



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Isadora Bolzoni Pacheco

Estudo Molecular e Espectroscópico
da Interação de Derivados Dihidropiridínicos com o DNA

Florianópolis

2023

Isadora Bolzoni Pacheco

Estudo Molecular e Espectroscópico
da Interação de Derivados Dihidropiridínicos com o DNA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina para
a obtenção do título de mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt

Coorientadora: Prof^a Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis

2023

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

Bolzoni Pacheco, Isado

Estudo Molecular e Espectroscópico da Interação de
Derivados Dihidropiridínicos com o DNA / Isado Bolzoni
Pacheco ; orientadora, Ricardo Ferreira Affeldtt,
coorientador, Rozangela Curi Pedrosa, 2023.
127 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. núcleo dihidropiridínico. 3. ctDNA. 4. in
silico . 5. estudo fotofísico . I. Ferreira Affeldtt,
Ricardo. II. Curi Pedrosa, Rozangela. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. IV. Título.

Isadora Bolzoni Pacheco

**Estudo Molecular e Espectroscópico da Interação
de Derivados Dihidropiridínicos com o DNA**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 10 de novembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Hernan Francisco Terenzi, Dr.
UFSC (PPGQ)

Prof.^a Lílian Sibelle Campos Bernardes, Dr.^a
UFSC (PPGFAR)

Prof.^a Juliana Paula da Silva, Dr.^a
UFSC (PPGQ)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Ricardo Ferreira Affeldt
Orientador



Prof.^a Rozangela Curi Pedrosa
Co-orientadora

Florianópolis, 2023.

“Discovery consists of seeing what everybody has seen and thinking what nobody has thought” Albert Szent-Gyorgyi (Biochemist, 1937 Nobel Prize for Medicine)

Isadora Bolzoni Pacheco
Estudo Molecular e Espectroscópico
da Interação de Derivados Dihidropiridínicos com o DNA

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais Neiva e Maurício, e meus avós Clarice e José (à memória) pelo apoio em todas as minhas escolhas, pelo amor, pelas palavras diárias de incentivo e por sempre acreditarem em mim. Sou eternamente grata por ter vocês na minha vida.

Ao meu namorado Victor, sua paciência, compreensão e encorajamento foram fundamentais para superar os desafios enfrentados. Sua presença ao meu lado tornou tudo mais leve e fácil, obrigada.

A minha amiga, Amanda, por viver intensamente a mesma jornada. Sua amizade foi um verdadeiro presente.

Ao professor Ricardo Ferreira Affeldt, pela orientação, conhecimentos compartilhados durante esses anos e constante motivação ao longo deste processo, e à professora Rozangela Pedrosa Curi pela coorientação e conhecimentos na área de bioquímica.

Minha profunda gratidão também para meus colegas de laboratório, especialmente Larissa e Willian pelas inúmeras discussões e sugestões, vocês foram peças fundamentais nesse trabalho. Agradeço também a Claudiana pela parceria e dedicação no trabalho, tenho certeza de que o projeto terá uma continuidade brilhante.

Aos colegas do LaCFI, além da amizade que construímos, sou grata a todas as contribuições, trocas de ideias e discussões nessa trajetória de pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Química e a todos aqueles professores que cruzaram o meu caminho durante esses anos acadêmicos, e de alguma forma compartilharam seus conhecimentos. Por fim, ao INCT-Catálise, Capes e CNPq pelo suporte financeiro.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio, orientação e encorajamento de todos vocês. Obrigada por fazerem parte desta jornada.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CONGRESSOS

1. PACHECO, I. B.; VALENTINI, G.; CAON, N. B.; PARIZE, A. L.; AFFELDT, R. F. *Estudo Fotofísico de Derivados do Núcleo 1,4-Dihidropiridínico*. In: 27º Encontro de Química da Região Sul, 2021, Itajai. Livro de Resumos, 2021.
2. PACHECO, I. B.; DOTTI, C.; ZEFERINO, R. C.; PEDROSA, R. C.; AFFELDT, R. F. *Dihydropyridine Nucleus as a Potential Molecular DNA Target*. In: 15th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, 2022, Florianópolis. Abstract Book, 2022.
3. DOTTI, C.; PACHECO, I. B.; ZEFERINO, R. C.; PEDROSA, R. C.; SALLES, H. D.; LOUSA, D.; SOARES, C. M.; AFFELDT, R. F. *Síntese de um novo híbrido imidazol-1,4-dihidropiridina e ancoragem molecular com a kinase Akt1 na busca de potenciais antitumorais*. In: 30º Encontro de Química da Região Sul, 2023, Pelotas. Livro de Resumos, 2023.

RESUMO

Bolzoni, P. I. **Estudo Molecular e Espectroscópico da Interação de Derivados Dihidropiridínicos com o DNA**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

O presente trabalho descreve inicialmente o estudo *in silico* de estruturas derivadas do núcleo dihidropiridínico (**Compostos I**). As propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) foram avaliadas por meio de softwares online como SwissADME, ADMETlab e SOMP. Com os resultados das predições pode-se afirmar, que entre as estruturas analisadas nenhuma violou os parâmetros físico-químicos, mas algumas não apresentam uma biodisponibilidade significativa. Logo, pode-se afirmar que apresentam um potencial terapêutico a ser explorado. A partir dessas análises, os **Compostos I** foram selecionados para síntese e caracterização, baseado numa reação multicomponente de Hantzsch, catalisados por uma nanopartícula superparamagnética, obteve-se rendimentos moderados entre 50 e 80%. Por se tratar de estruturas com potencial fotoativo foi efetuado o estudo fotofísico dos **Compostos I** através de técnicas de espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível e espectrofluorimetria em solventes de diferente polaridade. Assim foi realizado um estudo comparativo devido à modificação estrutural do núcleo dihidropiridínico. O aumento da rigidez de uma estrutura cíclica simétrica para uma tricíclica levou a uma maior intensidade na emissão de fluorescência. Por outro lado, a hibridização do grupo imidazol na posição 4 resultou em uma redução de 10 vezes na intensidade da emissão de luz. Assim a terceira parte do trabalho teve como propósito realizar uma breve avaliação da interação dos **Compostos I** com ctDNA (*Calf thymus*) utilizando técnicas espectroscópicas. Isto porque o estudo da interação entre DNA e pequenas moléculas pode levar a compreensão dos mecanismos moleculares de ação dos fármacos contribuindo para novos medicamentos DNA-alvo. Os compostos **A** e **E** selecionados para o estudo exibem notável sensibilidade ao microambiente circulante ao DNA, determinando seu padrão de ligação. Essa característica se traduz em um mecanismo de interação ou intercalação. Para reforçar essas observações, a ancoragem molecular, em colaboração conjunta, evidenciou uma preferência dos ligantes **A** e **E** para a fenda (*groove*) menor do DNA. Consequentemente, o conjunto de resultados sugere que os compostos avaliados podem promover interação com o DNA como alvo farmacológico.

Palavras-chave: núcleo dihidropiridínico; estudo *in silico*; síntese multicomponente; ctDNA.

ABSTRACT

Bolzoni, P. I. Molecular and Spectroscopic Study of the Interaction between Dihydropyridine Derivatives and DNA. Dissertation (Master's in Organic Chemistry). Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

The present work initially describes the *in silico* study of structures derived from the dihydropyridine nucleus (**Compounds I**). Pharmacokinetic properties such as absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) were evaluated through online software such as SwissADME, ADMETlab, and SOMP. Based on the prediction results, it can be affirmed that among the analyzed structures, none violated physicochemical parameters, but some do not exhibit significant bioavailability. However, it can be stated that they present therapeutic potential to be explored. Based on these analyses, **Compounds I** were selected for synthesis and characterization. Using a multicomponent Hantzsch reaction catalyzed by a superparamagnetic nanoparticle, moderate yields between 50 and 80% were obtained. Given their potential photoactivity, a photophysical study of **Compounds I** was conducted using techniques such as UV-visible absorption spectroscopy and spectrofluorimetry in solvents of varying polarity. A comparative study was performed due to the structural modification of the dihydropyridine nucleus. The increase in rigidity from a symmetric cyclic structure to a tricyclic one led to higher fluorescence emission intensity. On the other hand, the hybridization of the imidazole group at position 4 resulted in a 10-fold reduction in light emission intensity. Thus, the third part of the work aimed to conduct a brief evaluation of the interaction between **Compounds I** and ctDNA (Calf thymus) using spectroscopic techniques. This is because studying the interaction between DNA and small molecules can lead to an understanding of the molecular mechanisms of drug action, contributing to new DNA-targeted medications. **Compounds A** and **E**, selected for the study, exhibit remarkable sensitivity to the surrounding DNA microenvironment, determining their binding pattern. This characteristic translates into an interaction or intercalation mechanism. To reinforce these observations, molecular docking, in joint collaboration, highlighted a preference of ligands **A** and **E** for the minor groove of DNA. Consequently, the set of results suggests that the evaluated compounds can promote interaction with DNA as a pharmacological target.

Keywords: dihydropyridine nucleus; *in silico* study; multicomponent synthesis; ctDNA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais áreas da farmacologia: farmacocinética e farmacodinâmica.
- Figura 2.** Método de propriedades farmacocinéticas no processo de P&D de fármacos.
- Figura 3.** Ilustração do *docking* molecular de uma proteína com um ligante.
- Figura 4.** Estrutura dos isômeros 1,2-DHP e 1,4-DHP.
- Figura 5.** Subunidades dos canais de cálcio.
- Figura 6.** Estruturas de 1,4-dihidropiridinas com propriedades farmacológicas.
- Figura 7.** Estrutura da hexahidroquinolina e medicamentos derivados da quinolina.
- Figura 8.** Estrutura da acridinodiona e fármacos derivados do núcleo acridina.
- Figura 9.** Derivados da acridinodiona e suas respectivas funções biológicas.
- Figura 10.** Série de azóis simples.
- Figura 11.** Estruturas de ressonância do imidazol e seus orbitais atômicos.
- Figura 12.** Equilíbrio de ácido e base da estrutura do imidazol.
- Figura 13.** Derivados do núcleo imidazol com importantes funções biológicas ou terapêuticas.
- Figura 14.** Diagrama de Jablonski para processos fotofísicos.
- Figura 15.** Diagrama de Jablonski para a emissão de fluorescência após relaxação do estado excitado no solvente.
- Figura 16.** Comparação entre química molecular e química supramolecular.
- Figura 17.** (a) Estrutura do DNA mostrando a ligação fosfodiéster (b) Estruturas das bases nitrogenadas presente no DNA.
- Figura 18.** Isoformas do DNA, B-DNA; A-DNA e Z-DNA.
- Figura 19.** Estrutura do DNA de três e quatro fitas, triplex e quadruplex respectivamente.
- Figura 20.** Representação dos modos de interação do ligante-DNA.
- Figura 21.** Núcleos que interagem via intercalação com o DNA.

Figura 22. Núcleos que interagem via groove com o DNA.

Figura 23. a) Gráfico Bioavailabilty Radar **b)** Gráfico BoiledEgg.

Figura 24. Espectro de absorção do ct-DNA livre e sua respectiva curva de calibração ([ct-DNA] = $1,52 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ em 50mM Tampão Tris, pH = 7,47, 100mM NaCl, $\epsilon = 6596,59$ L.mol⁻¹).

Figura 25. Radar de biodisponibilidade disponibilizado pelo SwissADME para os **Compostos A-E**.

Figura 26. Gráfico BOILED-Egg dos Compostos **A-E**.

Figura 27. Metodologia e estrutura molecular dos derivados do núcleo dihidropiridínico sintetizadas.

Figura 28. Espectro de RMN de ¹H do **Composto C (ACD)** em DMSO, 50MHz.

Figura 29. Espectro de RMN de ¹H do **Composto D (ImPHQ)** em DMSO, 50MHz.

Figura 30. Mecanismo de fotodegradação das 1,4-dihidropiridinas (DHPs) proposto por De Luca et al. 2019.

Figura 31. Titulação potenciométrica do **Composto A (HEH)** em H₂O, KOH 0,087mol. L⁻¹ e [HEH] = 5×10^{-3} mol.L⁻¹.

Figura 32. Titulação potenciométrica do composto **ImPHQ** em H₂O, KOH 0,087mol. L⁻¹ e [ImPHQ] = 5×10^{-3} mol.L⁻¹.

Figura 33. Equilíbrio ácido-base da estrutura do imidazol.

Figura 34. Estruturas sintetizadas relacionadas com o aumento da rigidez do ciclo e a inserção do grupo imidazol no anel.

Figure 35. Espectro de absorção na região UV-Vis para os **Composto A-E** em etanol [] = $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência para os **Composto A-E** em etanol [] = 1×10^{-4} mol L⁻¹.

Figura 37. Espectro de absorção na região UV-Vis para o **Composto D (ImPHQ)** em DMSO, etanol, diclorometano e 1,4-dioxano ([ImPHQ] = $1 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹).

Figura 38. Espectro de emissão de fluorescência para os **Composto E** em DMSO, etanol, diclorometano e 1,4-dioxano ($[ImPHQ] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) slit 5,0.

Figura 39. Estrutura dos núcleos dihidropiridínicos avaliados.

Figura 40. Espectro de absorção do **Composto A** (HEH) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.

Figura 41. Espectro de absorção do **Composto E** (ImACD) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.

Figura 42. Espectro de emissão de fluorescência do **Composto A** (HEH) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.

Figura 43. Espectro de emissão de fluorescência do **Composto E** (ImACD) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.

Figura 44. Espectro de emissão do brometo de etídio (BE) livre, na presença de ctDNA e em concentrações crescentes do **Composto A**.

Figura 45. Monitoramento da intensidade de fluorescência no sistema BE-ctDNA na presença de 105uM do **Composto A**.

Figura 46. Estrutura DNA 5T4W d(CGTGAATTCACG) do Protein Data Bank.

Figura 47. Pose dos ligantes **A** e **E** na fenda menor.

Figura 48. Mapa de interação do ligante **E** com base nitrogenada adenina do DNA.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. (a) Síntese multicomponente de Hantzsch **(b)** Estrutura da coenzima NADH correlacionada com o par redox (NADH/NAD⁺).

Esquema 2. Protótipo de derivados do núcleo dihidropiridínicos (**Compostos I**).

Esquema 3. Metodologia sintética dos derivados do núcleo dihidropiridínico.

Esquema 4. Estrutura dos **Compostos I** avaliados.

Esquema 5. Fotooxidação do núcleo dihidropiridínico.

Esquema 6. Equilíbrio químico de protonação da espécie **HEH** em meio aquoso.

Esquema 7. Equilíbrio químico de desprotonação do composto **ImPHQ** em meio aquoso.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Dados dos **Compostos I** obtidos no SwissADME.

Tabela 3. Dados de solubilidade (LogS) dos **Compostos I** obtidos no software SwissADME.

Tabela 4. Dados de % de absorção intestinal humana (HIA), ação de inibição da Pgp, absorção por células Caco-2, % permeabilidade na barreira hematoencefálica (BBB) e % de ligação a proteínas plasmáticas (PPB).

Tabela 5. Predição de inibição do citocromo P450 dos **Compostos I** – SwissADME.

Tabela 6. Predição de probabilidade e sítios de interações com as isoformas CYP450.

Tabela 7. Dados de LD₅₀ pelo ADMETLab para os **Compostos A-E**.

Tabela 8. Propriedades fotofísicas dos **Compostos A-E** em EtOH [] = 1×10^{-4} mol L⁻¹.

Tabela 9. Constante Dielétrica dos solventes DMSO, etanol, diclorometano e 1,4-dioxano.

Tabela 10. Propriedades fotofísicas dos **Compostos A-E** em DMSO, Etanol, Diclorometano e 1,4-Dioxano.

Tabela 11. Dados de energia de ligação das melhores poses dos ligantes **A** e **E**.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBB	Barreira Hematoencefálica
CB	Bloqueador do Canal de Cálcio
Caco-2	Células de Adenocarcinoma Colorretal Humano
CYP	Citocromo P450 Oxidase
DHP	Dihidropiridina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESOL	<i>Estimated Solubility</i>
HBA	Aceptores de Ligação de Hidrogênio
HBD	Doadores de Ligação de Hidrogênio
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
INCA	Instituto Nacional de Câncer
K _p	Coefficiente de Permeabilidade da Pele
Log <i>P</i>	Coefficiente de Partição de uma Substância em Sistema octanol/água
Log <i>S</i>	Coefficiente de Solubilidade
MM	Massa Molar
MCR	Reação Multicomponente
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Oxidada)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Reduzida)
NCE	Nova Entidade Química
NRotb	Número de Ligações Rotacionáveis
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PK/DB	Base de Dados de Propriedades Farmacocinéticas
PPB	Ligação às Proteínas Plasmáticas
P-gp	Glicoproteína-P
p.f.	Ponto de fusão
pH	Potencial de hidrogênio
PSA	Área de Superfície Polar
QSAR	Relações Quantitativas entre Estrutura e Atividade

SNC	Sistema Nervoso Central
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i>
^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
	13RNA
	Ácido Ribonucleico
RO5	Rega dos 5
S_0	Estado Singlete Fundamental
S_1	Estado Singlete Excitado
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>
SOMP	<i>Site of Metabolism Prediction</i>
TGI	Trato Gastrointestinal
TPSA	Área Topológica Superficial Polar
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
3J	Constante de Acoplamento de Terceira Ordem
4J	Constante de Acoplamento de Quarta Ordem
$\Delta\lambda_{ST}$	Deslocamento de Stokes
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ_{abs}	Comprimento de onda de absorção
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PARTE I	16
2.1.1 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	16
2.1.2 FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA	18
2.1.2.1 Propriedades ADMET	19
2.1.3 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	21
2.1.4 DOCKING MOLECULAR	22
2.2 PARTE II	24
2.2.1 NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO	25
2.2.2 NÚCLEO POLIHIDROQUINOLINA E ACRIDINODIONA	29
2.2.3 NÚCLEO IMIDAZOL	32
2.2.4 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	34
2.2.5 PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS	35
2.3 PARTE III	39
2.3.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	39
2.3.1.1 <i>DNA</i>	40
2.3.1.2 <i>INTERAÇÕES DO DNA COM LIGANTES</i>	43
2.3.1.3 <i>DNA: ALVO BIOLÓGICO</i>	46
3. OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 REAGENTES E SOLVENTES	49
4.2 EQUIPAMENTOS	49
4.2.1 ANÁLISE DE RMN DE ¹ H E ¹³ C	49
4.2.2 ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS	50
4.2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	50
4.2.4 TEMPO DE MEIA VIDA DE FLUORESCÊNCIA (τ_F)	50
4.2.5 RENDIMENTO QUÂNTICO ABSOLUTO (Φ_F)	50
4.3 METODOLOGIA	51
4.3.1 PARTE I	51
4.3.1.1 <i>AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCINÉTICAS IN SILICO</i>	51
4.3.2 PARTE II	53
4.3.2.1 <i>SÍNTESE DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO</i>	53
4.3.2.2 <i>METODOLOGIA GERAL PARA SÍNTESE DAS 1,4-DIHIDROPIRIDINAS</i>	54
4.3.2.3 <i>CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS 1,4-DIHIDROPIRIDINAS</i>	55
4.3.2.5 <i>ESTUDO FOTOFÍSICO DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO</i>	56
4.3.3 PARTE III	57

4.3.3.1 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO: MODO DE INTERAÇÃO DE DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO E CT-DNA (CALF-THYMUS)	57
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
----------------------------------	-----------

5.1 PARTE I. ESTUDO <i>IN SILICO</i> DE DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO	60
5.1.1 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PROPRIEDADES DE FÍSICO-QUÍMICA, ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO	60
5.1.2 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DO METABOLISMO E TOXICIDADE	67
5.2 PARTE II. DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO	71
5.2.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO	71
5.2.2 DETERMINAÇÃO DO pK_a DAS ESTRUTURAS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	75
5.2.3 ESTUDO FOTOFÍSICO	79
5.3 PARTE III. ESTUDO ESPECTROSCÓPICO: MODO DE INTERAÇÃO DE DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO E CT-DNA (CALF-THYMUS)	86
5.3.1 INTERAÇÃO DO DNA-LIGANTE DETERMINADA POR UV-VIS	86
5.3.2 INTERAÇÃO DO DNA-LIGANTE DETERMINADA POR FLUORESCÊNCIA	89

6. CONCLUSÕES	96
----------------------	-----------

7. PERSPECTIVAS	98
------------------------	-----------

8. REFERÊNCIAS	99
-----------------------	-----------

<u>ANEXO A – RESULTADOS <i>IN SILICO</i> DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO</u>	106
-----------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<u>ANEXO B - ESPECTROS DE CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO</u>	111
-----------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<u>ANEXO C – GRÁFICOS DO ESTUDO FOTOFÍSICO DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO</u>	115
-------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO

O uso de terapias eficientes na prevenção e atenuação de doenças está diretamente relacionado com o desenvolvimento de fármacos. No âmbito dessas ações, estão incluídas desde doenças de etiologia conhecida, como as causadas por microrganismo, até as multifatoriais. O planejamento de novos fármacos é um processo oneroso, uma vez que a descoberta de moléculas com potencial atividade envolve um longo período e financiamento para o desenvolvimento dos estudos pré-clínicos e clínicos até a aplicação no mercado.

Visando contornar a problemática da pesquisa e desenvolvimento (P&D) de um fármaco, métodos computacionais (*in silico*) se tornam uma estratégia nesse processo. A bioinformática vem se mostrando promissora para a seleção e otimização de moléculas com maior potencial de desenvolvimento. Este modelo reduz custos e tempo, aumentando as chances de identificação de NCEs (Novas Entidades Químicas) qualificados. Outras estratégias para reduzir o tempo de pesquisa é o planejamento racional, que consiste na modificação da estrutura de um fármaco já existente ou, menos difundida, a hibridação molecular de grupos com aplicação farmacológica existente, com a tentativa de se obter um novo bioativo ou ampliar a atividade desses compostos.

Nesse contexto, várias patologias possuem como um dos principais alvos farmacológicos o DNA, como malária, doença de chagas, leishmaniose, entre elas destaca-se o câncer. A doença que, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que em 2022 acometeu mais de 700 mil indivíduos. No entanto, ainda há limitações no progresso de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento destas doenças, como elevado tempo e custo, taxa de sucesso baixa e resistência de medicamentos. Isso, impulsiona a busca por novos compostos com potente atividade que promovam maior eficácia e menos efeitos colaterais.

Estruturas planares heterocíclicas e aromáticas podem interagir com o ácido nucleico e formar complexos supramoleculares, podendo interferir na atividade de várias enzimas e proteínas responsáveis pela estrutura e função celular. O núcleo dihidropiridínico faz parte de uma importante classe de compostos farmacêuticos devido à sua semelhança com a estrutura da coenzima NADH. Pesquisas das dihidropiridinas (DHP) e análogos revelam que quando são substituídos adequadamente, podem modular seletivamente diversos receptores, canais e enzimas, logo, podem tratar diversas doenças.

Diante do que foi relatado fica claro a importância do estudo da descoberta e desenvolvimento de fármacos que possuem como alvo o DNA. O presente trabalho visa fazer

o *screening* de moléculas derivadas do núcleo dihidropiridínico baseado em estudos *in silico* de suas propriedades farmacocinética e na previsão de seu modo de interação com *ctDNA* (*Calf-Thymus*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PARTE I

2.1.1 Descoberta e Desenvolvimento de novos Fármacos

A química farmacêutica e medicinal é uma ciência de caráter interdisciplinar, abrange ciências do conhecimento - química, biológica, farmacêutica e médica. Essa área tem como objetivo estudar substâncias biologicamente ativas, também conhecidas como protótipos, a fim de compreender a ação de seus mecanismos moleculares. A relação estrutura-atividade é uma etapa essencial nesse campo, a qual consiste em investigar e elucidar os pontos chave da estrutura molecular que são responsáveis pela atividade biológica de um composto. Isso envolve identificar as características estruturais necessárias para que um composto tenha uma determinada atividade farmacológica desejada, bem como propriedades físico-químicas adequadas (IUPAC; GUIDO,2010).

A descoberta de novos fármacos contribui para avanços significativos no campo da saúde e no tratamento de doenças que surgem e se disseminam rapidamente. Embora, já exista diversos fármacos no mercado, a pesquisa de desenvolvimento é relevante visto que há um número considerável de patologias invasivas, com alta resistência e sem tratamentos terapêuticos. Além disso, a busca por fármacos que propiciem uma absorção melhor, seja mais eficiente, seletivos e apresentem custo baixo é de elevado valor (CHAN et al.,2019). No entanto, um fármaco leva um longo período até chegar no mercado farmacêutico, desde a descoberta, desenvolvimento e registro. Esse processo é complexo e rigoroso, com várias etapas e requisitos regulatórios a serem cumpridos (KIRIIRI; NJOGU; MWANGI,2020).

Os investimentos em P&D (pesquisa e desenvolvimento) na indústria farmacêutica são altos, com estimativas na ordem de U\$ 314 milhões a 2,8 bilhões. Esses valores incluem os

custos relacionados à pesquisa básica, triagem de compostos, estudos pré-clínicos, ensaios clínicos e processos regulatórios (WOUTERS, OLIVER J., et al, 2020). É importante destacar que o sucesso no desenvolvimento de novos fármacos é relativamente baixo, a taxa de sucesso pode chegar aproximadamente 12% na fase dos ensaios clínicos, isso significa que a maioria dos compostos falha em algum estágio do processo devido a questões de eficácia, segurança ou viabilidade comercial. Apesar desses desafios e dos altos investimentos, a indústria farmacêutica continua sendo umas das quemais investe em pesquisa e desenvolvimento (SCHLANDER, MICHAEL, et al., 2021).

O desenvolvimento de fármacos é uma área de constante evolução, com crescentes alternativas e abordagens para otimizar o processo de P&D e contornar o alto tempo e custo. Associados a isso, diversas estratégias estão sendo exploradas para acelerar e aprimorar esse campo, visando proporcionar terapias mais eficazes e acessíveis para o tratamento de patologias. Entre elas, triagem de alto rendimento (do inglês, *high-throughput screening* -HTS), método que permite testar rapidamente bibliotecas de compostos para identificar aqueles com atividade contra um alvo específico. Reposicionamento de fármacos, ou seja, envolve a identificação de novos alvos terapêuticos para medicamentos já aprovados, ou até mesmo a combinação de diferentes estruturas moleculares (hibridização) que proporciona desenvolver compostos híbridos que apresentam propriedades sinérgicas ou aprimorar em relação de suas bioatividades originais. (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; WU et al., 2020; YANG et al., 2020).

Outra estratégia é explorar os parâmetros físico-químicos de um candidato à fármaco por método *in silico*, simulação e análise de dados computacionais. Um dos principais métodos aplicados, atualmente, na abordagem computacional é a ancoragem molecular, conhecido como *docking molecular*, essa técnica permite prever e analisar a interação entre uma molécula-alvo, como uma proteína, e um ligante, que pode ser um candidato a fármaco (BARREIRO; FRAGA, 2015; PATRICK, 2017; FOKOUE et al., 2020).

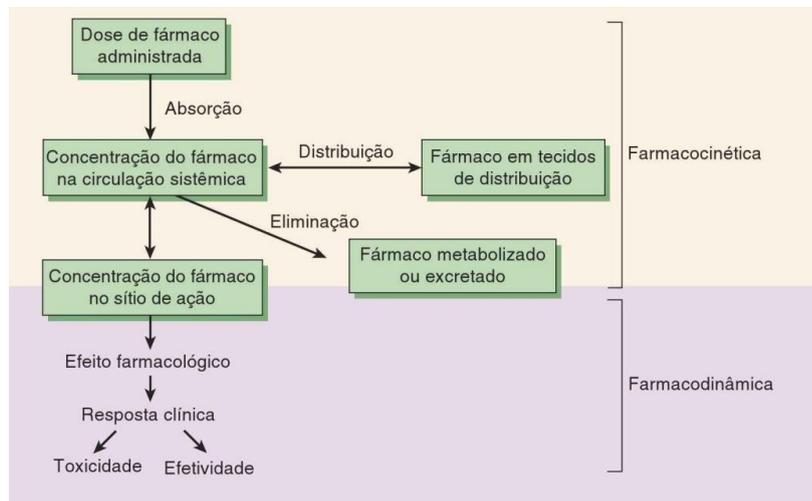
A adesão a essas técnicas permite explorar o espaço químico, avaliar a relação estrutural-atividade, aprimorar os parâmetros físico-químicos e compreender o processo metabólico,

contribuindo frente ao tempo e custo na descoberta e desenvolvimento de compostos com propriedades terapêuticas desejáveis.

2.1.2 Farmacodinâmica e Farmacocinética

No estudo da farmacologia destacam-se duas áreas que são dadas para o entendimento da interação de um xenobiótico com o sistema biológico por meio de vias metabólicas: farmacodinâmica e farmacocinética. Esses dois campos estão interconectados e são frequentemente avaliados em conjunto para otimizar a dosagem, a eficácia dos fármacos, prever interações medicamentosas e entender melhor os perfis de segurança e toxicidade dos medicamentos. A farmacodinâmica se concentra em entender como os fármacos interagem com o organismo para produzir efeitos específicos. A fase farmacocinética, por sua vez, estuda o destino do fármaco no organismo após ser administrado e atingir a circulação sistêmica para exercer o efeito terapêutico desejado, passando por quatro fases: absorção (A), distribuição (D), metabolismo ou biotransformação (M), excreção (E) e toxicidade (T) (ADMET, sigla) (HILL MCGRAW, 2019; VAN DE WATERBEEMD, 2003).

Figura 1. Principais áreas da farmacologia: farmacocinética e farmacodinâmica.



FONTE: HILL MCGRAW, 2019.

2.1.2.1 Propriedades ADMET

As propriedades ADMET estão relacionadas às características físico-químicas do fármaco e afetam sua biodisponibilidade, tempo de permanência no organismo e eficácia terapêutica. O fármaco ao ser administrado pelo organismo, inicialmente, sofre o processo de absorção (A). Esse é um processo oneroso influenciado por diversas propriedades moleculares gerando um efeito direto na sua eficácia. Entre as principais propriedades que influenciam a absorção destaca-se o pK_a , medida de acidez ou basicidade, que indica a presença de cargas na molécula, e a lipofilicidade. A solubilidade está relacionada à dissolução completado fármaco, visto que a afinidade dele em água (baixa lipofilia e presença de cargas) aumenta a disponibilidade e absorção. No entanto, um fármaco lipofílico e neutro tem maior facilidade em atravessar as membranas lipídicas, o que aumenta sua permeabilidade no trato gastrointestinal, afetando sua absorção também (GLEESON et. Al, 2011; EKINS et al., 2010; BHATI, et. al 2019). O caráter lipofílico pode ser expresso pelo coeficiente de partição octanol-água, $\log P$, que representa a capacidade de atravessar membranas biológicas. Em resumo, encontrar um equilíbrio adequado entre essas propriedades é importante para garantir a absorção eficaz de um fármaco (ZHONG, 2017).

Uma ferramenta amplamente utilizada, como um guia inicial, para avaliar a adequação de compostos químicos em relação à absorção e permeabilidade é a “Regra dos 5” (do inglês “Rule of 5”) também conhecida como Regra de Lipinski, desenvolvida por Christopher Lipinski em 1997. Ela estabelece quatro critérios principais e seus valores limites para determinar se uma estrutura molecular tem potencial para ser um fármaco oralmente ativo. Esses critérios incluem a massa molecular (MM) do composto, coeficiente de partição octanol-água ($\log P$), o número de doadores de hidrogênios (HBD) e o número de aceptores de hidrogênio (HBA) (LIPINSKI, 2000, SHULTZ, 2018, YANG et al., 2020).

O candidato a fármaco deve apresentar uma massa molecular menor ou igual a 500 daltons e um $\log P$ menor ou igual a 5. Isso ajuda a garantir a adequada absorção e permeabilidade do composto através das barreiras biológicas. Esses dois fatores se tornam críticos, uma vez que o candidato a fármaco deve ter alta lipossolubilidade para conseguir atravessar membranas lipídicas, enquanto alta hidrossolubilidade para ser absorvido em outros lugares específicos. Já o número de doadores de hidrogênio deve ser menor ou igual a 10, enquanto o número de aceptores de hidrogênio menor ou igual a 5, esses descritores são referentes à capacidade de um composto participar de ligações de hidrogênio, podendo influenciar além da solubilidade e

permeabilidade, nas interações moleculares com proteínas e receptores, afetando sua atividade farmacológica (PLANEY, 2012; YANG et al., 2020).

De forma complementar ao trabalho de Lipinski, Veber e colaboradores observaram que compostos com um maior potencial de biodisponibilidade oral tendem a apresentar uma área de superfície polar reduzida (TPSA) $\leq 120\text{\AA}$ e um número de ligações rotativas menores que dez. Destaca-se que para medicamentos que precisam atravessar a membrana hematoencefálica os valores de TPSA são menores que 70\AA . O número de ligações rotativas refere-se ao número de rotações livres que a molécula apresenta, logo quanto maior a quantidade de carbonos sp^3 , mais flexível ela se torna. Por outro lado, a área de superfície polar refere-se à parte polar da estrutura molecular, esse descritor apresenta um valor limite pequeno, pois uma polaridade reduzida é benéfica para absorção oral, facilita a capacidade de passagem de um meio extracelular para um meio intracelular através da bicamada lipídica (VEBER et al., 2002; YANG et al., 2020). Mesmo que a regra de Lipinski e Veber sejam amplamente aplicadas, ressalta-se que existem exceções a esses critérios e que muitos fármacos bem-sucedidos violam essas regras, no entanto, essas regras continuam a ser utilizadas na triagem e seleção de compostos durante o processo inicial de descoberta de fármacos.

Após serem absorvidos, os fármacos são transportados pela corrente sanguínea distribuídos para diferentes tecidos e órgãos do organismo. A distribuição ocorre através de processos como difusão, transporte ativo e ligação a proteínas plasmáticas (do inglês, *plasma protein binding* – PPB), sendo esse último a principal propriedade farmacocinética de ação farmacológica, pois afeta a concentração do fármaco na circulação. Além do mais, alguns fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC), como anestésicos gerais, antidepressivos, antiepiléticos, entre outros podem permear a barreira hematoencefálica (do inglês, *blood brain barrier*- BBB). É importante destacar que essa capacidade de atravessar a BBB pode variar e depende das características físico-químicas, como relatadas anteriormente. Contudo, também se torna importante o desenvolvimento de fármacos que apresentam limitações na capacidade de permear a BBB pois isso reduz possíveis efeitos colaterais (BRYAN, 2004; CECHELLI R. et al., 2007; PARDRIDGE W., 2007).

O metabolismo é o processo químico no qual o organismo altera os xenobióticos para eliminá-los, isto ocorre via hepáticas, principalmente no fígado. Durante essa etapa, o fármaco sofre transformações químicas, conhecidas como reações metabólicas que podem envolver oxidação, redução, hidrólise e conjugação do fármaco com outras moléculas. Essas biotransformações podem afetar a duração de ação, o tempo de meia-vida e as interações com

outros fármacos. O objetivo principal é inativar o fármaco e facilitar sua eliminação, através do aumento da solubilidade dos metabólitos. Destaca-se que o metabolismo de fármacos ocorre em duas fases, a fase I ocorre por ação das enzimas da família de isoformas do citocromo P450 (CYP), sendo sete (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4) responsáveis pelo metabolismo de mais de 90% dos fármacos comercializados. As reações da fase I visam introduzir grupos funcionais na molécula do fármaco, tornando-o mais suscetível a reações na fase II. Na fase II, os fármacos sofrem reações de conjugação com moléculas endógenas, como glutathiona, sulfato, ácido glicurônico e aminoácidos, formando conjugados mais hidrossolúveis. Por fim, a excreção ocorre principalmente pelos rins, através da urina. A taxa de eficiência da excreção depende de fatores como a solubilidade do fármaco, uma vez que fármacos insolúveis podem sofrer reabsorção passiva nos túbulos renais dos néfrons e retornar para corrente sanguínea, o que pode prolongar sua ação no organismo, levando a efeitos indesejados, como toxicidade (RUDIJK et al., 2015, LEPPERT, 2011, DE GROOT, 2006).

2.1.3 Avaliação *in silico* de Propriedades Farmacocinéticas

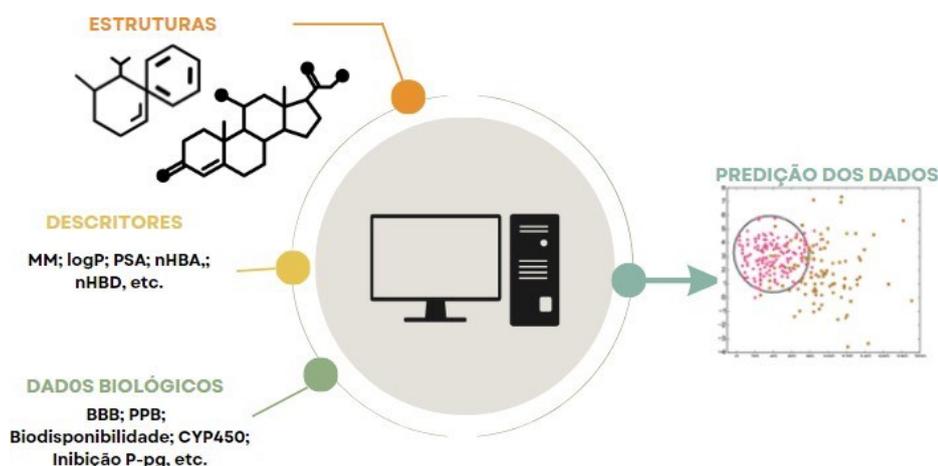
O método tradicional de P&D de fármacos envolve inicialmente a síntese de compostos moleculares para posteriormente realizar teste *in vitro* e *in vivo*. Os compostos promissores são estudados na fase do desenvolvimento, onde propriedades farmacocinéticas, metabolismo e potencial de toxicidade são investigados. No entanto, nessa fase o projeto geralmente é interrompido e a busca por outro candidato clínico se inicia, causando um prejuízo financeiro para pesquisa farmacêutica. Isto, pois, as propriedades ADMET são as principais causas do fracasso de candidatos a fármacos no estado clínico (CHAN et al., 2019; USHA et al., 2018).

É notório que a integração de métodos computacionais nos últimos anos para predição de informações farmacocinéticas permite uma triagem inicial eficiente, direcionando os recursos para compostos promissores. Atualmente, existem várias bases de dados comerciais, até mesmo com acesso livre disponíveis, como por exemplo PubChem, PK/DB (*Database for Pharmacokinetic Properties*) e SwissADME, criadas para predição das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Por meio de modelos computacionais, é possível prever características importantes de um fármaco, como sua biodisponibilidade oral, permeabilidade através de barreiras biológicas, metabolismo hepático e tempo de meia-vida (AGAMAH, 2020).

O estudo *in silico* envolve várias etapas para obter *insights* sobre as propriedades ADMET de um composto de forma rápida e eficiente. A primeira etapa é a coleta de dados do candidato a fármaco, ou seja, sua estrutura química e suas propriedades físico-químicas. Em seguida, a previsão de absorção, baseada na permeabilidade intestinal é possível estimar a capacidade de absorção do composto através das barreiras biológicas, como a hematoencefálica. A distribuição do fármaco no organismo é simulada pela afinidade do fármaco por proteínas plasmáticas e sua distribuição nos diferentes tecidos. Outra etapa é a previsão do metabolismo do fármaco, baseado em enzimas hepáticas e vias metabólicas conhecidas, possível de identificar sítios de metabolismo e prever as reações metabólicas que podem ocorrer. Por último, a excreção é analisada pela previsão do tempo de meia-vida do composto (AGAMAHA, 2020; FERREIRA, 2019).

Dessa forma, modelos *in silico* têm sido impulsionados pelos avanços na tecnologia computacional, pela disponibilidade de dados e pelo desenvolvimento de algoritmos e técnicas de modelagem mais sofisticadas. No entanto, é importante destacar que o modelo *in silico* não alega e nem prova as propriedades farmacocinéticas, deve ser apenas a fase inicial da P&D, como uma triagem. Os estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* (fenótipo e genótipo) devem ser realizados para validar e confirmar os resultados obtidos.

Figura 2. Método *in silico* de propriedades farmacocinéticas no processo de P&D de fármacos.

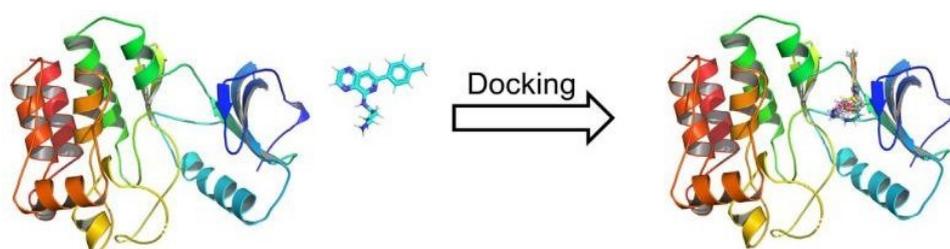


FONTE: AUTORAL (2023).

2.1.4 Docking Molecular

Nos últimos anos, o *docking molecular* ou ancoragem consolidou-se uma ferramenta computacional chave no projeto de descoberta de novos fármacos (CABALLERO, 2020). Essa técnica é parte fundamental da estratégia SBDD (do inglês, *structure-based drug design*), que se tornou eficiente por avaliar o maior número de compostos de maneira mais rápida e com menor custo, sendo um método extremamente útil para identificação de substâncias líderes (BATISTA, et. al 2021), (STANZIONE, et. al 2021).

Figura 3. Ilustração do *docking* molecular de uma proteína com um ligante.



FONTE: Adaptado de STANZIONE, 2021.

O *docking* molecular é uma abordagem baseada em mecânica molecular. As equações obtidas pela física clássica consideram apenas o núcleo dos átomos, ou seja, não incluem os elétrons, uma vez que sua massa é muito inferior, simplificando os cálculos de energia do sistema, de acordo com a aproximação de Born-Oppenheimer (LEACH, 1996). Esse método consiste em simular as interações entre o ligante e a macromolécula alvo, estimando a afinidade ligante-macromolécula por meio do *score* (pontuação). Essa predição da afinidade é baseada na conformação e orientação do ligante, ou seja, na pose em um sítio de ligação presente na macromolécula (alvo molecular), logo é possível avaliar como o ligante se ajusta a um sítio ativo ou domínio de ligação do receptor (STANZIONE, et. al 2021) (FAN et al., 2019). Os softwares de *docking* combinam e otimizam variáveis estérica, hidrofóbica e eletrostática. Um algoritmo eficiente de *docking* amostra todos os modos de ligação possíveis, enquanto o sistema de pontuação classifica todas as amostragens e identifica o modo de ligação mais provável do ligante (BERMAN, et. al, 2000).

O processo de amostragem não é trivial, as conformações no espaço envolvem vários graus de liberdade (rotação e translação) de uma molécula em relação a outra, em relação à macromolécula ou ao solvente. Isto faz com que se torne impossível determinar todos os

possíveis rearranjos de um ligante com um alvo dentro de um tempo no sistema (FERREIRA, et. al 2015). Logo, a amostragem do espaço conformacional ainda é um desafio encontrado. Por esse motivo, muitos programas de *docking* consideram o ligante flexível e limitam a flexibilidade da proteína ou a tornam um corpo rígido.

O estudo de ancoragem inicia com a determinação 3D da estrutura do ligante por programas ou por banco de dados como PubChem e ZINC, gratuitos para acesso. Já o alvo muitas vezes é selecionado pelo banco de dados do PDB (do inglês, *Protein Data Bank*) ou obtido por modelagem comparativa (BERMAN, et. al, 2000). A partir de então é otimizado a conformação e a orientação, ajustado o ângulo dihedral da ligação flexível do resíduo de aminoácido para obter o modo de ligação mais estável (menos energética) e o score de afinidade do complexo formado entre o ligante e o alvo (FAN et al., 2019). Há diferentes softwares com específicos algoritmos disponíveis para realizar *docking* de proteína-ligante, como FLEX X, GOLD, GLIDE, AutoDOCK, ZDOCK, RDOCK, SwissDOCK, entre outros, no entanto todos eles apresentam semelhança na sua organização em relação a operação da pose e do score (FAN et al., 2019).

A ancoragem molecular pode ser inserida em diversos segmentos da descoberta de fármacos. Isto, inclui estudos das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (do inglês, *quantitative structure-activity relationship* – QSAR), triagem virtual, elaboração de bibliotecas combinatórias, hipótese de ligação para pesquisa mutagênese, cristalografia de raios X no ajuste de substratos e antagonistas, entre outros. Esta tem se consolidado como um dos métodos mais importantes no campo de modelagem molecular. Nas últimas duas décadas, mais de 60 ferramentas de docagem molecular foram desenvolvidas em ambientes acadêmicos e industriais (BATISTA, et. al 2021) (NATARAJ, et. al 2016). Ainda assim, o *docking* molecular não é capaz de prever propriedades físico-químicas citadas anteriormente, sendo esta triagem inicial complementar aos estudos para a descoberta e proposta de novos fármacos.

2.2 PARTE II

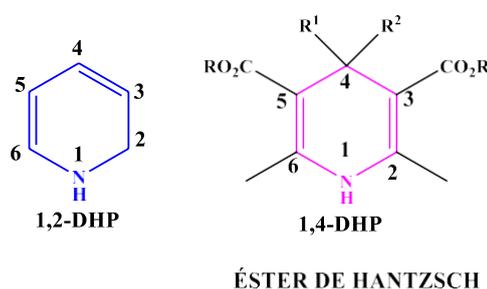
Os heterociclos à base de nitrogênio são considerados compostos orgânicos de mais vasta importância, por serem abundantes na natureza e por existirem como subunidades em diversos produtos naturais, como exemplos, vitaminas, coenzimas, hormônios, entre outros. Estima-se

que mais de 85% de todos os compostos biologicamente ativos apresentam núcleo heterocíclico nitrogenado na sua estrutura (MAJID, VAHIDEH, 2020). Estes fatos revelam o porquê de ocuparem uma posição exclusiva como uma fonte valiosa de agentes terapêuticos na química medicinal, e enfatizam o papel vital desses compostos na descoberta de novos medicamentos, construindo uma vasta biblioteca.

2.2.1 Núcleo Dihidropiridínico

As dihidropiridinas (DHPs) são evidenciadas há mais de quatro décadas e seus estudos ainda são persistentes na química medicinal. Essa classe de compostos heterocíclicos nitrogenados faz parte do grupo das piridinas, estruturas aromáticas nitrogenadas, possuindo dois isômeros de configurações 1,2 e 1,4 mais significantes (Figura 4) (SHARMA, 2017). Sendo 1,4-DHP conhecida como éster de Hantzsch, por ser sintetizada e descrita pela primeira vez em 1882 por Arthur Hantzsch.

Figura 4. Estrutura dos isômeros 1,2-DHP e 1,4-DHP.

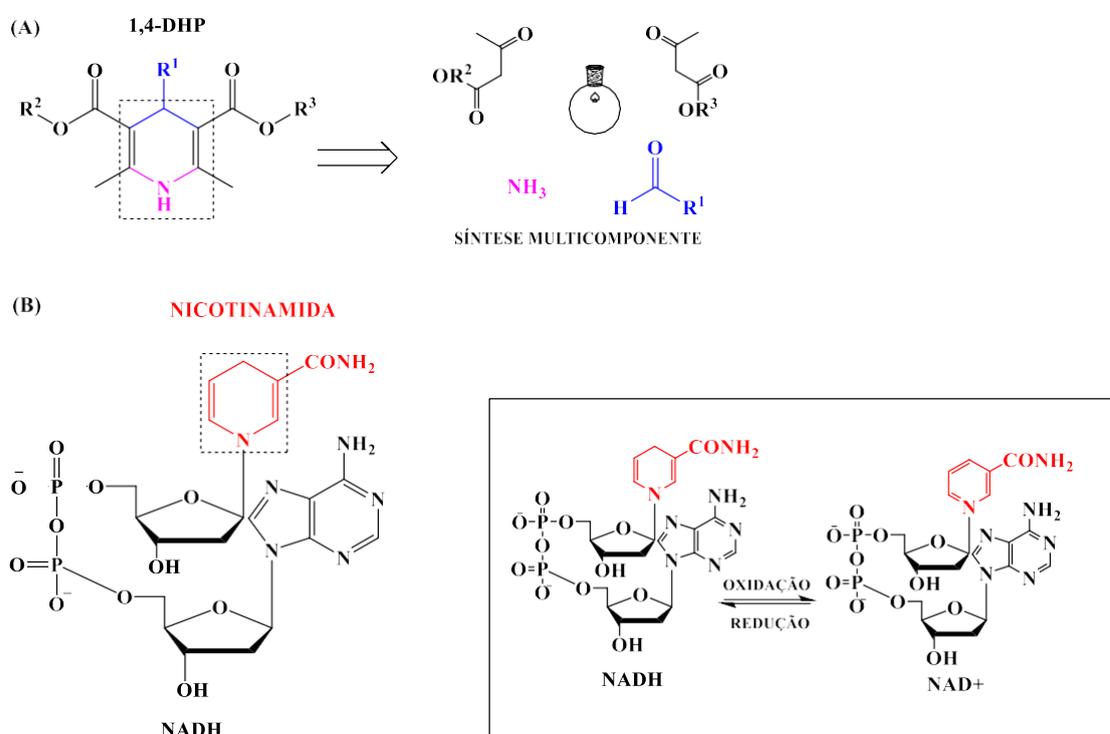


FONTE: AUTORAL (2023).

Hantzsch pressupôs uma rota sintética desses compostos que se baseia em uma reação multicomponente (MCR, do inglês, *multi-component reaction*) ou seja, onde aldeído, β-cetoéster e amônia são misturados em único frasco reacional (*one-pot*) (Esquema 1a) (HANTZSCH, 1882). Destaca-se que as MCRs são reações que visam economia atômica, eficiência energética e condições reacionais brandas, princípios abordados na química verde (CIOCI, et al., 2014). Mais tarde, observou-se a semelhança estrutural do núcleo dihidropiridínico do éster de Hantzsch com o sítio nicotinamida presente na coenzima nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD), constituído de dois nucleotídeos, unidos por uma ligação fosfoanidrido (Esquema 1b). O NAD atua como mediador enzimático em diversas reações eletroquímicas biocatalisadas e sofre redução reversível no anel de nicotinamida. Quando o substrato NAD sofre oxidação (desidrogenação), libera-se dois átomos de hidrogênio para formar NAD⁺, já a estrutura oxidada do nucleotídeo formada pode receber um íon hidreto

(H⁻, o equivalente a um próton e dois elétrons) e é reduzida a NADH. O par redox (NAD⁺/NADH) existe principalmente em reações metabólicas como uma coenzima durante a qual os elétrons e prótons são transferidos (Esquema 1b), possuindo um papel vasto e importante nas reações biológicas do organismo, sendo a principal a fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias durante a respiração celular aeróbica (FUKUZUMI, et al.1, 1987; MEUER et al., 1984; AFFELDT, et al., 2012). Isto fez com que a estrutura das 1,4-DHPs ganhasse atenção no estudo farmacológico.

Esquema 1. (a) Síntese multicomponente de Hantzsch (b) Estrutura da coenzima NADH correlacionada com o par redox (NADH/NAD⁺).

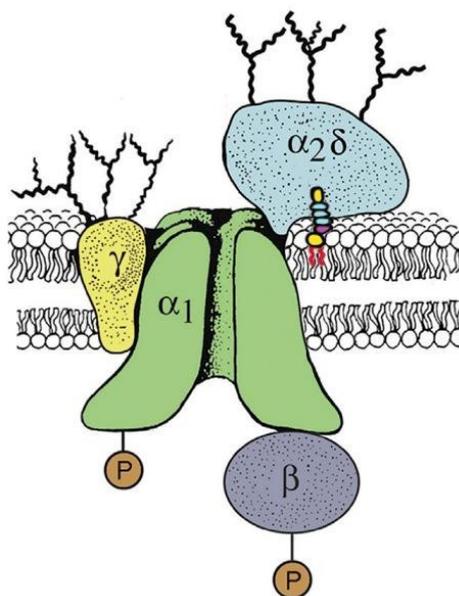


FONTE: AUTORAL (2023).

Em 1972, Fleckenstein e colaboradores descobriram que os derivados do núcleo 1,4-dihidropiridínico possuem potencial de atuar como bloqueador dos canais de cálcio (CBs, do inglês, *calcium channel blockers*). Esses canais de Ca²⁺ (CaVs) são proteínas compostas por quatro ou cinco subunidades distintas (α_1 , $\alpha_2\delta$, β_1 -4 e γ) (Figura 5). Os canais de cálcio são canais iônicos presentes nas membranas celulares e estão envolvidos na regulação do influxo de íons de cálcio para o interior das células. Esses canais são controlados por diferença de voltagem elétrica entre o interior e o exterior da célula. A subunidade CaV1.2 (α -1C dos canais de Ca²⁺ do Tipo L) encontrada em diferentes tipos de células, incluindo células musculares lisas, permite a passagem específica desse íon na matriz extracelular, aumentando sua

concentração citoplasmática, promovendo a vasoconstrição. A vasoconstrição tem efeitos importantes na regulação do fluxo sanguíneo, pressão arterial e resposta a estímulos fisiológicos e patológicos (WANG, et al., 2021; CATTERALL 2018).

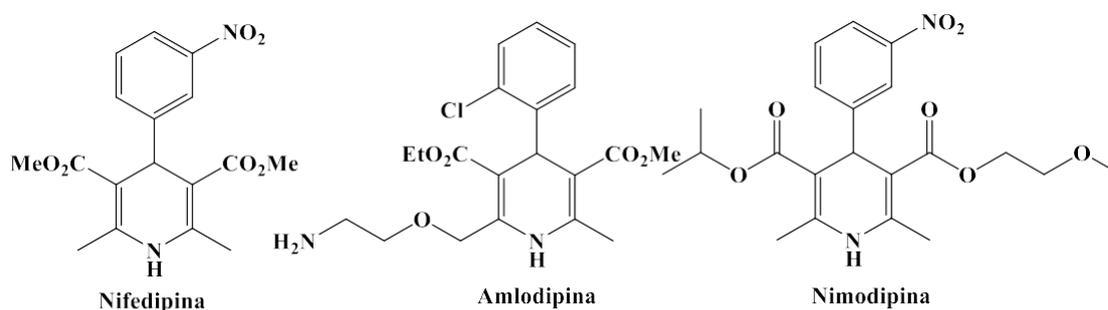
Figura 5. Subunidades dos Canais de Cálcio.



FONTE: CATTERALL, 2018.

Um composto que modula a função celular dos canais de cálcio pode inibir sua entrada e (ou) sua liberação e (ou) interferir em uma de suas ações intracelulares que competem como o Ca^{2+} por um sítio de ligação. Substâncias que atuam inibindo seletivamente a entrada de íons de cálcio através desses canais, conhecidas como antagonistas dos canais de cálcio, afetam várias vias de sinalização celular e tem sido utilizado como uma estratégia terapêutica para controlar a vasoconstrição em várias condições médicas (SCHRAMM et al., 1983). Esse é o caso das 1,4-DHPs como Nifedipina, Amlodipina e Nimodipina (Figura 6) (BURNIER, et al., 2009) usadas para o tratamento de doenças cardiovasculares. Com sucessos nas últimas décadas, esses medicamentos exercem efeito vasodilatador predominante, com mínima interferência na frequência cardíaca e na função sistólica, sendo, por isso, mais frequentemente usados em casos clínicos de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

Figura 6. Estruturas de 1,4-dihidropiridinas com propriedades farmacológicas.



FONTE: AUTORAL (2023).

É notório que o íon cálcio desempenha um papel fundamental no controle de processos celulares, como mencionado. Logo, Ca^{2+} pode levar a um aumento na concentração citoplasmática desse íon nas células tumorais, resultando em respostas celulares desreguladas, incluindo neoplasia e inibição de apoptose. Essa capacidade do íon cálcio, combinado com o seu potencial de modulação farmacológica, oferece a oportunidade para novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. Uma estratégia terapêutica relatada na literatura é o uso de bloqueadores seletivos de canais de cálcio, como o caso das DHPs (NIRANJAN, et al., 2019). No entanto, é importante ressaltar que esses compostos ainda estão em fase de pesquisa e desenvolvimento, e mais estudos são necessários para avaliar sua eficácia em diferentes tipos de câncer.

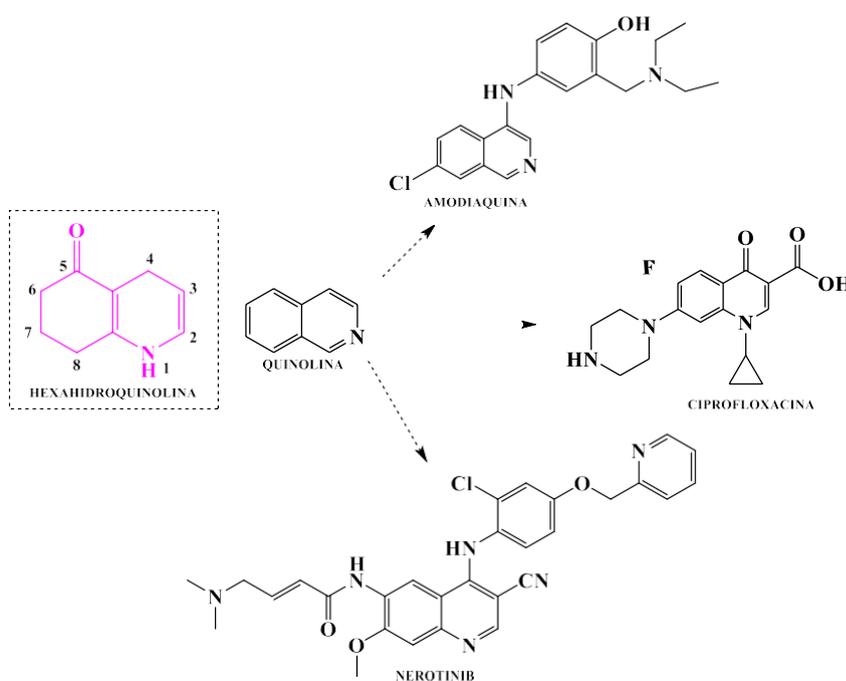
Pequenas alterações na estrutura central do anel dihidropiridínico podem resultar em mudanças significativas nos efeitos farmacológicos. Diversos princípios ativos como antioxidantes, anticonvulsivantes (PRASANTHI, G.; PRASAD, K.; BHARATHI, K., 2013, 2014; SADDALA et al, 2017), anti-inflamatórios (ULLOORA et al, 2013; EISSA; FARAG; SOLIMAN, 2009), antidiabéticos (NIAZ, H. et al, 2015; PRAVEENKUMAR, E. et al, 2019; YOUSUF, H. et al, 2020), antituberculares (EDRAKI et al, 2009; MOGHADAM et al, 2006; SAINI et al, 2008), anticâncer (VALENTE, S. et al, 2016; MOHAMED, M.F. et al, 2016; MOHAMED, M.F. et al., 2018), entre outros são relatados na literatura. Além disso, algumas estruturas já desenvolvidas apresentam reposicionamento de fármaco, este é o caso da Nimodipina usada como agente anti-isquêmico no tratamento da doença de Alzheimer, acredita-se que há uma relação da ação do cálcio no cérebro com a modulação de vias de sinalização celular envolvidas na patogênese da doença. De fato, esta diversidade relativa relatada das 1,4-DHPs de atuar com diferentes efeitos terapêuticos importantes faz com que o estudo do núcleo básico seja uma área de estudo contínuo.

2.2.2 Núcleo Polihidroquinolina e Acridinodiona

As hexahidroquinolinas conhecidas como polihidroquinolinas (PHQ) e as acridinodionas (ACD), também conhecidas como acridine-1,8-dionas são duas classes de compostos moleculares derivados do núcleo dihidropiridínico. Análogo às 1,4-dihidropiridinas, estas estruturas são obtidas via reação multicomponente de Hantzsch, a partir de um equivalente de aldeído, dois equivalentes de composto 1,3 dicarbonílico e um excesso de amônia (SHARMA, et al., 2022). Estes compostos, conforme a literatura, têm recebido considerável atenção nos últimos anos por mostrarem ser promissores em diversas patologias.

Ao fundir o heterociclo nitrogenado dihidropiridínico com um anel 1,3-ciclohexanona, obtém-se um composto, mas rígido e não simétrico, semelhante a quinolina, a hexahidroquinolina (Figura 8). A quinolina e seus derivados exibem uma biblioteca de fármacos valiosos que possuem gama atividade biológica já conhecida, incluindo a Amodiaquina, utilizado para terapia da malária (KALARIA et al., 2018); Ciprofloxacina, um antibiótico com ação na inibição da síntese de DNA; Neratinib, um inibidor de tirosina quinase, utilizado na terapia de câncer de mama (GONG et al., 2019; PAIDEPALA et al., 2014). A estrutura desses medicamentos é representada na Figura 7.

Figura 7. Estrutura da hexahidroquinolina e medicamentos derivados da quinolina.



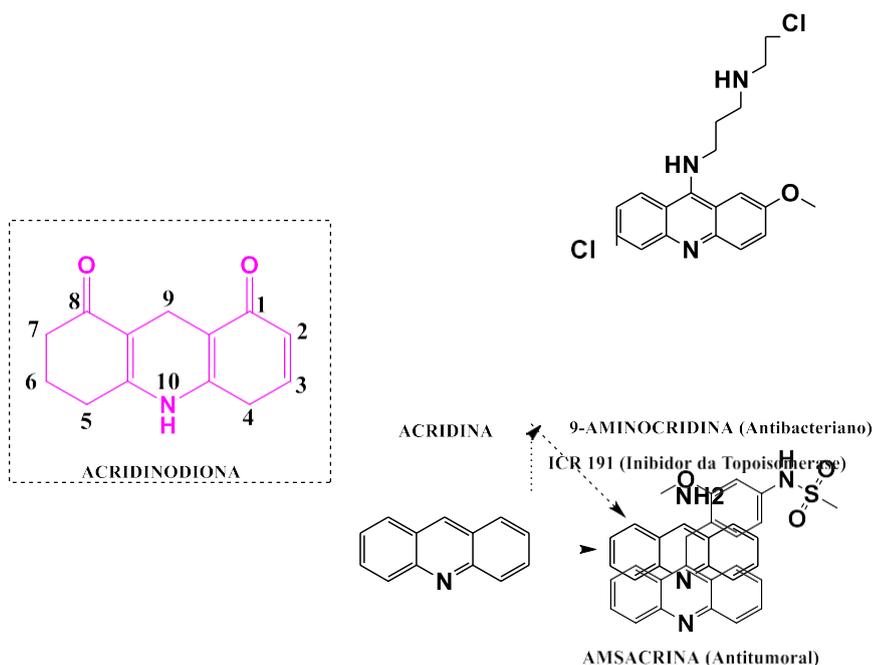
FONTE: AUTORAL (2023).

Tendo em vista a similaridade da estrutura molecular com a da quinolina, estes compostos são de interesse para os pesquisadores devido ao seu amplo campo farmacológico e biológico, tais como antibacteriana, antifúngica, anticonvulsivante, anti-inflamatórias, antituberculares, antimalárias, antioxidantes, neuroprotetoras e anti-Alzheimer (RANJBAR, et al., 2019; KALARIA et al., 2018). Ademais nos últimos anos demonstrou atividade citotóxica *in vitro* frente a células do tipo MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HeLa (colo de útero) e SK-N-SH (neuroblastoma) (GONG, et al., 2019; PAIDEPALA, et al., 2014). Estes resultados indicam uma possível associação desta classe de moléculas para o desenvolvimento de novas drogas no tratamento de câncer. Essas atividades importantes e valiosas incentivaram os químicos a projetar métodos catalíticos novos, ecológicos, econômicos e eficientes para síntese desta classe de heterociclos nitrogenados, diferentes metodologias têm sido relatadas na literatura (KAZEMI et al., 2020).

Mesmo que as metodologias apresentadas pela literatura ofereçam vantagens na síntese de polihidroquinolinas, elas ainda sofrem algumas desvantagens, como o uso de precursores metálicos caros, uso de catalisadores tóxicos, altas temperaturas, quantidade elevada de compostos orgânicos voláteis e tóxicos, formação de subprodutos, além da contaminação e dificuldade na separação do catalisador do meio reacional (PAIDEPALA et al., 2014). Logo, a busca por uma metodologia com abordagem verde, eficiente e reutilizável na síntese de estruturas de hexahidroquinolinas é um desafio ainda para os químicos orgânicos-sintéticos. A relevância para os químicos medicinais no campo da descoberta de projetar e desenvolver novos potentes agentes terapêuticos portadores do núcleo hexahidroquinolina é crescente.

Já a conjugação do núcleo dihidropiridínico com dois anéis de ciclohexanona leva a formação de um composto tricíclico simétrico, acridine-1,8-diona, estrutura nitrogenada que se assemelha a acridina (Figura 8). As acridinas são compostos planares conhecidos por serem potentes agentes quimioterápicos, especialmente no campo de agentes antitumorais ligantes ao DNA, devido à sua capacidade estrutural de intercalar reversivelmente com os pares de bases nitrogenadas consecutivas do DNA (KOZURKOVÁ, 2021). Ademais, estas estruturas têm o potencial inibidor das topoisomerasas, enzimas nucleares capazes de manipular a topologia do DNA. Adicionalmente, as acridinas devidamente substituídas apresentam outras atividades biológicas como antibacteriana, antileishmania, antimalária, anti-inflamatória, agente imunossupressor e inibidor de esclerose lateral amiotrófica (ALS) (SAHIBA et al., 2021). Na figura abaixo são apresentadas algumas estruturas de fármacos já comercializados com este núcleo.

Figura 8. Estrutura da acridinodiona e fármacos derivados do núcleo acridina.



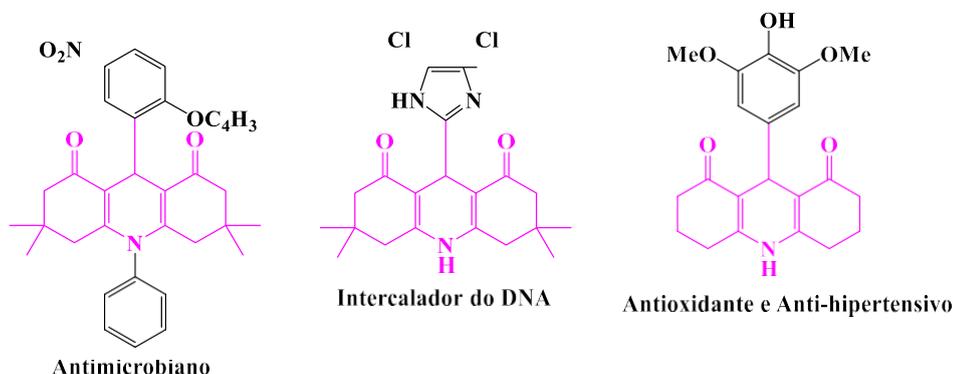
FONTE: AUTORAL (2023).

A aproximação estrutural da acridinodiona com a acridina proporcionou uma vasta aplicação no campo da química orgânica sintética, farmacêutica, de materiais e industrial. As suas propriedades eletrônicas, estrutura e absorção na faixa da região ultra-violeta são responsáveis por seu papel na química medicinal, sintética e fotofísica. Além de possuírem potencial antimicrobiano, antimalárico, antioxidante, antitumoral, anti-hipertensivo e funcionar como intercalador de DNA (Figura 9) (SAHIBA, et al., 2021), similar ao discutido para a classe das acridinas. Ademais, a substituição na posição 9 do núcleo desses compostos leva a uma gama de derivados que possuem diferentes aplicações: controle de processo de transferência eletrônica fotoinduzida (PET), dispositivos emissores de luz azul, extinção de fluorescência, polimerização, corante, quimiossensor de íons de flúor, detecção de Hg^{2+} , sensor fluorescente de Ca^{2+} , entre outros (SAHIBA, et al., 2021).

A diversidade nos campos da pesquisa dessas moléculas, as torna lucrativas para os pesquisadores explorarem sua síntese através de uma biblioteca de compostos. Recentemente, em 2021, Sahibe e colaboradores realizaram uma revisão sistemática da enorme expansão e inovação sobre as acridina-1,8-dionas. O trabalho mostra as diferentes metodologias sintéticas voltadas para estes compostos e afirma que pesquisadores estão trabalhando com métodos

simples, fáceis e econômicos, além de catalisadores ecológicos, evitando o uso de reagentes e solventes tóxicos. Propostas que projetam candidatas à medicamentos híbridos multialvo com vantagens com dupla ação e menor toxicidade.

Figura 9. Derivados da acridinodiona e suas respectivas funções biológicas.

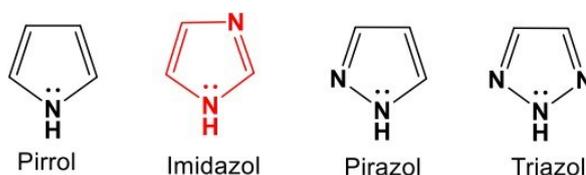


FONTE: Adaptada de Sahiba et al., 2021.

2.2.3 Núcleo Imidazol

O núcleo imidazólico constitui a série de azóis simples (Figura 10): compostos heterocíclicos com anel aromático de 5 membros, nas quais a estrutura contém um ou mais átomos de nitrogênio. Estas moléculas são planares, apresentando um sistema de seis elétrons pi, no qual um átomo de nitrogênio (da ligação N-H) doa seu par de elétrons ao anel, as tornando aromáticas (MANOCHA, et al., 2016).

Figura 10. Série de azóis simples.

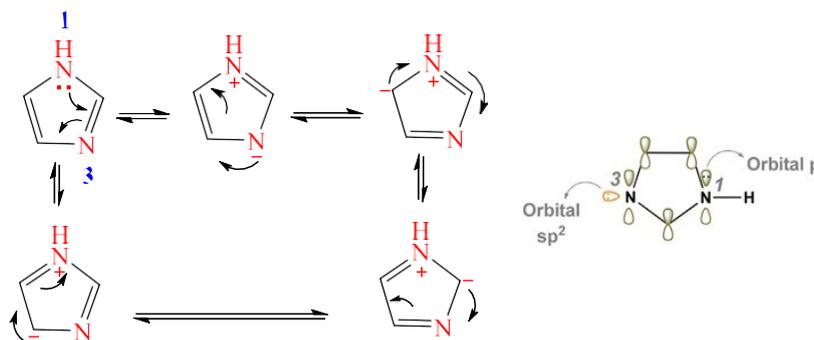


FONTE: AUTORAL (2023).

O imidazol além de apresentar o nitrogênio (N¹) responsável pela conjugação do anel, devido à deslocalização do par de elétrons do orbital p (Figura 12), apresenta um segundo nitrogênio (N³) que possui par de elétrons livre em orbital sp² (Figura 11). Esse nitrogênio N₃ comporta-se como o nitrogênio da piridina, conferindo caráter básico, potencialmente nucleofílico. Essa característica estrutural faz do imidazol um anfótero, podendo atuar como ácido ($pK_a = 14,5$) ou base ($pK_{aH} = 7,0$). A forma estrutural aniônica do imidazol ocorre apenas

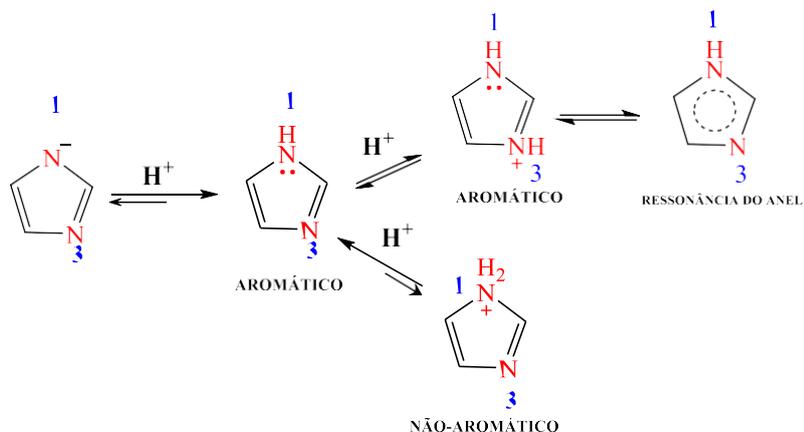
em meio fortemente básico, já a estrutura catiônica em meio neutro. Destaca-se que a protonação ocorre no nitrogênio N₃, visto que no nitrogênio pirrolíco (N₁) a estrutura é desfavorável, pois leva a formação de uma espécie não-aromática, enquanto no nitrogênio piridinico (N₃) a aromaticidade do ciclo é conservada (Figura 12) (SILVA; ORTH, 2020; BAVISKAR et al., 2011).

Figura 11. Estruturas de ressonância do imidazol e seus orbitais atômicos.



FONTE Adaptada de B. SILVA; S. Orth, 2020.

Figura 12. Equilíbrio de ácido e base da estrutura do imidazol.

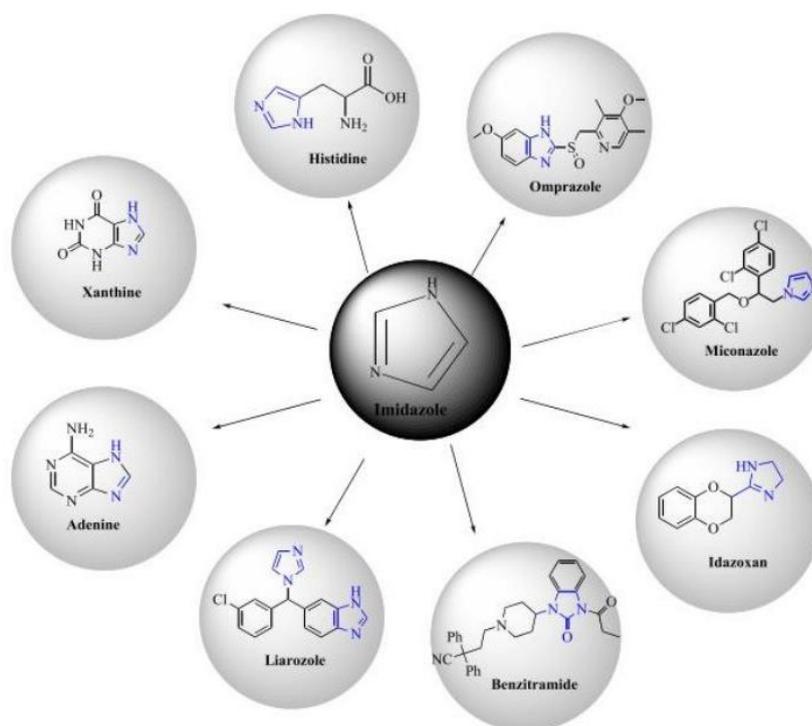


FONTE: Adaptada de B. Silva; S. Orth, 2020.

A reatividade deste núcleo está relacionada à sua especificidade estrutural, o que permite que atue como catalisador em diferentes formas químicas. Quando se encontra protonado, o imidazol age como um catalisador ácido, enquanto na forma neutra ou aniônica, pode atuar como catalisador básico. O papel catalítico dessas estruturas é de extrema importância biológica, visto que o imidazol está presente em diversas formas e possui papéis fundamentais em várias vias metabólicas e funções regulatórias. Um exemplo disso é a presença do imidazol na cadeia lateral do aminoácido essencial, histidina, o qual apresenta papel fundamental em inúmeros sítios enzimáticos (SILVA; ORTH, 2020).

Ademais, as características estruturais únicas do anel imidazol faz com que possa exercer inúmeras interações do tipo, eletrostáticas, π - π , hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, coordenação de metal e forças de Van der Waals com os vários sítios ativos dos organismos. Podendo assim, simplesmente se ligar com inúmeras enzimas e receptores em ensaio biológico exibindo assim uma ampla gama de bioatividades farmacológicas, incluindo alguns como, antimicrobiana, anticonvulsivante, anticâncer e anti-inflamatório. A alta eficiência terapêutica dos medicamentos à base de imidazol (Figura 13) tem feito os químicos projetarem muitos novos agentes quimioterápicos, devido às distintas ações terapêuticas, logo ainda é uma área de pesquisa muito concentrada (SIWACH, et al., 2021; SONI et al., 2019).

Figura 13. Derivados do núcleo imidazol com importantes funções biológicas ou terapêuticas.



FONTE: SONI ET AL., 2019.

2.2.4 Hibridização Molecular

O planejamento, estrutura, modificação e hibridização molecular de ligantes e protótipos estão entre as estratégias para a descoberta e o desenvolvimento de um novo candidato a fármaco. Hibridização molecular compreende a união de duas ou mais estruturas moleculares com diferentes funções biológicas e atividade dupla já conhecidas, que são combinadas para

produzir um novo composto. Essa molécula resultante pode apresentar a atividade de um dos padrões originais ou pode combinar ambas as atividades em uma única molécula, podendo levar a um aumento no potencial de sua bioatividade (BÉRUBÉ, 2016; BARREIRO, 2015).

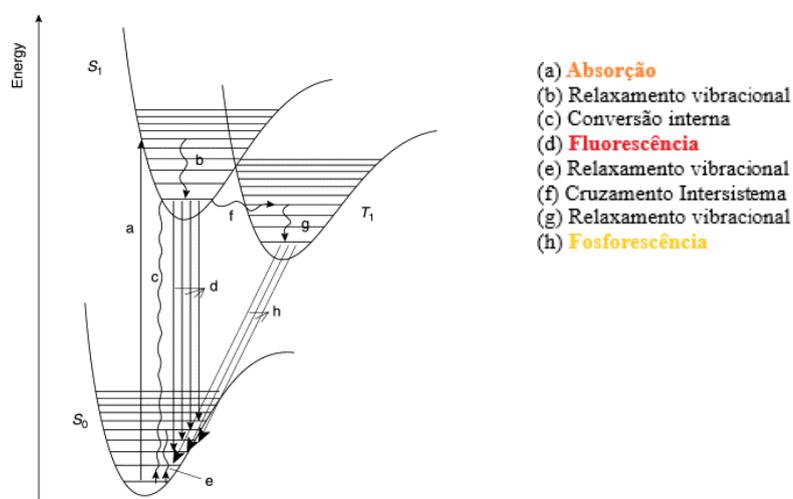
A descoberta de um novo composto híbrido com propriedades farmacológicas pode representar uma inovação terapêutica altamente promissora para abordar doenças com causas multifatoriais específicas. Esses medicamentos híbridos têm potencial de oferecer terapias combinadas em um único agente multifuncional, tornando-se mais direcionados e específicos em comparação com os tratamentos convencionais tradicionais. Considerando o uso de substâncias conhecidas, já avaliadas quanto aos aspectos físico-químicos e farmacológicos característicos, como toxicidade e mecanismo de ação, é possível que geração de extensas bibliotecas químicas, constituídas por milhares híbridos moleculares trazendo um nível elevado de informação acumulada (SHALINI, 2021).

Essa técnica tende a se tornar rápido e eficiente o desenvolvimento de novas entidades químicas, uma vez que antecipa teoricamente a possibilidade de ter um fármaco com boa biodisponibilidade, já que o protótipo em estudo foi ou é empregado na clínica. Embora muito promissor para combater a natureza multifatorial de doenças complexas, o desenvolvimento de híbridos moleculares enfrenta problemas críticos de selecionar a combinação de alvos corretos e obter uma atividade equilibrada em relação a eles, mantendo as propriedades semelhantes aos medicamentos já existentes (REHMAN, et al., 2015).

2.2.5 Propriedades Fotofísicas de Compostos Orgânicos

A fotofísica é o ramo da química que relaciona a interação entre a matéria e fótons de luz visível ou ultravioleta. A compreensão do comportamento dos processos de transição energética causados pela interação com um composto é importante para o mapeamento de possíveis rotas de desativação do estado excitado, o que leva a compreender suas características particulares. A representação esquemática desses processos energéticos é dada por um diagrama, conhecido como diagrama de Jablonski (Figura 14), composto por uma série de estados eletrônicos, cada um com diferentes níveis energéticos vibracionais (WARDLE, 2009; LAKOWICK, 2006).

Figura 14. Diagrama de Jablonski para processos fotofísicos.



FONTE: Adaptada de CORCORAN, 2014.

O estado fundamental, representado como S_0 (singleto) é o estado de menor energia de uma molécula. Quando uma molécula é excitada pela absorção de um fóton (**a**), um elétron é promovido para um estado excitado de maior energia, representado por S_n (singleto excitado). Essa transição é vertical e muito rápida, ocorrendo em frações de 10^{-15} segundos, entre o orbital preenchido de mais alta energia (HOMO), e o orbital desocupado de mais baixa energia (LUMO). Após a molécula estar no nível de mais alta energia, ela pode relaxar de volta para o estado fundamental. A desativação do estado S_n pode ocorrer via transferência de energia vibracional intermolecular (**b**) ou a espécie pode relaxar via conversão interna (CI) (**c**), ambos processos não-radioativos. Destaca-se que nestes processos há a conservação da multiplicidade de spin, sendo desativações rápidas entre 10^{-12} e 10^{-9} segundos (CORCORAN,2014; LAKOWICZ,2006).

A desativação do estado excitado também pode ocorrer por processos radiativos, de duas maneiras distintas: fluorescência (**d**) ou fosforescência (**h**). A diferença entre os dois processos é que a fluorescência é permitida por spin, uma vez que não envolve a mudança de spin eletrônico, logo ocorre rapidamente, entre 10^{-10} e 10^{-7} segundos. Contudo, quando ocorre conversão inter-sistema (CIS) (**f**), ocorre mudança do spin eletrônico para o estado tripleto (T_1), de forma não radioativa. A espécie ao retornar ao estado singleto pode emitir radiação, esse percurso de desativação leva cerca de 10^{-8} a 10 segundos, conhecido como fosforescência. Os caminhos de desativação do estado excitado descritos dependem da molécula em questão e das condições experimentais propostas (CORCORAN,2014; LAKOWICZ,2006).

Ao observar o diagrama de Jablonski nota-se que a energia de emissão é geralmente menor que a energia de absorção. Esta perda de energia está relacionada com o relaxamento vibracional, promovido por um decaimento rápido que ocorre para o menor nível vibracional de S_1 . O método utilizado para quantificar essa perda de energia é o deslocamento de Stokes, que representa a diferença entre o comprimento de onda máximo da primeira banda de absorção e o comprimento máximo de emissão. Destaca-se que essa medida pode ser influenciada por diversos fatores como efeito do solvente, transferência de energia, reações no estado excitado e formação de complexos (VALEUR, 2002).

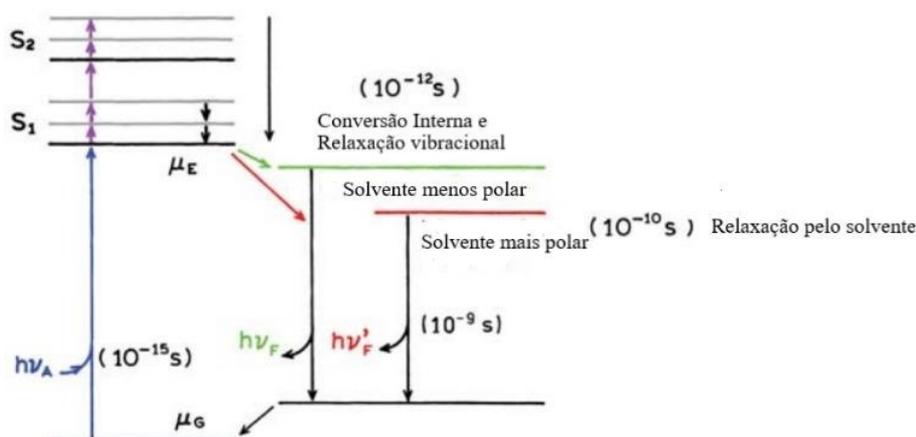
O ambiente em que a molécula se encontra em relação a polaridade do meio é determinante na posição e intensidade nas bandas de absorção e emissão de radiação no espectro, e por consequência nas suas demais propriedades fotofísicas. A natureza das interações intermoleculares que ocorrem entre soluto-solvente, sobretudo se essas interações são polares (momento dipolo diferente de zero), e dependem do momento de dipolo do estado fundamental (S_0) e excitado (S_1), tendem a alterar a posição das bandas de absorção e emissão, $S_0 \Rightarrow S_1$ e $S_1 \Rightarrow S_0$, respectivamente. Assim como a intensidade de absorção, que está relacionada com a probabilidade de transição eletrônica (LAKOWICZ, 2006; SILVERSTEIN, 2019).

Quando o momento de dipolo elétrico do solvente provoca um deslocamento no comprimento de onda do composto (cromóforo) para região do vermelho, comprimentos de onda maiores, tem-se um deslocamento batocrômico. Já o deslocamento para região do azul, comprimentos de onda menores, tem um deslocamento hipsocrômico. Este fenômeno é conhecido como solvatocromismo. Stokes estudou estes efeitos, e como relatado anteriormente, através da diferença entre o comprimento de onda máximo de emissão e de absorção de um composto em um dado solvente é possível medir o nível de relaxação sofrido pelo estado fundamental e excitado de uma molécula, em função das interações dela com o meio que se encontra (VALEUR, 2002).

Um fluoróforo, espécie química emite fluorescência, apresenta naturalmente um momento de dipolo maior no estado excitado (μ_E) do que no estado fundamental (μ_G). Contudo, o solvente do meio pode relaxar, ou seja, reorientar o momento dipolo do fluoróforo no estado excitado, diminuindo a energia do sistema. Assim, quanto maior for a polaridade do solvente, maior será a estabilização causada pelo mesmo, reduzindo a energia do estado excitado e por conseguinte deslocando a banda para maiores comprimentos de onda. Essa teoria, que se baseia no fluoróforo como um dipolo, sozinha é insuficiente, uma vez que não leva em consideração

nenhum tipo de interações com o ambiente. Já a teoria de efeitos específicos leva diversos tipos de interações, como a formação de ligação de hidrogênio, teoria ácido-base, transferência de carga entre outros, sendo complementar para explicar os efeitos que podem gerar alterações significativas no espectro (VALEUR, 2002; LAKOWICZ, 2006).

Figura 15. Diagrama de Jablonski para a emissão de fluorescência após relaxação do estado excitado no solvente.



FONTE: Adaptada de LAKOWICZ, 2006.

Uma molécula quando eletronicamente excitada possui um tempo de vida finito, e suas propriedades físicas e químicas diferem daquelas no estado fundamental. Logo, é possível inferir o tempo que uma espécie leva ao retornar para o estado inicial, ou seja, o tempo de meia vida que o composto apresenta. Tendo em vista este conceito, pode-se quantificar a intensidade de fluorescência emitida por um fluoróforo, ou seja, determinar seu rendimento quântico. Pode-se definir rendimento quântico como a razão entre o número de fótons emitidos (N_f) e o número de fótons absorvidos (N_a), conforme a equação abaixo (LAKOWICZ, 2006).

$$\Phi F = \frac{N_f}{N_a} \quad (\text{Equação 1})$$

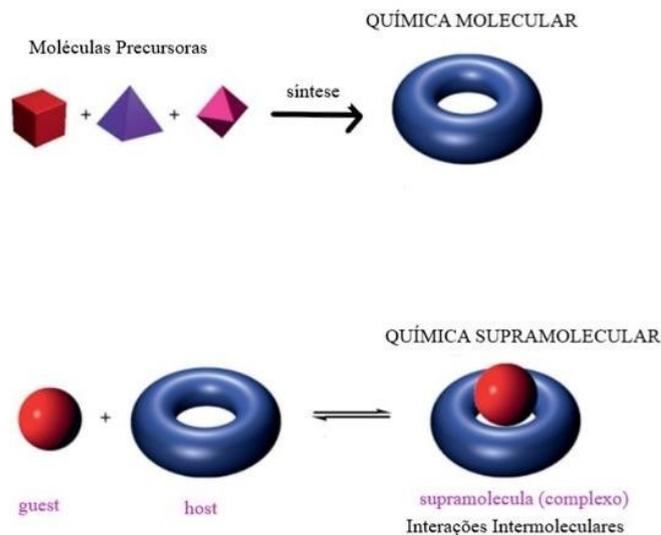
Compostos fluorescentes desempenham um papel crucial na biotecnologia e diagnóstico, permitindo a marcação de biomoléculas para rastrear processos celulares, o diagnóstico de doenças através da detecção de marcadores específicos, a visualização de interações moleculares em tempo real, a identificação de patógenos em amostras clínicas, a investigação de processos de regeneração e desenvolvimento de tecidos, além de possibilitar a triagem de potenciais fármacos (DOMLJANOVIC et al., 2017). Essas aplicações destacam a importância dos compostos fluorescentes na compreensão da biologia, no avanço da medicina e na pesquisa científica de ponta.

2.3 PARTE III

2.3.1 Química Supramolecular

A química supramolecular é um campo interdisciplinar que se concentra no estudo do reconhecimento molecular e sistemas polimoleculares auto-organizados formados por interações entre moléculas. O termo “supramolecular” refere-se ao fato desses sistemas serem constituídos por blocos de construção que são ligados entre si de maneira não covalente. O campo da química supramolecular foi bem aceito em 1987, quando o prêmio Nobel de Química foi concedido a Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn e Charles J. Pedersen por seu trabalho nesta área (STEED, 2009; HUANG, 2015). Mais recentemente, em 2016, coube aos pesquisadores Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart e Barnard L. Feringa receberem o prêmio Nobel pelo desenvolvimento de máquinas moleculares, conceito possível devido ao estudo detalhado de supramoléculas (Figura 16).

Figura 16. Comparação entre química molecular e química supramolecular.



FONTE: Adaptada de STEED, 2009.

Assim, a química supramolecular se concentra em estudar as interações entre moléculas e como elas formam estruturas maiores e mais complexas, conhecidas como supramoléculas. Essas interações são responsáveis por dar propriedades únicas a estas estruturas que se diferem das propriedades das moléculas individualmente. Assim como, o estudo dinâmico dessas interações, incluindo como elas são afetadas por variação de fatores externos como temperatura, pressão e concentração (STEED, 2009).

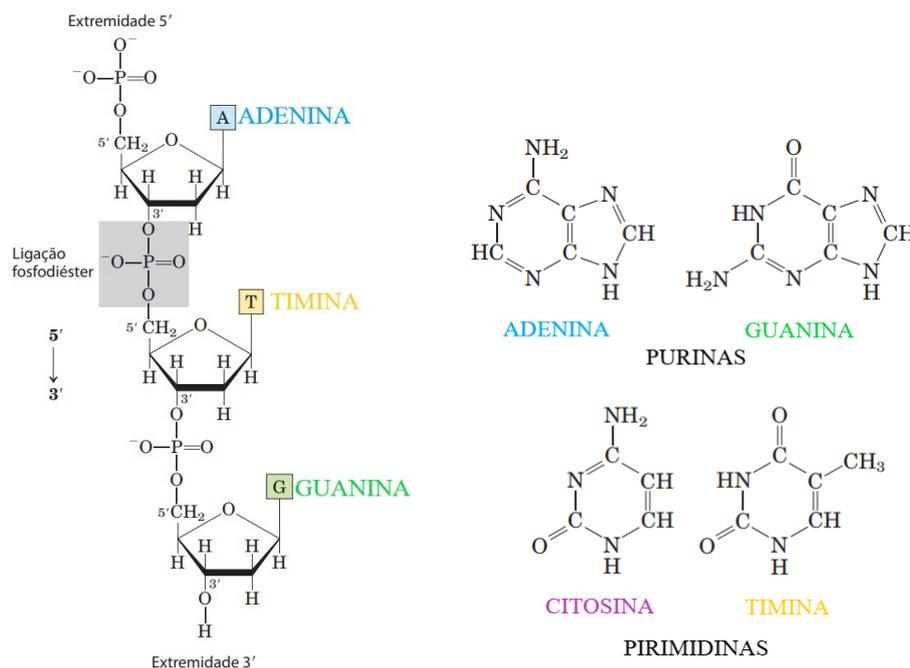
Este campo está fundamentado em uma área de pesquisa interdisciplinar que engloba características químicas, físicas e biológicas para compreender como as interações intermoleculares afetam a estrutura e função de sistemas complexos. Moléculas simples, ligadas entre si e auto-organizadas por interações, já conhecidas pela química clássica, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas entre outras. Essas interações são de fundamental importância nos processos biológicos entre substratos e proteínas receptoras, reações enzimáticas, reconhecimento celular, regulação da expressão genética pelas proteínas ligadas ao DNA e sobretudo a interação de DNA e fármacos (LEHN, 1996). Por este motivo, recentemente os termos *host* (hospedeiro) e *guest* (hóspede) vem sendo substituídos pelos termos receptor e substrato, respectivamente.

2.3.1.1 DNA

A descoberta da dupla hélice de DNA, em 1953 pelos cientistas James Dewey Watson, Francis Crick (WATSON; CRICK,1953) e por Rosalind Franklin, forneceu uma base para a compreensão de como a informação genética é regulada, como os genes são expressos e como as mudanças genéticas ocorrem. Isso tem sido de fundamental importância para a identificação de doenças hereditárias e para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento (TRAVERS,2015).

O DNA, ácido desoxirribonucleico, é um ácido nucléico constituído por três componentes característicos de um nucleotídeo (1) uma base nitrogenada derivada de dois compostos a pirimidina e purina, (2) uma pentose, 2'-desóxi-D-ribose e um grupo (3) fosfato. Esta descrição apresenta a estrutura do esqueleto covalente do DNA, formado por fosfatos e resíduos de pentose alternados, ligados por ligações fosfodiéster, isto é um grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3-hidroxila do próximo nucleotídeo (Figura 17a). Esta forma se dá, já que os grupos hidroxila dos resíduos de pentose formam ligações de hidrogênio com biomolécula a deixa hidrofílica a água, e os grupos fosfatos, ionizados e carregados negativamente em pH biológico podem ser neutralizados por interações com cargas positivas (NELSON;COX, 2017).

Figura 17. (a) Estrutura do DNA mostrando a ligação fosfodiéster (b) Estruturas das bases nitrogenadas presente no DNA.



FONTE: NELSON; COX, 2017.

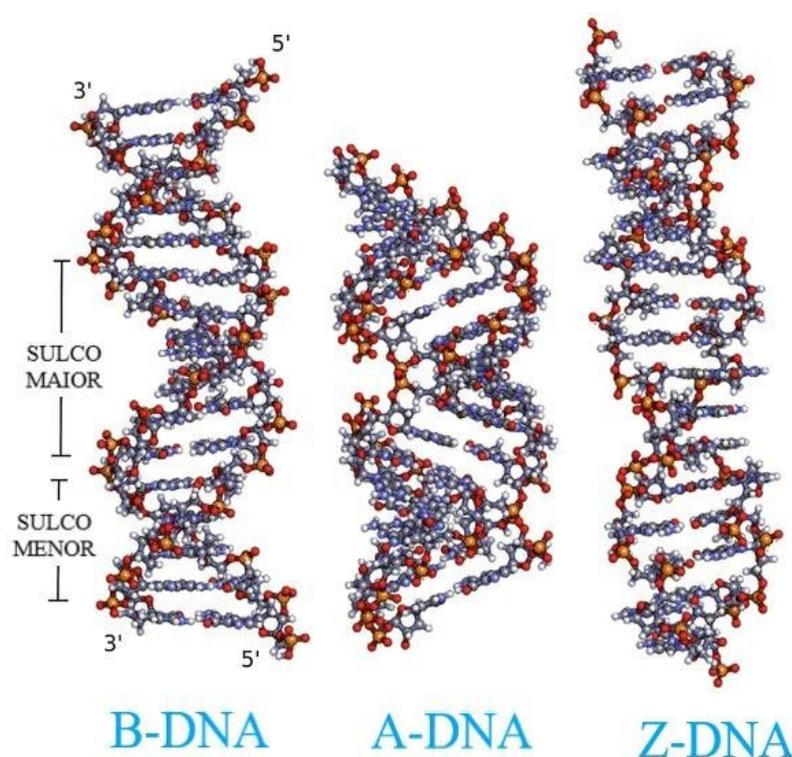
As bases nitrogenadas, também compostos heterocíclicos, são grupos laterais ligados ao esqueleto em intervalos regulares. Essas moléculas aromáticas possuem deslocamento de elétrons entre os átomos do anel, devido às ligações duplas alternadas, o que resulta em uma distribuição eletrônica diferenciada. As bases do tipo pirimidinas, citosina (C) e timina (T), são estruturas planas, enquanto as purinas, adenina (A) e guanina (G) são estruturas muito próximas de uma estrutura planar, com uma leve prega (Figura 17b). Elas podem existir em diferentes formas tautoméricas dependendo do pH. De forma geral, elas são hidrofóbicas, portanto, insolúveis em água em pH fisiológico. No entanto, em meio ácido ou alcalino, elas podem tornar-se carregadas e aumentar sua solubilidade meio aquoso. Destaca-se que por serem estruturas cromóforas elas absorvem luz na região do ultra-Violeta, logo os ácidos nucleicos são caracterizados por uma forte absorção em comprimentos de onda próximo a 260 nm, essa propriedade fotofísica é utilizada para quantificar a quantidade de ácidos nucleicos presente em uma solução (NELSON; COX, 2017, DAHM, 2008).

Uma das interações mais importantes entre as bases nitrogenadas do DNA é o empilhamento hidrofóbico, em que duas ou mais bases são posicionadas com os planos de seus anéis em paralelo, como uma pilha. Esta interação envolve grupos amino e carbonilas entre as bases complementares. Os padrões mais comuns de ligações de hidrogênio são aqueles definidos por Watson e Crick, nos quais a adenina (A) liga-se especificamente a timina (T), e a

guanina (G) liga-se a citosina (C). Esses pares de bases complementares são responsáveis pela estrutura de dupla hélice do DNA, além de serem fundamentais na estabilização da estrutura tridimensional do ácido nucleico, e envolve interações dipolo-dipolo e de van der Waals também (WATSON 1953; NELSON; COX, 2017).

Existem três principais formas de estrutura de DNA duplex, conhecidas como isoformas: B, A e Z dependentes do meio onde se encontra (Figura 18) e elas podem afetar a maneira como o DNA interage com outras moléculas.

Figura 18. Isoformas do DNA, B-DNA; A-DNA e Z-DNA.



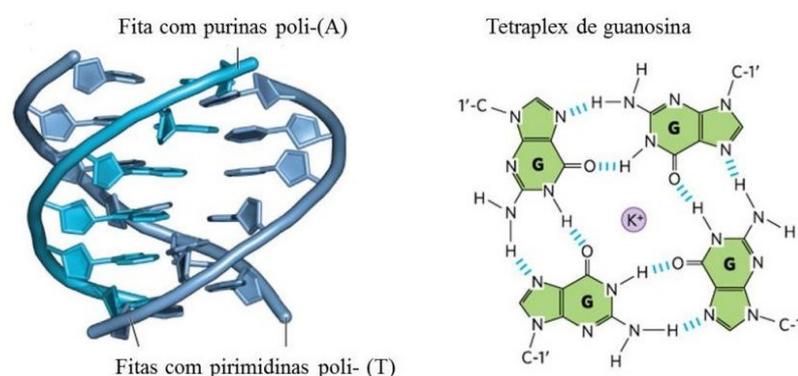
FONTE: Adaptada de PEDERSEN, 2014.

A estrutura B-DNA é a forma duplex mais comum e amplamente estudada, uma vez que foi a estrutura proposta por Watson e Crick e a mais estável. Essa isoforma é a mais encontrada em meio fisiológico, apresenta 11 pares de bases para uma volta completa na hélice, possui uma hélice de diâmetro médio, com sulcos maiores e menores bem definidos. Já a forma A-DNA é uma hélice mais compacta e mais grossa que a forma B, com sulco menor mais estreito e sulco maior mais amplo, tendo 10 pares de bases para uma volta completa na hélice. Essa isoforma é encontrada em condições de baixa concentração de água e é tipicamente associada a formas mais curtas de DNA de fita dupla. Enquanto a forma Z é uma hélice mais fina e mais longa do que a forma B, ela se forma quando o DNA está em condições de alta salinidade ou alcalinidade,

ou seja, elevada força iônica, diferentes das outras conformações, a Z não é regular e não apresenta sulcos definidos (PEDERSEN, 2014).

O DNA pode assumir diferentes conformações estruturais, além da clássica dupla hélice (B-DNA). Duas delas são o DNA triplex e o DNA quadruplex (Figura 20). A triplex é uma estrutura de três fitas formadas por duas fitas de DNA emparelhadas através de ligações de hidrogênio com uma terceira pirimidínica. Já o DNA quadruplex são quatro guaninas associadas em uma configuração de quatro fitas por meio da coordenação de íons metálicos (geralmente potássio), conhecida como G-quadruplex. Essas conformações têm importância biológica e podem ter aplicações terapêuticas no tratamento de doenças relacionadas à regulação gênica, além de fornecer insights para a compreensão da função do DNA (COX, M.M, et al., 2012).

Figura 19. Estrutura do DNA de três e quatro fitas, triplex e quadruplex respectivamente.



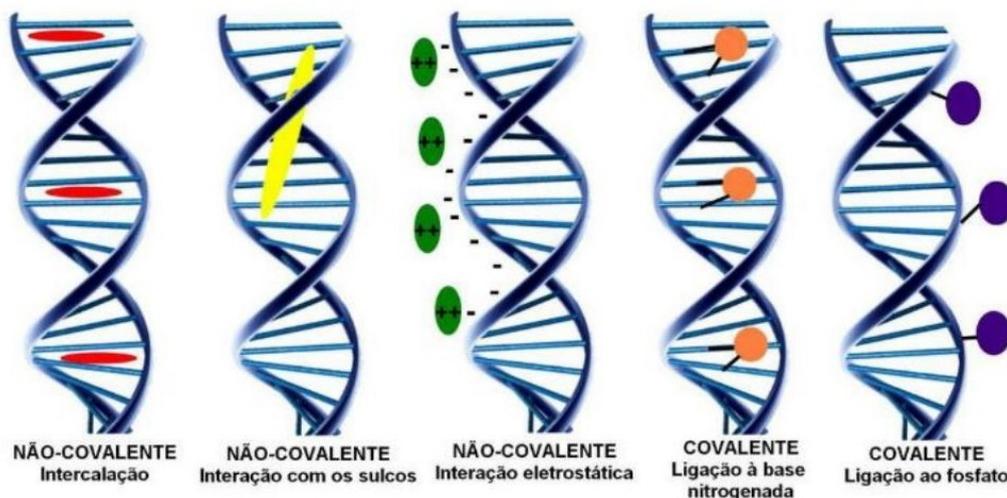
FONTE: COX, M.M, et al., 2012.

2.3.1.2 Interações do DNA com ligantes

O DNA pode interagir com diversas espécies ou compostos químicos por dois modos distintos: ligações covalentes e não covalentes (Figura 20). O termo ligante é aqui usado para representar uma molécula de menor dimensão capaz de associar-se a moléculas de DNA, formando um complexo estável ou supramolécula. A ligação covalente é caracterizada por uma ligação direta e permanente entre o DNA e o ligante, que pode ocorrer por meio das bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato do ácido nucléico. Essa ligação é geralmente irreversível e pode alterar permanentemente a estrutura e a função do DNA. Já a ligação não covalente, é caracterizada por interações que não envolvem uma ligação direta e permanentes entre a macromolécula e o ligante. Estas são geralmente mais fracas e reversíveis, o que permite que o DNA mantenha sua estrutura e função original. Estas interações podem ocorrer por diferentes

mecanismos, entre eles interações eletrostáticas, intercalações ou por meio de interações no *groove* do DNA (BARRA, NETO, 2015; SHENG 2013). A figura 20 retirada do trabalho de Barrae colaboradores ilustra esses tipos de interações.

Figura 20. Representação dos modos de interação do ligante-DNA.



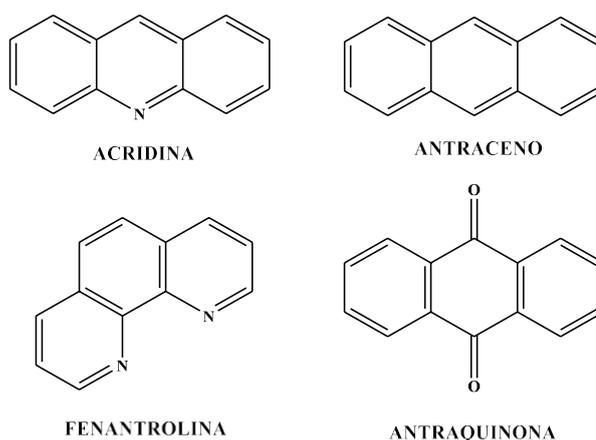
FONTE: BARRA, NETO, 2015.

O modo de ligação covalente do DNA, como relatado anteriormente, apresenta elevada resistência, o que pode causar distorção na molécula de DNA, e assim afetar o processo de transcrição e replicação. O mecanismo mais conhecido é a alquilação de sítios nucleofílicos dentro da dupla hélice os ligantes alquilantes mais eficazes tem duas porções capazes de desenvolver carbocátions transientes que se ligam covalentemente aos sítios ricos em elétrons no DNA, impedindo e/ou inibindo o ciclo celular. De modo semelhante, pode ocorrer ligações covalentes entre os nitrogênios das bases do DNA com o ligante, ou com os grupos fosfatos do DNA e o ligante. Um exemplo de composto que interage com o DNA por esse modo é a cisplatina [*cis*-diclorodiaminoplatina(II)], capaz de realizar ligações covalentes com os nitrogênios das bases do DNA e deslocar o cloreto de sua estrutura (SHENG, 2013; PUYO et al., 2014).

O modo de ligação não covalente pode se dar por intercalação, interação nos sulcos ou interação eletrostática. Cada tipo de interação pode afetar a conformação do DNA e inibir o processo de interação DNA-proteína nos processos biológicos. A intercalação ocorre entre um ligante, geralmente anel planar e aromática/ e ou heterocíclica (Figura 21), e as bases nitrogenadas empilhadas da dupla hélice do DNA. Esse ligante se insere fisicamente entre as bases nitrogenadas consecutivas, formando interação do tipo pi-stacking, resultando em

alterações na estrutura do DNA, como distorção na hélice (WHEATE, 2007). Ressalta-se que nesse tipo de interação não ocorre a formação de ligações covalentes, mas interações como eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, plausíveis de levar a mudanças na estrutura da dupla hélice. Isso pode interferir em processos biológicos que dependem da estrutura do DNA. Alguns fármacos anticancerígenos atuam por meio da intercalação, impedindo a correta replicação e transcrição do DNA nas células tumorais, levando à morte celular. Contudo o uso de intercalantes apresenta baixa especificidade, o que significa que esses ligantes também podem interagir com o DNA de células saudáveis, causando toxicidade (ROGERIO, et al., 2016). Portanto, o desenvolvimento de intercalantes é uma área da de pesquisa importante para evitar efeitos colaterais indesejados e tornar esses agentes terapêuticos mais seguros e eficientes no tratamento de doenças relacionadas ao DNA, como o câncer.

Figura 21. Núcleos que interagem via intercalação com o DNA.

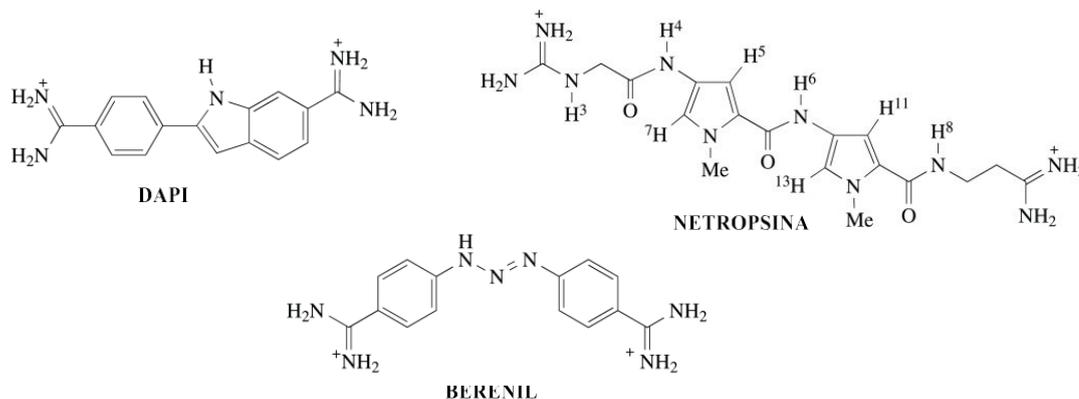


FONTE: Adaptado de WHEATE, 2007.

A interação por *groove*, por sua vez, acontece quando moléculas se ligam em regiões onde as bases nitrogenadas não estão empilhadas, formando uma estrutura tridimensional característica, regiões chamadas de sulcos maiores e menores, e elas surgem devido à maneira como as duas fitas do DNA se enrolam em uma dupla hélice. Os sulcos oferecem um ambiente químico único e diferenciado, eles contêm grupos funcionais e características químicas que permitem o reconhecimento específico de moléculas que se ligam a eles. Essa ligação específica nos sulcos pode ser medida por interação como as ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals e oferecem maior seletividade. Essas interações nos sulcos são importantes na regulação da expressão gênica e em diversos processos biológicos. Proteínas regulatórias, podem se ligar aos sulcos e influenciar a atividade dos genes, além de alguns agentes carcinogênicos, medicamentos quimioterápicos, produtos naturais como flavonoides e

compostos sintéticos, como corantes de DNA, podem atuar ligando especificamente aos sulcos do DNA, interferindo na sua função e processos celulares essenciais (MIZUTA et al., 2018; DOLENC et al., 2006; WILSON, 1994).

Figura 22. Núcleos que interagem via *groove* com o DNA.



FONTE: Adaptado de WILSON D. W., 1994.

E por último, as ligações eletrostáticas ocorrem quando a carga elétrica do ligante interage com a carga do DNA, e isso pode ocorrer por meio de interações com os grupos fosfato (carregados negativamente) em condições de pH fisiológico. Essas interações estão associadas à superfície externa da molécula de DNA, fora dos sulcos (BARRA, NETO, 2015).

2.3.1.3 DNA: alvo biológico

O DNA tem sido estudo de alvo farmacológico para diversas patologias. Esta biomolécula que contém e transmite informações genéticas na célula, como visto anteriormente, pode sofrer modulações na expressão gênica ou interferência na replicação. Isto pode levar a uma gama de doenças, desde atividade tumoral até microbianas. As propriedades químicas e físicas deste ácido nucleico permitem que ele seja alvo de manipulação e modulação para fins terapêuticos.

No tratamento do câncer, por exemplo, fármacos que interferem na replicação do DNA podem inibir o crescimento de células tumorais e induzir a morte. Em relação às doenças infecciosas, os fármacos que alvejam o DNA de microrganismos patogênicos podem interromper seu ciclo de replicação e impedir sua proliferação. Isso tem sido particularmente importante no tratamento de doenças como malária, doença de Chagas, Leishmaniose, HIV e outras infecções virais. A pesquisa contínua nessa área tem impulsionado o desenvolvimento

de novos medicamentos e terapias direcionadas, buscando melhorar a eficácia dos tratamentos e reduzir os efeitos colaterais indesejados (BRINKMAN et al., 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as propriedades farmacocinéticas de derivados sintéticos do núcleo dihidropiridínico utilizando ferramenta *in silico* e, uma vez conhecidas suas propriedades fotofísicas, avaliar o modo de interação destes com o DNA (*Calf Thymus*) através de técnicas espectroscópicas.

3.2 Objetivos Específicos

- (I) Avaliar as propriedades farmacocinéticas (ADMET) dos derivados do núcleo dihidropiridínicos previamente planejados por ferramenta *in silico*;
- (II) Sintetizar os derivados via reação multicomponente, através do uso da maghemita, catalisador superparamagnético, com otimização dos parâmetros reacionais;
- (III) Compreender o comportamento fotofísico dos compostos frente à absorção de radiação ultravioleta, emissão de fluorescência, tempo de meia vida e rendimento quântico;
- (IV) Identificar o modo de interação molecular das estruturas com o ct-DNA (*Calf Thymus*) através de ensaios espectroscópicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram disponibilizados no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LaCFI) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Destaca-se os reagentes: formaldeído P.A (Vetec), acetoacetato de etila ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich), 1,3-ciclohexanodiona ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich), acetato de amônio ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), 2-imidazolcarboxaldeído (97%, Sigma-Aldrich); brometo de n-butila, sulfato de sódio anidro (Sigma-Aldrich), ácido clorídrico 37% (Neon), cloreto de sódio (99%, Aldrich), hidróxido de potássio P.A (Neon), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS; Sigma-Aldrich), ácido desoxirribonucleico sal sódico (Calf thymus, ctDNA; Sigma-Aldrich), brometo de etídio (Sigma-Aldrich) fornecido pelo Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas – UFSC).

Os solventes como etanol (Quimidrol), acetona, acetato de etila, hexano, diclorometano (Vetec) e clorofórmio (Neon) possuem grau de pureza P.A/absoluto. Solventes deuterados: CDCl_3 , DMSO- d_6 (99,8% + 0,05% TMS, Cambridge Isotope Laboratories) e DCl (38%). Os experimentos em solução aquosa foram realizados utilizando água deionizada (PureLab Option-Q, 18,2 M Ω cm).

O catalisador maghemita (Fe_2O_3) foi fornecido em colaboração com o Prof. Dr. Alexandre Luis Parize e a Me. Giuliana Valentini do Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (Departamento de Química – UFSC)

4.2 Equipamentos

4.2.1 Análise de RMN de ^1H e ^{13}C

As análises dos espectros de RMN ^1H (200 e 400 MHz), ^{13}C (50 e 100 MHz) foram realizadas na Central de Análise do Departamento de Química - UFSC nos espectrômetros Bruker AC 200 MHz e AS-400 400 MHz. As amostras foram preparadas pela dissolução em clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO). Destaca-se que amostras com o núcleo imidazol fez o uso de gotas de DCl (38%) para ajudar na solubilidade do composto. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em parte por milhão (ppm)

contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno ($\delta = 0,00$ ppm). Os dados espectrais obtidos foram tratados por meio do software MestReNova (Mestrelab Research S.L.).

4.2.2 Espectroscopia UV-Vis

As análises no espectro de absorção de UV-Vis foram obtidas no espectrofotômetro UV-Vis da marca Agilent Cary, presente no LaCFI (Departamento de Química – UFSC). Para obtenção dos espectros foi fixada uma varredura de 200 - 600 nm, primeiramente realizou-se uma leitura do branco (sem conter analito) e posteriormente a leitura das amostras. A cubeta utilizada apresenta caminho óptico de 1cm. O tratamento dos dados foi realizado com auxílio do software Origin 8.0 (OriginLab).

4.2.3 Espectroscopia de Fluorescência

As análises de fluorescência foram realizadas no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais, LaCFI (Departamento de Química – UFSC) em um espectrofotômetro de fluorescência modelo Cary Eclipse da marca Varian (Agilent Technologies). Para a obtenção dos espectros de emissão, foi utilizada uma cubeta de quartzo de 4 lados transparentes com caminho óptico de 1 cm. Para os espectros de emissão, cada amostra foi fixada com valor de comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) cerca de 10 nm a mais que o comprimento de onda de absorção.

4.2.4 Tempo de Meia Vida de Fluorescência (τ_F)

As medidas de tempo de meia vida de fluorescência foram realizadas no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais, LaCFI (Departamento de Química – UFSC), no equipamento EasyLife. Utilizou-se um LED de comprimento de onda correspondente com a região de absorção da amostra, em 370 nm. Um filtro também foi selecionado, com comprimento de onda 10 nm maior que o LED, a fim de filtrar as demais contribuições e gerar informação apenas da região de interesse. Realizou-se leituras do padrão LUDOX® (suspensão aquosa 30% em massa) a fim de comparação do IRF de mesma intensidade da amostra, cuja variação de intensidade é alcançada através da variação da fenda. Os dados foram tratados matematicamente no software Origin®.

4.2.5 Rendimento Quântico Absoluto (Φ_F)

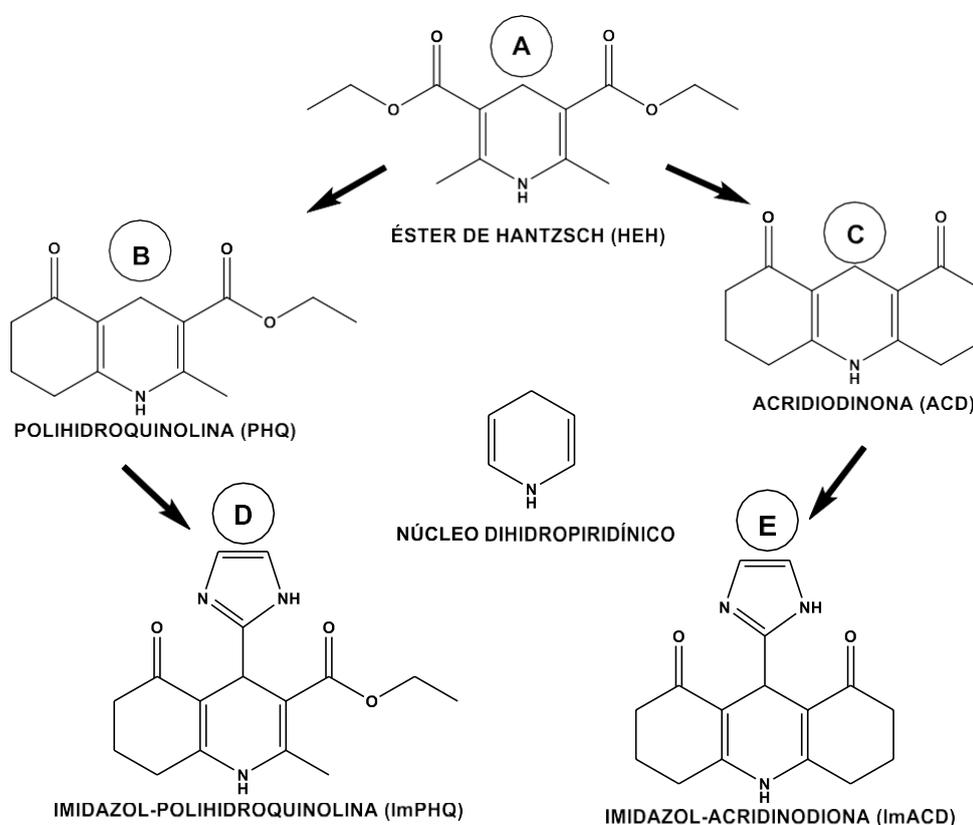
As medidas de rendimento quântico foram realizadas no Laboratório de optoeletrônica orgânica e sistemas anisotrópicos, LOOSA (Departamento de Química – UFSC). Inicialmente foi realizada leitura de absorção no espectrofotômetro da marca OceanOptics modelo USB4000. Já as leituras do rendimento quântico no espectrofotômetro da marca Hitachi modelo F-7000, contendo uma lâmpada de xenônio/mercúrio, a qual foi ajustada para emitir no

comprimento de onda de maior absorção de cada molécula, juntamente com uma esfera integradora modelo A10094 acoplada à analisador de espectro modelo PMA-12, da marca Hamamatsu.

4.3 Metodologia

As estruturas estudadas no presente trabalho dos derivados do núcleo dihidropiridínico estão apresentadas no Esquema 2.

Esquema 2. Protótipo de derivados do núcleo dihidropiridínicos (**Compostos I**).



FONTE: AUTORAL (2023).

4.3.1 PARTE I

4.3.1.1 Avaliação de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas *in silico*

O estudo *in silico* avaliou as propriedades farmacocinéticas ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), permeabilidade da barreira hematoencefálica, inibição da glicoproteína-P (gpP), absorção por células Caco-2 e solubilidade aquosa dos protótipos dos **Compostos I**. Os parâmetros físico-químicos, baseados na regra de Lipinski (LIPINSKI, 2000),

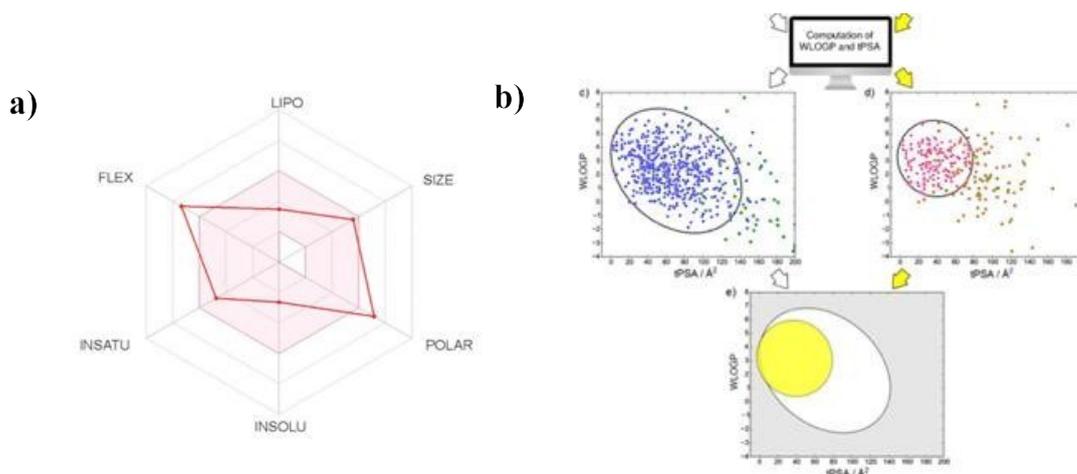
como MM (massa molar em g/mol), logP (coeficiente de partição octanol/água), HDA e HBA (número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio respectivamente). Além do número de rotações livres e TPSA (área de superfície polar), propostos por Veber e colaboradores (VEBER *et al.*,2002), foram verificados através do software online gratuito SwissADME (www.swissadme.ch).

Os dados de solubilidade em água (logS), absorção do trato gastrointestinal de humanos (TGI), permeabilidade da membrana hematoencefálica (BHE), inibição da gpP e absorção por células Caco-2 foram obtidos pelo software online gratuito ADMETlab (www.admet.scbdd.com). Todas as estruturas dos compostos utilizados na rodagem dos softwares foram obtidas pelo software *ChemDraw Professional 17.0* ou o próprio do servidor, juntamente com o *SMILE* das moléculas.

O programa SwissADME ao simular por métodos computacionais a biodisponibilidade e características farmacocinéticas de possíveis fármacos leva em consideração 6 propriedades: lipofilicidade, tamanho, polaridade, insolubilidade, insaturação e flexibilidade. Cada um desses atributos é plotado no vértice de um hexágono e a molécula é então posicionada no gráfico de *Bioavailability Radar* (Figura 23a) com base nos valores calculados para cada uma das propriedades, a sua “drug-likeness” (ou seja, a probabilidade de ser um bom candidato a fármaco) é avaliada com base na sua posição em relação a uma região rosa específica dentro do hexágono. Quanto mais próximo do centro do polígono, menor a probabilidade de biodisponibilidade da molécula, à medida que se aproxima dos vértices, sua biodisponibilidade aumenta.

Ademais, o software simula dados da absorção gastrointestinal passiva (HIA) e da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) em função da posição da molécula no gráfico $W\log P$ (coeficiente de partição octanol/água) versus TPSA (área de superfície polar) esse gráfico é conhecido com *BOILED-Egg*, onde a “clara” corresponde a elipse branca referente a HIA, e a “gema” círculo amarelo representa a BBB (Figura 23b).

Figura 23. a) Gráfico Bioavailabilty Radar **b)** Gráfico BoiledEgg.



FONTE: SWISSADME, 2023.

Para prever o potencial da molécula atuar como inibidor dos citocromos P450 (CYPs) foi também utilizado o software SwissADME. Já para predição dos sítios de metabolização (SOM) que as principais isoformas CYPs vão atuar foi utilizado a ferramenta online gratuita SOMP (<http://www.way2drug.com/somp/index.php>) Essa web-service é baseada na tecnologia PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) e nos descritores LMNA, desenvolvida pelo Institute of Biomedical Chemistry of Rus.Acad.Med.Sci. Para a previsão de quais locais de irão sofrer biotransformação, a estrutura com todos os átomos marcados apresenta os valores deltaP ($P_t - P_f$) para cada átomo presente na estrutura, isto é, P_t é a probabilidade de que o átomo marcado seja um sítio de metabolismo da enzima apropriada e P_f é a probabilidade de que o átomo marcado não seja o sítio de metabolismo da enzima apropriada. Os átomos do composto são arranjados de acordo com os valores decrescentes de deltaP para cada isoforma do CYP, valores positivos indicam uma probabilidade maior para aquele sítio, já valores negativos indicam uma baixa probabilidade.

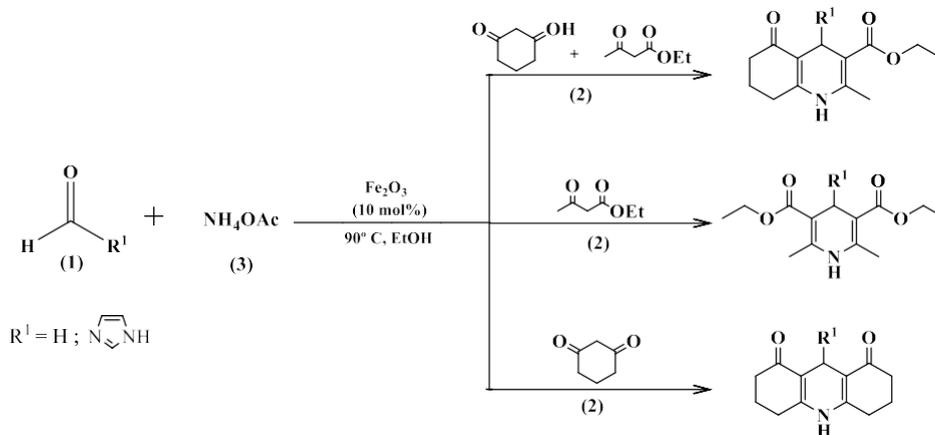
4.3.2 PARTE II

4.3.2.1 Síntese dos derivados do núcleo dihidropiridínico

A condições reacionais para síntese dos compostos DHPs (Esquema 3) foi desenvolvida durante o trabalho de conclusão de curso em 2020 (Bolzoni, I, 2020), juntamente com os projetos anteriores realizados pelo grupo LACFI, coordenado pelo professor Dr. Ricardo Affeldt. Essa síntese trata-se de uma reação multicomponente de Hantzsch, utilizando a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) como catalisador, devido a sua propriedade superparamagnética, o que

proporciona um método simples de separação do meio reacional, sendo então possível seu reuso.

Esquema 3. Metodologia Sintética dos derivados do núcleo dihidropiridínico.

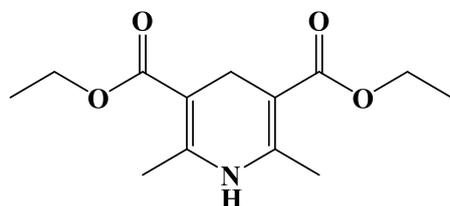


FONTE: AUTORAL (2023).

4.3.2.2 Metodologia geral para síntese das 1,4-dihidropiridinas

Para obtenção dos compostos partiu-se de 1,0 equivalente de aldeído (1mol) **(1)**, 2,0 equivalentes de 1,3- dicarbonílico (2mol) **(2)**, 10mol% de Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) na presença de 1mL de etanol P.A. Em seguida, o balão com a reação foi protegido da luz com papel alumínio e colocada sob refluxo, em banho de óleo à 90°C com agitação magnética. Após alguns minutos foi adicionado um excesso de acetato de amônia (4mol) **(3)** e a mistura reacional foi deixada por 1 hora. Ao término, o catalisador magnético é facilmente separado do meio reacional, através da aproximação de um ímã de neodímio. Ao atingir a temperatura ambiente, os compostos **HEH** e **PHQ** foram isolados por precipitação em água deionizada gelada. Vale salientar que no caso do **HEH** já ocorre a formação de um precipitado amarelo assim que se cessa a reação. Enquanto o composto **ACD** é isolado por precipitação em acetato de etila gelado. Já as estruturas com a inserção do imidazol (**ImPHQ** e **ImACD**), após estarem em temperatura ambiente, são precipitados com acetato de etila e recristalizados com etanol à quente, gerando um sólido branco. Destaca-se que é comum ocorrer uma mudança de coloração durante a reação, inicialmente a mistura reacional pode apresentar coloração avermelhada isto se deve ao fato de possivelmente o ferro presente na maghemita se coordenar aos nitrogênios do imidazol.

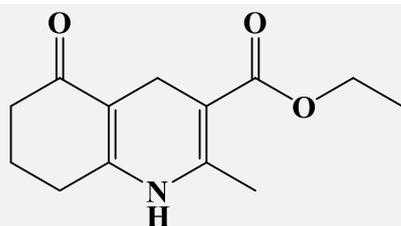
4.3.2.3 Caracterização espectroscópica das 1,4-dihidropiridinas

Tabela 1. Caracterização dos derivados do núcleo dihidropiridínico.**HEH**MM = 253,30g mol⁻¹

RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃): δ = 5,22 (s, 1H); 4,19 (qua, J = 7 Hz, 4H); 3,27 (s, 2H); 2,19 (s, 6H); 1,29 (t, J = 7 Hz, 6H) ppm.

RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃): δ = 168; 144,73; 99,51; 59,60; 24,76; 19,10; 14,42ppm.

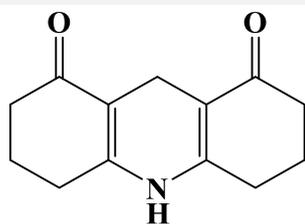
Rendimento: 67%

**PHQ**MM= 235,28 g mol⁻¹

RMN de ¹H (200MHz, DMSO): δ= 9,1 (s,1H); 4,27 (q, 2H, J=7Hz); 2,96-2,31 (m, 9H) 1,99 (m, 2H); 1.18 (3H, t, J = 7.1 Hz).

RMN de ¹³C (50MHz, DMSO): δ = 196,3; 168,59; 152,27; 146,1; 127,5; 87,67; 61,57; 37,96; 31,95; 26,52; 18,61; 14,64.

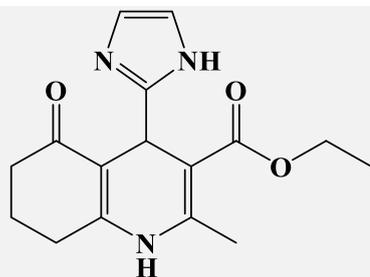
Rendimento: 66%

**ACD**MM= 217,27g mol⁻¹

RMN de ¹H (200MHz, DMSO-d₆): δ = 9,00 (s, 1H); 2,81 (s, 2H); 2,35-2,21 (m, 8H); 1,86 (q, 4H, J=5Hz).

RMN de ¹³C (100MHz, DMSO-d₆): δ = 194,86; 152,10; 108,16; 35,72; 25,59; 20,28; 18,10.

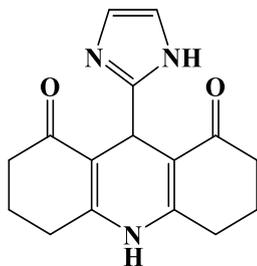
Rendimento: 65%

**ImPHQ**MM = 301,35g mol⁻¹

RMN de ¹H (200MHz, DMSO): δ = 9,4 (s, 1H); 6,71 (s, 2H); 4,98 (s, 1H); 4,0 (q, 2H, J=7Hz); 3,35-2,44 (m, 7H) 1,86 (m, 2H); 1.10 (3H, t, J = 7.1 Hz)

RMN de ¹³C (50MHz, DMSO): δ = 195,29; 167,27; 152,35; 145,57; 108,95; 101,6; 59,37; 36,96; 30,95; 26,52; 18,61; 14,64.

Rendimento: 53%

**ImACD**MM = 283,33g mol⁻¹

RMN de ¹H (200MHz, DMSO): δ = 7,97 (s, 12H)
7,22 (s, 2H); 4,94 (s, 1H); 2,49-1,74 (m, 15H).

RMN de ¹³C (50MHz, DMSO): δ = 196,78;
154,86; 149,93; 118,74; 107,19; 36,49; 29,05;
27,01; 21,08.

Rendimento: 57%

Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C estão na Anexo B.

4.3.2.3 Determinação do pK_a das estruturas por titulação potenciométrica

Os valores de pK_a para os equilíbrios de desprotonação do núcleo dihidropiridínico não substituído e substituído, imidazol na posição 4, foram determinados por método de titulação potenciométrica ácido-base. O procedimento consiste basicamente na medição do pH ao decorrer de uma reação de neutralização em meio aquoso. O sistema de titulação utilizado foi o Schoott Titronic Universal M2/50 juntamente com o auxílio de um pHmetro, previamente calibrado, da marca HANNA Instruments contendo um eletrodo de vidro combinado com referência de Ag/AgCl, a faixa trabalhada foi de pH 1,0 - 14,0.

No copo titulante foi preparado uma solução de 0,005 mol/L de substrato em 20mL de água deionizada (faixa entre o limite de detecção e o gasto excessivo de titulante). Uma pequena quantidade de ácido clorídrico (4M) foi adicionada para obter uma curva de titulação com uma larga faixa de pH, iniciando com os sítios básicos protonados. Sob agitação magnética constante e método de adições com intervalos variando de 0,15mL/min – 0,5mL/min de alíquotas de titulante de hidróxido de potássio previamente padronizado (0,087M), a cada adição foi lido o pH da solução. Após as leituras, os dados foram tratados através do software Origin Pro 8 (Origin Lab), e a determinação da constante de acidez do analito foi realizada pelo método das derivadas, ou seja, o pK_a se encontra no ponto onde a derivada de primeira ordem da curva de titulação (pH *versus* volume de base adicionada) é máxima, ou onde a derivada segunda é igual a zero. Juntamente com o programa CurTiPOT (versão 43.0/Janeiro 2018) obteve-se os valores. Destaca-se que as titulações foram realizadas em duplicata.

4.3.2.4 Estudo fotofísico dos derivados do núcleo dihidropiridínico

Para os compostos sintetizados, um estudo de solvatocromismo, com soluções estoques de 10^{-3} mol L⁻¹ com solventes de diferentes constantes dielétricas: DMSO (46,7), etanol (24,3), diclorometano (9,1) e 1,4-dioxano foi realizado. Inicialmente foram avaliados a absorção de UV -Vis e a emissão de fluorescência dos compostos. O procedimento geral se deu por meio da determinação da curva de calibração e do coeficiente de absorção (ϵ), através da equação de Lambert- Beer, para cada composto nos diferentes solventes. A absorção dos compostos se encontra na faixa entre 350 e 380 nm, onde duas bandas são observadas. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos entre 410 e 460 nm. Por meio da diferença do comprimento de onda máximo de emissão e do comprimento máximo de absorção foi possível calcular o deslocamento de Stoke, como descrito na revisão bibliográfica. Por fim, ainda foi determinado o rendimento quântico dos compostos em diferentes solventes.

4.3.3 PARTE III

4.3.3.1 *Estudo espectroscópico: Modo de Interação de Derivados do Núcleo Dihidropiridínico e ct-DNA (Calf-Thymus)*

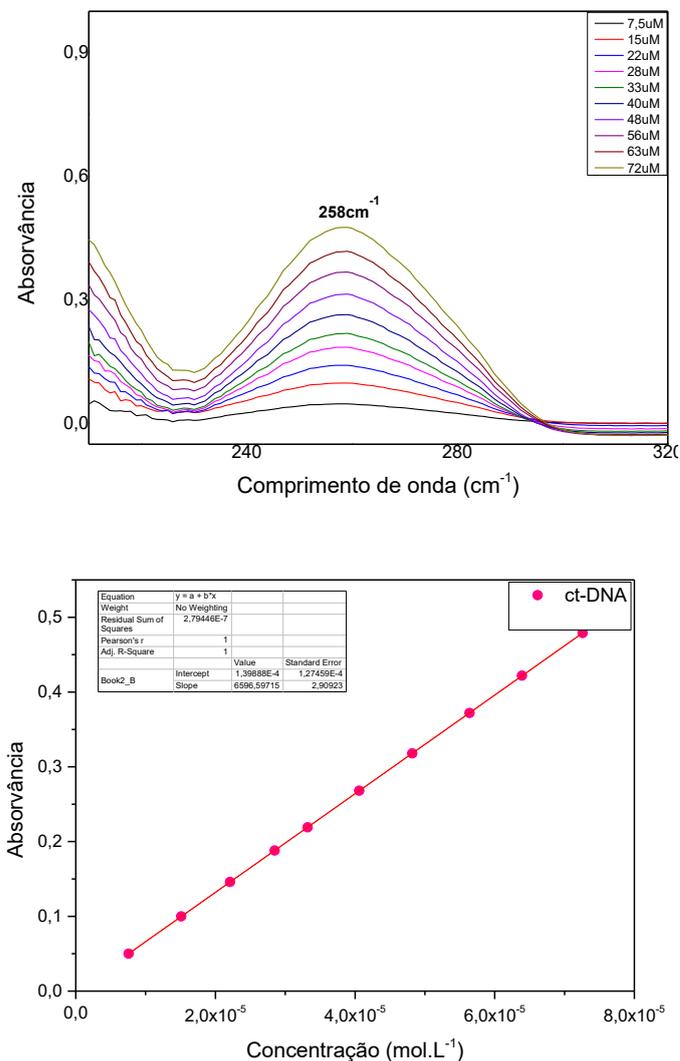
As soluções estoques dos compostos derivados do núcleo dihidropiridínicos, sintetizados como já descrito, foram preparadas pesando cerca de 1mg e solubilizado em DMSO, contudo destaca-se que alguns compostos não apresentam boa solubilidade, por isso para os compostos realizou-se uma mistura de solventes que será descrito posteriormente. Todas as diluições posteriormente foram realizadas com o tampão Tris (50mM, pH 7,47; 100mM NaCl) e as soluções armazenadas sob proteção da luz.

4.3.3.2 *Determinação da concentração do ctDNA (Calf Thymus)*

O ctDNA de 1mg empregado na forma de sal (Sigma Aldreich) foi diluído em 2mL de uma solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl (100mM) para anular a força iônica. A solução estoque foi armazenada em frasco âmbar, sob proteção de luz e sob refrigeração. Antes de realizar os ensaios com os compostos a solução de ctDNA é deixada em temperatura ambiente e mantida em banho de ultrassom por alguns instantes para promover melhor homogeneidade. (SAVARIZ, et al., 2014). Enfatiza-se que Calf Thymus – DNA é escolhido nos estudos de interação devido a similaridade com o DNA de placenta humana, tendo grande proporções das suas bases em relação as bases da placenta humana (AT 58%, CG 41,9%; AT 58% ; CG 42%) (MARMUR, J., 1962).

Após o preparo da solução estoque de ct-DNA, sua concentração foi determinada com base no coeficiente de extinção de $6600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a partir do máximo de absorção em 260 nm. Inicialmente uma alíquota de 5 uL de solução de ctDNA foi diluída em 1000 uL de tampão TRIS, e medidas de absorção foram lidas a cada adição sucessiva de 5uL ctDNA na solução inicial. Ressalta-se que a solução de ctDNA estava livre de proteínas, isto pois não houve sinal de absorção significativa em 280 nm, logo a razão do sinal de absorvância a 260 e 280 nm ficou inferior o limite de 1,8-1,9 (REICHAMANN, et al., 1954).

Figura 24. Espectro de absorção do ct-DNA livre e sua respectiva curva de calibração ($[\text{ct-DNA}] = 1,52 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em 50mM Tampão Tris, pH = 7,47, 100mM NaCl, $\epsilon = 6596,59 \text{ L.mol}^{-1}$).



4.3.3.2 Interação ctDNA-ligante por UV-Vis

Para os compostos avaliados, as complexações com ctDNA por UV-Vis foram realizadas em tampão Tris 50mM/ 100mM NaCl, pH – 7,47, em temperatura ambiente. A concentração dos ligantes avaliados foi mantida constante em 25 uM e a concentração de DNA foi variada de 0 – 100uM, gerando um meio insaturado, saturado e supersaturado de ctDNA. Cada leitura foi realizada após um tempo médio de 120 minutos, isto pois percebeu-se uma oscilação na absorção entre o momento instantâneo adição de ct-DNA na cubeta até cerca de 2h, após ser realizado leituras a cada 5 minutos durante 12 h de incubação. Dessa maneira, após completa incubação, foi realizado as medidas de absorção de cada ligante, em uma faixa entre 360nm e 380nm, banda característica da transição π - π^* . Os espectros obtidos foram tratados através do software OriginPro 8.

4.3.3.3 Interação ctDNA-ligante por Fluorescência

Para os compostos avaliados, as titulações espectrofluorimétricas foram executadas da mesma maneira descritas anteriormente, ou seja, mantendo constante o ligante e variando a quantidade de ctDNA de maneira crescente. Para cada composto utilizou-se um *slit* diferente na hora da leitura, visto que alguns compostos apresentam fluorescência mais elevada. Além das medidas de fluorescência, realizou-se um ensaio de competição a fim de inferir sobre o modo de ligação DNA-ligante. O brometo de etídio foi o padrão utilizado neste estudo, visto que ele possui modo de ligação por intercalação bem definido na literatura, e na presença do DNA apresenta fluorescência molecular considerável. Neste estudo, manteve-se constante a concentração de 2 μ M de brometo de etídio e 6 μ M de ctDNA e adicionaram-se quantidades crescentes dos compostos selecionados.

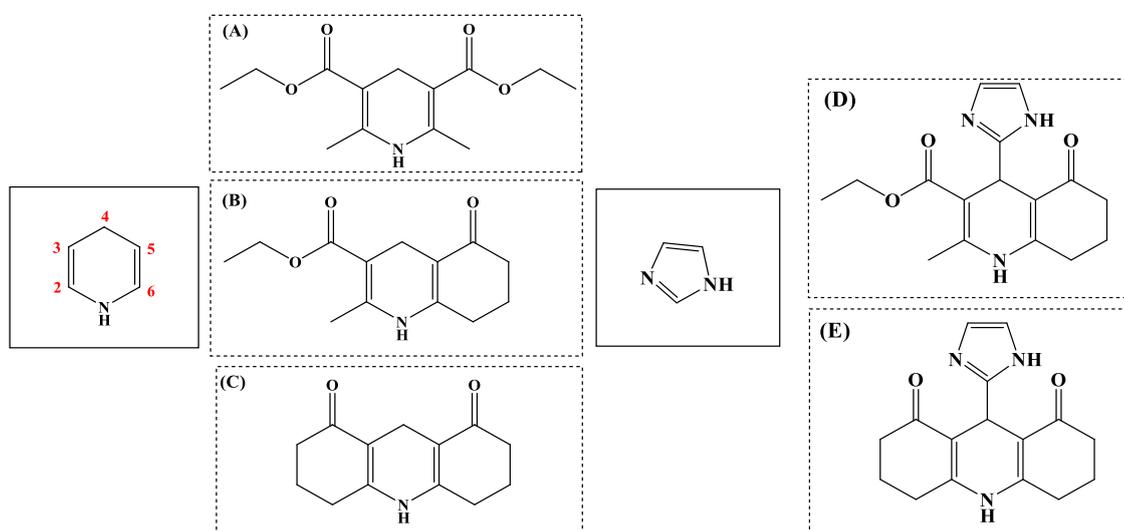
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I. Estudo *in silico* de Derivados do Núcleo Dihidropiridínico

5.1.1 Avaliação *in silico* de propriedades de físico-química, absorção e distribuição

Os **Compostos I** avaliados *in silico* (Esquema 4) serão apresentados na forma de discussão de resultados. O núcleo básico dessas estruturas, dihidropiridínico, foi estendido por cadeias laterais cíclicas na posição 2 e 3 / 5 e 6 e no carbono benzílico (posição 4) por um grupo imidazol.

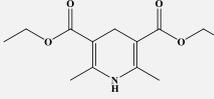
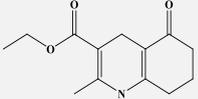
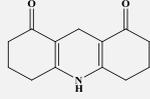
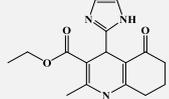
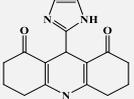
Esquema 4. Estrutura dos **Compostos I** avaliados.



FONTE AUTORAL (2023).

A técnica *in silico* tem ocupado papel de destaque entre as estratégias modernas exploradas na identificação de novos candidatos a fármacos nos estágios iniciais de planejamento. Nesse contexto, o estudo *in silico* para previsão de propriedades ADMET promove rapidez na execução e redução de custo. No estudo foi utilizado o software “SwissADME” para prever os parâmetros farmacocinéticos a partir das estruturas moleculares. O próprio servidor consta com ChemAxon, no qual é possível obter a estrutura 2D e o seu respectivo SMILE, a molécula é lida e a partir dos cálculos teóricos é fornecido informações de propriedades relacionadas como solubilidade e biodisponibilidade.

Tabela 2. Dados dos **Compostos I** obtidos no SwissADME.

	A	B	C	D	E
					
MM (Da)	249,35	235,28	217,26	301,34	283,33
TPSA (Å ²)	30,49	55,40	46,17	84,08	74,85
CLogP	1,85	1,74	1,63	1,42	1,28
HBD	1	1	1	2	2
HBA	2	3	2	4	3
N°Rotb	6	3	0	4	1
N° Viol.	-	-	-	-	-

(MM: peso molecular; TPSA: área topológica de superfície polar; LogP: lipofilicidade; HBD: (do inglês, hydrogen bond donor) átomos doadores de ligação de hidrogênio); HBA: (do inglês, hydrogen bond acceptor) átomos aceptores de ligação de hidrogênio); N°Rotb: número de ligações rotativas; N°Viol.: número de violações).

FONTE: AUTORAL (2022).

As propriedades moleculares como lipofilicidade, solubilidade, permeabilidade e peso molecular são importantes características estruturais que influenciam na biodisponibilidade de um candidato a fármaco. A alta biodisponibilidade oral é desejável para o desenvolvimento de moléculas bioativas como agentes terapêuticos, e é comumente analisada por várias regras propostas, mas destaca-se a Regra dos cinco ou RO5 (*Rule of five*, em inglês) proposta por Lipinski e colaboradores. Essa regra tem como características os seguintes parâmetros para os compostos: não ter um peso molecular maior de 500Da, visto que moléculas maiores tendem a uma baixa absorção intestinal. A lipofilicidade é avaliada pelo logP que se refere ao coeficiente de partição de uma substância entre uma fase orgânica (octano) e o uma fase aquosa (água), amplamente utilizado para estimar como um fármaco pode ser transferido entre diferentes meios biológicos. Aqueles que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, maior afinidade pela fase orgânica, são melhores absorvidos, no entanto um incremento na lipossolubilidade pode reduzir a absorção, pois dificulta as etapas anteriores de dissolução e solubilização do fármaco na fase aquosa. O perfil geral de lipofilicidade é expresso por um modelo parabólico bilinear na faixa de 1 a 5.

Parâmetros como número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (HBD, sigla em inglês) e número de átomos receptores de ligação de hidrogênio (HBA, sigla em inglês) também estão entre as regras seguidas por Lipinski. Recentemente descobriu-se que as ligações de hidrogênio desempenham um papel importante na permeação na membrana celular do trato gastrointestinal, visto que um número excessivo de grupos doadores de ligação de hidrogênio prejudica a permeabilidade através das membranas biológicas (BHATI, et. al 2019). Além de terem influência sobre a afinidade de ligação entre ligante e seu alvo. O limite de HBD é de 5, enquanto de HBA é de 10. Em adição aos parâmetros propostos por Lipinski, outras duas propriedades relacionadas a biodisponibilidade foram adicionadas por Veber e colaboradores. A flexibilidade molecular, através do número de ligações rotacionáveis está relacionada com a biodisponibilidade oral, ou seja, ligações rotacionáveis resulta em conformações distintas. Logo para os pesquisadores um menor número de ligações rotacionáveis (menor que 10) garante maior estabilidade da molécula e permite sua passagem através das membranas celulares. Além de estarem relacionado à afinidade do alvo molecular, diferentes conformações podem promover ligação com distintos alvos biológicos.

A área topológica de superfície polar (TPSA) área superficial ocupada por átomos de nitrogênio e oxigênio ligados ou não a hidrogênios, associadas diretamente à polaridade. Esse parâmetro, que deve ter valores abaixo de 120\AA^2 , está relacionada com absorção intestinal e penetração na barreira hematoencefálica, visto que envolve a interação da molécula com a superfície polar de membranas celular e migração na porção lipídica. Analisando os dados obtidos na Tabela 2, nota-se que todos os compostos apresentam boa biodisponibilidade no organismo, pois se enquadram em todos os parâmetros propostos por Lipinski e Veber descritos anteriormente, ou seja, não há violação das regras.

A primeira etapa do processo de absorção do fármaco é a sua desintegração do comprimido ou da cápsula, seguido da dissolução do fármaco ativo, logo a baixa solubilidade é prejudicial para uma boa e completa absorção oral, isto torna a solubilidade uma propriedade físico-química de muita importância. O perfil de solubilidade em meio aquoso é dado por LogS, o software SwissADME fornece o dado através da metodologia ESOL (Estimated SOLubility). O modelo utiliza regressão linear contra nove propriedades moleculares, os descritores mais significativos utilizados são LogP, peso molecular, proporção de átomos pesados em sistemas aromáticos e número de ligações rotativas. Os valores analisados pelo software são representados na Tabela 3 abaixo, variando de -2,23 a -1,74 ($\log S \leq -5$) todos apresentam uma boa solubilidade, sendo solúveis em meio biológico, destaque para o **Composto C**.

Tabela 3. Dados de solubilidade (LogS) dos Compostos I obtidos no software SwissADME.

	A	B	C	D	E
LogS	-2,80 (S)	-1,95 (+S)	-1,74 (+S)	-2,23(S)	-2,02 (S)

FONTE: AUTORAL (2022).

Outros parâmetros de absorção e distribuição importantes são analisados também pelos softwares ADMETLab, entre eles absorção intestinal humana (*Human intestinal absorption*, HIA, do inglês), inibidor da glicoproteína-P, absorção por células Caco-2, permeabilidade pela barreira hematoencefálica (*Blood-brain barrie*, BBB, do inglês) e ligação a proteínas plasmáticas (*Plasma protein binding*, PPB, do inglês). Os valores encontrados para cada composto são apresentados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Dados de % de absorção intestinal humana (HIA), ação de inibição da Pgp, absorção por células Caco-2, % permeabilidade na barreira hematoencefálica (BBB) e % de ligação a proteínas plasmáticas (PPB).

	A	B	C	D	E
HIA (%)	+ 62,7	+ 72	+ 85	+ 64,8	+ 77
Pgp-Inibidor	SIM (56%)	SIM (67,3%)	NÃO	NÃO	NÃO
Caco-2*(nm/s)	-4,496	-4,518	-4,298	-4,785	-4,634
BBB (%)	+++ 90,8	+++ 90,6	+++ 99,1	+ 69,5	+++ 97,7
PPB (%)	48,00	60,36	56,93	71,67	67,91

FONTE: AUTORAL (2022).

O fármaco entra no sistema circulatório humano a partir de sua administração, principalmente oral. A absorção mais importante é no intestinal, consequentemente a absorção intestinal humana de um candidato é pré-requisito essencial para sua aparente eficácia. Os valores para esse estudo *in silico* foram expressos na forma de percentagem da dose de princípio ativo administrado por via oral que alcança a veia porta. Os resultados mostram que todos os compostos apresentam HIA % superior a 60%, sendo rotulados como positivos, ou seja,

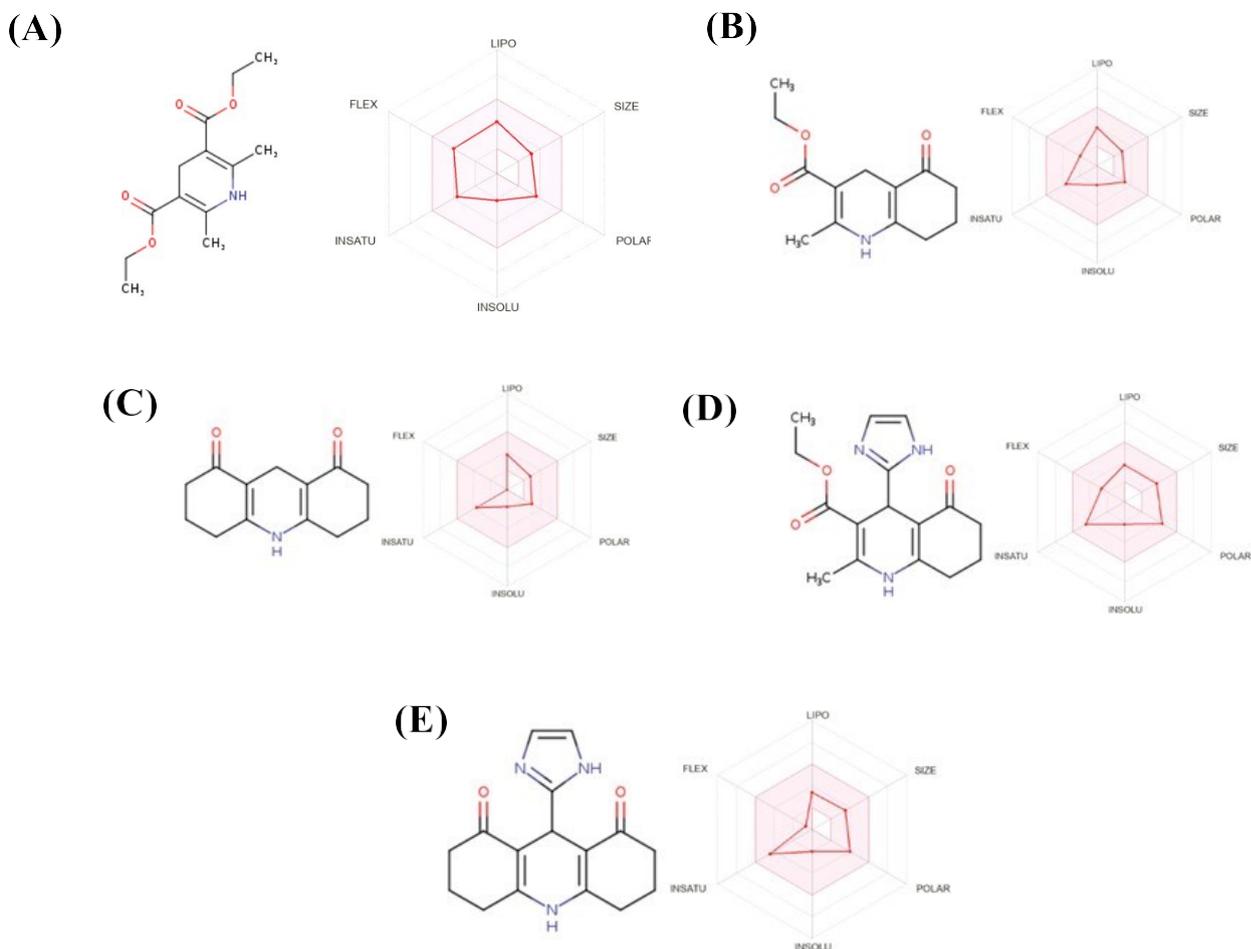
apresentam uma absorção intestinal relevante. Pode-se relacionar o valor de HIA % com o valor de TPSA, o **Composto C** apresenta maior absorção intestinal comparado aos outros, da mesma forma possui o menor TPSA (46,17Å²). Os parâmetros se correlacionam uma vez que o composto apresenta um balanço hidrofílico-lipofílico que se ajusta as características de solubilidade e lipofilicidade discutidos anteriormente.

As propriedades ADMET também são influenciadas por proteínas transportadoras, entre elas a glicoproteína-P (Pgp). Uma proteína transmembrana que atua como uma bomba de efluxo das células, transportando toxinas que ocorrem naturalmente ou xenobióticos para fora das células, reduzindo assim sua concentração intracelular. A glicoproteína-P é expressa em tecidos com funções excretórias como rins, fígado e intestino, além de exercer função na barreira hematoencefálica. O efluxo promovido pela Pgp torna relevante no índice farmacocinético de um fármaco. Como observado na Tabela 4, apenas os **Compostos A e B** mostraram potencial inibidor da Pgp, ou seja, podem levar a melhores índices de absorção e distribuição, uma vez que há baixa probabilidade de efluxo, aumentando a concentração intracelular dos substratos.

As linhas celulares de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2 têm sido comumente usadas para estimar a permeabilidade de fármacos *in vivo* devido à sua semelhança morfológica e funcional. Dessa forma, a permeabilidade celular de Caco-2 também é um parâmetro de absorção importante para um candidato elegível. Os dados ADMELab otimiza como permeabilidade ideal valores superiores de -5,40, dessa forma, como observado na tabela todas as moléculas analisadas pelo banco de dados do software apresentam permeabilidade ideal, com valores entre -4,634 e -4,298.

A plataforma SwissADME ainda apresenta o gráfico Radar de Biodisponibilidade (do inglês, *Bioavailability Radar*) para cada estrutura simulada no software, o qual faz uma avaliação de drug-likeness. Esse radar leva em consideração seis propriedades físico-químicas, como lipofilicidade, tamanho da molécula, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. Cada eixo do hexágono é representado por uma propriedade descrita anteriormente e a área rosa do hexágono representa o intervalo ideal para biodisponibilidade oral. Na figura abaixo é possível perceber que todos os compostos caem integralmente na região rosada, apresentando um perfil parecidos entre si, apenas o composto **C** e **E** diferem na questão flexibilidade, **C** por não apresentar ligação racionável e **E** por ter apenas uma rotação no carbono benzílico. Logo prevê-se que os compostos derivados do núcleo dihidropiridinico nesse estudo sejam biodisponíveis por via oral.

Figura 25. Radar de Biodisponibilidade disponibilizado pelo SwissADME para os **Compostos A-E.**



² Lipofilicidade: XLOGP3 entre -0,7 e +5,0; Tamanho: PM entre 150 e 500g/mol; Polaridade: TPSA entre 20 e 130Å Solubilidade: LogS não maior que 6; Saturação: fração de carbono sp³ não menor que 0,25; Flexibilidade: não maior que 9 ligações rotáveis.

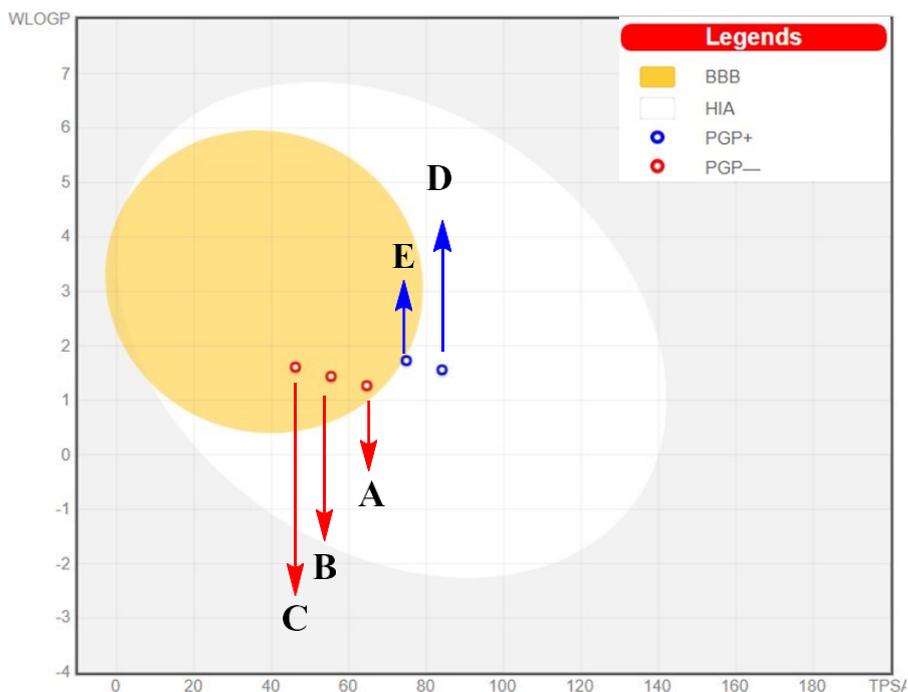
FONTE: AUTORAL (2022), plataforma SwissADME.

Como visto anteriormente, a absorção gastrointestinal é um dos indicadores farmacocinéticos importantes para os estágios iniciais do processo de descoberta de medicamentos. Além dele, a barreira hematoencefálica (BBB) é outro parâmetro de influência, sendo capacidade ou incapacidade de transpor esta membrana. Fármacos que atravessam a BBB têm como alvo os receptores do cérebro, isto é, antiepilépticos, antidepressivos e antipsicóticos, já para fármacos que o sistema nervoso central não é alvo, transpor a BBB é indesejado, podendo neste caso pode levar a efeitos colaterais.

Para isto, a plataforma SwissADME consta com o método *Brain or Intestinal Estimated Permeation Method* (BOILED-Egg) que permite uma avaliação intuitiva da absorção

gastrointestinal passiva (HIA) e penetração na barreira hematoencefálica (BBB) em função das moléculas no WLogP (lipofilicidade) versus TPSA. A região branca (“clara”) representa a alta probabilidade de absorção passiva pelo trato gastrointestinal, onde todos os compostos do estudo estão inseridos. Já a região amarela (“gema”) indica a alta probabilidade de permear a barreira hematoencefálica, neste caso pode-se observar pela figura que o **Composto D** não cruza passivamente a BBB, enquanto o **Composto E** se encontra bem no limite da “gema”. Esses dados fazem correlação, uma vez que **D** e **E** são os que apresentam maior área superficial polar ($84,08 \text{ \AA}^2$ e $74,85 \text{ \AA}^2$, respectivamente) e maior peso molar ($301,34 \text{ Da}$ e $283,33 \text{ Da}$ respectivamente). Além disso, os **Compostos A, B** e **C** estão indicados por pontos vermelhos, previstos como não substratos de Pgp (PGP-), enquanto os **Compostos D** e **E**, em azul, previstos como efluxo ativo por Pgp (PGP+). Moléculas que atuam como substrato da Pgp apresentam maior probabilidade de serem eliminadas do corpo ou de não atingirem concentrações terapêuticas adequadas, reduzindo assim sua eficácia como medicamento. Destaca-se resistência múltipla da glicoproteína-P a fármacos (do inglês, *multidrug resistance*, MDR) responsável por parte dos insucessos de quimioterápicos no tratamento do câncer, logo a identificação de moduladores da P-gp é de relevância para o desenvolvimento de NCEs no tratamento do câncer.

Figura 26. Gráfico BOILED-Egg dos Compostos A-E.



FONTE: Adaptada do software SwissADME (2022).

Um fármaco após ser absorvido, alcança a via sistêmica e muitas vezes encontra proteínas plasmáticas (como albumina e globulinas) às quais pode se ligar. A ligação a proteínas reduz a concentração livre do medicamento no plasma sanguíneo, diminuindo a sua atividade farmacológica, uma vez que apenas a fração livre é que se torna disponível para distribuição para os tecidos alvos e metabolização. No entanto, a formação de complexos proteicos pode prolongar a meia-vida do fármaco, influenciando na duração de sua ação. Dessa maneira, a ligação às proteínas plasmáticas (do inglês, *plasma protein binding*, PPB) é uma propriedade farmacocinética e farmacodinâmica fundamental para um candidato a fármaco. Analisando os resultados dispostos na Tabela, é possível identificar que os compostos estão numa faixa de 48% - 72% (o complexo fármaco-proteína pode variar de 1% a 99,9% dependendo da força da ligação), isso significa que apenas o **Composto A** apresenta maior quantidade na forma livre e desvinculada dessas proteínas, logo maior disponibilidade, podendo ser mais potente em termo de atividade biológica. Já os **Compostos B, C, D e E** que apresentam maior afinidade pelas proteínas plasmáticas, tendo de ter menor disponibilidade para interagir com seus alvos. Portanto, o, a PPB pode influenciar diretamente a biodisponibilidade oral de um fármaco, além de ser um parâmetro importante para determinar a dosagem adequada do medicamento.

5.1.2 Avaliação *in silico* do metabolismo e toxicidade

O metabolismo ou biotransformação é um processo químico através do qual o organismo altera os xenobióticos, preparando para a eliminação. Os fármacos podem sofrer depuração por via hepática, hepatobiliar ou renal. Geralmente estruturas lipofílicas sofrem processos enzimáticos, gerando metabólitos de fase 1 e 2, mais hidrofílicos, para não serem reabsorvidos e voltam para circulação sistêmica. O processo enzimático da primeira fase engloba reações catalisadas pelas isoformas do citocromo P450 (CYP450) que levam a metabólitos mais polares.

Neste sentido, a segunda parte do estudo *in silico* prevê quais isoformas do citocromo P450 podem ser inibidas pelos compostos em estudo, e quais são os sítios das estruturas que são mais propensas a sofrer a ação do metabolismo (SOM's, do inglês, *sites of metabolism*). Os programas SwissADME e Way2drug foram utilizados para essa parte da triagem. Os cálculos foram realizados para as cinco principais isoformas (CYP1A2; CYP2C9; CYP2C19; CYP2D6 e CYP3A4) que correspondem a maior parte do metabolismo oxidativo do organismo, sendo as

principais CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 responsáveis por cerca de 70% do metabolismo dos fármacos (LEPPERT, 2011).

Tabela 5. Predição de inibição do citocromo P450 dos **Compostos I** – SwissADME.

ISOFORMAS DO CITOCROMO P450					
	Inibidor CYP 1A2	Inibidor CYP 2C19	Inibidor CYP 2C9	Inibidor CYP 2D6	Inibidor CYP 3A4
Composto A	sim	não	não	não	não
Composto B	sim	não	não	não	não
Composto C	sim	não	não	não	não
Composto D	sim	sim	não	não	não
Composto E	sim	sim	não	não	não

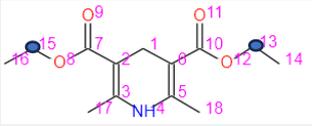
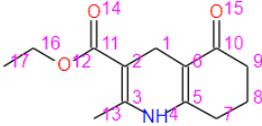
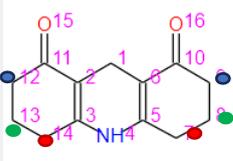
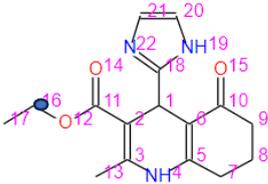
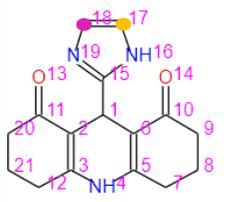
FONTE: AUTORAL (2022).

Ao observar a predição realizada pelo SwissADME observou-se que todos os compostos apresentam como possíveis inibidores da CYP1A2, uma das enzimas hepáticas mais importantes da superfamília do citocromo P450, respondendo a 13% a 15% das enzimas CYP hepáticas. Responsável por metabolizar muito medicamentos clínicos, como fenacetina, propranolol, mexiletina, até mesmo a cafeína (GUO et. al, 2021). Os **Compostos D e E** mostraram probabilidade de atuarem como inibidores também do CYP2C19, contribui em 16% das enzimas hepáticas e é a principal envolvida no metabolismo de medicamentos antimalária, anticoagulante, agentes quimioterapêuticos, anti-epilépticos, inibidores dos canais de próton entre outros (PETROVC et. al, 2020). Fármacos que inibem a atividade de alguma isoforma dos CYP450 provavelmente provocam um aumento da concentração plasmática do medicamento, em alguns casos pode levar a efeitos indesejados.

As transformações enzimaticamente promovidas na estrutura química dos fármacos podem acarretar alterações na resposta biológica, uma vez que as modificações moleculares podem alterar o farmacóforo, promovendo novas interações com outras macromoléculas, gerando distintos efeitos biológicos. Nesse âmbito a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que os estudos do metabolismo do fármaco sejam parte obrigatória nas avaliações pré-clínicas e clínicas de novos medicamentos. A predição dos sítios de metabolismo (SOMs) dos compostos metabolizados pela isoenzima P450 tem a finalidade de modificar a estrutura química para evitar ou minimizar reações metabólicas indesejada, aumentando o seu tempo de meia-vida e otimizando sua biodisponibilidade, além de reduzir a metabolização indesejada no organismo, comprometendo sua eficácia clínica.

A ferramenta Way2Drug, como descrita na metodologia, faz a previsão de SOM's para compostos com base nos resultados de previsão de todos os átomos marcados na estrutura. Com os descritores apropriados é gerado predições de locais de metabolismo. Para discussão dos dados foram considerados apenas os valores de deltaP (Pt-Pf) positivos, maiores que 0,5.

Tabela 6. Predição de probabilidade e sítios de interações com as isoformas CYP450.

	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	
A	0,649	0,605	0,658	0,700	0,681	
B	0,839	0,701	0,764	0,787	0,781	
C	0,535	-	-	0,651	0,540	
D	0,726	0,633	0,664	0,741	0,684	
E	-	-	-	0,690	0,644	

Dados retirados da plataforma Way2Drug.

FONTE: AUTORAL (2022).

A plataforma Way2Drug apresenta os possíveis sítios de metabolismo de compostos para cinco principais citocromos P450 de humanos: CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Cada isoforma do citocromo possui uma especificidade para certos substratos, mas de forma geral todas elas estão envolvidas em reações de hidroxilação e desalquilação. A simulação demonstrou que todos os compostos apresentam probabilidade de sofrer metabolização

oxidativa frente a isoforma CYP3A4 (mais abundante no fígado humano), diferindo apenas a posição do sítio do **Composto C** e do **Composto E** frente aos demais. O mesmo acontece com a enzima CYP2D6, apenas a posição dos sítios dos **Compostos C** e **E** diferem dos outros. Essas isoformas e as outras apresentadas na Tabela estão envolvidas em reações de hidroxilação α -heteroátomo, no qual substratos com heteroátomos (N, O ou S) sofrem adição de um grupo hidroxila em posição ao carbono α a eles. Essas oxidações ocorrem nos carbonos CH₂ do grupo éster da cadeia lateral do núcleo, nos carbonos α da cetona e nas amins do núcleo imidazólico. Alguns medicamentos que sofrem desse tipo de reação é o omeprazol e o diazepam, no carbono α do heteroátomo de enxofre e nitrogênio, respectivamente. Outra reação de biotransformação que se torna provável de ocorrer é a desalquilação (remoção de grupos alquilas), por meio do rearranjo intramolecular, uma vez que há a hidroxilação dos carbonos α -heteroátomos, ocorre a formação de acetais ($^1\text{RO-C-OR}^2$), no caso de heteroátomos de éter, ou aminoacetais ($\text{R}^1\text{NH-C-OR}^2$), no caso de heteroátomos de amins secundárias e terciárias (BARREIRO, 2015). Além disso, destaca-se que as cadeias laterais com esteres podem sofrer reações de hidrólise.

A predição da toxicidade dos compostos foi realizada através do base de dados do ADMETLab. As propriedades analisadas foram Bloqueador de Herg, relacionado ao canal de potássio, importante efeito no sistema cardiovascular; Mutagenicidade, capacidade de um agente causar mutações no material genético; Hepatotoxicidade, toxicidade causado ao fígado, além de sensibilidade da pele, lesão hepática induzida por medicamentos e dose diária máxima recomendada (Dados em ANEXO I). Destaca-se que de acordo com a classificação de toxicidade, baseado nos valores de dose letal (LD₅₀) do ADMETlab, todos os compostos apresentaram baixa toxicidade, isto é, LD₅₀ entre 501 e 5000mg/Kg (Tabela 7).

Tabela 7. Dados de LD₅₀ pelo ADMETLab para os **Compostos A-E**.

LD₅₀ (mg/Kg)

A	1098,074
B	825,260
C	893,297
D	873,103
E	611,356

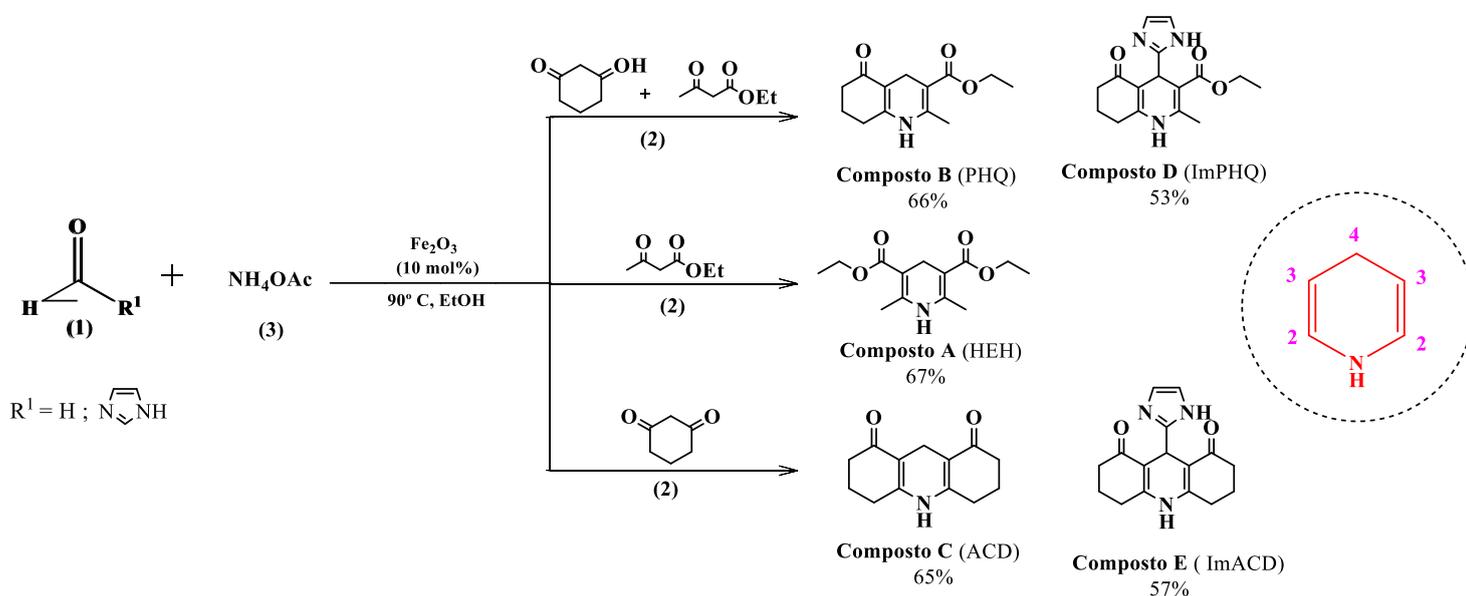
FONTE: AUTORAL 2022.

5.2 PARTE II. Derivados do núcleo Dihidropiridínico

5.2.1 Síntese dos Derivados do Núcleo dihidropiridínico

As estruturas alvo escolhidas (Figura 28) baseadas no *estudo in silico* foram selecionadas para síntese e caracterização, através de uma reação multicomponente de Hantzsch, catalisada por uma nanopartícula superparamagnética, maghemita, como descrito na metodologia. Obteve-se rendimentos moderados entre 50 e 70%, tendo a solubilidade dos compostos de imidazol um fator de influência na questão reacional.

Figura 27. Metodologia e estrutura molecular dos derivados do núcleo dihidropiridínico.



FONTE: AUTORAL (2023).

Modificações estruturais no núcleo 1,4-dihidropiridínico nas posições **2** e **3** acarretam moléculas simétricas e não simétricas. Além disso, a inserção de um grupo substituinte na posição benzílica do anel, posição **4**, reflete na distribuição e deslocamento de sinais no RMN¹H. O éster de Hantzsch (**HEH – Composto A**) apresenta conformação planar e larga simetria estrutural apresentando dois sinais, um em 1,29 ppm (t, $J = 7,0$ Hz, 6H), e em 4,19 ppm (q, $J = 7$ Hz, 4H), referentes ao acoplamento com CH₂ e com o CH₃ do éster, respectivamente. Além disso, é possível verificar um sinal em 5,22 ppm (s, 1H) característico do hidrogênio do heteroátomo de nitrogênio, este sinal indica a não aromaticidade do núcleo dihidropiridínico, um fator importante visto que o núcleo tende a sofrer oxidação facilmente na presença de luz, tornando-se um núcleo piridínico (WECKER, G., 2020).

Ao fundir um dos lados do núcleo, passa-se a ter a estrutura não-simétrica polihidroquinolina (**PHQ – Composto B**), de um lado os sinais de CH₃ e CH₂, tripleto e quarteto respectivamente, do éster se mantém, contudo, apresentam uma diminuição da intensidade devido à perda da simetria. Já a cadeia externa ciclohexanona, justamente por sua conformação cíclica, os hidrogênios acoplam de maneira vicinal com constantes de acoplamento diferentes entre hidrogênio cis e trans com outros hidrogênios do ciclo gerando sinais não muito definidos, multipletos. Destaca-se ainda que o DMSO, solvente utilizado no preparo da amostra apresenta sinal em 2,5 ppm, região característica dos hidrogênios do ciclohexanona, dessa forma todos os sinais na região de 2,5-2,2 ppm apresentam sobreposição, não sendo possível o cálculo das constantes de acoplamento *J*_{cis} e *J*_{trans}. Ao tornar a estruturatríclica (**ACD – Composto C**) os sinais característicos do anel ciclohexanona externo apresentam aumento de intensidade permanecendo no mesmo deslocamento químico (Figura 29).

Ao comparar os espectros de RMN de ¹H dos compostos discutidos anteriormente com o composto que sofreu inserção do grupo imidazol (**Composto D e E**), é observado dois sinais característico da formação do composto. O principal sinal é o singleto em 4,98 ppm (1H, s), hidrogênio benzílico, que prova a extensão da cadeia com o grupo imidazol, além do sinal próprio dos hidrogênios do núcleo imidazol em 6,71 ppm (2H, s). O esperado para o núcleo imidazólico seria dois dubletos, contudo o espectro dos dois compostos (**D e E**) apresentaram apenas um singleto com integral de 2H, possivelmente ocorre a sobreposição dos dois sinais. Quanto aos sinais da cadeia lateral aberta e fechada não há deslocamento tão acentuado na presença do substituinte (Figura 30).

No espectro dos **Compostos C e D** é possível identificar um sinal em 3,3ppm, característico de água presente no meio. Já no espectro do **Composto E** por questão de solubilidade no preparo da amostra foi adicionado gotas de DCl para protonar os sítios básicos e aumentar a solubilidade no meio, contudo isso gerou respostas no espectro, uma vez que hidrogênios lábeis da estrutura podem rapidamente trocar de lugar com o deutério, o que explica o sinal em 7,97 ppm (s, 12H), com alta intensidade devido ao excesso de ácido clorídrico deuterado adicionado.

Figura 28. Espectro de RMN de ^1H do **Composto C (ACD)** em DMSO, 50MHz.

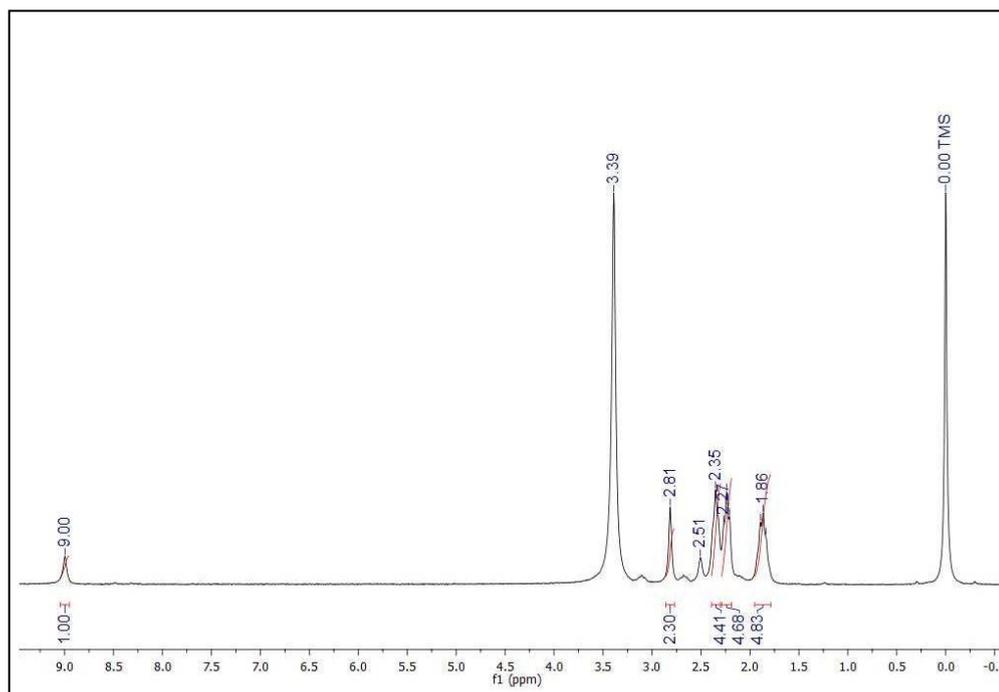
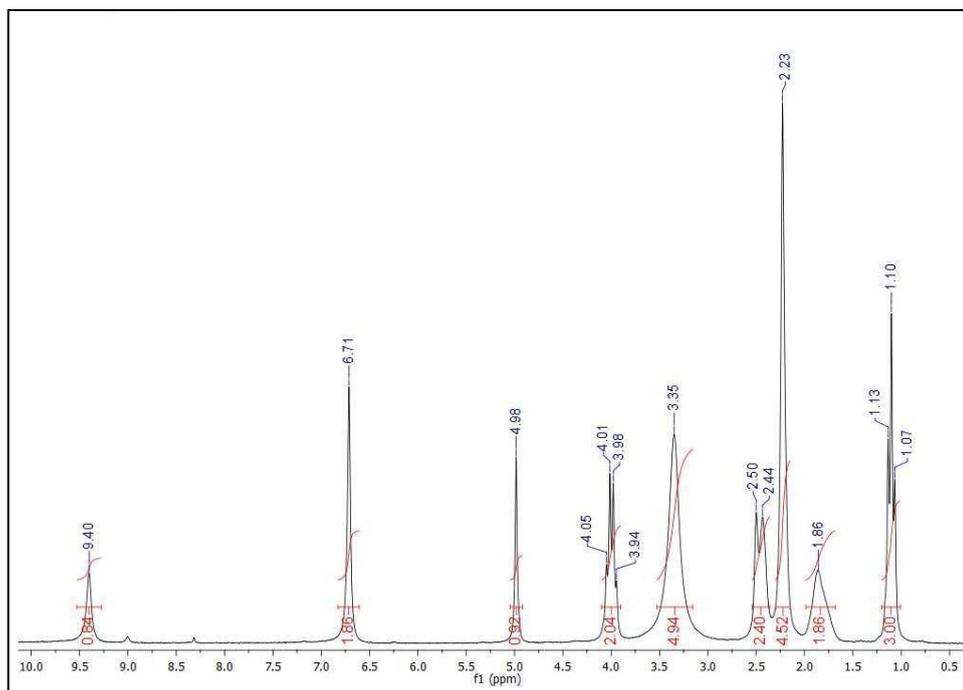


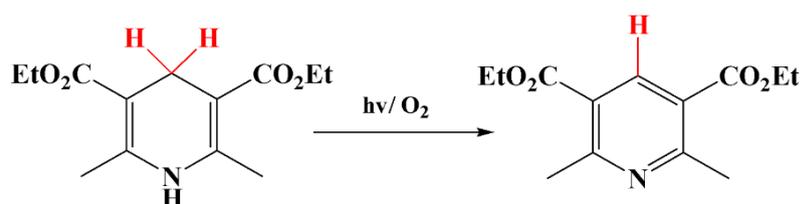
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do **Composto D (ImPHQ)** em DMSO, 50MHz.



Um fator pouco abordado na literatura, mas que é de extrema importância, é a baixa fotoestabilidade do núcleo dihidropiridínico. Embora, a reação redox do núcleo seja bem conhecida, devido sua similaridade com a papel metabólico da NAD, esse processo de oxidação do núcleo base dihidropiridínico para o núcleo piridínico pode ocorrer por meio fotoquímico, uma vez que absorvem fortemente na faixa de radiação Ultravioleta A (UV-A) entre 320 e 400

nm (Esquema 6). Contudo, a fotoreatividade dessas substâncias pode as tornarem biologicamente inativas ou tóxico para o organismo. Dessa forma, a mudança da cadeia lateral, para estruturas mais rígidas, Composto **B** e **C**, tornam os compostos mais estáveis frente a fotooxidação.

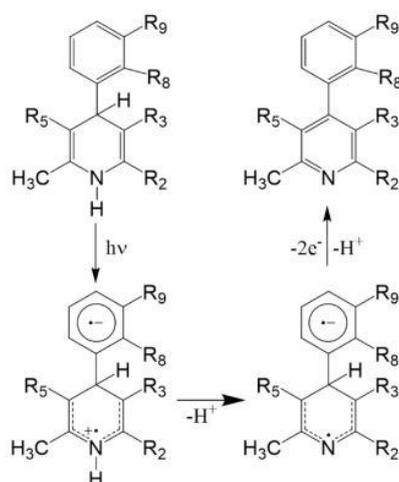
Esquema 5. Fotooxidação do núcleo dihidropiridínico.



FONTE AUTORAL.

O processo químico de fotodegradação de compostos como os medicamentos da classe das dihidropiridias como descrito anteriormente também pode gerar fotoprodutos secundários, dependendo dos grupos funcionais presentes no anel fenil ou piridínico. O mecanismo geralmente inicia com a absorção de energia da luz pelo composto, levando-o a um estado excitado de maior energia. Durante esse processo, ocorre a transferência de um próton, possivelmente proveniente do solvente, para o estado excitado. Ao retornar para o estado de mais baixa energia, o composto pode liberar radicais livres ou fotoprodutos reativos. Esses produtos resultantes da fotooxidação podem apresentar potencial tóxico para as membranas celulares e o DNA. A interação dos fotoprodutos com as estruturas celulares pode causar danos às células e aos tecidos, podendo levar a reações adversas na pele (LUCA et al., 2019). Por esse motivo, tanto a durante a síntese dos compostos, como após purificados eles são mantidos sobre proteção da luz.

Figura 30. Mecanismo de fotodegradação das 1,4-dihidropiridinas (DHPs) proposto por de Luca et al. 2019.



FONTE DE LUCA ET AL., 2019.

Uma estratégia para fotoestabilidade das 1,4-dihidropiridinas é o uso de encapsulamento. O encapsulamento envolve a inserção dessas substâncias em um ambiente confinado, matrizes como polímeros, lipossomas, nanoestruturas ou ainda por formação de complexos de inclusão, no caso da ciclodextrinas (CDx) a 1,4-dihidropiridina fica localizada na cavidade do macrociclo. Esse encapsulamento permite uma proteção contra a degradação fotoquímica, além de oferecer vantagens em termos de solubilidade e liberação controlada do composto (WECKER, G., 2020).

5.2.2 Determinação do pK_a das estruturas por titulação potenciométrica

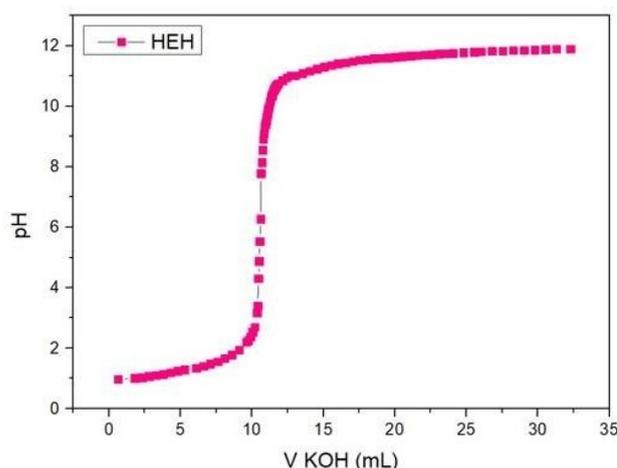
Um fator determinante para permeação de um fármaco em membranas é a difusão neste meio, como a solubilidade lipídica é determinante neste processo, a ionização de fármacos pode reduzir significativamente a capacidade de absorção.

No caso de estruturas ácidas e básicas fracas, ou seja, que perdem ou ganham prótons de acordo com o pH do meio, a capacidade de difundir de um meio hidrofílico para um hidrofóbico ou vice-versa é afetada, visto que a carga eletrostática de uma molécula ionizada atrai dipolos de água e resulta em um complexo polar (KATZUNG, 2014). Os compostos estudados neste trabalho apresentam dois sítios com caráter básico contido por amina secundária e terciária, o núcleo dihidropiridínico e o núcleo imidazol.

Os **Compostos A e D (HEH e ImPHQ)** foram os escolhidos para determinar seus equilíbrios químicos de protonação através de uma titulação potenciométrica. O composto **HEH** em solução aquosa apresenta pH entre 8,0 e 9,0, com baixa solubilidade, ao acidificar, pH próximo a 1,0, o composto passa a ser solúvel em água, em razão do seu sítio nitrogenado do heterociclo passar a ser catiônico. A determinação potenciométrica do pK_a da espécie protonado do **HEH** baseou-se nas mudanças do pH com adição do titulante, pelo método da segunda derivada, descrito na metodologia.

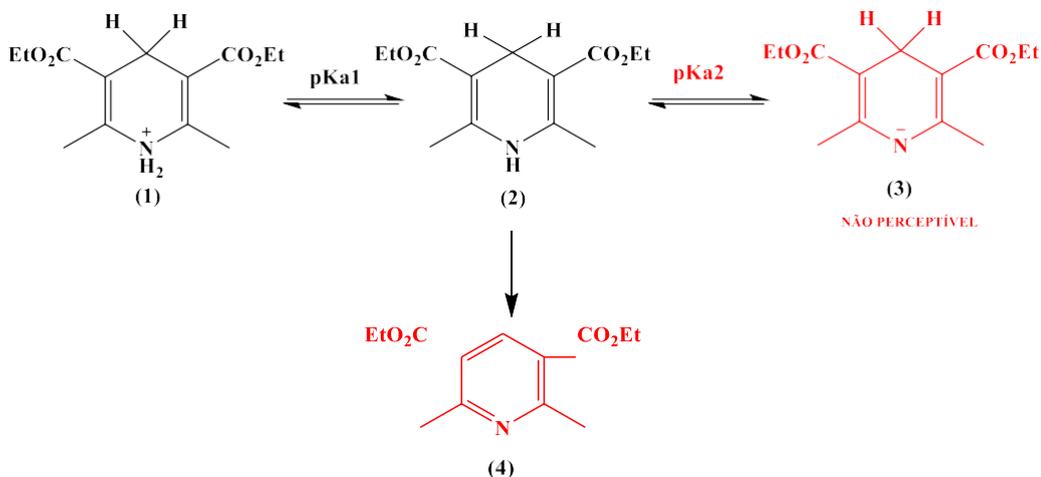
Dessa forma, foi possível calcular o valor da constante de dissociação do **HEH** através do pH inicial e do ponto de equivalência (tratando o composto como ácido monoprótico), obteve-se um $pK_{a1} = 1,28$.

Figura 31. Titulação potenciométrica do **Composto A (HEH)** em H_2O , KOH $0,087\text{ mol. L}^{-1}$ e $[HEH] = 5 \times 10^{-3}\text{ mol. L}^{-1}$.



Na curva de titulação (Figura 29) verifica-se apenas um ponto de inflexão referente ao equilíbrio entre a espécie catiônica (**1**) e neutra (**2**), pois o segundo hidrogênio ligado ao nitrogênio (**3**) não apresentou um ponto de inflexão perceptível, em consequência da fraca acidez e maior estabilidade comparado à espécie aniônica, representados no Esquema 6. Contudo, é notado a conversão direta do composto reduzido para o composto oxidado (**4**), esta justificativa é elucidada na espectrofotometria de absorção, que será discutida posteriormente, devido ao aumento de uma banda em 280nm, característico da espécie oxidada.

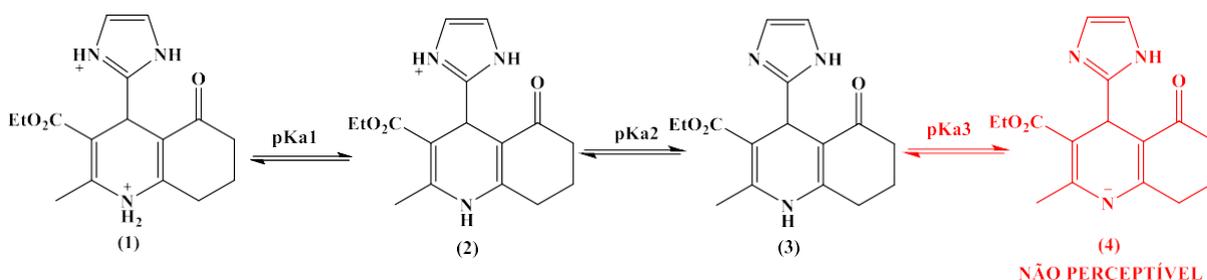
Esquema 6. Equilíbrio químico de protonação da espécie **HEH** em meio aquoso.



FONTE: AUTORAL (2023).

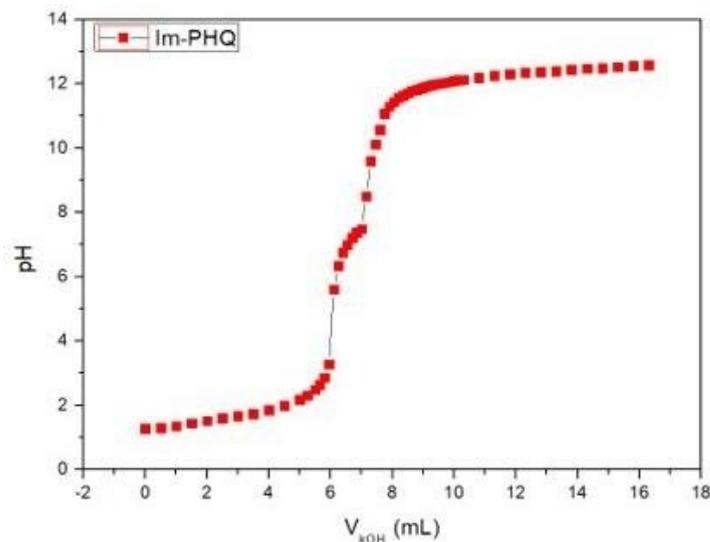
Na titulação potenciométrica do **Composto D (ImPHQ)** foi observado dois pontos de inflexão (Figura 30). No primeiro ponto de inflexão, em torno de $\text{pH} = 6$, foi obtido um $\text{pK}_{a1} = 1,67$ característico do equilíbrio químico do núcleo dihidropiridínico neutro (1) e catiônico (2), como discutido anteriormente. Já o segundo ponto com pH em torno de 8,0, correspondente de 50% da espécie do imidazol catiônica (2) e 50% da neutra (3) que permitiu a obtenção do segundo valor de constante de acidez $\text{pK}_{a2} = 6,96$.

Esquema 7. Equilíbrio químico de desprotonação do composto **ImPHQ** em meio aquoso.



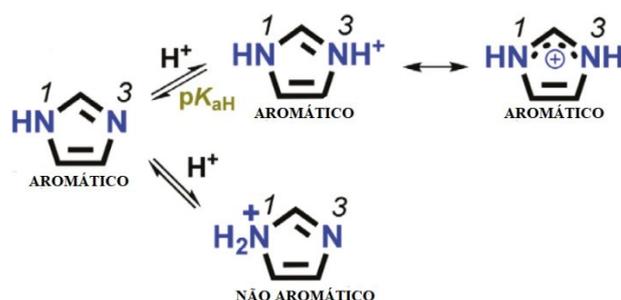
FONTE: AUTORAL (2023).

Figura 32. Titulação potenciométrica do composto **ImPHQ** em H₂O, KOH 0,087mol. L⁻¹ e [ImPHQ] = 5x10⁻³ mol.L⁻¹.



O equilíbrio de protonação do núcleo imidazol neutro é característico dos seus dois nitrogênios presentes, dando-lhe caráter anfótero, pois pode atuar como ácido ($pK_{aH} = 14,5$) ou base ($pK_{aH} = 7,0$) como representado na Figura 31. A protonação da espécie neutra ocorre favoravelmente no nitrogênio **3** que além de possui par de elétrons livre em orbital sp^2 , a espécie catiônica gerada conserva a aromaticidade do heterociclo. Enquanto no nitrogênio **1**, o par de elétrons está em ressonância com o anel e a formação de uma espécie catiônica leva a uma estrutura não aromática.

Figura 33. Equilíbrio ácido-base da estrutura do imidazol.



FONTE: Adaptada de Quim. Nova, 2021.

Destaca-se que este estudo se torna relevante em razão de sua forma protonada poder atuar como catalisador ácido e sua forma neutra poder atuar como catalisador básico. O papel catalítico do núcleo imidazol é encontrado em processos biológico enzimáticos, visto que sítios enzimáticos possuem grupos imidazois que exercem inúmeras funções como exemplo

sinalização e regulação da atividade celular, provimento de energia através de anidridos fosfóricos (ATP) e metabolismo.

5.2.3 Estudo fotofísico

O estudo fotofísico dos derivados do núcleo dihidropiridínico foram determinadas por método espectroscópico de absorção na (i) região do UV-Vis (ii) emissão de fluorescência (iii) rendimento quântico como descrito na metodologia. Os **Compostos A-E** apresentam duas bandas de absorção na região UV-Vis características, uma banda mais intensa situada em torno de 260 nm e outra, de menor intensidade, na região de 350-380 nm. Essa última banda corresponde a transições eletrônicas $\pi-\pi^*$, a partir dela foram retirados os valores de absorvidade molar (ϵ), calculados através da equação de Lambert-Beer (curvas de calibração estão anexadas na seção C).

Os espectros de emissão de fluorescência dos compostos mostram uma banda entre 415 e 455 nm, com um deslocamento de Stokes entre 30 e 80 nm, calculadas através do espectro de excitação obtido para o máximo de emissão. Apenas o **Composto C** apresentou rendimento quântico absoluto significativo.

Tabela 8. Propriedades fotofísicas dos **Compostos A-E** em EtOH [] = 1×10^{-4} mol L⁻¹.

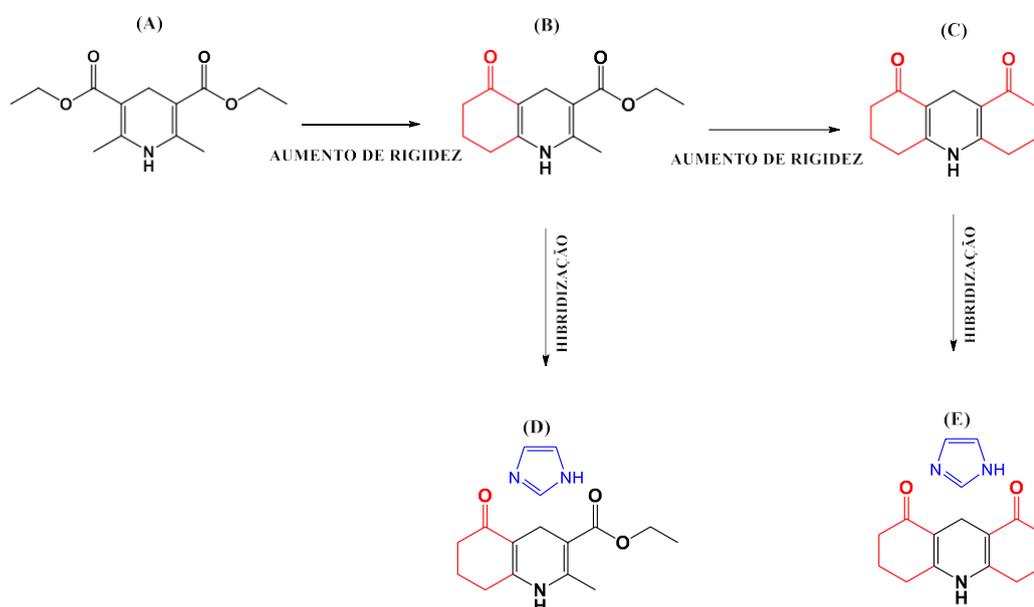
	$\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}, \text{ nm}$	$\epsilon_{\text{máx}}^*$ ($\times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\Delta\lambda_{\text{ST}}, \text{ nm}$	Φ
A	373/456	0,61	83	0,146
B	387/453	0,58	66	0,146
C	388/453	1,11	65	0,49
D	363/459	1,61	96	-
E	365/459	1,46	94	-

λ_{abs} = comprimento de onda de absorção; λ_{em} = comprimento de onda de emissão; ϵ = coeficiente de absorção; $\Delta\lambda_{ST}$ = deslocamento de Stokes; Φ = rendimento quântico.

* Curvas de calibração Anexo C.

Com os resultados obtidos nos espectros de absorção e emissão de fluorescência em etanol foi possível elucidar a mudança do comportamento fotofísico do cromóforo dihidropiridínico (**Composto A**) com o (i) aumento da rigidez do anel (**Composto B** e **C**) e com a (ii) hibridização do grupo imidazol na posição 4 do heterocíclico nitrogenado (**Composto D** e **E**) (Figura 34).

Figura 34. Estruturas sintetizadas relacionadas com o aumento da rigidez do ciclo e a inserção do grupo imidazol no anel.



FONTE AUTORAL (2023).

As modificações do **Composto A** (éster de Hantzsch) para uma estrutura bicíclica não simétrica (polihidroquinolina, **Composto B**) e uma tricíclica de maior rigidez (acridinodiona, **Composto C**) levou a diferentes características fotofísicas principalmente em relação à emissão de fluorescência. Observou-se, um deslocamento batocrômico (região do vermelho) no espectro de absorção do **Composto B** e **Composto C** em relação ao **Composto A**. Enquanto para o espectro de emissão de fluorescência houve um pequeno deslocamento hipsocrômico. Destaca-se que a emissão de fluorescência do **Composto B** apresentou maior intensidade comparada ao **Composto C**, esse favorecimento se deve a conjugação do sistema eletrônico π do grupo éster juntamente com as insaturações do anel piridínico que supera a maior rigidez do **Composto C**. Contudo, o **Composto C** apresentou maior rendimento quântico absoluto, o que a torna mais eficiente na conversão de energia absorvida em luz emitida.

A hibridização do grupo imidazol no **Composto B** e no **Composto C** proporcionou mudanças significativas no comportamento fotofísico da molécula. O espectro de absorção do **Composto B** apresenta uma banda característica em 387 nm. Já na presença de um imidazol na posição 4 do anel há um deslocamento hipsocrômico para 363 nm. O espectro de emissão do **Composto B** apresenta uma banda em torno de 453 nm, enquanto na presença do heterociclo nitrogenado há decréscimo de intensidade de fluorescência, fazendo com que a presença de um substituinte possa ser dependente do máximo de emissão do **Composto B**. A literatura descreve que a banda de emissão relativa ao núcleo dihidropiridínico presente nas moléculas é resultado de processos de transferência de energia (*ET*, do inglês *Energy Transfer*) entre o núcleo dihidropiridínico e o substituinte aromático, neste caso o imidazol, bem como transferência intramolecular de carga (*ICT*, do inglês *Intramolecular Charge Transfer*) entre o grupo carbonílico da cadeia lateral e o nitrogênio do núcleo dihidropiridínico (PÁVEZ, P., et al., 2007). Já ao inserir o substituinte imidazol no composto tricíclico (**Composto C**) o espectro de absorção do **Composto E** mostra um deslocamento para comprimento de onda menor, de 388 nm para 365 nm, onde o deslocamento é maior na emissão de fluorescência, sofrendo um deslocamento hipsocrômico de 6 nm e um decréscimo de cerca de 10 vezes em intensidade.

Figura 35. Espectro de absorção na região UV-Vis para os **Composto A-E** em etanol [$]=1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

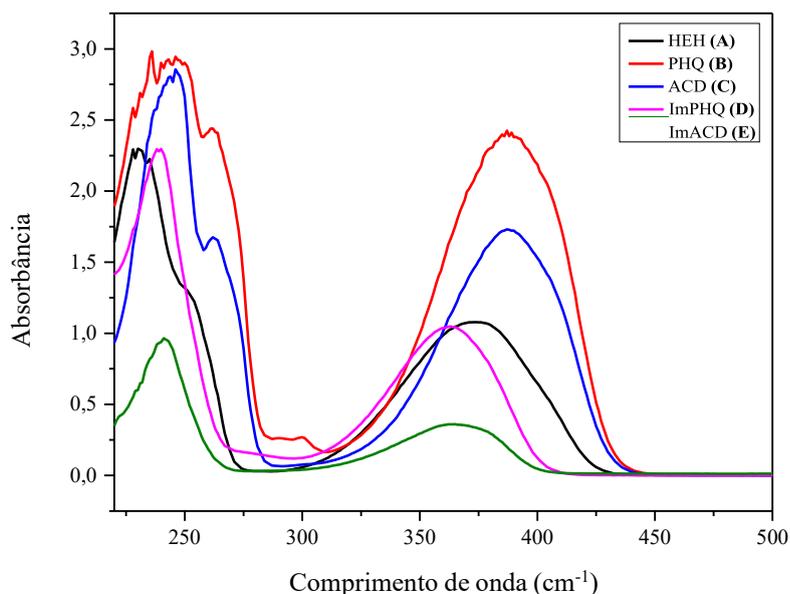
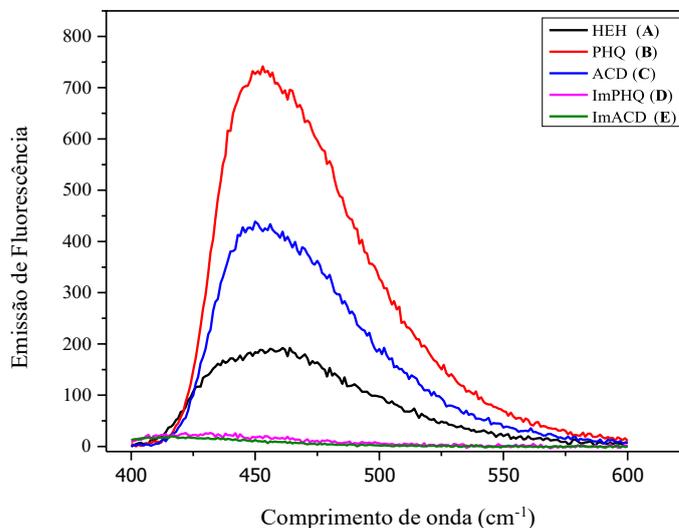


Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência para os **Composto A-E** em etanol $[\] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



As moléculas podem sofrer diversos efeitos com a mudança do ambiente em que se encontram, podendo afetar a sua absorção ou emissão de energia durante o processo. Dessa forma, a intensidade, comprimento de onda e até suas propriedades podem ser alteradas. Essas mudanças podem se dar pela diferença de polaridade do solvente no meio que o composto está (solvatocromismo). A fim de analisar o comportamento dos compostos em diferentes ambientes químicos, nesta última parte do estudo fotofísico utilizou-se dois grupos de solventes polares e apolares, sendo subdividido os polares em próticos e apróticos, a fim de compreender o comportamento dos derivados dihidropiridínicos em diferentes meios.

A Tabela 9 indica a constante dielétrica dos solventes utilizados nesse estudo, o valor é diretamente relacionado com a polaridade do solvente e sua capacidade de solvatar o soluto. (REINCHARDT, 2002).

Tabela 9. Constante Dielétrica dos solventes DMSO, etanol, diclorometano e 1,4-dioxano.

Solvente	Constante Dielétrica
DMSO	46,7
EtOH	24,5
CH ₂ Cl ₂	9,1
1,4-DIOXANO	2,25

FONTE HAYNES W.M., 93 ed., 2012.

Os Compostos (A-E) apresentaram leve solvatocromismo com a mudança da polaridade do meio. As transições eletrônicas ocorrem em velocidades muito mais rápidas do que o rearranjo do solvente na presença das moléculas, assim as mudanças de energia envolvidas na absorção e na emissão são diferentes (LAKOWICZ, 2006).

Tabela 10. Propriedades fotofísicas dos **Compostos A-E** em DMSO, Etanol, Diclorometano e 1,4-Dioxano.

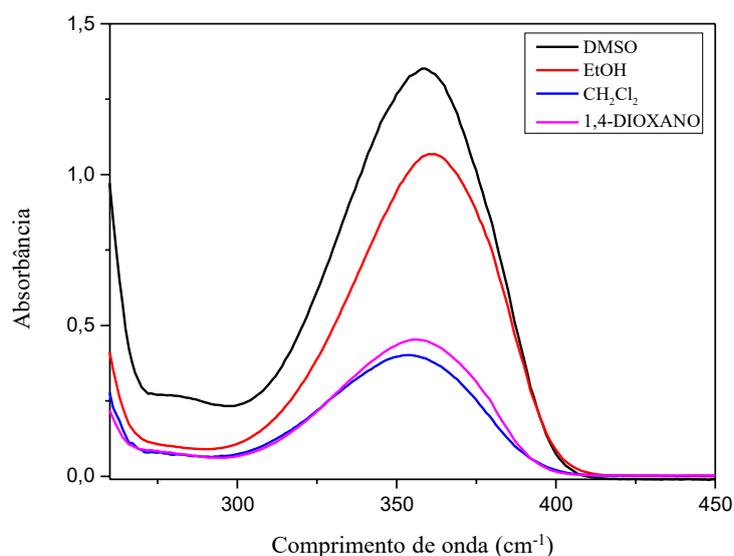
	DMSO		EtOH		CH ₂ Cl ₂		1,4-Dioxano	
	λ_{Abs} (ϵ)	λ_{Em} (Φ)	λ_{Abs} (ϵ)	λ_{Em} (Φ)	λ_{Abs} (ϵ)	λ_{Em} (Φ)	λ_{Abs} (ϵ)	λ_{Em} (Φ)
A	372 (0,15)	455 (0,142)	372 (0,61)	454 (0,146)	357 (1,56)	437 (1,46)	362 (3,11)	450 (0,146)
B	380 (0,83)	448 (0,146)	381 (0,58)	453 (0,146)	369 (0,46)	425 (0,146)	369 (0,85)	443 (0,146)
C	382 (1,50)	443 (0,44)	386 (1,11)	449 (0,49)	371 (0,37)	423 (0,73)	370 (0,17)	370 (0,45)
D	358 (2,27)	424 (-)	360 (1,46)	425 (-)	354 (0,67)	420 (-)	356 (0,67)	421 (-)
E	363(2,00)	419 (-)	365 (1,16)	418 (-)	357 (0,18)	418 (-)	360 (0,14)	416 (-)

Parâmetros: λ_{abs} = comprimento de onda de absorção (nm); ϵ = coeficiente de absorção (1×10^4 L mol⁻¹cm⁻¹); λ_{em} = comprimento de onda de emissão (nm); Φ = rendimento quântico.

Para discussão dos resultados foi selecionado o imidazol-polihidroquinolina (**Composto D**). Nas transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ em solventes mais polares (DMSO e etanol) é observado uma maior intensidade de absorção e um deslocamento batocrômico (vermelho) em relação aos solventes menos polares (diclorometano e 1,4-dioxano). Essa diferença ainda é percebida ao comparar diretamente a capacidade do solvente em fazer ligação de hidrogênio com o substrato. O etanol promove um deslocamento batocrômico em comparação ao DMSO, por se tratar de um solvente polar prótico, quando o composto está dissolvido nesse meio, os prótons do solvente podem formar ligações de hidrogênio com grupos doadores de elétrons da molécula adsorvente. Essas interações estabilizam o estado eletrônico excitado da molécula, como resultado diminui o momento de dipolo dos estados S_0 e S_1 e por conseguinte esse processo é evidenciado no espectro de absorção pelo aumento do comprimento de onda. Em acréscimo, essa menor contribuição de polarizabilidade do etanol, contribui para uma menor intensidade de absorção, enquanto o DMSO, por não promover ligação de hidrogênio, gera uma maior polarizabilidade e uma possível transferência interna de carga (*ICT*, do inglês *Intramolecular Charge Transfer*) e/ou transferência de energia (*ET*, do inglês *Energy Transfer*)

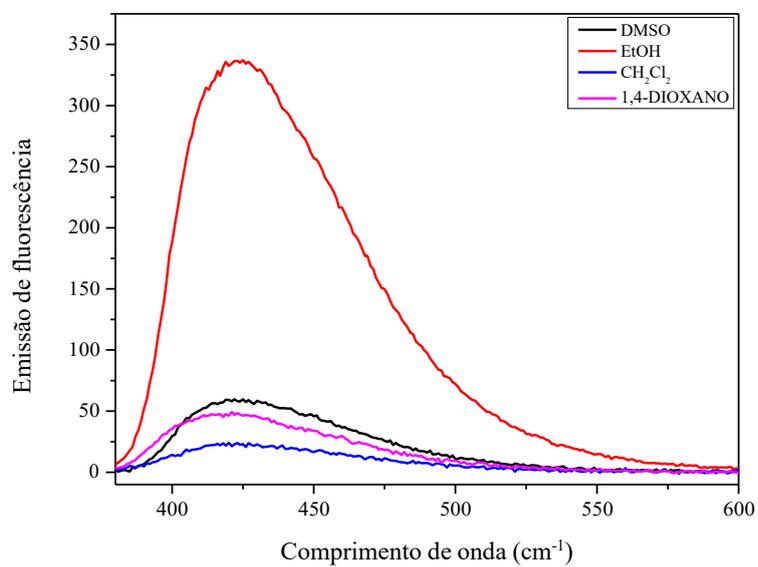
no núcleo dihidropiridínico, o que conduz a uma intensidade de absorção maior. A comparação do comprimento de onda e a intensidade de absorção dos compostos em solventes menos polares (diclorometano e 1,4-dioxano) evidencia um pequeno deslocamento hipsocrômico da banda $\pi - \pi^*$ para o azul, isto resulta de um estado eletrônico excitado menos estabilizado, logo uma maior contribuição de polarizabilidade em S_1 .

Figura 37. Espectro de absorção na região UV-Vis para o **Composto D (ImPHQ)** em DMSO, etanol, diclorometano e 1,4-dioxano ($[ImPHQ] = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).



Os espectros de emissão de fluorescência, obtidos pela excitação do composto **D**, mostraram apenas uma banda situada entre 420nm. O valor do deslocamento de Stokes, calculado através da diferença entre o comprimento máximo de emissão e de absorção dos diferentes solventes, está entre 65 e 66 nm. Esse valor está relacionado ao nível de relaxação sofrido pelo estado fundamental e excitado da molécula, como descrito na revisão bibliográfica. O fluoróforo apresenta um maior momento de dipolo no estado excitado, contudo quanto maior for a polaridade do solvente que o soluto se encontra, maior será a estabilização e maior será a emissão de fluorescência. Isso fica claro, ao observar a banda de emissão em etanol, uma intensidade cerca de 6,5 vezes maior comparada aos demais solventes, essa diferença está atribuída a diretamente ao rearranjo das moléculas de etanol com o imidazol-poli-hidroquinolina.

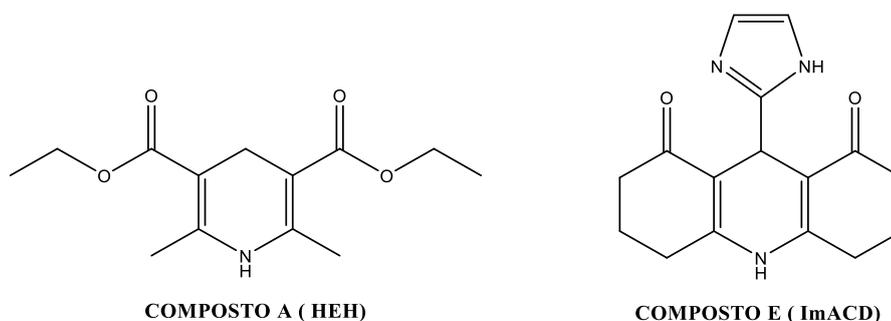
Figura 38. Espectro de emissão de fluorescência para os **Composto D** em DMSO, etanol, diclorometano e 1,4-dioxano ($[ImPHQ] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) slit 5,0.



5.3 PARTE III. Estudo Espectroscópico: Modo de Interação de Derivados do Núcleo Dihidropiridínico e ctDNA (*Calf-Thymus*)

Nesta terceira parte do trabalho, o foco se deu em designar as possíveis estruturas derivadas do núcleo dihidropiridínico que interagem com o DNA, para entender o mecanismo de ação em nível molecular e investigar o possível potencial de novos candidatos terapêuticos para algumas doenças como alvo a biomolécula. O estudo do mecanismo de interação ácido nucléico-ligante se deu por dois métodos espectroscópicos: absorção UV-Vis e emissão de fluorescência. Para este estudo, foi selecionado os compostos HEH (**Composto A**) e o ImACD (**Composto E**).

Figura 39. Estrutura dos núcleos dihidropiridínicos avaliados.



FONTE AUTORAL 2023.

5.3.1 Interação do DNA-ligante determinada por UV-Vis

Para avaliar o mecanismo dominante no processo de interação com o ctDNA, inicialmente utilizou-se o método de absorção na região UV-Vis. Sabe-se que o ctDNA apresenta uma banda característica em 260 nm relativo as transições eletrônicas dos grupos cromóforos das purinas (adenina e guanina) e pirimidina (citosina e guanina) (RUIZ-GONZÁLEZ V., et al., 2011). Enquanto, os compostos avaliados apresentam duas, uma em torno de 260 nm e outra na faixa de 350 e 380 nm, sendo a segunda a banda da transição eletrônica $\pi - \pi^*$, descrita nos estudos fotofísicos. Dessa forma, foi acompanhado a segunda banda de absorção dos compostos e adicionado proporções crescentes de ctDNA ao meio (0:1, 1:1, 1:2).

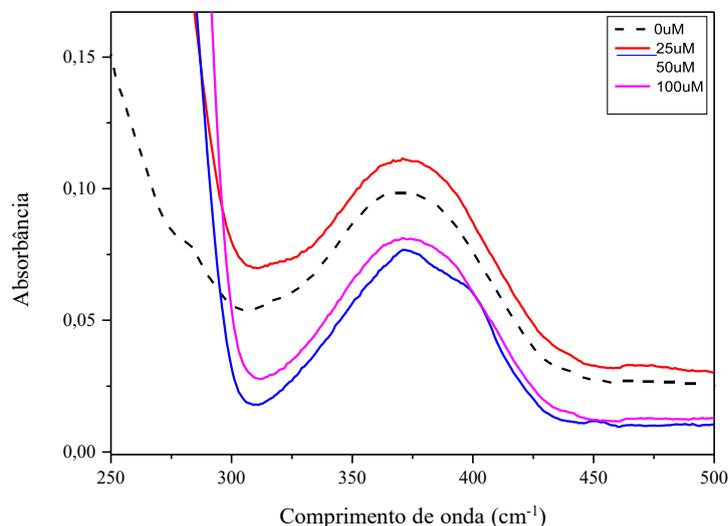
Ao adicionar ctDNA no sistema ocorrem mudanças espectrais significativas, indicando interação do composto com a biomolécula. A diminuição do sinal de absorbância (efeito hipocrômico) e o deslocamento para a região vermelha, comprimentos de onda maiores (efeito

batocrômico) do espectro pode ser indício de intercalação da molécula com o ctDNA. Esse efeito pode ser resultado do empilhamento π (interação π *stacking*) entre o cromóforo e os pares de base do DNA, ou seja, interação entre os orbitais π e π^* do ligante e dos orbitais das bases de DNA empilhadas. Neste processo, os orbitais π^* do ligante passam interagir parcialmente com os orbitais π das bases do DNA, essa interação eletrônica diminui a probabilidade de transição eletrônica, uma vez que π^* do ligante foi parcialmente preenchido pelo acoplamento com o orbital π das bases, afetando a intensidade de absorção do composto (SIRAJUDDIN M. et al., 2013).

No entanto, se um aumento do sinal de absorvância (efeito hiperacrômico) e/ou deslocamento para a região azul do espectro, comprimentos de onda menores (efeito hipocrômico) é reflexo de mudanças na conformação e na estrutura do DNA e do ligante. Após a interação complexo-DNA ter ocorrido pode ocorrer uma atração eletrostática com os grupos fosfatos, carregados negativamente, no exterior da hélice do DNA (SIRAJUDDIN M. et al., 2013). Embora essa interação eletrostática desempenhe um papel na ligação de pequenas moléculas ao DNA, a força dessa interação pode ser afetada pela concentração de íons no sistema. O estudo de Jie-HuaShi e colaboradores mostrou que quando a concentração de íons (NaCl) aumenta no sistema, a ligação eletrostática entre o ligante e o DNA tende a diminuir, e outros modos de ligação podem se tornar mais dominantes, como o *groove*. Ligantes que se ligam à fenda do DNA (maior ou menor) contêm ligações com liberdade de rotação, a fim de adotar uma conformação apropriada para realizar essa interação com a dupla hélice. Isso pode explicar por que a ocorre a variação de absorvância no complexo composto-ctDNA, dependendo do meio que se encontra (SHI J. et al., 2014).

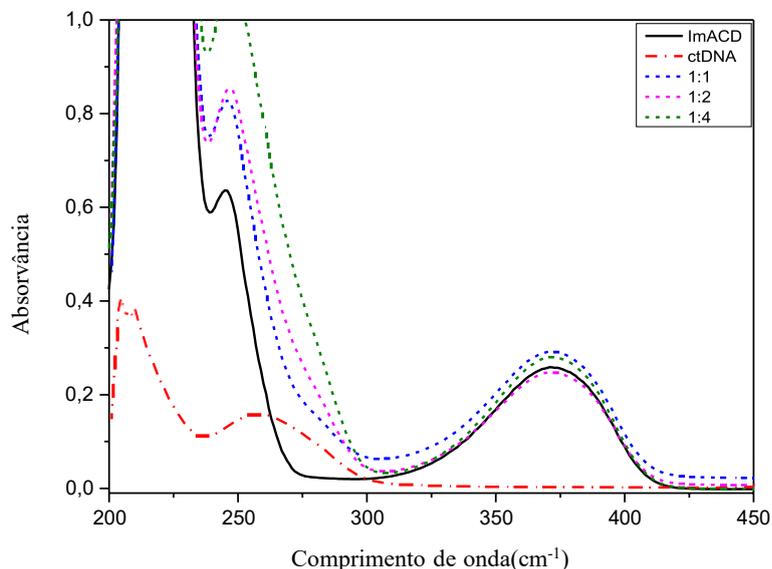
Dessa forma, a partir do espectro do **Composto A (HEH)** observou-se que ao adicionar 2,5 vezes o excesso de ctDNA em relação ao composto, ocorreu um aumento de absorção, efeito hiperacrômico, demonstrando que o **HEH** pode ter realizado ligação eletrostática com o DNA, ou seja, por efeito do meio fisiológico, ou interação via fenda, visto que o composto apresenta certa flexibilidade por apresentar mais de um carbono sp^3 na estrutura. Contudo, ao adicionar um excesso de 5x ou mais de ctDNA no meio, ocorre uma diminuição do sinal de absorção e possivelmente alteração no modo de ligação com o DNA, passando a intercalar aos pares de base da dupla hélice. Logo, conclui-se que as razões DNA-ligante pode interferir diretamente no modo de ligação do composto com a biomolécula, podendo intercalar em meio saturado ou interagir via ligação eletrostática ou *groove*.

Figura 40. Espectro de absorção do **Composto A** (HEH) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.



O mesmo estudo foi realizado com o **Composto E** (ImACD) de acordo com o espectro apresentado na Figura 41. Nota-se o modo de ligação entre a molécula e o DNA varia conforme o meio mais uma vez. Em uma relação 1:1 de ligante ctDNA há um aumento da absorção do ligante, já com a adição de 2 vezes mais da biomolécula no sistema ocorre uma pequena diminuição da absorção. No entanto, em um meio supersaturado, o sinal de absorção volta a aumentar, assim, o modo de ligação do imidazol é influenciado pelas mudanças no microambiente. Justamente por a estrutura do composto ter dois planos coplares, a estrutura tricíclica e o anel imidazol aromática hibridizado no carbono benzílico conseguem se interpor entre os pares de bases do DNA, esse complexo DNA-ligante é então estabilizado por forças intermoleculares, como ligação de hidrogênio ou até mesmo interação π -stacking entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e o composto. No entanto, esse mesmo composto apresenta também características estruturais para interagir via *groove* menor, por se tratar de uma molécula pequena, podendo então, como o composto anterior ser dependente das razões DNA-ligante.

Figura 41. Espectro de absorção do **Composto E** (ImACD) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.



5.3.2 Interação do DNA-ligante determinada por fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é comumente usada para estudar interações entre moléculas de ligantes pequenos e o DNA. Uma das vantagens da fluorescência molecular em comparação com outras técnicas, como UV-vis, é sua alta sensibilidade, ampla faixa de concentração e seletividade (SIRAJUDDIN M. et al., 2013). Assim, a maneira como os compostos se ligam ao DNA pode ser determinada por espectroscopia de fluorescência.

A partir das características espectroscópicas conhecida das estruturas, uma avaliação da interação dos **Composto A** e **Composto E** com o ctDNA via emissão de fluorescência foi realizada. Os compostos A e E sofrem excitação em 384 e 372nm respectivamente, e apresentam emissão significativa em 464 e 421nm respectivamente. Na presença de ctDNA no sistema, em concentrações crescentes (1:0, 1:1,1:2), observou-se um aumento gradual da intensidade de fluorescência intrínseca de ambos compostos (Figura 42 e Figura 43). Uma explicação plausível seria que a inserção desse composto a sequência de bases do DNA, fora uma espécie de "empilhamento" dentro da estrutura helicoidal do DNA. Quando essas moléculas estão livres e não ligadas ao DNA, sua rotação favorece outros processos de desativação que não envolvam a emissão de luz (SIRAJUDDIN M. et al., 2013). No entanto, quando essas drogas estão ligadas ao DNA, a desativação através da emissão de fluorescência

é mais propícia, visto que leva a uma restrição no grau de rotação da molécula, torando-as mais planares (rígidas) e desta forma intensificando a emissão de fluorescência (HAN, et al., 2014).

Figura 42. Espectro de emissão de fluorescência do **Composto A** (HEH) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.

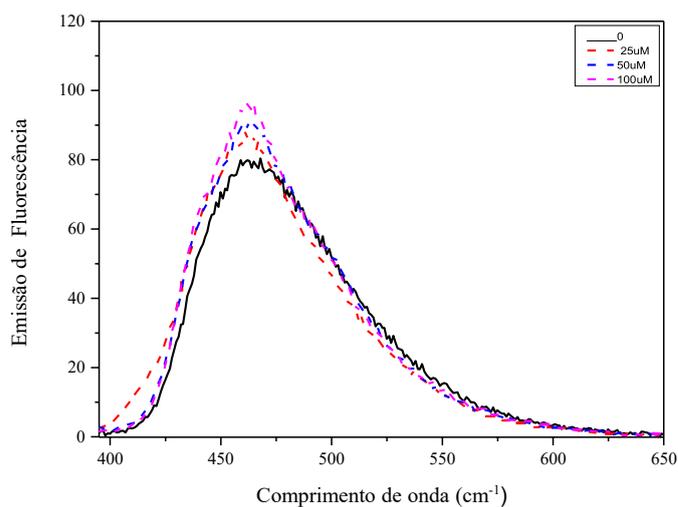
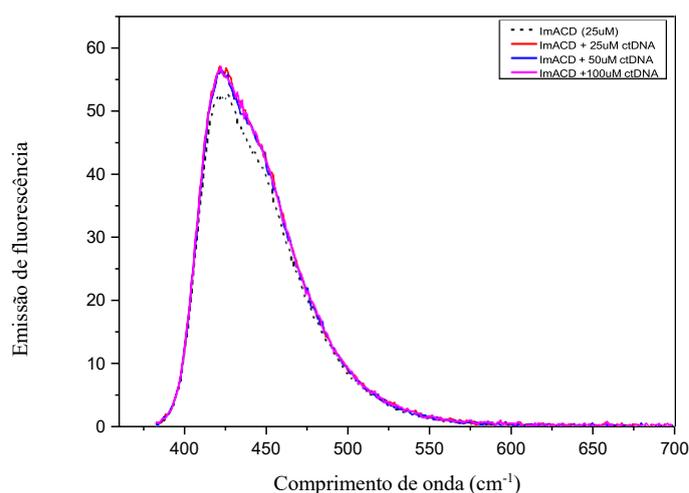


Figura 43. Espectro de emissão de fluorescência do **Composto E** (ImACD) livre e na presença de concentrações crescentes de ctDNA. Condições: solução tampão Tris (50mM, pH = 7,47) contendo NaCl 100mM.



É importante destacar que no caso de agentes de ligação às fendas (*grooves*) do DNA, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas estão envolvidas. Essas interações conduzem os ligantes à espinha dorsal de grupos fosfatos do DNA, sendo

possível observar uma diminuição na intensidade da fluorescência do ligante (SIRAJUDDIN M. et al., 2013).

Para confirmar se realmente trata-se de um modo de ligação por intercalação realizou-se um ensaio de competição com brometo de etídio (BE). Esse composto apresenta baixa emissão de fluorescência, no entanto na presença de DNA acaba intercalando entre os pares de bases, ocasionando um aumento da intensidade de sua fluorescência. Neste estudo, observou-se que o brometo de etídio, com emissão em aproximadamente 620 nm, na presença de ctDNA aumenta sua intensidade de fluorescência cerca de 2x, nesse sentido foi realizado uma titulação com o **Composto A** (HEH) no sistema. Observou-se que a intensidade de emissão do complexo BE-ctDNA não sofreu variações significativas, como mostra o espectro da Figura 44. Inferiu-se então que o HEH não apresenta capacidade de deslocar o BE do DNA, assim evidência que possivelmente o modo de ligação desse composto não se dá por intercalação. Em acréscimo, foi monitorado por cerca de 12h a emissão de fluorescência após um excesso do **Composto A** no sistema BE-ctDNA e não houve variação na intensidade de fluorescência como mostra a Figura 44.

Figura 44. Espectro de emissão do brometo de etídio (BE) livre, na presença de ctDNA e em concentrações crescentes do **Composto A**.

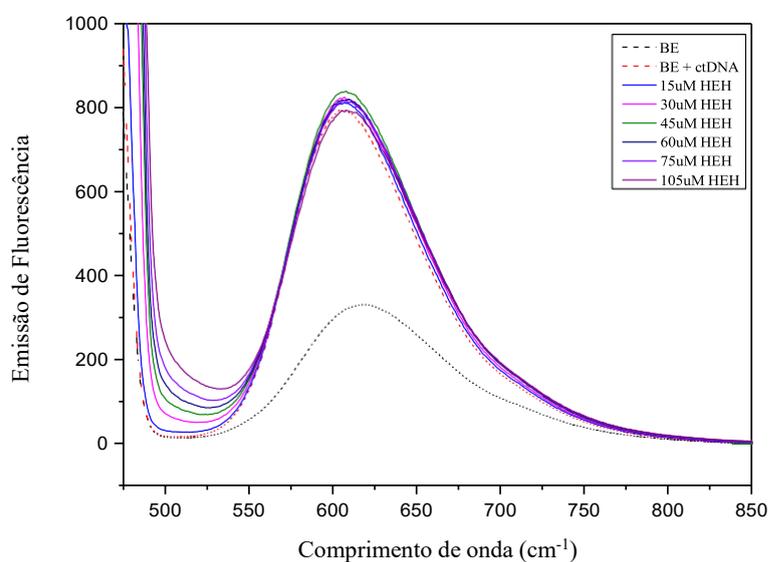
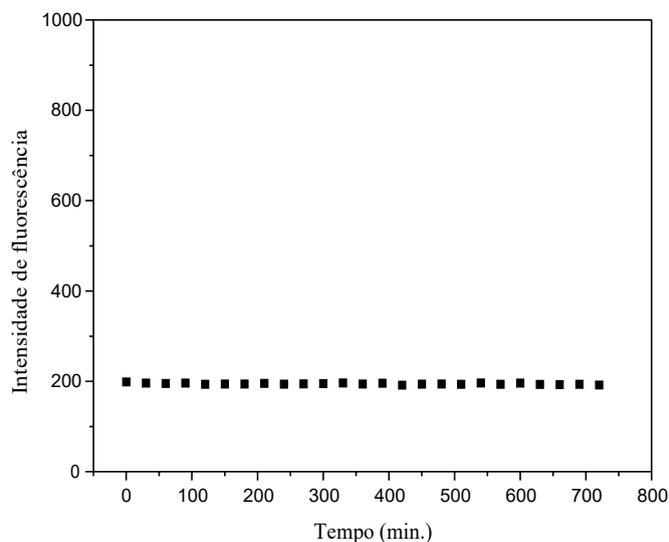


Figura 45. Monitoramento da intensidade de fluorescência no sistema BE-ctDNA na presença de 105uM do **Composto A**.

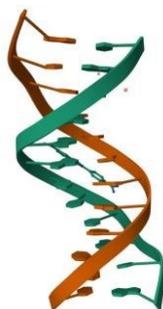


5.3.3 Estudo complementar: *docking* molecular

Em parceria com o Prof. Dr. Claudio M. Soares, do Instituto de Tecnologia Química e Biológica Antonio Xavier da Universidade Nova de Lisboa, Portugal, e o pós-doutorando Rodrigo Costa Zeferino foi possível realizar ancoragem molecular dos compostos apresentados nesse trabalho com o DNA.

O estudo de *docking* molecular foi conduzido no programa AutoDock4 com a função de scores AutoDock Vina (TROTT O e OLSON A., 2009). A estrutura do receptor DNA utilizado foi PDB 5t4w (foram atribuídas cargas de -15.99992 e inseridos apenas os hidrogênios polares). Para o cálculo das diferenças conformações dos ligantes foi definido as ligações sigmas como rotacionáveis.

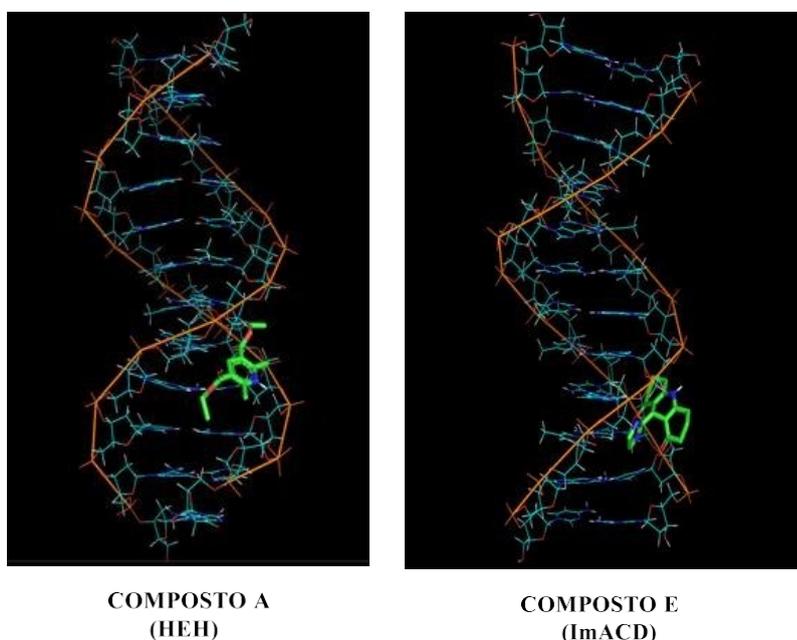
Figura 46. Estrutura DNA 5T4W d(CGTGAATTCACG) do *Protein Data Bank*.



FONTE [RCSB PDB: Homepage](https://www.rcsb.org/), 2023.

Neste trabalho serão apresentados os dados dos Compostos **A** e **E**, a fim de complementar o estudo de modo de ligação com ctDNA apresentado anteriormente. As três primeiras poses foram a de menor energia, porém o desvio padrão aumenta muito, portanto é considerado apenas a pose 1 como o melhor resultado (Figura 47). Observou-se que em todas as poses o modo de interação para os dois compostos corresponde a fenda menor, por serem ligantes de tamanho pequeno, ocorre a preferência de se posicionar onde o espaço entre as duplas fitas é menos amplo. Além disso, é possível que esse modo de interação por meio de sulco seja mais forte em comparação com as interações do tipo forças intermoleculares envolvidas entre os pares de bases do DNA.

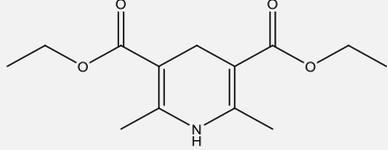
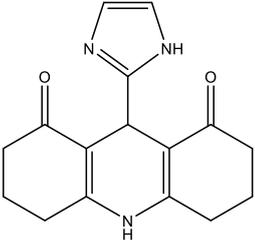
Figura 47. Pose dos ligantes **A** e **E** na fenda menor.



FONTE PyMOL.

A afinidade da ligação entre o ligante e a biomolécula alvo após a interação é estimada pelo método SCORE, ferramenta disponível no software AutoDock Vina. Os valores de energia de afinidade resultam da análise das interações de hidrogênio, bem como dos graus de liberdade rotacionais e translacionais, além das interações hidrofóbicas presentes nas moléculas. Valores negativos indicam uma interação espontânea e representam a capacidade do ligante em interagir com eficácia com a biomolécula alvo. Na tabela 11, os valores de energia de ligação são apresentados para as cinco melhores poses dos ligantes **A** e **E**.

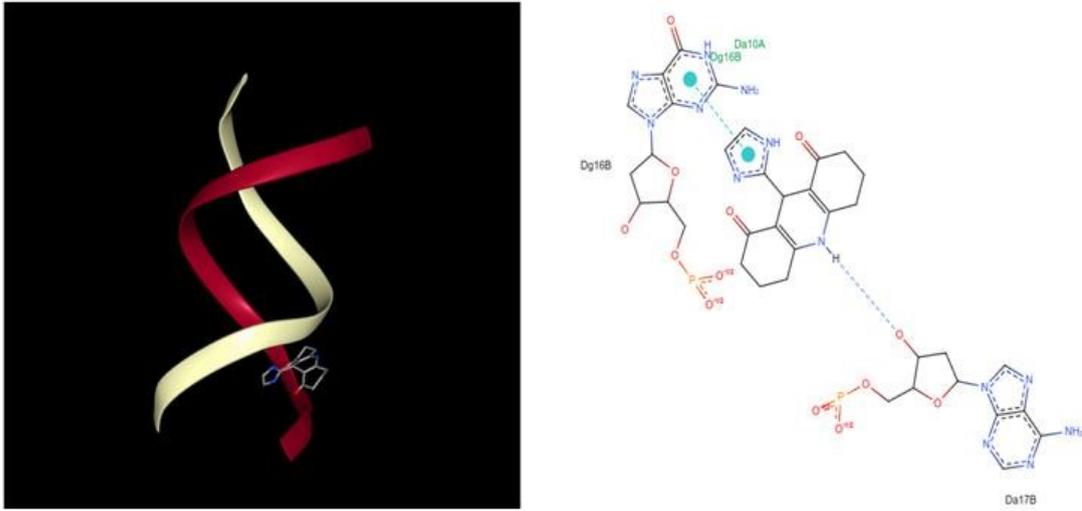
Tabela 11. Dados de energia de ligação das melhores poses dos ligantes **A** e **E**.

POSE	COMPOSTO	ENERGIA DE LIGAÇÃO (KCAL.MOL ⁻¹)
1	 COMPOSTO A (HEH)	-6,4
2		-6,3
3		-6,3
4		-6,3
5		-6,3
1	 COMPOSTO E (ImACD)	-8,3
2		-7,8
3		-7,6
4		-7,6
5		-7,5

FONTE AUTORAL.

A presença do imidazol no núcleo dihidropiridínico promove um acréscimo de aproximadamente 30% na estabilidade do complexo ligante-DNA. Esse aumento está relacionado com uma maior afinidade dos nitrogênios do imidazol com as bases nitrogenadas e a dupla fita do DNA. O papel do imidazol ainda pode ser evidenciado pelo ProteinPlus (<https://proteins.plus/>). A partir da conversão do arquivo da pose 1 do ligante **E** do PDB para SDF, o receptor DNA é inserido como PDB, e a ferramenta permite além do cálculo do tamanho do sítio ativo para enzimas, o mapa de interações em duas dimensões, Figura 48. O sítio de ligação no DNA (fenda menor), conforme previsto pelo site, possui 32 aceptores de ligação de H e profundidade de 10,5 angstroms, adequado para uma pequena molécula contendo doadores de ligação de H. Concluindo que, o imidazol realiza interações π com a base nitrogenada adenina do DNA.

Figura 48. Mapa de interação do ligante **E** com base nitrogenada adenina do DNA.



FONTE ProteinsPlus.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho utilizou-se de um conjunto de ferramentas, mediante a colaboração de diferentes áreas da química, permitindo não somente a obtenção de possíveis novos candidatos à fármacos como também uma síntese mais direcionada, conseqüentemente, trazendo otimização de tempo e benefícios econômicos.

Uma classe de derivados do núcleo dihidropiridínico, importante classe de compostos farmacêuticos devido à sua semelhança estrutural com a coenzima NADH, foram modulados em relação a sua cadeia lateral e hibridizados com um grupo imidazol. A primeira parte deste estudo envolveu uma triagem *in silico* de suas propriedades farmacocinéticas de biodisponibilidade, metabolismo e toxicidade. Essa avaliação foi realizada utilizando bases de dado online, tais como SwissADME, ADMETlab e Way2Drug. Os resultados dessa triagem indicaram características satisfatórias no que concerne às propriedades ADMET, que incluem absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Contudo, estudos subsequentes *in vitro* e *in vivo* são necessários para validação dos parâmetros observados na avaliação computacional.

A segunda parte realizada foi a síntese dos Compostos **A** - **E** (HEH, PHQ, ACD, ImPHQ e ImACD) por reação multicomponente de Hantzsch, com a utilização do catalisador maghemita, obtiveram-se rendimentos bons a moderados. Os compostos sintetizados foram então devidamente caracterizados por RMN ^1H e RMN ^{13}C . Além disso, o equilíbrio de protonação dos Compostos **A** e **D** foram determinados por titulação potenciométrica em meio aquoso. Para o **Composto A** foi determinado $\text{p}K_{a1} = 1,28$ e para o **Composto E**, $\text{p}K_{a1} = 1,67$ referente ao anel dihidropiridínico, e $\text{p}K_{a2} = 6,96$ referente ao anel imidazol. Concluiu-se que em meio fisiológico os compostos não apresentam cargas.

As propriedades fotofísicas desses compostos foram estudadas em quatro solventes com constantes dielétricas diferentes. A obtenção dos espectros de absorção e emissão de fluorescência permitiu investigar tanto o efeito do solvente nos compostos, como a mudança na estrutura conformacional do núcleo dihidropiridínico. Os compostos apresentaram leve solvatocromismo, sendo mais evidente em meio polar prótico. Já a mudança de uma cadeia lateral e a hibridização com o núcleo imidazol promoveram deslocamentos na banda de absorção e emissão, comprovando que o grupo substituinte imidazol no anel dihidropiridínico interfere diretamente no máximo de intensidade de fluorescência.

Na terceira parte do trabalho os **Compostos A** e **E** selecionados mostram interação significativa com o DNA empregado, através da técnica espectroscópica de UV-Vis e emissão de fluorescência. De acordo com os espectros de absorção obtidos ambas as moléculas dependem do microambiente que se encontra com o DNA para definir o seu modo de ligação. O **Composto A** em ambientes saturado de DNA apresentou efeito hipocrômico, indicando um possível modo de intercalação com os pares de bases nitrogenadas. No entanto, o **Composto E** apresentou um efeito hipercrômico com o aumento de DNA no sistema, inferindo que possivelmente seu modo de ligação seja via *groove* ou ligação eletrostática. Na emissão de fluorescência ambos compostos apresentaram aumento de emissão na presença de DNA, devido a uma restrição no grau de rotação da molécula. Por meio de um ensaio de competição empregando brometo etídio foi possível perceber que o **Composto A** não atua de modo intercalante, mas possivelmente via *groove*.

Por fim, o *Docking* Molecular corroborou para confirmar por quais sítios ocorrem as interações dos compostos com o DNA. Os dados de energia de afinidade mostraram a atuação dos ligantes pela fenda (*groove*) menor do DNA, devido aos seus pequenos tamanhos, além de não gerarem uma interação tão forte para ficar intercalados entre as bases nitrogenadas da dupla hélice, como era uma suposição pelo estudo espectroscópico com ctDNA.

7. PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho envolvem maior elucidação dos resultados apresentados por meio de estudos complementares:

- ✓ Aumentar a biblioteca de estudo *in silico* de derivados do núcleo dihidropiridínicos, o que já está em andamento pelo grupo de pesquisa;
- ✓ Realizar *docking molecular* das demais estruturas com o DNA alvo, comprovando o modo de interação macromolécula ligante, já em andamento, parceria, com o Prof. Dr. Claudio M. Soares, do Instituto de Tecnologia Química e Biologia Antonio Xavier – Universidade Nova de Lisboa, Portugal;
- ✓ Realizar estudos complementares de interação com ctDNA;
- ✓ Realizar ensaios *in vitro* frente às células de hepatocarcinoma humano (HepG-2), adenocarcinoma de mama (MCF-7), glioblastoma humano (A172) e câncer de colo (HeLa) em parceria com o Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX).
- ✓ Redação de artigos científicos.

O grupo de pesquisa planeja estender trabalho interagindo os derivados do núcleo dihidropiridínico (**Compostos I** e novos compostos) também com a proteína ATK1-4EJN, por meio de *docking* e dinâmica molecular. Essa abordagem visa fornecer *insights* valiosos para o desenvolvimento potencial de novos compostos ou fármacos com propriedades anticancerígenas.

8. REFERÊNCIAS

- AGAMAH, Francis E.; MAZANDU, Gaston K.; HASSAN, Radia; BOPE, Christian D.; THOMFORD, Nicholas E.; GHANSAH, Anita; CHIMUSA, Emile R. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. **Briefings in Bioinformatics**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1663–1675, 2020.
- AFFELDT, R. F.; IGLESIAS, R. S.; RODEMBUSCH, F. S.; RUSSOWSKY, D., Photophysical properties of a series of 4-aryl substituted 1,4-dihydropyridines. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 769–777, 2012.
- A ARNOTT, John; PLANEY, Sonia Lobo. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 863-875, 19 set. 2012. Informa Healthcare.
- CABALLERO, J. The latest automated docking technologies for novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p.1–21, 2020.
- CECHELLI, R.; BEREZOWSKI, V.; LUNDQUIST, S.; CULOT, M.; RENFTEL, M.; DEHOUCQ, M. P.; FENART, L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.6, n.8, p, 650-661, 2007.
- BARRA, C. V.; NETTO, A.V.G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, 2015.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**. As bases moleculares da ação dos fármacos. 3a Edição ed. São Paulo: Artmed, 2015.
- BAUDELET, Matthieu. Laser Spectroscopy for Sensing. **Elsevier**, 15 Feb. 2014.
- BAVAISKAR, Ashish T, et al. N-Fused Imidazoles as Novel Anticancer Agents That Inhibit Catalytic Activity of Topoisomerase II α and Induce Apoptosis in G1/S Phase. **J Med Chem**. 2011 Jul 28;54(14):5013-30
- BERMAN, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v.28, p. 235–242.
- BHATI, S., Kaushik, V. & Singh, J. In Silico Identification of Piperazine Linked Thiohydantoin Derivatives as Novel Androgen Antagonist in Prostate Cancer Treatment. **Int. J. Pept. Res. Ther.**, 25, 845–860 (2019).
- BÉRUBÉ, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 2016, 11(3), 281–305.
- BRYAN, J. Crossing the blood-brain barrier: drug delivery to the brain is still elusive. **The Pharmaceutical Journal**, v.273, n.10, p 475-476, 2004.
- BURNIER, M.; Pruijm, M.; Wuerzner, G. Treatment of Essential Hypertension with Calcium Channel Blockers: What Is the Place of Lercanidipine? **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology** 2009.

- CHAN, H. C. Stephen; SHAN, Hanbin; DAHOUN, Thamani; VOGEL, Horst; YUAN, Shuguang. Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 40, n. 8, p. 592–604, 2019.
- CIOC, R. C.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A. Multicomponent Reactions: Advanced Tools for Sustainable Organic Synthesis. **Green Chem.** 2014, 16 (6), 2958–2975.
- COX, M.M; DOUDNA, J.A; O’ DONNELL. **Biologia Molecular: Princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012. DAHM, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. **Hum Genet**, 122:565-581, 2008. 6.
- DE GROOT, M. J. Designing better drugs: predicting cytochrome P450 metabolism. **Drug Discovery Today**, v 11, n.13-14 p. 601-606, 2006.
- DOLENC J, BARON R, OOSTENBRINK C, KOLLER J, VAN GUNSTEREN WF. Configurational entropy change of netropsin and distamycin upon DNA minor groove binding. **Biophys J.**;91(4):1460-1470, 2006.
- DOMLJANOVIC I, CARSTENS A, OKHOLM A, et al. Complexes of DNA with fluorescent dyes are effective reagents for detection of autoimmune antibodies. **Sci Rep**, 7(1):1-9, 2017.
- EISNER, U.; KUTHAN, J., Chemistry of Dihydropyridines. **Chemical Reviews**, v. 72, n. 1, p. 1–42, 1972.
- EKINS, S. HONEYCUTT, J. D.; METZ, J. T. Evolving molecules using multi-objective optimization: applying to ADME/ Tox. **Drug Discovery Today**. v. 15, n. 11-12, p 451-460, 2010.
- FAN, Jiyu, et al. “Progress in Molecular Docking.” **Quantitative Biology**, vol. 7, no. 2, June 2019, pp. 83–89.
- FERREIRA, L., dos Santos, R., Oliva, G., & Andricopulo, A. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, 20(7), 13384–13421.
- FOKOUE, Harold et al. Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal? **Química Nova**, [S.L.], p. 78-89, fev. 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- FUKUZUMI, S.; KOUMITSU, S.; HIRONAKA, K.; TANAKA, T., Energetic Comparison between Photoinduced Electron-Transfer Reactions from NADH Model Compounds to Organic and Inorganic Oxidants and Hydride-Transfer Reactions from NADH Model Compounds to p-benzoquinone Derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 2, p. 305–316, 1987.
- GLESSON, M. P.; HERSEY, A.; MONTANARI, D.; OVERINGTON, J. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3p. 197-208, 2011.
- GUIDO, Rafael V. C., et al. “Planejamento de Fármacos, Biotecnologia E Química Medicinal: Aplicações Em Doenças Infecciosas.” **Estudos Avançados**, vol. 24, no. 70, 2010, pp. 81–98.

- GUO J, Zhu X, Badawy S, Ihsan A, Liu Z, Xie C, Wang X. Metabolism and Mechanism of Human Cytochrome P450 Enzyme 1A2. **Curr. Drug Metab.** 2021;22(1):40-49.
- GONG, G. H., Bian, M., Liu, C. Y., & Zhang, B. Heterocyclic pyran and polyhydroquinoline derivatives to inhibit human breast cancer cells. **Main Group Chemistry** 2019 18(1), 15–22. 11.
- HAN, L., et al. A multi-spectroscopic approach to investigate the interaction of prodigiosin with ct-DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v.123, p. 497-502, Dez., 2014.
- HANTZSCH, A., Condensationsprodukte aus Aldehydammoniak und ketonartigen Verbindungen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, v. 14, n. 2, p. 1637– 1638, 1881.
- HERAVI, Majid M., and Vahideh Zadsirjan. “Prescribed Drugs Containing Nitrogen Heterocycles: An Overview.” **RSC Advances**, vol. 10, no. 72, 2020, pp. 44247–44311
- HUGHES, Jp et al. Principles of early drug discovery. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 22 fev. 2011.
- HUANG, Feihe, and Eric V. Anslyn. “Introduction: Supramolecular Chemistry.” **Chemical Reviews**, vol. 115, no. 15, 12 Aug. 2015, pp. 6999–7000.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em < [Instituto Nacional de Câncer - INCA — Português \(Brasil\) \(www.gov.br\)](http://www.gov.br/inca)> Acesso em: 15 novembro 2022.
- JACQUELINE A. BRIKMAN, YUE LIU, STEPHEN J. KRON, Small-molecule drug repurposing to target DNA damage repair and response pathways, **Seminars in Cancer Biology**, Volume 68, 2021, pages 230-241.
- KALARIA, P. N., Karad, S. C., & Raval, D. K. A review on diverse heterocyclic compounds as the privileged scaffolds in antimalarial drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry** 2018 158, 917–936.
- KIRIIRI, Geoffrey Kabue; NJOGU, Peter Mbugua; MWANGI, Alex Njoroge. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 27, 2020.
- KOZURKOVÁ, MARIA. “Acridine Derivatives as Inhibitors/Poisons of Topoisomerase II.” **Journal of Applied Toxicology**, vol. 42, no. 4, 12 Sept. 2021, pp. 544–552.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3. ed. Baltimore: **Springer**, 2006.
- LEACH, A. R. Molecular Modelling: Principles and Applications, 2nd ed. **Pearson Prentice Hall**, 2001.
- LEHN, J.-M., Supramolecular chemistry: concepts and perspectives. New York: **VHC**, 1995.
- LEPPERT, Wojciech. CYP2D6 in the Metabolism of Opioids for Mild to Moderate Pain. **Pharmacology**, [S.L.], v. 87, n. 5-6, p. 274-285, 2011.

LIMA, Lídia M. “Química Medicinal Moderna: Desafios E Contribuição Brasileira.” **Química Nova**, vol. 30, no. 6, Dec. 2007, pp. 1456–1468,

LIPINSKI, Christopher A. et al. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 235-249, jul. 2000.

MANOCHA, P.; et al. A review: Imidazole synthesis and its biological activities. **Int. J. Pharm. Sci.** 2016, Vol. 1-7, 12-16

MARMUR, J., and Doty, P., Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. **J. Mol. Biol.**, 5, 109-118 (1962).

MIZUTA R, DEVOS JM, WEBSTER J, et al. Dynamic self-assembly of DNA minor groove-binding ligand DB921 into nanotubes triggered by an alkali halide. **Nanoscale**. 10(12):5550-5558, 2018.

NANOUE, E, Catterall WA. Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. **Neuron**. 2018 May 2;98(3):466-481.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7ed. São Paulo: Sarvier, 2017.

NIRANJAN Babu, M.; Elumalai, K.; Srinivasan, S.; Eluri, K.; Elumalai, M.; Sivannan, S. Synthesis and Anticholinesterase Activity of a Novel Series of Acetazolamide Condensed 1,4-Dihydropyridines. **Carbon Resources Conversion** 2019, 2 (3), 191–197.

PAIDEPALA, H., Nagendra, S., Saddanappu, V., Addlagatta, A., & Das, B. Catalyst-free efficient synthesis of polyhydroquinolines using polyethylene glycol as a solvent and evaluation of their cytotoxicity. **Medicinal Chemistry Research** 2014 23(2), 1031–1036.

PAGADALA, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, 9(2), 91–102.

PARDRIDGE W. M. Drug targeting to the brain. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n.9, p 1733-1744, 2007.

PATRICK, G. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Sixth Edit ed. Oxford: Oxford, 2017.

PETROVIC, J., Pešić, V. & Lauschke, V.M. Frequencies of clinically important *CYP2C19* and *CYP2D6* alleles are graded across Europe. **Eur J Hum Genet** 28, 88–94 (2020).

PEDERSEN, R. *et al.* (2014). Properties of DNA. In: Bhushan, B., Luo, D., Schrickler, S., Sigmund, W., Zauscher, S. (eds) Handbook of Nanomaterials Properties. **Springer**, Berlin, Heidelberg.

PUYO, S; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agentes to new mibnor groove binders. **Critical. Reviews in Oncology/ Hematology**, França, v.89, p.43-61, Jul., 2014.

REINCHARDT, C.; Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3^a ed., **Winheim, Cambridge**, 2002.

RUDIK, Anastasia et al. SOMP: web server for prediction of sites of metabolism for drug-like compounds. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 31, n. 12, p. 2046-2048, 11 fev. 2015.

ROGERIO, K. R.; et al. Multicomponent reactions: A brief history and their versatility for the synthesis of biologically active molecules. **Revista Virtual de Química**, 2016, 8(6), 1934–1962.

SAHIBA, NUSRAT, et al. “Acridine-1,8-Diones: Synthesis and Biological Applications.” **ChemistrySelect**, vol. 6, no. 9, 2 Mar. 2021, pp. 2210–2251.

SCHLANDER, MICHAEL, et al. “How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment.” **PharmacoEconomics**, vol. 39, no. 11, 9 Aug. 2021.

SHALINI, & Kumar, V. Have molecular hybrids delivered effective anti-cancer treatments and what should future drug discovery focus on? **Expert Opinion on Drug Discovery**, 16(4), 335–363, 2021.

SHALINI, K.; SHARMA P. K.; KUMAR, N. Imidazole and its Biological Activities: A Review. **Der Chemica Sinica**, Vol. 1-3, 36-47, 2010.

SHARMA, DHARMINDER, et al. “Application of Cyclohexane-1,3-Diones in the Synthesis of Six-Membered Nitrogen-Containing Heterocycles.” **ChemistrySelect**, vol. 7, no. 12, 23 Mar. 2022.

SCHRAMM, M.; Thomas, G.; Towart, R.; Franckowiak, G. Novel Dihydropyridines with Positive Inotropic Action through Activation of Ca²⁺ Channels. **Nature** 1983, 303, 535–537.

SHENG, J.; GAN, J.; Structure-Based DNA-targeting strategies with small molecule ligands for drug discovery. **Medicinal Research Reviews**. 33(5) 1119-1173, 2013. 11.

SHULTZ, Michael D. Two Decades under the Influence of the Rule of Five and the Changing Properties of Approved Oral Drugs. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 1701-1714, 13 set. 2018. American Chemical Society (ACS).

SILVA, Valmir, and Elisa Orth. “IMIDAZOL E CATÁLISE: UM PAR PERFEITO.” **Química Nova**, 2020.

SILVERSTEIN, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., In: **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 8^a ed., Guanabara Dois, Rio de Janeiro 2019.

SIWACH, A., & Verma, P. K. Synthesis and therapeutic potential of imidazole containing compounds. **BMC Chemistry** 2021, 15(1), 1–69.

STANZIONE Francesca, Giangreco Ilenia, Cole C. Jason. Use of Molecular Docking Computational tools in Drug Discovery. **Progress in Medicinal Chemistry** 60,273-343 (2021).

STEED, Jonathan W, and Jerry L Atwood. **Supramolecular Chemistry**. Chicester, Wiley Blackwell, 2009.

SONI, J.; et al. Contemporary Progress in the Synthetic Strategies of Imidazole and its Biological Activities. **Current Organic Synthesis** 2019, 16(8), 1078–1104.

TRIPATHI, A.; Bankaitis, V.A. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. **Journal of molecular medicine and clinical applications**, 2017.

USHA, Talambedu; SHANMUGARAJAN, Dhivya; GOYAL, Arvind Kumar; KUMAR, Chinaga Suresh; MIDDHA, Sushil Kumar. Recent Updates on Computer-aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 30, p. 3296–3307, 2018.

VALEUR, B. Molecular Fluorescence Principles and Applications. Weinheim: **Wiley-vch**, 2002.

VAN DE WATERBEEMD H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nat. Ver. Drug Discov.** 2003; 2:192-204.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.

VICTOR S. Batista, et al. Construção, Otimização e Ancoragem Molecular de Substâncias Bioativas em Biomacromoléculas: Um Tutorial Prático. **Quim. Nova** 45, 223-234 (2022).

WANG, Z., Sun, H., Yao, X., Li, D., Xu, L., Li, Y., ... Hou, T. (2016). Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 18(18), 12964–12975.

WANG, Min, et al. “Calcium Channels: Noteworthy Regulators and Therapeutic Targets in Dermatological Diseases.” **Frontiers in Pharmacology**, vol. 12, 19 Aug. 2021.

WARDLE, B. Principles and Applications of Photochemistry. **Manchester: Wiley**, 2009.

WATSON, J.D; CRICK, F.H.C, A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, 171:737-738, 1953. 5.

WHEATE, N. J., et al. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Austrália, v. 7, p. 627-648, Jul., 2007.

WILSON WD, Mizan S, Tanious FA, Yao S, Zon G. The interaction of intercalators and groove-binding agents with DNA triple-helical structures: the influence of ligand structure, DNA backbone modifications and sequence. **J Mol Recognit.** 1994 Jun;7(2):89-98.

WOUTERS, OLIVER J., et al. “Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018.” **JAMA**, vol. 323, no. 9, 3 Mar. 2020, p. 844.

WU, Fengxu; ZHOU, Yuquan; LI, Langhui; SHEN, Xianhuan; CHEN, Ganying; WANG, Xiaoqing; LIANG, Xianyang; TAN, Mengyuan; HUANG, Zunnan. Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 8, n. September, 2020.

YANG, Zi-Yi et al. Application of Negative Design To Design a More Desirable Virtual Screening Library. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 9, p. 4411-4429, 13 jan. 2020. American Chemical Society (ACS).

ZHONG, Haizheng. “ADMET Properties: Overview and Current Topics.” **Drug Design: Principles and Applications**, 9 Aug. 2017, pp. 113–133.

ANEXO A – RESULTADOS *IN SILICO* DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO

Figura A 1. Resultados *in silico* do software SwissADME e ADMETLab para o composto A (HEH).

Absorção	HEH
Absorção Gastrointestinal (Swissadme)	Alto
Absorção intestinal Humana (ADMETlab)	+0.67 (67%)
Absorção células caco-2 (ADMETlab)	-4.496 cm/s
Disponibilidade Oral em Humanos (ADMETlab) -20% /30%	--- 0.246 / - 0.355
Substrato (swissADME/ADMETlab) glicoproteína-p	Não 0.054
Inibidor da glicoproteína-P (ADMETlab)	Sim 0.56 (56%)
Absorção e Biodisponibilidade*	
Distribuição	HEH
Permeabilidade pela BHE (swiss ADME e ADMETlab)	SIM +++ 0.908
Ligação a proteínas plasmáticas	48.005%
Volume de distribuição (ADMETlab)	0.057 L/kg
Ligação de proteínas plasmáticas*	
Volume de distribuição*	
Eliminação	HEH
Meia Vida	1.161 h
Clearance	1.97mL/min/kg
Meia-vida*	
Clearance*	
Metabolismo	HEH
CYP1A2 Inibidor	Sim ++ 0.825 (82.5%)
CYP1A2 Substrato	- 0.404
CYP3A4 Inibidor	--- 0.09
CYP3A4 Substrato	- 0.382
CYP2C9 Inibidor	--- 0.063
CYP2C9 Substrato	--- 0.226
CYP2C19 Inibidor	- 0.418
CYP2C19 Substrato	--- 0.212
CYP2D6 Inibidor	--- 0.154
CYP2D6 Substrato	--- 0.235
Toxicidade	
Bloqueador da hERG	--- 0.223
Hepatotoxicidade Humana	+ 0.666
Mutagenicidade (AMES)	--- 0.278
Sensibilidade da pele	- 0.38
LD50	1098.074mg/kg
Lesão hepática induzida por medicamentos	- 0.46
Dose diária máxima recomendada	+ 0.654

Figura A 2. Resultados *in silico* do software SwissADME e ADMETLab para o composto **B** (PHQ).

Absorção – confirmar estes dados	PHQ
Absorção Gastrointestinal (Swissadme)	Alto
Absorção intestinal Humana (ADMETlab)	++ 0.72 (72%)
Absorção células caco-2 (ADMETlab)	-4.518 cm/s
Disponibilidade Oral em Humanos (ADMETlab) -20% /30%	-0.339/-0.323
Substrato (swissADME/ADMETlab) glicoproteína-p	Não --- 0.021
Inibidor da glicoproteína-P (ADMETlab)	Sim + 0.673
Absorção e Biodisponibilidade*	
Distribuição	PHQ
Permeabilidade pela BHE (swiss ADME e ADMETlab)	SIM +++ 0.906
Ligação a proteínas plasmáticas	60.357%
Volume de distribuição (ADMETlab)	0.157 L/kg
Ligação de proteínas plasmáticas*	
Volume de distribuição*	
Eliminação	PHQ
Meia Vida	1.071 h
Clearance	1.797/min/kg
Meia-vida*	
Clearance*	
Metabolismo	PHQ
CYP1A2 Inibidor	Não – 0.461
CYP1A2 Substrato	- 0.442
CYP3A4 Inibidor	--- 0.106
CYP3A4 Substrato	- 0.446
CYP2C9 Inibidor	--- 0.192
CYP2C9 Substrato	- 0.307
CYP2C19 Inibidor	- 0.341
CYP2C19 Substrato	- 0.335
CYP2D6 Inibidor	--- 0.245
CYP2D6 Substrato	--- 0.272
Toxicidade	
Bloqueador da hERG	--- 0.201
Hepatotoxicidade Humana	+ 0.628
Mutagenicidade (AMES)	--- 0.228
Sensibilidade da pele	--- 0.286
LD50	825.26 mg/kg
Lesão hepática induzida por medicamentos	- 0.324
Dose diária máxima recomendada	+ 0.616

Figura A 3. Resultados *in silico* do software SwissADME e ADMETLab para o composto C (ACD).

Absorção	ACD
Absorção Gastrointestinal (Swissadme)	Alto
Absorção intestinal Humana (ADMETlab)	+0.851 (85%)
Absorção células caco-2 (ADMETlab)	-4.298 cm/s
Disponibilidade Oral em Humanos (ADMETlab) -20% /30%	+0.589/0.582+
Substrato (swissADME/ADMETlab) glicoproteína-p	Não ---0.012
Inibidor da glicoproteína-p (ADMETlab)	Não --- 0.012
Absorção e Biodisponibilidade*	
Distribuição	ACD
Permeabilidade pela BHE (swiss ADME e ADMETlab)	SIM +++ 0.991
Ligação a proteínas plasmáticas	56,93%
Volume de distribuição (ADMETlab)	0.052351 L/kg
Liogação de proteínas plasmáticas*	
Volume de distribuição*	
Eliminação	ACD
Meia Vida	1.764 h
Clearance	1.957mL/min/kg
Meia-vida*	
Clearance*	
Metabolismo	ACD
CYP1A2 Inibidor	Não --- 0.031(0,3%)
CYP1A2 Substrato	+ 0.574
CYP3A4 Inibidor	--- 0.013
CYP3A4 Substrato	- 0.338
CYP2C9 Inibidor	--- 0.018
CYP2C9 Substrato	--- 0.411
CYP2C19 Inibidor	- 0.092
CYP2C19 Substrato	- 0.499
CYP2D6 Inibidor	--- 0.178
CYP2D6 Substrato	--- 0.289
Toxicidade	ACD
Bloqueador da hERG	--- 0.205
Hepatotoxicidade Humana	- 0,396
Mutagenicidade (AMES)	--- 0.284
Sensibilidade da pele	- 0.491
LD50	893.297mg/kg
Lesão hepática induzida por medicamentos	- 0.454
Dose diária máxima recomendada	++ 0.714

Figura A 4. Resultados in silico do software SwissADME e ADMETLab para o composto **D** (ImPHQ).

Absorção	imPHQ1
Absorção Gastrointestinal (Swissadme)	Alto
Absorção intestinal Humana (ADMETlab)	+ 0.648 (64%)
Absorção células caco-2 (ADMETlab)	-4.785 cm/s
Disponibilidade Oral em Humanos (ADMETlab) -20% /30%	-0.415/-0.266
Substrato (swissADME/ADMETlab) glicoproteína-p	<i>Sim</i> --- 0.026
Inibidor da glicoproteína-p (ADMETlab)	<i>Não</i> + 0.564
Absorção e Biodisponibilidade*	
Distribuição	imPHQ1
Permeabilidade pela BHE (swiss ADME e ADMETlab)	<i>Não</i> + 0.695
Ligação a proteínas plasmáticas	71.672%
Volume de distribuição (ADMETlab)	0.191 L/kg
Ligação de proteínas plasmáticas*	
Volume de distribuição*	
Eliminação	imPHQ1
Meia Vida	1.061 h
Clearance	1.843/min/kg
Meia-vida*	
Clearance*	
Metabolismo	imPHQ1
CYP1A2 Inibidor	<i>Não</i> --- 0.25
CYP1A2 Substrato	+ 0.548
CYP3A4 Inibidor	--- 0.204
CYP3A4 Substrato	+ 0.619
CYP2C9 Inibidor	- 0.317
CYP2C9 Substrato	--- 0.268
CYP2C19 Inibidor	--- 0.257
CYP2C19 Substrato	--- 0.246
CYP2D6 Inibidor	- 0.355
CYP2D6 Substrato	- 0.315
Toxicidade	
Bloqueador da hERG	+ 0,501
Hepatotoxicidade Humana	++ 0.89
Mutagenicidade (AMES)	--- 0.228
Sensibilidade da pele	--- 0.248
LD50	873.103 mg/kg
Lesão hepática induzida por medicamentos	+ 0.51
Dose diária máxima recomendada	- 0.424

Figura A 5. Resultados *in silico* do software SwissADME e ADMETLab para o composto **E** (ImACD).

Absorção	Im-ACD
Absorção Gastrointestinal (Swissadme)	Alto
Absorção intestinal Humana (ADMETlab)	++ 0.767 (85%)
Absorção células caco-2 (ADMETlab)	-4.634 cm/s
Disponibilidade Oral em Humanos (ADMETlab) -20% /30%	+0.618/0.58+
Substrato (swissADME/ADMETlab) glicoproteína-p	Não ---0.018
Inibidor da glicoproteína-p (ADMETlab)	Não --- 0.076
Absorção e Biodisponibilidade*	
Distribuição	Im-ACD
Permeabilidade pela BHE (swiss ADME e ADMETlab)	SIM +++ 0.977
Ligação a proteínas plasmáticas	67,910%
Volume de distribuição (ADMETlab)	0.299 L/kg
Ligação de proteínas plasmáticas*	
Volume de distribuição*	
Eliminação	Im-ACD
Meia Vida	1.836 h
Clearance	1.815mL/min/kg
Meia-vida*	
Clearance*	
Metabolismo	Im-ACD
CYP1A2 Inibidor	Não --- 0.055(0,5%)
CYP1A2 Substrato	+ 0.639
CYP3A4 Inibidor	--- 0.059
CYP3A4 Substrato	- 0.389
CYP2C9 Inibidor	--- 0.031
CYP2C9 Substrato	- 0,347
CYP2C19 Inibidor	--- 0.089
CYP2C19 Substrato	- 0.37
CYP2D6 Inibidor	--- 0.341
CYP2D6 Substrato	--- 0.381
Toxicidade	
Bloqueador da hERG	+ 0,55
Hepatotoxicidade Humana	++ 0.776
Mutagenicidade (AMES)	--- 0.286
Sensibilidade da pele	- 0.428
LD50	611.356 mg/kg
Lesão hepática induzida por medicamentos	+ 0.606
Dose diária máxima recomendada	+ 0.572

ANEXO B - ESPECTROS DE CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO

Figura B 1. Espectro de RMN ^1H do **Composto A (HEH)** em CDCl_3 , 200 MHz.

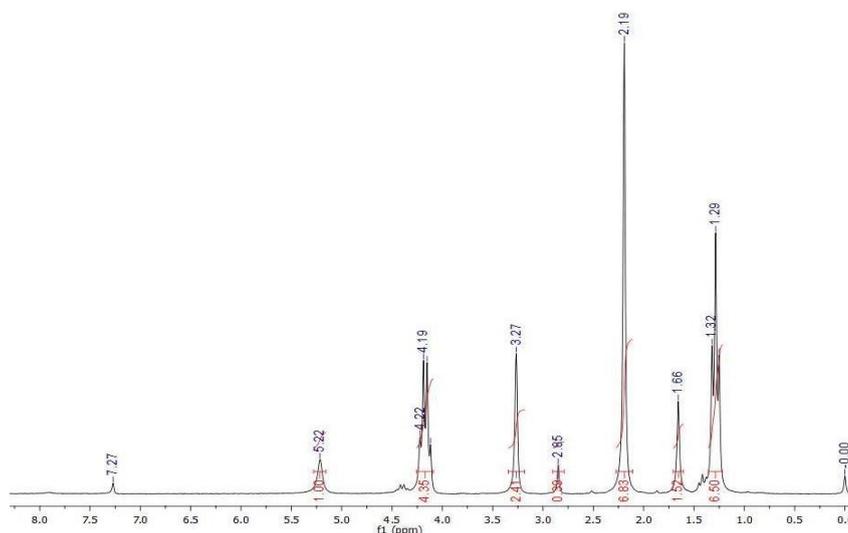


Figura B 2. Espectro de RMN de ^{13}C do **Composto A (HEH)** em CDCl_3 , 50MHz

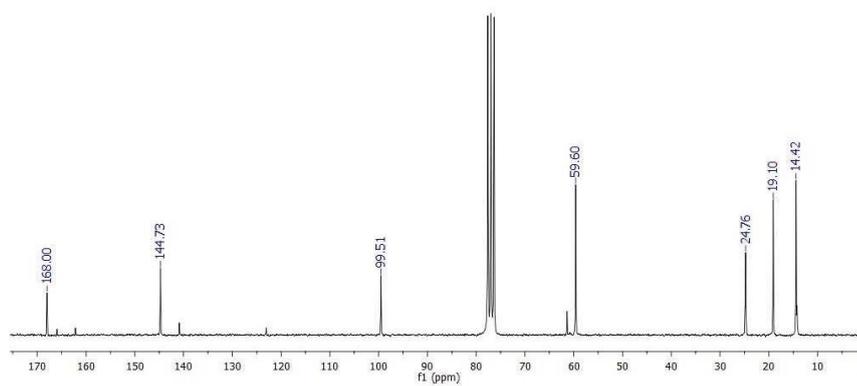


Figura B 5. Espectro de RMN¹H do **Composto C (ACD)** em DMSO, 400MHz.

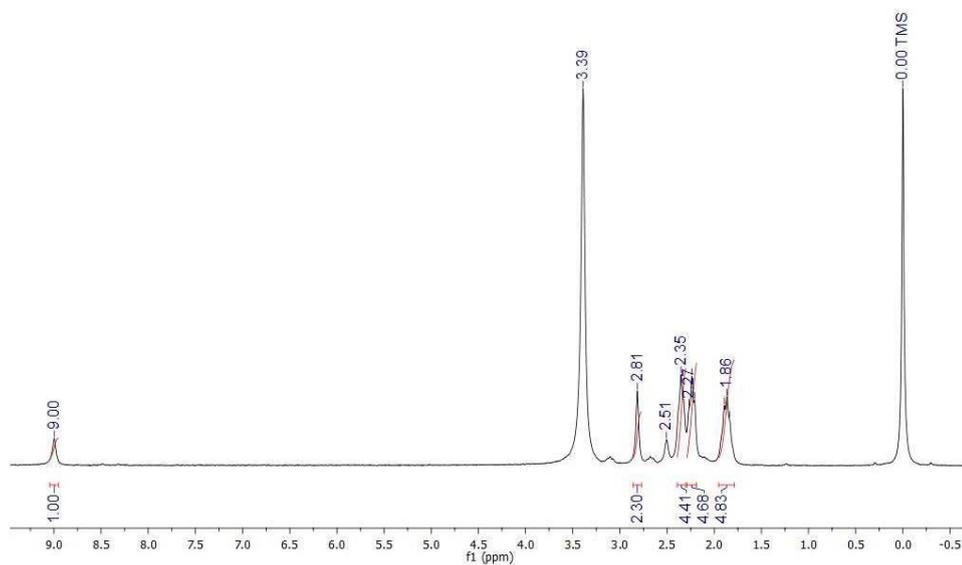


Figura B6. Espectro de RMN de ¹³C do **Composto C (ACD)** em DMSO, 50MHz

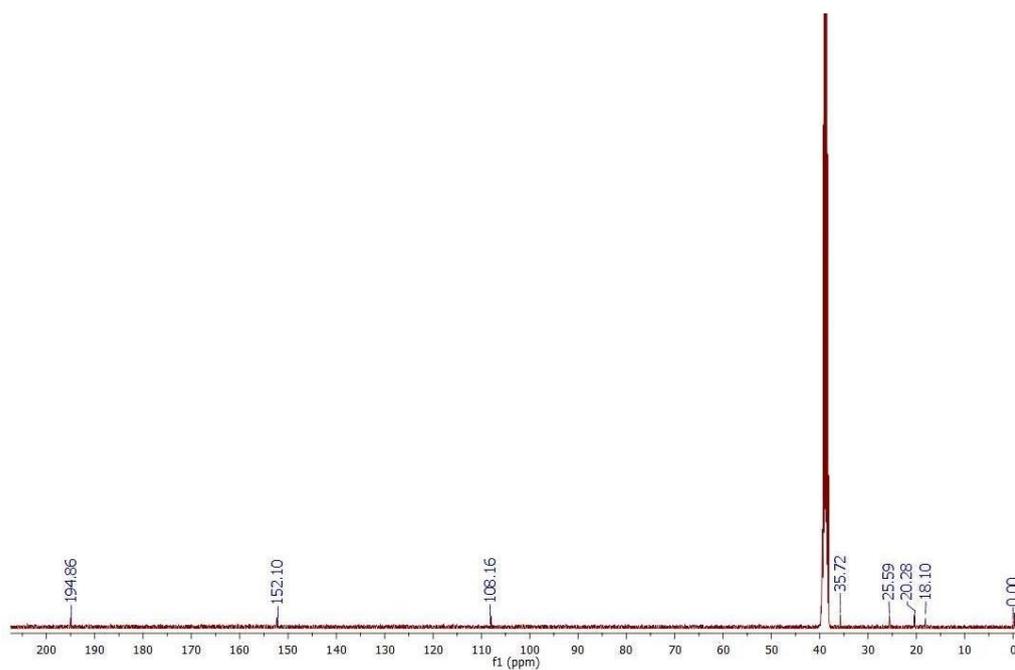


Figura B 7. Espectro de RMN ^1H do Composto D (ImPHQ) em DMSO, 400MHz.

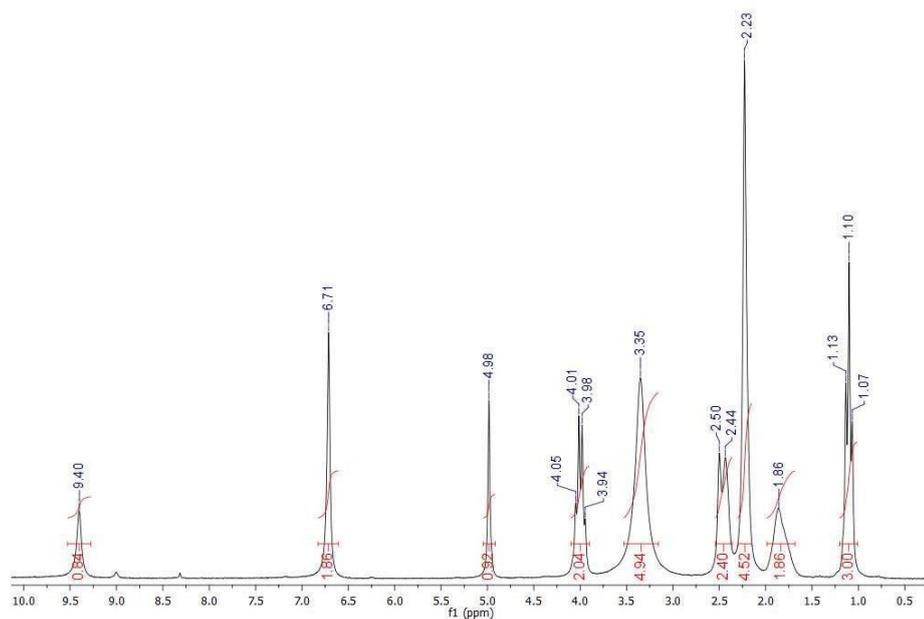


Figura B 8. Espectro de RMN ^{13}C do Composto D (ImPHQ) em DMSO, 400MHz.

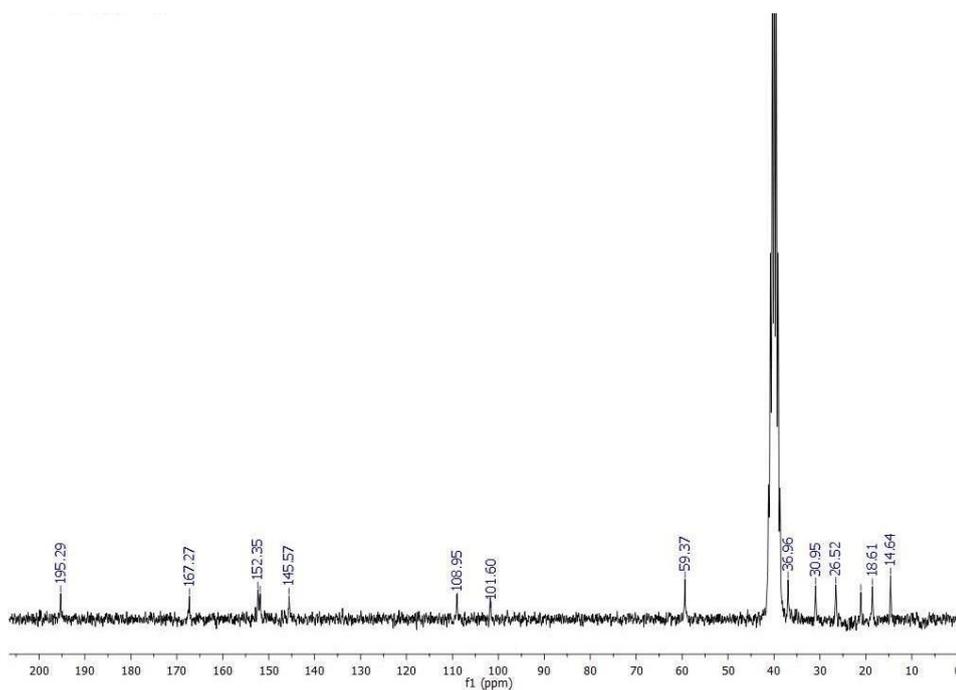


Figure B 9. Espectro de RMN ^1H do **Composto E (ImACD)** em DMSO (DCI), 400MHz.

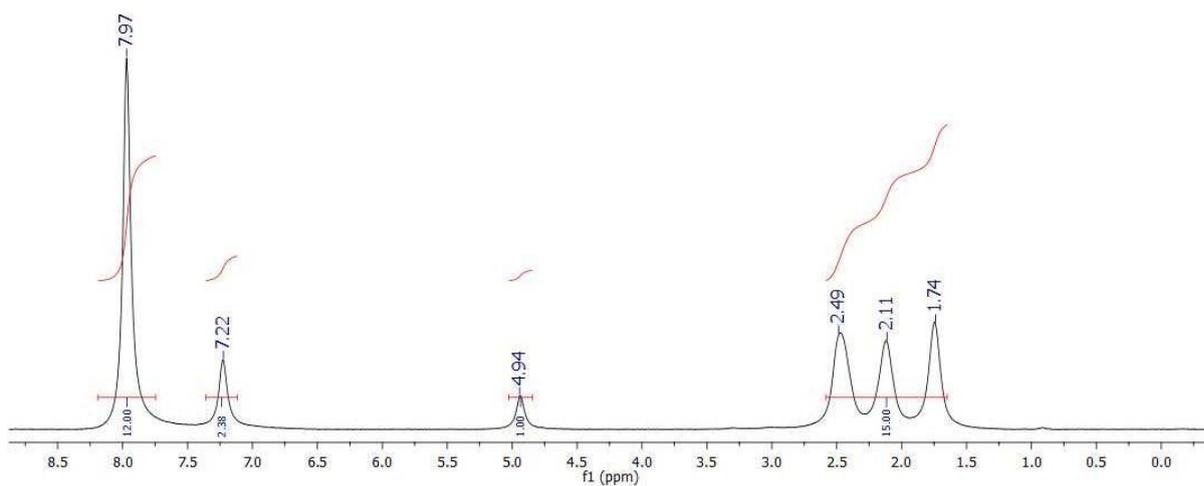
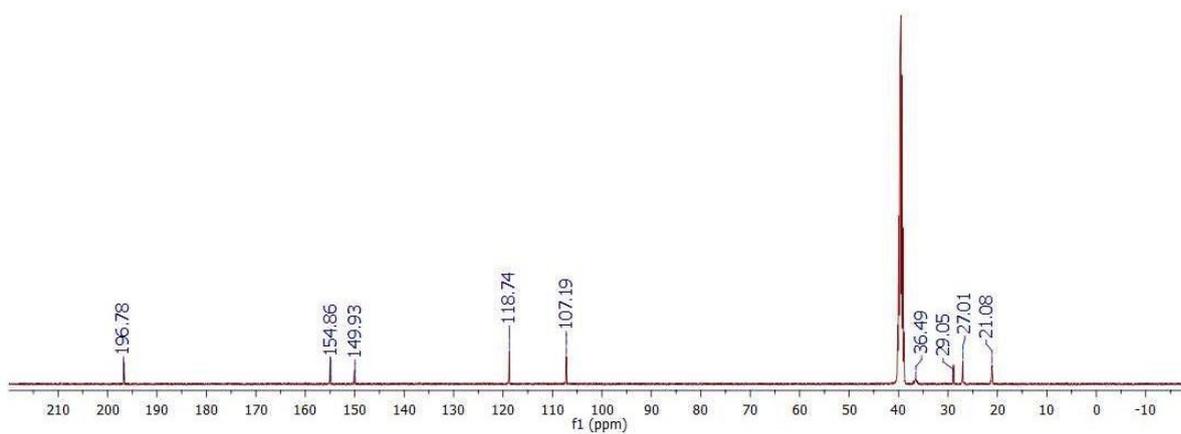


Figure B 10. Espectro de RMN ^{13}C do **Composto E (ImACD)** em DMSO (DCI), 400MHz.



ANEXO C – GRÁFICOS DO ESTUDO FOTOFÍSICO DOS DERIVADOS DO NÚCLEO DIHIDROPIRIDÍNICO

Figura C1. Curva de calibração para o **Composto A (HEH)** em etanol.

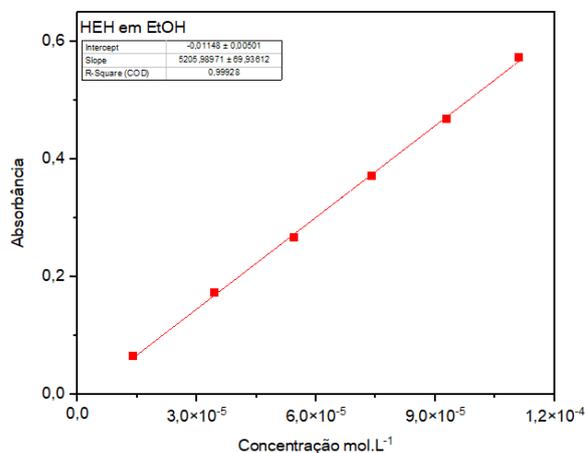


Figura C2. Curva de calibração para o **Composto B (PHQ)** em etanol.

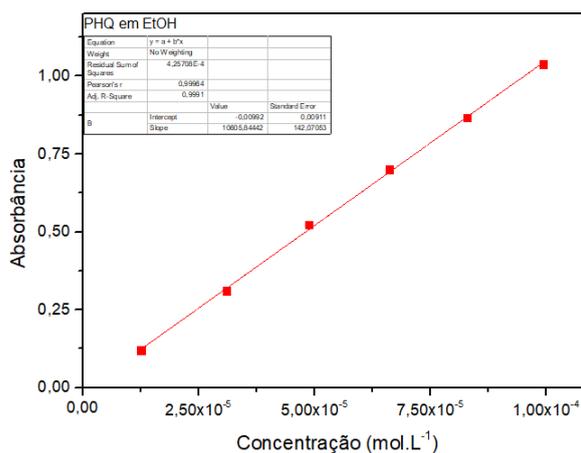


Figura C3. Curva de calibração para o **Composto C (ACD)** em etanol.

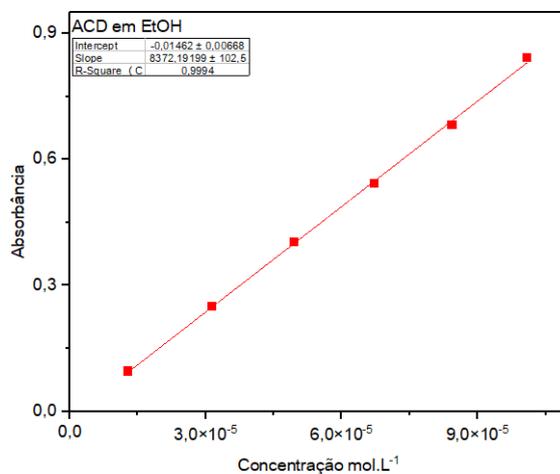


Figura C4. Curva de calibração para o **Composto D** (ImPHQ) em etanol.

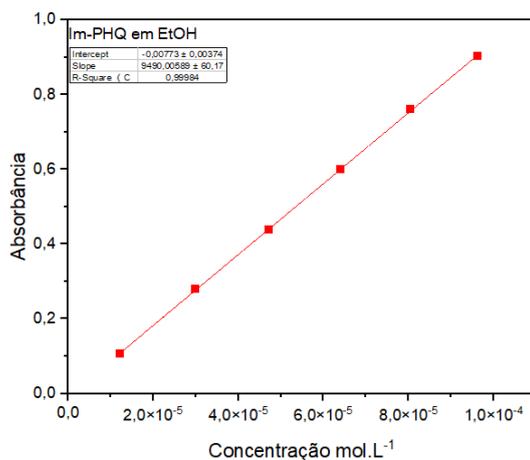


Figura C5. Curva de calibração para o **Composto E** (ImACD) em etanol.

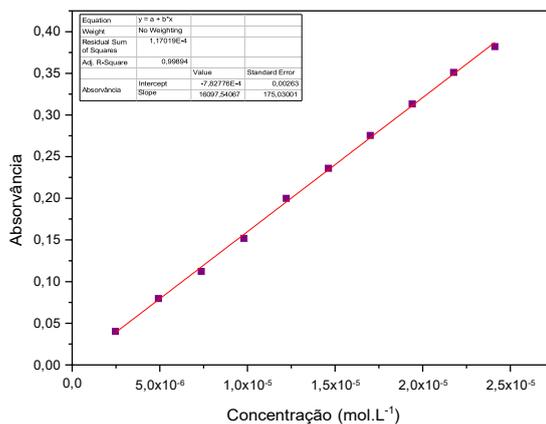


Figura C6. Curva de calibração para o **Composto A** (HEH) em DMSO.

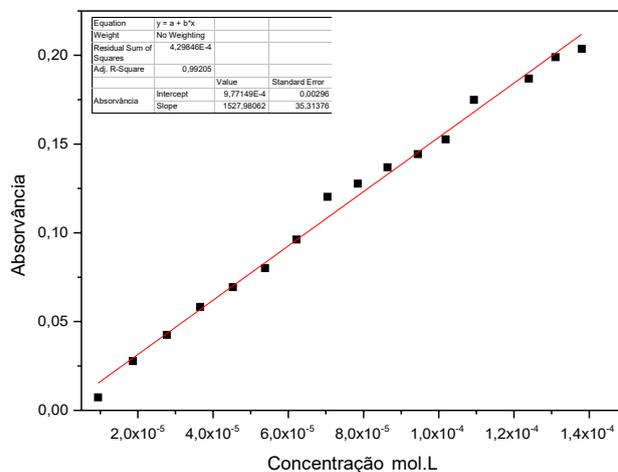


Figura C7. Curva de calibração para o **Composto B (PHQ)** em DMSO.

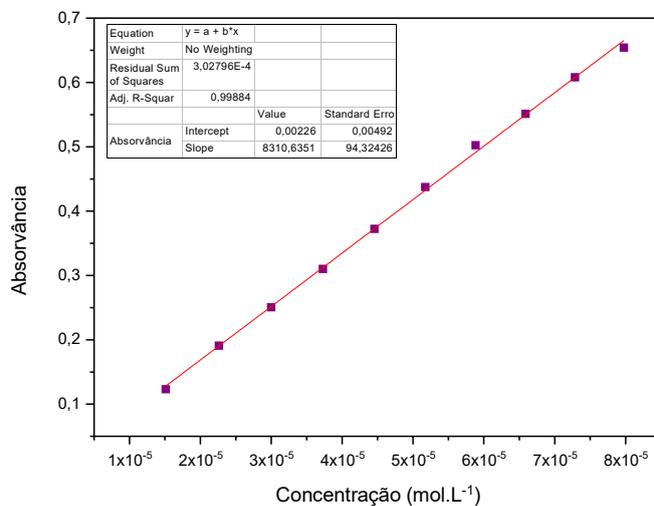


Figura C8. Curva de calibração para o **Composto C (ACD)** em DMSO.

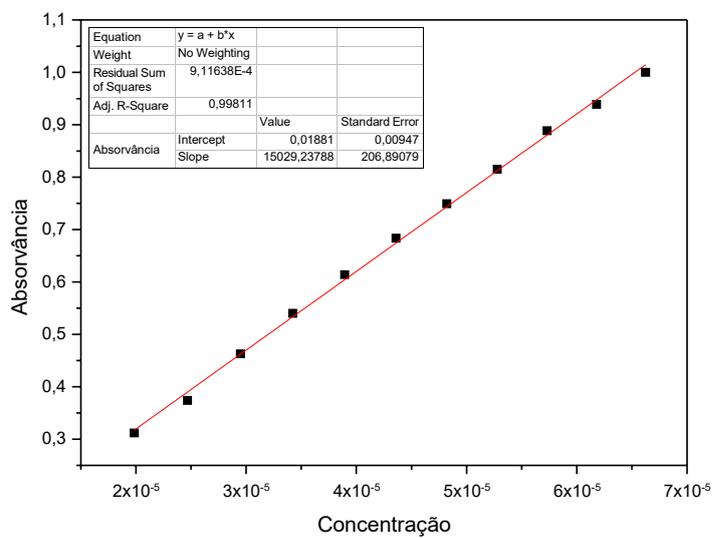


Figura C9. Curva de calibração para o **Composto D (ImPHQ)** em DMSO.

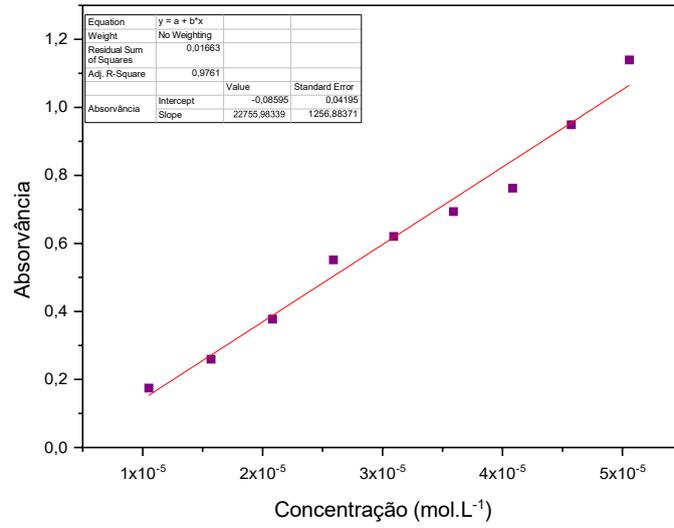


Figura C10. Curva de calibração para o **Composto E (ImACD)** em DMSO.

