0\text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida uma solução de ácido trifluorometanosulfônico (ácido triflico) em acetonitrila (20 mol%) foi adicionado com auxílio de uma seringa. Após um

determinado período, a mistura reacional foi diluída com acetato de etila (20 mL) e lavada com solução saturada de NaHCO_3 (30 mL) e solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). O solvente foi removido sob pressão reduzida e os correspondentes ciclopenta[*b*]indóis **76-83** foram purificados em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex: AcOEt (80:20).

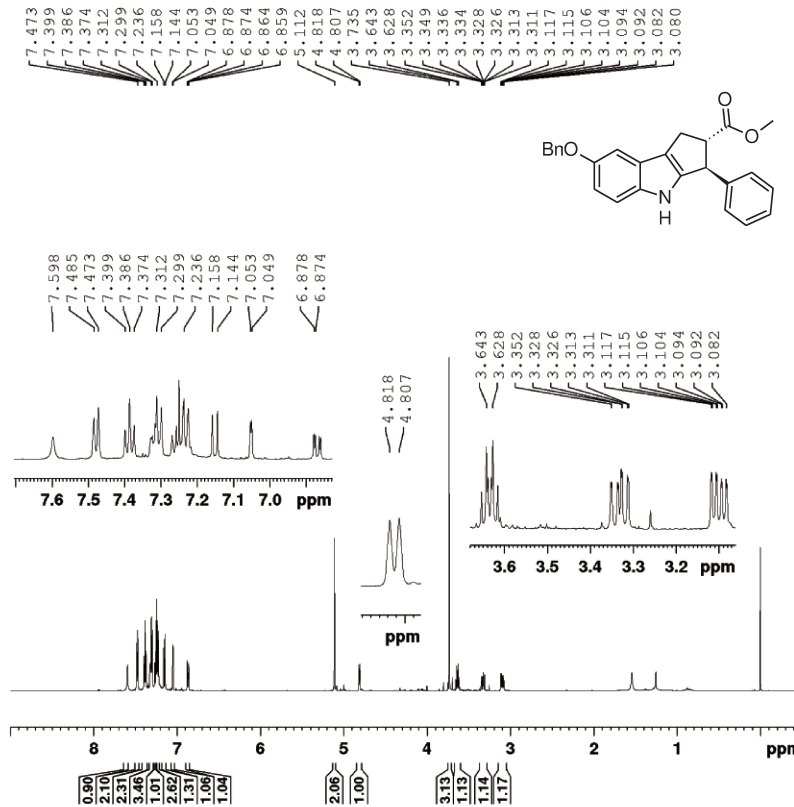
Composto 76: 7-(benzilóxi)-3-fenil-6-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxilato de metila



Tempo reacional: 12 h; **Rendimento:** 35%; **Característica:** óleo amarelo; **RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3):** δ 3,10 (ddd, $J = 1,3; 6,6$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,31-3,35 (m, 1H); 3,63 (dt, $J = 6,9$ e $9,0$ Hz, 1H), 3,74 (s, 3H); 4,81 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 5,11 (s, 2H); 6,87 (dd, $J = 2,4$ e $8,4$ Hz, 1H); 7,05 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,24-7,40 (m, 9H); 7,48 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 7,60 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3):** δ 28,8; 48,5; 52,0; 58,3; 71,0; 102,9; 111,8; 112,2; 117,9; 124,6; 127,3; 127,5; 127,7; 127,8; 128,5; 128,8; 136,4; 137,8; 142,6; 143,8; 153,5; 174,8.

Espectro 31. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 76.

Daniara "aduto s/subst_Bn" CDCl_3 / Av600 MHz - set18dcpH1



Current Data Parameters
 NAME set18dcpH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

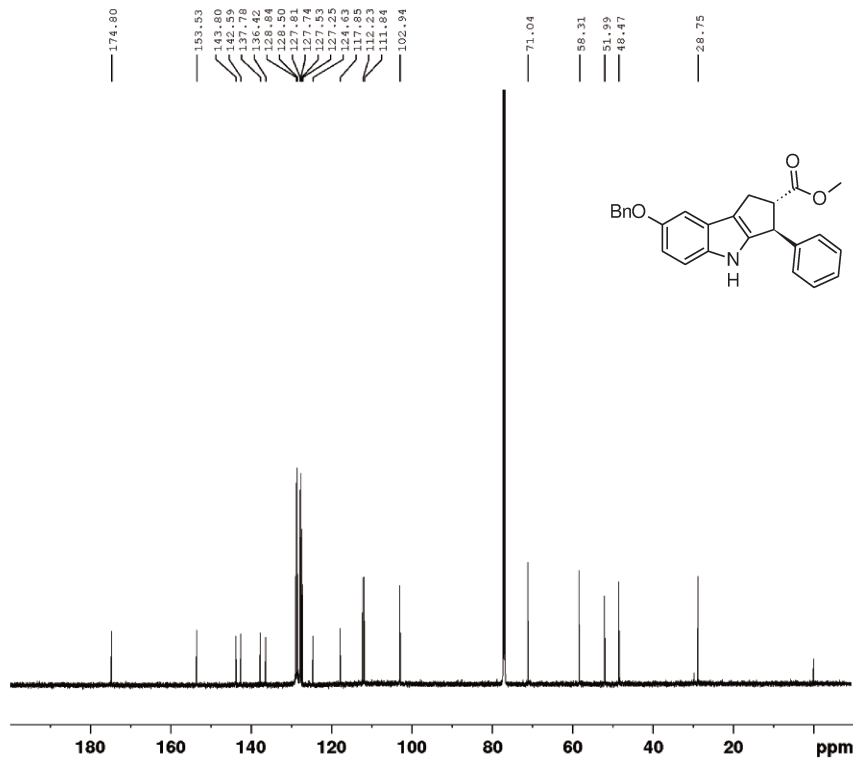
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140918
 Time 16.31
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PATXI 1H/
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 16
 DS 0
 SWH 12335.526 Hz
 FIDRES 0.188225 Hz
 AQ 2.6563926 sec
 RG 114
 DW 40.533 usec
 DE 6.50 usec
 TE -0.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 SFO1 600.1737063 MHz
 NUC1 ^1H
 P1 7.50 usec
 PLW1 7.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 600.1700208 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 32. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 76.

Daniara "aduto s/subst_Bn" CDCl_3 / Av600 MHz - set18dcpH1 - ^{13}C



Current Data Parameters
 NAME set18dcpH1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

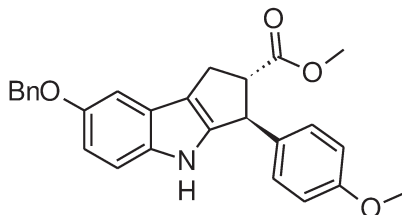
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140919
 Time 9.27
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PATXI 1H/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl_3
 NS 10405
 DS 0
 SWH 36057.691 Hz
 FIDRES 1.100393 Hz
 AQ 0.4543829 sec
 RG 203
 DW 13.667 usec
 DE 6.50 usec
 TE -0.2 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 SFO1 150.9294674 MHz
 NUC1 ^{13}C
 P1 17.00 usec
 PLW1 95.00000000 W

CHANNEL f2
 SFO2 600.1724007 MHz
 NUC2 ^1H
 CPDPRG[2] waltz16
 PCPD2 70.00 usec
 PLW2 7.00000000 W
 PLW12 0.08035700 W
 PLW13 0.03937500 W

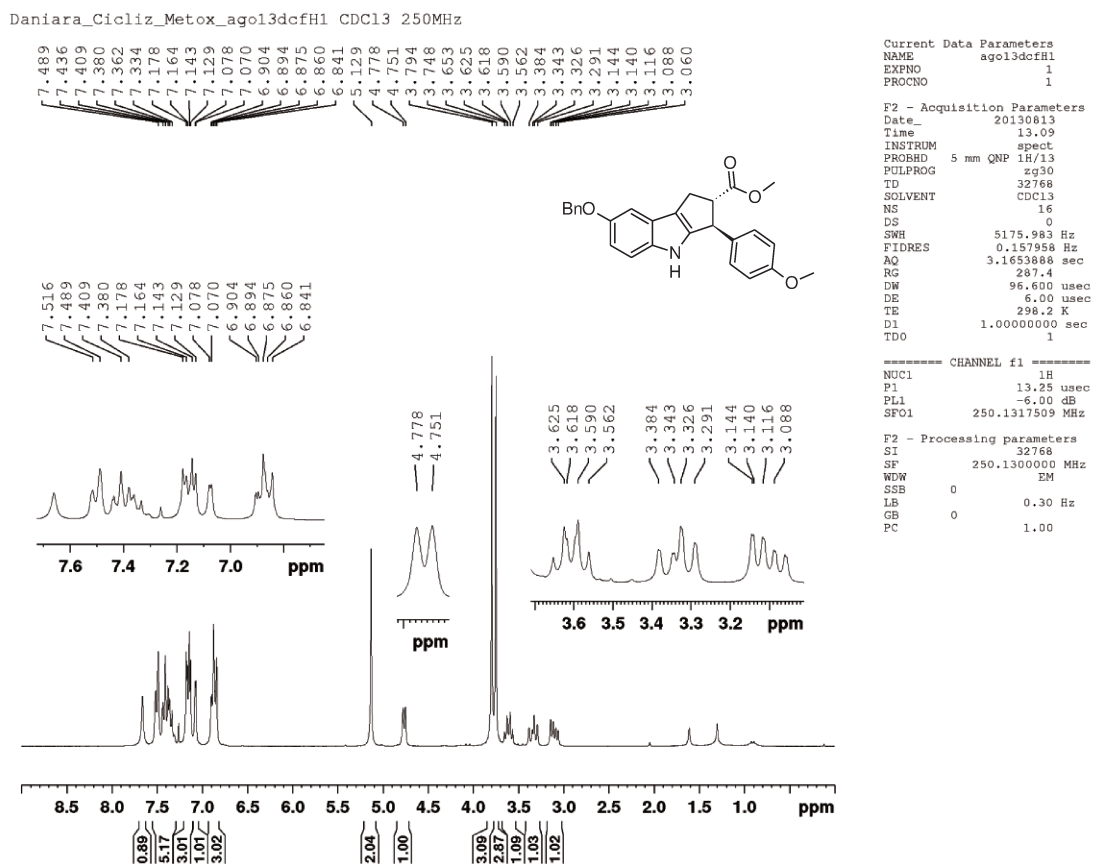
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 150.9128670 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Composto 77: 7-(benzilóxi)-3-(4-metóxiifenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxilato de metila

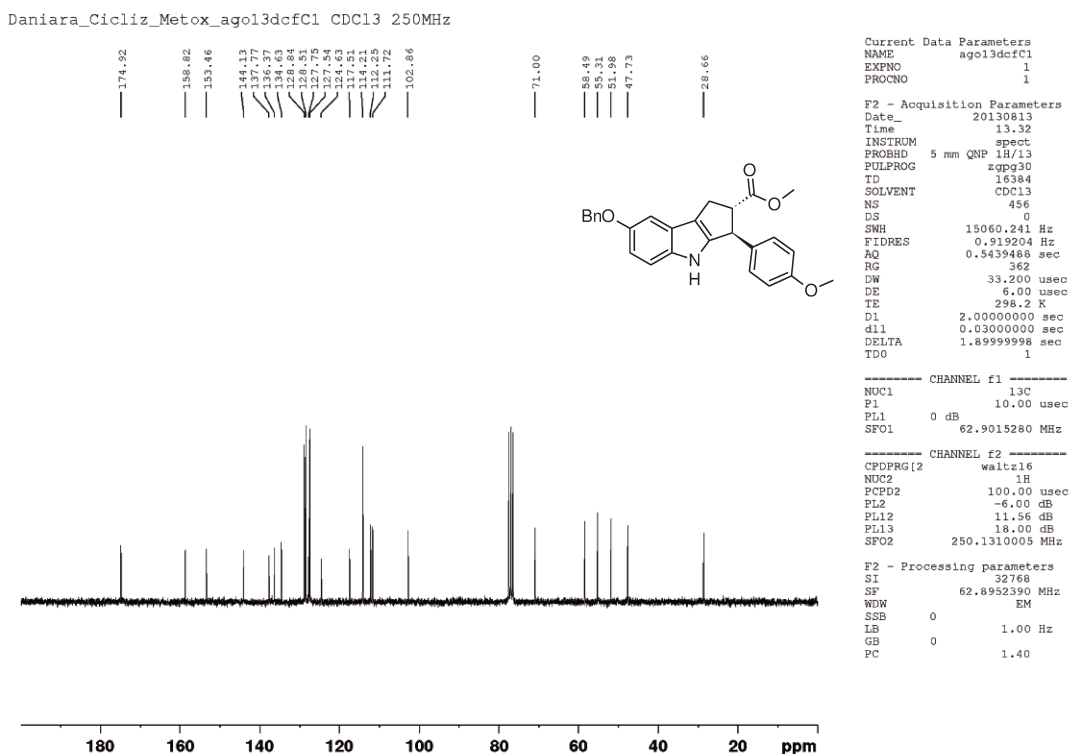


Tempo reacional: 5 h; **Rendimento:** 53%; **Característica:** óleo amarelo; **IV (filme):** 3374, 1731, 1585, 1247, 1176, 736 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,06-3,14 (m, 1H); 3,29-3,38 (m, 1H); 3,56-3,63 (m, 1H), 3,75 (s, 3H); 3,79 (s, 3H); 4,76 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H); 5,13 (s, 2H); 6,84-7,51 (m, 12H); 7,64 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 28,7; 47,7; 52,0; 55,3; 58,5; 71,0; 102,9; 111,7; 112,3; 114,2; 117,5; 124,6; 127,5; 127,8; 128,5; 128,8; 134,6; 136,4; 137,8; 144,1; 153,5; 158,8; 174,9; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 450,1681, encontrado: 450,1677.

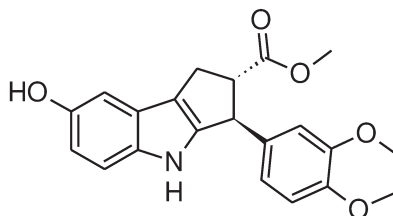
Espectro 33. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 77.



Espectro 34. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto **77**.

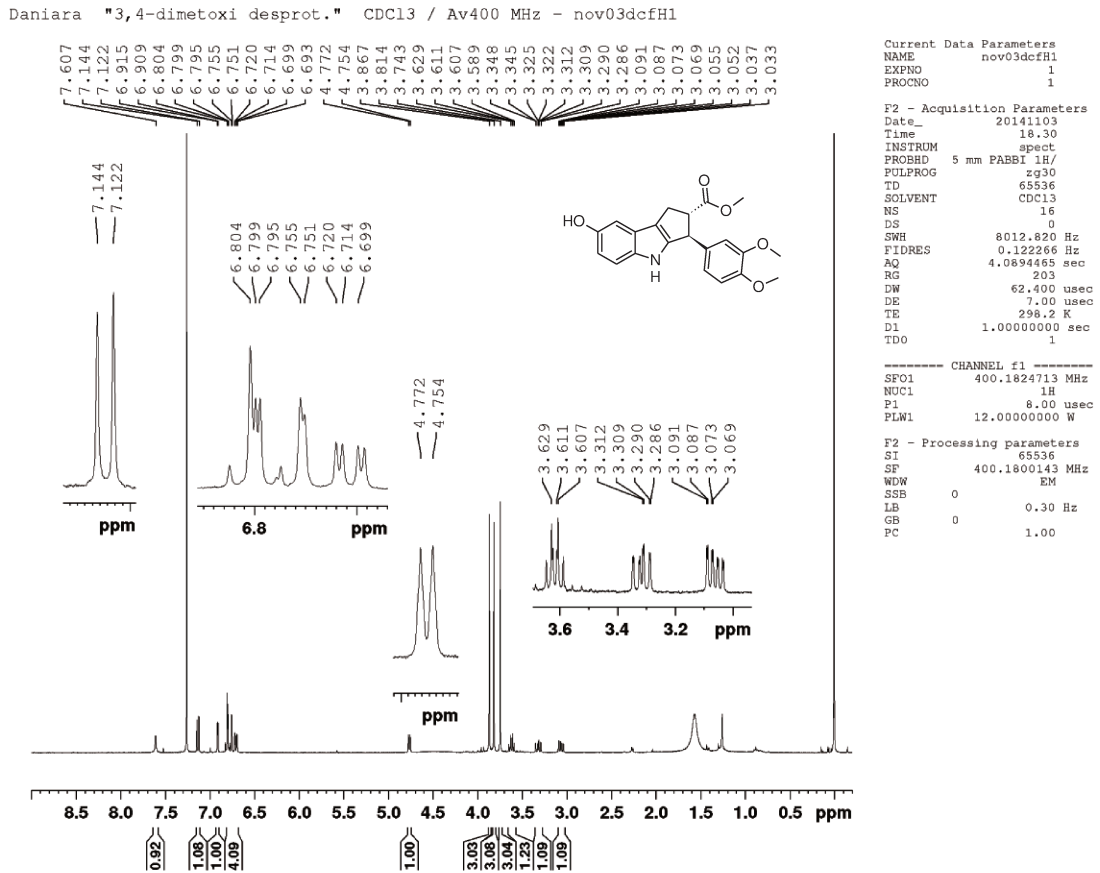


Composto 78: 7-(benzilóxi)-3-(3,4-dimetóxfenil)-7hidróxi-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxilato de metila

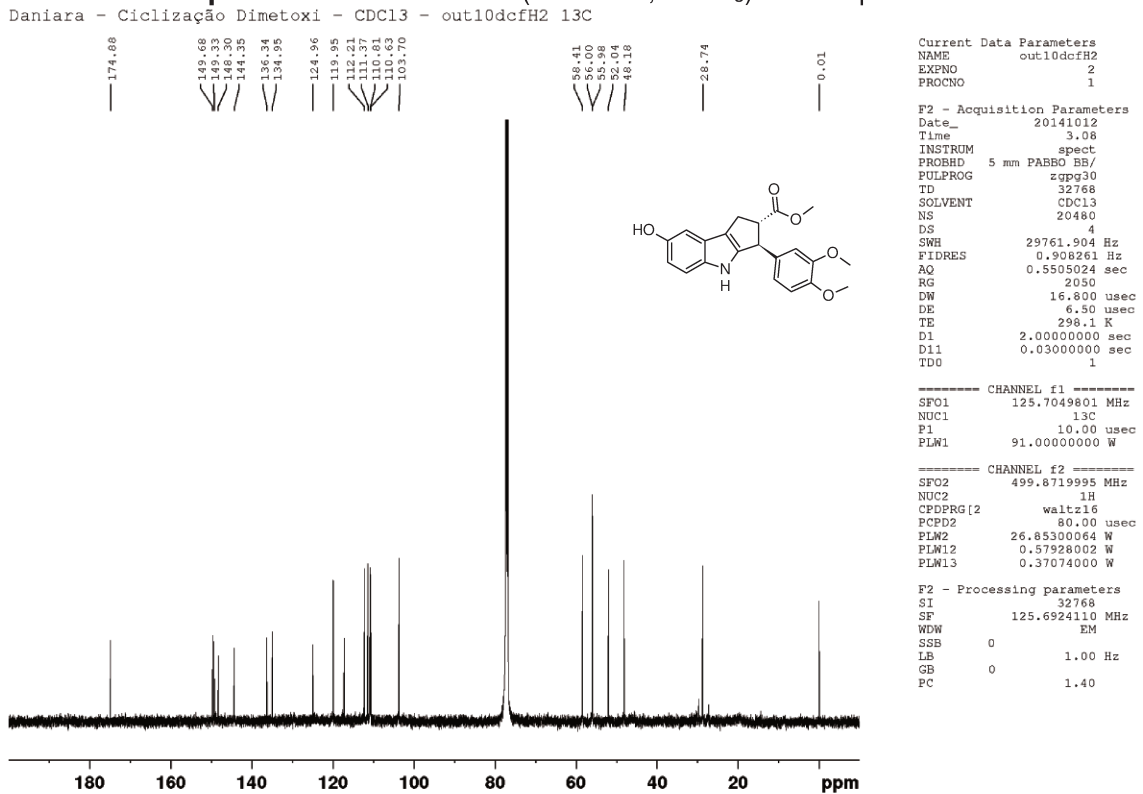


Tempo reacional: 6 h; **Rendimento:** 58%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3343, 1729, 1597, 1123, 791 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 3,06 (ddd, $J = 1,5; 7,2$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,32 (ddd, $J = 1,4; 9,0$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,62 (dt, $J = 7,2$ e $9,0$ Hz, 1H); 3,74 (s, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,87 (s, 3H); 4,76 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H); 6,71 (dd, $J = 2,4$ e $8,4$ Hz, 1H); 6,75 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H); 6,79-6,80 (m, 2H); 6,91 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,13 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,61 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,7; 48,2; 52,0; 56,0; 58,4; 103,7; 110,6; 110,8; 111,4; 112,2; 117,4; 120,0; 125,0; 135,0; 136,3; 144,4; 148,3; 149,3; 149,7; 174,9; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 390,1317, encontrado: 390,1308.

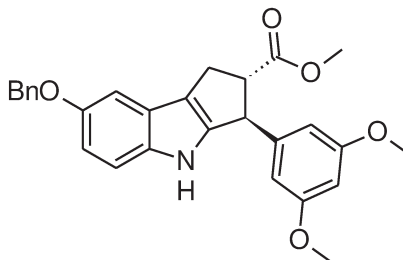
Espectro 35. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 78.



Espectro 36. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 78.

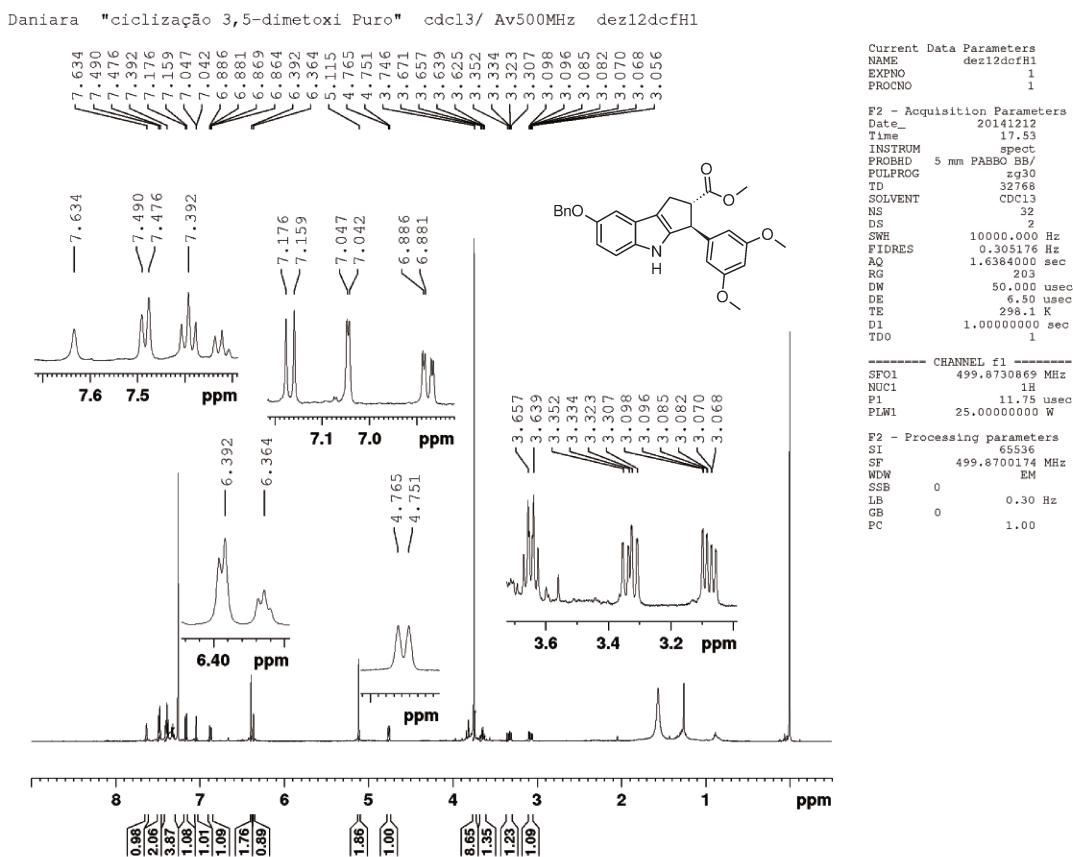


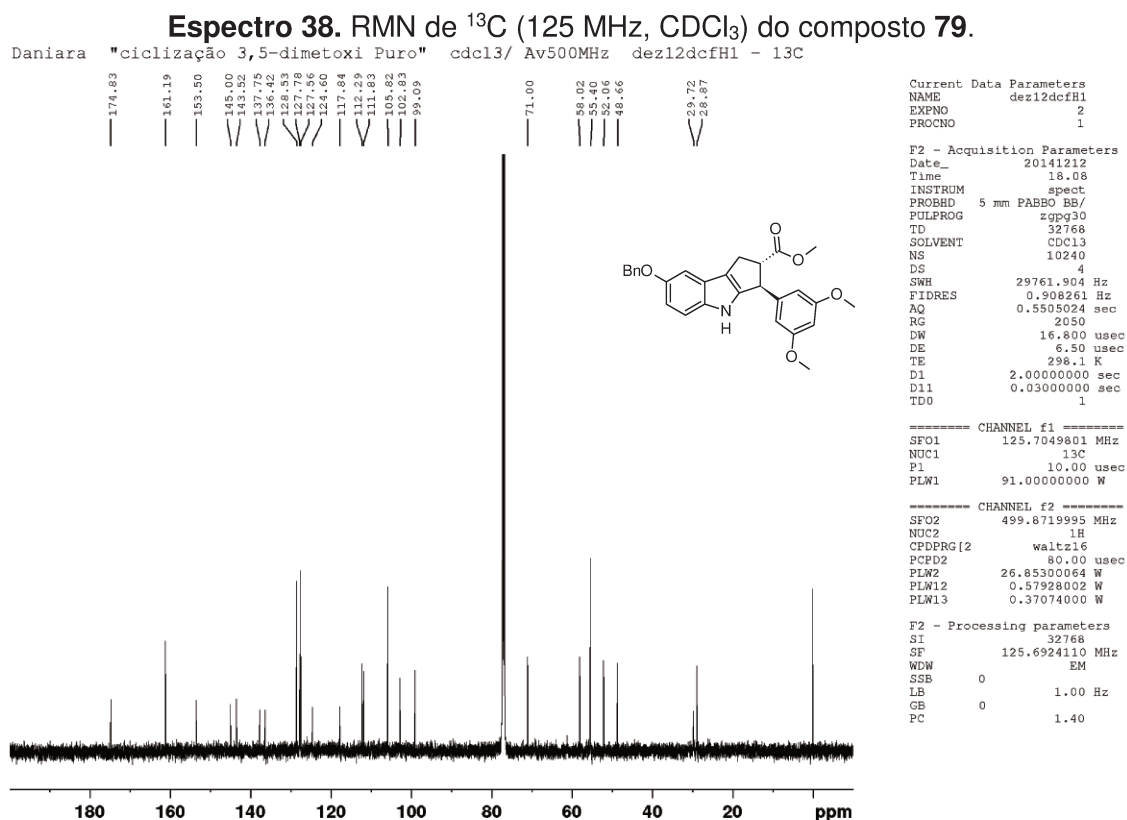
Composto 79: 7-(benzilóxi)-3-(3,5-dimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila



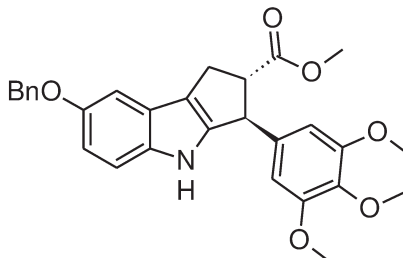
Tempo reacional: 8 h; Rendimento: 50%; Característica: óleo marrom; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 3,08 (ddd, $J = 1,2; 7,0$ e $14,3$ Hz, 1H); 3,31-3,35 (m, 1H); 3,67 (dt, $J = 7,0$ e $9,0$ Hz, 1H); 3,75 (s, 9H); 4,76 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H); 6,36-6,39 (m, 3H); 6,88 (dd, $J = 2,5$ e $8,5$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,17 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,31-7,41 (m, 4H); 7,48 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 7,63 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,9; 29,7; 48,7; 52,1; 55,4; 58,0; 71,0; 99,1; 102,8; 105,8; 111,8; 112,3; 117,8; 124,6; 127,6; 127,8; 128,5; 136,4; 137,8; 143,5; 145,0; 153,5; 161,2; 174,8.

Espectro 37. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 79.



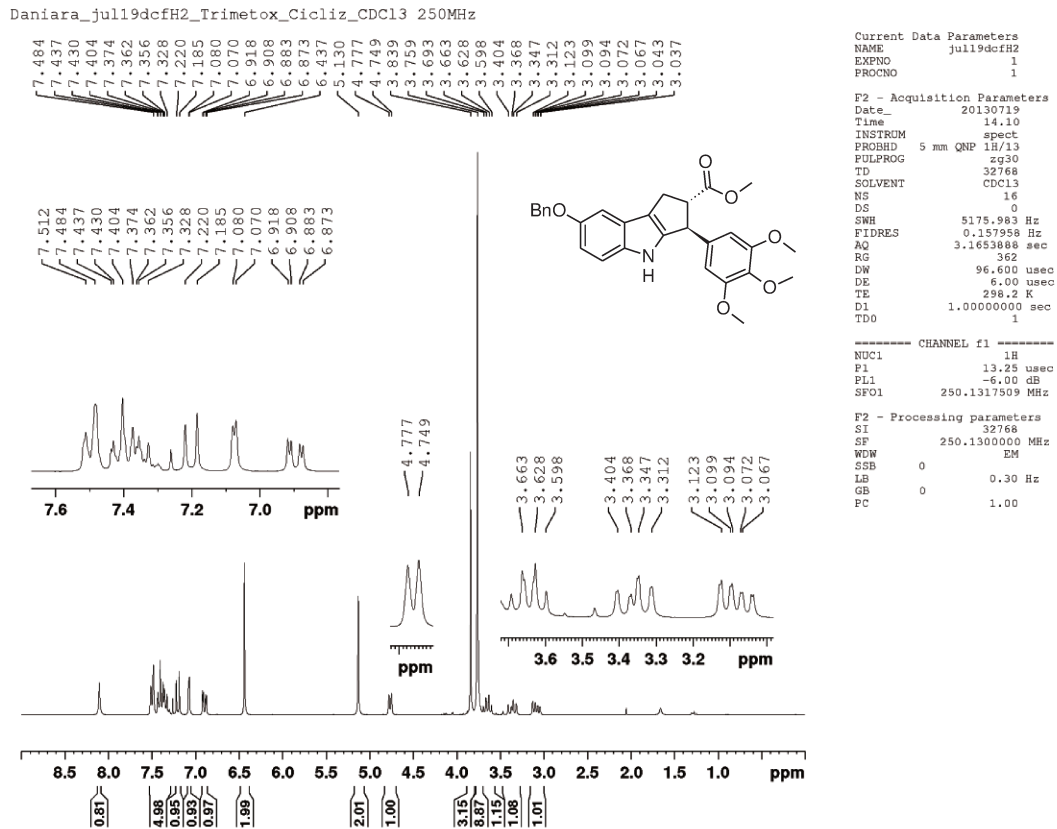


Composto 80: 7-(benzilóxi)-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila

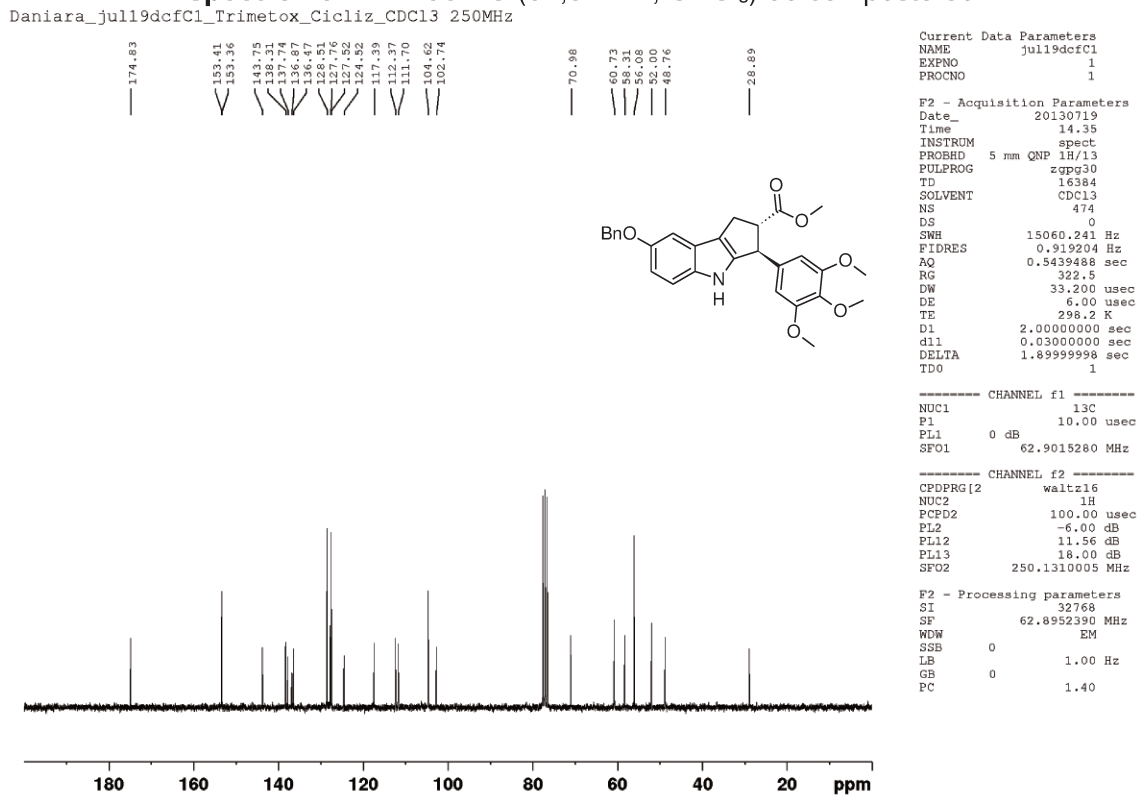


Tempo reacional: 6 h; Rendimento: 75%; Característica: óleo marrom; IV (filme):
 3328, 1731, 1138, 785 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,04-3,12 (m, 1H); 3,31-3,40 (m, 1H); 3,60-3,69 (m, 1H); 3,76 (s, 9H); 3,84 (s, 3H); 4,76 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H); 5,13 (s, 2H); 6,44 (s, 2H); 6,90 (dd, $J = 2,5$ e 8,8 Hz, 1H); 7,08 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,20 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,33-7,51 (m, 5H); 8,10 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 28,9; 48,8; 52,0; 56,1; 58,3; 60,7; 71,0; 102,7; 104,6; 111,7; 112,4; 117,4; 124,5; 127,5; 127,8; 128,5; 136,5; 136,9; 137,7; 138,3; 143,8; 153,3; 153,4; 174,8; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 488,2073, encontrado: 488,2056.

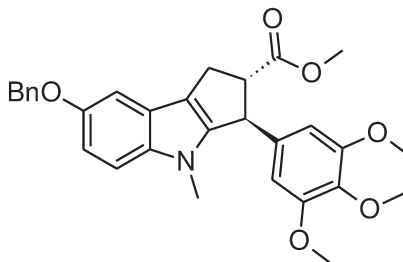
Espectro 39. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 80.



Espectro 40. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto 80.



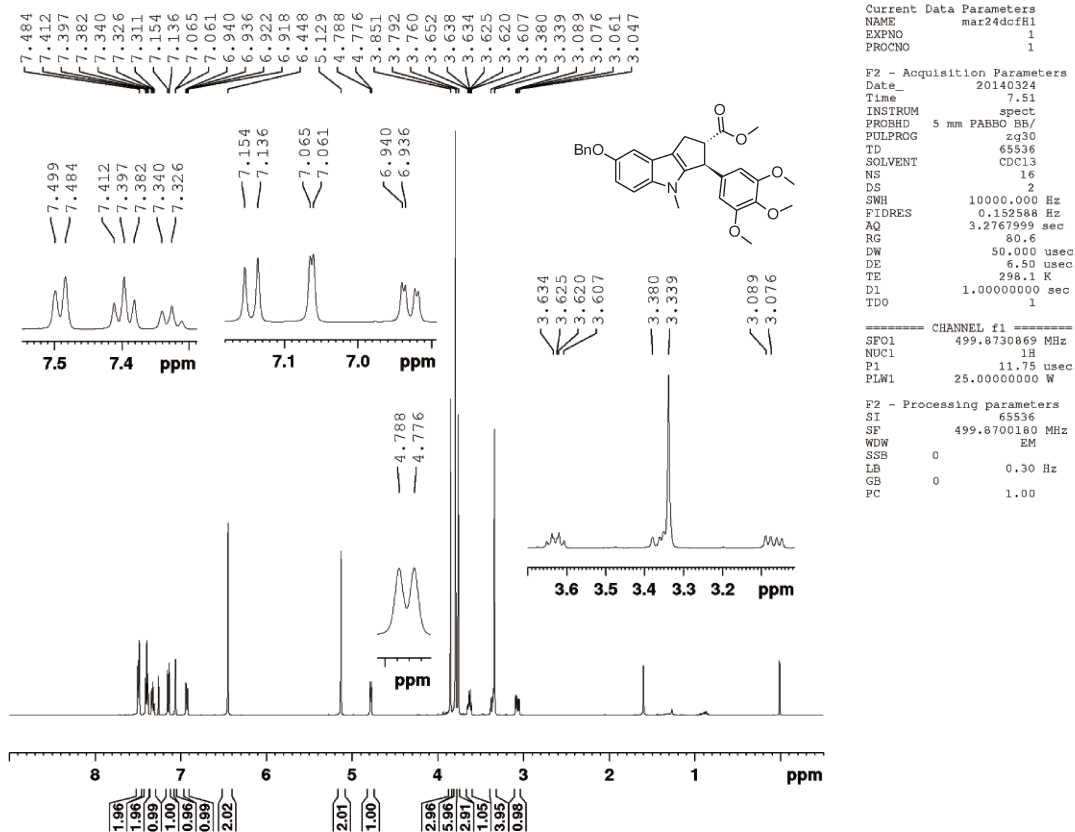
Composto 81: 7-(benzilóxi)-4-metil-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila

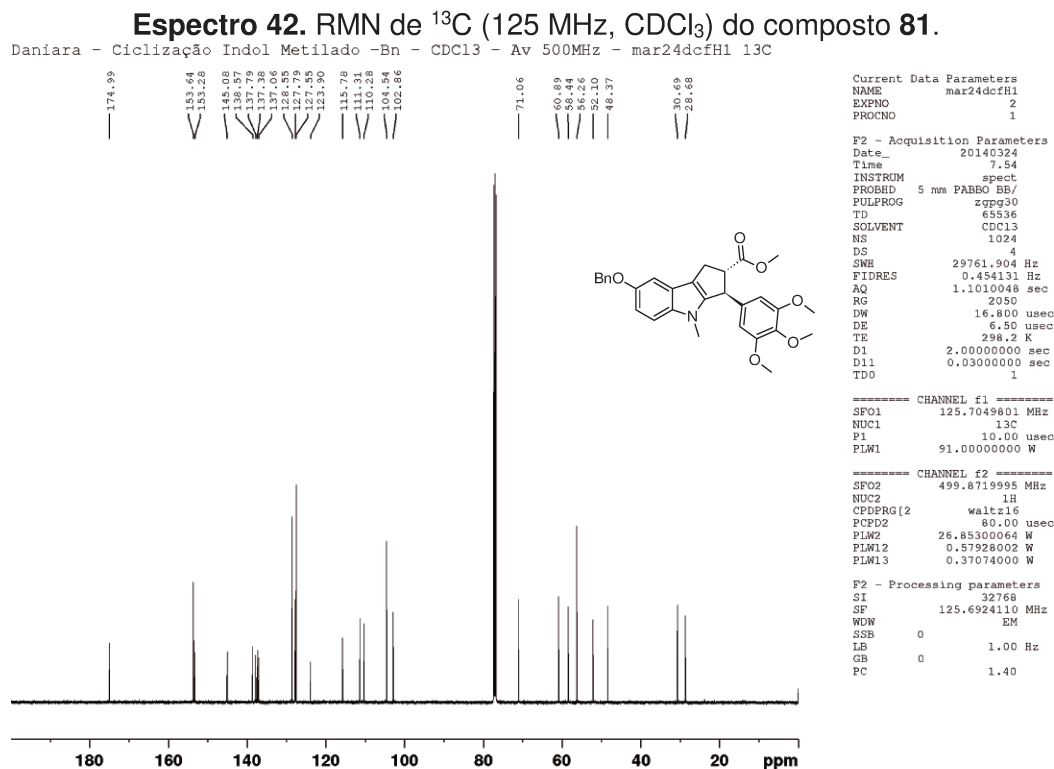


Tempo reacional: 4 h; **Rendimento:** 70%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3345, 1732, 1595 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,07 (dd, $J = 6,7$ e $14,0$ Hz, 1H); 3,34 (s, 3H); 3,34-3,38 (m, 1H); 3,63 (dt, $J = 6,7$ e $9,0$ Hz, 1H); 3,76 (s, 3H); 3,79 (s, 6H); 3,85 (s, 3H); 4,78 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 5,13 (s, 2H); 6,45 (s, 2H); 6,91 (dd, $J = 2,0$ e $9,0$ Hz, 1H); 7,06 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,15 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,31-7,41 (m, 3H); 7,49 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,7; 30,7; 48,4; 52,1; 56,3; 58,4; 60,9; 71,1; 102,9; 104,5; 110,3; 111,3; 115,8; 123,9; 127,6; 127,8; 128,6; 137,1; 137,4; 137,8; 138,6; 145,1; 153,3; 153,6; 175,0; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 524,2049, encontrado: 524,2044.

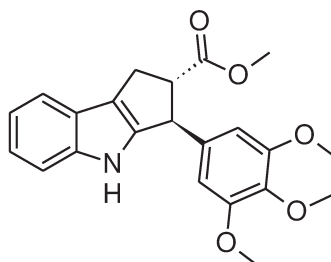
Espectro 41. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 81.

Daniara - Ciclização Indol Metilado -Bn - CDCl_3 - Av 500MHz - mar24dcfH1



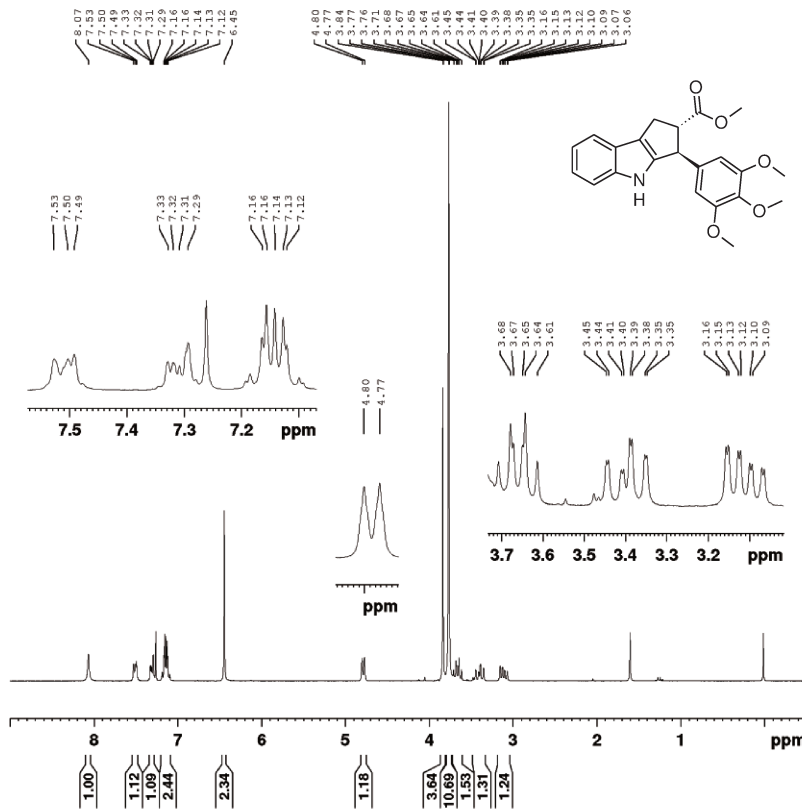


Composto 82: 3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila



Tempo reacional: 6 h; **Rendimento:** 50%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3356, 1732, 1603 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,11 (ddd, $J = 1,5; 7,3$ e $14,3$ Hz, 1H); 3,35-3,45 (m, 1H); 3,66 (dt, $J = 7,3$ e $9,0$ Hz, 1H); 3,76 (s, 3H); 3,77 (s, 6H); 3,84 (s, 3H); 4,79 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 6,45 (s, 2H); 7,12-7,16 (m, 2H); 7,29-7,33 (m, 1H); 7,49-7,53 (m, 1H); 8,07 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 29,0; 48,7; 52,0; 56,1; 58,4; 60,8; 104,6; 111,8; 117,7; 118,7; 119,8; 121,3; 124,2; 136,9; 138,3; 141,2; 142,7; 153,4; 174,8; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 404,1474, encontrado: 404,1467.

Espectro 43. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

abr05dcfH1-Trimet-s/substituente-Cicliz- CDCl_3 

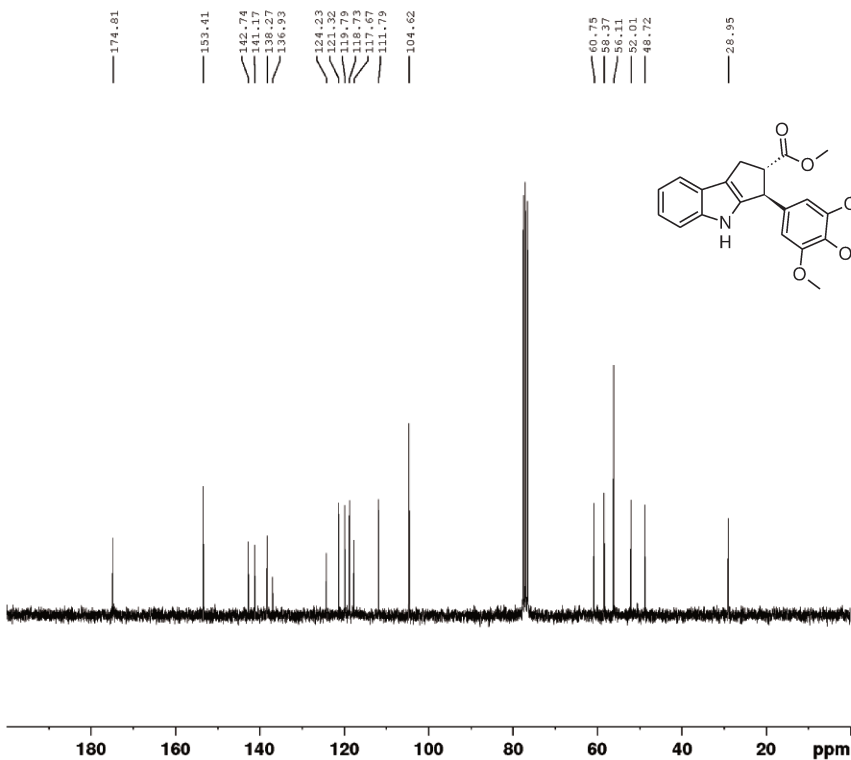
Current Data Parameters
 NAME abr05dcfH1
 EXPNO 4
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130405
 Time 13.56
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl_3
 NS 16
 DS 0
 SWH 5175.993 Hz
 FIDRES 0.157958 Hz
 AQ 3.1653888 sec
 RG 912.3
 DW 96.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 NUC1 ^1H
 P1 13.25 usec
 PL1 -6.00 dB
 SF01 250.1317509 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 250.1300000 MHz
 WDN EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 44. RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do composto **82**.

abr05dcfC1-Trimet-s/substituente-Cicliz- CDCl_3 

Current Data Parameters
 NAME abr05dcfC1
 EXPNO 4
 PROCNO 1

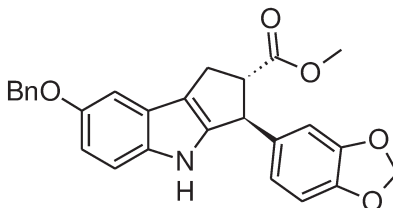
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130405
 Time 14.32
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 16384
 SOLVENT CDCl_3
 NS 740
 DS 0
 SWH 15060.241 Hz
 FIDRES 0.919204 Hz
 AQ 0.5439468 sec
 RG 382
 DW 33.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 NUC1 ^{13}C
 P1 10.00 usec
 PL1 0 dB
 SF01 62.9015280 MHz

CHANNEL f2
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 ^1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PL12 11.56 dB
 PL13 18.00 dB
 SF02 250.1310005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 62.8952390 MHz
 WDN EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

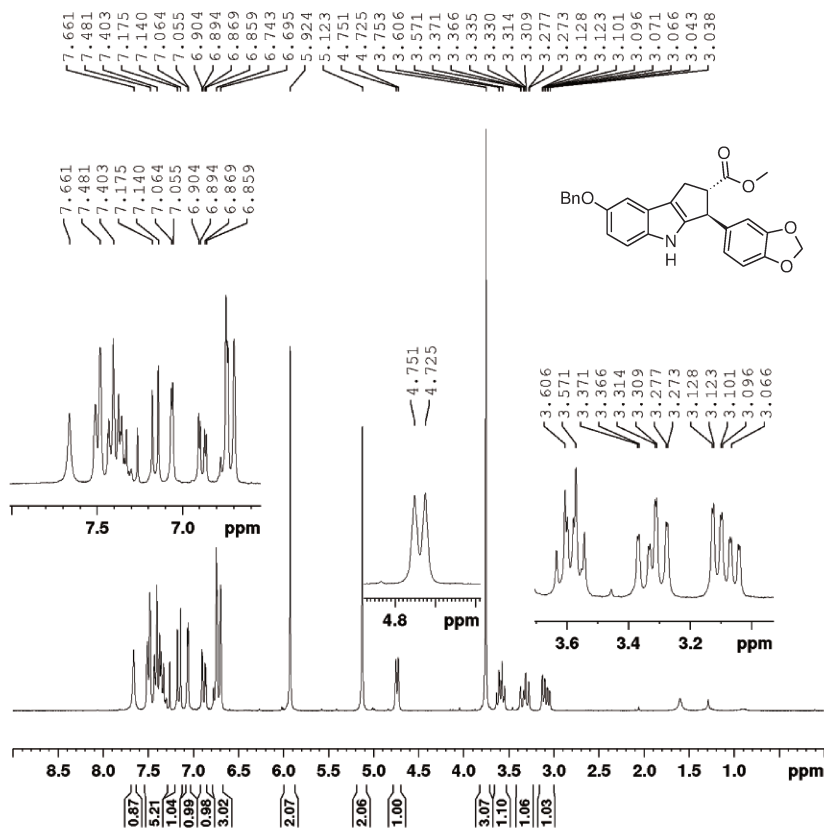
Composto 83: 3-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)-7-(benzilóxi)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila



Tempo reacional: 6 h; **Rendimento:** 55%; **Característica:** sólido amorfo marrom; **IV (filme):** 3313, 1731, 1597, 1126 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,08 (ddd, $J = 1,3; 6,9$ e $14,3$ Hz, 1H); 3,27-3,37 (m, 1H); 3,59 (dt, $J = 6,9$ e $8,9$ Hz, 1H), 3,75 (s, 3H); 4,74 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H), 5,92 (s, 2H); 6,70-6,74 (m, 3H); 6,88 (dd, $J = 2,5$ e $8,8$ Hz, 1H); 7,06 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,40-7,48 (m, 5H); 7,66 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 28,6; 48,2; 52,0; 58,4; 71,0; 101,1; 102,9; 108,0; 108,4; 111,8; 112,3; 117,7; 121,0; 124,6; 127,5; 127,8; 128,5; 136,4; 136,5; 137,7; 143,8; 146,8; 148,1; 153,5; 175,0; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 442,1654, encontrado: 442,1630; **P.F:** 124°C .

Espectro 45. RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) do composto 83.

Daniara_Piper_Cicliz_ago02dcfH3 CDCl_3 250MHz

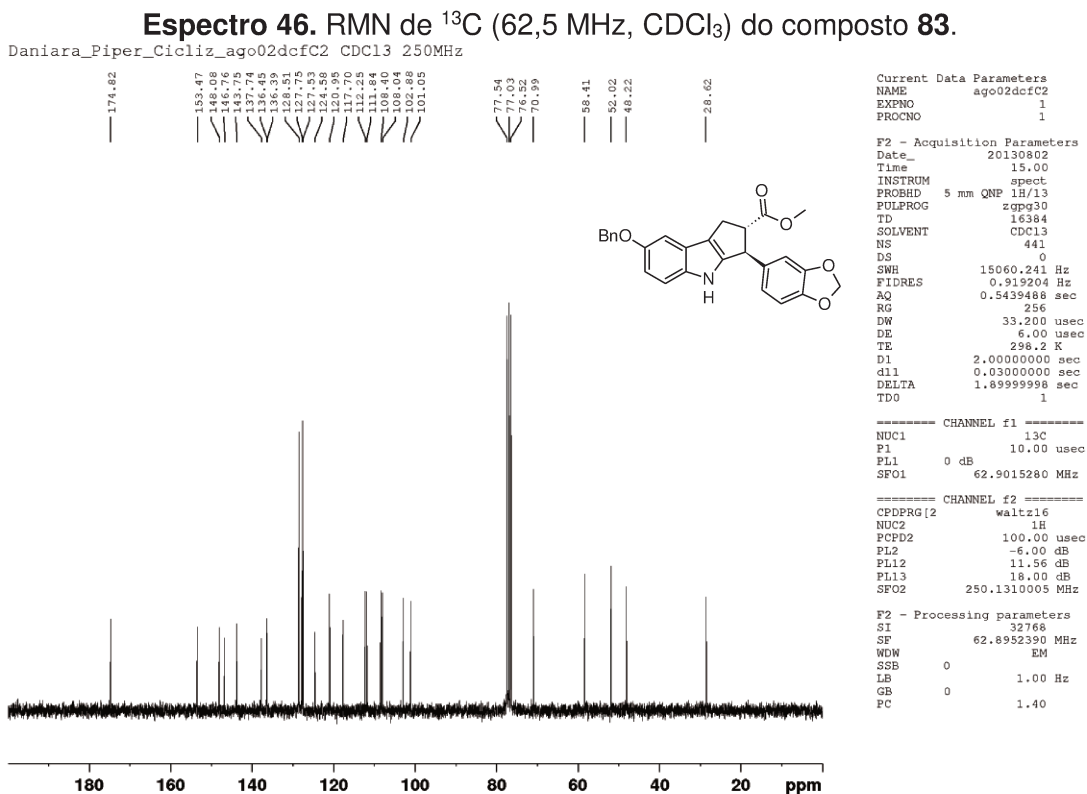


Current Data Parameters
NAME ago02dcfH3
EXPNO 1
PROCNO 1

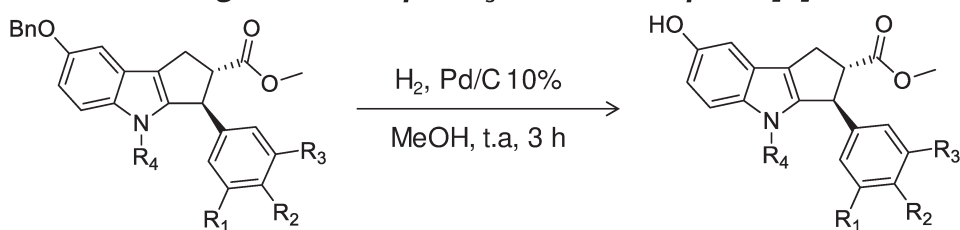
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130802
Time 14.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 16
DS 0
SWH 5175.983 Hz
FIDRES 0.157958 Hz
AQ 3.1653888 sec
RG 574.7
DM 96.600 usec
DE 6.00 usec
TE 298.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.25 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 250.1317509 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 250.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

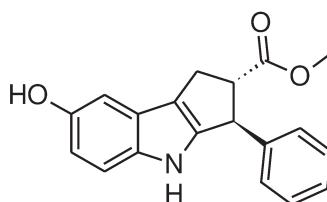


6.1.2.5. Procedimento geral de desproteção dos ciclopenta[b]indóis



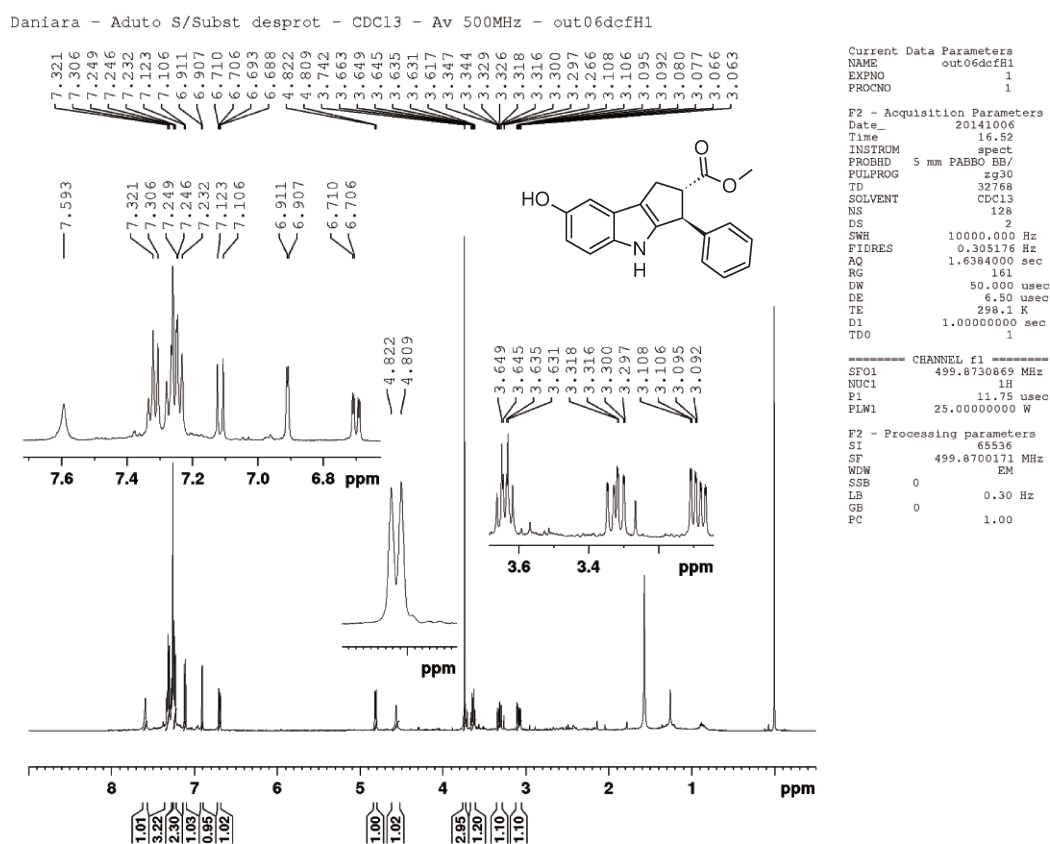
Os compostos **76**, **77**, **80**, **81** e **83** (0,12 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de MeOH em um balão contendo 10 mg de Pd/C 10%. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente e atmosfera de H_2 . Após um determinado período, a mistura reacional foi filtrada em coluna de sílica gel para fornecer os produtos **84-88**.

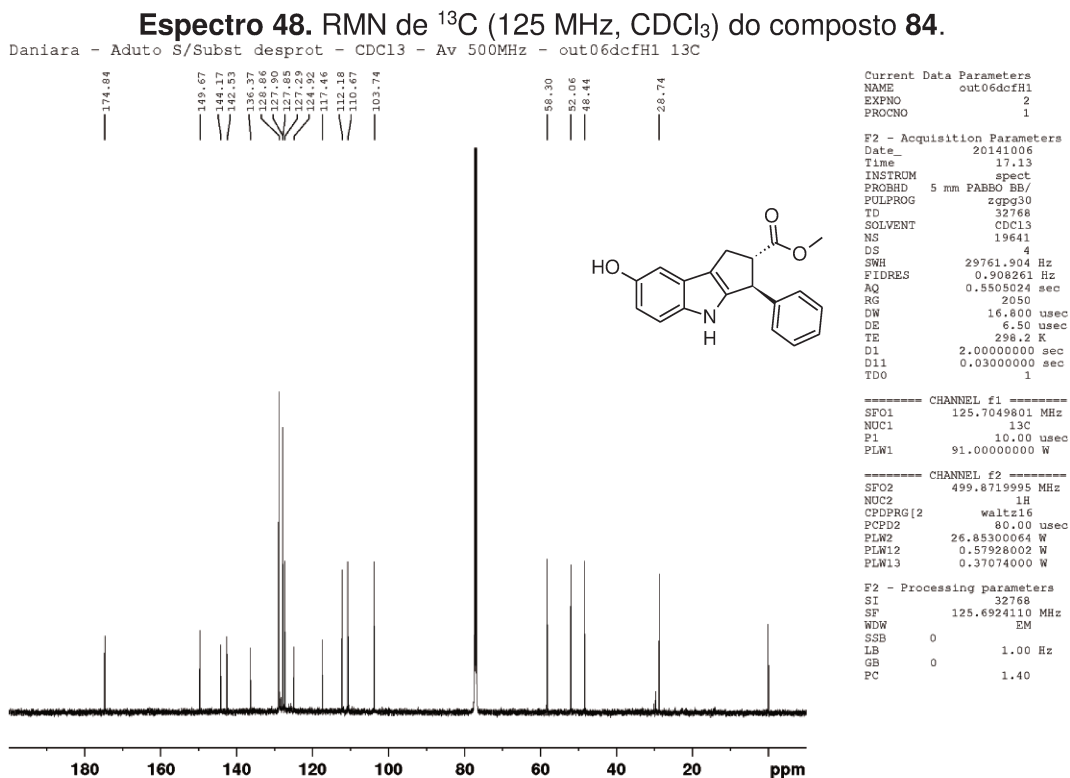
Composto 84: 7-hidróxi-3-fenil-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila



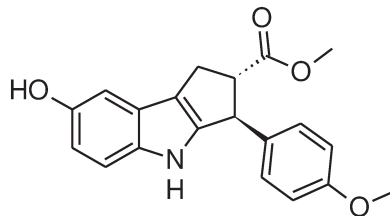
Tempo reacional: 2 h; Rendimento: 78%; Característica: óleo amarelo; IV (filme): 3396, 2923, 1716, 1453, 1191, 701; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,09 (ddd, $J = 1,4; 7,0$ e $14,3$ Hz, 1H); 3,32 (ddd, $J = 1,4; 9,1$ e $14,3$ Hz, 1H); 3,64 (dt, $J = 7,0$ e $9,1$ Hz, 1H); 3,74 (s, 3H); 4,82 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 6,70 (dd, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz, 1H); 6,91 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,11 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 7,23-7,32 (m, 5H); 7,59 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,7; 48,4; 52,1; 58,3; 103,7; 110,7; 112,2; 117,5; 124,9; 127,3; 127,8; 127,9; 128,9; 136,4; 138,0; 142,5; 144,2; 149,7; 174,8.

Espectro 47. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 84.





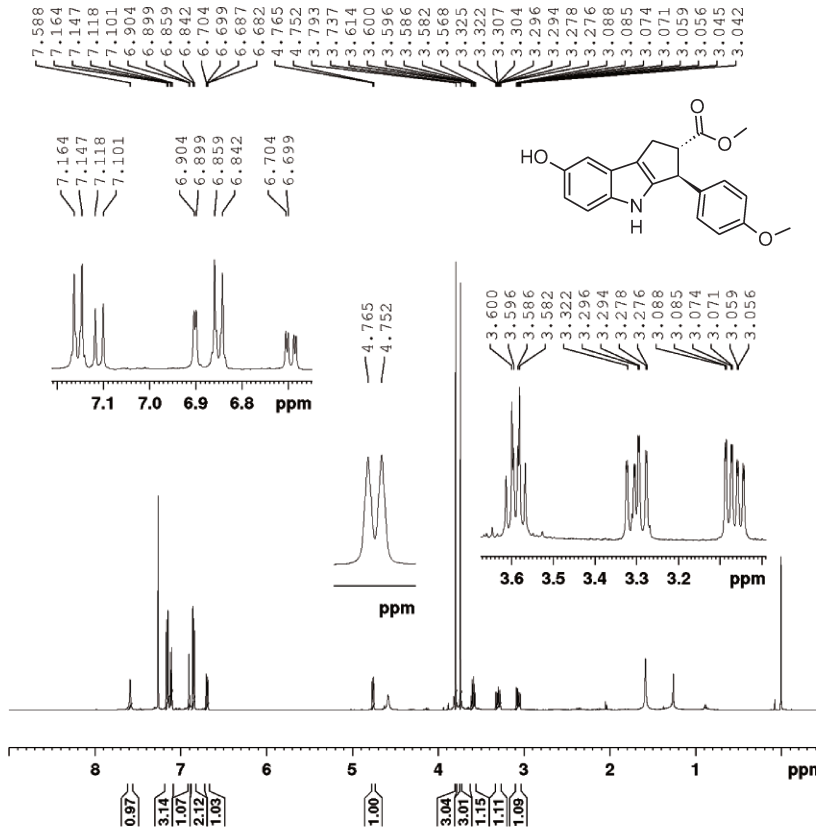
Composto 85: 7-hidróxi-3-(4-metóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila



Tempo reacional: 5 h; **Rendimento:** 60%; **Característica:** sólido cinza; **IV (filme):** 3465, 3397, 1716, 1245, 736 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,06 (ddd, $J = 1,4; 7,1$ e 14,3 Hz, 1H); 3,30 (ddd, $J = 1,4; 9,1$ e 14,3 Hz, 1H); 3,59 (dt, $J = 7,1$ e 9,0 Hz, 1H); 3,74 (s, 3H); 3,79 (s, 3H); 4,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 6,69 (dd, $J = 2,5$ e 8,5 Hz, 1H); 6,85 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 6,90 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,11 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 7,59 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,7; 29,7; 47,7; 52,0; 55,4; 58,5; 103,7; 110,6; 112,2; 114,2; 117,2; 125,0; 128,9; 134,5; 136,3; 144,5; 149,7; 158,9; 174,9; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 338,1392, encontrado: 338,1337; **P.F:** 92°C.

Espectro 49. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 85.

Daniara Metoxi Desprot cdcl3 av500 MHz ago26dcfH1



```
Current Data Parameters
NAME      ago26dcfH1
EXPNO    1
PROCNO   1

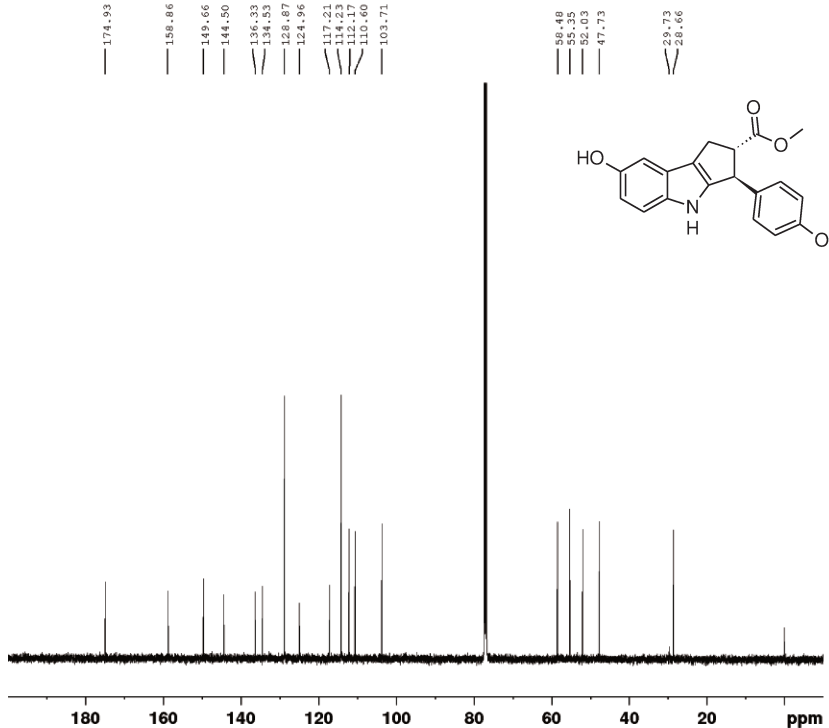
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20130826
Time     11.16
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD       32768
SOLVENT  cdcl3
NS       32
DS       2
SWH      10000.000 Hz
FIDRES   0.305176 Hz
AQ       1.6384000 sec
RG       161
DM       50.000 usec
DE       6.50 usec
TE       298.2 K
D1       1.0000000 sec
TD0      1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1    499.8730869 MHz
NUC1     1H
P1       11.75 usec
PLW1     25.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       499.8700172 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       1.00
```

Espectro 50. RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto 85.

Daniara Metoxi Desprot cdcl3 av500 MHz ago26dcfH1 - 13C



```
Current Data Parameters
NAME      ago26dcfH1
EXPNO    2
PROCNO   1

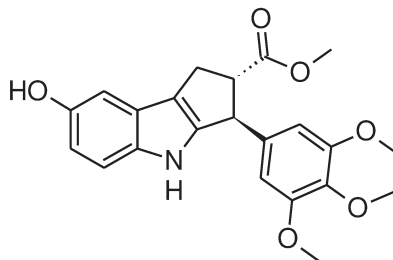
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20130826
Time     12.06
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  cdcl3
NS       2560
DS       4
SWH      29761.904 Hz
FIDRES   0.908261 Hz
AQ       0.5505224 sec
RG       2050
DM       16.800 usec
DE       6.50 usec
TE       298.1 K
D1       2.0000000 sec
D11      0.0300000 sec
TD0      1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1    125.7049801 MHz
NUC1     13C
P1       10.00 usec
PLW1     91.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2    499.8719995 MHz
NUC2     1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2    80.00 usec
PLW2     26.85300064 W
PLW12    0.57928002 W
PLW13    0.37074000 W

F2 - Processing parameters
SI       131072
SF       125.6924110 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
```

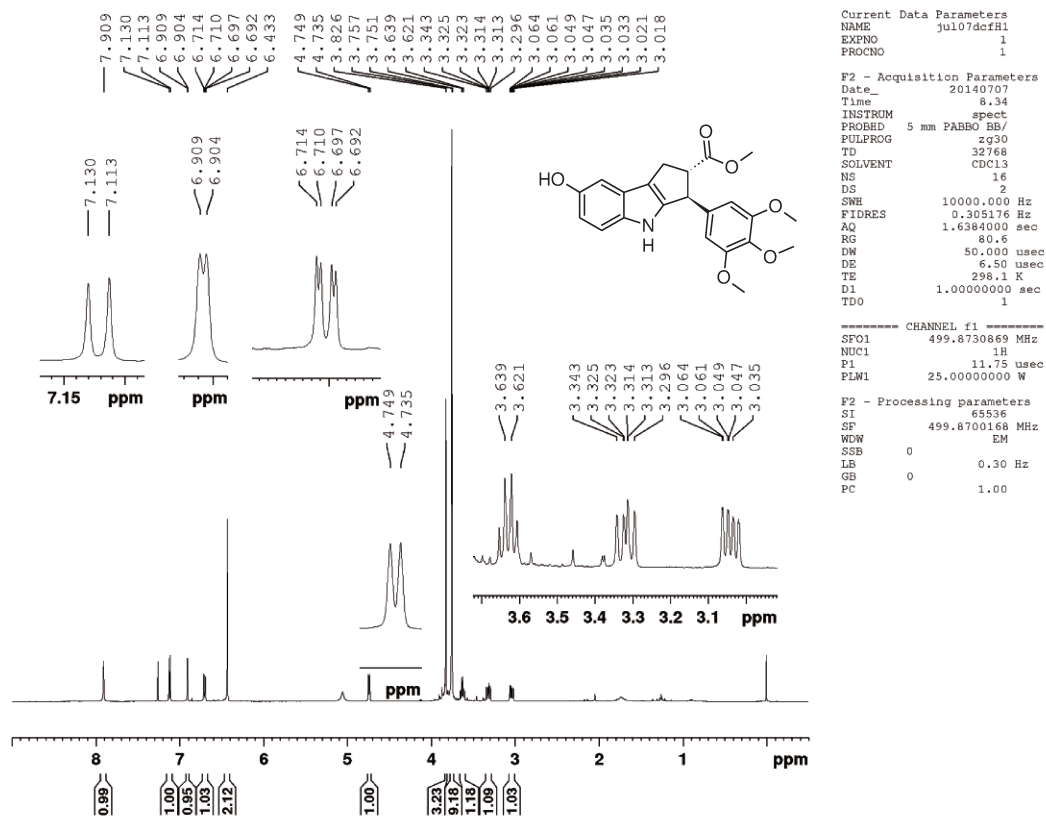

Composto 86: 7-hidróxi-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxilato de metila

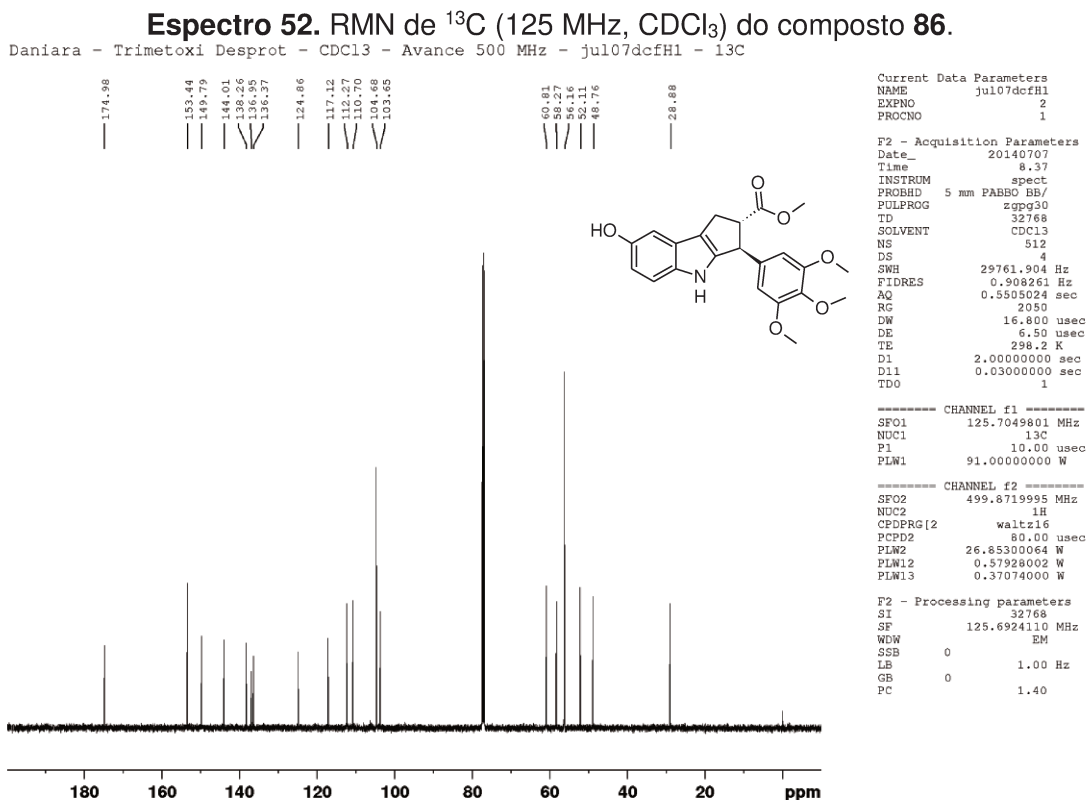


Tempo reacional: 1,5 h; **Rendimento:** 77%; **Característica:** sólido marrom; **IV (filme):** 3397, 1736, 1142, 787 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,04 (ddd, $J = 1,2; 7,4$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,29-3,34 (m, 1H); 3,61-3,65 (m, 1H); 3,76 (s, 9H); 3,83 (s, 3H); 4,74 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H); 6,43 (s, 2H); 6,70 (dd, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz, 1H); 6,90 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,12 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 7,91 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,9; 47,8; 52,1; 56,2; 58,3; 60,8; 103,7; 104,7; 110,7; 112,3; 117,1; 124,9; 136,4; 137,0; 138,3; 144,0; 149,8; 153,4; 175,0; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 398, 1637, encontrado: 398,1628; **P.F:** 90°C .

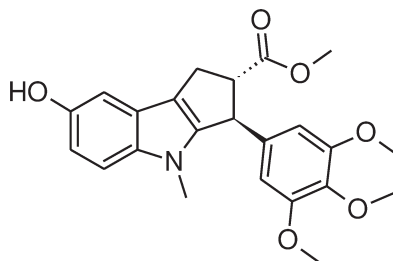
Espectro 51. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 86.

Daniara - Trimetoxi Desprot - CDCl_3 - Avance 500 MHz - jul07dcfH1 - ^1H





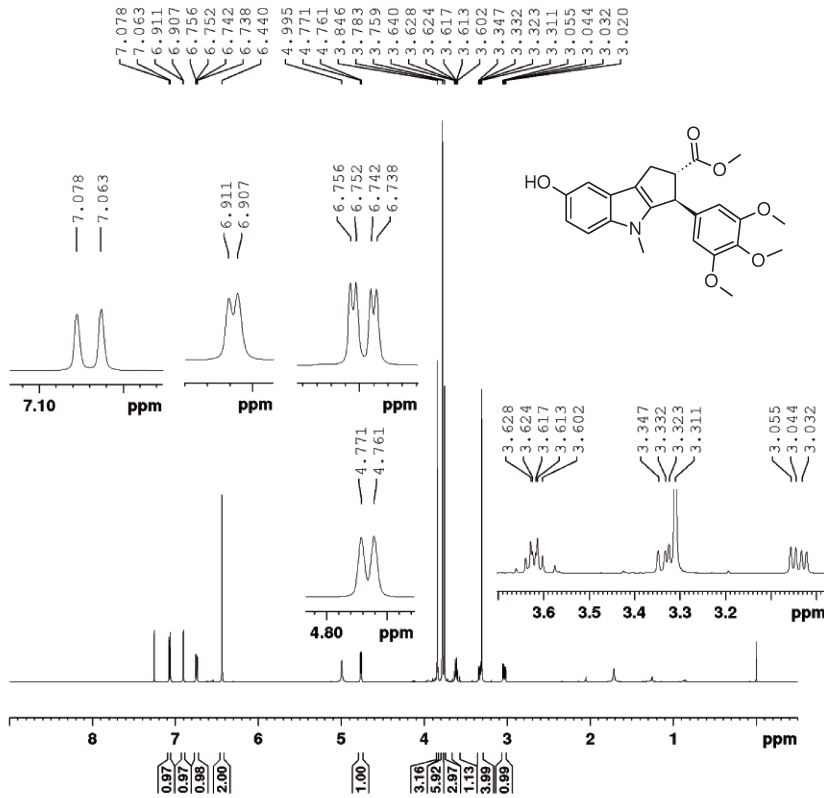
Composto 87: 7-hidróxi-4-metil-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila



Tempo reacional: 1 h; **Rendimento:** 81%; **Característica:** sólido marrom claro; **IV (filme):** 3448, 2953, 1722, 1590, 1463, 1422, 1232, 1126; **RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3):** δ 3,04 (dd, $J = 6,7$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,31 (s, 3H); 3,32-3,35 (m, 1H); 3,62 (dt, $J = 6,7$ e $9,1$ Hz, 1H); 3,64 (s, 3H); 3,76 (s, 6H); 3,78 (s, 3H); 4,77 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 6,44 (s, 2H); 6,75 (dd, $J = 1,1$ e $4,4$ Hz, 1H); 6,91 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,07 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3):** δ 28,6; 30,7; 48,3; 52,1; 56,2; 58,4; 60,9; 103,7; 104,5; 110,1; 110,2; 115,3; 124,2; 137,0; 137,3; 138,5; 145,3; 149,6; 153,6; 175,1; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 434,1580, encontrado: 434,1592; **P.F:** 159°C .

Espectro 53. RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) do composto 87.

Daniara "Indol Metilado Desprot." CDCl₃ / Av 600 MHz - mai09dcpH1



Current Data Parameters
 NAME mai09dcpH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

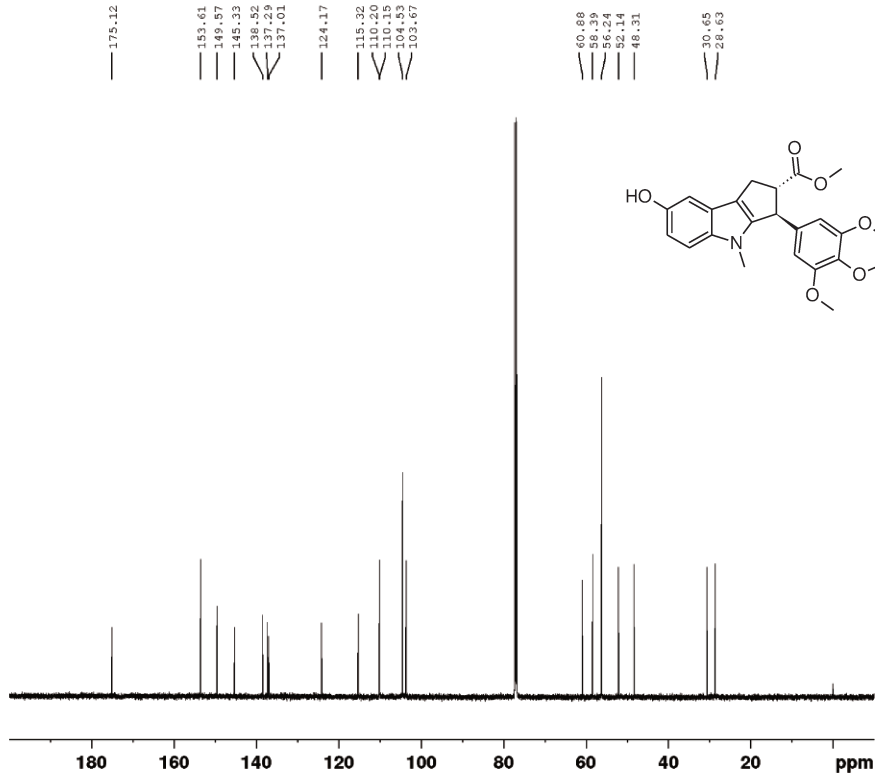
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140509
 Time 17.23
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm TBI 1H/13
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 12335.526 Hz
 FIDRES 0.186225 Hz
 AQ 2.6563926 sec
 RG 64
 DW 40.533 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 600.1737063 MHz
 NUC1 1H
 P1 7.38 usec
 PLW1 9.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 600.1700163 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 54. RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃) do composto 87.

Daniara "Indol Metilado Desprot." CDCl₃ / Av 600 MHz - mai09dcpH1



Current Data Parameters
 NAME mai09dcpH1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

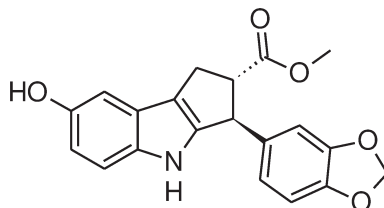
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140509
 Time 17.56
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm TBI 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 1024
 DS 0
 SWH 36057.691 Hz
 FIDRES 1.100393 Hz
 AQ 0.4543829 sec
 RG 203
 DW 13.867 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.1 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 150.9279571 MHz
 NUC1 13C
 P1 16.50 usec
 PLW1 95.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
 SFO2 600.1724007 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waitz16
 PCPD2 70.00 usec
 PLW2 9.00000000 W
 PLW12 0.09990100 W
 PLW13 0.04895200 W

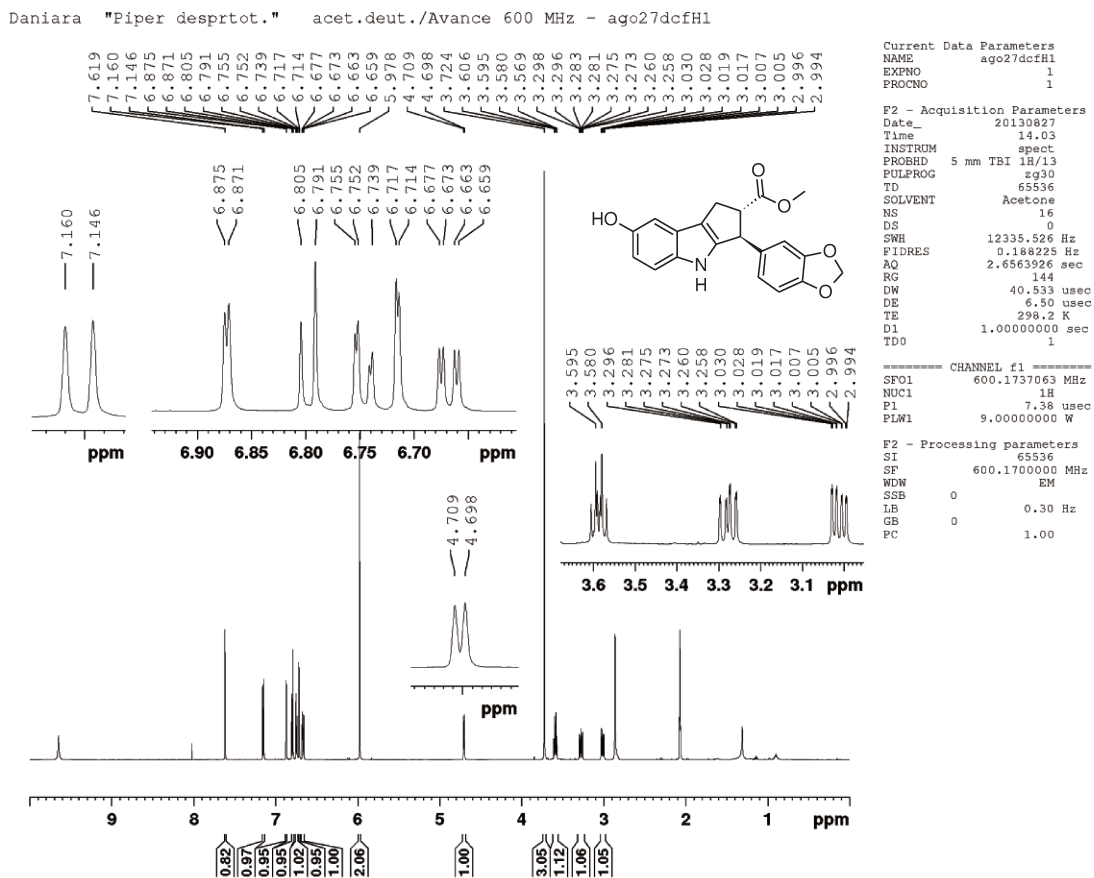
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 150.9128670 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

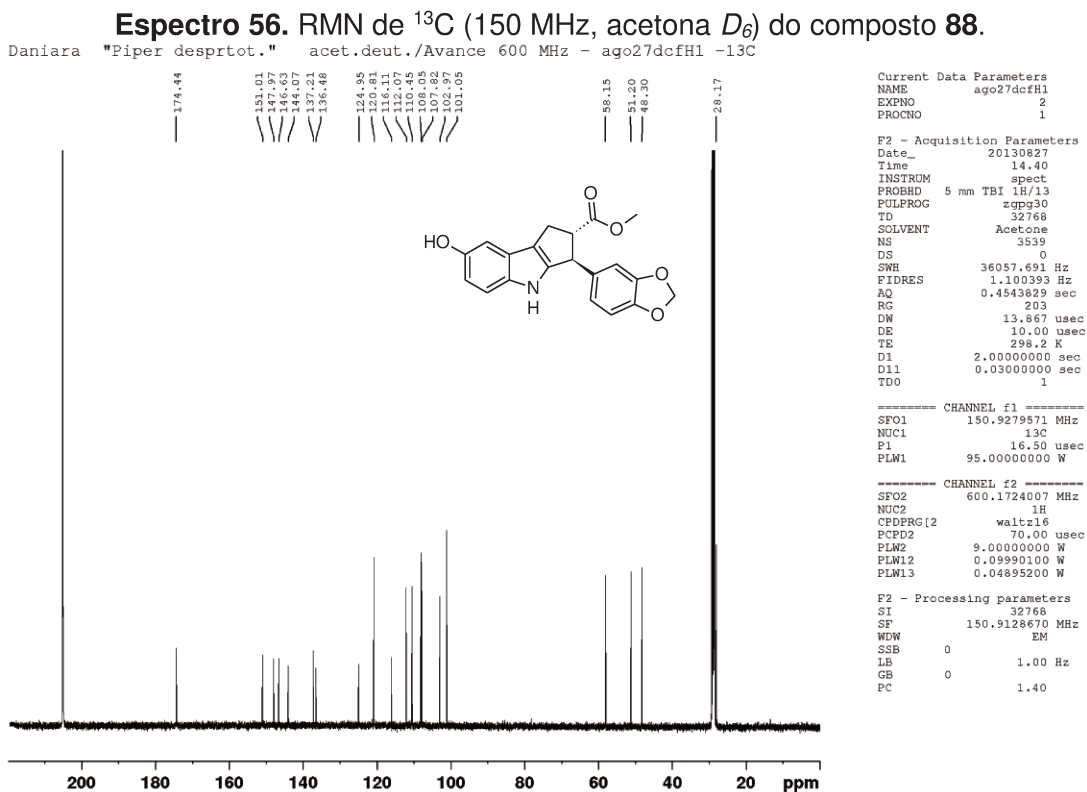
Composto 88: 3-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)-7-hidróxi-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxilato de metila



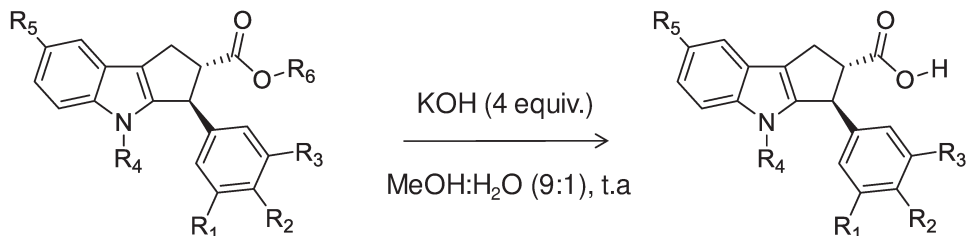
Tempo reacional: 1 h; Rendimento: 72%; Característica: sólido marrom claro; RMN de ^1H (600 MHz, acetona D_6): δ 3,01 (ddd, $J = 1,3; 6,5$ e $14,1$ Hz, 1H); 3,28 (ddd, $J = 1,3; 9,0$ e $14,1$ Hz, 1H); 3,59 (dt, $J = 6,5$ e $8,9$ Hz, 1H); 3,72 (s, 3H); 4,70 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 5,98 (s, 2H); 6,67 (dd, $J = 2,4$ e $8,4$ Hz, 1H); 6,71 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 6,75 (m, 1H); 6,80 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 6,87 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,62 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, acetona D_6):** δ 28,2; 48,3; 51,2; 58,2; 101,1; 103,0; 107,8; 108,1; 110,5; 112,1; 116,1; 120,8; 125,0; 136,5; 137,2; 144,1; 146,6; 148,0; 151,0; 174,4; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 374,1004, encontrado: 374,1012.

Espectro 55. RMN de ^1H (600 MHz, acetona D_6) do composto 88.



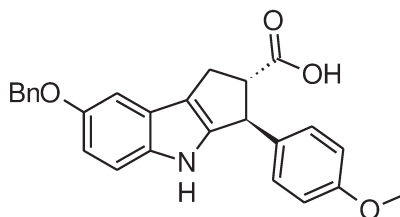


6.1.2.6. Procedimento geral de hidrólise dos ciclopenta[b]indóis

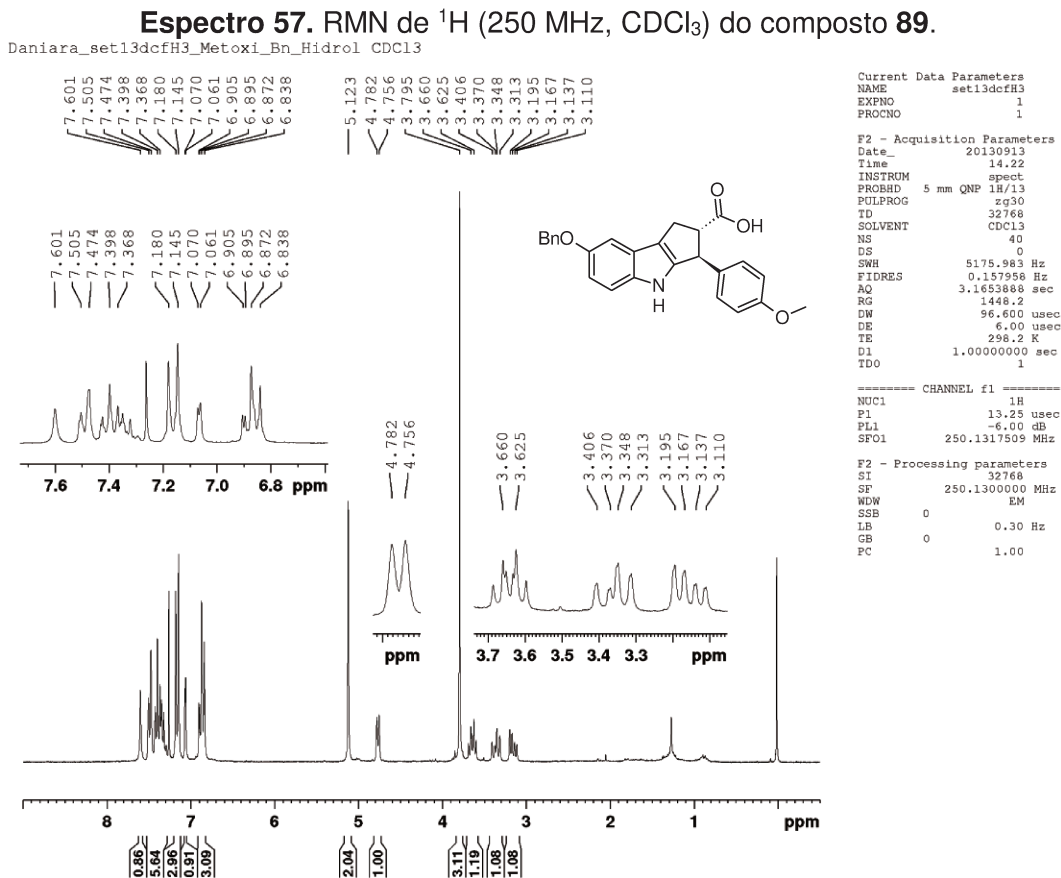


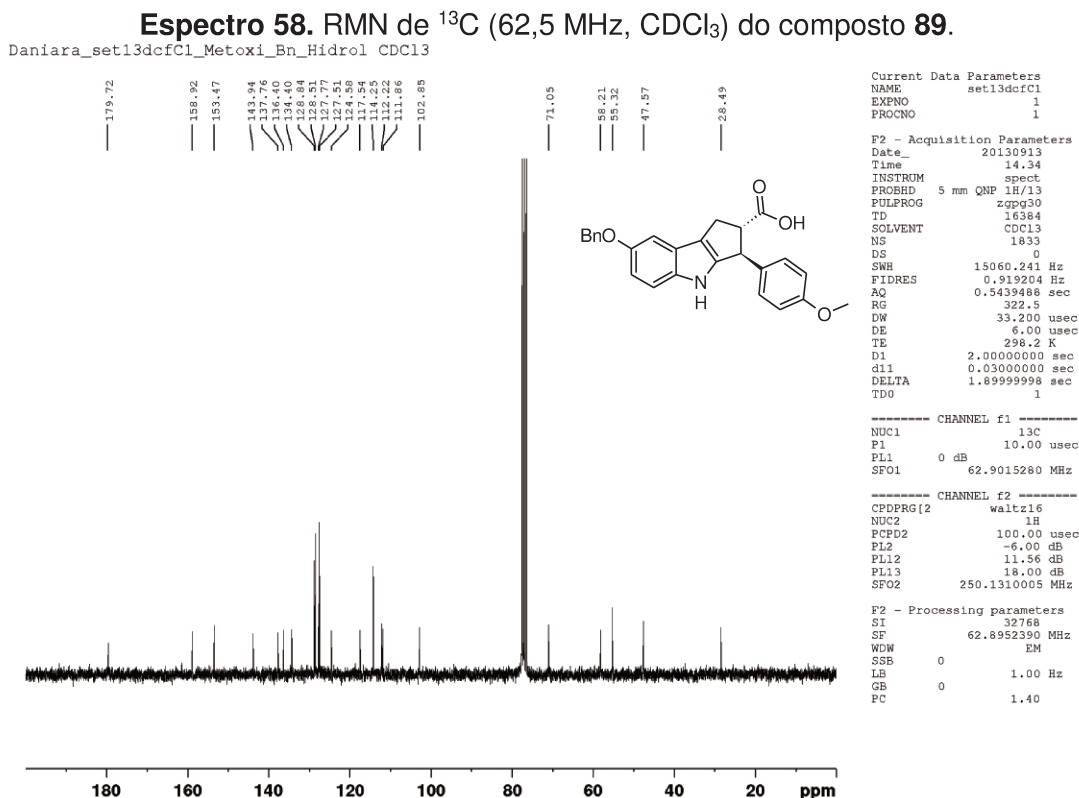
Os compostos **77**, **78**, **80**, **81**, **82**, **83**, **85**, **86**, **87** e **88** (0,2 equiv.) foram dissolvidos em uma mistura de MeOH:H₂O (9:1)/KOH (0,4 equiv.) e deixada sob agitação magnética e temperatura ambiente por 3 dias. O solvente foi evaporado e o bruto foi dissolvido em acetato de etila e lavado com HCl 10% (25 mL), H₂O (2 x 25 mL) e solução saturada de NaCl (25 mL), sucessivamente. A fase orgânica foi seca sob Na₂SO₄ anidro e o solvente foi retirado sob pressão reduzida para fornecer os produtos **89-98**.

Composto 89: Ácido 7-(benzilóxi)-3-(4-metóxfenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxílico

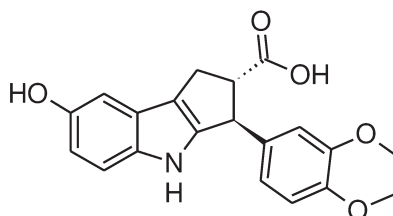


Tempo reacional: 72 h; **Rendimento:** 65%; **Característica:** sólido marrom; **IV (filme):** 3445; 1634, 1174, 1026 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 3,11-3,19 (m, 1H); 3,31-3,41 (m, 1H); 3,64 (dt, $J = 6,7$ e $8,9$ Hz, 1H); 3,80 (s, 3H); 4,77 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H); 6,84-6,91 (m, 3H); 7,07 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H); 7,37-7,51 (m, 7H); 7,60 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3):** δ 28,5; 47,6; 55,3; 58,2; 71,1; 102,9; 111,9; 112,2; 114,3; 117,5; 124,6; 127,5; 127,8; 128,5; 128,8; 134,4; 136,4; 137,8; 143,9; 153,5; 159,0; 179,7; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 436,1525, encontrado: 436,1534; $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{Na}$: 374,1004, encontrado: 374,1012.





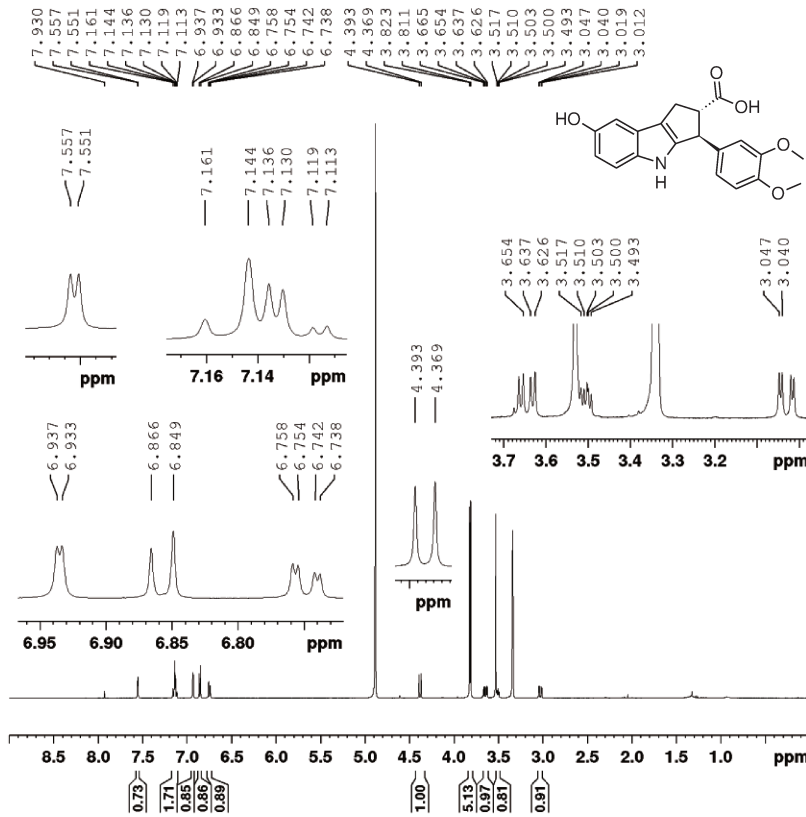
Composto 90: Ácido 3-(3,4-dimetóxiifenil)-7-hidróxi-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxílico



Tempo reacional: 72 h; Rendimento: 62%; Característica: sólido marrom; RMN de ^1H (500 MHz, MeOD): δ 3,03 (dd, $J = 3,5$ e $14,0$, 1H); 3,49-3,52 (m, 1H); 3,65 (dd, $J = 5,2$ e $14,0$ Hz, 1H); 3,82 (s, 6H); 4,35 (d, $J = 12,5$ Hz, 1H); 6,75 (dd, $J = 2,0$ e $8,0$ Hz, 1H); 6,83 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 6,91 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,10-7,11 (m, 2H); 7,52 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,90 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD):** δ 46,2; 52,2; 55,0; 55,1; 111,1; 112,9; 115,8; 121,6; 121,6; 128,1; 128,6; 129,5; 134,3; 148,7; 156,3; 172,2; 173,7; 195,7.

Espectro 59. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 90.

Daniara "dimetoxi desprot.-Hidrolise" cd3od/ av500 MHz set13dcfH1



Current Data Parameters
 NAME set13dcfH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

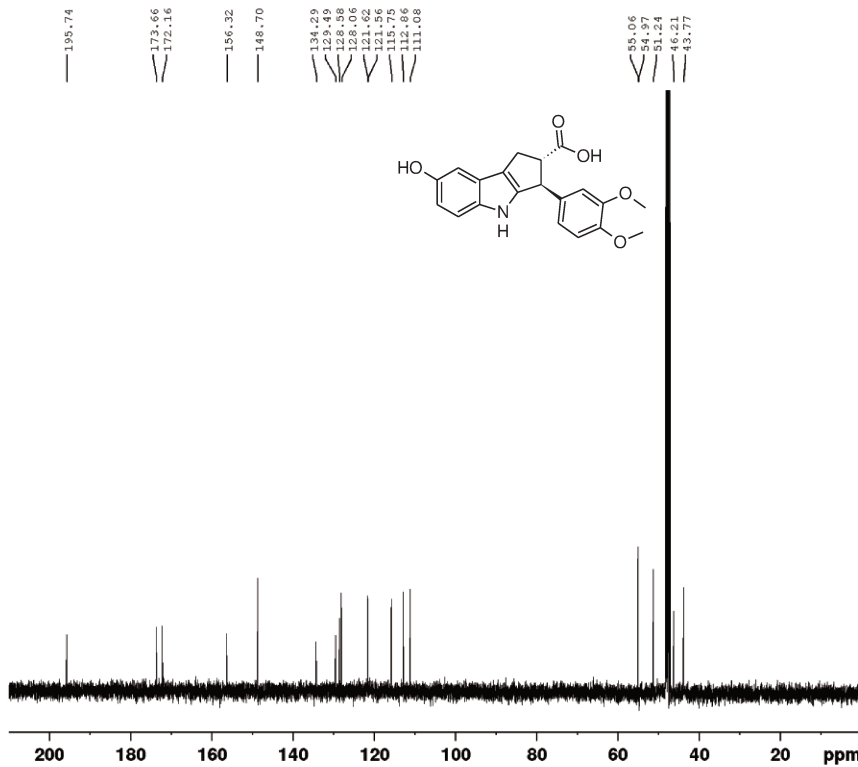
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130913
 Time 15.12
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 16
 DS 0
 SWH 10302.198 Hz
 FIDRES 0.314398 Hz
 AQ 1.5903403 sec
 RG 128
 DW 48.533 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 499.8730869 MHz
 NUC1 1H
 P1 11.75 usec
 PLW1 25.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 6536
 SF 499.8699997 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 60. RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD) do composto 90.

Daniara "dimetoxi desprot.-Hidrolise" cd3od/ av500 MHz set13dcfH1- 13C



Current Data Parameters
 NAME set13dcfH1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

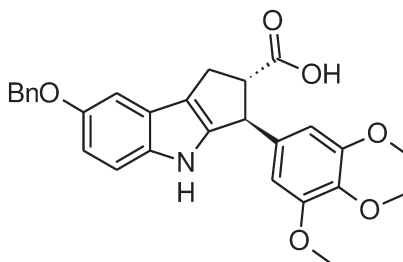
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130913
 Time 17.40
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 2531
 DS 0
 SWH 32894.738 Hz
 FIDRES 1.003868 Hz
 AQ 0.4980736 sec
 RG 2050
 DW 15.200 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 125.7062372 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 91.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
 SFO2 499.8719995 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 26.85300064 W
 PLW12 0.57928002 W
 PLW13 0.37074000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.6924110 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

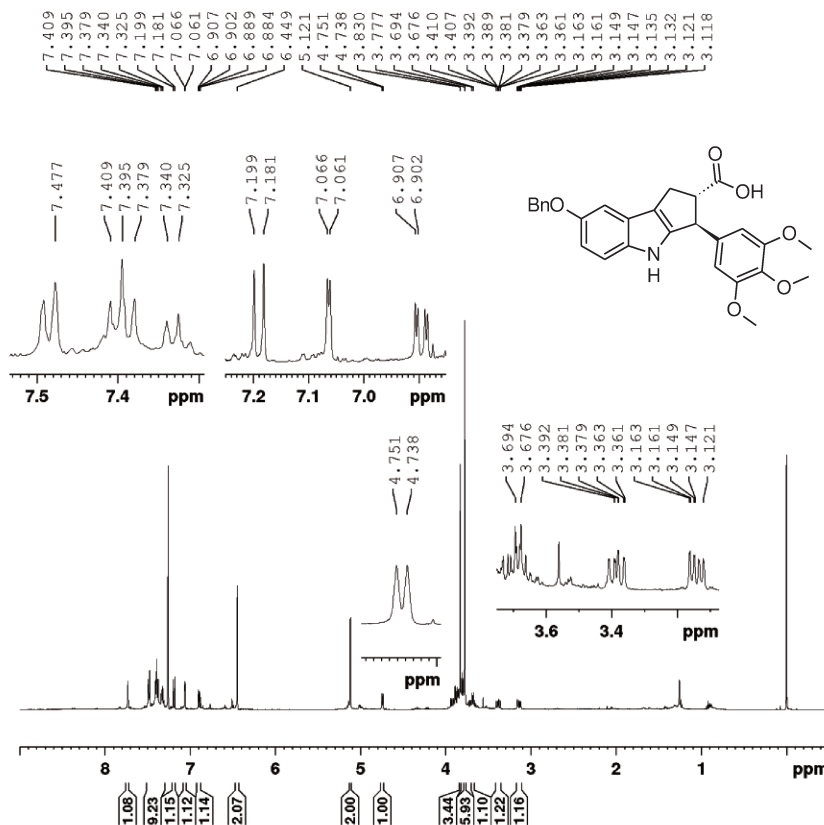
Composto 91: Ácido 7-(benzilóxi)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxílico



Tempo reacional: 72 h; Rendimento: 93%; Característica: sólido marrom; IV (filme): 3386, 2930, 1691, 1588, 1128, 693; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,14 (ddd, $J = 1,2; 7,0$ e $14,4$ Hz, 1H); 3,39 (ddd, $J = 1,2; 9,0$ e $14,4$ Hz, 1H); 3,66-3,71 (m, 1H); 3,78 (s, 6H); 3,83 (s, 3H); 4,74 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H); 6,45 (s, 2H); 6,90 (dd, $J = 2,5$ e $9,0$ Hz, 1H); 7,06 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,19 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,33-7,41 (m, 8H); 7,52 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,77 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,8; 29,7; 48,7; 56,2; 57,9; 60,9; 71,0; 102,8; 104,7; 112,0; 112,4; 117,6; 124,5; 127,6; 127,7; 127,8; 128,6; 128,8; 136,4; 137,2; 138,0; 143,5; 153,6; 178,6; **P.F:** 187°C .

Espectro 61. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 91.

Daniara Trimetoxi-Bn-Hid-16-17 cdcl3 av500 MHz ago26dcfH2

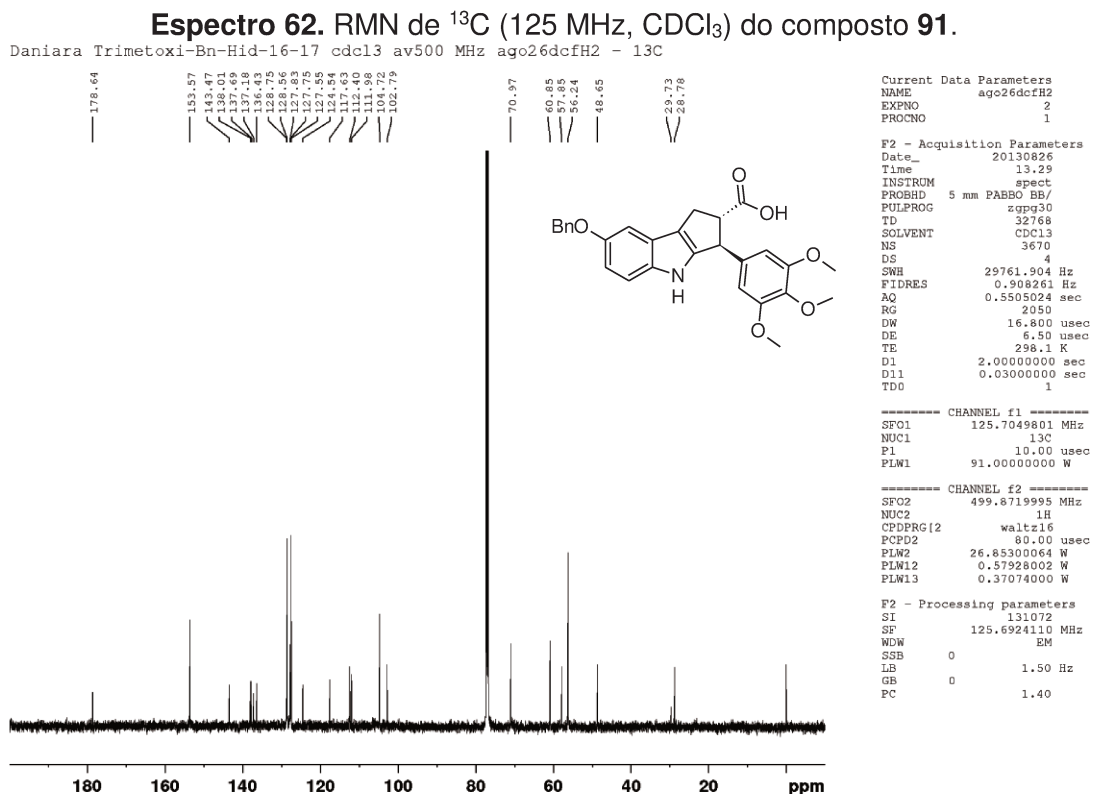


Current Data Parameters
NAME ago26dcfH2
EXPNO 1
PROCNO 1

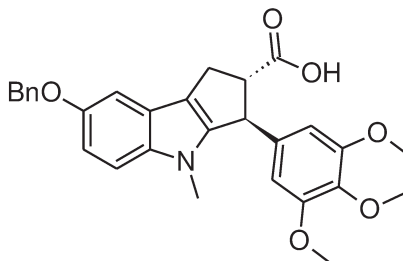
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130826
Time 13.13
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 1.6384000 sec
RG 161
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 298.1 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 499.8730869 MHz
NUC1 1H
P1 11.75 usec
PLW1 25.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 499.8700174 MHz
WDW EM
SSB 0
GB 0
PC 1.00



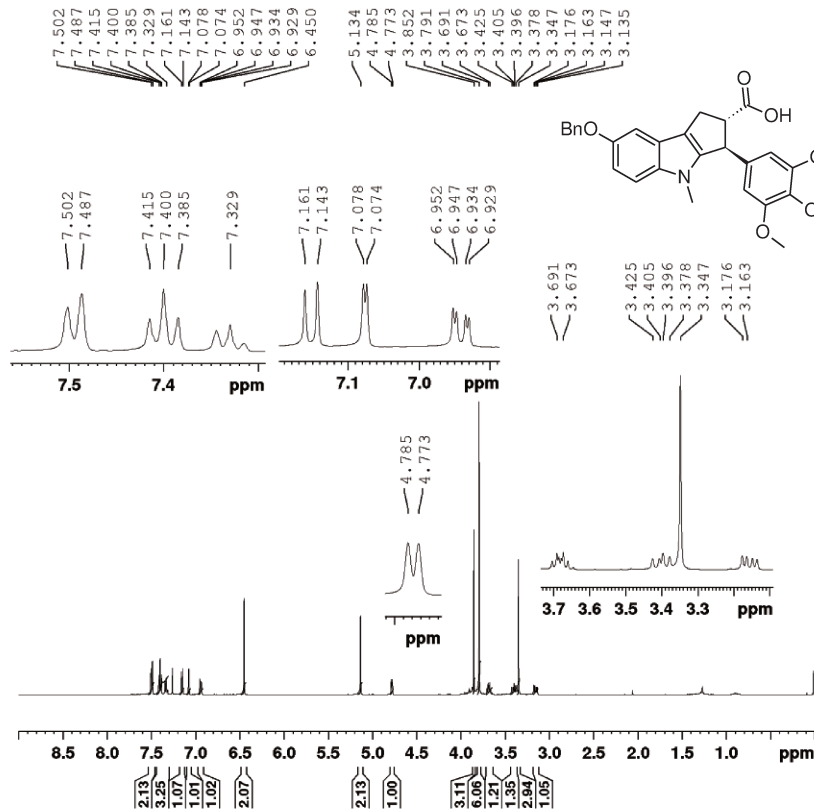
Composto 92: Ácido 7-(benzilóxi)-4-metil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxílico



Tempo reacional: 72 h; Rendimento: 55%; Característica: sólido marrom; IV (filme): 3187, 2934, 1736, 1466, 1128, 696 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 3,16 (dd, $J = 6,3$ e $14,3$ Hz, 1H); 3,35 (s, 3H); 3,38-3,42 (m, 1H); 3,68 (dt, $J = 6,3$ e $9,1$ Hz, 1H); 3,79 (s, 6H); 3,85 (s, 3H); 4,78 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 5,13 (s, 2H); 6,45 (s, 2H); 6,94 (dd, $J = 2,5$ e $9,0$ Hz, 1H); 7,08 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,15 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,33-7,42 (m, 3H); 7,49 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,7; 30,7; 48,2; 56,3; 58,1; 60,9; 71,1; 102,9; 104,6; 110,3; 111,5; 115,7; 123,8; 127,6; 127,8; 128,6; 137,2; 137,4; 137,8; 138,3; 144,9; 153,3; 153,7; 180,2; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 510, 1893, encontrado: 510,1895; **P.F:** 198°C.

Espectro 63. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 92.

Daniara "indol metilado Bn-hidrolise" cdcl3/Av500Mhz abr25dcfH1



Current Data Parameters
 NAME abr25dcfH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

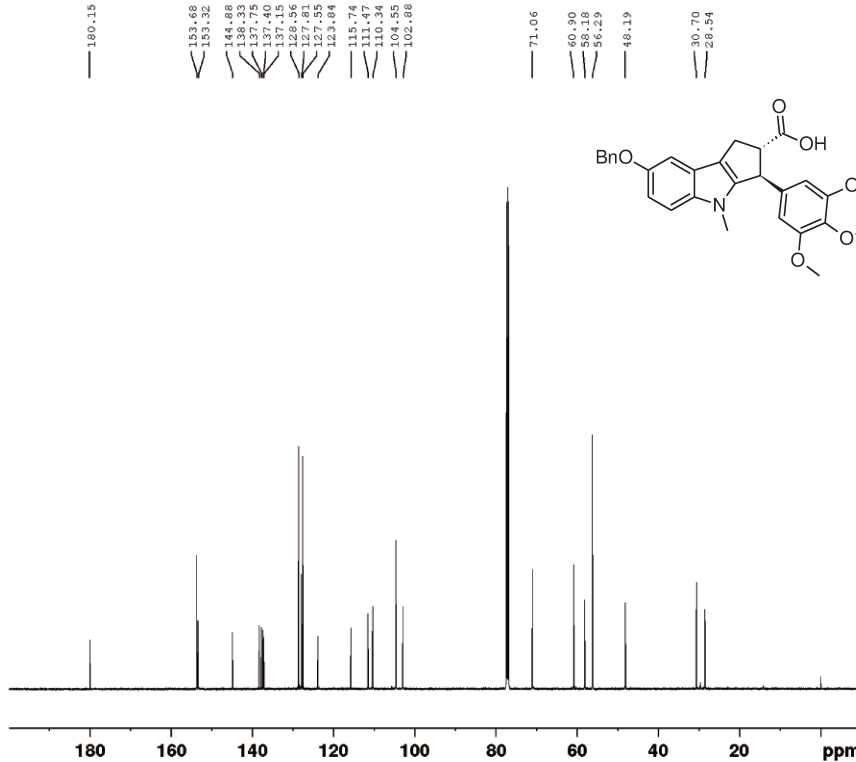
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140426
 Time 15:53
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 32
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.305176 Hz
 AQ 1.6384000 sec
 RG 80.6
 DW 50.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 SFO1 499.8730869 MHz
 NUC1 1H
 P1 11.75 usec
 PLW1 25.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 499.8700169 MHz
 WDN EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 64. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 92.

Daniara "indol metilado Bn-hidrolise" cdcl3/Av500Mhz abr25dcfH1 - 13C



Current Data Parameters
 NAME abr25dcfH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

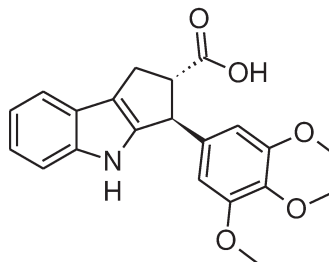
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140426
 Time 19:36
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 5120
 DS 4
 SWH 29761.904 Hz
 FIDRES 0.908261 Hz
 AQ 0.5505024 sec
 RG 2050
 DW 16.800 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

CHANNEL f1
 SFO1 125.7049801 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 91.00000000 W

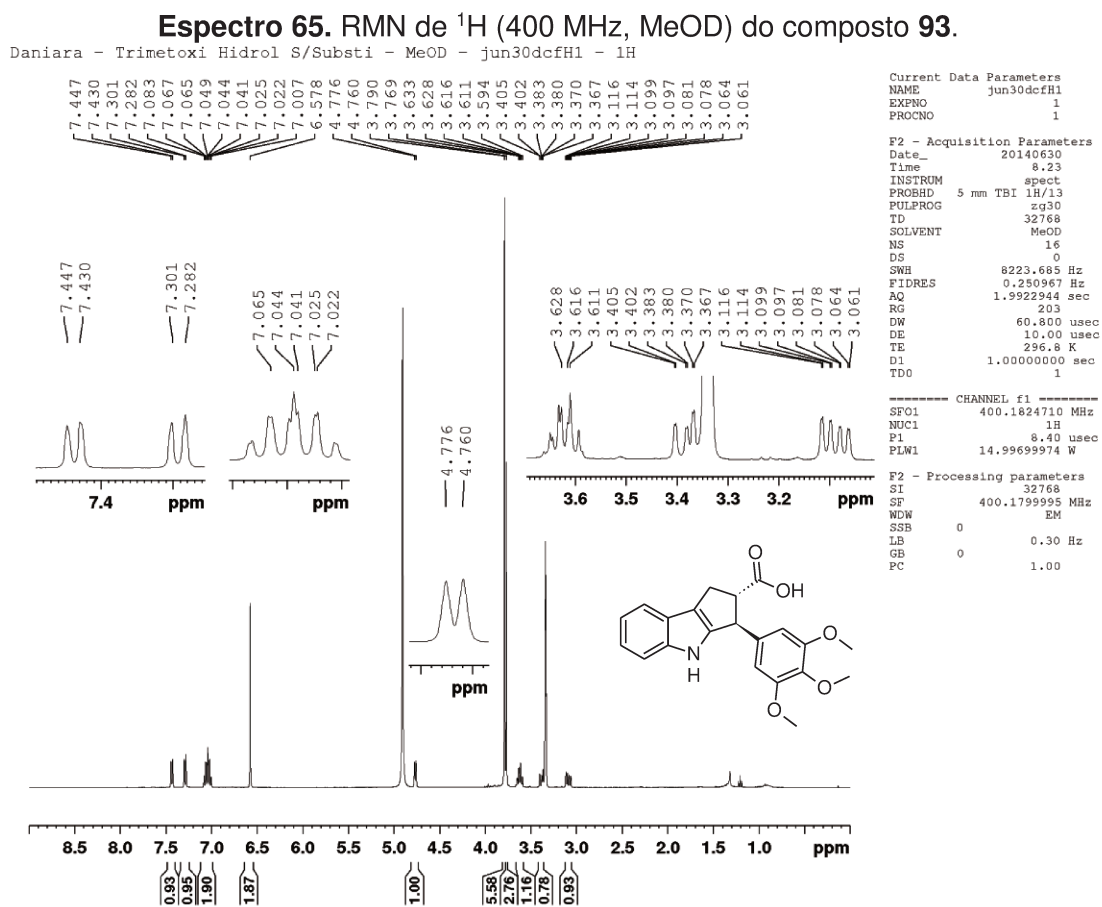
CHANNEL f2
 SFO2 499.8719995 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 26.85300064 W
 PLW12 0.57928002 W
 PLW13 0.37074000 W

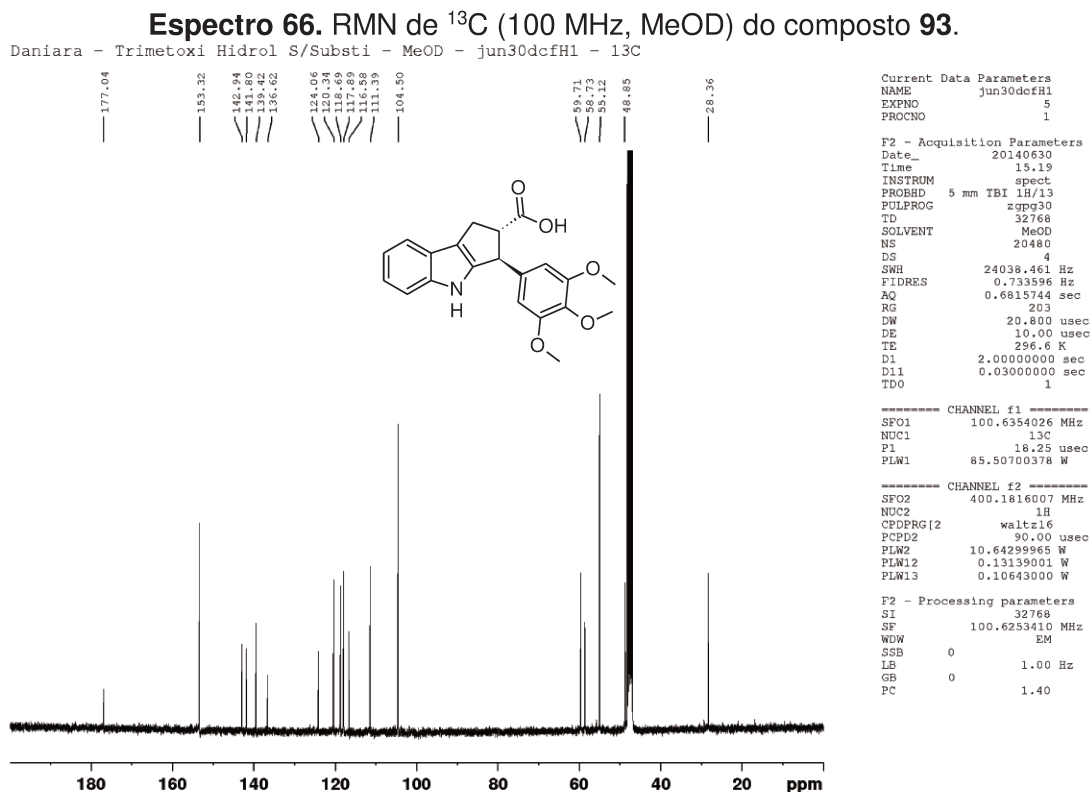
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.6924110 MHz
 WDN EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Composto 93: Ácido 3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxílico

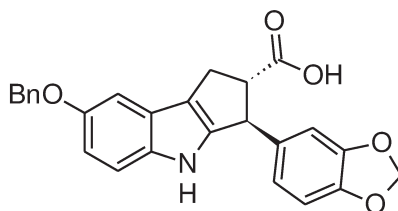


Tempo reacional: 72 h; **Rendimento:** 75%; **Característica:** sólido amarelo claro; **IV (filme):** 3454, 1639 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (400 MHz, MeOD):** δ 3,09 (ddd, $J = 1,1$; 6,8 e 14,2 Hz, 1H); 3,37-3,41 (m, 1H); 3,59-3,63 (m, 1H); 3,77 (s, 3H); 3,79 (s, 6H); 4,77 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H); 6,58 (s, 2H); 7,00-7,08 (m, 2H); 7,29 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,44 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H); **RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD):** δ 28,4; 48,9; 55,1; 58,7; 59,7; 104,5; 111,4; 116,6; 117,9; 118,7; 120,3; 124,1; 136,6; 139,4; 141,8; 142,9; 153,3; 177,0; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 390,1317, encontrado: 390,1315.





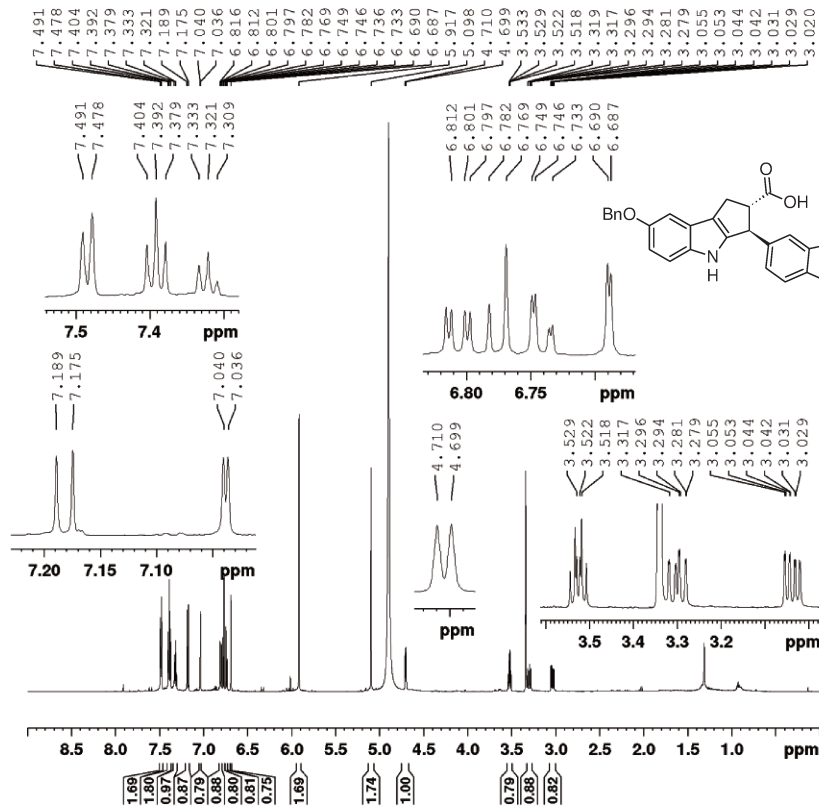
Composto 94: Ácido 3-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)-7-(benzilóxi)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxílico



Tempo reacional: 72 h; Rendimento: 53%; Característica: sólido marrom; IV (filme): 3414, 2899, 1698, 1487, 1247, 1036, 736 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (600 MHz, MeOD):** δ 3,04 (ddd, $J = 1,2; 6,6$ e $14,1$ Hz, 1H); 3,30 (ddd, $J = 1,2, 8,9$ e $14,1$ Hz, 1H); 3,53 (dt, $J = 6,6$ e $8,9$ Hz, 1H); 4,70 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 5,10 (s, 2H); 5,92 (s, 2H); 6,69 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 6,74 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 6,73-6,78 (m, 2H); 6,81 (dd, $J = 2,4$ e $9,0$ Hz, 1H); 7,04 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,18 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,32-7,40 (m, 3H); 7,48 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD):** δ 28,2; 58,7; 70,8; 100,9; 102,3; 107,5; 107,8; 110,8; 111,9; 116,3; 120,5; 124,3; 127,3; 128,0; 137,2; 138,1; 144,2; 146,6; 148,0; 152,9; 177,0; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 450,1317, encontrado: 450,1322; **P.F:** 165°C.

Espectro 67. RMN de ^1H (600 MHz, MeOD) do composto 94.

Daniara "Piper-Bn-Hidrolise" CD3OD/ Av 600 MHz - nov21dcfH1



Current Data Parameters
NAME nov21dcfH1
EXPNO 1
PROCNO 1

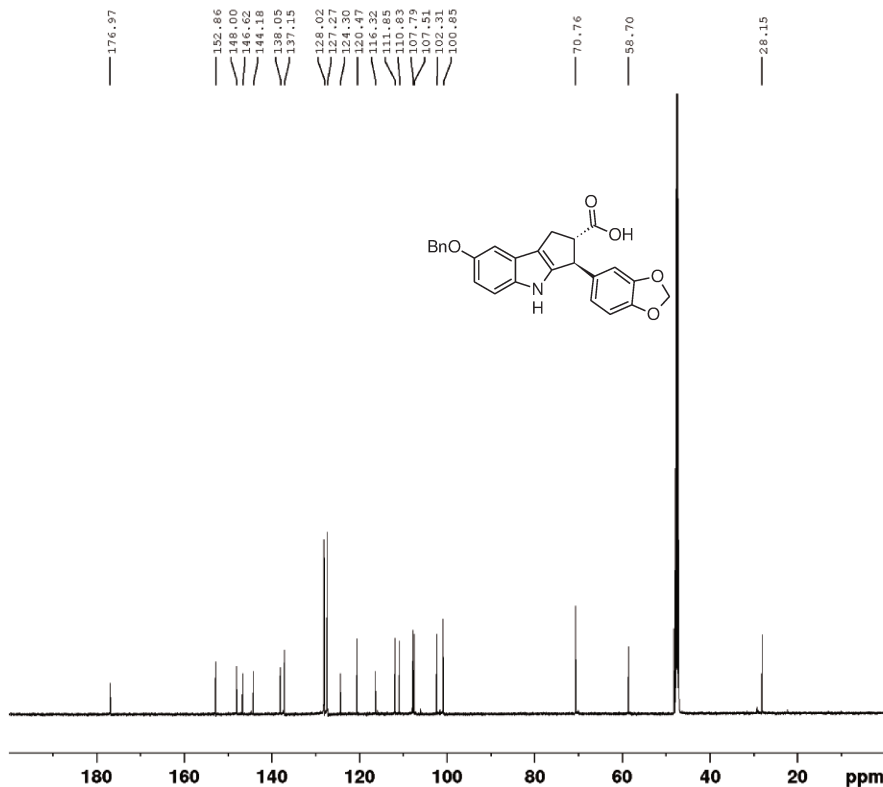
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131121
Time 19.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 0
SWH 12335.526 Hz
FIDRES 0.188225 Hz
AQ 2.6563926 sec
RG 80.6
DW 40.533 usec
DE 6.50 usec
TE 298.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

CHANNEL f1
SFO1 600.1737063 MHz
NUC1 1H
P1 7.38 usec
PLW1 9.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 600.1699945 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Espectro 68. RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD) do composto 94.

Daniara "Piper-Bn-Hidrolise" CD3OD/ Av 600 MHz - nov21dcfH1 - 13C



Current Data Parameters
NAME nov21dcfH1
EXPNO 2
PROCNO 1

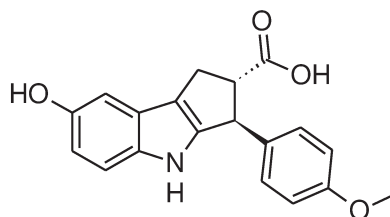
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131122
Time 8.26
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 19147
DS 0
SWH 36057.691 Hz
FIDRES 1.100393 Hz
AQ 0.4543829 sec
RG 203
DW 13.867 usec
DE 10.00 usec
TE 298.1 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TDO 1

CHANNEL f1
SFO1 150.9279571 MHz
NUC1 13C
P1 16.50 usec
PLW1 95.00000000 W

CHANNEL f2
SFO2 600.1724007 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 70.00 usec
PLW2 9.00000000 W
PLW12 0.09990100 W
PLW13 0.04895200 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 150.9128670 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

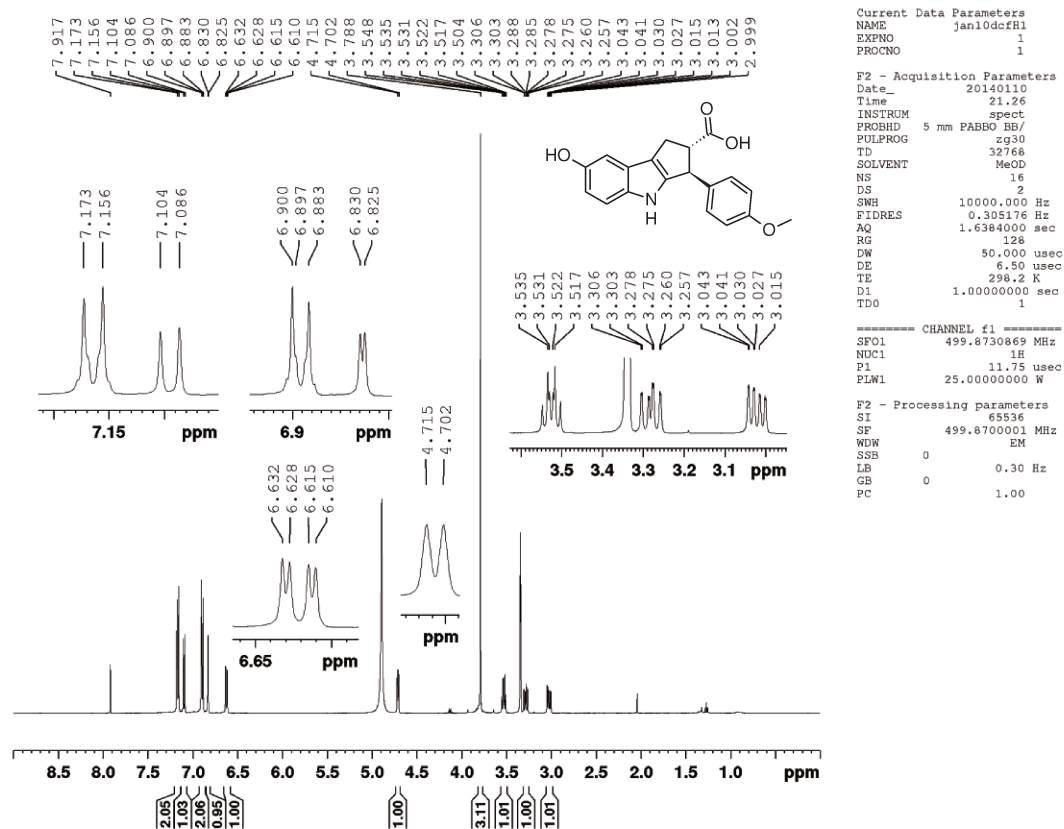
Composto 95: Ácido 7-hidróxi-3-(4-metóxiifenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxílico

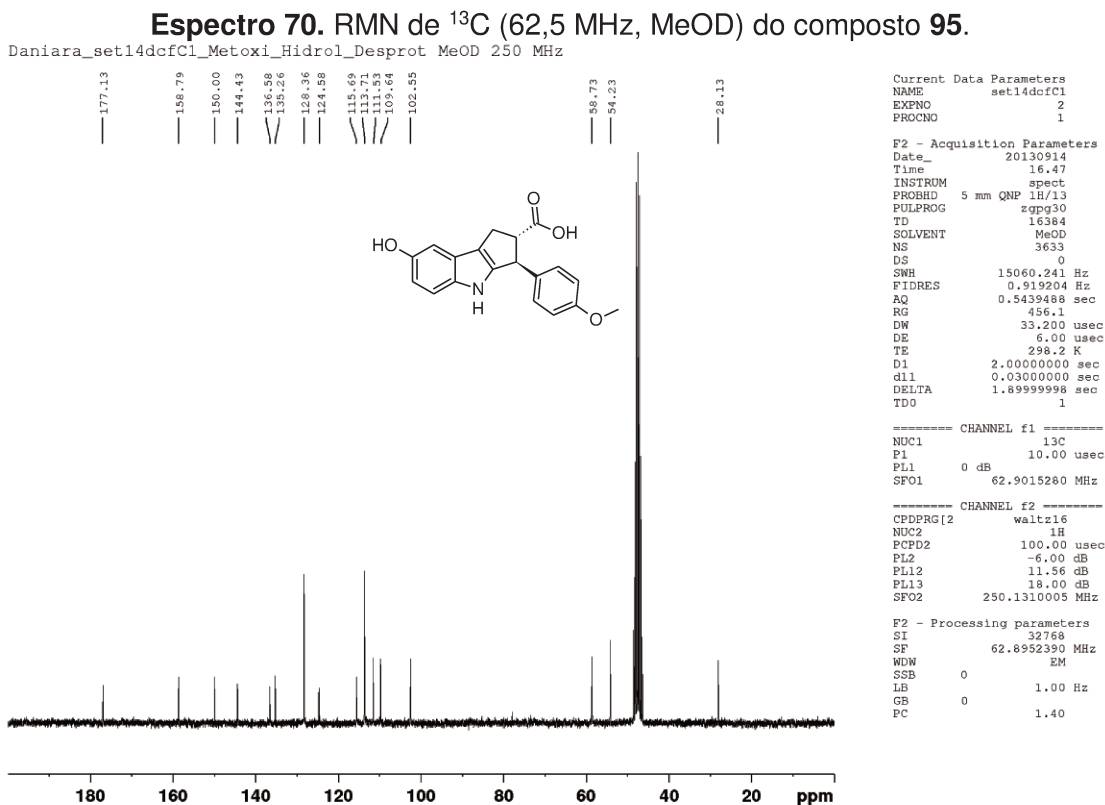


Tempo reacional: 72 h; **Rendimento:** 50%; **Característica:** sólido marrom; **IV (filme):** 3391, 1704, 1511, 1179, 1027 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, MeOD):** δ 3,02 (ddd, $J = 1,2; 6,8$ e $14,1$ Hz, 1H); 3,28 (ddd, $J = 1,2; 9,0$ e $14,1$ Hz, 1H); 3,53 (dt, $J = 6,7$ e $8,9$ Hz, 1H); 3,79 (s, 3H); 4,71 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H); 6,62 (dd, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz, 1H); 6,83 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 6,89 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H); 7,10 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 7,92 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (62,5 MHz, MeOD):** δ 28,1; 54,2; 58,7; 102,6; 109,6; 111,5; 113,7; 115,7; 124,6; 128,4; 135,3; 136,6; 144,4; 150,0; 158,8; 177,1; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 346,1055, encontrado: 346,1059; **P.F:** 119°C.

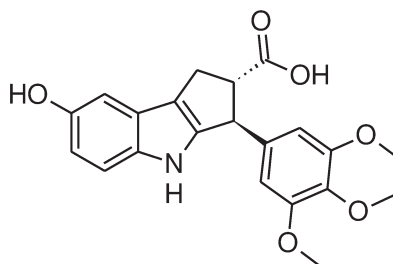
Espectro 69. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 95.

Daniara - Metoxi Hidrolise Desprot - MeOD - av 500 MHz - jan10dcfH1





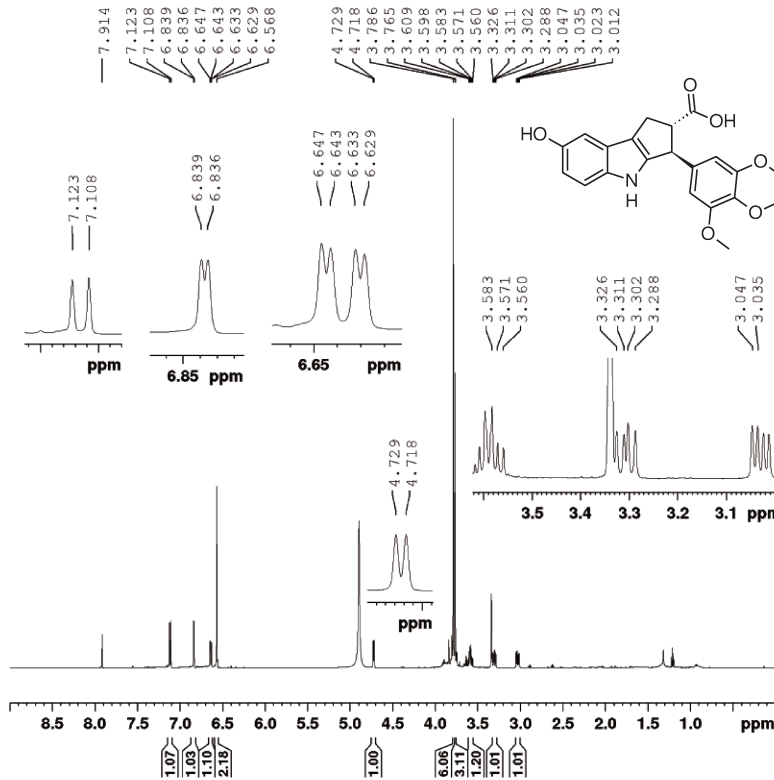
Composto 96: Ácido 7-hidróxi-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxílico



Tempo reacional: 72 h; **Rendimento:** 50%; **Característica:** sólido marrom claro; **RMN de ^1H (600 MHz, MeOD):** δ 3,03 (dd, $J = 7,2$ e $14,4$ Hz, 1H); 3,31 (dd, $J = 9,0$ e $14,4$ Hz, 1H); 3,56-3,61 (m, 1H); 3,77 (s, 3H); 3,79 (s, 6H); 4,72 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H); 6,57 (s, 2H); 6,64 (dd, $J = 2,4$ e $8,4$ Hz, 1H); 6,84 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 7,12 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,91 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD):** δ 28,3; 48,8; 55,1; 58,5; 59,7; 102,5; 104,5; 110,0; 111,7; 115,9; 124,6; 136,6; 136,6; 139,4; 143,8; 150,1; 153,3; 177,0; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 406,3843, encontrado: 406,3301.

Espectro 71. RMN de ^1H (600 MHz, MeOD) do composto 96.

Daniara "Trimetoxi Desprot Hidrolise" MeOD / Av600Mhz - set05dcfH1



Current Data Parameters
 NAME set05dcfH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

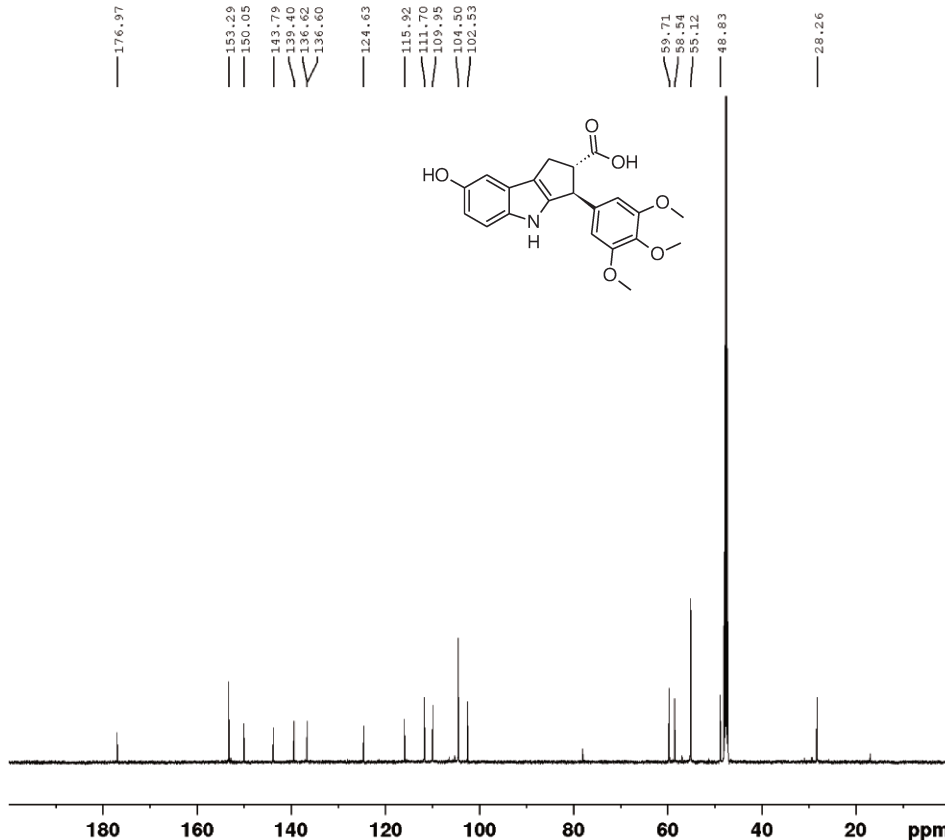
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130905
 Time 11.14
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm TBI 1H/13
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 16
 DS 0
 SWH 12335.526 Hz
 FIDRES 0.188225 Hz
 AQ 2.6563926 sec
 RG 90.5
 DW 40.533 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

CHANNEL f1
 SFO1 600.1737063 MHz
 NUC1 1H
 P1 7.38 usec
 PLW1 9.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 600.1699947 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 72. RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD) do composto 96.

Daniara "Trimetoxi Desprot Hidrolise" MeOD / Av600Mhz - set05dcfH1 13C



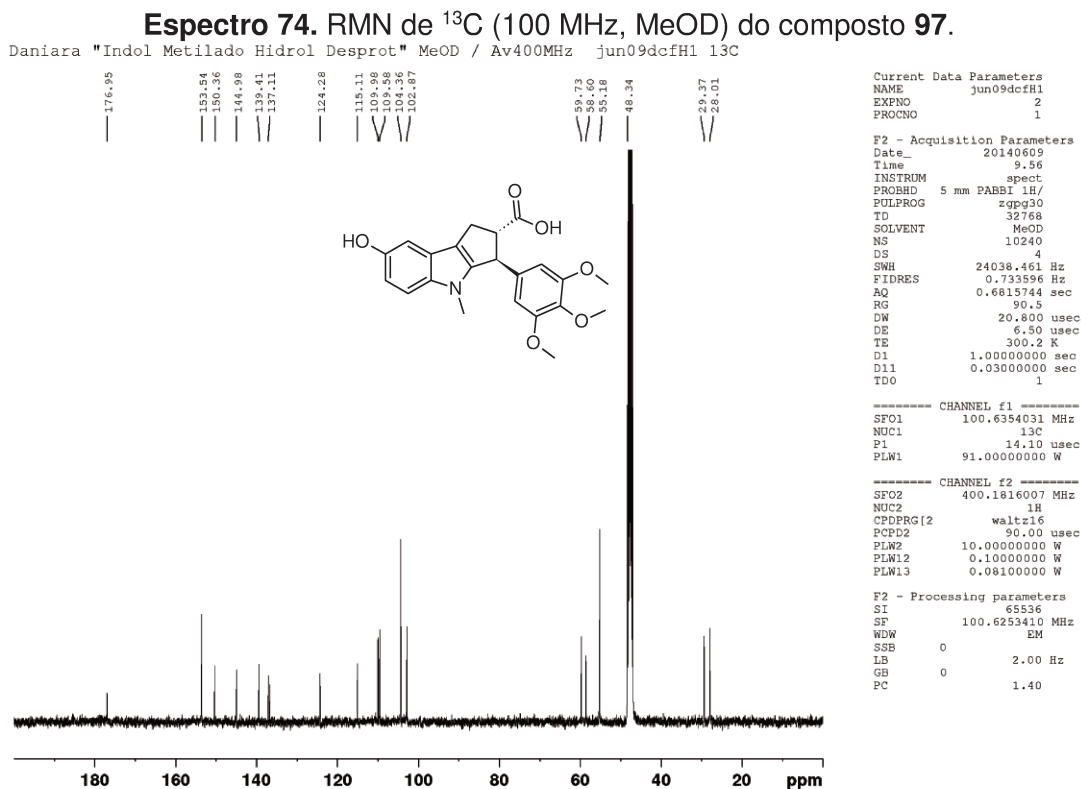
Current Data Parameters
 NAME set05dcfH1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130905
 Time 12.14
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm TBI 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 5120
 DS 0
 SWH 36057.691 Hz
 FIDRES 1.100393 Hz
 AQ 0.4543829 sec
 RG 203
 DW 13.867 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.1 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TD0 1

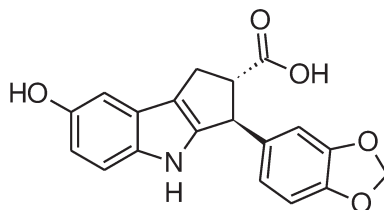
CHANNEL f1
 SFO1 150.9279571 MHz
 NUC1 13C
 P1 16.50 usec
 PLW1 95.00000000 W

CHANNEL f2
 SFO2 600.1724007 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 70.00 usec
 PLW2 9.00000000 W
 PLW12 0.09990100 W
 PLW13 0.04895200 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 150.9128670 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 2.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



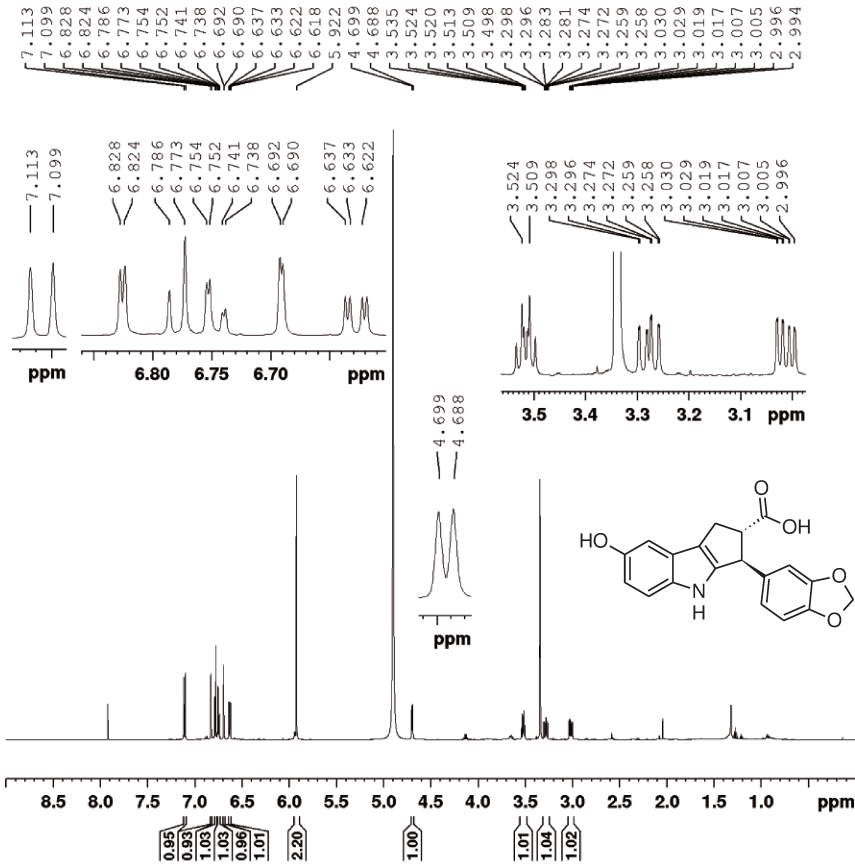
Composto 98: Ácido 7-hidróxi-4-metil-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxílico



Tempo reacional: 72 h; **Rendimento:** 58%; **Característica:** sólido marrom; **IV (filme):** 3422, 1624, 1384, 1054, 803 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (600 MHz, MeOD):** δ 3,01 (ddd, $J = 1,1; 6,7$ e $14,0$ Hz, 1H); 3,28 (ddd, $J = 1,1; 8,9$ e $14,0$ Hz, 1H); 3,52 (dt, $J = 6,7$ e $8,9$ Hz, 1H); 4,69 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 5,92 (s, 2H); 6,63 (dd, $J = 2,4$ e $9,0$ Hz, 1H); 6,69 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 6,74-6,79 (m, 2H); 6,83 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,11 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,92 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD):** δ 28,2; 48,3; 58,8; 100,8; 102,5; 107,5; 107,8; 109,9; 111,6; 115,8; 120,5; 124,6; 136,6; 137,2; 144,1; 146,6; 148,0; 150,0; 177,1; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 360,0848, encontrado: 360,0855 ; **P.F:** 174°C.

Espectro 75. RMN de ^1H (600 MHz, MeOD) do composto 98.

Daniara "Pipr-hidrolise-desprot." cd3od/ Av. 600MHz - nov29dcfH1



```
Current Data Parameters
NAME      nov29dcfH1
EXPNO    1
PROCNO   1

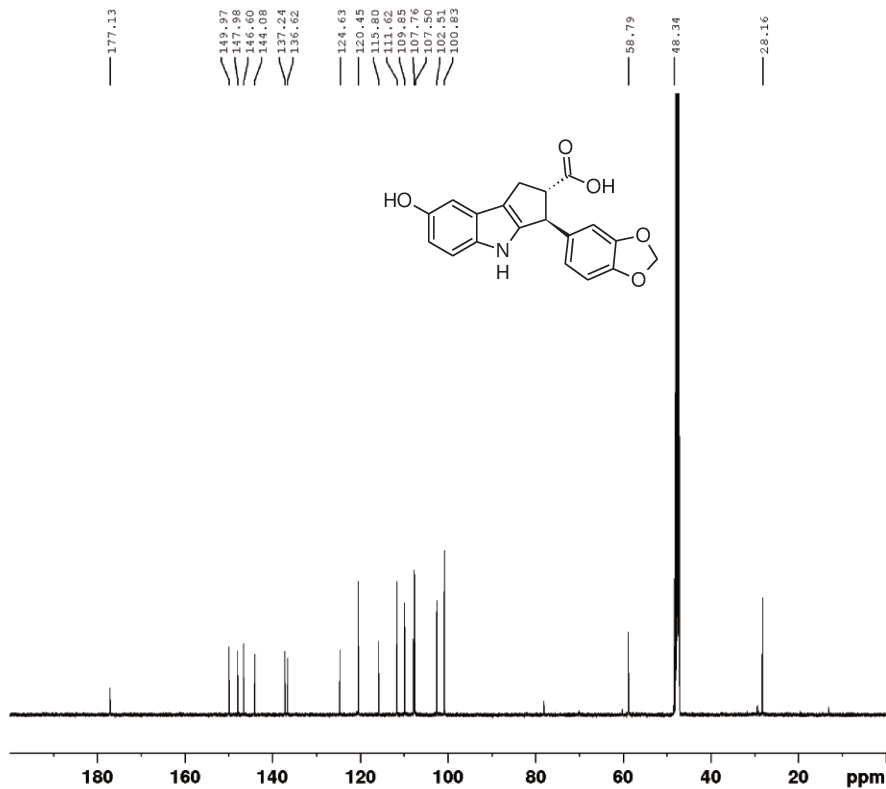
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20131129
Time     17.39
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm TBI 1H/13
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        32
DS        0
SWH       12335.526 Hz
FIDRES    0.188225 Hz
AQ        2.6563926 sec
RG         161
DW        40.533 usec
DE        6.50 usec
TE        298.1 K
D1        1.00000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     600.137063 MHz
NUC1      1H
P1        7.38 usec
PLW1     9.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        600.1699948 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
```

Espectro 76. RMN de ^{13}C (150 MHz, MeOD) do composto 98.

Daniara "Pipr-hidrolise-desprot." cd3od/ Av. 600MHz - nov29dcfH1 - 13C



```
Current Data Parameters
NAME      nov29dcfH1
EXPNO    2
PROCNO   1

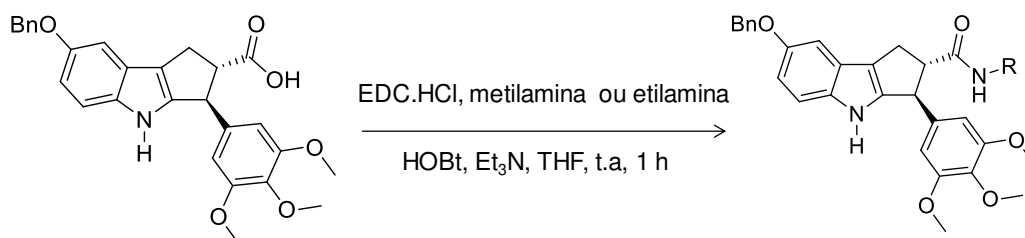
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20131129
Time     17.47
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm TBI 1H/13
PULPROG  zgpg30
TD        32768
SOLVENT  MeOD
NS        25600
DS        0
SWH       36057.691 Hz
FIDRES    1.100393 Hz
AQ        0.4543829 sec
RG         203
DW        13.867 usec
DE        10.00 usec
TE        298.1 K
D1        2.00000000 sec
D11       0.03000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     150.9279571 MHz
NUC1      13C
P1        16.50 usec
PLW1     95.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2     600.1724007 MHz
NUC2      1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2    70.00 usec
PLW2     9.00000000 W
PLW12    0.039990100 W
PLW13    0.04895200 W

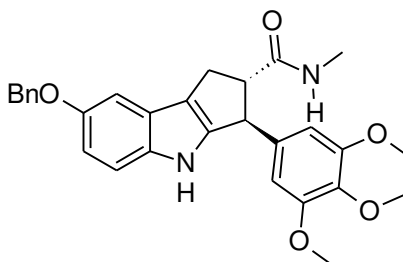
F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        150.9128670 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
```

6.1.2.7. Procedimento geral de preparação das amidas protegidas



O ácido **91** (30 mg, 1 equiv.) foi dissolvido em um balão com THF anidro sob atmosfera de nitrogênio. Em outro balão, uma mistura de EDC.HCl (1,25 equiv.), metilamina ou etilamina (1,1 equiv.), HOBT (0,1 equiv.) e Et₃N (2 equiv.) foi dissolvido em THF anidro (sob atmosfera de nitrogênio) e adicionado juntamente com a solução do ácido. A mistura foi deixada a temperatura ambiente sob agitação magnética por 1 h e, após acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), foi feita uma filtração em papel de filtro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os produtos **99** e **100** foram purificados em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (70:30).

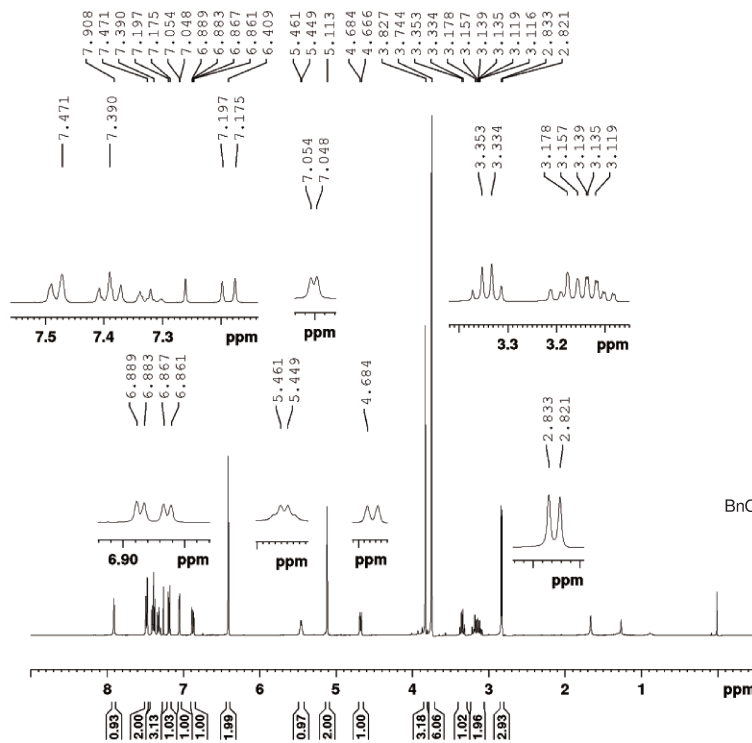
Composto 99: 7-(benzilóxi)-N-metil-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida



Tempo reacional: 1 h; **Rendimento:** 72%; **Característica:** sólido marrom claro; **IV (filme):** 3358, 1672, 1596 cm⁻¹; **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 2,86 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H); 3,12-3,18 (m, 2H); 3,34 (q, *J* = 7,8 Hz, 3H); 3,74 (s, 6H); 3,83 (s, 3H); 4,68 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H); 5,11 (s, 2H); 5,46 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H); 6,41 (s, 2H); 6,88 (dd, *J* = 2,4 e 8,8 Hz, 1H); 7,05 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 7,19 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); 7,37-7,41 (m, 3H); 7,47 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H); 7,91 (s, 1H); **RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃):** δ 26,5; 29,1; 49,9; 56,2; 60,8; 61,1; 71,0; 102,8; 104,5; 111,7; 112,4; 118,0; 124,7; 127,6; 127,8; 128,5; 136,5; 136,9; 137,7; 138,5; 143,7; 153,4; 153,5; 174,2; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para C₂₉H₃₀N₂O₅ [M+Na]⁺: 509,2052, encontrado: 509,2059; **P.F:** 248°C.

Espectro 77. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 99.

Daniara - Trimetoxi Bn Metilamina - cd3c13 - av400MHz jan16dcfH2

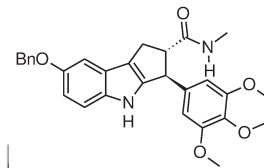


Current Data Parameters
NAME jan16dcfH2
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140116
Time 14.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 0
SWH 4166.667 Hz
FIDRES 0.127167 Hz
AQ 3.9321599 sec
RG 90.5
DW 120.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

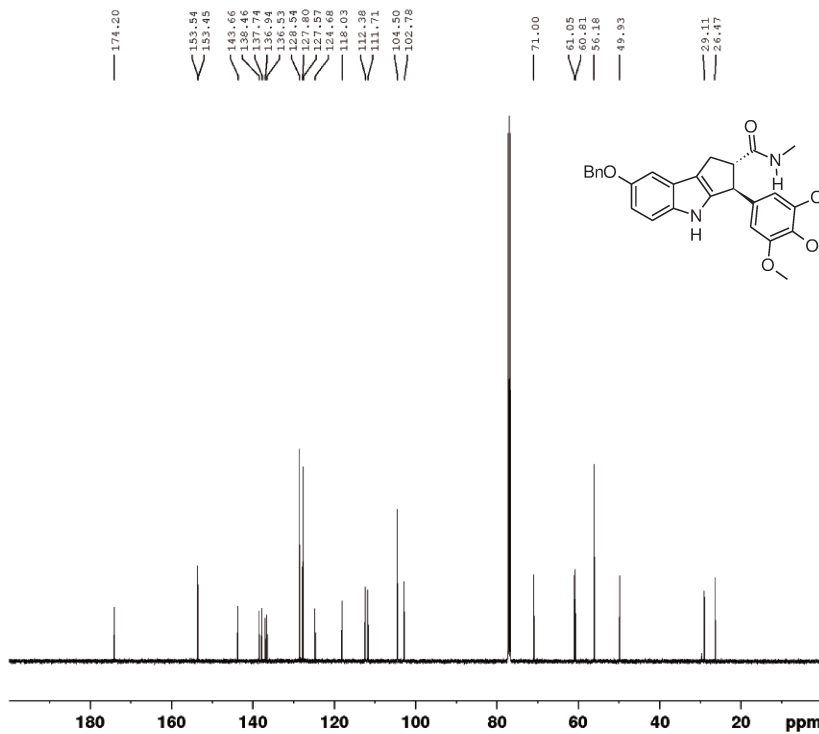
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 400.1817368 MHz
NUC1 1H
P1 8.40 usec
PLW1 14.99699974 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.180013 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Espectro 78. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 99.

Daniara - Trimetóxi Bn Metilamina - CDCl3 - Av 500MHz - jan16dcfH1 13C



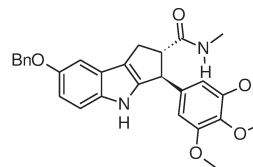
Current Data Parameters
NAME jan16dcfH2
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140116
Time 11.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 1024
DS 4
SWH 29761.904 Hz
FIDRES 0.908261 Hz
AQ 0.5505024 sec
RG 2050
DW 16.800 usec
DE 6.50 usec
TE 298.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TDO 1

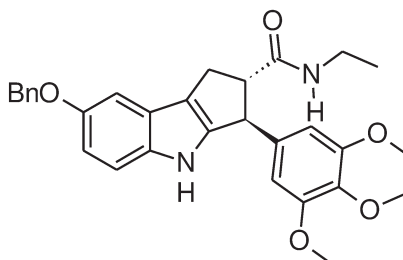
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 125.7049801 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 91.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2 499.8719995 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 26.85300064 W
PLW12 0.57928002 W
PLW13 0.37074000 W

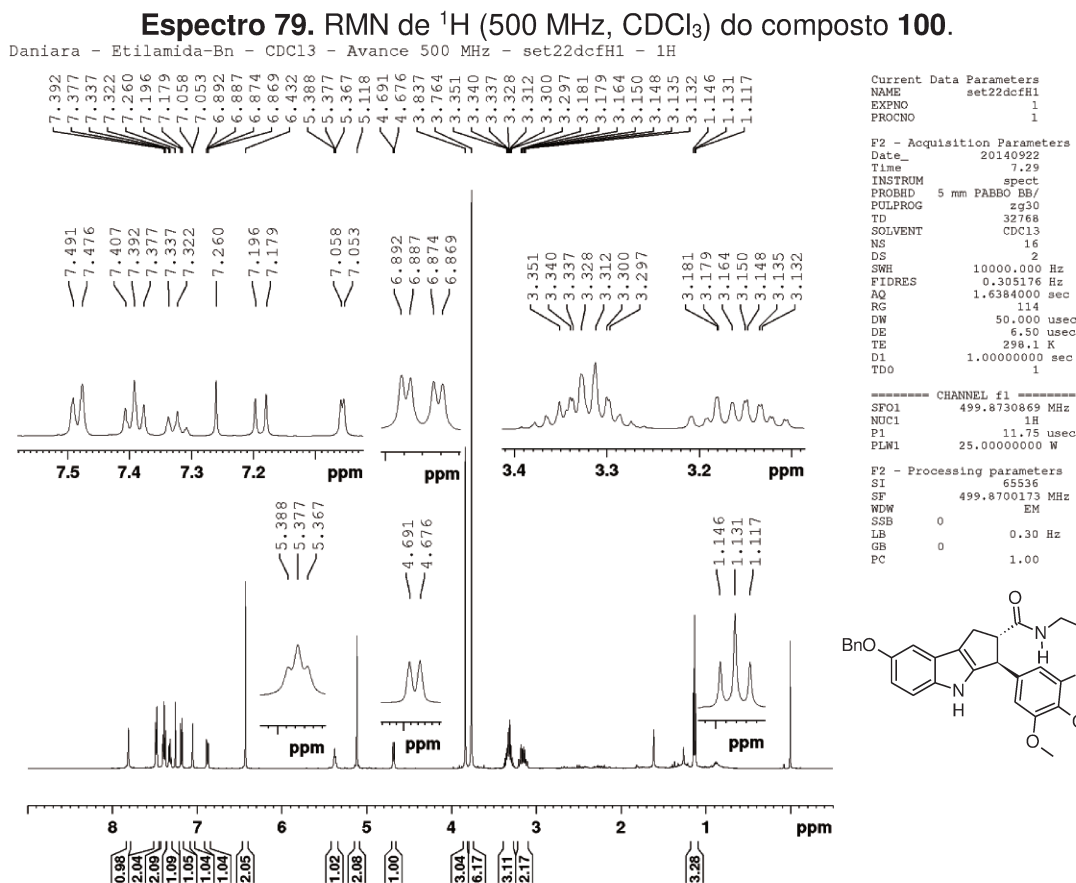
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.6924110 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

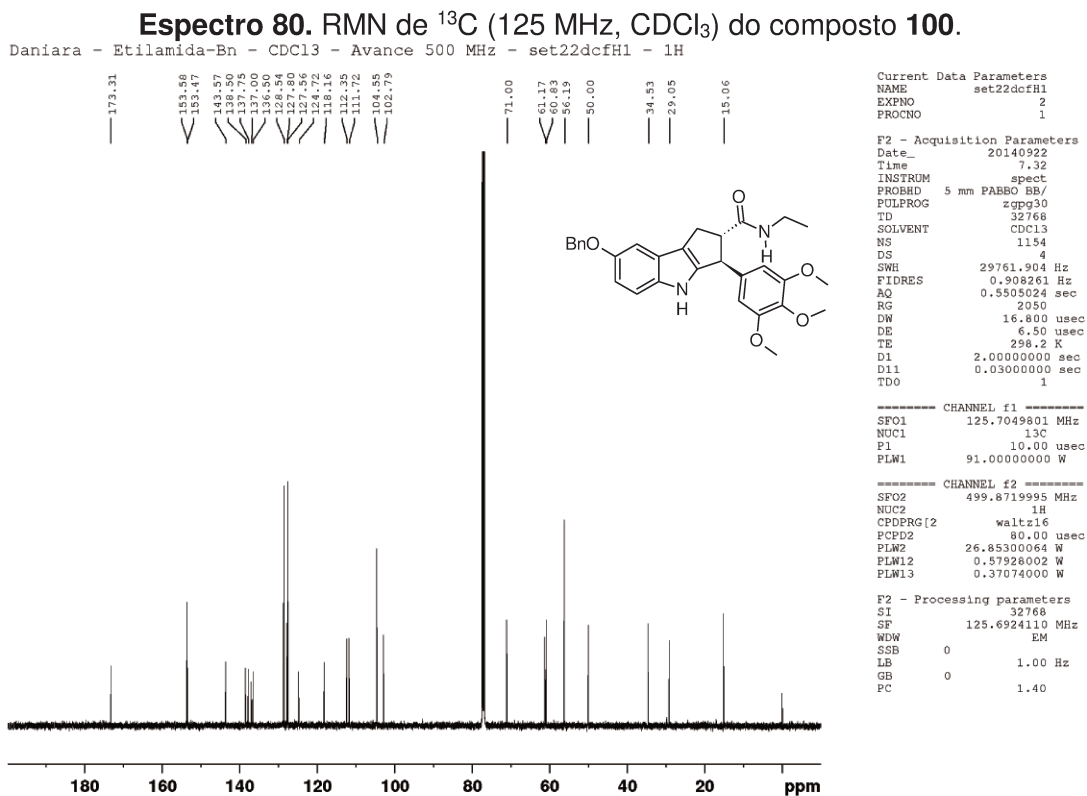


Composto 100: 7-(benzilóxi)-N-etil-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida

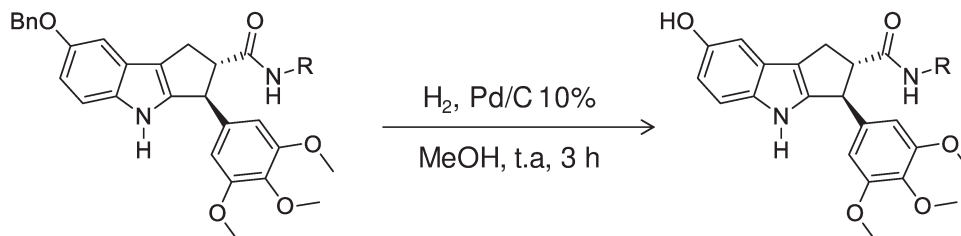


Tempo reacional: 1 h; **Rendimento:** 65%; **Característica:** sólido marrom claro; **IV (filme):** 3351, 1673, 1610, 1245 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 1,13 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H); 3,13 – 3,18 (m, 2H); 3,30-3,35 (m, 3H); 3,76 (s, 6H); 3,84 (s, 3H); 4,68 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H); 5,38 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H); 6,43 (s, 2H); 6,88 (dd, $J = 2,5$ e 9,0 Hz, 1H); 7,06 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,19 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 7,32-7,41 (m, 3H); 7,48 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,87 (s, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 15,1; 29,1; 34,5; 50,0; 56,2; 60,8; 61,2; 71,0; 102,8; 104,6; 111,7; 112,4; 118,2; 124,7; 127,6; 127,8; 128,5; 136,5; 137,0; 137,8; 138,5; 143,6; 153,5; 153,6; 173,3; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 523,2209, encontrado: 523,2214.



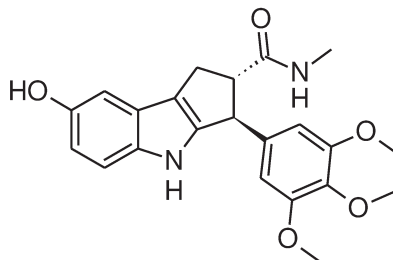


6.1.2.8. Procedimento geral de preparação das amidas desprotegidas



Os compostos **99** e **100** (0,12 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de MeOH em um balão contendo 10 mg de Pd/C 10%. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente e atmosfera de H_2 por 3h. Após esse período, a mistura reacional foi filtrada em plug de sílica gel para fornecer os produtos **101** e **102**.

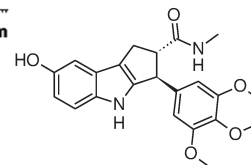
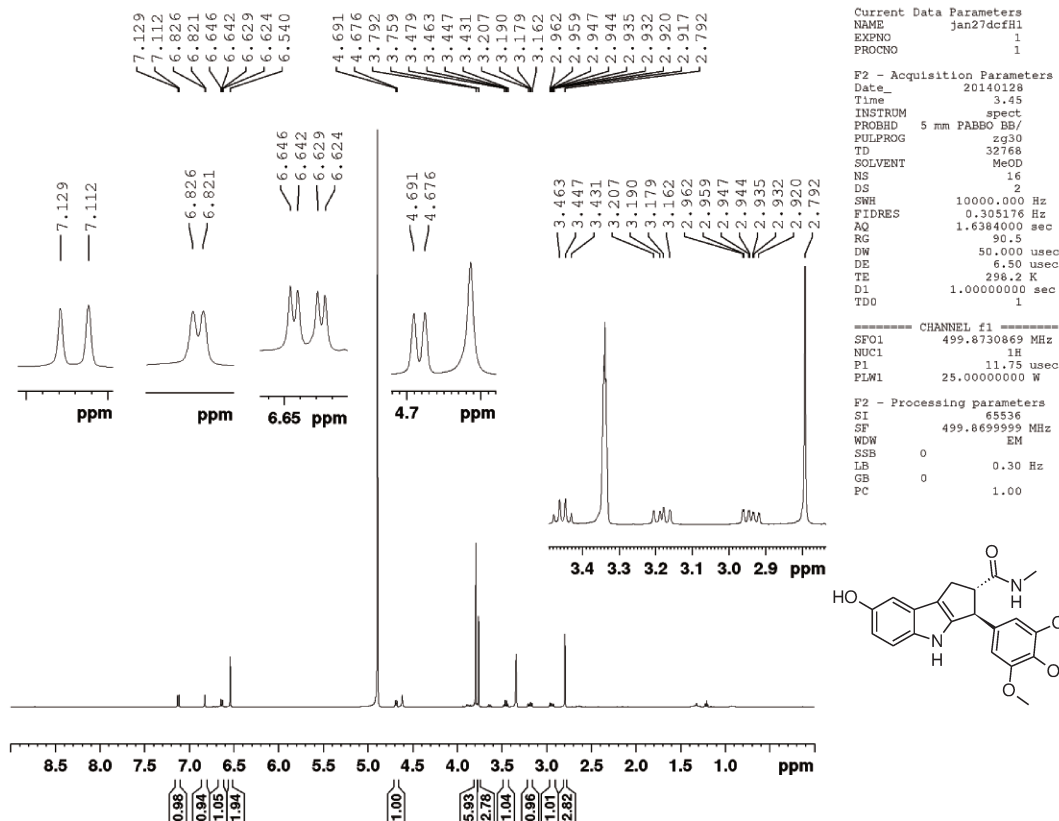
Composto 101: 7-hidróxi-N-metil-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida



Tempo reacional: 1 h; Rendimento: 65%; Característica: sólido marrom; IV (filme): 3384, 2925, 1636, 1454, 1235, 1128, 748 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, MeOD):** δ 2,79 (s, 3H); 2,92-2,96 (m, 1H); 3,16-3,21 (m, 1H); 3,43-3,48 (m, 1H); 3,76 (s, 3H); 3,79 (s, 6H); 4,68 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 6,51 (s, 2H); 6,64 (dd, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz, 1H); 6,82 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,12 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD):** δ 25,1; 29,0; 49,5; 55,2; 59,7; 60,6; 102,5; 104,4; 109,9; 111,7; 116,1; 124,7; 136,6; 136,7; 139,2; 143,7; 150,0; 153,4; 176,1; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 419,1583, encontrado: 419,1593; **P.F:** 195°C.

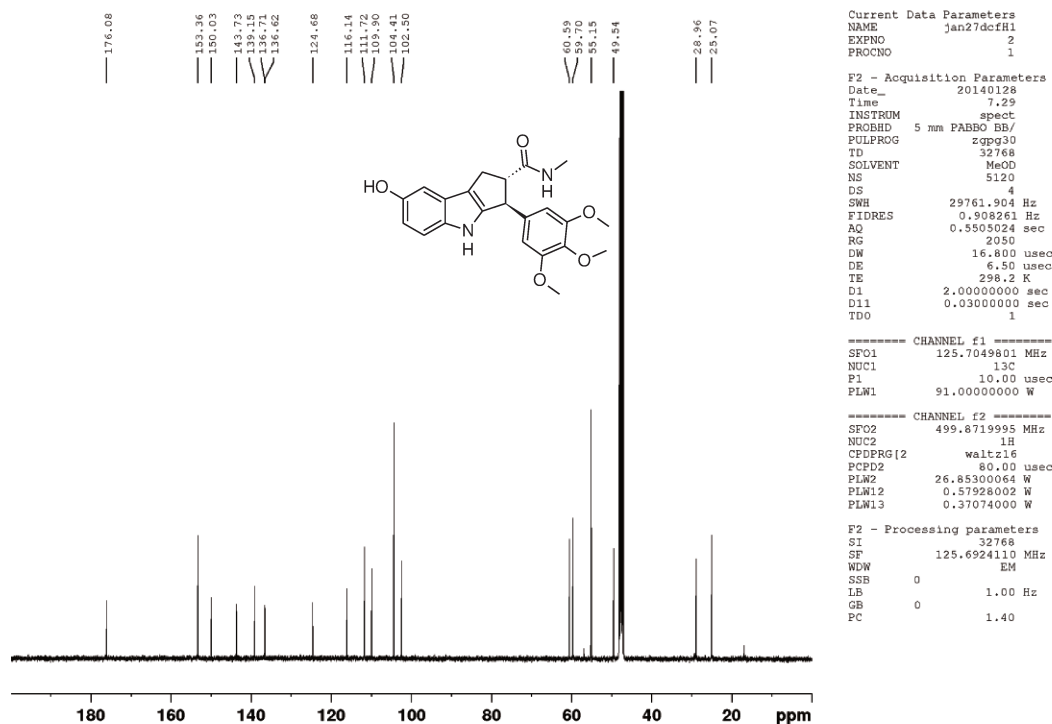
Espectro 81. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 101.

Daniara - Trimetoxi - Desprot - Metilamina - MeOD - Avance 500 MHz - jan27dcfH1

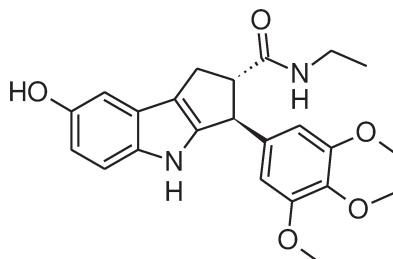


Espectro 82. RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD) do composto 101.

Daniara - Trimeoxi - Desprot - Metilamina - MeOD - Avance 500 MHz - jan27dcfH1



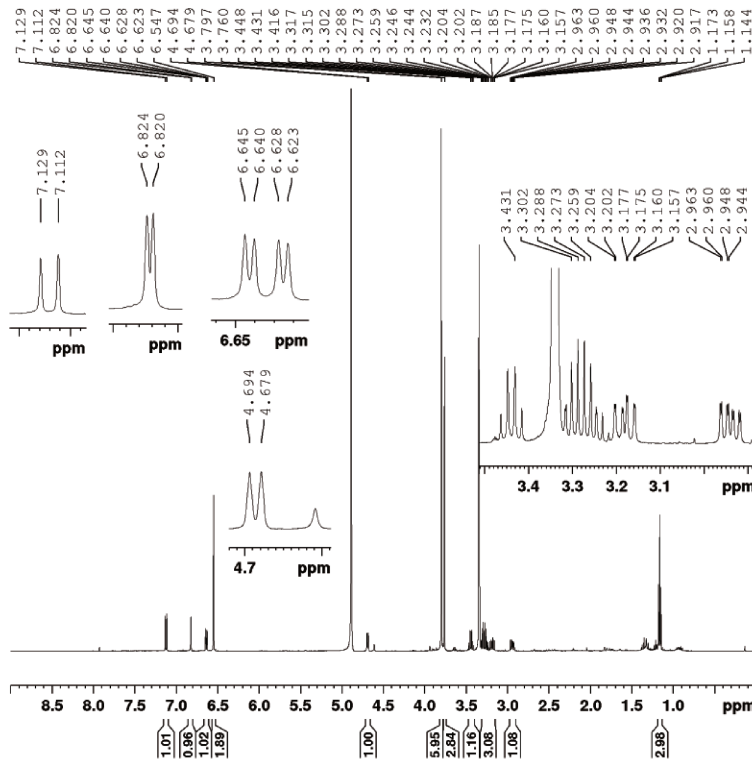
Composto 102: N-etil-7-hidróxi-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida



Tempo reacional: 1 h; Rendimento: 60%; Característica: sólido marrom claro; RMN de ^1H (500 MHz, MeOD): δ 1,16 (t, $J = 7,3$, 3H); 2,94 (ddd, $J = 1,7$; 7,7 e 13,7 Hz, 1H); 3,18 (ddd, $J = 1,2$; 8,6 e 13,7 Hz, 1H); 3,23-3,32 (m, 2H); 3,42-3,46 (m, 1H); 3,76 (s, 3H); 3,80 (s, 6H); 4,69 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 6,55 (s, 2H); 6,63 (dd, $J = 2,5$ e 8,5 Hz, 1H); 6,82 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,12 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD):** δ 13,6; 29,0; 34,0; 49,6; 55,1; 59,7; 60,7; 102,5; 104,4; 109,9; 111,7; 116,2; 124,7; 136,6; 136,7; 139,2; 143,7; 150,0; 153,4; 175,3; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 433,1739, encontrado: 433,1737.

Espectro 83. RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) do composto 102.

Daniara - Etilamida Desprot - CDCl_3 - out10dcfH1

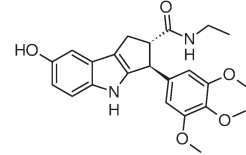


Current Data Parameters
NAME out10dcfH1
EXPNO 1
PROCNO 1

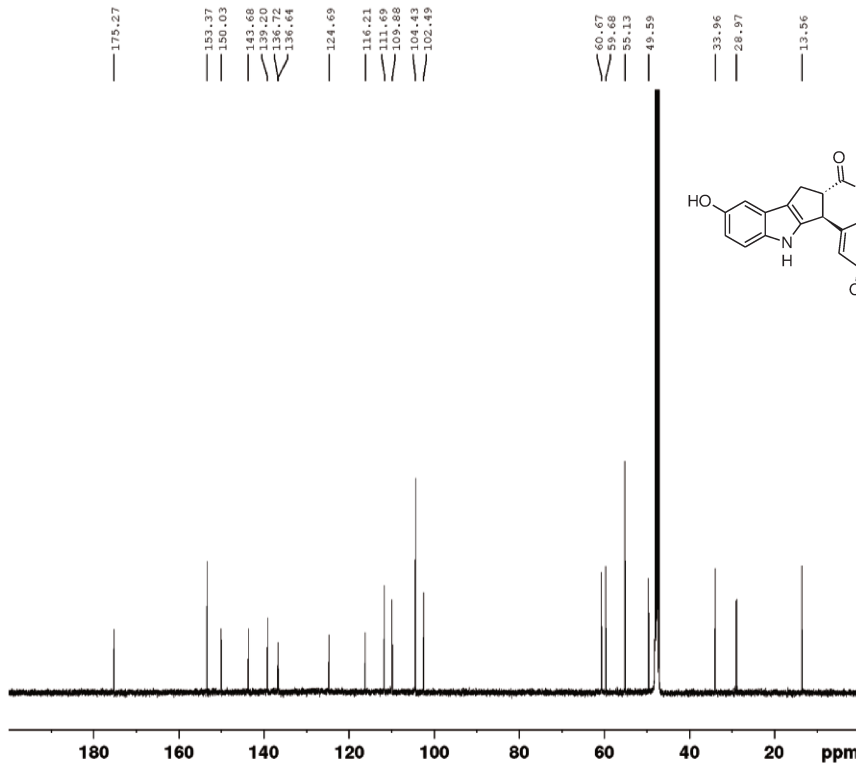
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20141010
Time 21.15
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
ID 32768
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.1305176 Hz
AQ 1.6384000 sec
RG 144
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 298.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
SFO1 499.8730869 MHz
NUC1 1H
P1 11.75 usec
PLW1 25.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 499.8699998 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Espectro 84. RMN de ^{13}C (125 MHz, MeOD) do composto 102.



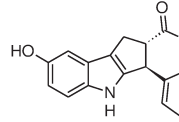
Current Data Parameters
NAME out10dcfH1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20141011
Time 12.09
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 20480
DS 4
SWH 29761.904 Hz
FIDRES 0.908261 Hz
AQ 0.5505024 sec
RG 2050
DW 16.800 usec
DE 6.50 usec
TE 298.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
SFO1 125.7049801 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 91.00000000 W

CHANNEL f2
SFO2 499.8719995 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 26.85300064 W
PLW12 0.57928002 W
PLW13 0.37074000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.6924110 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



6.1.3. Ensaio bioquímico dos novos análogos ciclopenta[b]indólicos

Os ensaios foram realizados com kits comerciais de polimerização da tubulina (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, EUA). O kit de código BK011P consiste em 10 mg de tubulina liofilizada purificada de cérebro de porco (pureza > 99%), alíquotas de GTP, paclitaxel (**12**), DMSO e tampões específicos para reconstituição e polimerização de tubulina. Os ensaios foram realizados de acordo com protocolos já estabelecidos para identificação de moduladores de polimerização de tubulina.⁵⁰⁻⁵²

As medidas de fluorescência foram executadas utilizando um leitor de placas Victor 3 1420 *Multilabel Plate Counter* (Perkin Elmer Inc; Waltham, MA, USA), juntamente com placas OptiPlate-1536 F Black (Perkin Elmer) de 96 poços, ideais para este tipo de estudo. Com o intuito de padronizar todas as medidas de polimerização da tubulina na presença de diversos ligantes, todos os ensaios foram realizados utilizando reações de 50 μL /poço da placa e diluindo os compostos (originalmente dissolvidos em 100% de DMSO) em concentrações de 1% de DMSO. Esta concentração de DMSO foi escolhida a fim de permitir a solubilização dos compostos sem afetar a cinética de reação.¹⁴¹

Na primeira etapa de realização dos ensaios, a temperatura do leitor de placas foi ajustada para 37 °C e alíquotas de 5 μL de soluções preparadas para cada ligante (10 vezes concentradas) foram transferidas para cada poço. Em seguida, uma reação de polimerização foi preparada pela adição de GTP e tubulina a uma solução tampão com glicerol a baixa temperatura, levando a uma mistura com 2 mg/mL de tubulina e 1 mM de GTP. Imediatamente após preparar a mistura, alíquotas de 45 μL da reação foram adicionadas à placa utilizando-se pipeta multicanal. A placa foi então, inserida no fluorímetro e o processo de excitação a 360 nm e leitura de emissão a 420 nm foi iniciado. Foram executados 70 ciclos de medidas em todos os poços da placa, com intervalos de aproximadamente 1 min entre duas leituras do mesmo poço. Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando 3 poços adjacentes.

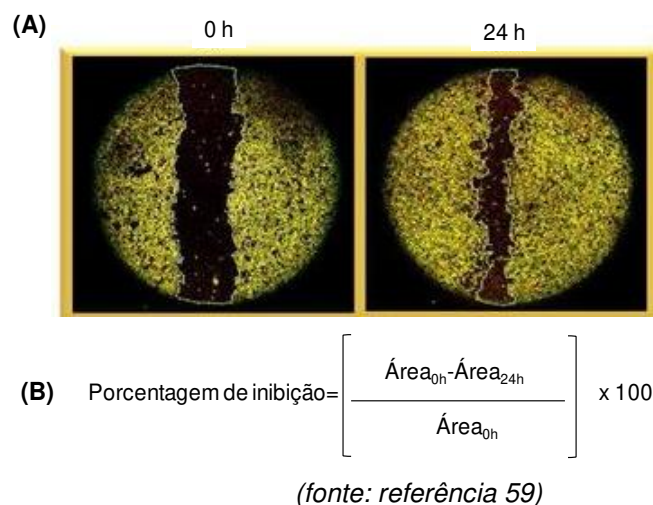
6.1.4. Ensaios biológicos dos novos análogos ciclopenta[b]indólicos

6.1.4.1. Ensaio celular wound healing

A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura DMEM (modified Dulbecco's Minimum Medium – Cultilab), 10% de soro fetal bovino (SFB, estéril, Cultilab) e os compostos testes em concentrações variáveis. Após a cultura se tornar confluenta, foi realizada uma lesão na camada unicelular com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando assim uma fenda na camada de células.¹⁴²

As imagens obtidas do experimento em 0 h e 24 h foram avaliadas medindo-se a área da fenda em cada uma e transformando-a na porcentagem de migração mostrada na **Figura 55**.

Figura 55. (A) Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 400x em 0 h e 24 h após a incubação. (B) Fórmula para o cálculo da porcentagem de inibição do composto teste.



6.1.4.2. Teste hemolítico

Em um tubo de ensaio centrifugou-se 1 mL de sangue fresco e 1 mL de tampão PBS por 5 min. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram diluídos 25x em tampão PBS, constituindo assim, a solução de eritrócitos utilizada no teste.

Os compostos foram solubilizados em DMSO e diluídos com concentrações variáveis em tampão PBS (pH 7,2) de modo que a porcentagem máxima de DMSO fosse 0,5%. O controle negativo (0% de hemólise) foi preparado adicionando-se 100

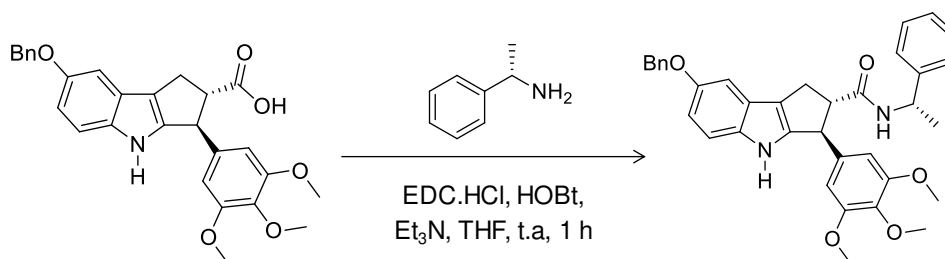
μL de solução 0,5% DMSO em PBS e o controle positivo (100% de hemólise) foi preparado adicionando 100 μL de uma solução de triton 1%. Aos tubos contendo os compostos diluídos e aos controles foram adicionados 100 μL de solução de eritrócitos. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 h. Após este período, as soluções foram centrifugadas a 500 g durante 5 min e 100 μL do sobrenadante foram transferidos para cada poço em uma placa de 96 poços transparente.

As análises foram realizadas em duplicata em dois eventos e lidas em um leitor de placas em um comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a relação:

$$\% \text{ de Hemólise} = \frac{(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. PBS})}{(\text{Abs. Triton} - \text{Abs. PBS})}$$

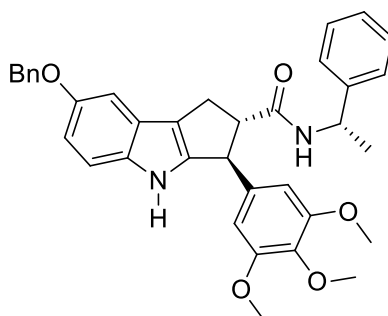
6.2. Parte experimental do tópico 5 “Resolução enantiomérica dos derivados ciclopenta[b]indólicos”

6.2.1. Procedimento geral para obtenção dos diastereômeros 103 e 104



O ácido **91** (100 mg, 1 equiv.) foi dissolvido em um balão com THF anidro sob atmosfera de nitrogênio. Em outro balão, uma mistura de EDC.HCl (1,25 equiv.), (S)-(-)- α -metilbenzilamina (1,1 equiv.), HOBT (0,1 equiv.) e Et_3N (2 equiv.) foi dissolvido em THF anidro (sob atmosfera de nitrogênio) e adicionado juntamente com a solução do ácido. A mistura foi deixada a temperatura ambiente sob agitação magnética por 1 h e, após acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), foi feita uma filtração em papel de filtro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os compostos **103** e **104** foram separados por métodos convencionais de cromatografia utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt:CHCl₃ (6:3:1).

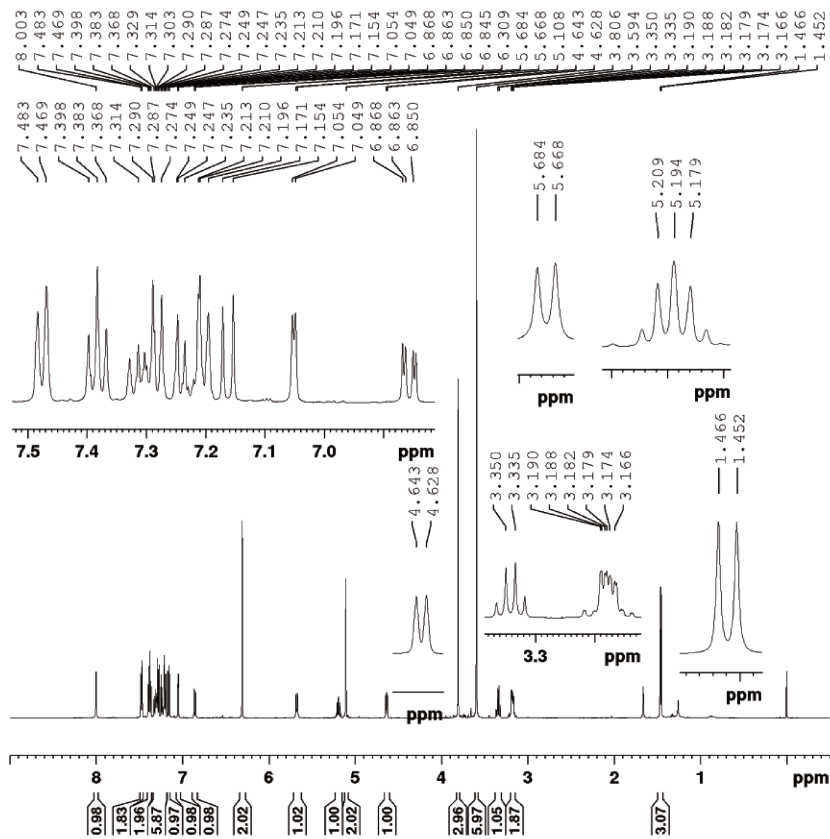
Composto 103: (2S,3S)-7-(benzilóxi)-N-[(1S)-1-feniletíl]-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida



Tempo reacional: 1 h; **Rendimento:** 82%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3351, 1636, 1610, 1245 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 1,46 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H); 3,17-3,19 (m, 2H); 3,37-3,41 (m, 1H); 3,59 (s, 6H); 3,81 (s, 3H); 4,64 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 5,11 (s, 2H); 5,18-5,21 (m, 1H); 5,68 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 6,31 (s, 2H); 6,86 (dd, $J = 2,5$ e $9,0$ Hz, 1H); 7,05 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 7,20-7,31 (m, 6H); 7,38 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,48 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 8,00 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 22,0; 29,0; 48,8; 50,0; 56,0; 60,8; 61,3; 71,0; 102,8; 104,4; 111,7; 112,4; 118,0; 124,7; 126,1; 127,4; 127,6; 127,8; 128,6; 128,7; 136,5; 136,8; 137,8; 138,4; 143,2; 143,5; 153,4; 153,5; 172,6; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 599,2522, encontrado: 599; 2518.

Espectro 85. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 103.

Daniara trimetoxi-Bn-1M - cdcl3 - av500MHz - jan15dcfH1

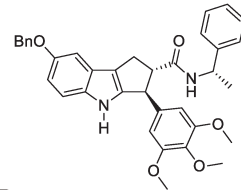


Current Data Parameters
 NAME jan15dcfH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

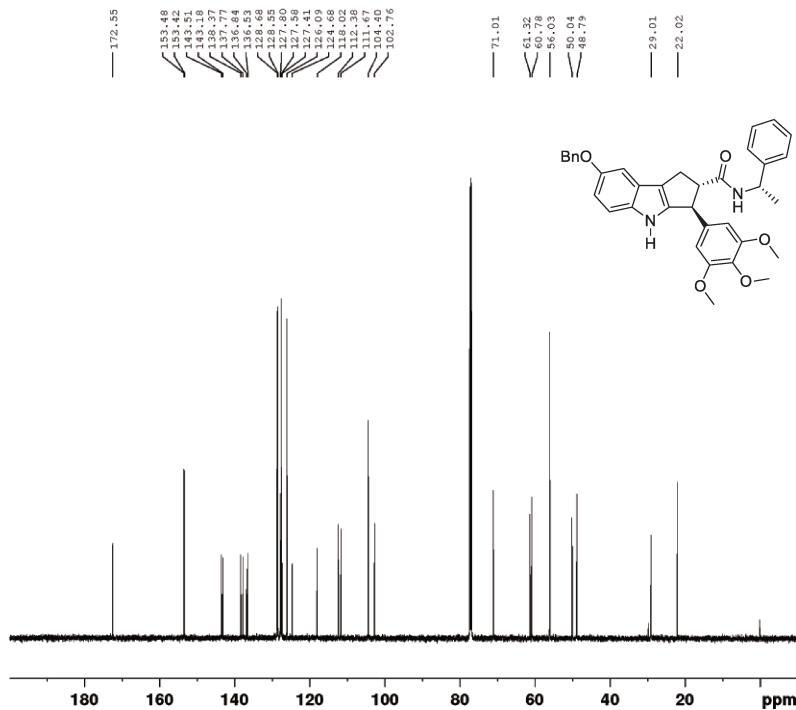
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140115
 Time 10.32
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.305176 Hz
 AQ 1.6384000 sec
 RG 64
 DW 50.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 499.8730869 MHz
 NUC1 1H
 P1 11.75 usec
 PLW1 25.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 499.8700241 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**Espectro 86. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 103.**

Daniara trimetoxi-Bn-1M - cdcl3 - av500MHz - jan15dcfH1 - 13C



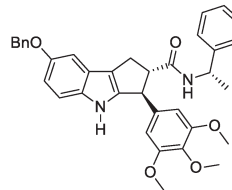
Current Data Parameters
 NAME jan15dcfH1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140115
 Time 10.53
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 4
 DS 4
 SWH 29761.904 Hz
 FIDRES 0.908261 Hz
 AQ 0.5505024 sec
 RG 2050
 DW 16.800 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

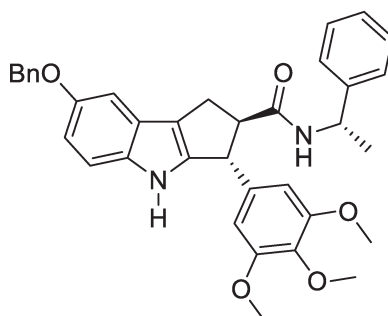
----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 125.7049801 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 91.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
 SFO2 499.8719995 MHz
 NUC2 1H
 CDPGRG2 waltz16
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 26.85300064 W
 PLW12 0.57926002 W
 PLW13 0.37074000 W

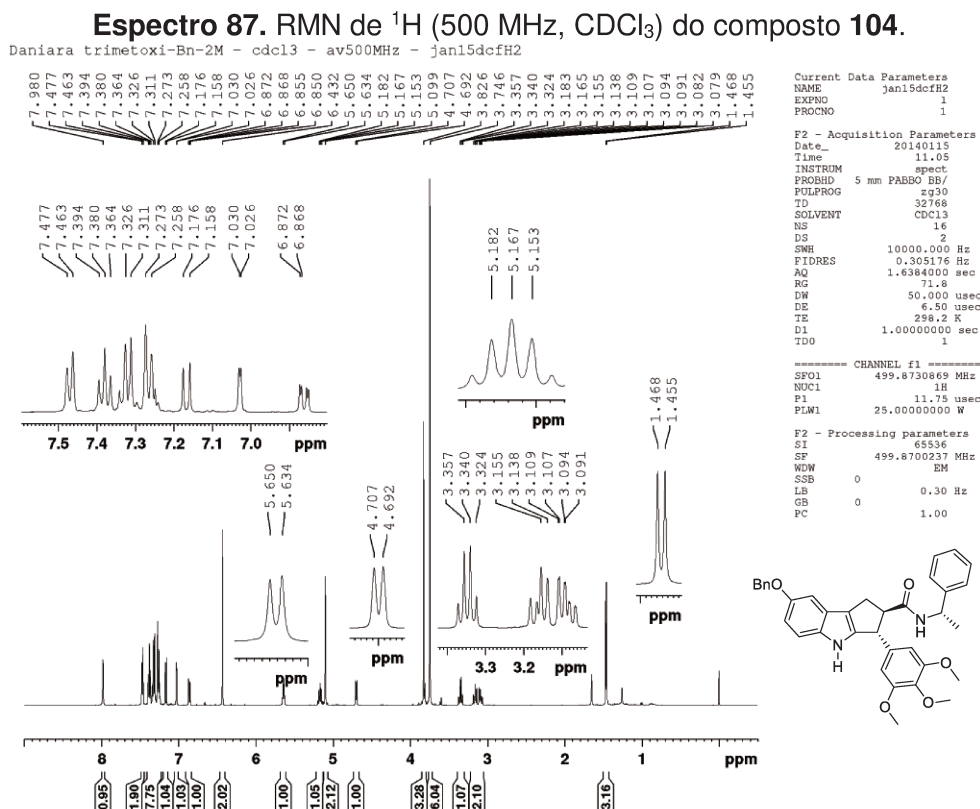
F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 125.6924110 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.50 Hz
 GB 0
 PC 1.40

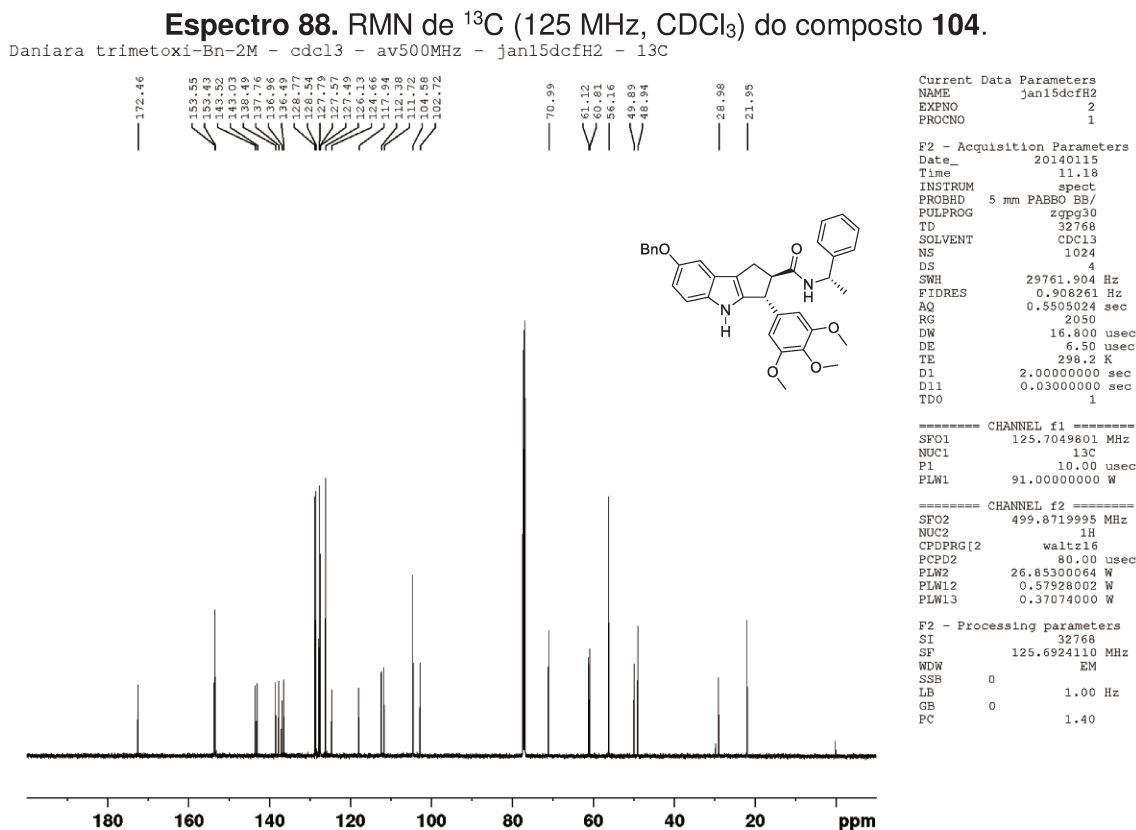


Espectro 104: (2R,3R)-7-(benzilóxi)-N-[(1S)-1-feniletil]-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida

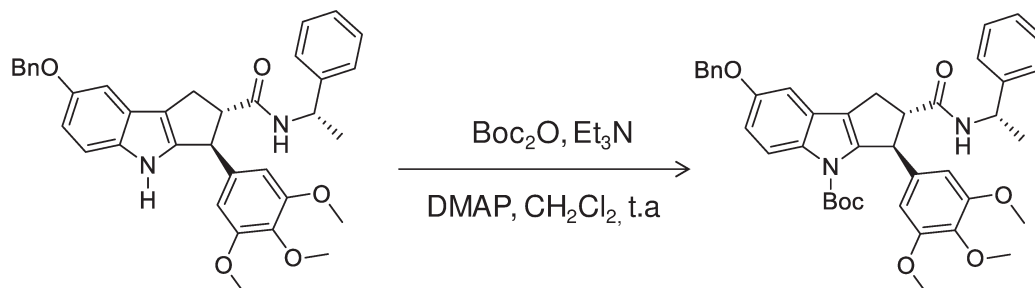


Tempo reacional: 1 h; **Rendimento:** 82%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3351, 1636, 1610, 1245 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 M75 (s, 6H); 3,83 (s, 3H); 4,70 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 5,10 (s, 2H); 5,15-5,18 (m, 1H); 5,64 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 6,43 (s, 2H); 6,86 (dd, $J = 2,0$ e 8,5 Hz, 1H); 7,03 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,17 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,26-7,33 (m, 6H); 7,36-7,39 (m, 2H); 7,47 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 7,98 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 22,0; 29,0; 48,9; 49,9; 56,2; 60,8; 61,1; 71,0; 102,7; 104,6; 111,7; 112,4; 117,9; 124,7; 126,1; 127,5; 127,6; 127,8; 128,5; 128,8; 136,5; 137,0; 137,8; 138,5; 143,0; 143,5; 153,4; 153,6; 172,5; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 599,2522, encontrado: 599; 2518.**



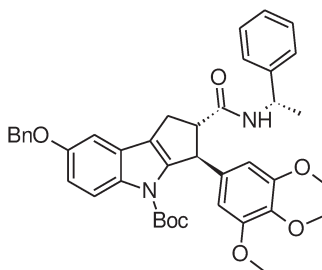


6.2.2. Procedimento geral para obtenção das amidas **105** e **106**

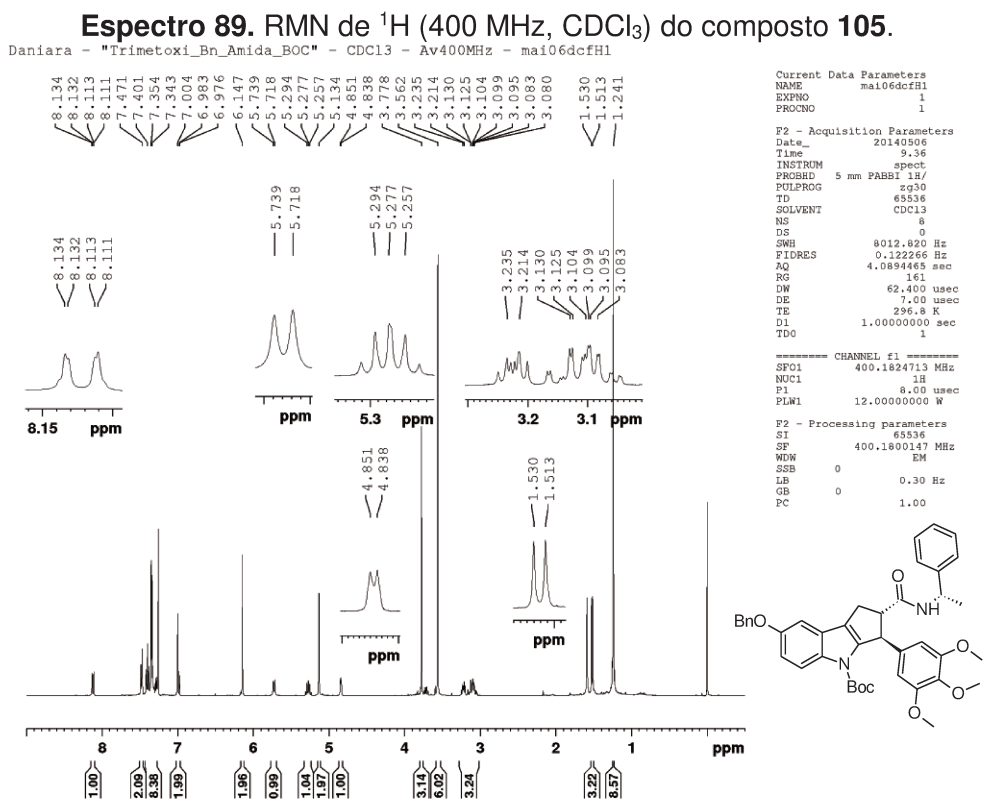


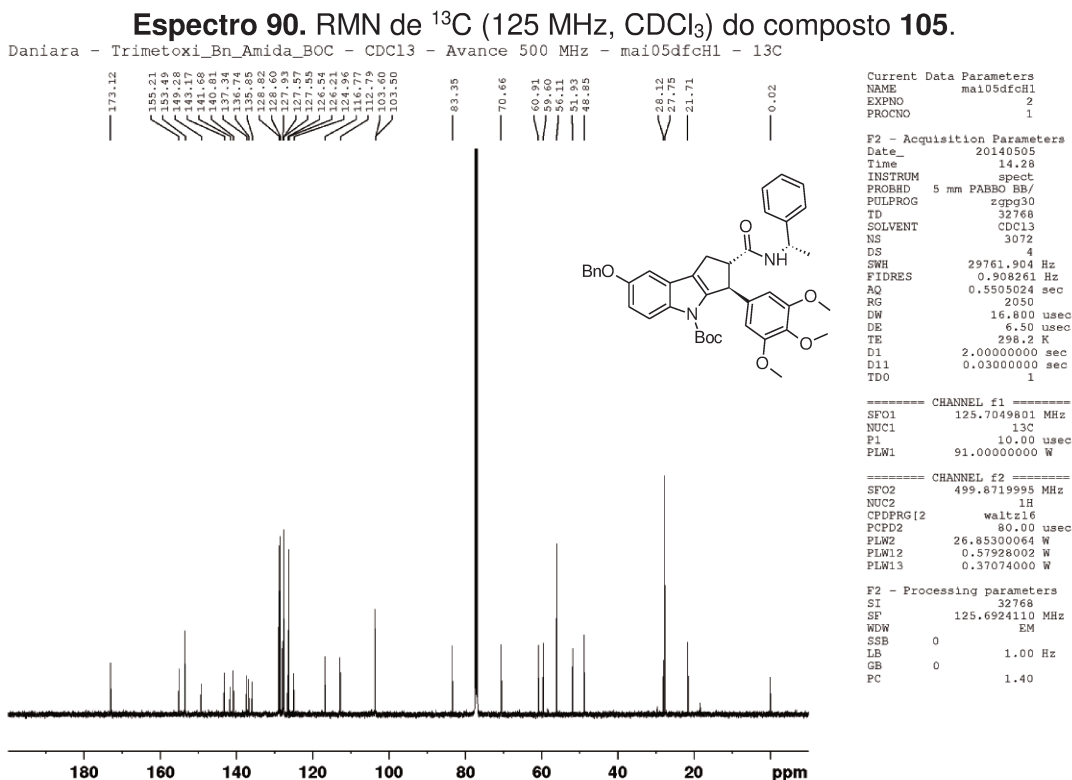
As amidas **103** e **104** (20 mg, 1 equiv.) foram dissolvidas em um balão contendo 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), Boc_2O (4 equiv.), Et_3N (2 equiv.) e DMAP (2 equiv.). A mistura foi deixada sob atmosfera de nitrogênio, a temperatura ambiente e sob agitação magnética por 1 h. Após acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD) foi feita uma filtração em papel de filtro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os produtos **105** e **106** foram purificados em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (70:30).

Composto 105: (2S,3S)-7-(benzilóxi)-2-[[[(1S)-1-feniletil]cabamoil]-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-4-carboxilato de terc-butila

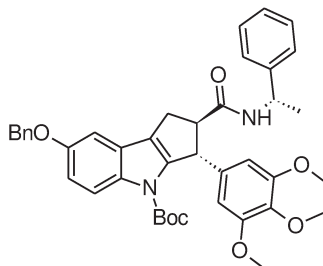


Tempo reacional: 1 h; **Rendimento:** 90%; **Característica:** óleo marrom; **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 1,24 (s, 9H); 1,52 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H); 3,08-3,24 (m, 3H); 3,56 (s, 6H); 3,78 (s, 3H); 4,84 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H); 5,13 (s, 2H); 5,26-5,29 (m, 1H); 5,73 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 6,15 (s, 2H); 6,98-7,00 (m, 2H); 7,34-7,47 (m, 8H); 8,12 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 21,7; 27,8; 28,1; 48,9; 51,9; 56,1; 59,6; 60,9; 70,7; 83,4; 103,5; 103,6; 112,8; 116,8; 125,0; 126,2; 126,5; 127,6; 127,6; 127,9; 128,6; 128,8; 135,8; 136,7; 137,3; 140,8; 141,7; 143,2; 149,3; 153,5; 155,2; 173,1; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 699,3046, encontrado: 699,3064.





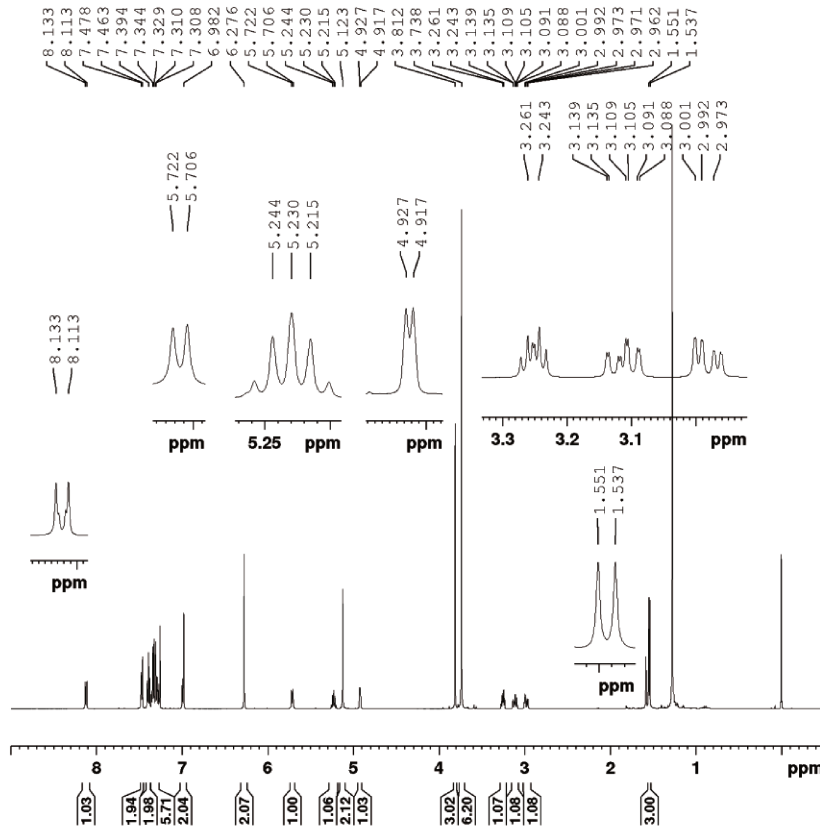
Composto 106: (2R,3R)-7-(benzilóxi)-2-[[[(1S)-1-feniletil]cabamoil]-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-4-carboxilato de terc-butila



Tempo reacional: 1 h; **Rendimento:** 90%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3276, 2929, 1729, 1456, 1115 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 1,27 (s, 9H); 1,54 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H); 2,96-3,00 (m, 1H); 3,09-3,14 (m, 1H); 3,24-3,26 (m, 1H); 3,74 (s, 6H); 3,81 (s, 3H); 4,92 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H); 5,12 (s, 2H); 5,22-5,24 (m, 1H); 5,71 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 6,28 (s, 2H); 6,98-7,00 (m, 2H); 7,27-7,41 (m, 8H); 7,47 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 8,12 (d, $J = 10$ Hz, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 22,0; 27,8; 28,2; 49,0; 51,8; 56,3; 50,6; 61,0; 70,6; 83,4; 103,5; 103,8; 112,9; 116,8; 124,8; 126,1; 126,5; 127,5; 127,9; 128,6; 128,8; 135,8; 136,9; 137,3; 140,7; 141,9; 143,0; 149,3; 153,5; 155,2; 173,1; **HRMS (ESI, m/z):** $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$: 699,3046, encontrado: 699,3068.

Espectro 91. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto 106.

Daniara - Amida 2M Boc Bn - CDCl₃ - Avance 500 MHz - mail9dcfH1 - 1H



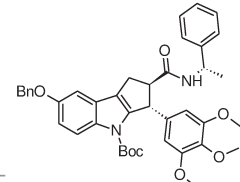
```

Current Data Parameters
NAME      mail9dcfH1
EXPNO    1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20140519
Time      7:50
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         2
SWH        10000.000 Hz
FIDRES     0.305176 Hz
AQ         1.6384000 sec
RG         114
DW         50.000 usec
DE         6.50 usec
TE         298.2 K
D1         1.00000000 sec
TDO        1

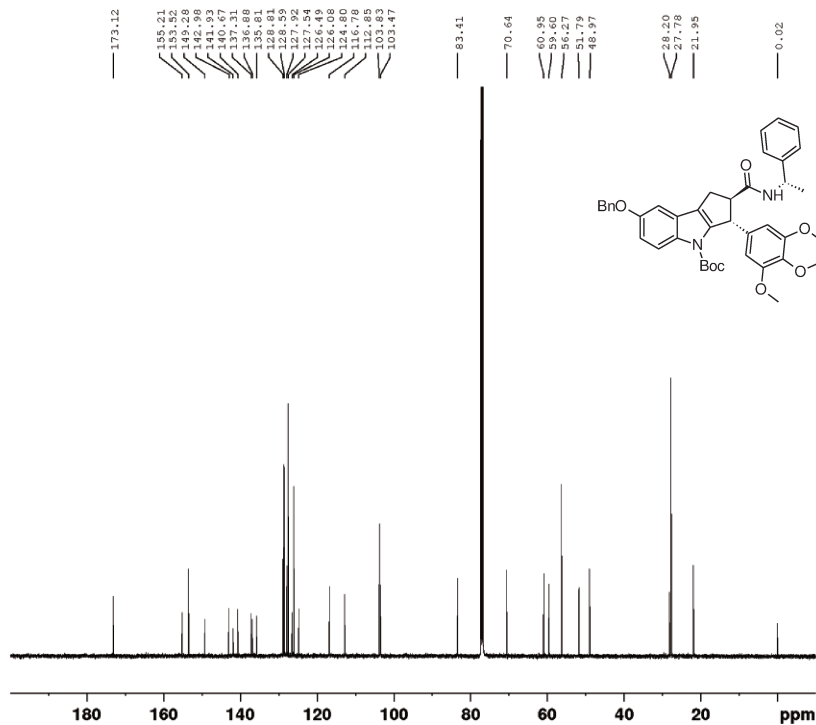
----- CHANNEL f1 -----
SF01      499.8730869 MHz
NUC1       1H
P1         11.75 usec
PLW1      25.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         499.8700175 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```



Espectro 92. RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto 106.

Daniara - Amida 2M Boc Bn - CDCl₃ - Avance 500 MHz - mail9dcfH1 - 13C



```

Current Data Parameters
NAME      mail9dcfH1
EXPNO    2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20140519
Time      9:58
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         3072
DS         4
SWH        29761.994 Hz
FIDRES     0.903261 Hz
AQ         0.5505024 sec
RG         2050
DW         16.800 usec
DE         6.50 usec
TE         298.1 K
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
TDO        1

----- CHANNEL f1 -----
SF01      125.7049801 MHz
NUC1       13C
P1         10.00 usec
PLW1      91.00000000 W

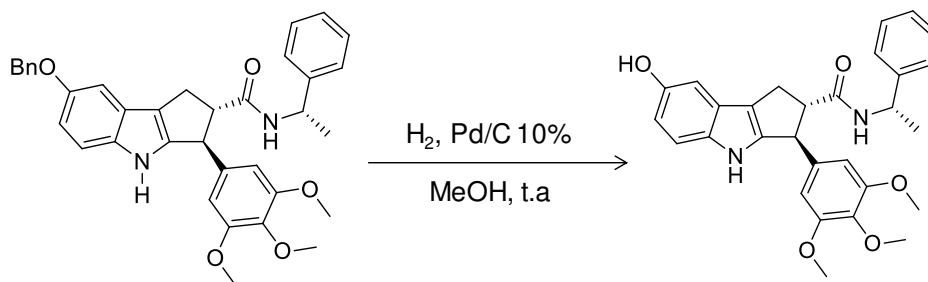
----- CHANNEL f2 -----
SF02      499.8719995 MHz
NUC2       1H
CPDPRG2   waltz16
PCPD2     80.00 usec
PLM2     26.85300064 W
PLW12    0.57928002 W
PLW13    0.37074000 W

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SF01      400.1618 MHz
FIDRES     36.643997 Hz
SW         11.721 ppm
FHM0000   QF

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.6924110 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40

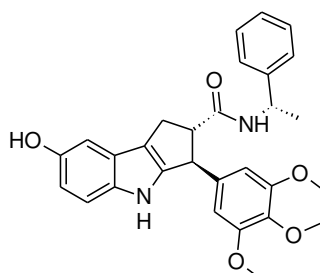
F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         400.1800000 MHz
WDW        QF3HM
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
    
```

6.2.3. Procedimento geral para obtenção das amidas **107** e **108**



Os compostos **103** e **104** (0,12 mmol) foram dissolvidos em 5 mL de MeOH em um balão contendo 5 mg de Pd/C 10%. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente e atmosfera de H₂ por 3h. Após esse período, os compostos **107** e **108** foram purificados em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (70:30).

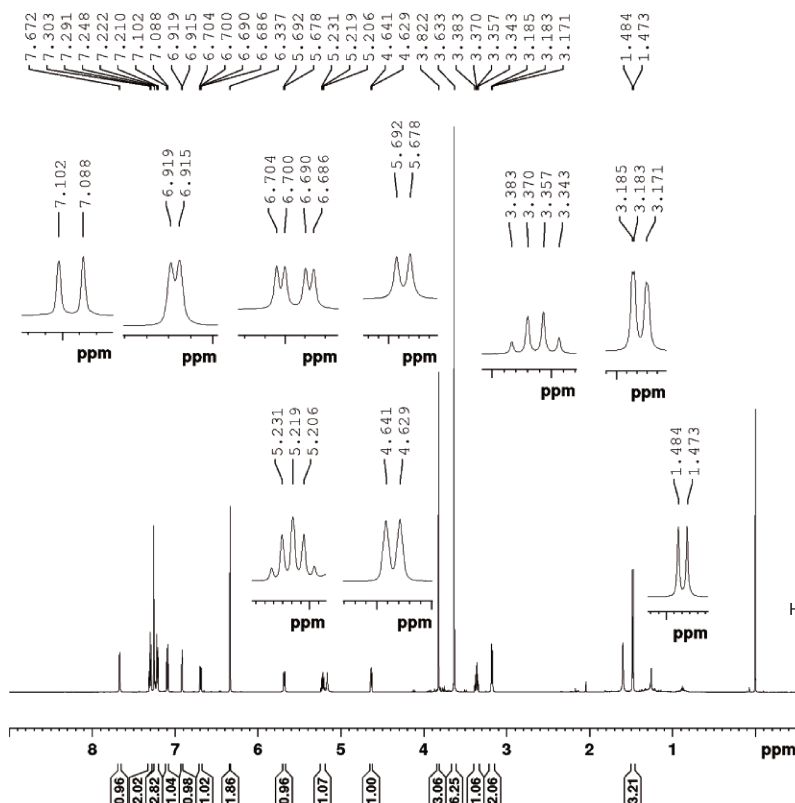
Composto 107: (2S,3S)-7-hidróxi-N-[(1S)-1-feniletíl]-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida



Tempo reacional: 3 h; **Rendimento:** 70%; **Característica:** óleo marrom; **RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃):** δ 1,48 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H); 3,17-3,19 (m, 2H); 3,34-3,38 (m, 1H); 3,63 (s, 6H); 3,82 (s, 3H); 4,64 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H); 5,21-5,23 (m, 1H); 5,69 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 6,34 (s, 2H); 6,70 (dd, *J* = 2,4 e 8,4 Hz, 1H); 6,92 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 7,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 7,21-7,25 (m, 3H); 7,29-7,30 (m, 2H); 7,67 (sl, 1H); **RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃):** δ 22,0; 29,0; 48,9; 50,1; 56,1; 60,8; 61,2; 103,7; 104,5; 110,7; 112,2; 117,8; 125,0; 126,1; 127,4; 128,6; 128,7; 136,4; 137,0; 138,2; 143,0; 143,6; 149,9; 153,6; 172,6.

Espectro 93. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto 107.

Daniara "Amida -1M- Desprot." CDCl_3 / Av 600 MHz - mai23dcpH1

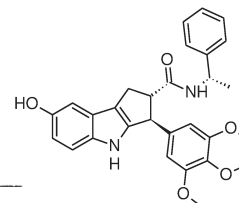


Current Data Parameters
NAME mai23dcpH1
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140523
Time 15:54
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG zg30
TD 65336
SOLVENT CDCl_3
NS 16
DS 0
SWH 12335.526 Hz
FIDRES 0.188225 Hz
AQ 2.6563926 sec
RG 161
DW 40.533 usec
DE 6.50 usec
TE 298.2 K
D1 1.0000000 sec
TDO 1

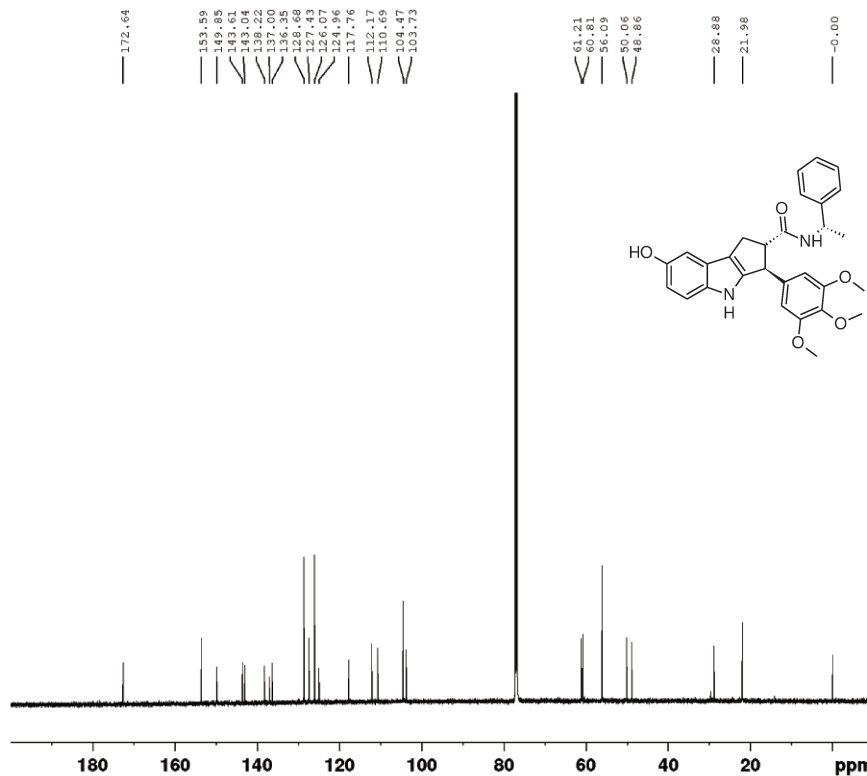
CHANNEL f1
SFO1 600.1722716 MHz
NUC1 1H
P1 7.38 usec
PLW1 9.0000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65336
SF 600.1700155 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Espectro 94. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 107.

Daniara "Amida -1M- Desprot." CDCl_3 / Av 600 MHz - mai23dcpH1 -13C



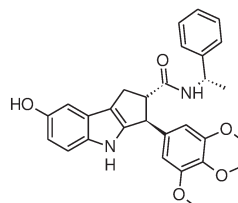
Current Data Parameters
NAME mai23dcpH1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140524
Time 9:50
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TBI 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 10240
DS 0
SWH 36057.691 Hz
FIDRES 1.100393 Hz
AQ 0.4543829 sec
RG 203
DW 13.867 usec
DE 10.00 usec
TE 298.1 K
D1 2.0000000 sec
D11 0.0300000 sec
TDO 1

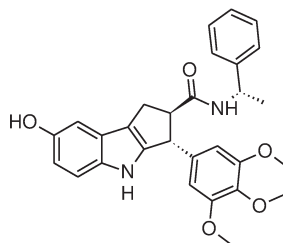
CHANNEL f1
SFO1 150.9279571 MHz
NUC1 13C
P1 16.50 usec
PLW1 95.0000000 W

CHANNEL f2
SFO2 600.1724007 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 70.00 usec
PLW2 9.0000000 W
PLW12 0.09990100 W
PLW13 0.04895200 W

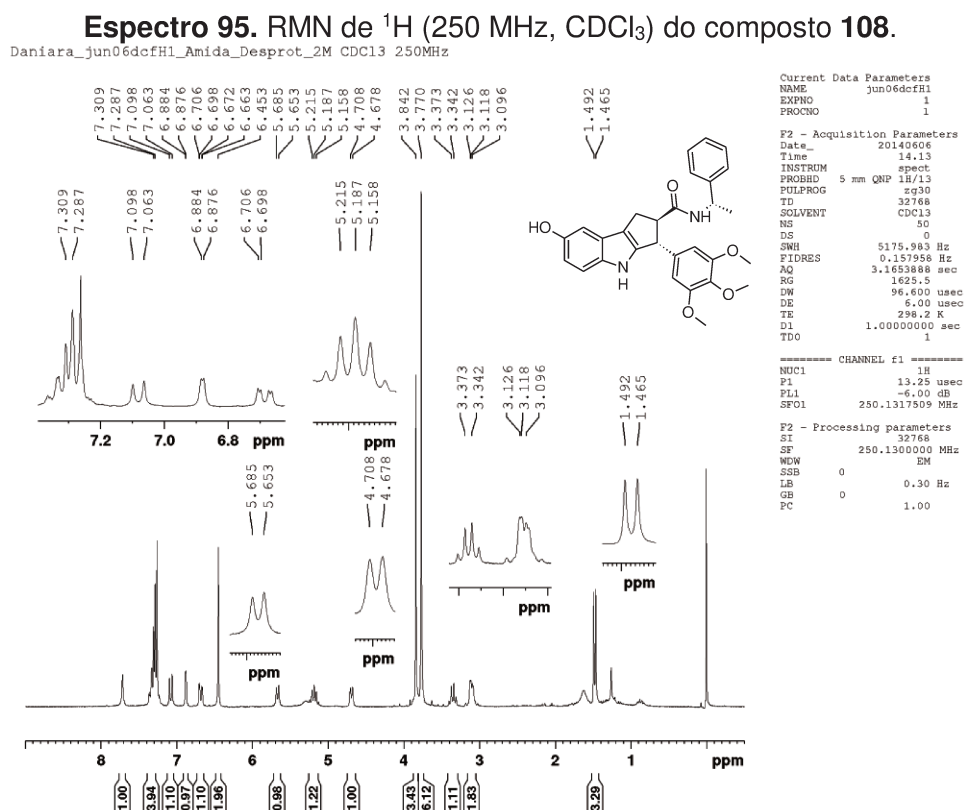
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 150.9128670 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

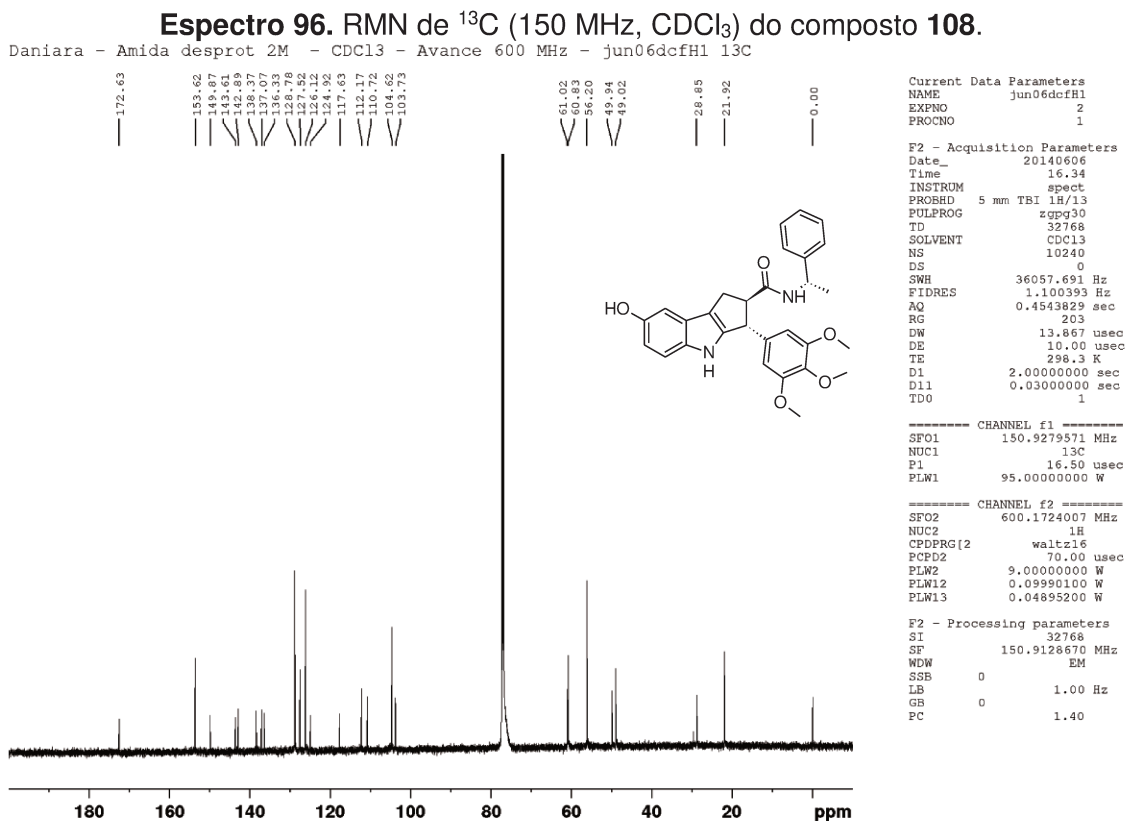


Composto 108: (2R,3R)-7-hidróxi-N-[(1S)-1-feniletil]-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-2-carboxamida

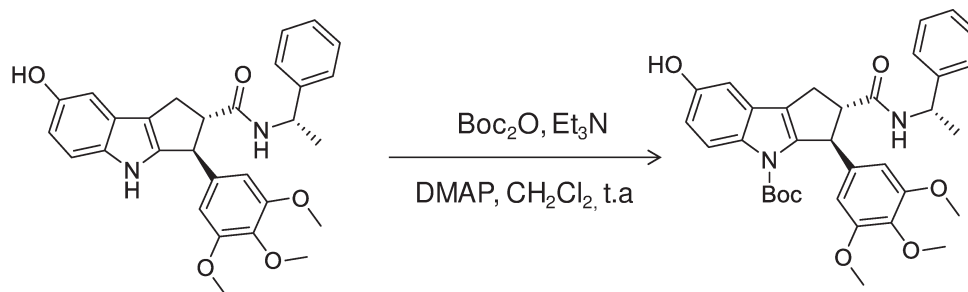


Tempo reacional: 3 h; **Rendimento:** 68%; **Característica:** óleo marrom; **IV (filme):** 3343, 2924, 1647, 1455, 1125, 698 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3):** δ 1,48 (d, J = 6,8 Hz, 3H); 3,10-3,13 (m, 2H); 3,34-3,37 (m, 1H); 3,77 (s, 6H); 3,84 (s, 3H); 4,69 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 5,16-5,22 (m, 1H); 5,67 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 6,45 (s, 2H); 6,68 (dd, J = 2,0 e 8,5 Hz, 1H); 6,88 (d, J = 2,0 Hz, 1H); 7,08 (d, J = 8,8 Hz, 1H); 7,29-7,31 (m, 5H); 7,72 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3):** δ 21,9; 28,9; 49,0; 49,9; 56,2; 60,8; 62,0; 103,7; 104,6; 110,7; 112,2; 117,6; 124,9; 126,1; 127,5; 128,8; 136,3; 137,1; 138,4; 142,9; 143,6; 149,9; 153,6; 172,6; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 509,2952, encontrado: 509,2068 .



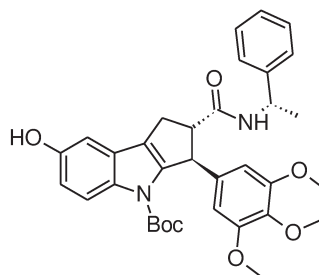


6.2.4. Procedimento geral para obtenção das amidas **109** e **110**



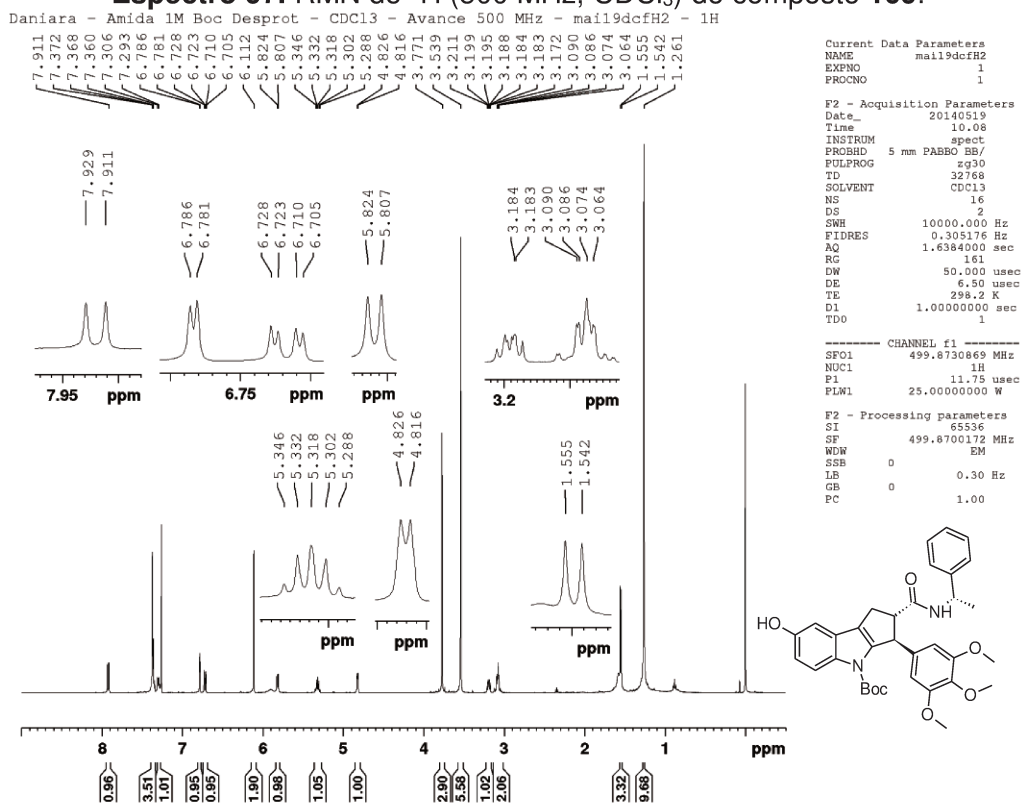
As amidas **107** e **108** (10 mg, 1 equiv.) foram dissolvidas em um balão contendo 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), Boc_2O (4 equiv.), Et_3N (2 equiv.) e DMAP (2 equiv.). A mistura foi deixada sob atmosfera de nitrogênio, a temperatura ambiente e sob agitação magnética por 1 h. Após acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD) foi feita uma filtração em papel de filtro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os produtos **109** e **110** foram purificados em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (70:30).

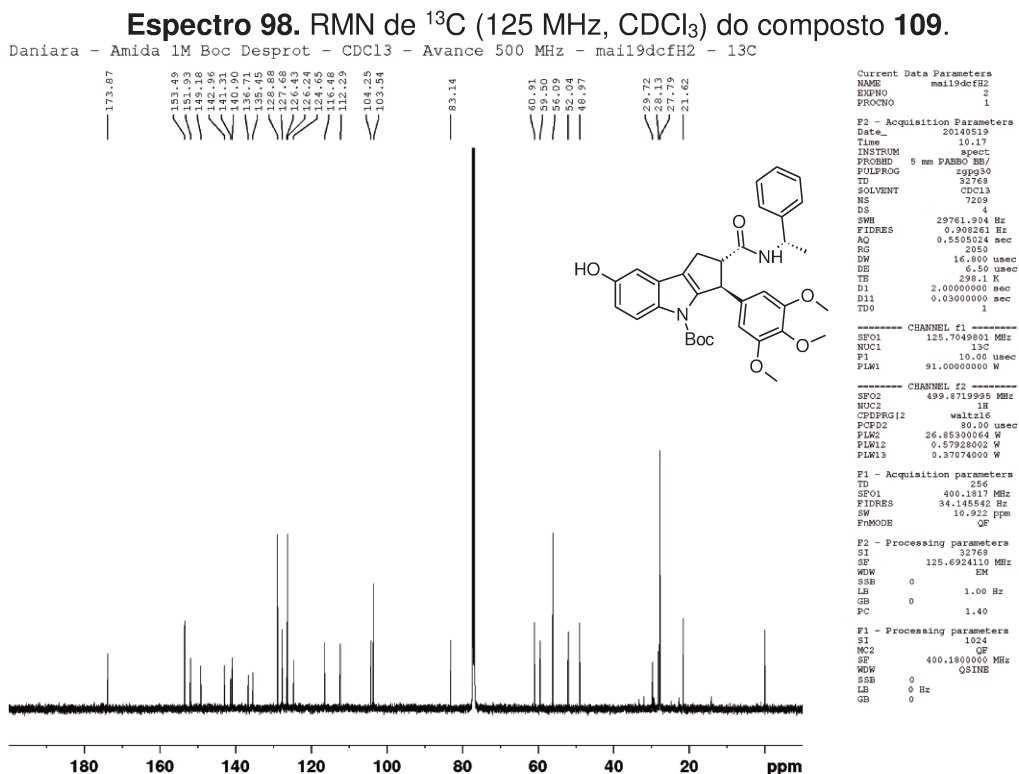
Composto 109: (2R,3R)-7-hidróxi-2-[[[(1S)-1-feniletil]carbamoil]-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-4-carboxilato de terc-butila



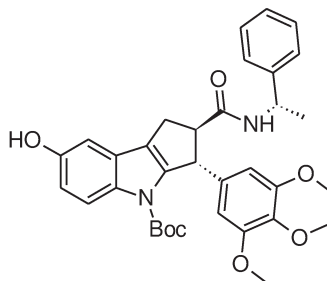
Tempo reacional: 1 h; Rendimento: 75%; Característica: óleo marrom; IV (filme): 3336, 2925, 1730, 1457, 1368, 1112 cm^{-1} ; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 1,26 (s, 9H); 1,55 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H); 3,06-3,09 (m, 2H); 3,17-3,21 (m, 1H); 3,54 (s, 6H); 3,77 (s, 3H); 4,82 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H); 5,29-5,35 (m, 1H); 5,82 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 6,11 (s, 2H); 6,72 (dd, $J = 2,5$ e $9,0$ Hz, 1H); 6,78 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 7,29-7,37 (m, 4H); 7,92 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 21,6; 27,8; 28,1; 29,7; 49,0; 52,0; 56,1; 59,5; 60,9; 83,1; 103,5; 104,3; 112,3; 116,5; 124,7; 126,2; 126,4; 127,7; 128,9; 135,5; 136,7; 140,9; 141,3; 143,0; 149,2; 151,9; 153,5; 173,9; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 609,2577, encontrado: 609,2569.

Espectro 97. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 109.





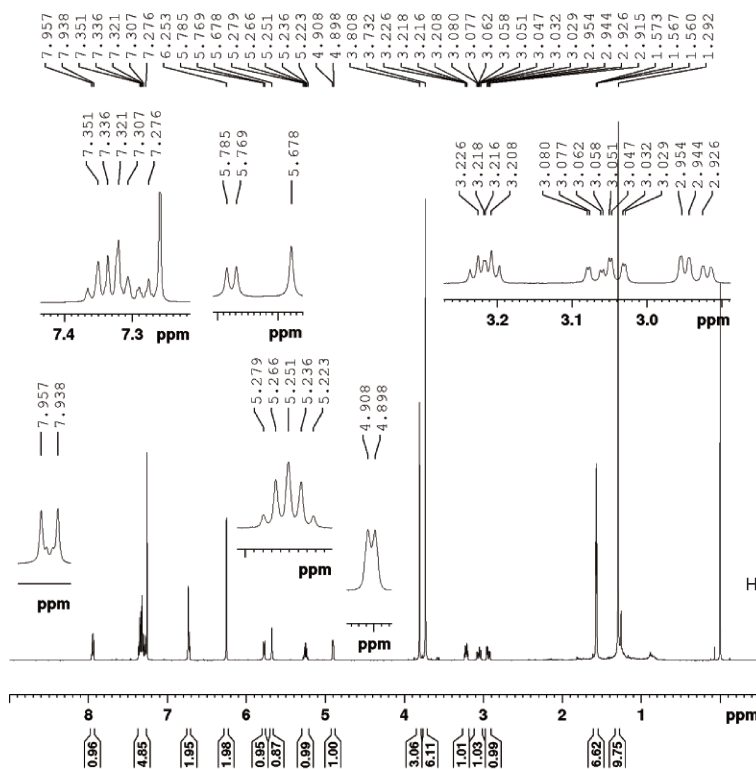
Composto 110: (2S,3S)-7-hidróxi-2-[[1(S)-1-feniletil]carbamoil]-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-4-carboxilato de terc-butila



Tempo reacional: 1 h; Rendimento: 75%; Característica: óleo marrom; IV (filme):
 3845, 1728, 1641, 1591, 1369; **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):** δ 1,29 (s, 9H); 1,56 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H); 2,92-2,95 (m, 1H); 3,03-3,08 (m, 1H); 3,21-3,23 (m, 1H); 3,73 (s, 6H); 3,81 (s, 3H); 4,90 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H); 5,22-5,28 (m, 1H); 5,68 (s, 1H); 5,78 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 6,25 (s, 2H); 6,72-6,74 (m, 2H); 7,28-7,35 (m, 5H); 7,95 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H);
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 21,9; 27,8; 28,2; 29,7; 49,1; 51,8; 56,3; 59,5; 61,0; 83,2; 103,8; 104,2; 112,3; 116,6; 124,5; 126,1; 126,4; 127,6; 128,9; 135,5; 136,9; 140,8; 141,7; 142,8; 149,2; 151,9; 153,5; 173,7; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 609,2577, encontrado: 609,2578.

Espectro 99. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 110.

Daniara - Amida Boc Desprot 2M - CDCl_3 - Avance 500 MHz - jun30dcfH1 - ^1H

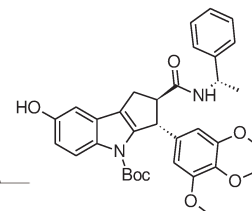


Current Data Parameters
NAME jun30dcfH1
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140630
Time 7.46
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 2
DS 16
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 1.6384000 sec
RG 181
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 298.1 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

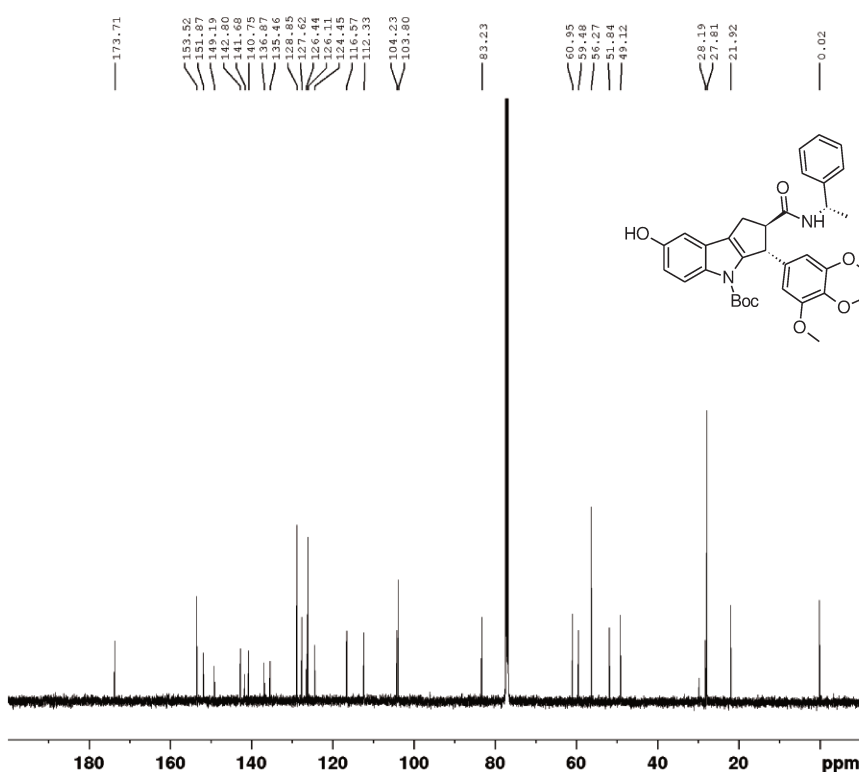
CHANNEL f1
SFO1 499.8730869 MHz
NUC1 ^1H
P1 11.75 usec
PLW1 25.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 499.8700177 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Espectro 100. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 110.

Daniara - Amida Boc Desprot 2M - CDCl_3 - Avance 500 MHz - jun30dcfH1 - ^{13}C



Current Data Parameters
NAME jun30dcfH1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140630
Time 7.51
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl_3
NS 4
DS 4
SWH 29761.904 Hz
FIDRES 0.908261 Hz
AQ 0.5505024 sec
RG 2050
DW 16.800 usec
DE 6.50 usec
TE 298.1 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

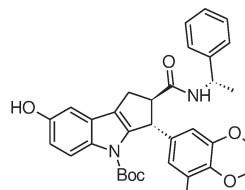
CHANNEL f1
SFO1 125.7049801 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 10.00 usec
PLW1 91.00000000 W

CHANNEL f2
SFO2 499.8719995 MHz
NUC2 ^1H
CPRPG2 waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 26.8530064 W
PLW12 0.27928002 W
PLW13 0.37074000 W

F1 - Acquisition parameters
TD 256
SFO1 400.1816 MHz
FIDRES 31.175180 Hz
SW 9.972 ppm
FwMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 125.6924110 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

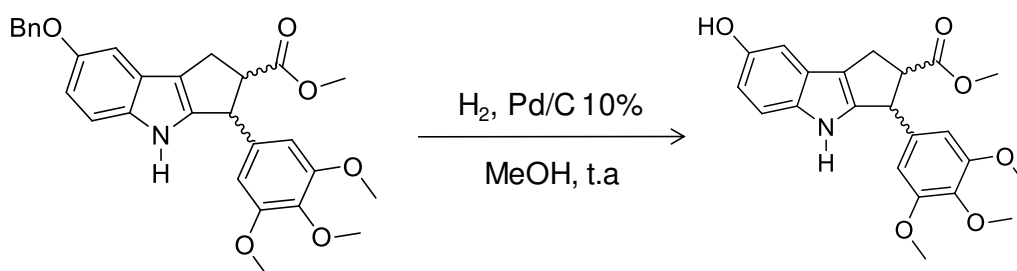
F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 400.1800000 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0



6.2.5. Procedimento geral para separação dos enantiômeros em cromatografia quiral

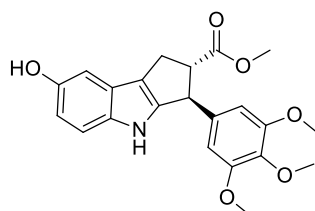
A resolução foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em parceria com a Prof^a Quézia Bezerra Cass e a Dra. Juliana Barreiro. Para isso, a mistura racêmica foi submetida à cromatografia quiral, no qual teve-se como fase estacionária derivados de fenilcarbamatos de amilose. Para a escala analítica utilizou-se uma coluna do tipo *Chiralpak* ID 150 mm x 2.1 mm x 3 um, fase móvel hexano:etanol (80:20), temperatura de 30°C, comprimento de onda igual a 230 nm e uma vazão de 0,15 mL/min. Para separação semipreparativa utilizou-se uma coluna do tipo *Chiralpak* ID 150 mm x 10 mm x 20 um, fase móvel hexano:etanol (80:20), temperatura de 30°C, comprimento de onda igual a 230 nm e uma vazão de 4 mL/min.

6.2.6. Procedimento geral para obtenção dos enantiômeros 51a e 51b

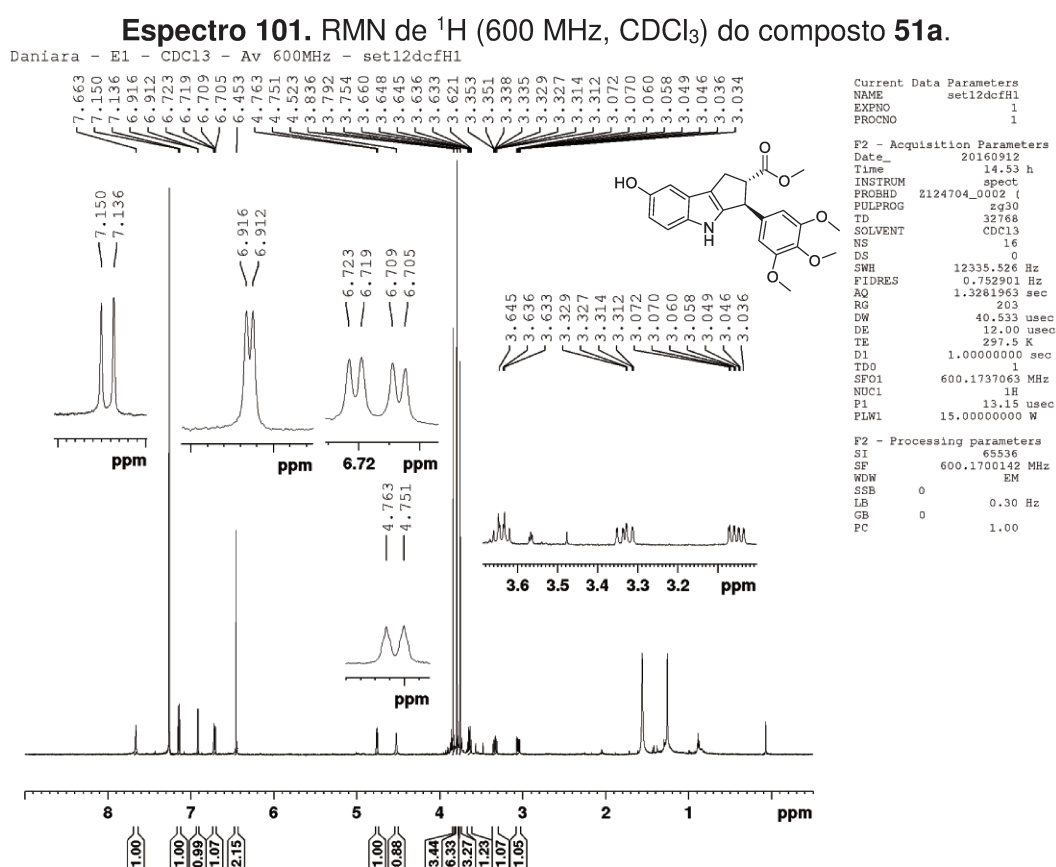


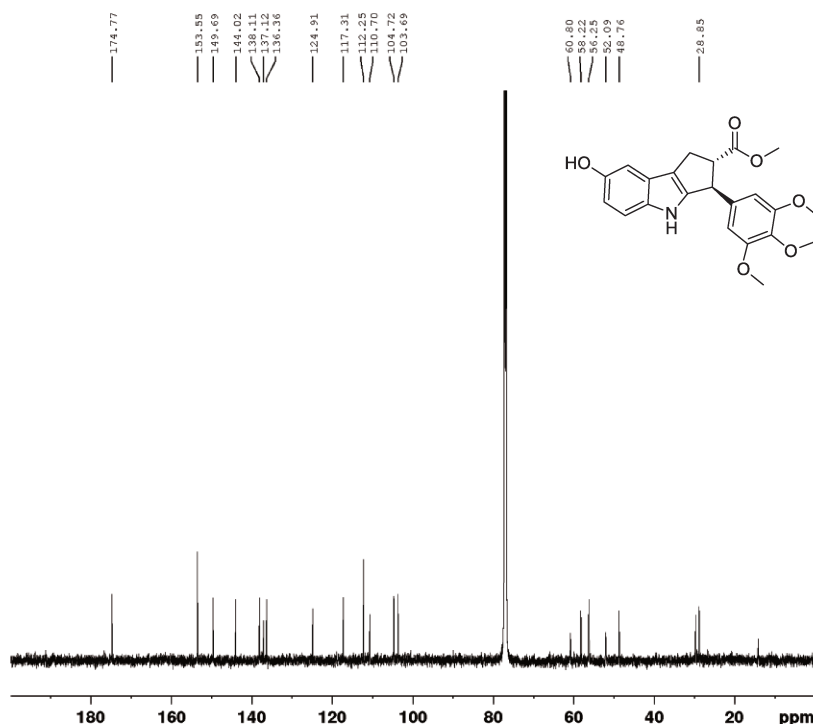
Após separação por meio da cromatografia quiral, os enantiômeros **80a** e **80b** foram submetidos a etapa de desproteção do grupo benzil. Para isso, 5 mg de cada composto foi dissolvido em MeOH em um balão contendo 3 mg de Pd/C 10%. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente e atmosfera de H₂ por 3h. Após esse período, os compostos enantiomericamente puros **51a** e **51b** foram purificados em coluna cromatográfica utilizando fase estacionária de sílica gel e fase móvel Hex:AcOEt (60:40).

Composto 51a: (2*S*,3*S*)-7-hidróxi-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-4-carboxilato de metila



Tempo reacional: 3 h; **Rendimento:** 74%; **Característica:** óleo marrom; **RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3):** δ 3,05 (ddd, $J = 1,6; 7,3$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,33 (ddd, $J = 1,3; 9,1$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,64 (dt, $J = 7,3$ e $9,1$ Hz, 1H); 3,75 (s, 3H); 3,79 (s, 6H); 3,84 (s, 3H); 4,52 (sl, 1H); 4,75 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H); 6,45 (s, 2H); 6,71 (dd, $J = 2,4$ e $8,4$ Hz, 1H); 6,91 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,14 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,66 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3):** δ 28,9; 48,8; 52,1; 56,2; 58,2; 60,8; 103,7; 104,7; 110,7; 112,3; 117,3; 124,9; 136,4; 137,1; 138,1; 144,0; 149,7; 153,6; 174,8; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 398,1598, encontrado: 398,1593; $\alpha_D^{20} = -38$.



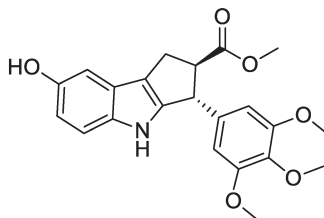
Espectro 102. RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) do composto 51a.Daniara - E1 - CDCl_3 - Av 600MHz - set12dcfH1 ^{13}C
14h

Current Data Parameters
 NAME set12dcfH1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20160913
 Time 6.50 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z124704_0002 ()
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl_3
 NS 20480
 DS 0
 SWH 40760.871 Hz
 FIDRES 2.487846 Hz
 AQ 0.4019541 sec
 RG 203
 DW 12.267 usec
 DE 10.00 usec
 TE 297.4 K
 D1 2.0000000 sec
 D11 0.0300000 sec
 TDO 1
 SFO1 150.9309761 MHz
 NUC1 ^{13}C
 P1 9.10 usec
 PLW1 89.90000153 W
 SFO2 600.1724007 MHz
 NUC2 ^1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 70.00 usec
 PLW2 15.00000000 W
 PLW12 1.54970002 W
 PLW13 0.77951002 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 150.9128670 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 2.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

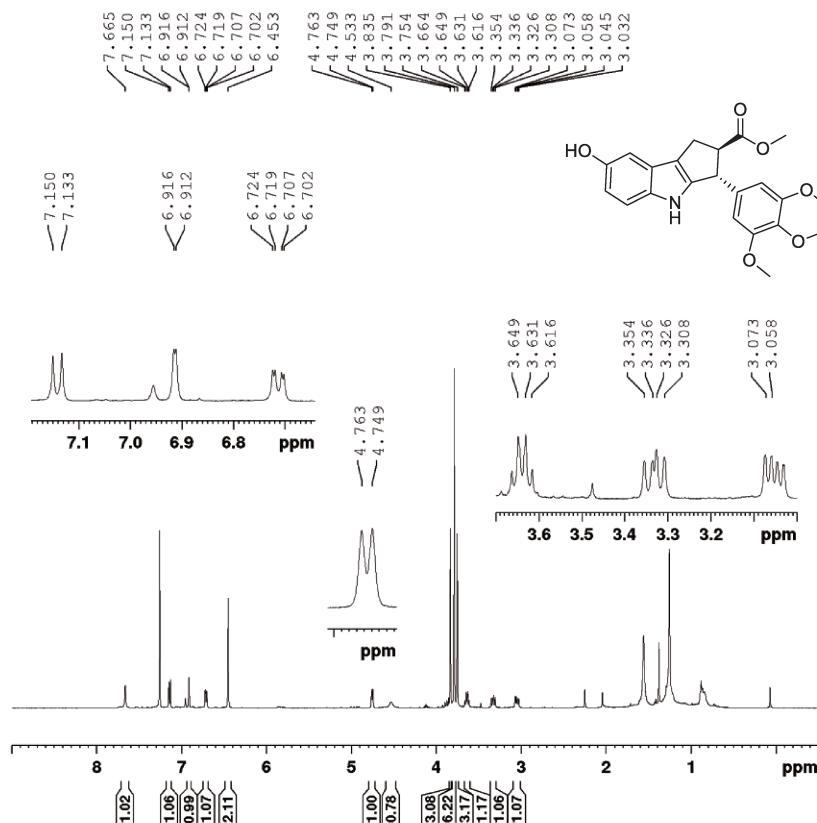
Composto 51b: (2R,3R)-7-hidróxi-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1H,2H,3H,4H-ciclopenta[b]indol-4-carboxilato de metila



Tempo reacional: 3 h; Rendimento: 72%; Característica: óleo marrom; RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 3,05 (ddd, $J = 1,3; 7,3$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,33 (dd, $J = 9,3$ e $14,2$ Hz, 1H); 3,62-3,66 (m, 1H); 3,75 (s, 3H); 3,79 (s, 6H); 3,84 (s, 3H); 4,52 (sl, 1H); 4,76 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H); 6,45 (s, 2H); 6,71 (dd, $J = 2,5$ e $8,5$ Hz, 1H); 6,91 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,14 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 7,67 (sl, 1H); **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ 28,9; 48,8; 52,1; 56,2; 58,2; 60,8; 103,7; 104,7; 110,7; 112,3; 117,3; 124,9; 136,4; 137,1; 138,1; 144,0; 149,7; 153,6; 174,8; **HRMS (ESI, m/z):** Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 420,1418, encontrado: 420,1410; $\alpha_D^{20} = +34$.

Espectro 103. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **51b**.

Daniara - E2 - Enantiomero 1 - CDCl_3 - Avance 500 MHz - set13dcfH1 - ^1H



Current Data Parameters
 NAME set13dcfH1
 EXPNO 1
 PROCNO 1

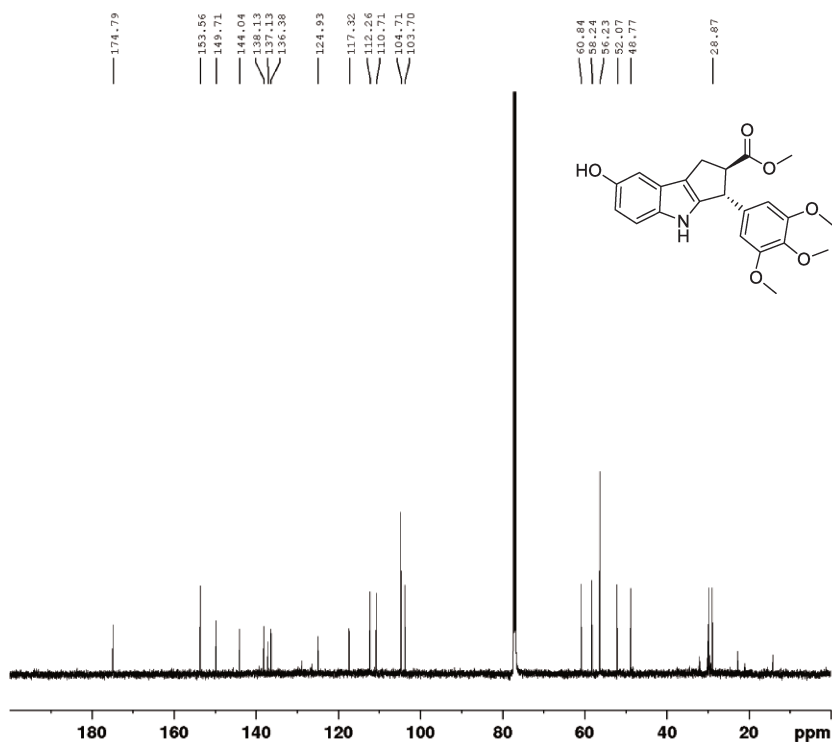
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20160913
 Time 13.39
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl_3
 NS 32
 DS 0
 SWH 10302.198 Hz
 FIDRES 0.314398 Hz
 AQ 1.5903403 sec
 RG 228
 DW 48.533 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 499.8730869 MHz
 NUC1 ^1H
 P1 11.75 usec
 PLW1 25.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 499.8700176 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro 104. RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **51b**.

Daniara - E2 - Enantiomero 1 - CDCl_3 - Avance 500 MHz - set13dcfH1 - ^{13}C
 12 h 8 min



Current Data Parameters
 NAME set13dcfH1
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20160914
 Time 7.01
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl_3
 NS 17057
 DS 0
 SWH 32894.738 Hz
 FIDRES 1.003868 Hz
 AQ 0.4980736 sec
 RG 2050
 DW 15.200 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 125.7062372 MHz
 NUC1 ^{13}C
 P1 10.00 usec
 PLW1 91.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
 SFO2 499.8719995 MHz
 NUC2 ^1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 26.85300064 W
 PLW12 0.57928002 W
 PLW13 0.37074000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.6924110 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

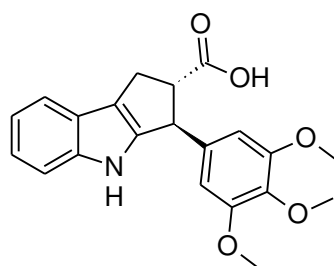
6.3. Obtenção dos cristais e dados cristalográficos

O composto **93** foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol. Após, a solução foi resfriada em frizzer por 1 semana, filtrada e lavada com pequenas porções de clorofórmio a temperatura ambiente. A mistura foi deixada em repouso até evaporação completa do solvente e formação dos monocristais, os quais foram analisados por difração de Raio-X com o auxílio do Prof^o Ricardo Aparício, da Dra. Deborah de Alencar Simoni e do doutorando Jorge H. K. Monteiro.

Os dados de difração de Raio-X foram coletados no difratômetro Bruker Kappa APEX II Duo usando radiação Mo K α ($K\alpha = 0.71073 \text{ \AA}$) radiação. A temperatura de aquisição dos dados foi mantida a 298 K. A aquisição dos dados foi realizada com o software APEX2¹⁴³, a redução dos dados e refinamento da célula foi realizada com o software SHELXS-97¹⁴⁴ e a determinação e o refinamento estrutural, com o software SHELXL-2014.¹⁴⁵

Os átomos de hidrogênio foram colocados em posições idealizadas com comprimentos de ligação C-H de 0,95, 0,98 e 0,99 para o grupo fenílico, metílico e metileno, respectivamente. Os valores dos parâmetros de deslocamento isotrópico (Uiso (H)) foram fixados em 1.5 Ueq (C) para H metílicos e 1.2 Ueq (C) para os demais.

Composto **93**: Ácido 3-(3,4,5-trimetóxfenil)-1*H*,2*H*,3*H*,4*H*-ciclopenta[*b*]indol-2-carboxílico



Dados cristalográficos

Estrutura molecular: C₂₁H₂₁NO₅

M: 367,39

Crystal system, space group: Triclinic, *P*

Temperature (K): 100

a, *b*, *c* (Å): 7,203 (1); 9,5844 (12); 12,9957 (17)

α , β , γ (°): 91,939 (5); 97,198 (6); 91,716 (5)

V (Å³): 889,1 (2)

Z: 2

Radiation type: Mo K α

μ (mm⁻¹): 0,10

Crystal size (mm): 0,34 × 0,17 × 0,13

Data collection

Diffractometer Bruker: APEX CCD

Detector: diffractometer Absorption correction Multi-scan SADABS

T_{\min} , T_{\max} : 0,967; 0,987

No. of measured, independent and observed [$I > 2\sigma(I)$] reflections: 100846, 7825, 6558

R_{int} : 0,031

$(\sin \theta/\lambda)_{\text{max}}$ (Å⁻¹): 0,806

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$, S : 0,038; 0,119; 0,94

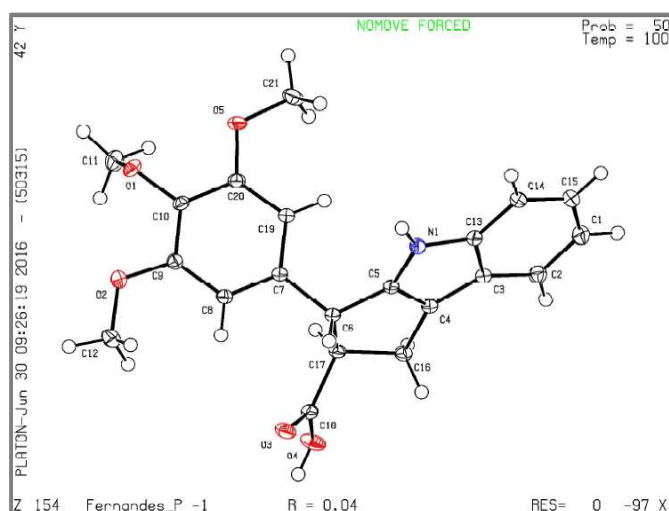
No. of reflections: 7825

No. of parameters: 248

H-atom treatment: H-atom parameters constrained

$\Delta\rho_{\text{max}}$, $\Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å⁻³): 0,58; -0,27

Figura 56. Estrutura molecular do ciclopenta[b]indol **93** com elipsoides de 50% de probabilidade.



7. REFERÊNCIAS

- 1 WHO, World Health Statistics Report. **2016**, Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 05/07/2016.
- 2 Bray, F.; Moller, B. *Nat. Rev. Cancer*. **2006**, 6, 63.
- 3 Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. *Cancer J. Clin.* **2015**, 65, 87.
- 4 Saha, S. K.; Khuda-Bukhsh, A. R. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 714, 239.
- 5 Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell*. **2011**, 144, 646.
- 6 Cuendt, M.; Oteham, C. P.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 3, 460.
- 7 Lundberg, A. S.; Weinberg, R. A. *Eur. J. Cancer*. **1999**, 35, 4, 531.
- 8 Reddy, L.; Odhav, B.; Bhoola, K. D. *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99, 1, 1.
- 9 Smith, J. S.; Herrero, R.; Bosetti, C.; Muñoz, N.; Bosch, F. X.; Eluf-Neto, J.; Castellsagué, X.; Meijer, C. J. L. M.; Van den Brule, A. J. C.; Franceschi, S.; Ashley, R. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, 6, 94, 21, 1604.
- 10 Wu, S.; Powers, S.; Zhu, W.; Hannun, Y. A. *Nature*. **2016**, 529, 43.
- 11 INCA, **2016**. Instituto Nacional de Câncer, Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil.
- 12 Chow, A. Y. *Nature Ed.* **2010**, 3, 9, 7.
- 13 Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. *Nat. Med.* **2004**, 10, 789.
- 14 Nelson, D. L.; Cox, M. M. Em *Lehninger: Princípios de Bioquímica*, 3ª Ed, Editora Sarvier, São Paulo, SP, Brasil, **2002**.
- 15 Karp, J. E.; Broder, S. *Nat. Med.* **1995**, 1, 309.
- 16 Ortega, S.; Malumbres, M.; Barbacid, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1602, 73.
- 17 Zhou, B. S.; Zhang, H.; Damelin, M.; Geles, K. G.; Grindley, J. C.; Dirks, P. B. *Nat. Rev.* **2009**, 8, 806.
- 18 Foye, W. O.; Sengupta, S. K. Em *Principles of Medicinal Chemistry*, 4ª ed, Williams & Wilkins: Baltimore, **1995**.

- 19** Burdelya, L. G.; Krivokrysenko, V. I.; Tallant, T. C.; Strom, E.; Gleiberman, A. S.; Gupta, D.; Kurnasov, O. V.; Fort, F. L.; Osterman, A. L.; DiDonato, J. A.; Feinstein, E.; Gudkov, A. V. *Science*. **2008**, 320, 11, 5873, 226.
- 20** Nygren, P.; Larsson, R. *J. Int. Medic.* **2003**, 253, 46.
- 21** Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L. *Quim. Nova*. **2005**, 28, 1, 118.
- 22** Bertram, J. S. *Mol. Aspects Med.* **2001**, 21, 167.
- 23** Roithmann S. Em Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional, 2^a Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **1998**.
- 24** Jong, F. A.; Jonge, M. J. A.; Verweij, J.; Mathijssen, R. H. J. *Cancer Lett.* **2006**, 234, 90.
- 25** Steeg, P. S. *Nature*. **2016**, 16, 201.
- 26** Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer*. **2004**, 4, 253.
- 27** Kavallaris, M. *Nat. Rev. Cancer*. **2010**, 10, 194.
- 28** Salum, L. B.; Dias, L. C.; Andricopulo, A. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 4, 693.
- 29** Zhou, J.; Giannakakou, P. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 5, 65.
- 30** Sapra, S.; Bhalla, Y.; Nandani, S.; Singh, G.; Nepali, K. A.; Budhiraja, K. L. *Med. Chem. Res.* **2013**, 22, 531.
- 31** Rappl, C.; Barbier, P.; Bourgarel-Rey, V.; Grégoire, C.; Gilli, R.; Carre, M.; Combes, S.; Finet, J. P.; Peyrot, V. *Biochem.* **2006**, 45, 9210.
- 32** Zhao, H.; Quan, H.; Xie, C.; Xu, Y.; Xie, F.; Hu, Y.; Lou, L. *Cancer Lett.* **2012**, 314, 54.
- 33** Brancale, A.; Silvestri, R. *Med. Res. Rev.* **2007**, 27, 2, 209.
- 34** Nguyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Zaharevitz, D. W.; Day, B. W.; Wipf, P.; Hamel, E.; Gussio, R. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6107.
- 35** Patil, S. A.; Patil, R.; Miller, D. D. *Future Med. Chem.* **2012**, 4, 16, 2085.

- 36** La Regina, G.; Bai, R.; Rensen, W. M.; Di Cesare, E.; Coluccia, A.; Piscitelli, F.; Famigliani, V.; Reggio, A.; Nalli, M.; Pelliccia, S.; Pozzo, E.; Costa, B.; Granata, I.; Porta, A.; Maresca, B.; Soriani, A.; Iannitto, M. L.; Santoni, A.; Li, J.; Cona, M. M.; Chen, F.; Ni, Y.; Brancale, A.; Dondio, G.; Vultaggio, S.; Varasi, M.; Mercurio, C.; Martini, C.; Hamel, E.; Lavia, P.; Novellino, E.; Silvestri, R.; *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 123.
- 37** Nepali, K.; Sharma, S.; Sharma, M.; Bedi, P. M.; Dhar, K. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 77, 422.
- 38** (a) Morita, K.; Suzuki, Z.; Hirose, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, 41, 2815. (b) Baylis, A. B.; Hillman, M. E. D.; DE 2155113, **1972** (CA 1972, 77, 434174).
- 39** Coelho, F.; Rossi, R. C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 2797.
- 40** Coelho, F. A. S.; Almeida, W. P. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 5, 937.
- 41** Amarante, G. W.; Rezende, P.; Cavallaro, M.; Coelho, F. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3744. Pedido de privilégio de Invenção, protocolo INPI No PI0900158-1, de 07 de janeiro de 2009.
- 42** Silveira, G. P. C.; Coelho, F. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 38, 6477. Pedido de privilégio INPI PI0603112-9 (13 de julho de 2006).
- 43** Luna Freire, K. R.; Scaramal, J. P. S.; Resende, J. A. L. C.; Tormena, C. F.; Oliveira, F. L.; Aparicio, R.; Coelho, F. *Tetrahedron.* **2014**, 70, 3319.
- 44** Amarante, G. W.; Cavallaro, M.; Coelho, F. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2597.
- 45** Rodrigues Jr, M. T.; Gomes, J. C.; Smith, J.; Coelho, F. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 4988.
- 46** Ullah, H.; Ferreira, A. V.; Bendassolli, J. A.; Rodrigues Jr, M. T.; Formiga, A. L. B.; Coelho, F. *Synthesis.* **2015**, 47, 113.
- 47** Barcelos, R. C.; Zeoly, L.; Rodrigues Jr, M. T.; Ferreira, B. R. V.; Eberlin, M. N.; Coelho, F. *Monatsh. Chem.* **2015**, 146, 3.
- 48** Kohn, L. K.; Pavam, C. H.; Veronese, D.; Coelho, F.; De Carvalho, J. E.; Almeida, W. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, 41, 6, 738.
- 49** Nascimento dos Santos, R. Estudos computacionais e experimentais no desenvolvimento de novos fármacos e na análise estrutural de macromoléculas. **2015**. (Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular), Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- 50** Bonne, D.; Heuséle, C.; Simon, C.; Pantaloni, D. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 2819.
- 51** Dyrager, C.; Wickström, M.; Fridén-Saxin, M.; Friberg, A.; Dahlén, K.; Wallén, E. A.; Gullbo, J.; Grøtli, M.; Luthman, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2659.
- 52** Cytoskeleton Tubulin polymerization assay using 99% pure tubulin, fluorescence based. Disponível em <http://www.cytoskeleton.com/bk011p/>. Acesso em: 24 junho de 2016.
- 53** Gaskin, F.; Cantor, C. R.; Shelanski, M. L. *J. Mol. Biol.* **1974**, 89, 737.
- 54** Li, C. M.; Lu, Y.; Ahn, S.; Narayanan, R.; Miller, D. D.; Dalton, J. T. *J. Mass. Spectrom.* **2010**, 45, 1160.
- 55** Gururaja T. L.; Goff, D.; Kinoshita, T.; Goldstein, E.; Yung, S.; McLaughlin, J.; Pali, E.; Huang, J.; Singh, R.; Daniel-Issakani, S.; Hitoshi, Y.; Cooper, R. D. G.; Payan, D. G. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 3831.
- 56** Clark, J. I.; Garland, D. *J. Cell. Biol.*, **1978**, 76, 619.
- 57** Lipinski, C. A. *Drug Discov. Today Tech.* **2004**, 1, 337.
- 58** Fernandes, D. C.; Simoni, D. A.; Rodrigues, M. T.; Santos, M. S.; Coelho, F. *Acta Cryst. E.* **2015**, 71, 395.
- 59** Alteij, W. F. Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos. **2014**. (Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular), Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- 60** Cornejo, A.; Oliveira, C. R.; Wurtele, M.; Chung, J.; Hilpert, K.; Schenkman, S. *Protein and Pept. Lett.* **2012**, 19, 6, 636.
- 61** Cory, A. H.; Owen, T. C.; Barltrop, J. A.; Cory, J. G. *Cancer Commun.* **1991**, 3, 7, 207.
- 62** Barreiro, E. J. *Rev. Virtual Quim.* **2009**, 1, 1, 26.
- 63** Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 7, 3012.
- 64** Cragg, G. M.; Newman, D. J. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629.
- 65** Kingston, D. G.; Chaudhary, A. G.; Chordia, M. D.; Gharpure, M.; Gunatilaka, A. A.; Higgs, P. I.; Rimoldi, J. M.; Samala, L.; Jagtap, P. G.; Giannakakou, P.; Jiang, Y. Q.; Lin, C. M.; Hamel, E.; Long, B. H.; Fairchild, C. R.; Johnston, K. A. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3715.
- 66** Verma, R. P.; Hansch, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1470.

- 67** Guido, R. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. Av.* **2010**, *24*, 70, 81.
- 68** Andrade, C. H.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I.; Hopfinger, A. J. *Molecules.* **2010**, *15*, 3281.
- 69** Andricopulo, A. D.; Montanari, C. A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 585.
- 70** Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 37.
- 71** Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O. *J Cel. Mol. Med.* **2009**, *13*, 2, 238.
- 72** Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2004**, *3*, 935.
- 73** McConkey, B. J.; Sobolev, V.; Edelman, M. *Curr. Sci.* **2002**, *83*, 7, 845.
- 74** Bursulaya, B. D.; Totrov, M.; Abagyan, R.; Brooks, C. L. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2003**, *17*, 755.
- 75** Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 3, 470.
- 76** Ewing, T. J.; Makino, S.; Skillman, A. G.; Kuntz, I. D. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2001**, *15*, 5, 411.
- 77** Jain, A. N. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4, 499.
- 78** Rocha, J. R. Planejamento de inibidores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. **2010**. (Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Química), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- 79** Docking Suite Manual release in SYBYL 8.0, **2007**, Tripos Inc., St. Louis, MO.
- 80** Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727.
- 81** Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olsonet, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 14, 1639.
- 82** Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 335.
- 83** Coupez, B.; Lewis, R. A. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 25, 2995.
- 84** Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D. *R. P.Q/SENAI.* **2008**, *2*, 4.

- 85** Araújo, C. R. M.; Filho, C. A. L.; Santos, V. L. A.; Maia, G. L. A.; Gonsalves, A. A. *Quim. Nova.* **2015**, 38, 6, 868.
- 86** Ward, J. S.; Merritt, L.; Klimkowski, V. J.; Lamb, M. L.; Mitch, C. H.; Bymaster, F. P.; Sawyer, B.; Shannon, H. E.; Olesen, P. H.; Sheardown, M. J.; Sauerberg, P.J. *Med. Chem.* **1992**, 35, 4011.
- 87** Barreiro, E. J. *Quim. Nova.* **2002**, 25, 6B, 1172.
- 88** Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V. Em Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna, 3ª Ed, Argos Editora Universitária, UNOESC: Chapecó, **2001**.
- 89** Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, 41, 10, 1543.
- 90** Barreiro, E. J.; Lima, L. M. *Curr. Med. Chemistry.* **2005**, 12, 23.
- 91** Friedman, H. L. *NASNRS.* **1951**, 206, 229.
- 92** Patani, G. A.; Lavoie, E. J. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147.
- 93** Wermuth, C. G. Em *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3ª Ed, Academic Press, San Diego, **2005**.
- 94** Patrick, G. L. Em *An introduction to Medicinal Chemistry*, 4ª Ed, Oxford: Oxford University Press, **2009**.
- 95** Ratni, H.; Blum-Kaelin, D.; Dehmlow, H.; Hartman, P.; Jablonski, P.; Masciadri, R.; Maugeais, C.; Patiny-Adam, A.; Panday, N.; Wright, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1654.
- 96** Roll, D. M.; Barbieri, L. R.; Bigelis, R.; McDonald, L. A.; Arias, D. A.; Chang, L.; Singh, M. P.; Luckman, S. W.; Berrodin, T. J.; Yudt, M. R. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1944.
- 97** Talaz, O.; Gulçin, I.; Goksu, S.; Saracoglu, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6583.
- 98** Hillier, M. C.; Marcoux, J. F.; Zhao, D.; Grabowski, E. J.; McKeown, A. E.; Tillyer, R. D. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8385.
- 99** Xu, B.; Guo, Z.; Jin, W.; Wang, Z.; Peng, Y.; Guo, Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1059.
- 100** Humphrey, G. R.; Kuethe, J. T. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2875.
- 101** Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1983**, 16, 2241.
- 102** Pombo-Villar, E. *Helv. Chim. Acta.* **2004**, 87, 82.

- 103** Coelho, F.; Almeida, W. P.; Veronese, D.; Mateus, C. R.; Lopes, E. C. S.; Rossi, R. C.; Silveira, G. P. C.; Pavam, C. H. *Tetrahedron*. **2002**, 58, 7437.
- 104** Santos, M. S. A potencialidade sintética da reação de Morita-Baylis-Hillman explorada na síntese de compostos tricarbonilados vicinais e derivados ciclopenta[*b*]indólicos. **2012**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- 105** Santos, M. S.; Fernandes, D. C.; Rodrigues Jr, M. T.; Andricopulo, A. D.; Ruiz, A. L. T. G.; Vendramini-Costa, D. B.; Carvalho, J. E.; Eberlin, M. N.; Coelho, F. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 6626.
- 106** Basavaiah, D.; Veeraraghavaiah, G. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 68.
- 107** Wei, Y.; Shi, M. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 6659.
- 108** Santos, M. S.; Coelho, F.; Lima-Junior, C. G.; Vasconcellos, M. L. A. *Curr. Org. Synth.* **2015**, 12, 6, 830.
- 109** Hoffmann, H. M. R.; Rabe, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 795.
- 110** Hill, J. S.; Isaacs, N. S. J. *Phys. Org. Chem.* **1990**, 3, 285.
- 111** Price, K. E.; Broadwater, S. J.; Jung, H. M.; McQuade, D. T. *Org. Lett.* **2005**, 7, 147.
- 112** Price, K. E.; Broadwater, S. J.; Walker, B. J.; McQuade, D. T. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3980.
- 113** Aggarwal, V. K.; Robiette, R.; Harvey, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15513.
- 114** Plata, R. E.; Singleton, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 3811.
- 115** Molinspiration Property Explorer. Disponível em: <http://www.molinspiration.com/>. Acesso em: 07/07/2014.
- 116** Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3.
- 117** Quinn, R. J.; Carroll, A. R.; Pham, N. B.; Baron, P.; Palframan, M. E.; Suraweera, L.; Pierens, G. K.; Muresan, S. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 464.
- 118** Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Singh, A. P.; Basak, A. K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 4169.
- 119** Liel, E. L.; Wilen, S. H.; Mander, L. N. Em *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley. Interscience, N. York, **1994**.

- 120** Bruice, Paula Yurkanis. *Em Química orgânica*, 4ª Ed, São Paulo: Pearson Prentice Hall, v.1, **2006**.
- 121** Barreiro, E. J.; Ferreira, V. F.; Costa, P. R. R. *Quim. Nova*. **1997**, 20, 6, 647.
- 122** Caldwell, J. J. *J. Chromatogr.* **1995**, 694, 39.
- 123** Ariens, E. J. *Em Stereoselectivity of Bioactive Agents: General Aspects*, Backwell, Oxford, **1982**.
- 124** Lima, V. R. E. *Quim.Nova*. **1997**, 20, 657.
- 125** Fabros, S.; Smith, R. L.; William, R. T. *Nature*. **1990**, 13, 29.
- 126** Coelho, F. A. S. *Cadernos Temáticos-QNESC*. **2001**, 3, 23.
- 127** Cremasco, Marco Aurélio. *Cienc. Cult.* **2013**, 65, 3, 4.
- 128** Solomons, G.; Fryhle, C. *Em Organic Chemistry*, 7ª Ed, John Wiley and Sons, Nova Iorque, **2000**.
- 129** Hyneck, M.; Dent, J.; Hook, J. B. *Em Chirality: pharmacological action and drug development*, London: Academic Press, **1990**.
- 130** Romero, A. L.; Baptistella, L. H. B.; Coelho, F.; Imamura, P. M. *Quim. Nova*. **2012**, 35, 8, 1680.
- 131** Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 195.
- 132** Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*, 2ª Ed, John Wiley & Sons-NY, **1997**.
- 133** Bonato, P. S.; Jabor, V. A. P.; Gaitanil, C. M. *Quim. Nova*. **2005**, 28, 4, 683.
- 134** Cass, Q. B.; Lourenço, T. C.; Cassiano, N. M. *Quim. Nova*. **2010**, 33, 10, 2155.
- 135** Flynn, D. L.; Zelle, R. E.; Grieco, P. A. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 14, 2424.
- 136** Evans, D. A. Carter, P. H.; Dinsmore, C. J.; Barrow, J. C.; Katz, J. L.; Kung, D. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 26, 4535.
- 137** Darbeau, R. W.; Gible, R. E.; Pease, R. S.; Bridges, D. E.; Siso, L. M.; Heurtin, D. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2001**, 1084.
- 138** Charette, A. B.; Chua, P. *Synlett*. **1998**, 2, 163.
- 139** Ghosh, P.; Aubé, J. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 4168.

- 140** Yashima, E. *J. Chromatogr. A.* **2001**, 906, 105.
- 141** Copeland, R. A. *Em Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, 1^a Ed, Wiley-Interscience, **2005**.
- 142** Burk, R. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, 70, 2, 368.
- 143** Bruker (**2010**). *APEX2, SAINT and SADABS*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- 144** Sheldrick, G. M. *Acta Cryst.* **2008**, A64, 112.
- 145** Sheldrick, G. M. *Acta Cryst.* **2015**, C71, 3.