



Universidade Federal do Rio de Janeiro

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
NOVOS ANÁLOGOS DO IMATINIBE**

Liviane Dias de Azevedo

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS ANÁLOGOS DO IMATINIBE

Liviane Dias de Azevedo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal)

Orientadoras: Dra. Núbia Boechat

Dra. Monica Macedo Bastos

Rio de Janeiro, RJ

Julho / 2015

" Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos
análogos do imatinibe "

LIVIANE DIAS DE AZEVEDO

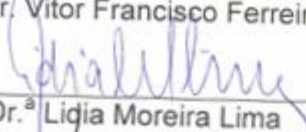
Orientadoras:

Prof.^a Dr.^a Nubia Boechat
Prof.^a Dr.^a Monica Macedo Bastos

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

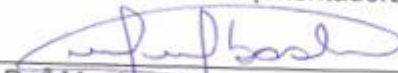

Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira


Prof.^a Dr.^a Lidia Moreira Lima


Prof. Dr. Floriano Paes Silva Junior


Prof. Dr. Daniel Tadeu Gomes Gonzaga (Revisor)


Prof.^aDr.^a Nubia Boechat (orientadora)


Prof.^a Dr.^a Monica Macedo Bastos (coorientadora)

Rio de Janeiro
28 de julho de 2015

Azevedo, Liviane Dias de.

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos análogos do imatinibe / Liviane Dias de Azevedo. – Rio de Janeiro : UFRJ/ICB, 2015.

xxxiii, 296 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Núbia Boechat e Monica Macedo Bastos.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ/ICB, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

Referências bibliográficas: f. 146-164.

1. Proteínas Tirosina Quinases - antagonistas e inibidores. 2. isatina - antagonistas e inibidores. 3. Leucemia Mielogênica Crônica BCR-ABL Positiva - quimioterapia. 4. Farmacologia e Química Medicinal -Tese. I. Boechat, Núbia. II. Bastos, Monica Macedo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Farmacologia e Química Medicinal. IV. Título.

RESUMO

O mesilato de imatinibe foi o primeiro representante da classe dos inibidores de tirosina quinase (ITK) Bcr-abl para o tratamento da leucemia mieloide crônica (LMC). Posteriormente, outros fármacos de segunda e terceira geração foram introduzidos na terapêutica, proporcionando um aumento da sobrevivência do paciente. No entanto, todos os ITK Bcr-abl têm apresentado mecanismos de resistência, exigindo a busca de novas opções terapêuticas. A isatina é um núcleo altamente versátil para a preparação de novas substâncias, e vários exemplos de ITK podem ser obtidos a partir dela. Este trabalho teve como objetivo o planejamento, a síntese, caracterização de novas substâncias e a sua avaliação antimieloproliferativa, frente a células da linhagem K562, que expressam a enzima tirosina quinase Bcr-abl constitutivamente ativa. Foram planejadas cinco moléculas híbridas, contendo o esqueleto FAP (fenil amino-pirimidina), principal fragmento farmacofórico do imatinibe, e a isatina; e dez análogos ao imatinibe. Estes novos compostos foram sintetizados através de metodologias simples, sendo obtidos com elevado grau de pureza. Ao todo, foram sintetizados vinte e cinco produtos, sendo dez intermediários e quinze novos ITK. Todos os novos inibidores foram avaliados frente às células K562. Os resultados indicaram que os híbridos foram inativos, e na série dos análogos ao imatinibe três moléculas se mostraram mais ativas, apresentando uma redução da viabilidade celular com valores entre 0,51 μM e 1,82 μM , sendo este valor próximo ao padrão imatinibe (0,27 μM). Os estudos teóricos de ancoramento molecular mostraram que todas as substâncias planejadas podem atuar como inibidores de tirosina quinase Bcr-abl, uma vez que realizaram interações semelhantes ao padrão nativo.

Palavras chave: leucemia mieloide crônica, imatinibe, FAP, inibidores de tirosina quinase e isatina.

ABSTRAT

Mesylate was the first representative of the class of tyrosine kinase inhibitors (ITK) Bcr-abl for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). Later, other drugs second and third generation were introduced in therapy, providing increased patient survival. However, all Bcr-abl ITK have shown resistance mechanisms, requiring the search for new therapeutic options. The isatin nucleus is a highly versatile for the preparation of new substances, and several examples of ITK can be obtained therefrom. This study aimed to planning, synthesis, characterization of new substances and their antimieloproliferativa assessment, compared to K562 cell line, which express the enzyme tyrosine kinase Bcr-abl constitutively active. Five hybrid molecules have been planned, containing the skeleton FAP (amino phenyl-pyrimidine), the main pharmacophore fragment of imatinib, and isatin; and ten similar to imatinib. These novel compounds were synthesized using simple methodologies and is obtained with high purity. Altogether twenty-five products were synthesized, ten and fifteen new intermediate ITK. All new inhibitors were tested against K562 cells. The results showed that hybrids were inactive, and the series of the analogs to imatinib three molecules were more active, a reduction of cell viability with values between 0.51 uM and 1.82 uM, this value being close to the standard imatinib (0.27 mM). Theoretical studies of molecular anchoring showed that all scheduled substances can act as inhibitors of tyrosine kinase Bcr-abl, since interactions conducted similar to the native pattern.

Keywords: chronic myeloid leukemia, imatinib, FAP, tyrosine kinase inhibitors and isatin.

“Assim como casas são feitas de pedras, a ciência é feita de fatos. Mas uma pilha de pedras não é uma casa e uma coleção de fatos não é, necessariamente, ciência”.

(Jules Henri Poincare)

“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.”

(Sócrates)

Márcio e Guilherme, por todo amor e compreensão.

Aos meus pais, que me ensinaram a ousar, questionar e acima de tudo ser curiosa. Muito curiosa.

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que, com certeza, deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a Dra. Núbia Boechat por aceitar me orientar mesmo me conhecendo, por acreditar que eu seria capaz de conciliar o meu trabalho com minha vida familiar. Agradeço, também, por ser um exemplo e um modelo de profissional no qual eu me inspiro. Espero poder continuar mantendo essa cumplicidade na nossa relação profissional.

As palavras seriam poucas para agradecer tudo que a Dra. Monica Macedo (mamy) fez e faz por mim. Desde de minha iniciação científica você abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor em que tudo faço e irei fazer daqui para frente. Tenho orgulho em dizer que sou sua orientada.

Agradeço ao meu esposo Márcio e meu filho Guilherme e meu enteado Douglas por serem compreensíveis e aceitarem minha ausência em muitos momentos. Meus pais e sogros agradeço por toda motivação e por serem em muitos momentos a “mãe” do meu filho, me substituindo durante etapas fundamentais para o seu desenvolvimento. Meu irmão Marcelo, meus cunhados Clara, Ricardo e Sandra, agradeço por todo apoio durante essa trajetória.

Aos meus amigos de laboratório agradeço por me proporcionarem o melhor ambiente em que uma pessoa pode trabalhar, cercado de aprendizados, companheirismo e muitas risadas. Agradeço as amigas e irmãs que essa experiência me proporcionou, Débora, Nathalia e Maria, por sempre estarem dispostas a me ajudarem e incentivarem, na alegria, na tristeza, na nota A e nota C. Obrigada também por me escutarem quando parecia que tudo iria dar errado e por sempre acreditarem em mim. Até quando eu mesma não acreditava que era capaz,

vocês nunca desistiram de mim. Para vocês um OBRIGADO do tamanho do mundo.

Aos doutores Samir, Edson e Claudinha, que estavam diariamente convivendo comigo e sempre dispostos a tirarem qualquer dúvida, por mais idiota que pudesse ser. A Sandrinha, uma amiga que eu aprendi a amar. Mesmo sem gostar de emprestar as coisas, afinal eu pegava da mesma forma. Agradeço a todos que estiveram e estão no laboratório de síntese I, em especial ao Luiz, Alcione, Daniel, João, Frederico, Luiz Felipe, Paula, Dona Lourdes, Rita, Carlinhos e ao Evanoel, também a equipe do lab da alegria, Raiane, Yasmin, Camila, Mayara, Guiliana, Carolina, Jéssica, Talita, Andressa, Fernanda, Wagner, Fábio, Aninha, Cris e Victor. À todos da secretaria, muito obrigada por serem tão prestativos, em especial um muito obrigada para Dona Lúcia e Dona Bruna. A Vanderleia, por todo seu jeito irreverente de ser.

À Farmanguinhos que me proporcionou excelente infraestrutura, possibilitando a realização desse trabalho. À Eliane e todos da Central Analítica de Farmanguinhos.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro e a todo o corpo docente do programa de Pós Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, obrigada por todo ensinamento.

Aos doutores Thadeu Estevam, Raquel Maia e Flávia Vasconcelos, pela realização das avaliações biológicas.

À Dra. Carla Menezes pelo estudo de modelagem molecular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante o curso e a agência de fomento CAPES, pelo suporte financeiro e FAPERJ.

À banca avaliadora por ter aceito o convite.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
ÍNDICE DE QUADROS	xxiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxv
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. Leucemia	2
1.3. Leucemia Mieloide Crônica (LMC)	3
1.3.1. Aspectos Epidemiológicos	3
1.3.2. Características Moleculares	3
1.3.3. Características Clínicas da LMC	5
1.3.4. Tratamento	7
1.4. Inibidores de Tirosina Quinase	13
1.4.1. Imatinibe	14
1.4.1.1. Mecanismos de Resistência	16
1.4.2. Dasatinibe (7)	17
1.4.3. Nilotinibe (8)	17
1.4.4. Bosutinibe (9)	18
1.4.5. Ponatinibe (10)	19
1.5. 2,3-Dioxoindóis: As Isatinas	20
1.5.1. Reações para a Preparação de Isatinas	24
1.6. Compostos Organofluorados Usados como Inibidores de Tirosina Quinase (ITK)	26
2. OBJETIVOS	28
	xi

2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	29
3. PLANEJAMENTO E JUSTIFICATIVAS	30
3.1. Planejamento dos Compostos da Primeira Série 46a-e	30
3.2. Planejamento dos análogos do imatinibe 47a-e	33
3.3. Planejamento dos análogos do imatinibe 48a-e	36
4. METODOLOGIA	39
4.1. Metodologia sintética para a preparação das moléculas inéditas (46-48a-e)	39
4.2. Metodologia de avaliação do perfil biológico em células da linhagem K562 e K562 Lucena.	40
4.2.1. Ensaio de Viabilidade Celular através do método de MTT	41
4.3. Metodologia de avaliação in silico dos compostos planejados	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Síntese	44
5.1.1. Síntese das moléculas da Primeira Série 46a-e	47
5.1.2. Síntese das moléculas da Segunda Série 47a-e	61
5.1.3. Síntese das moléculas da Terceira Série 48a-e	74
5.2. Avaliação Biológica	86
5.2.1. Ensaios de Citotoxicidade na linhagem K562 E K562 Lucena	87
5.2.2. Ensaios de Citotoxicidade	94
5.3. Estudo da Relação Estrutura Atividade (REA)	97
5.3.1. Relação Estrutura Atividade dos Compostos da Primeira série 46a-e	99
5.3.2. Relação Estrutura Atividade dos Compostos da Segunda Série	100

47a-e	
5.3.3. Relação Estrutura Atividade dos Compostos da Terceira Série 48a-e	104
5.4. Estudo de Ancoramento Molecular dos compostos 46-48a-e	105
5.4.1. Estudo de Ancoramento Molecular na Proteína 2HYY	106
5.4.2. Estudo de Ancoramento Molecular na Proteína PDB ID 3G0E	117
5.4.3. Conclusões do Estudo de Ancoramento Molecular	122
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	124
7. EXPERIMENTAL	126
7.1. Solventes e reagentes	126
7.2. Instrumentação	126
7.3. Obtenção dos Produtos Finais 46a-e	128
7.3.1. 3-(4-metil-3-(4-(piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)fenilimino)indolin-2-ona (46a)	128
7.3.2. 5-metil-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)2-ona (46b)	129
7.3.3. 5-fluor-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)indolin-2-ona (46c)	130
7.3.4. 5-cloro-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)indolin-2-ona (46d)	131
7.3.5. 5-bromo-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)indolin-2-ona (46e)	132
7.4. Obtenção de N-acetilisatinas (50a-e)	132
7.4.1. 1-acetilisatina (50a)	133
7.4.2. 1-acetil-5-metilisatina (50b)	133

7.4.3. 1-acetil-5-fluorisatina (50c)	133
7.4.4. 1-acetil-5-cloroisatina (50d)	133
7.4.5. 1-acetil-bromoisatina (50e)	134
7.5. Obtenção dos Produtos Finais 47a-e	134
7.5.1. 2-(2-acetamidafenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47a)	135
7.5.2. 2-(2-acetamida-5-metilfenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47b)	135
7.5.3. 2-(2-acetamida-5-fluorfenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47c)	136
7.5.4. 2-(2-acetamida-5-clorofenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47d)	137
7.5.5. 2-(2-acetamida-5-bromofenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47e)	138
7.6. Obtenção de 1-acetil-3,3-Difluoro-2-oxoindóis (51a-e)	139
7.6.1. 1-acetil-3,3-difluoroindolin-2-ona (51a)	139
7.6.2. 1-acetil-3,3-difluoro-5-metilindolin-2-ona (51b)	139
7.6.3. 1-acetil-3,3,5-trifluoroindolin-2-ona (51c)	140
7.6.4. 1-acetil-5-cloro-3,3-difluoroindolin-2-ona (51d)	140
7.6.5. 1-acetil-5-bromo-3,3-difluoroindolin-2-ona (51e)	140
7.7. Obtenção dos produtos finais 48a-e	140
7.7.1. 2-(2-acetamidofenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48a)	141
7.7.2. 2-(2-acetamida-5-metilfenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48b)	142
7.7.3. 2-(2-acetamida-5-fluorfenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-	143

il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48c)

7.7.4. 2-(2-acetamida-5-clorofenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48d) 144

7.7.5. 2-(2-acetamida-5-bromofenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48e) 145

BIBLIOGRAFIA

146

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reações mais comuns a partir de isatinas para a síntese de outras classes de compostos.	21
Esquema 2. Método de Sandmeyer.	24
Esquema 3. Metodologia de síntese de derivados de isatinas a partir de nitroacetanilidas 32 .	25
Esquema 4. Método de Stolle.	25
Esquema 5. Síntese de Martinet.	26
Esquema 6: Metodologia para obtenção das moléculas 46-47a-e .	40
Esquema 7. Rota sintética desenvolvida por Zimmermann e colaboradores para a síntese do esqueleto FAPP.	45
Esquema 8. Rota sintética desenvolvida por Liu e colaboradores.	46
Esquema 9. Rota sintética desenvolvida por Boechat e colaboradores para a síntese do esqueleto FAPP.	46
Esquema 10. Síntese de iminas através do método descrito por Zari e colaboradores.	47
Esquema 11. Método descrito por Ikotun e colaboradores para a obtenção de iminas.	48
Esquema 12. Obtenção de iminas a partir da metodologia descrita por Shah e colaboradores.	48
Esquema 13. Metodologia sintética empregada para obtenção dos compostos 46a-e .	50
Esquema 14. Rota sintética empregada para a obtenção dos compostos da segunda série 47a-e .	62
Esquema 15. <i>N</i> -acetilação das isatinas 13a-e .	63

Esquema 16. Proposta de fragmentação para os espectros de CG-EM dos derivados <i>N</i> -acetilados 50a-e .	64
Esquema 17. Reações de abertura das <i>N</i> -acetilisatinas 50a-e para a formação dos compostos da segunda série 47a-e .	65
Esquema 18. Rota sintética empregada para a obtenção dos compostos da terceira série 48a-e .	75
Esquema 19. Reação de desoxofluoração das <i>N</i> -acetilisatinas 50a-e com DAST.	76
Esquema 20. Proposta de fragmentação para os compostos 51a-e .	76
Esquema 21. Reações de abertura das 1-acetil-3,3-difluoroindolin-2-ona 51a-e .	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromossomo Philadelphia (Ph) - resultado da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (t(9:22)). Após a translocação, é formado o cromossomo 9 com o braço mais longo e o cromossomo 22 com o braço mais curto. O cromossomo 22 encurtado é descrito como o cromossomo Ph.	4
Figura 2. Estrutura química da quinina (1).	9
Figura 3. Estrutura química da mostarda nitrogenada (2) e do bussulfano (3).	10
Figura 4. Estrutura química da hidroxiuréia (4) e da citarabina (5).	12
Figura 5. Inibidores de tirosina quinase de primeira, segunda e terceira geração disponíveis para uso.	13
Figura 6. Estrutura da tirfostina (11) e do esqueleto (FAP;12).	14
Figura 7. Mecanismo de ação da Bcr-abl, e sua inibição promovida pelo imatinibe.	15
Figura 8. Estrutura química da isatina (13)	20
Figura 9. Estrutura das moléculas planejadas.	28
Figura 10. Planejamento dos compostos da primeira série 46a-e .	31
Figura 11. Planejamento dos análogos do imatinibe 47a-e .	34
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H (400,00 Hz; CD ₂ Cl ₂) do composto 46d , mostrando a formação dos isômeros na proporção 7:3.	49
Figura 13. Análise de COSY do composto 46c .	52
Figura 14. Análise de HSQC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d ₆) e expansão de RMN ¹³ C (100,0 MHz; DMSO-d ₆) do composto 46c .	53
Figura 15. Análise de HMBC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d ₆) do composto 46c , correlações dos hidrogênios da metila com os carbonos.	54

Figura 16. Análise de HSQC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d ₆) para o produto 46c , mostrando a correlação entre o carbono em 131,3 ppm com o hidrogênio em 7,39 ppm.	55
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H (400,00 Hz; DMSO-d ₆) do composto 46d , mostrando a duplicação dos sinais na proporção 9:1.	60
Figura 18. Análise de COSY (400,00 MHz; DMSO- d ₆) do composto 47a .	67
Figura 19. Análise de HSCQ (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d ₆) do composto 47a .	68
Figura 20. Análise de HMBC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d ₆) do composto 47a .	69
Figura 21. Análise de COSY (400,00 MHz, DMSO-d ₆) para o composto 48d .	79
Figura 22. Análise de HSQC (400,00/100,0 MHz, DMSO-d ₆) para o composto 48d .	80
Figura 23. Análise de HMBC (400,00/100,0 MHz, DMSO-d ₆) do composto 48d .	81
Figura 24. Identificação dos hidrogênios e carbonos do composto 48d por COSY, HSQC e HMBC.	81
Figura 25. Efeito dos compostos 46a-e e do imatinibe na viabilidade celular em linhagem de K562.	88
Figura 26. Efeito dos compostos 47a-e e do imatinibe na viabilidade celular em linhagem de K562.	90
Figura 27. Efeito dos compostos 47a-e e do imatinibe na viabilidade celular em linhagem de K562-Lucena 1.	91
Figura 28. Efeito dos compostos 48a-e e do imatinibe na viabilidade celular em linhagem K562.	93
Figura 29. Gênese estrutural do imatinibe (6).	99

Figura 30. Relação estrutura atividade do imatinibe <i>versus</i> os compostos da primeira série 46a-e .	100
Figura 31. Relação estrutura atividade do imatinibe <i>versus</i> os compostos da segunda série 47a-e .	103
Figura 32. Relação estrutura atividade do imatinibe <i>versus</i> os compostos da terceira série 48a-e .	104
Figura 33. Moléculas usadas nos estudos de ancoramento molecular.	106
Figura 34. A. Representação do ligante cocrystalizado STI-575 (carbono na cor verde) e do imatinibe reancorado (carbono na cor azul ciano) no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza) (à esquerda). Sobreposição do imatinibe reancorado ao STI-575 com ilustração das interações com resíduos do sítio ativo da proteína (à direita). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco) e enxofre (amarelo). B. Diagramas bidimensionais ilustrativos da interação STI-575 (à esquerda) e do imatinibe reancorado (à direita) no sítio ativo da proteína.	108
Figura 35. A. Sobreposição atômica do Z-46d (carbono na cor laranja) e E-46d (carbono na cor amarelo) ao STI-575 (carbono na cor verde) com ilustração de interações com resíduos do sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza). Cores dos demais átomos: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), cloro (verde claro) e enxofre (amarelo). B. Diagrama bidimensional ilustrativo da interação do Z-46d no sítio ativo da proteína.	110
Figura 36. A. Sobreposição atômica do E-46a M01R01 (carbono na cor amarelo claro) e E-46a M02R01 (carbono na cor marrom) ao STI-575 (carbono na cor verde) com ilustração de interações com resíduos no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco) e enxofre (amarelo). B. Diagrama bidimensional ilustrativo da interação do E-46a M01R01 no sítio ativo da proteína.	111

Figura 37. A. Sobreposição atômica das conformações **M01R01** de **47a** (carbono na cor magenta), **47c** (carbono na cor verde claro), **47d** (carbono na cor laranja), **47e** (carbono na cor azul escuro) e **47b** (carbono na cor marrom) e do **47e-M01R05** (carbono na cor azul claro) ao STI-575 (carbono na cor verde) com ilustração de interações com resíduos no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), flúor (azul claro), cloro (verde claro), bromo (rosa claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagrama bidimensional ilustrativo da interação do **47d-M01R01** no sítio ativo da proteína. 113

Figura 38. A. Sobreposição atômica do **48d-M01R02** (carbono na cor rosa escuro) e ao **48d-M01R01** (carbono na cor azul claro) ao STI-575 (carbono na cor verde) no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), cloro (verde claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagramas bidimensionais da interação do **48d-M01R02** (à esquerda) e do **48d-M01R01** (à direita) com resíduos do sítio ativo da proteína. 116

Figura 39. A. Representação do ligante co-cristalizado B49 (carbono na cor verde) e da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe reancorada (carbono na cor azul ciano) no sítio ativo da proteína código PDB ID 3G0E (em cinza) (à esquerda). A sobreposição atômica da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe reancorada ao B49 (à direita). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), flúor (azul claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagrama bidimensional ilustrativo da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe reancorada com resíduos do sítio ativo da proteína. 119

Figura 40. A. Sobreposição atômica do **Z-46a** (carbono na cor magenta) e **E-46a** (carbono na cor amarela) ao B49 (carbono na cor verde) no sítio ativo da proteína código PDB ID 3G0E. Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), flúor (azul claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagramas bidimensionais da interação do **Z-46a** (à esquerda) e do **E-46a** (à direita) com resíduos do sítio ativo da proteína. 121

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Definição dos tipos de respostas esperadas no tratamento da LMC, exames de monitoramento, classificação das respostas e períodos em que devem ser avaliados.	8
Tabela 2. Estrutura, massa molar, doadores de ligação de hidrogênio (GLH), aceptores de ligação de hidrogênio e LogP calculado dos derivados planejados 46a-e .	32
Tabela 3. Estrutura, massa molar, doadores de ligação de hidrogênio (GLH), aceptores de ligação de hidrogênio e LogP calculado dos derivados planejados 47a-e .	35
Tabela 4. Estrutura, massa molar, doadores de ligação de hidrogênio (GLH), aceptores de ligação de hidrogênio e LogP calculado dos derivados planejados 48a-e .	37
Tabela 5. Dados de ponto de fusão, EM-IES e IV dos produtos finais 46a-e .	51
Tabela 6. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹ H dos produtos finais 46a-e .	56
Tabela 7. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹³ C e ¹⁹ F dos produtos finais 46a-e .	58
Tabela 8. Resultados de EMAR e CLAE para os compostos 46a-e .	61
Tabela 9. Dados de ponto de fusão, EM-IES e IV dos produtos finais 47a-e .	66
Tabela 10. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹ H dos produtos finais 47a-e .	70
Tabela 11. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹³ C, ¹⁹ F dos produtos finais 47a-e .	71
Tabela 12. Resultados de EMAR e CLAE para os compostos 47a-e .	73

Tabela 13. Dados de ponto de fusão, EM-IES e IV dos produtos finais 48a-e .	78
Tabela 14. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹ H dos produtos finais 48a-e .	82
Tabela 15. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹ H dos produtos finais 48a-e .	84
Tabela 16. Resultados de EMAR e CLAE para os compostos 48a-e .	86
Tabela 17. Efeito dos compostos 46a-e e do imatinibe na viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774A.	94
Tabela 18. Efeito dos compostos 47a-e e do imatinibe na viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774A.	96
Tabela 19. Efeito dos compostos 48a-e e do imatinibe na viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774A.	97
Tabela 20. Parâmetros biológicos e RM dos substituintes utilizados neste trabalho.	102
Tabela 21. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, e indicação do comportamento de sobreposição das conformações do reancoramento do imatinibe e dos compostos da primeira série 46a , 46d e 46b na proteína código PDB ID 2HYY.	109
Tabela 22. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, e indicação do comportamento da sobreposição das conformações do reancoramento do imatinibe e dos compostos da segunda série 47a-e na proteína código PDB ID 2HYY.	112
Tabela 23. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, e indicação do comportamento da sobreposição das conformações do reancoramento do imatinibe e dos compostos da terceira série 48a-e na proteína código PDB ID 2HYY.	115
Tabela 24. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, indicação do comportamento de sobreposição das conformações do reancoramento da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe dos compostos 46a-e na proteína código PDB ID 3G0E.	117

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de substâncias bioativas obtidas a partir da isatina.	22
Quadro 2. Exemplos de ITK contendo o átomo de flúor.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- δ - Deslocamento Químico
- μM – Micro Molar
- Abl – Abelson
- ATP – Adenosina trifosfato
- Bcr - Breakpoint cluster region
- CC₅₀ – Concentração Citolóxica para 50%
- CCF – Cromatografia em Camada Fina
- CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de Massas
- CH₂Cl₂ - diclorometano
- CHCl₃ – Clorofórmio
- Cl₅₀ – Concentração inibitória necessária para reduzir 50% da atividade biológica (*IC₅₀ – Inhibitory Concentration*)
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- cLogP – Logaritmo do Coeficiente de partição de um composto entre água e octanol para medir sua lipofilicidade
- DAST - Dietilaminotrifluoreto de Enxofre
- DRM - Doença residual mínima
- DNA - Desoxirribonucleicos
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução
- EM-IES – Espectrometria de massas com ionização por *Eletrospray*
- eq – equivalente

FA – Fase acelerada

FB – Fase blástica

FC – Fase crônica

FDA – Órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêuticos

(Food and Drug Administration)

HTS - High-throughput screening

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ITK – Inibidores de tirosina quinase

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

LLA - Leucemia Linfoide Aguda

LLC - Leucemia Linfoide Crônica

LMC - Leucemia Mieloide Crônica

n - índice de refração do composto à 20 °C

p.f. – Ponto de Fusão

Ph – Philadelphia

PM – Peso molecular

ppm – Partes por Milhão

r – densidade a 20 °C

RCC - Resposta citogenética completa

REA - Relação estrutura atividade

RHC – Resposta hematológica completa

RM - Resposta molecular

RM – Refratividade molar

RMC – Resposta molecular completa

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear para o núcleo de carbono

RMN ^{19}F - Ressonância Magnética Nuclear para o núcleo de flúor

RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear para o núcleo de hidrogênio

Obs: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam desta relação encontram-se descritas no texto ou são convenções conhecidas.

ANEXO DE ESPECTROS

Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 46a	1
Espectro de IV da molécula 46a	2
Espectro de RMN ¹ H da molécula 46a	3
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 46a	4
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 46a	5
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 46a	6
Cromatograma da molécula 46a	7
Espectro de (EM-IES [M+Na] ⁺) da molécula 46b	8
Espectro de IV da molécula 46b	9
Espectro de RMN ¹ H da molécula 46b	10
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 46b	11
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 46b	12
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 46b	13
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 46b	14
Cromatograma da molécula 46b	15
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 46c	16
Espectro de IV da molécula 46c	17
Espectro de RMN ¹ H da molécula 46c	18
Expansões do espectro de RMN ¹ H da molécula 46c	19
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 46c	20
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 46c	21
Espectro de RMN ¹⁹ F da molécula 46c	22

Espectro de RMN de 2D-COSY da molécula 46c	23
Expansões do espectro de RMN de 2D-COSY da molécula 46c	24
Espectro e expansão de RMN de HSQC da molécula 46c	25
Espectro de RMN de 2D-HMBC da molécula 46c	26
Expansão do espectro de RMN de 2D-HMBC da molécula 46c	27
Cromatograma da molécula 46c	28
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 46d	29
Espectro de IV da molécula 46d	30
Espectro de RMN ¹ H da molécula 46d	31
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 46d	32
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 46d	33
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 46d	34
Cromatograma da molécula 46d	35
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 46e	36
Espectro de IV da molécula 46e	37
Espectro de RMN ¹ H da molécula 46e	38
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 46e	39
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 46e	40
Cromatograma da molécula 46e	41
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 50a	42
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 50b	43
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 50c	44
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 50d	45

Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 50e	46
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 47a	47
Espectro de IV da molécula 47a	48
Espectro de RMN ¹ H da molécula 47a	49
Expansões do espectro de RMN ¹ H da molécula 47a	50
Expansões do espectro de RMN ¹ H da molécula 47a	51
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 47a	52
Espectro e expansão de RMN de 2D-COSY da molécula 47a	53
Espectro e expansão de RMN de 2D-HSQC da molécula 47a	54
Espectro e expansão de RMN de 2D-HMBC da molécula 47a	55
Cromatograma da molécula 47a	56
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 47b	57
Espectro de IV da molécula 47b	58
Espectro de RMN ¹ H da molécula 47b	59
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 47b	60
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 47b	61
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 47b	62
Cromatograma da molécula 47b	63
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 47c	64
Espectro de IV da molécula 47c	65
Espectro de RMN ¹ H da molécula 47c	66
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 47c	67
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 47c	68

Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 47c	69
Espectro de RMN ¹⁹ F da molécula 47c	70
Cromatograma da molécula 47c	71
Espectro de (EM-IES [M+Na] ⁺) da molécula 47d	72
Espectro de IV da molécula 47d	73
Espectro de RMN ¹ H da molécula 47d	74
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 47d	75
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 47d	76
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 47d	77
Cromatograma da molécula 47d	78
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 47e	79
Espectro de IV da molécula 47e	80
Espectro de RMN ¹ H da molécula 47e	81
Expansões do espectro de RMN ¹ H da molécula 47e	82
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 47e	83
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 47e	84
Cromatograma da molécula 47e	85
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 51a	86
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 51b	87
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 51c	88
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 51d	89
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário 51e	90
Espectro de (EM-IES [M+Na] ⁺) da molécula 48a	91

Espectro de IV da molécula 48a	92
Espectro de RMN ¹ H da molécula 48a	93
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 48a	94
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 48a	95
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 48a	96
Espectro de RMN ¹⁹ F da molécula 48a	97
Cromatograma da molécula 48a	98
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 48b	99
Espectro de IV da molécula 48b	100
Espectro de RMN ¹ H da molécula 48b	101
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 48b	102
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 48b	103
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 48b	104
Espectro de RMN ¹⁹ F da molécula 48b	105
Cromatograma da molécula 48b	106
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 48c	107
Espectro de IV da molécula 48c	108
Espectro de RMN ¹ H da molécula 48c	109
Expansões do espectro de RMN ¹ H da molécula 48c	110
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 48c	111
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 48c	112
Espectro de RMN ¹⁹ F da molécula 48c	113
Cromatograma da molécula 48c	114

Espectro de (EM-IES [M+Na] ⁺) da molécula 48d	115
Espectro de IV da molécula 48d	116
Espectro de RMN ¹ H da molécula 48d	117
Expansão do espectro de RMN ¹ H da molécula 48d	118
Espectro e expansão de RMN ¹³ C da molécula 48d	119
Espectro de RMN de ¹⁹ F molécula 48d	120
Espectro e expansão do de RMN de 2D-COSY da molécula 48d	121
Espectro e expansão de RMN de 2D-HSQC da molécula 48d	122
Espectro e expansão de RMN de 2D-HMBC da molécula 48d	123
Cromatograma da molécula 48d	124
Espectro de (EM-IES [M-1] ⁺) da molécula 48e	125
Espectro de IV da molécula 48e	126
Espectro de RMN ¹ H da molécula 48e	127
Expansões do espectro de RMN ¹ H da molécula 48e	128
Espectro de RMN ¹³ C da molécula 48e	129
Expansão do espectro de RMN ¹³ C da molécula 48e	130
Espectro de RMN ¹⁹ F da molécula 48e	131
Cromatograma da molécula 48e	132

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico para denominar um grande grupo de doenças que tem em comum o crescimento desordenado das células. Uma característica do câncer é a multiplicação rápida de células anormais, que se estendem para além dos seus limites habituais e podem invadir partes adjacentes do corpo ou se espalhar para outros órgãos, sendo esse processo conhecido como metástase (INCA, 2015a).

Ele é um dos principais causadores de morte no mundo, sendo responsável por 22% do total, em 2012. Aproximadamente 30% das causas de câncer são devido a quatro principais fatores de risco: alto índice de massa corporal, redução da ingestão de frutas e legumes, falta de atividade física, elevado consumo de tabaco e de álcool (WHO, 2015). No Brasil, as previsões apontam para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos, em 2015 (INCA, 2015b).

As neoplasias estão incluídas em um grupo chamado de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Em 2011, o governo implementou o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das DCNT para o período de 2011-2022. Esse plano define e prioriza as ações e os investimentos necessários para preparar o país para enfrentar as DCNT nos próximos anos (PORTAL SAÚDE, 2015).

O Globocan é um projeto da Organização Mundial da Saúde (OMS) que visa coletar, organizar e divulgar dados estimativos da incidência e mortalidade dos tipos mais comuns de câncer no mundo. De acordo com esse programa, em 2012, a incidência anual dos tipos de câncer com maior ocorrência de óbitos na população mundial são: pulmão, com 1,6 milhões; fígado com 745 mil; estômago com 723 mil; colo retal, com 693 mil; mama, com 521 mil; esôfago, com 400 mil; pâncreas, com 330 mil; próstata, com 307 mil; leucemias e colo de útero com 265 mil cada (IARC, 2015).

1.2. Leucemia

O termo leucemia origina-se do grego e significa sangue branco (CONTRAN, 2000). É uma neoplasia que tem como característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, as quais substituem as células sanguíneas normais (INCA, 2015c). No Brasil, em 2011 o número de óbitos relacionados a esta neoplasia chegou em 6.187, sendo 3.277 homens e 2.910 mulheres. Para 2015, estima-se que esse número aumente para 9.370, sendo 5.050 homens e 4.320 mulheres (INCA, 2015b).

A leucemia é classificada de acordo com o tipo de célula acometida e com a velocidade de progressão da doença (FAUCI *et. al.*, 2008). Se as células afetadas forem linfoides ou linfócitos é denominada leucemia linfoide. Quando o alvo são as células mieloides (células que mais tarde se transformam em eritrócitos, leucócitos e megacariócitos) é denominada leucemia mieloide (INCA, 2015c). De acordo com a progressão da doença ela pode ser classificada em crônica ou aguda. Na fase crônica, as células ainda conseguem realizar as funções dos glóbulos brancos, replicando-se mais lentamente podendo funcionar por um período mais longo.

Algumas formas de leucemia crônica não apresentam sintomas iniciais, podendo não ser diagnosticadas durante anos. A fase aguda tem início depois que alguns glóbulos brancos perdem ou danificam a sua sequência de ácidos desoxirribonucleicos (DNA), permanecendo imaturos. Estes são conhecidos como células blásticas, que ainda mantêm a sua capacidade para se multiplicar. Estas células, não morrem como as normais, e ao se acumularem interferem no funcionamento de órgãos vitais. Além disso, não realizam as suas funções, pois se multiplicam mais rápido que o normal, piorando a doença em um curto espaço de tempo. As leucemias agudas requerem um tratamento rápido e agressivo.

Assim, as leucemias podem ser classificadas em quatro tipos mais comuns: Leucemia Linfoide Crônica (LLC), comum em adultos com mais de 55 anos; Leucemia Linfoide Aguda (LLA), prevalente em crianças (2-5 anos); Leucemia Mieloide Crônica (LMC), acomete principalmente adultos do sexo masculino;

Leucemia Mieloide Aguda (LMA), que é comum em adultos e crianças (INCA, 2015c).

1.3. Leucemia Mieloide Crônica (LMC)

A Leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal de células-tronco pluripotentes, descrita pela primeira vez por John Hughes Bennett em 1845 (JOSKE, 2008). No final de 1960, os pesquisadores Nowell e Hungerford, da Universidade da Pensilvânia, identificaram um cromossomo anormal presente nas células leucêmicas humanas (GEARY, 2000). Este cromossomo, chamado de Philadelphia (Ph), é resultado da translocação entre os braços do cromossomo 9 e 22, sendo encontrado em 95% dos pacientes com LMC (NOWELL & HUNGERFORD, 1961; DRUKER *et al.*, 2001).

1.3.1. Aspectos Epidemiológicos

A taxa de incidência da LMC é de 7 a 20% de todos os casos de leucemias (REDAELLI *et al.*, 2004). Embora possa acometer indivíduos em qualquer faixa etária, ele é mais comum entre 40 e 60 anos. Em crianças, a taxa é de aproximadamente 10% dos novos casos (SAWYERS, 1999).

A LMC ocorre de 1 a 2 casos, em cada 100.000 indivíduos, sendo mais frequente em homens do que mulheres (JEMAL *et al.*, 2008). As terapias atuais promoveram, nos primeiros 2 anos, uma redução de 10% na taxa mortalidade, e de 20% nos anos subsequentes. A taxa de sobrevivência, que inicialmente era de 10 a 15%, passou para 80 a 90% (XIE *et al.*, 2003).

1.3.2. Características Moleculares

Como descrito anteriormente, a principal característica da LMC é a presença de um cromossomo acrocêntrico chamado de Philadelphia (Ph) (NOWELL & HUNGERFORD, 1961), sendo este o primeiro exemplo de anomalia cromossômica

relacionada à malignidade específica. Treze anos após a descoberta do cromossomo Ph, Rowley determinou que este cromossomo encurtado, era o produto da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, t(9:22) (q34;q11) (ROWLEY, 1973) (Figura 1).

Em murinos, os estudos com retrovírus permitiram que fossem identificados os oncogenes, ou seja, genes que quando mutados induzem a conversão de células normais em malignas. Posteriormente, foi demonstrado que o oncogene Abl (*Abelson*), responsável pela leucemia em murinos, normalmente localizado no cromossomo 9, encontrava-se translocado para o cromossomo 22 em pacientes com LMC (KLEIN *et al.*, 1982). O ponto de quebra no cromossomo 22 ocorria em uma pequena região chamada de “breakpoint cluster region” (Bcr) (GROFFEN *et al.*, 1984), e em 1990, alguns trabalhos demonstraram que Bcr-abl era suficiente para induzir a leucemia em um modelo animal, estabelecendo-o como um oncogene leucêmico (DALEY *et al.*, 1990; HEISTERKAMP *et al.*, 1990).

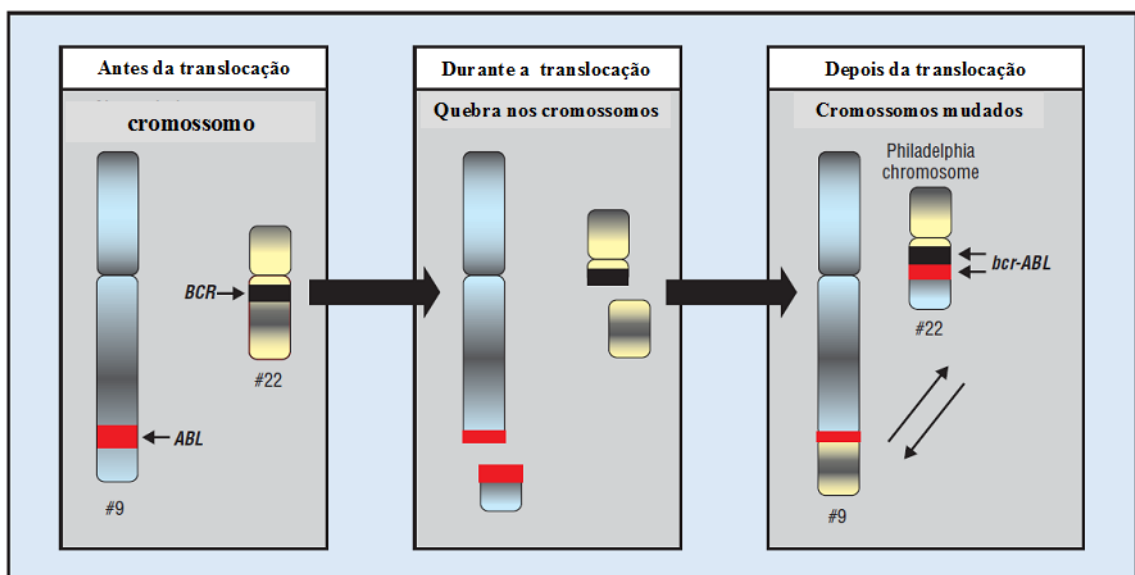


Figura 1. Cromossomo Philadelphia (Ph) - resultado da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (t(9:22)). Após a translocação, é formado o cromossomo 9 com o braço mais longo e o cromossomo 22 com o braço mais curto. O cromossomo 22 encurtado é descrito como o cromossomo Ph (VASCONCELOS, 2012).

O cromossomo Ph é responsável por codificar uma proteína com atividade tirosina quinase mais elevada que a proteína normal, sendo denominada proteína tirosina quinase Bcr-abl. Esta atividade alterada é responsável pela transformação celular e patogênese da doença (LUGO *et al.*, 1990).

Em condições normais, a proteína Bcr é uma serina/treonina quinase ativada que regula proteínas envolvidas em diversas vias celulares. O gene Bcr é considerado um gene supressor de tumor, visto que regula, de forma negativa, genes que promovem a proliferação celular (RESS & MOELLING, 2005). O gene abl está presente em células eucarióticas, codifica e realiza um importante papel na regulação da divisão celular e apoptose (COLICELLI, 2010).

Na fisiopatologia, o oncogene Bcr-abl é responsável por codificar uma proteína com atividade tirosina quinase constitutivamente ativa. Ao se ligar com o trifosfato de adenosina (ATP), esta proteína transfere fosfato para resíduos de tirosina em proteínas específicas. Após fosforilações, ocorre a transdução de sinais de energia necessários à proliferação celular e apoptose de modo anormal, levando à ocorrência de LMC (DRUKER *et al.*, 2001). Desta forma, o bloqueio da ligação entre a proteína e o ATP é essencial para a interrupção de todas as etapas subsequentes. A descoberta deste mecanismo foi fundamental para o desenvolvimento de uma terapia alvo para o tratamento de pacientes com LMC (FADERL *et al.*, 2000).

1.3.3. Características Clínicas da LMC

A fase clínica do paciente com LMC está dividida em: fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e fase blástica (FB). A maior parte dos casos são diagnosticados na FC, que costuma ser assintomática, no entanto, alguns pacientes relatam sintomas relacionados à anemia, como fadiga e perda de peso. Outros sintomas comumente observados são, hepatoesplenomegalia e sudorese (BOLLMANN & DEL GIGLIO, 2011; FRAZER *et al.*, 2007; VIANNA & ALMEIDA, 2006; CLARKSON *et al.*, 2003). Contudo, o maior indício da doença é o elevado número de leucócitos no sangue

periférico, com predomínio de granulócitos neutrófilos e a presença de granulócitos imaturos como mieloblastos, promieloblastos, mielócitos e metamielócitos (CLARKSON *et al.*, 2003).

A falta de tratamento ou o desenvolvimento de resistências na FC, pode levar à progressão para a FA ou FB. Quando isto ocorre, a hematopoiese fica comprometida e ocorre uma interrupção na diferenciação celular, levando à substituição das células maduras por blastos na medula óssea e no sangue periférico (JAGANI *et al.*, 2008).

A FA é caracterizada por elevado aumento do baço e de células como basófilos, promielócitos e blastos na medula óssea e/ou no sangue periférico. Nesta fase, ocorre anemia e trombocitopenia, além de agravamento dos sintomas constitucionais, tais como, esplenomegalia progressiva e resistência ao tratamento com progressiva leucocitose e/ou trombocitose (VIANNA & ALMEIDA, 2006). Em média 75% dos pacientes em FB descendem da FA (FRAZER *et al.*, 2007).

Na FB ocorrem mutações secundárias e acúmulo progressivo (>20%) de células imaturas como mieloblastos e promielócitos na medula óssea ou sangue periférico. Nessa fase, a anemia se torna mais intensa, podendo ocorrer um quadro hemorrágico com gravidade variável. Também são observados sintomas como febre e piora do estado clínico de modo geral (VIANNA & ALMEIDA, 2006; MELO & BARNES, 2007). A média de sobrevida nessa fase é de 3 meses (FRAZER *et al.*, 2007), devido à resistência ao tratamento e das alterações moleculares que acompanham esse evento (ADVANI & PENDERGAST *et al.*, 2002).

Com objetivo de identificar a doença nos estágios iniciais, Sokal e colaboradores (SOKAL *et al.*, 1984) analisaram diversas características clínicas e laboratoriais. Eles desenvolveram um sistema baseado em escores, que permite a classificação dos pacientes em três grupos, de acordo com a sobrevida, características clínicas e laboratoriais. São verificados parâmetros como a idade, o tamanho do baço, a contagem de plaquetas e o percentual de blastos no sangue periférico. A cada uma dessas variáveis foi atribuído um peso, e a partir disso, os pacientes são classificados em risco alto (Sokal >1,2), risco intermediário (Sokal 0,8-1,2) e risco baixo (Sokal <0,8), sendo atribuída uma estimativa de sobrevida média. A estimativa da mediana de sobrevida calculada pelo método de Kaplan-

Meier foi de 30 meses para os pacientes de alto risco e de 60 meses para os de baixo risco (BOLLMANN & DEL GIGLIO, 2011).

1.3.4. Tratamento

Os principais objetivos no tratamento da LMC são:

Obter resposta hematológica completa (RHC), que considera a leucometria geral e específica, número de plaquetas e tamanho do fígado. Estes aspectos devem ser avaliados através de hemogramas, a cada dois meses após a confirmação da RHC (Tabela 1) (BACCARANI *et al.*, 2009).

Alcançar resposta citogenética completa (RCC), que é definida pelo número de metáfases contendo o cromossomo Ph. Os testes citogenéticos são geralmente realizados em células da medula óssea, que são coletadas por aspiração/punção da medula óssea. Esta avaliação é realizada a cada seis meses e, após a confirmação da RCC, passa para ser refeita a cada 12 meses (Tabela 1) (BACCARANI *et al.*, 2009).

Atingir resposta molecular completa (RMC), sendo essa mensurada após a RCC. Para este diagnóstico são utilizados métodos moleculares, com objetivo de detectar a doença residual mínima (DRM), através da análise dos transcritos do gene Bcr-abl. A quantificação dos transcritos dos Bcr-abl é feita por RT-PCR e a avaliação da RM (RM) leva em consideração o número de transcritos do gene Bcr-abl. O RT-PCR deve ser realizado a cada 3 meses e, após a confirmação da RMC, deve ser feita a cada 6 meses (Tabela 1) (BACCARANI *et al.*, 2009).

Tabela 1. Definição dos tipos de respostas esperadas no tratamento da LMC, exames de monitoramento, classificação das respostas e períodos em que devem ser avaliados.

Tipo de resposta	Exames de monitoramento	Classificação da resposta	Acompanhamento da resposta	
Hematológica	Hemograma	(Completa) Plaquetas <450 x 10 ⁹ /L; Leucometria <10 x 10 ⁹ /L; Ausência de mielócitos, promielócitos ou mieloblastos; Basófilos <5%; Baço não palpável	Imediata após o diagnóstico e a cada 2 meses	
Citogenética	Cariotipagem	Completa	0	Ao diagnóstico e a cada 6 meses até RCC. A cada 12 meses após o RCC
		Parcial	1-35%	
		<i>Minor</i>	36-65%	
		Mínima	66-96%	
		Ausência	>96%	
Molecular	RT-PCR	Completa	Transcritos não detectáveis	A cada 3 meses até alcançar a RMM, depois a cada 6 meses
	Maior (RMM)	Razão entre Bcr-abl a ABL ≤0,1%		

O histórico dos tratamentos para a LMC mostra que os primeiros compostos testados foram a quinina (1) (Figura 2) e o ferro, porém o uso destas substâncias não apresentou nenhum resultado. Em 1865, o médico alemão Lissauer

administrou em uma paciente baixas doses de arsênio combinado com iodo e cloreto de potássio (KCl). Esse tratamento provocou a diminuição do tamanho do baço, do número de células brancas e melhora da anemia, restaurando em sensação de bem-estar (GEARY, 2000). Em 1878, Cutler e Bradford estudaram cientificamente os efeitos do arsênio no hemograma e na doença. Eles realizaram a contagem total dos glóbulos brancos e vermelhos do sangue e descobriram que a administração desta associação, conhecida como solução de Fowler, causava a diminuição progressiva do número de glóbulos vermelhos e brancos do sangue (CUTLER *et al.*, 1878). Mesmo assim, independentemente de sua toxicidade, esta solução continuou sendo utilizada para o tratamento da LMC até a introdução da radioterapia, em 1903 (GEARY, 2000).

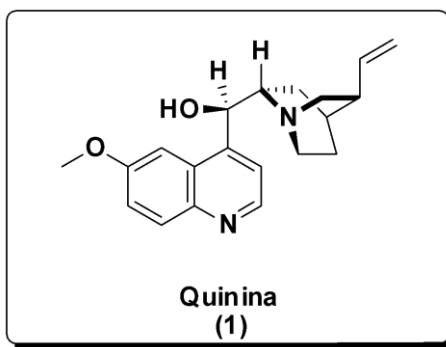


Figura 2. Estrutura química da quinina (1).

Em 1903, Nicholas Senn observou, que o uso de raios-X provocava uma rápida diminuição no baço e a redução no número de leucócitos. Isto porque eles impediam a replicação celular e causavam a morte das células, promovendo uma melhora no hemograma e no bem estar do paciente (SENN, 1903). Os benefícios desta terapia foram tão evidentes que, pela primeira vez, o termo “remissão” passou a ser utilizado. Contudo, o uso de raios-X não aumentou a sobrevivência dos pacientes, que naquela época não ultrapassava os três anos (SENN, 1903).

Outra medida terapêutica utilizada no tratamento da LMC foi a esplenectomia, que consiste na completa ou parcial remoção cirúrgica, do baço. As primeiras esplenectomias datam de 1863 e a maior parte dos pacientes submetidos à esta intervenção encontravam-se em situação trágica (BRYANT, 1866). Em 1879,

Gowers afirmou que a esplenectomia era invariavelmente fatal. Contudo a cirurgia ainda era indicada apenas para tornar os pacientes “mais confortáveis”. Posteriormente, alguns médicos recomendaram a esplenectomia após o tratamento com radioterapia (GEARY, 2000).

O primeiro medicamento citotóxico utilizado no tratamento de LMC foi a mostarda nitrogenada (2) (Figura 3). Desenvolvida em 1947, na Primeira Guerra Mundial, a mostarda nitrogenada demonstrou que quando administrada por via intravenosa causava uma enorme queda no número de leucócitos. Embora a melhora clínica fosse significativa, não houve aumento na sobrevida dos pacientes (WINTROBE, 1947).

Em 1952, foi introduzido o primeiro fármaco – bussulfano (3) (Figura 3). Este medicamento produziu uma remissão hematológica em 42%, gerando uma sobrevida na fase crônica de 3,8 anos. Ele apresentou maior ação seletiva em tecido hematopoiético, particularmente nas séries granulocíticas, embora os ensaios clínicos mostrassem que era tóxico para o epitélio germinal e para os pulmões. Após vários estudos, com diferentes dosagens do fármaco, verificou que ele era capaz de controlar as manifestações da LMC de modo mais eficiente do que a radioterapia, especialmente porque poderia ser administrado por via oral. No entanto, seu uso foi suspenso, devido aos graves efeitos adversos, tais como, mielossupressão prolongada, fibrose pulmonar, mielofibrose e endomiocardiofibrose (OSAROGIAGBON & MC GLAVE, 1999).

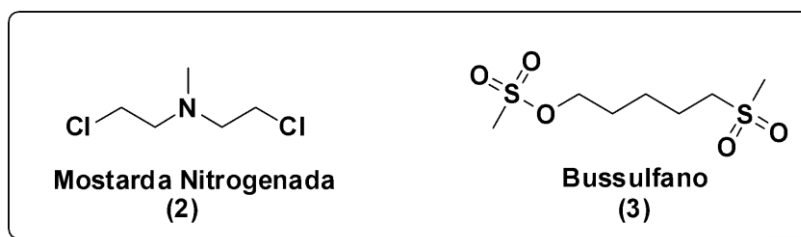


Figura 3. Estrutura química da mostarda nitrogenada (2) e do bussulfano (3).

A hidroxiuréia (4) foi outro fármaco que, inicialmente, se destacou pelos seus excelentes resultados (Figura 4). O seu uso teve início em 1972, tornando-o o fármaco de escolha, pois produzia uma resposta hematológica completa de 80% e

uma sobrevida média de 4,7 anos, na fase crônica. Seu mecanismo de ação consiste na interrupção da síntese de DNA, através da inibição da enzima ribonucleotídeo-reductase (GUIMARÃES, 2006). O fármaco **4**, quando comparado a **3** mostrou-se menos tóxica, no entanto, ambas as terapias não produziram uma remissão citogenética ou prevenção da progressão da doença para fase blástica (HEHLMANN *et al.*, 1993).

No início dos anos 80, o interferon alfa começou a ser empregado na terapêutica da LMC. A introdução desta substância promoveu a remissão citogenética parcial, que consiste na redução do número de cromossomos Ph. Além disso, o uso deste composto foi essencial para mostrar que um fármaco poderia ser capaz de aumentar a sobrevida do paciente (KANTARJIAN *et al.*, 2003; TALPAZ, 2001). Por não ser um tratamento curativo, os pacientes que apresentavam remissão citogenética faziam terapia de manutenção, com doses de interferon por três vezes semanais, resultando em sobrevida de 5,5 anos (HEHLMANN *et al.*, 1993). Segundo Kantarjian, dos 274 pacientes tratados diariamente com interferon, 80% alcançaram remissão hematológica completa (RHC) e 58% remissão citogenética completa (RCC), com sobrevida média de 7,4 anos (KANTARJIAN *et al.*, 2003; KANTARJIAN *et al.*, 1992). No entanto, as reações adversas levaram ao abandono do tratamento em cerca de 20% dos casos (HAHN, 2003). Outros fármacos também foram associados ao interferon (KANTARJIAN *et al.*, 2003; KANTARJIAN *et al.*, 1992;). Quando o interferon foi associado a **4** aumentou significativamente a sobrevida do paciente, se comparado ao uso de **4** em monoterapia. Foi alcançada uma remissão hematológica completa em 59% dos casos e 12% de remissão citogenética completa (HEHLMANN *et al.*, 1993). A associação com a citarabina (**5**) (Figura 4) aumentou a sobrevida em 86%, quando comparado aos pacientes que mantiveram uso de interferon em monoterapia. Entretanto, a inclusão deste fármaco na politerapia aumentou a toxicidade do tratamento (GRATWOHL *et al.*, 1993).

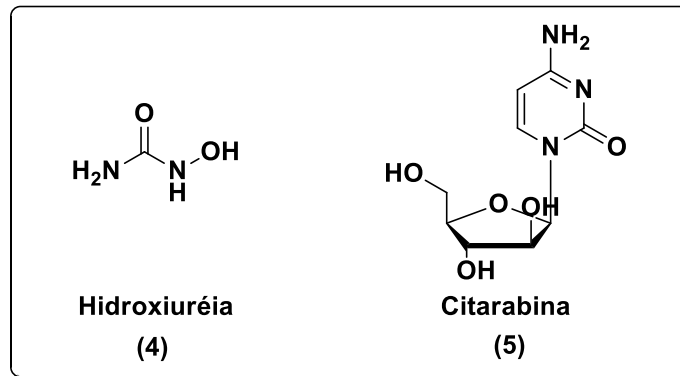


Figura 4. Estrutura química da hidroxiuréia (4) e da citarabina (5).

O transplante de célula tronco hematopoiética (TCTH) começou em 1986, sendo muito efetivo no tratamento da LMC, pois é capaz de produzir uma resposta curativa. Porém, 55% dos pacientes têm idade superior a 60 anos, dificultando o encontro de um doador compatível e tornando essa modalidade terapêutica restrita a um pequeno grupo (GUILHOT *et al.*, 1997).

No início do século 21, o tratamento da LMC foi revolucionado com o surgimento de uma nova classe de medicamentos, os inibidores de tirosina quinase (ITK), que mudou drasticamente a terapia convencional (JABBOUR *et al.*, 2007). Atualmente, estão disponíveis para a terapia da LMC cinco ITK: imatinibe (6), dasatinibe (7), nilotinibe (8), bosutinibe (9) e ponatinibe (10) (Figura 5).

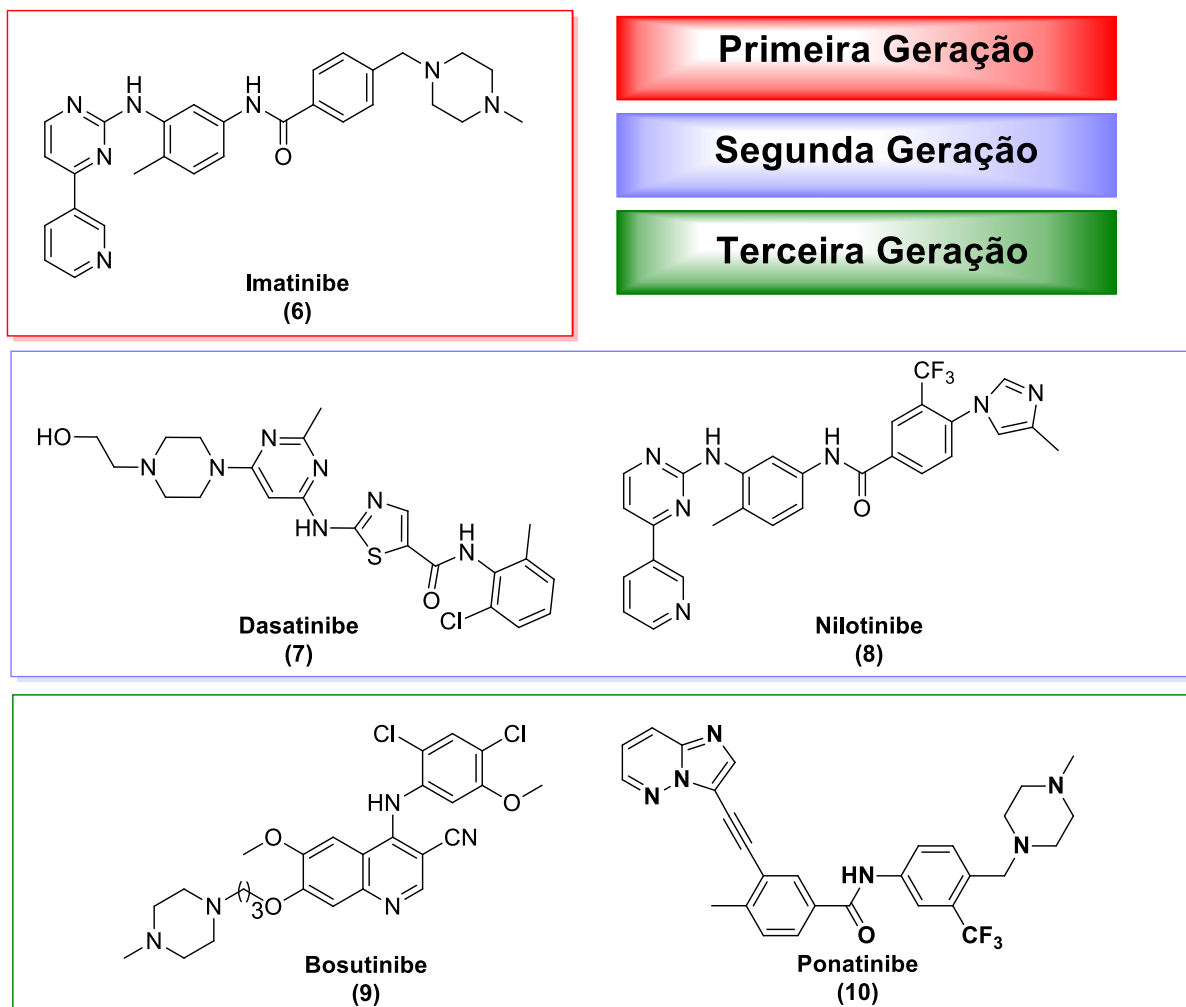


Figura 5. Inibidores de tirosina quinase de primeira, segunda e terceira geração disponíveis para uso.

1.4. Inibidores de Tirosina Quinase

O primeiro inibidor seletivo da tirosina quinase, a tirfostina (**11**), foi descrito em 1988, por Yaish & Colaboradores (YAISH *et al.*, 1988). Posteriormente, estudos com o uso de técnicas robotizadas de avaliação maciça de amostras (HTS, do inglês “*high throughput screening*”), demonstraram que o esqueleto fenil amino-pirimidina (FAP;**12**) apresenta elevado potencial para inibir a forma não específica da quinase (Figura 6) (CHOI *et al.*, 2010; DRUKER & LYDON, 2000).

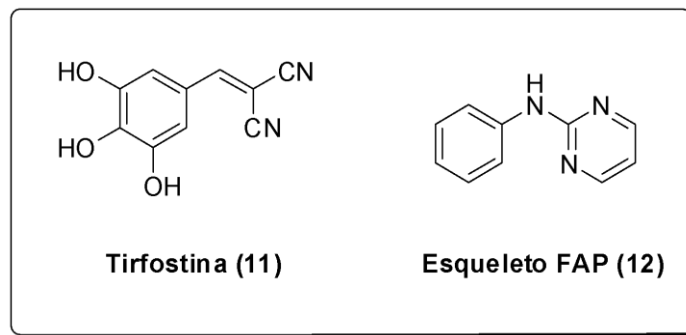


Figura 6. Estrutura da tirfostina (11) e do esqueleto (FAP;12).

Em 1993, Druker e colaboradores sintetizaram e testaram uma série de moléculas contendo o esqueleto FAP (CAPDEVILLE *et al.*, 2002). Os resultados mostraram que o imatinibe 6 era capaz de eliminar de forma seletiva as células da LMC (GOLDMAN, 2000). Com o avanço dos testes clínicos, este fármaco passou a ser considerado como um “milagre”. Estatísticas demonstraram que aproximadamente 100% dos pacientes tratados com o mesilato de imatinibe alcançavam a remissão total da doença (HUNTER, 2007).

O mesilato de imatinibe (Glivec®, STI571), revolucionou o tratamento da LMC, marcando o início da era dos “tinibes” (KANTARJIAN *et al.*, 2011). No entanto, posteriormente, alguns pacientes começaram a apresentar resistência a este fármaco. Este fato mostrou a necessidade de desenvolver novos fármacos para o tratamento da doença e eles foram classificados como inibidores de segunda e terceira geração. Os novos inibidores têm como alvo mais de uma quinase, sendo chamados inibidores “multi-quinases”. A segunda geração é composta pelo dasatinibe (7) e nilotinibe (8) e, a terceira, pelos bosutinibe (9) e ponatinibe (10) (Figura 5) (QUÍNTAS-CARDAMA *et al.*, 2010).

1.4.1. Imatinibe

O mesilato de imatinibe foi desenvolvido pela indústria suíça Novartis, sendo aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2001, para o tratamento da LMC (COHEN *et al.*, 2012). Ele produz três principais efeitos em células que

expressam Bcr-abl, inibição da proliferação, indução de apoptose e inibição da autofosforilação do Bcr-abl (GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997; DEININGER *et al.*, 1997; DRUKER *et al.*, 1996).

O mecanismo de ação do imatinibe mostra que ele funciona como um inibidor competitivo do ATP junto a enzima tirosina quinase Bcr-abl. A figura 7A mostra a oncoproteína Bcr-abl com uma molécula de ATP na quinase. O substrato é ativado pela fosforilação de um dos seus resíduos de tirosina, ativando outras moléculas efetoras. Na presença do imatinibe, figura 7B, o sítio de ligação do ATP na proteína é ocupado pelo inibidor e a ação da Bcr-abl é inibida devido o substrato não sofrer mais a fosforilação, desta forma ocorre o bloqueio da atividade desta tirosina quinase. Este bloqueio previne a transdução de sinais de energia necessários à proliferação celular e apoptose. Além disso, o imatinibe inibe o c-Kit (fator antiplaquetário) e o PDGFR (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas) (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

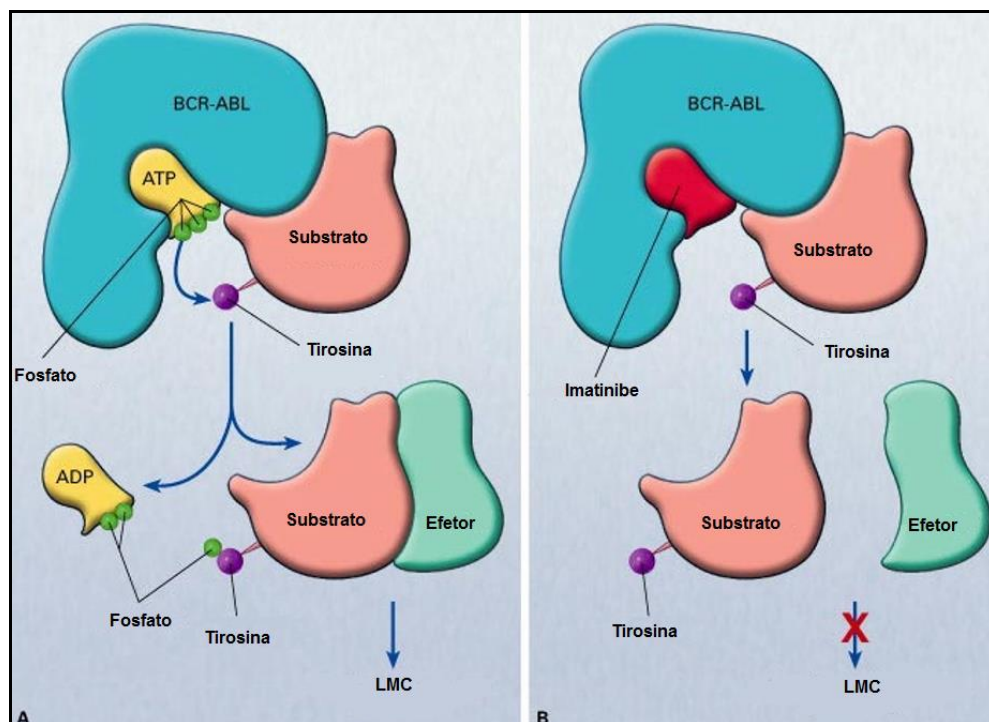


Figura 7. Mecanismo de ação da Bcr-abl, e sua inibição promovida pelo imatinibe (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

O imatinibe é administrado por via oral, com doses de 300 a 800 mg/dia. Ele pode ser utilizado na terapêutica de pacientes na fase aguda e na fase acelerada, no entanto, os melhores resultados são observados em pacientes na fase crônica (O'BRIEN *et al.*, 2003). O imatinibe apresenta uma rápida absorção (duas horas), quando administrado em altas doses e a sua biodisponibilidade é de 98%. Seu metabolismo é hepático, sendo realizado pela enzima citocromo P450, isoforma CYP3A4 e, em menor extensão, por outras isoformas (PORTAL NORVATIS, 2015). Nos últimos anos, observou-se que os maiores índices Sokal foram para pacientes tratados com imatinibe (ROSTI *et al.*, 2003; CASTAGNETTI *et al.*, 2009).

1.4.1.1. Mecanismos de Resistência

Embora o tratamento com imatinibe tenha alcançado resultados fantásticos, aproximadamente 20 a 30% dos pacientes têm apresentado resistência (APPERLEY, 2007). A resistência pode ser primária, quando desde o início o paciente não apresenta resposta alguma, ou pode ser adquirida, quando o paciente diminui ou não alcança mais resultados ao longo do tratamento (MAHON *et al.*, 2000).

Os mecanismos de resistências podem ser explicados através das mutações no domínio quinase da proteína Bcr-abl, amplificação genética e super expressão do gene Bcr-abl, alteração da expressão de proteínas transmembranares de influxo e de efluxo e, ainda por alterações na regulação de mecanismos de transdução de sinal (APPERLEY, 2007; a, b). A mutação no domínio quinase Bcr-abl, denominada de T315I, foi uma das primeiras mutações observadas nos pacientes, sendo esta a mais temida (GORRE *et al.*, 2001). Esta mutação resulta de uma substituição de aminoácido na posição 315 em Bcr-abl, de uma treonina (T) para uma isoleucina (I), ela também é encontrada em mecanismos de resistência do dasatinibe e do nilotinibe (MELO *et al.*, 2007).

1.4.2. Dasatinibe (7)

O dasatinibe (Sprycel®, BMS-354825), comercializado pela Bristol-Myers Squibb, foi aprovado pelo FDA, em 2006, para o tratamento de pacientes resistentes ou intolerantes ao imatinibe (HOCHCHAUS *et al.*, 2008). Além de inibir a forma ativa e inativa da molécula Bcr-abl, inibe também outras quinases, tais como a família SRC, que é uma tirosina quinase intracelular que está envolvida em processos como o crescimento celular. Estudos *in vitro* mostraram que **7** é 300 vezes mais potente que o imatinibe (O'HARE *et al.*, 2009; O'HARE *et al.*, 2005).

Ele é utilizado na terapia de pacientes em FC, com dose inicial de 100 mg/dia. Pacientes em FA ou FB utilizam doses 70 mg, duas vezes ao dia (QUÍNTAS-CADARMA *et al.*, 2007). Seu tempo de meia vida é de 3 a 5 horas, sendo metabolizado pela enzima CYP3A4 do citocromo P450. A eliminação é realizada principalmente pela via entérica (85%) (NCI, 2015).

Devido à habilidade em inibir a proliferação da maioria das células mutantes resistentes ao imatinibe, **7** mostrou ser uma boa alternativa para o tratamento de pacientes que não apresentaram adequada resposta ao imatinibe. No entanto, este fármaco mostrou alta toxicidade nas fases mais avançadas da doença (DELAMAIN & CONCHON, 2008; TOKARSKI *et al.*, 2006).

1.4.3. Nilotinibe (8)

O nilotinibe (Tasigna®, AMN107) foi desenvolvido pela Novartis, sendo aprovado em 2007 pelo FDA, para o tratamento de pacientes adultos com LMC, em FC ou FA, resistentes ou intolerantes ao imatinibe. É estruturalmente semelhante ao imatinibe, pois além de conter o grupamento farmacofórico FAP, foi mantido também o anel da piridina e este esqueleto receberá neste trabalho o nome FAPP (fenil amino-pirimidina piridina). O nilotinibe foi descoberto a partir de um planejamento racional que objetivava uma melhor afinidade e especificidade de ligação contra Bcr-abl em relação ao imatinibe, (WEISBERG *et al.*, 2005).

Estudos *in vitro* demonstraram que **8** é aproximadamente 30 vezes mais potente que o imatinibe. Ele apresenta atividade contra a maioria das mutações resistentes ao imatinibe, com exceção domínio de mutação T315I do gene Bcr-abl, que permaneceu insensível. Além disso, inibe o receptor de tirosina quinase e marcador tumoral (c-Kit) e o receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) (WEISBERG *et al.*, 2005).

A dose usual do tratamento é de 200 mg, duas vezes ao dia. O pico de concentração plasmática é alcançado três horas após a ingestão oral. Os principais metabólitos encontrados são produtos de oxidação e hidroxilação, que ocorre na fase I do metabolismo hepático. Seus metabólitos são inativos e a principal via de eliminação é pela via entérica. As reações adversas mais relatadas pelos pacientes foram erupção cutânea, prurido, náusea, fadiga, dor de cabeça, dor abdominal, constipação e diarreia (FDA, 2015a).

Pacientes em FC apresentaram uma resposta hematológica parcial de 62% e completa de 41%. Para pacientes na FA, estes índices reduziram para 44 e 22%, respectivamente. Com relação à resposta citogenética, observou-se índices de 42% e 12%, respectivamente para pacientes em FC e FA (LE COUTRE *et al.*, 2008). Recentemente, Hochhaus e colaboradores publicaram um estudo comparativo entre a incidência de mutações em pacientes que fizeram uso do nilotinibe ou imatinibe. Os resultados mostraram que pacientes tratados com nilotinibe apresentaram menor número de mutações Bcr-abl, do que pacientes tratados com imatinibe (HOCHHAUS *et al.*, 2013).

1.4.4. Bosutinibe (9)

O bosutinibe (Bosulif®, SKI606), comercializado pela Pfizer, foi aprovado pelo FDA, em setembro de 2012, para o tratamento da LMC. Os pacientes indicados para uso deste fármaco podem estar nas três fases clínicas da doença com cromossomo Ph positivo, resistentes ou intolerantes ao imatinibe (FDA, 2015b).

Assim como o dasatinibe, o bosutinibe é um duplo inibidor de SCR e Bcr-abl (inibe a maioria das células resistentes ao imatinibe, exceto a T315I). Não apresenta atividade inibitória contra o c-Kit ou PDGFR (PUTTINI *et al.*, 2006). Possui um padrão de inibição parecido com o imatinibe, contudo, requer menores doses para atingir tal resposta. Acredita-se que devido à similaridade do padrão de inibição, ambos os fármacos compartilham de um mecanismo comum de inibição (PUTTINI *et al.*, 2006).

A dosagem indicada é de 500 mg ao dia, sendo necessário a ingestão acompanhada de um alimento. Entre 4 a 6 horas, o medicamento atinge o seu pico plasmático, sendo metabolizado principalmente pelo CYP3A4. Os seus metabólitos não são ativos e a sua eliminação é pela via entérica (PFIZER, 2015).

1.4.5. Ponatinibe (10)

Em 14 de dezembro de 2012, o FDA concedeu aprovação acelerada para ponatinibe (Iclusig®, AP24534). Desenvolvido pela Ariad Pharmaceuticals, é indicado para o tratamento de pacientes adultos nas três fases clínicas da doença, que são resistentes ou intolerantes às terapias com quaisquer inibidores de tirosina quinase (FDA, 2015c)

A aprovação acelerada foi baseada nos resultados de um estudo multicêntrico internacional. Os ensaios clínicos em 449 pacientes resistentes ou intolerantes ao tratamento com inibidores da tirosina quinase mostraram que ele inibe a mutação T315I (FDA, 2015c).

A dose recomendada para **10** é de 45 mg/dia. Os efeitos colaterais mais comuns relatados no ensaio clínico incluem hipertensão, erupção cutânea, dor abdominal, fadiga, dor de cabeça, pele seca, constipação, febre, dor nas articulações e náuseas. Também, foram observados casos de trombose arterial e toxicidade do fígado em pacientes tratados com este fármaco (FDA, 2015c).

1.5. 2,3-Dioxoindóis: As Isatinas

A isatina (**13**) (Figura 8) é um benzo-heterociclo que pode ser encontrado na natureza em plantas do gênero *Isatis*, *Calanthe discolor* e *Couroupita guinensis*, e em humanos, como metabólito derivado da adrenalina (SILVA & GARDEN, 2001; YOSHIKAWA *et al.*, 1998; PALUMBO *et al.*, 1989; ISCHIA *et al.*, 1988; GUO *et al.*, 1986). No entanto, a principal fonte de obtenção deste núcleo é através da síntese orgânica.

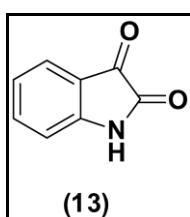
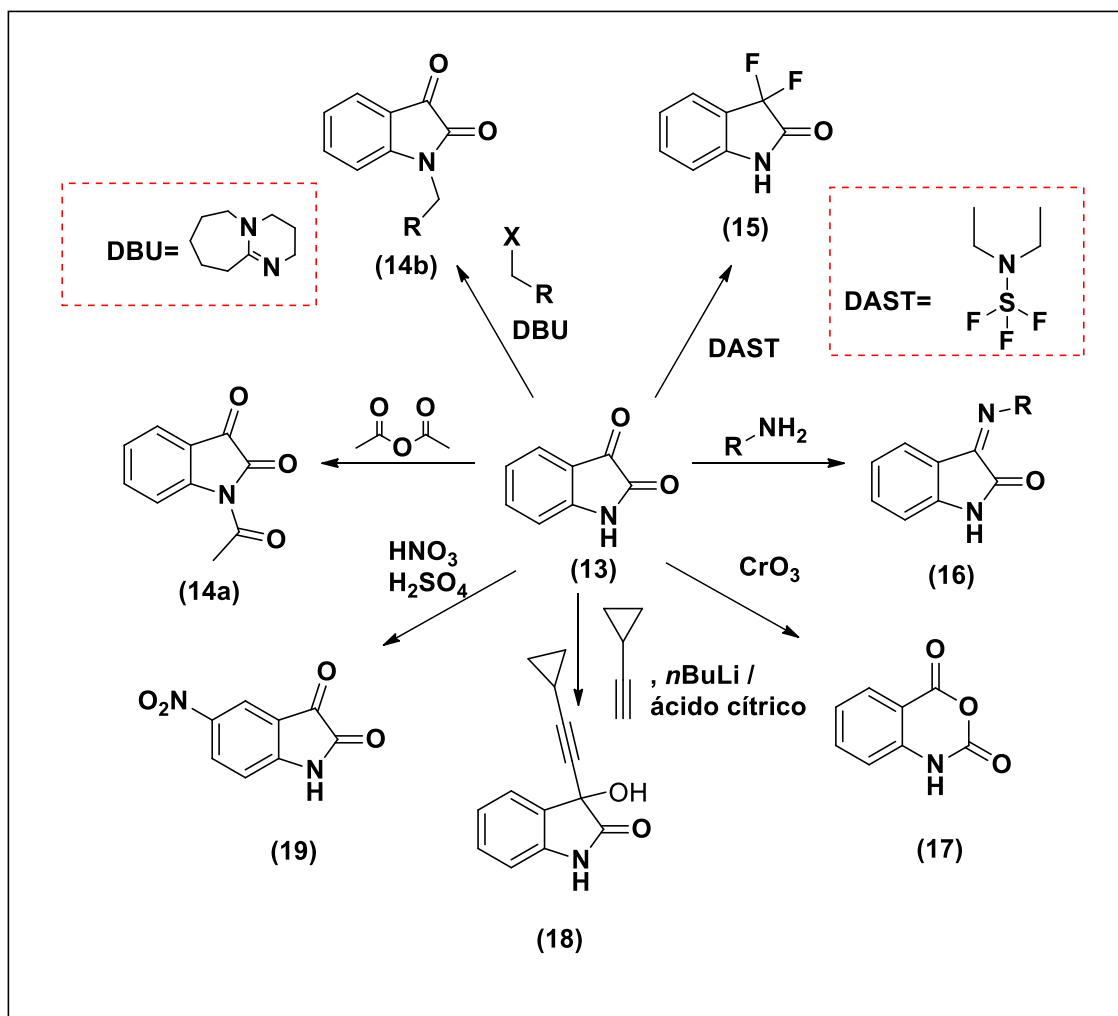


Figura 8. Estrutura química da isatina (**13**)

A diferença da reatividade das carbonilas C-2 e C-3 torna a isatina um material de partida versátil e amplamente utilizado para a preparação de outras classes de substâncias. A carbonila C-2 é tipicamente uma amida e a C-3 é essencialmente cetônica, tornando-as quimiosseletivas frente a nucleófilos (POPP, 1975, SUMPTER, 1944).

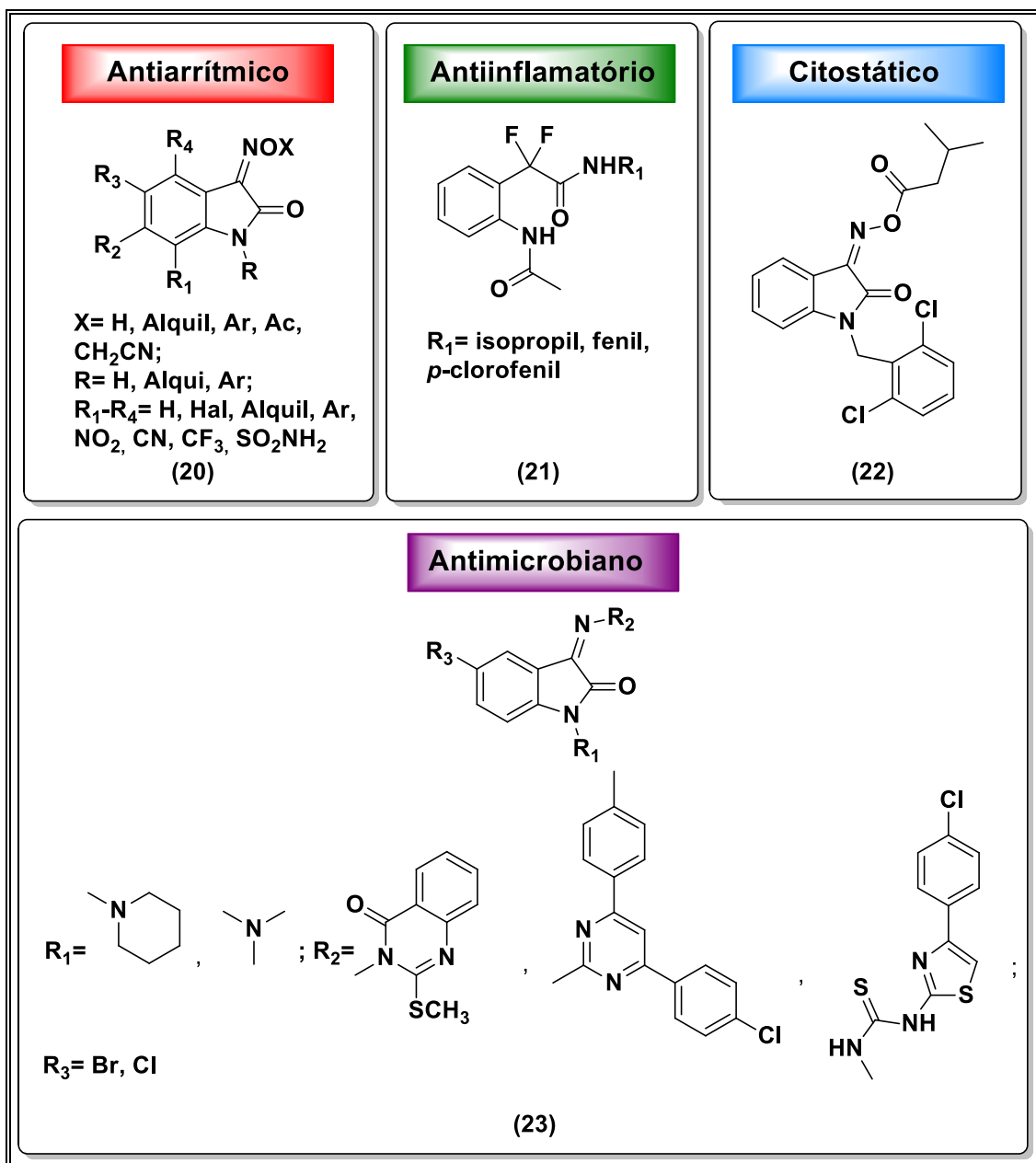
Dentre os produtos obtidos a partir deste núcleo podemos citar os *N*-acetilados **14a** (PINTO & SILVA, 1994), *N*-alquilados **14b** (JORDAN *et al.*, 2014), desoxofluorados na carbonila C-3 **15** (BOECHAT *et al.*, 2008), iminas **16** (ZARI, 2014) oxidados **17** (COPPOLA, 1980), alquilados na carbonila C-3 **18** (BOECHAT *et al.*, 2007), substituídos através de reações eletrofílicas aromáticas **19** (KARALI *et al.*, 2007), dentre outras (Esquema 1).



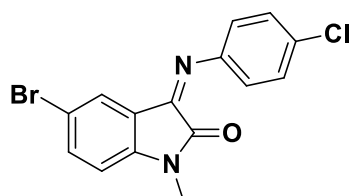
Esquema 1. Reações mais comuns a partir de isatinas para a síntese de outras classes de compostos.

A isatina e seus derivados estão presentes em vários compostos com atividade biológica, tais como, antiarrítmicos **20** (JENSEN *et al.*, 2000), anti-inflamatórios **21** (BOECHAT & PINTO, 2000), citostáticos **22** (GAETA *et al.*, 2000) antimicrobiano **23** (PANDEYA *et al.*, 1999a, 1999b, 1999c), anticonvulsivante **24** (VERMA *et al.*, 2004) e antivirais **25** (DO VALLE *et al.*, 1965). Como ITK, podemos destacar, o sunitinibe **26**, nintedanibe **27**, semaxanibe **28** e TSU-68 **29** (XIANG *et al.*, 2011; KRUG & HILGEROTH, 2008; MOTZER *et al.*, 2007) (Quadro1).

Quadro 1. Exemplos de substâncias bioativas obtidas a partir da isatina.

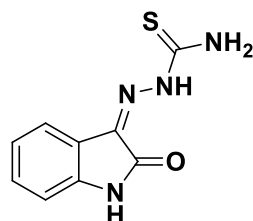


Anticonvulsivante



(24)

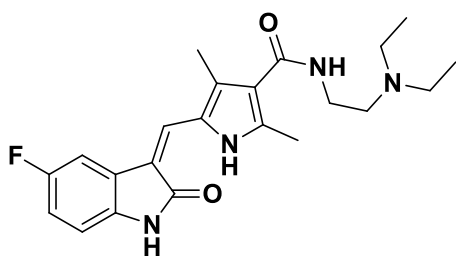
Antiviral



(25)

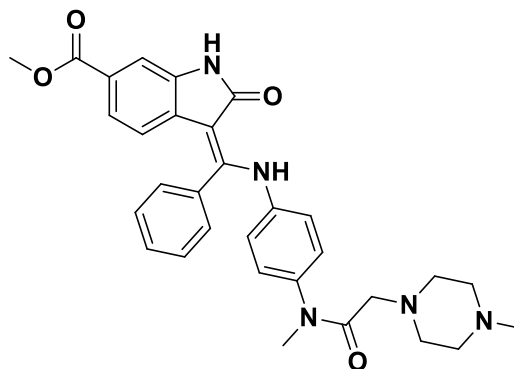
Metisazona

Inibidores de Tirosinas Quinase



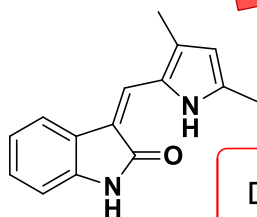
(26)

Sunitinibe



(27)

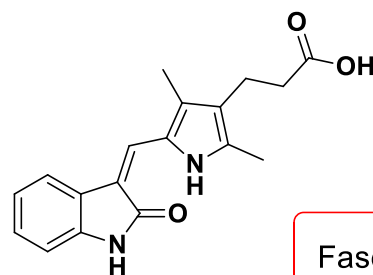
Nitendanibe



(28)

Senaxanibe

Descontinuado no
ensaio clínico



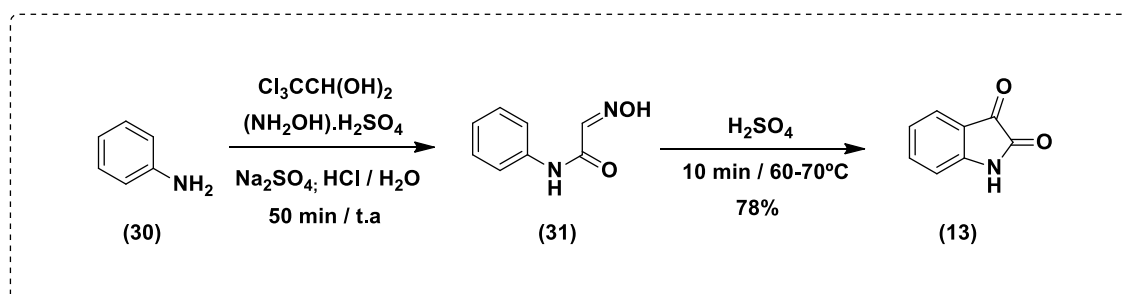
(29)

TSU-68

Fase II

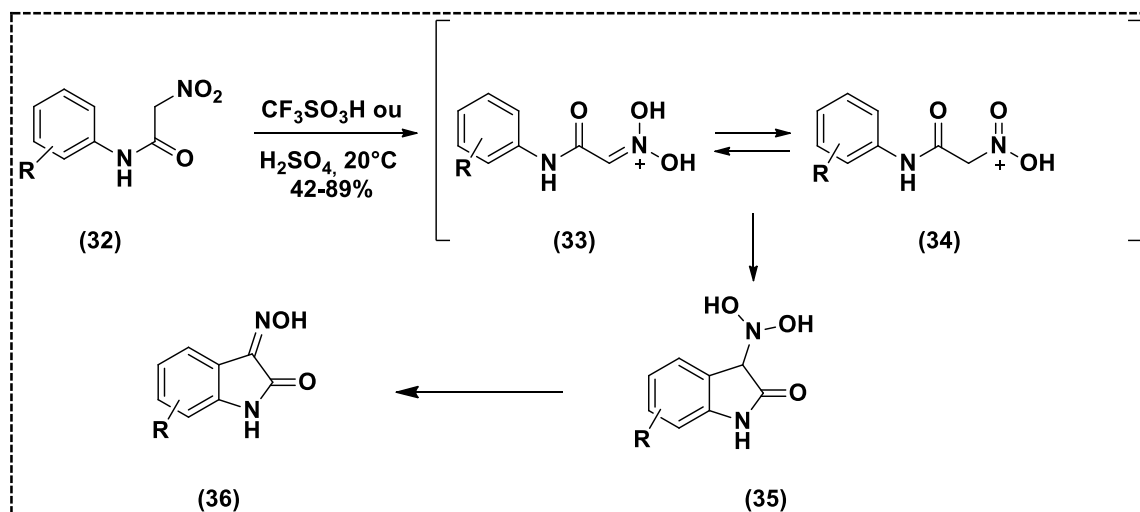
1.5.1. Reações para a Preparação de Isatinas

A literatura descreve diversos métodos para a obtenção das isatinas. A primeira síntese foi descrita por Sandmeyer em 1919, e apesar de ser um método antigo, até o momento, é o mais empregado. Ele consiste na reação entre uma anilina apropriada **30**, hidrato cloral, cloridrato de hidroxilamina e sulfato de sódio, formando o intermediário isonitroacetanilida **31**, e este, na presença de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) é ciclizado, resultando na isatina de interesse (Esquema 2) (LAVANYA *et al.*, 2015; SANDMEYER, 1919).



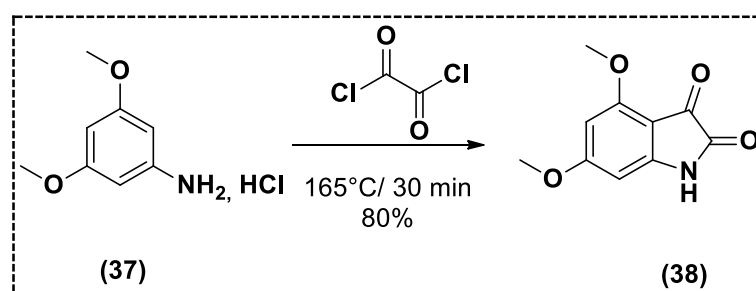
Esquema 2. Método de Sandmeyer.

Um outro método empregado na preparação das isatinas utiliza as nitroacetanilidas **32**. O produto **32** é facilmente ciclizado em ácido sulfúrico concentrado ou ácido trifluorometano-sulfônico, e após o intermediário **35** sofrer uma desidratação forma-se a 3-oximaisatinas **36** (Esquema 3) (KEARMEY *et al.*, 1992; BUSCARONS & SANCHEZ, 1967; WIECHERT *et al.*, 1961).



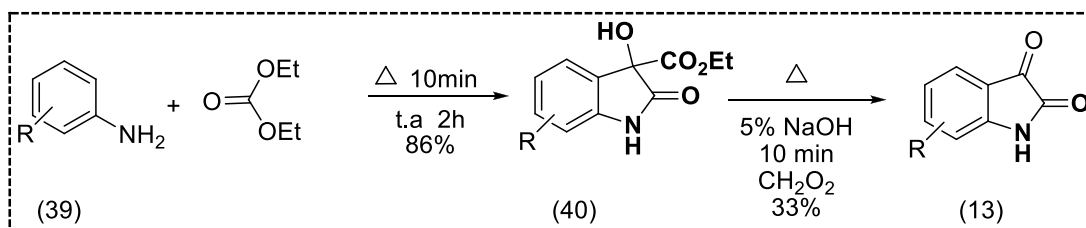
Esquema 3. Metodologia de síntese de derivados de isatina a partir de nitroacetanilidas **32**.

No método de Stolle, a anilina correspondente reage com cloreto de oxalila, formando o derivado de isatina, esse método pode ser catalisado ou não por ácido de Lewis. É uma das metodologias mais empregadas, depois do método de Sandmeyer (Esquema 4) (GUNGOR *et al.*, 2006; STOLLE, 1914).



Esquema 4. Método de Stolle.

A síntese de Martinet envolve a reação de um derivado aminoaromático **39** e um éster oxomalonato, levando a formação do derivado **40**, que após descarboxilação oxidativa, fornece a respectiva isatina (Esquema 5) (BENINGTONI *et al.*, 1955; GUYOT & MARTINET, 1913).



Esquema 5. Síntese de Martinet.

1.6. Compostos Organofluorados Usados como Inibidores de Tirosina Quinase (ITK)

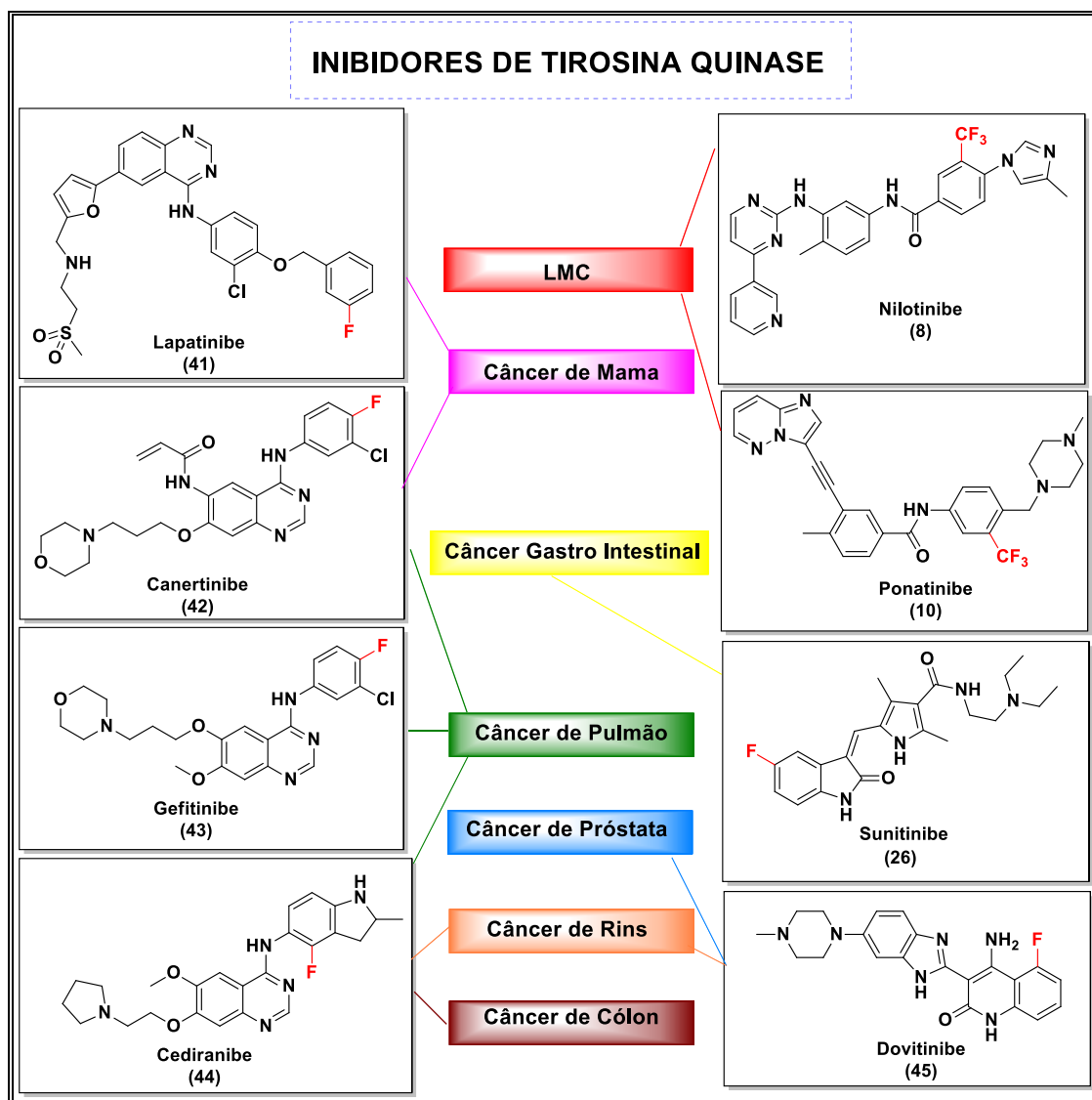
Os compostos orgânicos contendo flúor, conhecidos como organofluorados, têm grande destaque, devido às suas muitas aplicações industriais (BANKS, 1994; 1982; 1979). Os organofluorados são amplamente encontrados em vários produtos, tais como, gases refrigerantes, extintores de incêndio, solventes, surfactantes, propelentes em aerossóis, bateria de lítio recarregável (ZHANG *et al.*, 2015; DOLBIER, 2005), polímeros de alta resistência química e térmica (AMEDURI *et al.*, 2004), cristais líquidos (KIRSCH, 2015), radiofármacos em tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês “*positron emission tomography*”) (TRESSAUD *et al.*, 2008), agroquímicos (FUJIWARA *et al.*, 2014) e, principalmente em fármacos (KIRK, 2006). Em 2011, 7 dos 35 novos medicamentos aprovados e 3 dos 10 mais vendidos eram organofluorados (RITTER, 2012).

A introdução de um ou mais átomos de flúor, em substituição ao átomo de hidrogênio é capaz de proporcionar mudanças físicas, químicas e biológicas significativas em uma molécula. Isso se deve ao fato do flúor ser altamente eletronegativo e alterar as características eletrônicas do composto. De modo geral, os organofluorados possuem maior lipofilicidade, facilitando a sua passagem através das barreiras lipídicas e, desta forma, favorecendo a absorção *in vivo* e sua atividade intracelular. O átomo de flúor é capaz de mimetizar o hidrogênio no receptor, devido ao fato de possuir um raio de van der Waals (1,35 Å) não muito maior que o hidrogênio (1,20 Å), essa semelhança no entanto, é apenas no parâmetro estereoquímico, já que o flúor pode participar de diferentes interações. Além disso, a alta energia atribuída à ligação C-F (450 KJ mol⁻¹), quando

comparada com a C-H (413 KJ mol⁻¹), aumenta a estabilidade química da molécula (KIRK *et al.*, 2006; RENASTI, 1993; WELCH *et al.*, 1991)

O arsenal terapêutico para tratamento do câncer mostra que os derivados fluorados estão presentes em grande número de ITK, sendo empregados na terapia de diversos tipos de oncologias (Quadro 2).

Quadro 2. Exemplos de ITK contendo o átomo de flúor.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o planejamento e a obtenção de novas substâncias (**46-48a-e**), contendo em suas estruturas um fragmento do esqueleto FAP e outro de derivado de isatinas, para serem avaliadas quanto às potenciais atividades antimieloproliferativas. A Figura 9 apresenta as estruturas das moléculas planejadas.

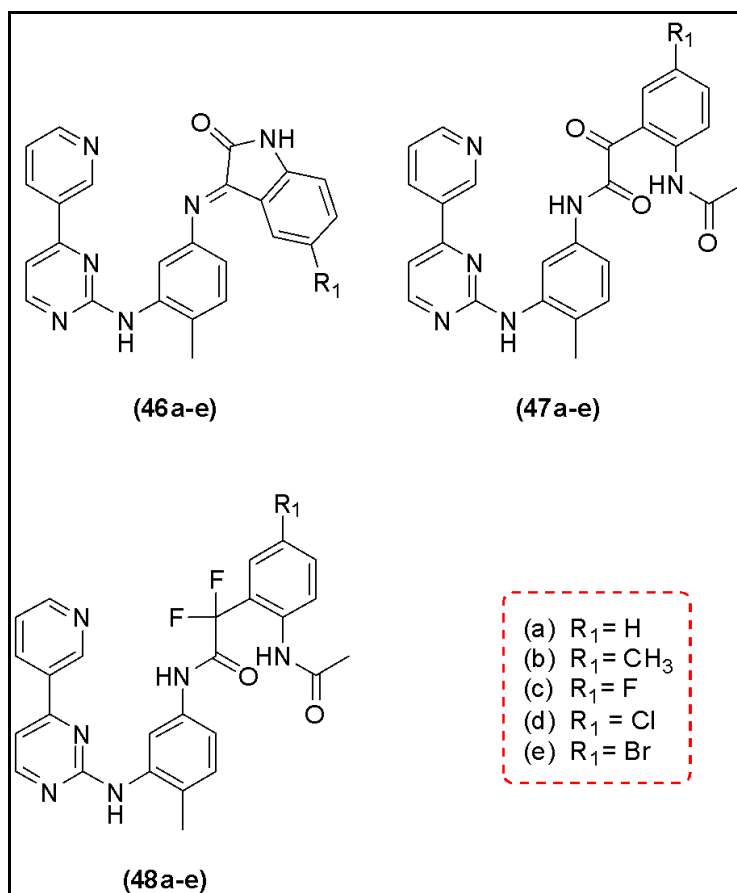


Figura 9. Estrutura das moléculas planejadas.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar estruturalmente quinze moléculas inéditas **46-48a-e** com potencial atividade antimieloproliferativa.
- Avaliar biologicamente os produtos obtidos **46-48a-e** frente às células que contenham a proteína tirosina quinase Bcr-abl constitutivamente ativas.
- Selecionar os compostos que serão testados em células resistentes que expressam a proteína tirosina quinase Bcr-abl constitutivamente ativada.
- Realizar estudos teóricos de ancoragem molecular na presença da proteína Bcr-abl, com o objetivo de colaborar na escolha dos compostos que serão avaliados sobre a enzima Bcr-abl.
- Avaliar a influência da introdução do átomo de flúor nas moléculas sobre a atividade biológica.

3. PLANEJAMENTO E JUSTIFICATIVAS

Os compostos planejados **46-48a-e** foram agrupados em três séries, de acordo com as suas estruturas químicas. A primeira série (**46a-e**) foi planejada com base na hibridação entre o FAP com as isatinas. As séries **47-48a-e** foram planejadas a partir de modificações sob o imatinibe, dando origem a análogos do mesmo.

3.1. Planejamento dos Compostos da Primeira Série 46a-e

A ferramenta utilizada no planejamento dos novos derivados **46a-e** foi a hibridação molecular, que consiste na junção das características estruturais de duas moléculas, com atividades biológicas reconhecidas, em uma única estrutura. Esta técnica tem sido amplamente empregada por químicos medicinais para o desenho de novos compostos biologicamente ativos (BARREIRO & FRAGA, 2015).

Em geral, as moléculas híbridas são capazes de ligar-se a dois alvos distintos de uma mesma fisiopatologia, sendo esta chamada de hibridação dual. Outro exemplo de hibridação consiste na união estrutural completa de duas substâncias bioativas, ou dois fármacos. Estes híbridos podem apresentar as atividades farmacológicas das substâncias que lhe deram origem, recebendo o nome de gêmeas. Em avaliações *in vivo* elas podem ser capazes de, após hidrólise, liberar ambas as substâncias de origem, sendo este um método diferenciado de hibridação molecular (BARREIRO & FRAGA, 2015). O uso desta abordagem gera moléculas multialvos, que são de grande valia no tratamento de doenças multifatoriais, tal como a LMC.

Como descrito anteriormente, o esqueleto FAPP é um fragmento farmacofórico importante no imatinibe e foi mantido no nilotinibe (CHOI *et al.*, 2010; DRUKER *et al.*, 2000). Desta forma, para esta série foi planejado a hibridação

molecular do FAPP juntamente com as isatinas, presente no sunitinibe, também um potente inibidor de multiquinase (MOTZER *et al.*, 2009).

Os substituintes do anel isatínico (CH₃, F, Cl, Br) foram escolhidos a fim de verificar as respectivas contribuições eletrônicas e estéricas, através dos resultados a serem observados na avaliação biológica. O flúor, além de estar presente no sunitinibe, pode promover alterações significativas quando introduzido em uma molécula (Figura 10).

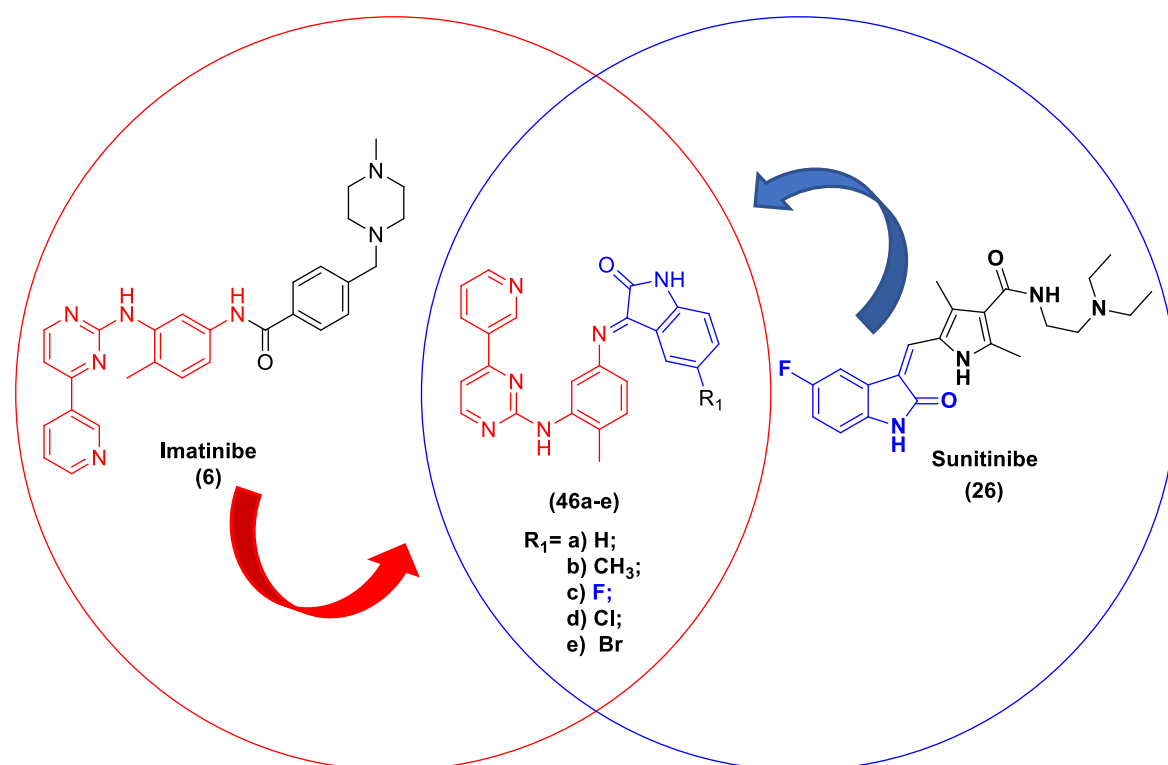


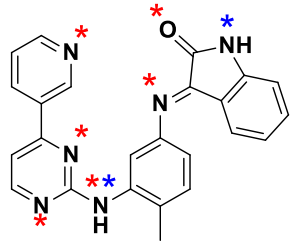
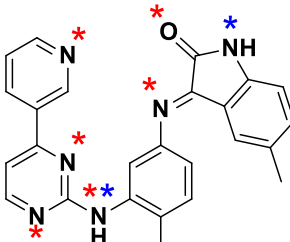
Figura 10. Planejamento dos compostos da primeira série **46a-e**.

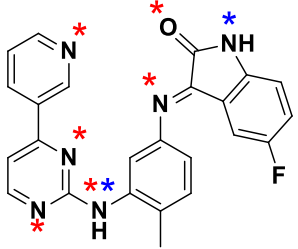
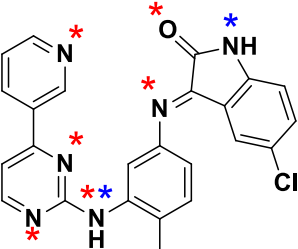
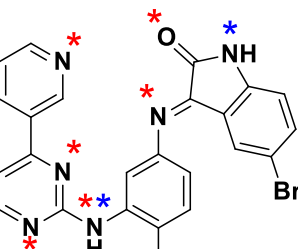
Todas as moléculas propostas atendem à regra de Lipinski. Apenas o substituído com bromo **46e** violou a regra em um dos parâmetros e apresentou cLogP ligeiramente acima de 5 (5,13). Este trabalho que originou a “regra dos 5 de Lipinski” trata-se das propriedades estruturais comuns aos fármacos oralmente ativos, tais como (LIPINSKI *et al.*, 2001):

- Massa Molar abaixo de 500 g/mol;
- Até 10 aceptores de ligação de hidrogênio (ALH);
- Doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 (DLH);
- Coeficiente de partição octanol-água calculado ou experimental (ClogP / LogP) (parâmetro que mede a lipofilicidade da molécula, quanto maior o LogP, maior a lipofilicidade) menor ou igual a 5.

Na Tabela 2 são mostrados todos os parâmetros da regra dos 5 de Lipinski para as moléculas planejadas nesta série.

Tabela 2. Estrutura, massa molar, doadores de ligação de hidrogênio (DLH), aceptores de ligação de hidrogênio e LogP calculado dos derivados planejados 46a-e.

Estruturas	Massa Molar (g/mol)	DLH*	ALH*	cLogP
 <p>(46a)</p>	406	2	6	4,34
 <p>(46b)</p>	420	2	6	4,81

 <p>(46c)</p>	424	2	6	4,48
 <p>(46d)</p>	440	2	6	4,86
 <p>(46e)</p>	484	2	6	5,13

3.2. Planejamento dos análogos do imatinibe 47a-e

A segunda série de compostos **47a-e**, obtidas a partir de derivados das isatinas, apresentam muitas semelhanças estruturais com imatinibe. Em relação ao protótipo, as principais modificações observadas nos novos derivados planejados **47a-e** foram:

- Introdução da carbonila cetônica como espaçador entre a amida e o anel aromático;

- Introdução de diferentes substituintes, tais como, CH₃, F, Cl, Br, na posição *meta* do anel aromático;
- Retirada do grupo metilpiperazina;
- Introdução de uma amida adicional na posição *orto* do anel aromático.

Todas essas modificações foram propostas com objetivo de verificar os seus efeitos frente às avaliações biológicas em células que expressam a proteína tirosina quinase Bcr-abl constitutivamente ativa (Figura 11).

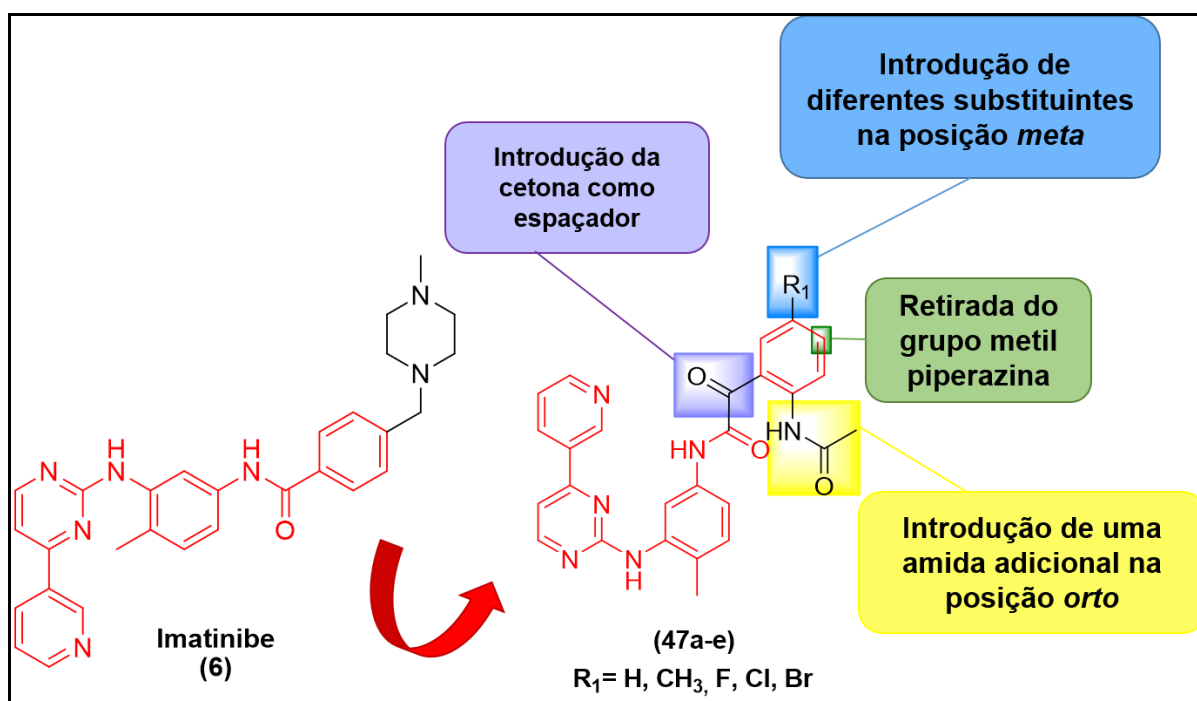
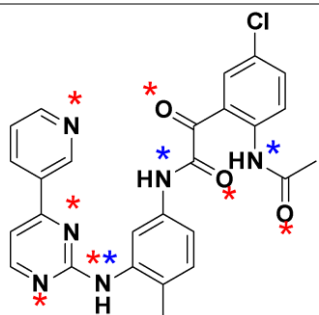
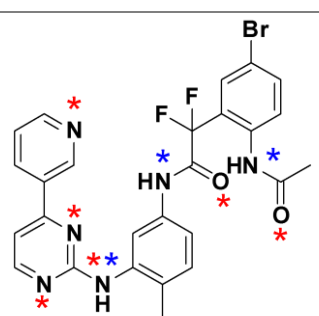


Figura 11. Planejamento dos análogos do imatinibe 47a-e.

Todos os compostos planejados 47a-e, atendem à regra de Lipinski. Apenas o substituído com bromo 47e violou a regra em um dos parâmetros e apresentou massa molar ligeiramente acima de 500 g/mol (Tabela 3).

Tabela 3. Estrutura, massa molar, doadores de ligação de hidrogênio (GLH), aceptores de ligação de hidrogênio e cLogP calculado dos derivados planejados 47a-e.

Estruturas	Massa molar (g/mol)	DLH*	ALH*	cLogP
<p>(47a)</p>	466	3	7	3,83
<p>(47b)</p>	480	3	7	4,30
<p>(47c)</p>	484	3	7	3,97

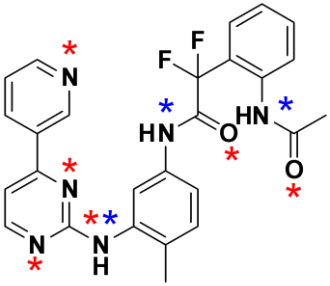
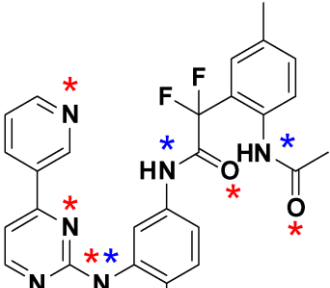
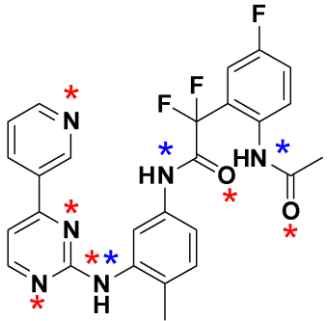
 <p>(47d)</p>	500	3	7	4,35
 <p>(47e)</p>	545	3	7	4,63

3.3. Planejamento dos análogos do imatinibe 48a-e

A última série de compostos **48a-e**, análogos do imatinibe, foi planejada com modificações estruturais semelhantes à segunda série. No entanto, para estes compostos foi escolhido como espaçador o grupo *gem*-difluorometil (CF₂). O átomo de flúor foi introduzido na molécula a fim de verificar os efeitos de suas propriedades, já descritas anteriormente, na atividade biológica desta classe de compostos.

Nesta série, apenas o **48e**, substituído com bromo violou a regra de Lipinsk em dois parâmetros, enquanto **48a** não violou nenhuma e **48b-d** apresentaram massa molar acima de 500 g/mol. Mesmo sabendo que **48e** não atende a regra de Lipinsk ele foi sintetizado, visto que nas avaliações biológicas iniciais isto não é um fator preponderante e esta é uma regra teórica. (Tabela 4).

Tabela 4. Estrutura, massa molar, doadores de ligação de hidrogênio (GLH), aceptores de ligação de hidrogênio e cLogP calculado dos derivados planejados 48a-e.

Estruturas	Massa molar (g/mol)	DLH	ALH	cLogP
 <p>(48a)</p>	488	3	6	4,48
 <p>(48b)</p>	502	3	6	4,95
 <p>(48c)</p>	506	3	6	4,62

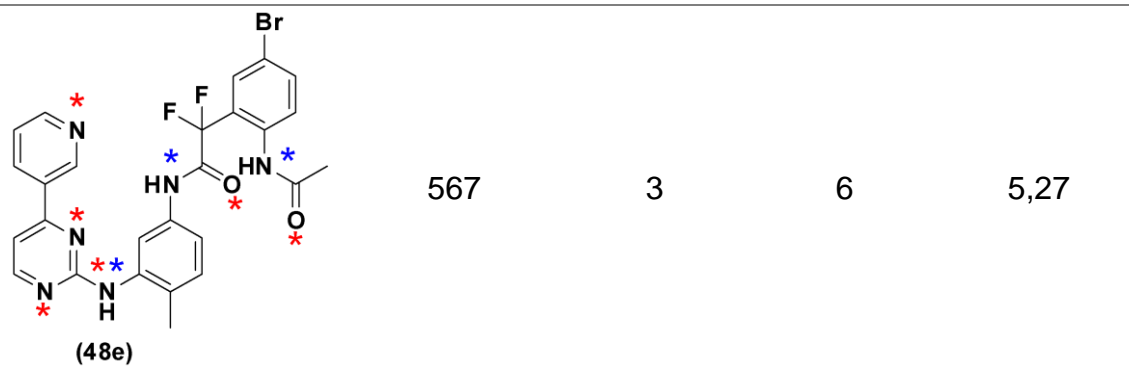


522

3

6

5,00



567

3

6

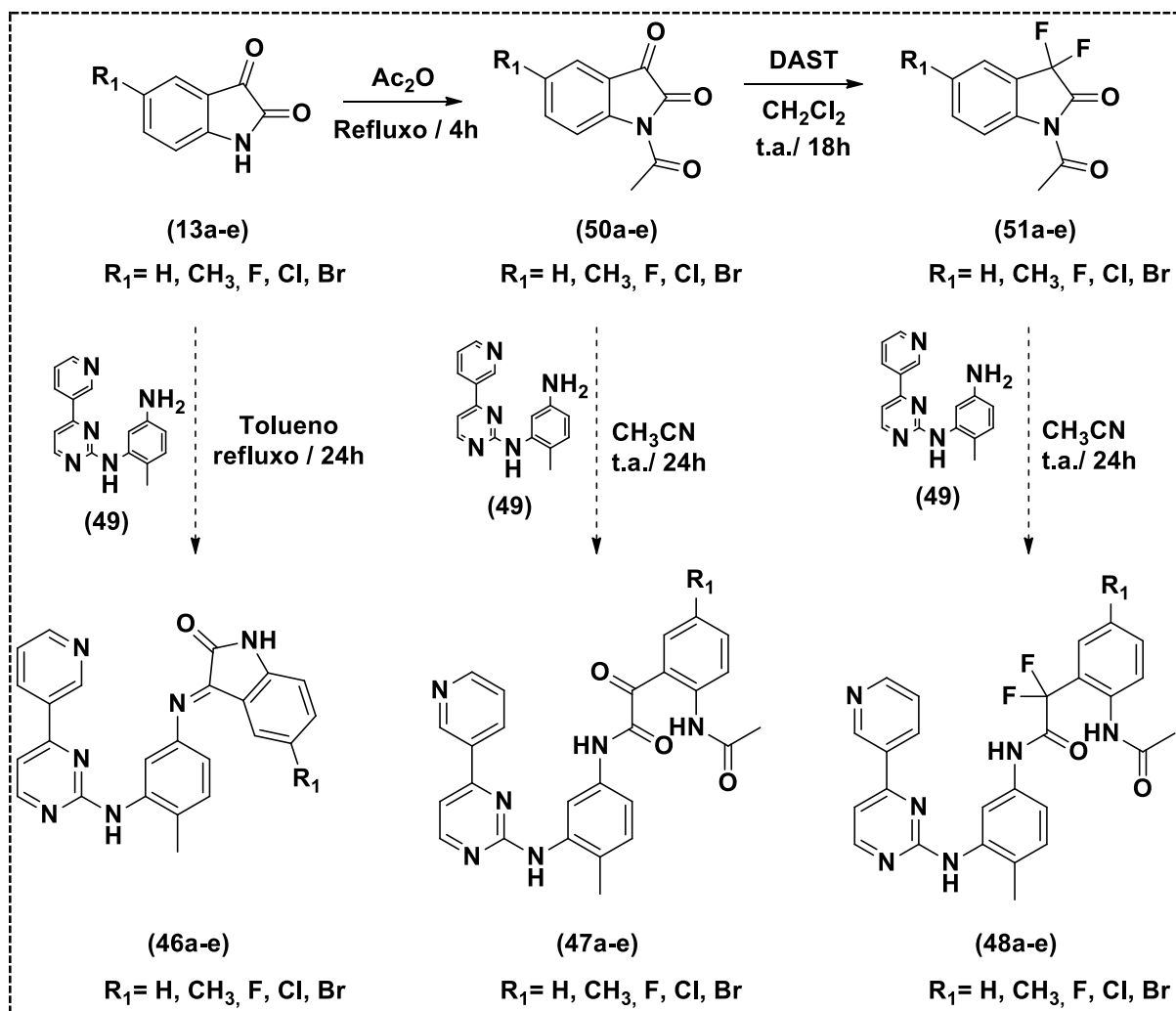
5,27

4. METODOLOGIA

4.1. Metodologia sintética para a preparação das moléculas inéditas (46-48a-e)

A metodologia proposta para a obtenção dos compostos da série **46a-e** consiste na reação entre as isatinas correspondente (**13a-e**) e o esqueleto fenil amino-pirimidina piridina (FAPP, **49**) (Esquema 6).

A síntese dos produtos da série **47a-e** inicia-se com preparação dos derivados *N*-acetilados da isatina **50a-e**, seguida da reação de adição a carbonila (Esquema 6). Para obtenção da série **48a-e**, foi realizada uma etapa adicional, que consiste na reação de *gem*-difluoração dos derivados *N*-acetilados **50a-e**, utilizando DAST como agente de fluoração. Posteriormente, estes foram reagidos o FAPP para a formação dos produtos finais (Esquema 6).



Esquema 6: Metodologia para obtenção das moléculas 46-47a-e

4.2. Metodologia de avaliação do perfil biológico em células da linhagem K562 e K562 Lucena.

A viabilidade celular foi avaliada através de ensaio de 3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-brometo de difeniltetrazolio (MTT). A linhagem celular humana usada nestes ensaios foi a K562, derivada da LMC, que expressa a proteína quimérica Bcr-abl, constitutivamente ativada. As células foram incubadas com os novos derivados sintetizados **46-48a-e** e com imatinibe, em concentrações variando entre 0,05 – 5,0 μM . Os compostos que apresentaram atividade semelhante ao imatinibe foram submetidos a avaliações com a linhagem K562-Lucena. Esta linhagem,

desenvolvida a partir da K562, por exposição contínua e crescente ao quimioterápico vincristina, possui o fenótipo de resistência à múltiplas drogas (MDR) e exibe a expressão e atividade da bomba de efluxo glicoproteína P (Pgp); além de expressar a proteína quimérica Bcr-abl, constitutivamente ativada.

4.2.1. Ensaio de Viabilidade Celular através do método de MTT

As células K562, originada de uma LMC em crise blástica, foram submetidas ao ensaio MTT para análise da redução na viabilidade celular, produzida pelos derivados planejados **46-48a-e**, e estes resultados foram comparados ao imatinibe. MTT é um método colorimétrico que mede a atividade da desidrogenase mitocondrial, baseado na capacidade das células vivas de reduzirem o sal 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^4 células/poço, em 200 μ L do meio "Roswell Park Memorial Institute" RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram adicionados 10 μ L de cada um dos novos derivados **46-48a-e**, ou do imatinibe, previamente diluídos em meio RPMI, em diferentes concentrações, sendo que ao grupo controle não se adicionou nenhuma molécula ou o imatinibe. As placas foram mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, à 37 °C, por 72 horas. Quatro horas antes do término do tempo estabelecido, foram adicionados 20 μ L de MTT (concentração final de 10 μ g/mL). As placas foram mantidas na estufa pelas quatro horas restantes. Foram retirados 180 μ L do sobrenadante de cada poço, e posteriormente 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados, para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial, resultando assim em uma coloração. A coloração obtida possui densidades ópticas diferentes, que variam de acordo com o metabolismo mitocondrial, após o tratamento das células com as diferentes concentrações dos novos derivados **46-48a-e** ou na ausência destes. A placa de 96 poços foi lida utilizando o espectrofotômetro (Spectramax Plus 384), em um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram analisados através da absorbância de cada poço. O percentual

de viabilidade foi obtido através da fórmula: [(Absorbância das células tratadas com os novos derivados **46-48a-e** ou imatinibe / Absorbância das células não tratadas) x 100]. Todos os testes foram realizados em três diferentes ocasiões e para cada concentração triplicatas foram feitas. Através desse método pôde-se detectar o percentual de inibição celular de cada nova molécula e comparar com o percentual de redução da viabilidade causada pelo imatinibe.

4.3 Metodologia de avaliação *in silico* dos compostos planejados.

Os compostos em avaliação foram desenhados e as geometrias otimizadas, para se adaptarem ao campo de força MMFF94 (HALGREN, 1996), no programa Spartan (Spartan'14). No programa AutoDock 4.0 (TROTT & OLSON, 2011), cargas Gasteiger (GASTEIGER & SALLER, 1985), foram atribuídas aos compostos. O estudo de ancoramento molecular foi realizado no programa AutoDock Vina (MORRIS *et al.*, 1998).

Os arquivos das proteínas empregados foram obtidos por extração das cadeias protéicas (cadeias A) dos arquivos originais das proteínas de códigos 2HYY e 3G0E, seguido por preparo de acordo com as condições padrões do programa AutoDock 4.0. Cargas Gasteiger foram igualmente selecionadas. Para cada arquivo de proteína, construíram-se caixas centradas nos ligantes co-cristalizados: STI-575, com centro em 14,878 Å, 16,836 Å, 17,241 Å, e B-49, com centro em 34,578 Å, -3,255 Å, -78,191. Os volumes adotados foram proporcionais àqueles dos compostos em estudo, a saber, 44x38x36 e 30x30x40 pontos para os eixos x, y e z, respectivamente, com discretização de 0,375 Å. A construção desta caixa tem por objetivo restringir o cálculo dos diferentes tipos de interação (eletrostática, hidrofóbica e estérica) entre o ligante/composto e proteína a determinado volume próximo daquele em que se encontra o ligante co-cristalizado.

Para a execução da etapa de ancoramento molecular no programa AutoDock Vina, adotou-se os parâmetros de *energy-range* = 5 kcal/mol, que representa o valor máximo permitido da diferença de energia de interação calculada entre o

melhor (e respectivo menor valor de energia de interação) e pior (maior valor de energia de interação), encontrado entre os 20 modelos gerados, e considerando-se o parâmetro de *exhaustiveness* = 150, que define o esforço do algoritmo na busca por um mínimo global próximo da conformação do ligante co-cristalizado (conformação nativa) (HAMMES, 2012). Um total de sete corridas foram efetuadas para cada composto. Inicialmente, foram realizados os estudos de *redocking*, ou seja, o estudo de ancoramento molecular do ligante co-cristalizado. Este estudo é necessário para que os parâmetros selecionados possam ser calibrados, e assim dar prosseguimento ao ancoramento dos compostos que serão avaliados, dos quais não se conhece os modos de ligação. Se o valor calculado da raiz quadrada do desvio médio quadrático (RMSD, do inglês “*Root Mean Square Deviation*”) entre as coordenadas tridimensionais da conformação de menor energia fornecida pelo algoritmo, e daquelas da estrutura cristalográfica do ligante estiver entre 1,5 a 2,0 Å, o algoritmo é considerado confiável para a análise de ancoramento molecular, e é dada a sequência na análise dos compostos de interesse.

A análise visual das interações presentes nos complexos ligante/composto - proteína foi realizada no programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System). Diagramas bidimensionais ilustrativos destas interações foram construídos empregando-se o programa *Pose View* (SITERAND, 2010). Nestes diagramas, linhas pretas tracejadas indicam interações dipolo-dipolo, como as ligações de hidrogênio, interações entre cargas opostas e com metal. Interações hidrofóbicas são representadas por linha verde contínua, e interações do tipo π - π e cátion- π são representadas por linha verde tracejada.

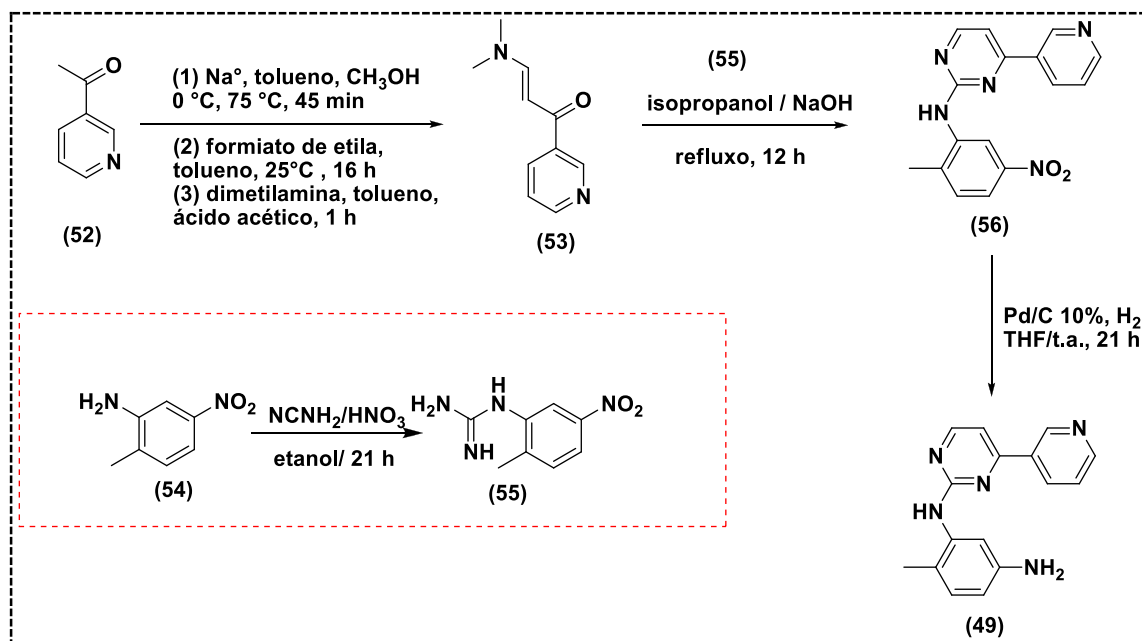
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese

Para a obtenção de todos os compostos planejados com potencial atividade antimieloproliferativa foram utilizadas as isatinas **13a-e** e o esqueleto FAP. A isatina não substituída **13a** e as substituídas em C-5 por flúor **13c**, cloro **13d** e bromo **13e** foram adquiridas comercialmente. A isatina **13b**, substituída em C-5 por metila, foi sintetizada através do método de Sandmeyer (SANDMEYER, 1919).

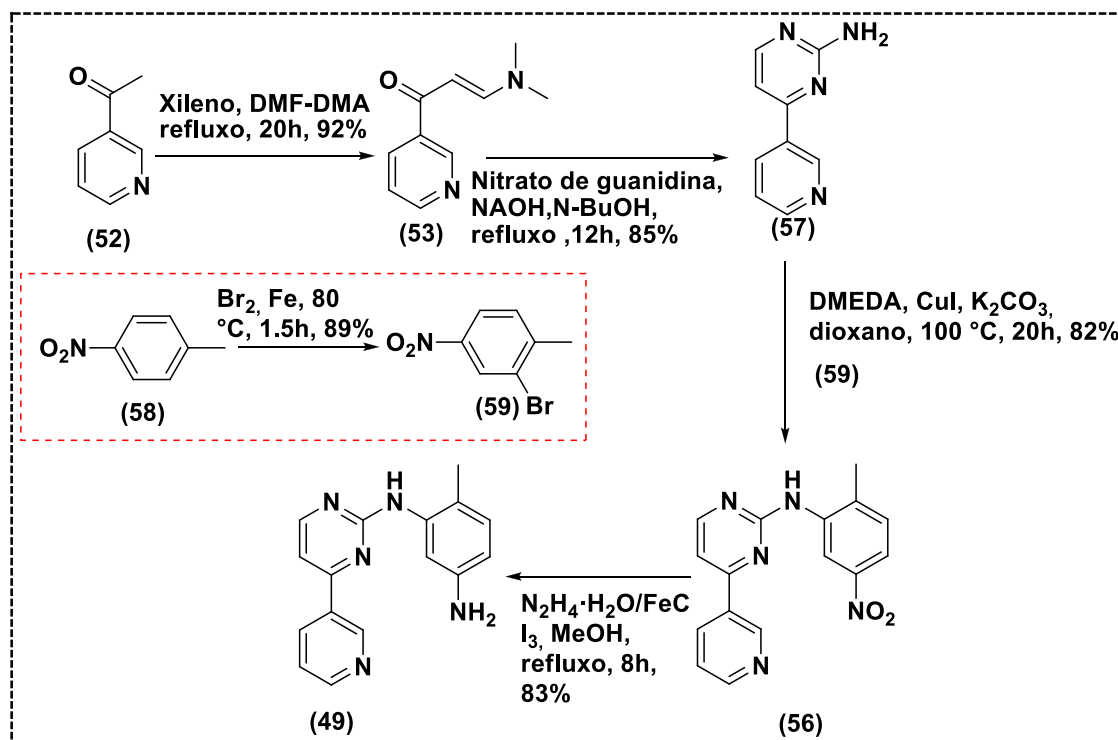
Para a síntese dos compostos finais (**46-48 a-e**) foi necessário realizar uma série de reações no anel da isatina, tais como adição/eliminação à carbonila C-3, *N*-acetilação e *gem*-difluoração da carbonila C-3.

Para este trabalho fez-se necessária a obtenção do FAPP (**49**). A síntese do intermediário FAPP é amplamente descrita na literatura através de rotas clássicas para preparações de sistemas pirimidínicos (FENG *et al.*, 2009; REWCASTLE *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 1996a,b; ZIMMERMANN, 1996). Em 1996, Zimmermann e colaboradores relataram a obtenção do imatinibe através de uma rota que envolvia a formação do esqueleto FAPP. Esta metodologia apresenta algumas desvantagens, tais como o uso de reagentes de difícil manipulação e a necessidade de três etapas de reação para a obtenção da enaminona **53** (ZIMMERMANN *et al.*, 1996a,b,; ZIMMERMANN, 1996) (Esquema 7). Além disso, neste trabalho os rendimentos reacionais não foram descritos.



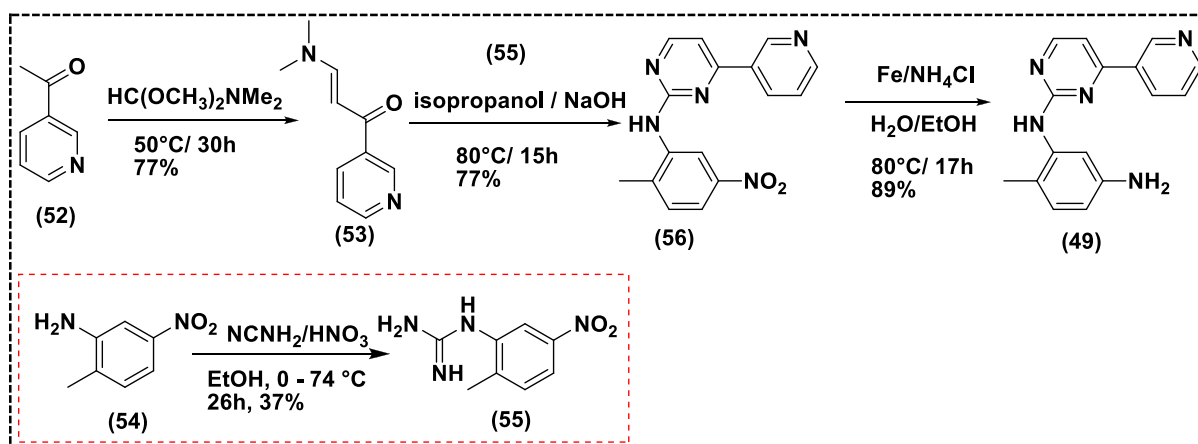
Esquema 7. Rota sint\u00e9tica desenvolvida por Zimmermann e colaboradores para a s\u00edntese do esqueleto FAPP.

Posteriormente, Liu e colaboradores desenvolveram uma rota sint\u00e9tica diferente com grande potencial para ser reproduzida em escala industrial. Nesta metodologia, ocorre redu\u00e7\u00e3o do grupo nitro, utilizando \u00e1gua como solvente, hidrazina (N_2H_4) e cloreto de ferro (FeCl_3). Os rendimentos variaram entre 82% e 92% (LIU *et al.*, 2008) (Esquema 8).



Esquema 8. Rota sintética desenvolvida por Liu e colaboradores.

Recentemente, o nosso grupo otimizou a síntese de Zimmermann e o esqueleto FAPP foi obtido com bom rendimento global de 20% (BOECHAT *et al.*, 2013) (Esquema 9). Contudo, para esse trabalho, o intermediário FAPP foi obtido através de doação da empresa Cristália S.A., com grau de pureza de 99%.

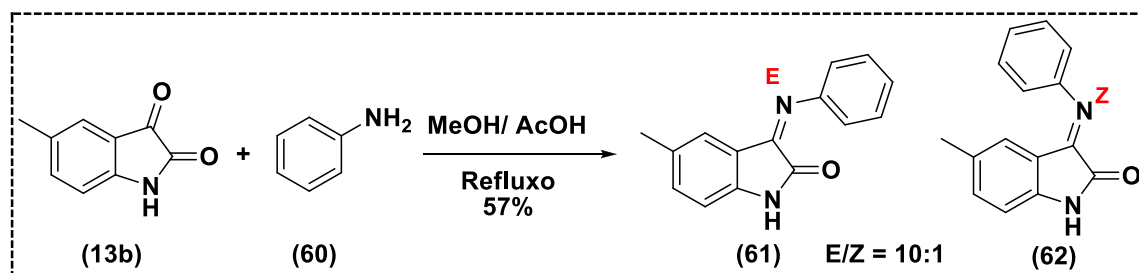


Esquema 9. Rota sintética desenvolvida por Boechat e colaboradores para a síntese do esqueleto FAPP.

5.1.1. Síntese das moléculas da Primeira Série 46a-e

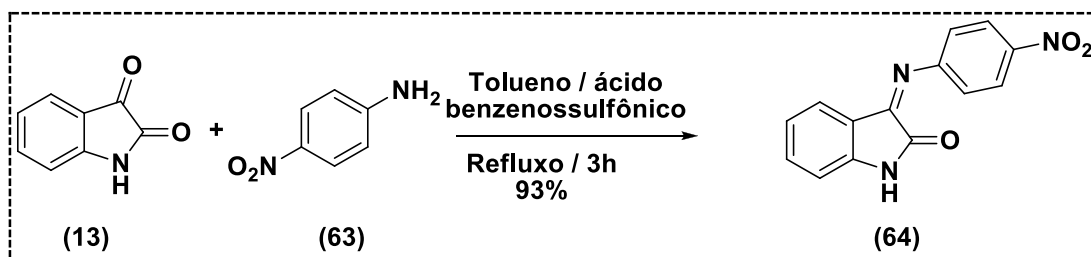
A literatura descreve uma série de métodos para a preparação de iminas a partir de isatinas (ZARI *et al.*, 2014; AZIZIAN *et al.*, 2012; IKOTUN *et al.*, 2012; DIGHE *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2007). A maior parte delas envolve o uso de um ácido e/ou um agente dessecante. O ácido atua como catalisador e o agente dessecante é utilizado para deslocar o equilíbrio para a obtenção das iminas aromáticas, também denominadas como base de Schiff.

Recentemente, Zari e colaboradores descreveram a síntese de uma série de iminas a partir de isatinas. A metodologia empregada neste trabalho consiste no uso de metanol como solvente e ácido acético como catalisador. Os produtos foram obtidos como uma mistura de isômeros *E/Z*, na proporção 10:1 (Esquema 10) (ZARI *et al.*, 2014).



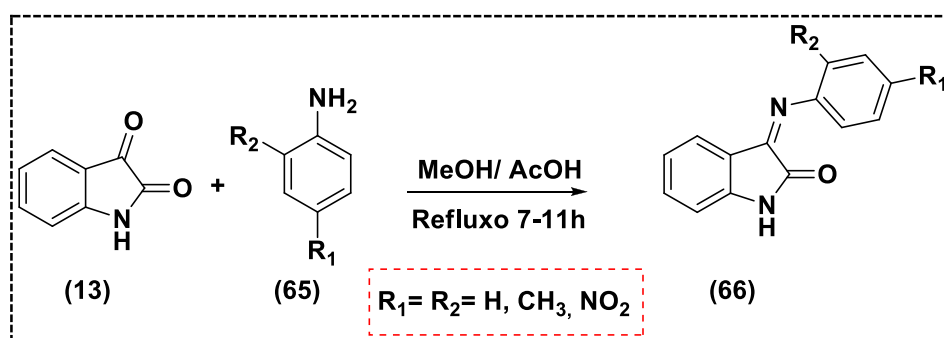
Esquema 10. Síntese de iminas através do método descrito por Zari e colaboradores.

Ikotun e colaboradores sintetizaram bases de Schiff através do uso do ácido benzenossulfônico como catalisador, em tolueno, sob refluxo. Neste método, o “dean-stark” é utilizado para a remoção da água, no presente trabalho o autor não menciona a formação de isômeros (Esquema 11) (IKOTUN *et al.*, 2012).



Esquema 11. Método descrito por Ikotun e colaboradores para a obtenção de iminas.

Em 2011, Shah e colaboradores descreveram a formação de bases de Schiff através do uso do metanol como solvente. Neste processo, o meio reacional foi ajustado para pH 4, com ácido acético glacial, e a reação foi mantida sob refluxo por 7 à 11 horas (SHAH *et al.*, 2011). Contudo, foi observado que o uso do sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), como agente dessecante, proporcionou uma melhora do processo, no entanto não foram descritos os rendimentos e se houve a formação de isômeros (Esquema 12).



Esquema 12. Obtenção de iminas a partir da metodologia descrita por Shah e colaboradores.

Inicialmente, os compostos desta primeira série **46a-e** foram obtidos através da metodologia descrita por Shah e colaboradores (SHAH *et al.*, 2011), que empregava MeOH/ AcOH e NaSO_4 . Os produtos finais foram obtidos como uma mistura de isômeros, na proporção de 7:3, como pode ser ilustrado na Figura 12.

Posteriormente, inúmeras tentativas de separação foram empregadas, tais como, coluna cromatográfica e cromatografia em placa preparativa, porém nenhuma destas logrou sucesso.

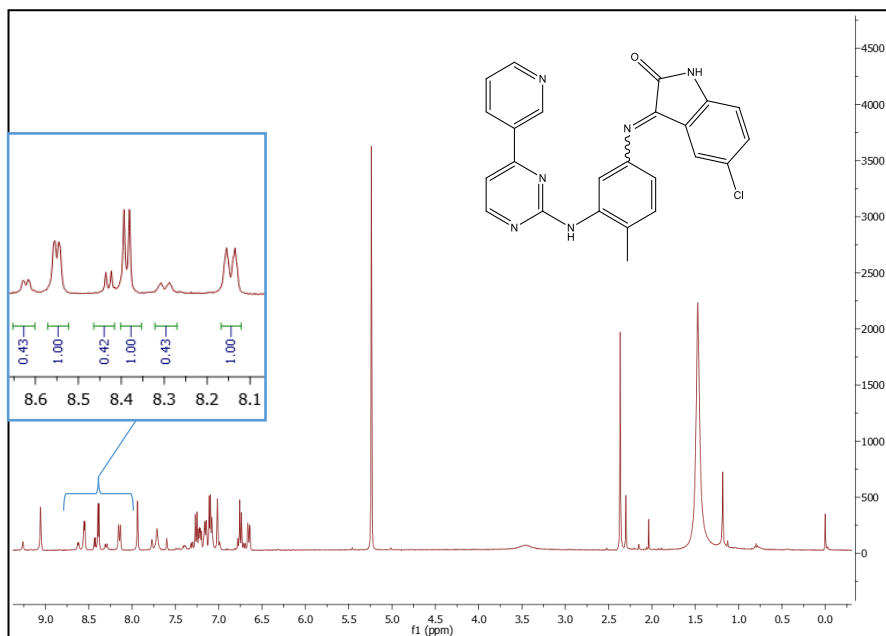
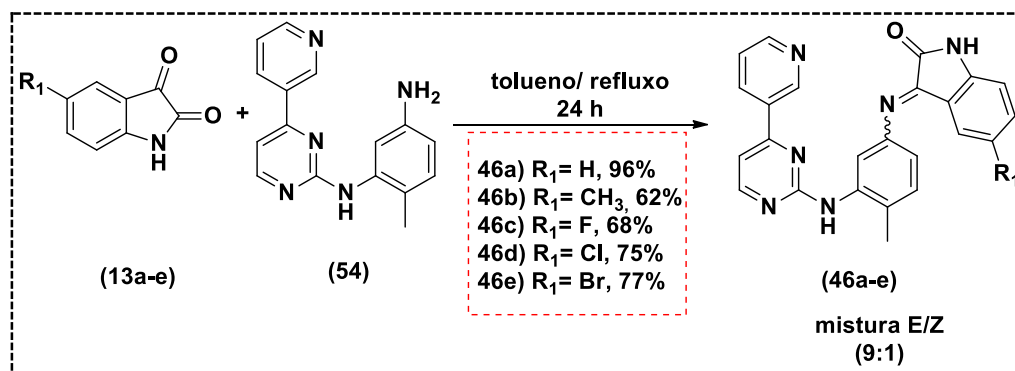


Figura 12. Espectro de RMN ¹H (400,00 Hz; CD₂Cl₂) do composto **46d**, mostrando a formação dos isômeros na proporção 7:3.

Na busca de uma metodologia mais eficiente, as reações para a formação dos compostos **46a-e** foram realizadas sem o uso do ácido. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada fina (CCF), por 21 dias, e após este período não houve a completa conversão do material de partida.

Desta forma, foi empregada a metodologia adaptada descrita por Ikotun e colaboradores (IKOTUN *et al.*, 2012). Os produtos finais **46a-e** foram obtidos através de uma reação sem o uso do ácido, em tolueno, sob refluxo por 24 horas (Esquema 13).



Esquema 13. Metodologia sintética empregada para obtenção dos compostos **46a-e**.

A metodologia empregada permitiu a formação dos produtos finais **46a-e** como uma mistura dos isômeros na proporção 9:1.

As estruturas químicas dos produtos finais **46a-e** foram confirmadas por análises de espectrometria de massas por ionização electrospray (EM-IES), espectrofotometria na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) para os núcleos ¹H, ¹³C e ¹⁹F e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR). O grau de pureza foi determinado através de análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Vale ressaltar que, todos os produtos finais desta série **46a-e** são inéditos.

Os EM-IES para os compostos **46a-e** apresentaram íons moleculares compatíveis com as estruturas propostas (Tabela 5), indicando a formação dos produtos desejados.

Os espectros na região do IV para os compostos **46a-e** apresentaram bandas de absorção entre 3256 e 3722 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento N-H; 2984 e 3068 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento C-H *sp*²; 1727 e 1740 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento C=O; 1608 e 1620 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento C=N; 705 e 867cm⁻¹ correspondentes às deformações angulares fora do plano das ligações C-H aromáticas (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de ponto de fusão, EM-IES e IV dos produtos finais **46a-e**.

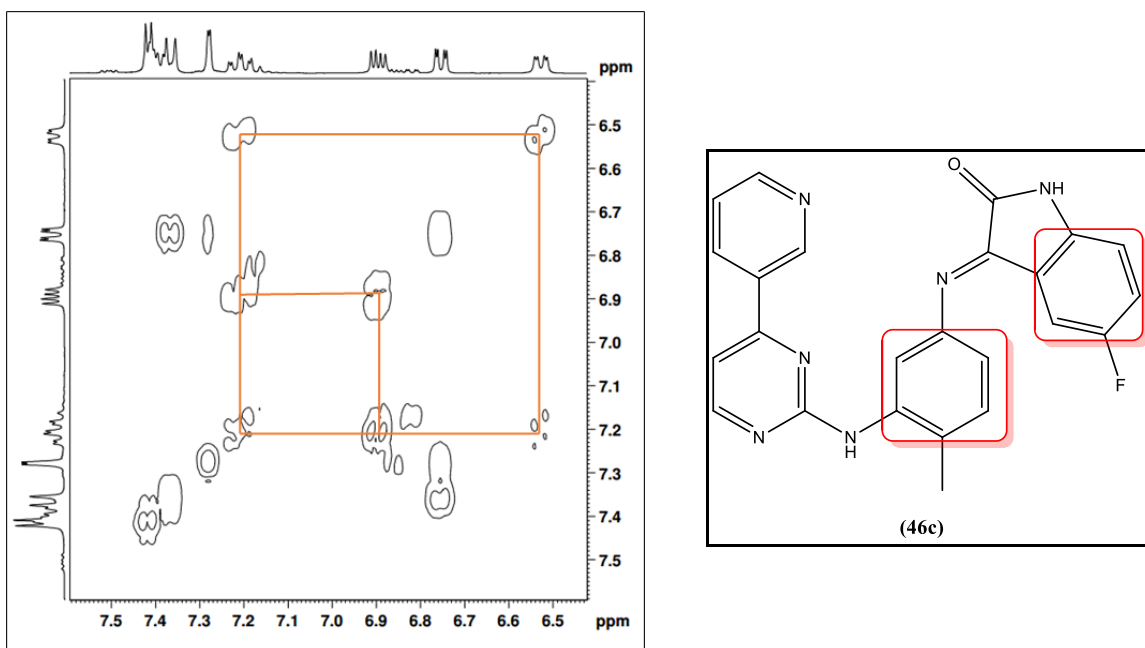
Compostos	P.F. (°C)	EM-IES (<i>m/z</i>)	IV cm ⁻¹				
			N-H	C-H <i>sp</i> ²	C=O	C=N	C-H (ar)
46a) R= H	184-185	405 (M ⁺ -1)	3444	3068	1727	1614	838, 795, 755
46b) R=CH₃	195-197	443 (M ⁺ +Na)	-	2984	1727	1616	798, 749, 705
46c) R= F	237-239	423 (M ⁺ -1)	3452	-	1739	1620	867, 822, 784
46d) R= Cl	247-248	439 (M ⁺ -1)	3449	3115	1740	1608	819, 792, 747
46e) R= Br	163-164	483/485 (M ⁺ -1)	3450, 3223	3115	1741	1606	817, 787, 740

Os assinalamentos dos hidrogênios e carbonos foram feitos com base nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C. Foram considerados os valores de deslocamentos químicos dos sinais, suas multiplicidades, constantes de acoplamento e integrações.

Com objetivo de elucidar estruturalmente os compostos **46a-e**, foram realizadas técnicas de RMN unidimensionais (para todos os compostos) e bidimensionais para o composto **46c**. As técnicas bidimensionais utilizadas nesse trabalho foram a correlação homonuclear (COSY, do inglês “Homonuclear Correlation Spectroscopy”), correlação heteronuclear de múltiplas ligações (HMBC, do inglês “Heteronuclear Multiple Bond Coherence”) e correlação heteronuclear de quantum-simples (HSQC-ED, do inglês “Heteronuclear Single Quantum Coherence – Editing”).

As análises de COSY permitem estabelecer as correlações entre os hidrogênios que acoplam por ²⁻³J_{H,H} (acoplamentos geminais e vicinais,

mensuráveis no espectro 1D), e distinguir a multiplicidade dos sinais constatados no espectro de RMN ^1H . O resultado do COSY para o composto **46c** indicou que o hidrogênio em 7,20 ppm, acopla com os hidrogênios em 6,89 ppm e em 6,52 ppm, respectivamente; e estes só acoplam com o 7,20 ppm. A partir destes dados foi possível estabelecer que esses sinais fazem parte de um anel aromático com três hidrogênios (Figura 13).



As análises de HSQC visam estabelecer as correlações entre as ligações diretas de $^1J_{\text{C-H}}$. Estes dados, aliados aos do COSY, permitiram determinar que os hidrogênios com descolamentos em: 7,20; 6,89 e 6,52 ppm encontram-se diretamente ligados à carbonos pertencentes a um anel substituído com o flúor. Estes carbonos apresentaram-se na forma de dupletos, com constantes de acoplamento (C-F) característicos para substituições em *orto*, *meta* e *para* (Figura 14).

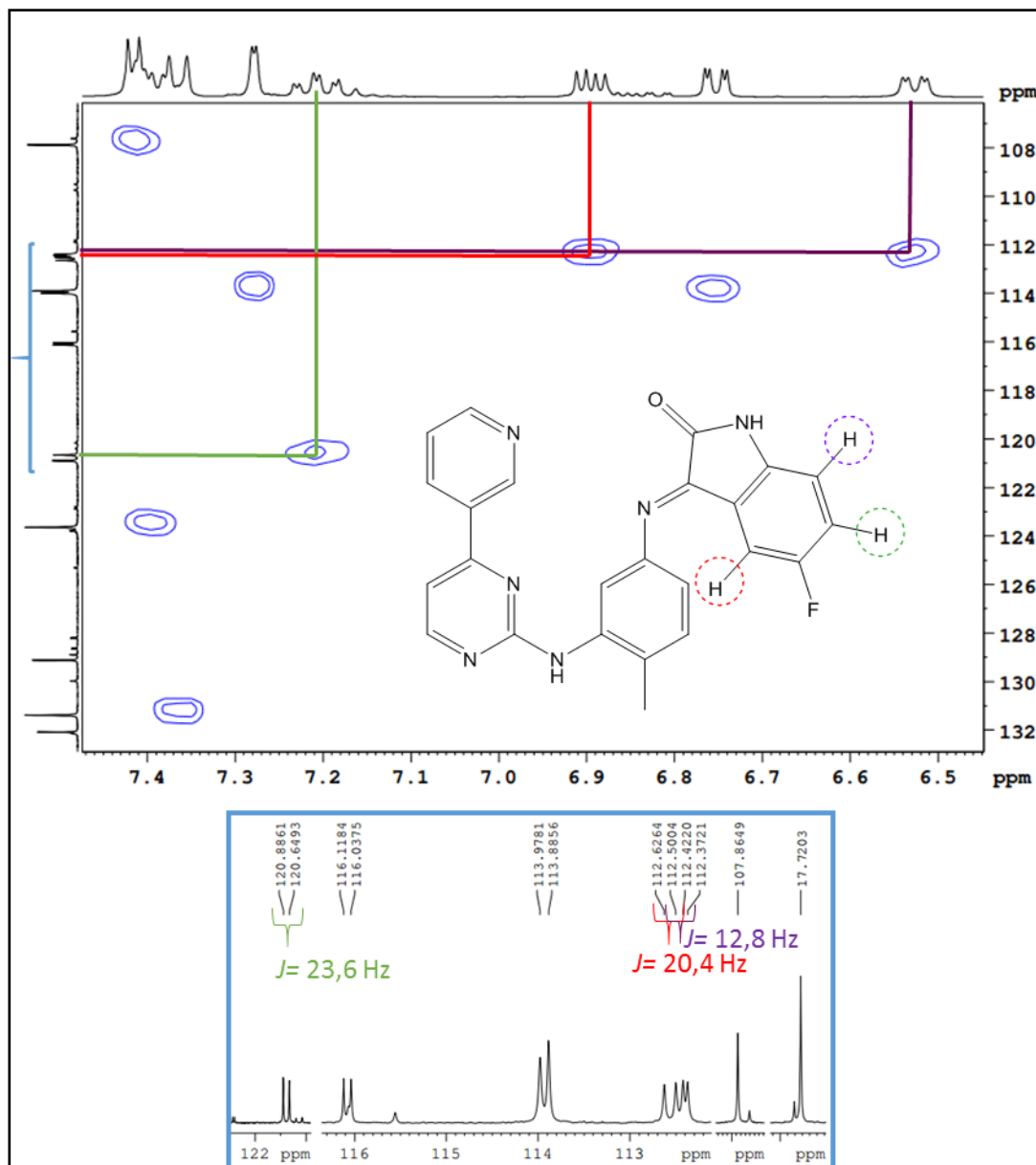


Figura 14. Análise de HSQC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d_6) e expansão de RMN ^{13}C (100,0 MHz; DMSO- d_6) do composto **46c**.

As análises de HMBC permitem realizar a correlação heteronuclear de duas a três ligações $^2J_{\text{H-C}}$ e $^3J_{\text{H-C}}$. O resultado deste experimento para o composto **46c** indicou que o hidrogênio em 2,32 ppm, característico de metila, está correlacionado com outros três carbonos com deslocamentos em: 129,1; 131,3; 137,7 ppm (Figura 15). O carbono com sinal em 131,3 ppm, através das análises de HSQC, mostrou-

se associado ao carbono, que está ligado ao hidrogênio com deslocamento em 7,39 ppm (Figura 16).

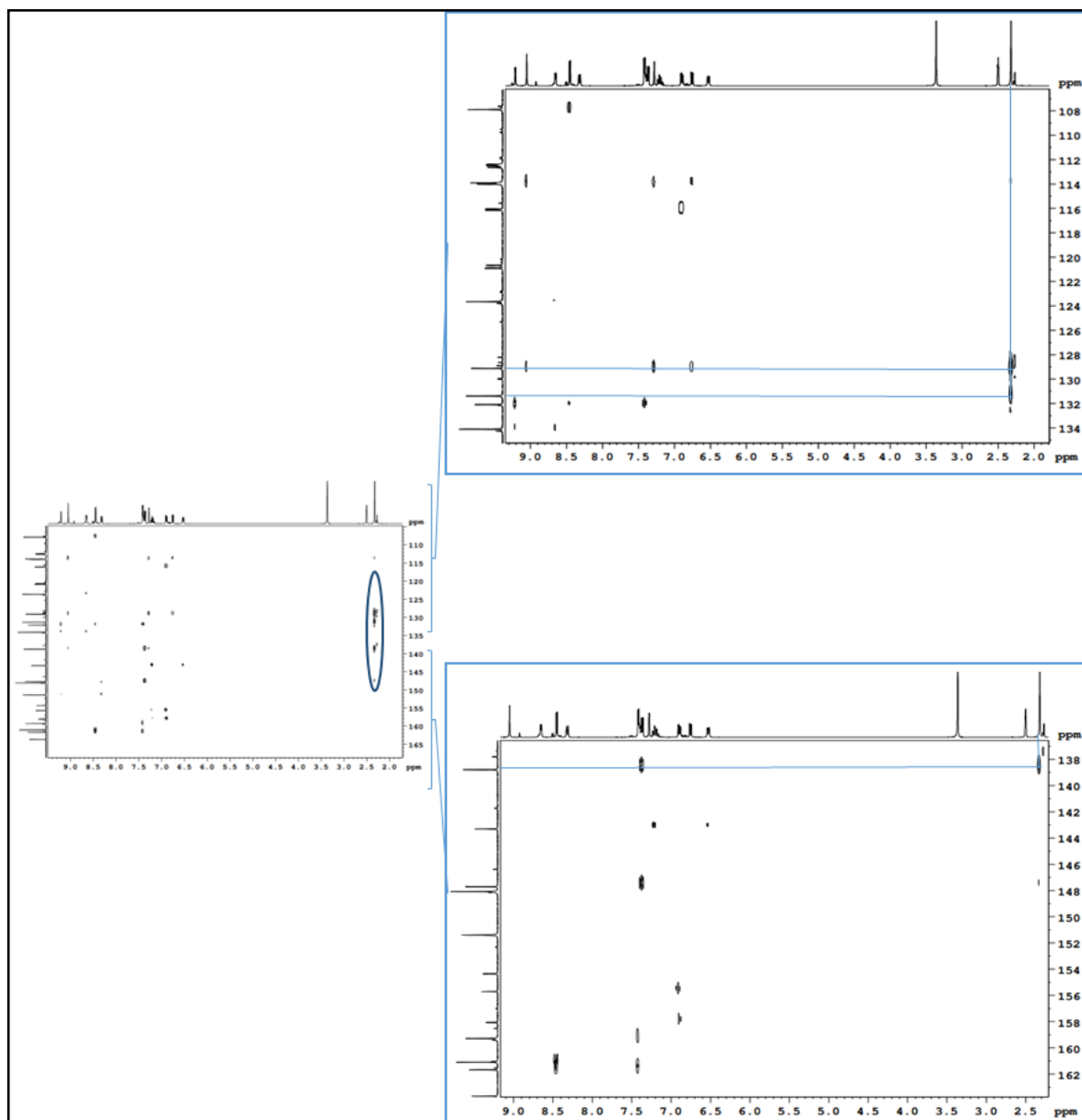


Figura 15. Análise de HMBC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d₆) do composto **46c**, correlações dos hidrogênios da metila com os carbonos.

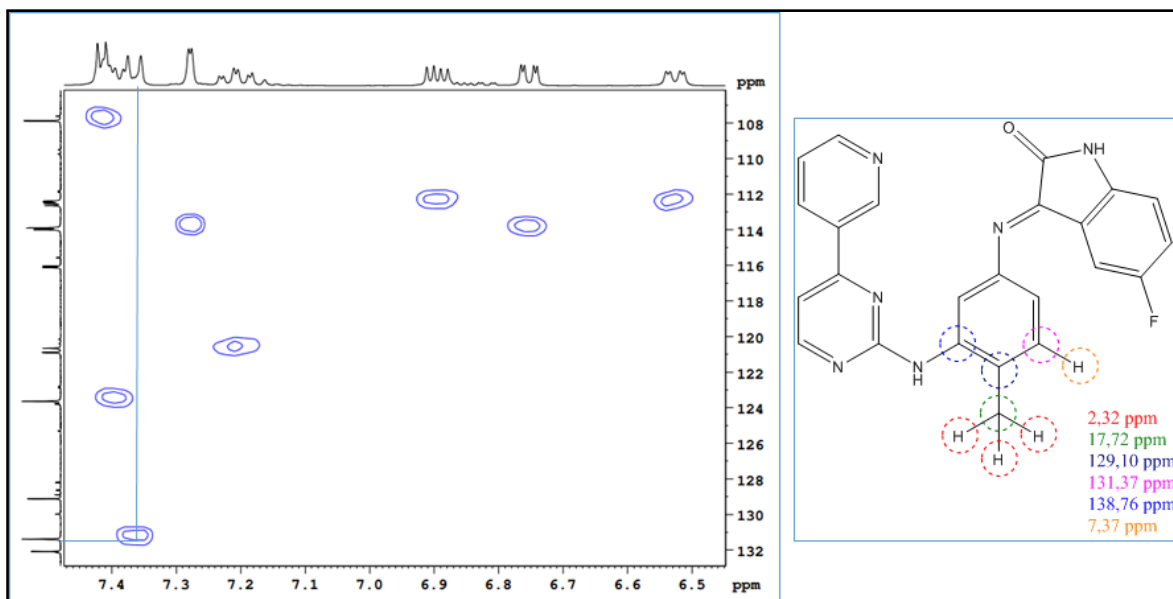
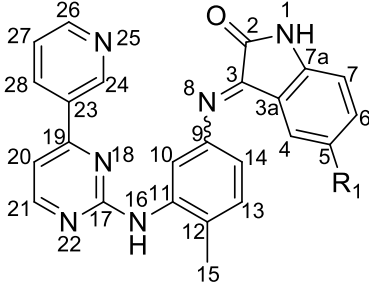


Figura 16. Análise de HSQC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d_6) para o produto **46c**, mostrando a correlação entre o carbono em 131,3 ppm com o hidrogênio em 7,39 ppm.

As análises de RMN de ^1H dos produtos finais **46a-e** evidenciaram os sinais dos hidrogênios metilênicos, que se apresentaram como simpletos, com deslocamentos na região entre 2,31 e 2,34 ppm. Os hidrogênios ligados ao anel aromático (H-4, (**46a**) H-5, H-6, H-7, H-10, H-13, H-14, H-20, H-21, H-24, H-26, H-27, H-28), mostraram-se com deslocamentos na faixa entre 6,52 a 9,22 ppm. O hidrogênio H-28 apresentou-se com um duplo tripleto, devido ao seu acoplamento com H-27 ($J= 8,0$ Hz), H-26 ($J= 1,8$ ou $1,9$ Hz) e H-24 ($J= 1,8$ ou $1,9$ Hz). No anel da pirimidina, o H-21 acoplou com H-20, exibindo-se como um duplete, com constante de acoplamento variando entre 4,9 a 5,2 Hz. Os hidrogênios da amina foram assinalados com deslocamento químico entre 8,99 e 9,07 ppm, enquanto os hidrogênios da amida apresentaram-se entre 10,85 e 11,12 ppm. Todos os assinalamentos encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H do isômero *E* dos produtos finais **46a-e**.

Números dos ^1H					
	RMN (400 ou 500 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm, <i>J</i> em Hz)				
	46a $R_1 = \text{H}$	46b $R_1 = \text{CH}_3$	46c $R_1 = \text{F}$	46d $R_1 = \text{Cl}$	46e $R_1 = \text{Br}$
1	10,96	10,85	10,99	11,12	11,11
4	6,67-6,76 (m, 3H)	6,55	6,52 (dd, <i>J</i> = 8,5 e 2,4)	6,73 (d, <i>J</i> = 2,0)	6,73 (d, <i>J</i> = 6,3)
5	6,90 (d, <i>J</i> = 7,8)	-	-	-	-
CH₃-5	-	1,88	-	-	-
6	6,67-6,76 (m, 3H)	6,73 (dd, <i>J</i> = 7,8 e 2,1)	7,20 (dt, <i>J</i> = 8,9 e 2,5)	6,92 (d, <i>J</i> = 8,4)	6,84-6,86 (m, 2H)
7	6,67-6,76 (m, 3H)	6,78 (d, <i>J</i> = 8,0)	6,89 (dd, <i>J</i> = 8,6 e 4,3)	6,76 (dd, <i>J</i> = 7,9 e 2,0)	6,84-6,86 (m, 2H)
10	7,27 (d, <i>J</i> = 1,8)	7,38-7,43 (m, 2H)	6,75 (dd, <i>J</i> = 7,9 e 2,1)	7,31 (d, <i>J</i> = 1,9)	7,30
13	7,32-7,38 (m, 3H)	7,13 (dd, <i>J</i> = 8,0 e 1,0)	7,35-7,42 (m, 3H)	7,36-7,44 (m, 4H)	7,35-7,42 (m, 3H)

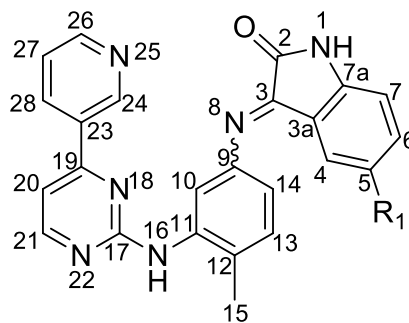
14	7,32-7,38 (m, 3H)	7,35 (d, $J= 8,1$)	7,35-7,42 (m, 3H)	7,36-7,44 (m, 4H)	7,35-7,42 (m. 3H)
15	2,32	2,31	2,32	2,34	2,32
16	8,99	9,05	9,05	9,07	9,05
20	7,42 (d, $J= 5,1$)	7,38-7,43 (m, 2H)	7,35,7-42 (m, 3H)	7,36-7,44 (m, 4H)	7,35-7,42 (m. 3H)
21	8,49 (d, $J= 5,2$)	8,48 (d, $J= 5,1$)	8,44 (d, $J= 5,1$)	8,49 (d, $J=5,1$)	8,49 (d, $J= 4,9$)
24	9,21 (d, $J= 1,7$)	9,21 (d, $J= 1,6$)	9,20 (d, $J= 1,6$)	9,22 (d, $J= 1,4$)	9,21
26	8,65 (dd, $J= 4,7$ e 1,4)	8,65 (dd, $J= 4,7$ e 1,6)	8,64 (dd, $J= 4,6$ e 1,1)	8,65 (dd, $J= 4,6$ e 1,2)	8,64 (d, $J= 2,9$)
27	7,32-7,38 (m, 3H)	7,22 (d, $J= 2,0$)	7,27 (d, $J= 1,8$)	7,36-7,44 (m, 4H)	7,48 (d, $J= 8,4$)
28	8,31 (dt, $J= 8,0$ e 1,8)	8,31 (dt, $J= 8,0$ e 1,9)	8,31 (dt, $J= 8,0$ e 1,8)	8,32 (dt, $J= 8,0$ e 1,8)	8,32 (d, $J= 7,8$)

Os espectros de RMN ^{13}C dos produtos finais **46a-e** mostraram os sinais das metilas com deslocamento químico variando entre 17,5 ppm a 17,7 ppm. Os carbonos C-2 apresentaram seus deslocamentos químicos entre 163,1 e 163,6 ppm. No intermediário **46c**, todos os carbonos do anel aromático, contendo flúor, mostraram-se como dupletos com constantes de acoplamento características. O C-5 apresentou-se com $J= 236,0$ Hz; o carbono em *orto* C-4 com $J= 20,4$ Hz; o C-6 com $J= 23,6$ Hz; o C-3a com $J= 8,0$ Hz; o C-7 com $J= 12,8$ Hz e o C-7a com $J= 1,1$ Hz. O RMN ^{19}F do derivado **46c** mostrou-se como um sinal único, com

deslocamento de -121,15 ppm. Todos os assinalamentos encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^{13}C e ^{19}F dos produtos finais **46a-e**.

Números dos ^{13}C e
 $^{19}\text{F}^*$



RMN (100 MHz ^{13}C e 376 MHz ^{19}F , DMSO- d_6 , δ em ppm,
J em Hz)

	46a R ₁ = H	46b R ₁ = CH ₃	46c R ₁ = F	46d R ₁ = Cl	46e R ₁ = Br
2	163,5	163,6	163,6	163,3	163,1
3	148,2	148,1	154,3 (d, <i>J</i> = 2,3)	148,0	148,0
3a	113,7	113,7	116,0 (d, <i>J</i> = 8,0)	113,6	117,3
4	125,6	128,7	112,5 (d, <i>J</i> = 20,4)	125,4	128,1
5	115,6	115,6	156,8 (d, <i>J</i> = 236,0)	116,8	123,6
CH₃-5	-	20,2	-	-	-
F-5*	-	-	-121,1	-	-
6	131,9	132,0	120,7 (d, <i>J</i> = 23,6)	132,1	132,1

7	111,3	111,0	112,4 (d, $J= 12,8$)	112,9	113,0
7a	146,8	144,5	143,2 (d, $J= 1,1$)	145,6	146,0
9	147,9	147,9	147,6	147,7	147,7
10	113,5	113,6	113,8	113,5	113,4
11	138,7	138,6	138,7	138,8	138,8
12	128,4	130,3	129,1	128,9	128,8
13	131,1	131,1	131,3	131,3	131,2
14	121,5	123,5	123,6	123,6	125,3
15	17,5	17,6	17,7	17,7	17,7
17	160,9	160,9	161,0	161,0	160,9
19	154,7	154,8	148,0	153,8	153,6
20	107,6	107,6	107,8	107,9	107,9
21	161,4	161,4	161,6	161,6	161,6
23	133,9	134,0	132,0	133,7	134,1
24	151,2	151,2	151,3	151,3	151,3
26	159,3	159,3	159,2	159,4	159,4
27	123,5	126,0	113,9	125,1	127,9
28	134,2	134,6	134,0	134,1	134,4

Todas as análises de RMN dos compostos **46a-e** evidenciaram a formação dos isômeros na proporção de 9:1 (Figura 17). Com intuito de elucidar a conformação mais abundante, as amostras foram enviadas para estudos de cristalografia de raio-X. Em paralelo, foram realizados experimentos de RMN bidimensionais utilizando a espectroscopia de efeito nuclear Overhauser (NOESY, do inglês “Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy”), através desta técnica é possível estabelecer as correlações entre hidrogênios que estão espacialmente próximos, e com isso definir a geometria da molécula. Porém, os dados obtidos não foram suficientes para a elucidação da estrutura isomérica abundante. Pode-se

propor que o isômero *E* seja o mais abundante, devido à possibilidade de repulsão entre os anéis aromáticos na conformação *Z*.

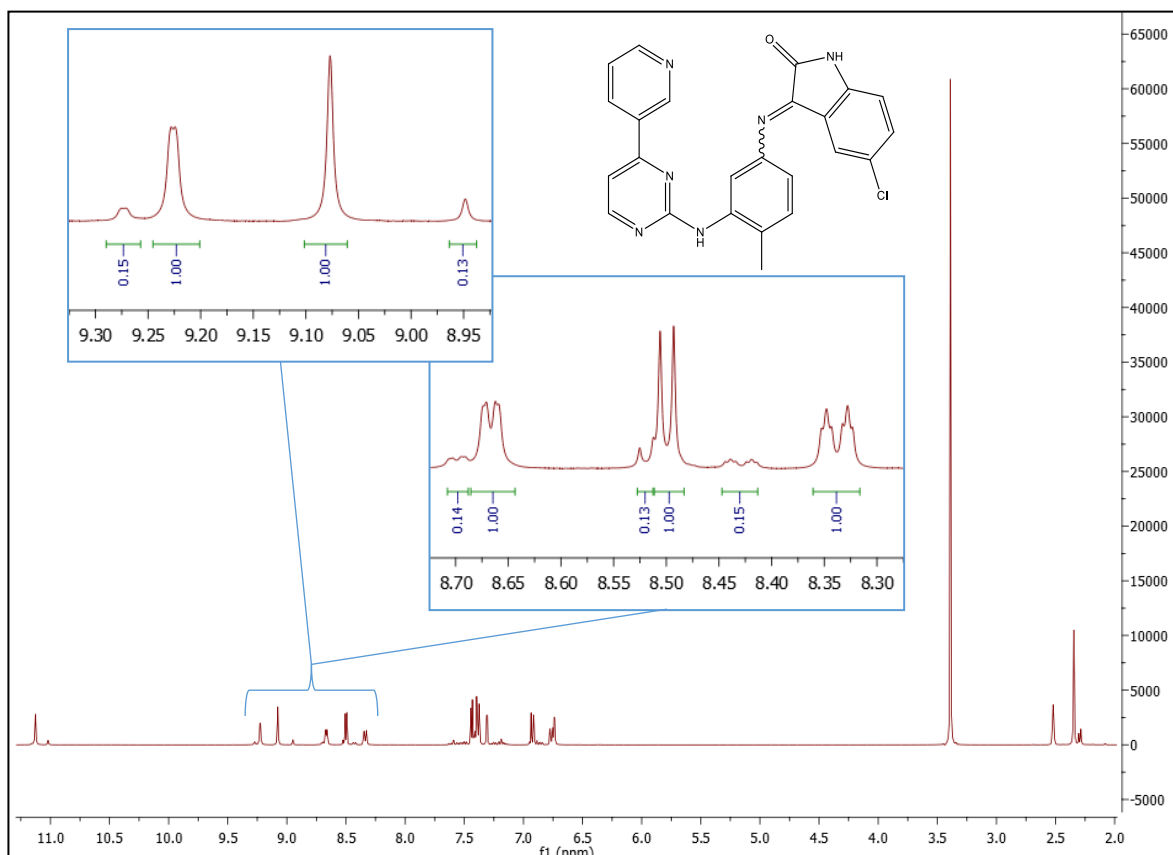


Figura 17. Espectro de RMN ¹H (400,00 Hz; DMSO-d₆) do composto **46d**, mostrando a duplicação dos sinais na proporção 9:1.

As análises de EMAR mostraram que os produtos obtidos **46a-e** apresentaram massa compatível com as estruturas propostas. Para verificação do grau de pureza destas substâncias foram realizadas as análises de CLAE, com resultados satisfatórios (Tabela 8).

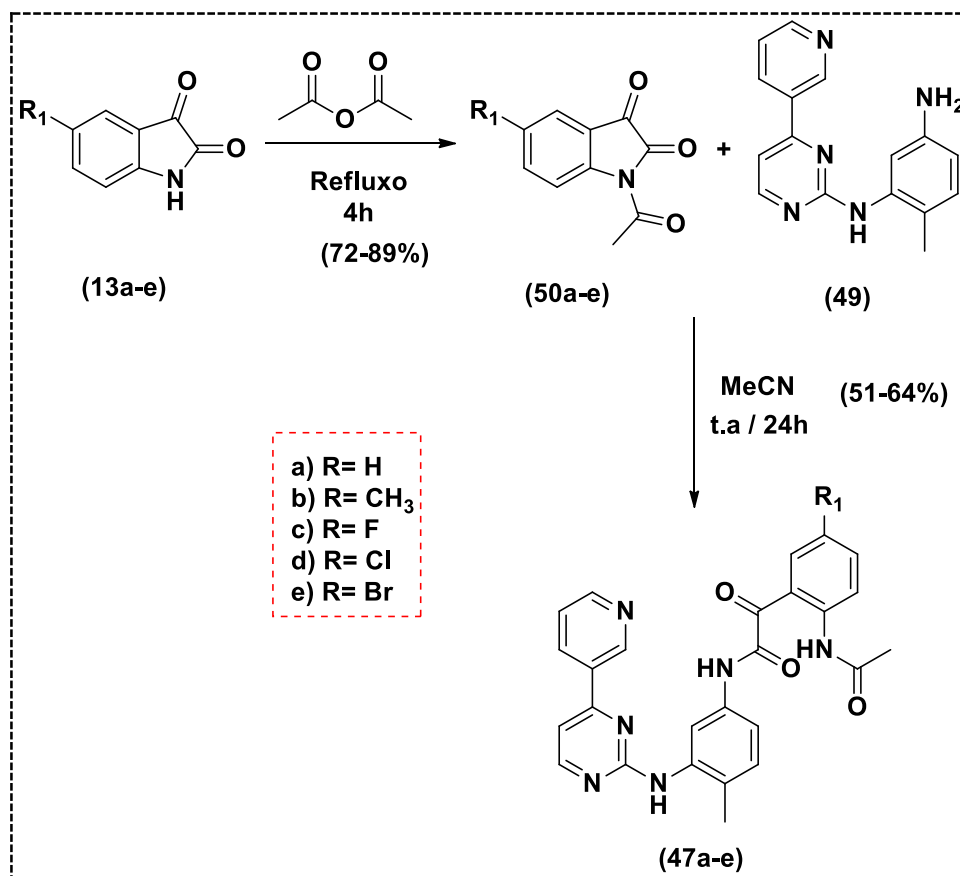
Tabela 8. Resultados de EMAR e CLAE para os compostos **46a-e**.

Compostos	EMAR		CLAE (% , 261 nm)
	Teórico	Obtido	
46a) R= H	406,1542	406,1540	96
46b) R= CH₃	420,1699	420,1702	88
46c) R= F	424,1448	424,1447	96
46d) R= Cl	440,1152	440,1173	98
46e) R= Br	484,0647	484,0634	89

Os dados físicos e espectroscópicos dos produtos finais **46a-e** foram compatíveis com as estruturas propostas e estão descritos na parte experimental.

5.1.2. Síntese das moléculas da Segunda Série 47a-e

Os compostos desta série foram obtidos a partir de uma rota sintética com duas etapas reacionais. Para a primeira etapa foi empregada a reação de *N*-acetilação de isatinas. Posteriormente, o anel dioxindólico foi submetido à reação de adição nucleofílica à carbonila, utilizando o esqueleto FAPP (Esquema 14).

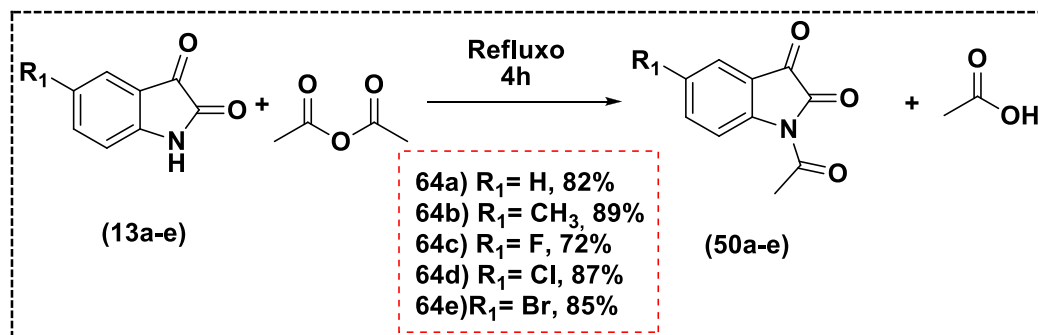


Esquema 14. Rota sintética empregada para a obtenção dos compostos da segunda série **47a-e**.

Há duas metodologias descritas na literatura para a *N*-acetilação de isatinas. A primeira consiste na utilização de cloreto de acetila e etóxido de sódio, em etanol. Nesta, o principal inconveniente é a necessidade de trabalhar em condições anidras (TOMCHIM *et al.* 1986). A segunda consiste de uma solvólise, utilizando-se o anidrido acético. Este processo apresenta menor custo e maior facilidade experimental, visto que não é necessário o uso de atmosfera inerte (CHEAH *et al.*, 2008; TOMCHIM, 1981).

Neste trabalho as isatinas foram acetiladas através da metodologia de Cheah e colaboradores. Foram utilizados 20 equivalentes de anidrido acético, previamente destilado. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, em refluxo, por 4 horas. Após o resfriamento, todas as isatinas precipitaram e foram

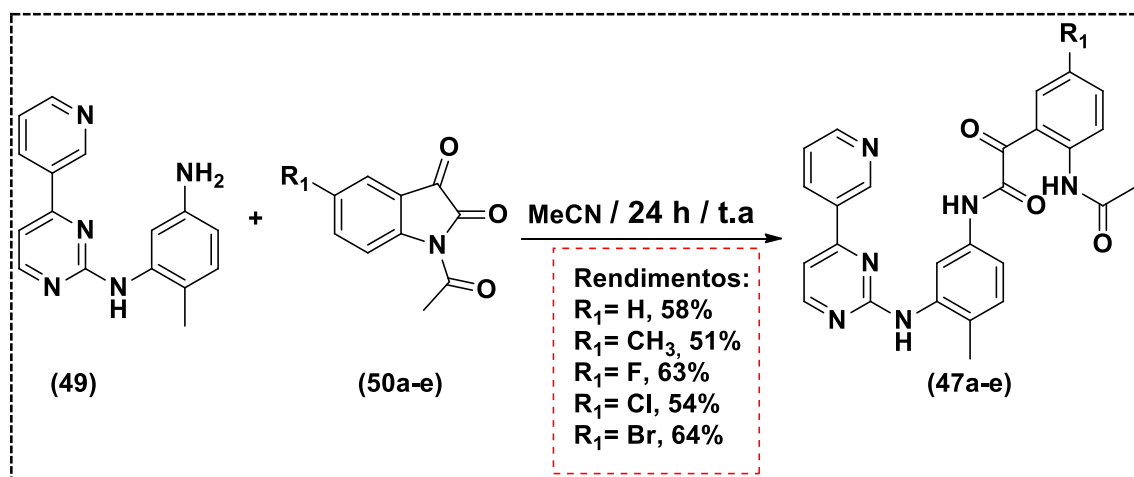
recristalizadas utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1). Todas as *N*-acetilsatinas **50a-e** foram obtidas com rendimentos variando entre 72 a 89% (Esquema 15).



Esquema 15. *N*-acetilação das isatinas **13a-e**.

Todas as *N*-acetilsatinas sintetizadas **50a-e** encontram-se amplamente descritas na literatura (CHEAH *et al.*, 2008; TOMCHIM, 1981). Desta forma, a caracterização destes compostos foi realizada através de análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os espectros de CG-EM apresentaram em sua totalidade, o íon molecular do fragmento referente à perda do grupamento acetila e das carbonilas (Esquema 16). Também foram obtidos os pontos de fusão e estes foram confrontados com os da literatura.

método descrito por Craig e colaboradores. Nesta reação, a acetonitrila foi usada como solvente, à temperatura ambiente, sob agitação por 24 horas. O produto formado precipitou no meio, sendo isolado por filtração, com elevado grau de pureza. Os rendimentos reacionais variaram entre 51 a 64% (Esquema 17).



Esquema 17. Reações de abertura das *N*-acetilisatinas **50a-e** para a formação dos compostos da segunda série **47a-e**.

As estruturas químicas dos produtos finais **47a-e** foram confirmadas por EM-IES, IV, RMN para os núcleos ¹H, ¹³C e ¹⁹F e EMAR. O grau de pureza foi determinado através de análises CLAE. Vale ressaltar que todos os produtos finais desta série **47a-e** são inéditos.

Os EM-IES dos compostos finais **47a-e** indicaram a formação dos produtos desejados, apresentando íons moleculares compatíveis às estruturas propostas (Tabela 9).

Os espectros na região do IV para as substâncias finais **47a-e** apresentaram bandas de absorção entre 3110 a 3442 cm⁻¹, correspondentes aos estiramentos N-H; entre 3061 e 3071 cm⁻¹, correspondentes aos estiramentos C-H *sp*²; entre 1662 e 1691cm⁻¹, correspondentes aos estiramentos C=O; entre 763 e 875 cm⁻¹, correspondentes às deformações angulares fora do plano das ligações C-H aromáticas (Tabela 9).

Tabela 9. Dados de ponto de fusão, EM-IES e IV dos produtos finais **47a-e**.

Compostos	P.F. (°C)	EM-IES (<i>m/z</i>)	IV (cm ⁻¹)			
			N-H	C-H <i>sp</i> ²	C=O	C-H (ar)
47a) R= H	211-214	465 [M+1] ⁺	3246	3061	1691, 1670	875, 821, 763
47b) R= CH₃	226-228	479 [M+1] ⁺	3242	3066	1687, 1670	827, 800, 787
47c) R= F	231-233	483 [M-1] ⁺	3329	3065	1687, 1669	832, 815, 801, 787
47d) R= Cl	217-218	523 [M+Na] ⁺	3442, 3252	-	1687, 1672, 1662	829, 818, 797
47e) R= Br	211-212	543 [M-1] ⁺	3247, 3110	3071	1688, 1674, 1662	852, 818, 797

Os assinalamentos dos hidrogênios e carbonos foram feitos com base nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C.

Com objetivo de elucidar estruturalmente as moléculas **47a-e**, foram realizadas técnicas de RMN unidimensionais (para todos os compostos) e bidimensionais (para um composto desta série). A molécula **47a** foi utilizado como referência para a discussão das atribuições dos sinais de RMN ¹H e ¹³C nas técnicas de COSY, HSQC e HMBC.

No experimento de COSY da molécula **47a** foi possível observar que o hidrogênio com deslocamento em 9,29 ppm acopla com o hidrogênio em 8,47 ppm,

e este último, também acopla com o hidrogênio em 7,50 ppm. Para o hidrogênio em 7,50 ppm também foi verificado um acoplamento adicional com o hidrogênio em 8,70 ppm, e este último, também acopla com o hidrogênio em 7,50 ppm. Estes dados possibilitaram estabelecer que estes sinais fazem parte de um anel aromático com quatro hidrogênios (Figura 18).

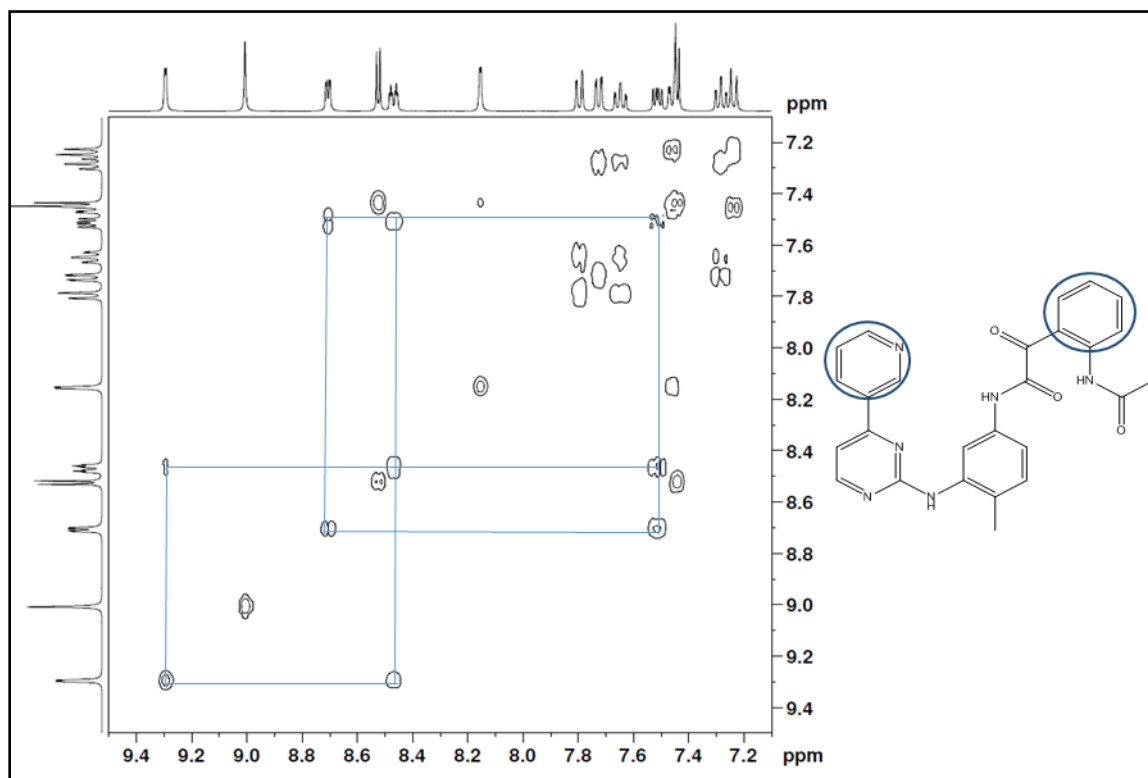


Figura 18. Análise de COSY (400,00 MHz; DMSO-*d*₆) do composto **47a**.

As análises de HSQC, aliadas aos resultados do COSY, permitiram determinar que:

- O hidrogênio com deslocamento em 9,29 ppm está diretamente ligado ao carbono em 148,1 ppm;
- O hidrogênio com deslocamento em 8,70 ppm está diretamente ligado ao carbono em 151,3 ppm;

Ambos fazem parte do anel piridínico, devido ao fato de estarem mais desblindados que carbonos e hidrogênios pertencentes a um benzeno (Figura 19).

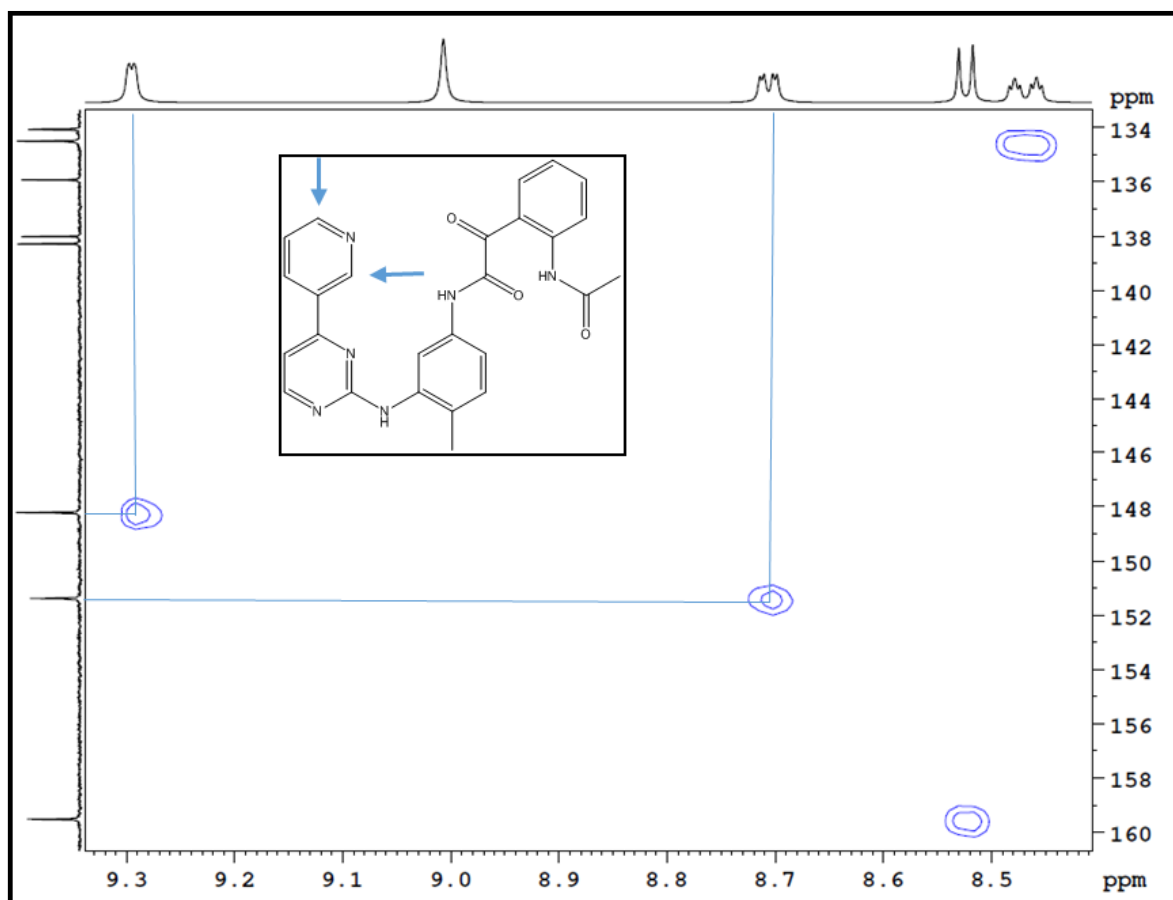


Figura 19. Análise de HSCQ (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d₆) do composto **47a**.

O experimento de HMBC do composto **47a** mostrou duas metilas com deslocamentos em 2,03 e 2,24 ppm. Os hidrogênios metilênicos em 2,03 ppm estão correlacionados com o carbono em 168,95 ppm. Na análise de HSQC, verificou-se que o hidrogênio em 10,64 ppm é uma amina, visto que não está diretamente ligado a nenhum carbono. Este sinal, na análise de HMBC, foi correlacionado com o carbono deslocado em 168,9 ppm. Todos estes dados permitiram os apontamentos de outra parte da molécula, como mostrado na Figura 20.

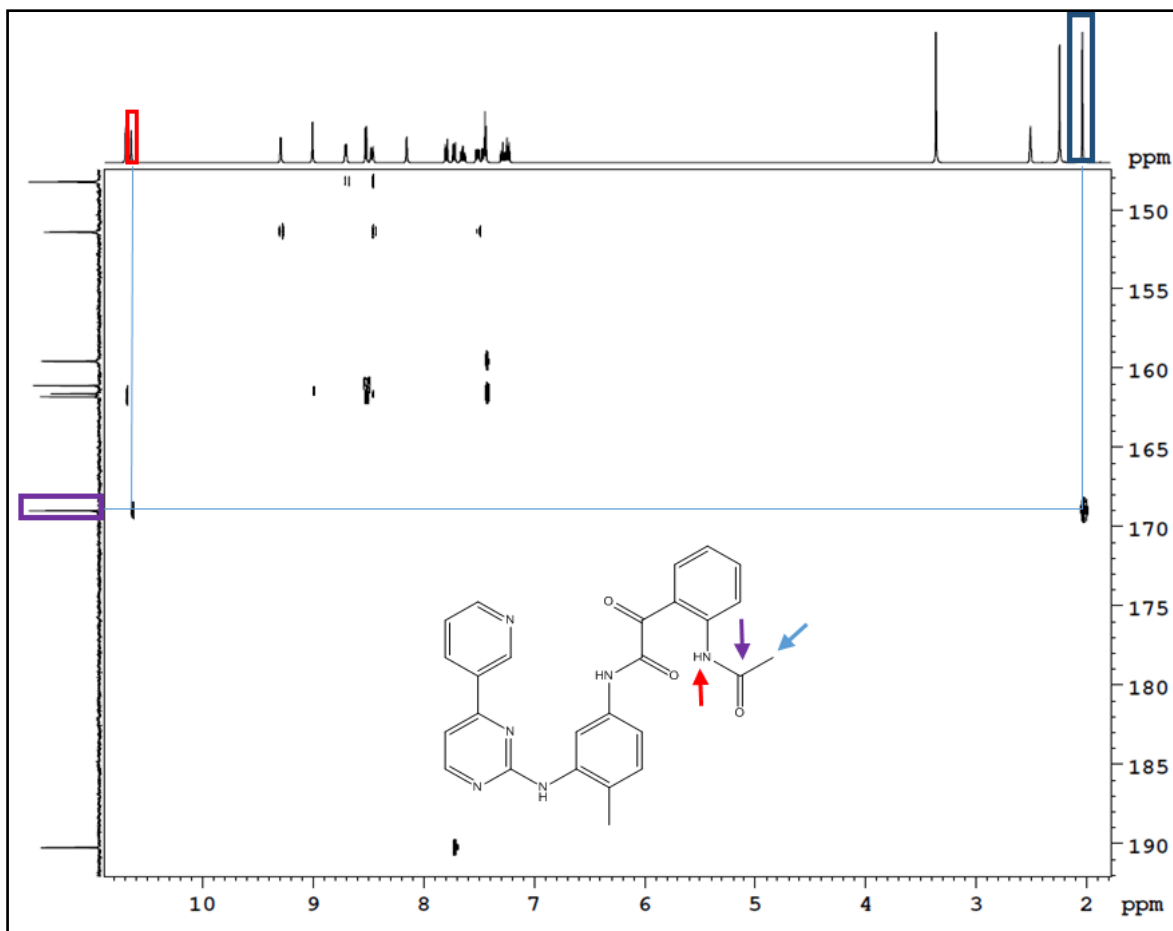
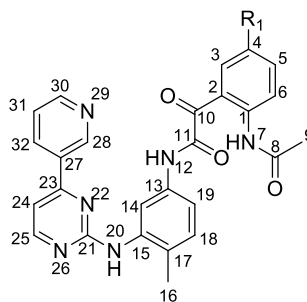


Figura 20. Análise de HMBC (400,00 / 100,0 MHz; DMSO- d_6) do composto **47a**.

As análises de RMN de ^1H dos produtos finais **47a-e** mostraram os hidrogênios metilênicos ligados à amida com deslocamentos químicos entre 1,96 a 2,03 ppm. Os hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao anel apresentaram seus deslocamentos na faixa de 2,23 a 2,24 ppm. Os hidrogênios do anel aromático (H-3, (**47a**) H-4, H-5, H-6, H-14, H-18, H-19, H-24, H-25, H-28, H-30, H-31, H-32), deslocaram-se quimicamente entre 7,21 a 9,30 ppm. Os hidrogênios da piridina apresentaram-se mais desblindados, quando comparados aos hidrogênios do benzeno (H-3, H-4, H-5, H-6). Todos os assinalamentos encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ¹H dos produtos finais **47a-e**.

Números dos ¹ H	RMN (400 MHz, DMSO-d ₆ , δ em ppm, J em Hz)				
	R ₁ = H	R ₁ = CH ₃	R ₁ = F	R ₁ = Cl	R ₁ = Br
3	7,72 (d, J= 7,8 e 1,4)	7,49-7,52 (m, 2H)	7,47-7,53 (m, 5H)	7,64-7,66 (m, 2H)	7,76-7,79 (m, 2H)
4	7,28 (td, J=7,7 e 1,0)	-	-	-	-
CH₃-4	-	2,31	-	-	-
5	7,62-7,66 (m, 1H)	7,49-7,52 (m, 2H)	7,47-7,53 (m, 5H)	7,47-7,52 (m, 3H)	7,45-7,55 (m, 3H)
6	7,79 (d, J= 7,7)	7,66 (d, J= 8,2)	7,47-7,53 (m, 5H)	7,64-7,66 (m, 2H)	7,76-7,79 (m, 2H)
7	10,64	10,52	10,49	10,55	10,51
9	2,03	2,00	1,95	1,97	1,99
12	10,69	10,65	10,62	10,60	10,47
14	7,46 (d, J= 2,0)	7,42-7,46 (m, 3H)	7,47-7,53 (m, 5H)	7,47-7,52 (m, 3H)	7,45-7,55 (m, 3H)
16	2,24	2,24	2,24	2,23	2,24
18	7,23 (d, J= 8,4)	7,23 (d, J= 8,3)	7,22 (d, J= 8,2)	7,22 (d, J= 5,7)	7,22 (d, J= 8,4)



19	8,15 (d, $J=1,8$)	8,15 (d, $J=1,6$)	8,19	8,17 (d, $J=1,1$)	8,14 (d, $J=2,0$)
20	9,00	8,98	8,99	8,97	8,85
24	7,44 (d, $J=5,1$)	7,42-7,46 (m, 3H)	7,43 (d, $J=5,1$)	7,43 (d, $J=5,1$)	7,41 (d, $J=5,2$)
25	8,52 (d, $J=5,1$)	8,51 (d, $J=5,1$)	8,52 (d, $J=5,4$)	8,51 (d, $J=5,1$)	8,51 (d, $J=5,2$)
28	9,29 (d, $J=1,7$)	9,29 (d, $J=1,7$)	9,30	9,28 (d, $J=1,7$)	9,26 (d, $J=1,6$)
30	8,70 (dd, $J=4,7$ e 1,4)	8,70 (dd, $J=4,7$ e 1,4)	8,70 (d, $J=4,1$)	8,69 (dd, $J=4,7$ e 1,4)	8,69 (dd, $J=4,4$ e 1,2)
31	7,51 (dd, $J=7,9$ e 4,7)	7,42-7,46 (m, 3H)	7,47-7,53 (m, 5H)	7,47-7,52 (m, 3H)	7,45-7,55 (m, 3H)
32	8,46 (dt, $J=7,9$ e 2,0)	8,46 (dt, $J=6,2$ e 1,4)	8,47 (d, $J=7,8$)	8,47 (dt, $J=8,0$ e 1,8)	8,46 (dt, $J=6,4$ e 1,6)

Os espectros de RMN ^{13}C dos produtos finais **47a-e** mostraram os sinais das metilas ligadas às carbonilas entre 20,1 a 23,8 ppm. Os carbonos metilênicos ligados ao benzeno apresentaram-se com deslocamentos químicos entre 17,5 a 17,6 ppm. As carbonilas cetônicas mostraram-se mais desblindadas, deslocando-se quimicamente entre 187,1 a 190,2 ppm. Os carbonos C-11 apresentaram deslocamentos entre 160,9 a 161,5 ppm. No composto **47c**, todos os carbonos do anel aromático contendo flúor mostraram-se como dupletos com constantes de acoplamento característicos. O carbono C-4 com $J=241,1$ Hz; o carbono C-3 com $J=22,3$ Hz; o C-5 com $J=23,8$ Hz; o carbono C-2 com $J=7,5$ Hz; o C-6 com $J=6,5$ Hz e o C-1 com $J=2,3$ Hz. O RMN ^{19}F deste composto mostrou-se como um sinal

10	190,2	190,3	187,2	187,2	187,1
11	161,5	161,5	160,9	161,0	161,0
13	137,9	137,9	137,8	137,9	136,0
14	116,3	116,2	116,3	116,4	115,5
15	138,2	135,9	135,8	138,8	137,9
16	17,6	17,6	17,5	17,6	17,6
17	128,1	128,1	128,0	128,1	128,1
18	130,3	130,2	130,1	129,6	130,1
19	116,6	116,6	123,7	116,7	116,4
21	161,7	161,8	160,3	160,2	160,2
23	161,0	161,0	161,4	161,5	161,5
24	107,6	107,6	107,5	107,5	107,5
25	159,5	159,4	159,4	159,4	159,4
27	132,1	131,1	132,1	130,1	132,1
28	148,1	148,1	148,0	148,1	148,1
30	151,3	151,3	151,2	151,2	151,3
31	123,8	123,7	116,7	123,9	124,2
32	135,9	134,5	134,4	135,6	135,8

As análises de EMAR mostraram que os produtos obtidos **47a-e** apresentaram massas compatíveis com as estruturas propostas. Para verificação do grau de pureza destas substâncias foram realizadas as análises de CLAE, que foram satisfatórias (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados de EMAR e CLAE para os compostos **47a-e**.

Composto	EMAR		CLAE (% , 261 nm):
	Teórico	Obtido	
47a) R= H	466,1753	466,1754	100

47b) R= CH₃	480,1910	480,1897	97
47c) R= F	484,1659	484,1656	98
47d) R= Cl	500,1364	500,1362	98
47e) R=Br	544,0859	544,0852	98

Os dados físicos e espectroscópicos dos produtos finais **47a-e** foram compatíveis com as estruturas propostas e estão descritos na parte experimental.

5.1.3. Síntese das moléculas da Terceira Série 48a-e

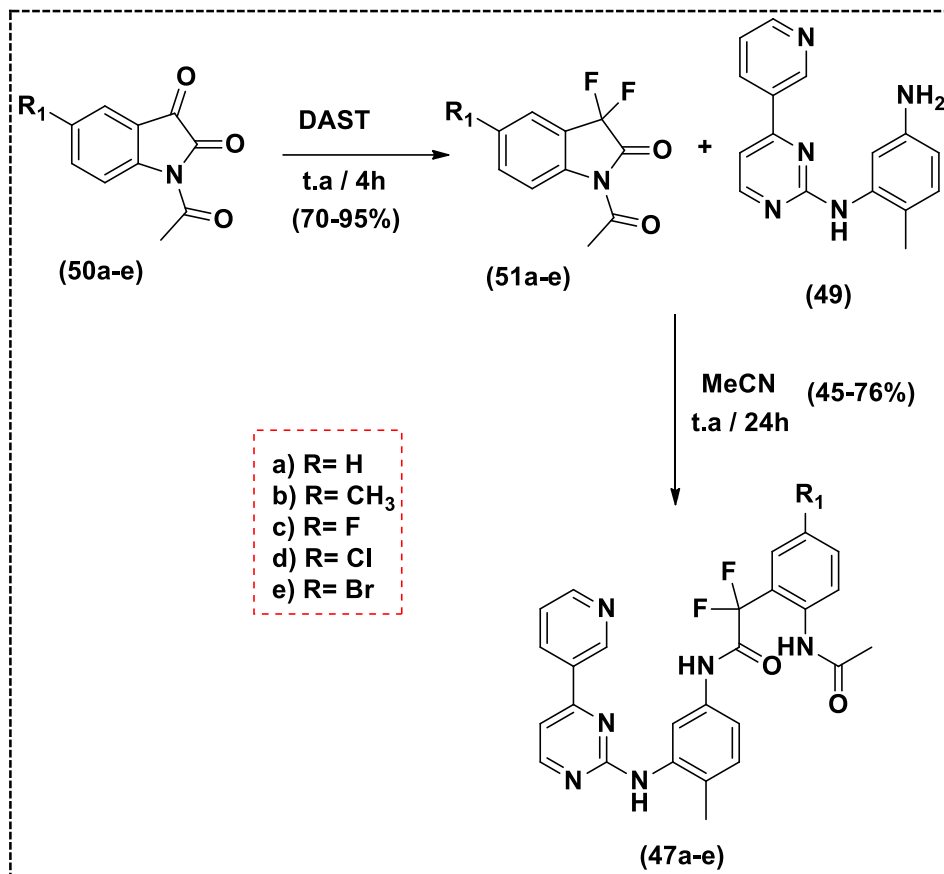
Até 1975, as reações de desoxofluoração eram realizadas com tetrafluoreto de enxofre (SF₄), que é capaz de fluorar diferentes grupos funcionais, como cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos e outros (SMITH, 1962). No entanto, o emprego deste reagente apresenta inúmeros inconvenientes, tais como, ser um gás altamente tóxico, possuir baixa seletividade e necessitar do uso do ácido fluorídrico anidro (HF) como solvente e catalisador.

Em 1975, Middleton desenvolveu um novo agente de desoxofluoração derivado do SF₄, o dietilaminotrifluoreto de enxofre (DAST), que pode ser preparado através da reação entre o dietilaminotrimetilsilano e o SF₄ (MIDDLETON, 1975). O DAST apresenta uma série de vantagens, quando comprado ao SF₄, pois é líquido à temperatura ambiente, e apresenta alta seletividade para carbonilas de aldeídos e cetonas (MIDDLETON, 1975).

O nosso grupo tem utilizado a *gem*-difluoração seletiva da carbonila cetônica de *N*-acetilsatinas **50a-e**, utilizando DAST como reagente, levando à formação dos indóis *gem*-difluorados **51a-e**, com rendimentos variando entre 65 a 94% (BOECHAT *et al.*, 2008).

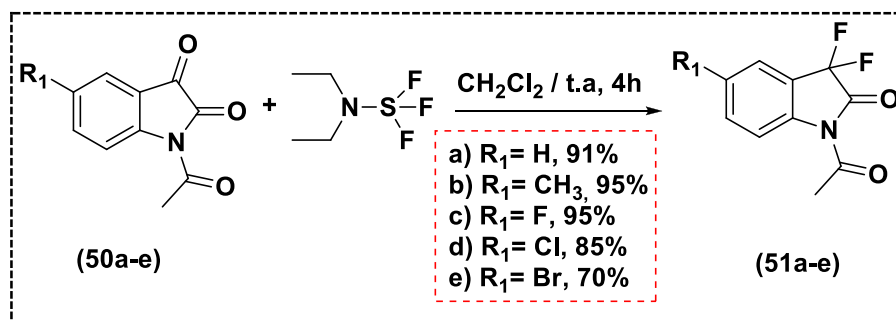
As moléculas desta série foram obtidas a partir das *N*-acetilsatinas **50a-e**, através de uma rota sintética com duas etapas reacionais. Para a primeira etapa foi empregada a reação de *gem*-difluoração de **50a-e**. Posteriormente, os 3,3-

difluoroxindóis **51a-e** foram submetidos à reação de abertura, utilizando o esqueleto FAPP (Esquema 18).



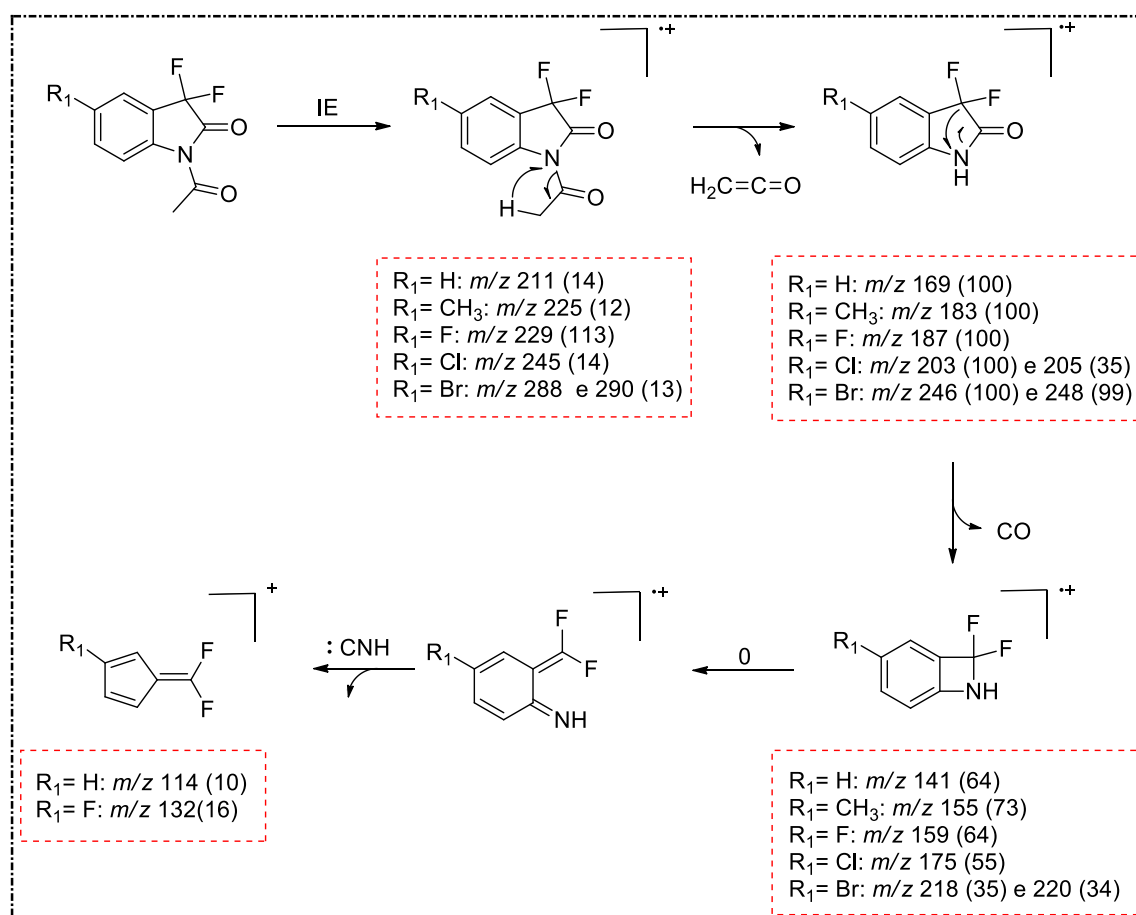
Esquema 18. Rota sintética empregada para a obtenção dos compostos da terceira série **48a-e**.

Neste trabalho, os intermediários **51a-e** foram obtidos a partir da metodologia descrita Boechat e colaboradores. As reações foram conduzidas empregando 4 equivalentes de DAST, em diclorometano anidro, por 4 horas, à temperatura ambiente. Os intermediários **51a-e** foram obtidos com rendimentos variando entre 70 a 91% (Esquema 19).



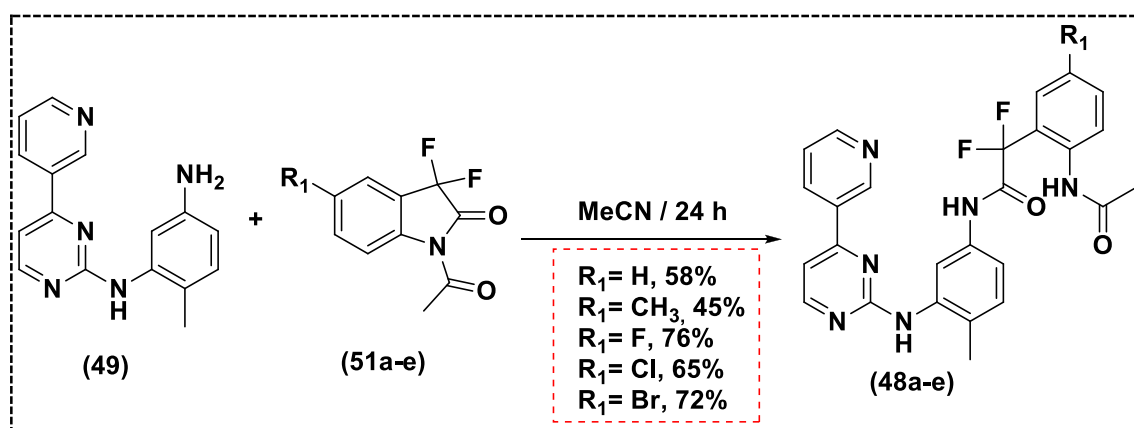
Esquema 19. Reação de desoxofluoração das *N*-acetilisatinas **50a-e** com DAST.

A caracterização dos intermediários **51a-e** foi realizada através de análises de CG-EM. Os espectros apresentaram fragmentações compatíveis com as suas estruturas (Esquema 20). Também foram obtidos os pontos de fusão, e estes foram comparados com os da literatura.



Esquema 20. Proposta de fragmentação para os compostos **51a-e**.

A última etapa para a síntese dos compostos **48a-e** consiste na reação de adição nucleofílica à carbonila dos intermediários 1-acetil-3,3-difluoroindolin-2-ona (**51a-e**) com o esqueleto FAPP. As reações foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando acetonitrila como solvente, sob agitação magnética, por 24 horas. O produto formado precipitou no meio, sendo isolado por filtração, com elevado grau de pureza. Os rendimentos reacionais variaram entre 45 a 76% (Esquema 21).



Esquema 21. Reações de abertura das 1-acetil-3,3-difluoroindolin-2-ona **51a-e**.

As estruturas químicas dos produtos finais **48a-e** foram confirmadas por EM-IES, IV, RMN para os núcleos ^1H , ^{13}C e ^{19}F e EMAR. O grau de pureza foi determinado através de análises CLAE. Vale ressaltar que, todos os produtos finais desta série **48a-e** também são inéditos.

Os EM-IES para os compostos **48a-e** indicaram a formação dos produtos desejados, apresentando íons moleculares compatíveis com as estruturas propostas (Tabela 13).

Os espectros na região do IV para os compostos **48a-e** apresentaram bandas de absorção entre 3222 a 3442 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento N-H; 2073 a 2984 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento C-H sp^2 ; 1660 a 1714 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento C=O; 765 a 862 cm^{-1} , correspondentes às deformações angulares fora do plano das ligações C-H aromáticas (Tabela 13).

Tabela 13. Dados de ponto de fusão, EM-IES e IV dos produtos finais **48a-e**.

Compostos	P.F. (°C)	EM-IES (<i>m/z</i>)	IV cm ⁻¹			
			N-H	C-H sp ²	C=O	C-H (ar)
48a) R= H	211-214	512 [M+Na] ⁺	3392, 3307	-	1689, 1662	862, 794, 765
48b) R= CH₃	225-227	501 [M-1] ⁺	3222	2984	1693, 1682	823, 804, 790
48c) R= F	133-135	505 [M-1] ⁺	3239	2073	1693, 1678	835, 809, 789
47d) R= Cl	218-220	546 [M+Na] ⁺	3442, 3338, 3263	-	1714, 1668	812, 801, 776
47e) R= Br	237-238	565 [M-1] ⁺	3441, 3278	2970	1688, 1660	844, 806, 792

Os assinalamentos dos hidrogênios e carbonos foram feitos com base nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C.

Com objetivo de elucidar estruturalmente os compostos **48a-e**, foram realizadas técnicas de RMN unidimensionais (para todos os compostos) e bidimensionais (para um composto desta série). O composto **48d** foi utilizado como referência para a discussão das atribuições dos sinais de RMN ¹H e ¹³C nas técnicas de COSY, HSQC e HMBC.

No experimento de COSY do composto **48d** foi possível observar que o hidrogênio em 8,50 ppm acopla com o hidrogênio em 7,44 ppm. Estes dados, aliados ao efeito de desblindagem observado, permitiram estabelecer que esses sinais são característicos dos hidrogênios pirimidínicos (Figura 21).

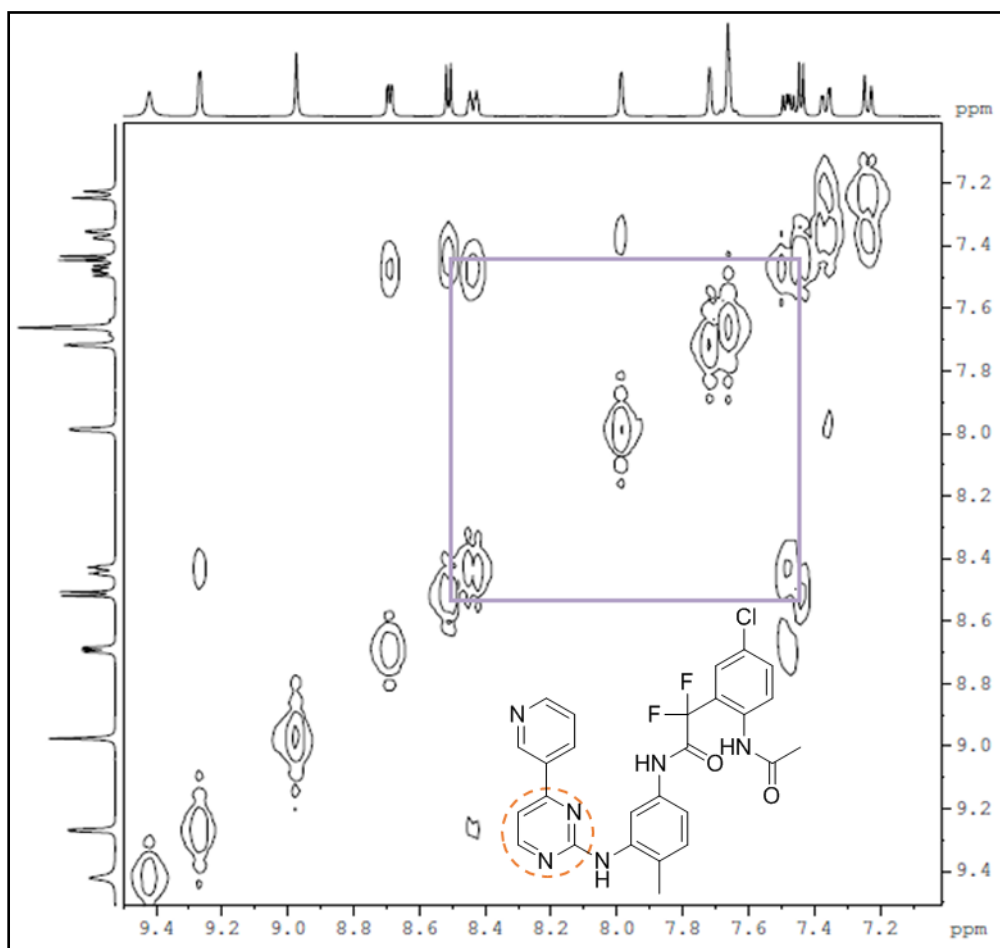


Figura 21. Análise de COSY (400,00 MHz, DMSO-d₆) para o composto **48d**.

As análises do HSQC, aliadas aos dados fornecidos pelo COSY, permitiram determinar que (Figura 22):

- O sinal em 8,50 ppm está correlacionado ao carbono em 159,4 ppm;
- O hidrogênio com deslocamento químico em 7,44 ppm está diretamente ligado ao carbono em 107,6 ppm;
- Os sinais em 8,50 e 159,4 ppm correspondem ao hidrogênio H-25 e ao carbono C-25, respectivamente;
- Os sinais em 7,44 e 107,6 ppm correspondem ao hidrogênio H-24 e ao carbono C-24, respectivamente.

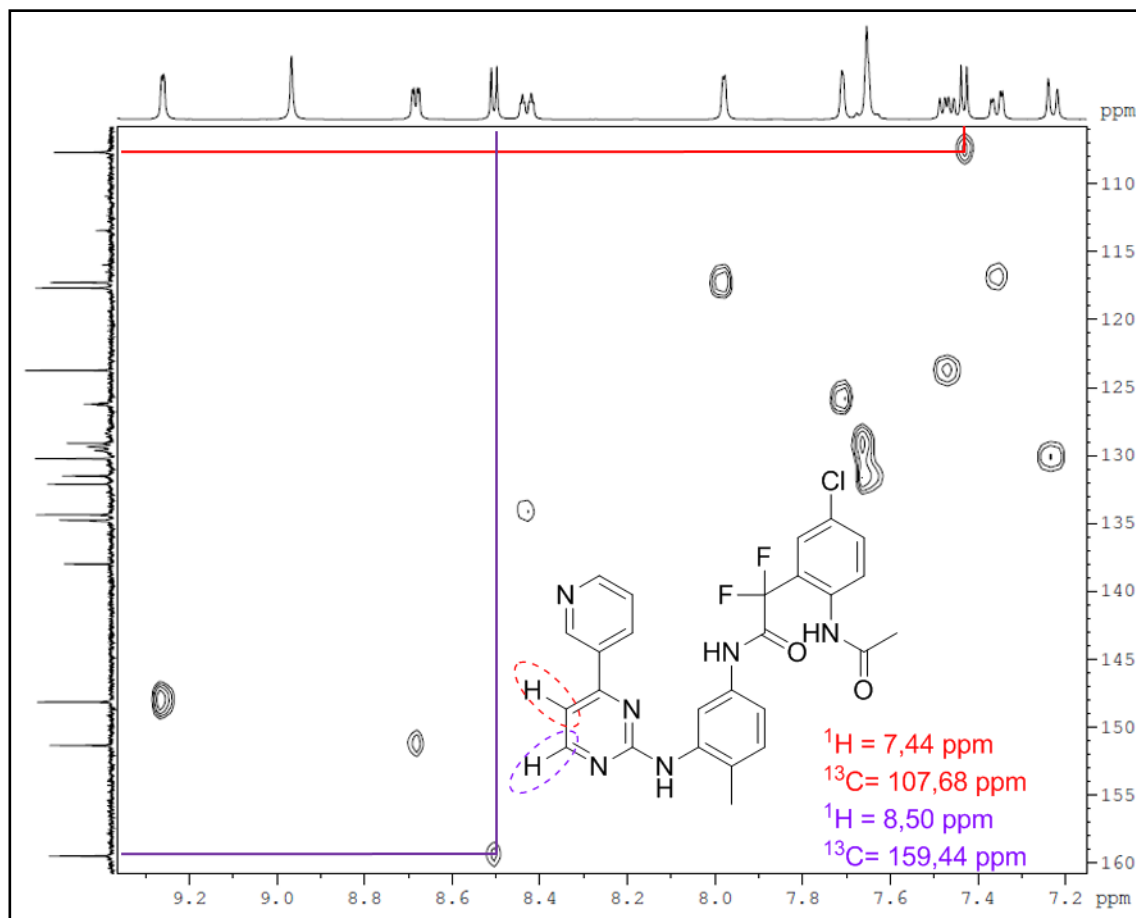


Figura 22. Análise de HSQC (400,00/100,0 MHz, DMSO-d₆) para o composto **48d**.

A análise de HMBC permitiu verificar que:

- O hidrogênio em 8,50 ppm está correlacionado com os carbonos em 107,6 e 161,5 ppm;
- O hidrogênio com deslocamento químico em 7,44 ppm está correlacionado com os carbonos em 159,4 e 161,0 ppm.
- A partir destes dados conclui-se que:
 - O sinal em 161,5 ppm está associado ao carbono C-21;
 - O sinal em 161,0 ppm está associado ao carbono C-23 (Figura 23). Além disso, foram assinalados todos os hidrogênios e carbonos do anel pirimidínico (Figura 24).

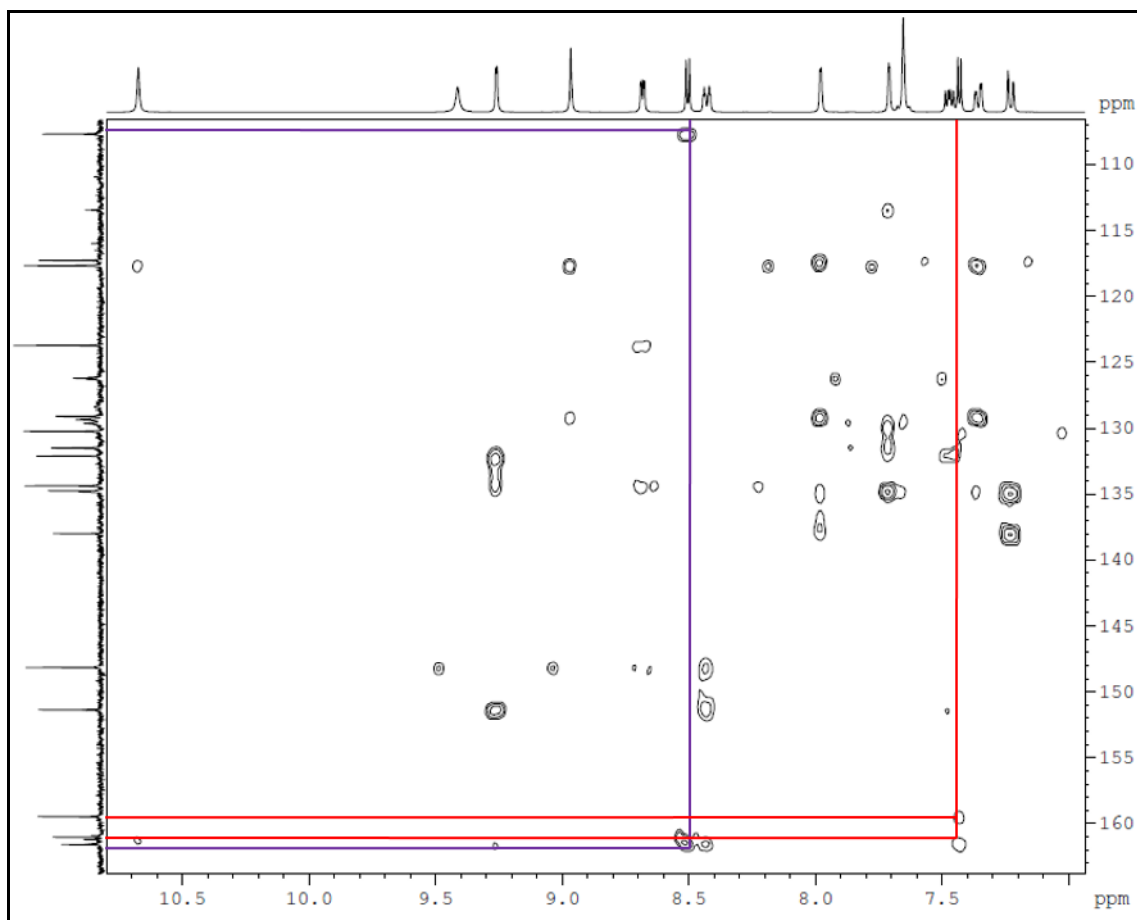


Figura 23. Análise de HMBC (400,00/100,0 MHz, DMSO-d₆) do composto **48d**.

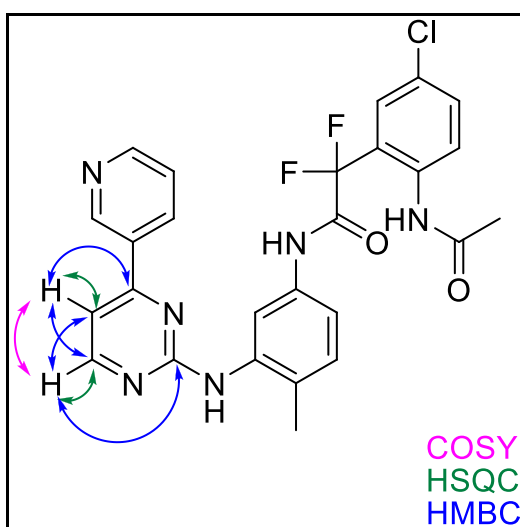
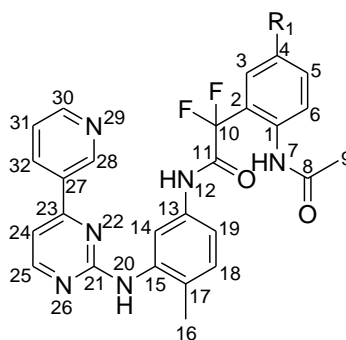


Figura 24. Identificação dos hidrogênios e carbonos do composto **48d** por COSY, HSQC e HMBC.

As análises de RMN de ^1H dos produtos finais **48a-e** mostraram os hidrogênios das metilas ligadas às amidas com deslocamentos químicos entre 1,94 e 1,96 ppm. Os hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao benzeno apresentaram-se com sinais entre 2,22 e 2,23 ppm. Os hidrogênios aromáticos (H-3, (**47a**) H-4, H-5, H-6, H-14, H-18, H-19, H-24, H-25, H-28, H-30, H-31, H-32), deslocaram-se quimicamente entre 7,22 e 9,27 ppm. Todos os assinalamentos encontram-se descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H dos produtos finais **48a-e**.

Números dos ^1H	RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm, J em Hz)				
	$R_1 = \text{H}$	$R_1 = \text{CH}_3$	$R_1 = \text{F}$	$R_1 = \text{Cl}$	$R_1 = \text{Br}$
3	7,62 (d, $J = 7,8$)	7,43-7,50 (m, 4H)	7,43-7,57 (m, 5H)	7,65 (s, 2H)	7,76 (dd, $J = 1,6$ e 2,7)
4	7,36-7,39 (m, 2H)	-	-	-	-
CH₃-4	-	2,36	-	-	-
5	7,56 (t, $J = 7,4$)	7,43-7,50 (m, 4H)	7,43-7,57 (m, 5H)	7,36 (dd, $J = 2,8$ e 8,2)	7,59 (d, $J = 8,4$)

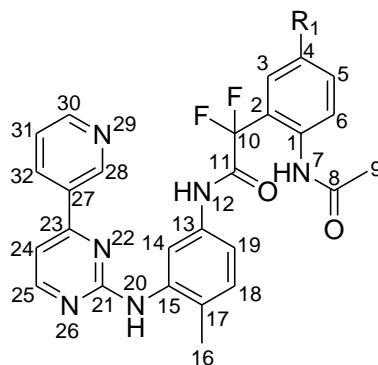


6	7,68 (d, J= 7,6)	7,43-7,50 (m, 4H)	7,43-7,57 (m, 5H)	7,71 (s, 1H)	7,33 (dd, J= 1,8 e 8,0)
7	10,68	10,65	10,64	10,67	10,69
9	1,96	1,94	1,94	1,95	1,94
12	9,38	9,31	9,36	9,41	9,41
14	7,36-7,39 (m, 2H)	7,35-7,40 (m, 2H)	7,43-7,57 (m, 5H)	7,65 (s, 2H)	7,82 (d, J= 2,4)
16	2,22	2,23	2,23	2,22	2,22
18	7,22 (d, J= 8,3)	7,23 (d, J= 8,4)	7,23 (d, J= 8,4)	7,23 (d, J= 8,0)	7,22 (d, J= 8,4)
19	7,99 (d, J= 1,7)	8,01	7,99 (d, J= 1,5)	7,97 (d, J= 1,7)	7,97 (d, J= 1,6)
20	8,97	9,00	8,99	8,97	8,96
24	7,43 (d, J= 5,1)	7,35-7,40 (m, 2H)	7,43-7,57 (m, 5H)	7,44 (d, J= 5,1)	7,43 (d, J= 4,8)
25	8,50 (d, J= 5,1)	8,51 (d, J= 5,1)	8,51 (d, J= 5,1)	8,51 (d, J= 5,1)	8,50 (d, J= 4,8)
28	9,26 (d, J= 1,8)	9,27 (d, J= 1,2)	9,27 (d, J= 1,3)	9,26 (d, J= 1,8)	9,25 (d, J= 1,6)
30	8,68 (dd, J= 4,7e 1,4)	8,69 (dd, J= 4,5 e 1,1)	8,68 (dd, J= 4,7 e 1,5)	8,69 (dd, J= 4,7 e 1,4)	8,68 (dd, J= 1,2 e 0,8)
31	7,46 (dd, J= 7,9 e 4,8)	7,43-7,50 (m, 4H)	7,38 (d, J= 8,2 e 2,0)	7,48 (dd, J= 7,9 e 4,8)	7,45 (dd, J= 7,6 e 4,6)
32	8,43 (dt, J= 8,0 e 1,8)	8,44 (dt, J= 7,7 e 1,9)	8,44 (dt, J= 8,2 e 1,8)	8,43 (dt, J= 8,2 e 1,8)	8,42 (d, J= 8,0)

Os espectros de RMN ^{13}C dos produtos finais **48a-e** mostraram os sinais das metilas ligadas às carbonilas com deslocamentos químicos entre 20,5 e 23,8 ppm. Os carbonos metilênicos apresentaram-se entre 17,5 e 17,6 ppm. Os carbonos C-11 mostraram-se como tripletos, devido aos acoplamentos com os átomos de flúor, com constante de acoplamento de 30,0 - 30,3 Hz, deslocando-se entre 160,8 e 161,8 ppm. Os carbonos C-8 apresentaram-se com sinais entre 168,68 e 161,57 ppm. Os carbonos C-10 mostraram-se como tripletos, com constante de acoplamento entre 251,5 Hz e 254,8 Hz. No intermediário **48c**, todos os carbonos do anel aromático contendo flúor mostraram-se como dupletos com constantes de acoplamento característicos. O carbono C-4 com $J= 241,1$ Hz; o C-3 com $J= 23,8$ Hz; o C-5 com $J= 22,3$ Hz; o C-2 com $J= 7,5$ Hz; o C-6 com $J= 6,5$ Hz e o C-1 com $J= 2,3$ Hz. O RMN ^{19}F do composto **48c** mostrou um sinal único com deslocamento químico de -118,00 ppm. Todos os assinalamentos encontram-se descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^{13}C e ^{19}F dos produtos finais **48a-e**.

Números
dos ^{13}C e
 $^{19}\text{F}^*$



RMN (100 MHz ^{13}C e 376 MHz ^{19}F , DMSO- d_6 , δ em ppm, J em Hz)

	R ₁ = H	R ₁ = CH ₃	R ₁ = F	R ₁ = Cl	R ₁ = Br
1	126,3 (t, $J= 7,5$)	126,5 (t, $J= 7,8$)	133,7 (d, $J= 2,3$)	126,2 (t, $J= 8,0$)	-
2	128,9	-	116,3 (d, $J= 7,5$)	128,3 (t, $J= 23,4$)	128,4 (t, $J= 23,7$)

3	125,4	127,7	118,9 (d, J= 23,8)	129,3	128,0 (t, J= 9,0)
4	132,0	132,0	159,5 (d, J= 241,1)	131,5	-
CH₃-4	-	23,2	-	-	-
F-4*	-	-	-115,28	-	-
5	127,4	126,8	132,4 (d, J= 22,3)	129,1	129,1
6	135,7	134,9	128,5 (d, J= 6,5)	134,7	134,7
8	168,6	168,8	168,9	168,8	168,7
9	23,3	20,5	23,8	23,2	23,3
10	114,3 (t, J= 252,7)	114,3 (t, J= 251,5)	114,4 (t, J= 254,2)	113,4 (t, J= 254,8)	113,3 (t, J= 253,7)
F₂-10*	-99,00	-99,01	-99,11	-99,00	-99,00
11	161,7	161,8 (t, J= 30,3)	160,2	161,2 (t, J= 30,0)	161,2 (t, J= 30,3)
13	148,0	137,9	139,0	138,0	137,9
14	117,6	117,6	116,4	117,6	117,6
15	137,9	135,0	135,6	134,8	135,2
16	17,5	17,6	17,6	17,6	17,6
17	130,1	128,9	128,2	129,6	129,4
18	131,4	130,2	131,1	130,2	130,2
19	117,2	117,2	117,0	117,2	117,2
21	162,0	161,5	162,9	161,5	161,5
23	161,5	161,0	161,7	161,0	161,0
24	107,6	107,6	108,7	107,6	107,6
25	160,9	159,4	160,1	159,4	159,4

27	134,3	133,1	133,0	132,1	132,1
28	151,2	148,1	149,2	148,1	148,1
30	159,3	151,3	152,1	151,3	151,3
31	123,6	123,7	124,2	123,7	123,7
32	134,8	134,3	135,0	134,3	134,4

As análises de EMAR mostraram que os produtos obtidos **48a-e** apresentaram massa compatível com as estruturas propostas. Para verificação do grau de pureza destas substâncias foram realizadas as análises de CLAE, que mostraram resultados satisfatórios (Tabela 16).

Tabela 16. Resultados de EMAR e CLAE para os compostos **48a-e**.

Composto	EMAR		CLAE (%; 261 nm):
	Teórico	Obtido	
48a) R= H	488,1772	488,1754	99
48b) R= CH₃	502,1929	502,1925	98
48c) R= F	506,1678	506,1677	97
48d) R= Cl	522,1383	522,1384	99
48e) R= Br	566,0877	566,0872	99

Os dados físicos e espectroscópicos dos produtos finais **48a-e** foram compatíveis com as estruturas propostas e estão descritos na parte experimental.

5.2. Avaliação Biológica

Para a avaliação biológica destes compostos foram realizados testes de citotoxicidade nas linhagens celulares K562, K562 Lucena e macrófagos da linhagem J774A.1. Os testes em células K562 e K562 Lucena foram feitos em

colaboração com o Laboratório de Hemato-oncologia Celular e Molecular do Instituto Nacional do Câncer (INCA), sob a supervisão da Dra. Raquel Maia e da Dra. Flávia Vasconcelos. Já os testes na linhagem de macrófagos J774A.1 foram realizados em colaboração com o Laboratório de Farmacologia Aplicada de Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob a coordenação do Dr. Thadeu Estevam.

5.2.1. Ensaios de Citotoxicidade na linhagem K562 E K562 Lucena

Os resultados obtidos com este estudo foram separados de acordo com cada série, e serão descritos sob a forma de gráficos, para facilitar a visualização e a discussão. Os compostos que se mostraram mais citotóxicos foram testados também na linhagem K562 Lucena. No gráfico apresentado na Figura 25 foi possível observar que, os derivados imínicos da primeira série **46a-e**, não foram capazes de reduzir a viabilidade celular de forma significativa. Sendo esta viabilidade maior que 50%, não foi possível calcular o valor exato da concentração citotóxica (CC_{50}). Para compostos que visam “eliminar” as células é calculado a concentração citotóxica ao invés da concentração inibitória (IC_{50}).

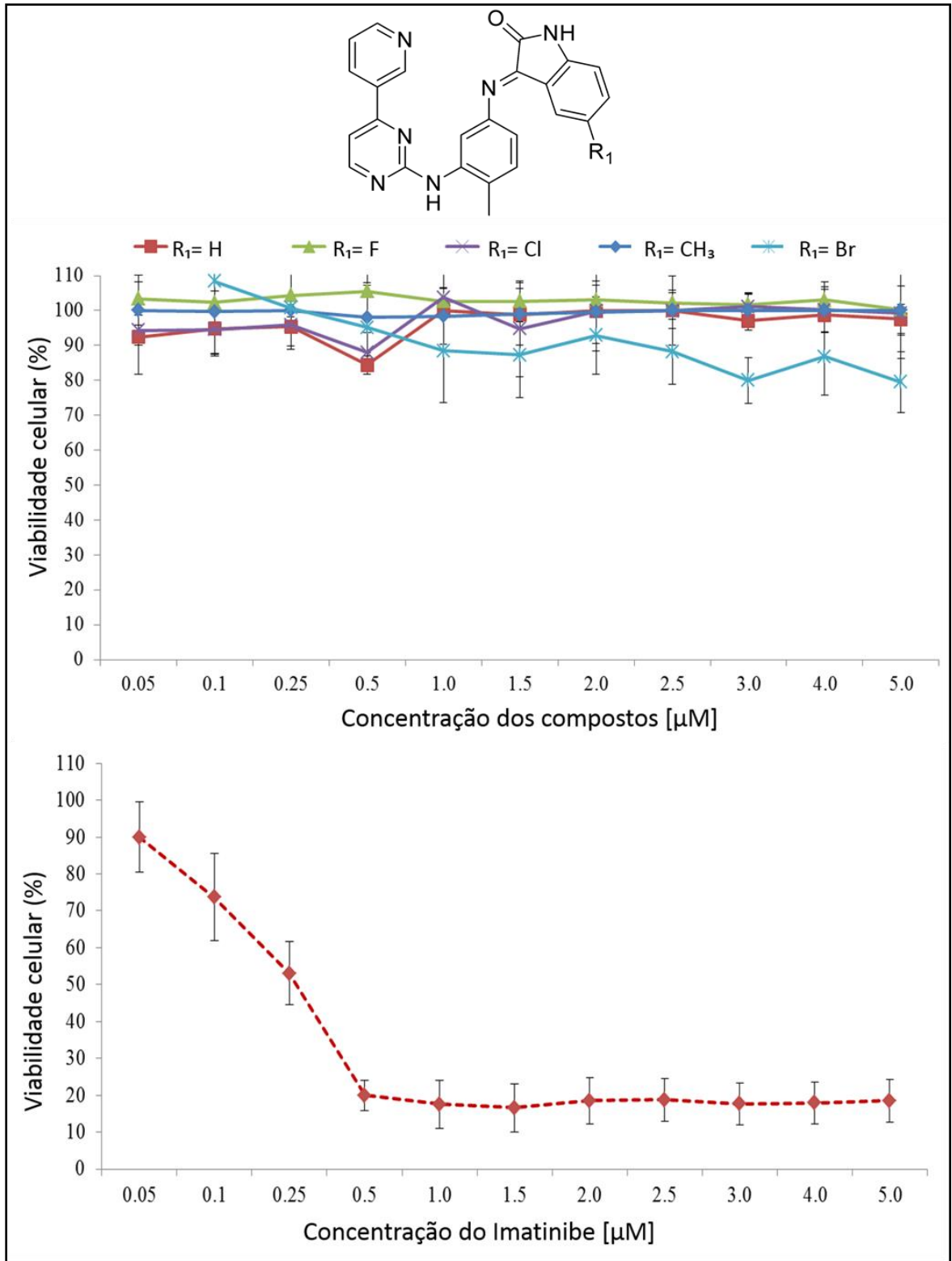


Figura 25. Efeito dos compostos **46a-e** e do imatinibe base na viabilidade celular em linhagem de K562.

Cabe ressaltar, que os produtos desta série **46a-e** também são análogos do sunitinibe, e desta forma, será necessário a realização de avaliações biológicas com células de tirosina quinase específicas para este fármaco.

Para a segunda série de produtos **47a-e**, a molécula substituída por flúor **47c** não promoveu uma redução celular significativa. O composto **47a**, não substituído, exibiu uma redução na viabilidade celular de 50%. As substâncias que apresentaram melhores resultados foram as substituídas por metila **47b**, cloro **47d** e bromo **47e**, atingindo uma viabilidade celular de 20%, equivalente ao padrão imatinibe. Para os compostos que foram capazes de reduzir a viabilidade celular em mais 50% foi calculada a CC₅₀. A molécula não substituída **47a** apresentou CC₅₀ de 3,89 µM; a substituída por bromo **47e** foi de 1,82 µM e a substituída por metila **47b** foi de 1,45 µM. O composto substituído com cloro **47d** foi o mais potente desta série, apresentando CC₅₀ de 0,51 µM, próximo ao padrão imatinibe (CC₅₀ de 0,27 µM) (Figura 26).

Os compostos **47b**, **47d** e **47e**, que apresentaram os melhores resultados de redução celular, juntamente com o padrão imatinibe, foram testados na linhagem celular K562-Lucena 1. As substâncias mostraram-se ativas, contudo, os resultados foram inferiores ao imatinibe. Vale ressaltar a necessidade dos testes serem feitos em concentrações abaixo de 1µM e a cima de 5µM para se obter uma melhor curva (Figura 27).

No momento, os compostos **47b**, **47d** e **47e** estão sendo submetidos a outros ensaios, tais como:

Avaliação da morte celular (apoptose) através do ensaio de anexina V por citometria de fluxo;

Deteção dos níveis de Crkl fosforilado antes e após o tratamento com os compostos selecionados, visto que esta é a principal proteína tirosina fosforilada em pacientes com LMC (NICHOLS *et al.*, 1994; TEN HOEVE *et al.*, 1994). Este ensaio permite avaliar de forma indireta a atividade da enzima Bcr-abl

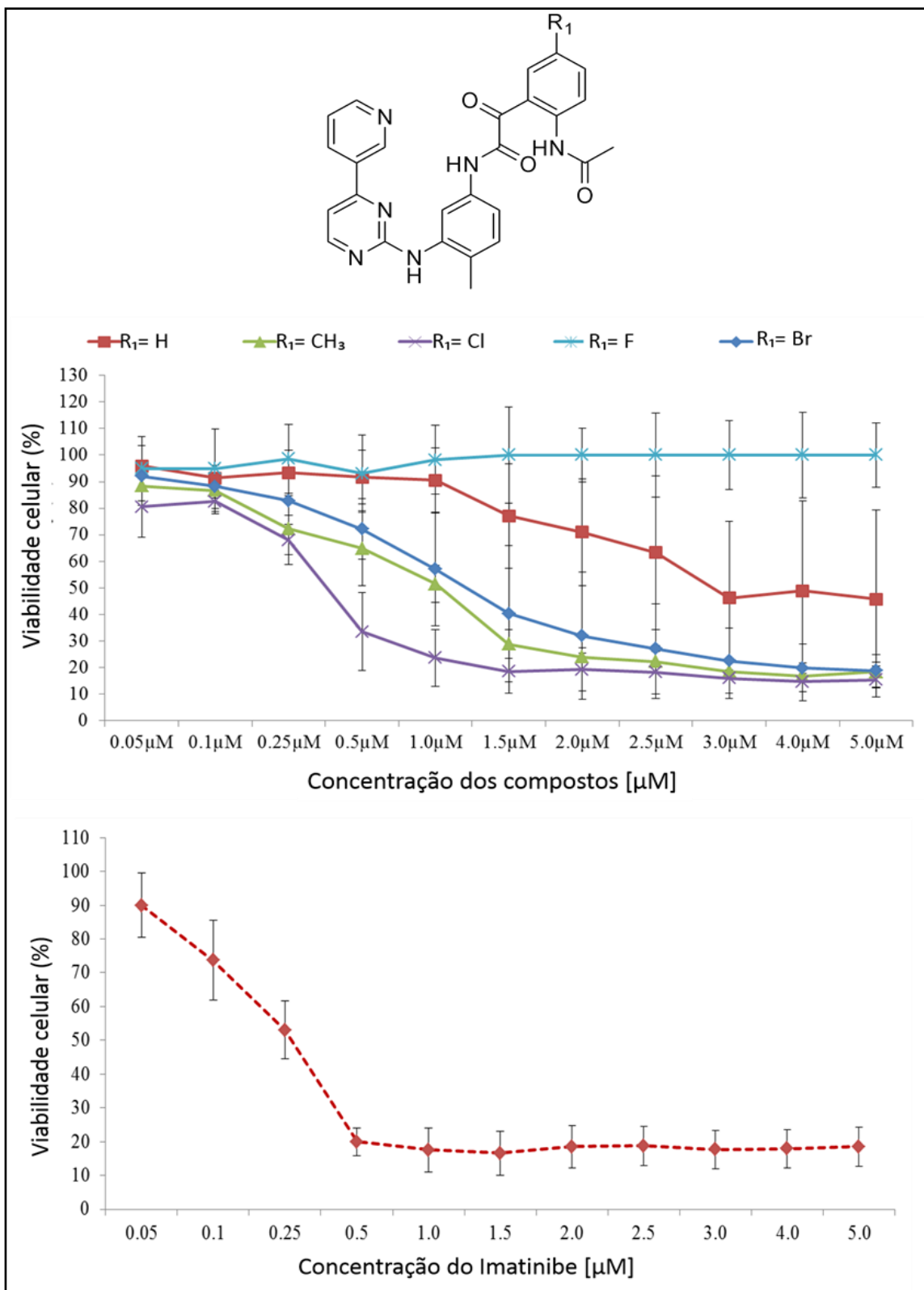


Figura 26. Efeito dos compostos **47a-e** e do imatinibe na viabilidade celular em linhagem de K562.

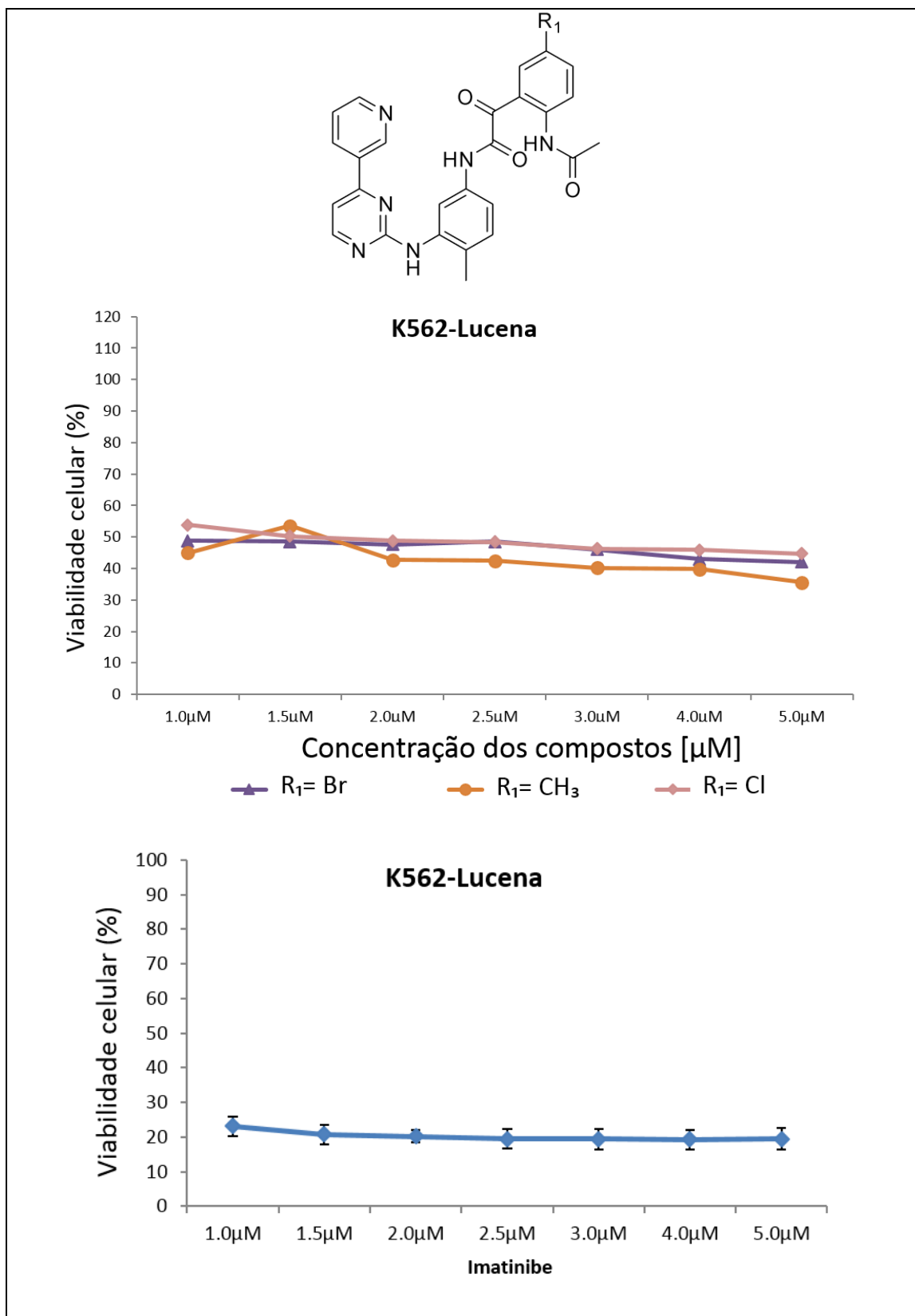


Figura 27. Efeito dos compostos **47a-e** e do imatinibe na viabilidade celular em linhagem de K562-Lucena 1.

Para a terceira série de compostos **48a-e**, não foi observada atividade significativa para nenhuma das substâncias testadas. O produto **48a** foi o que apresentou a maior redução na viabilidade celular (40%), na concentração de 5,0 μM . No entanto, esta redução foi muito inferior ao padrão imatinibe (Figura 28).

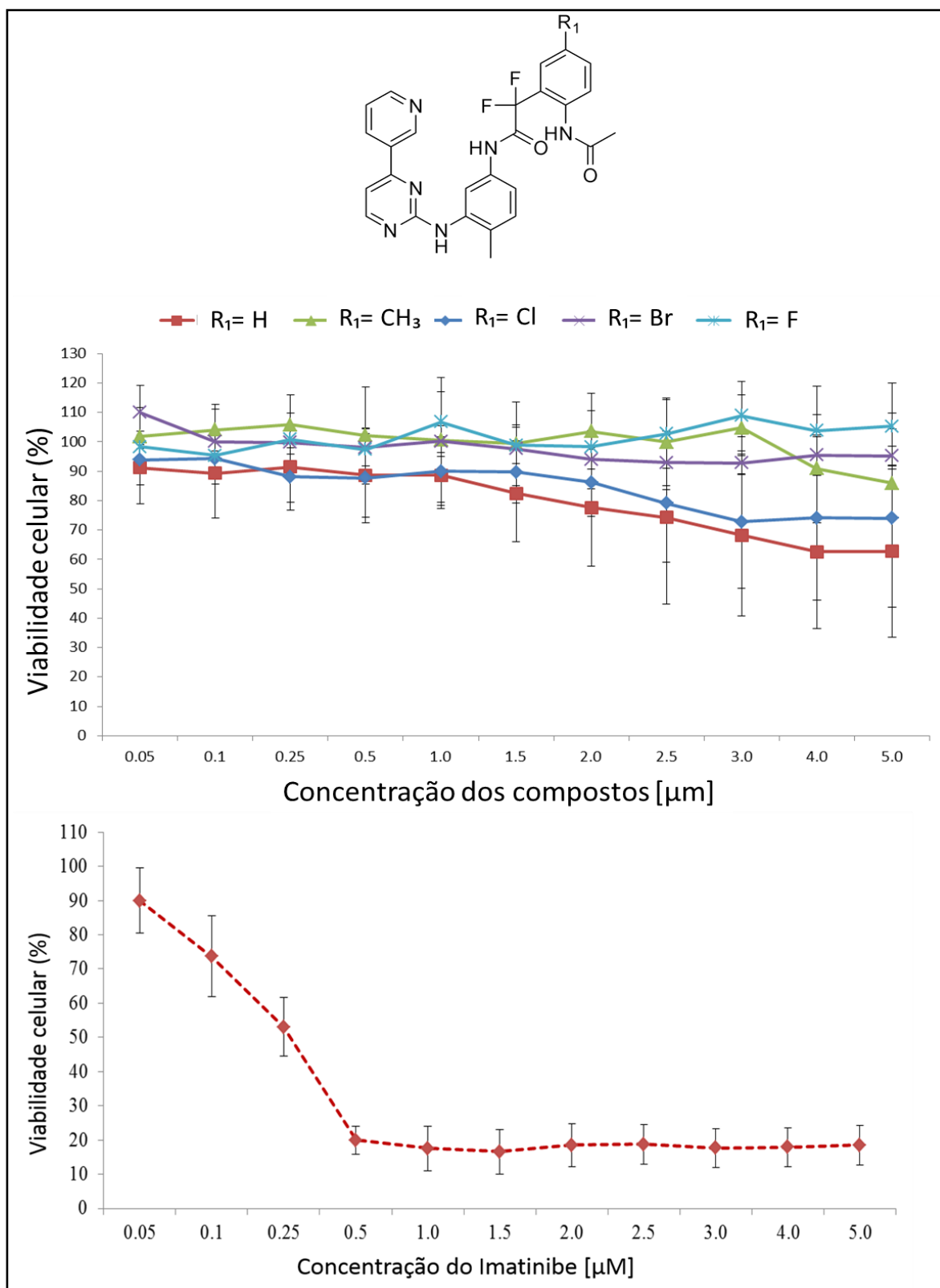


Figura 28. Efeito dos compostos **48a-e** e do imatinibe na viabilidade celular em linhagem K562.

5.2.2. Ensaios de Citotoxicidade

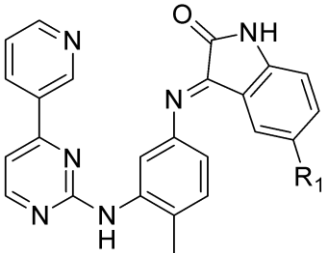
A viabilidade celular na presença e na ausência dos compostos foi determinada através um ensaio de redução de resazurina (Alamar Blue). Para este ensaio, utilizou-se células de macrófagos da linhagem J774A.1, originada de murinos. Neste ensaio, a resazurina é reduzida pelas mitocôndrias para resofurina, após essa redução é possível realizar a detecção colorimétrica e fluororimétrica.

As células foram cultivadas em placas planas de 96 poços de fundo preto, com uma densidade $2,5 \times 10^6$. As placas foram mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C. Após 1 hora de incubação as células receberam um novo meio de cultura, com ou sem Tween 20 (3%), DMSO (0,5%) e os compostos sintetizados **46-48a-e** ou o imatinibe em quadriplicata. Após 20 horas de incubação, foi adicionado 20 uL de uma solução de Alamar Blue em cada poço, e depois de 4 horas a fluorescência foi lida através do espectrofotômetro SpectraMax M5 / leitor de microplacas M5e (Molecular Devices; kexc = 555 nm, kem = 585 nm).

Os resultados obtidos neste estudo foram separados de acordo com cada série, e serão descritos sob a forma de tabelas para facilitar a discussão. Para os compostos que foram capazes de reduzir a viabilidade celular em mais de 50% foi calculado o CC₅₀.

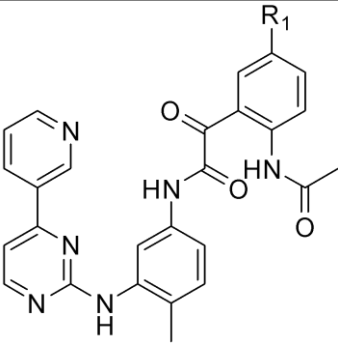
Nos derivados imínicos da primeira série **46a-e**, o composto não substituído **46a** foi o mais seguro, não sendo citotóxico em nenhuma das concentrações testadas. As moléculas substituídas por cloro **46d** e bromo **46e** mostraram-se citotóxicas, e para esses compostos foram calculados os CC₅₀ e comparados com o padrão imatinibe (CC₅₀= 51,3 µM). Esta comparação mostrou que os produtos **46d** e **46e** foram menos tóxicos que o padrão, com CC₅₀ de 56,6 µM e 64,6 µM, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17. Efeito dos compostos **46a-e** e do imatinibe na viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774A.

Concentração da amostra						
	Viabilidade celular (%)					
	46a R ₁ = H	46b R ₁ = CH ₃	46c R ₁ = F	46d R ₁ = Cl	46e R ₁ = Br	Imatinibe
100 μM	100,0	87,7	11,3	12,3	19,1	5,4
10 μM	100,0	89,2	81,2	92,6	100,0	84,5
1 μM	100,0	89,6	84,0	91,9	100,0	91,8
100 nM	99,5	90,6	86,6	90,2	100,0	94,5
10 nM	100,0	93,6	89,4	93,1	100,0	100,0
1nM	100,0	94,1	97,9	100,0	100,0	100,0

Para os compostos da segunda série **47a-e**, que apresentaram bons resultados de atividade em células leucêmicas, foram testadas concentrações maiores, com objetivo de definir o valor exato de CC₅₀. Contudo, na maior concentração testada (10 mM), eles foram seguros, apresentando redução da viabilidade celular em torno de 13%, não permitindo o cálculo do CC₅₀. Os compostos **47c** e **47e** foram testados até a concentração de 100 μM, e atingiram redução de 20% e 60%, respectivamente. Apesar disso, estas substâncias mostraram-se menos citotóxica que o padrão (Tabela 18).

Tabela 18. Efeito dos compostos **47a-e** e do imatinibe na viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774A.

Concentração da amostra						
	Viabilidade celular* (%)					
	47a R ₁ = H	47b R ₁ = CH ₃	47c R ₁ = F	47d R ₁ = Cl	47e R ₁ = Br	Imatinibe
10 mM	87,2	85,8	-	88,0	-	-
1 mM	98,4	90,5	-	97,0	-	-
100 µM	93,6	96,8	80,4	100,0	39,5	5,4
10 µM	99,1	95,6	80,8	99,5	74,6	84,5
1 µM	99,0	95,8	89,0	99,2	95,7	91,8
100 nM	100,0	95,9	90,5	97,5	96,3	94,5
10 nM	100,0	95,8	90,3	97,6	99,7	100,0
1 nM	100,0	94,9	93,5	99,5	100,0	100,0

Na terceira série de compostos **48a-e**, o produto **48d** foi o mais seguro, não apresentando citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. A molécula **48e** também não se mostrou tóxica, com redução da viabilidade celular de no máximo 19%. O composto **48a** reduziu em 37% a viabilidade celular, e os derivados **48b** e **48c** mostraram ser os mais citotóxicos. No entanto, quando comparados com o imatinibe (CC₅₀= 51,3 µM), ambos foram menos citotóxicos com CC₅₀ de 56,2 µM e 87,1 µM, respectivamente (Tabela 19).

Tabela 19. Efeito dos compostos **48a-e** e do imatinibe na viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774A.

Concentração da amostra	Viabilidade celular* (%)					
	48a	48b	48c	48d	48e	Imatinibe
	R ₁ = H	R ₁ = CH ₃	R ₁ = F	R ₁ = Cl	R ₁ = Br	
100 μM	62,8	6,1	41,9	94,0	81,3	5,4
10 μM	97,1	92,9	90,9	100,0	90,6	84,5
1 μM	97,9	100,0	93,2	99,7	99,4	91,8
100 nM	97,3	100,0	93,8	100,0	98,0	94,5
10 nM	97,4	100,0	92,6	100,0	97,8	100,0
1nM	98,1	100,0	91,8	100,0	98,3	100,0

O índice de seletividade (IS) consiste na razão entre a concentração citotóxica (CC₅₀) e a concentração inibitória (CI₅₀), ou neste caso, por se tratar de ensaios realizados em células tumorais, o CC₅₀. No entanto, como os ensaios foram realizados com diferentes tempos de incubação, não foi possível o cálculo do IS.

5.3. Estudo da Relação Estrutura Atividade (REA)

Como descrito anteriormente, o imatinibe foi desenvolvido a partir de estudos de ensaios cegos robotizados, conhecidos como “High-throughput screening

(HTS)". Na aplicação desta técnica foi identificado o esqueleto 2-fenilaminopirimidina (**12**) como um inibidor de proteína quinase C, que consiste numa família da serina e treonina quinase (ZIMMERMANN *et al.*, 1996a,b). Contudo, foi necessário realizar a otimização dessa estrutura (ZIMMERMANN *et al.*, 1997), e posteriormente, foi realizado um "screening" contra v-Abl (uma tirosina quinase codificada pelo gene ABL1) e um número de outras proteínas quinases, com objetivo de encontrar um composto específico Abl. Os resultados indicaram que a inserção de uma unidade benzoamida ligada ao grupo fenila foi essencial para aumentar a atividade frente a v-ABL. Além disso, a adição de uma metila em C-6 deste mesmo anel serviu para eliminar a atividade indesejada na proteína quinase C, sem alterar a atividade agonista na v-ABL (DEADMAN *et al.*, 2013) (Figura 29). Apesar de ter apresentado excelente atividade na proteína quinase v-ABL, o derivado **67**, não apresentou uma boa biodisponibilidade oral, e em condições neutras sua hidrossolubilidade era muito baixa, não favorecendo o uso como um fármaco (ZIMMERMANN *et al.*, 1996a,b). A adição da N-metilpiperazina resultou na molécula do imatinibe (**12**), que apresenta uma maior solubilidade em água e biodisponibilidade oral (Zimmermann *et al.*, 1997) (Figura 29).

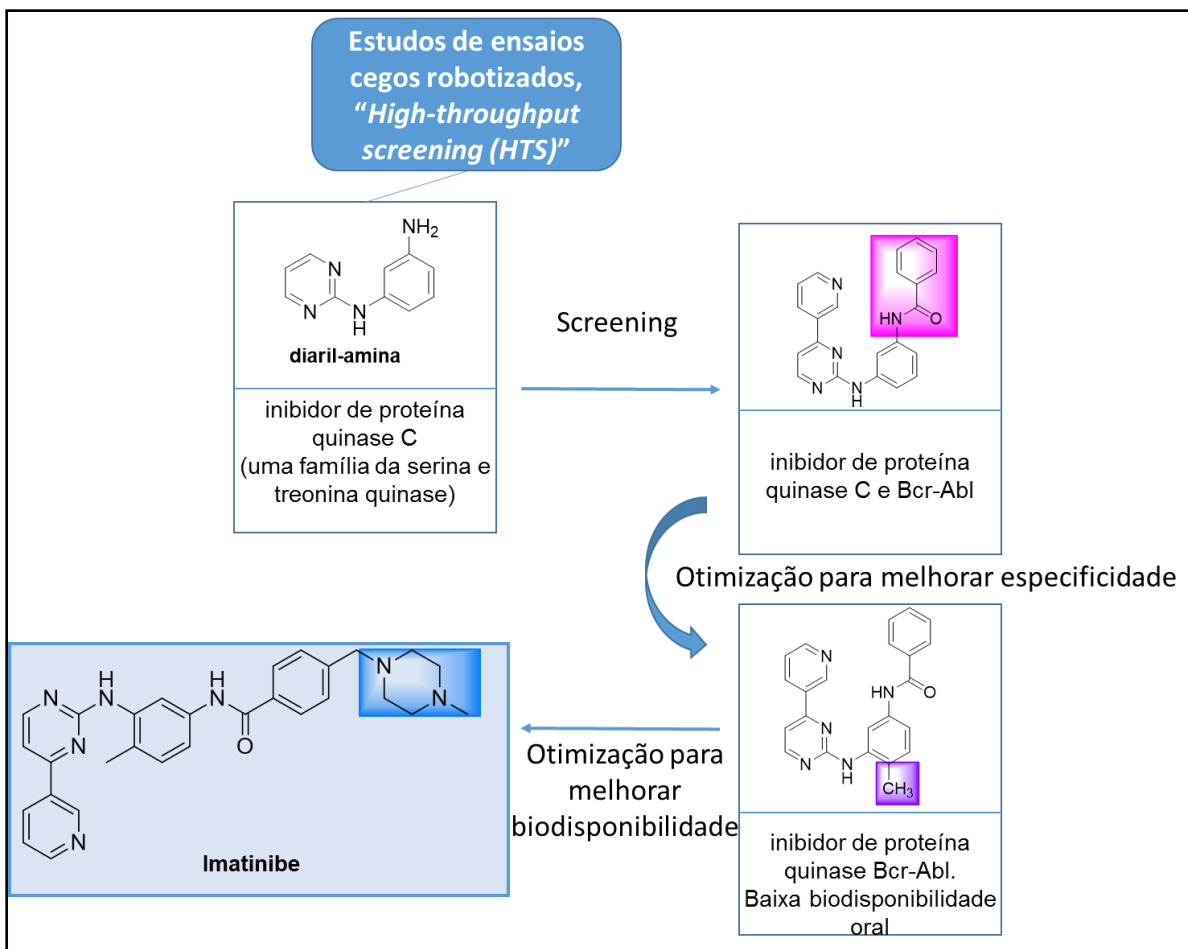


Figura 29. Gênese estrutural do imatinibe (6).

Os resultados das avaliações biológicas deste trabalho permitiram estabelecer as relações de estrutura atividade dos compostos sintetizados **46-48a-e**, e confrontá-los com os descritos para o imatinibe.

5.3.1. Relação Estrutura Atividade dos Compostos da Primeira série 46a-e

Em relação ao imatinibe, os resultados das avaliações biológicas obtidos para as substâncias da série das iminas **46a-e**, serviram para validar a importância da amida para atividade da molécula, uma vez que nestes compostos a atividade

foi cessada quando essa foi substituída por uma imina, uma hipótese é que a maior restrição conformacional na imina contribua para perda do efeito. Outra importante observação foi que a introdução de diferentes substituintes, não contribuiu significativamente para melhorar a atividade biológica (Figura 30).

Como descrito anteriormente, as avaliações biológicas com linhagens celulares específicas do sunitinibe são necessárias para a série de compostos **46a-e**, devido a similaridade estrutural entre estas substâncias e o sunitinibe. Posterior a estas avaliações, deverão ser realizados estudos de relação estrutura atividade que permitam estabelecer quais as principais vantagens e/ou desvantagens estruturais dos compostos desta série, em relação ao fármaco sunitinibe.

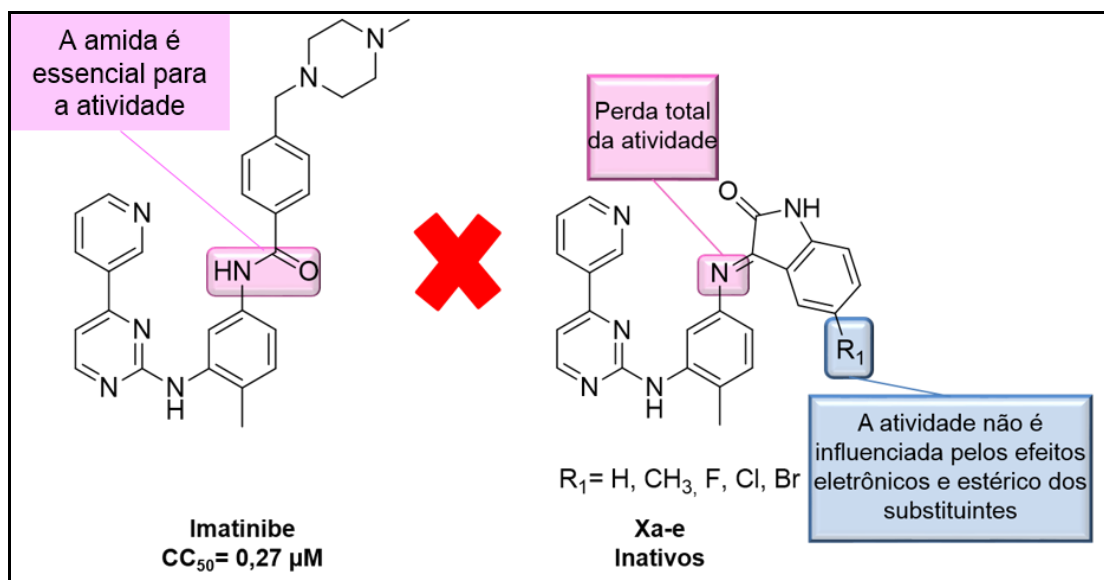


Figura 30. Relação estrutura atividade do imatinibe *versus* os compostos da primeira série **46a-e**.

5.3.2. Relação Estrutura Atividade dos Compostos da Segunda Série 47a-e

Em relação ao imatinibe, nos derivados **47a-e** as principais modificações estruturais realizadas foram:

- O grupamento *p*-metilpiperazina presente na estrutura do imatinibe, foi removido;
- A fenila foi substituída na posição *orto* por uma amida adicional;
- Houve a inclusão de uma carbonila cetônica como espaçador.
- Diferentes substituintes foram introduzidos na posição *para* da fenila, em relação ao grupo amida.

Todas as alterações estruturais, com exceção dos diferentes substituintes, não alteraram de forma significativa a atividade biológica. Contudo, em relação às substituições na fenila em posição *para* ao grupo amida, de acordo com os ensaios realizados, a ordem de atividade para os substituintes foram: cloro>metila>bromo>hidrogênio>flúor (Figura 31). Os substituintes utilizados neste trabalho apresentam uma série de propriedades que permite propor uma interpretação razoável para estes resultados.

A refratividade molar (RM) foi descrita em 1945 por Pauling e Pressman, e trata-se de uma propriedade de polarizabilidade muito empregada em estudos de REA (TAVARES, 2004). Ela é fortemente dependente da estrutura química do composto, pois expressa uma propriedade físico-química de caráter constitutivo-aditiva. Alguns parâmetros correlacionados com a polarizabilidade são: volume de van der Waals, índice de conectividade molecular e parâmetros relacionados ao volume (KUBINYI, 1993). Estas correlações estão descritas na equação a seguir:

$$RM = (PM/r) (n^2 - 1 / n^2 + 2)$$

PM - peso molecular

r – densidade a 20 °C

n – índice de refratividade do composto à 20 °C

Então, como pode-se observar, a RM está relacionada ao volume, tamanho e polarizabilidade, características representadas pelo peso molecular, densidade e

índice de refração. De forma geral, o coeficiente de refração molar tem auxiliado na compreensão da interação do composto, ou dos substituintes com o sítio de ligação do receptor. Assim, foi feita uma correlação entre a ordem de atividade apresentada nos ensaios biológicos e os valores de RM para cada substituinte. Foi observado que, com exceção do átomo de bromo, a resposta biológica seguiu o padrão de RM, ou seja, quanto maior a atividade, maior o valor de RM. Podemos propor que, a falta de correlação entre a atividade do composto substituído com bromo e o RM, devem estar associados a outras propriedades deste átomo (Tabela 20).

Tabela 20. Parâmetros biológicos e RM dos substituintes utilizados neste trabalho.

Substituinte na ordem decrescente de atividade	RM¹
Cl	6,03
CH ₃	5,65
Br	8,88
H	1,03
F	0,92

¹Valores descritos na referência: BARREIRO & FRAGA, 2015.

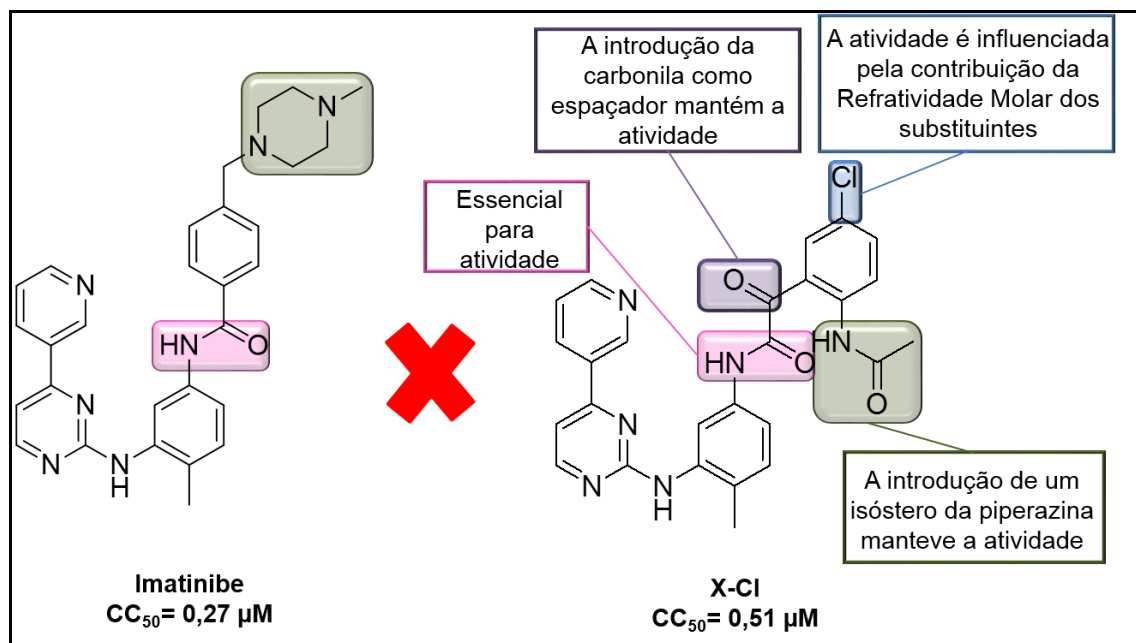


Figura 31. Relação estrutura atividade do imatinibe *versus* os compostos da segunda série **47a-e**.

5.3.3. Relação Estrutura Atividade dos Compostos da Terceira Série 48a-e

Os compostos da terceira série **48a-e** mostraram o efeito deletério da natureza do grupo CF₂ como espaçador para atividade biológica em células da linhagem K562. Os resultados de atividade desta série, quando comparados com a série **48a-e**, mostraram uma considerável perda da atividade. A comparação entre o produto substituído por cloro **48d**, com maior valor de atividade na série **48a-e**, e a substância substituída por cloro desta série **48d**, mostra uma redução de atividade de 80% para 25%. Na Figura 32, encontram-se destacados os principais grupos e as suas influências para atividade dos compostos da série **48a-e**.

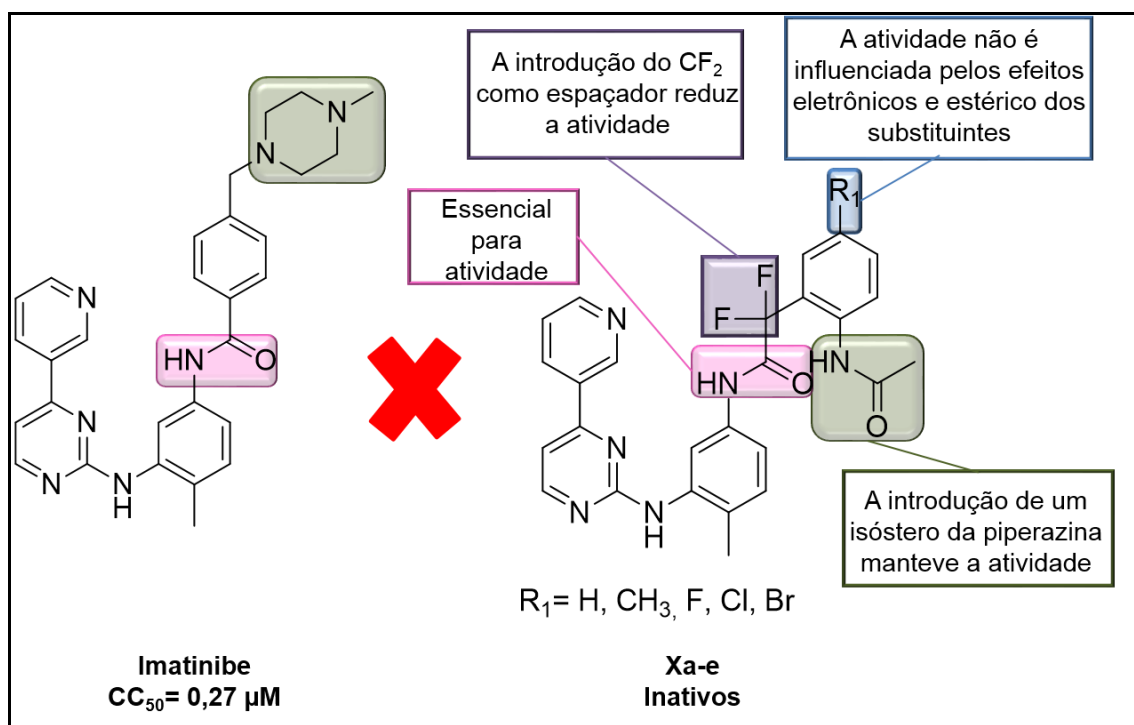


Figura 32. Relação estrutura atividade do imatinibe *versus* os compostos da terceira série **48a-e**.

5.4. Estudo de Ancoramento Molecular dos compostos 46-48a-e

Os compostos que apresentaram bons resultados de redução celular nas linhagens de K562 (**47b**, **47d e 47e**), foram selecionados para avaliação frente à enzima tirosina quinase Bcr-abl. Desta forma, os estudos teóricos de ancoramento molecular com esta proteína foram realizados, a fim de corroborar com a escolha destes compostos e entender um possível mecanismo de ação dessas moléculas. Os testes *in silico* foram realizados pela Dra. Carla Meneses do laboratório de síntese orgânica de Farmanguinhos, Fiocruz.

Por serem os compostos em avaliação planejados pela metodologia de hibridação molecular do fragmento farmacofórico FAP, contido no imatinibe, e derivados de isatina, o estudo de ancoramento molecular foi realizado considerando-se a proteína humana tirosina quinase, alvo molecular destes fármacos antineoplásicos, co-cristalizada com o imatinibe (STI-575), proteína código PBD ID 2HYY (JABBOUR *et al.*, 2007), e, uma segunda proteína, código PBD ID 3G0E (GAJIWALA *et al.*, 2009), co-cristalizada com a molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe (B49), por ser este um pró-fármaco.

Os compostos avaliados pertencem a três classes químicas que diferem quanto ao sistema que se liga a amina primária do FAP, aqui denominadas: primeira série **46a-e**, segunda série **47a-e** e terceira série **48a-e** (Figura 33). A seleção dos compostos que foram estudados em cada série considerou a natureza do substituinte (CH₃, F, Cl e Br), com objetivo de avaliar a importância da natureza eletrônica, estérica e hidrofóbica do substituinte, em relação aos análogos não substituídos. No estudo considerando-se a proteína código PBD ID 2HYY, os produtos **47a-e** tiveram os resultados de todos os substituintes apresentados. Para a primeira e terceira série, apenas os derivados sem substituinte, metila e cloro foram expostos. No estudo de ancoramento na proteína código PBD ID 3G0E, somente a primeira série **46a-e** tiveram os resultados com todos os substituintes apresentados. Vale ressaltar que esta série contém isômeros *E* e *Z*.

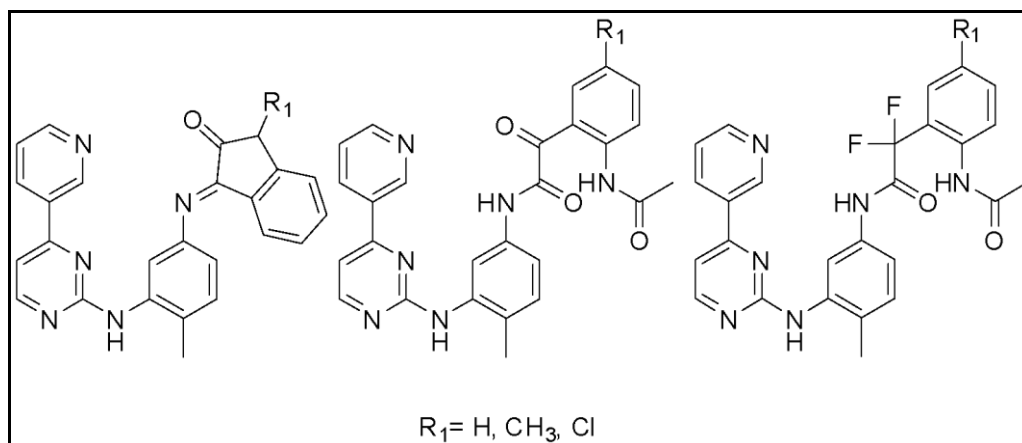


Figura 33. Moléculas usadas nos estudos de ancoramento molecular.

5.4.1. Estudo de Ancoramento Molecular na Proteína 2HYY

O reancoramento do imatinibe na proteína código PDB ID 2HYY mostrou o ligante com excelente sobreposição ao ligante co-cristalizado (STI-575), como demonstra o valor de RMSD igual a 1,199 Å. O valor calculado para a energia de interação foi -12,7 kcal/mol. Em adição, a sobreposição dos primeiros modelos (M01), nas sete corridas realizadas (R01 a R07), corrobora o emprego do programa AutoDock Vina e parâmetros selecionados para a realização deste estudo.

A análise no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY indica que o imatinibe reancorado reproduz as interações do ligante co-cristalizado STI-575, conforme pode ser verificado na Figura 34. Interações dipolo-dipolo são observadas entre o átomo de nitrogênio piridínico presente no sistema FAPP do imatinibe reancorado, e do STI-575 com o grupo amino da Met318, assim como, entre o átomo de hidrogênio ligado ao grupo amino secundário do FAP com o grupo hidroxila da Thr315, entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo amida com o oxigênio *alfa*-carbonílico do Asp381. Ressalta-se que, no STI-575 é o oxigênio do grupo amida que interage com o grupo amino do mesmo resíduo enquanto, o grupo amino interage com grupo carboxilato presente no Glu286. Esta diferença pode ser atribuída ao fato deste estudo não considerar a molécula de água co-cristalizada HOH146, com a qual o grupo amida do STI-571 forma ligação de hidrogênio. Interação dipolo-dipolo também ocorre entre o átomo de nitrogênio piperidínico protonado e o grupo *alfa*-carbonílico da Ile360. Interações hidrofóbicas e do tipo π -

π são observadas entre o sistema FAP, e a parte correspondente ao anel aromático ligado por grupo metileno ao anel *N*-metil-piperazina di-protonado do imatinibe reancorado, e do STI-575 com os resíduos Tyr253, Leu248, Met290, Thr315, Leu370 e Phe382. Através destas interações, o STI-575 se liga à conformação inativa do domínio ABL quinase, e promove a inibição da atividade catalítica da oncoproteína Bcr-abl. Estudos cristalográficos a respeito da ligação do imatinibe ao domínio ABL quinase possibilitaram o esclarecimento do mecanismo de ação, e a compreensão do efeito antineoplásico de uma nova classe terapêutica, os ITK da oncoproteína Bcr-abl, a qual tem o imatinibe como composto protótipo (JABBOUR *et al.*, 2007). A conformação do domínio ABL quinase será aqui definida como sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY.

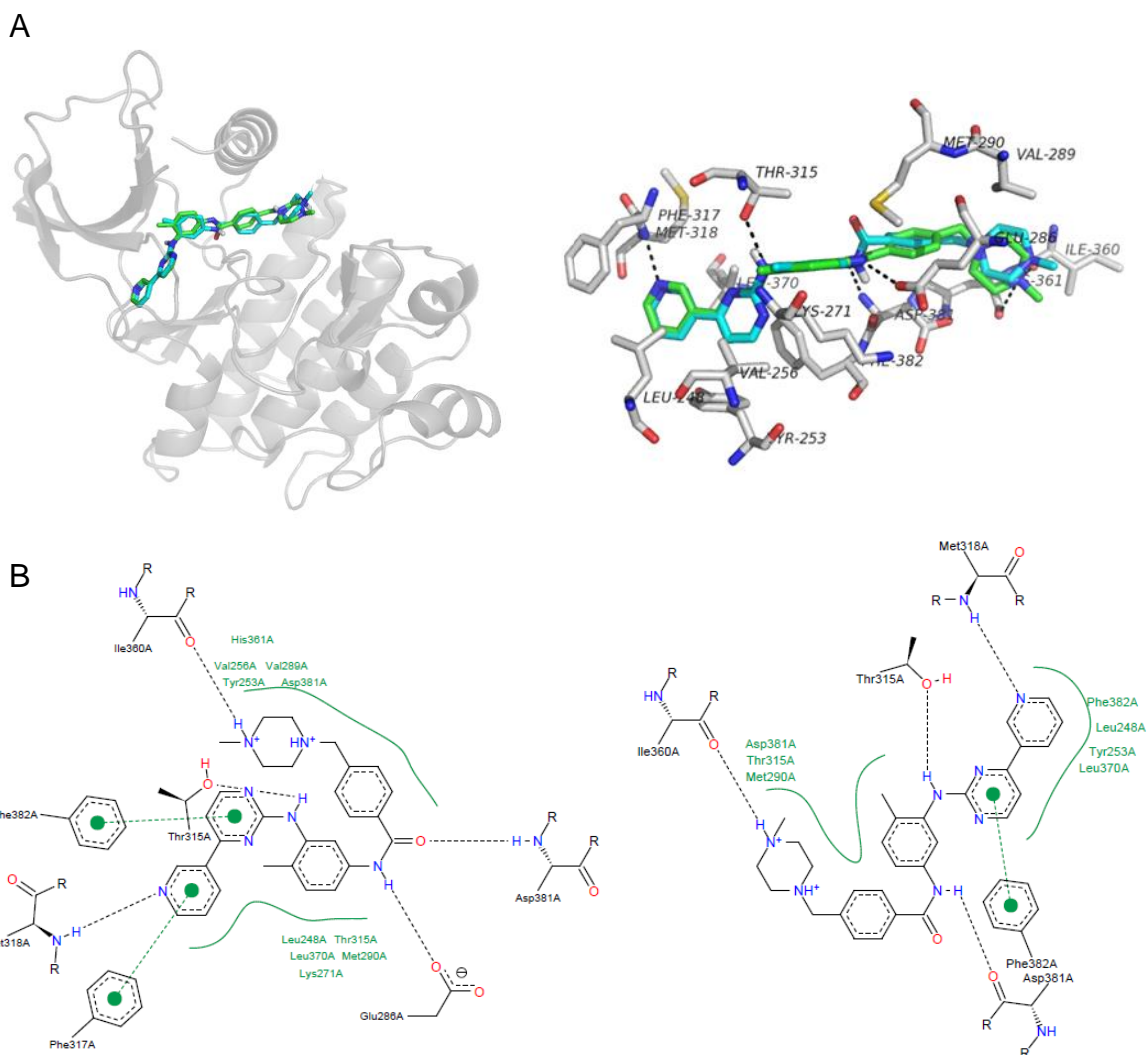


Figura 34. A. Representação do ligante co-cristalizado STI-575 (carbono na cor verde) e do imatinibe reancorado (carbono na cor azul ciano) no sitio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza) (à esquerda). Sobreposição do imatinibe reancorado ao STI-575 com ilustração das interações com resíduos do sítio ativo da proteína (à direita). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco) e enxofre (amarelo). **B.** Diagramas bidimensionais ilustrativos da interação STI-575 (à esquerda) e do imatinibe reancorado (à direita) no sítio ativo da proteína.

A análise dos resultados observados para a os compostos da primeira série **46a**, **46d** e **46e**, mostra energias de interação próximas ao valor de imatinibe reancorado (inferiores a 2,5 kcal/mol) (TROTT *et al.*, 2010), em especial para os isômeros Z (Tabela 21). Isto poderia indicar que nesta configuração geométrica, os

compostos interagiriam mais favoravelmente com o sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY, do que os correspondentes isômeros *E*.

Tabela 21. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, e indicação do comportamento de sobreposição das conformações do reancoramento do imatinibe e dos compostos da primeira série **46a**, **46d** e **46b** na proteína código PDB ID 2HYY.

Composto	Energia de interação (kcal/mol)	Número do modelo (M) e número da corrida (R) correspondente	Superposição das conformações
Imatinibe reancorado	-12,7	M01R01	M01 de R01 a R07
E-46a	-9,5	M01R01	M01 de R01 a R07
	-9,2	M02R01	M02 de R01 a R07
Z-46a	-11,8	M01R01	M01 de R01 a R07
E-46d	-9,4	M01R01	M01 a M02 de R01 a R07
Z-46d	-11,6	M01R01	M01 e M02 de R01 a R07
E-46b	-9,5	M01R01	M01 a M03 de R01 a R07
Z-46b	-11,9	M01R01	M01 e M02 de R01 a R07

Na maior energia de interação se observa maior sobreposição dos isômeros **Z** ao imatinibe co-cristalizado (STI-575), conforme pode ser verificado na Figura 35A. Os primeiros modelos das primeiras corridas (M01, M02 a até M03), os quais são idênticos até a sétima corrida (R01 a R07) (Tabela 21), de **Z-46a**, **Z-46d** e **Z-46b** têm suas estruturas sobreponíveis entre si, e quase que totalmente sobrepostas ao STI-575, porém apresentam-se em orientação oposta a este. O anel indolin-2-ona se sobrepõe à parte do piridinil-pirimidina do FAP do STI-575, com sobreposição do nitrogênio imínico ao nitrogênio amínico do FAP do STI-575 e dos respectivos anéis benzílicos dos sistemas FAP. Em contrapartida, o átomo de nitrogênio amínico do FAP de **Z-46a**, **Z-46d** e **Z-46b** se sobrepõe ao nitrogênio

amídico do STI-575. Estas sobreposições garantiriam aos compostos **Z-46a**, **Z-46d** e **Z-46a** a possibilidade de interações de naturezas semelhantes às do STI-575 na conformação inativa do domínio ABL quinase. Dentre as interações observadas estão a de natureza dipolo-dipolo, entre o nitrogênio imínico e o resíduo Thr315 (distância de 3,10 Å) e do grupo amino de **Z-46d**, com o resíduo Glu286 (distância de 2,93 Å). Em adição, interações hidrofóbicas semelhantes também se observam, conforme pode ser visualizado pelas interações formadas entre as partes aromáticas destacadas dos análogos **Z-46** com os resíduos Tyr253, Leu248 e Leu370 (Figura 35).

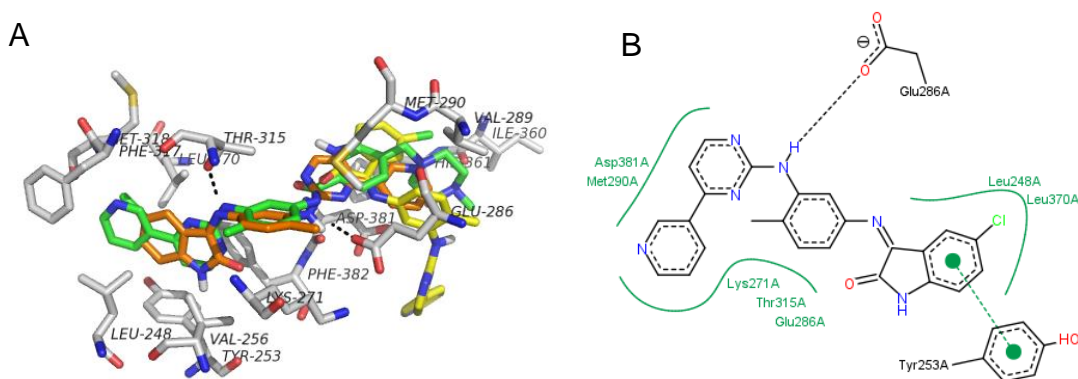


Figura 35. A. Sobreposição atômica do **Z-46d** (carbono na cor laranja) e **E-46d** (carbono na cor amarelo) ao **STI-575** (carbono na cor verde) com ilustração de interações com resíduos do sítio ativo da proteína código **PDB ID 2HYY** (em cinza). Cores dos demais átomos: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), cloro (verde claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagrama bidimensional ilustrativo da interação do **Z-46d** no sítio ativo da proteína.

Os correspondentes isômeros **E** por apresentarem configuração geométrica oposta em relação aos isômeros **Z**, têm o anel indolin-2-ona sobreponível ao anel benzamídico do **STI-575**, como pode ser visto para **E-46d** (Figura 36). Entretanto, enquanto conformações indiferentes ao substituinte cloro (**E-46d**) ou grupo metila (**E-46b**) são observadas, comportamento distinto ocorre para **E-46a**. Na conformação de menor energia (M01R01) deste composto, a parte do FAP se

encontra superposta à do STI-575, porém, em direção oposta. São conservadas apenas as interações com os resíduos Tyr253 e Phe382. O nitrogênio imínico da indolin-2-ona interage com o grupo amino de um novo resíduo, Gly249 (distância de 3,3 Å) (Figura 36A e B). Na segunda conformação de menor energia (M02R01), a parte correspondente ao anel indolin-2-ona se sobrepõe ao anel benzamídico do STI-575, contudo em direção oposta à observada para o **E-46d** e **E-46b**. Desta forma, não se mantêm as interações dipolo-dipolo com os resíduos Asp381 e glu286, observadas ao STI-575.

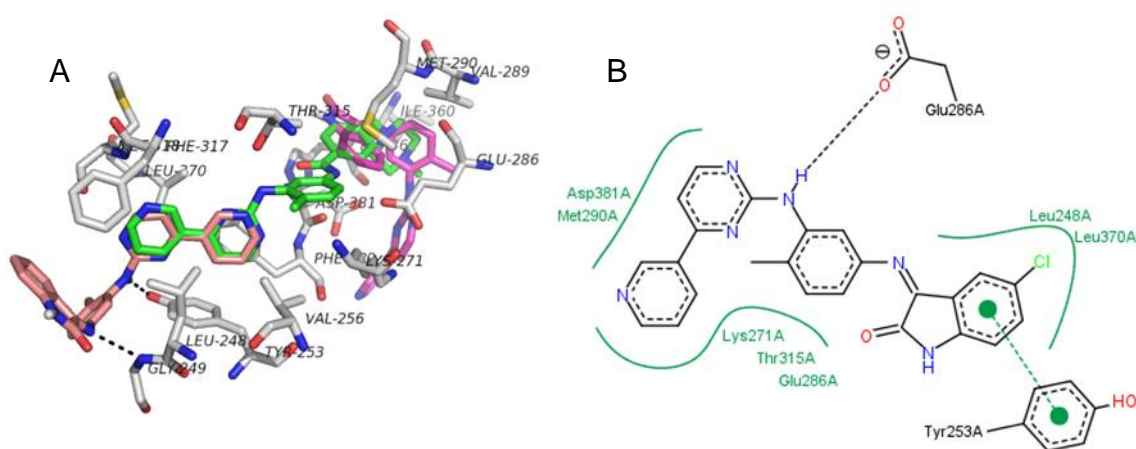


Figura 36. A. Sobreposição atômica do **E-46a M01R01** (carbono na cor amarelo claro) e **E-46a M02R01** (carbono na cor marrom) ao STI-575 (carbono na cor verde) com ilustração de interações com resíduos no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco) e enxofre (amarelo). **B.** Diagrama bidimensional ilustrativo da interação do **E-46a M01R01** no sítio ativo da proteína.

A análise dos resultados do ancoramento molecular para os compostos da segunda série **47a-e** mostraram energias de interação variando entre -9,7 a -12 kcal/mol (Tabela 22). Considerando-se a variação permitida de até 2,5 kcal/mol para conformações semelhantes (TROTT *et al.*, 2010), os valores calculados estão próximos ao do reancoramento do imatinibe (-12,7 kcal/mol), ou inferior, condição

observada especialmente para duas conformações de energia de interação mínima, idênticas, do composto substituído por bromo **47e** (**47e-M01R05** e **47e-M01R07**). Como consequência, as conformações de menor energia de interação das primeiras corridas (M01R01) de todos os compostos desta série, as quais são idênticas até a sétima corrida (R01 a R07), com exceção de **47e-M01R05** e **47e-M01R05**, são sobreponíveis entre si assim como à molécula do STI-575 (Figura 37). Esta sobreposição ocorre até a região da amida, embora se observem pequenas variações na angulação deste grupo em razão da presença da carbonila cetônica. Desta forma, são observadas interações com resíduos da proteína, aos quais o STI-575 interage entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio amídico com o grupo carboxilato do resíduo Glu286 (distância de 2,80 Å) e/ou oxigênio da *alfa*-carbonila do Asp381 (distância de 2,50 Å). Interações hidrofóbicas comuns também são mantidas. Estas interações podem ser visualizadas no diagrama bidimensional que complementam a Figura 37.

Tabela 22. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, e indicação do comportamento da sobreposição das conformações do reancoramento do imatinibe e dos compostos da segunda série **47a-e** na proteína código PDB ID 2HYY.

Composto	Energia de interação (kcal/mol)	Número do modelo (M) e número da corrida (R) correspondente	Sobreposição das conformações
Imatinibe reancorado	-12,7	M01R01	M01 de R01 a R07
47a	-12,0	M01R01	M01 de R01 a R07
47c	-11,9	M01R01	M01 de R01 a R07
47d	-11,5	M01R01	M01 de R01 a R07
47e	-10,7 -9,7	M01R01 M01R05	M01 de R01 a R04 e R05 a R06 M01 de R05 e R07
47b	-11,4	M01R01	M01 de R01 a R07

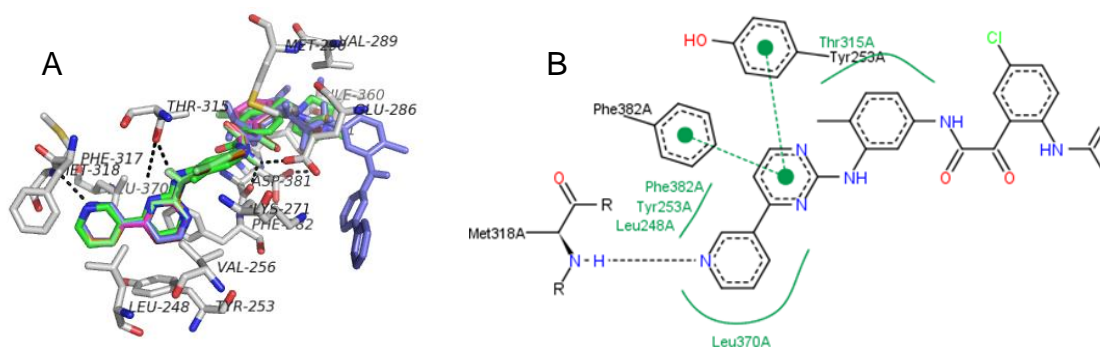


Figura 37. A. Sobreposição atômica das conformações **M01R01** de **47a** (carbono na cor magenta), **47c** (carbono na cor verde claro), **47d** (carbono na cor laranja), **47e** (carbono na cor azul escuro) e **47b** (carbono na cor marrom) e do **47e-M01R05** (carbono na cor azul claro) ao STI-575 (carbono na cor verde) com ilustração de interações com resíduos no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), flúor (azul claro), cloro (verde claro), bromo (rosa claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagrama bidimensional ilustrativo da interação do **47d-M01R01** no sítio ativo da proteína.

Estes resultados apontam que a introdução do grupo amida, da carbonila cetônica como espaçador e do grupo metil-ceto-anilina, em substituição ao grupo benzamida e anel piperazínico do imatinibe, manteve a maioria das interações observadas para o protótipo STI-575, quando se liga à conformação inativa do domínio ABL quinase da proteína. Exceção para o composto **47e**, que apresentou duas conformações (**47e-M01R05** e **47e-M01R07**), num total das sete de energia de interação mínima, parcialmente sobreponíveis ao STI-575, as quais ocupam região mais externa ao sítio ativo (**47e-M01R05**) (Figura 37).

Entretanto, nenhuma interação adicional foi observada para o oxigênio da carbonila cetônica, conforme observado em análise de corte em torno de 5 Å (o qual englobou os resíduos Glu286, Met290 e Asp381) ao redor do respectivo átomo, nas conformações de energia de interação mínima (exceto **47e-M01R05**). Nota-se a possibilidade da formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o oxigênio da carbonila cetônica e o hidrogênio da amida (distância de 2,15 Å e

105,84° para **47d-R01M01**), é o que poderia contribuir para a estabilidade da conformação.

Em relação ao substituinte de **47**, observou-se que, em corte de 5 Å ao redor do respectivo átomo de halogênio (F, Cl e Br), ou do carbono do grupo metila, se encontram os resíduos Leu298, Leu354, His361, Val379, Ala380 e Asp381. Três destes resíduos de contorno compõem o bolso hidrofóbico identificado na estrutura do receptor, proteína código **ID 2HYY**, formado por Ile293, Leu298, Leu354 e Val379. Em adição, foi verificado que a presença de substituinte na posição 3 do anel benzoamídico do imatinibe interage com este sítio hidrofóbico, favorecendo o efeito inibidor (ASAKI *et al.*, 2006). Os substituintes dos compostos da segunda série **47a-e** ocupam a mesma posição no anel metil-ceto-anilina. Como apresentaram conformações sobreponíveis (Tabela 22), pode-se inferir que a contribuição de **47** ao interagir com parte deste sítio hidrofóbico dependerá da natureza intrínseca do átomo substituinte. Maiores semelhanças são reconhecidas entre os pares flúor/hidrogênio e cloro/grupo metil. O bromo se diferencia, por exemplo, em razão do maior raio atômico (H = 0,29; F = 0,64; Cl = 0,99 e Br = 1,14 Å), maior lipofilicidade (π) (H = 0,00; F = 0,14; Cl = 0,71, Br = 0,86 e CH₃ = 0,56) e índice de refratividade molar (H = 1,03; F = 0,92; Cl = 6,03, Br = 8,88 e CH₃ = 5,65) (VERMUTH, 1996). Associa-se a estas características, às menores energias de interação observadas para **47e** bem como à ocorrência das conformações **47e-M01R05** e **47e-M01R07**, que se posicionaram mais externamente ao sítio ativo da proteína.

A presença do grupo *gem*-difluormetila na terceira série de compostos **48a-e**, proporcionou valores de energia próximos para os compostos analisados (X = H, Cl e CH₃), cerca de menos de 1,5 kcal/mol (TROTT *et al.*, 2010), assim como ao valor observado para o reancoramento do imatinibe (Tabela 23).

Entretanto, observa-se que estas conformações se orientam distintamente no sítio ativo da proteína (Figura 38A). As conformações **48a-M01R04**, **48d-M01R02** e **48b-M01R01**, que são sobreponíveis entre si, se sobrepõem até a região do grupo da amida do STI-575, em semelhança aos compostos **47a-e**. Interações com resíduos comuns ao STI-575 são observadas como com a Met318 e Thr315, bem como interações dipolo-dipolo entre o hidrogênio amídico do anel metil-ceto-anilina aos

grupos carbonil e carboxilato dos resíduos Glu286 e Asp381 (distâncias de 2,01 a 2,61 Å). Nova interação surge entre o grupo amida da metil-ceto-anilina com o grupo carboxilato do resíduo Glu286. Num segundo conjunto de conformações, igualmente sobreponíveis entre si, exemplificado por **48a-M01R01**, **48d-M01R01** e **48b-M01R02**, se observa menor sobreposição ao STI-575. Contudo, são mantidas interações comuns a este último, como a interação hidrofóbica do anel piridínico do sistema FAP com o resíduo Phe382, ligação de hidrogênio entre o grupo amina e o oxigênio *alfa*-carbonílico do Asp381 e entre o grupo amida da metil-ceto-anilina com o grupo carboxilato do resíduo Glu286 (Figura 38B).

Tabela 23. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, e indicação do comportamento da sobreposição das conformações do reancoramento do imatinibe e dos compostos da terceira série **48a-e** na proteína código PDB ID 2HYY.

Composto	Energia de interação (kcal/mol)	Número do modelo (M) e número da corrida (R) correspondente	Sobreposição das conformações
Imatinibe reancorado	-12,7	M01R01	M01 de R01 a R07
48a	-11,1	M01R01	M01 de R01 a R03 e R05
	-12,0	M01R04	M01 de R04, R06 e R07
48d	-10,2	M01R01	M01 de R01, R06 e R07
	-11,5	M01R02	M01 de R02 a R05
48b	-11,6	M01R01	M01 de R01, R03 a R07
	-10,2	M01R02	M01 de R02

Quando realizadas análises de corte em torno de 5 Å ao redor dos átomos de flúor do grupo *gem*-difluormetil das conformações com maior grau de sobreposição ao STI-575, como por exemplo, **48a-M01R04**, **48d-M01R02** e **48b-M01R01**, verifica-se a presença dos resíduos Glu286, Asp381, Phe382 e Met290. Dado o posicionamento dos átomos de flúor em relação a estes resíduos, apenas interações hidrofóbicas são observadas. Destaca-se, entretanto, a possibilidade de ligação de hidrogênio intramolecular entre os átomos de flúor e o átomo de

hidrogênio ligado ao nitrogênio benzoamídico (distância/ângulo de 2,39 Å/102,19°) e, uma segunda, entre o hidrogênio amídico presente no grupo da metil-ceto-anilina e o átomo de flúor mais próximo (distância/ângulo de 3,07 Å/101,87°) para **48b-M01R01**. Estas interações poderiam orientar as respectivas conformações, e o modo de ligações destes compostos no sítio ativo da proteína.

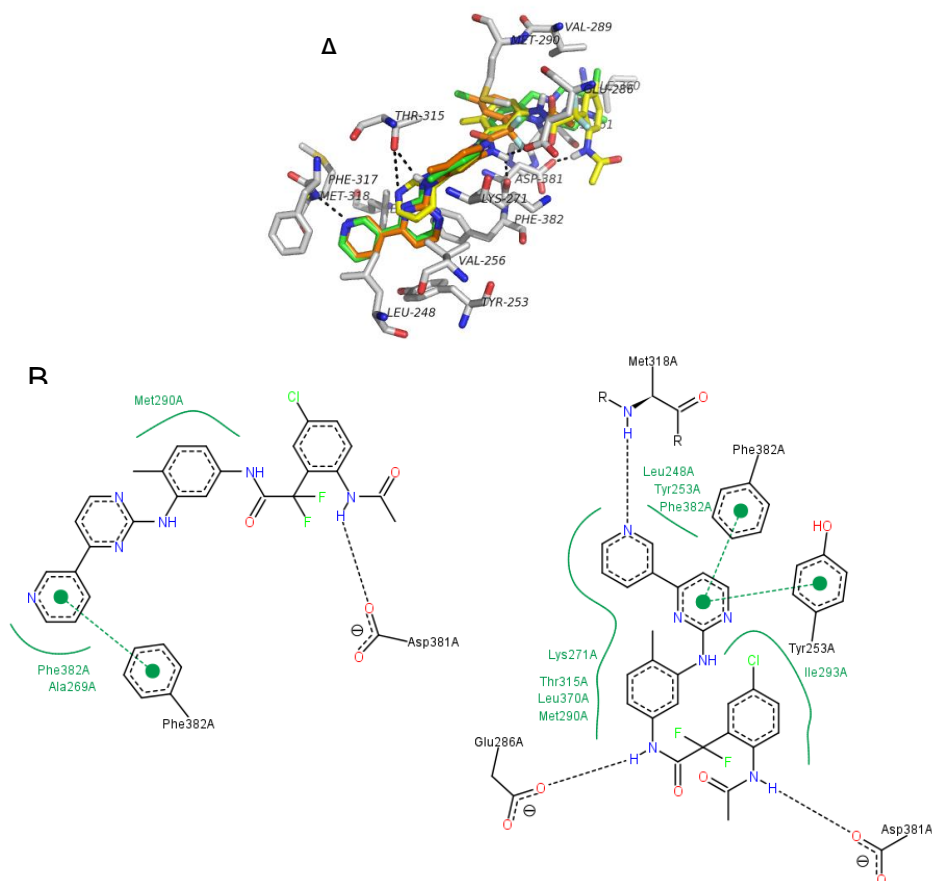


Figura 38. A. Sobreposição atômica do **48d-M01R02** (carbono na cor rosa escuro) e ao **48d-M01R01** (carbono na cor azul claro) ao **STI-575** (carbono na cor verde) no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY (em cinza). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), cloro (verde claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagramas bidimensionais da interação do **48d-M01R02** (à esquerda) e do **48d-M01R01** (à direita) com resíduos do sítio ativo da proteína.

O corte de 5 Å ao redor do átomo de carbono do grupo CH₃ para **48b-M01R01** e **48b-M01R02** apresentou os mesmos resíduos de contato (Glu286, Asp381, Phe382 e Met290) que para os átomos de flúor. E, igualmente, apenas interações hidrofóbicas são observadas, em especial para **48b-M01R01**, uma vez que o grupo metila de **48b-M01R02** encontra-se orientado externamente ao sítio ativo da proteína (Figura 38). Os mesmos resíduos são observados contornando o átomo de cloro. Ressalta-se, entretanto, que embora presentes na mesma posição do anel metil-ceto anilina, os substituintes da terceira série **48a-e** não ocupam parte do sítio hidrofóbico da proteína como ocorreu para os análogos carbonilados **47a-e**.

Destaca-se que, em contrário ao observado para os compostos **47a-e**, a substituição do grupo benzamido e anel piperazínico do STI-575 pelo grupo *gem*-difluormetil como espaçador e do grupo metil-ceto-anilina foi menos promissora. Menor número de conformações sobrepostas ao STI-575 foram observadas, em adição à ocorrência de dois conjuntos de conformações.

5.4.2. Estudo de Ancoramento Molecular na Proteína PDB ID 3G0E

Os valores de energia de interação e informações sobre a análise de reancoramento da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe em relação ao ligante co-cristalizado B49, e o comportamento do ancoramento molecular dos compostos da primeira série **46a-e** na proteína código PDB ID 3G0E, encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24. Energia de interação, com o modelo e corrida correspondentes, e indicação do comportamento de sobreposição das conformações do reancoramento da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe e dos compostos **46a-e** na proteína código PDB ID 3G0E.

Composto	Energia de interação (kcal/mol)	Número do modelo (M) e número da corrida (R) correspondente	Superposição das conformações
Sunitinibe	-10,1	M01R01	M01 de R01 a R07

Reancorado*			
E-46a	-10,5	M01R01	M01 de R01 a R07
Z-46a	-9,8	M01R01	M01 a M05 de R01 a R07
E-46b	-10,4	M01R01	M01 a M03 de R01 a R07
Z-46b	-9,5	M01R01	M01 de R01 a R07
E-46d	-10,4	M01R01	M01 a M03 de R01 a R03
Z-46d	-9,5	M01R01	M01 de R01 a R07

* molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe.

O reancoramento da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe na proteína código PDB ID 3G0E mostrou excelente sobreposição ao ligante co-cristalizado (B49) (Figura 39A). O valor calculado de RMSD foi igual a 1,112 Å. A sobreposição dos primeiros modelos (M01) nas sete corridas realizadas (R01 a R07), corroborou o emprego do programa Autodock Vina e parâmetros escolhidos para a realização do estudo de ancoramento molecular.

A análise no sítio ativo da proteína código PDB ID 3G0E mostra que a molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe quando reancorada, realiza interações dipolo-dipolo e hidrofóbicas com resíduos da proteína, conforme determinado para ligante co-cristalizado B49. Ligações de hidrogênio são observadas entre o grupo amino e oxigênio do anel da isatina com o resíduo Glu671 e resíduo Cys673, em distâncias próximas às determinadas para o B49, a saber, 2,90 e 3,25 Å em comparação a 2,74 e 2,98 Å, respectivamente. Outras interações hidrofóbicas são observadas com resíduos como Gly676, Tyr672, Leu799 e Phe811, em distâncias variáveis entre 3,40 e 4,40 Å, semelhantes àquelas para o ligante co-cristalizado. Algumas destas interações são apresentadas no diagrama bidimensional da Figura 39B da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe, o qual é idêntico ao obtido para o B49.

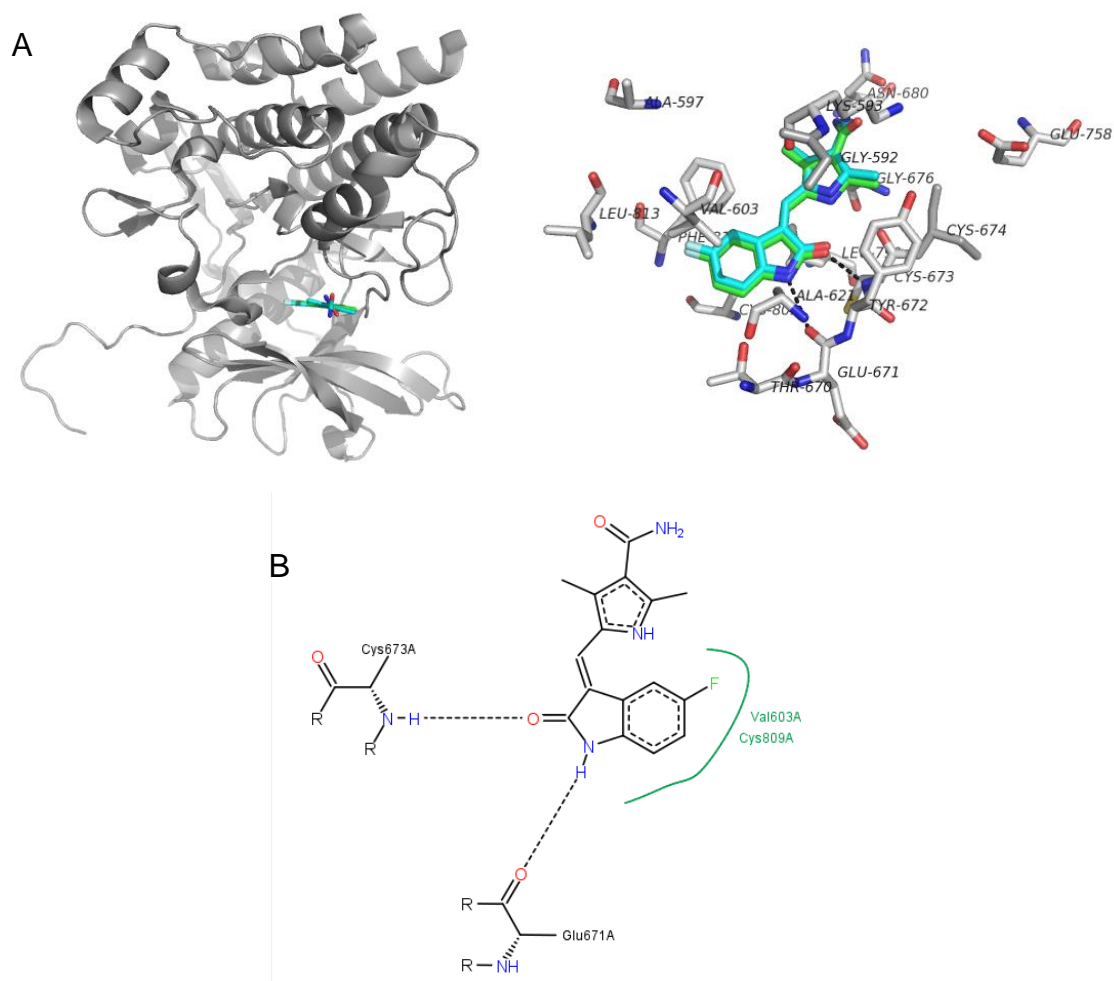


Figura 39. A. Representação do ligante co-cristalizado B49 (carbono na cor verde) e da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe reancorada (carbono na cor azul ciano) no sítio ativo da proteína código PDB ID 3G0E (em cinza) (à esquerda). A sobreposição atômica da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe reancorada ao B49 (à direita). Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), flúor (azul claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagrama bidimensional ilustrativo da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe reancorada com resíduos do sítio ativo da proteína.

Os isômeros *E* e *Z* dos compostos **46a-e** apresentam energias de interação semelhantes (inferiores a 2,5 kcal/mol) (TROTT *et al.*, 2010), sendo esta característica comum aos três compostos em avaliação (X = Cl, CH₃ e H). Estes

valores também se encontram próximos ao observado no reancoramento da molécula resultante da hidrólise metabólica do sunitinibe. Contudo, a análise no sítio de ancoramento do B49 mostra que os compostos **46a-e** se sobrepõem à estrutura co-cristalizada, mas não é o anel indolin-2-ona que se sobrepõe ao anel da isatina de B49, mas sim o sistema FAP (Figura 40A).

Em razão desta inversão de orientação, novas interações dipolo-dipolo ocorrem entre o nitrogênio pirimidínico e o grupo *alfa*-amino da Cys673 e entre o oxigênio da carbonila e grupo amino do anel indolin-2-ona com os resíduos Lys593 e Glu758, respectivamente, para os isômeros **E-46**; e, com a Asn680 para o grupo amino do anel indolin-2-ona nos correspondentes **Z-46** derivados (Figura 40B). Interações hidrofóbicas estão presentes com resíduos comuns à interação do B49, como Leu595, Val603, Cys809 e Phe811. Este comportamento conformacional é observado para maioria dos modelos, como pode ser verificado na Tabela 24.

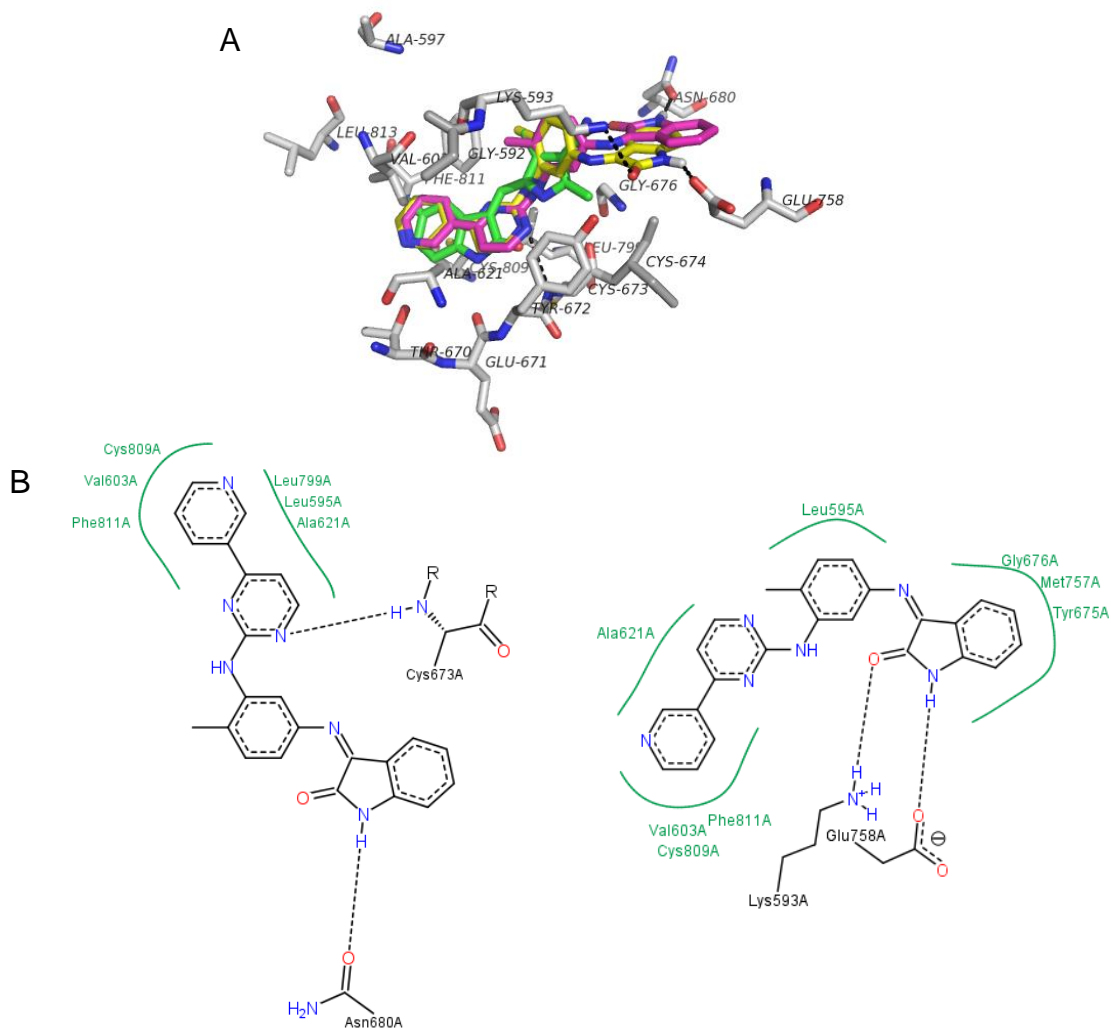


Figura 40. A. Sobreposição atômica do **Z-46a** (carbono na cor magenta) e **E-46a** (carbono na cor amarela) ao B49 (carbono na cor verde) no sítio ativo da proteína código PDB ID 3G0E. Demais átomos nas cores: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul escuro), hidrogênio polar (branco), flúor (azul claro) e enxofre (amarelo). **B.** Diagramas bidimensionais da interação do **Z-46a** (à esquerda) e do **E-46a** (à direita) com resíduos do sítio ativo da proteína.

A orientação inversa adotada pelos compostos **46a-e** em relação ao sunitinibe, com ressalva da igual inversão na sobreposição do anel indolin-2-ona de **Z-46a**, **Z-46d** e **Z-46b** ao sistema FAP do STI-575 no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY, pode ser relacionada à atividade inibitória do imatinibe, em semelhança ao sunitinibe, em receptores do domínio tirosina quinase do tipo KIT

(RTK-KIT) e PDGFRs, os quais são responsáveis por causar tumor no estroma gastrointestinal (GAJIWALA *et al.*, 2009). Estudos de cristalografia de raios-X demonstraram a sobreposição do anel isatina do sunitinibe, ao sistema FAP do imatinibe no sítio de ligação do receptor (RTK)-KIT, em que se observam interações do imatinibe com os resíduos Val654 e Thr670 (MOL *et al.*, 2003). Entretanto, como o sunitinibe não realiza interação forte com o resíduo Thr670, como faz o imatinibe em células selvagem (WT KIT), o sunitinibe continua a manter atividade em cepas em que houve a mutação da treonina por isoleucina (T670I), ao contrário do observado para o imatinibe (GAJIWALA *et al.*, 2009). Comportamento semelhante quanto a inversão da orientação foi observado para os compostos da segunda e terceira séries, em que o sistema FAP correspondente se sobrepõe ao anel da isatina de B49.

5.4.3. Conclusões do Estudo de Ancoramento Molecular

As melhores conformações dos compostos avaliados das três séries, com especial atenção àquelas conformações de menor energia de interação, e geradas nos primeiros modelos de corridas, preferencialmente (M01R01), apresentam interações com resíduos comuns aos ligantes co-cristalizados STI-575 e B49 nos sítios ativos de ambas as enzimas, o que permitiria sugerir serem estes compostos capazes de inibi-las. Entretanto, cada série mostrou particularidades:

a) A maior semelhança estrutural entre os compostos das segunda e terceira séries ao imatinibe, conduziu à sobreposições em igual orientação e maior extensão de área em relação à estrutura do STI-575 (especialmente para os compostos **47a-e**), no sítio ativo da proteína de código PDB ID 2HYY. Interações com a maioria dos resíduos considerados importantes para o STI-575, ligaram-se à conformação inativa da proteína e exerceram seu efeito inibidor. Destaca-se ainda que, quando o bromo é o átomo substituinte (**47e**) observaram-se menores energias de, e maiores variações conformacionais, com menor semelhança ao comportamento do ligante co-cristalizado STI-575;

b) Os compostos **46a-e** mostraram comportamento distinto ao se ancorarem no sítio ativo da proteína código PDB ID 2HYY. Os isômeros *Z* se sobrepuseram em

considerável extensão, porém com orientação inversa ao STI-575. O anel indolin-2-ona se sobrepôs ao sistema FAP do STI-575. Interações polares e hidrofóbicas foram mantidas com resíduos do sítio ativo. Os isômeros *E*, se sobrepuseram muito parcialmente ao STI-575, e em partes distintas do ligante co-cristalizado. Estes passaram a ocupar outras regiões da enzima;

c) O ancoramento molecular dos compostos em estudo no sítio catalítico da proteína código PDB ID 3G0E se deu de forma semelhante ao observado para os isômeros *Z* da primeira série. Desta vez, observou-se a sobreposição da parte do sistema FAP ao anel isatina do B49. Entretanto, surgem novas interações com resíduos comuns do sítio ativo proteína código PDB ID 3G0E, como com a cisteína 673A, lisina 593A e glutamato 758A;

d) A sobreposição observada do anel indolin-2-ona presente nos compostos **46a-e**, e, em especial dos isômeros *Z*, de conformações mais estendidas quando comparados aos isômeros *E*, à parte do sistema FAP do STI-575 (proteína código PDB ID 2HYY), é inversamente a sobreposição do sistema FAP dos compostos das séries em estudo ao anel isatina do B49 (proteína código PDB ID 3G0E), indicando serem estas regiões indolin-2-ona (Série **46**, *Z*) e FAP (STI-575) e FAP (Séries **46**, **47** e **48**) e anel isatina (B49) de maior semelhança quanto às características moleculares como, por exemplo, distribuição eletrônica e hidrofobicidade;

e) A esta similaridade físico-química se associam os valores de energia de interação próximos (inferiores a 2,5 kcal/mol) (TROTT *et al.*, 2010) entre os compostos propostos, e os calculados na análise reancoramento dos ligantes co-cristalizados;

f) O conjunto destes resultados indica que, teoricamente, os compostos propostos podem agir com os alvos moleculares dos dois fármacos que lhe deram origem.

Atenta-se que neste estudo não foram consideradas as moléculas de água co-cristalizadas HOH37, HOH87, E HOH146 presentes da cadeia A, em razão destas não estarem presentes nas mesmas posições em relação à molécula do STI-575, em todas as cadeias da proteína de código PDB ID 2HYY. Entretanto, análises preliminares considerando estas moléculas de água apontam energias de interação e conformações semelhantes às descritas neste texto.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através de um planejamento racional, utilizando a ferramenta da Química Medicinal conhecida como hibridação molecular, três séries inéditas, contendo 15 moléculas inéditas, foram idealizadas, sintetizadas, caracterizadas e testadas quanto a sua atividade frente às células da linhagem K562.

Em relação a série das iminas **46a-e**, a metodologia se mostrou eficiente para a obtenção do produto, no entanto, o mesmo foi adquirido na forma de isômeros, sendo necessário desenvolver métodos de separação dos mesmos.

Para as séries **47a-e** e **48a-e**, a rota sintética mostrou-se eficiente e os produtos foram obtidos em bons rendimentos e com alto grau de pureza.

As avaliações biológicas evidenciaram a importância do grupo amida, presente no imatinibe, uma vez que na série das iminas **46a-e**, a ausência deste grupo resultou em total perda da atividade. Outro fator importante, observado através das análises de REA, foi a natureza do grupo espaçador utilizado entre a amida e o anel aromático nas séries **47a-e** e **48a-e**. O uso da carbonila cetônica como espaçador forneceram produtos muito ativos **47a-e**, quando comparados ao grupo CF₂ **48a-e**.

Os estudos teóricos de ancoramento molecular permitiram concluir que todos os compostos avaliados apresentam interações comuns aos ligantes co-cristalizados (STI). Para a primeira série **46a-e**, avaliadas também com o padrão sunitinibe, é proposto que podem agir com bons resultados no mesmo alvo deste fármaco.

Por fim, como perspectivas, obter os resultados da cristalografia de raios-X para os compostos da primeira série **46a-e**, com objetivo de definir qual é a conformação predominante nos isômeros. Espera-se também realizar as avaliações biológicas na enzima tirosina quinase dos derivados **47a-e** e com base nesses dados planejar novos compostos.

Sabendo-se que o FAP é uma unidade estrutural importante em moléculas com atividade anticancerígenas, pretende-se fazer a triagem dos produtos obtidos

46-48a-e para ensaios antiproliferativos, em diferentes linhagens de células tumorais.

No momento, um artigo de revisão baseado na evolução do tratamento da LMC e o uso dos ITK, assim como as suas sínteses, encontra-se submetido; e um outro com os resultados dessa dissertação será elaborado.

7. EXPERIMENTAL

7.1. Solventes e reagentes

Os reagentes utilizados foram na maioria dos casos adquiridos da Sigma-Aldrich Co, e usados sem purificação prévia.

Os solventes utilizados foram adquiridos na Tedia e Vetec, e secos conforme as técnicas descritas e apropriadas para cada tipo de solvente, sendo estocados sob atmosfera de nitrogênio.

7.2. Instrumentação

As análises foram monitoradas por cromatografia em camada fina (CCF), utilizando cromatofolhas de sílica gel suportadas em alumínio de Kieselgel 60 F₂₅₄ da marca Merck, com indicador na região do ultravioleta (UV) (254 e 366 nm).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada utilizando o cromatógrafo da marca Agilent modelo 6890 com módulo de massas Agilent modelo 5973 à 70 eV. Os valores das fragmentações e íon molecular estão expressos em relação massa/carga (m/z). A coluna usada foi Agilent 122-5532 DB-5MS (5% difenil: 95% dimetilpolisiloxano). As corridas foram realizadas utilizando a rampa de temperatura de 50°C a 350°C.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Büchi B-545 e os valores não foram corrigidos.

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos por ionização por *eletrospray* (EM-IES) em um aparelho Micromass ZQ4000. O íon molecular foi descrito com relação entre a unidade de massa atômica e a carga do mesmo (m/z) e a abundância relativa foi expressa em percentagem.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro da marca ThermoScientific, modelo Nicolet 6700. Os valores das

absorções foram referidos em número de onda, utilizando-se como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}).

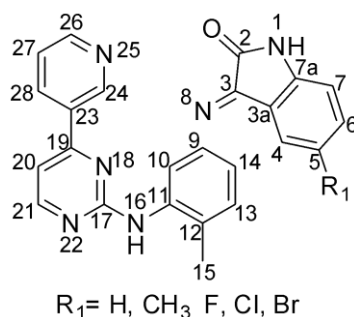
Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Bruker HC a 400,00 MHz para hidrogênio; 100,00 MHz para carbono e 376,00 MHz para flúor. O trimetilsilano (TMS) foi utilizado como padrão referencial interno para hidrogênio e carbono (0 ppm). Os deslocamentos químicos foram referidos em unidades adimensionais (δ), representando partes por milhão (ppm). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas da seguinte forma: s - simpleto, d – duplete, dd – duplo duplete, dt – duplo tripleto, t – tripleto, m – multiplete.

Os espectros de massa de alta resolução (EMAR) foram registrados usando um espectrômetro de massas por ionização *eletrospray* (EM-IES) em um aparelho Maxis 3G.

As análises de CLAE analítica foram obtidas em um aparelho Shimadzu (VP) com bombas modelo LC-10AD, degaseificador DGU-12A, detector por arranjo de fotodiodos (DAD) modelo SPD-M10A. As aquisições de dados e controle foram realizadas utilizando o software Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2. As corridas cromatográficas foram acompanhadas a 190-800 nm. Nas análises, a fase móvel utilizou como eluente (A) metanol: água (1:2) e eluente (B) acetonitrila, com eluição isocrática por 45 min de 25% de (B); o fluxo da fase móvel foi de 1,7 mL/min e o volume injetado foi de 20 μL . A separação foi obtida em coluna Shimpack MRC-C8, 250 mm x 6 mm, com diâmetro de partícula de 5 μm .

7.3. Obtenção dos Produtos Finais 46a-e

Em um balão monotubulado de 100 mL, acoplado com condensador de refluxo, dean-stark e agitador mecânico, foram adicionados 1 mmol das isatina correspondentes **13a-e**, 1 mmol de FAPP, em 50 mL de tolueno. O meio reacional foi mantido sob refluxo, por 24 horas. O término da reação foi evidenciado por CCF, e em seguida, o meio foi resfriado à temperatura ambiente. Ocorreu a formação de sólido, e este foi filtrado por filtração simples e lavado com tolueno gelado.



7.3.1. 3-(4-metil-3-(4-(piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)fenilimino)indolin-2-ona (46a)

Rendimento: 96%

Ponto de fusão: 184-185 °C

EM-IES ([M-1]⁺, *m/z*, %): 405 (100)

IV (cm⁻¹): 3444 (N-H); 3068 (C-H *sp*²); 1727 (C=O); 1614 (C=N); 832; 795; 755 (anel aromático).

RMN de ¹H (400 MHz; DMSO, δ, ppm): 2,32 (s, 3H, H-15); 6,73 (m, 3H, H-4, H-6, H-7); 6,90 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H, H-5); 7,27 (d, *J*= 1,8 Hz, 1H, H-10); 7,35 (m, 3H, H-13, H-14, H-27); 7,42 (d, *J*= 5,1 Hz, 1H, H-20); 8,31 (dt, *J*= 1,8 e 8,0 Hz, 1H, H-28); 8,49 (d, *J*= 5,2 Hz, 1H, H-21); 8,65 (dd, *J*= 1,4 e 4,7 Hz, 1H, H-26); 8,99 (s, 1H, H-16); 9,21 (d, *J*= 1,7 Hz, 1H, H-24); 10,96 (s, 1H, H-1)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,59 (CH_3 , C-15); 107,65 (C-20); 111,30 (C-7); 113,52 (C-10); 113,72 (C-3a); 115,64 (C-5); 121,55 (C-14); 123,55 (C-27); 125,64 (C-4); 128,47 (C-12); 131,16 (C-13); 131,99 (C-6); 133,99 (C-23); 134,25 (C-28); 138,72 (C-11); 146,82 (C-7a); 147,95 (C-9); 148,26 (C-3); 151,29 (C-24); 154,74 (C-19); 159,34 (C-26); 160,98 (C-17); 161,41 (C-21); 163,52 (C-2)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}$): 406,1542

Valor obtido: 406,1540

CLAE (% , nm): 97 (261)

7.3.2. 5-metil-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)indolin-2-ona (46b)

Rendimento: 62%

Ponto de fusão: 195-197 °C

EM-IES ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z , %): 443 (100)

IV (cm^{-1}): 2984 (C-H sp^2); 1727 (C=C); 1616 (C=N); 798; 749; 705 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 1,88 (s, 3H, 5- CH_3); 2,31 (s, 3H, H-15); 6,55 (s, 1H, H-4); 6,73 (dd, $J= 2,1$ e 7,8 Hz, 1H, H-6); 6,78 (d, $J= 8$ Hz, 1H, H-7); 7,13 (dd, $J= 1,0$ e 8,0 Hz, 1H, H-13); 7,22 (d, $J= 2,0$ Hz, 1H, H-27); 7,35 (d, $J= 8,1$ Hz, 1H, H-14); 7,39 (m, 2H, H-20 e H-10); 8,31 (dt, $J= 1,9$ e 8,0 Hz, 1H, H-28); 8,48 (d, $J= 5,1$ Hz, 1H, H-21); 8,65 (dd, $J= 1,6$ e 4,7 Hz, 1H, H-26); 9,05 (s, 1H, H-16); 9,21 (d, $J= 1,6$ Hz, 1H, H-24); 10,85 (s, 1H, H-1)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,67 (CH_3 , C-15); 20,29 (CH_3 -C-5); 107,64 (C-20); 111,07 (C-7); 113,66 (C-10); 113,73 (C-3a); 115,62 (C-5); 123,54 (C-14); 126,00 (C-27); 128,70 (C-4); 130,30 (C-12); 131,13 (C-13); 132,00 (C-6); 134,00 (C-23); 134,60 (C-28); 138,64 (C-11); 144,55 (C-7a); 147,93 (C-9); 148,13

(C-3); 151,27 (C-24); 154,81 (C-19); 159,31 (C-26); 160,94 (C-17); 161,45 (C-21);
163,61 (C-2)

EMAR

Valor teórico(C₂₅H₂₀N₆O): 420,1699

Valor obtido: 420,1702

CLAE (% , nm): 88 (261)

7.3.3. 5-fluor-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)indolin-2-ona (46c)

Rendimento: 68%

Ponto de fusão: 237-239 °C

EM-IES ([M-1]⁺, m/z, %): 423 (100)

IV (cm⁻¹): 3452; 3256 (N-H); 2853 (CH₃); 1739 (C=O); 1620 (C=N); 867; 822; 784
(anel aromático)

RMN de ¹H (400 MHz; DMSO, δ, ppm): 2,32 (s, 3H, H-15); 6,52 (dd, J= 2,4 e 8,5 Hz, H-4); 6,75 (dd, J= 2,1 e 7,9 Hz, 1H, H-10); 6,89 (dd, J= 4,3 e 8,6 Hz, 1H, H-7); 7,20 (td, J= 2,5 e 8,9 Hz, 1H, H-6); 7,27 (d, J= 1,8 Hz, 1H, H-27); 7,37 (m, 3H, H-13, H-14 e H-20); 8,31 (dt, J= 1,8 e 8,0 Hz, 1H, H-28); 8,44 (d, J= 5,1 Hz, 1H, H-21); 8,64 (dd, J= 1,1 e 4,6 Hz, 1H, H-26); 9,05 (s, 1H, H-16); 9,20 (d, J= 1,6 Hz, 1H, H-24); 10,99 (s, 1H, H-1)

RMN de ¹³C (100 MHz; DMSO, δ, ppm): 17,72 (CH₃, C-15); 107,86 (C-20) 112,43 (d, J= 12,8 Hz, C-7); 112,52 (d, J= 20,4 Hz, C-4); 113,88 (C-10); 113,97 (C-27); 116,07 (d, J= 8,0 Hz, C-3a); 120,76 (d, J= 23,6 Hz, C-6) 123,63 (C-14); 129,10 (C-12); 131,37 (C-13); 132,07 (C-23); 134,09 (C-28); 138,76 (C-11); 143,28 (d, J= 1,1 Hz, C-7a); 147,69 (C-9); 148,06 (C-19); 151,37 (C-24); 154,33 (d, J= 2,3 Hz, C-3); 156,87 (d, J= 236,05 Hz, C-5); 159,27 (C-26); 161,07 (C-17); 161,66 (C-21); 163,67 (C-2)

RMN de ¹⁹F (376 MHz; DMSO, δ, ppm): -121,15 (Ar-F)

EMAR

Valor teórico (C₂₄H₁₇FN₆O): 424,1448

Valor obtido: 424,1447

CLAE (% , nm): 96 (261)

7.3.4. 5-cloro-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)indolin-2-ona (46d)

Rendimento: 75%

Ponto de fusão: 247-248 °C

EM-IES ([M -1]⁺, m/z, %): 439 (100)

IV (cm⁻¹): 3449 (N-H); 3115 (C-H *sp*²); 1740 (C=O); 1623 (C=N); 819; 792; 747 (anel aromático)

RMN de ¹H (400 MHz; DMSO, δ, ppm): 2,34 (s, 3H, H-15); 6,73 (d, *J*= 2,0 Hz, 1H, H-4); 6,76 (dd, *J*= 7,9 e 2,0 Hz, 1H, H-7); 6,92 (d, *J*= 8,4 Hz, 1H, H-6); 7,31 (d, *J*= 1,9 Hz, 1H, H-10); 7,39 (m, 4H, H-13, H-14, H-20 e H-27); 8,32 (dt, *J*= 8,0 e 1,8 Hz, 1H, H-28); 8,49 (d, *J*= 5,1 Hz, 1H, H-21); 8,65 (dd, *J*= 4,6 e 1,2 Hz, 1H, H-26); 9,07 (s, 1H, H-16); 9,22 (d, *J*= 1,4 Hz, 1H, H-24); 11,12 (s, 1H, H-1)

RMN de ¹³C (100 MHz; DMSO, δ, ppm): 17,79 (CH₃, C-15); 107,90 (C-20); 112,99 (C-7); 113,58 (C-10); 113,66 (C-3a); 116,86 (C-5); 123,63 (C-14); 125,15 (C-27); 125,40 (C-4); 128,98 (C-12); 131,35 (C-13); 132,11 (C-6); 133,70 (C-23); 134,14 (C-28); 138,84 (C-11); 145,67 (C-7a); 147,75 (C-9); 148,09 (C-3); 151,36 (C-24); 153,83 (C-19); 159,40 (C-26); 161,00 (C-17); 161,66 (C-21); 163,36 (C-2)

EMAR

Valor teórico (C₂₄H₁₇ClN₆O): 440,1152

Valor obtido: 440,1173

CLAE (% , nm): 98 (261)

7.3.5. 5-bromo-3-((4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)imino)indolin-2-ona (46e)

Rendimento: 77%

Ponto de fusão: 163-164 °C

EM-IES ($[M+Na]^+$, m/z , %): 508 (99); 506 (100)

IV (cm^{-1}): 3450; 3223 (N-H); 3115 (C-H sp^2); 1741 (C=O); 1606 (C=N) 817; 787; 740 (anel aromático)

RMN de 1H (500 MHz; DMSO, δ , ppm): 2,32 (s, 3H, H-15); 6,73 (d, $J= 6,3$ Hz, 1H, H-4); 6,85 (m, 2H, H-6 e H-7); 7,30 (s, 1H, H-10); 7,39 (m, 3H, H-13, H-14 e H-20); 7,48 (d, $J= 8,4$ Hz, 1H, H-27); 8,32 (d, $J= 7,8$ Hz, 1H, H-28); 8,49 (d, $J= 4,9$ Hz, 1H, H-21); 8,64 (d, $J= 2,9$ Hz, 1H, H-26); 9,05 (s, 1H, H-16); 9,21 (s, 1H, H-24); 11,11 (s, 1H, H-1)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,79 (CH_3 , C-15); 107,90 (C-20); 113,04 (C-7); 113,45 (C-10); 117,34 (C-3a); 123,61 (C-5); 125,30 (C-14); 127,92 (C-27); 128,16 (C-4); 128,88 (C-12); 131,29 (C-13); 132,11 (C-6); 134,13 (C-23); 134,46 (C-28); 138,82 (C-11); 146,01 (C-7a); 147,72 (C-9); 148,09 (C-3); 151,34 (C-24); 153,67 (C-19); 159,42 (C-26); 160,96 (C-17); 161,65 (C-21); 163,18 (C-2)

EMAR

Valor teórico ($C_{24}H_{17}BrN_6O$): 484,0647

Valor obtido: 484,0634

CLAE (% , nm): 89 (261)

7.4. Obtenção de N-acetilisatinas (50a-e)

Em um balão ditubulado acoplado a um condensador de refluxo, foram adicionados os derivados isatóicos **50a-e** (1 mol) e 20 mols de anidrido acético,

previamente destilado. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em refluxo, de 2 à 4 horas, até a reação se completar. O término da reação foi evidenciado por CCF. A mistura reacional foi resfriada em freezer por duas horas, e após este período o precipitado foi filtrado a vácuo, lavado com hexano e seco à temperatura ambiente. Os sólidos foram recristalizados com hexano e acetato de etila (1:1).

Os derivados foram caracterizados por CG-EM e ponto de fusão (BOECHAT, 1996; JAMES *et al.*, 1989; TOMCHIN *et al.*, 1986).

7.4.1. 1-acetilisatina (50a)

Rendimento: 82%

Ponto de fusão: 139-140 °C (Lit. 143 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 189 (14); 147 (23); 146 (100); 119 (6); 90 (23)

7.4.2. 1-acetil-5-metilisatina (50b)

Rendimento: 89%

Ponto de fusão: 173-174 °C (Lit. 173 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 203 (17); 161 (51); 160 (100); 133 (20); 104 (26)

7.4.3. 1-acetil-5-fluorisatina (50c)

Rendimento: 72%

Ponto de fusão: 148-150 °C (Lit. 149 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 207 (14); 165 (50); 164(100); 137 (16); 108 (64)

7.4.4. 1-acetil-5-cloroisatina (50d)

Rendimento: 87%

Ponto de fusão: 242-243 °C (Lit. 245 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 223 (9); 182 (35); 181 (53); 180 (100); 153 (19); 124 (41)

7.4.5. 1-acetil-bromoisatina (50e)

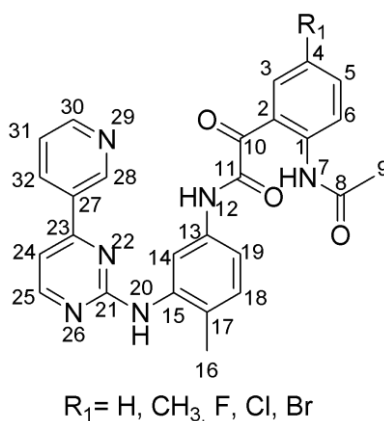
Rendimento: 85%

Ponto de fusão: 169-170 °C (Lit. 173 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 268 (22); 267 (22); 227 (64); 226 (100); 225 (64); 224 (100); 170 (33)

7.5. Obtenção dos Produtos Finais 47a-e

Em um balão monotubulado 100 mL, foram adicionados 1 mmol das *N*-acetilisatinas correspondentes **50a-e**, 1 mmol de FAPP em 50 mL de acetonitrila. O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente, sob agitação mecânica, por 24 horas. O término da reação foi evidenciado por CCF, e o produto foi precipitado no meio. O sólido foi isolado por filtração simples e lavado com acetonitrila gelada.



7.5.1. 2-(2-acetamidafenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47a)

Rendimento: 58%

Ponto de fusão: 211-214 °C

EM-IES ($[M+1]^+$, m/z , %): 465 (100)

IV (cm^{-1}): 3246 (N-H); 3061 (C-H sp^2); 2249 (CH_3); 1691; 1670 (C=O); 875; 821; 763 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 2,03 (s, 3H, H-9); 2,24 (s, 3H, H-16); 8,15 (s, 3H, H-19); 7,23 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H-18); 7,28 (td, $J=1,0$ e 7,7 Hz, 1H, H-4); 7,44 (d, $J=5,12$ Hz, 1H, H-14); 7,51 (dd, $J=4,7$ e 7,9 Hz, 1H, H-31); 7,79 (m, 1H, H-6); 7,64 (d, $J=1,4$ e 7,8 Hz, 1H, H-5); 7,72 (d, $J=7,7$ Hz, 1H, H-3); 8,46 (dt, $J=2,0$ e 7,9 Hz, 1H, H-32); 8,52 (d, $J=5,16$ Hz, 1H, H-25); 8,70 (dd, $J=1,4$ e 4,7 Hz, 1H, H-30); 9,00 (s, 1H, H-20); 9,29 (d, $J=1,7$ Hz, 1H, H-28); 10,64 (s, 1H, H-7); 10,69 (s, 1H, H-12)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,69 (C-16); 23,82 (C-9); 107,65 (C-24); 116,30 (C-14); 116,64 (C-19); 121,79 (C-6); 123,79 (C-2); 123,81 (C-31); 124,51 (C-4); 128,18 (C-17); 130,30 (C-18); 131,41 (C-3); 132,19 (C-27); 134,03 (C-5); 134,47 (C-1); 135,90 (C-32); 137,99 (C-13); 138,26 (C-15); 148,19 (C-28); 151,36 (C-30); 159,52 (C-25); 161,05 (C-23); 161,57 (C-11); 161,76 (C-21); 168,95 (C-8); 190,23 (C-10)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_3$): 466,1753

Valor obtido: 446,1754

CLAE (% , nm): 100 (261)

7.5.2. 2-(2-acetamida-5-metilfenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47b)

Rendimento: 51%

Ponto de fusão: 226-228 °C

EM-IES ($[M+1]^+$, m/z , %): 479 (100)

IV (cm^{-1}): 3242 (N-H); 3066 (C-H sp^2); 1687; 1670 (C=O); 827; 800; 787 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 2,00 (s, 3H, H-9); 2,24 (s, 3H, H-16); 2,31 (CH_3 , C-4); 7,23 (d, $J= 8,3$ Hz, 1H, H-18); 7,44 (m, 3H, H-31, H-24 e H-14); 7,50 (m, 2H, H-3 e H-5); 7,66 (d, $J= 8,2$ Hz, 1H, H-6); 8,15 (d, $J= 1,6$ Hz, 1H, H-19); 8,46 (dt, $J= 1,4$ e $6,2$ Hz, 1H, H-32); 8,51 (d, $J= 5,1$ Hz, 1H, H-25); 8,70 (dd, $J= 1,4$ e $4,7$ Hz, 1H, H-30); 8,98 (s, 1H, H-20); 9,29 (d, $J= 1,7$ Hz, 1H, H-28); 10,52 (s, 1H, H-7); 10,65 (s, 1H, H-12)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,65 (C-16); 20,16 (C-9); 23,70 (CH_3 , C-4); 107,63 (C-24); 116,29 (C-14); 116,63 (C-19); 122,02 (C-6), 123,76 (C-31); 124,68 (C-4); 128,15 (C-17); 130,26 (C-18); 131,18 (C-27); 132,18 (C-3); 133,03 (C-5); 134,43 (C-1); 134,55 (C-32); 135,91 (C-15); 137,97 (C-13); 148,17 (C-28); 151,30 (C-30); 159,47 (C-25); 161,04 (C-23); 161,56 (C-11); 161,82 (C-21); 168,78 (C-8); 190,31 (C-10)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3$): 480,1910

Valor obtido: 480,1897

CLAE (% , nm): 97 (261)

7.5.3. 2-(2-acetamida-5-fluorfenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47c)

Rendimento: 63%

Ponto de fusão: 231-233 °C

EM-IES ($[M-1]^+$, m/z , %): 483 (100)

IV (cm^{-1}): 3329 (N-H); 3065 (C-H sp^2); 1687; 1669 (C=O); 832; 815; 801; 787 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 1,95 (s, 3H, H-9); 2,24 (s, 3H, H-16); 7,22 (d, $J= 8,2$ Hz, 1H, H-18); 7,43 (d, $J= 5,1$ Hz, 1H, H-24); 7,48 (m, 5H, H-14, H-31, H-6, H-5 e H-3); 8,19 (s, 1H, H-19); 8,47 (d, $J= 7,8$ Hz, 1H, H-32); 8,52 (d, $J= 5,4$ Hz, 1H, H-25); 8,70 (d, $J= 4,1$ Hz, 1H, H-30); 8,99 (s, 1H, H-20); 9,30 (s, 1H, H-28); 10,49 (s, 1H, H-7); 10,62 (s, 1H, H-12)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,59 (CH_3 , C-16); 23,05 (CH_3 , C-9); 107,51 (C-24); 136,17 (d, $J= 23,8$ Hz, C-5); 116,38 (C-14); 116,72 (C-31); 119,66 (d, $J= 22,3$ Hz, C-3); 123,71 (C-19); 124,59 (d, $J= 7,5$ Hz, C-2); 128,06 (C-17); 128,82 (d, $J= 6,5$ Hz, C-6); 130,11 (C-18); 132,11 (C-27); 133,04 (d, $J= 2,3$ Hz, C-1); 134,40 (C-32); 135,87 (C-15); 137,81 (C-13); 148,08 (C-28); 151,27 (C-30); 157,96 (d, $J= 241,1$ Hz, C-4); 159,40 (C-25); 160,32 (C-21); 160,98 (C-11); 161,45 (C-23); 168,74 (C-8); 187,26 (C-10)

RMN de ^{19}F (376 MHz; DMSO, δ , ppm): -118,00 (Ar-F)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_3$): 484,1659

Valor obtido: 484,1656

CLAE (% , nm): 98 (261)

7.5.4. 2-(2-acetamida-5-clorofenil)-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47d)

Rendimento: 54%

Ponto de fusão: 217-218 °C

EM-IES ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z , %): 523 (100)

IV (cm^{-1}): 3442; 3252 (N-H); 3110 (C-H sp^2); 1687; 1672; 1662 (C=O); 829; 818; 797 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 1,97 (s, 3H, H-9); 2,23 (s, 3H, H-16); 7,22 (d, $J= 5,7$ Hz, 1H, H-18); 7,43 (d, $J= 5,1$ Hz, 1H, H-24); 7,50 (m, 3H, H-5, H-31 e H-14); 7,66 (m, 2H, H-3 e H-6); 8,17 (d, $J= 1,1$ Hz, 1H, H-19); 8,47 (dt, $J= 1,8$ e 8,0 Hz,

1H, H-32); 8,51 (d, $J= 5,1$ Hz, 1H, H-25); 8,69 (dd, $J= 1,4$ e $4,7$ Hz, 1H, H-30); 8,97 (s, 1H, H-20); 9,28 (d, $J= 1,7$ Hz, 1H, H-28); 10,55 (s, 1H, H-7); 10,60 (s, 1H, H-12)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,63 (C-16); 23,31 (C-9); 107,58 (24); 116,46 (C-14); 116,79 (C-19); 123,75(C-6); 123,97 (C-31); 127,72 (C-4); 128,16 (C-17); 129,66 (C-18); 130,18 (C-27); 132,17 (C-3); 132,55 (C-5); 134,44 (C-1); 135,67 (C-32); 138,88 (C-15); 137,90 (C-13); 148,13 (C-28); 151,28 (C-30); 159,44 (C-25); 160,23 (C-21); 161,05 (C-11); 161,54 (C-23); 168,84 (C-8); 187,23 (C-10)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{ClN}_6\text{O}_3$): 500,1364

Valor obtido: 500,1362

CLAE (% , nm): 98 (261)

7.5.5. 2-(2-acetamida-5-bromofenil)-N-(4-metil-3-((4-piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)-2-oxoacetamida (47e)

Rendimento: 64%

Ponto de fusão: 211-212 °C

EM-IES ($[\text{M}-1]^+$, m/z , %): 543 (100)

IV (cm^{-1}): 3247; 3110 (N-H); 3071 (C-H sp^2); 1688; 1674; 1662 (C=O); 852; 818; 797 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 1,96 (s, 3H, H-9); 2,23 (s, 3H, H-16); 7,21 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H-18); 7,47 (m, 4H, H-14, H-24, H-32 e H-5); 7,77 (m, 2H, H-6 e H-3); 8,16 (d, $J= 1,6$ Hz, 1H, H-19); 8,46 (dt, $J= 2,0$ e $8,0$ Hz, 1H, H-32); 8,51 (d, $J= 5,2$ Hz, 1H, H-25); 8,69 (dd, $J= 1,6$ e $4,8$ Hz, 1H, H-30); 8,97 (s, 1H, H-20); 9,27 (d, $J= 1,6$ Hz, 1H, H-28); 10,54 (s, 1H, H-7); 10,29 (s, 1H, H-12)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,64 (C-16); 23,34 (C-9); 107,59 (C-24); 115,55 (C-14); 116,47 (C-19); 116,79 (C-6); 123,77 (C-2); 124,20 (C-31); 128,18 (C-17); 128,44 (C-4); 130,19 (C-18); 132,18 (C-27); 132,49 (C-27); 134,45 (C-5); 135,45 (C-1); 135,88 (C-32); 136,08 (C-13); 137,91 (C-15); 148,13 (C-28); 151,30

(C-30); 159,44 (C-25); 160,23 (C-21); 161,06 (C-11); 161,55 (C-23); 168,84 (C-8); 187,15 (C-10)

EMAR

Valor teórico (C₂₆H₂₁BrN₆O₃): 544, 0859

Valor obtido: 544, 0852

CLAE (% , nm): 98 (261)

7.6. Obtenção de 1-acetil-3,3-Difluoro-2-oxoindóis (51a-e)

Em um balão monotubulado de 250 mL, foram adicionados 1 mol de **50a-e** e 50 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), recém destilado. Em seguida, foram adicionados 4 mols de DAST e o meio reacional foi mantido sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 4 horas. O término da reação foi evidenciado por CCF, e a mistura reacional foi vertida sob banho de gelo. A fase orgânica foi lavada com água destilada (3 x 30 mL), e a solução de CH₂Cl₂ foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi evaporado no rotavapor e o produto obtido foi seco no vácuo.

Os derivados foram caracterizados por CG-EM e ponto de fusão (BOECHAT, 1996).

7.6.1. 1-acetil-3,3-difluoroindolin-2-ona (51a)

Rendimento: 91%

Ponto de fusão: 108-111 °C (Lit. 109-111 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 211 (13); 169 (100); 168 (10); 141 (63); 114 (10)

7.6.2. 1-acetil-3,3-difluoro-5-metilindolin-2-ona (51b)

Rendimento: 95%

Ponto de fusão: 70-73 °C (Lit. 72-74 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 225 (12); 184 (9); 183 (100); 182 (8); 155 (73)

7.6.3. 1-acetil-3,3,5-trifluoroindolin-2-ona (51c)

Rendimento: 95%

Ponto de fusão: 72-75 °C (Lit. 73-76 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 229 (13); 187 (100); 159 (64); 131 (13)

7.6.4. 1-acetil-5-cloro-3,3-difluoroindolin-2-ona (51d)

Rendimento: 85%

Ponto de fusão: 133-135 °C (Lit. 134-136 °C)

CG-EM (70 eV, *m/z*, %): 245 (14); 205 (32); 203 (100); 175 (55)

7.6.5. 1-acetil-5-bromo-3,3-difluoroindolin-2-ona (51e)

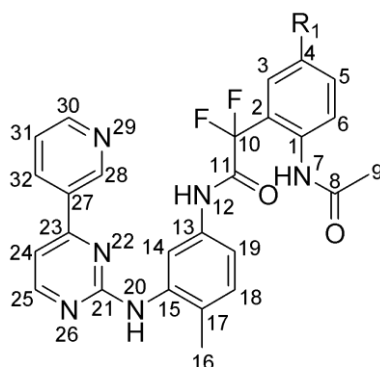
Rendimento: 70%

Ponto de fusão: 143-145 °C (Lit. 144-145 °C)

CG - EM (70 eV, *m/z*, %): 290 (13); 288 (13); 248 (99); 246 (100); 220 (34); 218 (35); 74 (15)

7.7. Obtenção dos produtos finais 48a-e

Em um balão monotubulado de 100 mL foram adicionados 1 mmol de **51a-e**, 1 mmol de FAPP em 50 mL de acetonitrila. O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente, sob agitação mecânica, por 24 horas. O término da reação foi evidenciado por CCF e o produto foi precipitado no meio. Este sólido foi isolado por filtração simples, e lavado com acetonitrila gelada.



R₁: H, CH₃, F, Cl, Br

7.7.1. 2-(2-acetamidofenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48a)

Rendimento: 58%

Ponto de fusão: 211-214 °C

EM-IES ([M+Na]⁺, m/z, %): 512 (100)

IV (cm⁻¹): 3392; 3307(N-H); 1689; 1662 (C=O); 862; 794; 765 (anel aromático)

RMN de ¹H (400 MHz; DMSO, δ, ppm): 1,96 (s, 3H, H-9); 2,22 (s, 3H, H-16); 7,22 (d, J= 8,3 Hz, 1H, H-18); 7,37 (m, 2H, H-14 e H-4); 7,43 (d, J= 5,1 Hz, 1H, H-24); 7,46 (dd, J= 4,8 e 7,9 Hz, 1H, H-31); 7,56 (t, J= 7,4 Hz, 1H, H-5); 7,62 (d, J= 7,8 Hz, 1H, H-3); 7,68 (d, J= 7,6 Hz, 1H, H-6); 7,99 (d, J= 1,7 Hz, 1H, H-19); 8,43 (dt, J= 1,8 e 8,0 Hz, 1H, H-32); 8,50 (d, J= 5,1 Hz, 1H, H-25); 8,68 (dd, J= 1,4 e 4,7 Hz, 1H, H-30); 8,97 (s, 1H, H-20); 9,26 (d, J= 1,8 Hz, 1H, H-28); 9,38 (s, 1H, H-12); 10,68 (s, 1H, H-7)

RMN de ¹³C (100 MHz; DMSO, δ, ppm): 17,59 (CH₃, C-16); 23,31 (C-9); 107,60 (C-24); 114,31 (t, J= 252,3 Hz, C-10); 117,22 (C-19); 117,61 (C-14); 123,66 (C-31); 125,44 (C-3); 126,33 (t, J= 7,5 Hz, C-1); 127,42 (C-5); 128,96 (C-2); 130,14 (C-17); 131,47 (C-18); 132,06 (C-4); 134,30 (C-27); 134,82 (C-32); 135,73 (C-6); 137,91 (C-

15); 148,09 (C-13); 151,29 (C-28); 159,39 (C-30); 160,97 (C-25); 161,52 (C-23); 161,79 (C-11); 162,09 (C-21); 168,68 (C-8)

RMN de ^{19}F (376 MHz; DMSO, δ , ppm): -99,00 (CF_2)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2$): 488,1772

Valor obtido: 488,1754

CLAE (% , nm): 99 (261)

7.7.2. 2-(2-acetamida-5-metilfenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48b)

Rendimento: 45%

Ponto de fusão: 225-227 °C

EM-IES ($[\text{M}-1]^+$, m/z , %): 501 (100)

IV (cm^{-1}): 3222 (N-H); 2984 (C-H sp^2); 1693; 1682 (C=O); 823; 804; 790 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 1,94 (s, 3H, H-9); 2,23 (s, 3H, H-16); 2,36 (s, 3H, CH_3 , C-4); 7,23 (d, $J= 8,4$ Hz, 1H, H-18); 7,38 (m, 2H, H-24 e H-14); 7,47 (m, 4H, H-3, H-31, H-5 e H-6); 8,01 (s, 1H, H-19); 8,44 (dt, $J= 1,9$ e 7,7 Hz, 1H, H-32); 8,51 (d, $J= 5,1$ Hz, 1H, H-25); 8,69 (dd, $J= 1,1$ e 4,5 Hz, 1H, H-30); 9,00 (s, 1H, H-20); 9,27 (d, $J= 1,2$ Hz, 1H, H-28); 9,31 (s, 1H, H-12); 10,65 (s, 1H, H-7)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,68 (CH_3 , C-16); 20,52 (CH_3 , C-9); 23,29 (CH_3 , C-4); 107,66 (C-24); 114,35 (t, $J= 251,9$ Hz, C-10); 117,26 (C-19); 117,66 (C-14); 123,76 (C-31); 126,59 (t, $J= 7,8$ Hz, C-1); 126,85 (C-5); 127,78 (C-3); 128,99 (C-17); 130,22 (C-18); 132,07 (d, $J= 13,1$ Hz, C-4); 133,11 (C-27); 134,39 (C-32); 134,98 (C-6); 135,09 (C-15); 137,96 (C-13); 148,17 (C-28); 151,37 (C-30); 159,48 (C-25); 161,05 (C-23); 161,58 (C-21); 161,83 (t, $J= 30,3$ Hz, C-11); 168,82 (C-8)

RMN de ^{19}F (376 MHz; DMSO, δ , ppm): -99,01 (CF_2)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2$): 502,1929

Valor obtido: 502,1925

CLAE (% , nm): 98 (261)

7.7.3. 2-(2-acetamida-5-fluorfenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48c)

Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 133-135 °C

EM-IES ($[\text{M}-1]^+$, m/z , %): 505 (100)

IV (cm^{-1}): 3239 (N-H); 2073 (C-H sp^2); 1693; 1678 (C=O); 835; 809; 789 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 1,94 (s, 3H, H-9); 2,23 (s, 3H, H-16); 7,23 (d, $J= 8,4$ Hz, 1H, H-18); 7,38 (d, $J= 2,0$ e 8,2 Hz, 1H, H-31); 7,50 (m, 5H, H-24, H-14, H-5, H-6 e H-3); 7,99 (d, $J= 1,5$ Hz, 1H, H-19); 8,44 (dt, $J= 1,8$ e 8,2 Hz, 1H, H-32); 8,51 (d, $J= 5,1$ Hz, 1H, H-25); 8,68 (dd, $J= 1,5$ e 4,7 Hz, 1H, H-30); 8,99 (s, 1H, H-20); 9,27 (d, $J= 1,3$ Hz, 1H, H-28); 9,36 (s, 1H, H- 12); 10,64 (s, 1H, H-7)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,69 (C-16); 23,87 (C-9); 108,73 (C-24); 114,46 (t, $J= 254$, Hz, C-10); 116,38 (d, $J= 5$, Hz, C-2); 116,45 (C-14); 117,04 (C-19); 118,97 (d, $J= 22$, Hz, C-3); 124,24 (C-31); 128,27 (C-17); 128,55 (d, $J= 8$, Hz, C-6); 128,27 (C-18); 132,42 (d, $J= 21$, Hz, C-5); 133,09 (C-27); 133,72(d, $J= 3$, Hz, C-1); 135,01 (C-32); 135,62 (C-15); 139,09 (C-13); 149,20(C-28); 152,13 (C-30); 159,58 (d, $J= 242$, Hz, C-4); 160,12 (C-25); 160,24 (C-11); 161,76 (C-23); 162,91 (C-21); 168,97 (C-8)

RMN de ^{19}F (376 MHz; DMSO, δ , ppm): -99,11 (CF_2); -115,28 (Ar-F)

EMAR

Valor teórico (C₂₆H₂₁F₃N₆O₂): 506,1678

Valor obtido: 506,1677

CLAE (% , nm): 97 (261)

7.7.4. 2-(2-acetamida-5-clorofenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48d)

Rendimento: 65%

Ponto de fusão: 218-220 °C

EM-IES ([M+Na]⁺, m/z, %): 546 (100)

IV (cm⁻¹): 3442; 3338; 3263 (N-H); 1714; 1668 (C=O); 812; 801; 776 (anel aromático)

RMN de ¹H (400 MHz; DMSO, δ, ppm): 1,95 (s, 3H, H-9); 2,22 (s, 3H, H-16); 7,23 (d, J=8,0 Hz, 1H, H-18); 7,36 (dd, J= 2,8 e 8,2 Hz, 1H, H-5); 7,44 (d, J= 5,1 Hz, 1H, H-24); 7,48 (dd, J= 4,8 e 7,9 Hz, 1H, H- 31); 7,65 (s, 2H, H-3 e H-14); 7,71 (s, 1H, H-6); 7,97 (d, J= 1,7 Hz, 1H, H-19); 8,43 (dt, J= 1,7 e 8,0 Hz, 1H, H-32); 8,51 (d, J= 5,1 Hz, 1H, H- 25); 8,69 (dd, J= 1,4 e 4,7 Hz, 1H, H-30); 8,97 (s, 1H, H-20); 9,26 (d, J= 1,8 Hz, 1H, H- 28); 9,41 (s, 1H, H-12); 10,67 (s, 1H, H-7)

RMN de ¹³C (100 MHz; DMSO, δ, ppm): 17,65 (CH₃, C-16); 23,28 (CH₃, C-9); 107,68 (C-24); 113,44 (t, J= 254,0 Hz, C-10); 117,27 (C-19); 117,66 (C-14); 123,72 (C-31); 126,21 (t, J= 8,0 Hz, C-1); 128,37 (t, J= 23,4 Hz, C-2) 129,10 (C-5); 129,33 (C-3); 129,64 (C-17); 130,24 (C-18); 131,50 (C-4); 132,11 (C-27); 134,38 (C-32); 134,77 (C-6); 134,82 (C-15); 138,00 (C-13); 148,13 (C-28); 151,34 (C- 30); 159,44 (C-25); 161,02 (C-23); 161,20 (t, J= 30,0 Hz, C-11); 161,58 (C-21); 168,85 (C-8)

RMN de ¹⁹F (376 MHz; DMSO, δ, ppm): -99,00 (CF₂)

EMAR

Valor teórico (C₂₆H₂₁ClF₂N₆O₂): 522,1383

Valor obtido: 522,1384

CLAE (% , nm): 99 (261)

7.7.5. 2-(2-acetamida-5-bromofenil)-2,2-difluor-N-(4-metil-3-((4-piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)fenil)acetamida (48e)

Rendimento: 72%

Ponto de fusão: 237-238 °C

EM-IES ($[M-1]^+$, m/z , %): 565 (100)

IV (cm^{-1}): 3441; 3278 (N-H); 1688; 1683 (C=O); 806; 792 (anel aromático)

RMN de ^1H (400 MHz; DMSO, δ , ppm): 1,94 (s, 3H, H-9); 2,22 (s, 3H, H-16); 7,22 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H-18); 7,33 (dd, $J=1,8$ e 8,0 Hz, 1H, H-6); 7,43 (d, $J=4,8$ Hz, 1H, H-24); 7,45 (dd, $J=8,0$ Hz e $J=4,6$ Hz, 1H, H-31); 7,59 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H-5); 7,76 (dd, $J=1,6$ e 2,72 Hz, 1H, H-3); 7,82 (d, $J=2,4$ Hz, 1H, H-14); 7,97 (d, $J=1,6$ Hz, 1H, H-19); 8,42 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, H-32); 8,50 (d, $J=4,8$ Hz, 1H, H-25); 8,68 (dd, $J=0,8$ e 1,2 Hz, 1H, H-30); 8,96 (s, 1H, H-20); 9,25 (d, $J=1,6$ Hz, 1H, H-28), 9,41 (s, H, H-12); 10,69 (s, 1H, H-7)

RMN de ^{13}C (100 MHz; DMSO, δ , ppm): 17,65 (CH_3 , C-16); 23,32 (CH_3 , C-9); 107,67 (C-24); 113,37 (t, $J=253,3$ Hz, C-10); 117,25 (C-19); 117,64 (C-14); 123,73 (C-31); 128,45 (t, $J=23,7$ Hz, C-2); 128,00 (t, $J=9,0$ Hz, C-3); 129,10 (C-5); 129,44 (C-17); 130,24 (C-18); 132,10 (C-27); 134,46 (C-32); 134,75 (C-6); 135,25 (C-15); 137,99 (C-13); 148,12 (C-28); 151,33 (C-30); 159,45 (C-25); 161,01 (C-23); 161,22 (t, $J=30,3$ Hz, C-11); 161,56 (C-21); 168,78 (C-8)

RMN de ^{19}F (376 MHz; DMSO, δ , ppm): -99 (CF_2)

EMAR

Valor teórico ($\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{BrF}_2\text{N}_6\text{O}_2$): 566,0877

Valor obtido: 566,0872

CLAE (% , nm): 99 (261)

BIBLIOGRAFIA

ADVANI, A. S.; PENDERGAST, A. M. Bcr-abl variants: biological and clinical aspects. **Leukemia Research**, v. 26, n. 8, p. 713-720, 2002.

AMEDURI, B.; BOUTEVIN, B. **Well Architected Fluoropolymers: Synthesis, Properties and Applications**, Editora Elsevier Science: Amsterdam, 2004.

APPERLEY, J. F. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leucemia. **Lancet Oncology**, v. 8, n. 11, p. 1018-1029, 2007.; (b) APPERLEY, J. F. Part II: Management of resistance to imatinib in chronic myeloid leucemia. **Lancet Oncology**, v. 8, n. 12, p. 1116-1128, 2007.

ASAKI, T.; SUGIYAMA, Y.; HAMAMOTO, T.; HIGASHIOKA, M.; UMEHARA, M.; NAITO, H.; NIWA, T. Design and synthesis of 3-substituted benzamide derivatives as Bcr-abl kinase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 5, p. 1421-1425, 2006.

AZIZIAN, J.; MOHAMMADI, M. K.; FIRUZI, O.; RAZZAGHI-ASL, N.; MIRI, R. Synthesis, biological activity and docking study of some new isatin Schiff base derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 11, p. 3730-3740, 2012.

BACCARANI, M.; CORTES, J.; PANE, F.; NIEDERWIESER, D.; SAGLIO, G.; APPERLEY, J.; CERVANTES, F.; DEININGER, M.; GRATWOHL, A.; GUILHOT, F.; HOCHHAUS, A.; HOROWITZ, M.; HUGHES, T.; KANTARJIAN, H.; LARSON, R.; RADICH, J.; SIMONSSON, B.; SILVER, R. T.; GOLDMAN, J.; HEHLMANN, R. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 6041-6051, 2009.

BANKS, R. E.; SMART, B. E.; TATLOW, J. C. **Organofluorine Chemistry: Principles and Commercial Applications**, Plenum Press: New York, 1994.

BANKS, R. E. **Preparation, Properties and Industrial Application of the Fluorine Compounds**, Ellis Horwood Ltd: Chichester, 1982

BANKS, R. E. **Organofluorine Chemicals and their Industrial Application**, Ellis Horwood Ltd: Chichester, 1979.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 3ª ed., Editora ArtMed Ltda., Porto Alegre, 2015.

BENINGTONI, F.; MORIN R. D., CLARK, L. C. Mescaline analogs. Iv. Substituted 4,5,6-trimethoxyindoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 20, p. 1454-1457, 1955.

BERGMAN, J.; CARLSSON, R.; LINDSTRÖM, J. O. The reaction of N-acetyl isatin with hydroxylamine. **Tetrahedron Letters**, v. 17, n. 40, p. 3611–3614, 1976.

BOECHAT, N.; BASTOS, M. M.; DUARTE, S. L.; COSTA, J. C. S.; MAFRA, J. C. M.; DANIEL, L. C. C. Mesilato de Imatinibe: Uma Otimização em sua Síntese. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 222-234, 2013.

BOECHAT, N.; KOVER, W. B. BASTOS, M. M.; PINTO, A. C.; MACIEL, L. C.; MAYER, L. M. U.; SILVA, F. S. Q.; SÁ, P. M.; MENDONÇA, J. S.; WARDELL, S. M. S. V.; ARRUDA, M. S. L. N-Acyl-3,3-difluoro-2-oxoindoles as Versatile Intermediates for the Preparation of Different 2,2-Difluorophenylacetic Derivatives. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 445-457, 2008.

BOECHAT, N.; KOVER, W. B.; BONGERTZ, V.; BASTOS, M. M.; ROMEIRO, N. C.; AZEVEDO, M. L. G.; WOLLINGER, W. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibition of New Indolin-2-Ones. **Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 533-542, 2007.

BOECHAT, N.; PINTO, A. C. **Preparation of α,α -difluorophenylacetates and -phenylacetamides as analgesics and antiinflammatories**. US 6034266, 2000.

BOECHAT, N. Isatinas: mais uma prova de versatilidade. Fluorodenitração: uma alternativa. Tese de doutorado, IQ/UFRJ, 244p. 1996.

BOLLMANN, P. W.; DEL GIGLIO, A. Leucemia Mielóide crônica: passado, presente, futuro. **Einstein**, v. 9, n. 2, p. 236–243, 2011.

BRYANT. T. Case of excision of the spleen for an enlargement of the organ, attended with leucocythaemia. *Guy's Hospital Reports*, v. 12, p. 444-455, 1866.

BUSCARONS, F.; SANCHEZ M. L. Analytical applications of isonitrosoacetanilides and derived oximes. XIII. Preparation, characteristics, and reactivity of 2,3-dichloroisnitrosoacetanilide, 2,5-dichloroisnitrosoacetanilide, 3,4-dichloroisnitrosoacetanilide, 3,5-dichloroisnitrosoacetanilide, and oximes of their derivatives. **Informacion de Quimica Analitica**, v. 21, n. 6, p. 191-201, 1967.

CAPDEVILLE, R.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; MATTER, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. **Nature Reviews**, v. 1, n. 7, p. 493-502, 2002.

CASTAGNETTI, F.; PALANDRI, F.; AMABILE, M.; TESTONI, N.; LUATTI, S.; SOVERINI, S.; IACOBUCCI, I.; BRECCIA, M.; CAMBRIN, G. R.; STAGNO, F.; SPECCHIA, G.; GALIENI, P.; IULIANO, F.; PANE, F.; SAGLIO, G.; ALIMENA, G.; MARTINELLI, G.; BACCARANI, M.; ROSTI, G. Results of high-dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: a phase 2 trial of the GIMEMA CML Working party. **Blood**, v. 113, n. 15, 3428-3434, 2009.

CHEAH, W. C.; BLACK, D. S.; GOH, W. K.; KUMAR, N. Synthesis of anti-bacterial peptide mimetics derived from N-acylisatins. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 18, p. 2965-2968, 2008.

CHEN, G.; WANG, Y.; HE, H.; LI, S.; ZHOU, L.; HAO, X.; Synthesis of isatin derivatives and biological activity against *Magnaporthe grisea*. **Yunnan Zhiwu Yanjiu**, v. 29, n. 6, p. 717-721, 2007.

CHOI, H. G.; SIM, T.; GRAY, N.; ZHOU, W.; CHANG, J. W.; ZHANG, J.; WEISBERG, E. **Preparation of phenylthiazolopyridine derivatives for use as antitumor agents**. WO 2010144909, 2010.

CLARKSON, B.; STRIFE, A.; WISNIEWSKI, D.; LAMBEK, C. L.; LIU, C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. **Leukemia**, v. 17, n. 7, p.1211-1262, 2003.

COHEN, M. H.; JOHNSON, J. R.; JUSTICE, R.; PAZDUR, R. Approval Summary: Imatinib Mesylate for One or Three Years in the Adjuvant Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumors. **The Oncologist**, v. 17, n. 7, p. 992-997, 2012.

COLICELLI, J. ABL tyrosine kinases: Evolution of function, regulation, and specificity. **Science Signaling**, v. 3, n. 139, p. 1-26, 2010.

CONTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**, 6^a ed., Editora Guanabara, Koogan, 2000.

COPPOLA, G. M. **Optionally substituted 2,3-indolinediones**. US 4212804, 1980.

CRAIG, A. O.; FESTUS, O. T.; EZEKIEL O. I.; DAVID A. A. SYNTHESIS, Antibacterial and anti-inflammatory activities of some 2-phenylglyoxylic acid derivatives. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 2, n. 2, p. 22-36, 2012.

CUTLER, E. G.; BRADFORD, E. H. Action of Iron, Cod-liver Oil, and Arsenic on the Globular Richness of the Blood. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 75, n. 149, p. 74-84, 1878.

DALEY, G. Q., VAN ETTEN, R. A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v. 247, n. 4944, p. 824-830, 1990.

DEADMAN, B. J.; HOPKIN, M.D.; BAXENDALEB I. R.; LEY. S. V. The synthesis of Bcr-abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, p. 1766-1800, 2013.

DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; LYDON, N.; MELO, J. V. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. **Blood**, v. 90, n. 9, 3691 – 3698, 1997.

DELAMAIN, M. T.; CONCHON, M. Os inibidores de tirosino quinase de segunda geração. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 37-40, 2008.

DIGHE, R. D.; ROHOM, S. S.; DIGHE, P. D.; SHIRADKAR, M. R. Condensed bridge head nitrogen heterocyclic systems: Synthesis and evaluation of isatin ylthiazole derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents and dTDP-rhamnose inhibitors. **Pharma Chemica**, v. 3, n. 2, p. 418-432, 2011.

DOLBIER, Jr.; WILLIAM, R. Fluorine chemistry at the millennium. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 157-163, 2005.

DO VALLE, L. A.; MELO, P. R.; GOMES, L. F.; PROENÇA, L. M. Methisazone in prevention of variola minor among contacts. **Lancet**, v. 2, n. 7420, p. 976-978, 1965.

DRUKER, B. J.; OHNO, S.; BUCHDUNGER, E.; TAMURA, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N. B. Selective killing of BCR-ABL positive cells with a specific inhibitor of the ABL tyrosine kinase. **Pezcoller Foundation Symposia**, v. 7, 255-267, 1996.

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 1, p. 3-7, 2000.

DRUKER, B. J.; SAWYERS, C. L.; KANTARJIAN, H.; RESTA, D. J.; REESE, S. F.; FORD, J. M.; CAPDEVILLE, R.; TALPAZ, M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1038-1042, 2001.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. New treatment approaches for chronic myelogenous leukemia. **Seminars in Oncology**, v. 27, n. 5, p. 578-586, 2000.

FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L.; LOSCALZO, J. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 17^a ed., Editora McGraw-Hill, New York, 2008.

FENG, Z.; CHEN, X.; LIU, H.; MENG, C.; ZUO, M. **Preparation of 2-(phenylamino) pyrimidine derivatives as tyrosine kinase inhibitors for treatment of immunity disorder and tumor**. CN 101423513, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), disponível em: <http://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/ucm218929.htm>, acesso em maio de 2005.; (b) disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm318203.htm>, acesso em maio de 2015.; (c) disponível em: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicinalProducts/ucm370971.htm>, acesso em maio de 2015.

FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. **The Ulster medical journal**, v. 76, n. 1, p. 8-17, 2007.

FUJIWARA, T.; O'HAGAN, D. Successful fluorine-containing herbicide agrochemicals. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 167, p. 16-29, 2014.

GAETA, F. C. A.; GALAN, A. A.; KRAYNACK, E. A. **Preparation of isatin derivatives as telomerase inhibitors and anticancer agents**. WO 9965875, 2000.

GAJIWALA, K. S.; WU, J. C.; CHRISTENSEN, J.; DESHMUKH, G. D.; DIEHL, W.; DINITTO, J. P.; ENGLISH, J. M.; GREIG, M. J.; HE, Y. A.; JACQUES, S. L.; LUNNEY, E. A.; *et al.* KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 5, p. 1542-1547, 2009.

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; LE C. P.; MOLOGNI, .; FANELLI, M.; BERTAZZOLI, C.; MARCHESI, E.; DI N. M.; BIONDI, A.; CORNEO, G. M.; BELOTTI, D.; POGLIANI, E.; LYDON, N. B. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 23, n. 3, p. 380-394, 1997.

GASTEIGER, J.; SALLER, H. Calculation of the charge distribution in conjugated systems by a quantification of the resonance concept. Issue **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 24, n. 8, p. 687-689, 1985.

GEARY, C. G. The story of chronic myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 1, p. 2-11, 2000.

GOLDMAN, J. M. Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1031-1032, 2000.

GORRE, M. E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; RAO, P. N.; SAWYERS, C. L. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, v. 293, n. 5531, 876-880, 2001.

GRATWOHL, A.; HERMANS, J.; NIEDERWIESER, D.; FRASSONI, F.; ARCESE, W.; GAHRTON, G.; BANDINI, G.; CARRERAS, E.; VERNANT, J. P.; BOSI, A. **Bone Marrow Transplantation**, v. 12, n. 5, p. 509-516, 1993.

GROFFEN, J.; STEPHENSON, J. R.; HEISTERKAMP, N.; KLEIN, A.; BARTRAM, C. R.; GROSVELD, G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. **Cell**, v. 36, n. 1, p. 93-99, 1984.

GUILHOT, F. M. D.; CLAUDE, C. M. D.; MICHALLET, M. M. D.; GUERCI, A. M. D.; HAROUSSEAU, J. L.; M.D., MALOISEL, F. M. D.; BOUABDALLAH, R. M. D.; GUYOTAT, D. M. D.; CHERON, N. M. D.; NICOLINI, F. M. D.; *et al.* Interferon Alfa-2b Combined with Cytarabine versus Interferon Alone in Chronic Myelogenous Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 4, p. 223-229, 1997.

GUIMARÃES J. R.Q. **Manual de Oncologia**. 2^a ed, Editora BBS, São Paulo, 2006.

GUNGOR, T.; CHEN, Y.; GOLLA, R.; MA, Z. CORTE, J. R.; NORTHROP, J. P.; BIN, B.; DICKSON, J. K.; STOUCH, T.; ZHOU, R.; JOHNSON, S. E.; SEETHALA, R.; FEYEN, J. H. M. Synthesis and Characterization of 3-Arylquinazolinone and 3-Arylquinazolinethione Derivatives as Selective Estrogen Receptor Beta Modulators. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 2440-2455, 2006.

GUO Y, CHEN F. TLC-UV-spectrophotometric and TLC-scanning determination of isatin in leaf of Isatis. **Zhongcaoyao**, v. 17, p. 8-11, 1986.

GUYOT, A.; MARTINET, J. Condensation of Primary and Secondary Aromatic Amines with Mesoxalic Esters. Synthesis in the Indole Series. **Comptes Rendus Chimie**, v. 156, p. 1625-1628, 1913.

HAHN, E. A.; GLENDENNING, G. A. Quality of life on imatinib. **Seminars in hematology**, v. 40, p. 31-6, 2003.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**. v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

HAMMES, A. S. O. Modelagem molecular de inibidores de aspartil protease: Potenciais novos compostos antimalariais. Dissertação (mestrado). Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, 87p. 2012.

HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; KOLB, H. J.; HEINZE, B.; HOCHHAUS, A.; GRIESSHAMMER, M.; PRALLE, H.; QUEISSER, W. P.; ESSERS, U.; FALGE, C. The German CML study, comparison of busulfan vs. hydroxyurea vs. interferon alpha and establishment of prognostic score 1. **Leukemia and lymphoma**, v. 11, p. 159-68, 1993.

HEISTERKAMP, N.; JENSTER, G.; TEN HOEVE, J.; ZOVICH, D.; PATTENGAL, P. K.; GROFFEN, J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. **Nature**, v. 344, n. 6263, p. 251-253, 1990.

HOCHHAUS, A.; SAGLIO, G.; LARSON, R. A.; KIM, D. W.; ETIENNE, G.; ROSTI, G.; SOUZA, C.; KUROKAWA, M.; KALAYCIO, M. E.; HOENEKOPP, A.; FAN, X.; SHOU, Y.; KANTARJIAN, H.; HUGHES, T. P. Nilotinib is associated with a reduced incidence of Bcr-abl mutations vs imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Blood**, v. 121, n. 18, p. 3703-3708, 2013.

HOCHHAUS, A.; DRUKER, B.; SAWYERS, C.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C. A.; CORTES, J.; NIEDERWIESER, D. W.; GAMBACORTI, C.; STONE, R. M.; GOLDMAN, J.; FISCHER, T.; O'BRIEN, S. G.; REIFFERS, J. J.; MONE, M.; KRAHNKE, T.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. M. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon- α treatment. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1039-1043, 2008.

HOSSAIN, M. M.; ISLAM, R. M.; SAHA, S. K.; ISLAM, MOHAMMAD K. An efficient microwave-assisted synthesis of dihydropyrazinones and bis-benzoylketones. **Tetrahedron Letters**, v.51, n. 8, p. 1155-1157, 2010.

HUNTER, T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, n. 8, p. 2036-2043, 2007.

ICHIA, M.; PALUMBO, A.; PROTA, G. Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. **Tetrahedron**, v. 44, n. 20, p. 6441-6446, 1988.

IKOTUN, A.; EGHAREVBA, G. O.; OBAFEMI, C. A.; OWOSENI, A. O. Ring deactivating effect on antimicrobial activities of metal complexes of the schiff base of

p-nitroaniline and isatin. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 1, p. 416-422, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>, acesso em maio de 2015.; (b) INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>, acesso em maio de 2015.; (c) INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>, acesso em maio de 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/bar_dev_sel.aspx, acesso em maio de 2015.

JABBOUR, E.; CORTES, J. E.; GILES, F. J.; O'BRIEN, S.; KANTARJIAN, A. M. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. **Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2171-2181, 2007.

JACOB, S. W. C.; FENDRICH, G.; FLOERSHEIMER, A.; FURET, P.; LIEBETANZ, J.; RUMMEL, G.; RHEINBERGER, P.; CENTELEGHE, M.; FABBRO, D.; MANLEY, P. W. Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 63, p. 80-93, 2007.

JAGANI, Z.; SINGH, A.; KHOSRAVI-FAR, R. FoxO tumor suppressors and Bcr-abl induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. **Biochimica e Biophysica**, v. 1785, n. 1, p. 63-84, 2008.

JAMES, R. A.; KOHN, C. A.; REES A. H.; VERSCHUREN, R. E. Some derivatives of benz(f)azepine. Part III. **Jornal of Heterocyclic Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 793-795, 1989.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, n. 2, p. 71-96, 2008.

JENSEN, B. S.; JORGENSEN, T. D.; AHRING, P. K.; CHRISTOPHERSEN, P.; STROBAEK, D.; TEUBER, L.; OLESEN, S. P. **Use of isatin oxime derivatives as ion channel activating agents**. WO0033834, 2000.

JORDAN, C. A.; WIECZERZAK, K. B.; KNISLEY, K. J.; KETCHA, D. M. Expedited microwave-assisted N-alkylation of isatins utilizing DBU. **Arkivoc**, v. 2014, p. 183-192, 2014.

JOSKE, D. J. L. Chronic myeloid leukaemia: the evolution of gene-targeted therapy. **The Medical Journal of Australia**, v.189, n.5, p. 277-282, 2008.

KANTARJIAN, H. M.; BACCARANI, M.; JABBOUR, E.; SAGLIO, G.; CORTES, J. E. Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors: The Future of Frontline CML Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 7, p. 1674-1683, 2011.

KANTARJIAN, H. M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.; GILES, F. J.; RIOS, M. B.; SHAN, J.; FADERI, S.; GARCIA-MANERO, G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; WIERDA, W.; KEATING, M.; TALPAZ, M. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: Comparison with historic data. **Cancer**, v. 98, n. 12, p. 2636-2642, 2003.

KANTARJIAN, H. M.; KEATING, M. J.; ESTEY, E. H.; O'BRIEN, S.; PIERCE, S.; BERAN, M.; KOLLER, C.; FELDMAN, E.; TALPAZ, M. Treatment of advanced stages of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and low-dose cytarabine. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. 5, p. 772-778, 1992.

KARALI, N.; GUERSOY, A.; KANDEMIRLI, F.; SHVETS, N.; KAYNAK, F. B.; OEZBEY, S.; KOVALISHYN, V.; DIMOGLO, A. Synthesis and structure-antituberculosis activity relationship of 1H-indole-2,3-dione derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 17, p. 5888-5904, 2007.

KEARNEY, T.; HARRIS, P. A.; JACKSON, A.; JOULE, J. A. Synthesis of isatin 3-oximes from 2-nitroacetanilides. **Synthesis**, v. 8, 769-72, 1992.

KIRSCH, P. Fluorine in liquid crystal design for display applications. **Journal of Fluorine Chemistry**, 2015, no prelo.

KLEIN, A.; KESSEL, A. G.; GROSVELD, G.; BARTRAM, C. R.; HAGEMEIJER A.; BOOTSMA, D.; SPURR, N. K.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; STEPHENSON, J. R. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 300, n. 5894, p. 765-7, 1982.

KRUG, M.; HILGEROTH, A. Recent advances in the development of multi-kinase inhibitors. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1312-1327, 2008.

KUBINYI, H. QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches. **Methods and Principles in Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 240, 1993.

LAVANYA, A.; PARLAPALLI, A.; CIDDI, M.; SARANGAPANI, M. Novel 2-amino-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)benzo[d]oxazol-5-carbohydrazides as anti-inflammatory agents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 1, p. 212-218, 2015.

LE COUTRE, P.; OTTMANN, O.G.; GILES, F.; KIM, D. W.; CORTES, J.; GATTERMANN, N.; APPERLEY, J. F.; LARSON, R. A.; ABRUZZESE, E.; O'BRIEN, S. G.; KULICZKOWSKI, K.; HOCHHAUS, A.; MAHON, F. X.; SAGLIO, G.; GOBBI, M.; KWONG, Y. L.; BACCARANI, M.; HUGHES, T.; MARTINELLI, G.; RADICH, J. P.; ZHENG, M.; SHOU, Y.; KANTARJIAN, H. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective Bcr-abl tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 1834-1839, 2008.

LIPINSKI, C.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, n. 1-2, p. 3-26, 2001.

LIU, Y. F.; WANG, C.L.; BAI, Y. J.; HAN, N.; JIAO, J. P.; QI, X. L. A facile total synthesis of imatinib base and its analogues. **Organic Process Research and Development**, v. 12, n. 3, p. 490-495, 2008.

LUGO, T. G.; PENDERGAST, A. M.; MULLER, A. J.; WITTE, O. N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of Bcr-abl oncogene products. **Science**, v. 247, n. 4946, p. 1079-1082, 1990.

MAHON, F. X.; DEININGER, M. W. N.; SCHULTHEIS, B.; CHABROL, J.; REIFFERS, J.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 1070- 1079, 2000.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 6, p. 441-453, 2007.

MIDDLETON, W. J. New fluorinating reagents. Dialkylaminosulfur fluorides. **Journal Organic Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 574–578, 1975.

MOL, C. D.; LIM, K. B.; SRIDHAR, V.; ZOU, H.; CHIEN, E. Y. T.; SANG, B-C.; NOWAKOWSKI, J.; KASSEL, D. B.; CRONIN, C. N.; MCREE, D. E. Structure of a c-Kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31461-31464, 2003.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MOTZER, R. J.; HUTSON, T. E.; TOMCZAK, P.; MICHAELSON, M. D.; BUKOWSKI, R. M.; OUDARD, S.; NEGRIER, S.; SZCZYLIK, C.; PILI, R. BJARNASON, G. A.; *et al.* Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 22, p. 3584-3590, 2009.

MOTZER, R.J.; HUTSON, T.E. B.; TOMCZAK, P. C.; MICHAELSON, D. D.; BUKOWSKI, R.M. E.; RIXE, O.F.; OUDARD, S. G.; NEGRIER, S. H.; SZCZYLIK, C. I.; KIM, S.T. J.; CHEN, I. J.; BYCOTT, P.W. J.; BAUM, C.M.J.; FIGLIN, R.A. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 2, p. 115-124, 2007.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI), disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-nilotinib>, acesso em junho 2015.

NICHOLS, J.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Derivation of Germline Competent Embryonic Stem Cells with a Combination of Interleukin-6 and Soluble Interleukin-6 Receptor. **Experimental Cell Research**, v. 215, n. 1, p. 237–239 1994.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 27, n. 5, p. 1013-1035, 1961.

O'BRIEN, S. G.; GUILHOT, F.; LARSON, R. A.; GATHMANN, I.; BACCARANI, M.; CERVANTES, F.; CORNELISSEN, J. J.; FISCHER, T.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T.; *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly

diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 11, p. 994-1004, 2003.

O'HARE, T.; SHAKESPEARE, W. C.; ZHU, X.; EIDE, C. A.; RIVERA, V. M.; WANG, F.; ADRIAN, L. T.; ZHOU, T.; HUANG, W. S.; XU, Q. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. **Cancer Cell**, v. 16, n. 5, p. 401-412, 2009.

O'HARE, T.; WALTERS, D. K.; STOFFREGEN, E. P.; JIA, T.; MANLEY, P. W.; MESTAN, J.; COWAN J.; SANDRA, W.; LEE, F. Y.; HEINRICH, M. C.; DEININGER, M. W. N.; DRUKER, B. J. In vitro Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutants. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4500-4505, 2005.

O'HOGAN, D. Fluorine in health care: Organofluorine containing blockbuster drugs. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 131, n. 11, p. 1071-1081, 2010.

OSAROGIAGBON, U. R.; MC GLAVE, P. B. Chronic myelogenous leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 6, n. 4, p. 241-246, 1999.

PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M.; MISURACA, G.; PROTA, G. A new look at the rearrangement of adrenochrome under biomimetic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, n. 3, p. 297-302, 1989.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DECLERCQ, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV evaluation of Schiff and Mannich bases of isatin derivatives with 3-amino-2-methylmercapto quinazolin-4(3H)-one. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 74, n. 1, p. 11-17, 1999.; (b) PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DECLERCQ, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 25-31, 1999.; (c) PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DECLERCQ, E. Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. **Farmaco**, v. 54, n. 9, p. 624-628, 1999.

PFIZER, disponível em: <http://www.pfizer.com/products/product-detail/bosulif>, acesso em maio de 2015.

PINTO, A. C.; SILVA, F. S. Q. Reduction of N-acylisatins with [BH₃.THF] complex. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 48, p. 8923-8926, 1994.

POPP, F. D. Chemistry of isatin. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 18, p. 1-58, 1975.

PORTAL NOVARTIS, disponível em: <https://portal.novartis.com.br/upload/imgconteudos/1821.pdf>, acesso em junho 2015.

PORTAL SAÚDE, disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/portal-dcnt/mais-sobre-portal-dcnt>, acesso em junho de 2015.

PURSER, S.; MOORE, P. R.; SWALLOW, S.; GOUVERNEUR, V. Fluorine in medicinal chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 2, p. 320-330, 2008.

PUTTINI, M.; COLUCCIA, A. M.; BOSCHELLI, F.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; DONELLA-DEANA, A.; AHMED, S.; REDAELLI, S.; PIAZZA, R.; MAGISTRONI, V.; ANDREONI, F.; SCAPOZZA, L.; FORMELLI, F.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-abl+ neoplastic cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11314-11322, 2006.

QUÍNTAS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J. Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors and Beyond. **Seminars in Hematology**, v. 47, n. 4, p. 371-380, 2010.

QUÍNTAS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H.; O'BRIEN, S.; BORTHAKUR, G.; BRUZZI, J.; MUNDEN, R.; CORTES, J. Pleural effusion in patients with chronic myelogenous leukemia treated with dasatinib after imatinib failure. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 25, p. 3908-3914, 2007.

REDAELLI, A.; BELL, C.; CASAGRANDE, J.; STEPHENS, J.; BOTTEMAN M.; LASKIN, B.; PASHOS, C. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. **Expert review of anticancer therapy**. v. 4, n.1, p. 85-96, 2004.

RESS, A.; MOELLING, K. Bcr is a negative regulator of the Wnt signaling pathway. **EMBO reports**, v. 6, n. 11, p. 1095-1100, 2005.

REWCASTLEA, G. W.; DENNYA, W. A.; SHOWALTERB, H. D. H. Synthesis of 4-(phenylamino)pyrimidine derivatives as ATP-competitive protein kinase inhibitors with potential for cancer chemotherapy. **Current Organic Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 679-706, 2000.

RITTER, S. K. Dabbling in Fluorine. **Chemical & Engineering News**, v. 90, n. 9, p. 10-17, 2012.

ROSTI, G.; TRABACCHI, E.; BASSI, S.; BONIFAZI, F.; DE V. A.; MARTINELLI, G.; ALBERTI, D.; FINCATO, G.; SAGLIO, G.; BACCARANI, M. Risk and early cytogenetic response to imatinib and interferon in chronic myeloid leucemia. **Haematologica**, v. 88, n. 3, p. 241-244, 2003.

ROWLEY, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290-293, 1973.

SANDMEYER, T. Uber isonitrosoacetanilide und deren kondensation zu isatinen. *Helvetica Chimica Acta*, v. 2, n. 1, p. 234-242, 1919.

SAVAGE, D. G; ANTMAN K. H. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. **The New England journal of medicine**, v. 346, n. 9, p. 683-693, 2002.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1330-1340, 1999.

SENN, N. Case of splenomedullary leukemia successfully treated by the use of Roentgen rays. **Medical Records of New York**, v. 64, p. 281-282, 1903.

SHAH, R. J.; MODI, N. R.; PATEL, M. J.; PATEL, L. J.; CHAUHAN, B. F.; PATEL, M. M. Design, synthesis and in vitro antibacterial and antifungal activities of some novel spiro[azetidine-2,3'-indole]-2,4(1'H)-dione. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 5, p. 587-594, 2011.

SILVA J. F. M.; GARDEN, S. J.; b, A. C. The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v.12, n. 3, p. 273-324, 2001.

SITERAND, K.; RAREY, M. PoseView - molecular interaction patterns at a glance. **Journal of Cheminformatics**, v. 2, p. 50, 2010.

SMITH, W. C. The Chemistry of Sulfur Tetrafluoride. **Angewandte Chemie**, v.1, n. 9, p. 467-475, 1962.

SOKAL, J. E.; COX, E. B.; BACCARANI, M.; TURA, S.; GOMEZ, G. A.; ROBERTSON, J. E.; TSO, C. Y.; BRAUN, T. J.; CLARKSON, B. D.; CERVANTES, F.; ROZMAN, C. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v. 63, n. 4, p. 789-799, 1984.

SPARTAN'14, disponível em: <http://www.wavefunction.com>, acesso em Abril de 2015.

STOLLE, R. New method for the preparation of N-substituted isatins (preliminary communication). **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 46, n. 3, p. 3915-3916, 1914.

SUMPTER, W. C. The chemistry of isatin. **Chemical Reviews**, v. 34, n. 3, p. 393-434, 1944.

TALPAZ, M. Interferon-alfa-based treatment of chronic myeloid leukemia and implications of signal transduction inhibition. **Seminars in Hematology**, v. 38, p. 22-27, 2001.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TEN HOEVE, J.; ARLINGHAUS, R. B.; GUO, J. Q.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. **Blood**, v. 84, n. 6, p.1731-1736, 1994.

THEODORIDIS, G. **Fluorine-containing agrochemicals: An overview of recent developments**, Editora Elsevier, 2006.

TOKARSKI, J. S.; NEWITT, J. A.; CHANG, C. Y. J.; CHENG, J. D.; WITTEKIND, M.; KIEFER, S. E.; KISH, K.; LEE, F. Y. F.; BORZILLERRI, R. L. J.; XIE, L.; ZHANG, D. Y.; KLEI, H. E. The Structure of Dasatinib (BMS-354825) Bound to Activated ABL

Kinase Domain Elucidates Its Inhibitory Activity against Imatinib-Resistant ABL Mutants. **Cancer Research**, v. 66, n. 11, p. 5790-5797, 2006.

TOMCHIN, A. B., FRADKINA, S. P., KRYLOVA, I. M., KHROMENKOVA, Z. A. Heterocyclic semicarbazones and thiosemicarbazones. XLVII. Acylation of isatin. **Zhurnal Organicheskoi Khimii**, v. 22, n.11, p. 2409-2420, 1986.

TOMCHIN, A. B. Heterocyclic semicarbazones and thiosemicarbazones. XLIV. Cyclization of isatin and 1-acetylisatin 3-thiobenzoylhydrazones. **Zhurnal Organicheskoi Khimii**, v. 17, n. 3, p. 589-95, 1981.

TRESSAUD, A.; HAUFE, G. **Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals**, Editora Elsevier Science, 2008.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2011.

VASCONCELOS, F. C. Análise da expressão e atividade das moléculas de influxo e de efluxo de drogas em células da leucemia. Tese de doutorado, INCA, 145p. 2012.

VERMA, M.; PANDEYA, S. N.; SINGH, K. N.; STABLES, J. P. Anticonvulsant activity of Schiff bases of isatin derivatives. **Acta Pharmaceutica**, v. 54, n. 1, p. 49-56, 2004.

VIANNA, J. C. C.; ALMEIDA, E. C. P. Leucemia Mielóide Crônica: tratamentos empregados nas diferentes fases da doença. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, p. 60–69, 2006.

WEISBERG, E.; MANLEY, P. W.; BREITENSTEIN, W.; BRÜGGEN, J.; SANDRA, W. C.; RAY, A.; HUNTLY, B.; FABBRO, D.; FENDRICH, G.; HALL-MEYERS, E.; KUNG, A. L.; MESTAN, J.; DALEY, G. Q.; CALLAHAN, L. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-abl. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 129–141, 2005.

WELCH, J. T.; ESWARAKRISHNAN, S. **Fluorine in Bioorganic Chemistry**, 1^a ed., Editora John Wiley & Sons, New York, 1991.

WERMUTH, C. G. **Specific substituent effects In: The practice of medicinal chemistry.** Wermuth, C. G. (Ed.), Editora Academic Press, San Diego, 1996.

WIECHERT, K.; HEILMANN, H. H.; JACOB, W. A simple synthesis of isatin 3-oxime. **Zeitschrift fuer Chemie**, v. 1, p. 191, 1961.

WINTROBE, M. M.; HUGULEY, C. M. Jr.; MCLENNAN, M. T.; LIMA, L. P. C. Nitrogen mustard as a therapeutic agent for Hodgkin's disease, lymphosarcoma and leucemia. **Annals of Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 529-540, 1947.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/, acesso em maio de 2015.

XIANG, Q. F.; WANG, F.; SU, X.D.; LIANG, Y.J.; ZHENG, L. S.; MI, Y.J.; CHEN, W.Q. Effect of BIBF 1120 on reversal of ABCB1-mediated multidrug resistance. **Cellular Oncology**, v. 34, n. 1, p. 33-44, 2011.

XIE, Y.; DAVIES, S.; XIANG, Y.; ROBISON, L.; ROSS, J. A. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973–1998). **Cancer**, v. 97, n. 9, p. 2229–2235, 2003.

YAISH, P.; GAZIT, A.; GILON, C.; LEVITZKI, A. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. **Science**, v. 242, n. 4880, p. 933-935, 1988.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; SAKURAMA, T.; MATSUDA, H.; NOMURA, M.; MATSUDA, H.; KUBO, M. Novel indole S,O-bisdesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin, and isatin, with increasing skin blood flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 5, p. 886-888, 1998.

ZARI, S. KUDRJASHOVA, M.; PEHK, T.; LOPP, M.; KANGER, T. Remote Activation of the Nucleophilicity of Isatin. **Organic Letters**, v. 16, n. 6, p. 1740-1743, 2014.

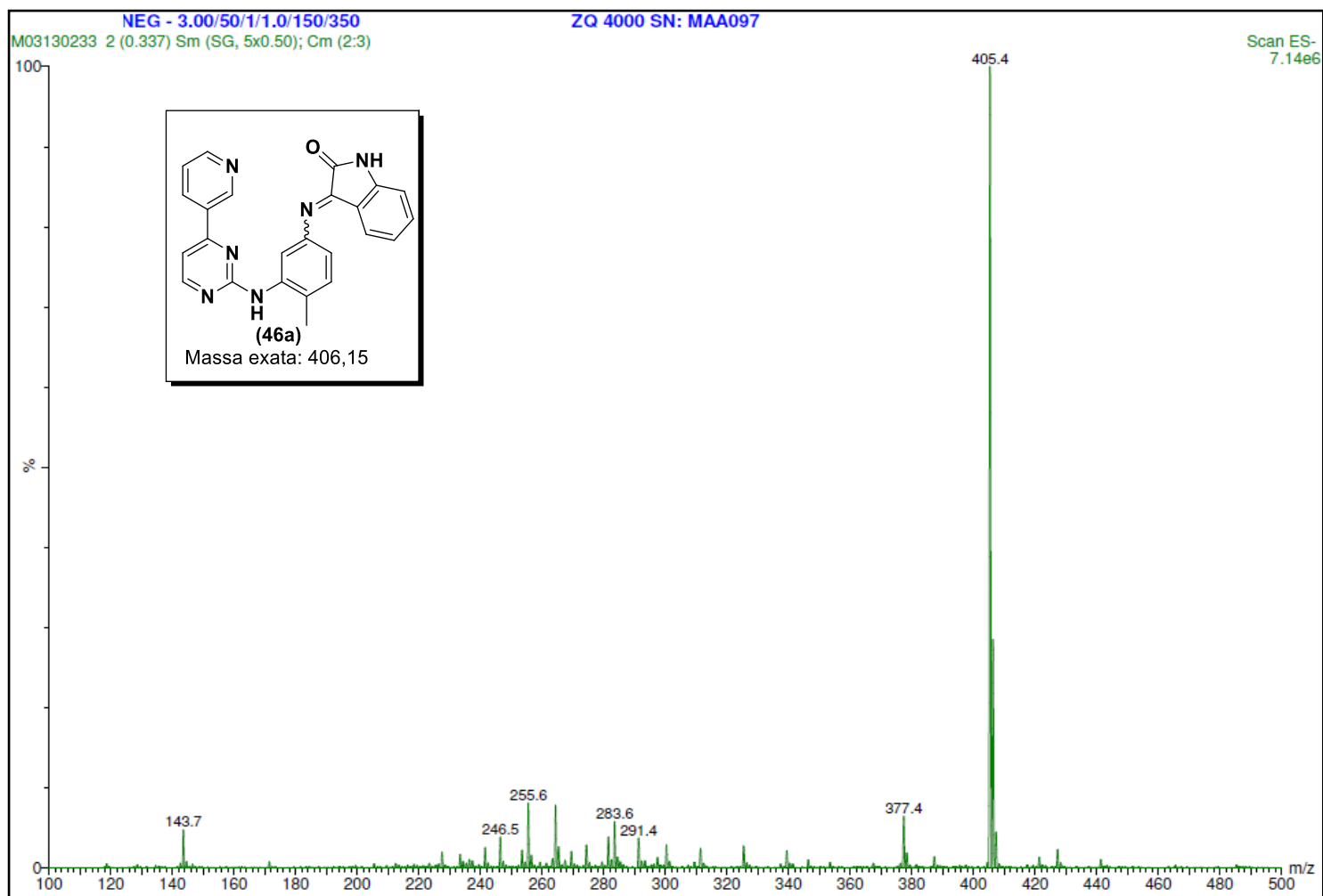
ZHANG, H.; FENG, W.; NIE, J.; ZHOU, Z. Recent progresses on electrolytes of fluorosulfonimide anions for improving the performances of rechargeable Li and Li-ion battery. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 174, p. 49-61, 2015.

ZIMMERMANN, J.; BUCHDUNGER E.; METT, H.; MEYER, T.; LYDON, N. B. Potent and selective inhibitors of the abl-kinase: phenylaminopyrimidine (pap) derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 2, p. 187-192, 1997.

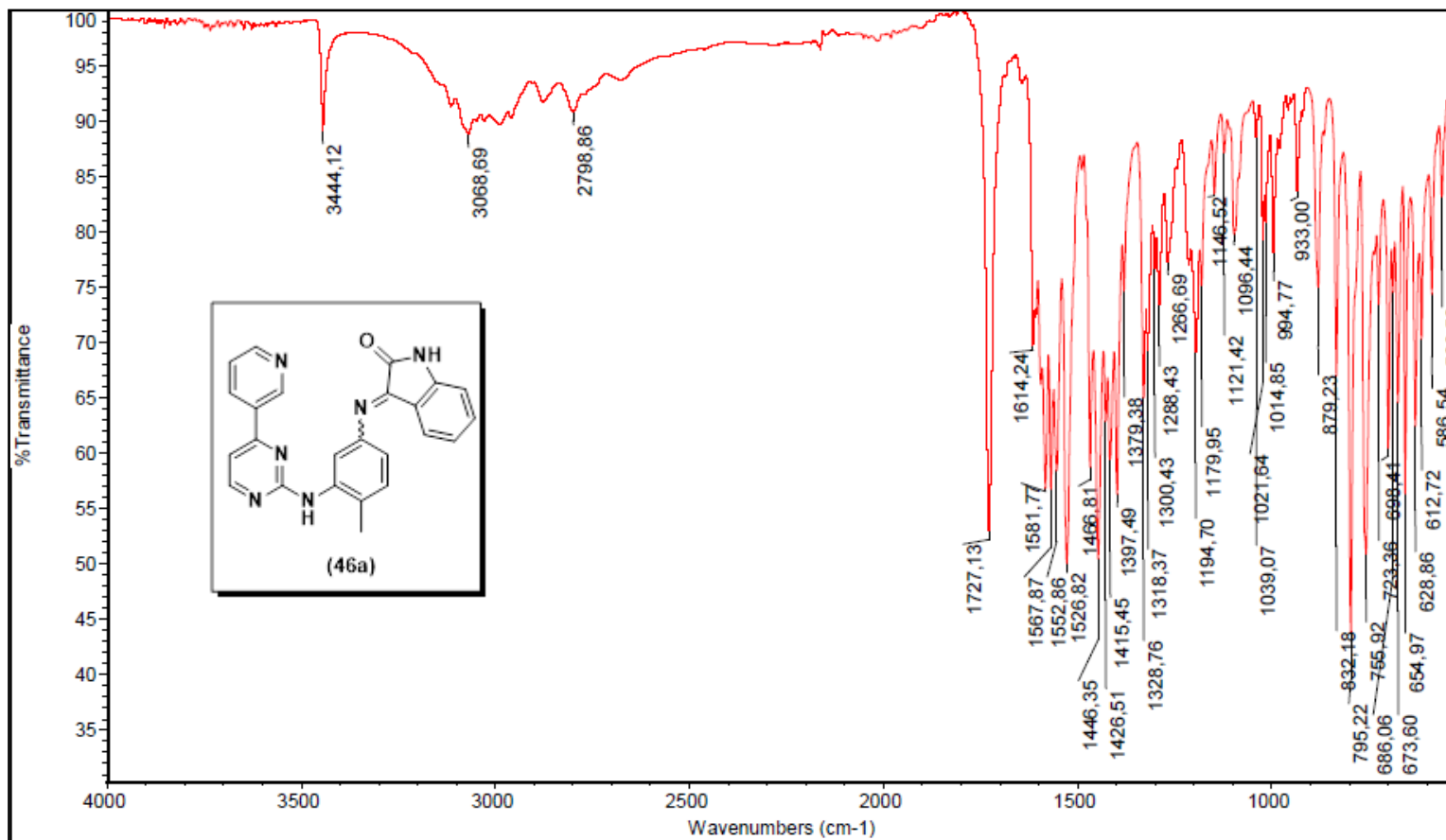
ZIMMERMANN, J.; BUCHDUNGER E.; METT, H.; MEYER, T.; LYDON, N. B.; TRAXLER, P.; Phenylamino-pyrimidine (PAP) — derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 11, p. 1221-1226, 1996.; (b) ZIMMERMANN. J.; CARAVATTI, G.; METT, H.; MEYER, T.; MÜLLER, M.; Lydon, N. B.; FABBRO, L. A. Phenylamino-Pyrimidine (PAP) Derivatives: A New Class of Potent and Selective Inhibitors of Protein Kinase C (PKC). **Archiv der Pharmazie**, v. 329, n. 7, p. 371–376, 1996.

ZIMMERMANN, J. **Pyrimidine derivatives and processes for the preparation thereof**. US 5521184, 1996.

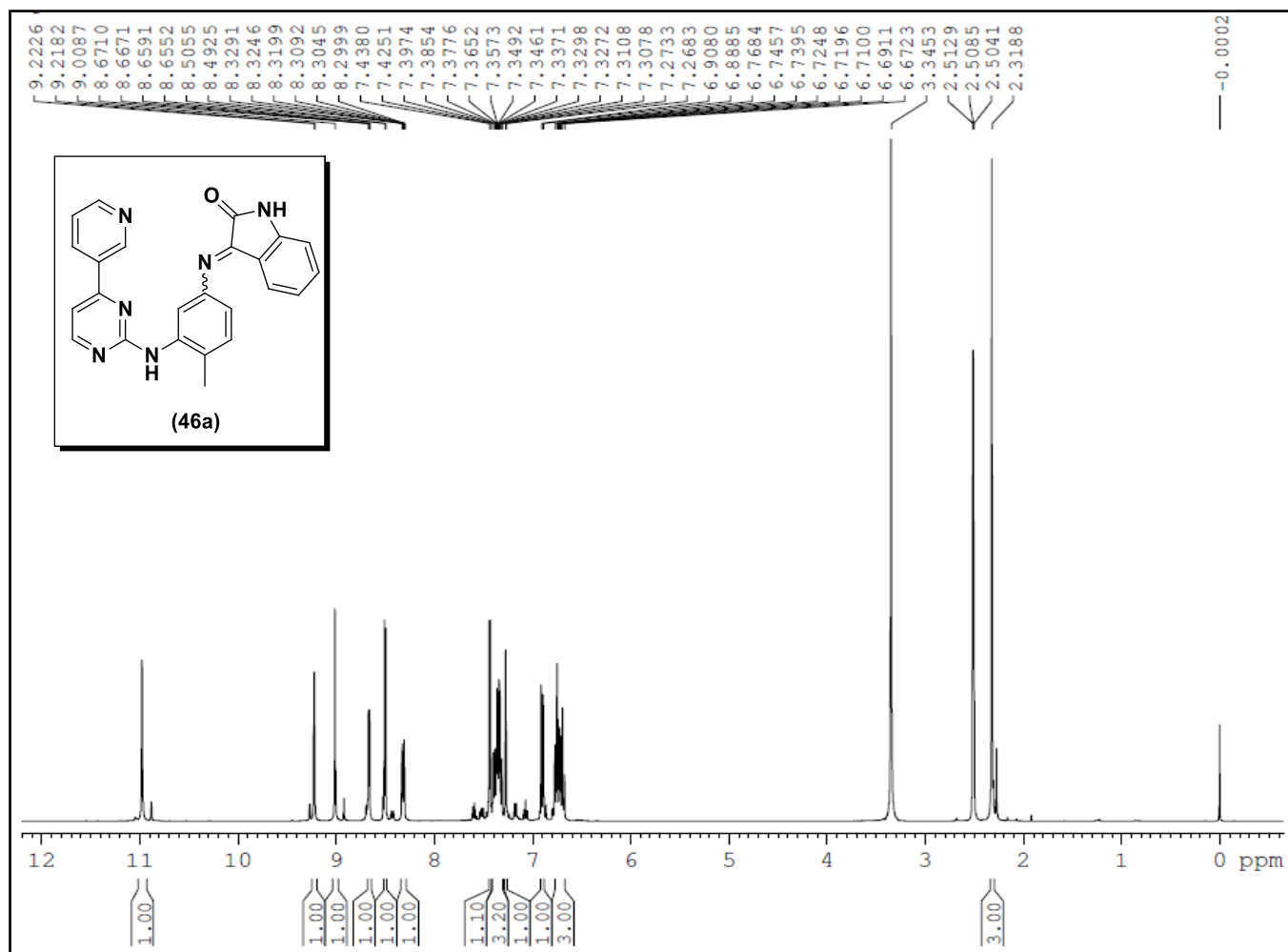
ANEXO DE ESPECTROS E CROMATOGRAMAS



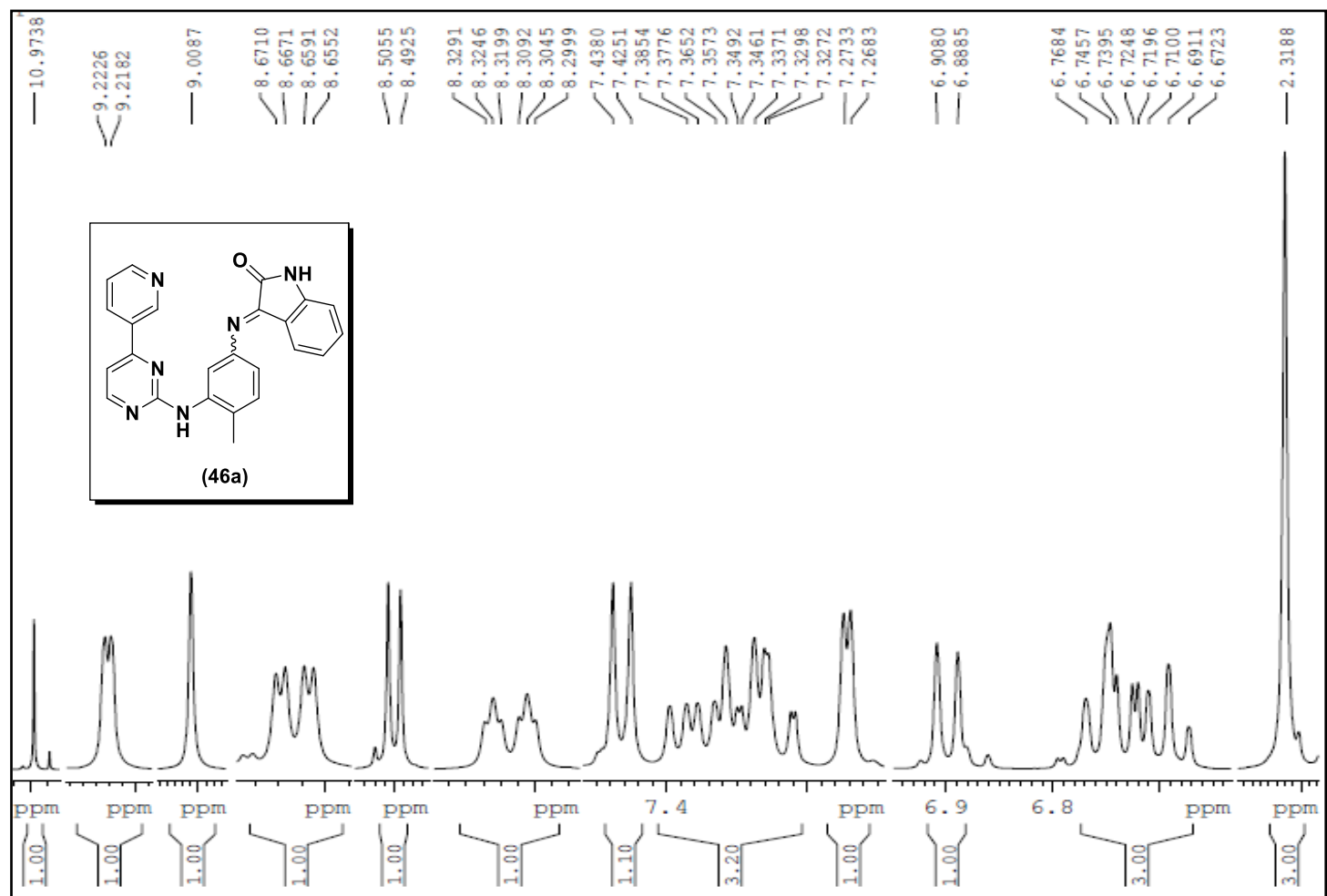
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **46a**



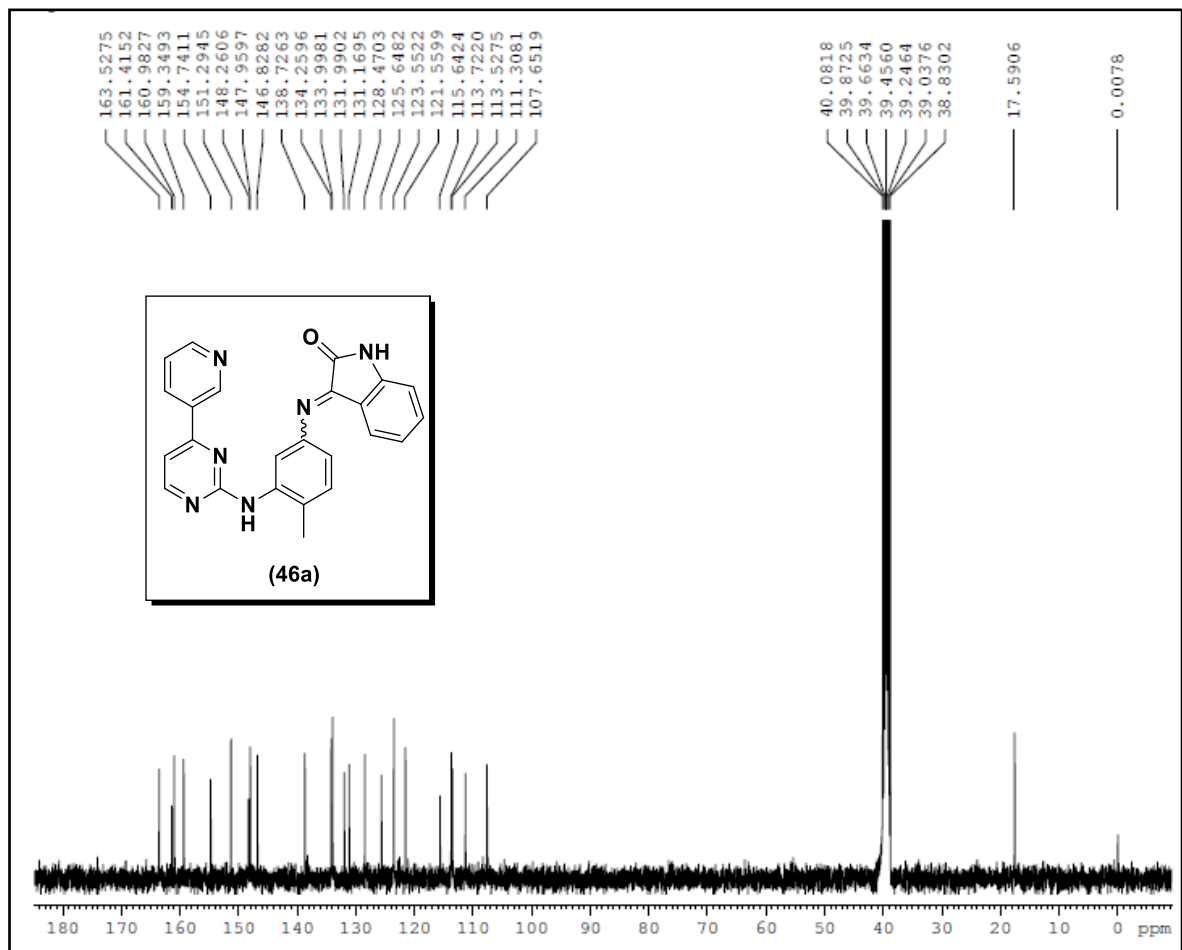
Espectro de IV da molécula **46a**



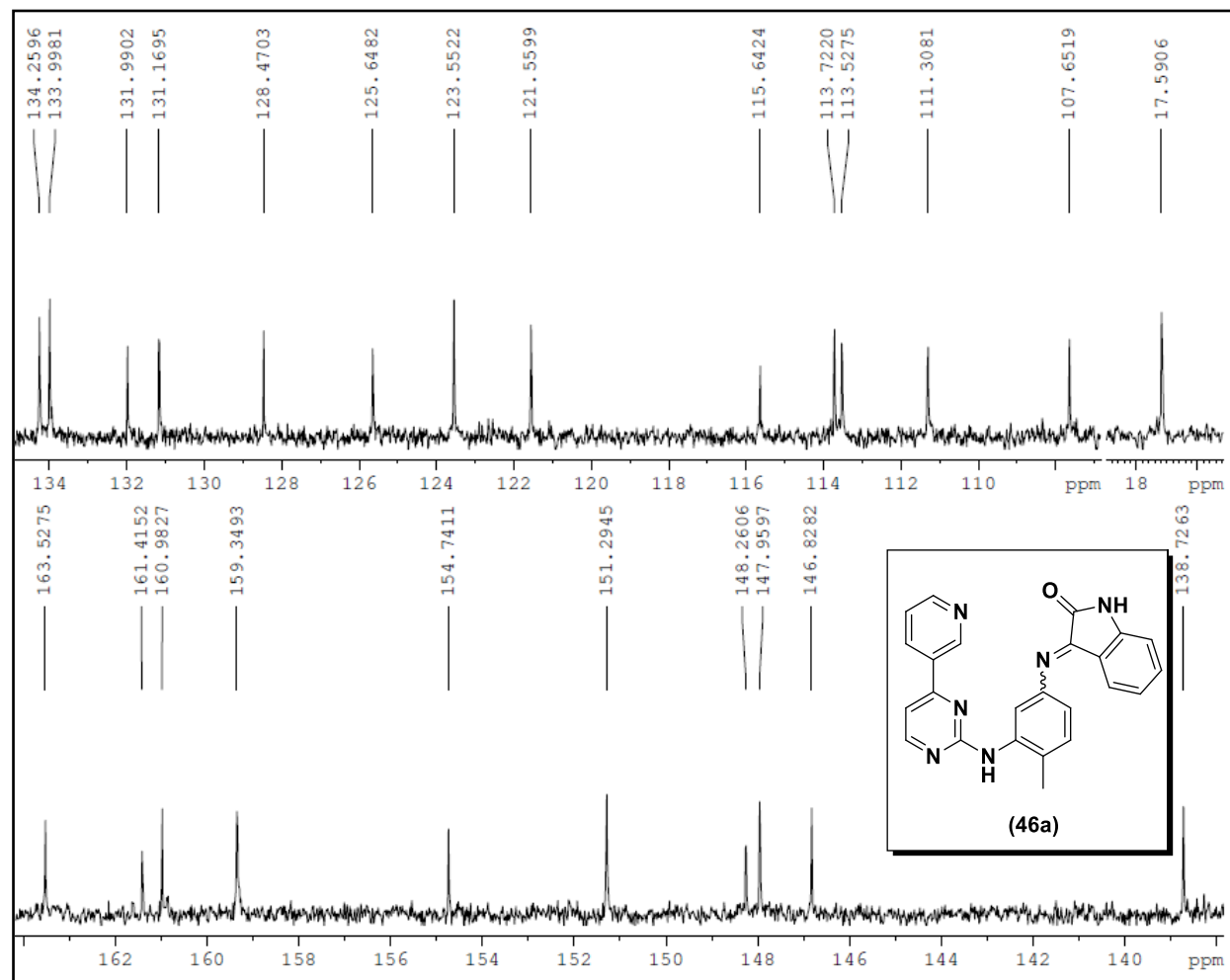
Espectro de RMN ¹H da molécula **46a**



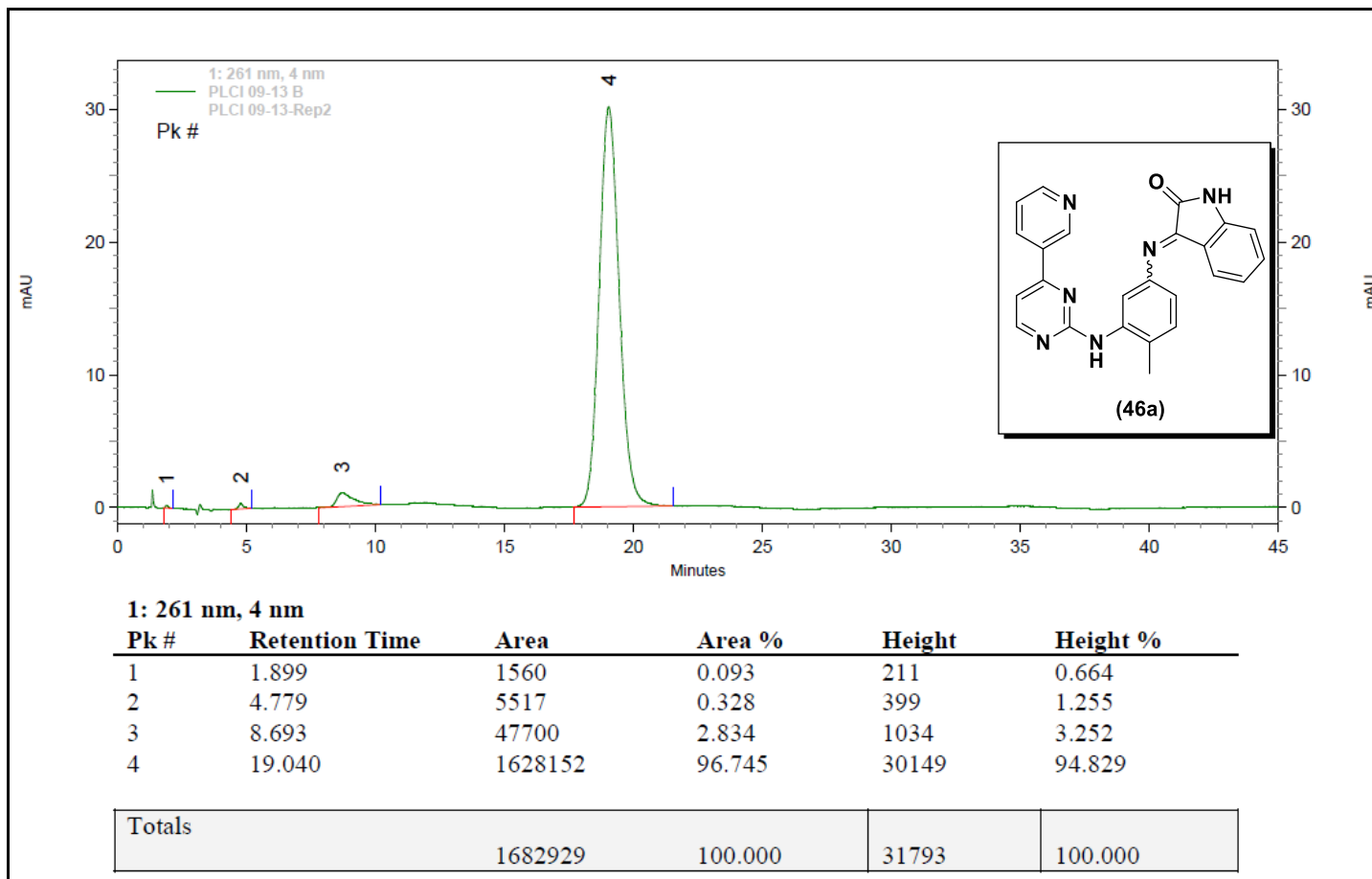
Expansão do espectro de RMN ¹H da molécula **46a**



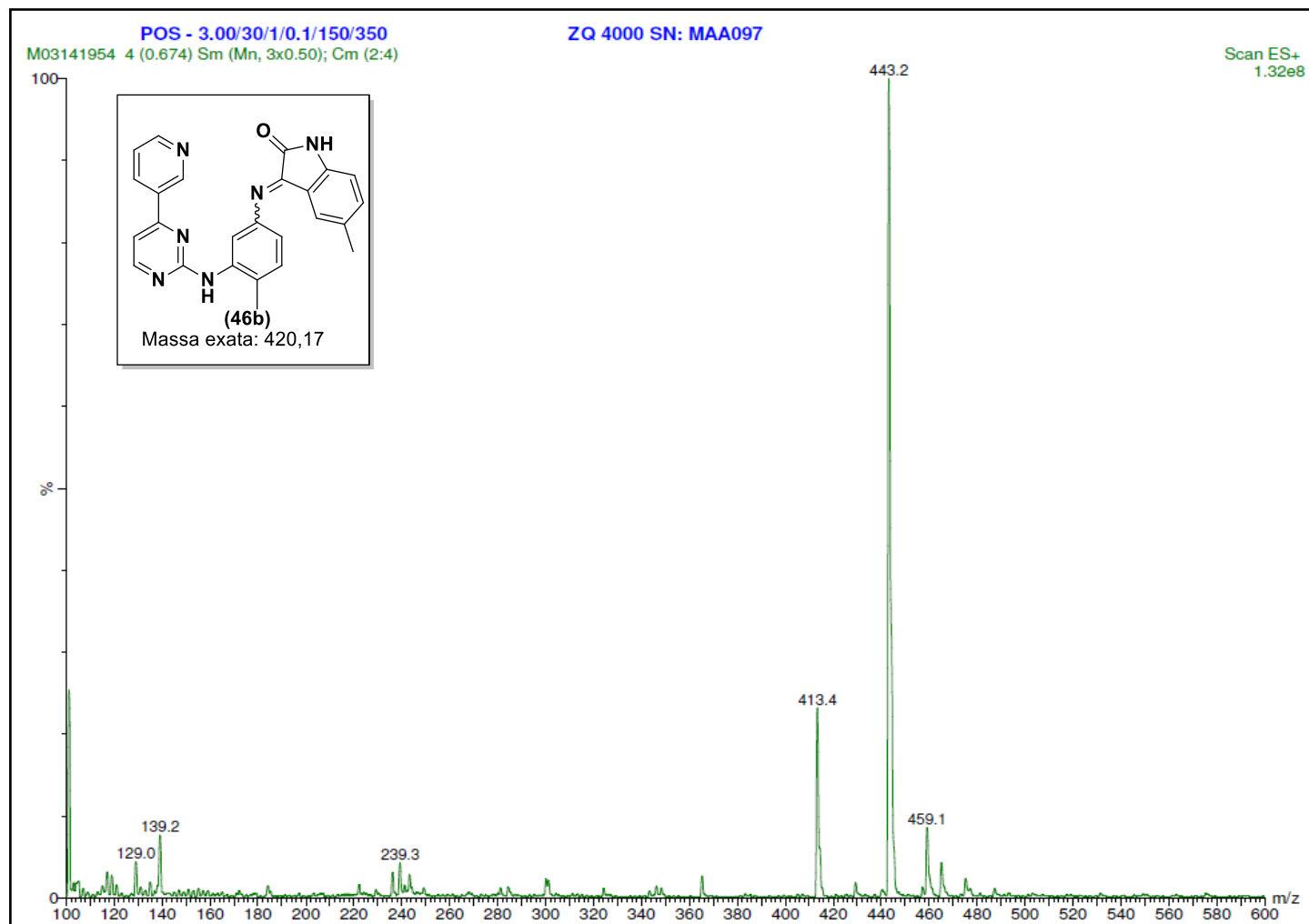
Espectro de RMN ¹³C da molécula **46a**



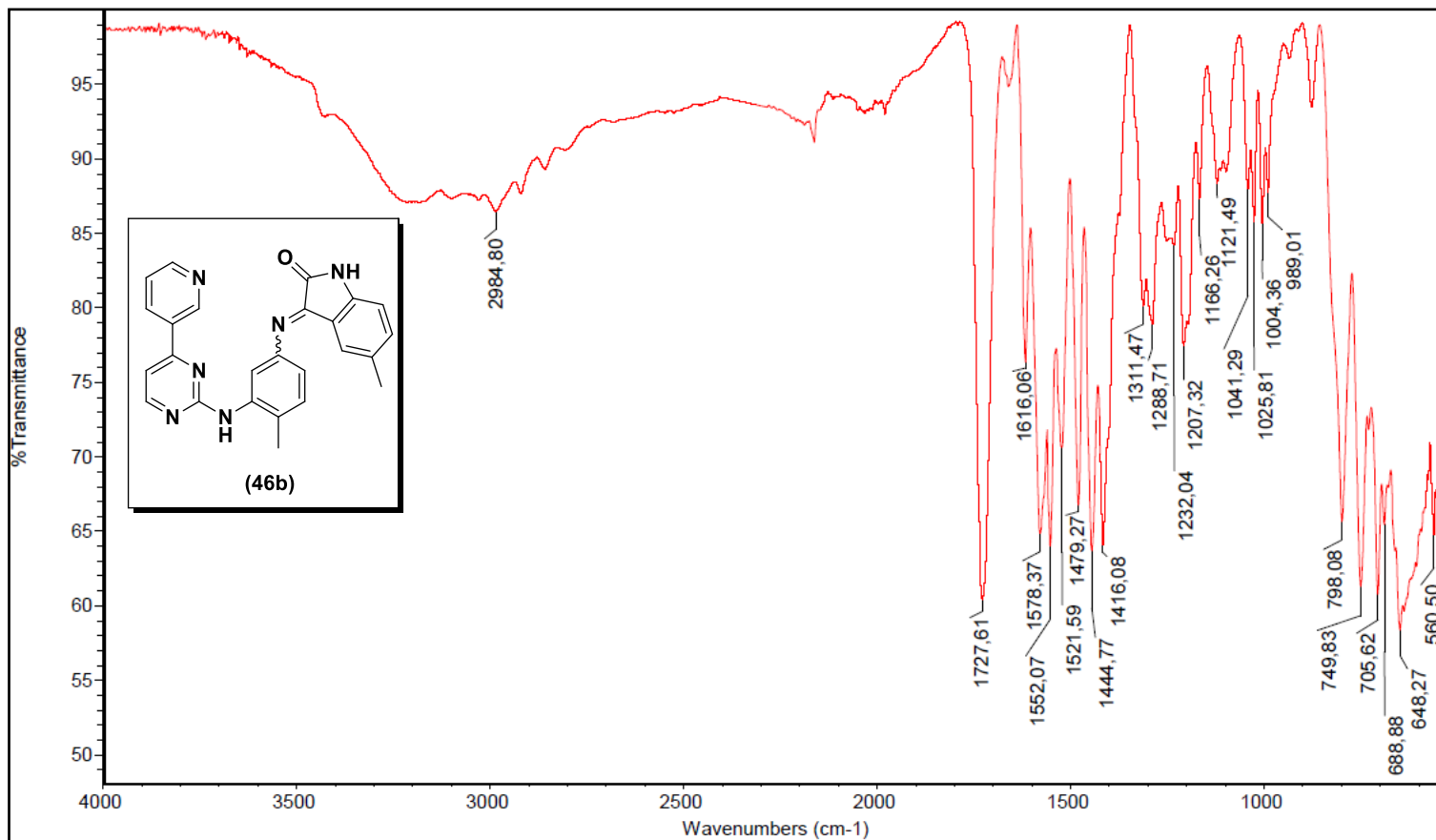
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **46a**



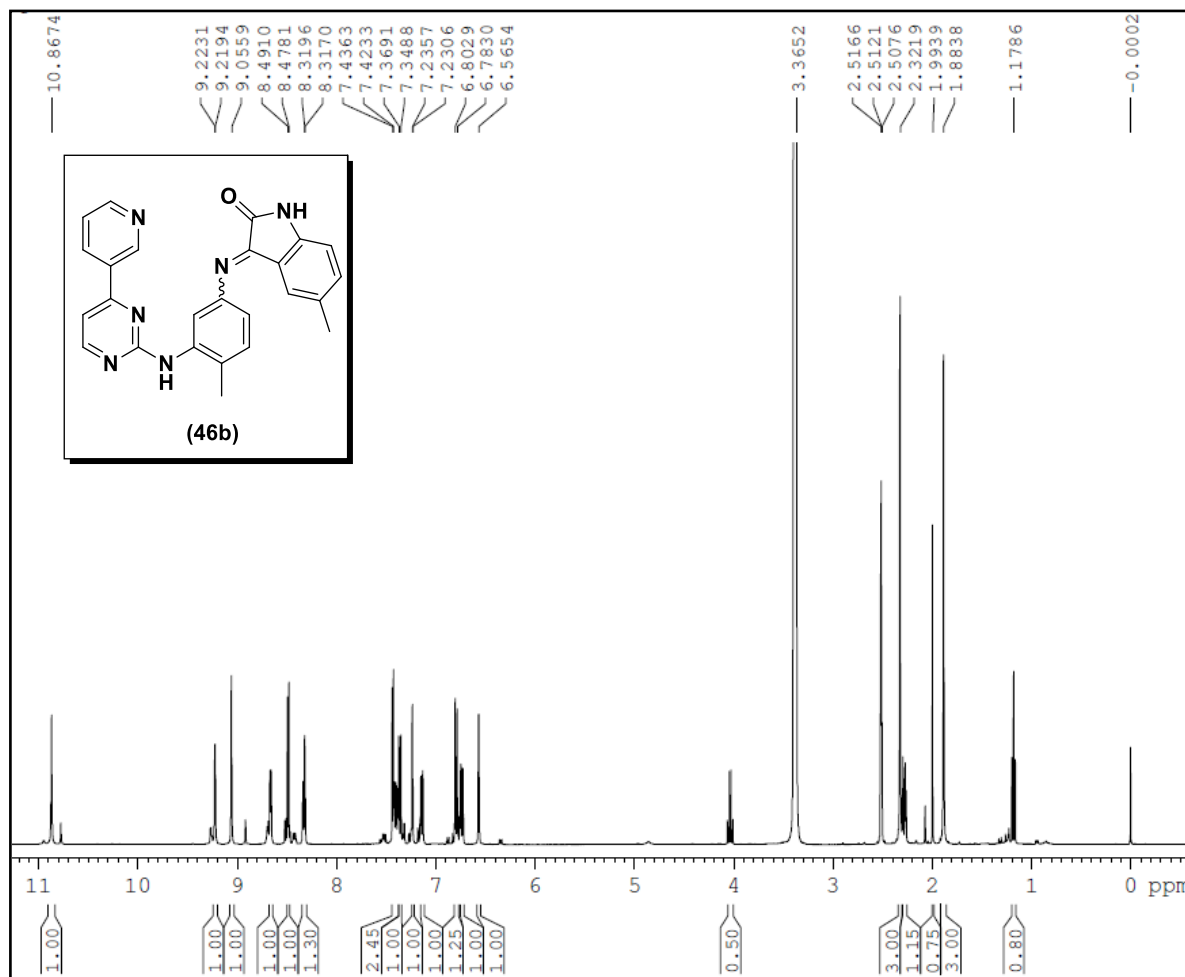
Cromatograma da molécula 46a



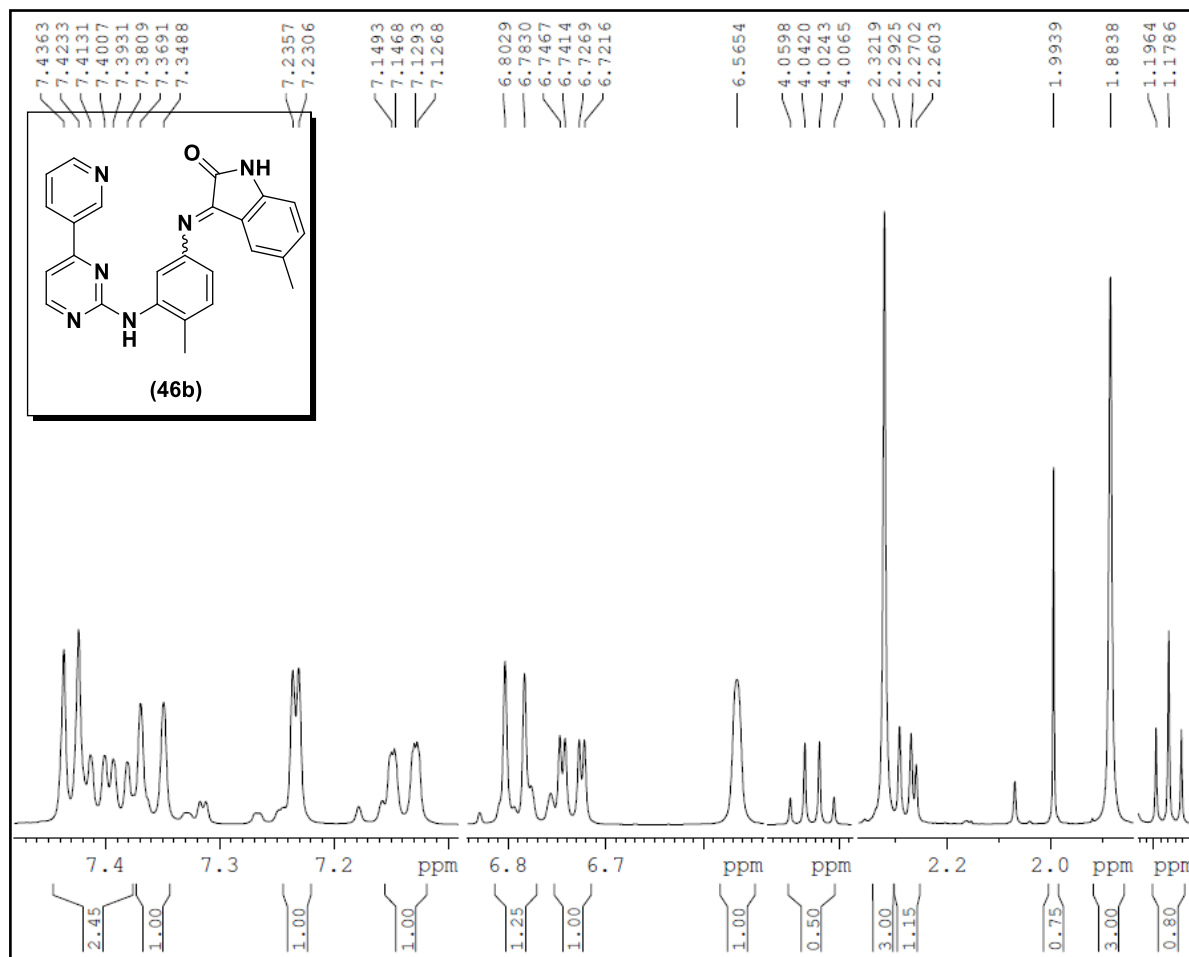
Espectro de (EM-IES $[M+Na]^+$) da molécula **46b**



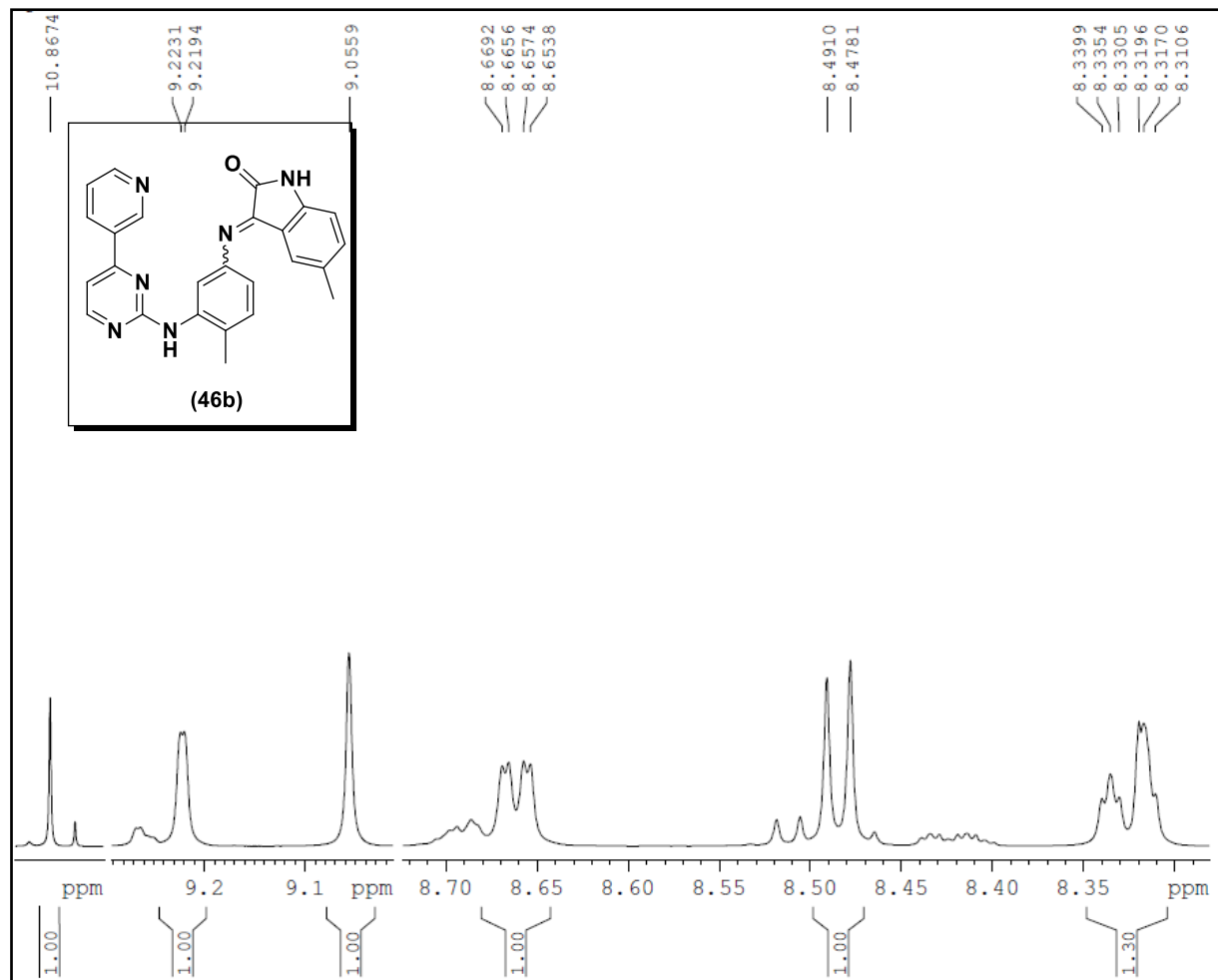
Espectro de IV da molécula **46b**



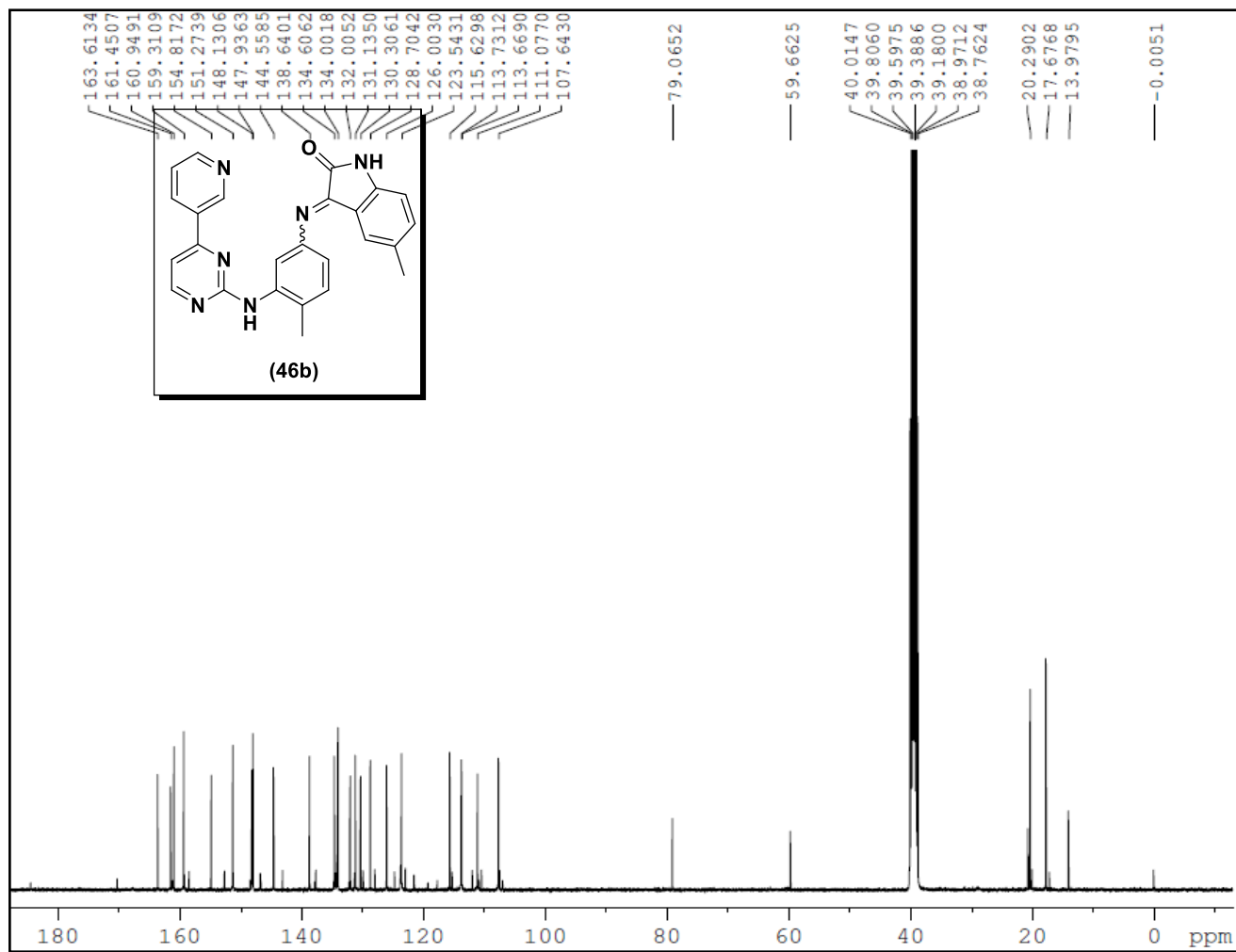
Espectro de RMN ¹H da molécula **46b**



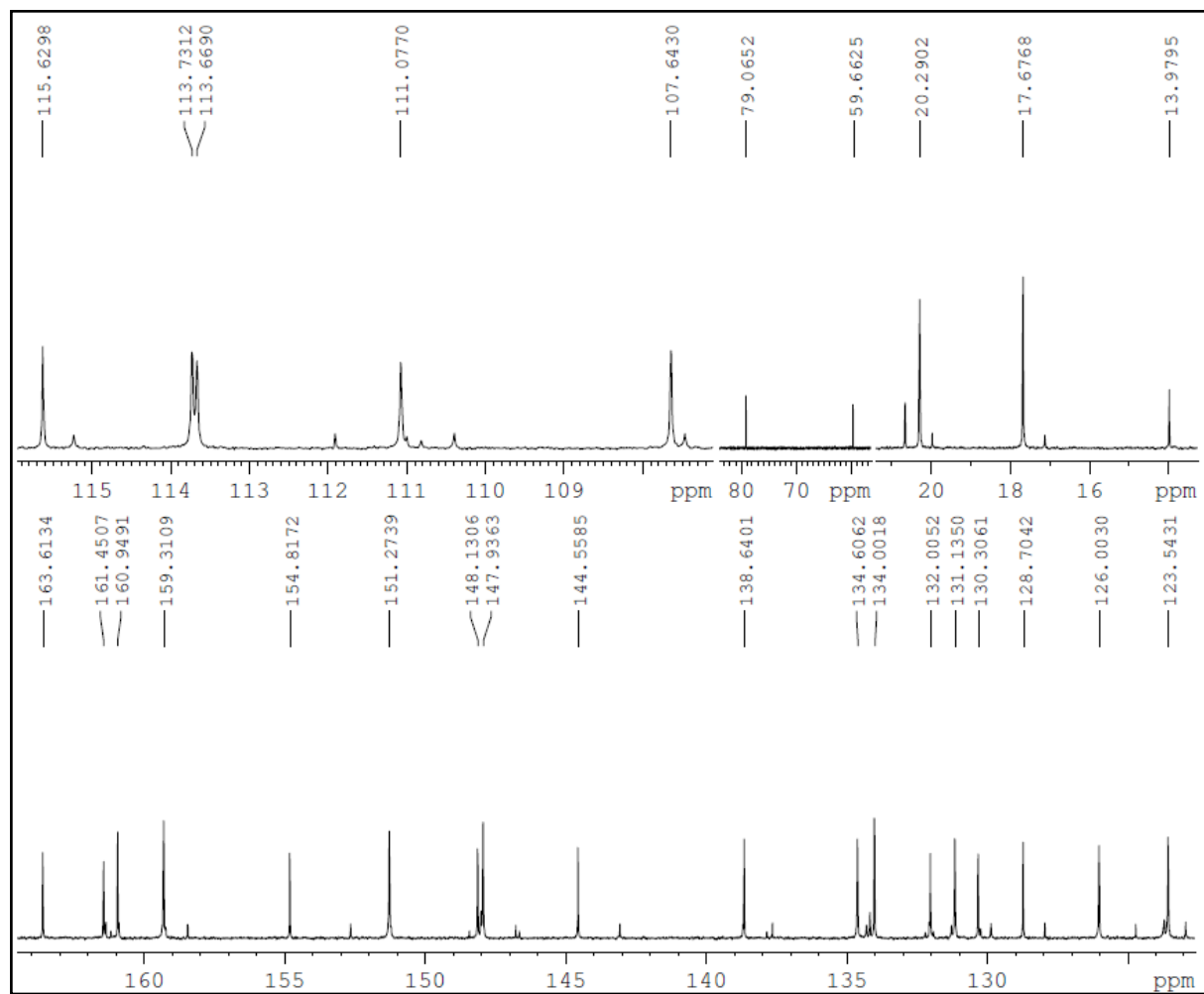
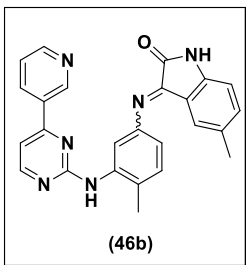
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **46b**



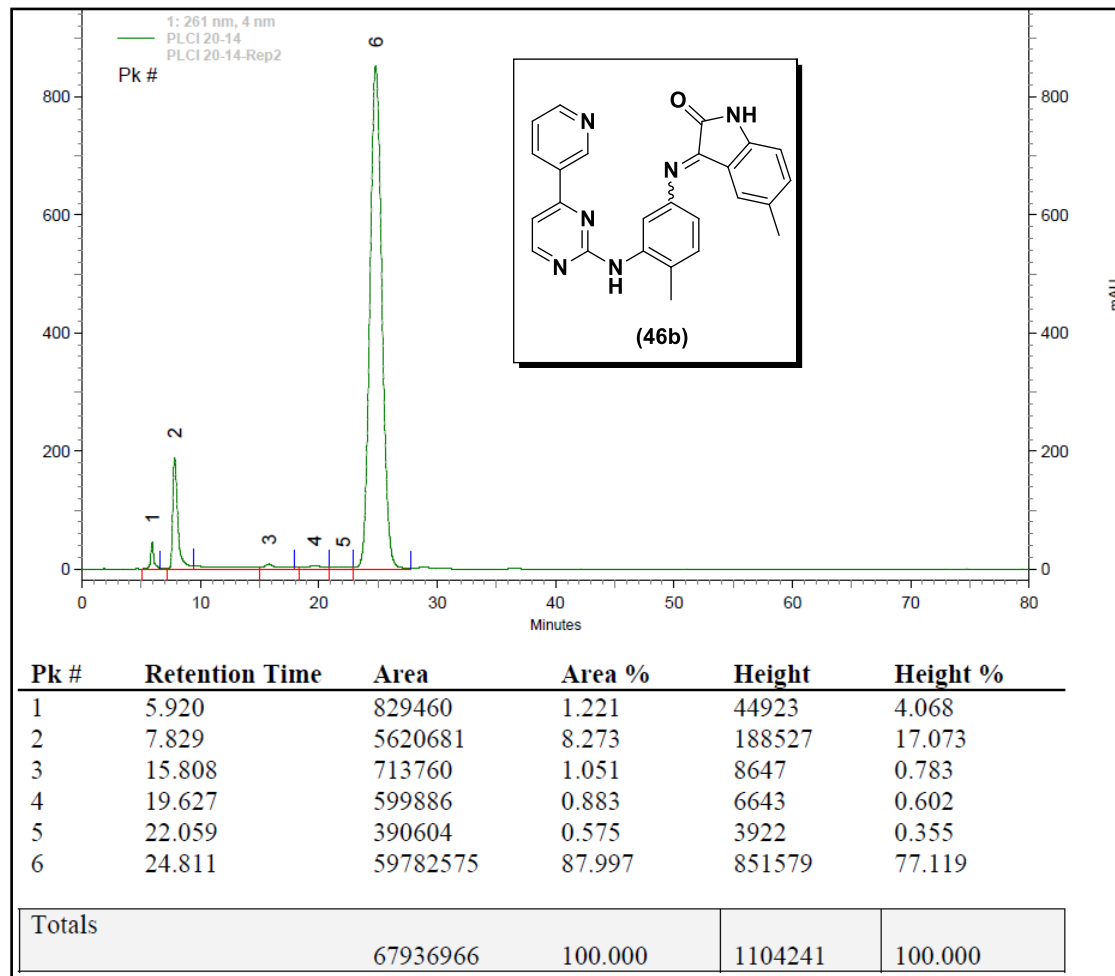
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **46b**



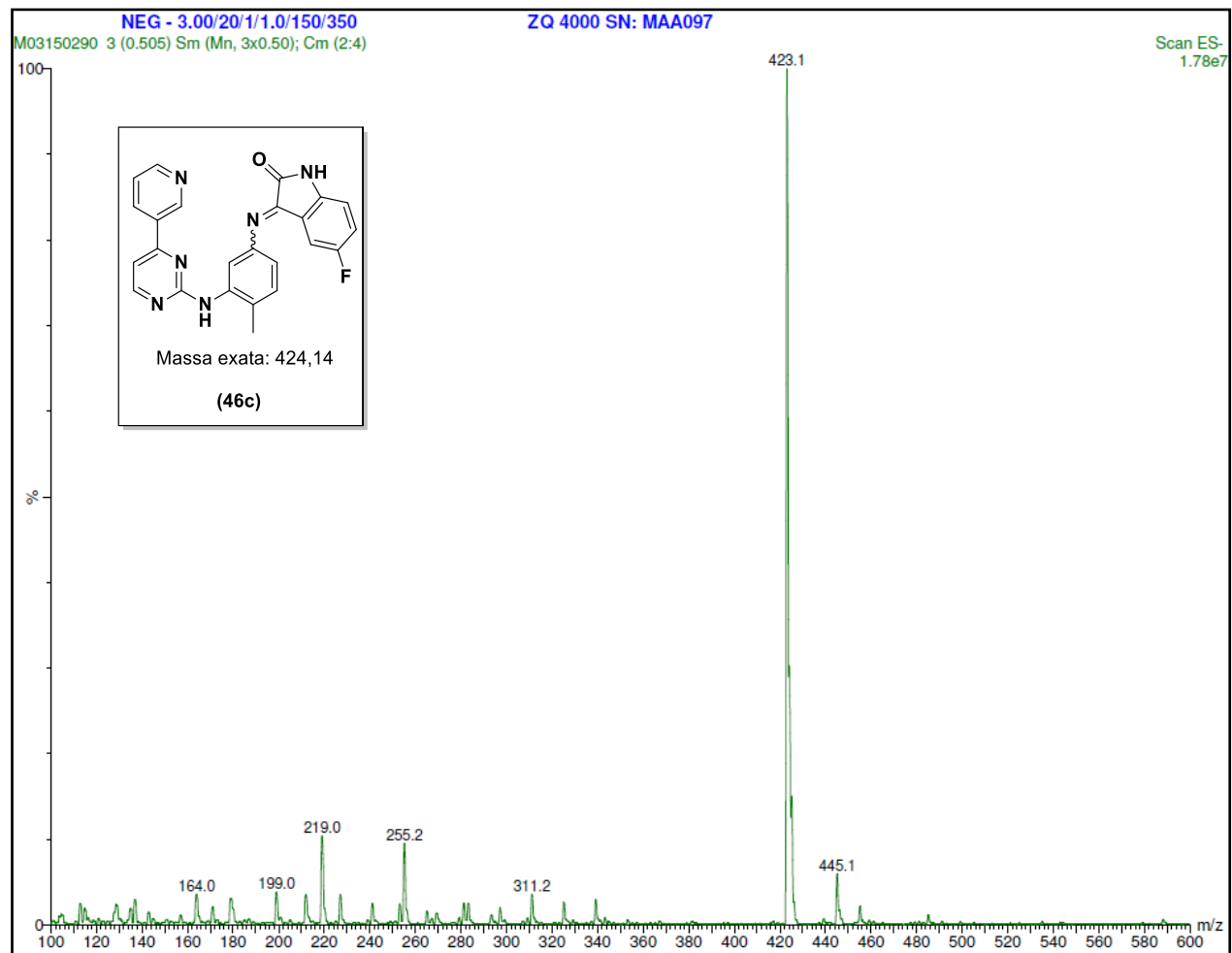
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **46b**



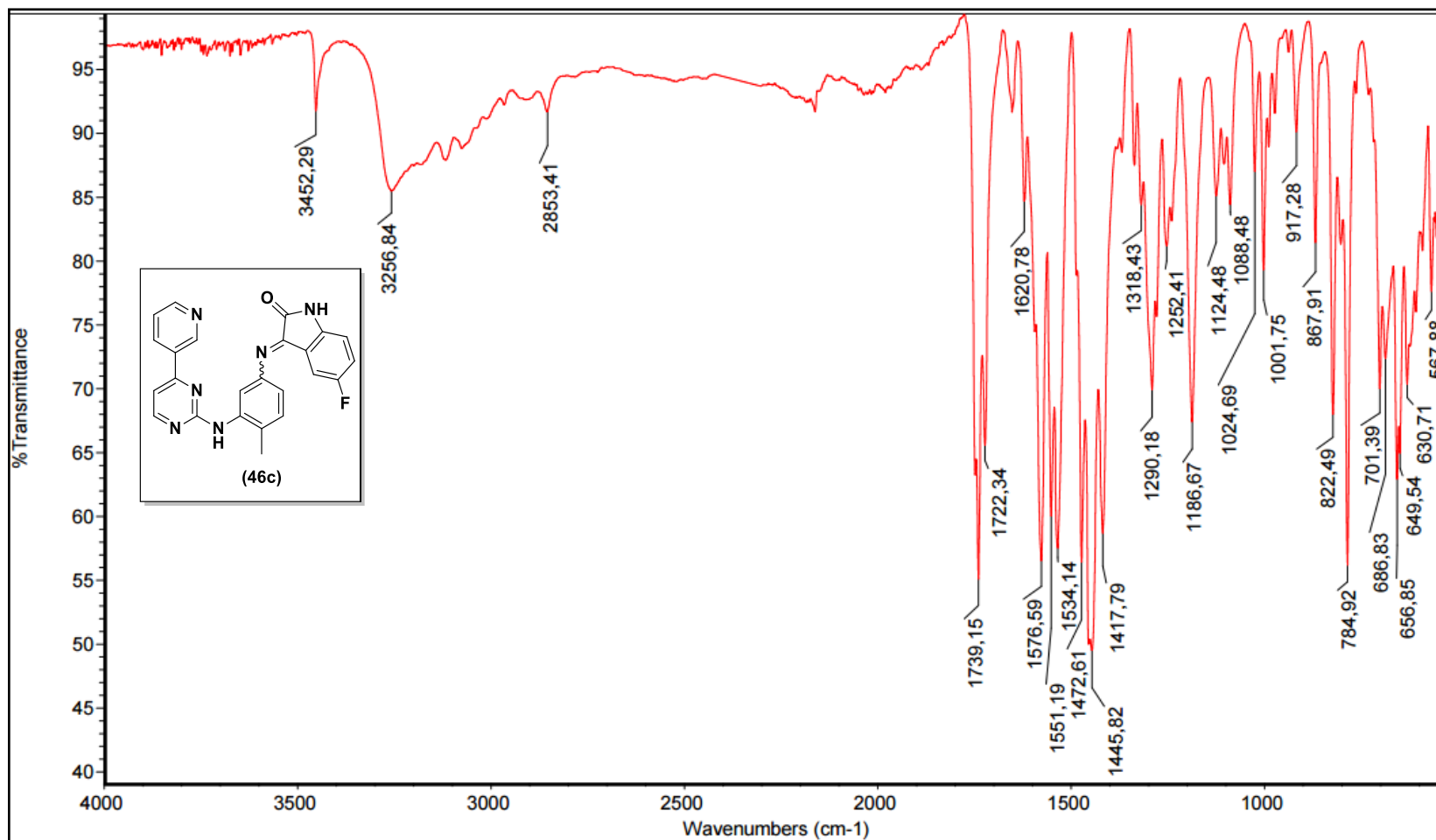
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **46b**



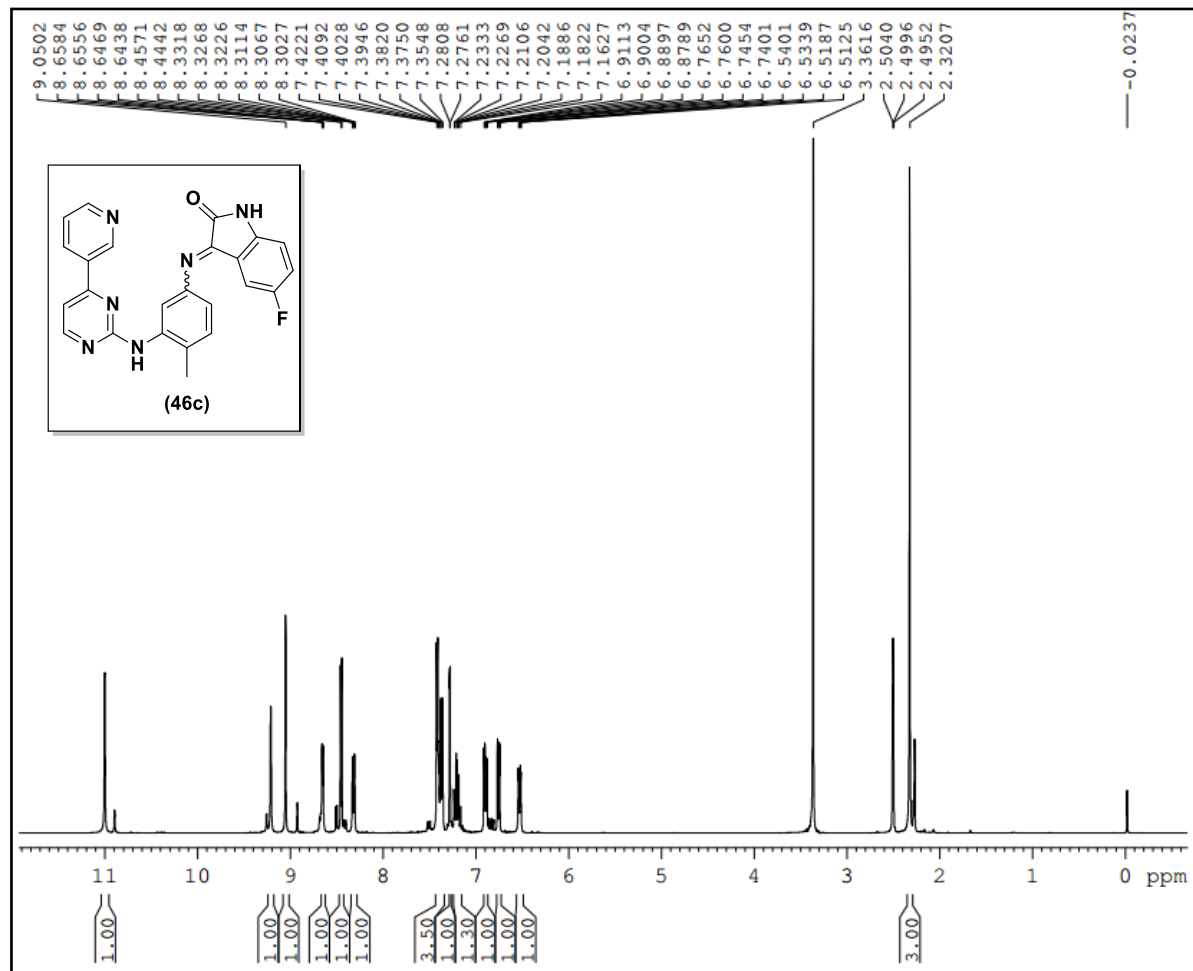
Cromatograma da molécula **46b**



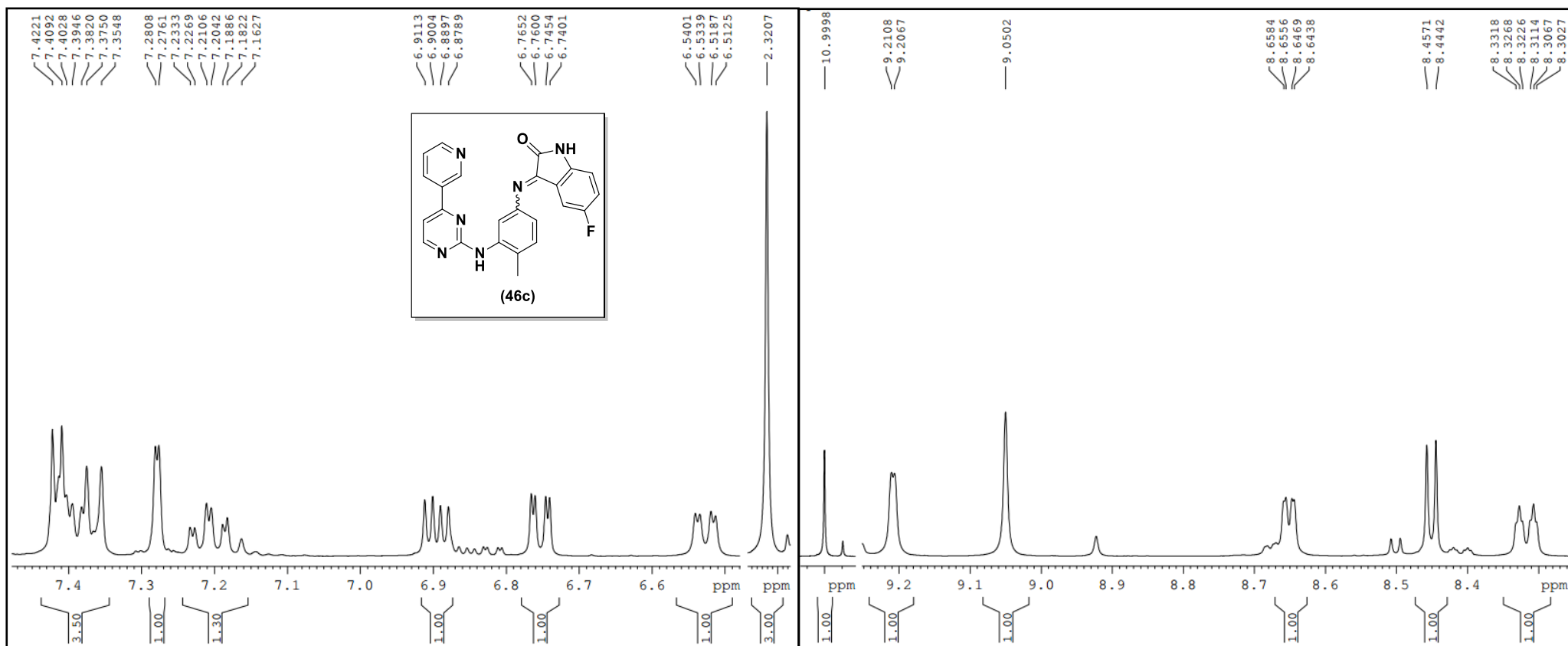
Espectro de (EM-IES $[M-1]^+$) da molécula **46c**



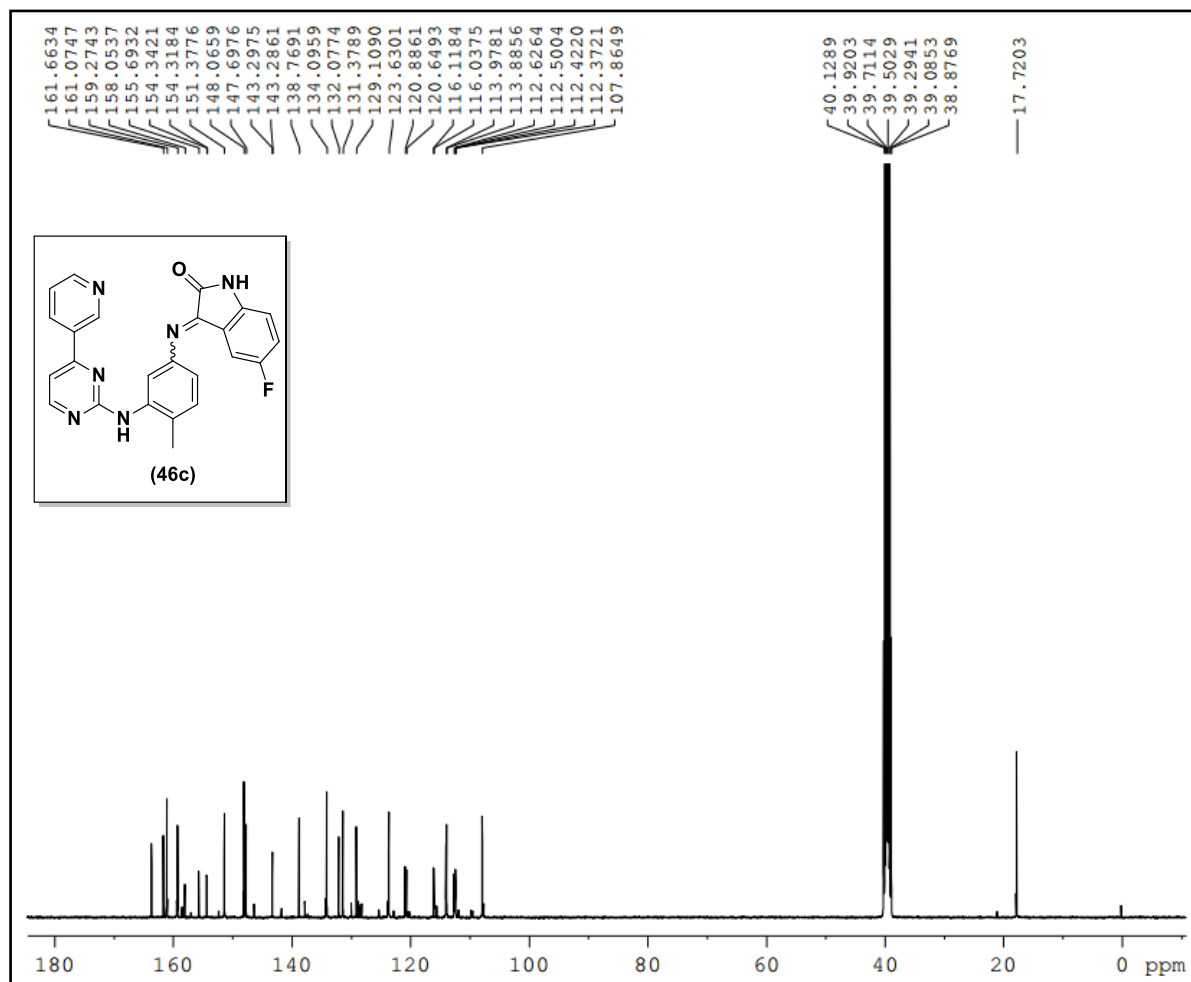
Espectro de IV da molécula **46c**



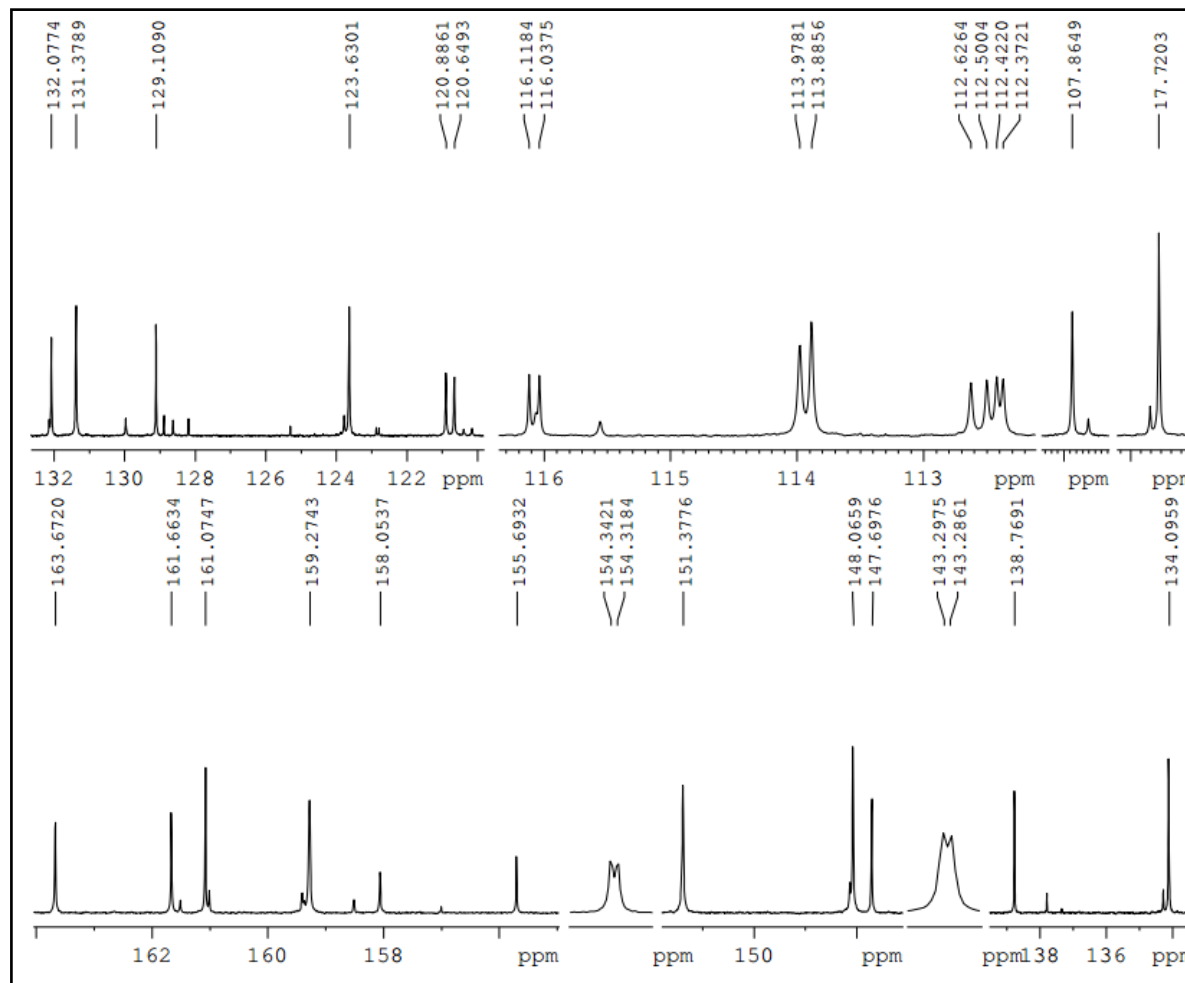
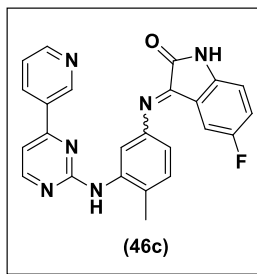
Espectro de RMN ^1H da molécula **46c**



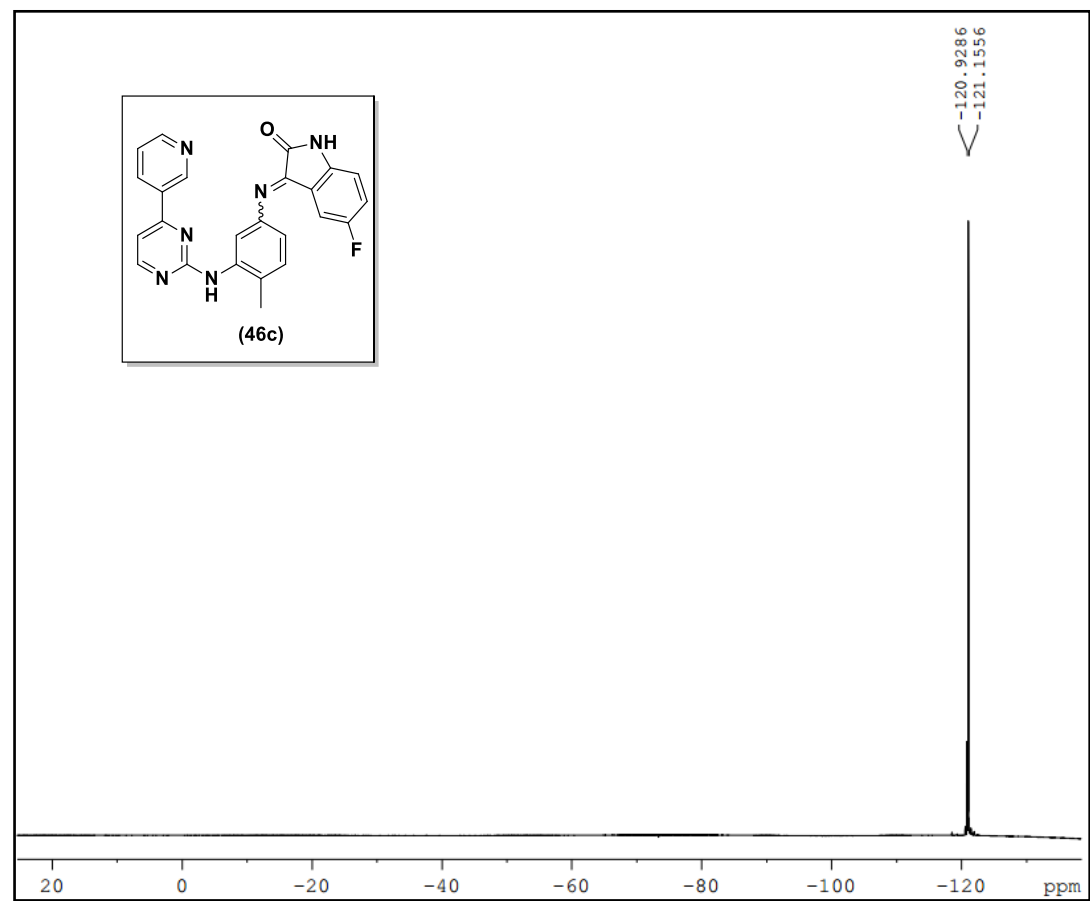
Expansões do espectro de RMN ^1H da molécula **46c**



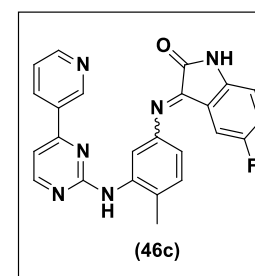
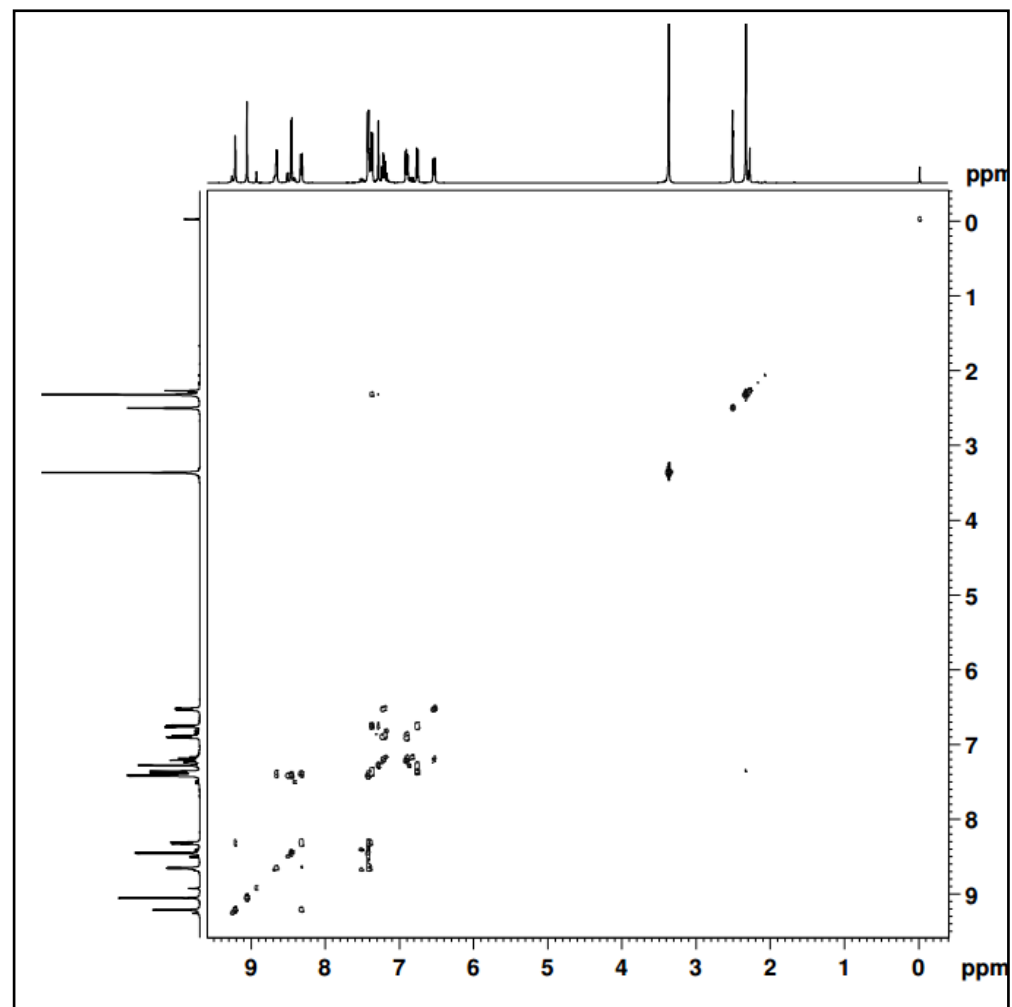
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **46c**



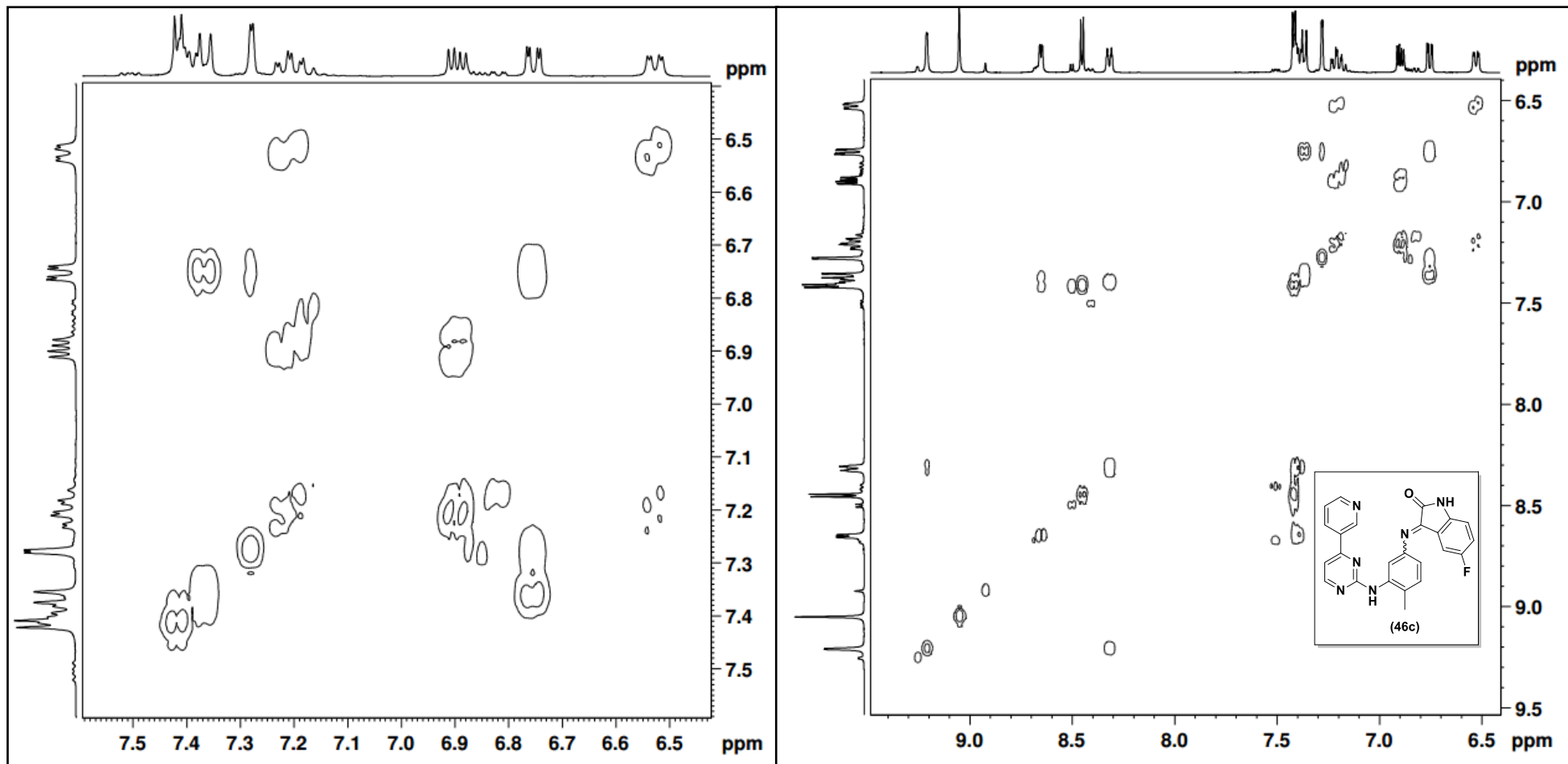
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **46c**



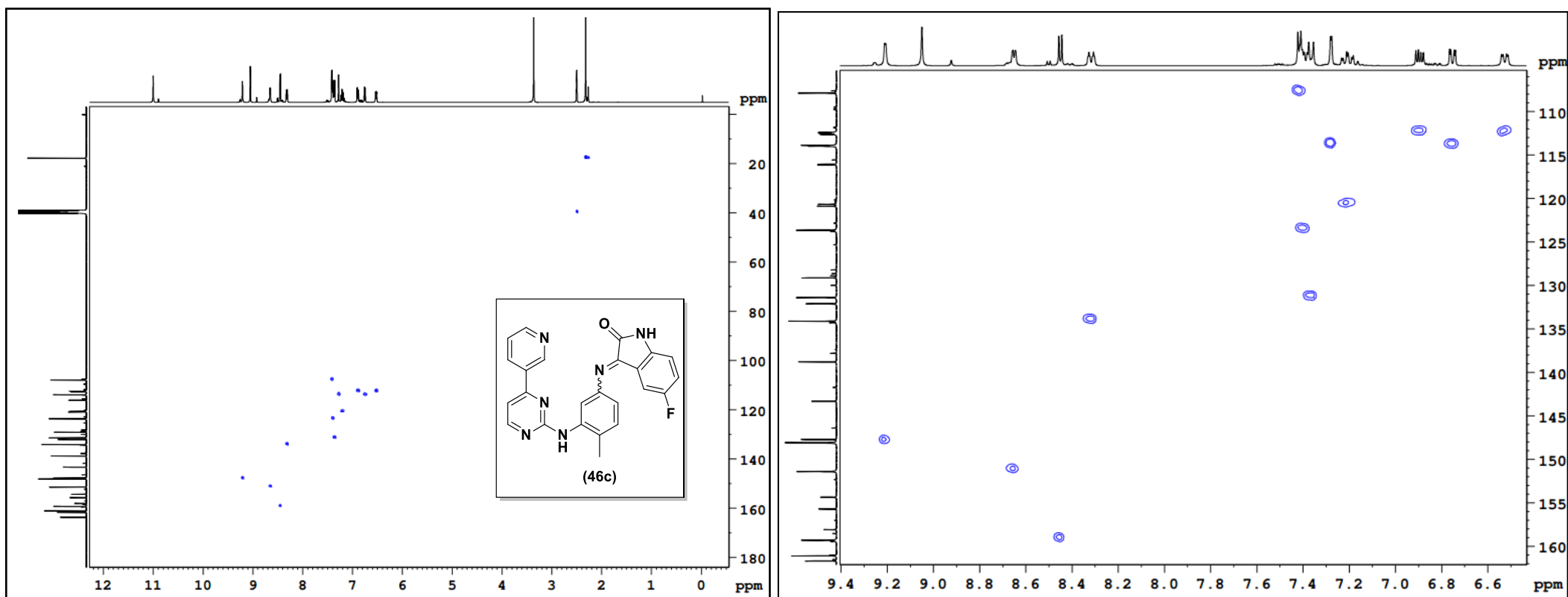
Espectro de RMN ^{19}F da molécula **46c**



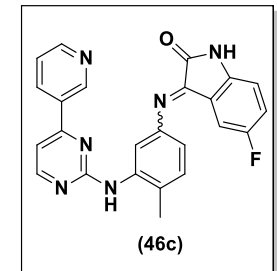
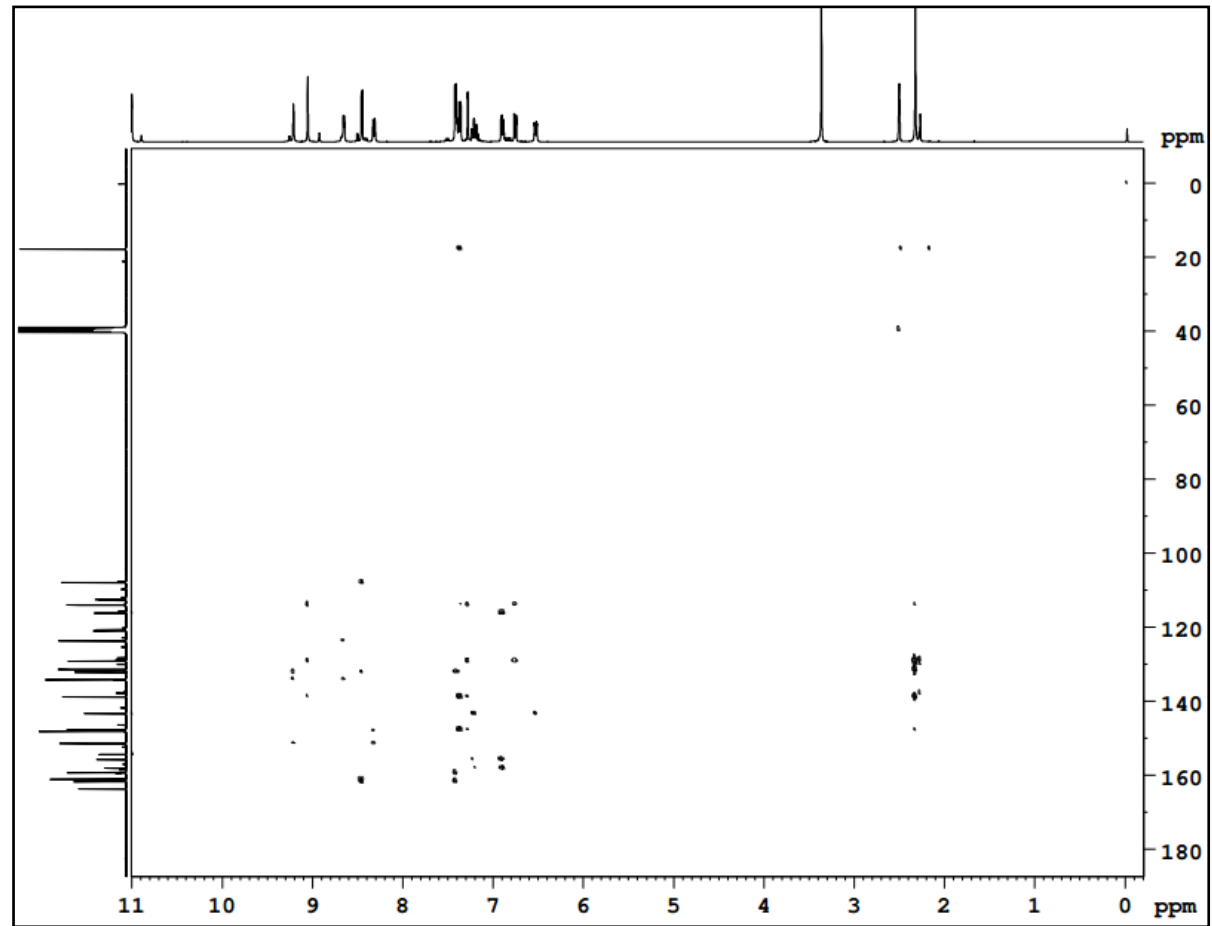
Espectro de RMN de 2D-COSY da molécula **46c**



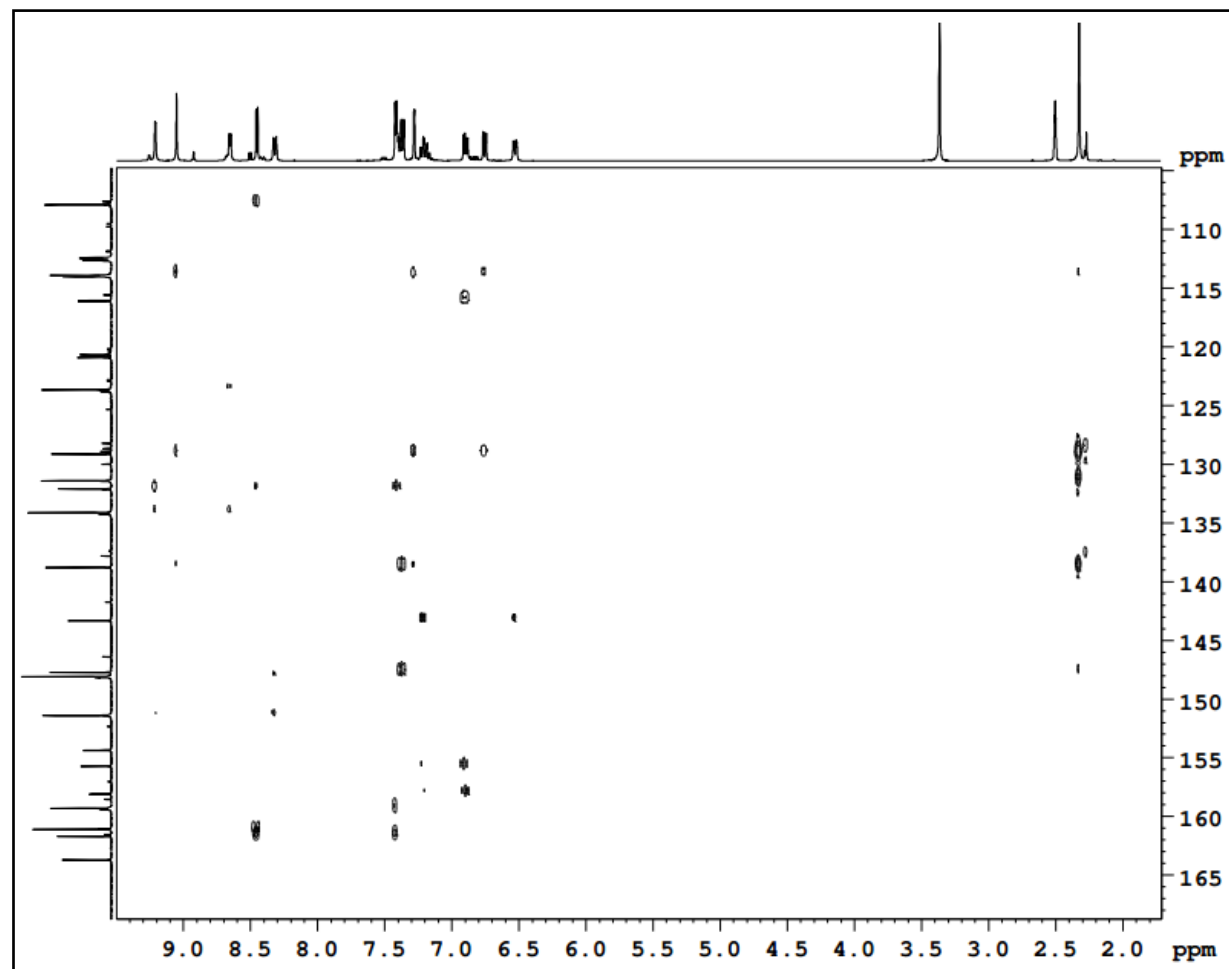
Expansões do espectro de RMN de 2D-COSY da molécula **46c**



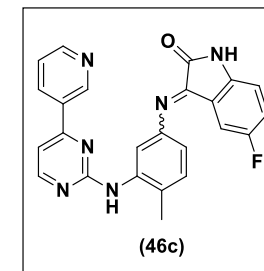
Espectro e expansão de RMN de HSQC da molécula **46c**

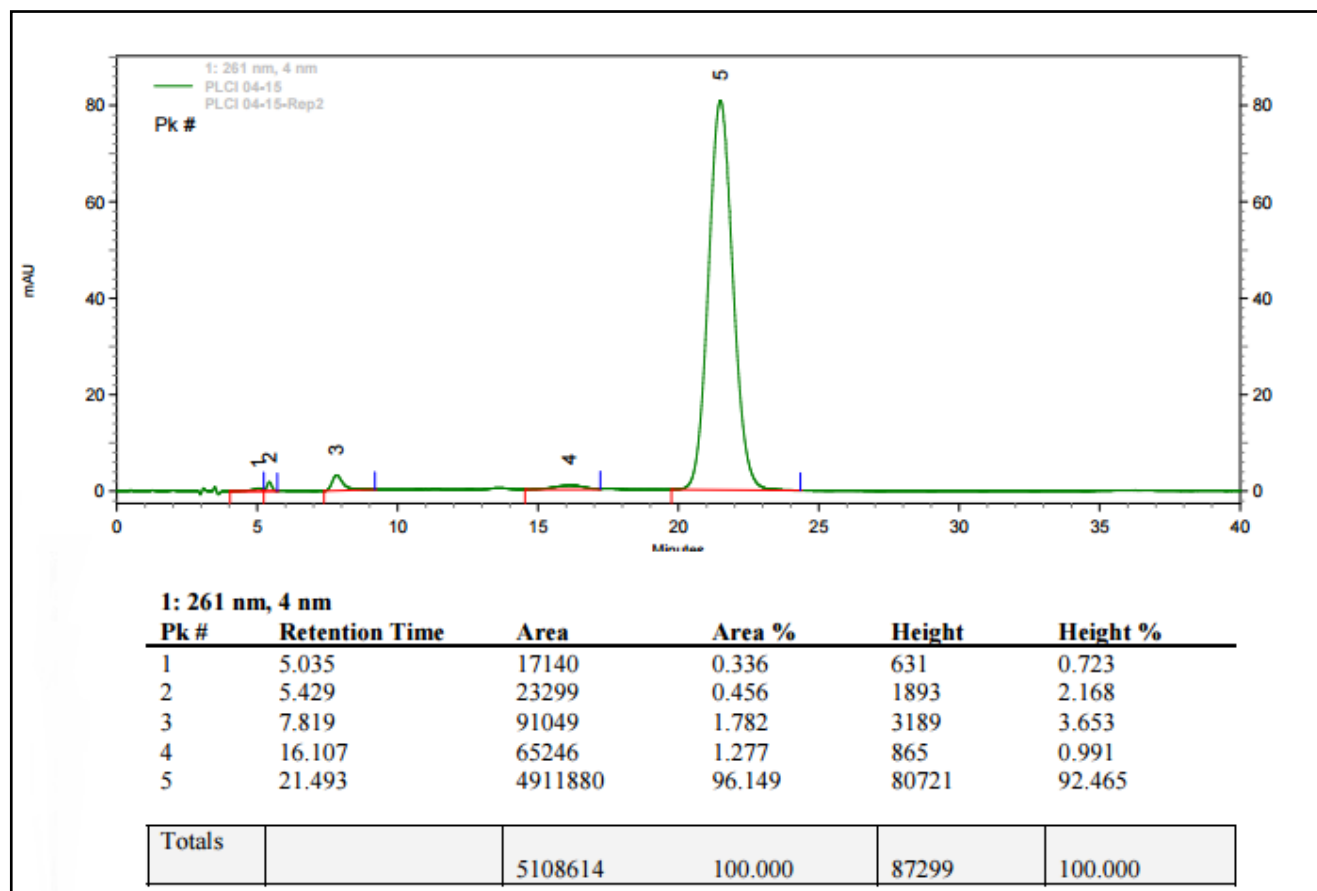


Espectro de RMN de 2D-HMBC da molécula **46c**

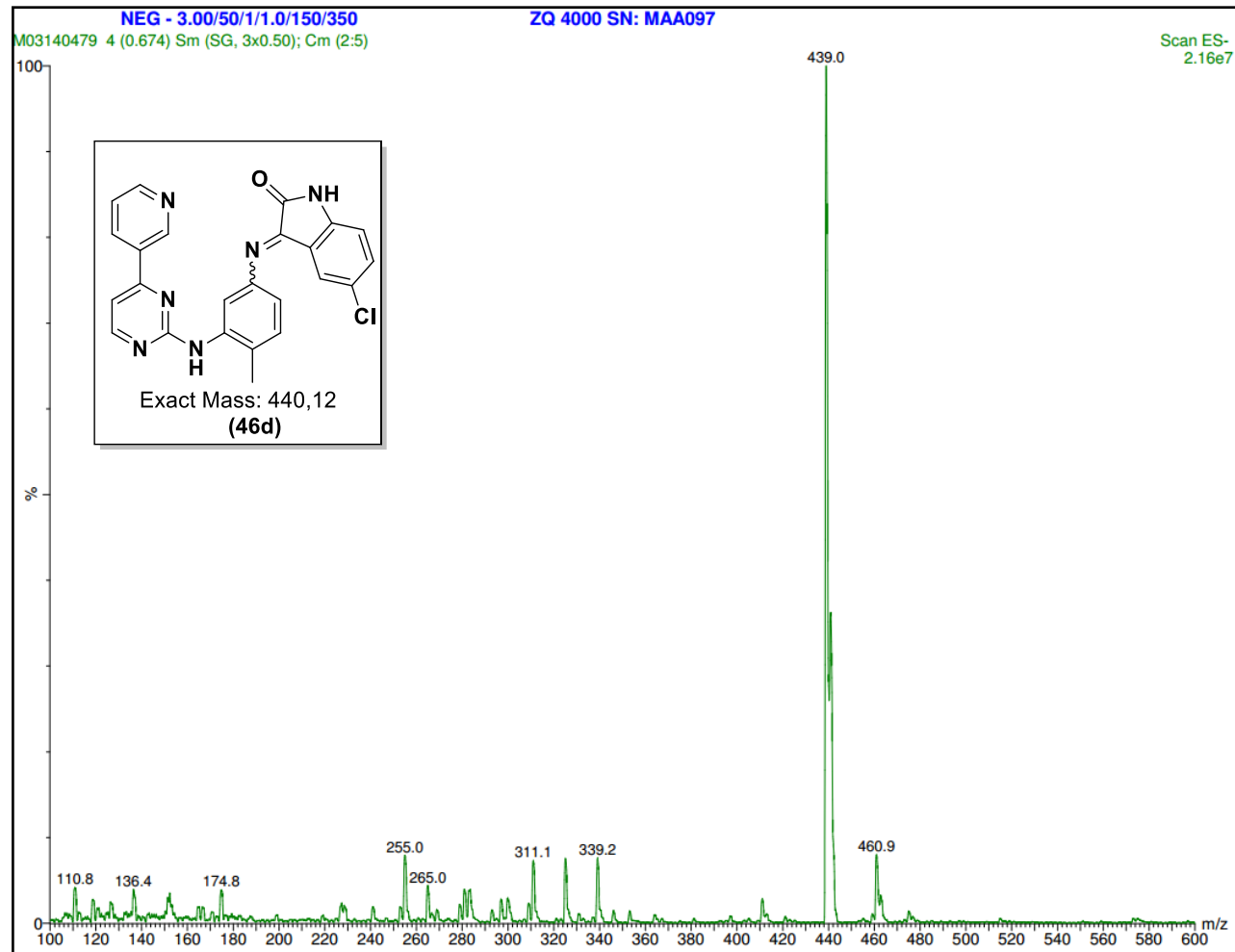


Expansão do espectro de RMN de 2D-HMBC da molécula **46c**

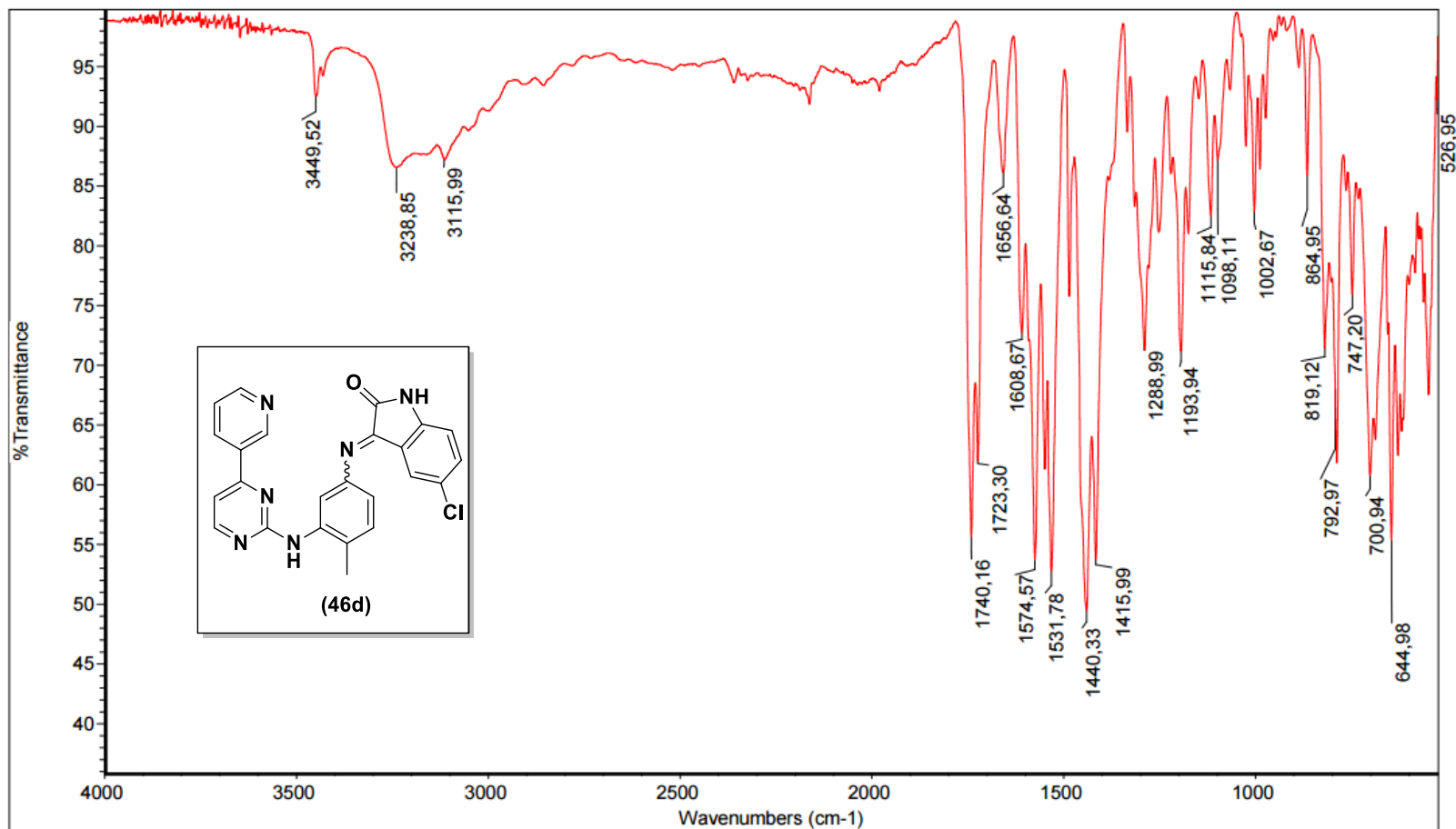




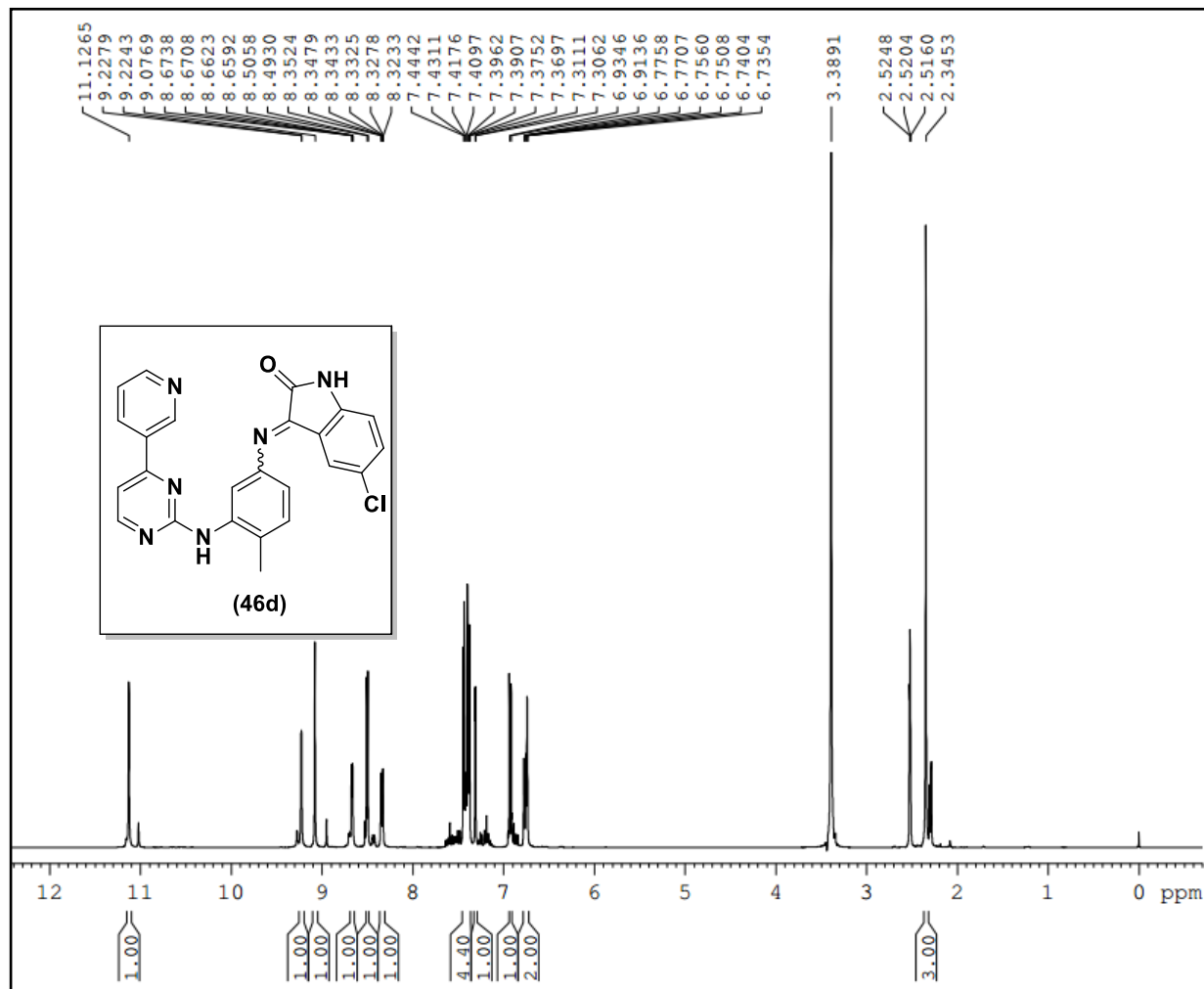
Cromatograma da molécula **46c**



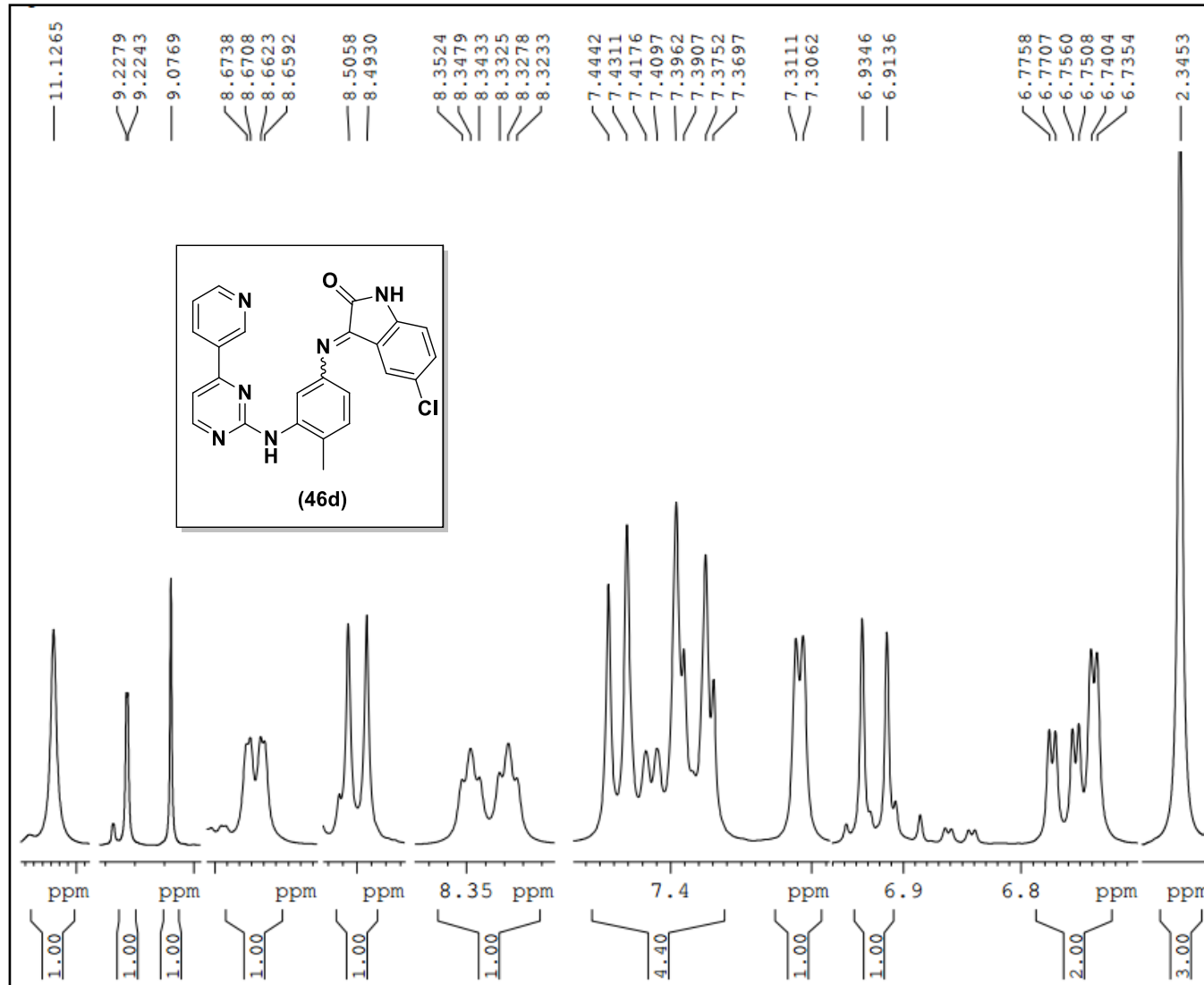
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **46d**



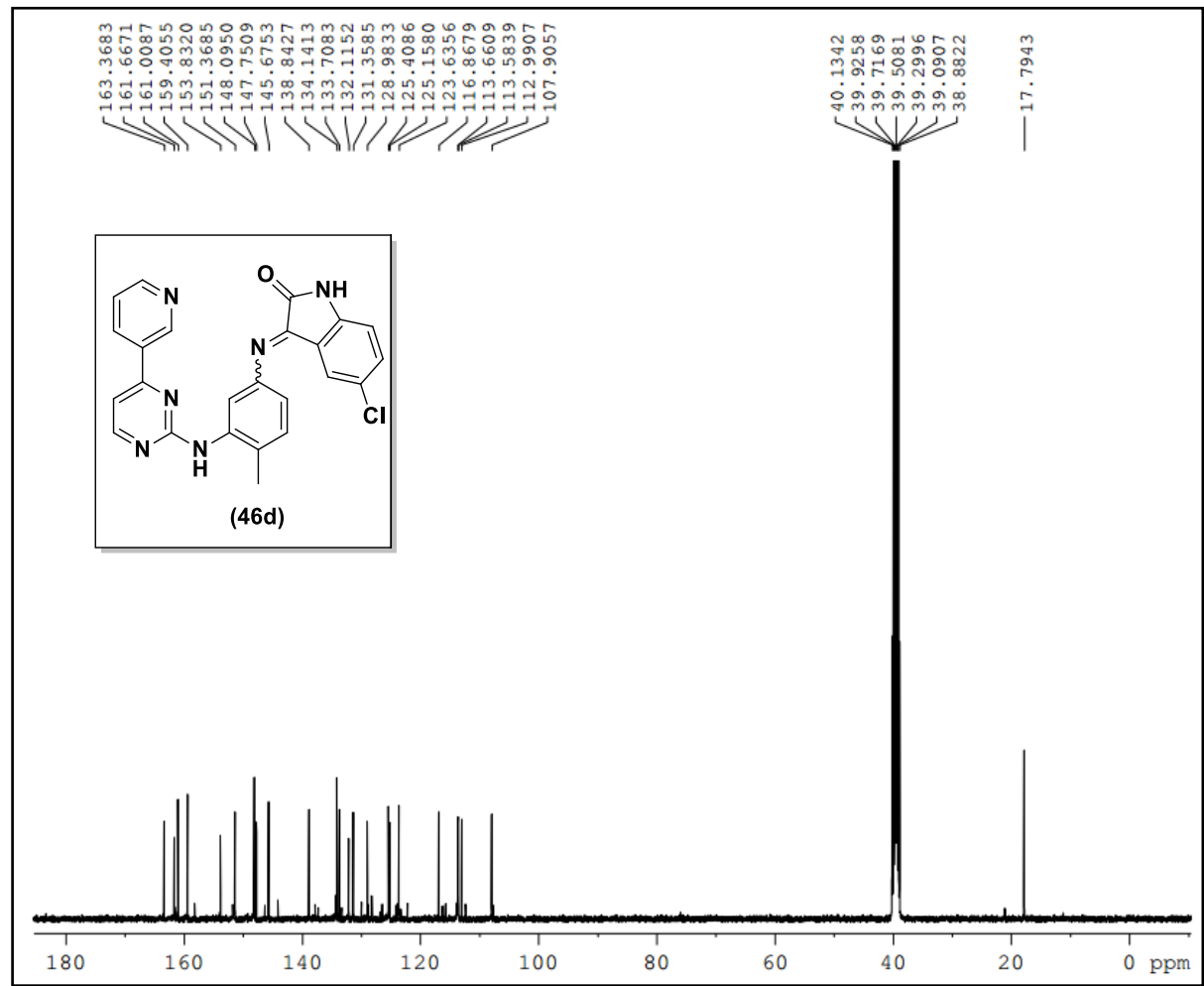
Espectro de IV da molécula **46d**



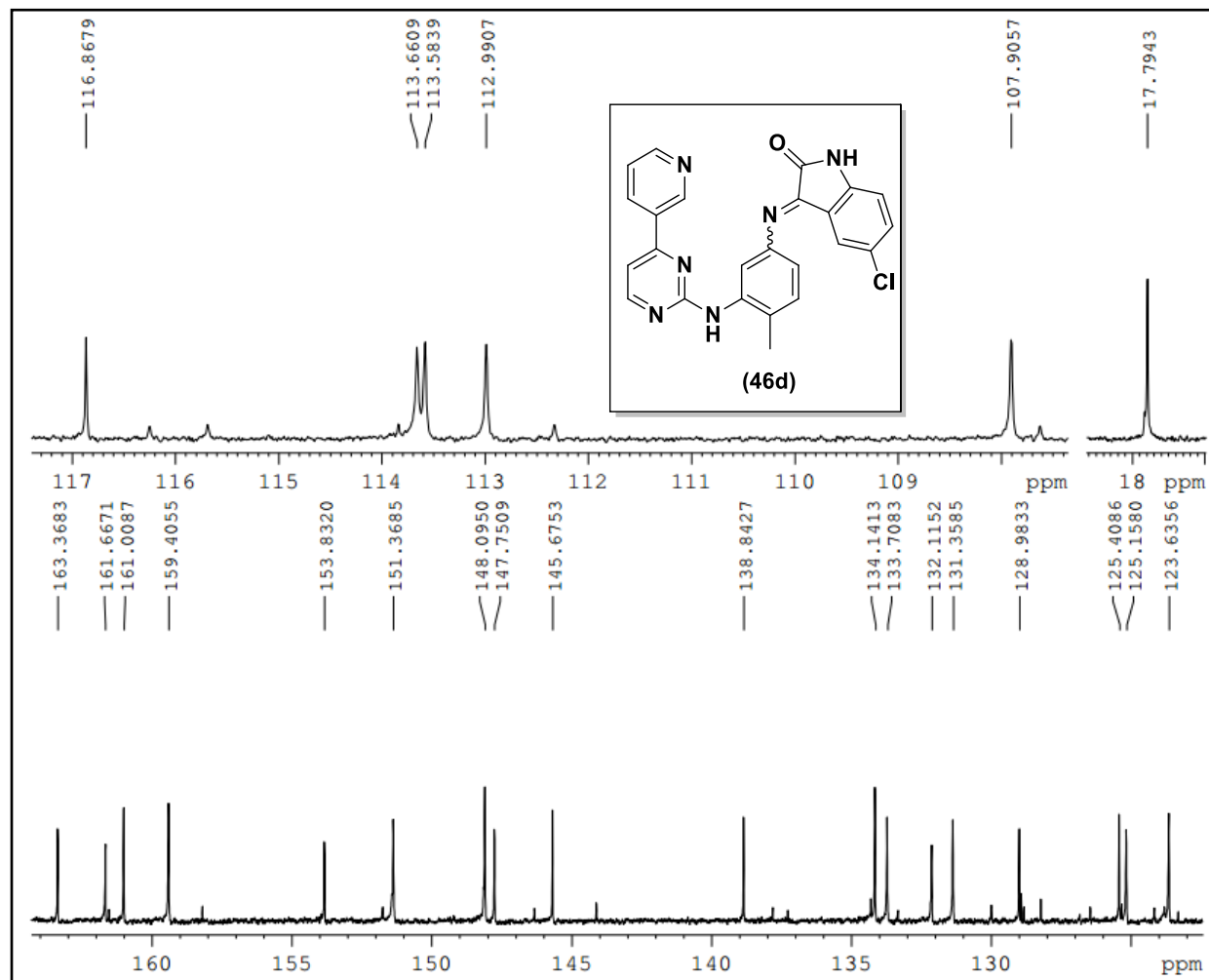
Espectro de RMN ^1H da molécula **46d**



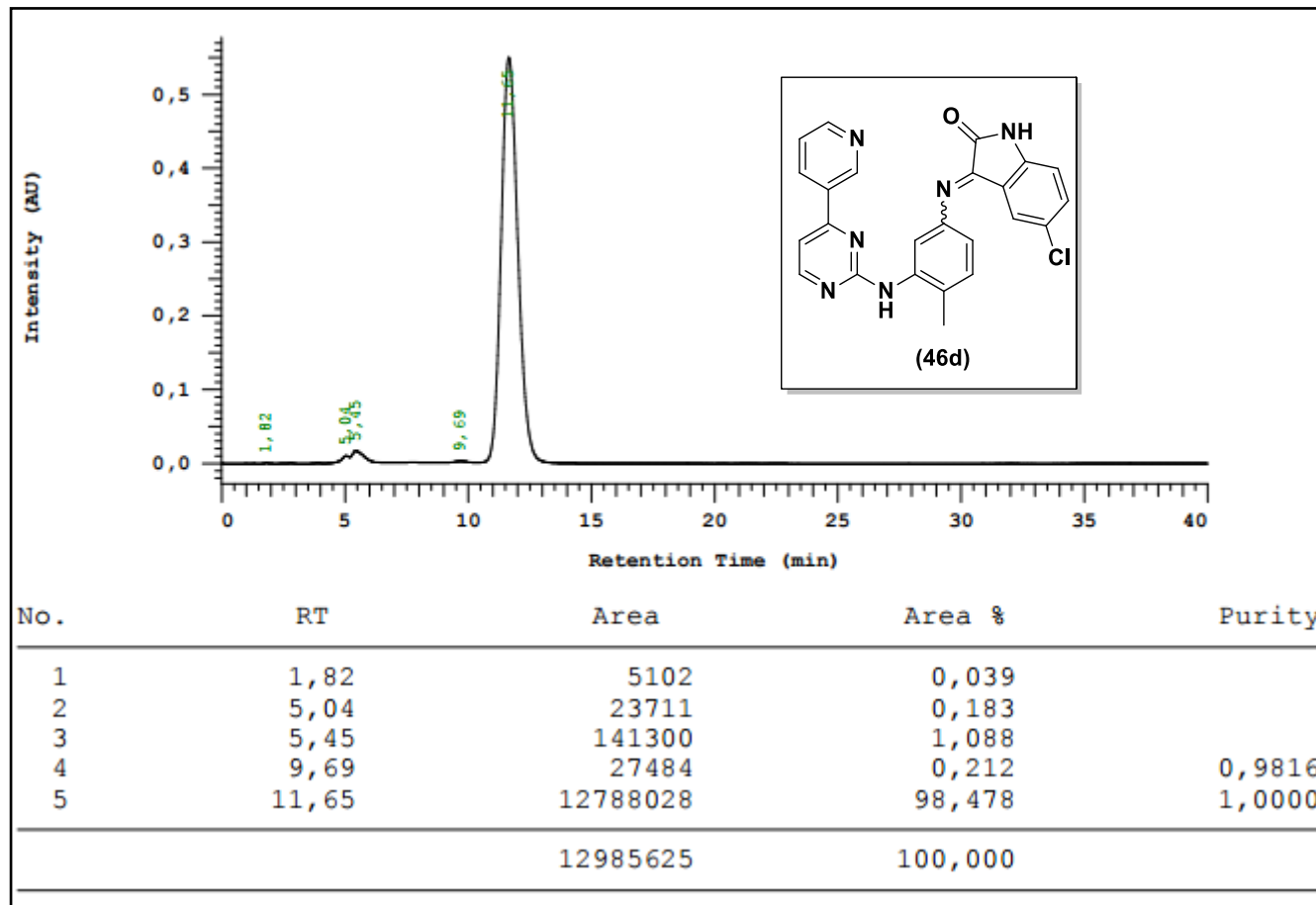
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **46d**



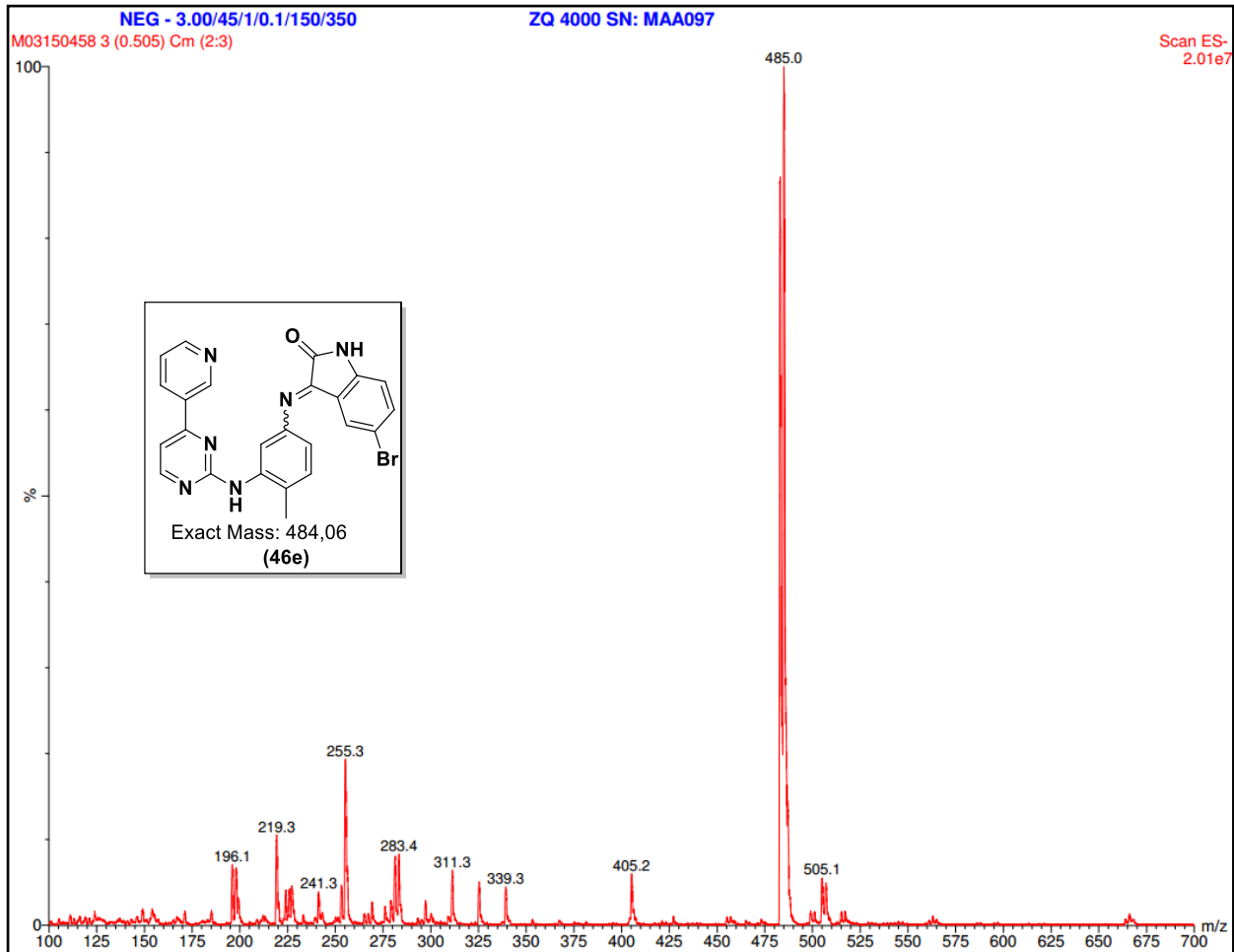
Espectro de RMN ¹³C da molécula **46d**



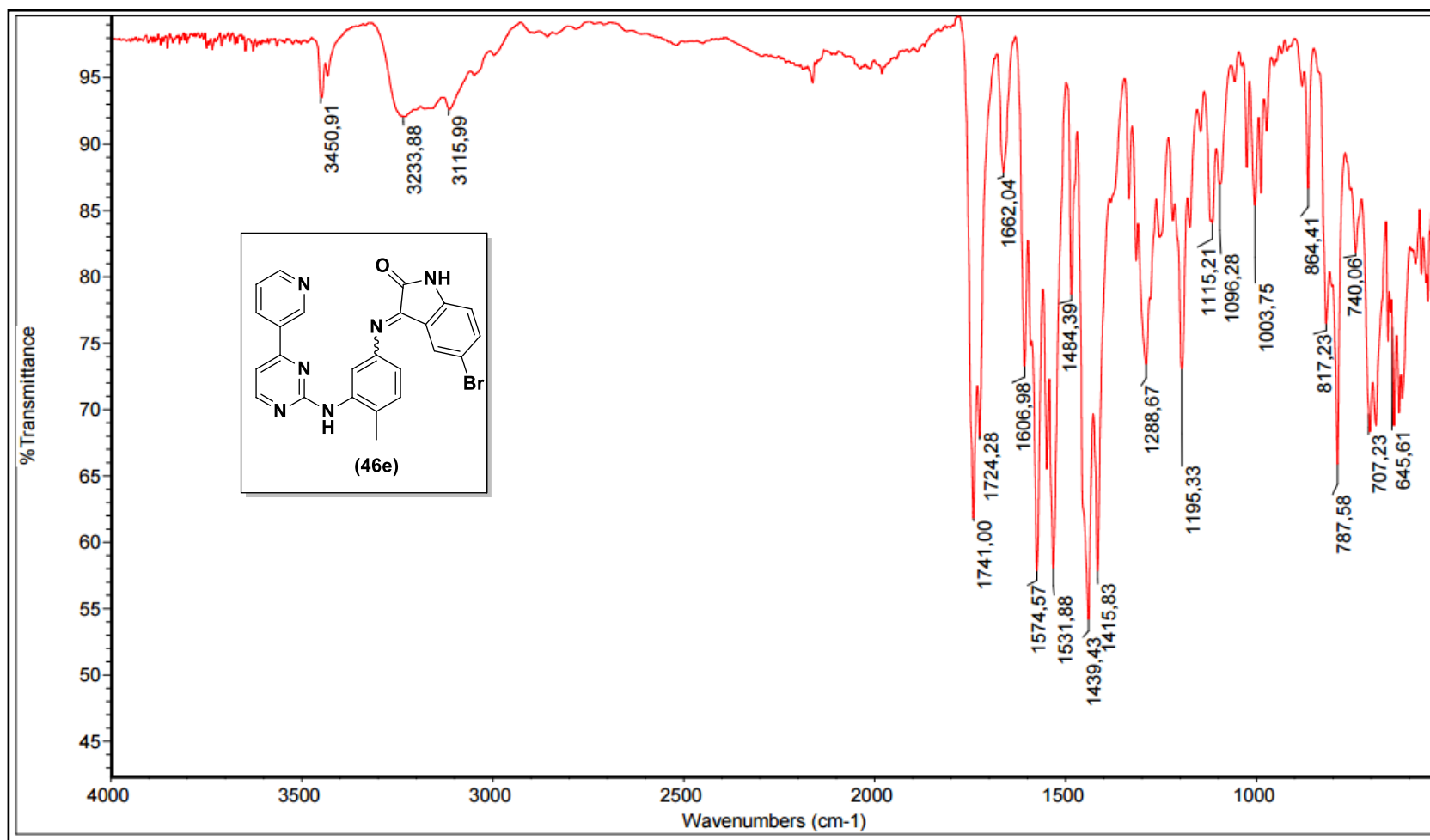
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **46d**



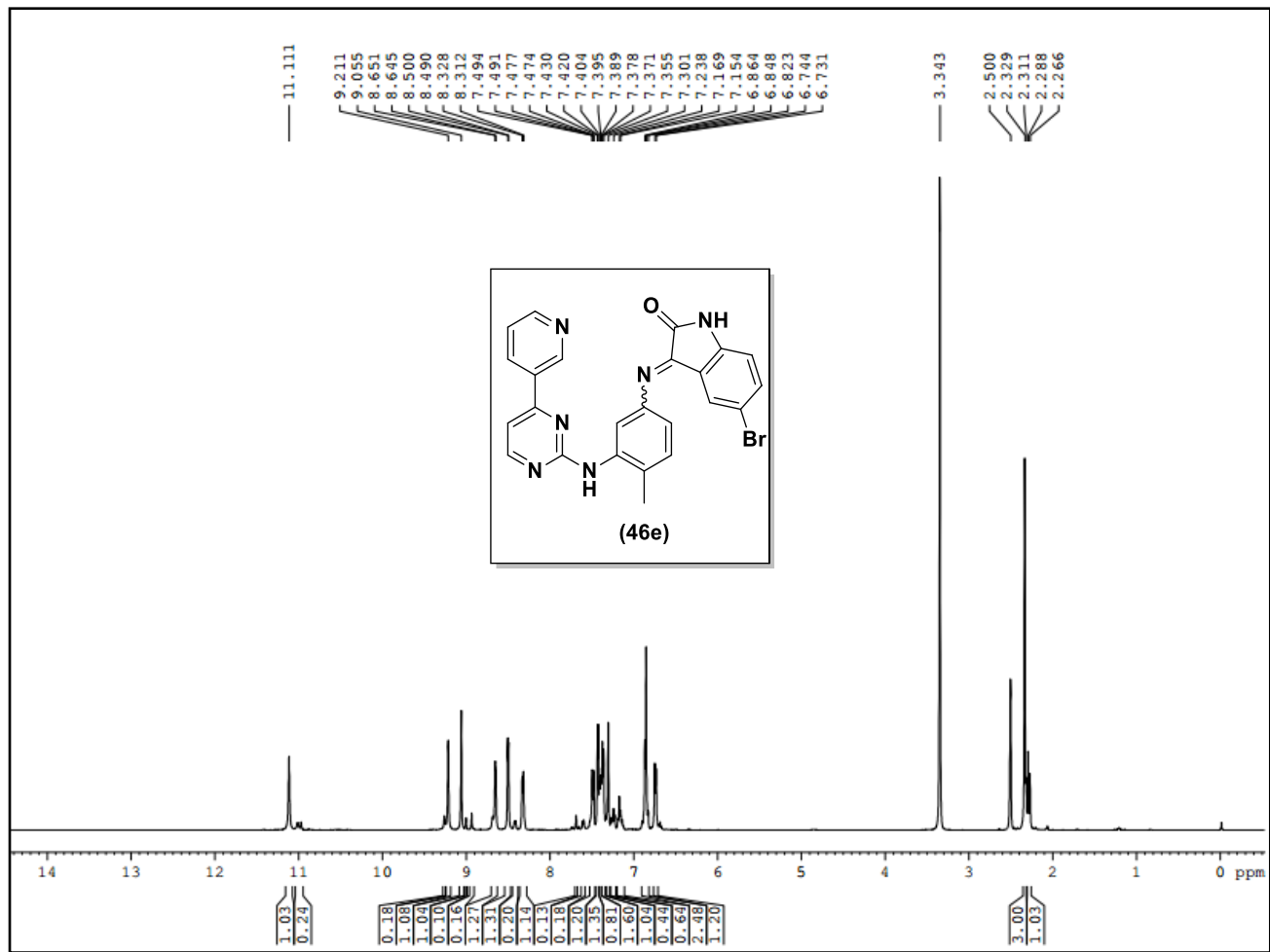
Cromatograma da molécula **46d**



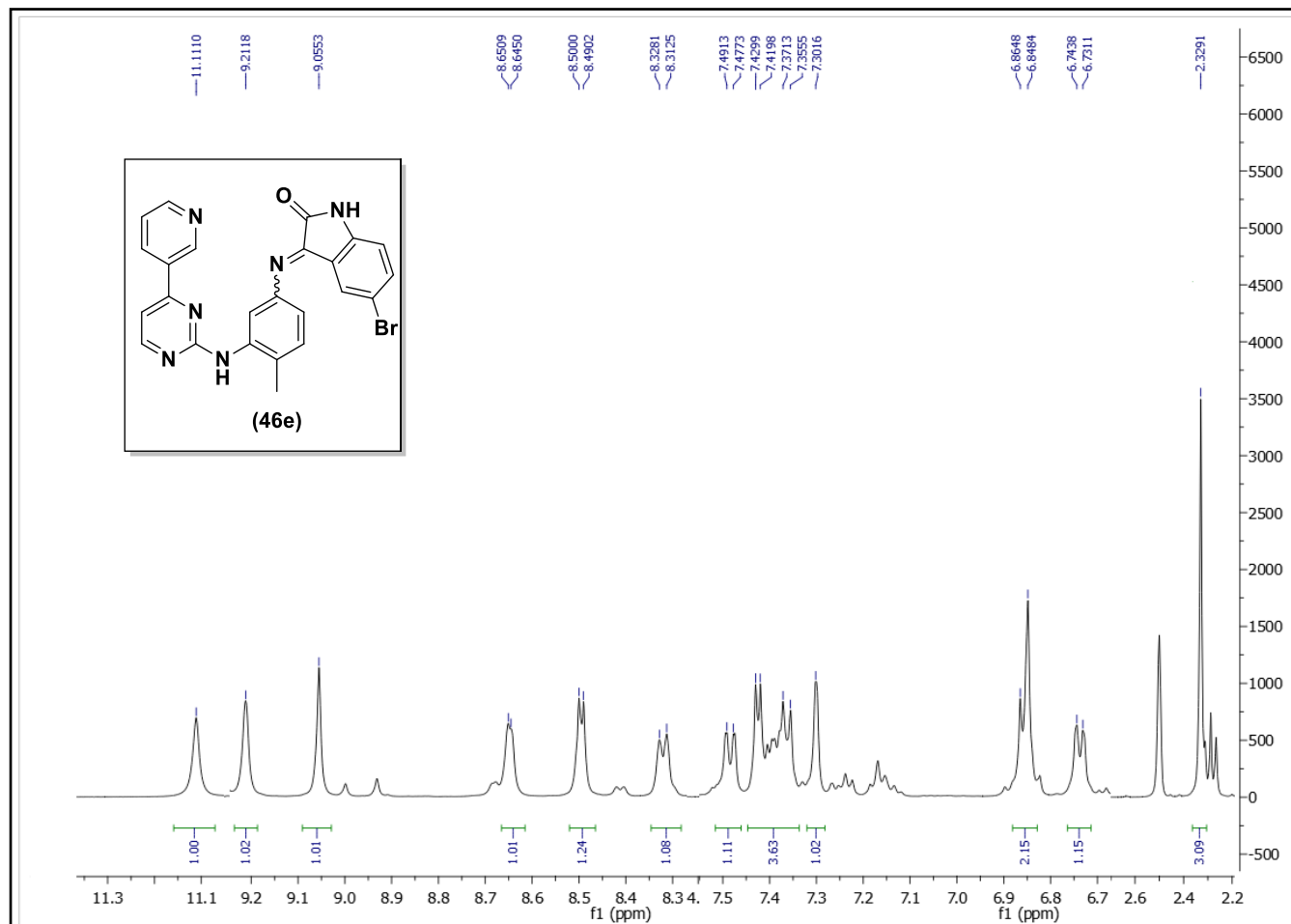
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **46e**



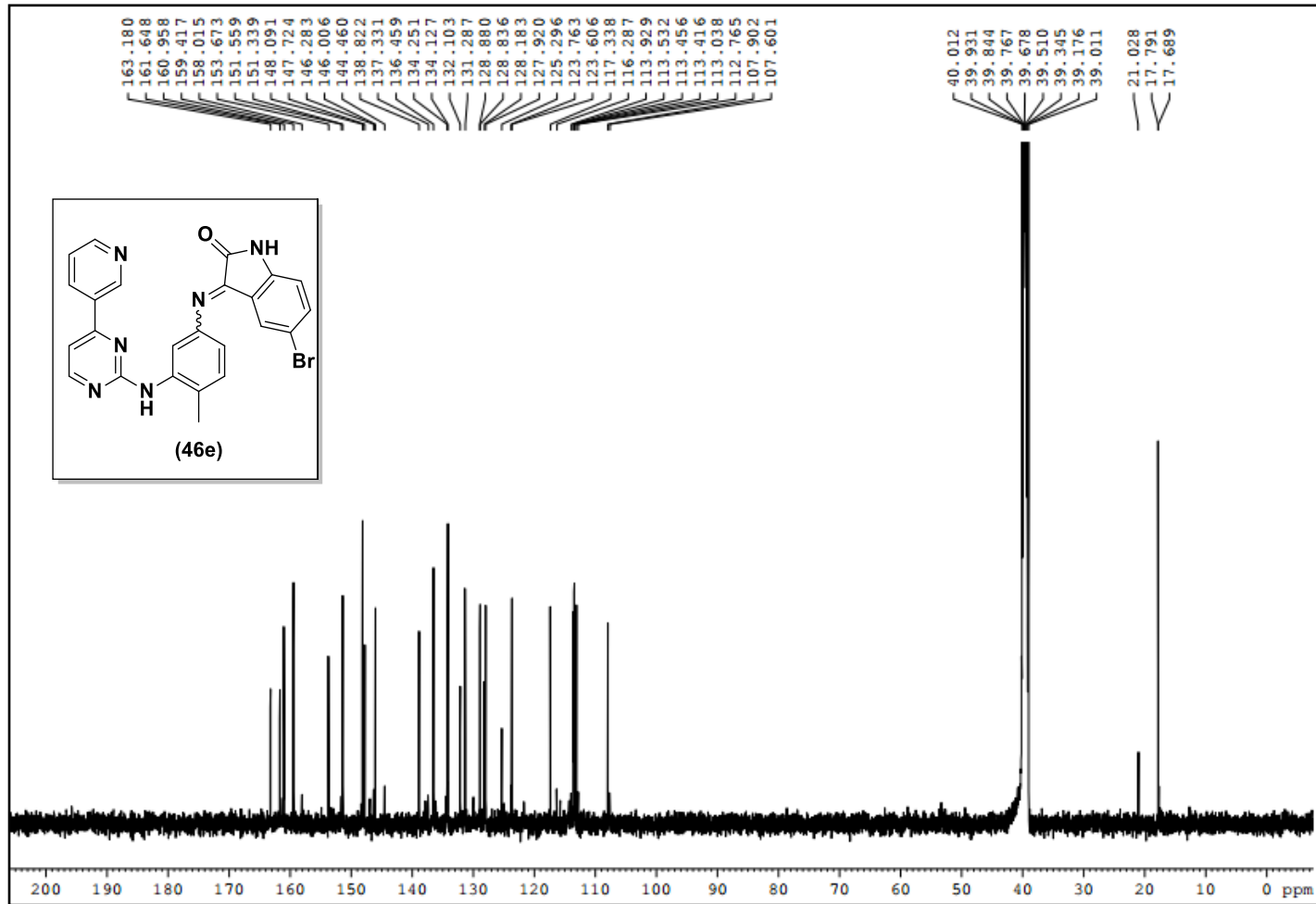
Espectro de IV da molécula **46e**



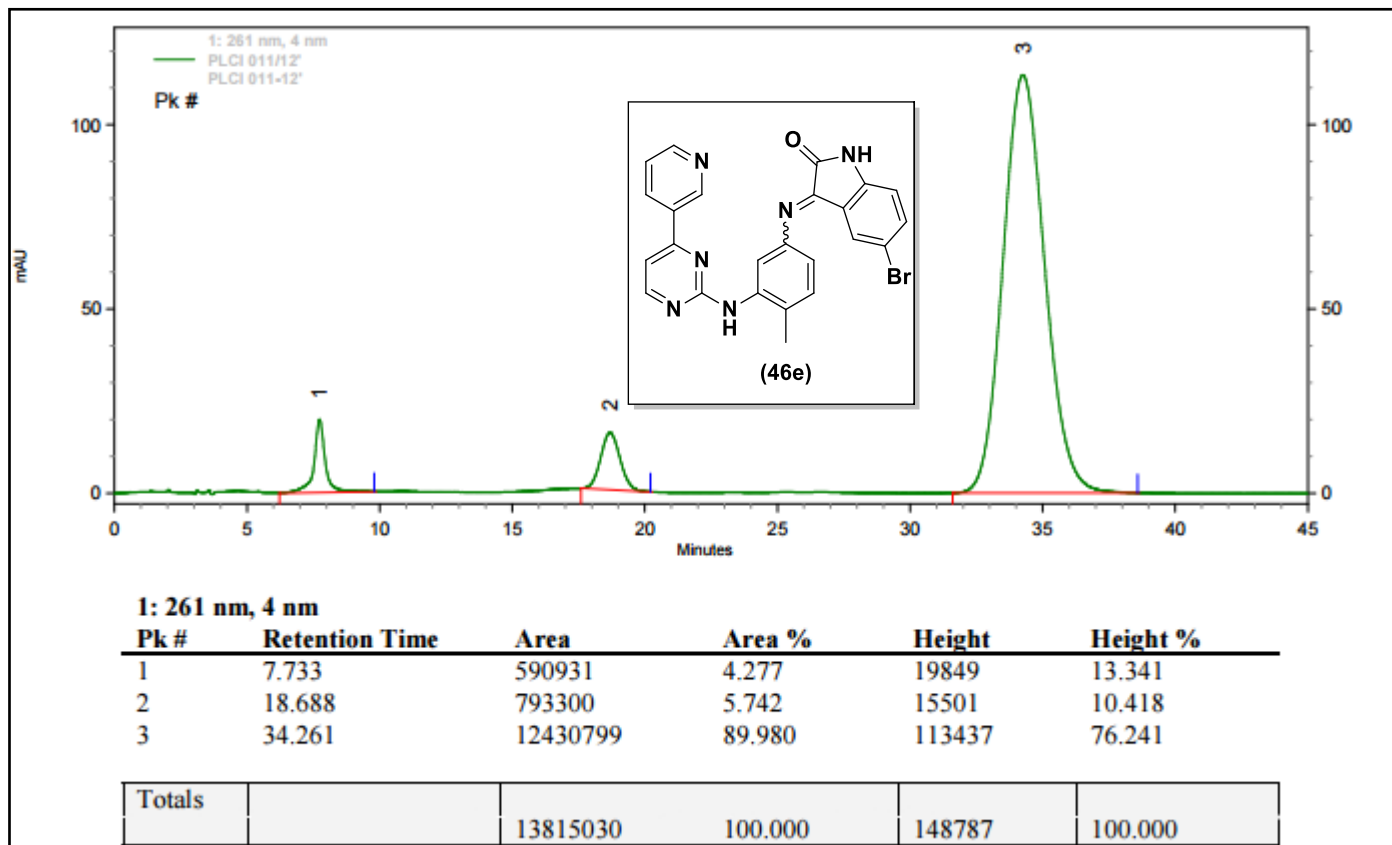
Espectro de RMN ¹H da molécula **46e**



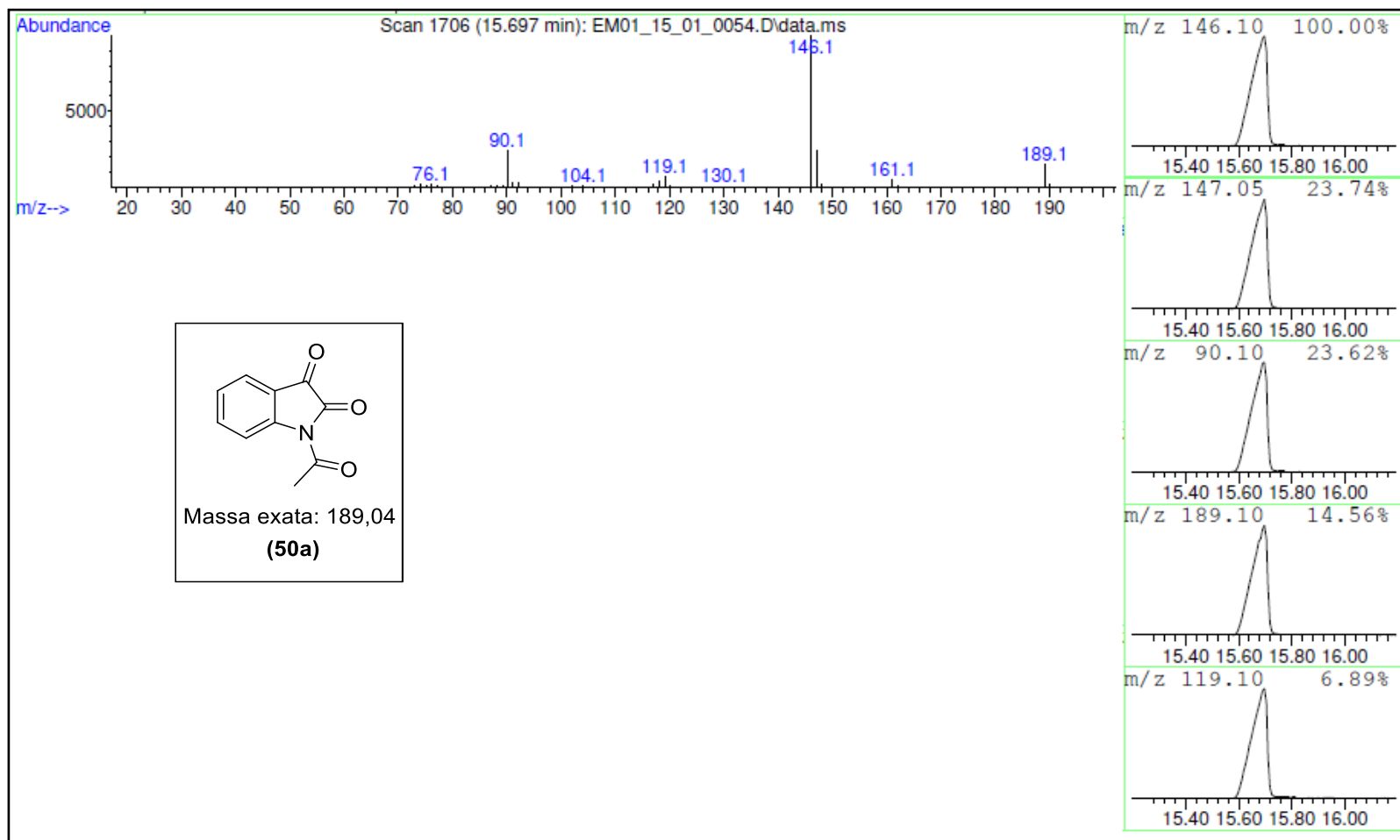
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **46e**



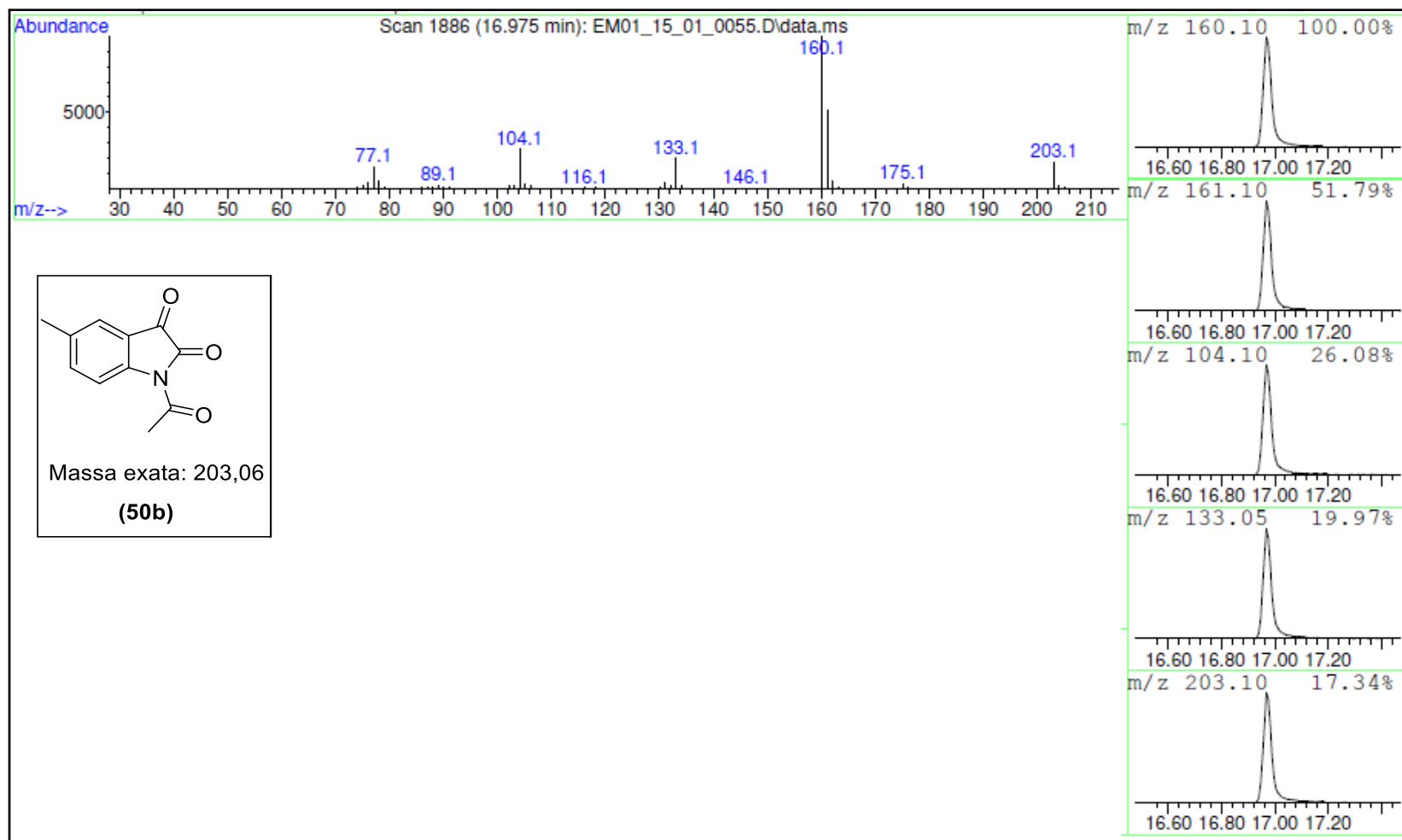
Espectro de RMN ¹³C da molécula **46e**



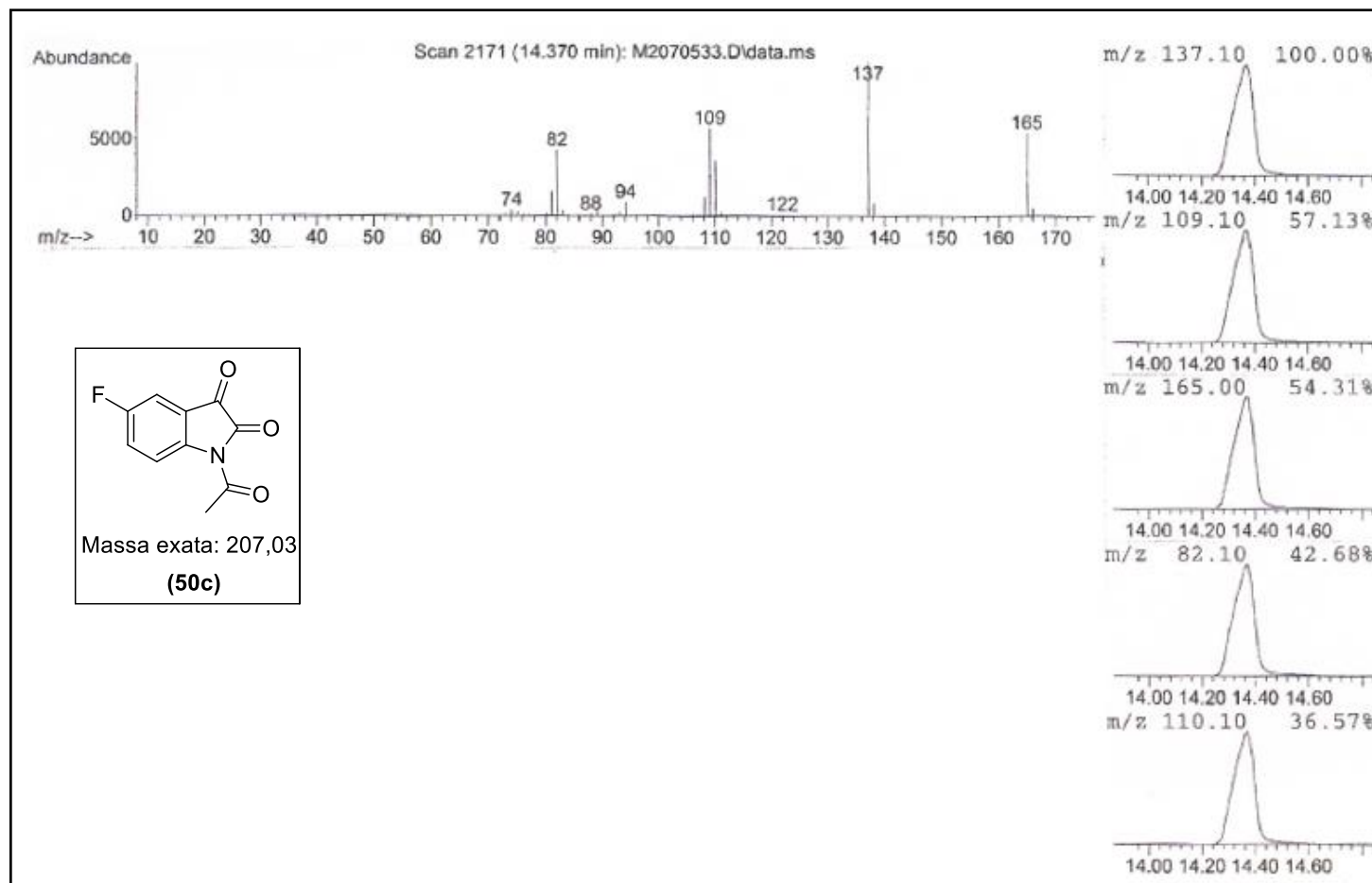
Cromatograma da molécula 46e



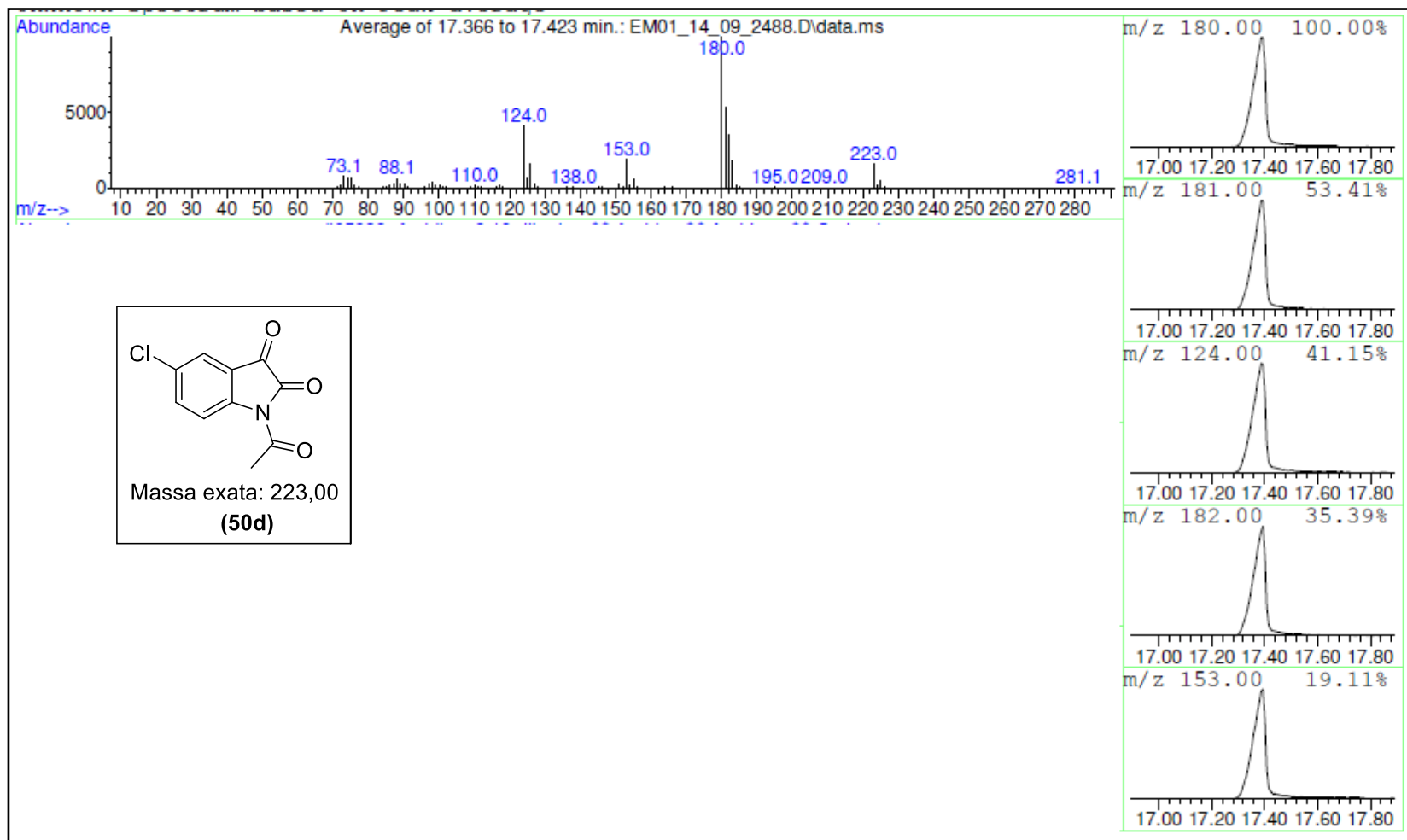
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **50a**



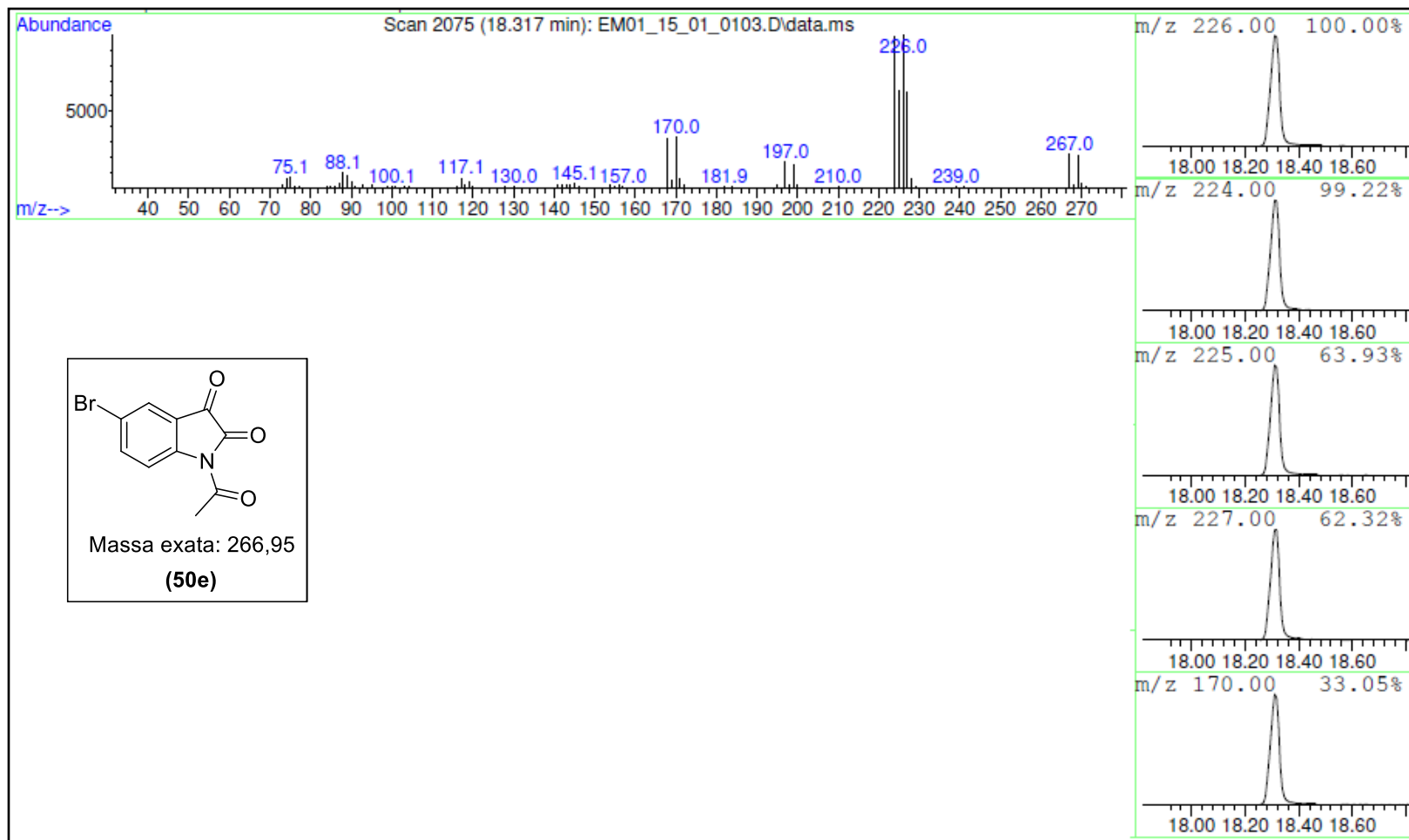
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **50b**



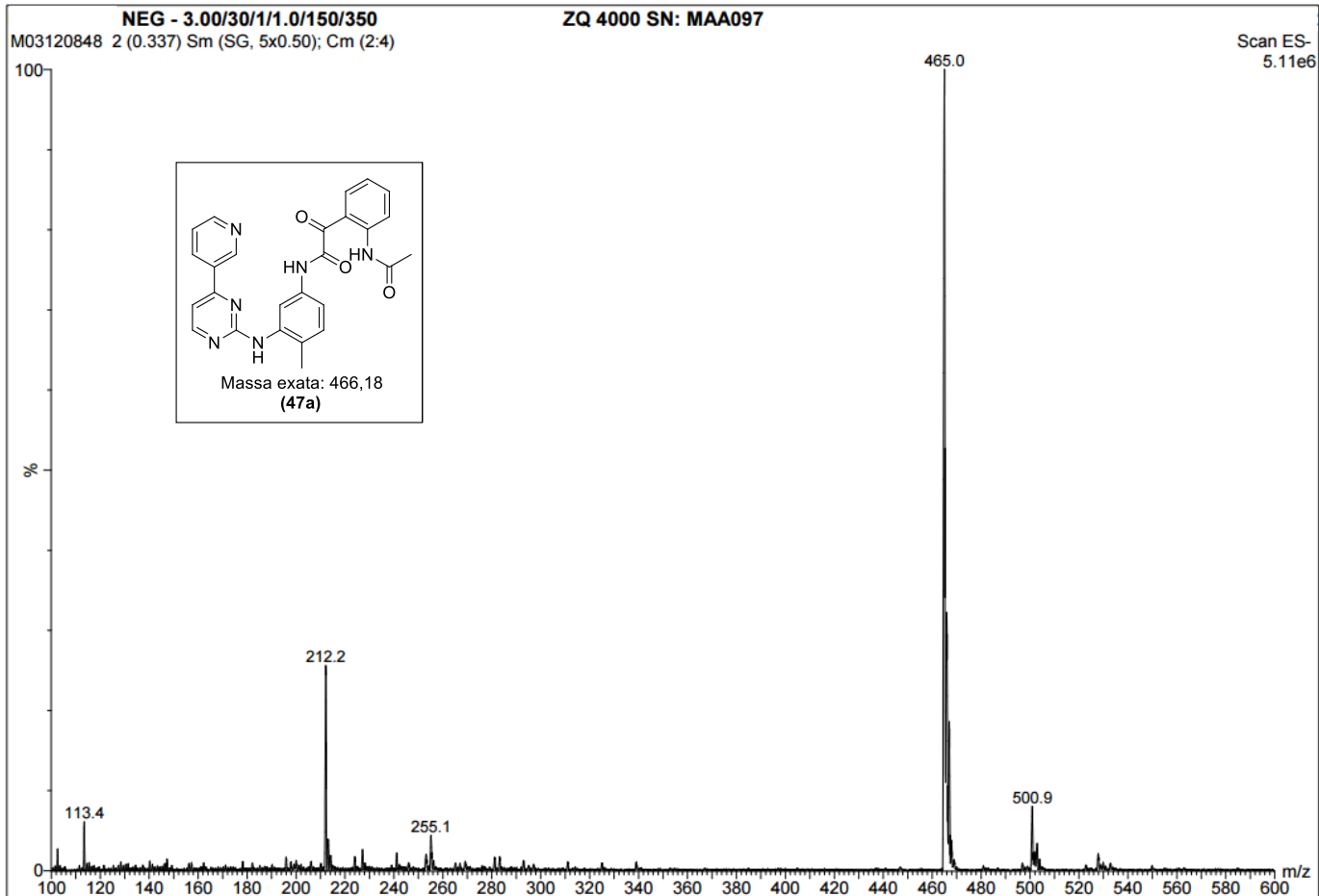
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **50c**



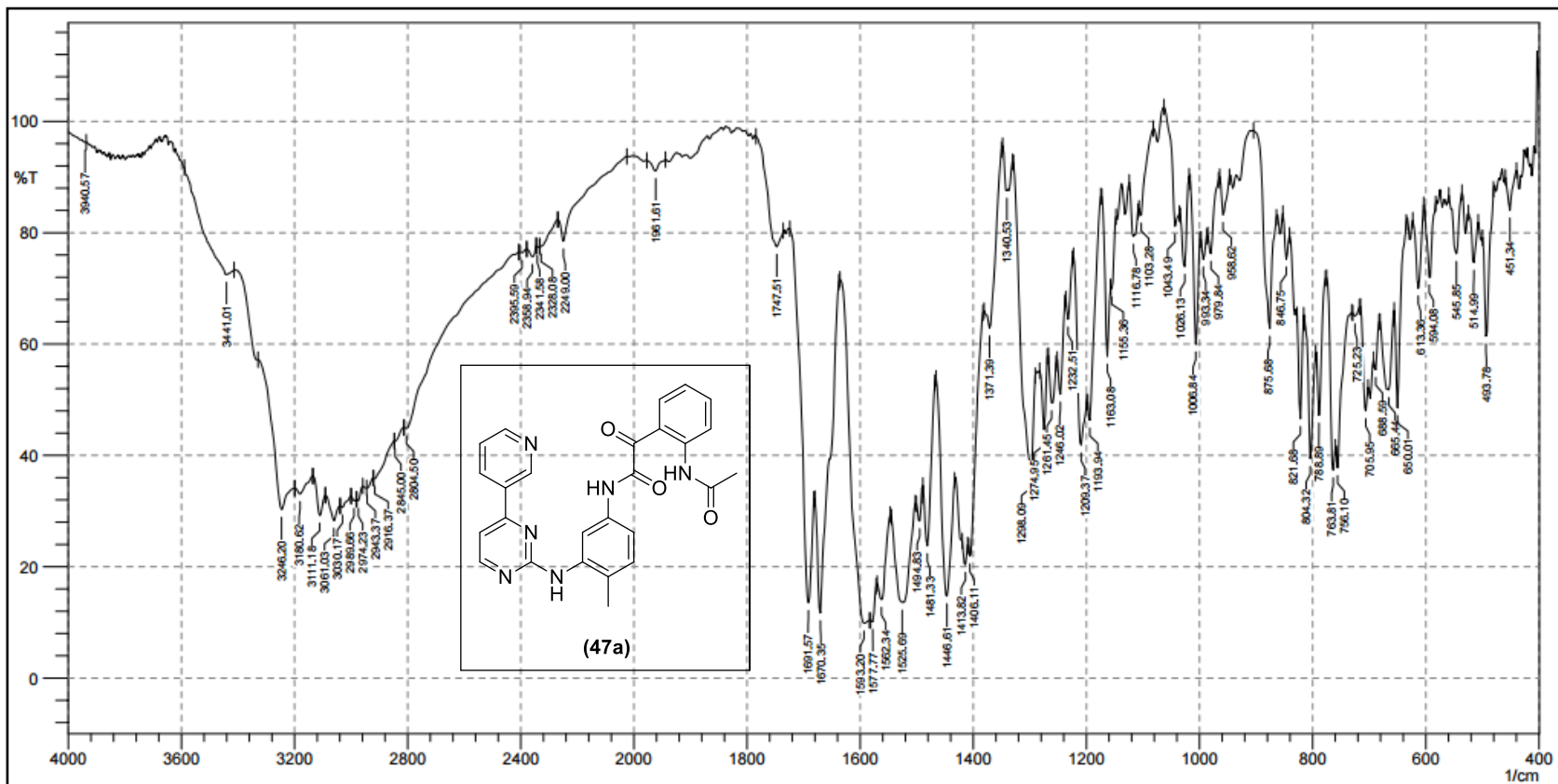
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **50d**



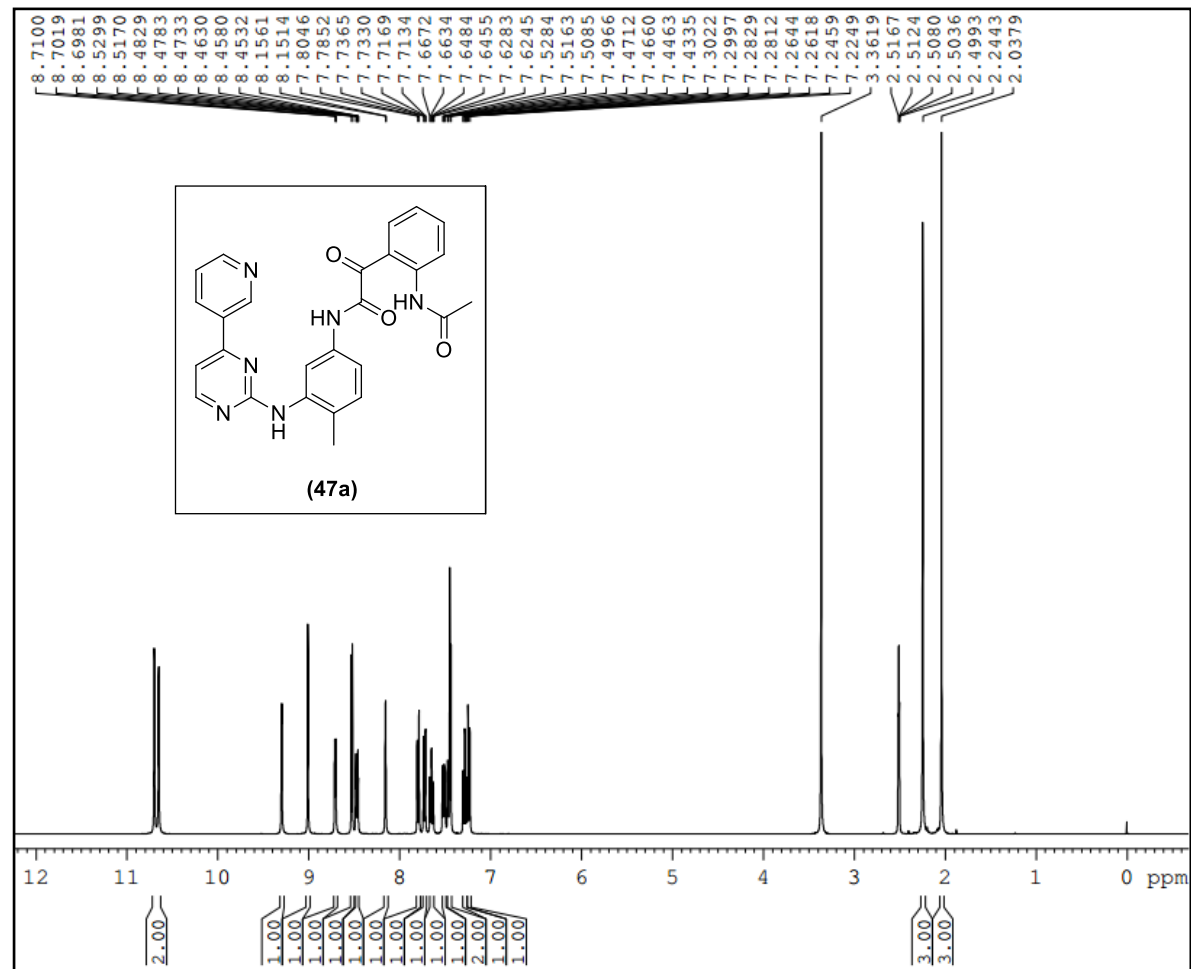
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **50e**



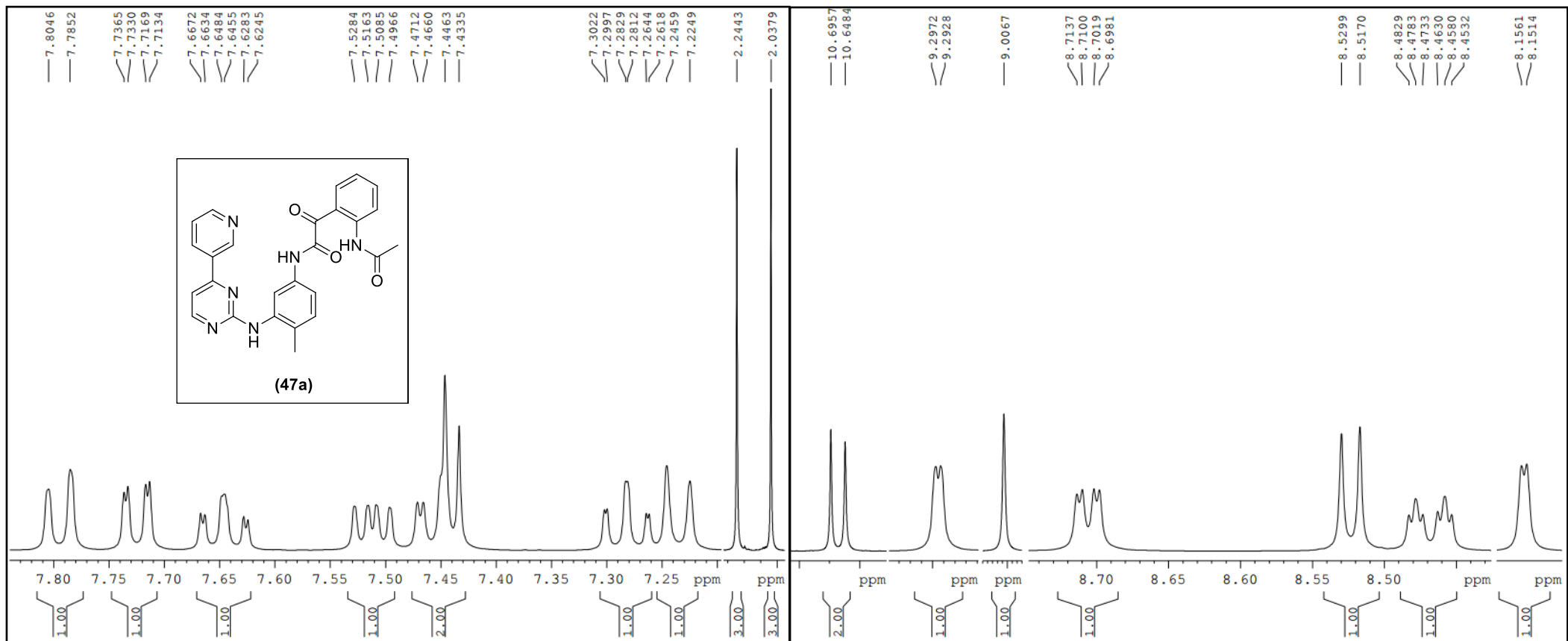
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **47a**



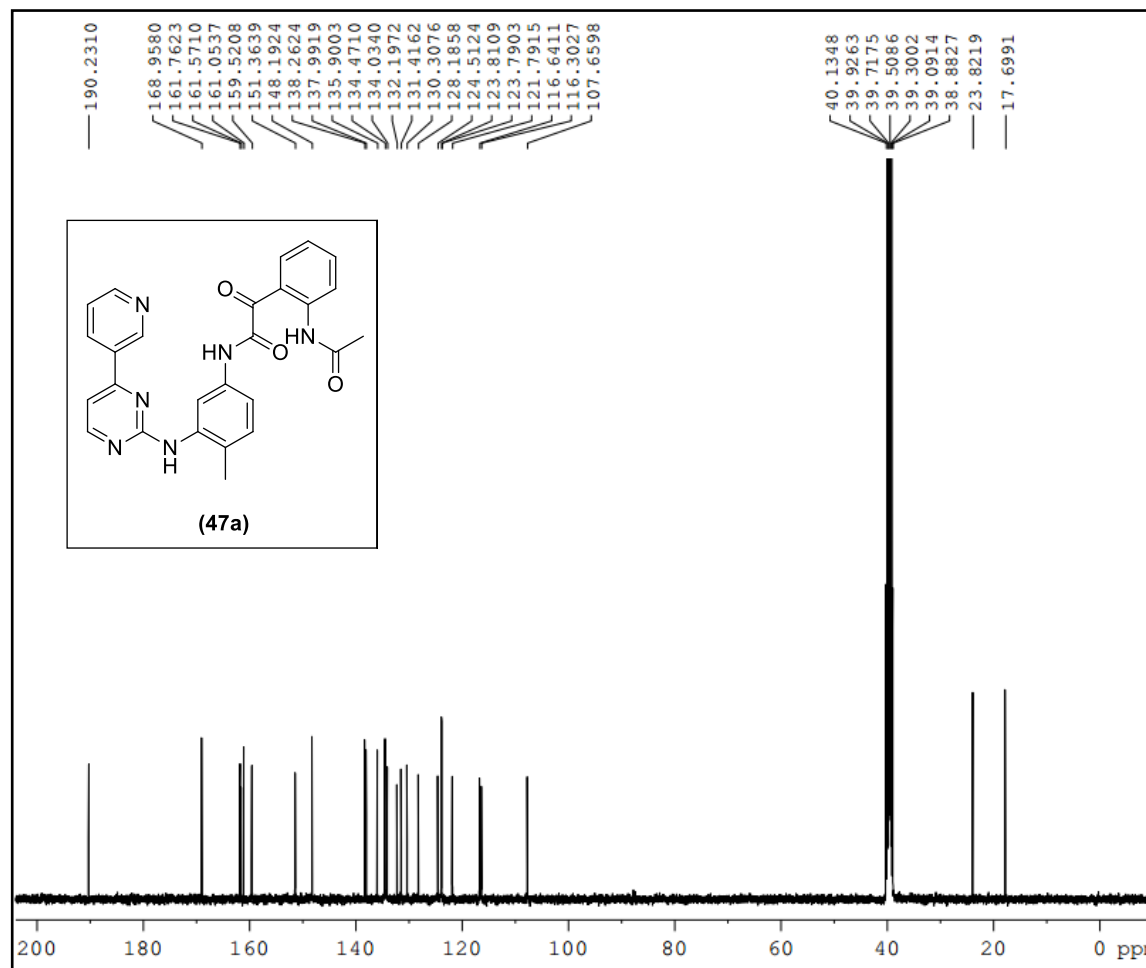
Espectro de IV da molécula 47a



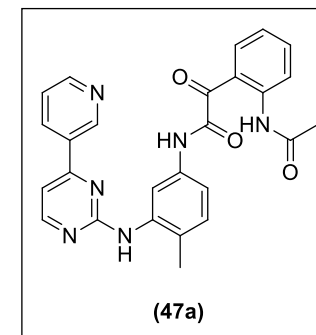
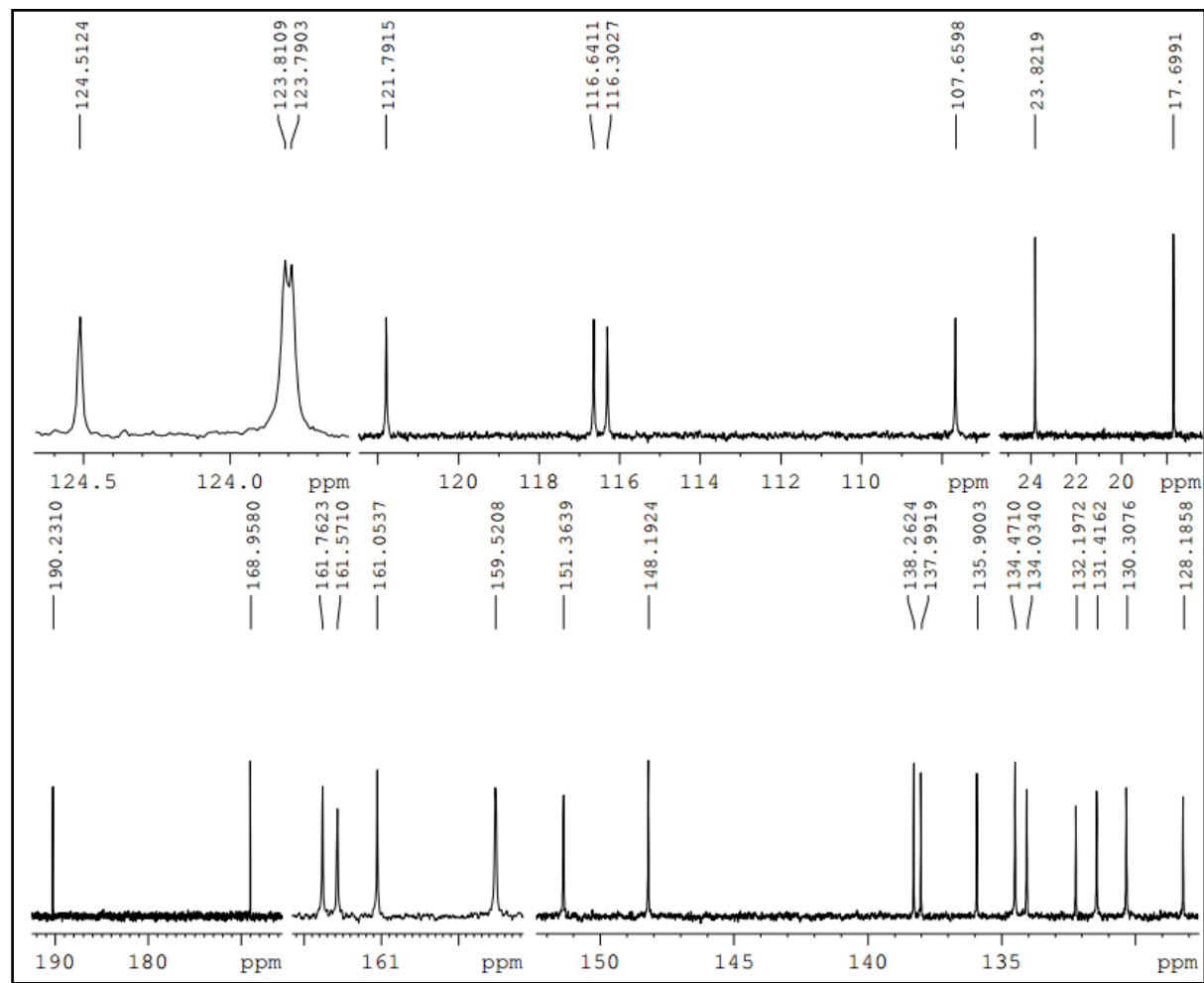
Espectro de RMN ^1H da molécula **47a**



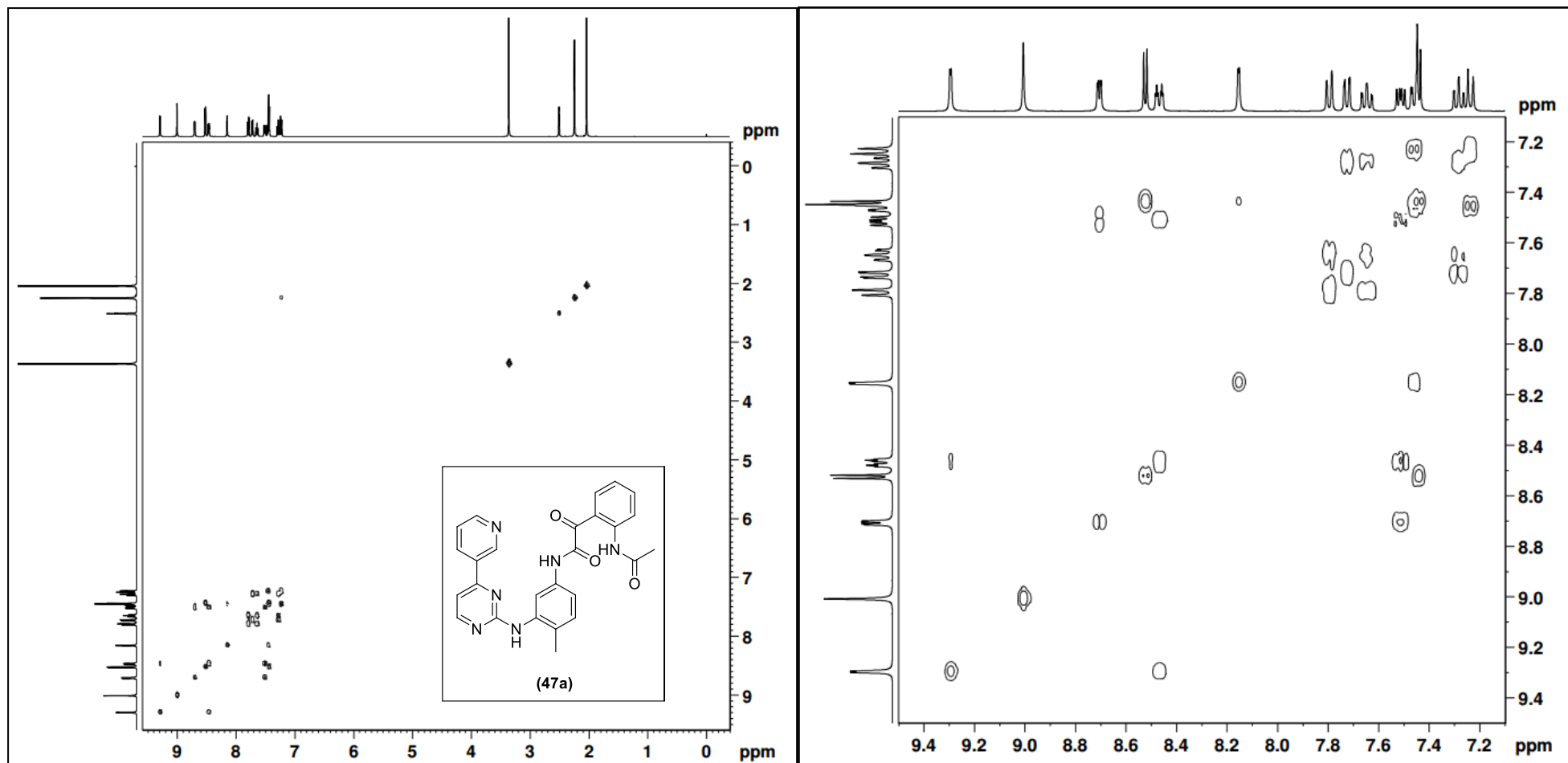
Expansões do espectro de RMN ^1H da molécula **47a**



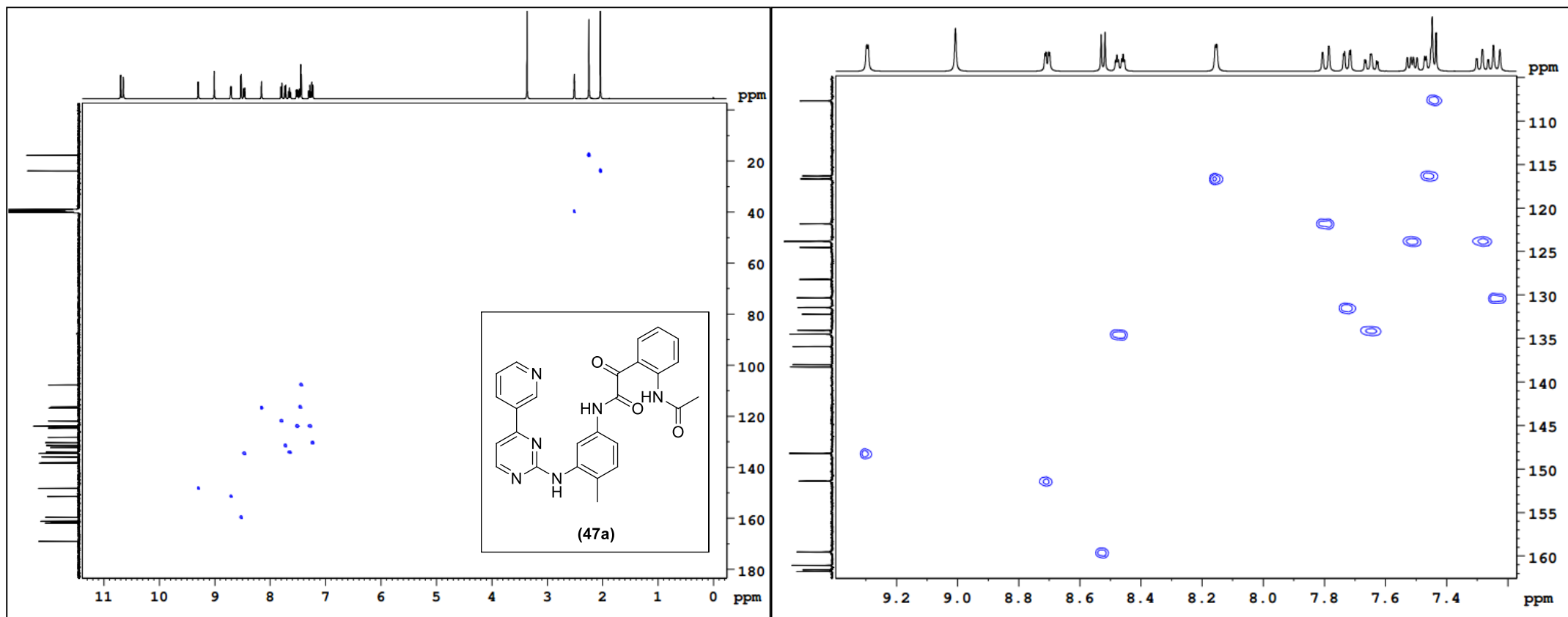
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **47a**



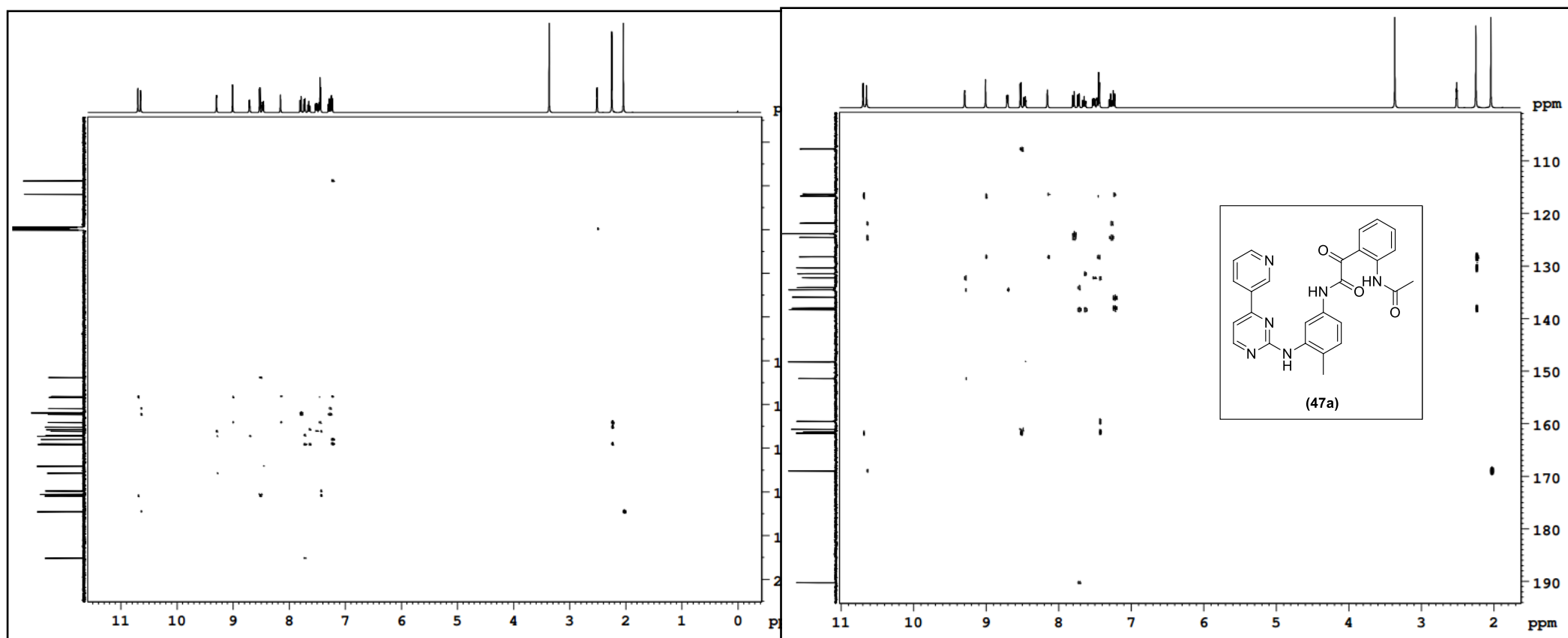
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula 47a



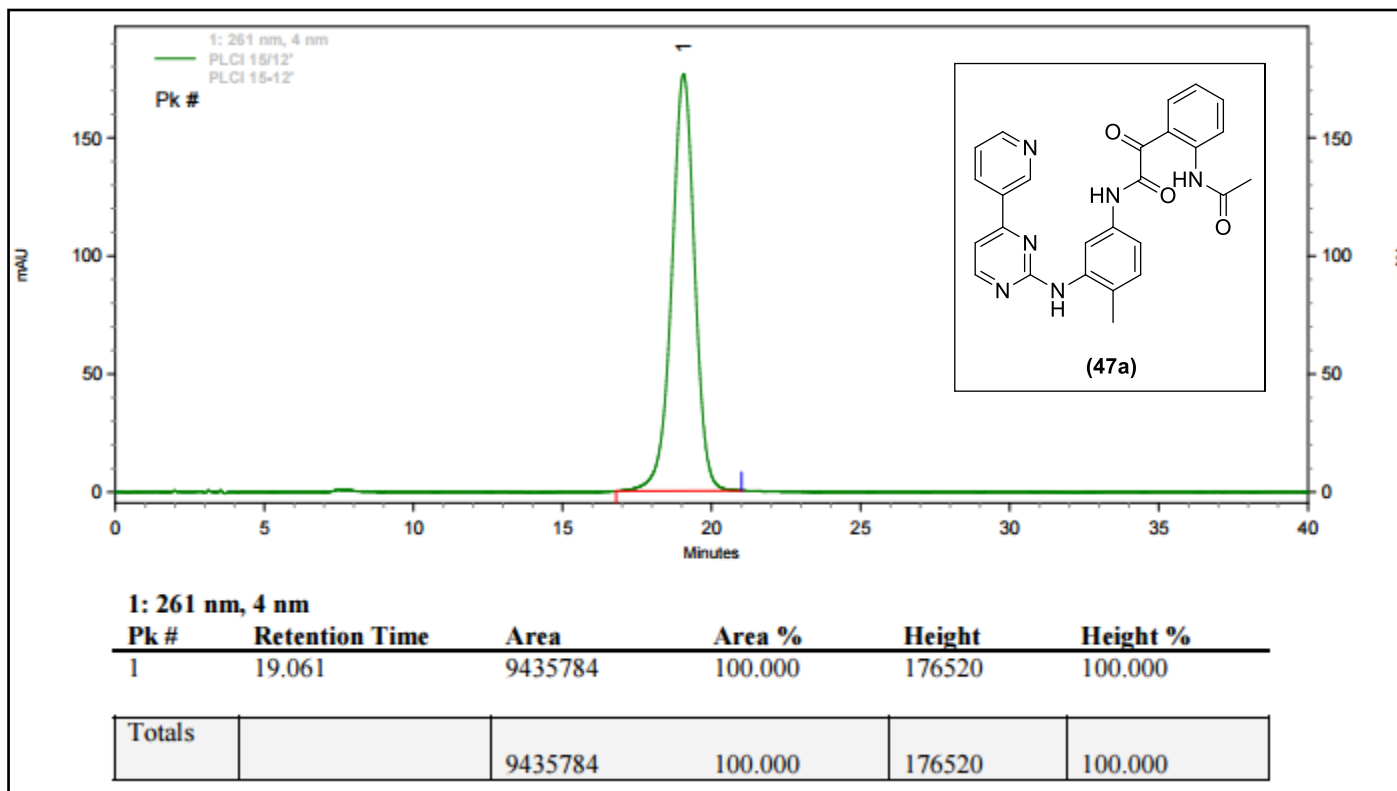
Espectro e expansão de RMN de 2D-COSY da molécula **47a**



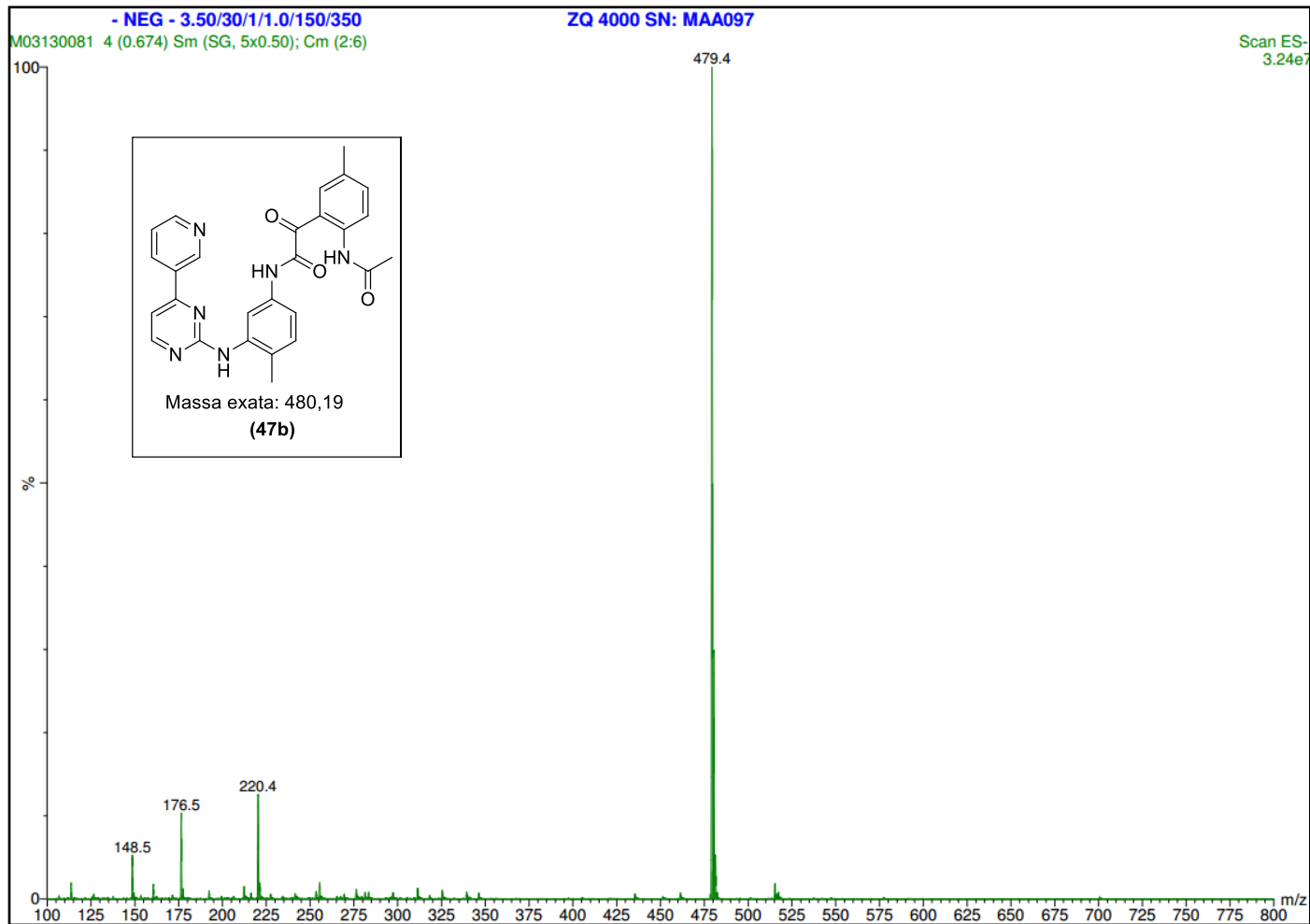
Espectro e expansão de RMN de 2D-HSQC da molécula **47a**



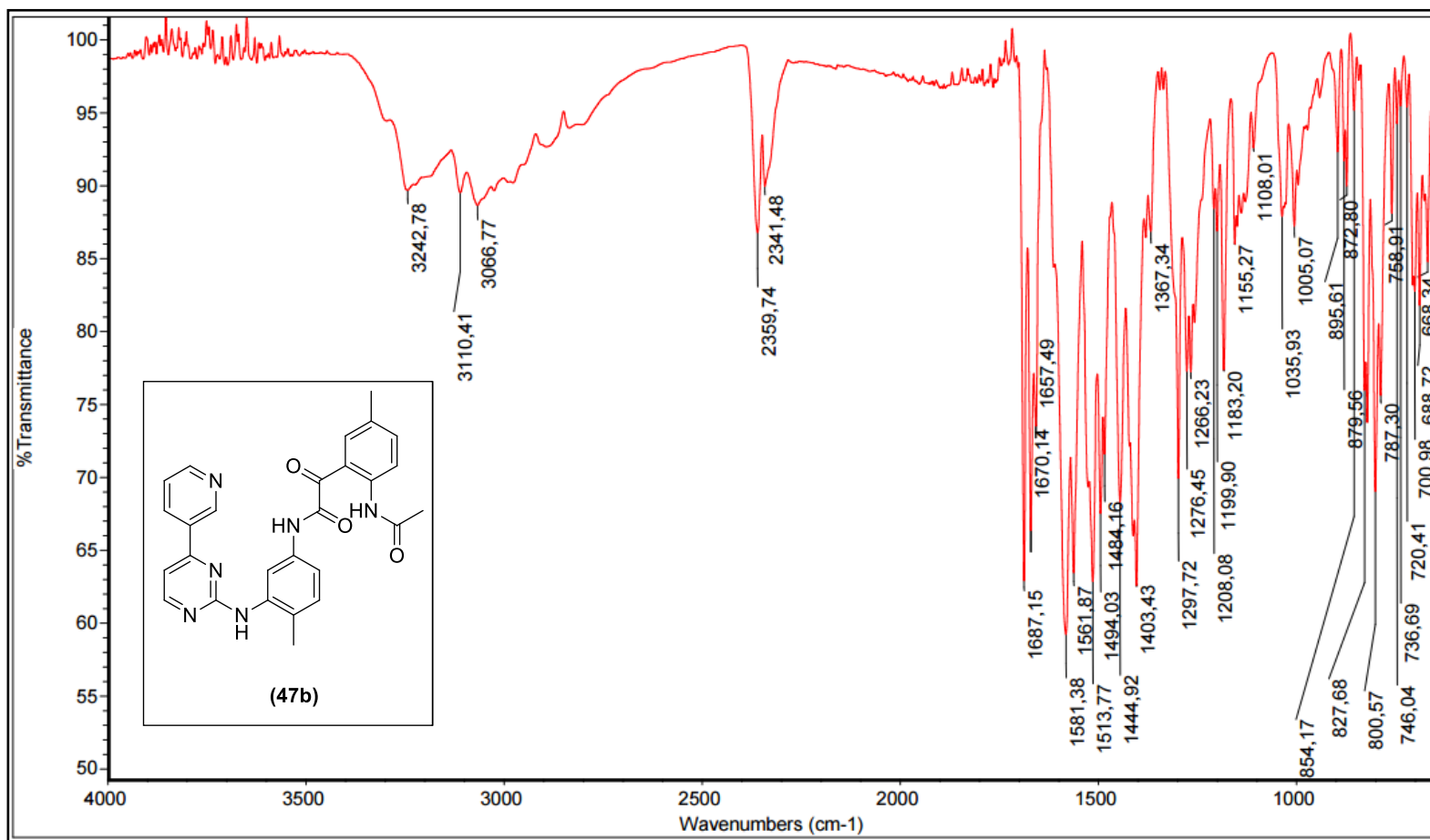
Espectro e expansão de RMN de 2D-HMBC da molécula **47a**



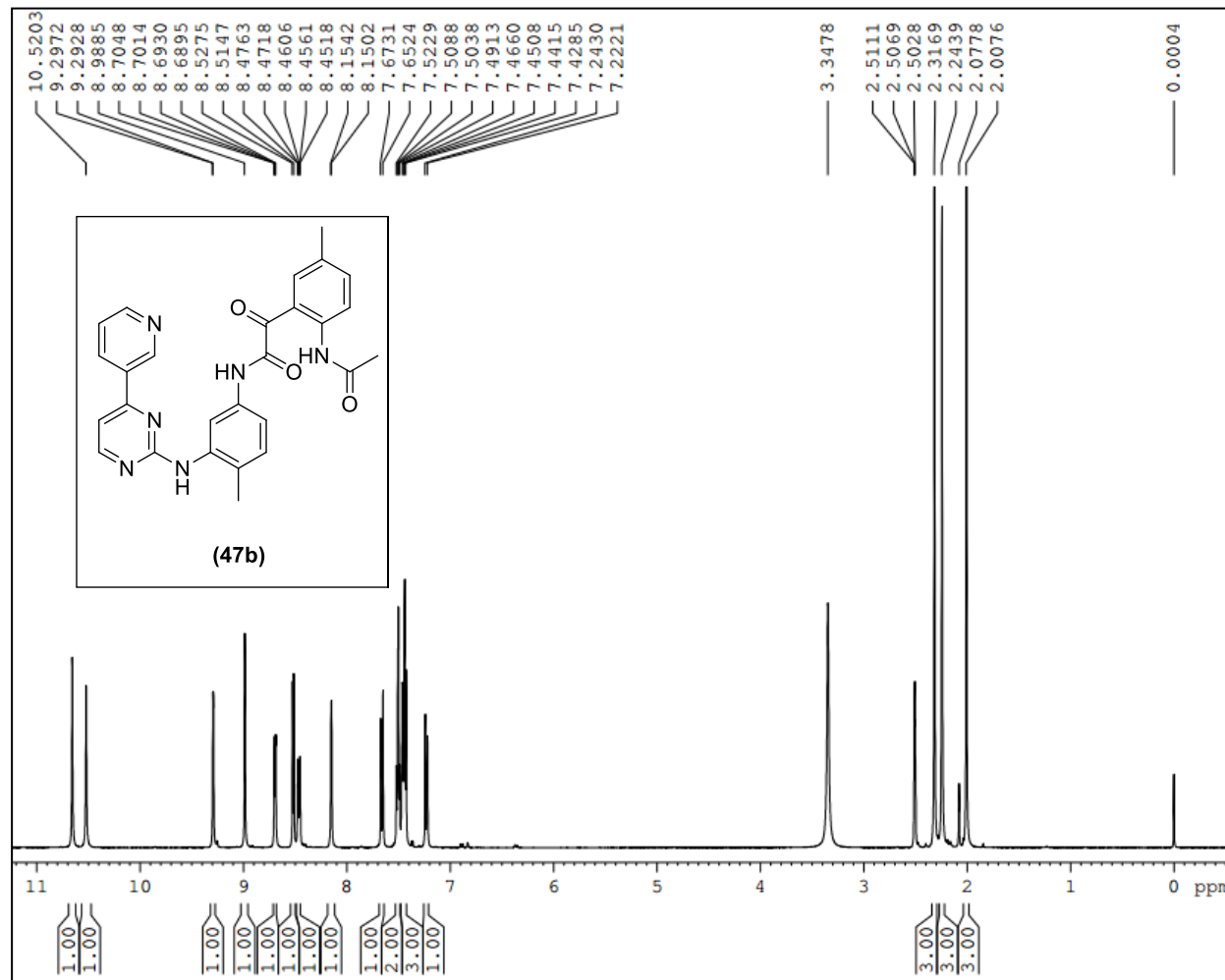
Cromatograma da molécula **47a**



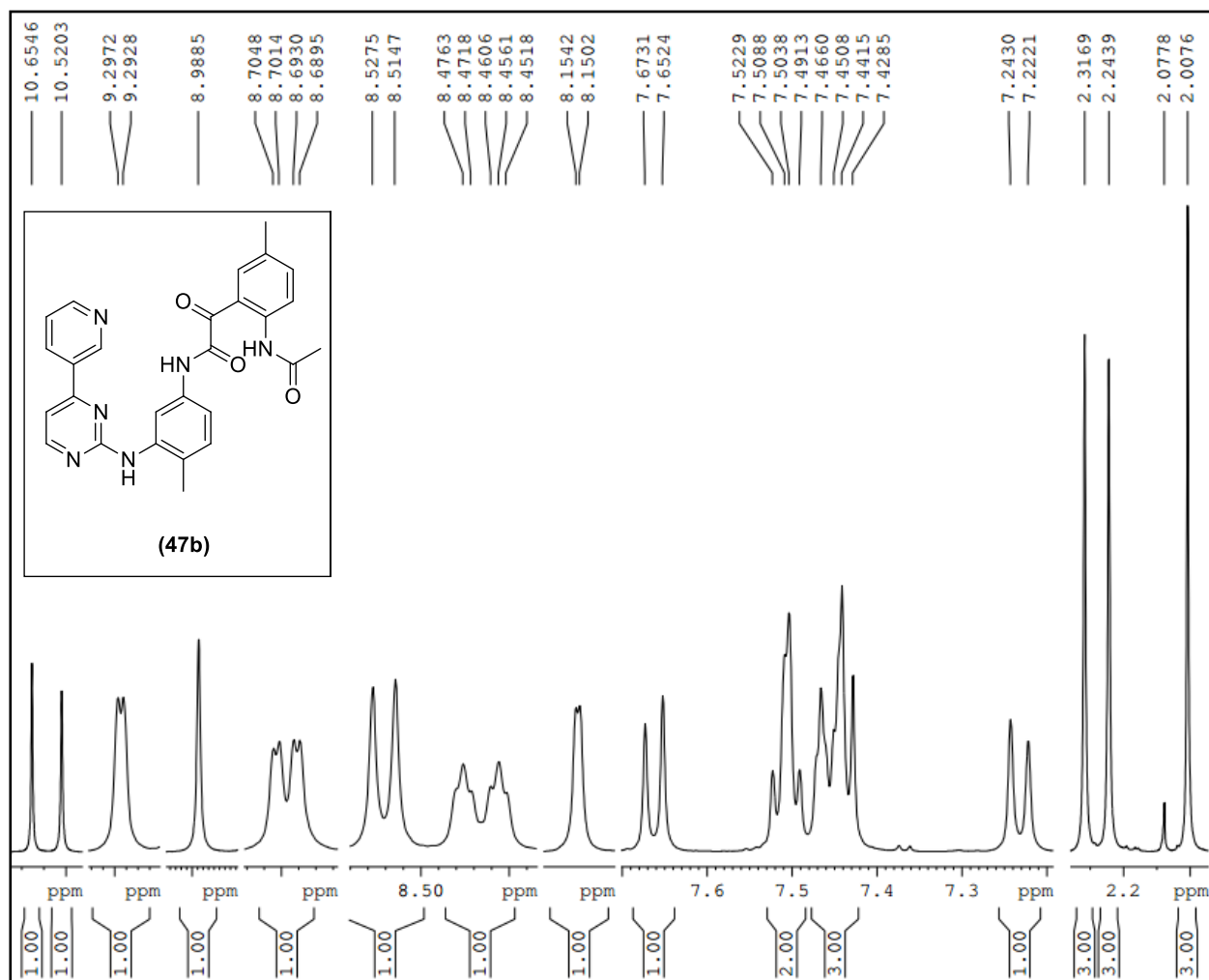
Espectro de (EM-IES $[M-1]^+$) da molécula **47b**



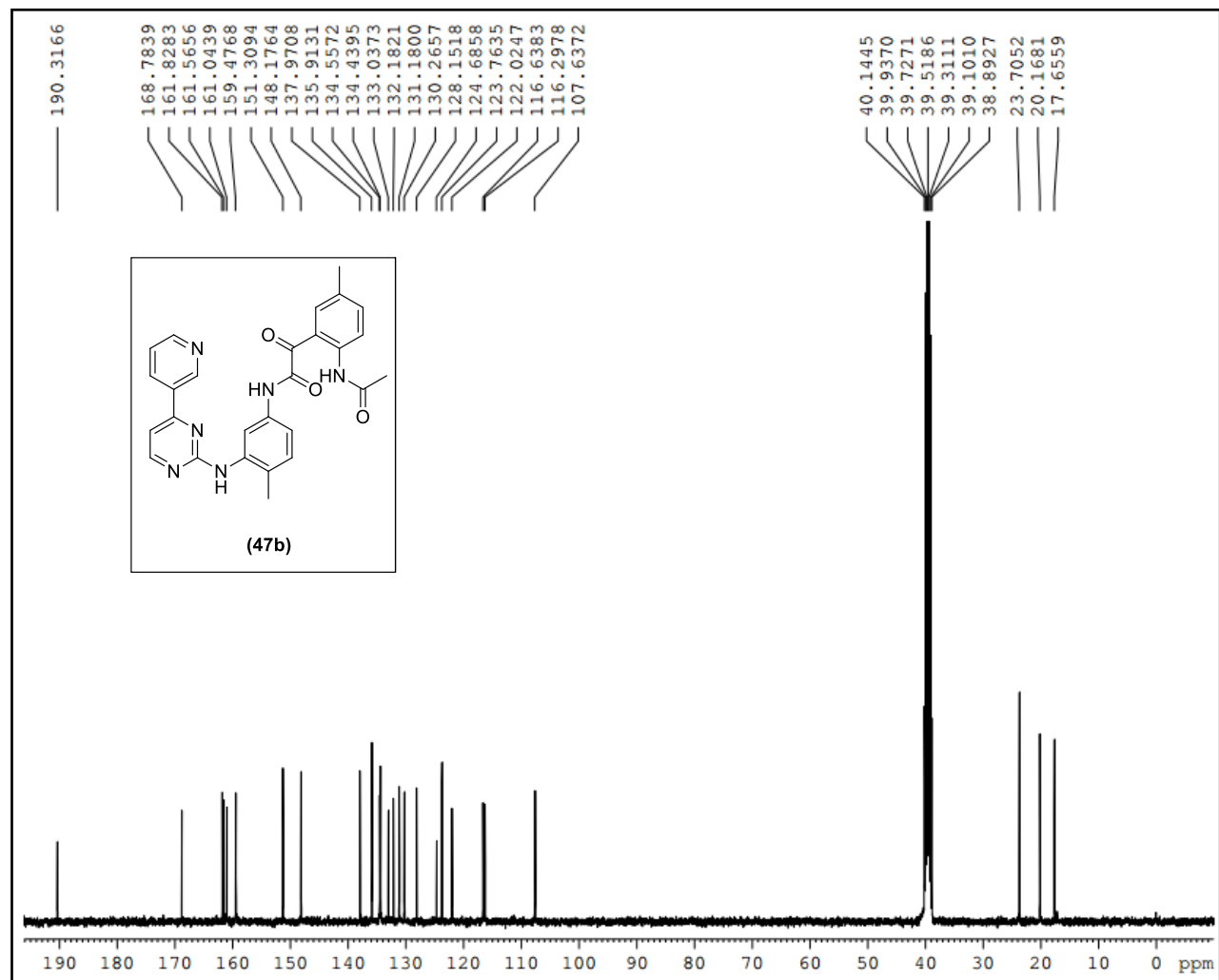
Espectro de IV da molécula **47b**



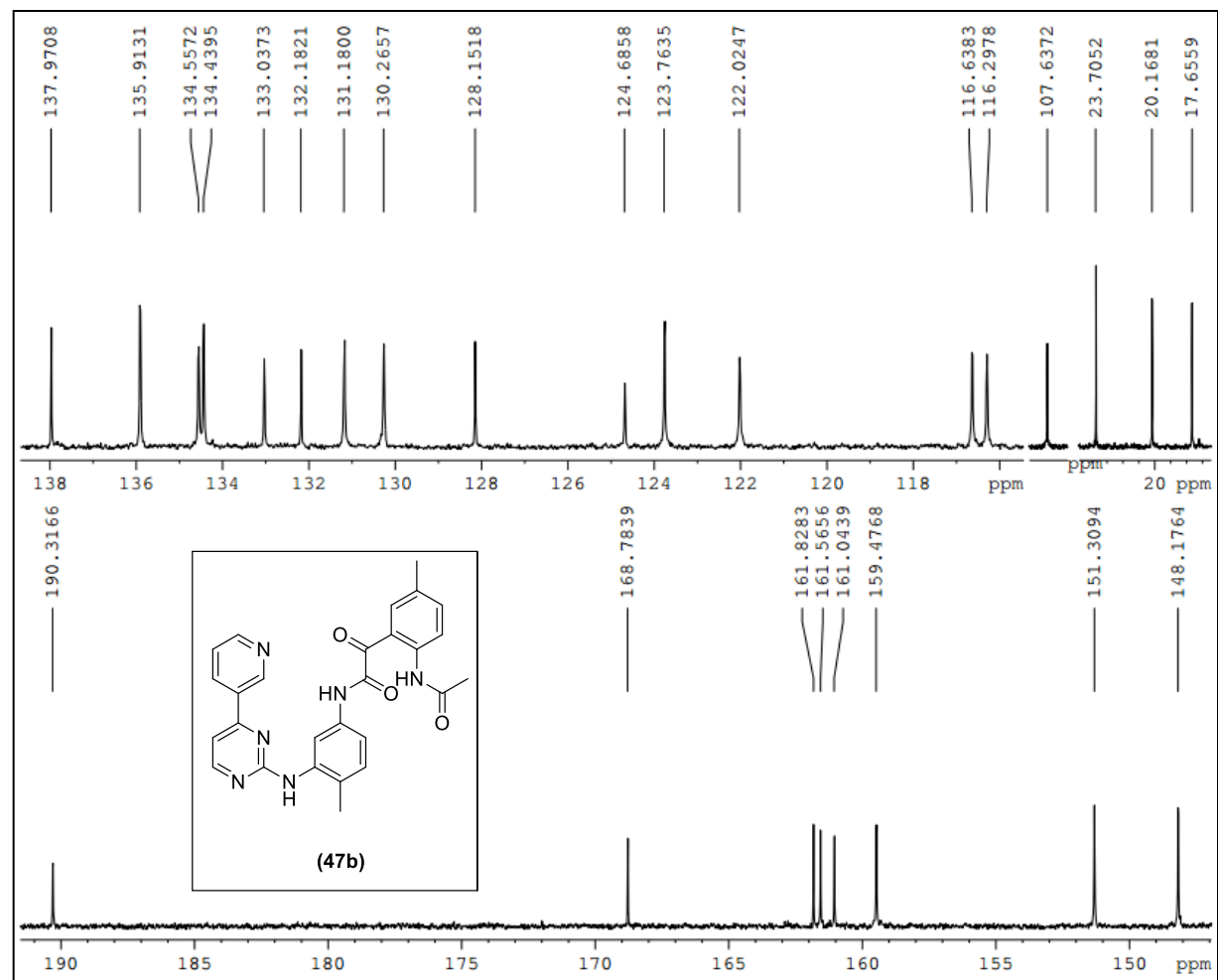
Espectro de RMN ^1H da molécula **47b**



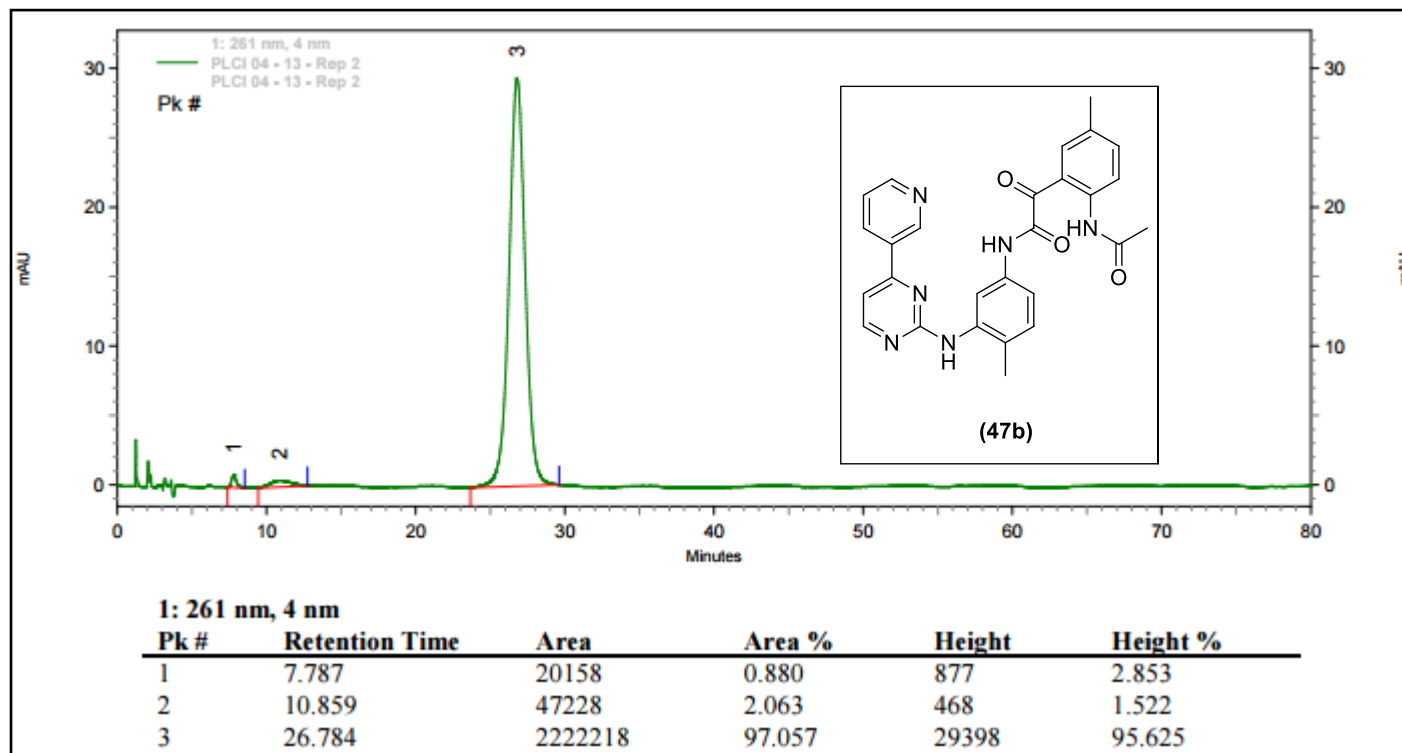
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **47b**



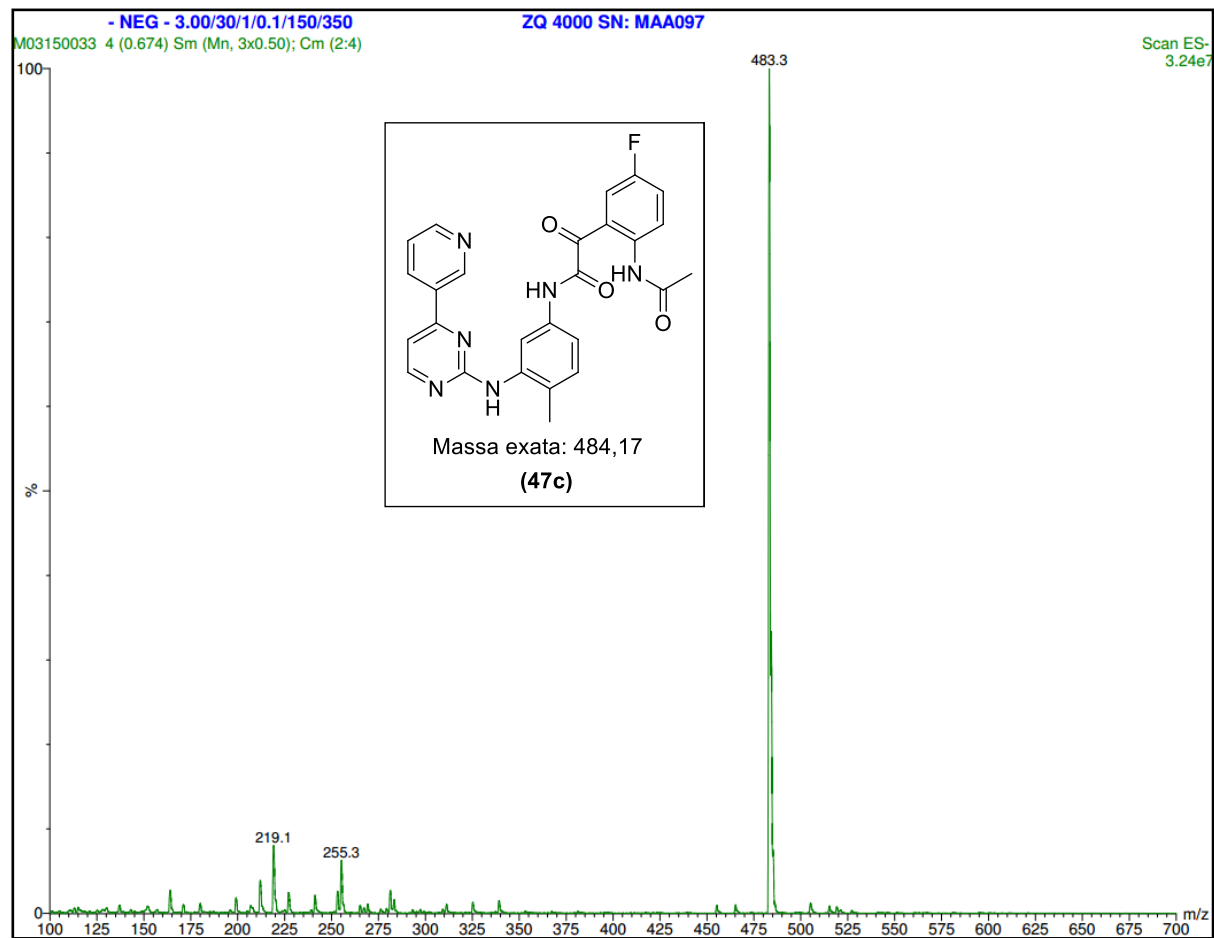
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **47b**



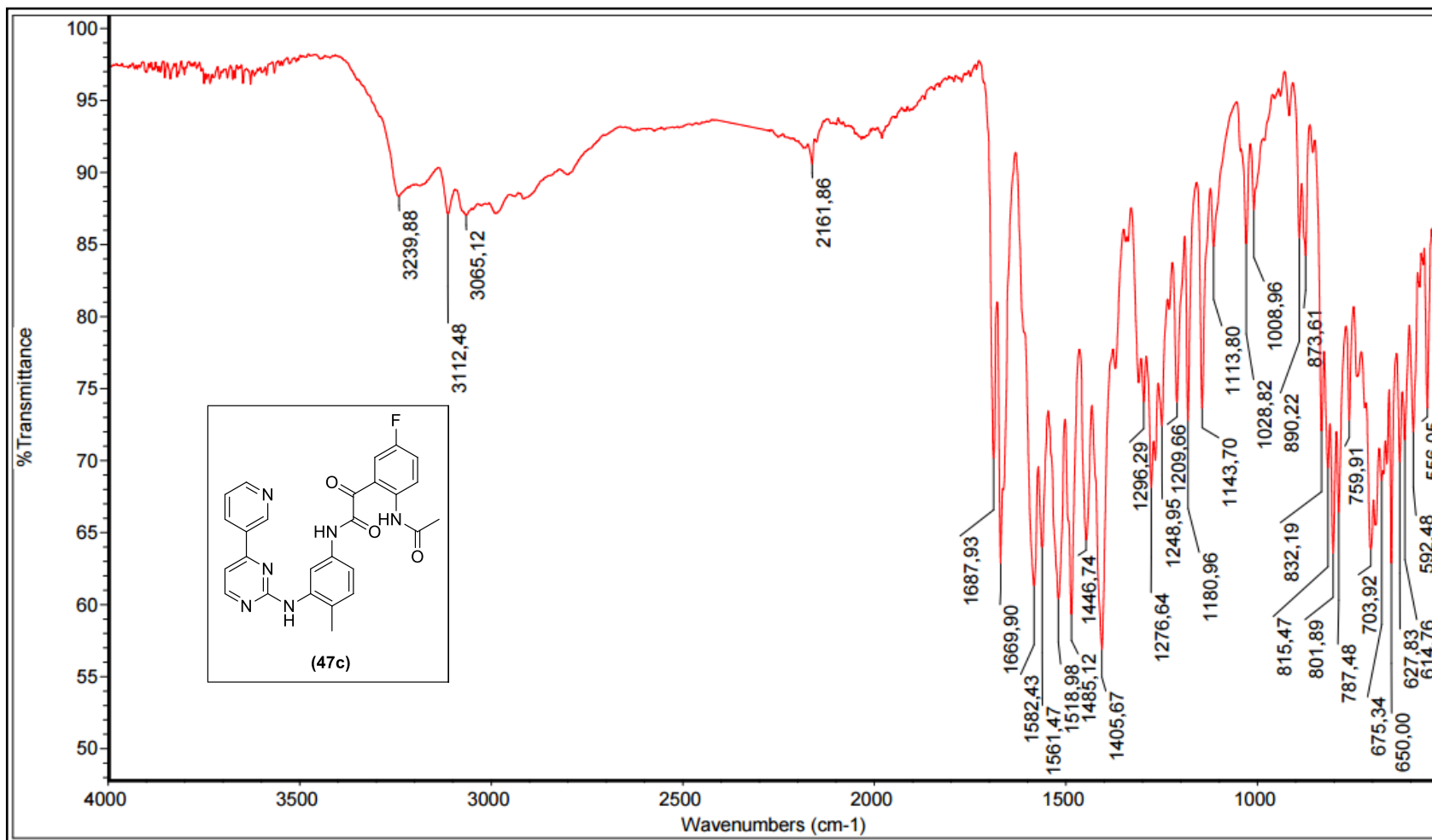
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **47b**



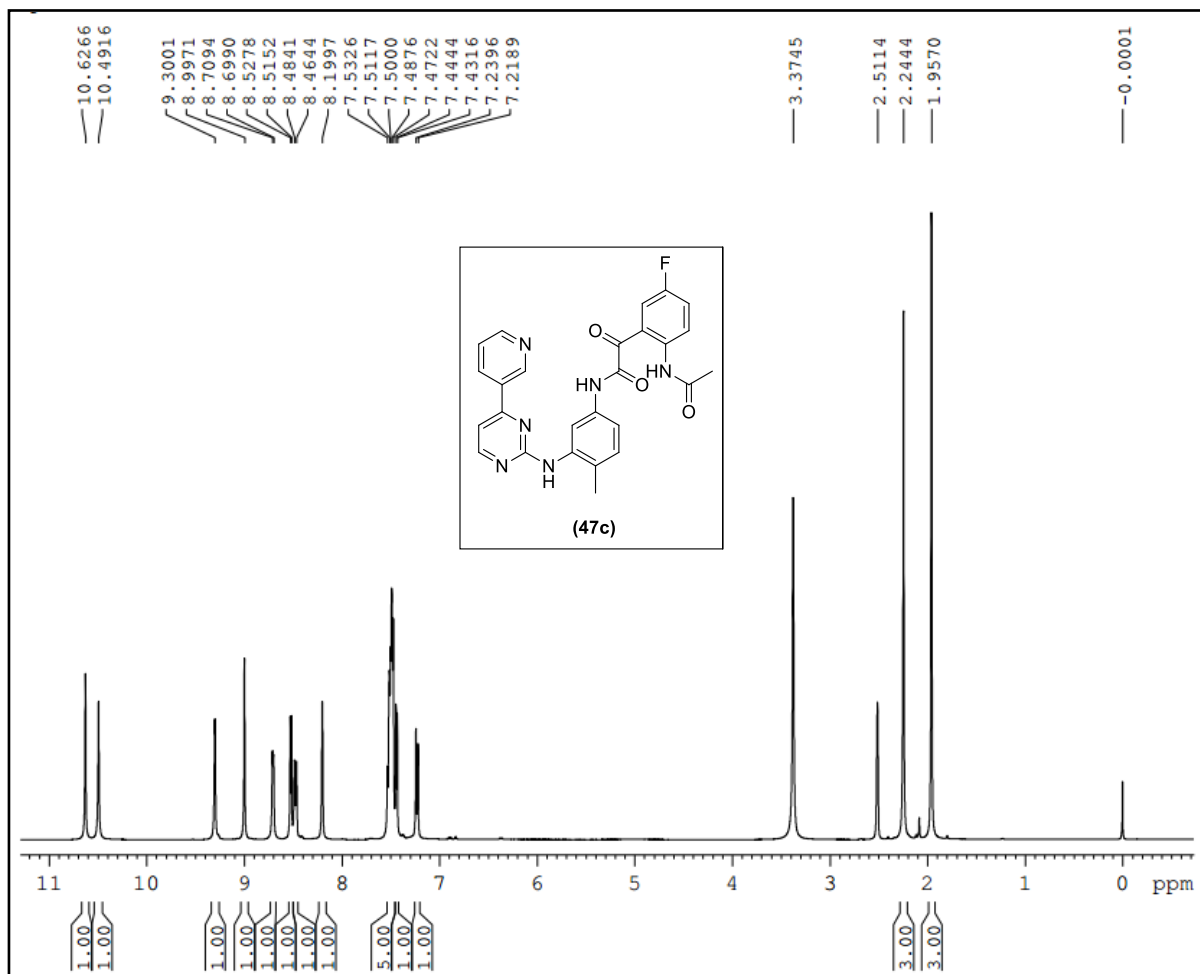
Cromatograma da molécula **47b**



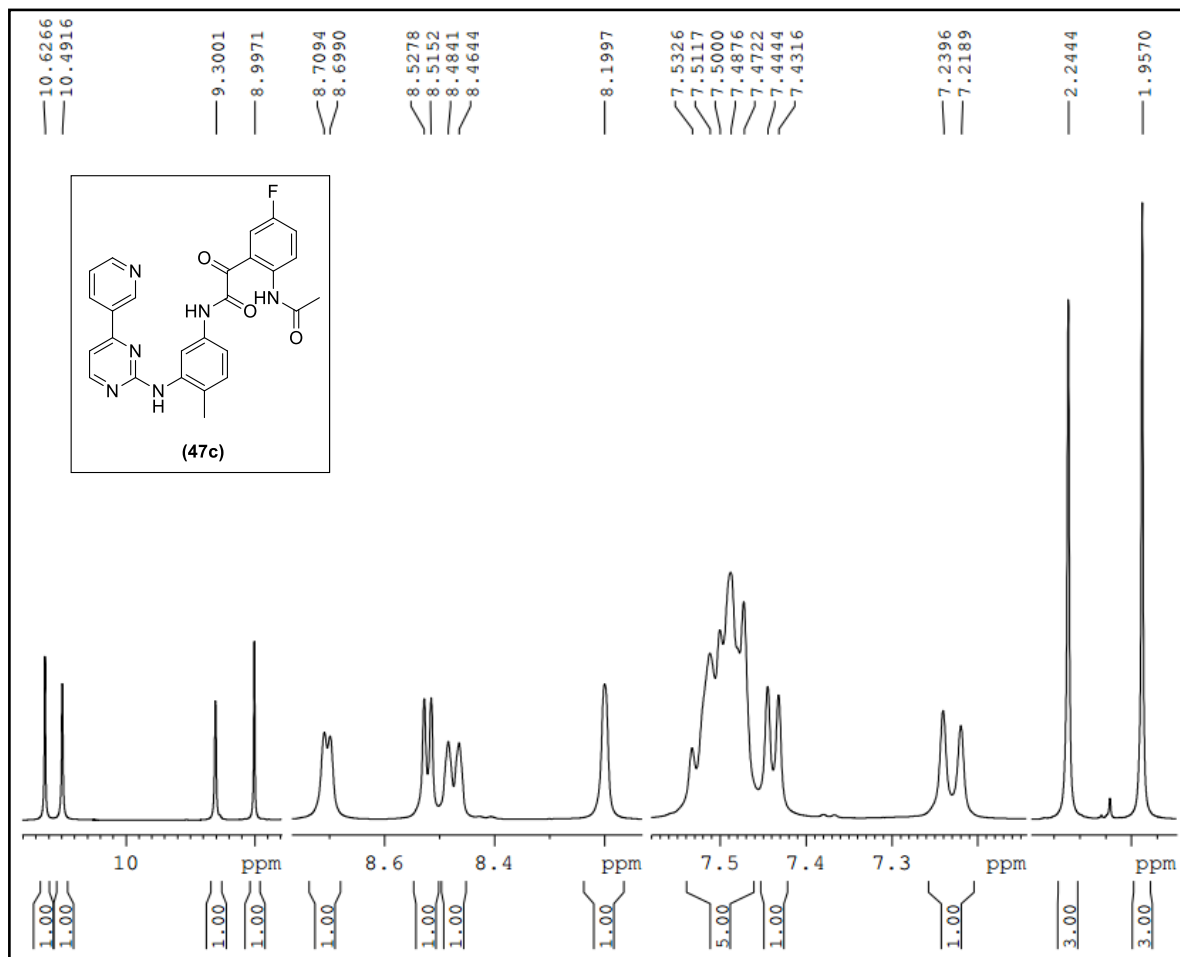
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **47c**



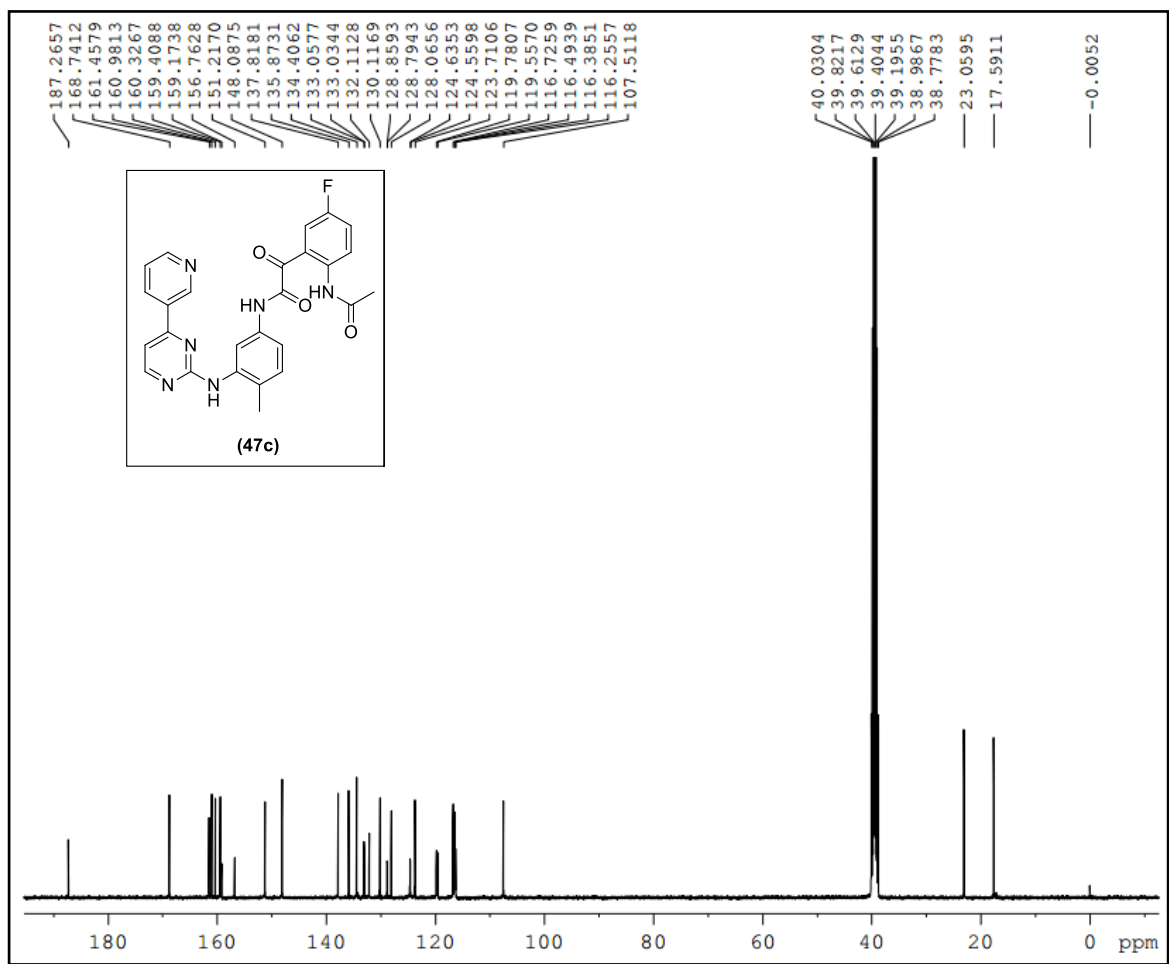
Espectro de IV da molécula **47c**



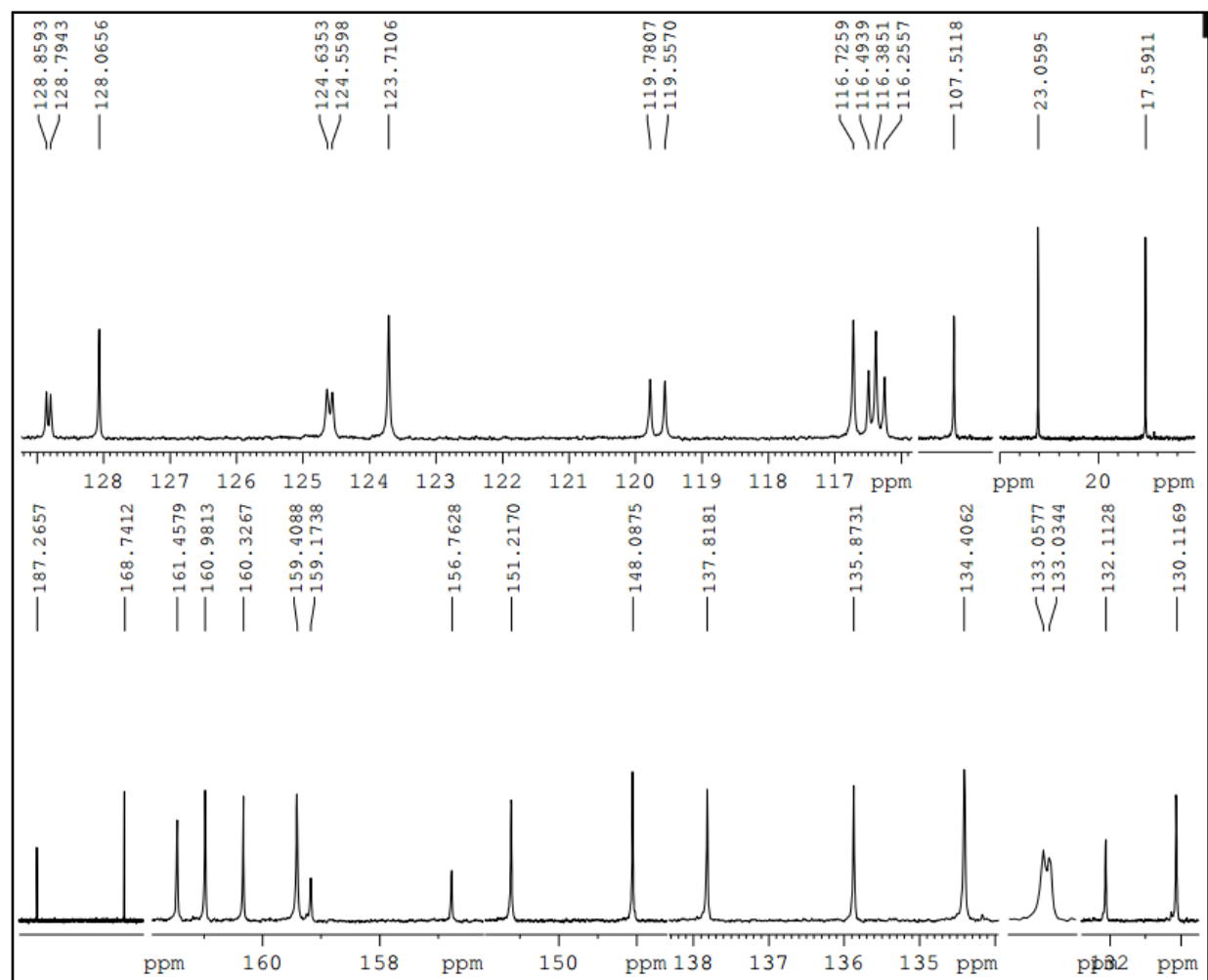
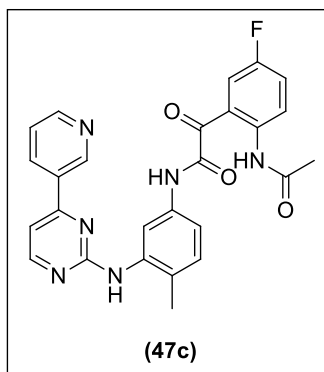
Espectro de RMN ¹H da molécula **47c**



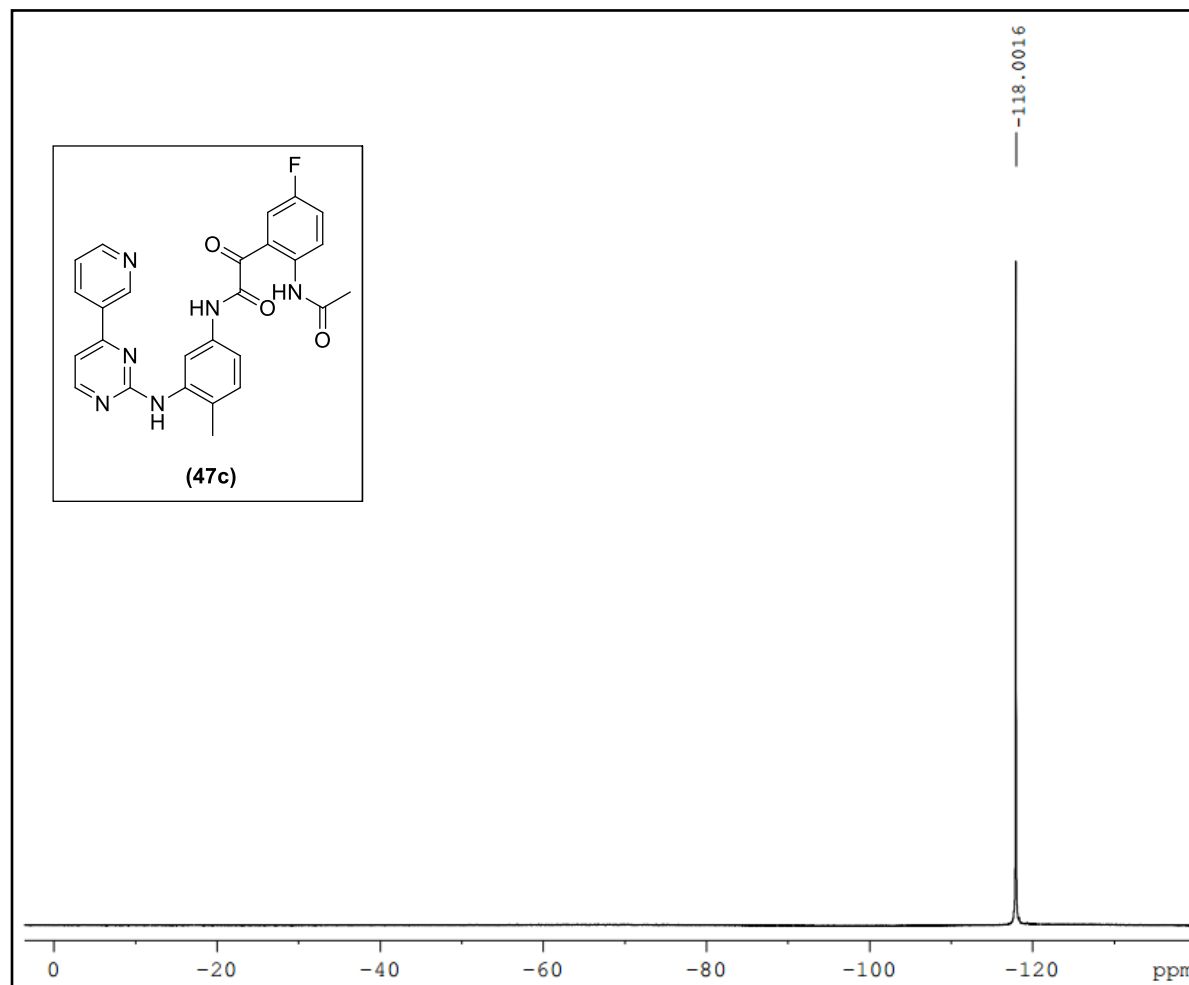
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **47c**



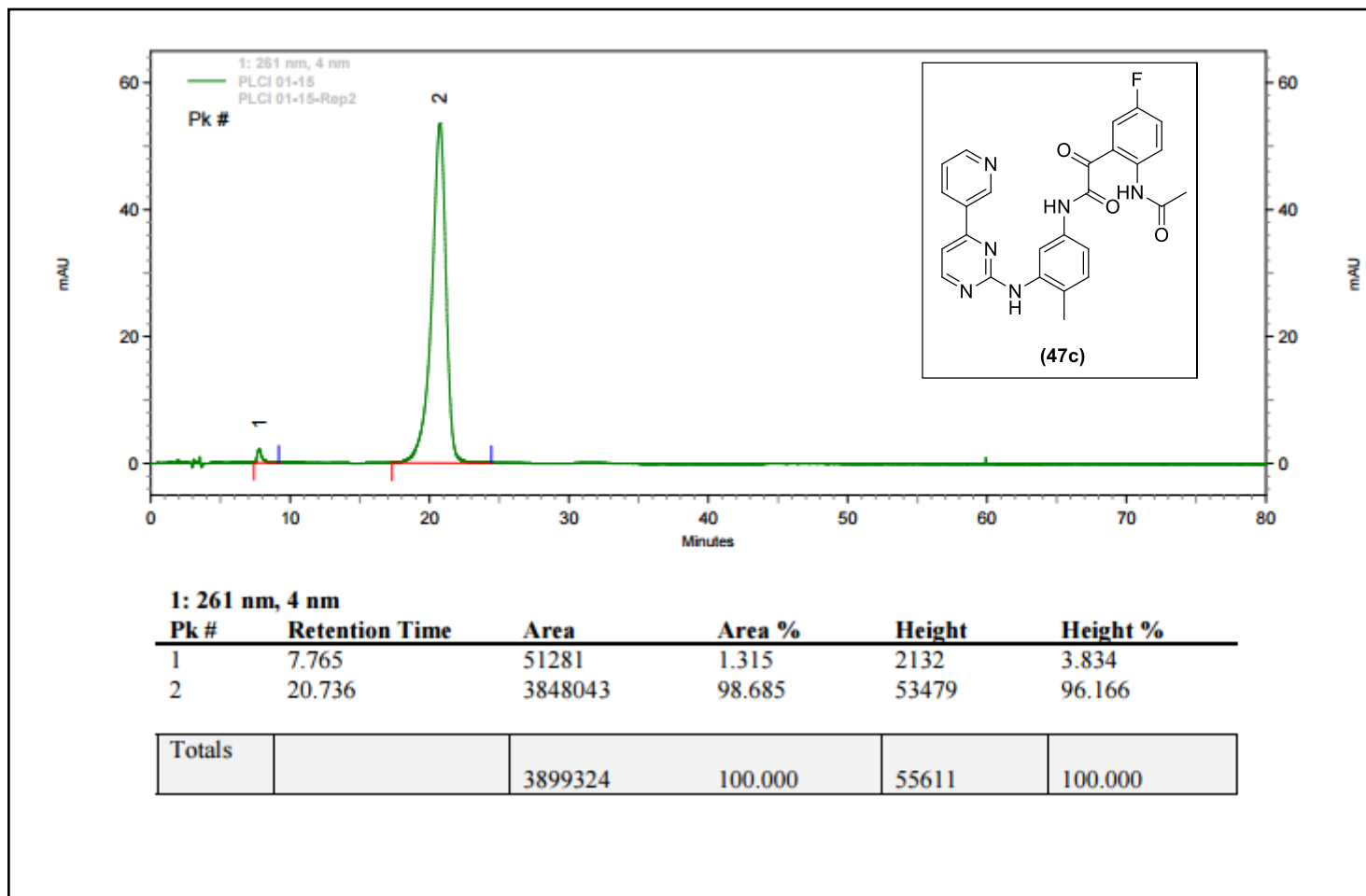
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **47c**



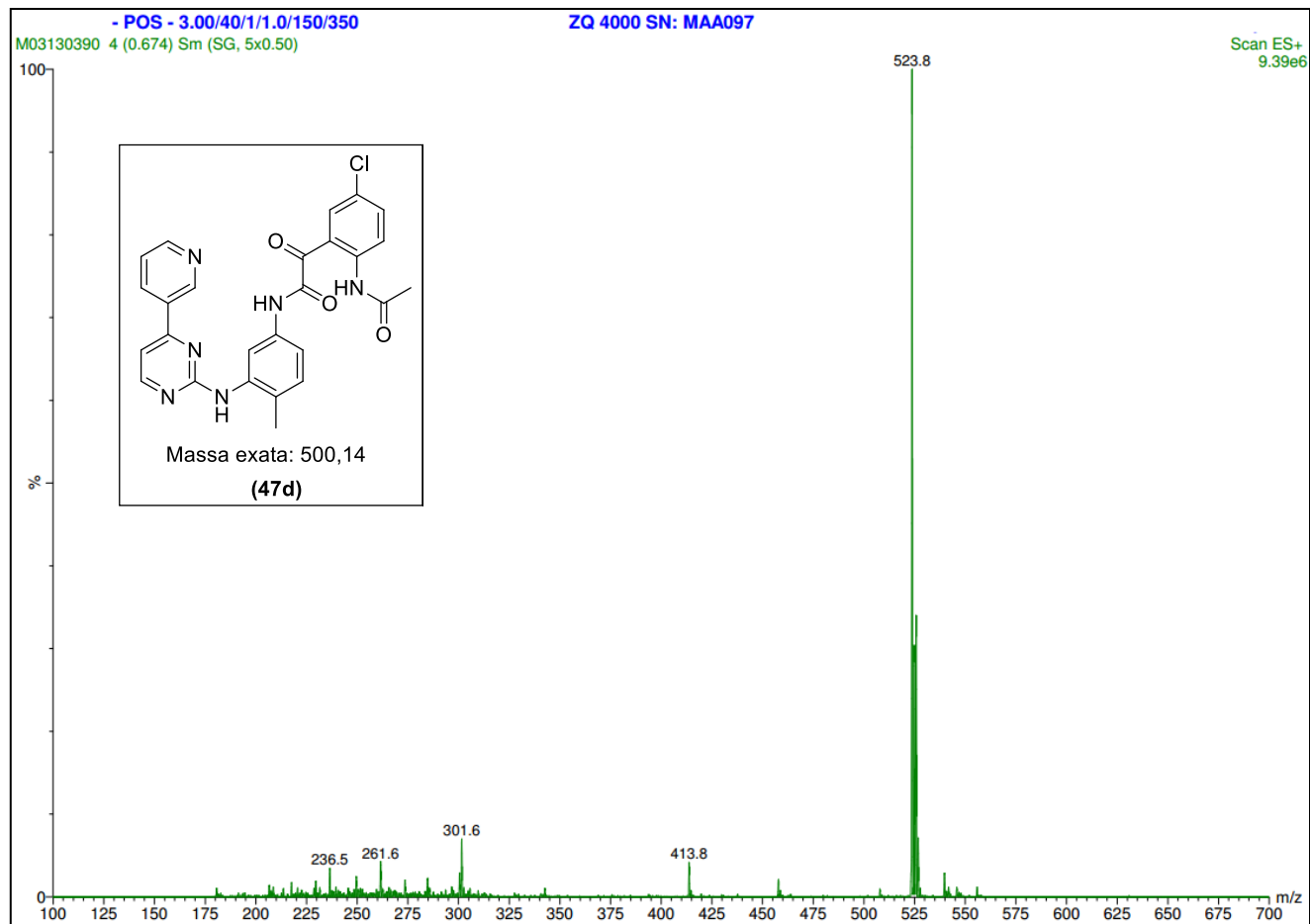
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **47c**



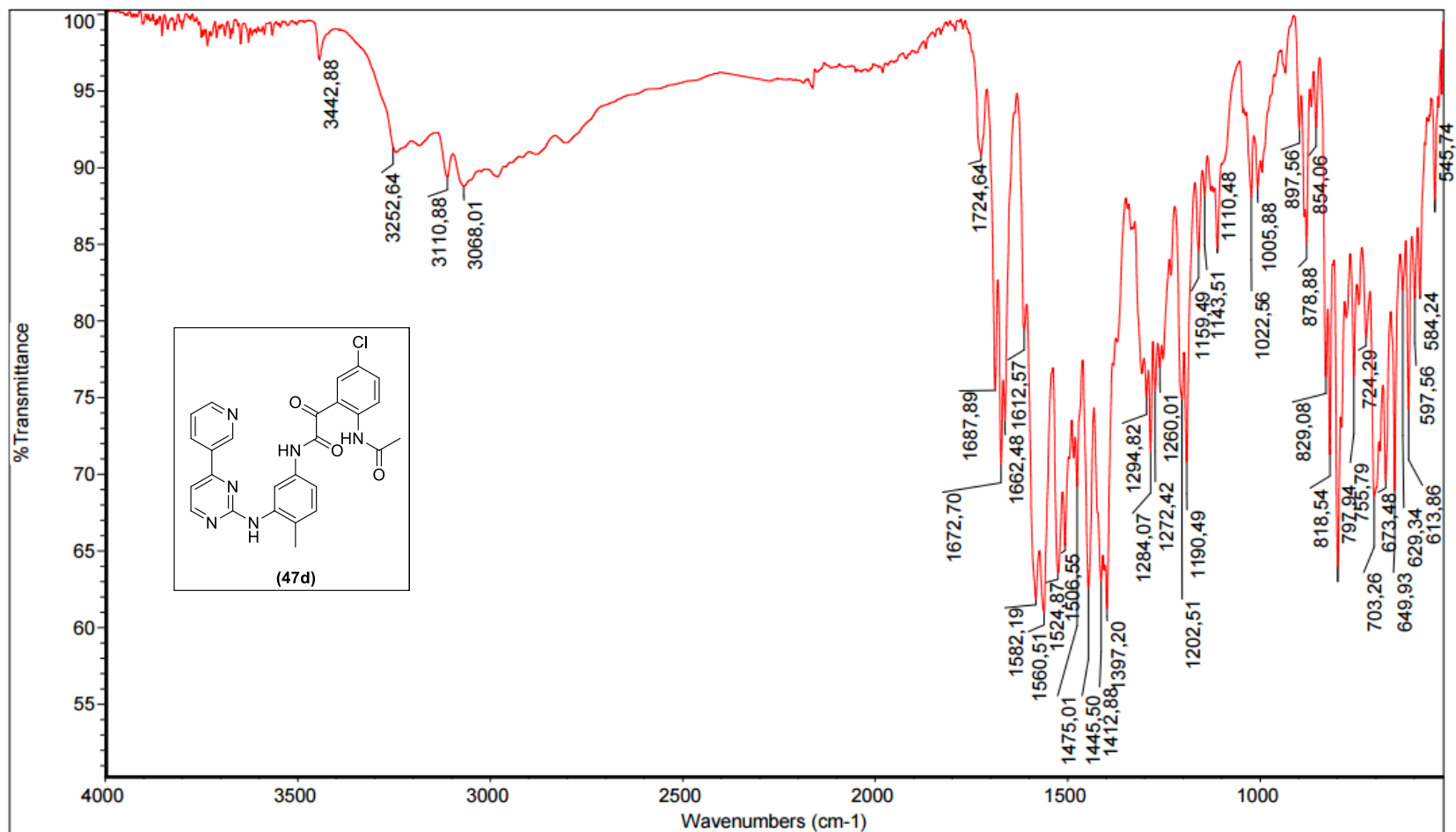
Espectro de RMN ^{19}F da molécula **47c**



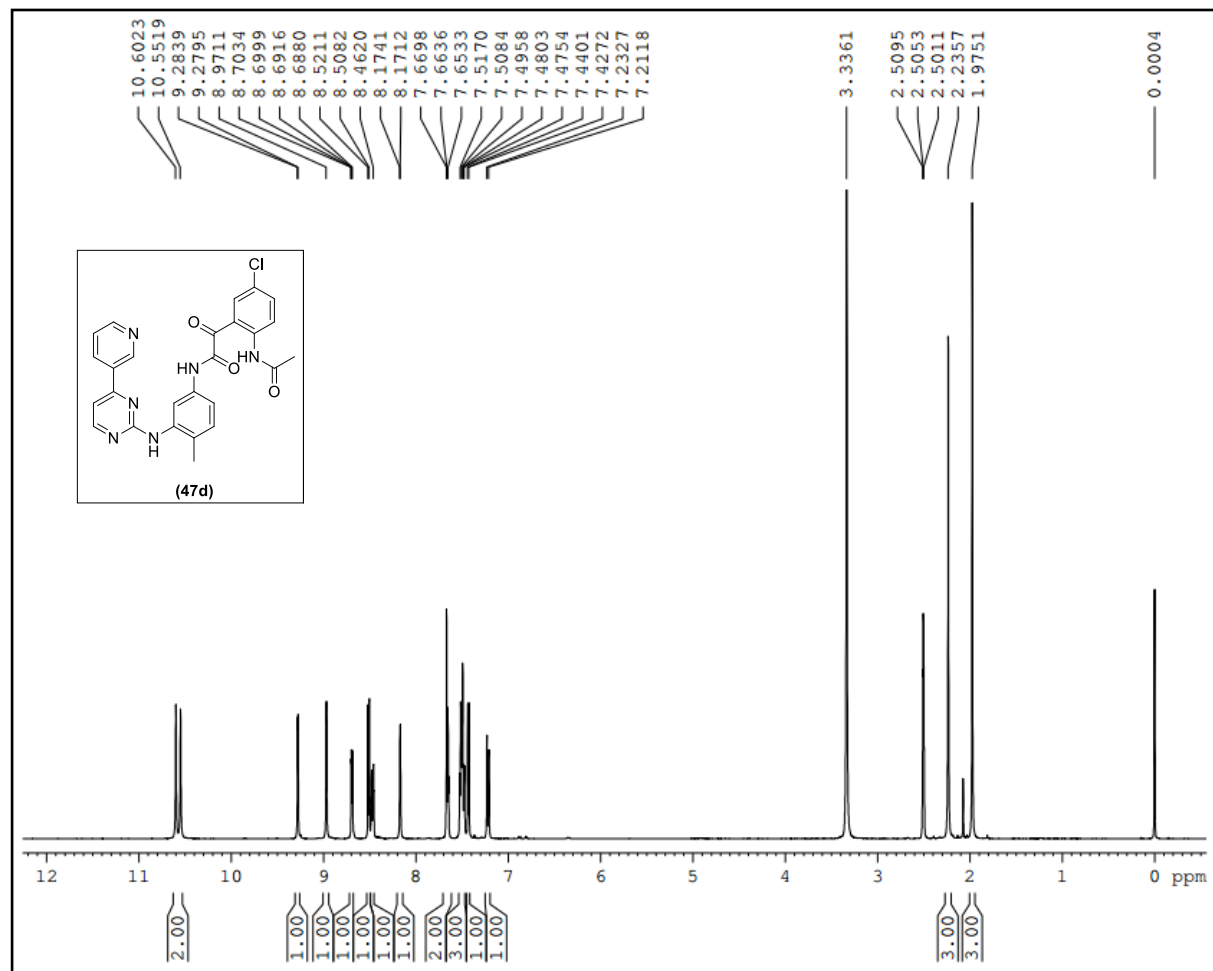
Cromatograma da molécula 47c



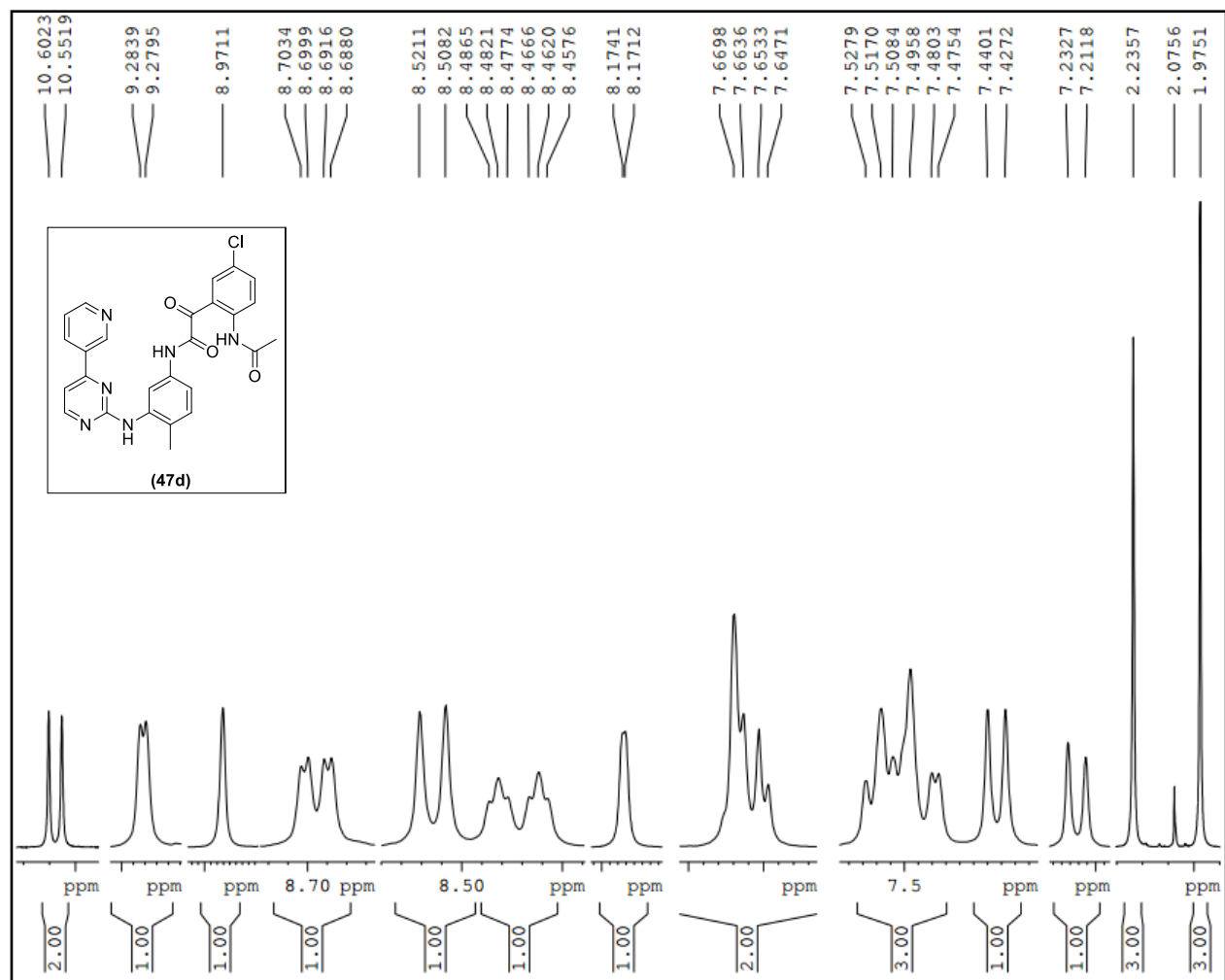
Espectro de (EM-IES $[M+Na]^+$) da molécula **47d**



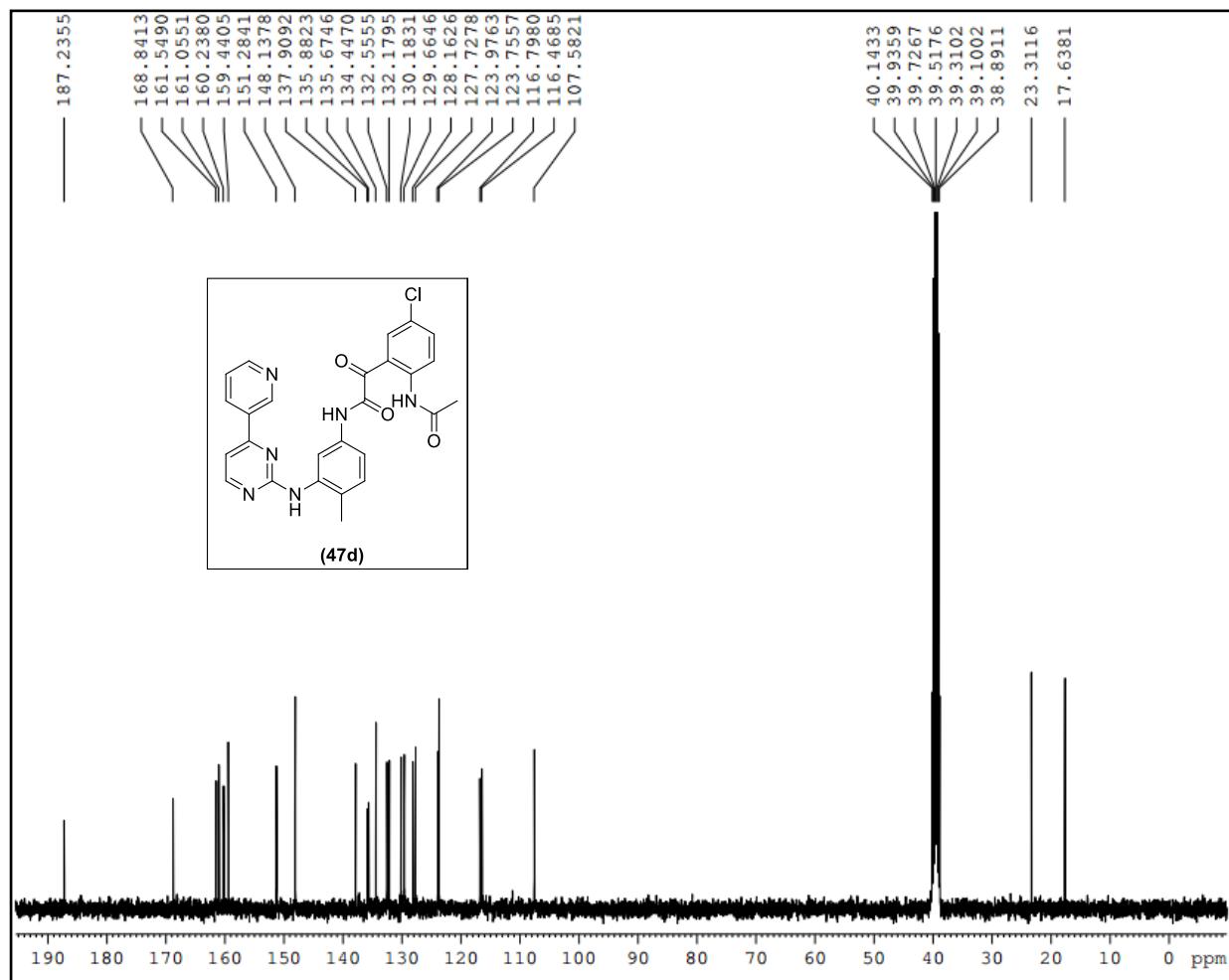
Espectro de IV da molécula **47d**



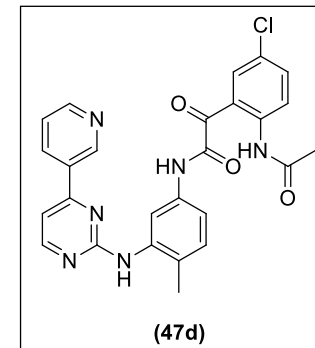
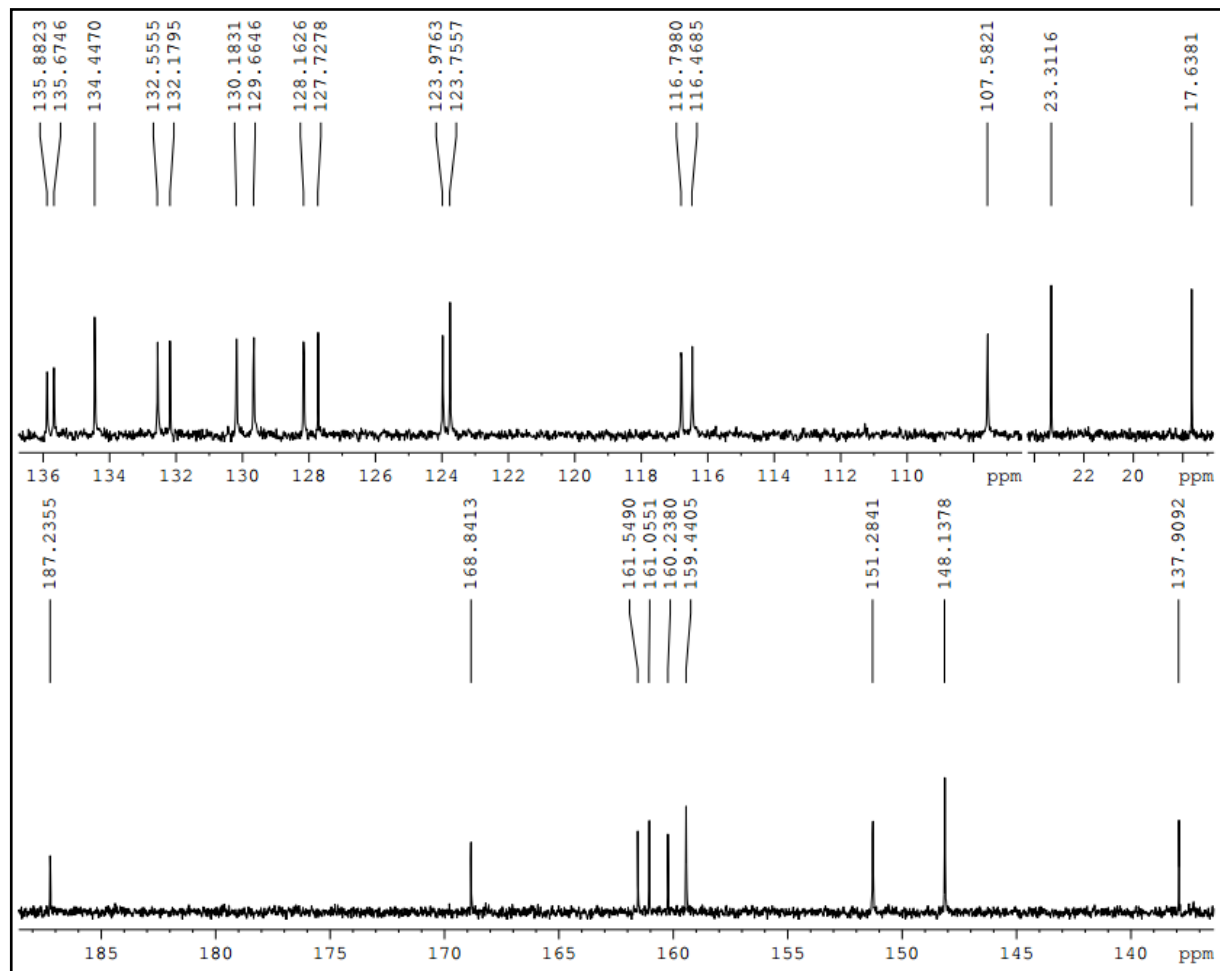
Espectro de RMN ^1H da molécula **47d**



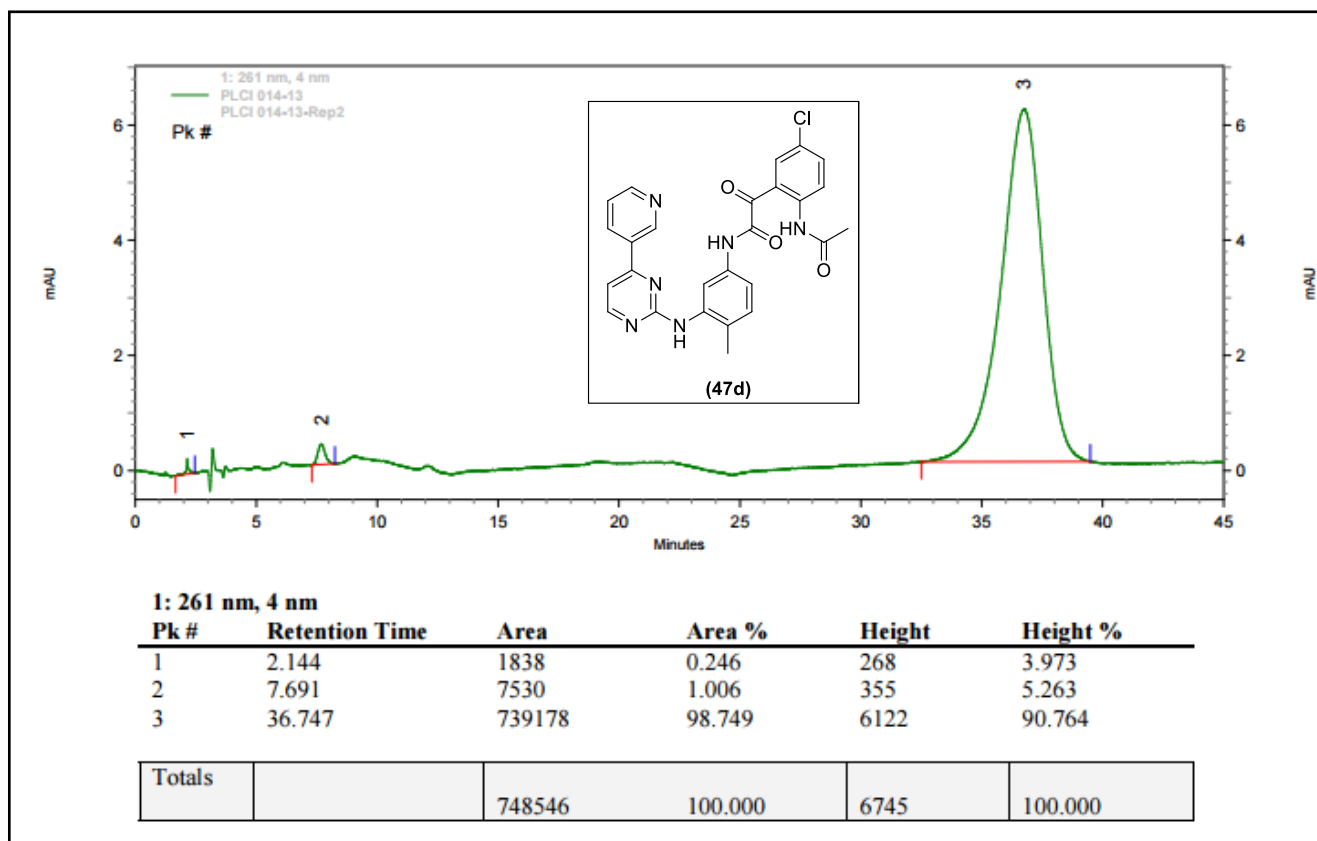
Expansão do espectro de RMN ¹H da molécula **47d**



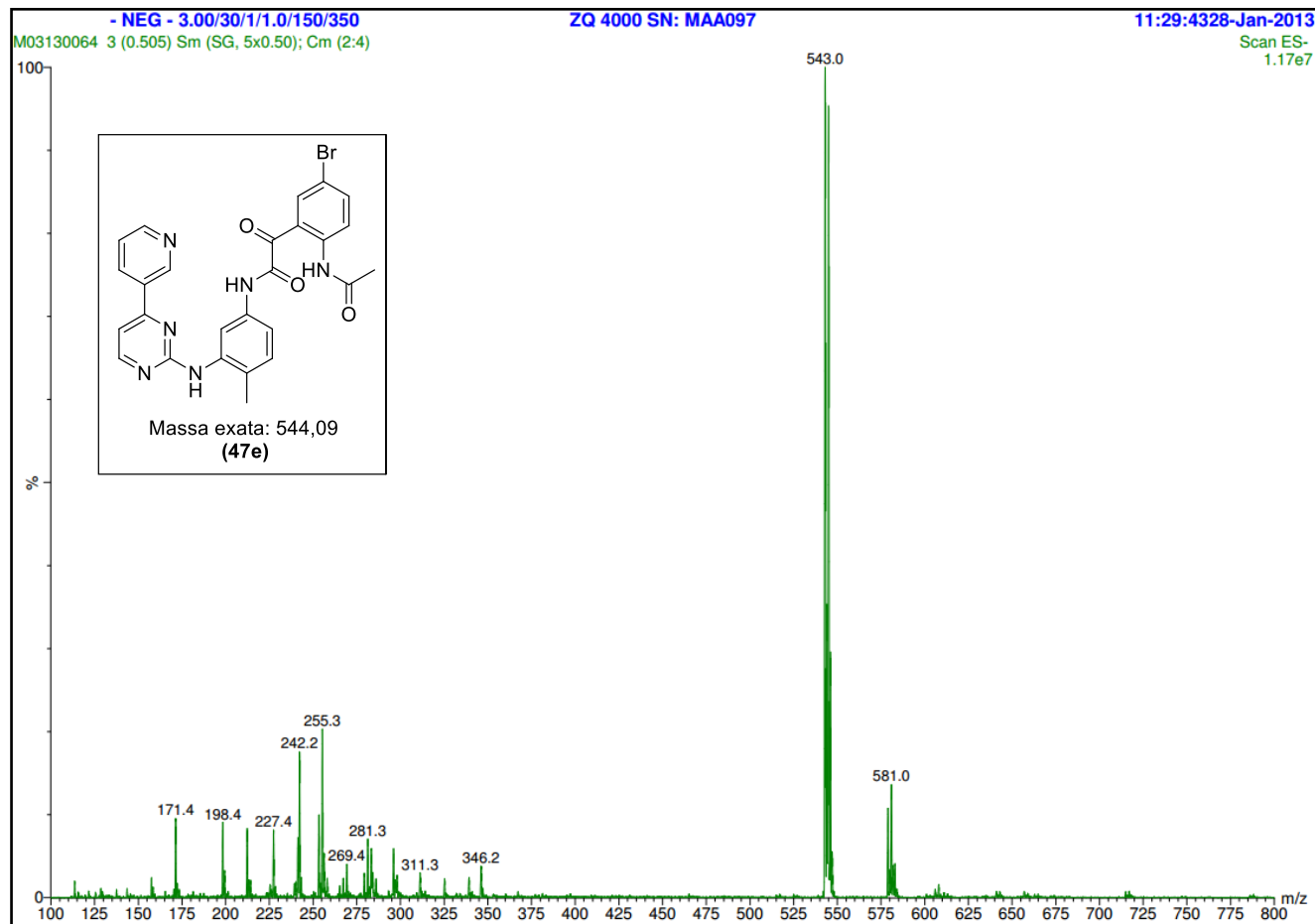
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **47d**



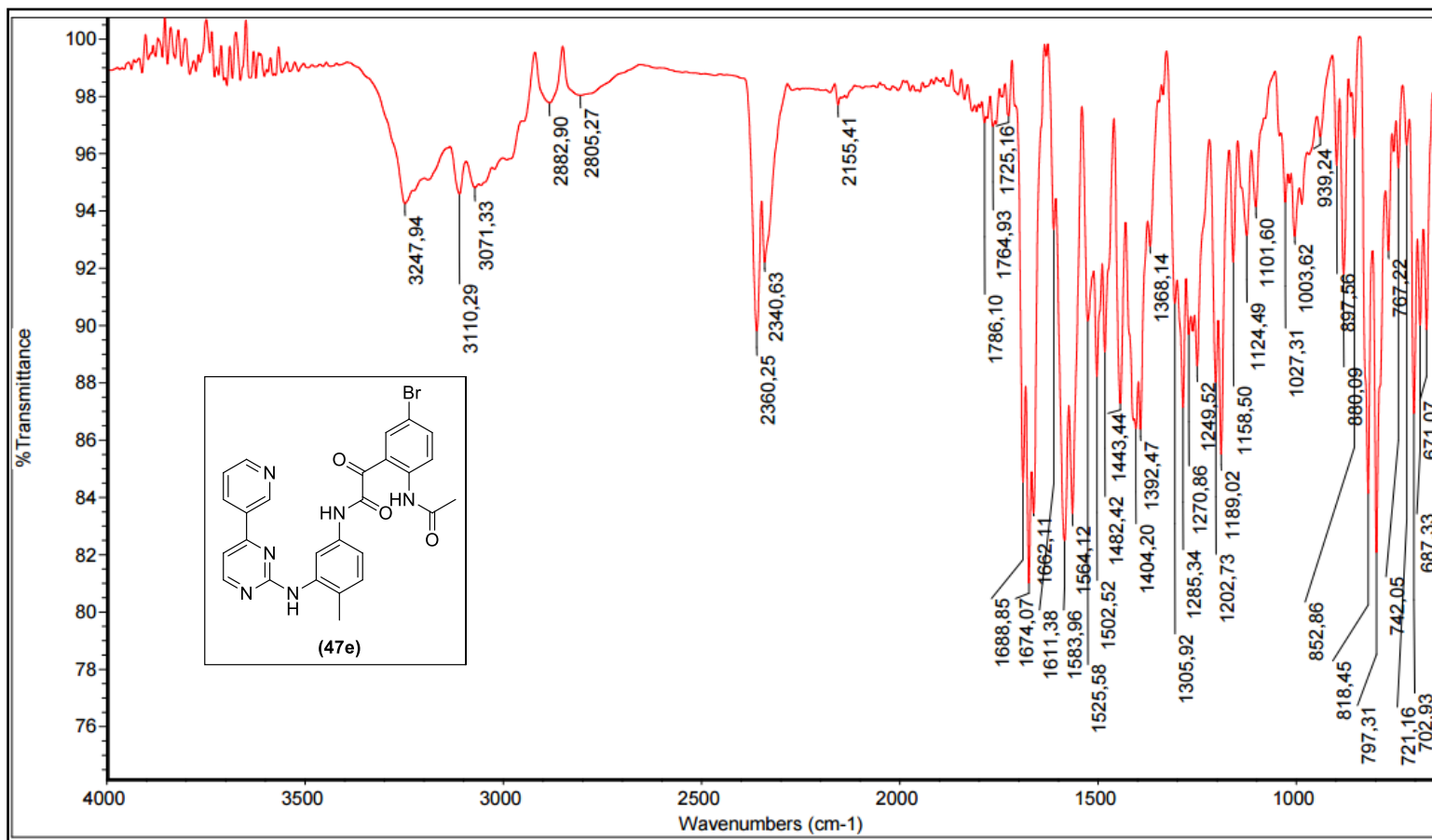
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **47d**



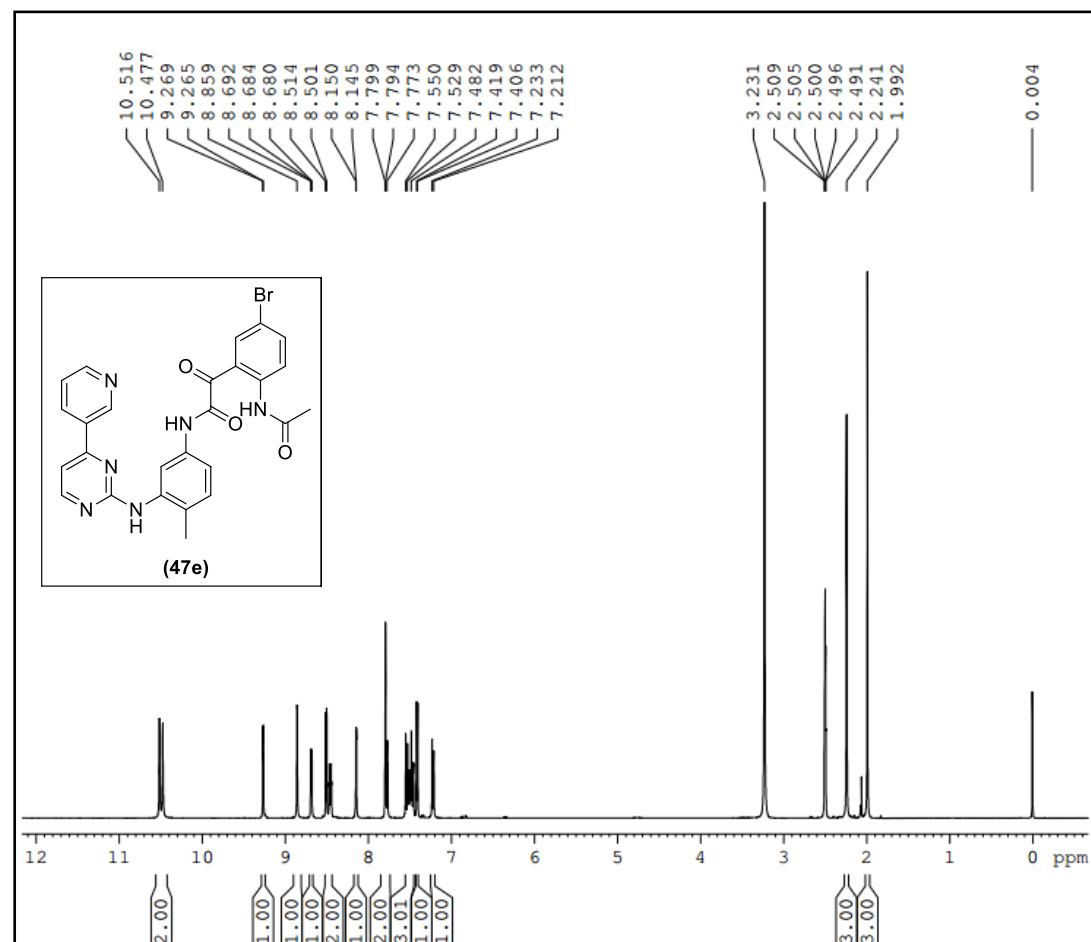
Cromatograma da molécula **47d**



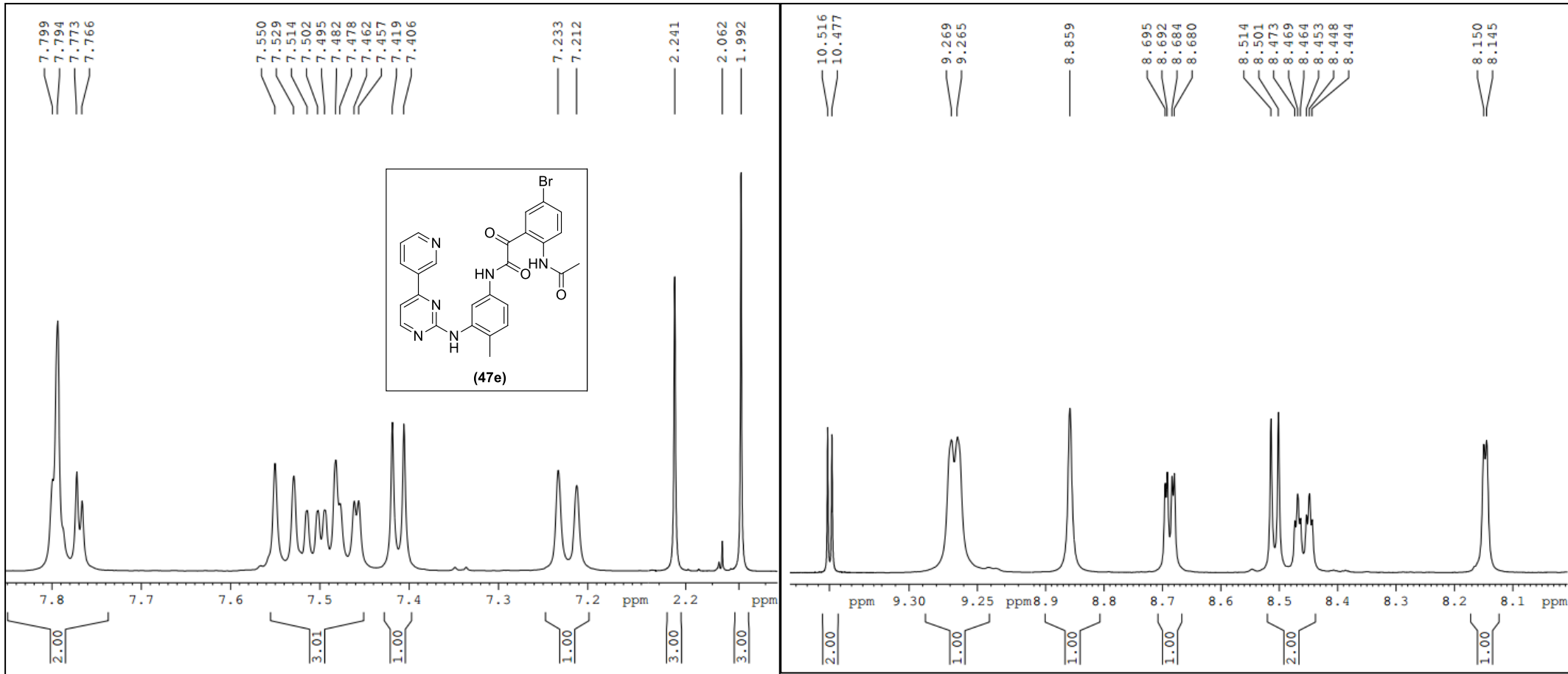
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **47e**



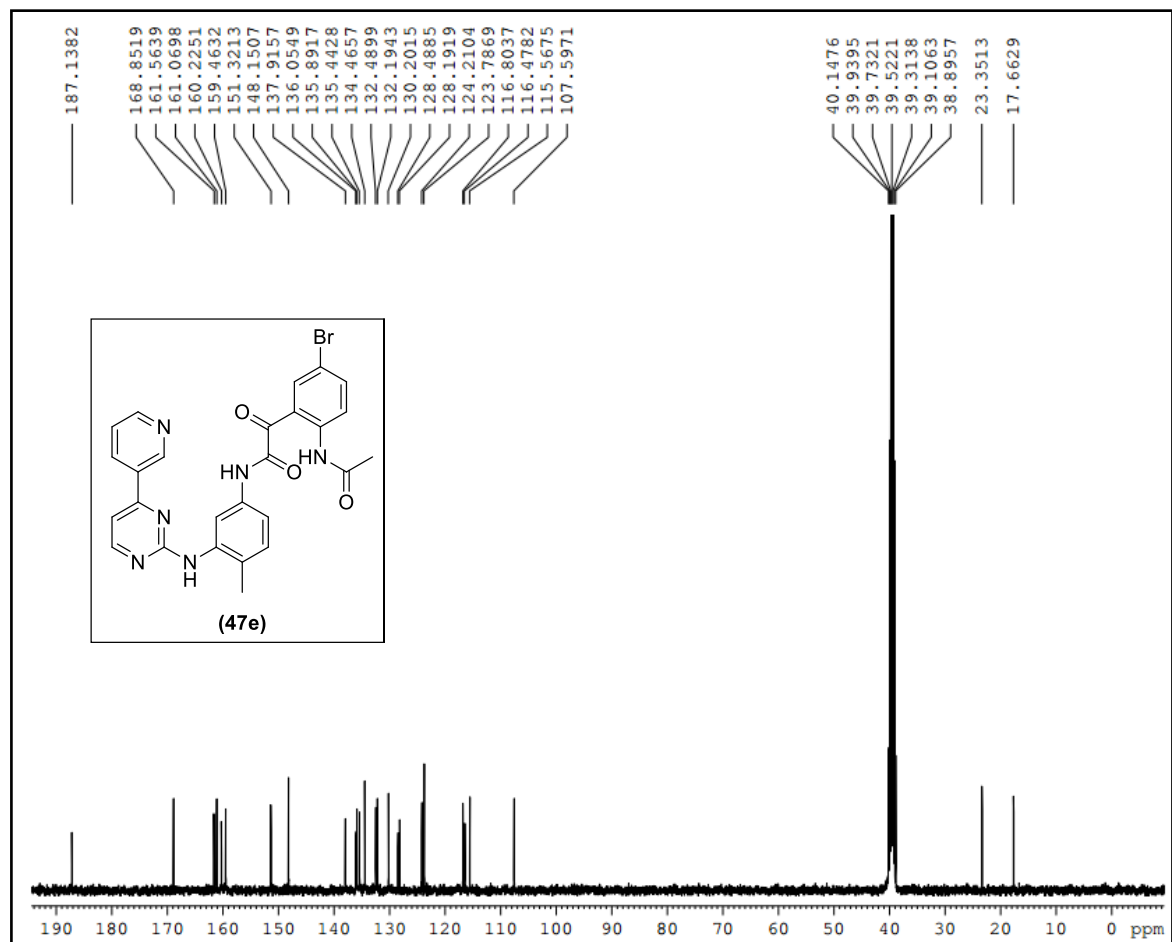
Espectro de IV da molécula **47e**



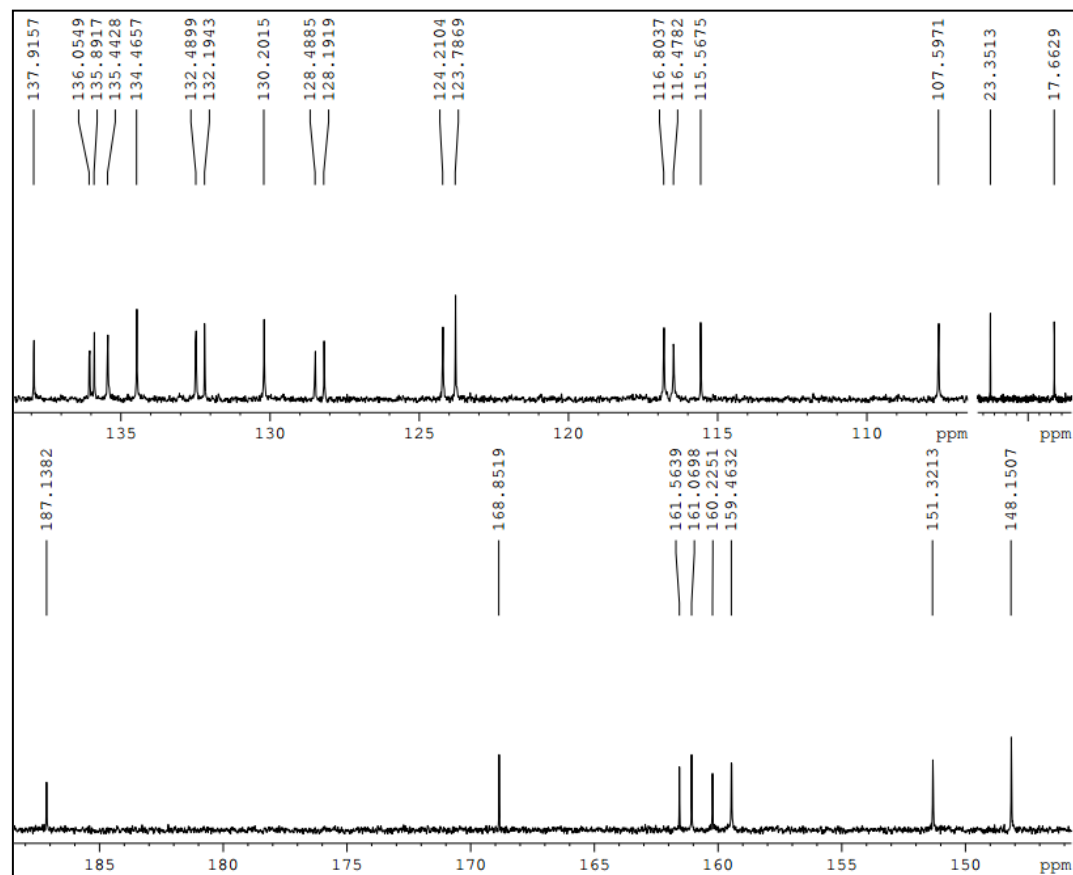
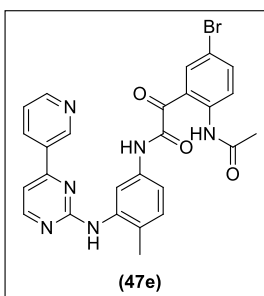
Espectro de RMN ¹H da molécula **47e**



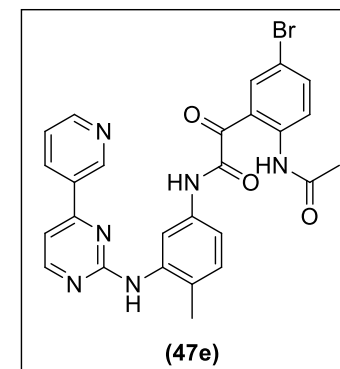
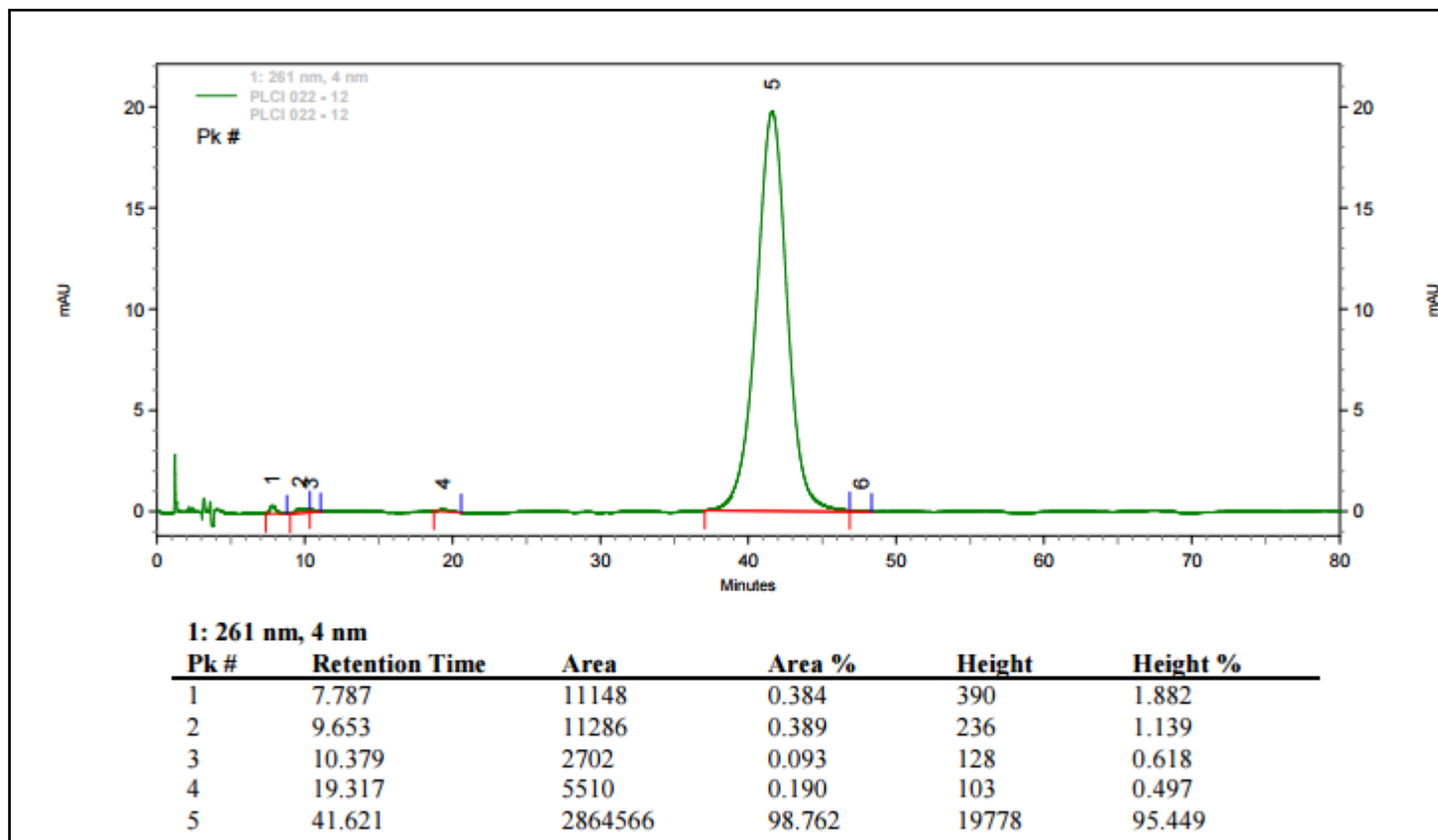
Expansões do espectro de RMN ^1H da molécula **47e**



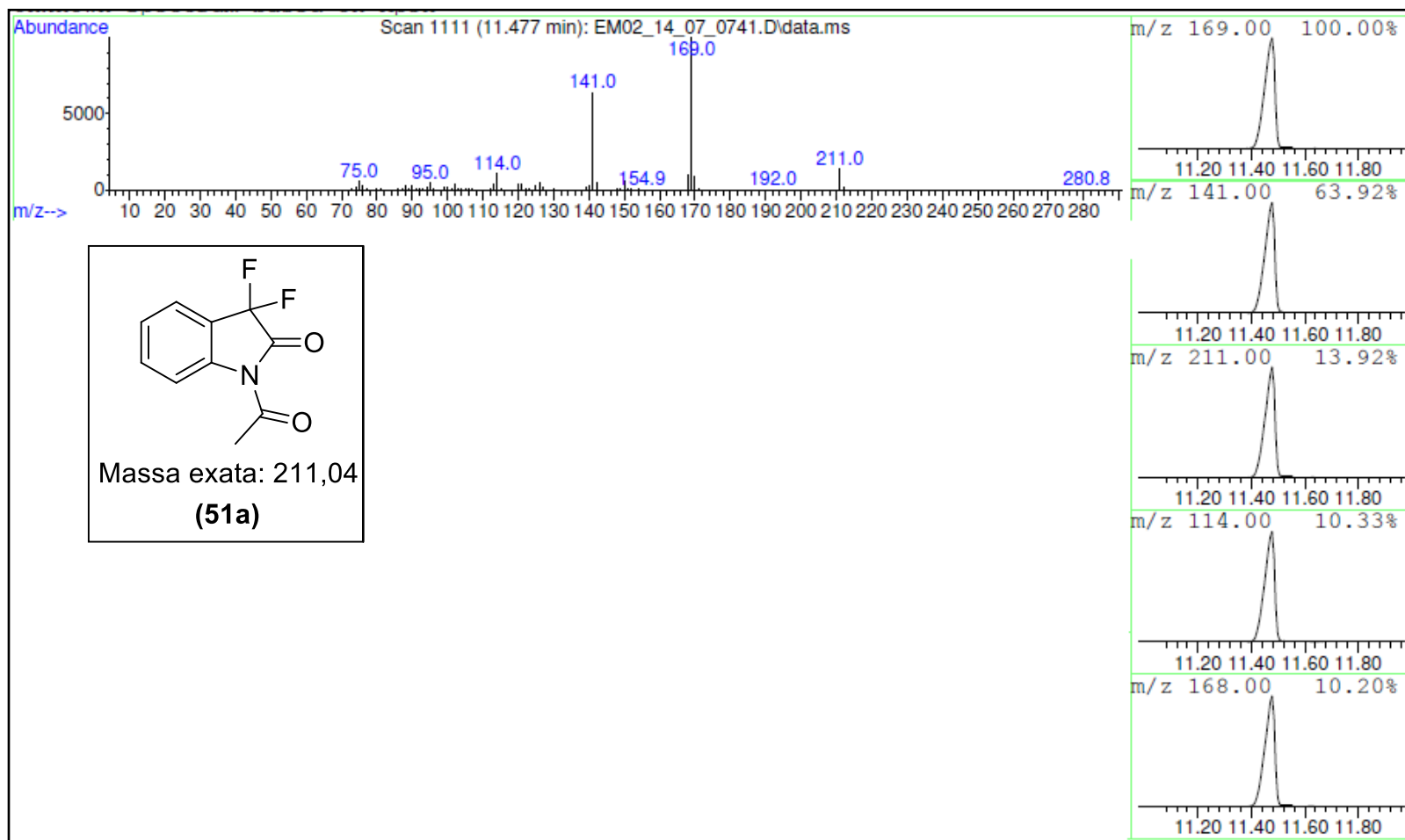
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **47e**



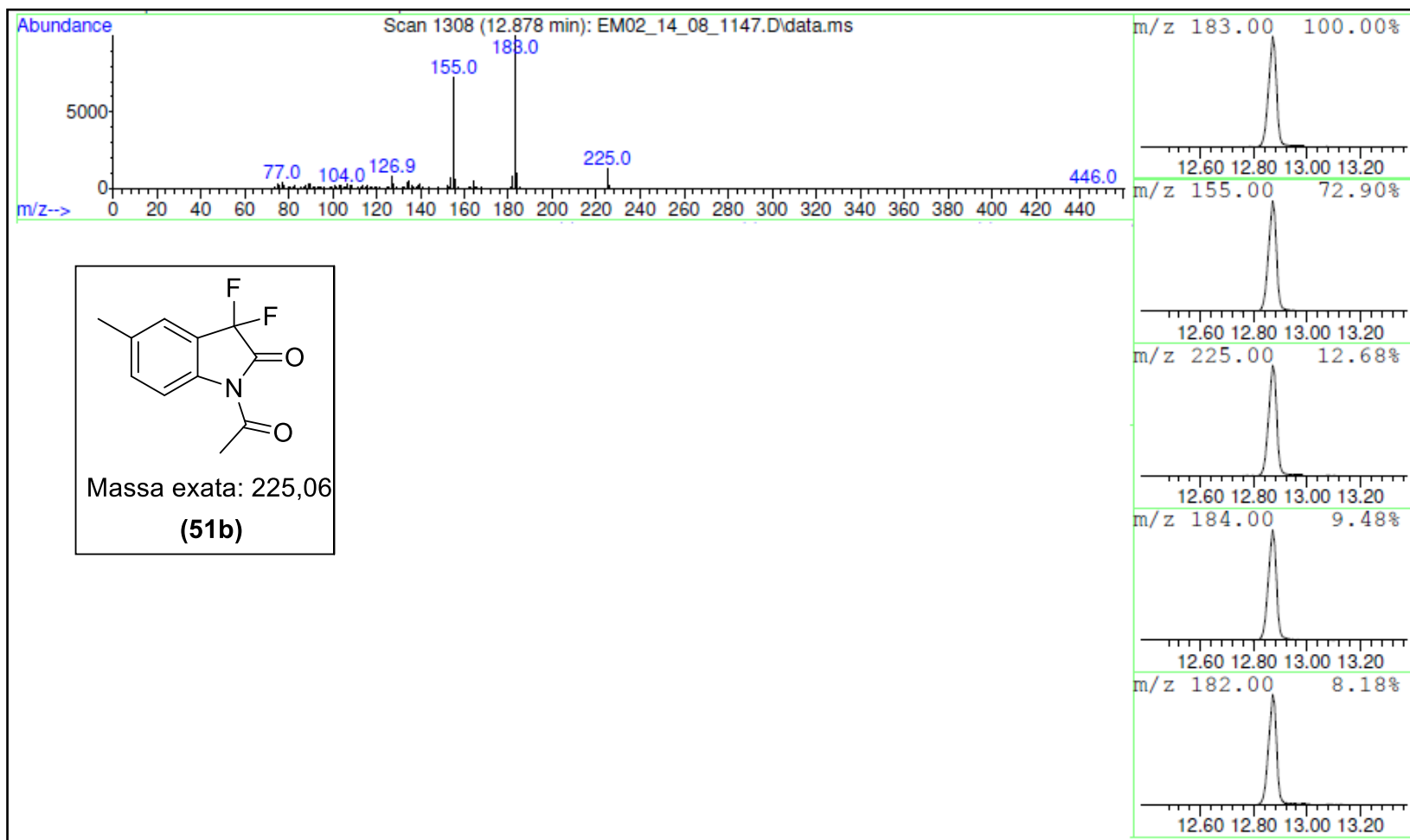
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **47e**



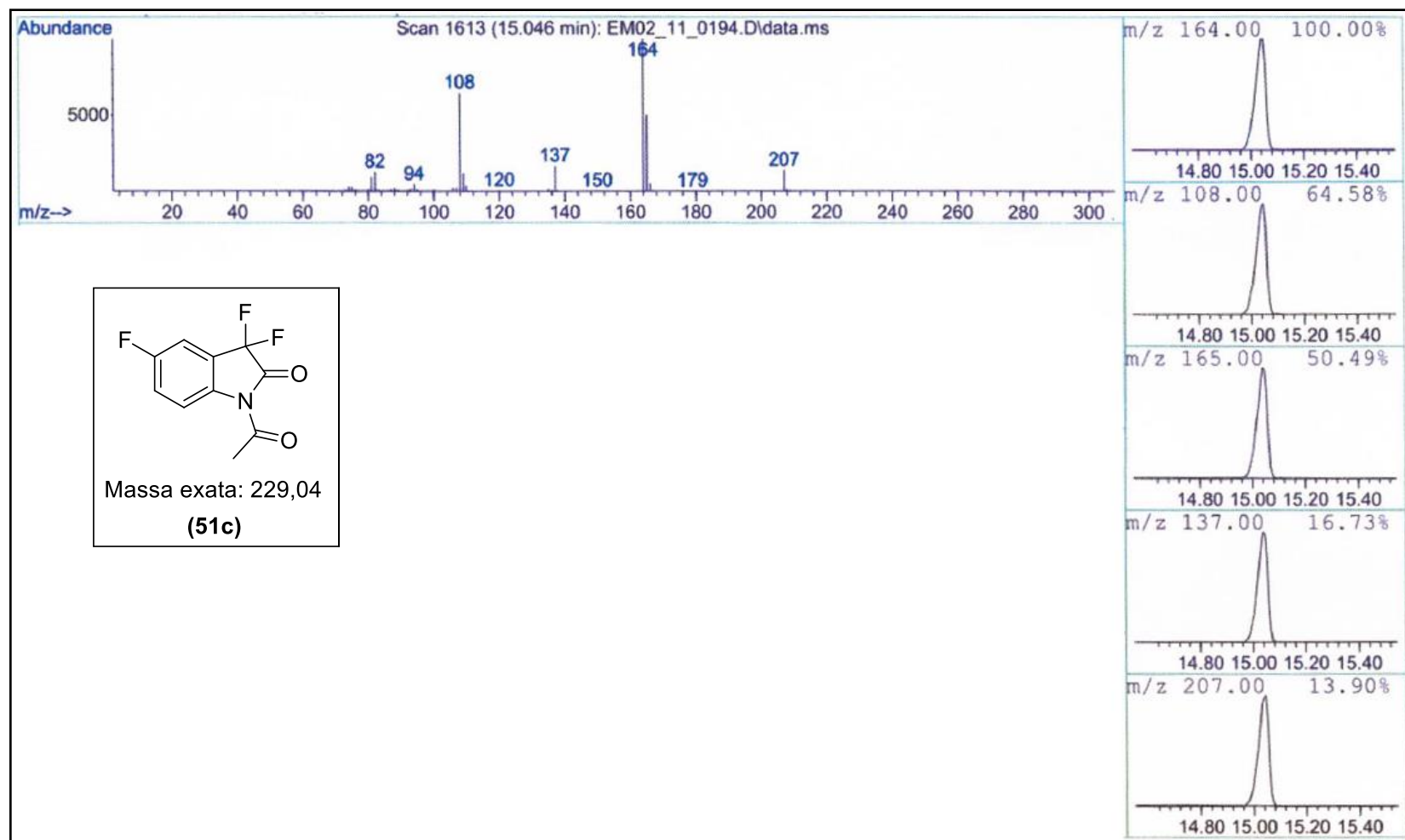
Cromatograma da molécula **47e**



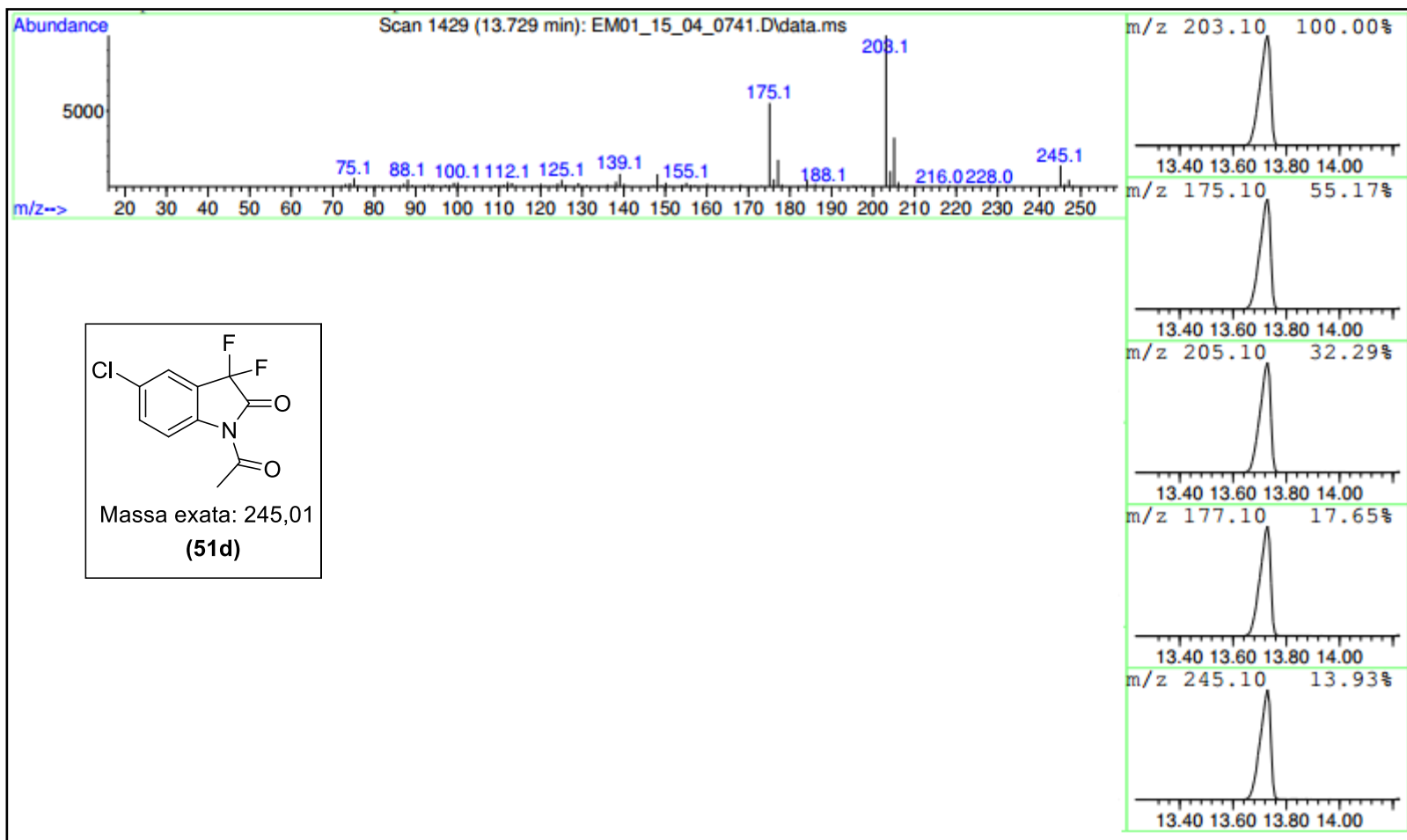
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **51a**



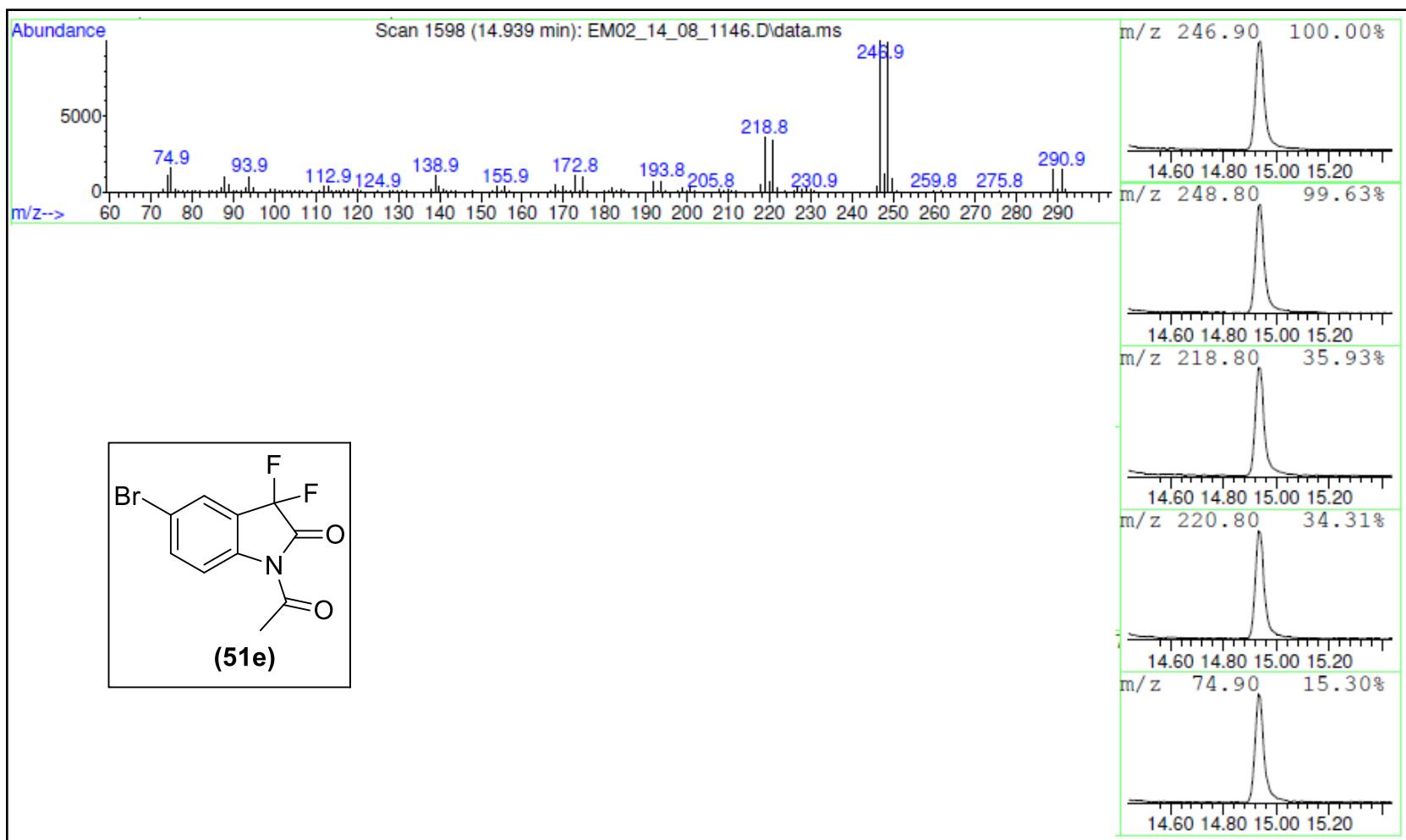
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **51b**



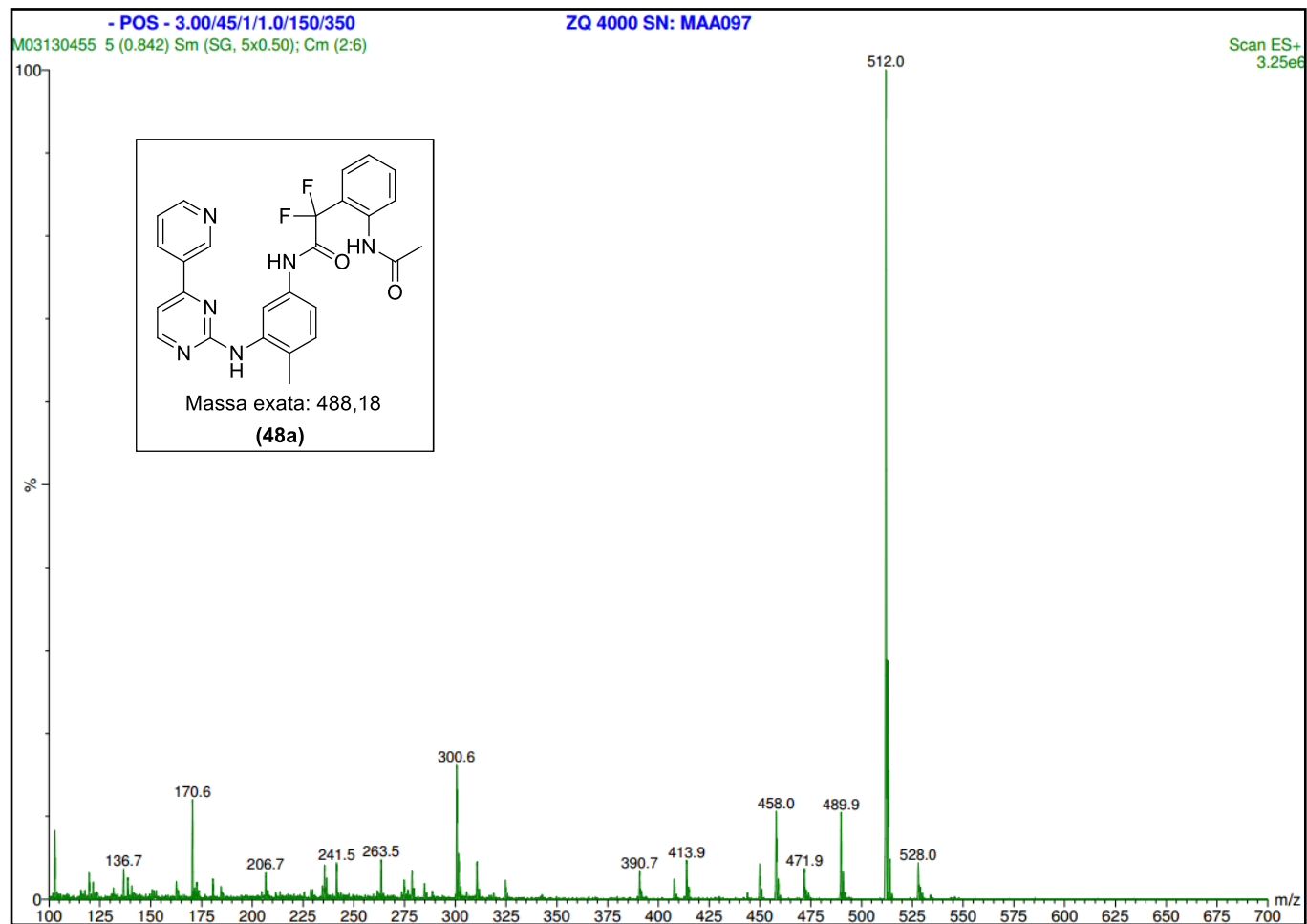
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **51c**



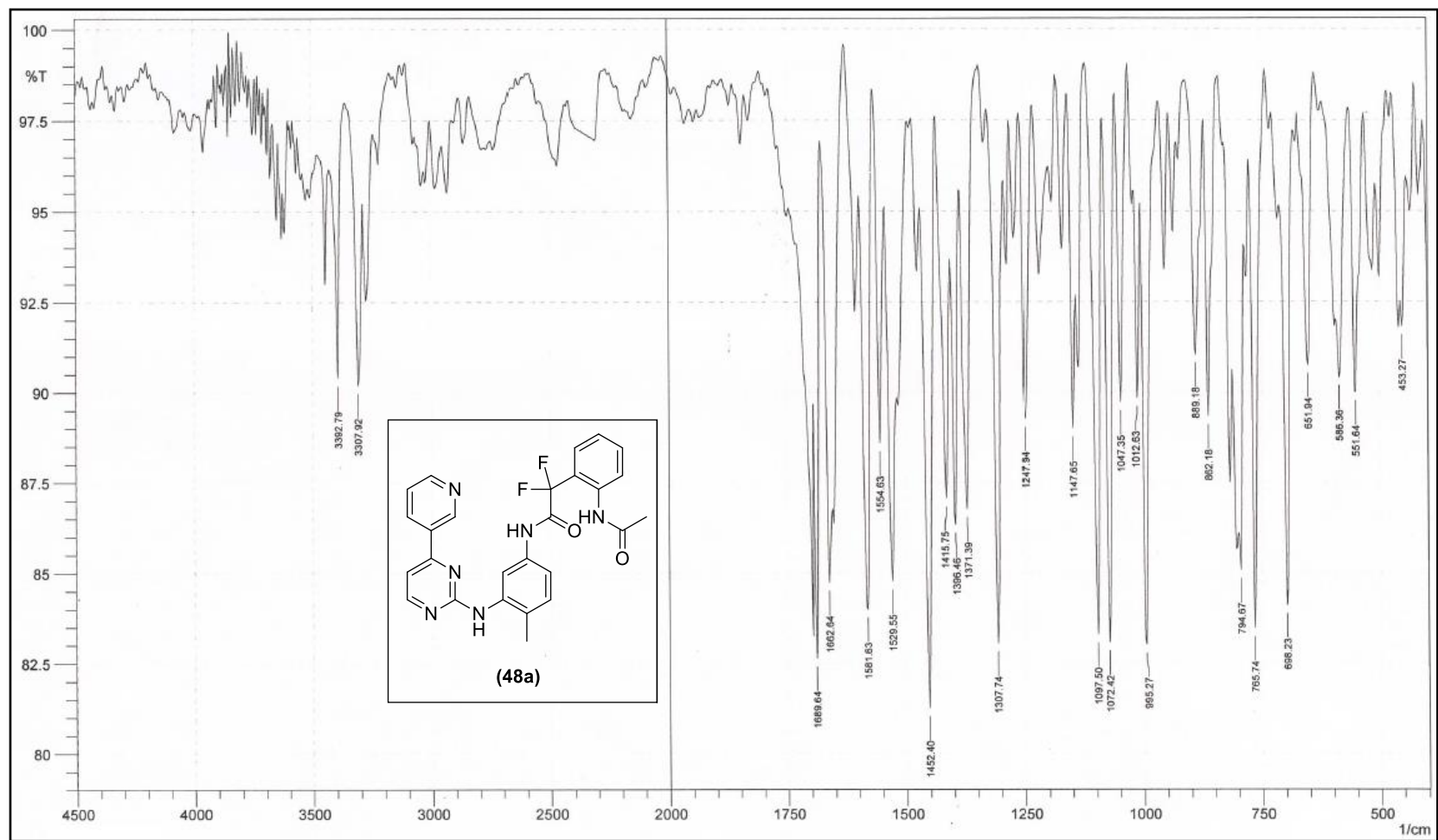
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **51d**



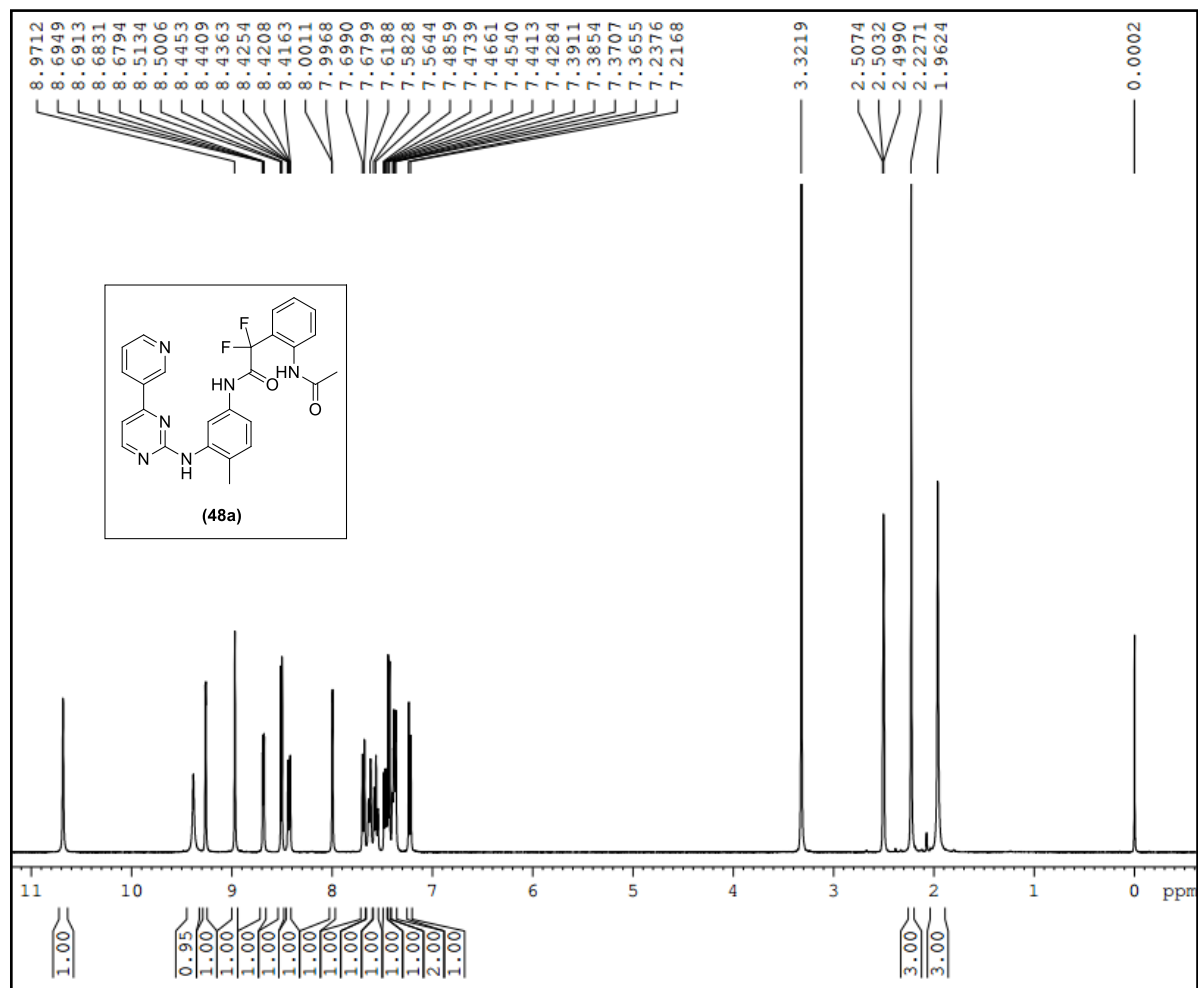
Espectro de massas (CG-EM) do intermediário **51e**



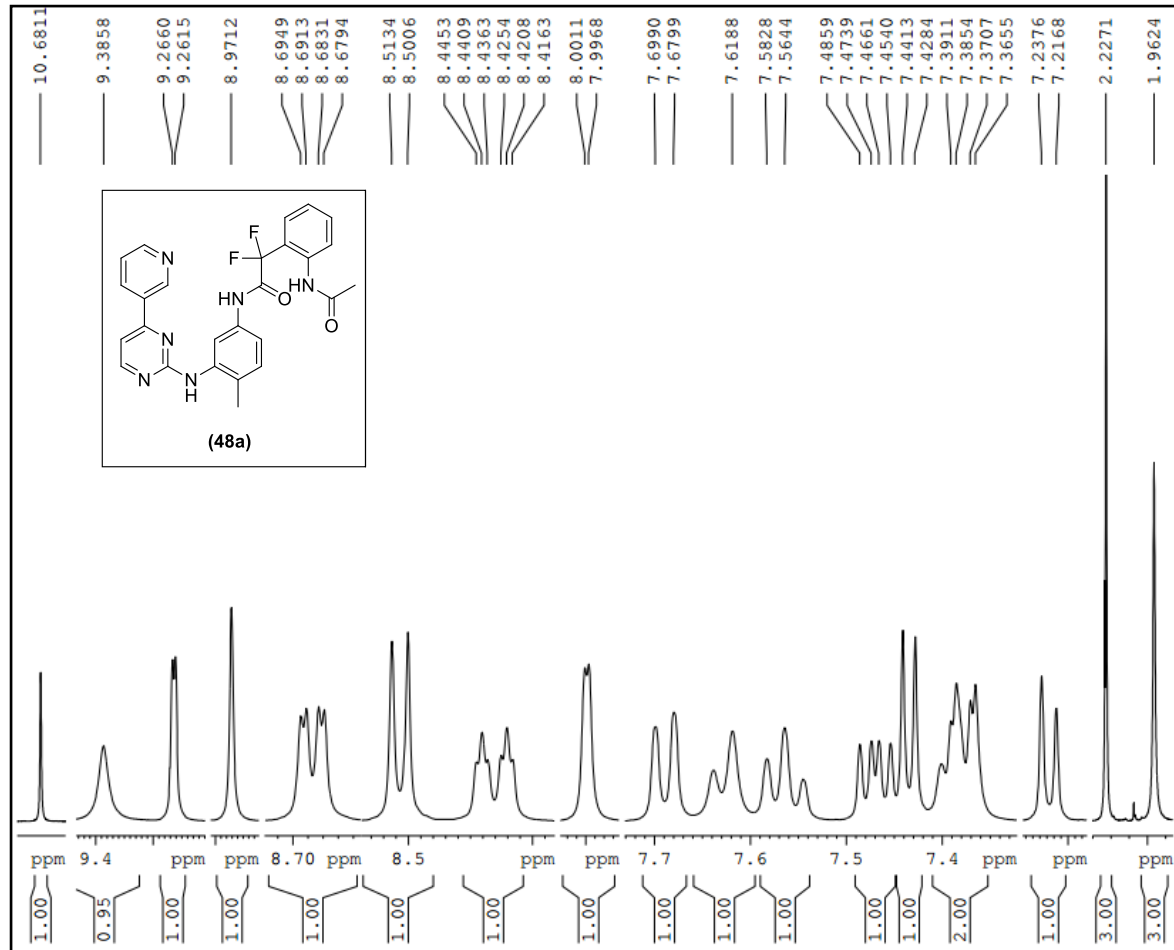
Espectro de (EM-IES $[M+Na]^+$) da molécula **48a**



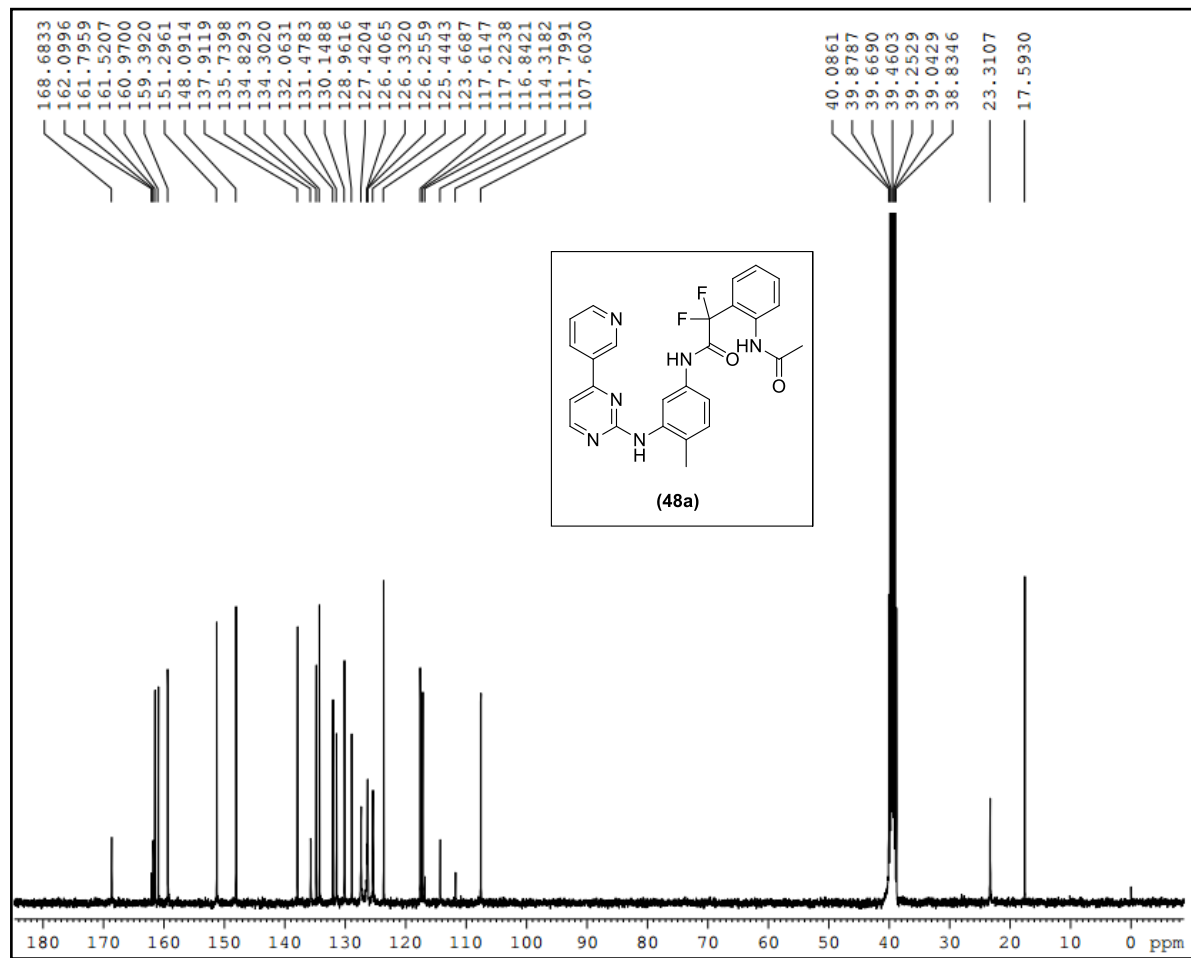
Espectro de IV da molécula **48a**



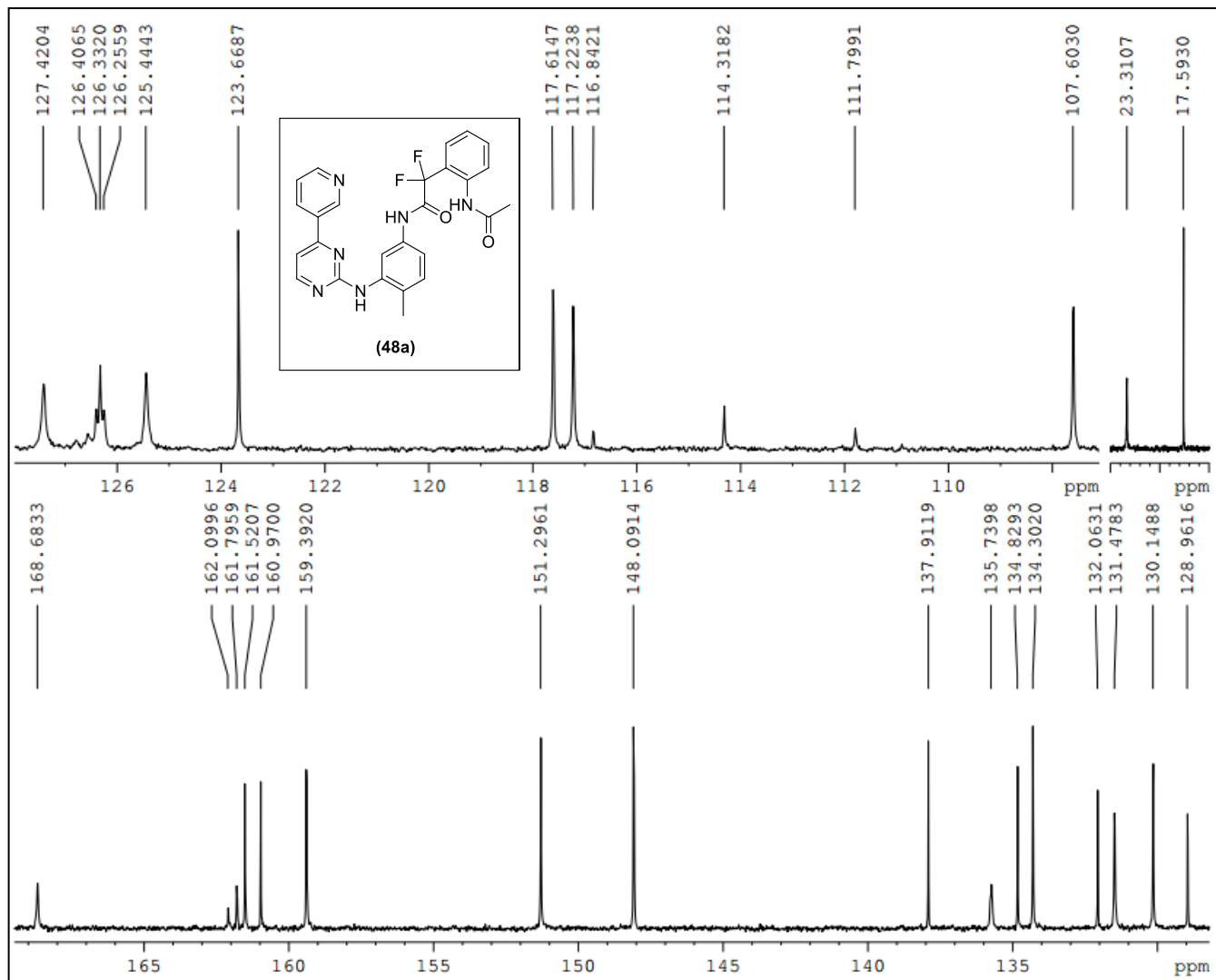
Espectro de RMN ¹H da molécula **48a**



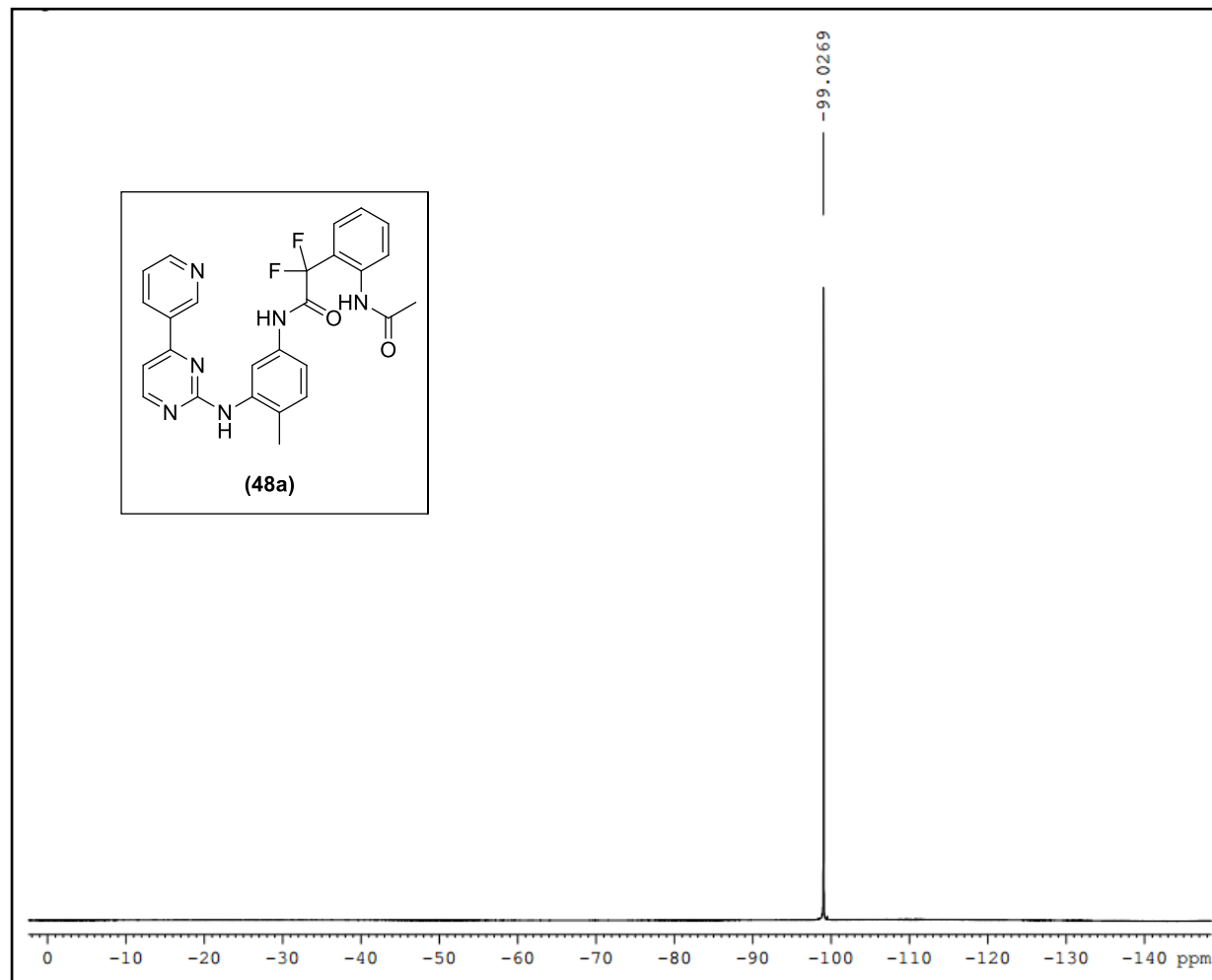
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **48a**



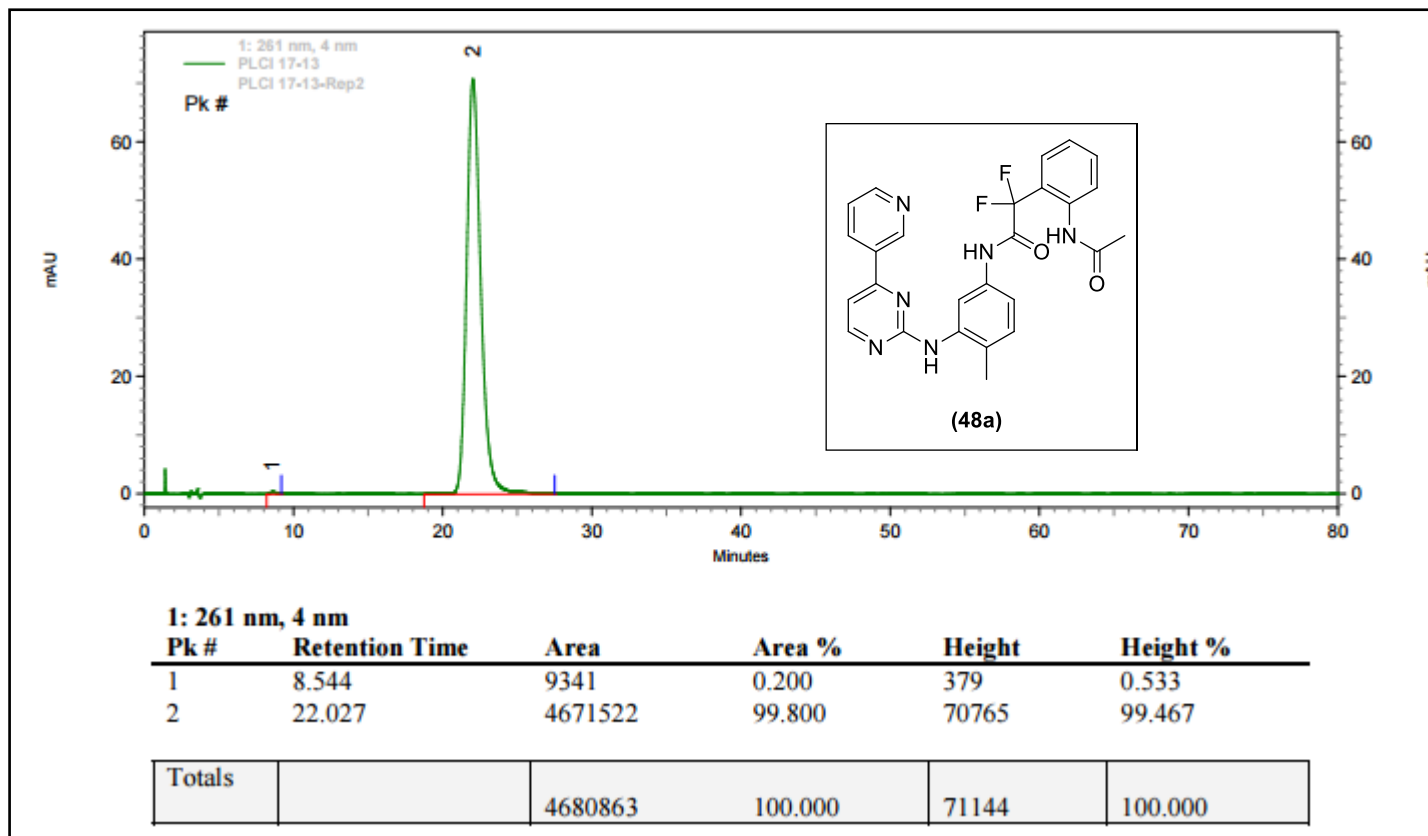
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **48a**



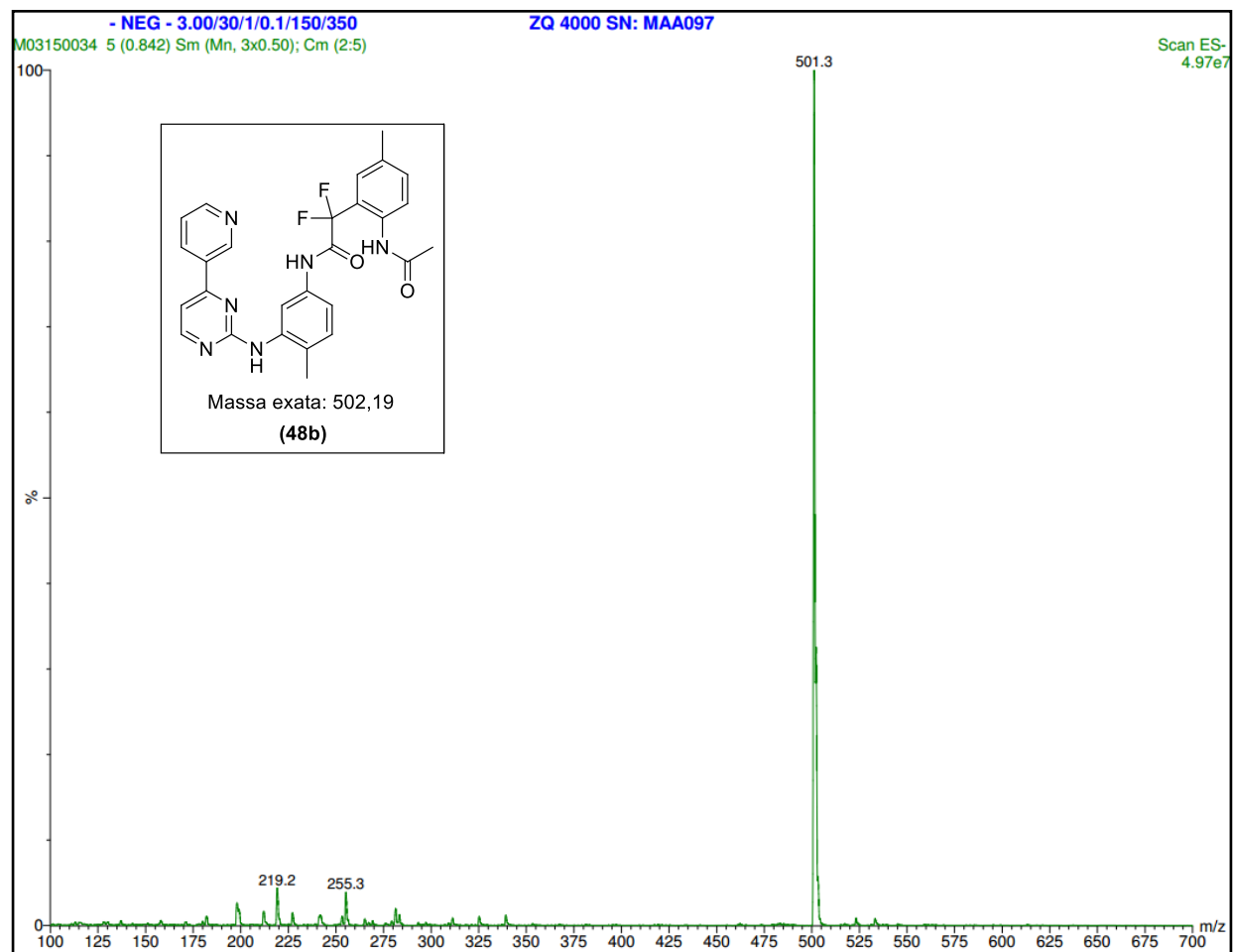
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **48a**



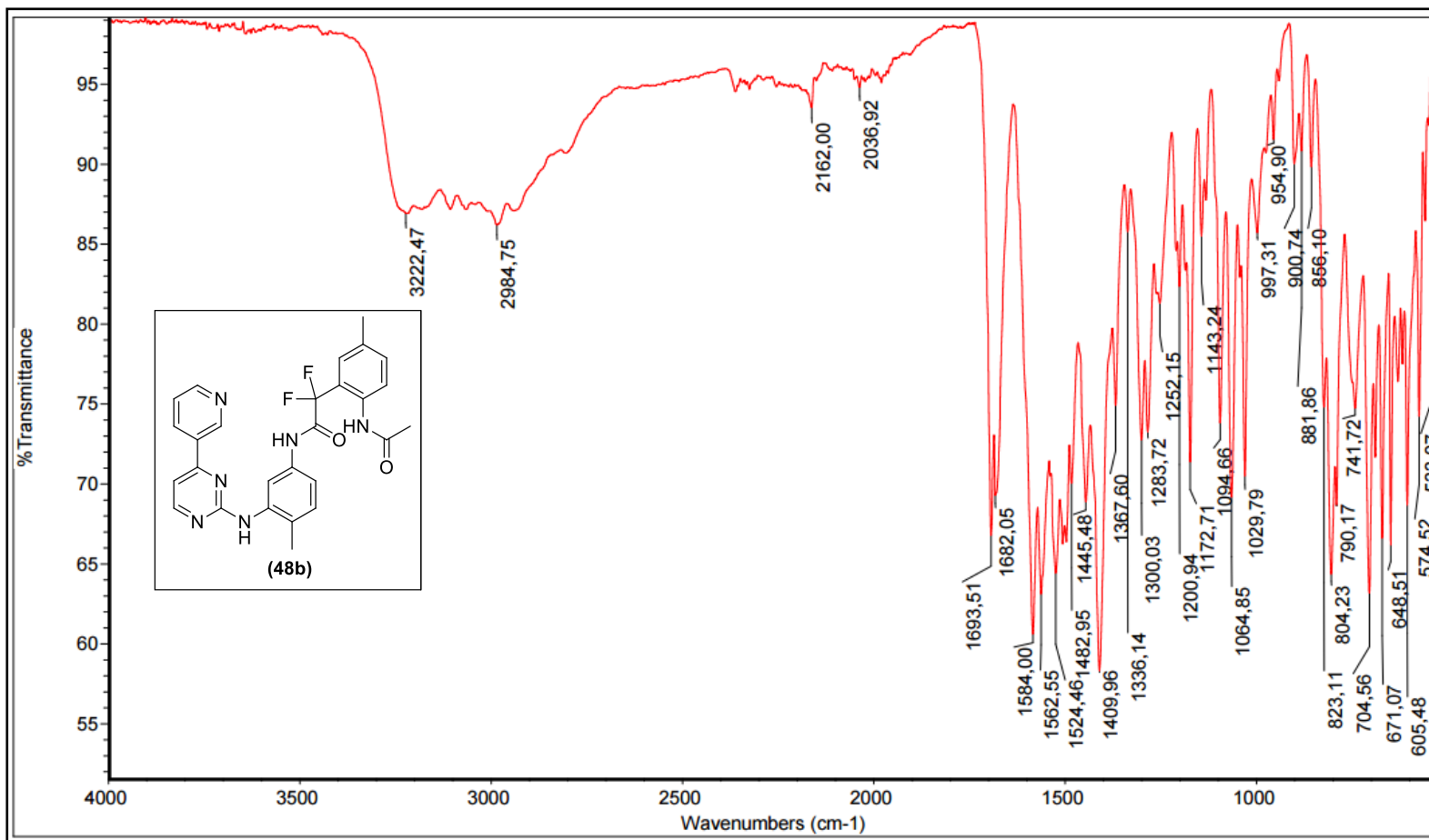
Espectro de RMN ^{19}F da molécula **48a**



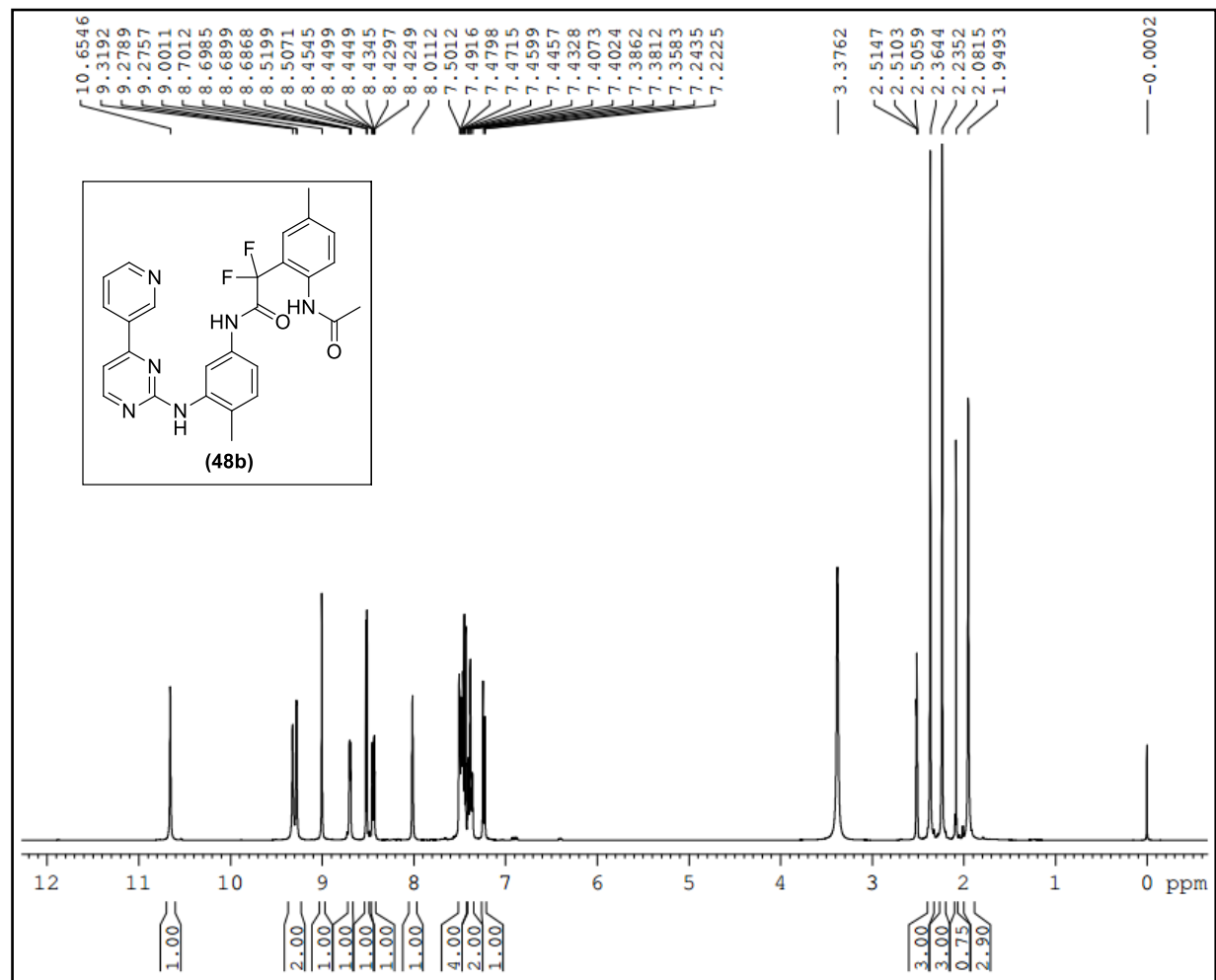
Cromatograma da molécula **48a**



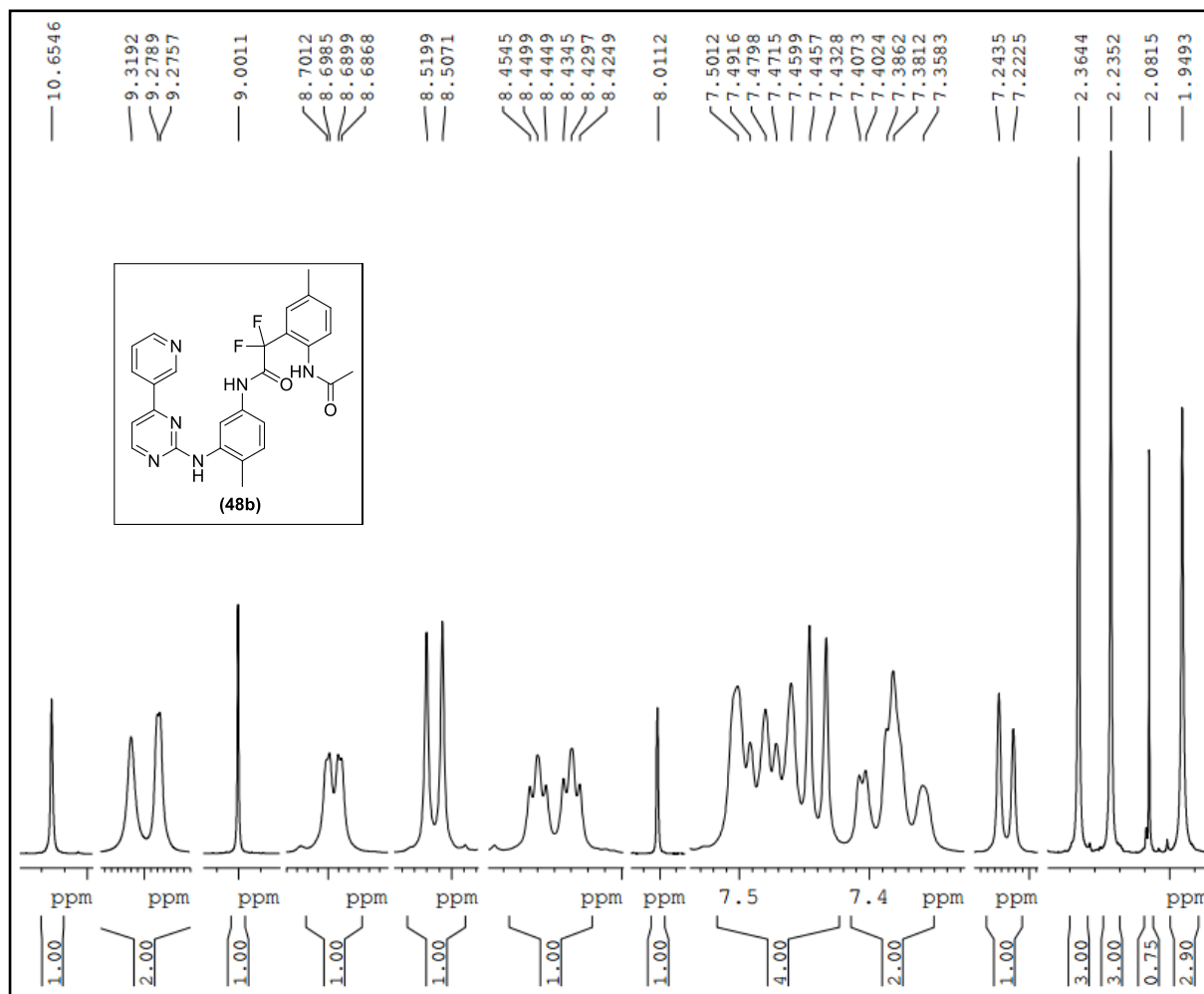
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **48b**



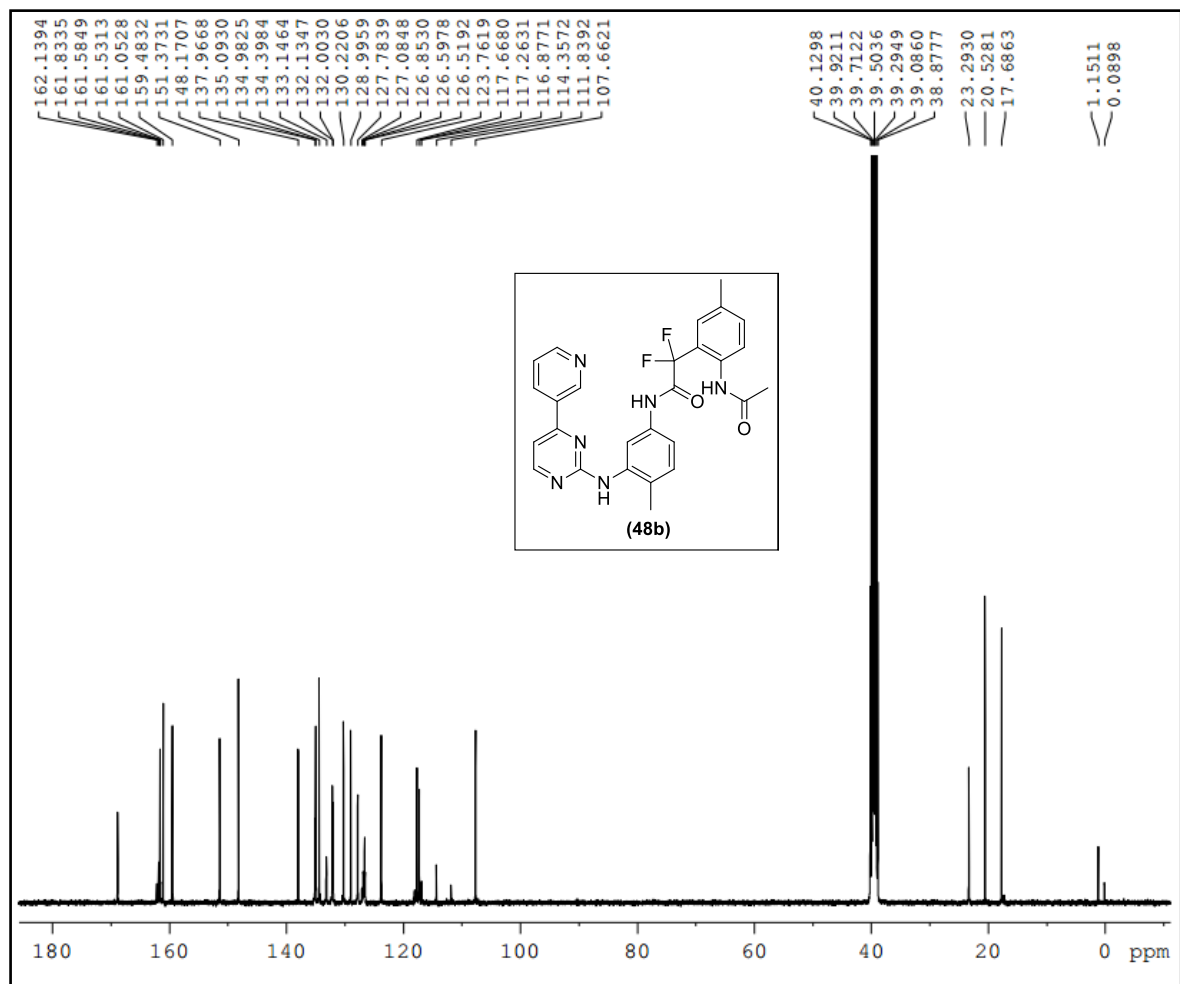
Espectro de IV da molécula **48b**



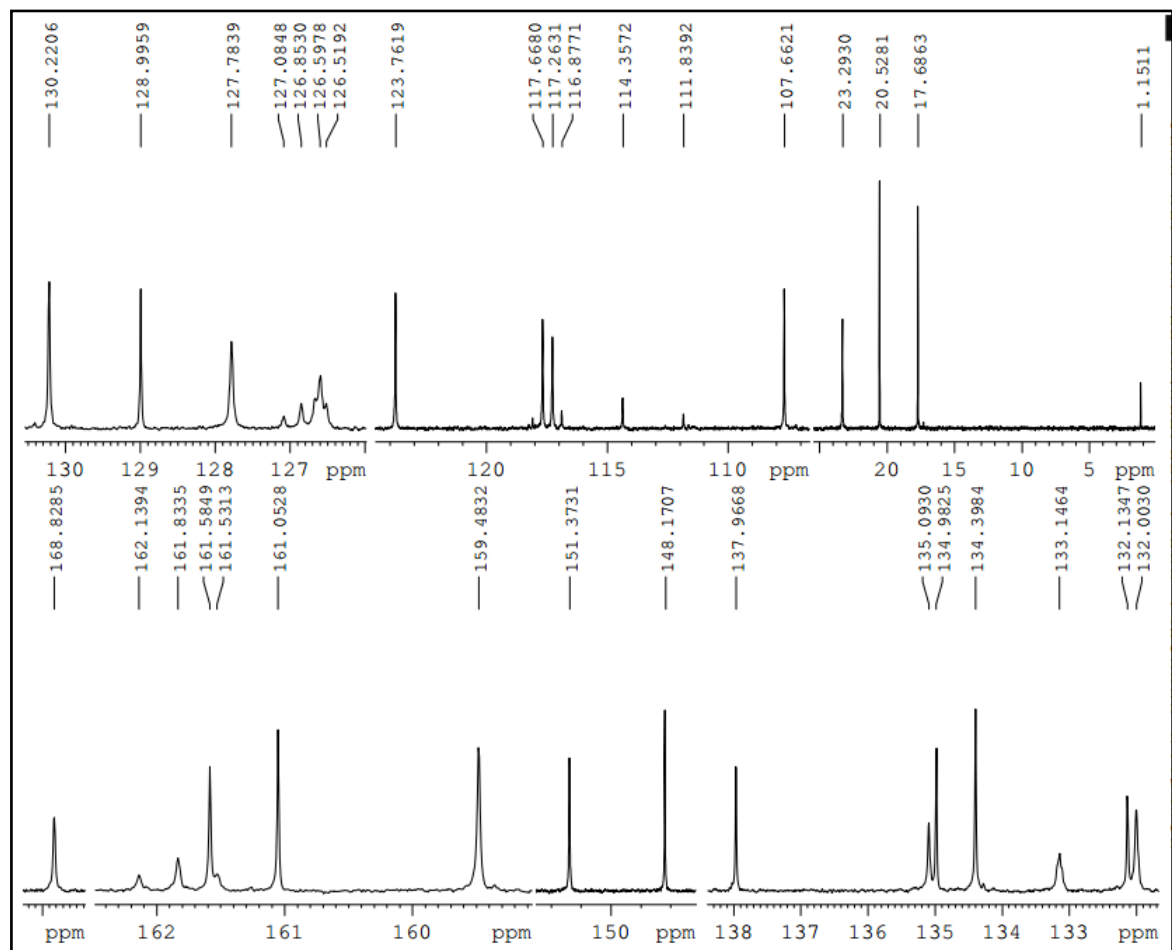
Espectro de RMN ¹H da molécula **48b**



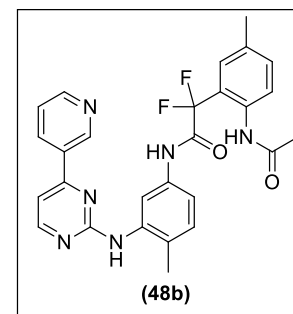
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **48b**

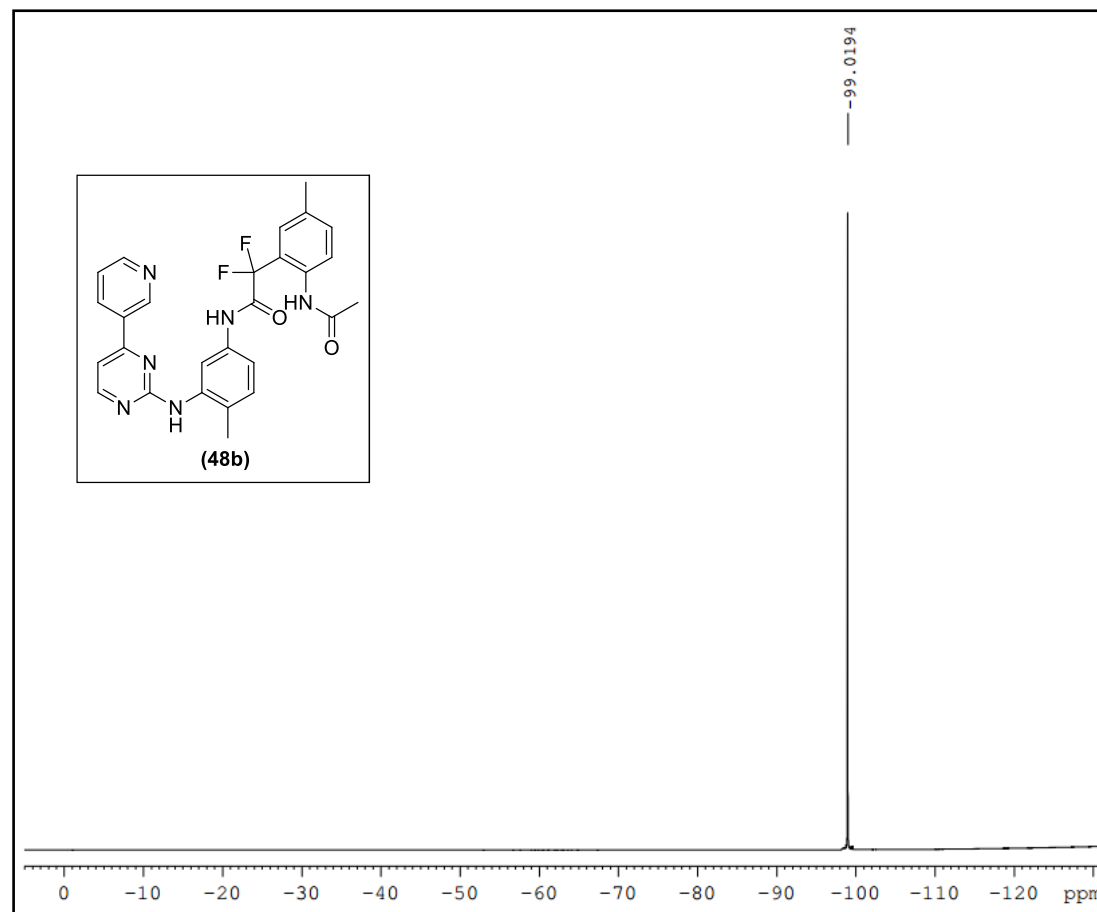


Espectro de RMN ^{13}C da molécula **48b**

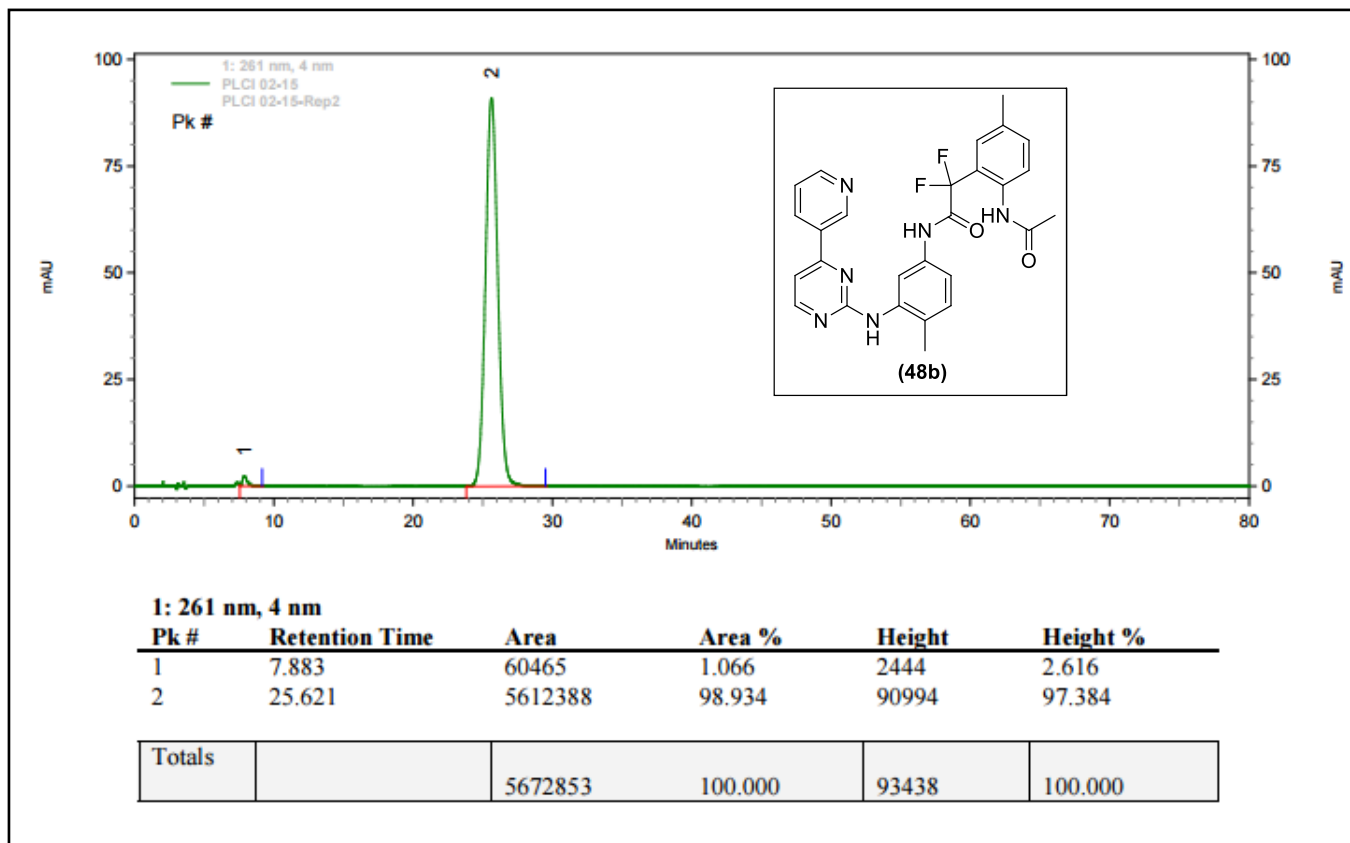


Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **48b**

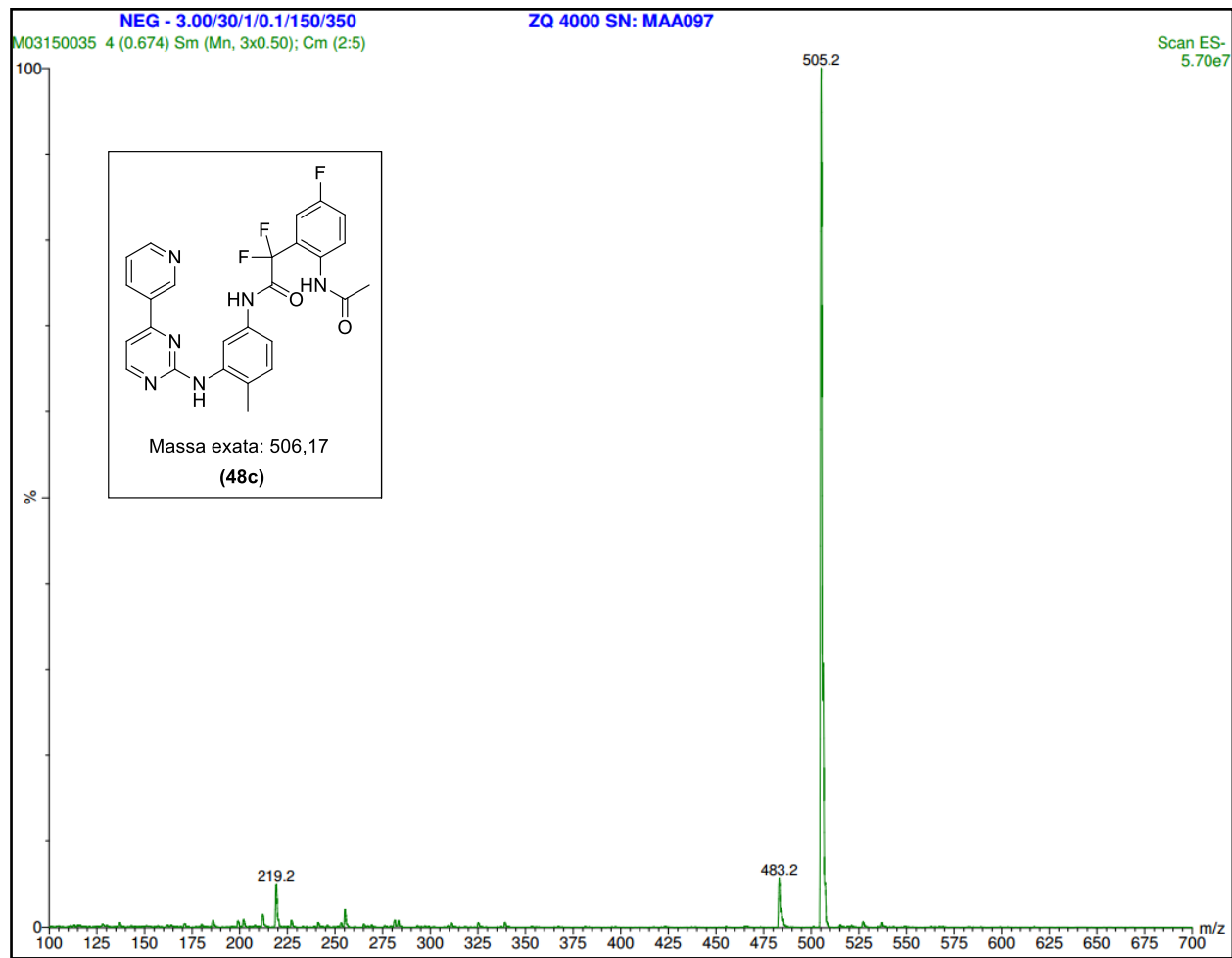




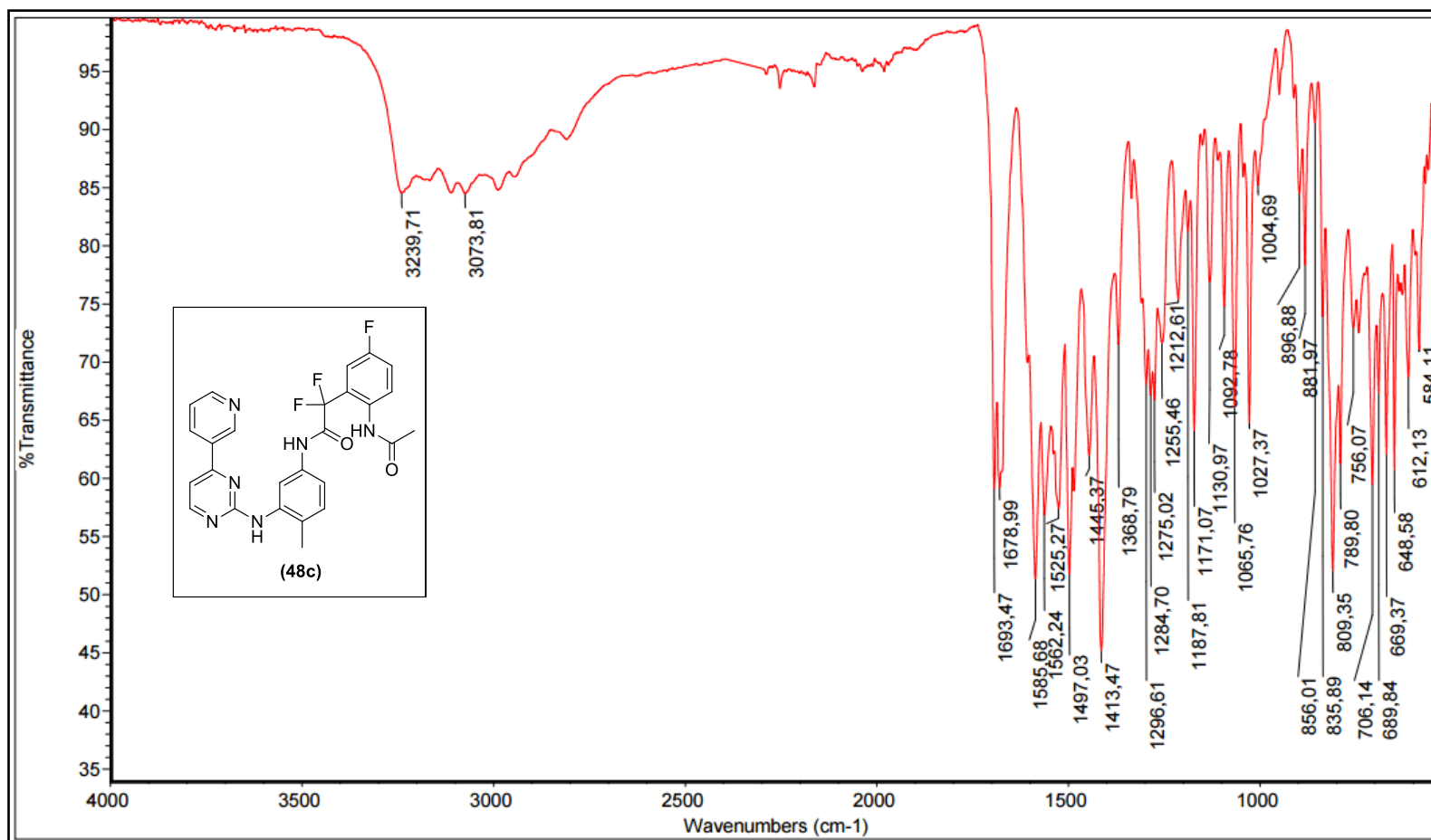
Espectro de RMN ^{19}F da molécula **48b**



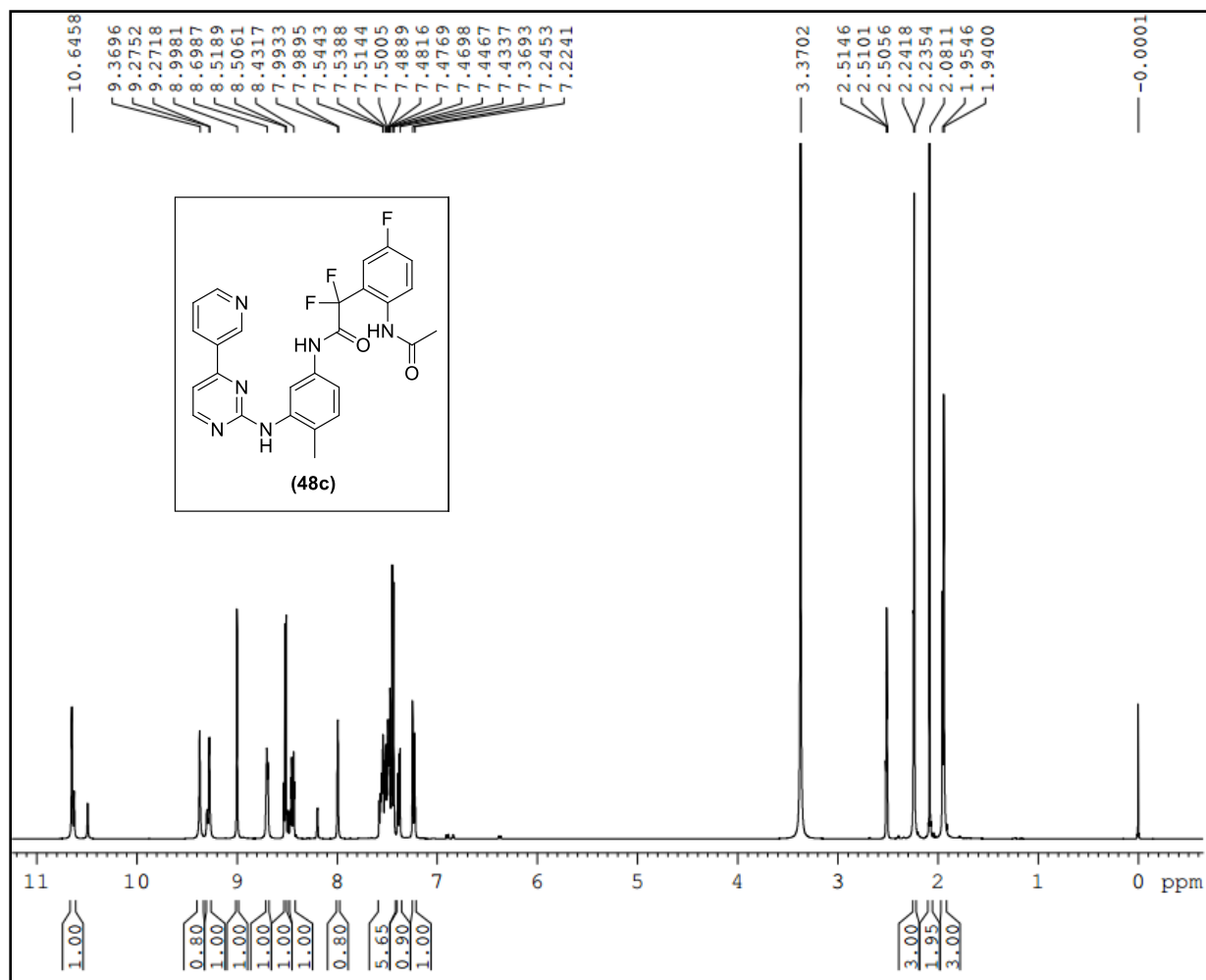
Cromatograma da molécula **48b**



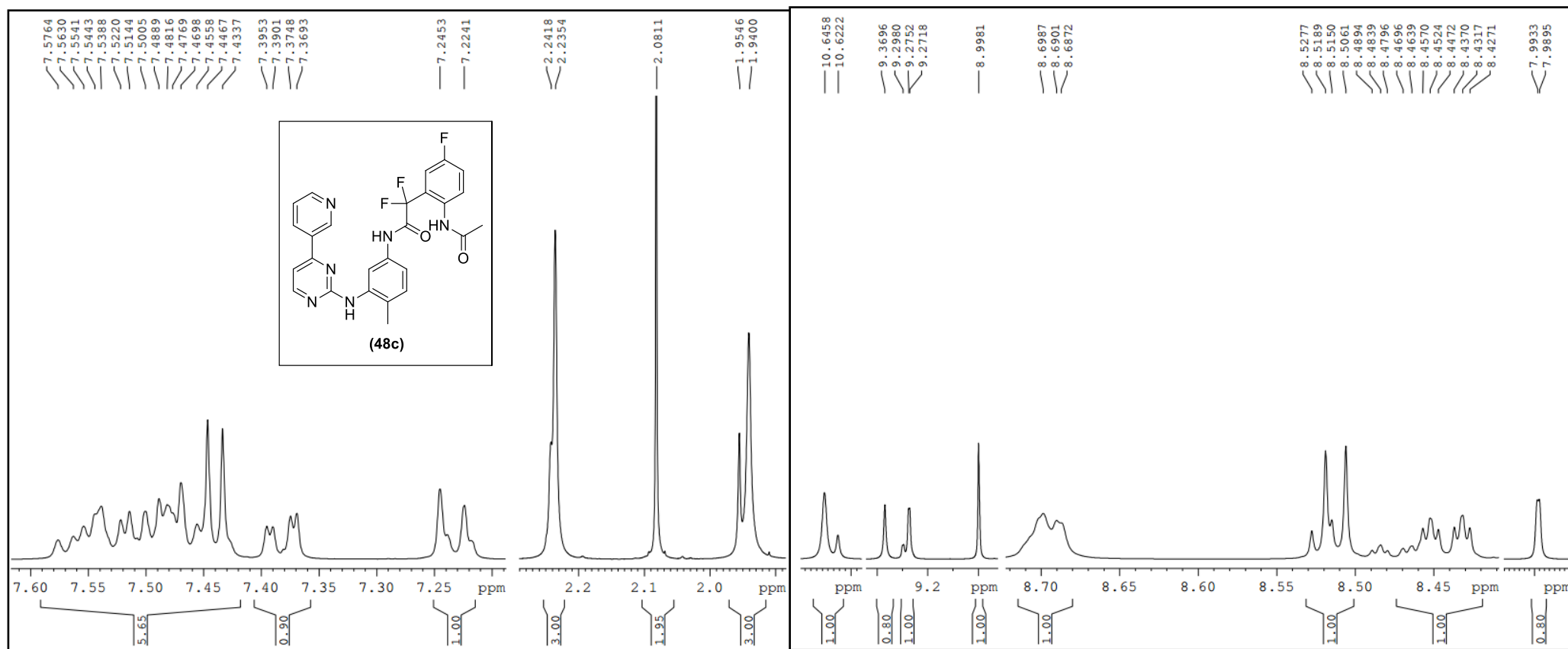
Espectro de (EM-IES [M-1]⁺) da molécula **48c**



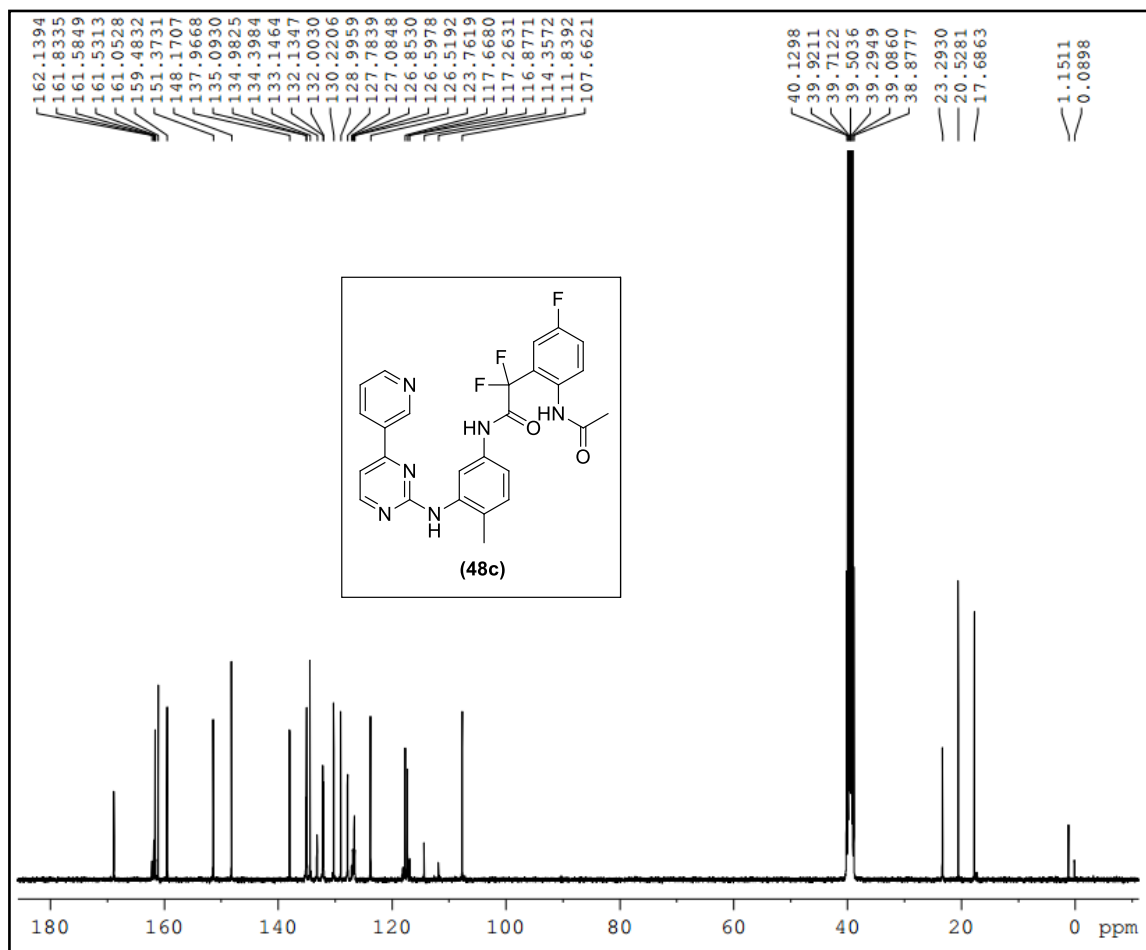
Espectro de IV da molécula **48c**



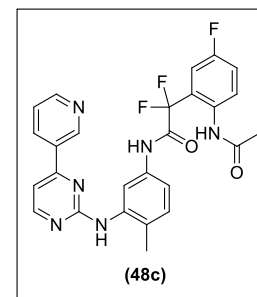
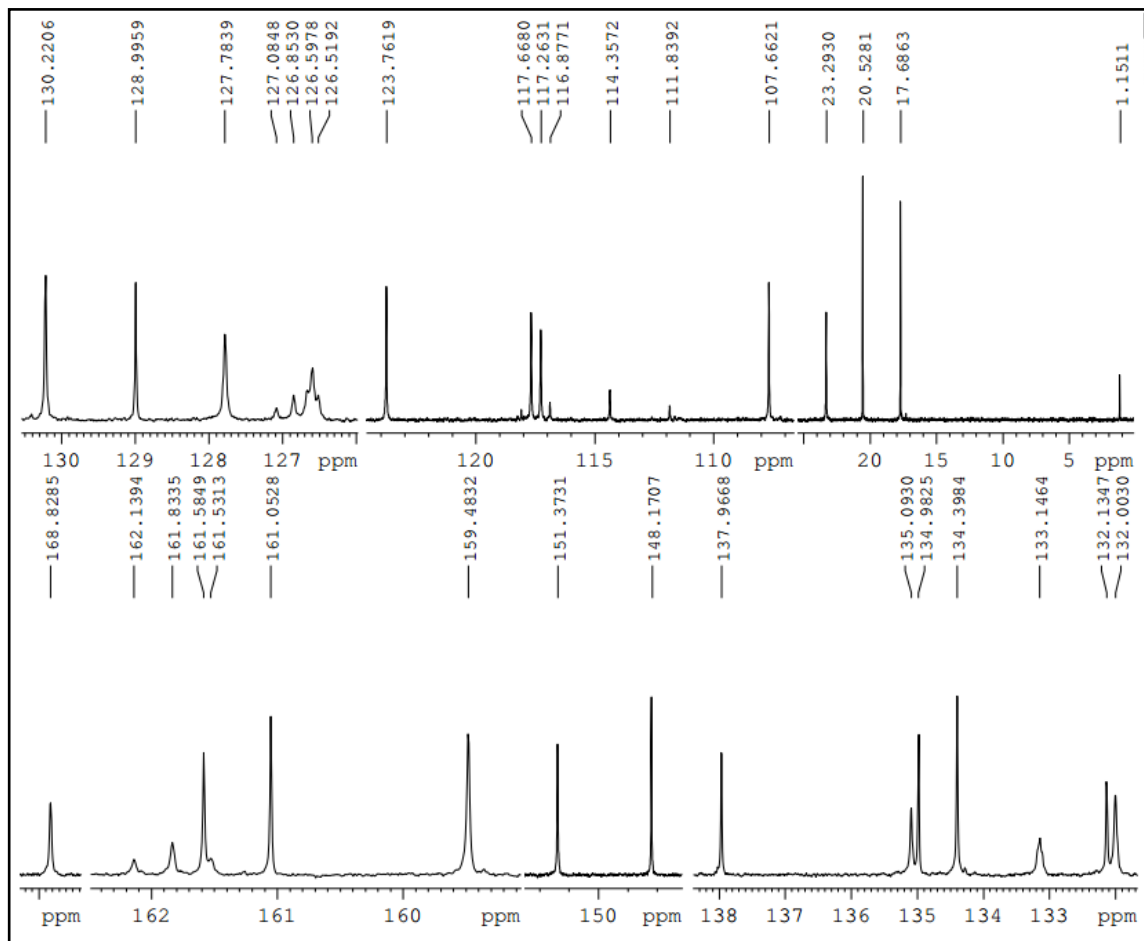
Espectro de RMN ¹H da molécula **48c**



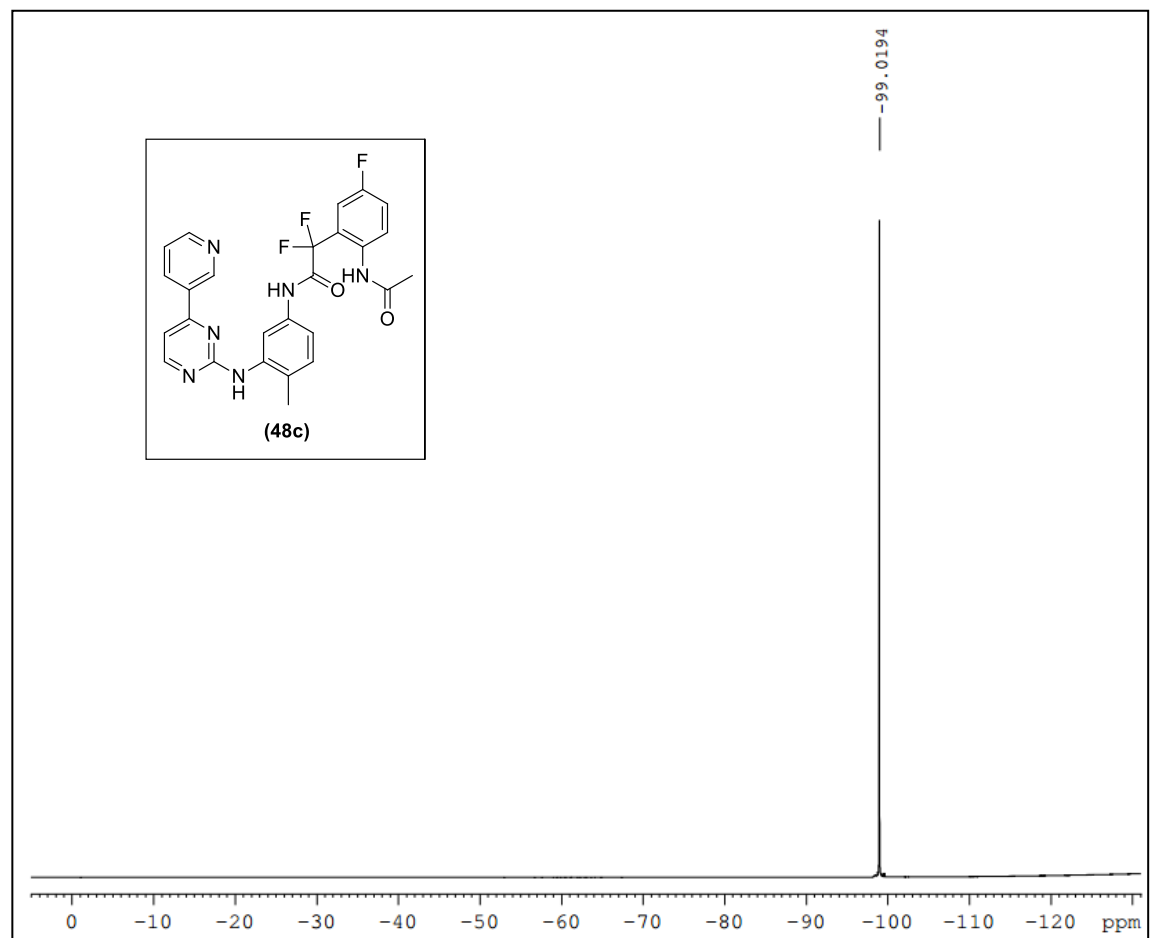
Expansões do espectro de RMN ¹H da molécula **48c**



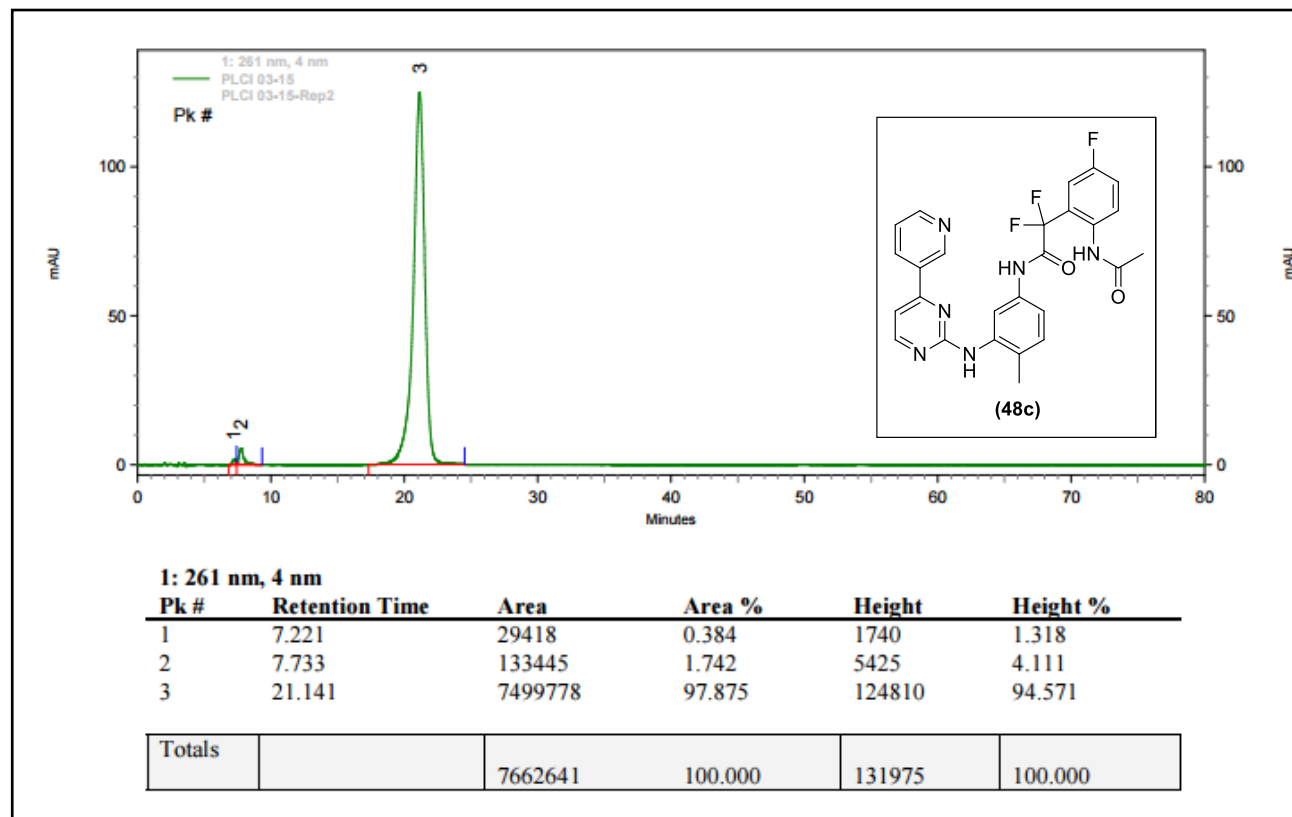
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **48c**



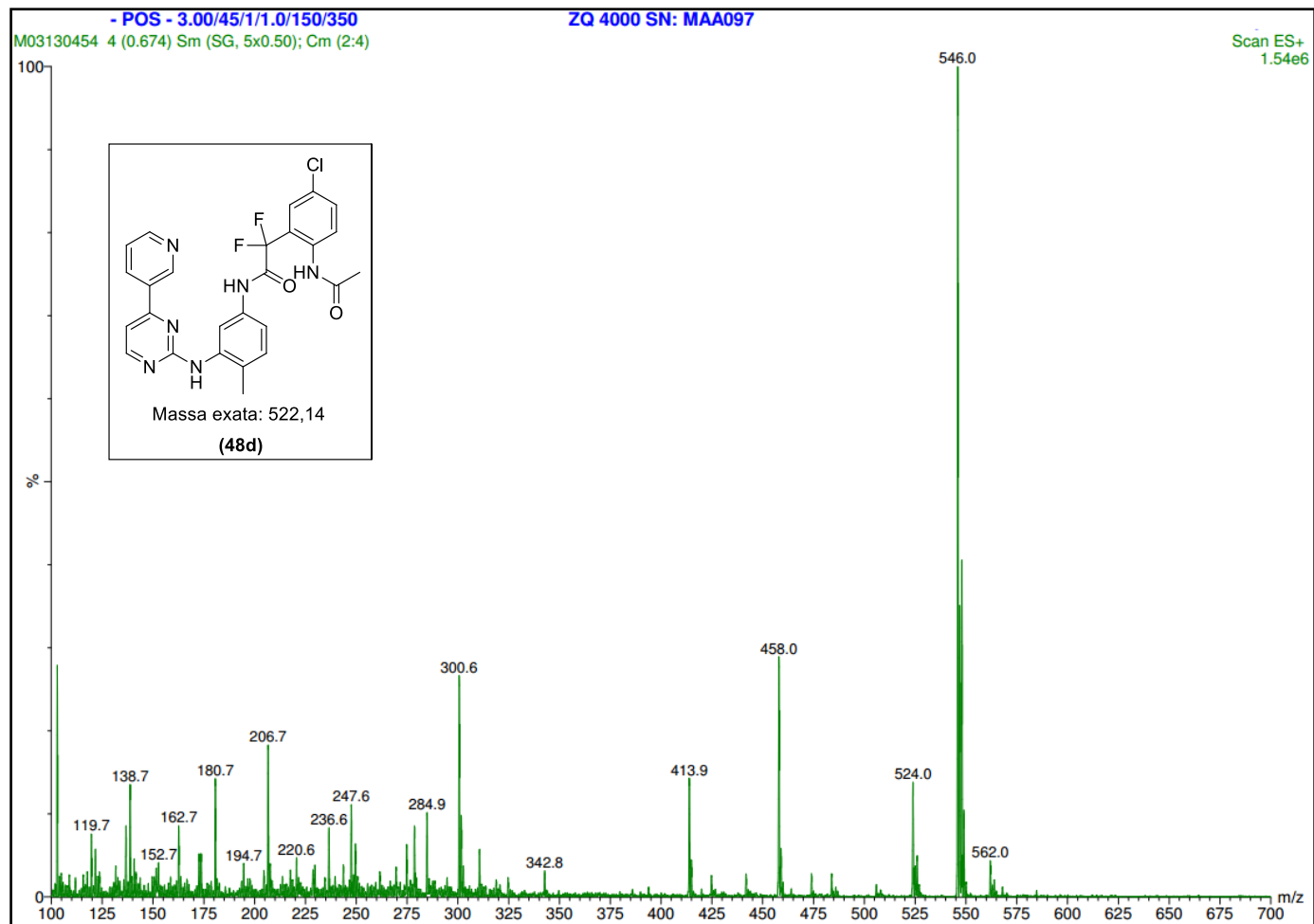
Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **48c**



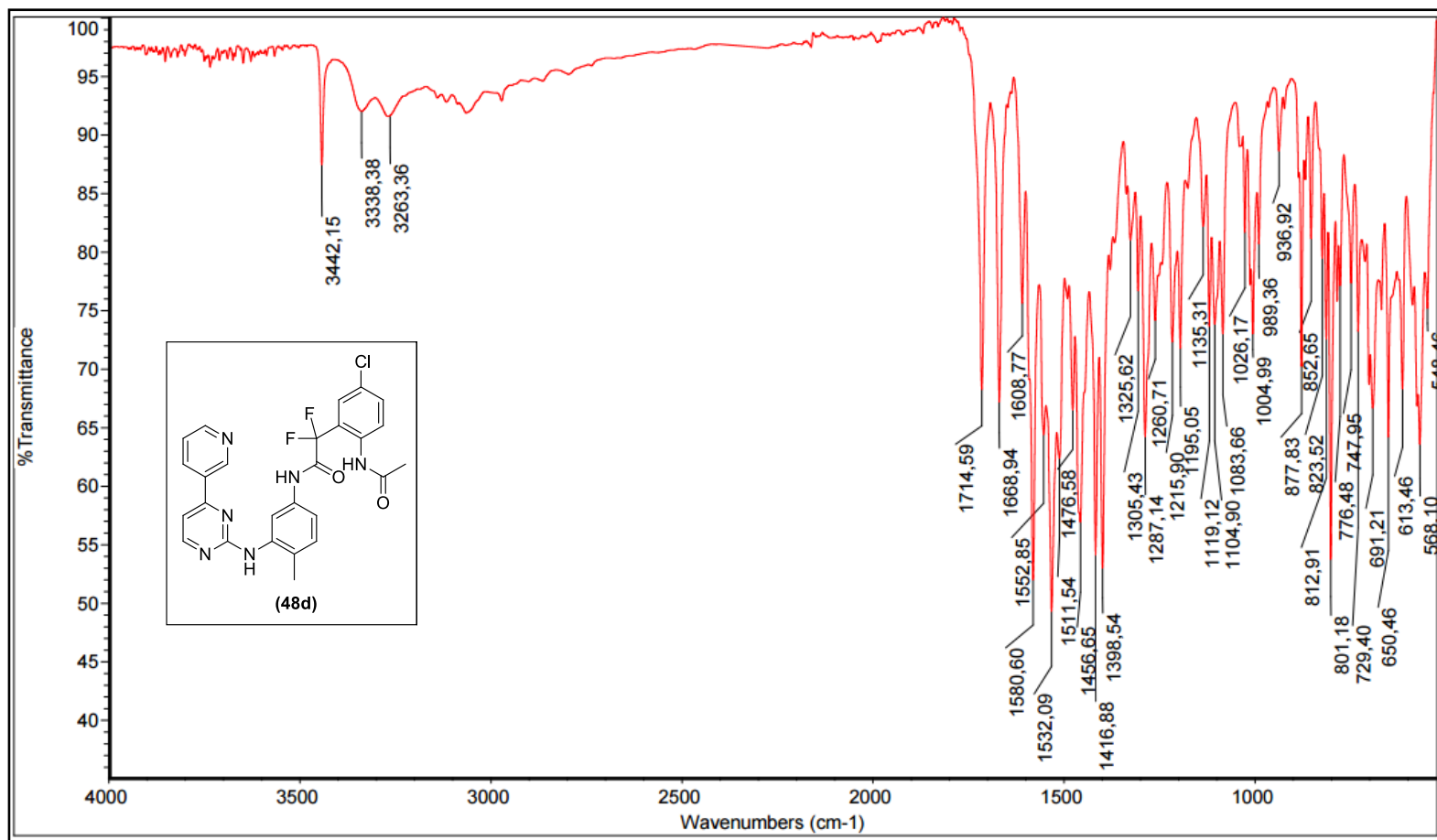
Espectro de RMN ^{19}F da molécula **48c**



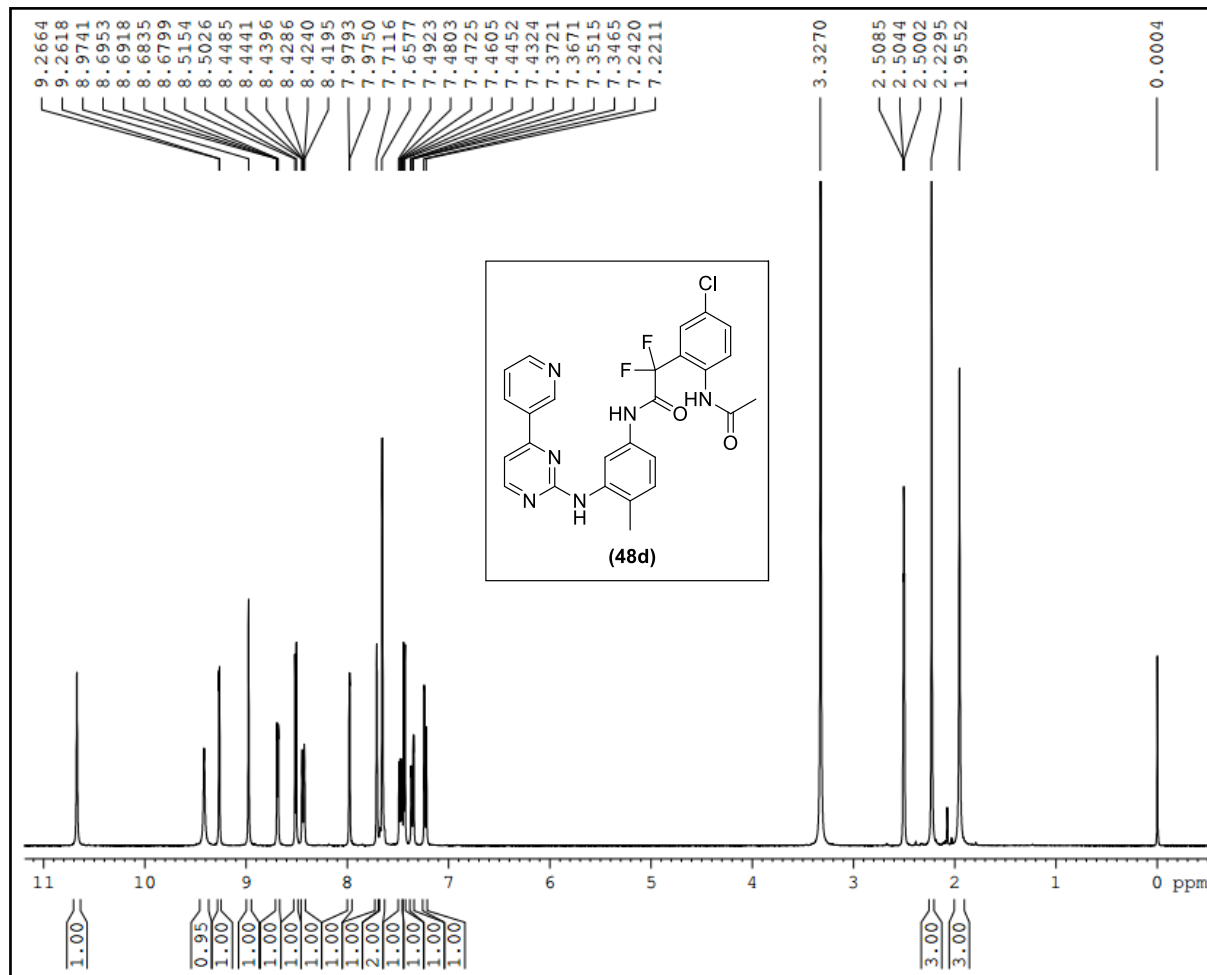
Cromatograma da molécula **48c**



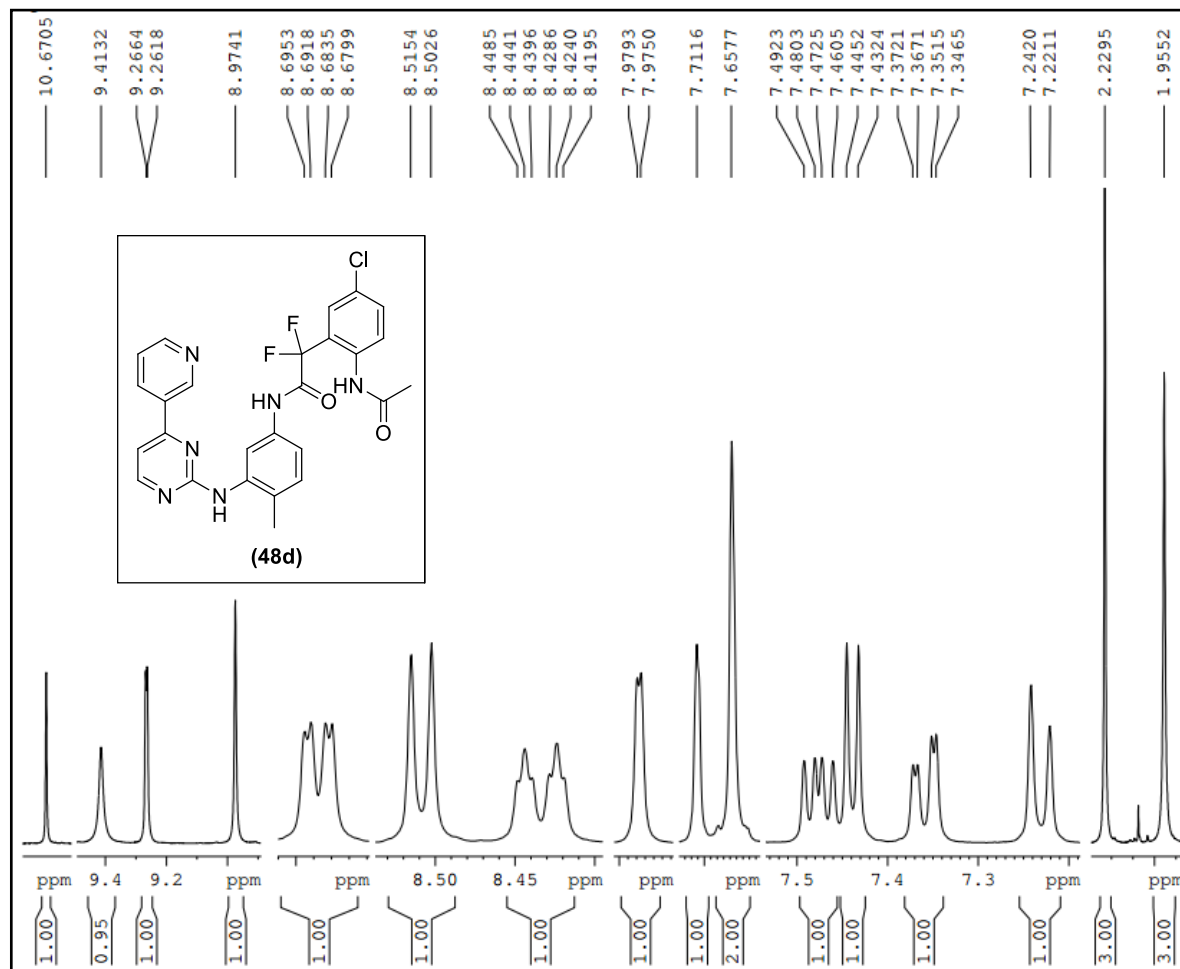
Espectro de (EM-IES $[M+Na]^+$) da molécula **48d**



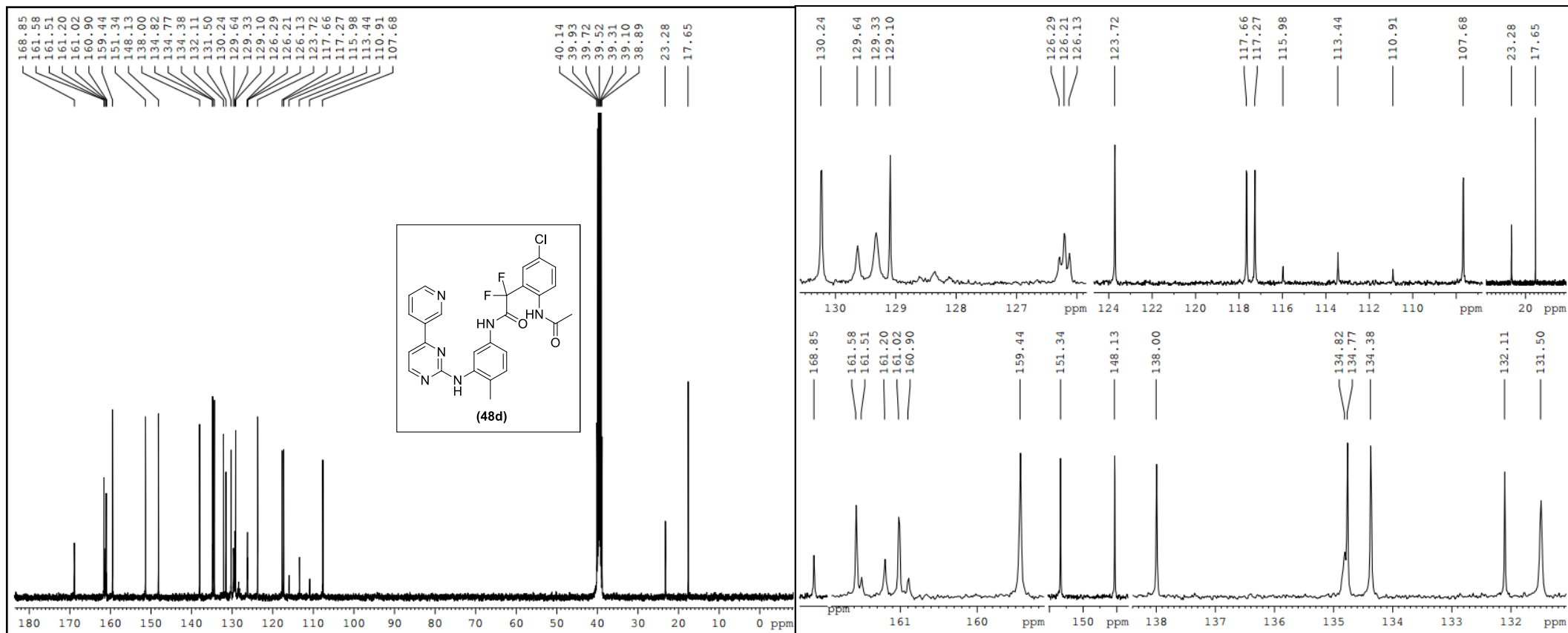
Espectro de IV da molécula **48d**



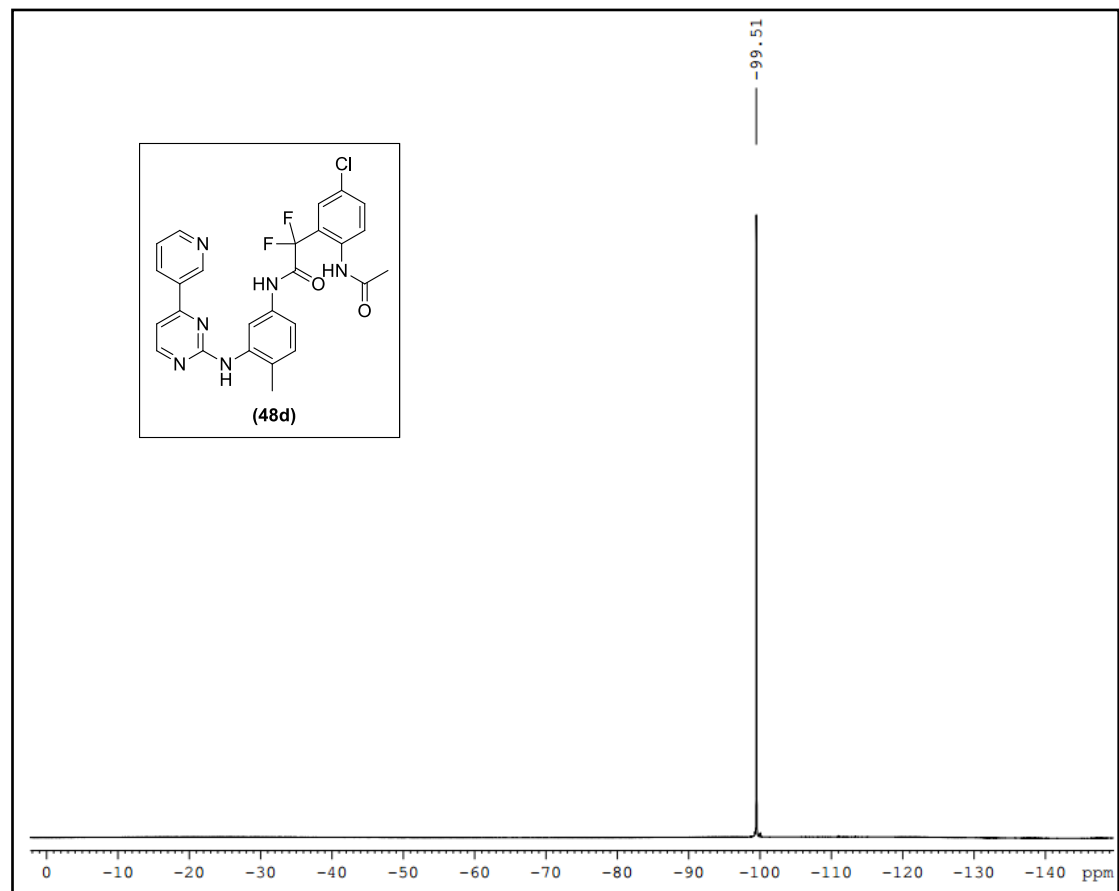
Espectro de RMN ^1H da molécula **48d**



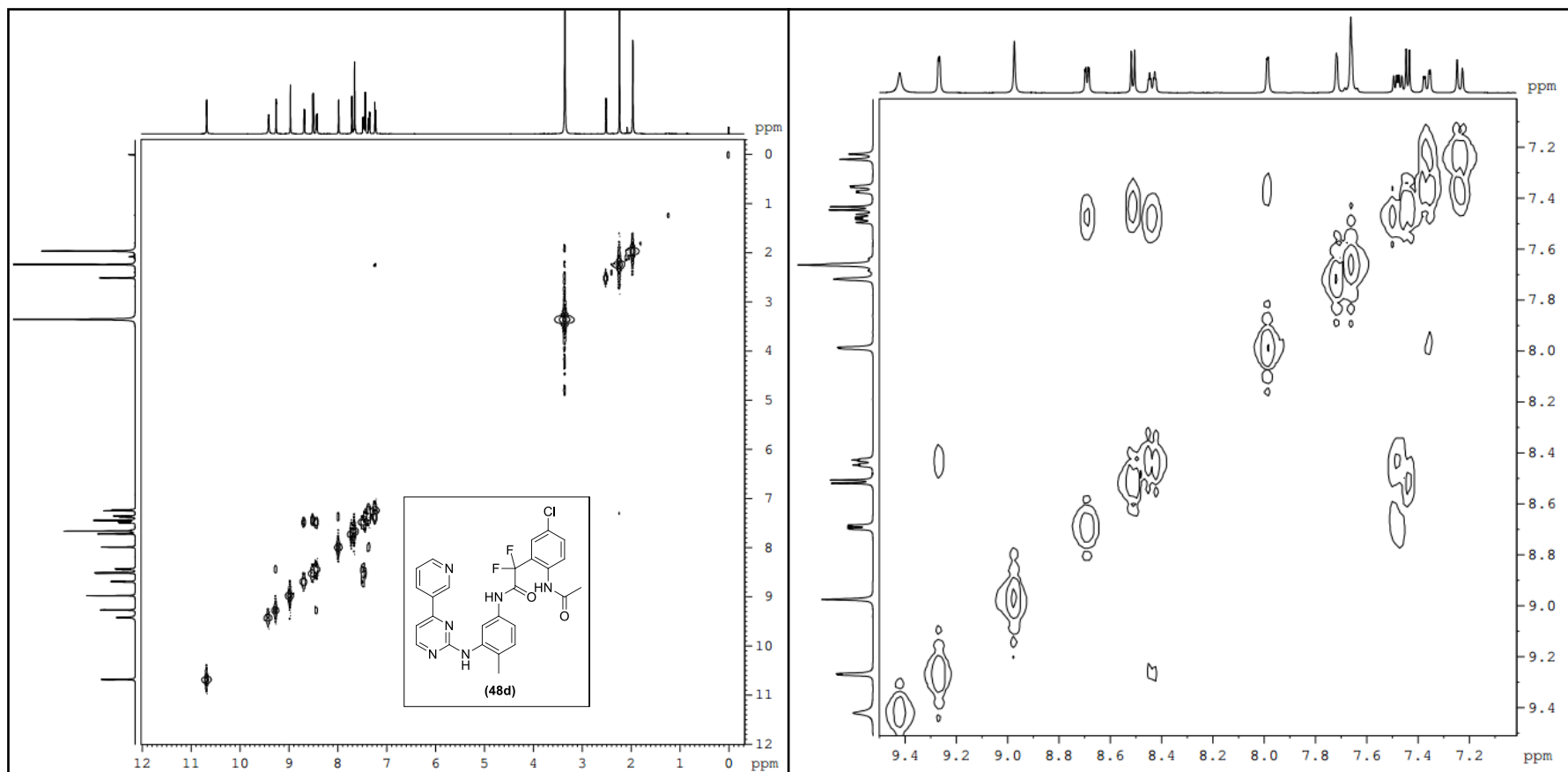
Expansão do espectro de RMN ^1H da molécula **48d**



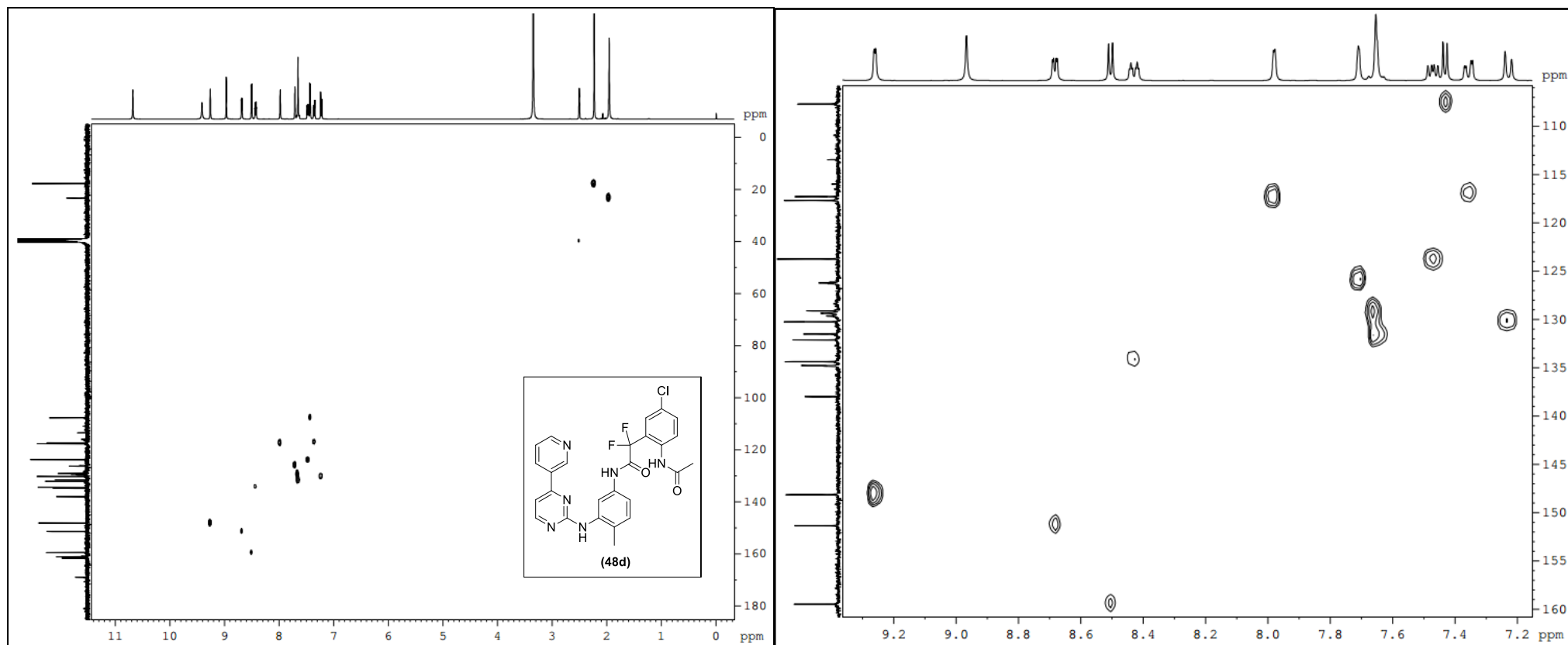
Espectro e expansão de RMN ¹³C da molécula **48d**



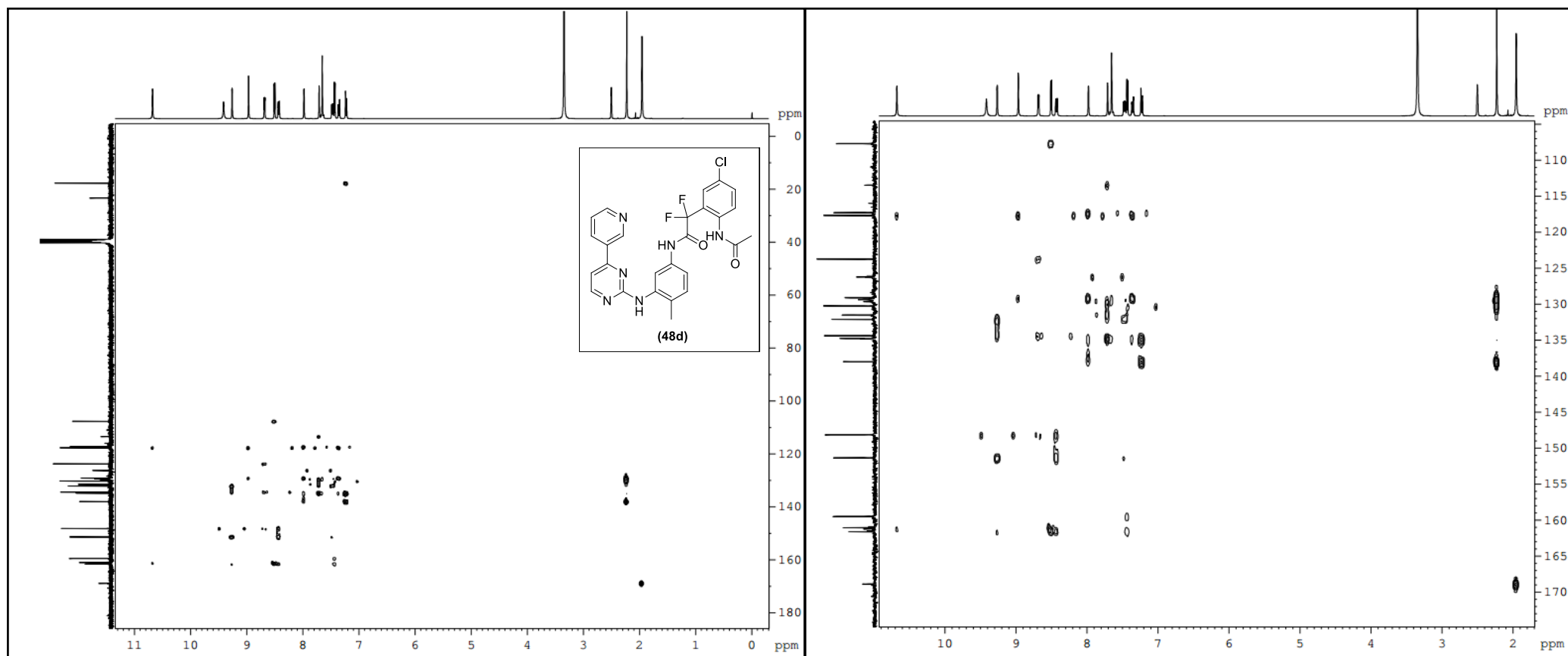
Espectro de RMN de ^{19}F molécula **48d**



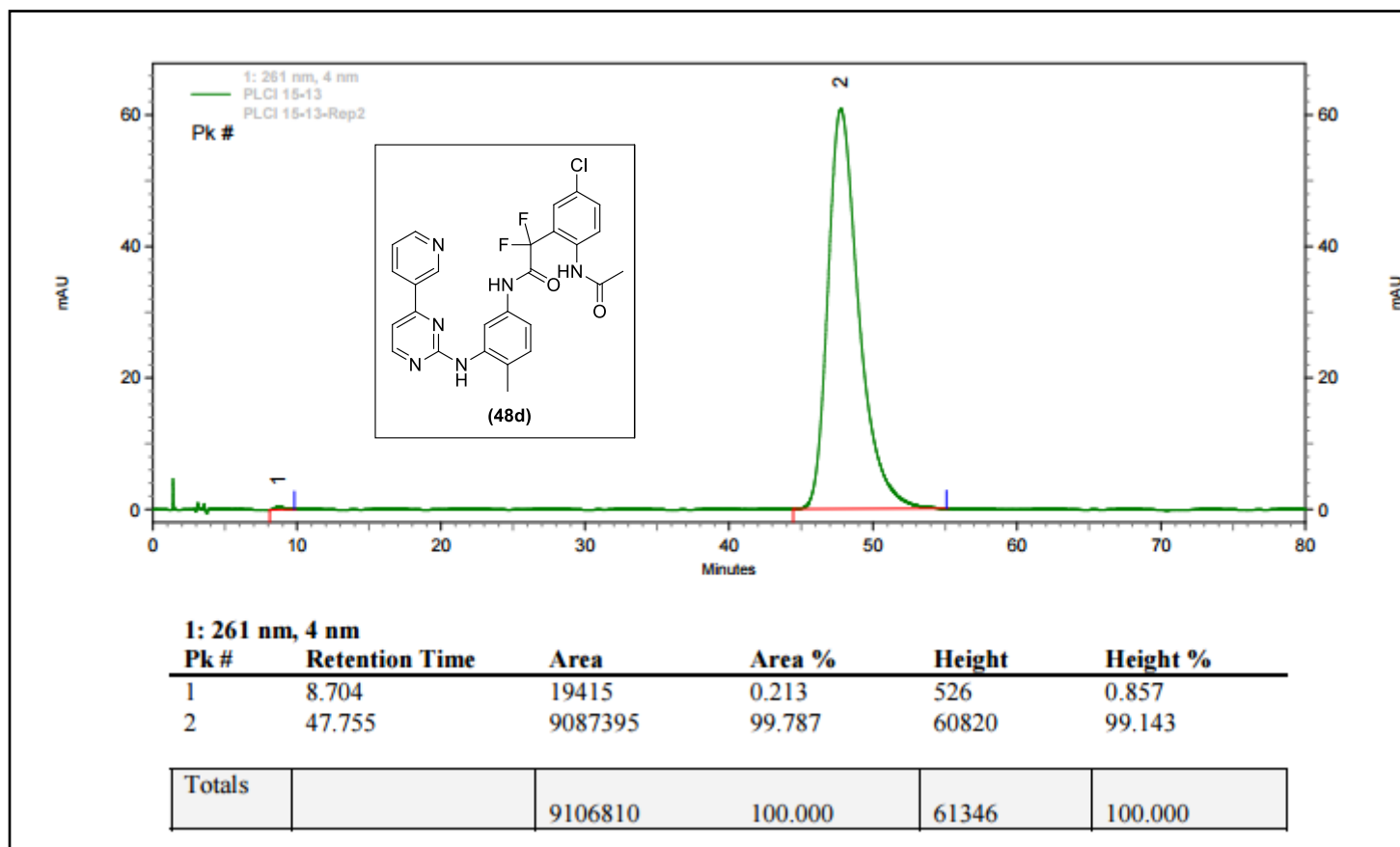
Espectro e expansão do de RMN de 2D-COSY da molécula **48d**



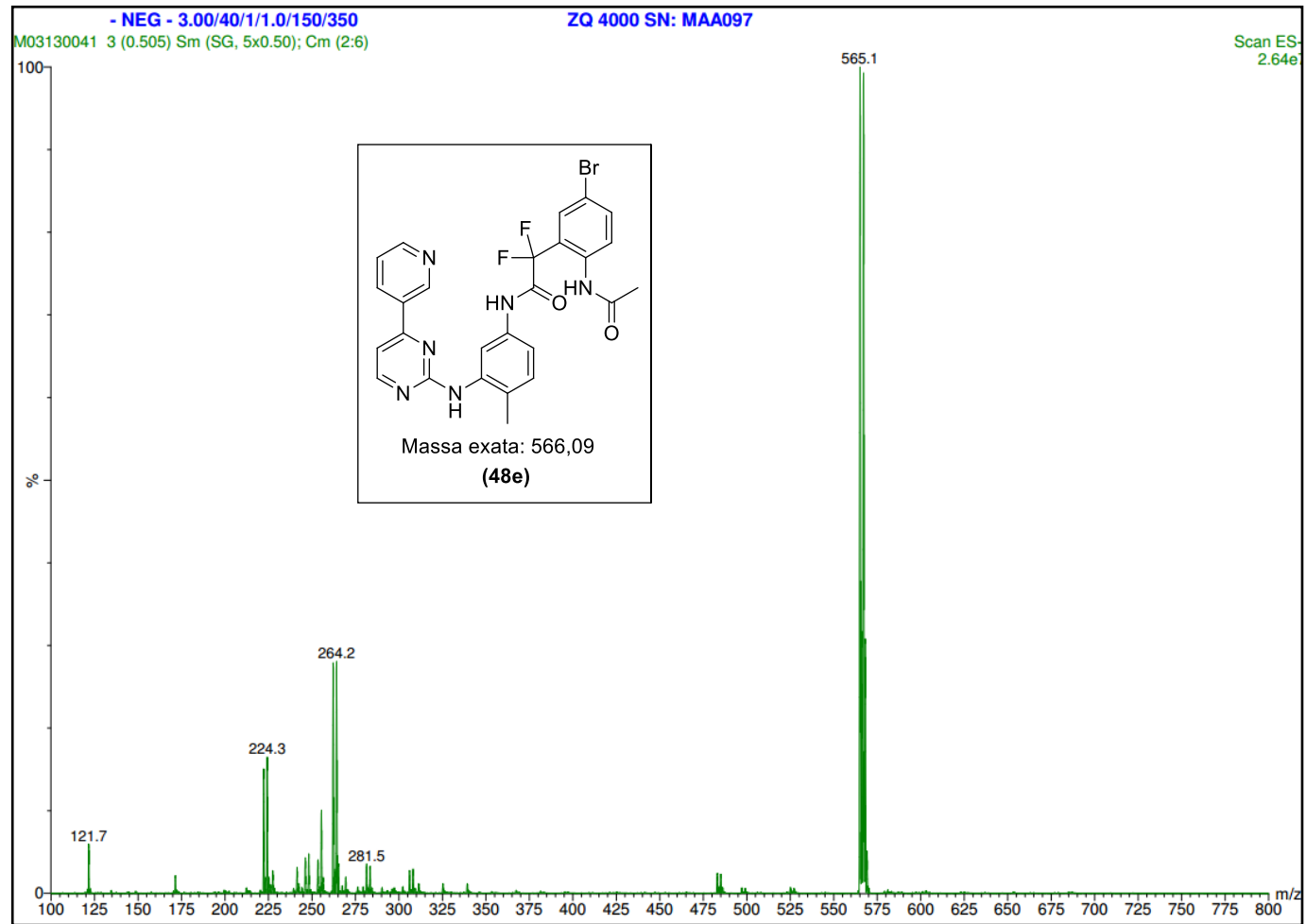
Espectro e expansão de RMN de 2D-HSQC da molécula **48d**



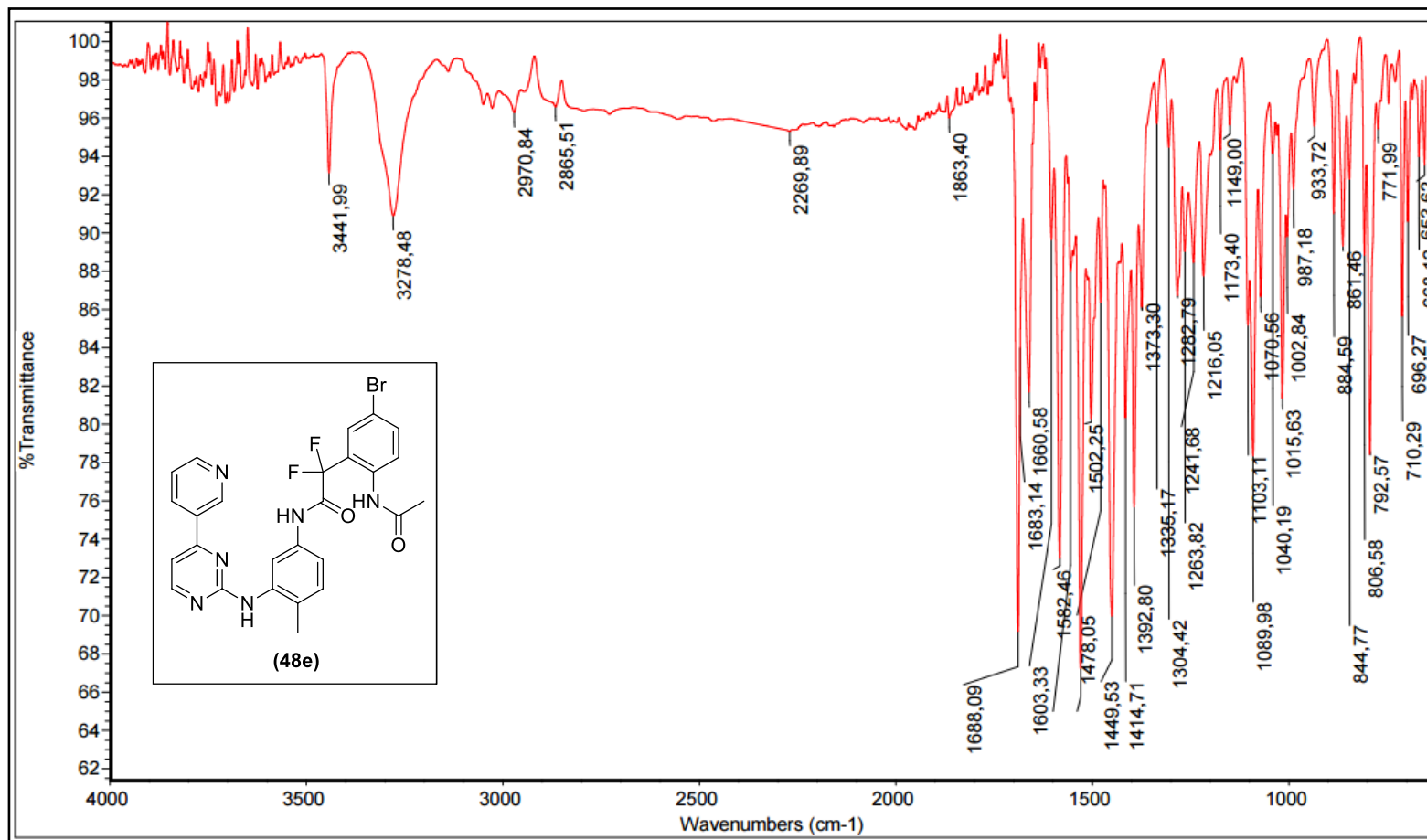
Espectro e expansão de RMN de 2D-HMBC da molécula **48d**



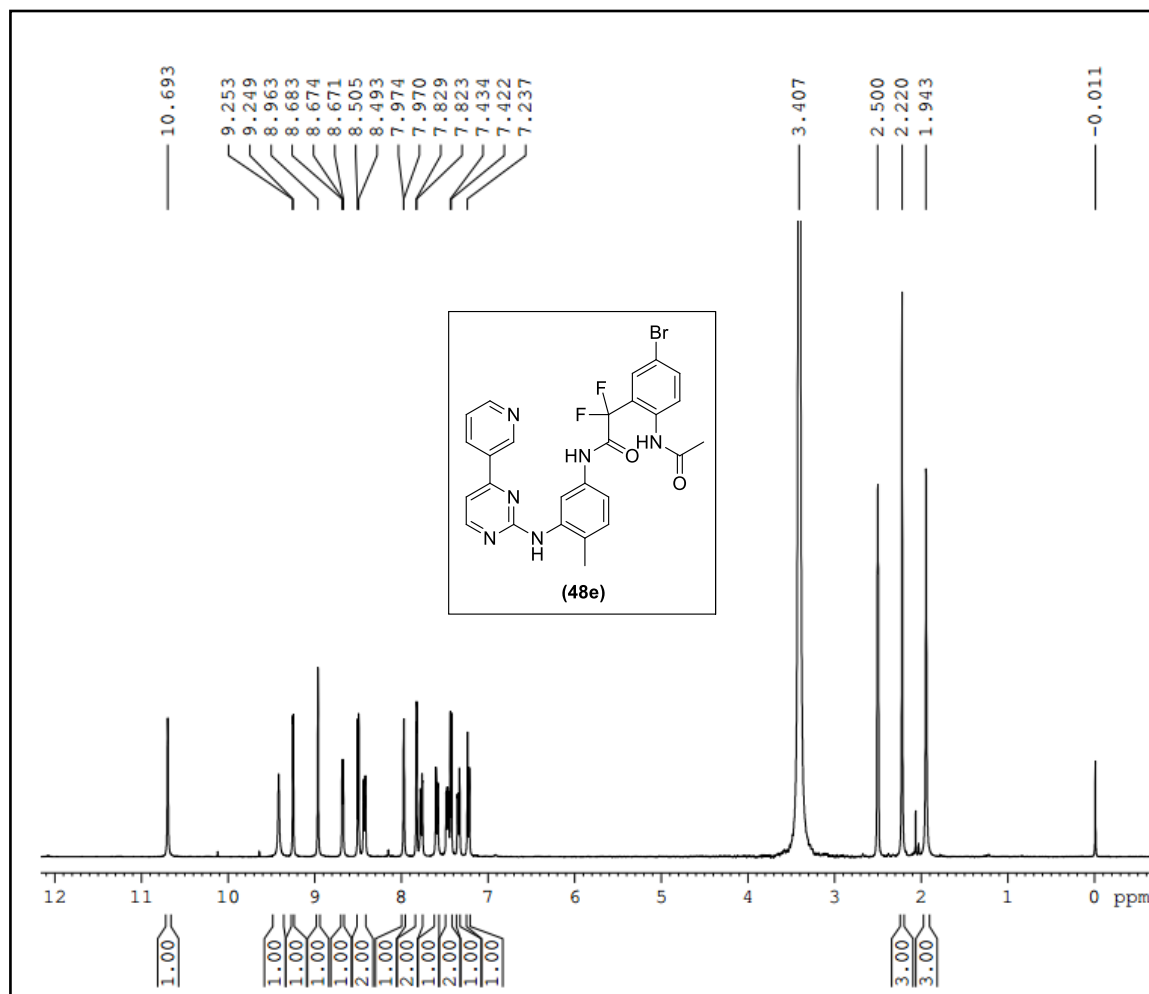
Cromatograma da molécula **48d**



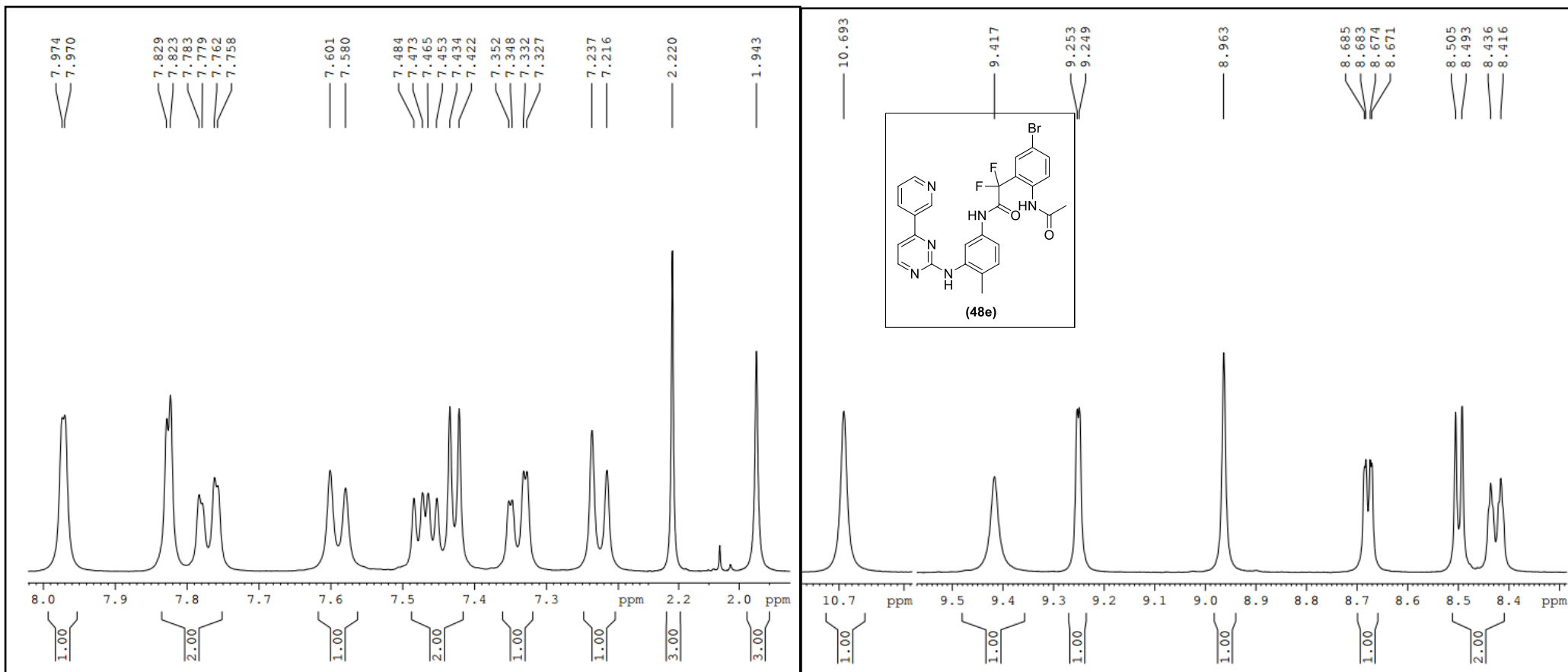
Espectro de (EM-IES $[M-1]^+$) da molécula **48e**



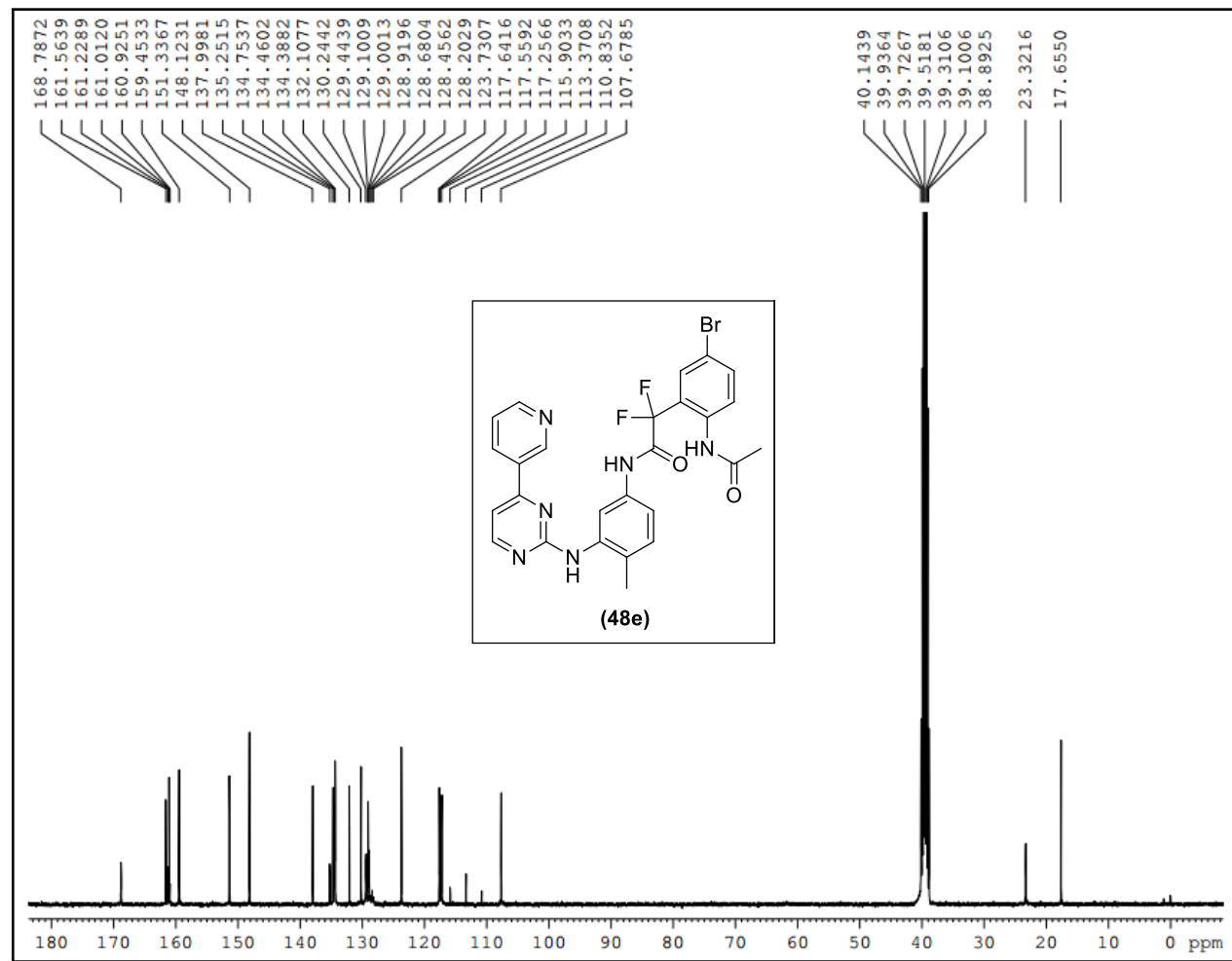
Espectro de IV da molécula **48e**



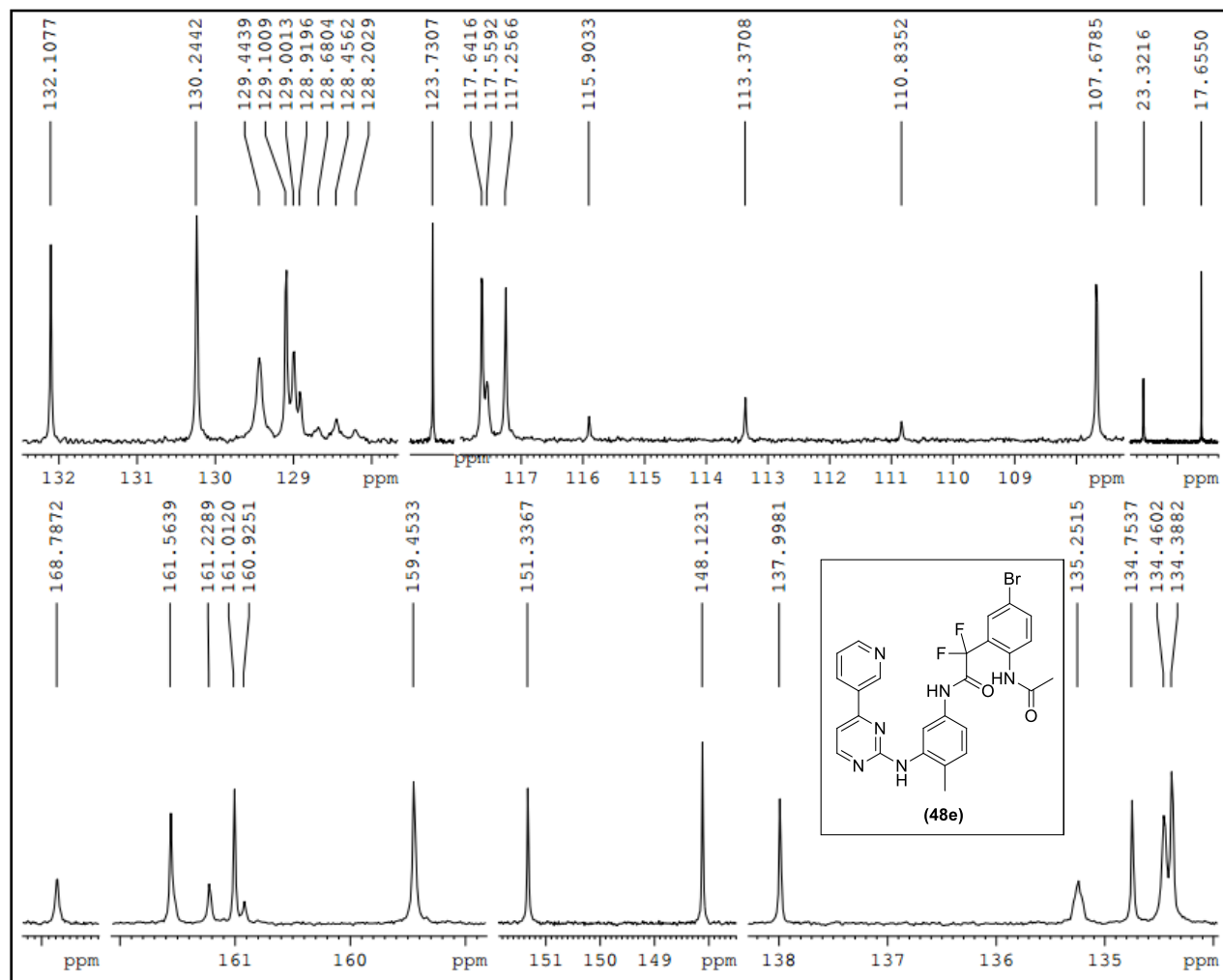
Espectro de RMN ^1H da molécula **48e**



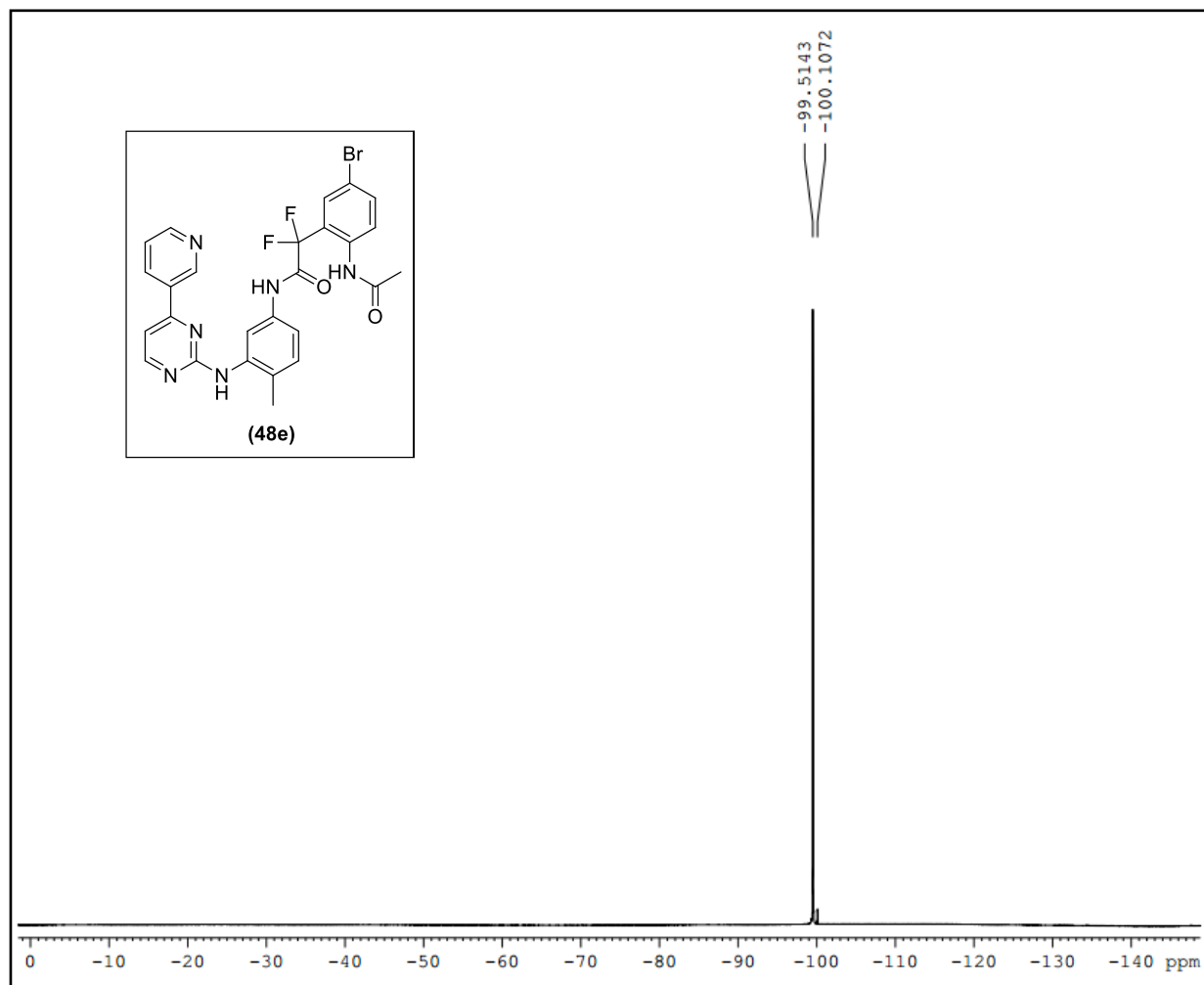
Expansões do espectro de RMN ¹H da molécula **48e**



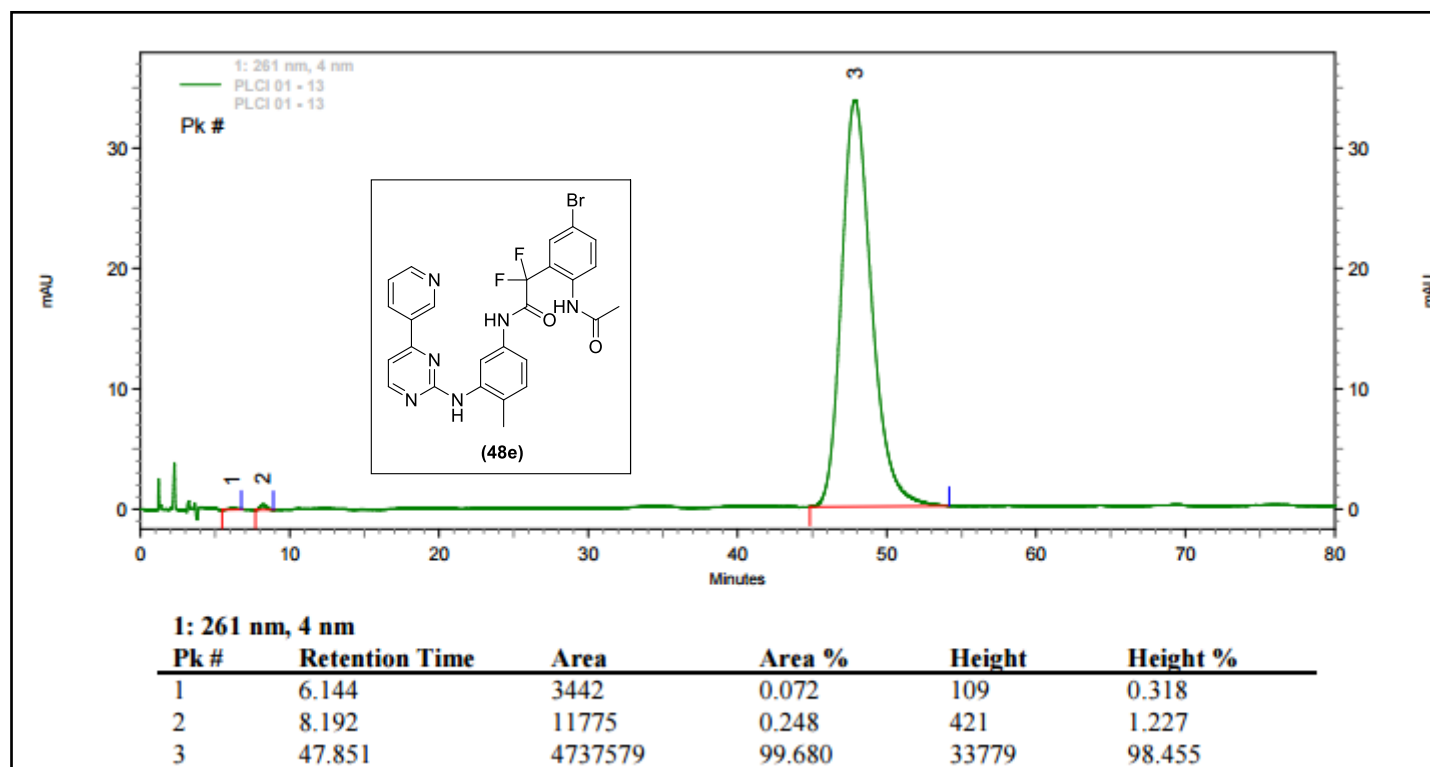
Espectro de RMN ^{13}C da molécula **48e**



Expansão do espectro de RMN ^{13}C da molécula **48e**



Espectro de RMN ^{19}F da molécula **48e**



Cromatograma da molécula **48e**