



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



SAMIRA FAGUNDES DE ANDRADE

**TENTATIVA DE SÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS DO METOTREXATO PARA A
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Ouro Preto

2019

SAMIRA FAGUNDES DE ANDRADE

**TENTATIVA DE SÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS DO METOTREXATO PARA A
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela
Escola de Farmácia da Universidade Federal de
Ouro Preto, Minas Gerais/Brasil.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Flaviane Francisco
Hilário

Ouro Preto

2019

A543t

Andrade, Samira Fagundes de .

Tentativa de síntese de novos análogos do metotrexato para a avaliação da atividade antitumoral [manuscrito] / Samira Fagundes de Andrade. - 2019.

83f.: il.: color; Quadro; Esquemas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Flaviane Francisco Hilário.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Síntese orgânica. 2. Metotrexato. 3. Agentes antineoplásicos. I. Hilário, Flaviane Francisco. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616-006.6



FOLHA DE APROVAÇÃO

SAMIRA FAGUNDES DE ANDRADE

TENTATIVA DE SÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS DO METOTREXATO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Membros da banca

Flaviane Francisco Hilário - Doutora - Universidade Federal de Ouro Preto
Jason Guy Taylor - Doutor - Universidade Federal de Ouro Preto
Thiago Belarmino de Souza - Doutor - Universidade Federal de Ouro Preto

Versão final

Aprovado em 14 de dezembro de 2019

De acordo

Prof^ª. Dr^ª. Flaviane Francisco Hilário



Documento assinado eletronicamente por **Flaviane Francisco Hilario, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/12/2019, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0028213** e o código CRC **9DF97894**.

Dedico este trabalho...

À minha mãe, exemplo de força, que se doou inteiramente às suas filhas.

AGRADECIMENTOS

A toda essa energia vital presente no universo, que flui por todos os lugares envolvendo todos os seres, a que alguns chamam de Deus.

Aos meus pais, que com sua forma de educar, me fizeram correr, com minhas próprias pernas, atrás dos sonhos.

A todos os amigos, muitas vezes anjos, que foram cruzando a minha vida e estendendo a sua mão, facilitando esta jornada. Sou grata a todos, sem vocês este sonho nunca estaria se realizando. Vocês me fizeram entender que a bondade existe. Muito obrigada!

A todos os professores que passaram por minha vida compartilhando seus conhecimentos. *“Os professores são os membros mais responsáveis e importantes da sociedade porque seus esforços profissionais afetam o destino de todos na Terra”*.

À querida professora Alceni, que me despertou a predileção para a Química Orgânica. Exemplo de profissional e de ser humano. As manhãs de segunda e terça-feiras eram, sem dúvida, as melhores daquele período.

À minha orientadora Flaviane, pela incrível oportunidade e pelos ensinamentos. Você fez despertar em mim o sentimento de capacidade de poder realizar um trabalho como este. Apesar difícil, foi uma experiência incrível.

Ao Diego, primeiro companheiro de laboratório, que colaborou tanto com meu desenvolvimento. Seu amor pela química é contagiante.

À Jéssica e ao Paulo, por toda a ajuda na realização de etapas deste trabalho.

Não podia deixar de agradecer ao PET Farmácia, o maior responsável por ter acreditado que eu poderia ser “lapidada” ao ponto de me tornar minha melhor versão.

Por fim, obrigada aos amigos de Ouro Preto, à república As Puritanas, ao 15.1 e às companheiras do 102 (obrigada pela força!). Sem todos vocês ao meu lado a caminhada teria sido bem mais difícil.

RESUMO

Introdução: O câncer é um conjunto de doenças que apresenta altas taxas de morbidade e de mortalidade em todo o mundo, envolvendo altos custos de tratamento. Atualmente, há disponível no mercado farmacêutico uma vasta gama de fármacos antineoplásicos, sendo que o metotrexato (MTX) está entre os mais utilizados contra diferentes tipos de câncer. Esse fármaco atua inibindo a enzima diidrofoloreductase (DHFR), o que impede a síntese de timidina, comprometendo mecanismos de síntese, reparo e replicação do ADN, levando à morte células cancerosas que se encontram em constante crescimento. No entanto, o MTX apresenta uma elevada toxicidade para células saudáveis, o que pode estar associado à sua elevada semelhança estrutural com o ligante natural, o diidrofolato. **Objetivo:** Desenvolver novos agentes terapêuticos, mais potentes e seletivos que o MTX, como uma estratégia de combate ao câncer. **Metodologia:** Após o entendimento da relação estrutura-atividade do MTX, planejou-se a estrutura de três novos análogos do MTX. As novas moléculas seriam obtidas empregando-se síntese linear para a formação do intermediário 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina por meio de uma reação de condensação do cloridrato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina com 1,3-dihidroxiacetona. Uma vez obtido, seria realizada uma reação de sulfonação da hidroxila deste composto, cujo produto seria empregado em reações de substituição nucleofílica (síntese de Williamson clássica) com três fenolatos, moléculas inéditas também sintetizadas neste trabalho, dando origem aos novos análogos do MTX. Os produtos obtidos seriam purificados e caracterizados por métodos cromatográficos e espectroscópicos. **Resultado:** Foram propostos três novos análogos do MTX, mantendo-se o grupo farmacofórico do MTX e modificando pontos específicos, acreditando-se melhorar as características farmacocinéticas dos novos análogos em relação ao MTX. Obtiveram-se em bons rendimentos os três compostos fenólicos, a partir dos quais se obteriam os respectivos fenolatos, que foram caracterizados por métodos cromatográficos e espectroscópicos. A síntese do intermediário 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina necessitou ser revista após a primeira tentativa, em que apresentou baixo rendimento. Em novas tentativas foi possível melhorar o rendimento e a pureza do produto. A reação de sulfonação deste intermediário necessitou ser modificada para uma reação de bromação, pois após a obtenção do 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina, percebeu-se que o mesmo não era solúvel no solvente da reação de sulfonação planejada. A reação de bromação forneceu um produto que não pôde ser purificado, portanto, não foi possível obter o composto 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina, não sendo possível realizar o término da síntese dos novos análogos do MTX planejados.

Conclusão: Acredita-se que após adequações na metodologia para a reação de obtenção do intermediário chave, 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina, os novos análogos poderão ser obtidos. Desta forma, como perspectivas futuras, tem-se a obtenção, a purificação e a caracterização estrutural dos novos análogos do MTX por métodos cromatográficos e espectroscópicos, seguindo-se à avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e da seletividade dos novos análogos e, caso a atividade antitumoral seja comprovada, será realizado o estudo do mecanismo pelo qual essa atividade ocorre.

ABSTRACT

Introduction: Cancer is a disease responsible for high morbidity and mortality rates worldwide, involving high treatment costs. Currently, there is available on the pharmaceutical market a wide range of antineoplastic drugs, with methotrexate (MTX) being among the most used against different types of cancer. This drug acts by inhibiting the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR), which prevents thymidine synthesis, compromising mechanisms of DNA synthesis, repair and replication, leading to the death of cancer cells that are constantly growing. However, MTX exhibits high toxicity towards healthy cells, which may be associated with its high structural similarity to the natural binder, dihydrofolate.

Objective: To develop new therapeutic agents, more potent and selective than MTX, as a strategy to combat cancer.

Methodology: After understanding the structure-activity relationship of MTX, the structure of three new MTX analogues was planned. The new molecules would be obtained using linear synthesis for the formation of the intermediate 2,4-diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridine by means of a condensation reaction of 2,4,5,6-tetraminopyrimidine hydrochloride with 1,3-dihydroxyacetone. Once obtained, a sulphonation reaction of the hydroxyl of this compound would be performed and the subsequent products subjected to nucleophilic substitution reactions (classical Williamson synthesis) with three phenolates, providing novel compounds. The obtained products would be purified and characterized by chromatographic and spectroscopic methods.

Result: Three new MTX analogues were proposed, maintaining the pharmacophoric group of MTX and modifying specific points in order to improve the pharmacokinetic characteristics of the new analogues in relation to MTX. The three phenolic compounds were obtained at good yields, from which the respective phenolates were obtained, which were characterized by chromatographic and spectroscopic methods. The yield and purity of the product was also improved. The sulphonation reaction of this intermediary needed to be modified to a bromination reaction, since after obtaining 2,4-diamino-6-(hydroxymethyl)-pteridine, it was noticed that it was not soluble in the solvent of the planned sulphonation reaction. The bromination reaction provided a product that could not be purified, so it was not possible to obtain the compound 2,4-diamino-6-(bromomethyl)-pteridine, and it was not possible to complete the synthesis of the new planned MTX analogues.

Conclusion: It is believed that after adjustments in the methodology for obtaining the key intermediary, 2,4-diamino-6-(bromomethyl)-pteridine reaction, new analogues may be obtained. Thus, as future perspectives, it is possible to obtain, purify and structural characterization of new MTX analogues by chromatographic and

spectroscopic methods, followed by the evaluation of the antitumor activity in vitro and selectivity of the new analogues and, if this activity is proven, the study of mechanism by which this activity occurs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismos e locais de ação de alguns agentes quimioterápicos usados no tratamento do câncer	29
Figura 2. Diferenças estruturais entre o metotrexato e o ácido fólico	32
Figura 3. Mecanismo de formação da timidina a partir de seus precursores	33
Figura 4. Mecanismo da redução catalítica do diidrofolato pela DHFR	34
Figura 5. Interações do anel 2,4-diaminopteridina do metotrexato no seu local de ação	36
Figura 6. Sobreposição das estruturas do MTX e do ácido fólico no sítio ativo da DHFR	37
Figura 7. Complexo DHFR-folato-NADPH	38
Figura 8. Estrutura química do pralatrexato e do pemetrexedo	39
Figura 9. Coeficiente de partição óleo-água correlacionado à capacidade de penetração no cérebro	50
Figura 10. Novos análogos do MTX planejados	51
Figura 11. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes ao composto 5	59
Figura 12. Subprodutos possíveis para a reação de condensação da 2,4,5,6-tetraminopirimidina com dihidroxiacetona	61
Figura 13. Equilíbrio dihidroxiacetona/gliceraldeído	62
Figura 14. Estrutura química da pirimido-pteridina	64
Figura 15. Estrutura química do 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina	65
Figura 16. Formação do composto 16 utilizando o trifenildibromofosforano	66
Figura 17. Reação para a síntese da 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina	67
Figura 18. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes ao composto 5 com condições reacionais ajustadas	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classe, mecanismo de ação e exemplos de fármacos antineoplásicos	28
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rota de síntese dos novos análogos do MTX.....	41
Esquema 2. Mecanismo da reação de formação do composto fenólico 10.....	52
Esquema 3. Mecanismo da reação de formação do carbamato 13	53
Esquema 4. Mecanismo da reação de formação do composto fenólico 15.....	54
Esquema 5. Mecanismo proposto para a formação do glioxal.	56
Esquema 6. Mecanismo proposto para a reação de formação do composto 5	57
Esquema 7. Mecanismo da reação de formação do composto 16	65
Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação com condições ajustadas	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de Etila

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ala-97: Alanina 97

Ar.: Aromático

Arg-57: Arginina 57

Asp-26: Aspartato 26

ATP: Trifosfato de Adenosina

BaCl₂: Cloreto de bário

BaSO₄: Sulfato de bário

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CH₂Cl₂: Diclorometano

CHCl₃: Clorofórmio

CH₃OH: Metanol

Cl: Íon cloreto

CPCNP: Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas

DCC: Diciclohexilcarbodiimida

DCU: Dicicloexiluréia

DHFR: Diidrolato redutase

DMAC: Dimetilacetamida

DMF: Dimetilformamida

dUMP: Dexoxiuridinamonofosfato

dMTP: Timidinamonofosfato

Et₃N: Trietilamina

GA: Grupo Auxofórico

GF: Grupo Farmacofórico

HBr: Ácido bromídrico

HCl: Ácidoclorídrico

Hex: Hexano

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

H₃PO₄: Ácido fosfórico

H₂-FOLATO: Diidrofolato

H₂O: Água

H₄-FOLATO: Tetraidrofolato

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Iniciação Científica

ICEB: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Ile-50: Isoleucina 50

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Kcal: Quilocaloria

LaSOQuiM: Laboratório de Síntese Orgânica e Química Medicinal

Leu-4: Leucina 4

Leu-28: Leucina 28

Leu-54: Leucina 54

LiOH: Hidróxido de lítio

LLA: Leucemia Linfocítica Aguda

M: mol/L

MTX: Metotrexato

NaCl: Cloreto de sódio

NADPH: Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NaOAc: Acetato de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NH₃: Amônia

NH₄OH: Hidróxido de amônio

PABG: ρ -aminobenzoilglutamato

pH: potencial Hidrogeniônico

Phe-31: Fenilalanina 31

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SO₄²⁻: Íon sulfato

SNC: Sistema Nervoso Central

SUS: Sistema Único de Saúde

THF: Tetraidrofolato

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. GERAL	22
2.2. ESPECÍFICOS.....	22
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1. O CÂNCER.....	23
3.2. FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER.....	24
3.3. TRATAMENTO DO CÂNCER.....	27
3.4. METOTREXATO: UM INIBIDOR DA SÍNTESE DE ADN.....	31
4. METODOLOGIA.....	40
4.1. SÍNTESE DO COMPOSTO FENÓLICO (10)A PARTIR DO QUAL O FENOLATO7B PODERIA SER OBTIDO.....	43
4.2. SÍNTESE DO COMPOSTO FENÓLICO (15) A PARTIR DO QUAL O FENOLATO7C PODE SER OBTIDO	44
4.3. SÍNTESE DA 2,4-DIAMINO-6-(HIDRÓXIMETIL)-PTERIDINA (5) (BAUGH E SHAW, 1964)	46
4.4. TENTATIVA DE SÍNTESE DA 2,4-DIAMINO-6-(BROMOMETIL)-PTERIDINA(16).....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. PLANEJAMENTO RACIONAL DOS NOVOS ANÁLOGOS DO MTX	49
5.2. REAÇÕES REALIZADAS PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (10 E 15) A PARTIR DOS QUAIS SERIA POSSÍVEL OBTER OS FENOLATOS 7B E 7C	51
5.3. REAÇÕES REALIZADAS PARA A OBTENÇÃO DA 2,4-DIAMINO-6-(HIDRÓXIMETIL)-PTERIDINA (5).....	55
5.4. REAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO COMPOSTO 2,4-DIAMINO-6-(BROMOMETIL)-PTERIDINA	65

5.5. OBTENÇÃO DA 2,4-DIAMINO-6-(HIDRÓXIMETIL)-PTERIDINA COM AS CONDIÇÕES DE REAÇÃO AJUSTADAS.....	67
6. CONCLUSÃO.....	72
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
8. REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS.....	80

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos adjacentes (INCA, 2019). Segundo dados do *World Health Organization (WHO)* o câncer apresenta altas taxas de morbidade e de mortalidade em todo o mundo, além de envolver alto custo de tratamento (WHO, 2018). Os três tipos principais de tratamento contra o câncer são cirurgia, quimioterapia e radioterapia, existindo ainda outros métodos como imunoterapia, fotorradiação, terapia hormonal e farmacogenética (ALMEIDA et al. 2005). A partir da década de 1990, os tratamentos contra o câncer visaram à quimioterapia direcionada, capaz de atingir a localização correta de tumores malignos para realizar a sua destruição. Avanços recentes de tratamento contra o câncer, que exploram a genética e a biologia molecular, têm contribuído significativamente para a redução das taxas de mortalidade por essa doença (ARRUEBO et al., 2011).

Atualmente há disponível no mercado farmacêutico uma vasta gama de fármacos antineoplásicos, sendo que o metotrexato (MTX) está entre os mais utilizados no tratamento quimioterápico contra diferentes tipos de câncer, apesar de possuir um baixo índice terapêutico (ALMEIDA, et al., 2005). O MTX é usado isoladamente ou em combinação com outros fármacos antineoplásicos, visando ao aumento da eficácia de tratamentos quimioterápicos contra o câncer. Em um estudo realizado por Moser et al. (1999) empregando pacientes com leucemia meníngea, foi demonstrado que na terapia combinada utilizando o MTX e citarabina, 93% dos pacientes alcançaram remissão completa por até 15 meses. O risco de recidiva no sistema nervoso central (SNC) foi reduzido e a estimativa de sobrevida livre de eventos foi de 80,2%. Em um estudo realizado por Garget al. (2009), foi abordado o tratamento de leucemia linfocítica aguda (LLA) utilizando o MTX, também em terapia combinada com ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona e citarabina, sendo observada uma taxa global de sobrevida de 35%, com uma sobrevida livre de doença de 45% em 5 anos e sobrevida a longo prazo de até 60%. Houve também remissão completa em todos os pacientes.

O MTX é um análogo do ácido fólico, que atua inibindo competitiva e reversivelmente a enzima diidrofolato redutase (DHFR), enzima responsável por reduzir o diidrofolato a tetraidrofolato, que será utilizado na síntese de timidina, uma das quatro bases

nitrogenadas que compõem o ácido desoxirribonucléico (ADN). Portanto, a inibição desta enzima compromete mecanismos de síntese, reparo e replicação do ADN, culminando com a morte de células que se encontram em constante crescimento, característica encontrada em células tumorais (BARBISAN, 2014; CHIBBER, 2011). Como no organismo humano existem células saudáveis que normalmente se encontram em constante renovação, há a necessidade do desenvolvimento de fármacos antineoplásicos que atuem seletivamente nas células cancerosas.

O MTX apresenta uma elevada toxicidade para células saudáveis, o que pode estar associado à sua elevada semelhança estrutural com o ligante natural, o diidrofolato (HARBISON et al., 2009). Por este motivo, o MTX usualmente deve ser utilizado em combinação com outros fármacos, pois na quimioterapia é necessária a administração de doses consideradas tóxicas ao ser humano. Uma modalidade de tratamento amplamente utilizada é a administração do ácido folínico algumas horas após a dose do MTX, para resgatar as células saudáveis (GILMAN, 2012; HARBISON et al., 2009).

Tendo em vista a ampla utilização do MTX na quimioterapia antineoplásica, é válida a síntese de novos análogos do MTX que sejam mais eficazes e seletivos que o MTX, apresentando maior índice de seletividade, a fim de garantir melhor qualidade de vida dos pacientes durante e após o tratamento contra o câncer.

Como perspectiva futura deste trabalho será finalizada a síntese dos novos análogos do MTX planejados e esses análogos serão encaminhados para avaliação da atividade antitumoral, *in vitro*, e da seletividade. Caso alguma molécula seja ativa e seletiva contra células cancerosas, será estudado o mecanismo de ação por meio do qual se dá essa atividade, podendo alguma das moléculas se tornar candidata a fármaco para o tratamento contra o câncer.

2. OBJETIVOS

2.1.GERAL

Desenvolver novos agentes terapêuticos, mais potentes e seletivos que o metotrexato, como uma estratégia de combate ao câncer.

2.2.ESPECÍFICOS

- i. Planejar novos análogos do metotrexato com potencial atividade antitumoral;
- ii. Sintetizar os novos análogos do metotrexato com potencial atividade antitumoral;
- iii. Caracterizar os novos análogos obtidos por meio de métodos espectroscópicos (infravermelho, ressonância magnética nuclear) e espectrometria de massas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O CÂNCER

A vida da população mundial tem apresentado significativas mudanças no decorrer dos anos, o que altera de forma expressiva o seu perfil demográfico. De acordo com o IBGE (2015), o aumento da probabilidade de indivíduos chegarem a idades mais avançadas, sendo concomitante a diminuição da probabilidade de morte precoce, força o direcionamento dos sistemas de saúde públicos ou privados para o seguimento desse tipo de população. Fries (2005) afirma que o século atual iniciou-se deixando para trás doenças infecciosas tais como varíola, difteria e tétano, ocorrendo uma redução de mortes por essas doenças em mais de 99%. Juntamente com as mudanças do perfil demográfico populacional, há também mudanças no perfil epidemiológico, surgindo, neste momento, as doenças crônicas como o câncer (CHU; SARTORELLI, 2014).

De acordo com o WHO (2018), neoplasia, câncer ou tumor maligno são os nomes dados para um grande conjunto de doenças que podem acometer todas as partes do corpo. Um tumor corresponde a um aumento de volume em qualquer região do corpo, que pode estar relacionado ao aumento do número de células (INCA, 2019), sendo classificado como benigno ou maligno. O tamanho do tumor e algumas características definem a malignidade e a ausência dessas características indica benignidade (CHAK et al., 1997), sendo que tumores benignos não colocam em risco a vida do indivíduo.

O câncer possui como característica a formação de células anormais que se dividem rapidamente sem se diferenciarem e que invadem os tecidos adjacentes. Esse crescimento tende ser muito agressivo e incontrolável (IBGE, 2014). A invasão de tecidos adjacentes caracteriza um processo denominado metástase, a principal causa de óbitos de pacientes com câncer. Nota-se que essa doença promove uma perda dos mecanismos fisiológicos de controle de processos reguladores da sobrevivência, da proliferação e da diferenciação celular (CHU; SARTORELLI, 2014).

O câncer é a segunda principal condição que leva à morbidade e mortalidade em todo o mundo. Estima-se que um em cada seis óbitos tem como causa o câncer, sendo que em 2018 essa doença foi responsável por 9,6 milhões de mortes. Dados mostram ainda que

aproximadamente 70% dos casos de morte por câncer ocorrem nos países de baixa e média renda (WHO, 2018).

Chu e Sartorelli (2014) definiram os múltiplos fatores que levam à incidência de câncer: sexo, idade, raça, pré-disposição genética e exposição a carcinógenos ambientais, sendo este último o fator mais importante. Pode-se inferir, portanto, que o fato da maior taxa de mortalidade por câncer concentrar-se em países de baixa e média renda pode estar relacionado à exposição ambiental dessa população, tendo em vista, ainda, que fatores comportamentais e alimentares sejam responsáveis por um terço do total de óbito por câncer (WHO, 2018).

Os tipos de câncer que mais comumente levam a óbito são os de pulmão (1,76 milhões de mortes), fígado (782 mil mortes), colorretal (862 mil mortes), estômago (783 mil mortes) e mama (627 mil mortes), segundo dados apresentados pela WHO em 2018. Tendo em vista o alto número de pessoas que desenvolvem câncer, pode-se prever o impacto econômico trazido por essa doença. Em 2010, o custo econômico anual total do câncer foi estimado em aproximadamente 1,16 trilhões de dólares, em todo o mundo (WHO, 2018).

Harford et al. (2009) relataram que, em todo o mundo, os recursos humanos necessários para o tratamento de câncer são muito limitados ou até mesmo inexistentes, o que se torna mais preocupante nos países de baixa renda. Como a incidência de câncer é alta nessa população, o que geralmente ocorre é o menor potencial de cura e a maior necessidade de alívio dos sintomas, o que envolve gastos econômicos consideráveis. De acordo com Medici (2018), o SUS (Sistema Único de Saúde) chega a gastar cerca de seis vezes mais no tratamento do câncer quando o mesmo encontra-se em estágio avançado, sendo parte deste aumento de custos relacionado a cuidados paliativos.

3.2.FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER

A fisiopatologia do câncer ainda necessita de estudos para maior e melhor compreensão dos eventos fisiopatológicos envolvidos. Alberts et al. (2002) abordam a doutrina celular do patologista alemão Rudolf Virchow de 1858, que transmite a ideia de que para o surgimento de uma célula deve haver uma célula anterior. Ou seja, a produção de células em um organismo se dá a partir de células já existentes, em um processo contínuo denominado ciclo celular, mecanismo que garante a continuidade da vida.

Tyson e Novak (2014) comparam a célula viva a um computador, no que diz respeito à capacidade de processamento de informações, que utiliza marcadores bioquímicos para efetuar a sua tomada de decisão durante o ciclo celular, que é uma sequência ordenada e complexa de eventos celulares. Todos esses fatores em funcionamento adequado garantem uma constância de massa, forma e composição corpórea (MARCONDES, 1987).

Os processos de diferenciação e multiplicação celular possuem uma relação inversa entre si: quanto mais avançado é o estado de diferenciação, menor a taxa de divisão de uma célula (BRASILEIRO FILHO, 2006). As células malignas que dão origem aos diferentes tipos de câncer se formam lenta e gradualmente a partir de células normais que de algum modo permaneceram um longo período em contato com agentes cancerígenos (INCA, 2019). A partir disso, em um determinado momento, as células malignas adquirem características diferentes não obedecendo ao ciclo celular normal (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa maneira, ocorre aumento da multiplicação celular e diminuição da diferenciação celular, podendo-se concluir que a célula perde seus mecanismos de regulação, adquirindo autonomia para se replicar, não respondendo mais aos estímulos fisiológicos e bioquímicos (INCA, 2019).

A perda da diferenciação de células compromete a sua função específica no organismo, porém, existem casos de tumores cujas células são bem diferenciadas podendo realizar sua função de forma excessiva, podendo haver também células que adquirem novas funções. Outro fator intrigante na fisiopatologia do câncer e que compromete a sua cura, são as recidivas, geralmente relacionadas à metástase, fator que, de forma geral, diferencia tumores malignos de benignos. No processo de metástase, células malignas destacam-se do local onde residem e invadem vasos linfáticos ou sanguíneos e canais, ductos ou cavidades naturais, onde são capazes de sobreviver por um longo tempo, podendo a qualquer momento migrar para outro tecido onde se instalam gerando um novo tumor. É válido destacar que existem componentes tanto das células como dos diferentes órgãos que são determinantes para o surgimento e localização de metástase, ou seja, para um novo tumor se instalar, ele necessita de um ambiente que favoreça a sua instalação (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Durante a carcinogênese, ocorrem alterações na expressão gênica das células comprometidas como, por exemplo, a síntese de enzimas que predominam na fase embrionária e que catalisam *vias* metabólicas menos complexas oferecendo vantagens a células cancerosas sobre as saudáveis. O que ocorre também são alterações bioquímicas que

favorecem o desenvolvimento do tumor, dando origem ao chamado “microambiente tumoral” (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Brasileiro Filho (2006) listou características e condições bioquímicas presentes no câncer que dão origem a este “microambiente tumoral” presentes em câncer:

- i. Maior resistência à hipóxia;
- ii. Menor adesão às células vizinhas, o que facilita seu deslocamento e disseminação para tecidos adjacentes;
- iii. Perda da inibição por contato, o que explica a sua replicação descontrolada;
- iv. Independência de ancoragem para crescimento;
- v. Maior captação de nutrientes do hospedeiro para sua manutenção (aminoácidos para replicação e glicose para produção rápida de adenosina trifosfato- ATP);
- vi. Diminuição da necessidade de soro para manutenção do crescimento: a célula adquire um mecanismo autócrino, produzindo fatores de crescimento que necessita;
- vii. Imortalidade devido à alta atividade da enzima telomerase, que impede o encurtamento do cromossomo ao longo das divisões celulares por meio da síntese de ADN não codificante, retardando os processos de envelhecimento celular.

WHO (2018) define três categorias de agentes externos causadores de câncer: carcinógenos físicos, como radiação ultravioleta e ionizante; carcinógenos químicos, como componentes da fumaça do tabaco, aflatoxina (contaminante de alimentos), arsênio (contaminante da água potável) e uso de álcool; por fim, carcinógenos biológicos, como infecções causadas por certos tipos de vírus (como o papiloma vírus), bactérias ou parasitas.

Tendo em vista que fatores modificáveis são os maiores responsáveis pelo desenvolvimento de câncer, pode-se afirmar que as taxas de mortalidade específicas para essa doença sofrem influência por mudanças na exposição a fatores de risco, bem como pela disponibilidade de sistemas para diagnóstico e tratamento precoce (DANAEI et al., 2005).

Muitos tipos de câncer são evitáveis, portanto, a prevenção primária pode ocorrer por meio de intervenções ambientais e no estilo de vida, sendo essas as melhores opções para frear o aumento da incidência de câncer na população (AMES; GOLD, 1998). Dos tipos de câncer existentes, 30% a 50% podem ser evitados pelas medidas de prevenção, bem como um diagnóstico precoce pode facilitar a cura, quando tratados corretamente (WHO, 2018).

3.3. TRATAMENTO DO CÂNCER

De acordo com o Formulário Terapêutico Nacional, (2010), o tratamento do câncer inclui algumas modalidades, sendo elas:

- i. Primária: inclui fármacos citotóxicos de primeira linha de acordo com o tipo de câncer;
- ii. Paliativa: objetiva retardar o crescimento do tumor;
- iii. Adjuvante: consiste em uma adição após o primeiro tratamento, como por exemplo, um tratamento específico utilizado após cirurgias para a prevenção de recidivas;
- iv. Neoadjuvante: reside na administração de fármacos antes da terapia principal, objetivando reduzir o tamanho da extensão do tumor a fim de aumentar as chances de sucesso da terapia principal.

Existem outras modalidades de tratamento contra o câncer empregadas na atualidade, desenvolvidas a partir da obtenção de maiores informações sobre a caracterização das mutações genéticas envolvidas nos diferentes tipos de câncer, bem como os eventos biológicos e *vias* que levam à carcinogênese (PALUMBO et al., 2013). A imunoterapia, por exemplo, estimula o mecanismo de defesa do próprio organismo para o combate de células tumorais, envolvendo fatores tais como interferon α e interleucina 2, ativadores do sistema imune (ALMEIDA, 2005). Estudos relacionados à farmacogenética também são uma alternativa atual para o tratamento do câncer. Esta modalidade estuda como a variabilidade genética de um indivíduo implica na resposta individual a um tratamento. Desta maneira, o tratamento selecionado será mais eficiente e seguro (EFFERTH; VOLM, 2005). Há também a técnica da fotorradiação, que localiza e destrói as células do tumor por meio de uma fonte de radiação específica (ALMEIDA et al., 2005). A terapia hormonal também tem melhorado a sobrevivência de muitos indivíduos com câncer de mama e de próstata, atuando por meio da privação de hormônios (PALUMBO et al., 2013).

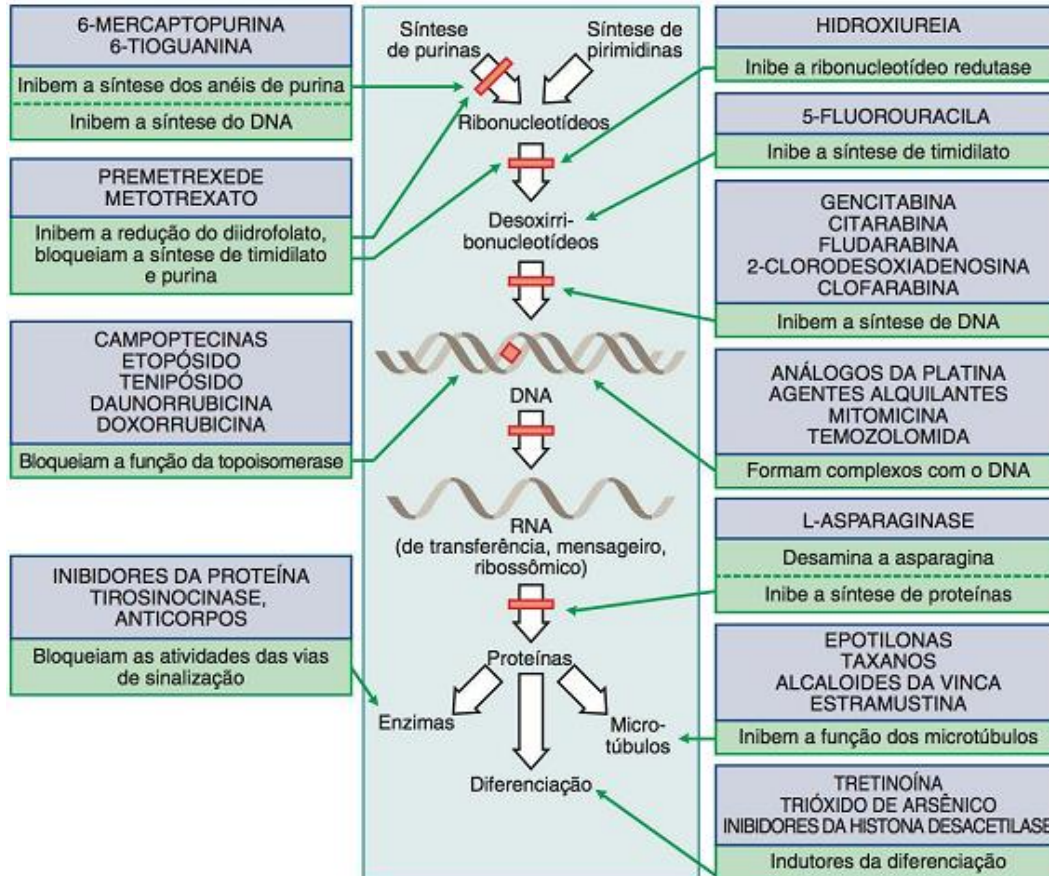
Os fármacos utilizados como antineoplásicos são geralmente classificados de acordo com seu mecanismo de ação (Quadro 1), que leva em consideração os alvos celulares (Figura 1) (GILMAN, 2012; Formulário Terapêutico Nacional, 2010).

Quadro 1. Classe, mecanismo de ação e exemplos de fármacos antineoplásicos

Classe	Mecanismo de ação	Exemplos
Agentes alquilantes	Ligam-se ao ADN impedindo a abertura da dupla hélice e por consequência inibindo a síntese de ADN e proteínas nos processos de replicação e transcrição.	Mostardas nitrogenadas: ciclofosfamida e ifosfamida
Análogos antimetabólicos	Como possuem estrutura semelhante aos componentes nucleares, atuam na inibição de enzimas que participam da síntese de ADN e proteínas estruturais semelhantes a componentes nucleares.	Metotrexato (análogo do ácido fólico), mercaptopurina e gencitabina (análogos das purinas), fluorouracila e citarabina (análogos das pirimidinas)
Antimitóticos	Possuem propriedades de inibição da mitose da célula, bloqueando processos tais como a polimerização da tubulina.	Vimblastina, vincristina, docetaxel, paclitaxel, etoposídeo, hormônios e antagonistas hormonais
Compostos de platina	Formam ligações cruzadas entre guaninas adjacentes do ADN, impedindo os processos de replicação e transcrição.	Cisplatina, carboplatina, oxaliplatina
Intercalantes	Intercalam-se com as bases nitrogenadas na estrutura da dupla hélice do ADN.	Dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, idarrubicina
Enzimas	Causam uma redução na produção de asparagina que é necessária para a síntese proteica celular, levando à morte da célula.	Asparaginase
Inibidores de enzimas	Inibe a ribonucleotídeo redutase que é responsável pela formação de desoxiribonucleotídeos para a síntese e reparo do ADN.	Hidroxiureia

Fonte: Criado pela autora com dados extraídos de GILMAN (2012)

Figura 1. Mecanismos e locais de ação de alguns agentes quimioterápicos usados no tratamento do câncer



Fonte: GILMAN (2012)

Os fármacos antineoplásicos disponíveis atualmente apresentam um estreito índice de seletividade bem como um alto potencial para causar efeitos adversos (GILMAN, 2012). Os regimes quimioterápicos possuem como alvo as células cancerosas que se multiplicam rapidamente, porém, justamente por essa característica, células saudáveis de tecidos linfóides, medula óssea, epitélio gastrointestinal, entre outros, tornam-se também alvos desses fármacos, visto que fazem parte de tecidos de rápida renovação (URUSHIZAKI, 1990).

Como exemplos de efeitos adversos decorrentes de quimioterapia podem-se citar náuseas e vômitos, observados em tratamento utilizando as mostardas nitrogenadas e a cisplatina; toxicidade na medula óssea, que ocorre após terapia com a maioria dos quimioterápicos existentes; leucopenia e trombocitopenia que comprometem os sistemas hematológico e imunológico; problemas dermatológicos, como queda de cabelos. Segundo

Chopra et al.(2016), além da baixa qualidade de vida experimentada pelos pacientes com câncer, existe também uma implicação na elevação de custos do tratamento devido aos efeitos adversos.

Os efeitos adversos surgem devido à falta de seletividade dos fármacos, que tendem a causar lesões tanto em células malignas como em células saudáveis. Para a superação desses obstáculos, faz-se necessário o reconhecimento da fisiopatologia do câncer para a descoberta de alvos terapêuticos mais específicos, tais como receptores de fatores de crescimento, *vias* de sinalizações intracelulares, processos epigenéticos, vascularidade dos tumores, defeitos no reparo do ADN e *vias* de morte celular. Esse conhecimento poderá proporcionar o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas com maior valor terapêutico, com grandes avanços no tratamento de pacientes (GILMAN, 2012).

Além dos efeitos adversos causados pela falta de seletividade de fármacos nos alvos terapêuticos, há também outro tipo de problema no uso de fármacos antineoplásicos atualmente disponíveis: a resistência de células cancerosas a tais fármacos. Algumas células que naturalmente apresentam mutações de resistência a um determinado fármaco são selecionadas após a exposição, quando se inicia o tratamento. Dessa forma, haverá uma resposta inicial à quimioterapia, visto que as células não resistentes são eliminadas, mas após algum tempo irá ocorrer recidiva do câncer, devido ao crescimento do grupo de células resistentes que restaram do tumor original. Essa recidiva dará origem a um tumor cujas células serão completamente resistentes àquele fármaco utilizado inicialmente (SWANTON, 2012).

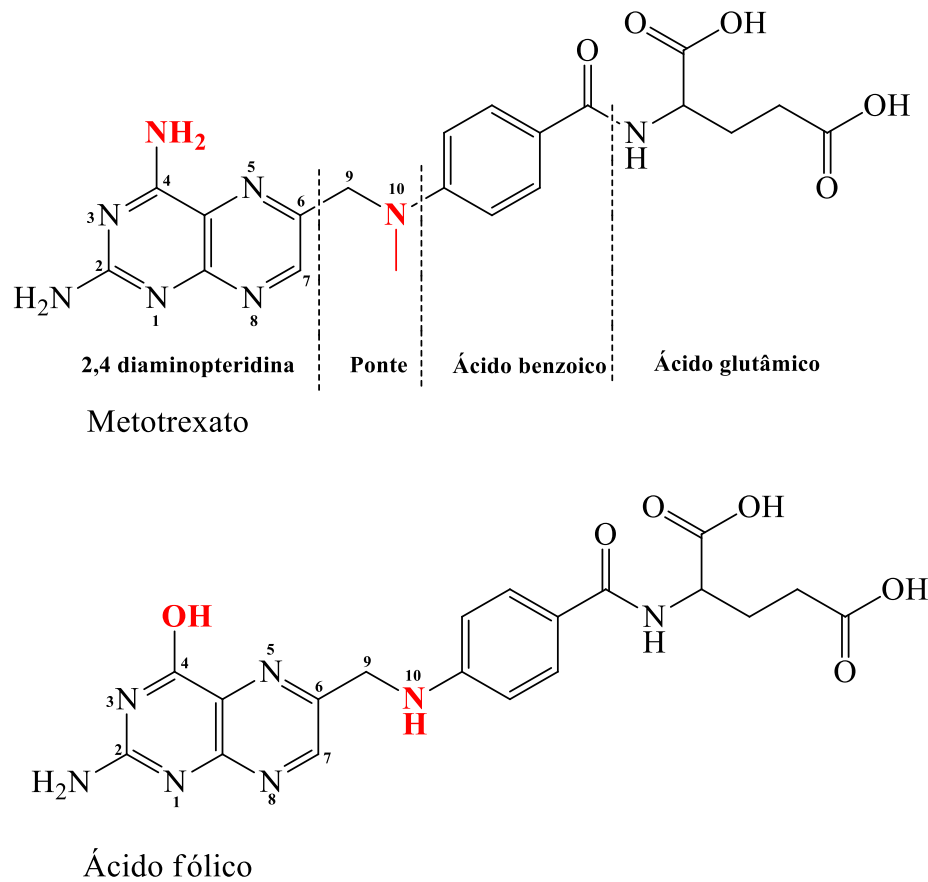
A combinação de fármacos pode ser utilizada no manejo de pacientes que apresentam resistência a um determinado fármaco, pois a combinação pode anular um mecanismo de resistência específico da célula cancerosa, podendo ocorrer ainda, um efeito sinérgico entre os fármacos combinados. O que se deve atentar é se os efeitos tóxicos também serão sinérgicos na terapia combinada (KATZUNG, 2014).

Apesar de a ciência apresentar importantes avanços em relação à compreensão da fisiopatologia do câncer, ainda é necessário o estudo de mais estratégias terapêuticas contra essa doença. É de grande interesse a descoberta de novos compostos que tenham potencial de se tornarem fármacos que possuam melhor eficácia, seletividade e menor toxicidade no tratamento do câncer.

3.4.METOTREXATO: UM INIBIDOR DA SÍNTESE DE ADN

O metotrexato (MTX) é o principal fármaco antagonista do ácido fólico, sendo empregado no tratamento de inúmeras doenças, como psoríase, imunossupressor após transplantes, dermatomiosite, artrite reumatóide, granulomatose de Wegener, doença de Crohn (BARBISAN, 2014) e para o tratamento de doenças malignas, como câncer de mama, cabeça, pescoço, bexiga, sarcoma osteogênico, linfoma primário do sistema nervoso central, linfoma não Hodgkin, coriocarcinoma (KATZUNG, 2014). O vasto emprego do MTX, como citado, deve-se a sua ação de inibição de enzimas-chave na biossíntese de componentes nucleares (CHAN; CRONSTEIN, 2013).

A molécula do MTX revela por meio de sua estrutura química que é um análogo do ácido fólico (Figura 2). Na Figura 2 estão representadas as estruturas químicas do MTX e do ácido fólico, sendo destacadas em vermelho as suas diferenças estruturais. A molécula do MTX pode ser dividida em quatro regiões (Figura 2): anel 2,4-diaminopteridina, ponte, ácidobenzóico e ácido glutâmico, ou resumidamente, em duas regiões: o anel 2,4-diaminopteridinae a porção p -aminobenzoilglutamato (PABG) (BLANEY et al., 1984).

Figura 2. Diferenças estruturais entre o metotrexato e o ácido fólico

Fonte: Elaborada pela autora

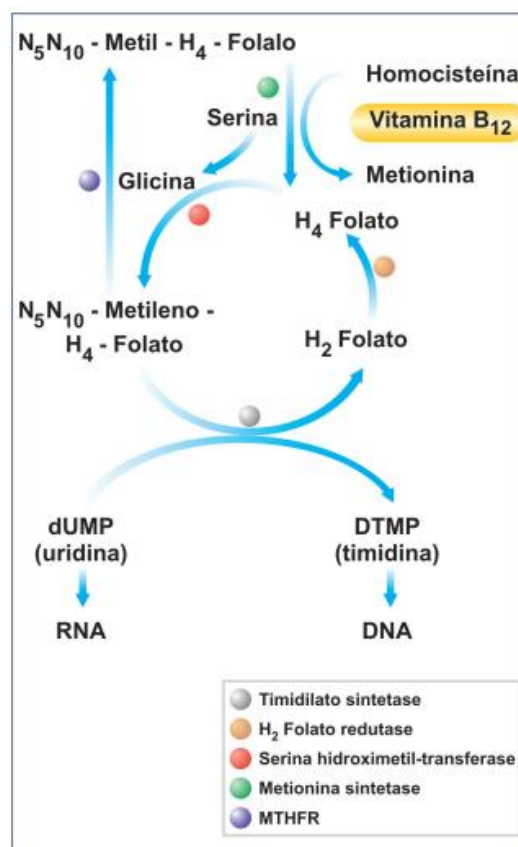
O ácido fólico é uma vitamina do complexo B (vitamina B9), proveniente da alimentação, que é essencial para a síntese de ADN. Mais especificamente, o ácido fólico está envolvido na síntese da timidina, que é um dos quatro nucleotídeos que compõem o ADN (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002). A carência de qualquer um dos quatro tipos de nucleotídeos (adenina, guanina, citosina e timidina), tem como consequência a síntese diminuída de ADN (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Os folatos, como o ácido fólico, ao serem ingeridos e absorvidos, serão convertidos na forma de N₅N₁₀-Metileno-H₄-Folato, que participa diretamente da síntese de timidina (DTMP)- Figura 3. Assim como o ácido fólico, a vitamina B12 também é essencial para a síntese de DTMP, participando como cofator na conversão de homocisteína em metionina, necessitando do N₅N₁₀-Metil-H₄-Folato, uma forma de transporte de folato (Figura 3). A vitamina B12 primeiramente recebe o radicalmetilido N₅N₁₀-Metil-H₄-Folato e, após, transfere este radical metil para a homocisteína que será então convertida em metionina (MAHMOOD, 2015). O N₅N₁₀-Metil-H₄-Folato, ao doar o grupo metil nesta reação, fornece o

H₄-Folato que participará da reação catalisada pela enzima serina hidroximetil-transferase, que converte serina em glicina, fornecendo N₅N₁₀-Metileno-H₄-Folato, essencial para o ciclo de formação de DTMP (LUBRAN, 1971; PANIZ et al., 2005).

O N₅N₁₀-Metileno-H₄-Folato, pela ação da enzima timidilatosintetase, cederá um radical metiladesoxiuridinamono-fosfato (dUMP), transformando-o em timidinamono-fosfato (DTMP) que, por sua vez, será incorporado ao ADN (LUBRAN, 1971). Após transferir um radical metil ao dUMP, o N₅N₁₀-Metileno-H₄-Folato se encontrará em seu estado oxidado como H₂-Folato (diidrofolato), que será reduzido a H₄-Folato (tetrahydrofolato) pela ação da enzima H₂-Folato redutase (diidrofolatoredutase, DHFR), dando continuidade ao ciclo de formação da timidina (DTMP) (LUBRAN, 1971; PANIZ et al., 2005).

Figura 3. Mecanismo de formação da timidina a partir de seus precursores

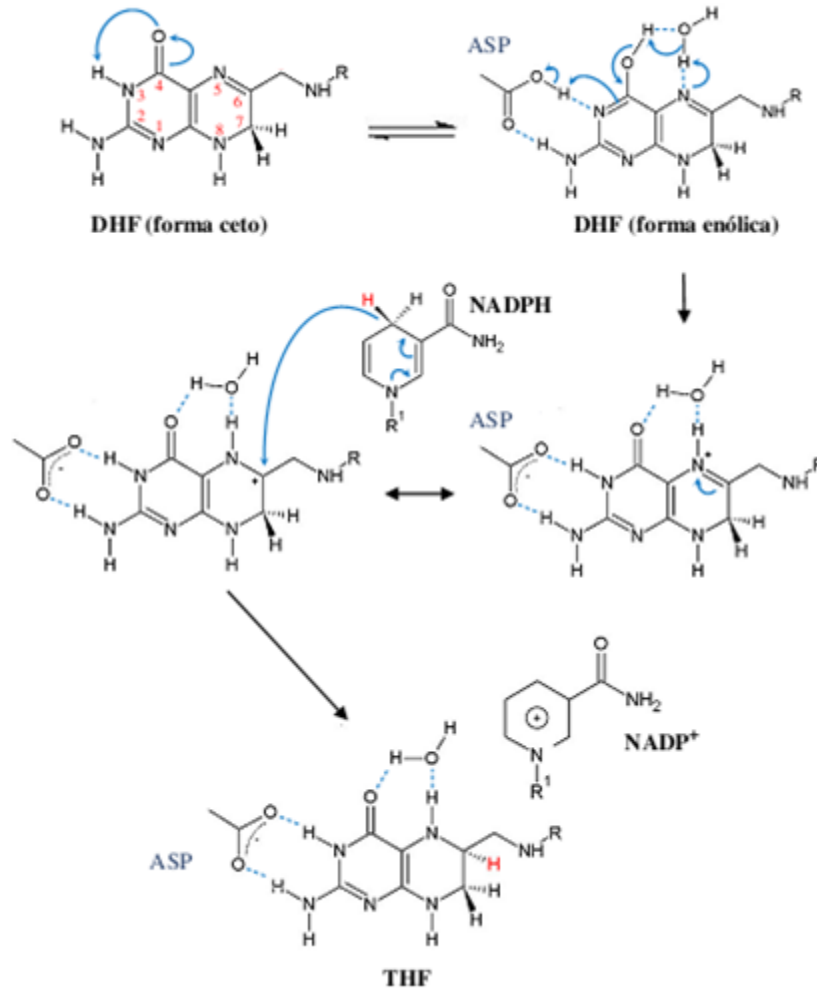


Fonte: ZAGO; FALCÃO; PASQUINI (2013)

A enzima DHFR catalisará a transferência de íons hidreto da porção denominada nicotinamida da molécula do fosfato de dinucleótido de nicotinamida (NADPH) para a molécula de H₂-Folato reciclando, assim, o H₄-Folato e dando continuidade à síntese de

DTMP (WAN et al., 2014). Na Figura 4 está representado como ocorre a redução catalítica do H₂-Folato (DHF) para H₄-Folato (THF).

Figura 4. Mecanismo da redução catalítica do diidrofolato pela DHFR



Fonte: Adaptado de MATOS, 2016

Quando a síntese de ADN é inadequada, ocorrem modificações do ciclo celular, retardo da duplicação e, dependendo do grau do dano, a célula afetada pode sofrer apoptose. É válido ressaltar que no caso de falha na *via* de formação da timidina, a síntese de RNA não estará comprometida, visto que esse nucleotídeo não está presente em sua estrutura. Nesse sentido, não há diminuição da formação de proteínas e de RNA pela célula já existente, no entanto a mesma não conseguirá se duplicar (WEIL, 2017).

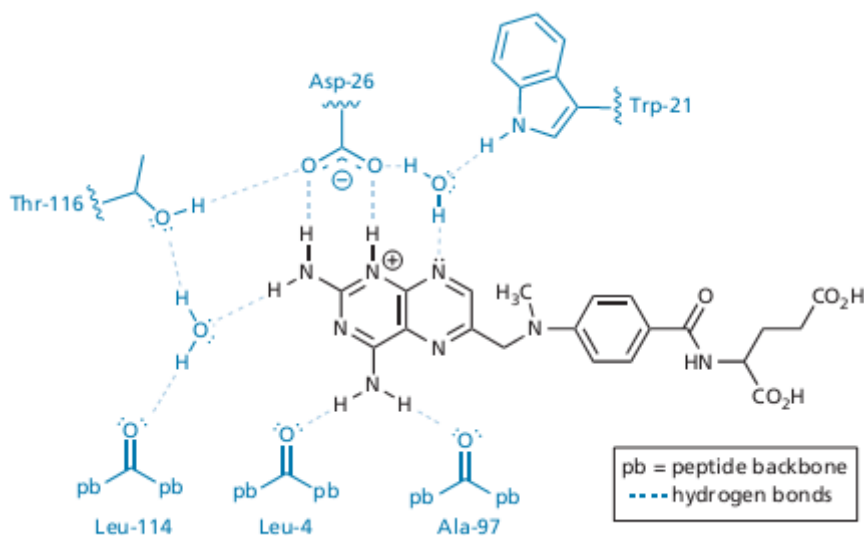
A fase S do ciclo celular se torna lenta, fazendo com que haja um aumento do número de células com quantidade de ADN entre o diplóide e o tetraplóide. Por meio de estudos citogenéticos, puderam-se observar exuberantes alterações cromossômicas como

gaps, fraturas e separação prematura do centrômero. A maioria dessas células com lesões cromossômicas graves não conseguem completar sua divisão celular, sendo destruídas prematuramente (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

O metotrexato (MTX) atua inibindo de forma competitiva e reversivelmente a enzima DHFR (BARBISAN, 2014; CHIBBER et al., 2011), que é uma enzima de importância central em bioquímica e química medicinal sendo responsável por reduzir o H₂-Folato ao H₄-Folato utilizando o NADPH como cofator doador de hidretos (Figura 4). A ligação do MTX à enzima impede que H₂-Folato se ligue à DHFR, impedindo a formação do H₄-Folato e consequentemente impede a formação do N₅N₁₀-Metileno-H₄-Folato e da timidina (DTMP) - Figura 3 (BLANEY et al., 1984). Essa situação compromete mecanismos de síntese e reparo do ADN e replicação celular. O MTX causa a interrupção abrupta na síntese de ADN, agindo, portanto, na fase S do ciclo celular. Dessa maneira, as células não conseguem se duplicar, resultando em morte celular de quaisquer células que estejam nesta fase do ciclo (BARBISAN, 2014; CHIBBER, 2011). Vale ressaltar que o MTX possui afinidade cerca de 3.000 a 10.000 vezes superior pela enzima DHFR em comparação aos folatos.

Para avaliação do mecanismo molecular do MTX, é importante a avaliação da sua estrutura química. O MTX possui um anel 2,4-diaminopteridina que contém heteroátomos de nitrogênio. Heterociclos possuem o potencial de interagir com os sítios de ligação por meio de interações intermoleculares. No caso do MTX, essas interações são do tipo ligação de hidrogênio, que permitem sua interação no seu local de ligação, na enzima DHFR, inibindo-a como demonstrado na Figura 5 (PATRICK, 2013).

Figura 5. Interações do anel 2,4-diaminopteridina do metotrexato no seu local de ação



Fonte: PATRICK (2013)

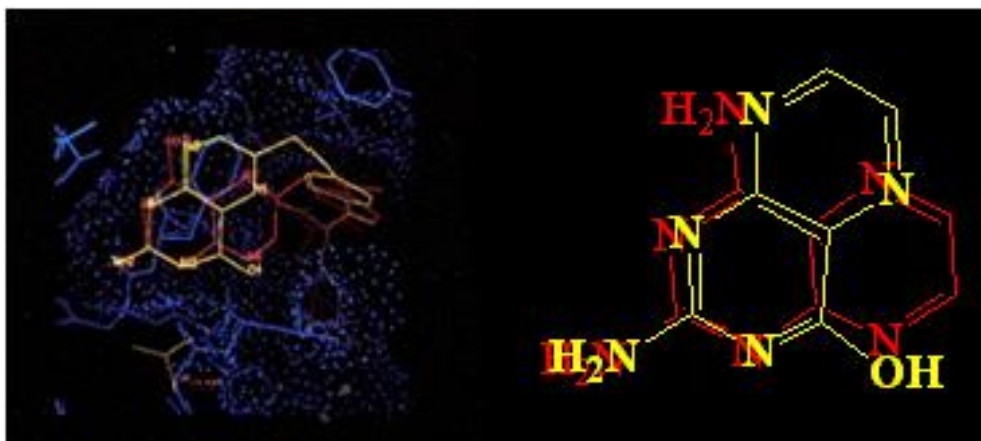
O sítio ativo da enzima constitui-se de uma cavidade hidrofóbica, na qual a entrada é ocupada pelos substratos da enzima ou pelo inibidor (MTX). O NADPH localiza-se mais no fundo da cavidade, com sua porção nicotinamida posicionada próxima a C-6 e C-7 (Figura 4) facilitando a transferência de íons durante a ação enzimática (HUENNEKENS, 1994).

Comparando-se a estrutura do ácido fólico com a do MTX (Figura 2, página 32), nota-se que a substituição isostérica do grupo -OH por -NH₂, na posição 4 do anel 2,4-diaminopteridina foi a mudança necessária para tornar a molécula uma forte inibidora da DHFR. O papel desse grupo amino pode estar relacionado à importância de ligações de hidrogênio no sítio ativo da enzima com oxigênios de carbonilas de Leu-4 e Ala-97 (Figura 5). O grupo amino também confere maior basicidade à molécula - consequência do isosterismo clássico, que modifica de forma considerável as propriedades ácido-base de moléculas (BARREIRO; FRAGA, 2008), o que permite à molécula de MTX ser protonada quando se ligar à enzima, tornando possível a geração de uma ligação iônica entre N1, N2 e COO⁻ do Asp-26 (BLANEY et al., 1984).

Tanto os substratos da DHFR quanto o MTX possuem suas porções de PABG localizadas na mesma posição, porém, há uma rotação de 180° em torno da ligação C-6 / C-9, causada pelo maior pKa (maior basicidade) da molécula do MTX, fazendo com que a porção do anel 2,4-diaminopteridina esteja localizada em regiões diferentes, situação que melhora a

ligação do fármaco ao sítio ativo na DHFR (HUENNEKENS, 1994). A Figura 6 apresenta um modelo construído por meio de estudos de difração de raio-X, onde estão representadas as estruturas do MTX (em vermelho) e do ácido fólico (em amarelo) sobrepostas, permitindo a observação da rotação em torno da ligação C-6/C-9 (BLANEY et al., 1984).

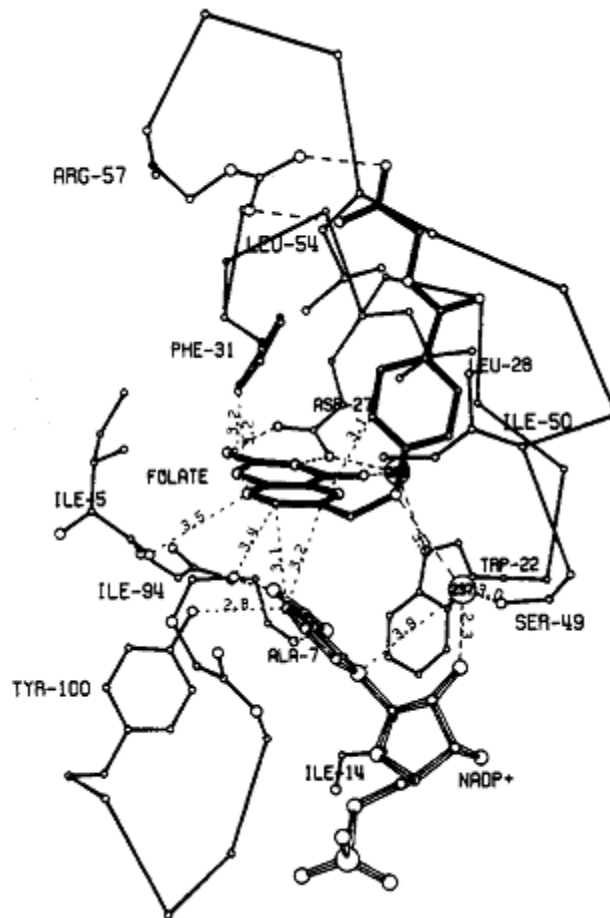
Figura 6. Sobreposição das estruturas do MTX e do ácido fólico no sítio ativo da DHFR



Fonte: Adaptado de BLANEY et al. (1984)

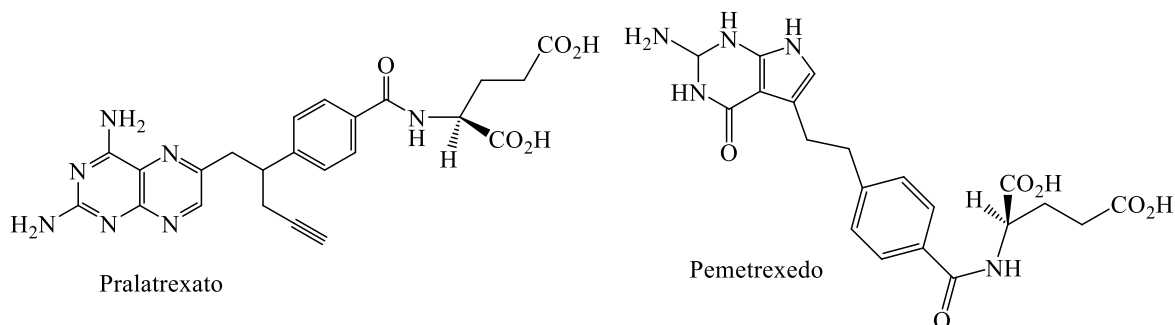
Na Figura 7 está representado um modelo do complexo DHFR-folato-NADPH apresentado por Bystroff, Oatley e Kraut (1990), no qual a região do PABG encontra-se na cavidade hidrofóbica realizando interações com os resíduos de aminoácidos que o cercam: Leu-28, Phe-31, Ile-50, e Leu-54. O grupo α -carboxil do glutamato faz um par iônico e duas ligações de hidrogênio com Arg-57. As interações hidrofóbicas do PABG com o aminoácido fenilalanina da enzima podem contribuir com até 2,5 kcal/mol para a energia de ligação (HUENNEKENS, 1994).

Figura 7.Complexo DHFR-folato-NADPH



Fonte: BYSTROFF; OATLEY; KRAUT (1990)

A molécula de MTX tem sido alvo de modificações na tentativa de desenvolver melhores inibidores de DHFR. Segundo PATRICK (2013), é válida a síntese de análogos do MTX contendo um anel de benzeno ou diferentes anéis heterocíclicos para que seja possível explorar se todos os heteroátomos presentes no protótipo são realmente necessários. Pemetrexedo e Pralatrexato (Figura 8) são análogos existentes que foram aprovados em 2004, para tratamento de mesotelioma e carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP) e, em 2009, para uso no tratamento de linfomas de células T periférico refratário ou que sofreu recidiva, respectivamente.

Figura 8. Estrutura química do pralatrexato e do pemetrexedo

Fonte: Elaborada pela autora

Estudos demonstraram ainda que existem pequenas quantidades de DHFR intracelulares que não são inibidas por bloqueadores e são capazes de produzir timidina suficiente para garantir o crescimento celular. Além disso, há evidências da existência de enzimas com baixa afinidade pelo MTX. Tais fatores justificam a busca por novos antifolatos que se liguem mais fortemente à DHFR (BLANEY et al., 1984).

Os fármacos antineoplásicos são programados levando em conta que as células que mais proliferam, as células cancerosas, serão as mais susceptíveis à sua ação (COLLEONI et al, 2006). Porém, isso nem sempre ocorre e a falta de seletividade culmina com os efeitos adversos. Dentre os efeitos adversos causados pelo MTX, vale ressaltar o grave acometimento do fígado e dos sistemas imune e hematopoiético. Esses sistemas são afetados devido à elevada taxa de replicação celular, levando a efeitos como mielossupressão com neutropenia e trombocitopenia. Há ainda o estresse oxidativo que causa efeitos tóxicos em diversos órgãos e mucosite e diarreia que também são exemplos de efeitos adversos causados pelo MTX (KATZUNG, 2014).

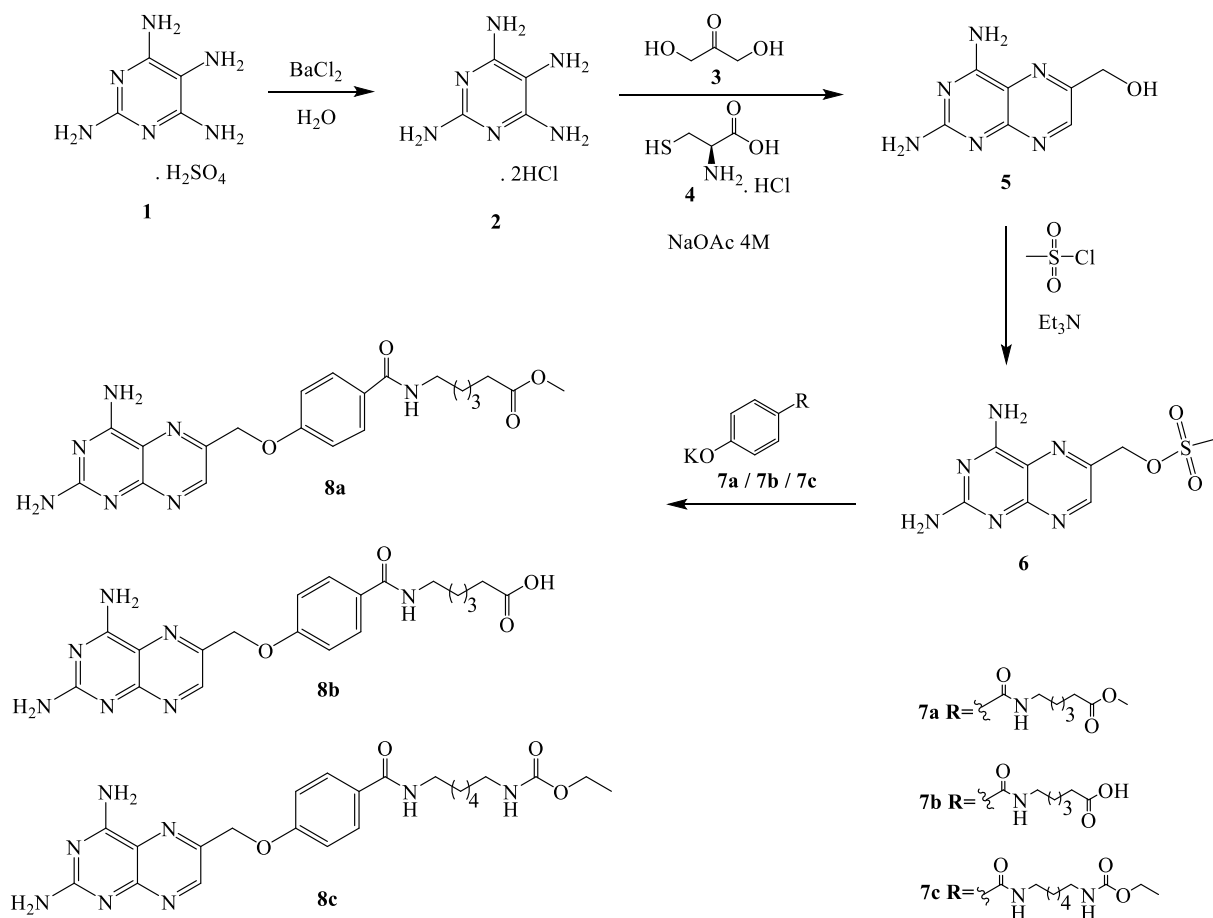
4. METODOLOGIA

A parte prática deste TCC foi desenvolvida no laboratório de Síntese Orgânica e Química Medicinal (LaSOQuiM) do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da UFOP.

O planejamento de novas moléculas, análogas do MTX, foi realizado tomando como base dados da literatura sobre o modo de interação da molécula do MTX no local de ação da enzima DHFR, buscando identificar o grupo farmacofórico que seria mantido na estrutura química das novas moléculas e identificar quais as possíveis modificações estruturais poderiam levar a novos inibidores mais ativos.

Os novos análogos do MTX planejados, com potencial atividade antitumoral, seriam obtidos empregando-se síntese linear conforme apresentado no Esquema 1.

Esquema 1. Rota de síntese dos novos análogos do MTX



Fonte: Elaborado pela autora

Inicialmente, a 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina (**5**) seria sintetizada por meio da reação de condensação do cloridrato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina (**2**) com 1,3-dihidroxiacetona (**3**), comercialmente disponível, na presença de cloridrato de (*L*)-cisteína, em solução aquosa de acetato de sódio (NaOAc) como descrito por Baugh e Shaw (1964). O cloridrato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina (**2**) seria obtido a partir do sulfato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina (**1**), comercialmente disponível, por meio da reação desse sulfato com cloreto de bário (BaCl_2) em meio aquoso. Uma vez obtido a 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina (**5**), seria realizada uma reação para mesilação da hidroxiladesse composto, empregando-se cloreto de mesila e levando à obtenção do composto **6** (FREITAS et al, 2014). Esse composto seria empregado em reações de substituição nucleofílica (FREITAS et al, 2014) com os fenolatos **7a**, **7b** e **7c** dando origem aos produtos **8a**, **8b** e **8c**, respectivamente, novos análogos do MTX.

Os compostos fenólicos, a partir dos quais se poderiam obter os fenolatos **7a**, **7b** e **7c**, foram sintetizados no mesmo laboratório onde a parte prática deste TCC foi desenvolvida, sendo inéditos os compostos fenólicos e seus respectivos fenolatos **7b** e **7c**. Os fenolatos seriam obtidos a partir da reação dos respectivos compostos fenólicos com carbonato de potássio e seriam empregados em síntese de Williamson clássica, envolvendo o composto mesilado (**6**) para obtenção de função éter (FREITAS et al, 2014), resultando nos novos análogos do MTX (**8a**, **8b** e **8c**).

Os intermediários de síntese e os produtos obtidos foram purificados por meio de recristalização e cromatografia em coluna "flash" e caracterizados por cromatografia em camada delgada (CCD), ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas.

Métodos Gerais

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel 60 G Merck sobre lâmina de vidro. A espessura da camada de sílica foi de 0,25 mm. Como revelador, foi utilizado vapor de iodo (eficiente para todos os compostos sintetizados). Os procedimentos de purificação foram por recristalização com solventes adequados ou cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh, E. Merck).

O ponto de fusão foi determinado em capilar de vidro em um aparelho de fase aquecida Büchi B-540 (Departamento de Química, UFOP).

O espectro de infravermelho (IV) foi registrado em aparelho ABB Bomen MB 3000 (FTIR), região de alta frequência (4000 a 400 cm^{-1}), com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras por amostra. A amostra sólida foi dissolvida em diclorometano e analisada por Refletância Total Atenuada (ATR), em cristal de ZnSe (Departamento de Química, UFOP).

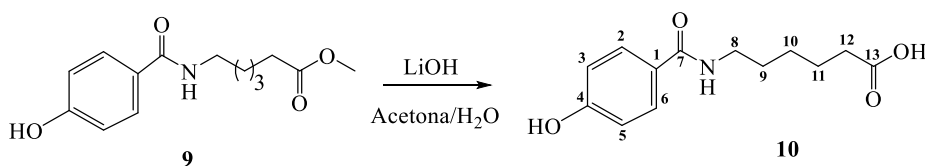
Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrômetro Bruker Avance DPX 200 (Departamento de Química, UFMG) e DRX 400 (Escola de Farmácia, UFOP). Os solventes deuterados utilizados foram dimetilsulfóxido (DMSO- D_6), piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e metanol (CD_3OD). Os valores dos deslocamentos químicos (δ) são apresentados em ppm relativamente aos sinais de ^1H e de ^{13}C dos solventes utilizados do padrão interno tetrametilsilano, e os valores de acoplamento (J) são expressos

em Hz. As multiplicidades estão abreviadas da seguinte forma: singlete (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m). A numeração adotada para os átomos de todos os compostos não corresponde à numeração da nomenclatura IUPAC. Isso foi feito para que compostos com estruturas análogas pudessem ter os seus dados de RMN comparados, quando necessário.

A análise de espectrometria de massas de alta resolução foi realizada no espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF (Shimadzu) - Departamento de Química, UFOP. Foram injetados 5µL de amostra, injeção direta, utilizando fase móvel água e acetonitrila com ácido fórmico 0,1 %, 50:50, com vazão de 0,2 mL/min. Foi utilizado modo SCAN positivo e negativo com faixa m/z de aquisição de ± 50.0000 em relação ao m/z do íon precursor calculado, com tempo de acumulação de 100.00 msec. O software utilizado para cálculo do m/z teórico (função Accurate Mass Calculator) e para o tratamento dos resultados foi o LCMSSolution versão 3.60.361 (Departamento de Química, UFOP).

A seguir serão descritas as reações realizadas. É importante ressaltar que o composto fenólico a partir do qual se poderia obter o fenolato **7a** foi sintetizado por outro aluno de Iniciação Científica (IC) da professora Flaviane, orientadora deste TCC.

4.1.SÍNTESE DO COMPOSTO FENÓLICO (10) A PARTIR DO QUAL O FENOLATO 7B PODERIA SER OBTIDO



Fonte: Elaborado pela autora

Esta reação teve como referência o procedimento descrito por Traoré et al. (2013) para a obtenção de ácidos carboxílicos a partir de ésteres.

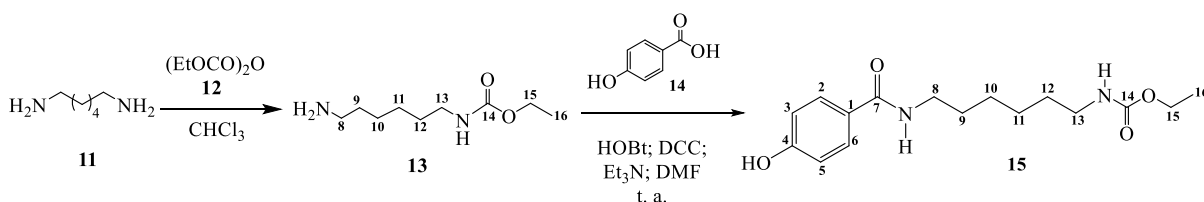
Em um balão de 100 mL contendo o composto **9** (1,88 mmol), adicionou-se acetona (10 mL). À solução obtida, adicionou-se solução de LiOH (9,43 mmol) em água (10 mL). A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética por 24 horas. O fim da reação foi confirmado por placa de CCD - eluente: Hex/AcOEt 3/7, utilizando iodo como revelador. À

mistura reagente adicionou-se ácido fosfórico (H_3PO_4) 5% até pH 3 e água destilada (10 mL). Essa solução foi transferida para um funil de separação e extraída com AcOEt (3x 10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado empregando-se cromatografia “flash” em coluna de sílica - eluente: CH_2Cl_2 / CH_3OH - 95/5, 90/10 e 80/20. O produto **10** foi obtido como um óleo amarelo (1,62 mmol, 86% rendimento) e caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C (espectros em Anexos).

^1H -RMN (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), δ (ppm): 1,44-1,52 (m, 2H, H-10); 1,69-1,81 (m, 4H, H-9 e H-11); 2,46 (t, $J = 8,00$ Hz, 2H, H-12); 3,65 (q, $J = 8,00$ Hz, 2H, H-8); 7,24 (d, $J = 8,00$ Hz, 2H, H-3 e H-5); 8,35 (d, $J = 8,00$ Hz, 2H, H-2 e H-6); 8,84 (t, $J = 6,00$ Hz, 1H, N-H).

^{13}C -RMN (100,64 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), δ (ppm): 25,62 (C-10); 27,36 (C-11); 30,43 (C-9); 35,09 (C-12); 40,38 (C-8); 116,23 (C-3 e C-5); 127,26 (C-1); 130,34 (C-2 e C-6); 162,08 (C-4); 167,90 (C-7); 177,34 (C-13).

4.2.SÍNTESE DO COMPOSTO FENÓLICO (15) A PARTIR DO QUAL O FENOLATO7C PODE SER OBTIDO



Fonte: Elaborado pela autora

Esta síntese baseou-se em trabalhos descritos por Dardonville et al. (2006) e Traoré et al. (2013).

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo uma solução da diamina **11** (20,37 mmol) em clorofórmio (CHCl_3) (26,5 mL), resfriada a 0°C , acoplou-se um funil de adição contendo uma solução de **12** (3,39 mmol) em CHCl_3 (12,1 mL). A adição da solução de **12** foi realizada durante uma hora, gota a gota, enquanto a mistura reagente foi mantida sob agitação magnética e a 0°C . Após o término da adição, a temperatura da mistura reagente foi elevada até a temperatura ambiente e mantida sob vigorosa agitação magnética por 25 horas. O fim da reação foi confirmado por placa de CCD [eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ - 1/1 saturado com amônia (NH_3)], por meio da adição de hidróxido de amônio (NH_4OH),

utilizando iodo como revelador. A mistura reagente foi filtrada para remoção do sólido branco formado e o filtrado obtido foi concentrado sob pressão reduzida. Obteve-se um óleo que foi dissolvido em AcOEt (40 mL). Essa solução foi transferida para um funil de separação e lavada com solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) saturada (3 x 15 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado empregando-se cromatografia “flash” em coluna de sílica - eluente: CH₂Cl₂/CH₃OH - 100/0 e 99,8/0,2, saturados com NH₃ (5 mL de NH₄OH). A eliminação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu o produto **13** como um óleo incolor (2,41 mmol, 56% de rendimento). Esse produto foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C (espectros em Anexos).

¹H-RMN (200 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 1,18 (t, *J* = 7,00 Hz, 3H, H-16); 1,33-1,53 (m, 8H, H-9, H-10, H-11 e H-12); 2,73 (t, *J* = 6,00 Hz, 2H, H-8); 3,01-3,08 (m, 2H, H-13); 3,25-3,28 (m, 1H, N-H); 4,01 (q, *J* = 7,33 Hz, 2H, H-15).

¹³C-RMN (50,32 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 15,02; 27,43; 30,82 (C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-16); 41,52 (C-8); 61,57 (C-15); 159,21 (C-14).

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados o ácido carboxílico **14** (1,39 mmol), a amina monoacilada **13** (1,39 mmol) e dimetilformamida-DMF (6 mL). Após completa solubilização, resfriou-se a solução obtida a 0°C e então foram adicionados 1-hidroxibenzotriazol - HOBt (1,66 mmol), diciclohexilcarbodiimida - DCC (1,66 mmol) e trietilamina - Et₃N (1,66 mmol). Essa mistura reagente foi mantida sob agitação magnética e a 0° C durante uma hora e, após, à temperatura ambiente por 18 horas. O término da reação foi confirmado por CCD (eluente: CH₂Cl₂/CH₃OH - 95/5), utilizando iodo como revelador. O solvente da reação foi removido sob pressão reduzida e o bruto da reação foi dissolvido em AcOEt (30 mL). A fase orgânica obtida foi lavada com solução aquosa de ácido cítrico a 10% (30 mL), solução aquosa de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 4% (25mL) e solução aquosa de NaCl saturada (25 mL). Então, a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado empregando-se cromatografia “flash” em coluna de sílica - eluente: CH₂Cl₂/CH₃OH - 99/1, 98/2, 97,5/2,5. A amida (**15**), obtida como um sólido branco e rendimento de 74% (1,78 mmol), foi caracterizada por espectroscopia de IV e de RMN de ¹H e de ¹³C, e espectrometria de massas (espectros em Anexos).

CCD (CH₂Cl₂:CH₃OH, 95:5) R_f = 0,76, PF: 75,1-75,9 °C.

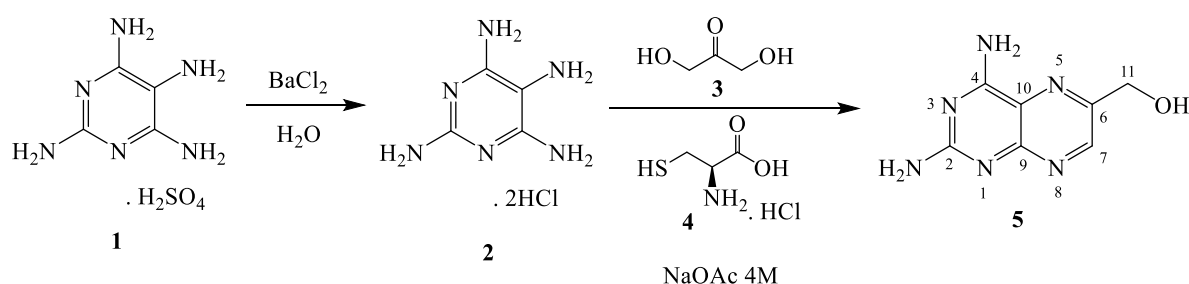
HRMS (ESI-TOF) m/z calculado para $C_{16}H_{25}N_2O_4^+$ $[(M+H)^+]$ 309,1809, observado 309,1792.

1H -RMN (400 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1,23 (t, $J = 8,00$ Hz, 3H, H-16); 1,36-1,44 (m, 4H, H-10 e H-11); 1,48-1,55 (m, 2H, H-12); 1,59-1,64 (m, 2H, H-9); 3,10 (t, $J = 8,00$ Hz, 2H, H-8); 3,33-3,38 (m, 3H, H-13); 4,04-4,09 (m, 2H, H-15); 6,84 (d, $J = 8,00$ Hz, 2H, H-3 e H-5); 7,71 (d, $J = 8,00$ Hz, 2H, H-2 e H-6).

^{13}C -RMN (100,64 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 15,00; 27,47; 27,69; 30,50; 30,84 (C-9, C-10, C-11, C-12, C-16); 40,81 (C-8); 41,56 (C-13); 61,57 (C-15); 116,04 (C-3 e C-5); 126,67 (C-1); 130,15 (C-2 e C-6); 159,22 (C-14); 161,88 (C-4); 170,04 (C-7).

$IV_{V_{max}}$ (attenuated total reflection), cm^{-1} : 3389 (O-H); 3293 (N-H); 3100 (C-H aromático); 2939 (C-H alcano); 1696 (C=O carbamato); 1632 (C=O amida); 1605, 1537, 1503 (C=C ar); 1346 (δ CH_3); 1264 (C-O éter); 1149 (C-O carbamato); 1043 (C-O éter); 842 (δ C-H benzeno ρ -substituído); 767 (δ CH_2).

4.3. SÍNTESE DA 2,4-DIAMINO-6-(HIDRÓXIMETIL)-PTERIDINA (5) (BAUGH E SHAW, 1964)



Fonte: Elaborado pela autora

Em um erlenmeyer de 25 mL adicionou-se o sulfato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina **1** (2,28 mmol) e H_2O destilada (12 mL). A essa mistura adicionou-se $BaCl_2$ monohidratado (2,28 mmol) previamente dissolvido em H_2O destilada (6 mL). A mistura reagente obtida foi aquecida em banho-maria, em ebulição, por 10 minutos. Resfriou-se o sistema e observou-se um precipitado branco (sulfato de bário, $BaSO_4$). Filtrou-se a suspensão e lavou-se o precipitado com H_2O destilada (6 mL). Completou-se o volume do filtrado para 45 mL com H_2O destilada. Em um balão de 250 mL adicionou-se solução aquosa de $NaOAc$ 4 mol/L (15 mL) e dihidroxiacetona **3** (6,84 mmol). Homogeneizou-se a solução obtida sob agitação magnética. Adicionou-se cloridrato de (L)-cisteínamonohidratada **4** (2,28 mmol) e, após, o filtrado obtido inicialmente contendo o cloridrato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina **2**. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura

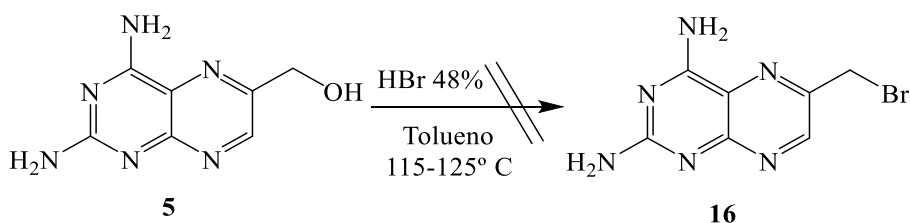
ambiente por 24 horas. Após, transferiu-se a mistura reagente para um erlenmeyer de 125 mL. A mistura reagente possuía cor amarela. Cobriu-se o erlenmeyer com papel alumínio e deixou-se na geladeira por cinco dias. O precipitado de cor laranja formado foi coletado por filtração a vácuo e lavado com H₂O destilada fria.

O precipitado foi suspenso em 10 mL de H₂O destilada em um erlenmeyer e aqueceu-se até ebulição. Adicionou-se hidróxido de sódio (1 mol/L) para solubilização completa do precipitado. Adicionou-se carvão ativado (0,15 g) e realizou-se a filtração a vácuo e a quente. Após, deixou-se a temperatura do filtrado retornar a temperatura ambiente e adicionou-se ácido clorídrico (1 mol/L) para que a solução atingisse pH 6. A solução foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL, que foi coberto com papel alumínio e deixado na geladeira. Após 24 horas foi observada a formação de um precipitado marrom que foi filtrado a vácuo. Depois de filtrado, o precipitado foi lavado com água gelada, éter etílico e solução éter etílico - etanol (1:1). O precipitado foi então transferido para um balão de fundo redondo de 15 mL e seco sob pressão reduzida. O produto foi obtido como um sólido marrom (0,41 mmol, 18% de rendimento) e foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C.

¹H-RMN (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 4,56 (d, *J* = 4,00 Hz, 2H, H-11), 5,42 (t, *J* = 4,00 Hz, 1H, O-H), 6,54 (s, 2H, NH₂), 7,55 (s, 2H, NH₂), 8,68 (s, 1H, H-7).

¹³C-RMN (100,64 MHz, DMSO), δ (ppm): 62,58 (C-11); 120,77; 148,62; 149,21; 155,28; 162,86; 162,92 (C-2, C-4, C-6, C-7, C-9 e C-10).

4.4. TENTATIVA DE SÍNTESE DA 2,4-DIAMINO-6-(BROMOMETIL)-PTERIDINA (16)



Fonte: Elaborado pela autora

Esta reação teve como referência o procedimento descrito por Hilário et al. (2011) para a obtenção de brometo de alquila a partir de álcool.

A um balão contendo o composto **5** (0,26 mmol) e tolueno 10 mL (mistura heterogênea), conectado a um extrator de água (aparelho de Dean-Stark) e a um condensador de refluxo, foi adicionado solução aquosa de ácido bromídrico 48% (2 mL, 17,32 mmol). A mistura obtida foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 24 horas. O solvente da reação foi removido sob pressão reduzida. O produto desejado **16** não foi obtido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

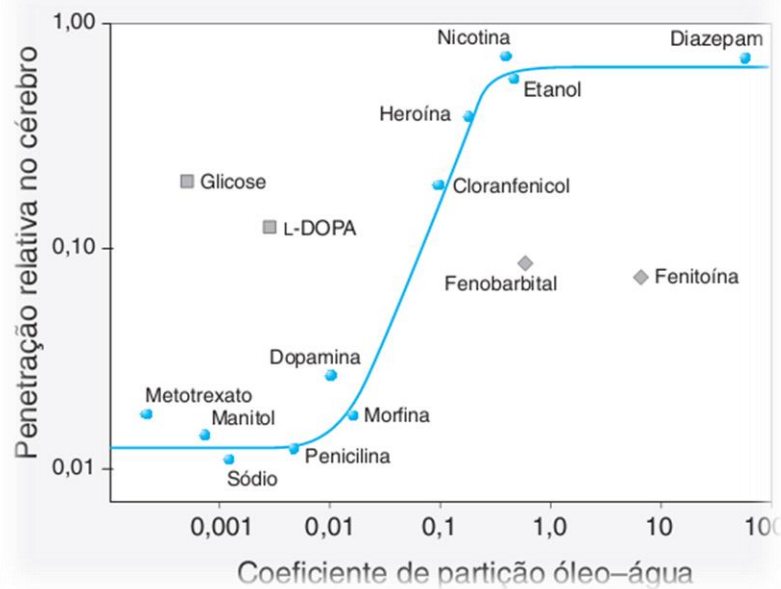
5.1. PLANEJAMENTO RACIONAL DOS NOVOS ANÁLOGOS DO MTX

De acordo com Barreiro e Fraga (2008), a melhora de atividade de moléculas bioativas por meio de modificação molecular necessita, previamente, de uma hierarquização das contribuições farmacofóricas dos diferentes grupos funcionais presentes na estrutura química da molécula protótipo, definindo o(s) grupamento(s) farmacofórico(s) (GF) e auxofórico(s) (GA), de maneira a preservá-los, assegurando assim o seu reconhecimento molecular pelo biorreceptor. Nesse contexto, sabendo-se que o grupo farmacofórico do MTX é o anel 2,4-diaminopteridina, que interage no sítio ativo da DHFR, concluiu-se que essa região deveria ser mantida na estrutura química dos novos análogos do MTX (Figura 10) (PATRICK, 2013).

Blaney et al (1984) afirmaram que atenção especial pode ser voltada para modificações na região da ponte entre o anel 2,4-diaminopteridina e o grupo fenil (C9-N10, Figura 2, página 32), a fim de melhorar o transporte das moléculas até o local de ação. Na literatura há o relato de algumas modificações que já foram realizadas na ponte, envolvendo a utilização de grupos substituintes como: S, CH₂, CH₂CH₂, CH₂S, CH₂O, CH=CH, CH₂N(CH₃), CH₂N(C₂H₅), CH₂N(CHO), CH₂N-(C₄H₉), CH₂N(C₆H₅), CH₂N(SO₂C₆H₄-4'-CH₃), CH₂N-(C₃H₇), CH₂N(CH₂C₆H₅), CH₂CH₂NH, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, CH₂NHCH₂, CH₂NHNH e CH=NNH em substituição ao grupo CH₂N presente na estrutura do MTX (Figura 2, página 32) (BLANEY et al., 1984). Alterações no comprimento da ponte demonstraram resultados no que diz respeito ao aumento ou diminuição da atividade inibitória da enzima DHFR: quando há o alongamento da ponte, observa-se uma diminuição da atividade de inibição da DHFR e do transporte da molécula ativa até o local de ação, resultando em uma redução da atividade inibitória. Em contrapartida, quando o comprimento da ponte não é alterado, o efeito inibitório do análogo não é modificado significativamente, porém, percebe-se um melhoramento do transporte da molécula ativa até o local de ação. Neste trabalho, portanto, foi proposto manter o tamanho da ponte dos novos análogos, substituindo-se CH₂N por CH₂O (Figura 10).

Outra parte da molécula do MTX que poderia ser alvo de alterações moleculares é a que correspondente ao ácido glutâmico (Figura 2, página 32). Blaney et al (1984) afirmaram que essa região pode ser explorada no sentido de melhorar a ligação da molécula a proteínas plasmáticas, tornando-a mais lipofílica, para que a mesma possa ser direcionada até as células tumorais resistentes e, assim, ser liberada por hidrólise. Nos estudos de Skibińska et al. (1990) foi demonstrado que a porcentagem de ligação do MTX a proteínas plasmáticas foi $50,4\% \pm 1,9$ em indivíduos saudáveis e em pacientes com câncer (no estudo, majoritariamente câncer de mama), esse valor decresceu para $32,3\% \pm 3,6$. Com isso percebe-se que o MTX encontra-se parcialmente ligado às proteínas plasmáticas podendo ser facilmente deslocado por outras estruturas que apresentam maior afinidade por essas proteínas. A baixa taxa de ligação a proteínas plasmáticas do MTX pode estar associada à sua baixa lipofilicidade. Na Figura 9 há a associação do coeficiente de partição óleo-água de várias substâncias com a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e penetrar no cérebro. Nota-se que o MTX possui baixo coeficiente de partição, comprovando a sua baixa lipofilicidade.

Figura 9. Coeficiente de partição óleo-água correlacionado à capacidade de penetração no cérebro

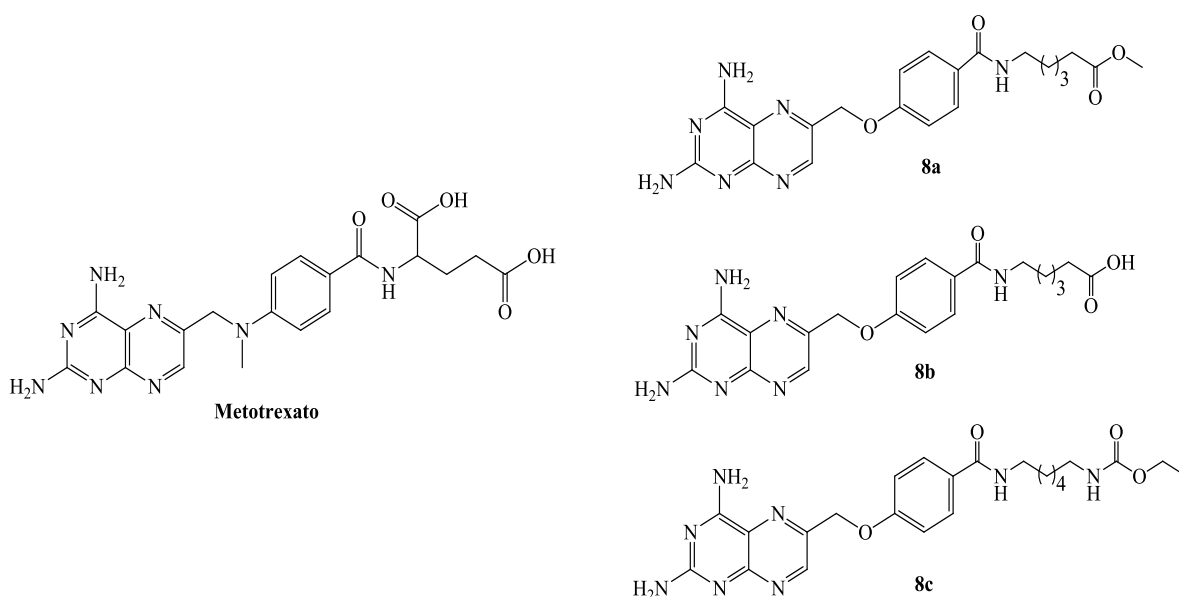


Fonte: GALANTER; LOWENSTEIN(2009)

Zhivkova (2015) afirmou que a ligação a proteínas plasmáticas facilita o transporte de fármacos, principalmente aqueles que são altamente lipossolúveis. Nesse contexto, neste trabalho foi proposta uma modificação na porção do ácido glutâmico da molécula do MTX (Figura 2, página 32), aumentando a cadeia carbônica e retirando o grupo funcional α -

carboxil, objetivando o aumento da lipofilicidade dos novos análogos em relação ao MTX (Figura 10). Como já mencionado anteriormente, o grupo α -carboxil realiza interações com a Arg-57 da enzima, no entanto, como há outras interações envolvidas, acredita-se que a retirada deste grupo não irá comprometer a interação enzima-inibidor. Com o aumento da lipofilicidade espera-se o aumento da ligação às proteínas plasmáticas, o aumento do transporte para os locais de ação e, por fim, aumento da atividade inibitória da DHFR.

Figura 10. Novos análogos do MTX planejados



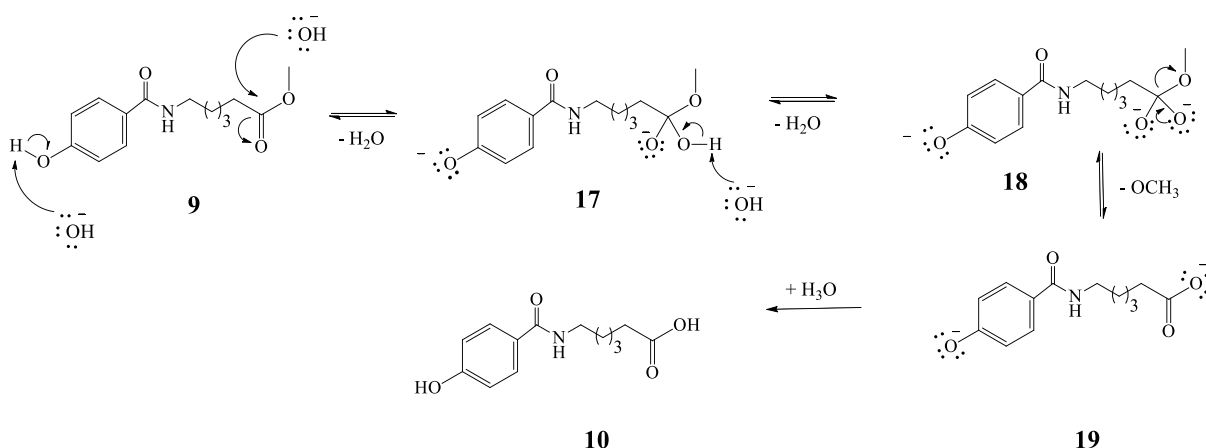
Fonte: Elaborada pela autora

5.2. REAÇÕES REALIZADAS PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (10 E 15) A PARTIR DOS QUAIS SERIA POSSÍVEL OBTER OS FENOLATOS 7B E 7C

A reação descrita no item 4.1 tratou-se de uma hidrólise básica do grupo éster do composto **9**, sendo que esse composto de partida foi obtido anteriormente por outro aluno de iniciação científica do laboratório. O fundamento da reação se baseou no fato de que ésteres são estruturas relativamente polares, podendo ser hidrolisados quando em condições básicas. Para a síntese do ácido carboxílico **10**, o grupo éster de **9** foi convertido ao seu respectivo carboxilato devido ao ataque nucleofílico da hidroxila, advinda do LiOH, à carbonila do éster (Esquema 2). Para a conversão do carboxilato obtido a ácido carboxílico, durante a elaboração da reação, acidificou-se o meio reagente utilizando H_3PO_4 5% tornando possível o isolamento

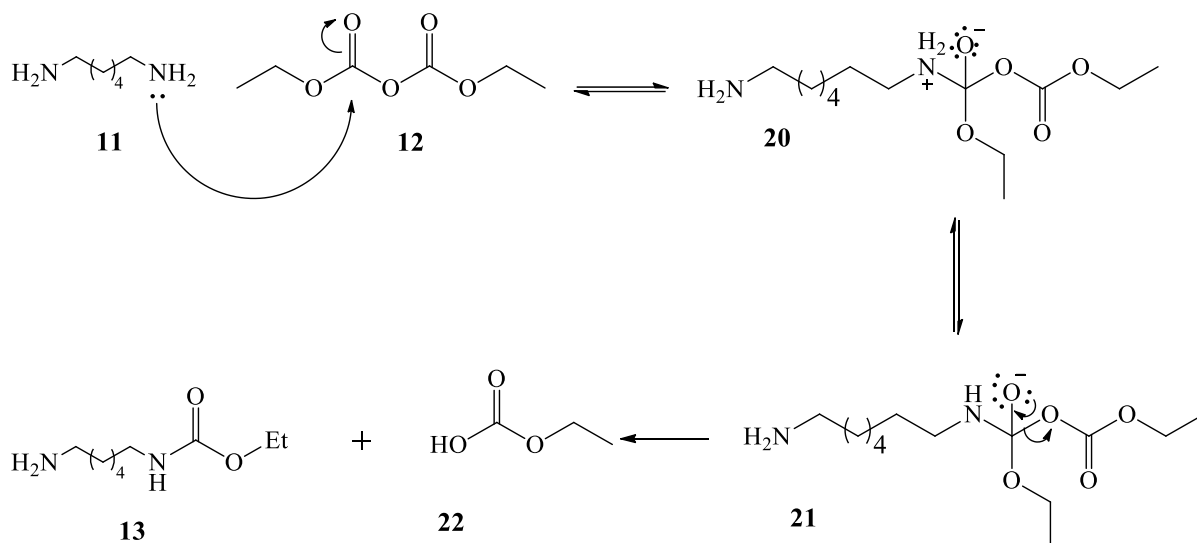
do produto na etapa de elaboração. A reação forneceu o produto como um óleo amarelo e em bom rendimento (86%). Os fenolatos (**7ae 7b**, página 39), que poderiam ser obtidos a partir dos compostos **9** e **10** respectivamente, seriam empregados para a síntese dos novos análogos **8a** e **8b** respectivamente.

Esquema 2. Mecanismo da reação de formação do composto fenólico **10**



Fonte: Elaborado pela autora

As etapas de síntese descritas no item 4.2 envolveram duas reações para a síntese do composto **15**, que seria empregado para a síntese do fenolato **7c**, envolvido na obtenção do novo análogo **8c**. A primeira reação (Esquema 3) referiu-se à monoproteção da diamina **11** com dicarbonato de dietila **12** para formação do carbamato intermediário **13** (DARDONVILLE et al., 2006). Durante essa reação, uma reação de adição-eliminação à carbonila do dicarbonato, utilizou-se excesso da diamina **11** e adicionou-se o dicarbonato de dietila **12** lentamente à solução da diamina a fim de evitar a proteção dos dois grupos aminos presentes na diamina e, assim, favorecer a monoacilação. A reação forneceu o carbamato **13** como um óleo incolor em rendimento de 56%.

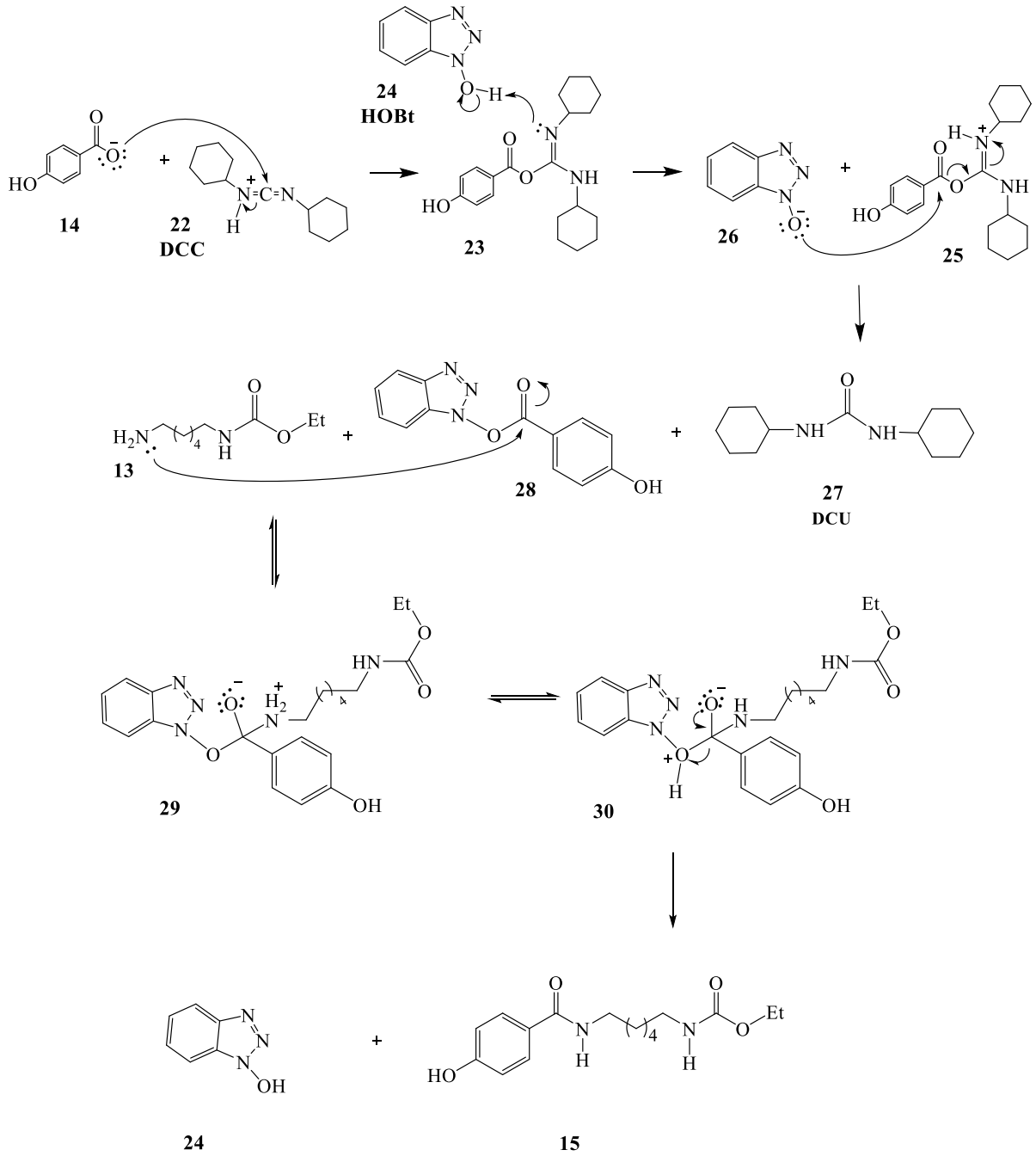
Esquema 3. Mecanismo da reação de formação do carbamato 13

Fonte: Elaborado pela autora

Para a obtenção do composto **15** realizou-se uma reação de acoplamento entre o ácido carboxílico **14** e o grupo amino terminal presente no carbamato intermediário **13**. A conversão direta de ácidos carboxílicos a amidas não é possível, pois as aminas são básicas e tendem a converter os ácidos carboxílicos nos seus respectivos sais de carboxilatos, compostos não reativos. Assim, para promover a conversão de ácidos carboxílicos a amidas é necessário utilizar reagentes de acoplamento como o DCC e HOBt (TRAORÉ et al., 2013).

Nessa reação (Esquema 4), a carbonila foi ativada pelo HOBt sendo essa ativação mediada pelo DCC. O grupo hidroxila do ácido carboxílico **14** foi transformado em um bom grupo abandonador, tornando a carbonila susceptível ao ataque nucleofílico do grupo amino terminal do intermediário **13**, resultando no composto **15**. A Et_3N foi utilizada para a manutenção de um pH básico, a fim de impedir a conversão do grupo amino terminal **13** em seu sal não reativo. Nessa reação, obteve-se a dicicloexiluréia (DCU), um derivado de uréia, como subproduto que foi retirado do meio reagente durante a etapa de elaboração da reação por meio da adição de ácido cítrico 10% (D'OCA, 2010). A reação forneceu a amida **15** como um sólido branco e rendimento de 74%.

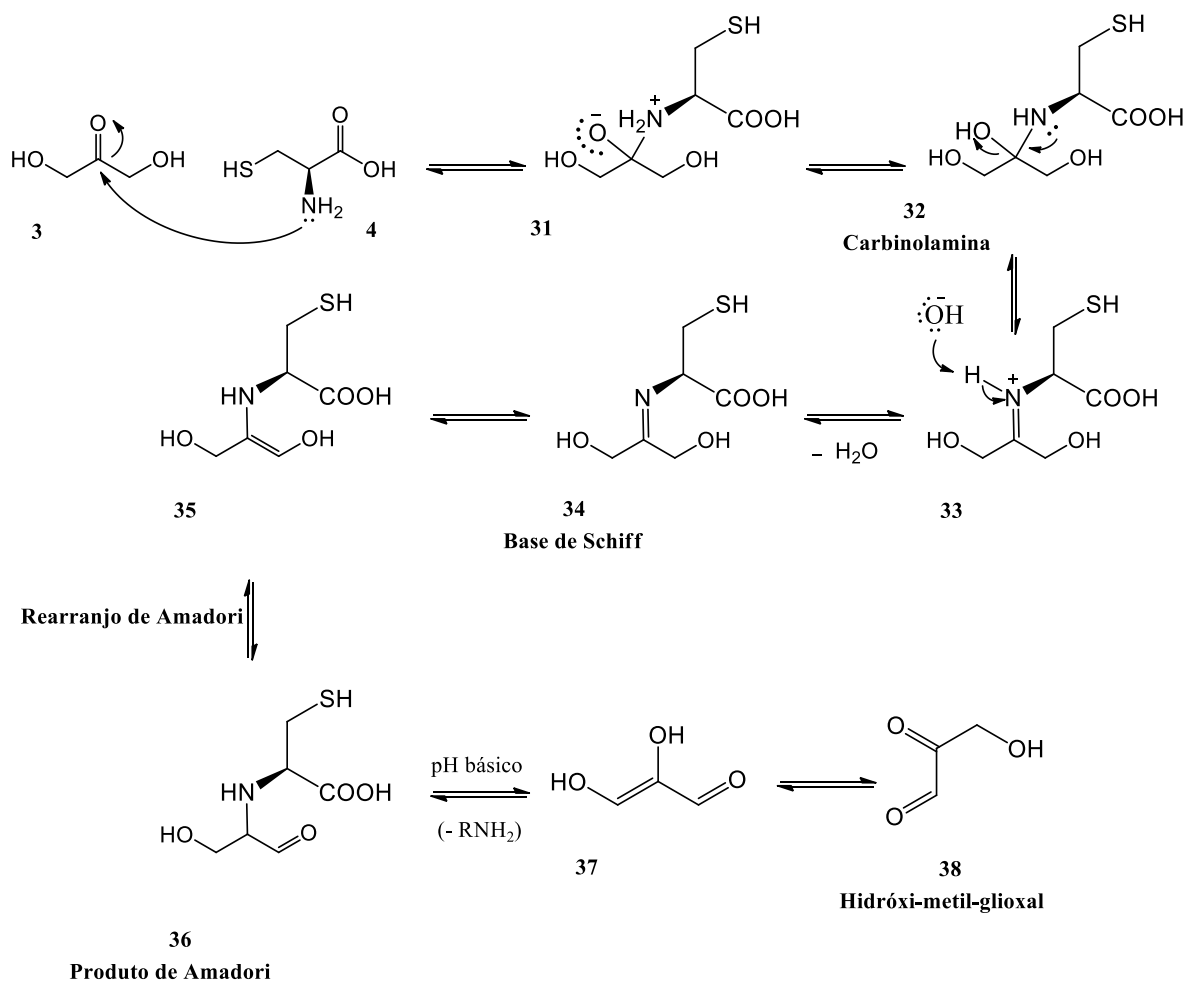
Esquema 4. Mecanismo da reação de formação do composto fenólico 15



Fonte: Elaborado pela autora

5.3.REAÇÕES REALIZADAS PARA A OBTENÇÃO DA 2,4-DIAMINO-6-(HIDRÓXIMETIL)-PTERIDINA (5)

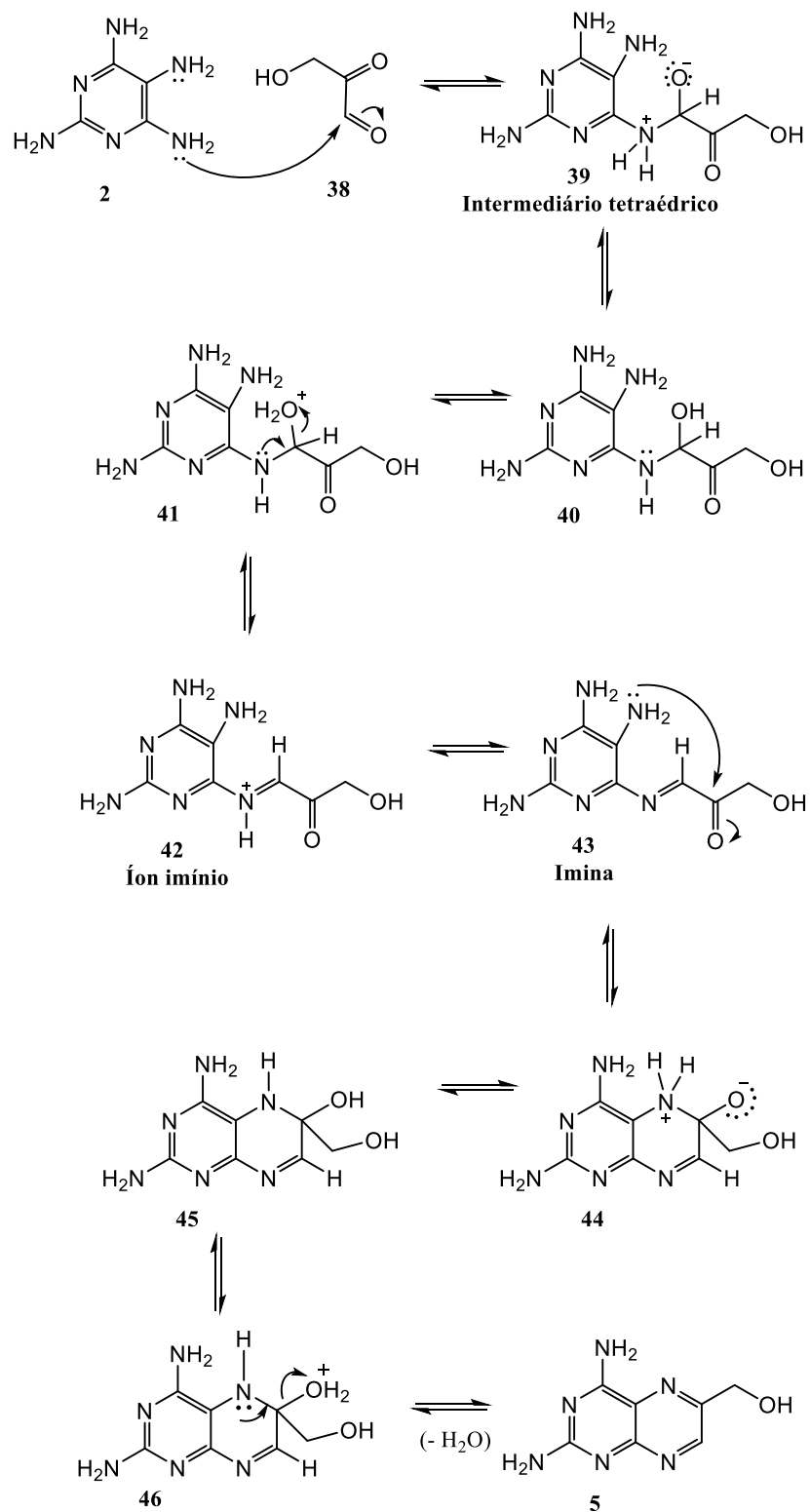
No item 4.3 estão descritas as etapas de síntese da 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina (**5**), a partir de uma reação de condensação entre o cloridrato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina (**2**) e a dihidroxiacetona (**3**) conforme descrito no trabalho de Baugh e Shaw (1964). Nxumalo e Dinsmore (2012) afirmaram que um dos métodos para a obtenção de antifolatos seria a condensação de anéis de pirimidinas com um glioxal, uma estrutura intermediária originada a partir da dihidroxiacetona, formando o correspondente anel pteridina substituído no carbono 6. Este intermediário pode ser formado por meio da reação de Maillard, uma série de reações paralelas que envolvem a condensação de agentes carbonílicos como, por exemplo, intermediários da via glicolítica (dihidroxiacetona), e grupos amino de aminoácidos (cisteína) (BARBOSA et al. 2016). O mecanismo proposto para a formação do hidróxi-metil-glioxal está representado no Esquema 5. Esse mecanismo ainda necessita ser mais bem compreendido, porém sabe-se que o primeiro passo da reação é a condensação do grupamento amino da cisteína com a carbonila da dihidroxiacetona, produzindo uma carbinolamina que, a seguir, desidrata formando um grupo funcional denominado imina, podendo também ser denominada de base de Schiff. A partir de então, a base de Schiff sofre um rearranjo, denominado Rearranjo de Amadori, gerando o composto **36**. Como a reação ocorre em pH básico, ocorrerá novamente um rearranjo na molécula, fornecendo o respectivo glioxal **38** (BARBOSA et al. 2016).

Esquema 5. Mecanismo proposto para a formação do glioxal.

Fonte: Elaborada pela autora

Uma vez formado o intermediário glioxal, ocorre a reação de condensação com o cloridrato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina, conforme o Esquema 6. Nesta reação, ocorre adição e eliminação às carbonilas de aldeído e de cetona do intermediário hidróxi-metil-glioxal (38), envolvendo os grupos amino que estão nas posições 5 e 6 do anel 2,4,5,6-tetraminopirimidina (2). As cetonas e aldeídos são estruturas capazes de reagir com um grupo amino primário, formando uma base de Schiff. A reação se inicia pelo ataque do amino ao carbono carbonílico do aldeído, formando um intermediário tetraédrico. Após o primeiro intermediário neutro ser formado, a mesma reação ocorrerá novamente, desta vez na carbonila da cetona, formando a 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina (5) (BRUICE, 2006).

Esquema 6. Mecanismo proposto para a reação de formação do composto 5

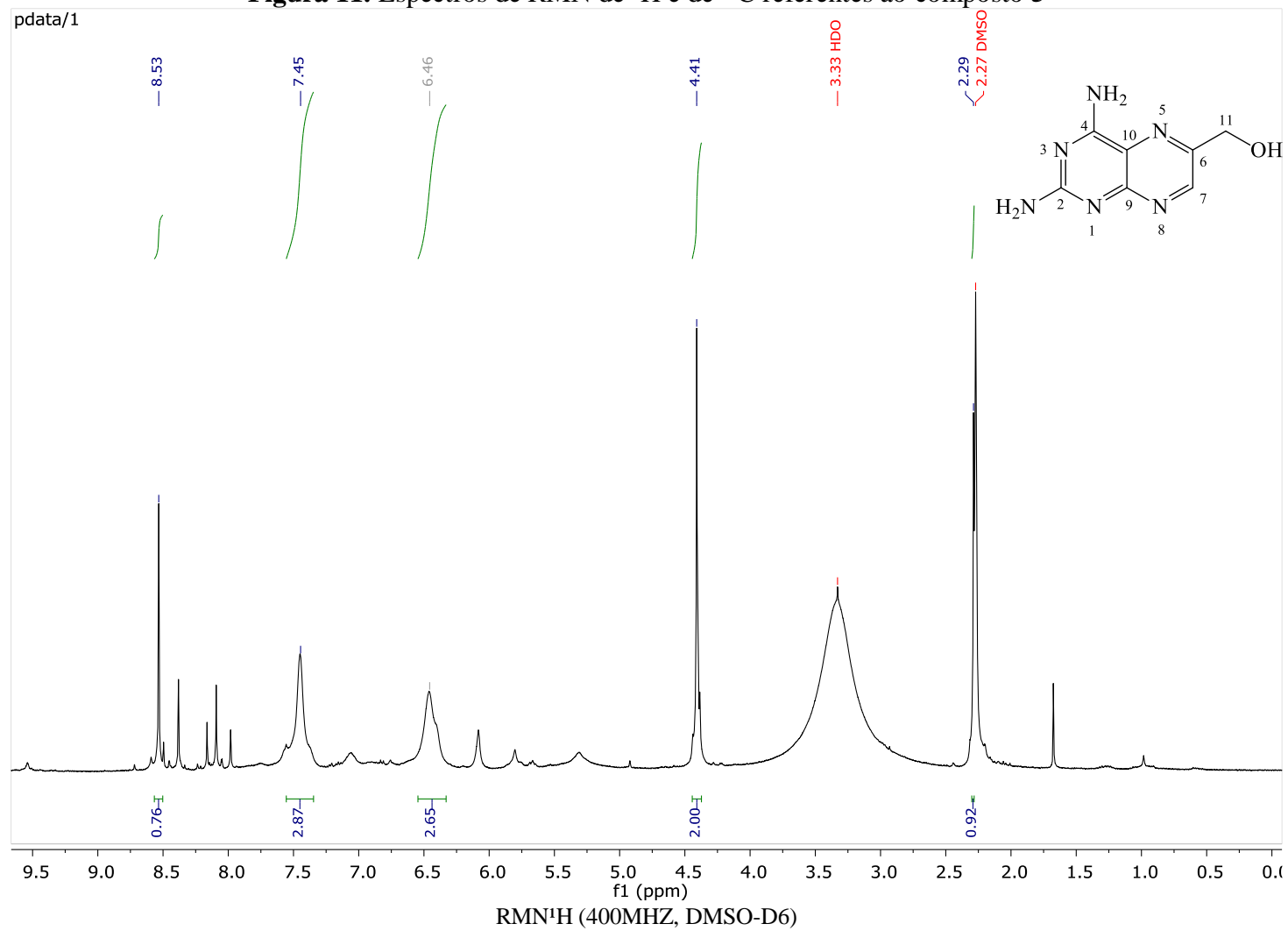


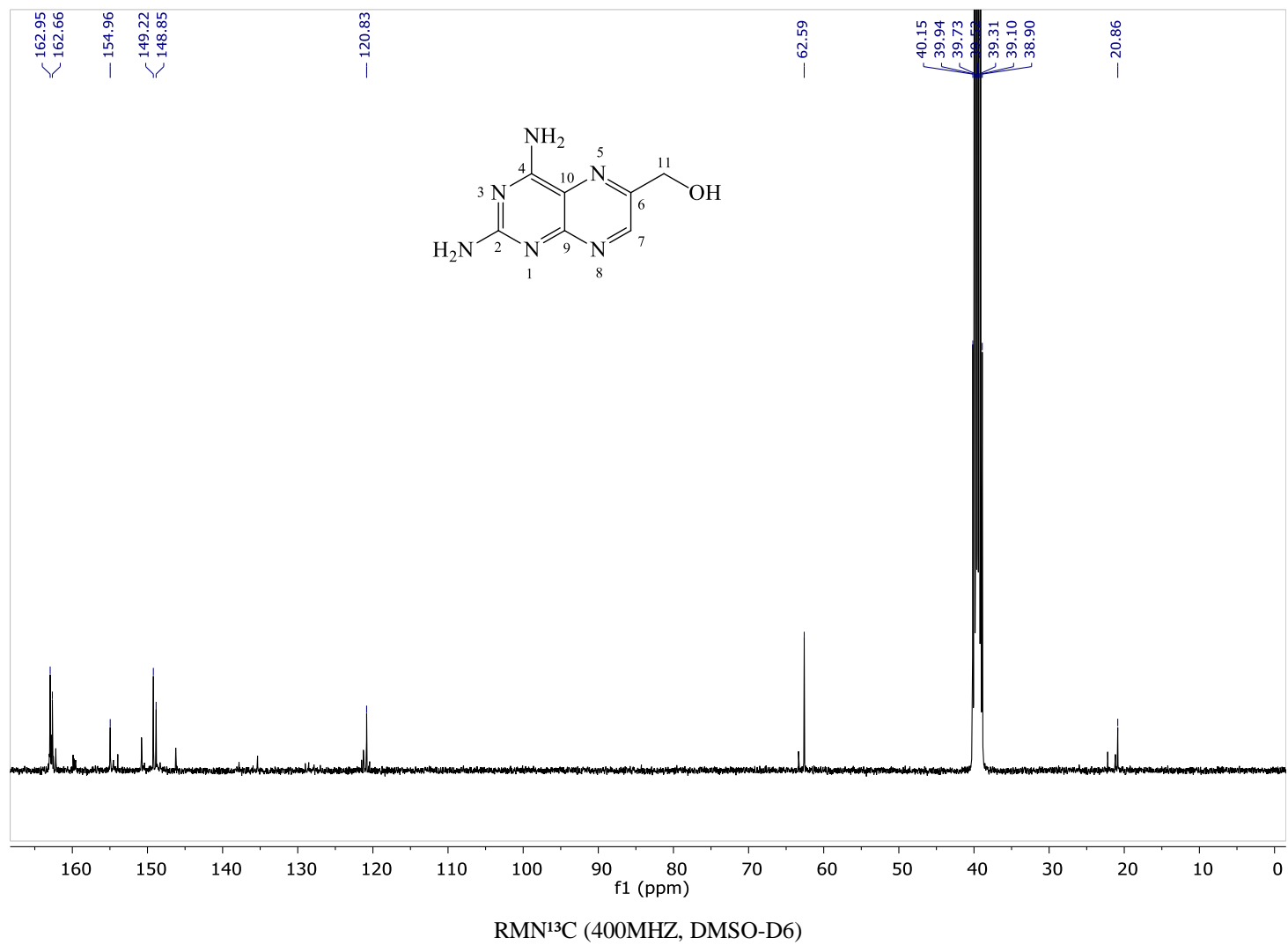
Fonte: Elaborado pela autora

Após três tentativas de realização da reação descrita no item 4.3 (Esquemas 5 e 6), o maior rendimento obtido foi de 18%, resultando em um produto sólido marrom. A obtenção do composto **5** foi confirmada por meio dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 11), porém, os mesmos revelaram que esse composto estava impuro.

No espectro de RMN de ^1H pode-se observar um duplete referente aos H11 com deslocamento químico em 4,41ppm. Dois singletos com deslocamentos em 6,46 e 7,45ppm referentes aos hidrogênios dos grupos amino. E finalmente o singlete com deslocamento químico em 8,53 ppm, referente ao H7. Neste espectro não foi possível observar sinal correspondente ao hidrogênio do grupo hidroxila. Nota-se ainda um singlete, com deslocamento químico de 2,29 ppm que pode representar um possível subproduto contaminante, o grupo metil de 6 e/ou 7-metil-pteridina.

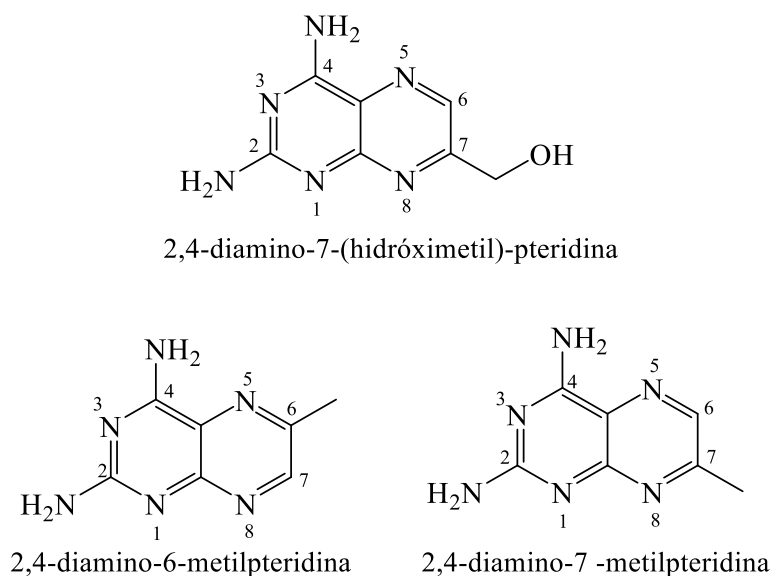
Na caracterização por RMN de ^{13}C do composto **5** (Figura 11) pode-se atribuir os sinais referentes ao C11 no deslocamento químico igual a 62,59 ppm. Os demais sinais com deslocamentos químicos dentro da faixa de 120 a 165 ppm são referentes aos seis carbonos aromáticos: C2, C4, C6, C7,C9 e C10, com deslocamentos de 162,95; 162,66; 154,96; 149,22; 148,55 e 120,83 ppm, respectivamente. Há um sinal com deslocamento igual a 20,86 referente a um CH_3 , podendo tratar do mesmo contaminante citado anteriormente para o espectro de RMN de ^1H .

Figura 11. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes ao composto **5**



O baixo rendimento de produto impuro formado nesta reação pode ser explicado devido a uma falta de controle da regioseletividade de condensação, levando à formação de produtos 6 e 7 substituídos. De acordo com Piper e Montgomery (1977), além da formação do produto desejado (2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina), nesta reação também podem ser formados 2,4-diamino-7-(hidróximetil)-pteridina, 2,4-diamino-6-metilpteridina e 2,4-diamino-7-metilpteridina (Figura 12). Acredita-se que os isômeros metil substituídos (metilpteridinas) são os responsáveis pelos sinais de grupos metil presentes nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentados anteriormente.

Figura 12. Subprodutos possíveis para a reação de condensação da 2,4,5,6-tetraminopirimidina com dihidroxiacetona

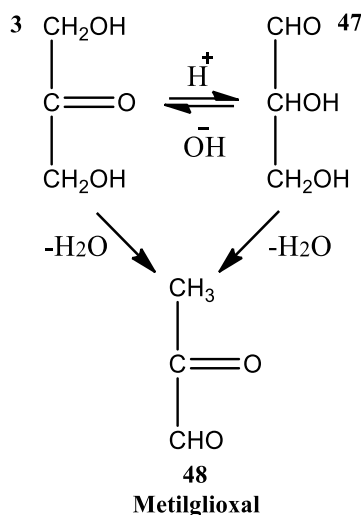


Fonte: Elaborada pela autora

Baugh e Shaw (1964) e outros autores discutiram alguns fatores que podem influenciar na formação desses subprodutos. Um fator trata-se do controle do pH da reação. Baugh e Shaw (1964) discutiram sobre um equilíbrio químico existente entre dihidroxiacetona (**3**) e gliceraldeído (**47**) (Figura 13). Em pH ácido, esse equilíbrio está deslocado para maior conversão à forma gliceraldeído, e em pH básico o equilíbrio está deslocado para a forma dihidroxiacetona. O pH ácido favorece a formação do intermediário metilgloxal (**48**) por meio de uma desidratação, em ambos os isômeros, o que resulta na formação dos subprodutos 2,4-diamino-6-metilpteridina e 2,4-diamino-7-metilpteridina durante a reação. Por outro lado, condições básicas não favorecem a formação do

intermediário metilglioxal, porém, a tetraaminopirimidina (material de partida **1e 2**) é instável nessas condições.

Figura 13. Equilíbrio dihidroxiacetona/ gliceraldeído



Fonte: Adaptado de BAUGH E SHAW(1964)

Outro fator a ser observado a fim de evitar a formação de subproduto é a ausência de ânions divalentes no meio reagente, pois esses favorecem a isomerização inadequada, resultando na formação do subproduto 2,4-diamino-7-(hidróximetil)-pteridina (Figura 12) (PIPER e MONTGOMERY, 1977; ELLARD, 1978). Na primeira etapa da reação demonstrada no Esquema 1 (página 41), ocorreu a troca do contra-íon sulfato (SO_4^{2-}) pelo cloreto (Cl), para obtenção do cloridrato de 2,4,5,6-tetraminopirimidina **2**, empregando-se BaCl_2 como reagente, em meio aquoso, formando sulfato de bário (BaSO_4), um sólido branco, que é insolúvel em meio aquoso e precipita, sendo retirado do meio reagente por filtração. A retirada do íon sulfato, um ânion divalente, é importante para evitar a formação do possível subproduto 2,4-diamino-7-(hidróximetil)-pteridina, na etapa seguinte da síntese. Durante as tentativas de síntese do produto desejado (2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina) realizadas neste trabalho, observou-se que o filtrado obtido possuía um aspecto turvo, indicando que não foi removido todo o BaSO_4 do meio reagente, o que pode ter implicado na formação do subproduto citado.

Além dos íons divalentes, outro fator importante a ser observado, a fim de evitar a formação de subprodutos, que foi discutido por Ellard (1978) e Piper e Montgomery (1977) é a eliminação do tampão acetato para a melhoria do rendimento da reação, pois a isomerização

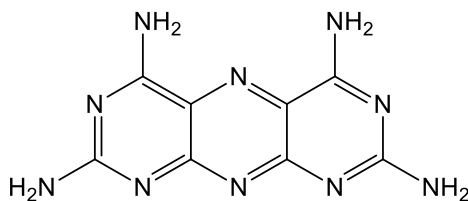
para a formação de subprodutos é catalisada pela presença de íon acetato. Segundo estes autores, a eliminação do tampão é indispensável para se atingir um bom rendimento da reação.

Ellard (1978) discutiu ainda que, na reação realizada por Baugh e Shaw (1964), não houve o controle do pH. Foi detectado por este mesmo autor que o isômero 2,4-diamino-7-(hidróximetil)-pteridina é favorecido em pH mais alto e o subproduto 2,4-diamino-6-metilpteridina é favorecido em pH mais baixo.

Em novas tentativas de obtenção do 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina, no presente trabalho, foi observado que o pH da solução obtida, após a remoção do sulfato de bário por filtração, estava em torno de 1, sendo, portanto, necessária uma correção do pH utilizando-se, por exemplo, solução aquosa de NaOH. Desta forma, verifica-se que o pH é fator crítico na reação. Ellard (1976 e 1981) realizou dois trabalhos nos quais definiu dois valores de pH adequados para a realização dessa reação. No primeiro trabalho (1976) foi estabelecido o pH de 5,5 com variação de 0,2. No segundo trabalho (1981) foi estabelecido o pH de 3, o qual resultou em um rendimento de reação de 60-70%, com uma proporção de 2,4-diamino-pteridinas substituídas 6-hidróximetil/7-hidróximetil de 20:1.

A utilização da cisteína na reação realizada, conforme proposto por Baugh e Shaw (1964), também é questionável. A função da cisteína no meio reagente, segundo Baugh e Shaw (1964), é atuar como um antioxidante, protegendo o material de partida **1** da autocondensação que forneceria um produto denominado pirimido-pteridina (Figura 14), além de participar da reação para formação do intermediário hidróxi-metil-glioxal (Esquema 5, página 54). O mercaptoetanol foi utilizado anteriormente como agente antioxidante nesta reação, porém, características como sua volatilidade e a formação de espuma na mistura reagente fizeram com que fosse substituído pela cisteína. Entretanto, Peter e Merrath (1993) desenvolveram uma metodologia na qual não foi necessária a adição de nenhuma substância antioxidante ao meio reagente e a reação foi realizada em um sistema aberto, no qual o ar atmosférico e o pH básico forneceram as condições para ocorrer a oxidação adequada ao fechamento do anel pteridina.

Figura 14. Estrutura química da pirimido-pteridina



Fonte: Elaborado pela autora

Por fim, outro fator a ser abordado que também pode ter colaborado para o baixo rendimento da reação, diz respeito à adição da dihidroxiacetona. No procedimento seguido neste trabalho, à solução de dihidroxiacetona foram adicionados os demais reagentes (item 4.3), porém, Peter e Merrath (1993) dizem que outro fator essencial para o sucesso dessa reação é a adição da dihidroxiacetona, que deve ser realizada lentamente ao meio reagente.

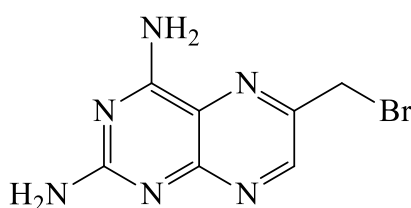
O composto **5** é insolúvel em água fria, dessa forma, ao fim da reação o sistema reagente foi levado à geladeira para favorecer a precipitação desse composto. A purificação do composto **5** foi realizada por meio de recristalização, que envolveu a dissolução desse composto em água destilada sob aquecimento e com adição de solução aquosa de NaOH 5 M. A solução obtida foi filtrada a vácuo e à quente, utilizando carvão ativo para adsorver impurezas presentes na solução do produto. Em seguida, fez-se a correção do pH da solução contendo o composto **5** para **6**, utilizando solução aquosa de HCl 1 mol/L para favorecer, mais uma vez, a precipitação desse composto após resfriamento do filtrado.

Piper e Montgomery (1977) discutiram a reação descrita por Baugh e Shaw (1964), por meio da análise de espectros de RMN de ^1H do produto bruto da reação e concluíram que, apesar da formação de diferentes subprodutos, a formação do produto desejado, 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina, ocorreu como produto majoritário. Nesse sentido, devem-se ajustar as condições dessa reação para que se possa exercer maior controle sobre o curso da síntese da pteridina.

5.4. REAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO COMPOSTO 2,4-DIAMINO-6-(BROMOMETIL)-PTERIDINA

A rota de síntese proposta inicialmente (Esquema 1, página 41) foi modificada em relação à síntese do composto **6**, inicialmente planejado como um composto mesilado, sendo modificado para um composto bromado **16** (Figura 15).

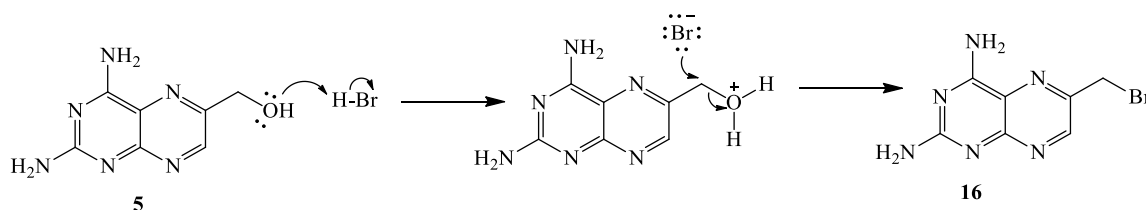
Figura 15. Estrutura química do 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina



Fonte: Elaborada pela autora

O intuito dessa etapa de síntese seria a formação de um bom grupo abandonador (mesilato) para as posteriores reações de substituição nucleofílica com os fenolatos (**7a**, **7b** e **7c**). A mudança foi necessária, pois após a obtenção do composto **5**, verificou-se que o mesmo não é solúvel em diclorometano, solvente que seria utilizado na reação de mesilação. O composto **5** também não é solúvel em vários outros solventes orgânicos que poderiam substituir o diclorometano na reação de mesilação da rota de síntese proposta inicialmente, conforme dados de solubilidade do desse composto encontrados na literatura. Dessa forma, realizou-se uma reação para a bromação do composto **5**, utilizando solução aquosa de ácido bromídrico 48% e aquecimento da mistura reagente. A reação gerou um sólido preto que não pôde ser purificado. Portanto, não foi possível obter o composto bromado **16**. O mecanismo de reação proposto está representado no Esquema 7.

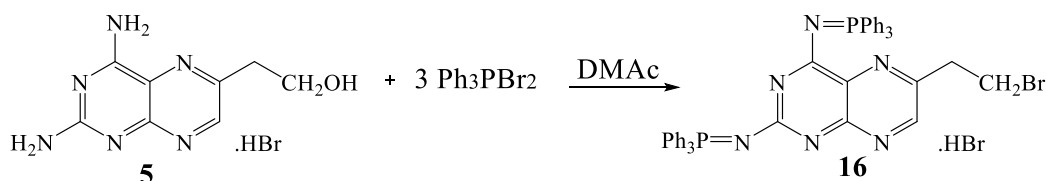
Esquema 7. Mecanismo da reação de formação do composto 16



Fonte: Elaborado pela autora

A não obtenção do composto **16** pode estar associada, em primeira análise, à baixa pureza e quantidade do composto **5** no meio reagente, como discutido no item 5.3 do presente trabalho. Em segunda análise, existem na literatura outras metodologias que melhoram as condições desta reação, tornando tangível a obtenção do composto **16**. Ellard (1976) e Piper e Montgomery (1977) apresentaram uma metodologia na qual a conversão do 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina em 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina ocorreu utilizando o reagente trifenildibromofosforano em dimetilacetamida (DMAc) como solvente, na proporção de 3:1 (trifenildibromofosforano : 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina), a 50°C, o qual além de fornecer o grupo bromometil na posição 6 do anel 2,4-diamino-pteridina, também protegeu as amins primárias das posições 2 e 4 durante a alquilação, que seria a próxima etapa de síntese, por meio da formação de fosfazinas (Figura 16).

Figura 16. Formação do composto 16 utilizando o trifenildibromofosforano



Fonte: Adaptado de ELLARD (1976)

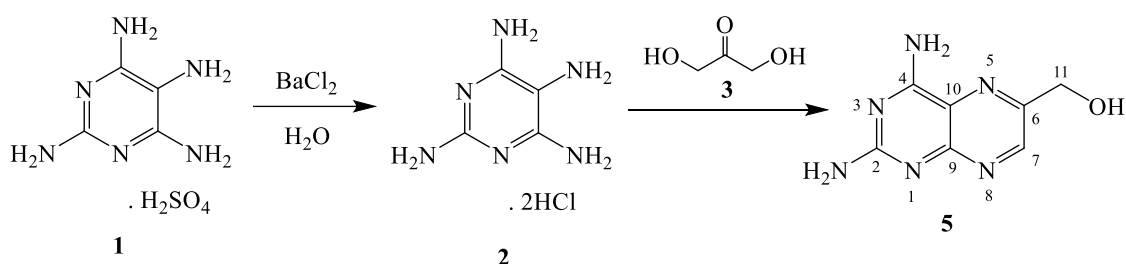
A presença destes grupos protetores preveniu a alquilação das amins primárias. A desproteção, de acordo com o autor, deveria ocorrer após a reação de alquilação por meio de uma hidrólise ácida.

Piper e Montgomery (1977) afirmaram ainda que, o tratamento da 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina (**5**) com HBr, da forma como realizado neste trabalho, pode fornecer o composto **16**, porém em baixo rendimento (aproximadamente 11%). Já o método alternativo proposto por eles, utilizando o trifenildibromofosforano, forneceu um rendimento em torno de 50%.

5.5. OBTENÇÃO DA 2,4-DIAMINO-6-(HIDRÓXIMETIL)-PTERIDINA COM AS CONDIÇÕES DE REAÇÃO AJUSTADAS

Para a obtenção de melhores resultados na síntese do composto **5** e, desta forma, prosseguir com a rota de síntese proposta, uma nova tentativa foi realizada, desta vez com modificações dos pontos discutidos no item 5.3 do presente trabalho (Figura 17).

Figura 17. Reação para a síntese da 2,4-diamino-6-(hidróximetil)-pteridina



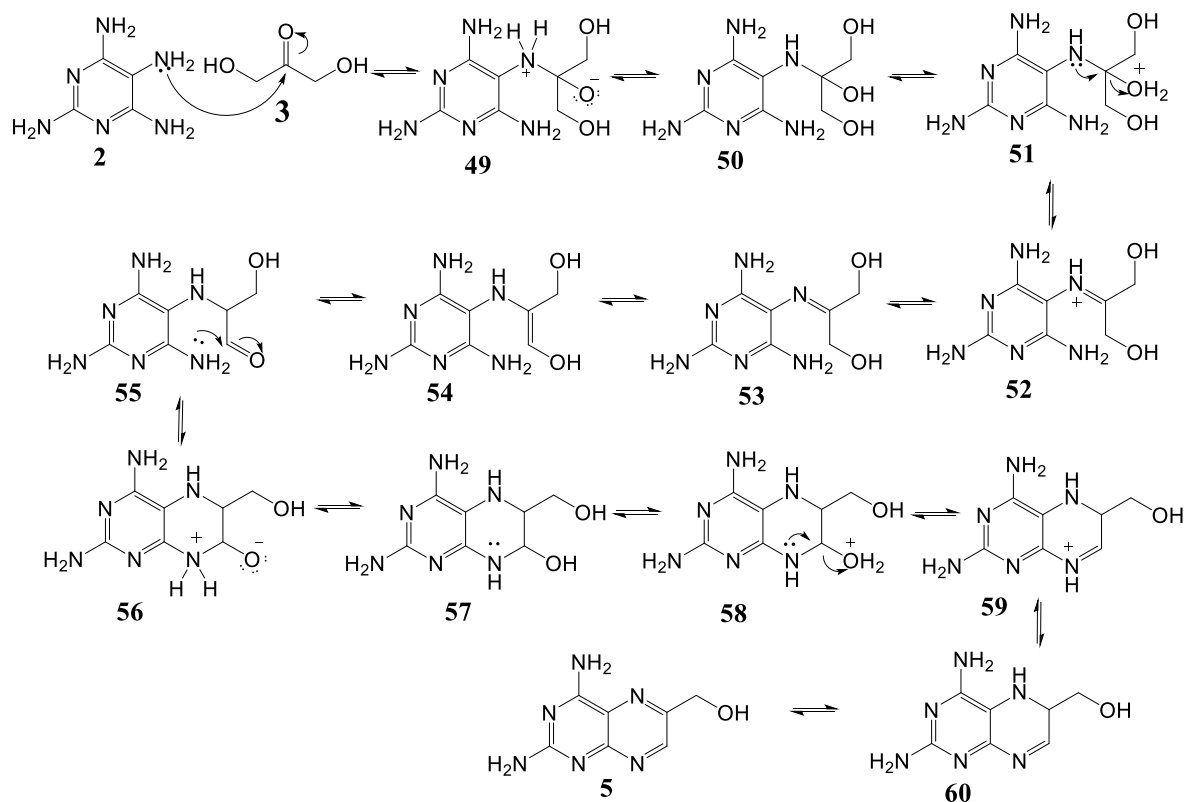
Fonte: Elaborado pela autora

Assim como descrito no item 4.3 da metodologia, em um erlenmeyer adicionou-se o material de partida **1** em água e o BaCl_2 também dissolvido em água. A mistura reagente foi colocada em banho-maria por 10 minutos. Ao resfriar a mistura reagente, observou-se a formação de um precipitado branco BaSO_4 . A partir desta etapa da reação, o procedimento apresentou modificações. Filtrou-se a mistura obtida repetidas vezes para eliminação completa do BaSO_4 . Mediu-se o pH do filtrado, que estava em torno de 1, portanto, adicionou-se NaOH 5 mol/L para atingir um pH de 3. Após, adicionou-se a dihidroxiacetona **3**, previamente dissolvida em água. A adição ocorreu por gotejamento, durante uma hora, sob agitação vigorosa constante. Ao término da adição de **3**, a solução reagente foi mantida sob agitação magnética e com o sistema reagente aberto, durante 22 horas. Após este período, saturou-se a solução reagente com cloreto de sódio e corrigiu-se o pH da solução para 7-8 utilizando-se NaOH 5mol/L. O sistema reagente foi deixado sob refrigeração por 5 dias em frasco tampado e protegido da luz com papel alumínio. Observou-se a formação de um precipitado marrom que foi removido por filtração a vácuo, e seco sob vácuo.

O composto **5** foi obtido em 48,65% de rendimento e foi caracterizado por RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 18). Pode-se notar que os espectros apresentaram-se mais limpos, com sinais mais bem resolvidos, quando comparados aos espectros da Figura 11, o que indica

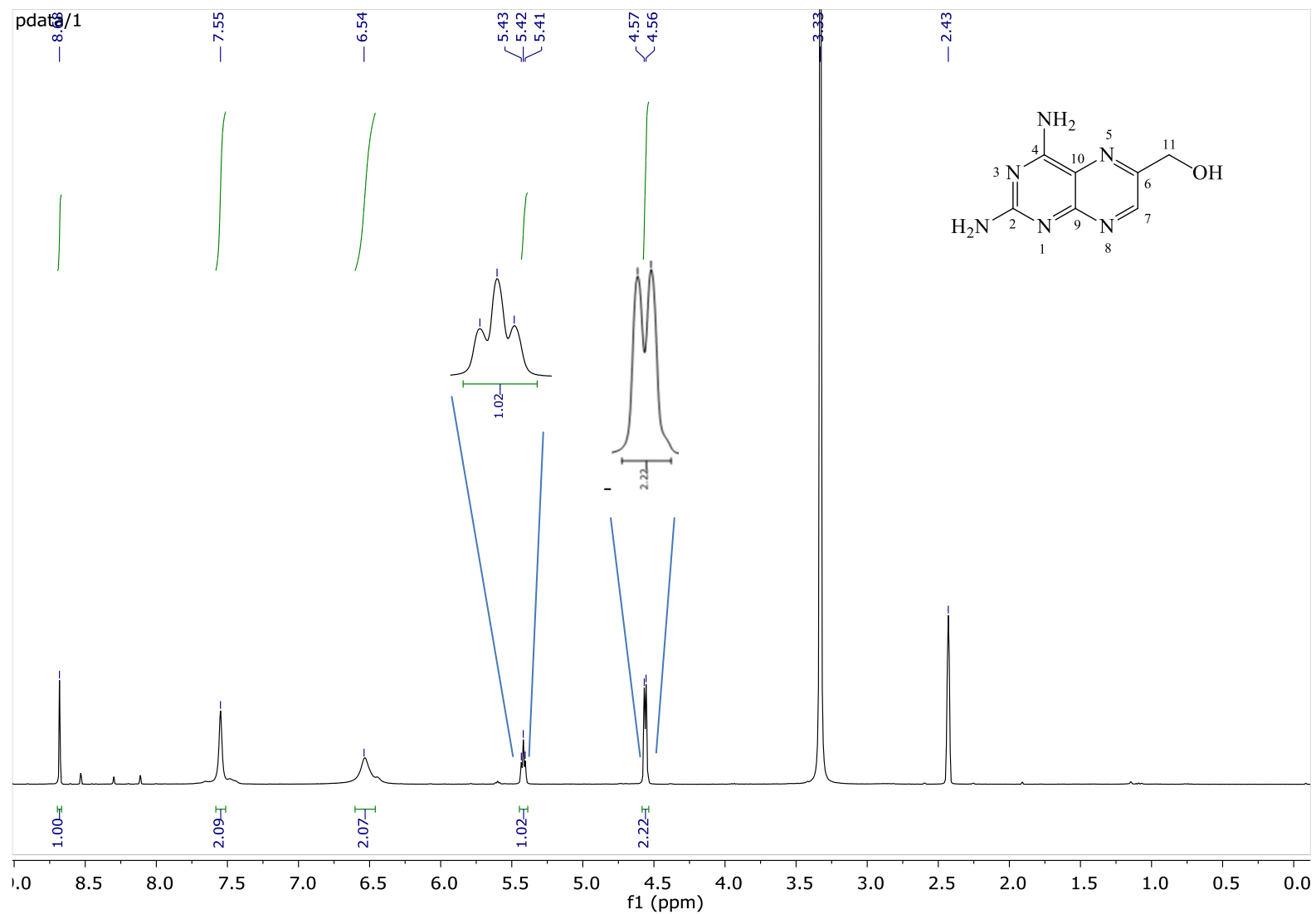
maior pureza do produto. O mecanismo proposto para a reação de obtenção do composto **5** (Figura 17), após ajustar as condições de reação, está representado no Esquema 8.

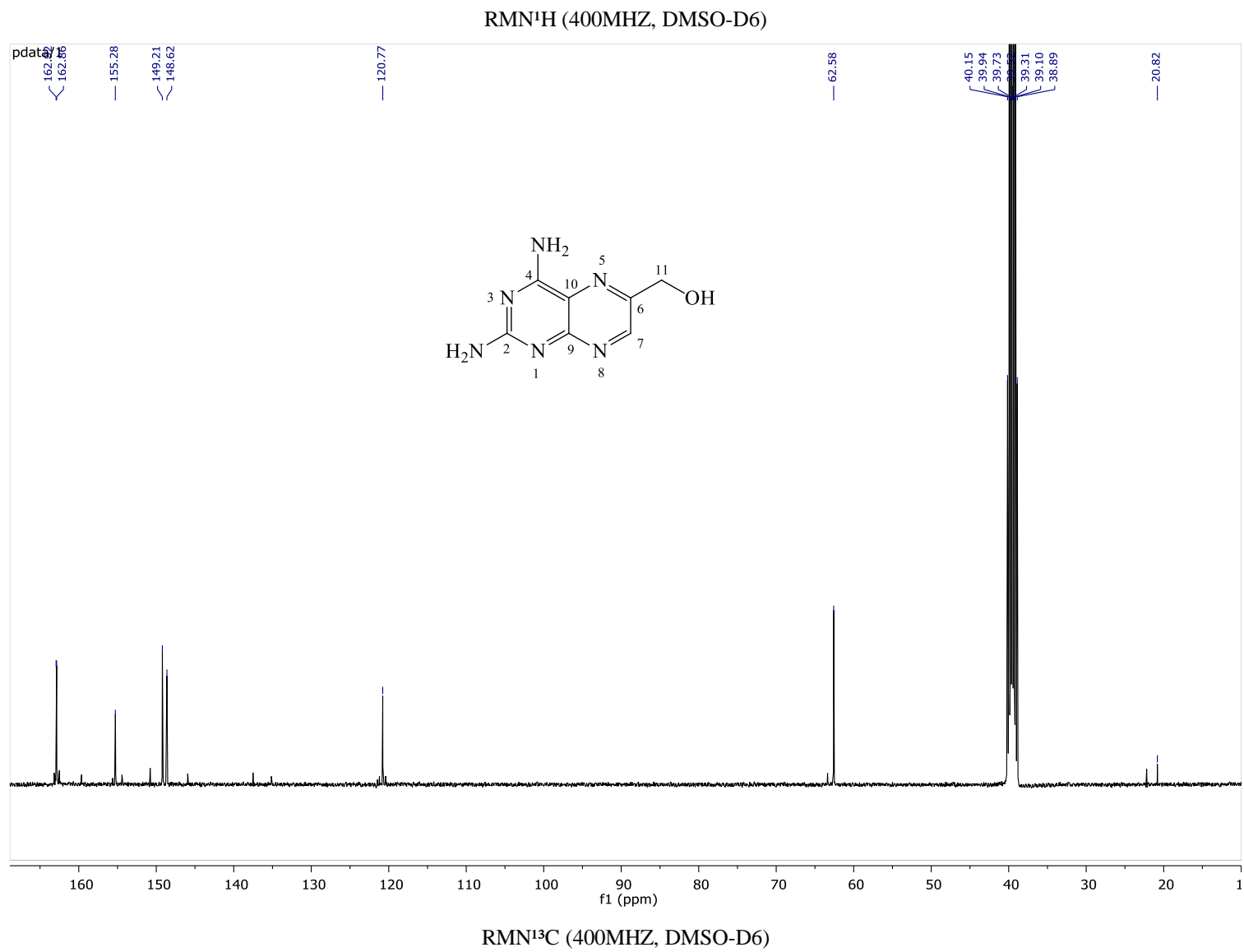
Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação com condições ajustadas



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 18. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes ao composto **5** com condições reacionais ajustadas





No espectro de RMN do ^1H pode-se observar o duplete referente ao H11 em 4,56 ppm. Neste espectro foi possível observar o tripleto referente ao hidrogênio ligado ao oxigênio da hidroxila, em 5,42 ppm. Os dois singletos observados em 6,54 e em 7,55 ppm referem-se aos hidrogênios dos grupos amino. E o singlete observado em 8,68 ppm, refere-se ao H7.

Na caracterização por RMN de ^{13}C atribui-se o sinal referente ao C11 em 62,58 ppm. Os sinais referentes aos seis carbonos aromáticos: C2, C4, C6, C7, C9 e C10, apresentaram os deslocamentos de 162,92; 162,86; 149,21; 148,62; 155,28 e 120,77 ppm, respectivamente. Observou-se um sinal em 20,82 ppm que pode ser atribuído ao grupo metil dos subprodutos metilpteridina, sendo que o sinal referente a esse grupo no espectro de RMN de ^1H pode ter sido encoberto pelo sinal do solvente (DMSO- D_6), que aparece em 2,50 ppm.

6. CONCLUSÃO

Por meio do desenvolvimento do presente trabalho foi possível planejar a síntese de novas moléculas com potencial atividade antitumoral, tendo como protótipo a molécula do metotrexato. As modificações propostas visaram à obtenção de moléculas com melhores características farmacocinéticas que o metotrexato, a fim de aumentar o acesso local de ação e, assim, potencializar a atividade antitumoral.

Neste trabalho também foi possível sintetizar os compostos fenólicos a partir dos quais podem ser obtidos os fenolatos **7a**, **7b** e **7c**, que serão empregados na síntese dos novos análogos do metotrexato planejados (**8a**, **8b** e **8c**). Os compostos fenólicos a partir dos quais podem ser obtidos os fenolatos **7b** e **7c** são inéditos e foram obtidos em bons rendimentos. Também foi possível aperfeiçoar as condições de reação para a obtenção do intermediário de síntese 2,4-diamino-6-(hidroximetil)-pteridina (**5**) que será empregado para a síntese do 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina (**16**), intermediário chave, cuja metodologia de síntese deverá ser adequada conforme encontrado na literatura. Acredita-se que, após as adequações nessa metodologia, os novos análogos do metotrexato planejados (**8a**, **8b** e **8c**) serão obtidos. Após a purificação e a caracterização desses análogos, por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, será possível avaliar a atividade antitumoral *in vitro* e a seletividade, e estudar o mecanismo pelo qual essa atividade ocorrerá, caso ela seja demonstrada pelos análogos.

A relevância do tema desenvolvido neste trabalho reside no emprego da síntese orgânica para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que sejam mais eficazes, mais seletivos e, portanto, mais seguros no tratamento do câncer, uma doença que apresenta grande impacto econômico e em saúde pública em vários países no mundo.

A elaboração deste trabalho de conclusão de curso me possibilitou ampliar meus conhecimentos na área de pesquisa, por meio do contato com textos científicos, equipamentos e diferentes metodologias empregadas na síntese orgânica. As vivências contribuíram de forma significativa para a minha formação, sendo que as experiências adquiridas durante este tempo ajudaram a me abrir portas para o mercado de trabalho.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Frente aos resultados obtidos no presente trabalho, têm-se as seguintes perspectivas futuras:

- i. Modificações na metodologia para obtenção e síntese do intermediário chave, 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina **16**;
- ii. Realização da reação de Willianson entre fenolatos **7a**, **7b** e **7c** e o intermediário **16** para obtenção dos novos análogos **8a**, **8b** e **8c**;
- iii. Caracterização estrutural dos novos análogos obtidos por meio de métodos cromatográficos e espectroscópicos;
- iv. Envio dos novos análogos obtidos para avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e da seletividade;
- v. Estudo do mecanismo de ação por meio do qual se dá atividade antitumoral, caso algum análogo apresente essa atividade.

8. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; WATSON, J. **Molecular Biology of the Cell**. 4.ed. Nova York: Garland Science, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21056/>. Acesso em: 18 de agosto de 2018.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *In: Quim. Nova*, v. 28, p.118-129, 2005.

AMES, B.; GOLD, S. N. The causes and prevention of cancer: the role of environment. *In: Biotherapy*, [S.l.], v.11, p. 205-220, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9677052>. Acesso em: 19 de agosto de 2018.

ARRUEBO, M.; VILABOIA, N.; SÁEZ-GUTIERRE, B.; LAMBEA, J.; TRES, A.; VALLADARES, M.; FERNANDÉZ, A. G. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *In: Cancers (Basel)*, v. 3, p.3279-3330, 2011.

BALUZ, K.; CARMO, M.G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: Revisão. *In: Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v.48, n.4, p.597-607, 2002. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_48/v04/pdf/revisao5.pdf. Acesso em: 26 de agosto de 2018.

BARBISAN, F. **Efeito farmacogenético e farmacogenômico do metrotexato na resposta citotóxica de células mononucleares periféricas do sangue**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul: UFSM, 2010. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/9011/BARBISAN%2C%20FERNANDA.pdf?s_equence=1&isAllowed=y. Acesso em: 23 de maio de 2018.

BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *In: Quim. Nova.*, vol. 39, p. 608-620, 2016.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: Fármacos inteligentes. *In: FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, p.137-190, 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Bioisosterismo como estratégia de planejamento, desenho e modificação molecular de ligantes e protótipos. *In: FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, p.271-341, 2008.

BAUGH, C. M.; SHAW, E. The synthesis of 6-hydroxymethylpteridines. *In: J. Org. Chem.*, v.29, p.3610-3612, 1964.

BYSTROFF, C.; OATLEY, S. J.; KRAUT, J. Crystal structures of Escherichia coli dihydrofolate reductase: the NADP⁺ holoenzyme and the folate. NADP⁺ ternary complex. Substrate binding and a model for the transition state. *In: Biochemistry*, v. 29, p.3263-3277, 1990.

BLANEY, J.M.; HANSCH, C.; SILIPO, C.; VITTORIA, A. Structure-Activity Relationships of Dihydrofolate Reductase Inhibitors. *In: Chem. Rev.*, v. 84, p.333-407, jul. 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Formulário Terapêutico Nacional**. 2ª ed. Brasília, 2010. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/janeiro/29/FTN-2010.pdf>. Acesso em: 29 de abril de 2018.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª ed., vol. 4. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CHAK, A.; CANTO, M. I.; RÖSCH, T.; DITTLER, H. J.; HAWES, R. H.; TIO, T.; LIGHTDALE, C. J.; BOYCE, H. W.; SCHEIMAN, J.; CARPENTER, S. L.; VAN DAM, J.; KOCHMAN, M. L.; SIVAK JR., M. V. Endosonographic differentiation of benign and malignant stromal cell tumors. *In: Gastrointestinal Endoscopy*, [S.l.], v. 45, p. 468-473, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/gastrointestinal-endoscopy/vol/45/issue/6>. Acesso em: 18 de agosto de 2018.

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Mechanisms of Action of Methotrexate. *In: Bulletin of the Hospital for Joint Diseases*, [S.l.], v. 71, p. S5-S8, 2013. Disponível em: <http://hjbbulletin.org/files/archive/pdfs/52.pdf>. Acesso em: 28 de maio de 2018.

CHIBBER, S.; HASSAN, I.; FARHAN, M.; NASEEN, I. In vitro pro-oxidant action of Methotrexate in presence of white light. *In: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, [S.l.], v. 104, p.387-393, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570314>. Acesso em: 28 de maio de 2018.

CHOPRA, D.; REHAN, H. S.; SHARMA, V.; MISHRA, R. Chemotherapy- induced adverse drug reactions in oncology patients: A prospective observational survey. *In: Indian Society of Medical and Pediatric Oncology*, [S.l.], v. 37, p.42-46, mar. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4795375/?report=classic>. Acesso em: 02 de maio de 2018.

CHU, E.; SARTORELLI, A. Quimioterapia do câncer. *In: KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica*. 12ª ed. Porto Alegre: AMGH, p.949-975, 2014.

COLLEONI, M.; ORLANDO, L.; SANNA, G.; ROCCA, A.; MAISONNEUVE, P.; PERUZZOTTI, G.; GHISINI, R.; SANDRI, M. T.; ZORZINO, L.; NOLÈ, F.; VIALE, G.; GOLDHIRSCH. Metronomic low-dose oral cyclophosphamid and methotrexate plus or minus thalidomide in metastatic breast cancer: antitumor activity and biological effects. *In: Annals*

of **Oncology**, [S.l.], v. 17, p.232–238, fev. 2006. Disponível em:
<https://academic.oup.com/annonc/article/17/2/232/165103>. Acesso em: 29 de maio de 2018.

DANAEI, G.; HOORN, S. V.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L.; EZZATI, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioral and environmental risk factors. *In: TheLancet*, Cambridge, v. 366, p.1784-1793, nov. 2005. Disponível em:
[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(05\)67725-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(05)67725-2/fulltext). Acesso em: 28 de abril de 2018.

DARDONVILLE, C.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, C.; GIBBONS, S. L.; RYAN, G. J.; JAGEROVIC, N.; GABILONDO, A. M.; MEANA, J. J.; CALLADO, L. F. Synthesis and pharmacological studies of new hybrid derivatives of fentanyl active at the μ -opioid receptor and I 2-imidazoline binding sites. *In: Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, n. 19, p.6570-6580, 2006.

D'OCA, C. R. **Síntese de novas benzilamidas graxas**: estudo da influência da variação estrutural na atividade antituberculose. 2010. 171 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande: FURG, 2010. Disponível em:
https://ppgqta.furg.br/images/CAROLINE_DA_ROS_MONTES_DOCA.pdf. Acesso em: 22 de setembro de 2019.

EFFERTH, T.; VOLM, M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *In: Pharmacol Ther.*, v. 107, p.155-176, 2005.

ELLARD, J. A. Synthesis of methotrexate. *In: United States Patent*, Dayton, p.1-8, 1978.

ELLARD, J. A. Synthesis of 2,4-diamino-6-hydroxymethylpteridine. *In: United States Patent*, Dayton, p.1-2, 1981.

FREITAS, L. B. O.; BORGATI, T. F.; FREITAS, R. P.; RUIZ, A. L. T. G.; MARCHETTI, G. M.; CARVALHO, J. E.; CUNHA, E. F. F.; RAMALHO, T. C.; ALVES, R. Synthesis and antiproliferative activity of 8-hydroxyquinoline derivatives containing a 1,2,3-triazole moiety. *In: Eur. J. Chem.*, v. 84, p.595-604, 2014.

FRIES, J. F. The compression of morbidity. *In: Milbank Quarterly*, Washington, v. 83, p.801-823, out. 2005. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690269/>. Acesso em: 28 de setembro de 2018.

GALANTER, J. M.; LOWENSTEIN, D. H. Princípios de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso. *In: GOLAN, E. Princípios de Farmacologia: A base farmacológica da farmacoterapia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GARG, R. KANTARJIAN, H.; THOMAS D.; FARDERL, S. F.; RAVANDI, F.; LOVSHE, D.; PIERSE, S.; O'BRIEN, S. Adults with acute lymphoblastic leukemia and translocation (1;19) abnormality have a favorable outcome with hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone alternating with methotrexate and high-dose cytarabine chemotherapy. *In: Cancer*, v. 115, p.2147-2154, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *In: Cell*, [S.l.], v. 144, p.646-674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>. Acesso em: 18 de agosto de 2018.

HARBISON, H.; ROSE, H. S.; COEN, D. M.; GOLAN, D. E. Princípios de Farmacologia Antimicrobiana e Antineoplásica. *In: GOLAN, E. Princípios de Farmacologia: A base farmacológica da farmacoterapia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HARFORD, J. B.; EDWARDS, B. K.; NANDAKUMAR, A.; NDOM, P.; CAPOCACCIA, R.; COLEMAN, M. P. Cancer control-planning and monitoring population-based systems. *In: Tumori*, [S.l.], v. 95, p. 568-578, 2009. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/030089160909500501>. Acesso em: 28 de abril de 2018.

HILÁRIO, F. F.; DE PAULA, R. C.; SILVEIRA, M. L. T.; VIANA, G. H. R.; ALVES, R. B.; PEREIRA, J. R. C. S.; SILVA, L. M.; DE FREITAS, R. P.; DE PILLA VAROTTI, F. Synthesis and evaluation of antimalarial activity of oxygenated 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues. *Chem. Biol. Drug. Des.*, v.78, p.477-482, 2011.

HUENNEKENS, F. M. The methotrexate story: A paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *In: Advan. EnzymeRegul.*, Reino Unido, v. 34, p.397-419, 1994.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mudança demográfica no Brasil no início do século XXI**: Subsídios para as projeções da população. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv93322.pdf>. Acesso em: 27 de abril de 2018.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv911110.pdf>. Acesso em: 27 de abril de 2018.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é o câncer?** Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 18 de agosto de 2019.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Como é o processo de carcinogênese?** Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319. Acesso em: 18 de agosto de 2019.

LUBRAN, M. The Biochemistry of Folic Acid and Vitamin B12. *In: Institute for Clinical Science*, Torrance, v. 1, p. 236-244, 1971. Disponível em: <http://www.annclinlabsci.org/content/1/3/236.full.pdf>. Acesso em: 15 de outubro de 2018.

MAHMOOD, L. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *In: Journal of Health Research and Review*, Doha, v. 1, p. 5-9, 2014.

MARCONDES, E. Homeostase e homeorrese na desnutrição. *In: Rev. Med.*, São Paulo, v. 67, p.44-48, 1987. Disponível em:

<https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/download/58311/61318>. Acesso em: 18 de agosto de 2018.

MATOS, I. A. **Planejamento *in silico* de inibidores da enzima diidrofolato redutase**. 2016.126 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Sergipe. Sergipe: UFS, 2016.

MEDICI, A. C. Custos do tratamento do câncer no Brasil: como melhorar o foco. *In: ResearchGate*, v. 88, p.1-5, 2018.

MOSER, A. M.; ADAMSON, P. C.; GILLESPIE, A. J.; POPLACK, D. G.; BALIS, F. M. Intraventricular concentration times time (C x T) methotrexate and cytarabine for patients with recurrent meningeal leukemia and lymphoma. *In: Cancer*, v. 85, p.511 - 516, 1999.

NXUMALO, W.; DINSMORE, A. Negishi coupling of pteridine-o-sulfonates. *In: S. Afr. J. Chem.*, South Africa, v. 66, p.42-46., 2013

PALUMBO, M. O.; KAVAN, P.; MILLER, W. H.; PANASCI L.; ASSOULINE, S.; JOHNSON, N.; COHEN, V.; PATENAUDE, F.; POLLAK, M.; JAGOE, T. R.; BATIST, G. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *In: Front Pharmacol.*, v. 4, p.1-9, 2013.

PANIZ, C.; GROTO, D.; SCHITT, G. C.; VALENTINI, J.; SCHOTT, K. L.; POMBLUM, V. J.; GARCIA, S. C. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *In: J. Bras. Patol.Med. Lab.*, Santa Maria, v. 41, p.323-334, 2005.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5ª edição. Oxford: OXFORD UNIVERSITY PRESS INC (IMPORT), 2013.

PETER, H.; PETER, M. A process for the preparation of 2,4-diamino-6- (hydroxymethyl) pteridine salts. *In: Google Patents*, Alemanha, 1993.

PIPER, J.; MONTGOMERY, J. A. Preparation of 6-(Bromomethyl)-2,4-pteridinediamine Hydrobromide and its use in improved syntheses of methotrexate and related compounds. *In: J. Org. Chem.*, Alabama, v.42, p.208-211, 1977.

SKIBIŃSKA, L.; RAMLAU, C.; ZALUSKI, J.; OLEINICZAK, B. Methotrexate Binding to Human Plasma Proteins. *In: Polym. J. Pharmacol. Pharm.*, v. 42, n. 2, p.151–157, 1990.

SWANTON, C. Intratumor Heterogeneity: Evolution through Space and Time. *In: CancerResearch*, [S.l.], v. 72, p.4875-4882. Out. 2012. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/72/19/4875.full-text.pdf>. Acesso em: 29 de abril de 2018.

TRAORÉ, M.; MIETTON, F.; MAUBON, D.; PEUCHMAUR, M.; FRANCISCO HILÁRIO, F.; PEREIRA DE FREITAS, R.; BOUGDOUR, A.; CURT, A.; MAYNADIER, M.; VIAL, H.; PELLOUX, H.; HAKIMI, M.-A.; WONG, Y.-S. Flexible Synthesis and Evaluation of Diverse Anti-Apicomplexa Cyclic Peptides. *In: J. Org. Chem.*, v.78, p.3655-3675, 2013.

TYSON, J. J.; NOVAK, B. Control of cell growth, division and death:information processing in living cells. *In: Interface Focus*, Reino Unido, v. 4, jun, 2014. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsfs.2013.0070>. Acesso em: 21 de abril de 2018.

URUSHIZAKI, I. Palliativetherapy in cancer.5. Side effects by anticancer drugs and their treatments. *In: Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy*, Japão, v. 17, p.1959-1969, 1990. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697455>. Acesso em: 02 de maio de 2018.

WAN, Q.; BENNET, B. C.; WILSON, M. A.; KOVALEVSKY, A.; LANGAN, P.; HOWELL, E. E.; DEALWIS, C. Toward Resolving the Catalytic Mechanism of MhydrofolateReductase Using Neutron and Ultrahigh-resolution X-ray crystallography. *In: Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 111, p.18225-18230, 2014.

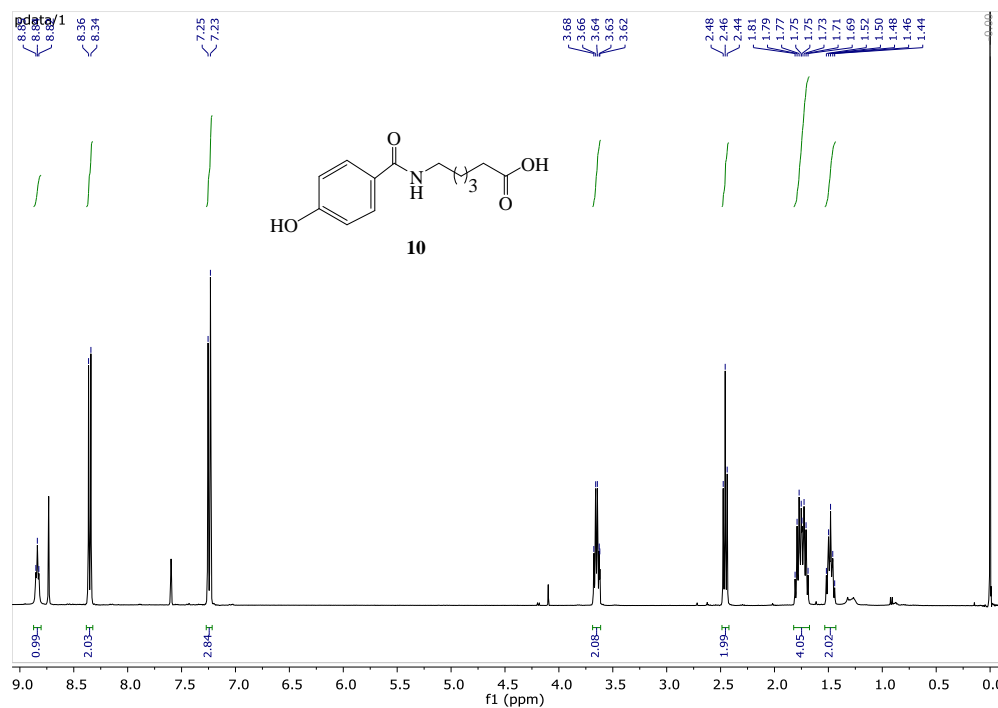
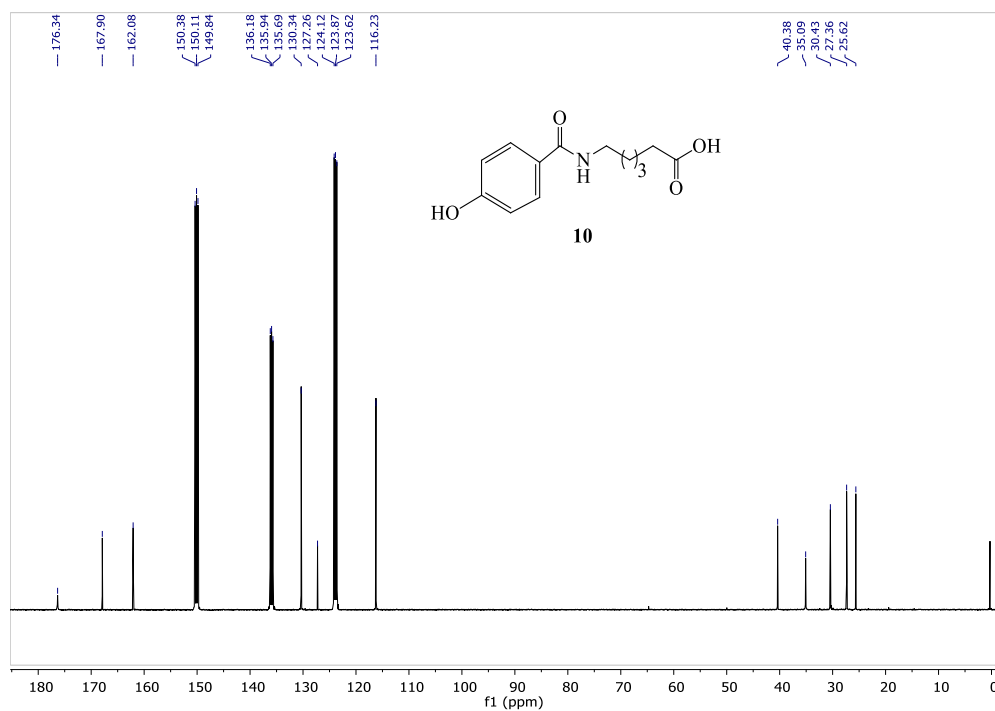
WEIL, A. Organização, replicação e reparo do DNA. *In: RODWELL, V. W. Bioquímica ilustrada de Harper*. 30ª ed., Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2017. p.370-393. Disponível em: <http://bit.ly/33ztBFI>. Acesso em 26 ago. 2018.

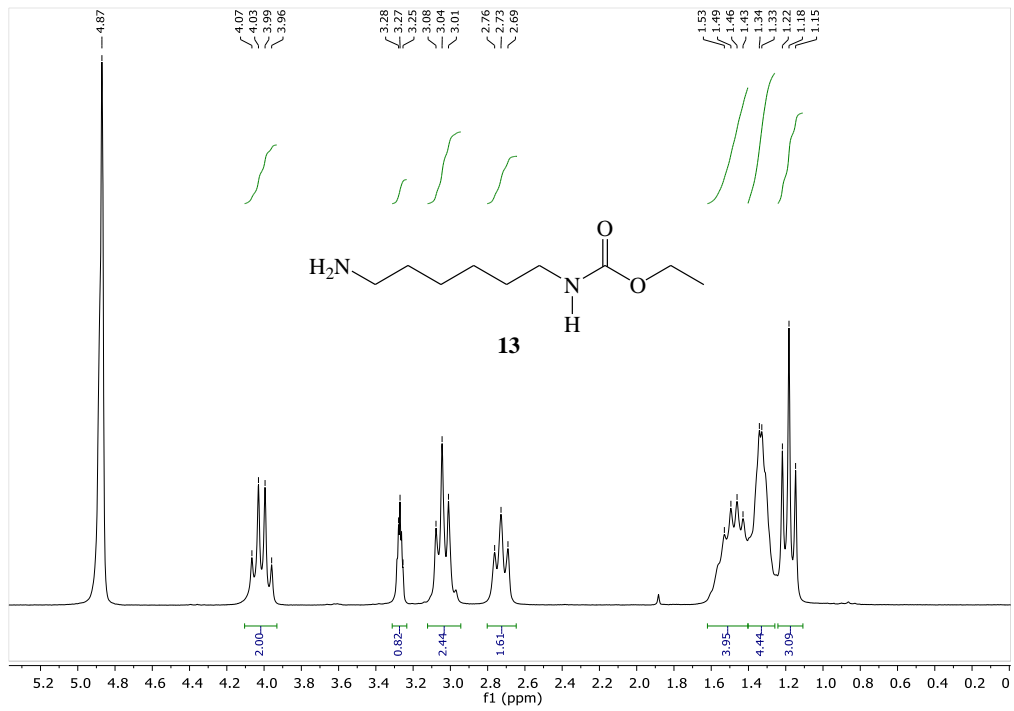
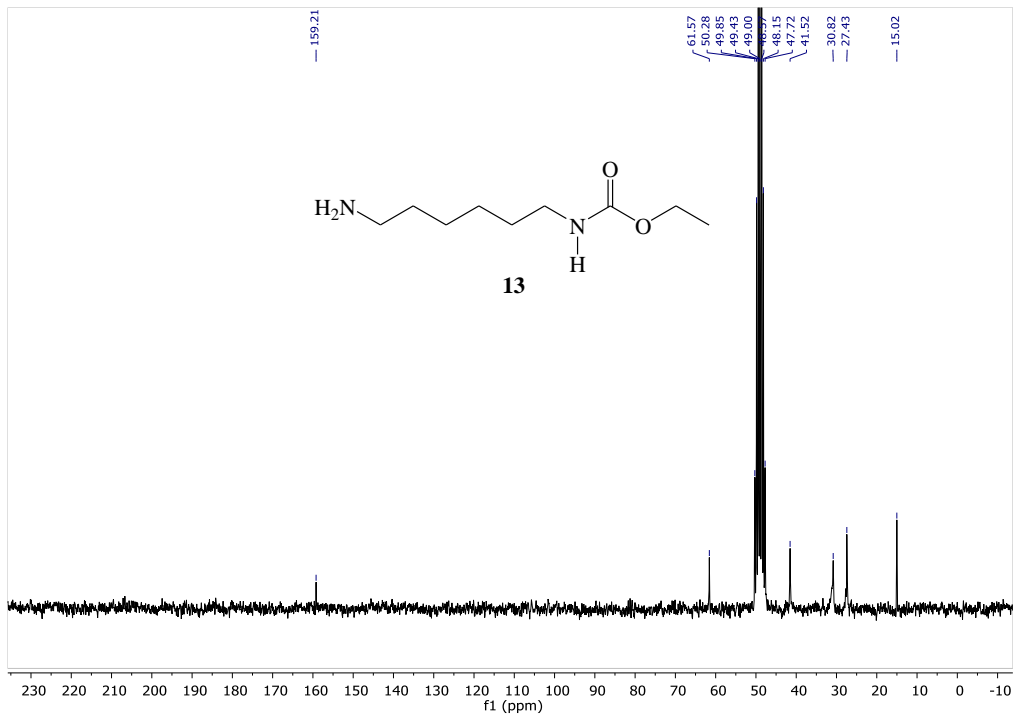
WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Factsheet. *In: WHO*, [S.l.]:fev. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 04 de novembro de 2019.

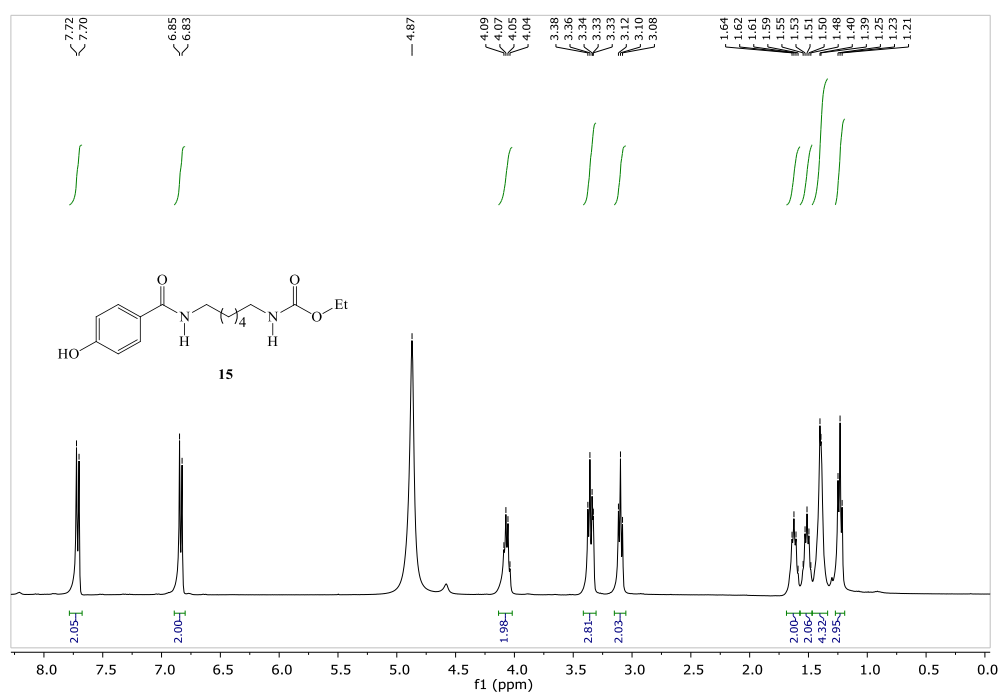
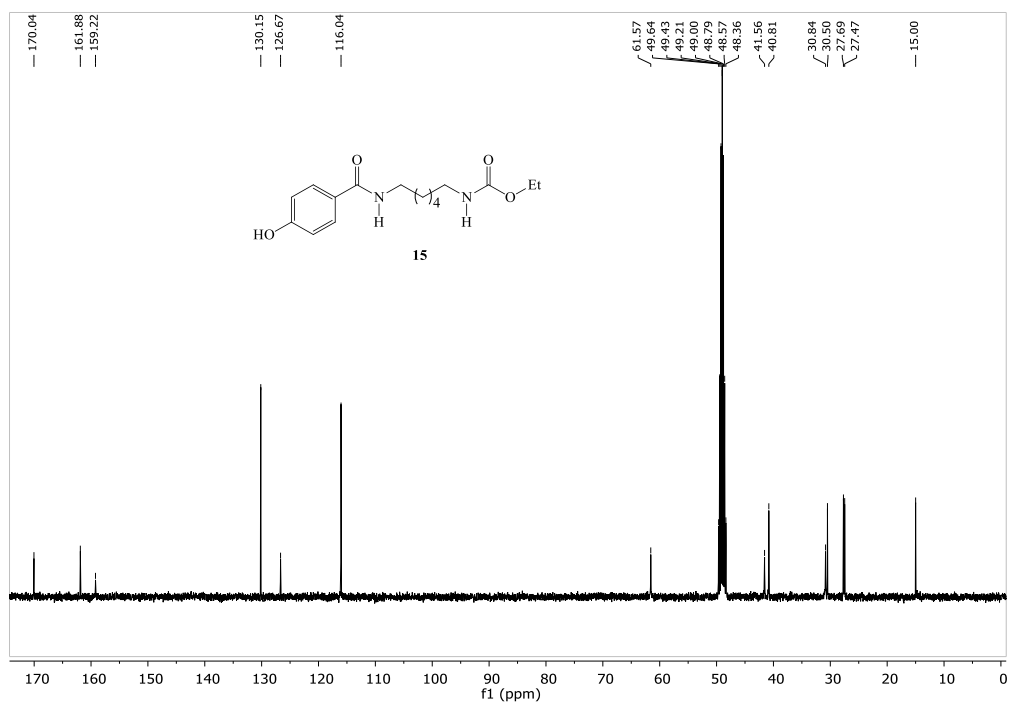
ZAGO, M. A. Carências de Folatos ou Vitamina B12- Anemias megaloblásticas. *In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Tratado de hematologia*. São Paulo: Atheneu, p.125-133, 2013.

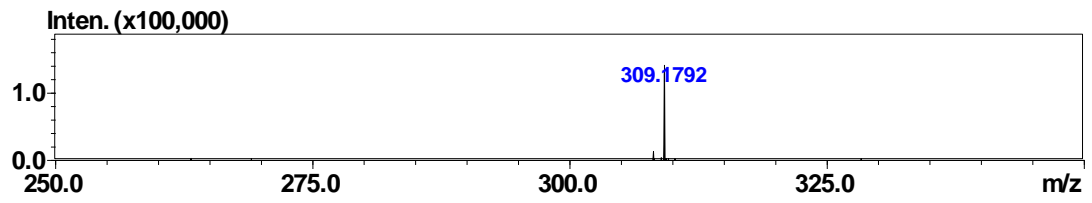
ZHIVKOVA, Z. D. Studies on Drug – Human Serum Albumin Binding:The Current State of the Matter. *In: Current Pharmaceutical Design*, v. 21, p.1817-1830, 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (100,64 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H do composto **13** (200 MHz, CD_3OD)**Anexo 4.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto **13** (50,32 MHz, CD_3OD)

Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H do composto **15** (200 MHz, CD_3OD)**Anexo 6.** Espectro de RMN de ^{13}C do composto **15** (50,32 MHz, CD_3OD)

Anexo 7. Espectro de massa do composto **15** do modo SIM**Anexo 8.** Espectro de infravermelho do composto **15**