

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELA SILVA RAMOS

**PLANEJAMENTO RACIONAL POR MODELAGEM MOLECULAR E  
SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS CARDENOLÍDEOS COM  
POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA**

BELO HORIZONTE

2021

GABRIELA SILVA RAMOS

**PLANEJAMENTO RACIONAL POR MODELAGEM MOLECULAR E  
SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS CARDENOLÍDEOS COM POTENCIAL  
ATIVIDADE CITOTÓXICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professor Dr. Rodrigo Maia de Pádua

Coorientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga e Prof. Dr. Vinícius Gonçalves Maltarollo

Colaboradores: Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva e Dra. Jennifer Munkert

Belo Horizonte

2021

R175p Ramos, Gabriela Silva.  
Planejamento racional por modelagem molecular e semissíntese de derivados cardenolídeos com potencial atividade citotóxica / Gabriela Silva Ramos. – 2021.  
253 f. : il.

Orientador: Rodrigo Maia de Pádua.

Coorientador: Fernão Castro Braga.

Coorientador: Vinícius Gonçalves Maltarollo.

Colaboradores: Izabella Thaís da Silva e Jennifer Munkert.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Cardenolídeos – Teses. 2. Cancer – Teses. 3. Enzimas – Teses. 4. Agentes antineoplásicos – Teses. 5. Atividade citotóxica – Teses. I. Pádua, Rodrigo Maia de. II. Braga, Fernão Castro. III. Maltarollo, Vinícius Gonçalves. IV. Silva, Izabella Thaís da. V. Munkert, Jennifer. VI. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VII. Título.

CDD:615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### FOLHA DE APROVAÇÃO

“PLANEJAMENTO RACIONAL POR MODELAGEM MOLECULAR E SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS  
CARDENOLÍDEOS COM POTENCIAL ATIVIDADE CITOTÓXICA”

GABRIELA SILVA RAMOS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Káthia Maria Honório  
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Vinícius Gonçalves Maltarollo - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Fernão Castro Braga - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 08 de outubro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Kathia Maria Honório, Usuário Externo**, em 08/10/2021, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernão Castro Braga, Professor do Magistério Superior**, em 08/10/2021, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinícius Goncalves Maltarollo, Professor do Magistério Superior**, em 08/10/2021, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Maia de Padua, Professor do Magistério Superior**, em 08/10/2021, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Saulo Fernandes de Andrade, Usuário Externo**, em 08/10/2021, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1009981** e o código CRC **4E03FEF7**.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores e colegas dos laboratórios de Farmacognosia e Fotoquímica da Faculdade de Farmácia.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro na realização desse trabalho.

“Não sejas... bobo. É verdade que fazes o papel – quando muito – de um pequeno parafuso nessa grande empresa de Cristo.

Mas sabes o que significa o parafuso não apertar o suficiente ou saltar fora do seu lugar? Cederão as peças de maior tamanho ou cairão sem dentes as rodas.

Ter-se-á dificultado o trabalho. – Talvez se inutilize toda a maquinaria.

Que grande coisa é ser um pequeno parafuso!”

Ponto 830 de “Caminho” – São Josemaria Escrivá.

## RESUMO

A enzima NaK é responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico das células, equilíbrio osmótico e condutividade em nervos e músculos. Vários experimentos durante as últimas décadas revelaram a capacidade dessa enzima de atuar como um transdutor de sinal versátil. Portanto, a NaK pode ser um alvo importante para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Avanços no reconhecimento estrutural e funcional da NaK têm possibilitado planejar inibidores mais potentes, capazes de regular a atividade dessa enzima nos processos da carcinogênese. Glicosídeos cardiotônicos (GC) são metabólitos especiais observados no gênero *Digitalis* e usados para tratar a insuficiência cardíaca devido ao efeito inotrópico positivo desencadeado pela inibição específica da NaK. O reposicionamento dos GC como fármacos anti-herpéticos e antitumorais vem sendo intensivamente investigado. Um derivado semissintético (AG) da 3 $\beta$ -OH-digitoxigenina (DG) apresentou potente atividade citotóxica frente a diferentes linhagens tumorais e um estudo *in silico* de avaliação da relação estrutura/atividade foi realizado para identificação dos grupos mais importantes para a atividade. Nesse contexto, no presente trabalho, objetivou-se o planejamento racional de uma série de potenciais inibidores da NaK apresentando diferentes amino-grupos acoplados à cadeia lateral em C-3, que sejam capazes de conservar o potencial citotóxico de AG, porém de maneira mais seletiva. O intermediário-chave da síntese dos derivados propostos (1I – 1R) foi obtido pela modificação do grupo 3 $\beta$ -OH da DG mediante reações sequenciais (rendimento global 87,4%). Antes de submeter esse intermediário às reações concludentes, uma triagem virtual foi realizada por ancoragem molecular para seleção dos derivados mais promissores. Além dos dez derivados propostos e dos sete intermediários de síntese, outros 40 derivados cardiotônicos com atividade anti-herpética e citotóxica determinada também foram avaliados quanto a capacidade de interagir com as duas principais isoformas ( $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ ) da NaK associadas a carcinogênese. Os modelos tridimensionais dessas isoformas foram construídos por modelagem comparativa, utilizando como molde a estrutura cristalográfica PDB ID 3A3Y. Dos dez derivados propostos, nove foram selecionados para ambas as isoformas e três (1M, 1N e 1R) conservaram as interações mais comuns entre os GC e a cavidade de ligação. Esse resultado sugere que as modificações moleculares propostas são pertinentes e podem vir a resultar efetivamente em agentes citotóxicos mais seletivos.

Palavras-chave: cardenólídeos; bomba de sódio e potássio; câncer.

## ABSTRACT

The NaK enzyme is a transmembrane enzyme responsible for cellular electrochemical gradient maintenance, osmotic balance, and conductivity in nerves and muscles. Multiple experiments during the last decades have revealed the ability of this enzyme to serve as a versatile signal transducer. Thus, NaK could be an important target for the development of new antitumor drugs. Advances in the structural and functional recognition of NaK have made it possible to design new and more potential inhibitors capable of regulating the activity of this enzyme in carcinogenesis processes. Cardiotonic glycosides (GC) are special metabolites observed in the *Digitalis* genus and used to treat heart failure due to the positive inotropic effect triggered by specific inhibition of NaK. The repositioning of GC as antiherpetic and antitumor agents has been intensively investigated. A semisynthetic derivative of 3 $\beta$ -OH-digitoxigenin (DG) showed potent cytotoxic activity against different tumor cell lines and an *in silico* structure/activity relationship study was performed to identify the most important groups for the activity. In this context, the present work aimed at the rational design of a potential NaK inhibitors series with different amino-groups coupled to the side chain at C-3, which can preserve the cytotoxic potential of AG, but in a more selective way. The key intermediate for the synthesis of these proposed derivatives (1I – 1R) was obtained by modifying the 3 $\beta$ -OH group of DG through sequential reactions (overall yield 87.4%). Before submitting this intermediate to conclusive reactions, a virtual screening was performed by *molecular docking* to select the most promising derivatives. In addition to the ten proposed derivatives and the seven synthesis intermediates, another 40 cardiotonic derivatives with antiherpetic and cytotoxic activity defined were also tested for the ability to interact with the two main isoforms ( $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ ) of NaK associated to carcinogenesis. The three-dimensional models of these isoforms were built by homology modeling, using the crystallographic structure PDB ID 3A3Y as a template. Nine of the ten proposed derivatives were selected as possible inhibitors for both isoforms and three (1M, 1N and 1R) kept the most common interactions between the GC and the binding site. This result suggests that the proposed molecular modifications are pertinent and may effectively result in more selective cytotoxic agents.

Keywords: cardenolides; sodium potassium pump; cancer.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ABORDAGENS SINTÉTICAS PARA OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO CHAVE (1F) DA SÍNTESE DOS DERIVADOS PROPOSTOS. ....	31
FIGURA 2 – ABORDAGENS SINTÉTICAS PARA OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO ELETRÓFILICO (1G) E DOS DERIVADOS PROPOSTOS (1I - 1R). ....	32
FIGURA 3 – ESTRUTURA GERAL DOS DERIVADOS PROPOSTOS E OS AMINO-COMPOSTOS SELECIONADOS PARA REAÇÃO FINAL DE ACOPLAMENTO. ....	32
FIGURA 4 – ROTA DE SÍNTESE PROPOSTA PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ESTRUTURALMENTE SEMELHANTES AO AMATANDIG. ....	34
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DOS GLICOSÍDEOS CARDIOATIVOS E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS. ....	52
FIGURA 6 – PRINCIPAIS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA CADEIA LATERAL OSÍDICA DOS GLICOSÍDEOS CARDIOATIVOS. ....	53
FIGURA 7 – EXPRESSÃO DAS DIFERENTES ISOFORMAS DAS SUBUNIDADES ALFA E BETA NOS DIFERENTES TIPOS DE TECIDOS CORPORAIS EM HUMANOS. ....	68
FIGURA 8 – EXPRESSÃO DAS DIFERENTES ISOFORMAS DA SUBUNIDADE GAMA NOS DIFERENTES TIPOS DE TECIDOS CORPORAIS EM HUMANOS. ....	69
FIGURA 9 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DERIVADO (1A). ....	82
FIGURA 10 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DERIVADO (1B). ....	85
FIGURA 11 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DERIVADO (1C). ....	86
FIGURA 12 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DERIVADO (1D). ....	88
FIGURA 13 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DERIVADO (1E). ....	89
FIGURA 14 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DERIVADO (1F). ....	90
FIGURA 15 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DERIVADO (1G). ....	91
FIGURA 16 – EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS GC EM RESÍDUO DO EXTRATO DE <i>D. LANATA</i> . ....	99
FIGURA 17 – CROMATOPLACAS DA ANÁLISE DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO EM CARVÃO ATIVADO. ....	101
FIGURA 18 – PRODUTOS FORMADOS PELA DESIDRATAÇÃO DA HIDROXILA EM C-14 EM 1A. ....	103
FIGURA 19 – CONFORMAÇÃO ASSUMIDA PELO ANEL C NOS DERIVADOS A E B-ANIDRODIGITOXIGENINA. ....	103
FIGURA 20 – DISTORÇÃO SOFRIDA PELO ANEL LACTÔNICO EM VIRTUDE DA DESIDRATAÇÃO DA HIDROXILA DA POSIÇÃO C-14B. ....	104
FIGURA 21 – CROMATOPLACAS DA ANÁLISE DO PRODUTO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE. ....	105
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR UPLC-PDA-ESI-MS PARA O PRODUTO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE APÓS PURIFICAÇÃO. ....	105
FIGURA 23 – CROMATOPLACA DE SÍLICA GEL DAS FRAÇÕES ÍMPARES OBTIDAS APÓS PURIFICAÇÃO EM COLUNA ABERTA DE SÍLICA GEL. ....	106
FIGURA 24 – ANÁLISE POR UPLC-PDA-ESI-MS DO MATERIAL OBTIDO APÓS PURIFICAÇÃO EM COLUNA ABERTA DE SÍLICA GEL. ....	107

FIGURA 25 – MUDANÇAS NA COLORAÇÃO DO MEIO REACIONAL AO LONGO DO CURSO REACIONAL. ....	110
FIGURA 27 – CROMATOPLACAS DA ANÁLISE DO PRODUTO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO.....	111
FIGURA 28 – MECANISMO DA REAÇÃO COM NABH <sub>4</sub> .....	113
FIGURA 29 – CENTROS QUIRAIS NO NÚCLEO ESTEROIDAL DOS CARDENOLÍDEOS DA SÉRIE A. ....	115
FIGURA 30 – FACES AXIAL E EQUATORIAL DO GRUPO CARBONILA NA POSIÇÃO C-3 DE 1B.....	117
FIGURA 31 – CROMATOPLACAS DA ANÁLISE DO PRODUTO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO. ....	120
FIGURA 32 – ISOMERIZAÇÃO DO ANEL LACTÔNICO NA POSIÇÃO C-17.....	122
FIGURA 33 – ANÁLISE RETROSSINTÉTICA DO INTERMEDIÁRIO CHAVE (1F). ....	123
FIGURA 34 – ROTA ALTERNATIVA PARA OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 1F A PARTIR DE 1A. ....	126
FIGURA 35 – MECANISMO DA REAÇÃO COM CLORETO DE P-TOLUENOSSULFONILA.....	127
FIGURA 36 – CROMATOPLACAS DA ANÁLISE DO PRODUTO DA REAÇÃO DE TOSILAÇÃO.....	129
FIGURA 37 – ANÁLISE RETROSSINTÉTICA ALTERNATIVA PARA OBTENÇÃO DE 1E. ....	134
FIGURA 38 – PROPOSTA DE MECANISMO DA REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE UM INTERMEDIÁRIO IODADO.....	135
FIGURA 39 – MECANISMO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO COM TRIFENILFOSFINA. ....	138
FIGURA 40 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS ALÍQUOTAS RECOLHIDAS DURANTE O ESTUDO DA CINÉTICA DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 1F. ....	139
FIGURA 41 – ESPECTRO DE MASSAS NO MODO ESI-POSITIVO PARA O PICO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 5,61 MINUTOS. ....	140
FIGURA 42 – RESULTADO DA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO MEIO REACIONAL APÓS 6 HORAS DE REAÇÃO.....	141
FIGURA 43 – ESPECTRO DE MASSAS NO MODO ESI-POSITIVO REFERENTE AO PICO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 6,31 MINUTOS. ....	142
FIGURA 44 – ESQUEMA GERAL DA MARCHA QUÍMICA APLICADA NA PURIFICAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 1F. ...	143
FIGURA 45 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO MATERIAL OBTIDO APÓS APLICAÇÃO DA MARCHA QUÍMICA DE ELABORAÇÃO DA REAÇÃO EMPREGANDO CADA UMA DAS PROPOSTAS. ....	145
FIGURA 46 – SOBREPOSIÇÃO DOS MODELOS CONSTRUÍDOS (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , A <sub>4</sub> ) E DO MOLDE SELECIONADO (3A3Y). .....	155
FIGURA 47- PRINCIPAIS RESÍDUOS QUE COMPÕEM A CAVIDADE DE LIGAÇÃO DOS GC NAS ISOFORMAS A <sub>1</sub> E A <sub>3</sub> . .....	159
FIGURA 48 – SOBREPOSIÇÃO DA CONFORMAÇÃO DE MENOR ENERGIA DE C-17 AO LIGANTE CRISTALOGRÁFICO NA CAVIDADE DE LIGAÇÃO DA ISOFORMA A <sub>1</sub> .....	161
FIGURA 49 – SOBREPOSIÇÃO DAS CONFORMAÇÕES DE MENOR ENERGIA DA OUABAÍNA AO LIGANTE CRISTALOGRÁFICO NA CAVIDADE DE LIGAÇÃO DA ISOFORMAS A <sub>1</sub> .....	162
FIGURA 50 – SOBREPOSIÇÃO DA CONFORMAÇÃO DE MENOR ENERGIA DA OUABAÍNA AO LIGANTE CRISTALOGRÁFICO INSERIDO NO MODELO CONSTRUÍDO PARA A <sub>1</sub> E A <sub>3</sub> .....	164
FIGURA 51 – SOBREPOSIÇÃO DAS POSES MAIS FAVORÁVEIS PARA OS DERIVADOS 1J – 1R.....	180
FIGURA 52 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES ESTABELECIDAS PELAS LIGANTES 1N (A), 1P (B) E 1Q (C) EM AMBAS AS ISOFORMAS.....	182

FIGURA 53 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES ESTABELECIDAS PELO LIGANTE 1J (A) E 1L (B) NA CAVIDADE DE LIGAÇÃO DAS ISOFORMAS A <sub>1</sub> E A <sub>3</sub> .....	183
FIGURA 54 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES ESTABELECIDAS PELO LIGANTE 1K EM AMBAS AS ISOFORMAS.....	184
FIGURA 55 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES ESTABELECIDAS PELO LIGANTE 1M EM AMBAS AS ISOFORMAS.....	185
FIGURA 56 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES ESTABELECIDAS PELO LIGANTE 1O EM AMBAS AS ISOFORMAS.....	185
FIGURA 57 – REPRESENTAÇÃO DAS PRINCIPAIS INTERAÇÕES ESTABELECIDAS PELO LIGANTE 1R EM AMBAS AS ISOFORMAS.....	186

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS AGLICONAS DOS CARDENOLÍDEOS DIGITÁLICOS DE ACORDO COM O GRAU DE SUBSTITUIÇÃO NO NÚCLEO ESTEROIDAL. ....	54
TABELA 2 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DAS ANÁLISES POR UPLC-PAD-ESI-MS. ....	79
TABELA 3 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISES DOS DERIVADOS OBTIDOS. ....	80
TABELA 4 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA COLUNA DE PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE HIDRÓLISE. ....	84
TABELA 5 – CONDIÇÕES TESTADAS NAS ETAPAS 2 E 3 NO PROCESSO DE ELABORAÇÃO DA REAÇÃO VI. ....	144
TABELA 6 – SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS DAS ISOFORMAS. ....	148
TABELA 7 – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE SIMILARIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS ISOFORMAS E DO CRISTAL 3A3Y. ....	150
TABELA 8 – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DOS MODELOS CONSTRUÍDOS UTILIZANDO OS SERVIDORES MOLPROBITY, SAVES E PROSA-WEB. ....	154
TABELA 9 – VALORES DE RMSD (Å) REFERENTES À COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES ISOFORMAS MODELADAS. ....	156
TABELA 10 – ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS SELECIONADAS COMO “ATIVAS”. ....	164
TABELA 11 – DERIVADOS SELECIONADOS NA SIMULAÇÃO DE ANCORAGEM FRENTE A ISOFORMA A <sub>1</sub> . ....	171
TABELA 12 – DERIVADOS SELECIONADOS NA SIMULAÇÃO DE ANCORAGEM FRENTE A ISOFORMA A <sub>3</sub> . ....	173
TABELA 13 – ESTRUTURA DOS DERIVADOS PROPOSTOS PARA A SÍNTESE. ....	179
TABELA 14 – PONTUAÇÃO DE ENCAIXE DAS POSES SELECIONADAS E OBSERVÂNCIA QUANTO AS INTERAÇÕES MAIS COMUNS. ....	181

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ACN	Acetonitrila
ALA	Alanina
AM1	Austin Model 1
ASP	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Grau Celsius
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% das células saudáveis
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% da população testada
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
d.C.	Depois de Cristo
d.i.	Diâmetro interno
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMT	Dose Máxima Tolerada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
eV	Elétron-volts
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HeLa	Linhagem de células tumorais imortalizadas
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSV-1	<i>Herpes Simplex Virus Type 1</i>
HSV-2	<i>Herpes Simplex Virus Type 2</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IS	Índice de Seletividade
kV	Quilovolt
LBDD	<i>Ligand Based Drug Design</i>
mg	Miligramas
mL	Mililitros

mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetros
mmols	Milimols
m/v	Massa por volume
m/z	Relação entre a massa e a carga
MM	Massa molar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Nº	Número
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetros
PDA	Detector de arranjo de fotiodo
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PHE	Fenilalanina
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
PPH <sub>3</sub>	Trifenilfosfina
RMSD	<i>Root Mean Square Derivation</i>
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
Rf	<i>Retention Factor</i>
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SBDD	<i>Structure Based Drug Design</i>
THF	Tetraidrofurano
µM	Micromolar
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
VERO	Cultura de células de rim de macaco-verde africano
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Principal .....	22
2.2	Objetivos Específicos .....	22
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E PLANO DE SÍNTESE.....	23
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	36
4.1	Estratégias no Desenvolvimento de Novos Fármacos .....	36
4.2	Simulações de Ancoragem Molecular (Molecular Docking).....	40
4.2.1	Modelagem da Biomolécula Receptora.....	45
4.3	Glicosídeos Cardiotônicos.....	48
4.3.1	Atividade Citotóxica, Antitumoral e Anticâncer dos GC .....	56
4.3.2	Atividade Antiviral dos GC.....	61
4.4	Bomba Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase .....	64
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
5.1	Equipamentos .....	75
5.2	Solventes e Reagentes .....	75
5.3	Vidrarias e Materiais Diversos.....	76
5.4	Solventes e Reagentes .....	77
5.5	Agentes Reveladores.....	77
5.6	Identificação e Caracterização dos Derivados.....	78
5.6.1	Análises por UPLC-PAD-ESI-MS .....	78
5.6.2	Análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	79
5.7	Síntese dos Derivados .....	81
5.7.1	Obtenção de Extrato Enriquecido em Cardenólídeos da Série A .....	81
5.7.2	Reação I – Hidrólise dos Glicosídeos Cardiotônicos .....	82

5.7.3	Reação II – Síntese da digitoxigenona .....	85
5.7.4	Reação III – Síntese da 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina .....	86
5.7.5	Reação IV – Síntese da 3 $\alpha$ -O-tosil-digitoxigenina .....	88
5.7.6	Reação V – Síntese da 3 $\beta$ -azido-3-desoxi-digitoxigenina .....	89
5.7.7	Reação VI – Síntese da 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina .....	90
5.7.8	Reação VII – Síntese da 3 $\beta$ -(cloroacetil)amino-3-desoxi-digitoxigenina .....	91
5.8	Análises in silico .....	93
5.8.1	Modelagem por Homologia .....	93
5.8.2	Preparo dos Ligantes .....	97
5.8.3	Simulações de Ancoragem Molecular (Molecular Docking) .....	97
5.8.4	Visualização e Análise dos Resultados do Docking .....	98
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
6.1	Síntese dos Derivados .....	99
6.1.1	Purificação de Extrato Enriquecido de Cardenolídeos da Série A .....	99
6.1.2	Reação I – Hidrólise dos Glicosídeos Cardiotônicos .....	101
6.1.3	Reação II – Síntese da digitoxigenona (1b).....	108
6.1.4	Reação III – Síntese da 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (1c) .....	111
6.1.5	Reação IV – 3 $\alpha$ -O-tosil-3-desoxi-digitoxigenina.....	123
6.1.6	Reação V – Síntese da 3 $\beta$ -azido-3-desoxi-digitoxigenina .....	129
6.1.7	Reação VI – Síntese da 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina .....	136
6.1.8	Reação VII – Primeiro Acoplamento .....	145
6.2	Análises in silico.....	147
6.2.1	Modelagem Por Homologia.....	147
6.2.2	Simulações de Ancoragem Molecular (Molecular Docking).....	160
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	188
	REFERÊNCIAS .....	191

APÊNDICE A .....	216
APÊNDICE B .....	238
APÊNDICE C .....	243
APÊNDICE D .....	15

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos do metabolismo secundário das espécies vegetais despertam o interesse, não só pelas atividades biológicas desencadeadas em resposta aos estímulos ambientais, mas também pela ampla variedade de propriedades farmacológicas, cosméticas, alimentícias e agroquímicas que essas substâncias podem manifestar.

No processo histórico da descoberta de plantas medicinais, muitas civilizações descreveram a utilização com fins curativos de ervas e outros vegetais em seus registros e manuscritos. Os primeiros dados literários sobre a utilização de espécies vegetais na busca por alívio e cura de doenças são datados de mais de 50.000 anos atrás. A obra História Natural do Brasil (do latim, *Historia Naturalis Brasiliae*), escrita pelo médico e naturalista holandês Guilherme Piso e publicada em 1648, foi o primeiro livro médico a documentar as propriedades terapêuticas e toxicológicas de uma extensa variedade de plantas medicinais da flora brasileira (Devienne *et al.*, 2004; Berlinck, 2012).

O profundo conhecimento das propriedades úteis ou nocivas dos elementos da natureza, construído com base nas investigações empíricas dos povos nativos, pode ser considerado a base fundamental para identificação de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. Diante desse diversificado e inesgotável arsenal terapêutico é que se iniciam os estudos fitoquímicos, dedicando-se a investigação de plantas consagradas pelo uso popular – geralmente incorporadas às farmacopeias da época – e limitando-se ao isolamento, purificação e à determinação estrutural das substâncias. Muitas dessas substâncias ativas que foram identificadas e introduzidas na terapêutica em meados do século XIX seguem sendo empregadas até os dias atuais, como a morfina, a quinina, cânfora, cloroquina e a emetina (Montanari & Bolzani, 2001; Duarte, 2005; Viegas Jr. *et al.*, 2006; Tomazzoni *et al.*, 2006; Oliveira & Szczerbowski, 2009; Krafts *et al.*, 2012; Katz & Baltz, 2016).

A química orgânica sintética – que nasceu como uma ferramenta importante dos estudos fitoquímicos para confirmação das estruturas moleculares das substâncias – alcançou um elevado grau de maturidade no período da II Guerra Mundial devido ao maciço investimento na área por parte dos centros de pesquisa

militar, motivada pela necessidade da descoberta de novas substâncias ativas para o tratamento de infecções e outras enfermidades advindas do momento de conflito em que o mundo se encontrava. Desse modo, o período pós-guerra foi de prosperidade para o desenvolvimento dos fármacos sintéticos. Como consequência, nessa mesma época, a química dos produtos naturais enfrentou um período de declínio em termos de investimento e interesse, deixando de ocupar um papel de destaque no cenário farmacêutico mundial e passando a se dedicar aos estudos de ecologia bioquímica e biossíntese dos metabólitos (Viegas Jr. *et al.*, 2006).

Apesar do grande número de novas entidades químicas sintetizadas visando a busca por novos fármacos, o processo se mostrou demasiadamente dispendioso, tendo em vista o pequeno número de novos compostos que eram capazes de vencer as etapas pré-clínicas e clínicas e chegar ao mercado de medicamentos. É nesse contexto que as indústrias farmacêuticas passam por uma mudança de paradigma e começam a investir em técnicas de biologia molecular, que permitiram o isolamento e a purificação de muitas das macromoléculas diretamente associadas aos processos patológicos e que se configuram como autênticos alvos-moleculares para os novos fármacos (Viegas Jr. *et al.*, 2006; Harvey *et al.*, 2015).

Paralelamente, o desenvolvimento de sistemas de triagem de alta eficiência (do inglês, *HTS - High Throughput Screening*) possibilitaram a avaliação *in vitro* da atividade biológica de milhares de novas substâncias de forma simultânea, o que impulsionou o desenvolvimento de novas técnicas de síntese que fossem capazes de gerar uma quantidade muito maior de novas entidades químicas. Nesse momento, com o nascimento da química combinatória, os investimentos farmacêuticos deixaram de focar no desenvolvimento de novos fármacos a partir de estratégias racionais da química farmacêutica e medicinal e passaram a construir enormes quimiotecas, compostas por milhares de novas substâncias geradas pela combinação aleatória de reagentes químicos (Dias & Corrêa, 2001; Katz & Baltz, 2016).

Ao longo da evolução, as micromoléculas do metabolismo secundário das espécies vegetais foram sendo moldadas para se tornarem capazes de interagir com os alvos biológicos de predadores e parasitas, garantindo a perpetuação da espécie, o que acabou resultando na formação de um acervo de substâncias que apresentam uma variedade e complexidade estrutural gigantesca que não pôde ser facilmente

reproduzida pelas estratégias sintéticas ora disponíveis. Assim, apesar das expectativas depositadas nos avanços tecnológicos observados naquele período, a química combinatória não foi capaz de se estabelecer como uma fonte primária na descoberta de novos candidatos a fármacos inovadores. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas mais avançadas de isolamento e elucidação estrutural – principalmente pelos métodos analíticos hifenados – e a disponibilidade de um vasto universo de espécies de plantas superiores ainda pouco estudado, contribuíram para que os produtos naturais recuperassem novamente seu espaço e importância na indústria farmacêutica, gerando um expressivo investimento em pesquisas de bioprospecção para identificação de novas substâncias de origem natural que fossem promissoras, seja *per-se*, seja como fonte de inspiração para descoberta de novos padrões moleculares bioativos (Montanari & Bolzani, 2001; Viegas Jr. *et al.*, 2006; Harvey *et al.*, 2015; Beutler, 2019; Zhang, 2020).

O retorno do interesse pelos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos pode ser comprovado pelo número de novos medicamentos aprovados junto à Agência de Vigilância Sanitária Norte Americana (do inglês, *FDA – Food and Drug Administration*). Segundo levantamento realizado por Cragg e colaboradores, durante os anos de 1981 a 2019 foram aprovados ao todo 1881 novos fármacos, dentre esses aproximadamente 66,4% derivam direta ou indiretamente de fontes naturais, principalmente de espécies vegetais (Newman & Gragg, 2020).

Nesse contexto se insere o presente trabalho, que explora o potencial terapêutico dos glicosídeos digitálicos, fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Essas substâncias vêm despertando a atenção da comunidade científica ao longo dos anos devido ao aumento exponencial de artigos científicos publicados relatando outras atividades biológicas, como a potente ação citotóxica e anti-herpética. A título de exemplo, em uma triagem de alto rendimento realizada com mais de 9.000 compostos apresentando aplicação terapêutica definida, os glicosídeos digitálicos estavam entre os inibidores mais potentes de genes relacionados ao câncer de próstata. Em outra grande investigação, Lindholm e colaboradores (2002) detectaram sete extratos de espécies vegetais com potencial atividade antitumoral. Dentre eles, três correspondiam a espécies produtoras de digitálicos: *Digitalis lanata*, *Digitalis purpurea* e *Helleborus cyclophyllus* (Johnson *et al.*, 2002; Lindholm *et al.*, 2002).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Principal**

Nesse trabalho objetivou-se o planejamento racional de derivados de glicosídeos cardioativos com potencial atividade inibidora da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase por meio de estudos de modelagem molecular, bem como a síntese e caracterização estrutural.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1 Executar simulações de ancoragem molecular envolvendo uma série de glicosídeos cardioativos e de novos derivados com diferentes amino-grupos acoplados na posição C-3 do núcleo esteroidal a fim de predizer a afinidade e o modo de ligação frente a diferentes isoformas da subunidade alfa da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

2.2.2 Sintetizar e caracterizar os compostos selecionados a partir das simulações.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E PLANO DE SÍNTESE

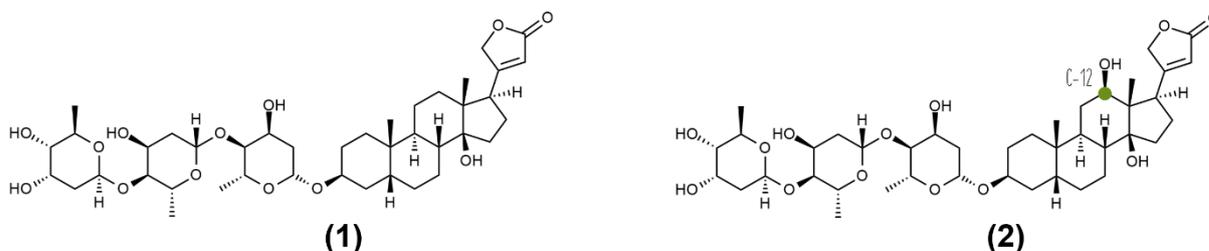
Os glicosídeos cardiotônicos são conhecidos como um grupo de substâncias que inibem seletivamente a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e promovem um efeito inotrópico positivo. Essa habilidade contribuiu para que os representantes dessa classe fossem usados ao longo dos anos no tratamento da ICC. O principal representante dessa classe e o único fármaco ainda empregado clinicamente no tratamento da ICC é a digoxina, embora não assuma mais um papel de destaque no mercado de fármacos no âmbito da cardiologia. O principal obstáculo no uso dessas substâncias está relacionado aos efeitos cardiotóxicos associados ao baixo índice terapêutico. Para os glicosídeos cardiotônicos, o intervalo entre as doses terapêuticas máxima e mínima (DTMin e DTMax, respectivamente) varia em torno de apenas 0,5 ng/mL. A maioria dos pacientes com sintomas de intoxicação apresenta uma concentração sérica em torno de 2,0 ng/mL, mas alguns sintomas de intoxicação podem ser observados quando a concentração sanguínea de digoxina estiver cerca de 10% acima da DTMax (Mijatovic *et al.*, 2007; Ziff & Kotecha, 2016).

Essa limitação levou os glicosídeos cardiotônicos a assumir um papel de coadjuvantes na perspectiva farmacêutica. A digoxina é atualmente empregada como uma estratégia terapêutica adicional, indicada para pacientes com insuficiência cardíaca e/ou que apresentam função sistólica prejudicada e continuam apresentando sinais e sintomas. Dessa forma, contribui na redução da frequência de internações, mas não exerce efeitos significativos na redução da mortalidade dos pacientes acometidos por esses distúrbios cardíacos (Mijatovic *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2018).

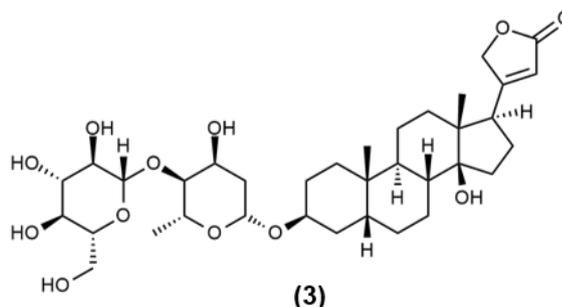
O reposicionamento de substâncias dessa classe no tratamento de outras doenças, como o câncer e infecções virais é uma perspectiva que se apresenta. Essa estratégia é empregada para agilizar o processo de desenvolvimento de novos fármacos e visa identificar aplicações fora do escopo da indicação medicinal original para fármacos que já apresentam uso terapêutico bem consolidado. A vantagem mais notória dessa abordagem se respalda na redução do tempo de desenvolvimento do medicamento, sem propiciar um aumento dos riscos associados, visto que os candidatos analisados com frequência já passaram por vários estágios de estudos clínicos e, portanto, informações sobre a segurança e os perfis farmacocinéticos já são conhecidos. Diante dessa expectativa de simplificar o processo no

desenvolvimento de novos medicamentos, essa abordagem fornece um incentivo ao processo de descoberta de novas abordagens medicamentosas para patologias que, apesar dos evidentes avanços científicos e tecnológicos das indústrias farmacêuticas, ainda intrigam os cientistas e não possuem um tratamento idôneo. Fibromialgia, doença de Alzheimer, vitiligo, alguns tipos de câncer e algumas infecções virais, são algumas das doenças que, embora disponham de tratamentos que amenizam os sinais e sintomas relacionados, ainda não possuem uma terapia capaz de debelar a doença (Ashburn & Thor, 2004; Langedijk *et al.*, 2015; Kreis, 2017).

Nesse contexto, Su e colaboradores (2008) submeteram 960 substâncias bioativas aprovadas pelo FDA em uma triagem antiviral que trouxe à luz a atividade anti-herpética exercida por dois glicosídeos cardiotônicos bastante conhecidos clinicamente: digitoxina (**1**) e a digoxina (**2**). A digoxina (série C) se difere estruturalmente da digitoxina (série A) em apenas uma hidroxila situada na posição C-12 $\beta$  do núcleo esteroidal. Essa diferença, embora discreta, confere propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas substancialmente distintas às duas substâncias (Haux, 1999; Su *et al.*, 2008).



Diante desse resultado, colaboradores do nosso grupo de pesquisa reuniram 65 derivados cardenólídeos – que foram obtidos por síntese total, semissíntese, biotransformação ou que foram isolados de espécies vegetais – e os avaliaram em estudos *in vitro* para investigação quanto ao potencial anti-herpético apresentado por essas substâncias. Dentre esses, um dissacarídeo da digitoxigenina (série A), conhecido como glicoevatromonosídeo (**3**), se destacou pela potente atividade frente cepa 29-R do vírus HSV-1 ( $CI_{50} = 0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ;  $IS = 4.566$ ) – cepa resistente à ação do aciclovir – e frente a cepa 333 do vírus HSV-2 ( $CI_{50} = 0,04 \pm 0,00 \mu\text{M}$ ;  $IS > 6.250$ ), cepa responsável pelas manifestações genitais da doença (Bertol *et al.*, 2011).

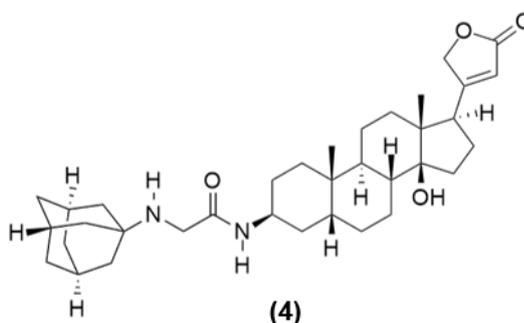


Diferente aplicação, no entanto, já havia sido proposta para essas duas substâncias congêneres (1 e 2). As primeiras evidências *in vitro* dos efeitos citotóxicos ocasionados por ação desses glicosídeos cardiotônicos foram descritas na segunda metade da década de 1960. Mais de 15 anos depois, Stenkvisst e colaboradores (1979) relataram, em um estudo epidemiológico, que mulheres mastectomizadas – em decorrência do câncer de mama – que eram tratadas concomitantemente com glicosídeos cardiotônicos para o controle de problemas cardíacos, apresentavam cerca de dez vezes menos chance de recorrência da doença do que pacientes que não eram submetidas ao tratamento com essas substâncias. O número de pacientes contempladas no estudo, não era, entretanto, expressivo o suficiente para corroborar a hipótese levantada. Duas décadas depois, os estudos conduzidos por um grupo de pesquisadores noruegueses – abrangendo ao todo 9.271 pacientes – forneceram evidências robustas de que a digitoxina, em concentração sanguínea terapêutica, era capaz de desencadear efeitos apoptóticos em diferentes linhagens de células tumorais malignas, sem afetar as células normais que apresentam alta taxa de proliferação. Essa observação contesta estudos anteriores que alegavam que as doses necessárias para obtenção de efeitos anticâncer em humanos estaria acima da dose terapêutica usualmente administrada na clínica, o que inviabilizaria a aplicação dessas substâncias como agentes antitumorais (Stenkvisst *et al.*, 1979; Stenkvisst, 1980; Stenkvisst, 1999; Haux, 1999; Haux, 2001; Elbaz, 2012).

Esses promissores relatos iniciais foram suficientes para encorajar outros grupos de pesquisa a aprofundar as análises sobre essa nova atividade dos glicosídeos cardiotônicos e vários estudos foram publicados nos últimos anos demonstrando os efeitos provocados por extratos vegetais, substâncias isoladas e derivados semissintéticos em diferentes tipos de câncer (Huang *et al.*, 2004; López-Lázaro *et al.*, 2005; Mijatovic *et al.*, 2006a,b; Kulikov *et al.*, 2007; Newman & Cragg, 2007; Mijatovic

*et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Elbaz *et al.*, 2012; Cerella *et al.*, 2013; De *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2017).

Diante desses relatos, os mesmos 65 cardenólídeos avaliados anteriormente para atividade antiviral, também foram testados *in vitro* frente a diferentes linhagens de células tumorais. Um derivado semissintético da digitoxigenina (série A), conhecido como amantadig (4), chamou a atenção dos nossos colaboradores pela sua expressiva atividade citotóxica frente células tumorais humanas de rins (A498, 786-O, Caki-1, Caki-2) e leucemia (SEM, K562) quando comparado com a própria digitoxina, cuja atividade fora anteriormente relatada (Carvalho, 2012; Nolte *et al.*, 2015; Nolte *et al.*, 2017).



Na tentativa de esclarecer a relação entre a estrutura química desses derivados cardenólídeos e suas atividades biológicas, nossos colaboradores realizaram ensaios de inibição *in silico* e *in vitro* da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, incluindo estudos de *docking* molecular, permitindo-nos assim, compreender melhor as nuances da interação dessas substâncias com o sítio de ligação.

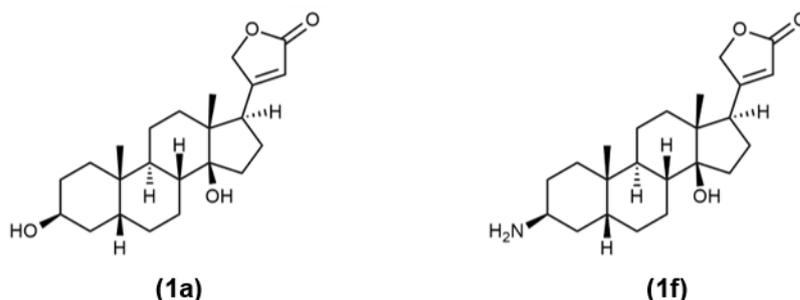
Diversos estudos anteriores já haviam relatado que a cadeia lateral de açúcares não é essencial para a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ao contrário de alguns elementos no núcleo esteroidal, como o grupo hidroxila na posição C-14 $\beta$  e o anel lactônico em C-17 $\beta$ , cuja ausência ou epimerização resultam em um efeito deletério. A união entre os anéis – A, B, C e D – deve apresentar uma junção do tipo *cis/trans/cis*, induzindo assim uma inclinação do núcleo esteroidal que contribui para um encaixe mais efetivo no sítio de ligação. Com esse arranjo, a superfície alfa ( $\alpha$ ) dessa porção da molécula consegue se acomodar na cavidade de tal forma que uma complementariedade com os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos é estabelecida, ao passo que a superfície beta ( $\beta$ ) se posiciona para favorecer a interação dos grupos substituintes hidroxila com

os resíduos mais hidrofílicos (Ogawa *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2018).

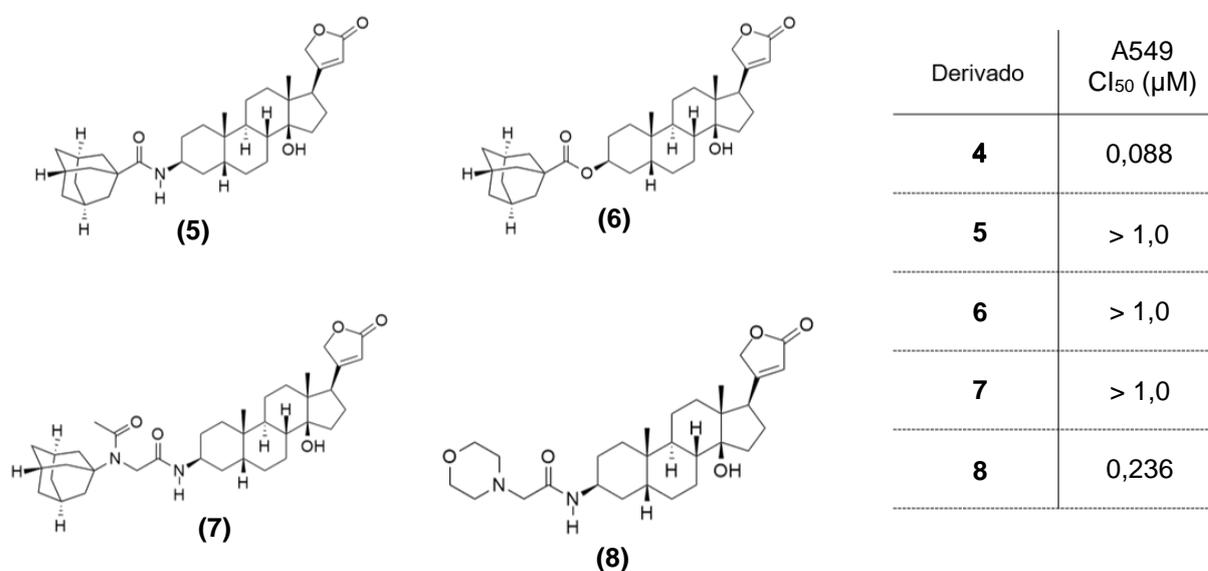
As agliconas dos heterosídeos cardiotônicos são divididas em séries de acordo com o grau de oxigenação do núcleo esteroidal. Diferentes grupos substituintes inseridos no esqueleto dessas agliconas podem, no entanto, ocasionar um grande impacto na orientação adequada da molécula na cavidade do complexo enzimático e prejudicar a formação do complexo inibidor da enzima. A introdução de um grupo hidroxila nas posições C-11, C-12 e C-16 do núcleo esteroidal geralmente resulta em uma ligeira diminuição na afinidade de ligação. Com efeito, a digitoxina possui uma afinidade de ligação cerca de quatro vezes maior do que a digoxina, que apresenta um grupo hidroxila estericamente desfavorável na posição C-12 (Paula *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2018).

O derivado semissintético amantadig (**4**) e o glicosídeo natural digitoxina se diferem quanto ao grupo substituinte da posição C-3 do esqueleto esteroidal. A 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**) – aglicona da digitoxina – apresenta um grupo hidroxila nessa posição do núcleo, ao passo que a 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina (**1f**) – “aglicona” do amantadig – possui um grupo amino. A mudança do grupo substituinte nessa posição C-3 $\beta$  não resulta em diferença substancial na afinidade de ligação dessas substâncias (resultados não divulgados). No entanto, uma vez administrados no organismo, os fármacos podem ser biotransformados por ação de diferentes enzimas com a finalidade de facilitar o processo de eliminação e excreção dessas substâncias. Embora alguns metabólitos formados por meio dessas reações do metabolismo sejam mais ativos do que as moléculas originais, a grande maioria dos metabólitos gerados é inativa e de natureza mais polar, sendo majoritariamente excretada pelos rins, na urina. Nesse contexto, o acoplamento da cadeia lateral do derivado amantadig por meio de um grupo amino confere uma vantagem estrutural a esse derivado. O grupo amida resultante apresenta menor susceptibilidade a hidrólise exercida pela ação das hidrolases humanas do que o grupo éster, que seria gerado caso a cadeia lateral do amantadig fosse acoplada por meio da hidroxila observada na 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**). Dessa forma, o derivado amantadig manteria sua integridade estrutural por um tempo mais prolongado – maior tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) – quando comparado ao seu análogo esterificado, proporcionando assim maior

biodisponibilidade e, conseqüentemente, doses menores e menos frequentes poderiam vir a ser necessárias (Nassar *et al.*, 2004; Carvalho, 2012; Boff *et al.*, 2019).



A cadeia lateral em C-3, presente no derivado semissintético amantadig, ainda possibilita duas inferências pertinentes para compreender o potencial citotóxico dessa substância. Entre derivados análogos que possuem o grupo adamantina (**5**, **6**, e **7**), apenas o derivado amantadig (**4**) apresenta atividade citotóxica frente a células tumorais de pulmão (A549). Por outro lado, o derivado **8** – que apresenta um grupo morfolina – também se mostrou mais ativo do que a digitoxina, embora ainda fosse cerca de 3 vezes menos ativo do que o amantadig. Essas constatações sugerem que o grupo amino na posição 4' da cadeia lateral desempenha um papel importante na atividade apresentada por esse derivado, uma vez que a acetilação desse grupo (**7**), indisponibiliza o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio, suprimindo o efeito citotóxico (Carvalho, 2012; Silva *et al.*, 2018).



Fonte: Carvalho, 2012 (adaptado).

O dissacarídeo da digitoxigenina (**3**) encontrado em espécies do gênero *Digitalis*, apontado anteriormente por seu promissor potencial anti-herpético, também foi submetido em ensaio *in vitro* para avaliação da atividade citotóxica frente a linhagem de células tumorais de pulmão (A549). O resultado obtido nessa análise sugere que esse glicosídeo seja aproximadamente 14 vezes mais citotóxico do que o fármaco antineoplásico paclitaxel ( $CI_{50} = 0,019 \pm 0,004 \mu\text{M}$  vs.  $CI_{50} = 0,26 \pm 0,070 \mu\text{M}$ ), empregado como controle positivo. Para avaliar a capacidade de **3** em desencadear os efeitos citotóxicos seletivamente em células tumorais, esse glicosídeo também foi avaliado frente a uma linhagem de células saudáveis (VERO) e se mostrou ser cerca de 14.400 vezes mais seletivo para as células A549 do que para as células VERO ( $CC_{50} = 273,95 \pm 46,46 \mu\text{M}$ ). O derivado semissintético amantadig (**4**) também foi avaliado nas mesmas condições descritas anteriormente e embora tenha se mostrado cerca de 5 vezes menos ativo e 46 vezes menos seletivo do que **3**, nenhuma correlação direta foi observada entre os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  obtidos para esses derivados ( $r^2 < 0,5$ ). Esse resultado evidencia a necessidade de análises complementares envolvendo células humanas saudáveis de pulmão (MRC-5) para avaliação mais fidedigna da seletividade dessas substâncias (Carvalho, 2012).

Análises do sítio de ligação dos glicosídeos cardiotônicos demonstram que os substituintes nas posições C-2 e C-3 do núcleo esteroidal interagem com uma porção da enzima capaz de acomodar adequadamente grupos substituintes mais extensos, – como as cadeias laterais observadas em **3** e **4** – sugerindo que modificações estruturais nessa porção da molécula representam uma estratégia interessante para obter substâncias com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (ADME-TOX) mais desejáveis a candidatos a fármacos. A presença de vários grupos hidroxila nas moléculas dos açúcares que formam a cadeia lateral de glicosídeos, como **3**, tornam, no entanto, a aplicação dessas substâncias em reações de semissíntese uma opção mais laboriosa e pouco seletiva, resultando muitas vezes em uma mistura complexa de substâncias de difícil separação (Mijatovic *et al.*, 2012).

Dessa forma, munidos dessas informações, e considerando que além de cadeia lateral osídica não ser essencial para a atividade citotóxica, o derivado **4** apresentou elevada citotoxicidade frente a diferentes linhagens de células tumorais, esse derivado semissintético foi selecionado como protótipo para a síntese de uma série de

derivados estruturalmente semelhantes, apresentando diferentes grupos substituintes na posição alfa-carbonílica, visando a obtenção de substâncias capazes de conservar o potencial citotóxico apresentado por esse derivado, sem, no entanto, apresentar algumas características negativas associadas, como a baixa seletividade aparente.

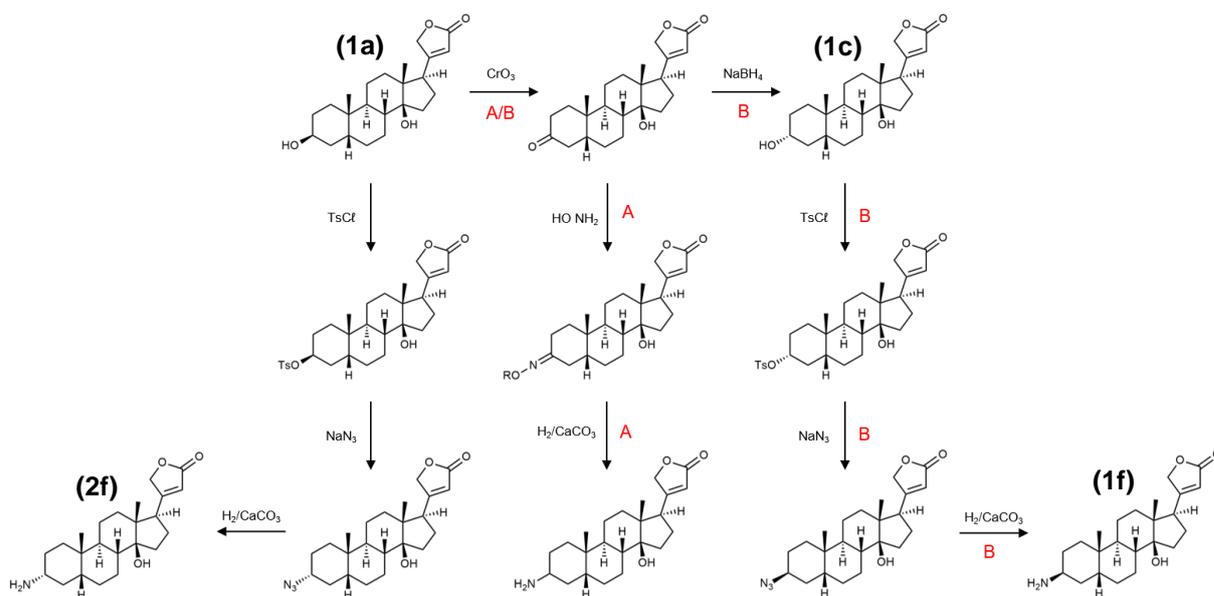
A etapa chave para obtenção desses derivados consiste na síntese do intermediário 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina (**1f**), que apresenta um grupo amino na posição C-3 $\beta$ , substituinte este que não é observado em nenhum glicosídeo cardiotônico naturalmente encontrado nas espécies produtoras desses metabólitos. A ausência de grupos substituintes nas posições C-12 e C-16, no entanto, torna esse intermediário estruturalmente muito semelhante a 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina, que só se diferencia pelo grupo hidroxila da posição C-3 $\beta$ . O núcleo esteroidal dessa aglicona – assim como de todas as agliconas desses metabólitos – apresenta uma disposição estrutural que se difere dos demais esteroides em três características principais: (1) os anéis C e D se fundem em uma conformação *cis* – menos estável; (2) o grupo hidroxila em C-14 $\beta$  e (3) o substituinte em C-17 $\beta$  que estão orientados termodinamicamente na configuração menos estável. Essas particularidades estruturais, somadas a existência de oito centros quirais, fez com que a síntese total enantiosseletiva dessa aglicona – descrita pela primeira vez em 1996 por Stork e colaboradores – envolvesse uma longa rota sintética, incluindo cerca de 30 etapas e um rendimento global inferior a 0,5% (Stork *et al.*, 1996; Honma & Nakada, 2007).

Por essa razão, planejar a síntese total do intermediário chave não se mostrou uma estratégia adequada para iniciar a síntese dos derivados propostos. Felizmente, as duas principais espécies vegetais que abastecem o mercado de glicosídeos cardiotônicos – obtidos exclusivamente de fontes naturais – produzem esses metabólitos em concentrações apreciáveis, dependendo das condições de cultivo. As folhas secas da espécie *D. purpurea* contêm, no mínimo, 0,3% de heterosídeos cardiotônicos, enquanto as folhas secas da espécie *D. lanata*, chegam a conter um teor superior a 1% desses metabólitos, expressos como digitoxina (Bruneton, 2009).

Em 1972, Sawlewicz e colaboradores, propuseram duas possíveis abordagens para a obtenção do intermediário chave usando **1a** como substrato de partida (**Figura 1**). A primeira delas (rota A) consistia na oxidação de **1a**, seguida de uma reação com hidroxilamina e redução do grupo oxima formado, resultando na formação de uma

mistura dos epímeros  $3\beta$  e  $3\alpha$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina (**1f** e **2f**), respectivamente). A segunda opção (rota B), por sua vez, consistia em reações sequências de oxidação, redução, tosilção, azidação e redução seletiva do grupo azida e, embora, envolvesse duas etapas a mais do que a primeira opção, fornecia exclusivamente o intermediário **1f** (Sawlewicz *et al.*, 1972).

**Figura 1 – Abordagens sintéticas para obtenção do intermediário chave (1f) da síntese dos derivados propostos.**



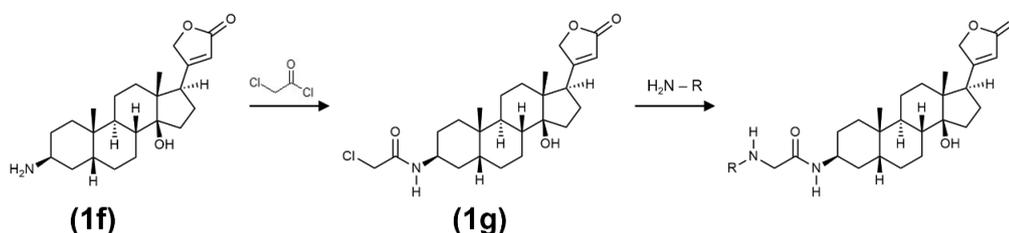
**Fonte:** Sawlewicz *et al.*, 1972 (adaptado).

Diante do exposto, optou-se por aplicar a rota sintética B com algumas adaptações. Para obtenção da  $3\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**) foi proposto a aplicação do método descrito por Pádua e colaboradores (2003), envolvendo a hidrólise da digitoxina em meio ácido. Como material de partida, no entanto, sugeriu-se empregar uma mistura de glicosídeos cardiotônicos da série A. Para obtenção dessa mistura foi proposto tomar como base as metodologias sugeridas por Munkert (2016), Ottoni (2018) e Ramos (2018), partindo-se de um extrato metanólico seco de folhas da espécie *D. lanata*, obtido após isolamento industrial da digoxina (Hausmann *et al.*, 1997; Pádua, 2003; Pádua *et al.*, 2005; Munkert, 2016; Ottoni, 2018; Ramos, 2018; Boff *et al.*, 2019).

As demais etapas necessárias para obtenção do derivado semissintético estruturalmente semelhantes ao amantadig (**Figura 2**) foram propostas por Munkert

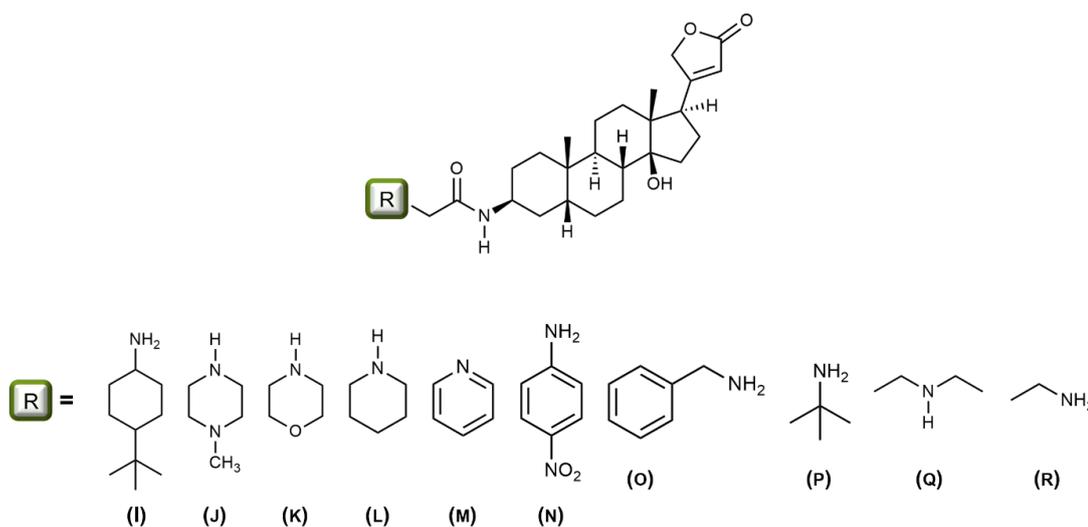
(2016) e se fundamentam na metodologia descrita por Villhauer e colaboradores (2003) e na patente WO2013000286 (Villhauer *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2013; Munkert, 2016).

**Figura 2 – Abordagens sintéticas para obtenção do intermediário eletrófilico (1g) e dos derivados propostos (1i - 1r).**



Além do grupo adamantina, para a última etapa da rota sintética também foi proposto o acoplamento de dez diferentes amino-compostos (I – R) na posição 4' da cadeia lateral (**Figura 3**). Todas essas aminas selecionadas estavam disponíveis comercialmente. Dentre elas algumas aminas menos reativas, como a 4-nitroanilina (**N**), cujo par de elétrons não-compartilhados do átomo de nitrogênio está comprometido pela ressonância estendida até o grupo nitro *para*-posicionado, tornando esse grupo amino muito menos propenso a atuar como nucleófilo em reações de substituição nucleofílica.

**Figura 3 – Estrutura geral dos derivados propostos e os amino-compostos selecionados para reação final de acoplamento.**

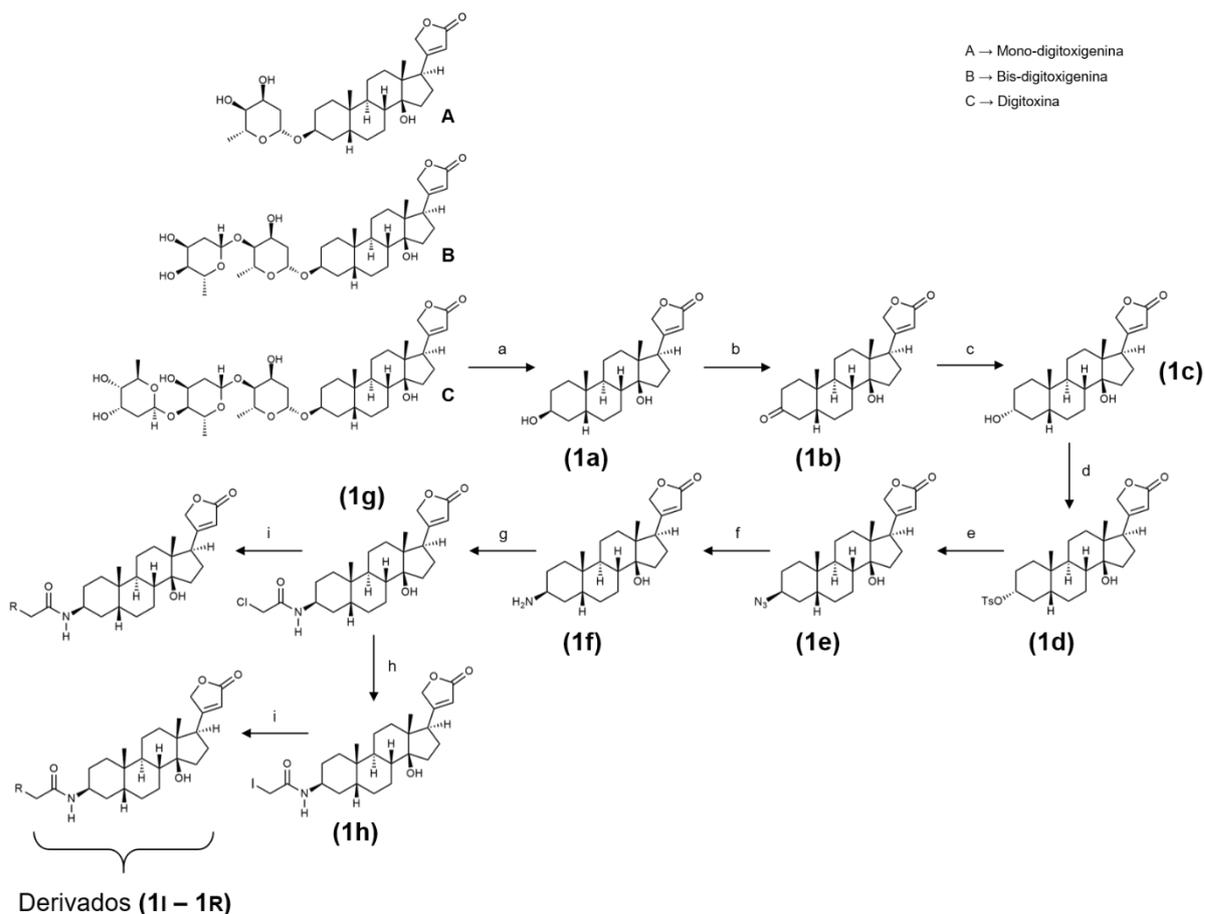


Villhauer e colaboradores (2003) também discorreram sobre alguns reagentes amina não serem capazes de reagir prontamente com o haleto de alquila proposto empregando-se condições reacionais mais brandas e propuseram a substituição do átomo de cloro por um grupo abandonador mais estável, como os íons brometo e iodeto, acentuando assim o caráter eletrofílico do substrato empregado. As reações envolvendo a troca de um halogênio por outro são chamadas de reações de Finkelstein e, embora consistam em reações de equilíbrio, onde os halogenetos envolvidos podem atuar tanto como nucleófilos, quanto como grupos abandonadores, a conversão desejada pode ser alcançada explorando a solubilidade diferencial dos sais de haletos, ou empregando um grande excesso do sal do haleto reagente. Esse tipo de reação é frequentemente aplicado com sucesso quando estão envolvidos haletos primários como (**1g**) e, portanto, se configura como uma alternativa relativamente simples para aumentar a reatividade desse intermediário eletrofílico (Finkelstein, 1910).

Sendo assim, considerando que algumas outras aminas selecionadas também possam vir a apresentar maior dificuldade em exercer o ataque nucleofílico esperado, também foi cogitada a possibilidade de converter previamente o intermediário **1g**, substituindo o cloreto pelo iodeto como grupo abandonador para obtenção de um substrato ainda mais eletrofílico e mais susceptível às reações de substituição previstas para obtenção dos derivados planejados. A clássica reação de Finkelstein envolve a conversão de um cloreto de alquila ou brometo de alquila para um iodeto de alquila mediante o tratamento do substrato empregado com solução de iodeto de sódio (NaI) em acetona. Para obtenção desse derivado, foi considerado adotar a metodologia proposta por Ramos (2018) envolvendo iodeto de potássio (KI) em acetonitrila (Ramos, 2018).

Dessa forma, no presente trabalho, a síntese da série de derivados semissintéticos da digitoxigenina (**1I – 1R**) foi planejada de acordo com o esquema apresentado na **Figura 4**. A estratégia sintética adotada contempla uma sequência reacional que se inicia com a hidrólise ácida de glicosídeos cardioativos da série A para obtenção da 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**).

**Figura 4 – Rota de síntese proposta para obtenção dos derivados estruturalmente semelhantes ao amatandig.**



**Reagentes e condições reacionais:** **a.** HCl 1M, MeOH, 55 °C, 35 min.; **b.** CrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (reagente de Jones), acetona, 0 °C, 20 min.; **c.** NaBH<sub>4</sub>, dioxano/H<sub>2</sub>O (8:2), - 20 °C, 90 min.; **d.** TsCl, piridina, 22 °C, 20 h.; **e.** NaN<sub>3</sub>, DMF, 75 °C, 7 h.; **f.** PPh<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O (5:1), 60 °C, 14 h.; **g.** ClCH<sub>2</sub>COCl, THF, t.a., 3 h.; **h.** KI, ACN, 70 °C, 24 h.; **i.** reagente I–R (Figura 3), ACN, DIPEA, 70 °C, 24 h.

A proposta para a modificação molecular de **1a** até obtenção do intermediário chave (**1f**) é constituída por cinco etapas reacionais, iniciando com a submissão desse substrato a reações sequenciais de oxidação e redução – adotando ácido crômico como agente oxidante e borohidreto de sódio como agente redutor – para obtenção do epímero correspondente, que apresenta o grupo hidroxila em configuração R na posição C-3 do núcleo esteroidal. Em seguida, a ativação desse grupo hidroxila via reação de tosilção fornece um intermediário capaz de atuar como substrato eletrofílico na reação subsequente com azida de sódio em DMF. A redução do produto dessa reação (**1e**) seria então realizada via reação de Staudinger, assumindo a

trifenilfosfina como agente redutor, fornecendo como produto o intermediário desejado (**1f**), que apresenta o grupo amino em C-3, configuração relevante para atividade dessas substâncias (equatorial).

Em seguida, foi proposta a síntese do segundo intermediário eletrofílico (**1g**), por meio da reação de **1f** com cloreto de cloroacetila. Por último, foi proposto a reação desse com iodeto de potássio para deslocamento do cloreto pelo iodeto, possibilitando a obtenção de um intermediário ainda mais reativo, capaz de interagir com nucleófilos mais fracos nas reações subsequentes.

O acoplamento das aminas selecionadas foi proposto para ocorrer por meio de um método geral que consiste em adicionar lentamente uma solução 0,3 mol/L da amina apropriada a uma solução previamente resfriada do intermediário eletrofílico mais adequado (**1g** ou **1h**), utilizando THF como solvente reacional. E a base de Hünig (N,N-Diisopropiletilamina – DIPEA) foi sugerida como a base a ser adicionada ao meio reacional com a finalidade de impedir a ionização dos amino-compostos, preservando o caráter nucleofílico dessas substâncias.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Estratégias no Desenvolvimento de Novos Fármacos

Após o cultivo bem-sucedido, em 1951, da primeira linhagem de células tumorais humana estabilizadas (HeLa), cientistas do mundo inteiro passaram a ter em mãos uma valiosa ferramenta para expandir o conhecimento de vários campos das áreas da bioquímica, biologia celular e biotecnologia. A linhagem de células HeLa forneceu aos pesquisadores da época a possibilidade de realizar experimentos *in vitro* reprodutíveis, capazes de avaliar o efeito de toxinas, fármacos, hormônios, venenos, radiação e, até a ação de vírus no crescimento de células cancerígenas, antes de serem testados em seres humanos. Além disso, essa cultura celular também despertou nos pesquisadores o interesse em expandir o portfólio de linhagens celulares disponíveis para experimentação, possibilitando assim compreender melhor os aspectos celulares relacionados com a evolução das doenças e a realização de ensaios *in vitro* que permitissem testar os novos tratamentos desenvolvidos (Overington *et al.*, 2006; Lucey *et al.*, 2009; Wermuth, 2015).

Já a descoberta da estrutura tridimensional da molécula do DNA e o mapeamento do material genético humano – e de outras espécies – no início do século XXI, tornou possível a identificação de diversos genes que codificam proteínas e, desde então, mais de 8.000 alvos de interesse farmacêutico já foram identificados e descritos na literatura. Um levantamento realizado por Overington e colaboradores em 2006, estimou que cerca de 324 alvos moleculares estão envolvidos no mecanismo de ação dos 1.357 medicamentos aprovados até aquela época, incluindo 266 proteínas derivadas no genoma humano e 58 provenientes de alvos moleculares de organismos patogênicos, tais como bactérias, vírus, fungos e protozoários (Overington *et al.*, 2006; Wermuth, 2015).

Os produtos naturais apresentam estruturas tridimensionais complexas que muitas vezes apresentam grupos funcionais em orientação espacial adequada para interagir com alvos moleculares de organismos de outras espécies. No entanto, essas substâncias também podem apresentar algumas características estruturais que interferem no comportamento farmacodinâmico e/ou farmacocinético, o que acaba impedindo que essas substâncias sejam capazes de vencer todas as etapas dos

ensaios que asseguram a segurança e eficácia dos medicamentos que chegam ao mercado (Montanari & Bolzani, 2001; Koehn & Carter, 2005).

Sob esse ponto de vista, as estratégias da química farmacêutica e medicinal, aplicadas ao planejamento racional de fármacos, passaram a desempenhar papel primordial na identificação e otimização de novas entidades químicas com potencial aplicação clínica. Assim, diante do reconhecimento do potencial que as espécies vegetais apresentavam para fornecer novos arcabouços bioativos e a consciência de que a afinidade pelos alvos moleculares não era o único aspecto a ser considerado, as pesquisas para desenvolvimento de novos medicamentos passaram a se preocupar igualmente com outras propriedades estruturais. Tais como as intimamente relacionadas com a capacidade de absorção, distribuição, de metabolismo e toxicológicas. Os pesquisadores também passaram a investigar e determinar os parâmetros que relacionam a estrutura molecular com a atividade desencadeada, identificando assim os elementos estruturais determinantes – grupos farmacofóricos – que permitissem em conjunto modular a potência, afinidade, seletividade e biodisponibilidade de um novo candidato a fármaco (Barreiro *et al.*, 1997; Montanari & Bolzani, 2001; Guido *et al.*, 2010).

Historicamente, o planejamento racional de novas substâncias bioativas foi seguindo um processo sequencial, em que a síntese dos compostos ocorria de maneira artesanal, baseando-se em informações moleculares coletadas sobre uma substância de referência. Essa abordagem, embora eficiente, se caracterizava como um processo lento, limitando-se à geração de um número reduzido de derivados, o que, conseqüentemente, acabava por tornar a busca por novos candidatos a protótipo um exercício laborioso e demorado. Nesse cenário, diante da urgência da indústria farmacêutica pela descoberta de novos *blockbuster* (termo em inglês para designar medicamentos com faturamento anual superior a US\$ 1 bilhão), a química combinatória se tornou uma ferramenta importante para a química medicinal, produzindo uma miríade de moléculas orgânicas estruturalmente semelhantes, com diferentes grupos farmacofóricos e/ou conformações, que eram sintetizadas simultaneamente, acelerando exponencialmente a construção de coleções de novas substâncias (Amaral *et al.*, 2003; Guido & Andricopulo, 2008; Li & Vederas, 2009).

A robotização e miniaturização dos ensaios *in vitro* passaram então a ser primordial para triagem dessas enormes quimiotecas. Qualquer ensaio bioquímico que fosse capaz de produzir um efeito mensurável e que pudesse ser detectado e medido automaticamente poderia ser facilmente reproduzido via HTS, permitindo assim que um extenso número de novas substâncias fosse testado de uma única vez frente a vários alvos moleculares diferentes, acelerando a identificação de moléculas bioativas (do inglês, *hits*). Não demorou muito para que a quantidade gigantesca de dados biológicos e químicos gerados nesse período tornasse impraticável a dedução manual de equações propostas para correlacionar quantitativamente a resposta biológica desencadeada com as características químicas estruturais das substâncias. No entanto, com os avanços nas áreas da química e bioinformática, os químicos medicinais foram capazes de codificar as informações estruturais das substâncias e aplicar uma variedade de algoritmos computacionais para criação de modelos preditivos capazes de testar enormes bibliotecas de substâncias químicas e selecionar apenas compostos que apresentassem determinadas propriedades desejadas (Alves *et al.*, 2018).

Em uma triagem virtual (do inglês, *VS – Virtual Screening*) de uma biblioteca de substâncias orgânicas, além das estratégias inicialmente desenvolvidas para correlacionar atividade e estrutura molecular, os métodos computacionais passaram a também ser empregados para aplicação de estratégias complementares no planejamento de compostos bioativos. Avanços nas áreas da genômica, proteômica e bioinformática, aliados à evolução das técnicas de cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear, forneceram o conhecimento necessário para o desenvolvimento de metodologias para modelagem de proteínas, proporcionando um aumento significativo no número de alvos moleculares com estruturas tridimensionais disponíveis em um Banco de Dados de Proteínas (do inglês, *PDB – Protein Data Bank*). A disponibilidade da estrutura 3D de alvos moleculares chaves no desenvolvimento de um processo patológico ou da estrutura de algum complexo ligante-alvo, permite o planejamento racional de fármacos por meio da estratégia baseada no alvo biológico (do inglês, *SBDD – Structure Based Drug Design*). Em contrapartida, quando um modelo da macromolécula alvo não está disponível ou essa não é conhecida, mas se tem conhecimento sobre a estrutura química de um ligante efetivo dessa macromolécula, a estratégia se baseia no desenvolvimento de um novo

fármaco tomando como base apenas as características multifuncionais desse ligante bioativo, que pode ser um substrato natural ou uma molécula exógena (Guido & Andricopulo, 2008; Guido *et al.*, 2010; Patrick, 2017; Alves *et al.*, 2018; Piccirillo & Amaral, 2018).

O poder preditivo de um modelo proposto, no entanto, pode ser prejudicado em virtude da complexidade intrínseca da avaliação de multifatores de forma concomitante. Por essa razão, raramente a aplicação de uma única ferramenta computacional é capaz de indicar, com uma elevada taxa de acerto, as moléculas mais promissoras. Como alternativa, sugere-se, portanto, a aplicação de diferentes ferramentas de modo sequencial que atuem como filtros de seleção (do inglês, *garbage filters*), sendo aplicados em ordem crescente de complexidade de cálculo, visando otimizar o uso dos recursos computacionais (Piccirillo & Amaral, 2018).

A taxa de sucesso das triagens *in silico* geralmente varia de 1 – 40%, enquanto a taxa de sucesso observada para as triagens *in vitro* de alta performance (HTS) varia entre 0,01% e 0,14%. A baixa taxa de sucesso no HTS decorre do fato de que ensaios *in vitro* não levam em consideração certas limitações experimentais inerentes aos compostos testados, como solubilidade, presença de grupos reativos, formação de agregados, estabilidade metabólica das substâncias e outras premissas que acabam contribuindo para uma geração significativamente alta de resultados falso-positivos. Dessa forma, uma parcela expressiva dos compostos selecionados como *hits* via HTS não são, na verdade, autênticas substâncias candidatas a fármaco (Patrick, 2017; Alves, 2018; Piccirillo & Amaral, 2018).

Segundo o Centro para o Estudos do Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade de Tufts (do inglês, *Tufts CSDD – Tufts Center for the Study of Drug Development*), estima-se que o custo total no desenvolvimento de um novo medicamento é da ordem de US\$ 2,8 bilhões, incluindo os custos com inserção de novas tecnologias no campo das ciências ômicas e bioinformática e os custos com o desenvolvimento de candidatos malsucedidos que não são capazes de chegar ao mercado. Além disso, a Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa do Estados Unidos (do inglês, *PhRMA – Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*) estima que dentre 10.000 candidatos a fármaco, em média apenas um será capaz de atravessar com sucesso as fases de testes pré-clínico e clínicos e ser

submetida à aprovação do FDA para comercialização. Dessa forma, uma importante estratégia para aumentar a produtividade da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos se baseia no conceito “*fail fast, fail cheap*”, que visa aprimorar os processos de descoberta e otimização de protótipos, assegurando que as substâncias que apresentam características *nondrug-like* (em português, não “fármaco-similar”) sejam rapidamente evidenciadas, permitindo assim eliminar o quanto antes os candidatos com menor probabilidade de sucesso (Montanari & Bolzani, 2001; Filho, 2006; DiMasi *et al.*, 2016; Piccirillo & Amaral, 2018).

Sendo assim, para que as substâncias selecionadas, sejam, de fato, promissoras candidatos a fármaco, todas as propriedades estruturais inerentes que influenciam na absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e na toxicidade devem ser avaliadas para assegurar que as substâncias direcionadas para os ensaios clínicos detenham capacidade genuína de chegar ao mercado farmacêutico. A evolução dos ensaios *in silico* permitiu que tanto as informações inerentes a farmacodinâmica – como potência, afinidade e seletividade – quanto os dados referentes às propriedades farmacocinéticas e de toxicidade sejam conciliados e considerados conjuntamente para construção dos modelos de busca virtual (Guido & Andricopulo, 2008; Guido *et al.*, 2010; Piccirillo & Amaral, 2018).

#### **4.2 Simulações de Ancoragem Molecular (*Molecular Docking*)**

A descoberta e o planejamento racional de substâncias bioativas com auxílio de ferramentas computacionais dispõem de metodologias de predição que podem ser classificadas em duas categorias gerais: as abordagens baseadas na estrutura da biomolécula receptora (do inglês, *SBDD – Structure Based Drug Design*) e as abordagens baseadas nos ligantes (do inglês, *LBDD – Ligand Based Drug Design*).

Os estudos de ancoragem molecular (do inglês, *molecular docking*) se baseiam em análises de complexos intermoleculares estabelecidos pela interação entre uma macromolécula biológica e um ligante, que pode tanto compreender uma outra macromolécula ou uma micromolécula, como as moléculas dos fármacos (Kitchen *et al.*, 2004).

Dessa forma, o objetivo geral dessa técnica é prever o modo de ligação e a afinidade com que essas moléculas interagem entre si. O processo do acoplamento envolve a previsão da conformação e da orientação do ligante dentro de uma cavidade de ligação e, no geral, as simulações de *docking* podem ser divididas em dois estágios principais. Em um primeiro estágio, algoritmos de busca eficientes são aplicados para explorar o espaço conformacional disponível e gerar modos de ligação putativos, também chamados de poses. Já na segunda etapa, uma função de pontuação deve ser aplicada para avaliar a energia envolvida nos modos de ligação amostrados, permitindo, assim, ranquear as poses geradas e prever as conformações e orientações mais adequadas para uma molécula ligante no seu sítio de ligação (Gonçalves, 2008; Yan & Zou, 2017).

Um dos principais problemas associados aos métodos de triagens envolvendo *docking* molecular estão relacionados às imprecisões nas funções de pontuação e na qualidade dos dados fornecidos ao sistema, muitas vezes em virtude das limitações na definição dos estados conformacionais corretos das estruturas, e alguns termos relacionados aos estados de solvatação, com frequência ignorados (Doman *et al.*, 2002; Cherkasov *et al.*, 2014).

Grande parte dos programas de ancoragem opera considerando a biomolécula receptora como uma estrutura de corpo rígido e assume total flexibilidade à estrutura do ligante. Dessa forma, a conformação das moléculas seria responsável pelo maior impacto observado na energia de associação ao sítio de ligação na biomolécula receptora. A etapa de determinação da conformação e orientação com que um ligante se ajusta adequadamente à cavidade de ligação é, por si só, um processo altamente complexo, visto que mesmo moléculas relativamente simples podem apresentar vários graus de liberdade conformacional, gerando uma gama de resultados alternativos. Sendo assim, mesmo em sistemas mais simples de análise, uma conformação menos energética para o ligante é primeiramente explorada antes de proceder com o processo de ancoragem no sítio de ligação previamente determinado (Brooijmans & Kuntz, 2003; Kitchen *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2015).

A identificação do conformero molecular mais adequado energeticamente pode ser realizada empregando-se diferentes algoritmos de busca, que exploram, por meio de métodos sistemáticos, determinísticos e estocásticos de busca, variações nos diferentes componentes moleculares que influenciam a energia final de uma molécula,

como os ângulos de torção, a distância entre os átomos e flexões entre as ligações (Brooijmans & Kuntz, 2003; Gonçalves, 2008).

No entanto, embora existam diversos métodos capazes de explorar os vários estados conformacionais assumidos pela molécula de um ligante, frequentemente os estudos de modelagem molecular demonstram que as conformações biologicamente ativas dos ligantes, na verdade, se diferem das conformações de menor energia identificadas pelos métodos de minimização de energia. As análises de estruturas cristalográficas das biomoléculas receptoras complexadas com ligantes endógenos ou exógenos conhecidos com frequência reforçam esse indicativo e permitem a identificação mais precisa do arranjo conformacional bioativo das moléculas (Roy *et al.*, 2015).

As conformações de menor energia são geralmente resultantes do estabelecimento de interações intramoleculares entre os grupos presentes na estrutura do ligante, tornando-os assim, menos disponíveis para interagir com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação. Dessa forma, com frequência, as conformações biologicamente ativas não são necessariamente representadas pelas conformações de menor energia e, portanto, a busca intensiva pela minimização da energia dos ligantes, pode não ser suficiente para predizer a conformação capaz de interagir mais eficientemente com o alvo molecular (Roy *et al.*, 2015).

Por essa razão, a identificação da conformação bioativa de um potencial candidato à fármaco, no entanto, é muito mais exata quando o sítio de ligação na biomolécula receptora é conhecido. No entanto, embora as conformações de menor energia e bioativa não sejam exatamente idênticas, com certa frequência, essas conformações não destoam substancialmente entre si, e geralmente, na ausência de modelos cristalográficos do alvo molecular, a conformação menos energética encontrada pode ser considerada como a conformação bioativa (Roy *et al.*, 2015; Brooijmans & Kuntz, 2003; Gonçalves, 2008).

Embora a maior parte dos estudos de ancoragem assumam a biomolécula receptora como uma estrutura estática, a comparação das estruturas do ligante e da biomolécula receptora, antes e após a formação do complexo de ligação, demonstra que ambas as estruturas sofrem alterações na conformação para permitir uma adequada interação intermolecular. Dessa forma, os efeitos biológicos observados só são possíveis devido as mudanças conformacionais sofridas por ambos durante a

formação do complexo. E as mudanças conformacionais observadas na biomolécula receptora, induzidas à medida que o ligante se encaixa em seu sítio de ligação, são determinantes para ativação ou inibição da atividade da macromolécula (Gonçalves, 2008).

O modelo “chave-fechadura” (do inglês, *lock-and-key*), proposto por Fischer em 1894, propunha que o reconhecimento dos substratos pelas enzimas seguia uma complementariedade estática. Dessa forma, embora o modelo de Fischer, fosse capaz de explicar, em parte, a especificidade das enzimas, não era adequado para explicar detalhadamente todo o fenômeno envolvido. No geral, tanto o substrato, como a biomolécula receptora são entidades dinâmicas, e não rígidas, sendo, portanto, observadas certas mudanças conformacionais durante a formação do complexo de ligação. Por essa razão, em 1958, Koshland propôs um novo modelo, conhecido como “ajuste induzido” (do inglês, *induced-fit*), sugerindo que o complexo formado entre o substrato e a enzima é resultado de uma otimização na interface por meio de interações estabelecidas mediante mudanças conformacionais. Para proteínas altamente flexíveis, um terceiro modelo, conhecido como modelo de seleção conformacional, também foi proposto na tentativa de explicar adequadamente os movimentos coletivos da cadeia principal (do inglês, *backbone*), rearranjos de domínio e a transição de estados observados para essas biomoléculas (Fischer, 1894; Koshland Jr., 1958; Kumar *et al.*, 2000; Yan & Zou, 2017).

Múltiplas proteínas apresentam diversos estados conformacionais pré-existentes quando não estão interagindo com o substrato. Diante desse cenário, antes da formação do complexo final, os ligantes necessitariam reconhecer, previamente, as conformações da biomolécula mais apropriadas para ligação e, assim, estabelecer um estado de complexo solto antes que as otimizações induzidas pudessem ocorrer para estabelecer uma interação efetiva. Diversos estudos sugerem que um modelo ideal, portanto, deveria considerar a coexistência dos fenômenos explicados por ambos os modelos de “ajuste induzido” e de seleção conformacional (Bucher *et al.*, 2011).

Os estudos de *docking* molecular, embora sejam eficientes em prever o modo e a afinidade de ligação de diferentes ligantes, ignoram consideravelmente as mudanças dinâmicas que possivelmente podem ocorrer ao longo do processo de encaixe molecular. A aplicação de campos de força baseado em modelos capazes de

promover a integração das equações de movimento, permite, no entanto, a execução de estudos de dinâmica molecular, que simulam o processo de ligação do ligante com a macromolécula receptora, levando em consideração a simultânea flexibilidade intrínseca dessas estruturas ao longo do tempo (Yan & Zou, 2017).

No entanto, em razão das limitações enfrentadas pelos algoritmos em ultrapassar barreiras de energia dentro do tempo razoável para as simulações executadas nos estudos de dinâmica molecular, os estudos de *docking* molecular acabam sendo, com frequência, muito mais eficientes. Além disso, o alto custo computacional envolvido nas simulações por dinâmica molecular faz com que frequentemente essas análises sejam utilizadas de maneira complementar, com a intenção de promover um refinamento nos modos de ligação considerados promissores em estudos de *docking* molecular (Brooijmans & Kuntz, 2003; Yan & Zou, 2017).

A eficiência dos estudos de *docking* molecular são decorrentes da precisão dos algoritmos de busca empregados no estágio de amostragem e das funções de pontuação, adotadas em um estágio subsequente, para avaliar os modos de ligação putativos que foram previstos no estágio anterior. Dessa forma, mesmo quando as conformações de ligação são previstas corretamente, há necessidade de uma análise complementar capaz de diferenciar um modo de ligação satisfatório de um não adequado e assim classificar os ligantes analisados, permitindo determinar aqueles com maior probabilidade de serem biologicamente ativos (Yan & Zou, 2017; Kitchen *et al.*, 2004).

A complementariedade físico-química entre um ligante e uma biomolécula receptora é estabelecida pela formação de interações intermoleculares capazes de favorecer a formação dos complexos pela diminuição da energia livre do sistema gerado. As interações formadas durante a estabilização do complexo ligante são regidas pelas funções termodinâmicas da entalpia e da entropia do sistema. A entalpia corresponde a energia térmica envolvida em um processo químico, ao passo que a entropia compreende uma grandeza física capaz de mensurar a desordem de um sistema. A afinidade entre um ligante e seu receptor pode ser calculada por meio da determinação da energia livre de Gibbs gerada pela associação e que está diretamente correlacionada com esses efeitos termodinâmicos desencadeados. Estimar com precisão as energias envolvidas no processo de ligação é, no entanto,

um processo complexo e demorado (Leach, 2001; Kitchen *et al.*, 2004; Gonçalves, 2008).

Diversas técnicas de quantificação da energia livre envolvida foram desenvolvidas para prever a afinidade da ligação. As funções de pontuação originalmente formuladas para estimar as contribuições energéticas, como as funções baseadas em campo de força, frequentemente não consideram os efeitos da solvatação e da entropia, e acabam calculado apenas o efeito da entalpia ao invés da energia livre propriamente dita, o que acaba incutindo consideráveis limitações na aplicabilidade desse tipo de função. Além de não serem praticáveis na triagem de bibliotecas contendo uma grande quantidade de moléculas, frequentemente as funções desse tipo também acabam gerando resultados imprecisos (Brooijmans & Kuntz, 2003; Kitchen *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012).

A necessidade de uma função de pontuação capaz de fornecer uma análise precisa e confiável no menor tempo computacional possível, resultou no desenvolvimento de uma série de funções. Essencialmente, três tipos ou classes de funções de pontuação são aplicadas atualmente: as funções baseadas em campo de força, funções empíricas e funções baseadas em conhecimento (Brooijmans & Kuntz, 2003; Rodrigues *et al.*, 2012; Piccirillo & Amaral, 2018).

Diante das limitações intrínsecas dessas funções de pontuação disponíveis, uma tendência recente combina as informações geradas por diferentes funções de pontuação na tentativa de equilibrar os erros e aumentar a probabilidade de acerto. No entanto, se as funções empregadas na construção desse modelo de pontuação, forem significativamente correlacionadas, os erros de cálculos acabariam sendo amplificados, gerando ainda mais incerteza aos resultados obtidos (Kitchen *et al.*, 2004).

#### **4.2.1 Modelagem da Biomolécula Receptora**

Como a flexibilidade da macromolécula receptora é um dos parâmetros que mais afeta o desempenho das simulações de ancoragem, a seleção da estrutura tridimensional da macromolécula receptora deve levar em consideração as diversas conformações assumidas pela estrutura durante o ciclo operacional da mesma. A

cristalografia de proteínas é uma das principais ferramentas na investigação da estrutura tridimensional de macromoléculas. Cerca de 90% das estruturas resolvidas das proteínas atualmente conhecidas e reportadas na literatura foram obtidas por difração de raios-X. No entanto, apesar dos consideráveis avanços nas técnicas espectroscópicas, a obtenção de cristais com qualidade necessária para aplicação nos trabalhos de modelagem, ainda enfrentam problemas consideráveis e apenas um cristal adequado é geralmente obtido para cada vinte proteínas extraídas. Dessa forma, a estrutura de uma biomolécula complexada com um ligante específico e/ou co-fatores (holoproteína) geralmente não se encontra disponível nos bancos de dados acessíveis (Maggio & Ramnarayan, 2001; Yan & Zou, 2017)

Por essa razão, os ensaios de ancoragem molecular são frequentemente realizados envolvendo a estrutura de uma aproteína ou uma holoproteína semelhante obtida por modelagem computacional. Entretanto, essa prática pode introduzir erros nas análises realizadas em virtude das variações estruturais, particularmente as variações estruturais no sítio de ligação, que muitas vezes induzem os algoritmos a desconsiderar modos de ligação que seriam considerados corretos, caso o exato estágio de amostragem da proteína estivesse disponível para as simulações realizadas (Yan & Zou, 2017).

Por outro lado, os métodos de elucidação das sequências de aminoácidos dessas biomoléculas têm se mostrado bastante eficazes e um aumento cada vez mais expressivo de sequências primárias disponíveis nos principais bancos de dados pôde ser observado nos últimos anos. Em consequência, alguns métodos de predição das estruturas terciárias a partir dessas estruturas primárias foram desenvolvidos. Na década de 60, Anfinsen e colaboradores (1961) foram pioneiros em estabelecer, por meio de princípios termodinâmicos, uma relação entre a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional nativa da proteína (Anfinsen *et al.*, 1961; Filho & Alencastro, 2003; Contessoto *et al.*, 2018)

Os principais métodos disponíveis atualmente podem ser divididos em duas classes principais: *template-free* e *template-based*. A aplicação desses métodos de predição do enovelamento proteico depende da disponibilidade de informações estruturais armazenadas em bancos de dados experimentais (Verli, 2014).

A modelagem independente de moldes (*template-free*) se baseia na predição por primeiros princípios (do latim, *ab initio*). Apesar dos intensos esforços para refinar

os algoritmos envolvidos nesse tipo de modelagem, esse método de simulação do processo de enovelamento (do inglês, *fold*ing) ainda se mostra inadequado para aplicação em diversas macromoléculas biológicas, principalmente aquelas com mais de 200 resíduos de aminoácidos. A principal limitação da modelagem *ab initio* reside na falta da completa elucidação das leis que regem o arranjo da estrutura nativa das proteínas. Esse entrave dificulta o desenvolvimento de algoritmos capazes de fornecer conformações estáveis e funcionais a um custo computacional razoável. Por essa razão, a opção pela modelagem *ab initio* ocorre geralmente para determinação de regiões da biomolécula de interesse cuja sequência não apresenta nenhuma outra estrutura homóloga disponível, ou para predição de regiões de *loop* (Filho & Alencastro, 2003; Verli, 2014; López-Blanco *et al.*, 2016).

A ferramenta de mais alta precisão na predição das estruturas tridimensionais se baseia, por outro lado, na utilização de estruturas cristalográficas de proteínas como moldes (*template-based*) para modelagem das proteínas de interesse. Esse tipo de modelagem é conhecido como modelagem comparativa ou modelagem por homologia. A modelagem das biomoléculas de interesse por esse método ocorre mediante identificação e seleção da proteína molde adequada, alinhamento das sequências de aminoácidos, construção dos modelos tridimensionais e validação (Filho & Alencastro, 2003).

A modelagem por homologia baseia-se em alguns padrões moleculares que são observados entre proteínas que derivam de um ancestral comum. Ao longo do processo evolutivo, essas proteínas mantêm uma certa semelhança na sequência de aminoácidos, sendo factível assumir que o empacotamento e a função exercidas por essas proteínas também sejam semelhantes. Geralmente é possível modelar, por homologia, todos os membros de uma determinada família proteica por meio da estrutura de um único representante da família (Wolf *et al.*, 2000; Filho & Alencastro, 2003).

Proteínas que apresentam sequência de aminoácidos semelhante e uma mesma função que a proteína de interesse, muito provavelmente também apresentam *fold*ing semelhante. No entanto, se essas proteínas não apresentam um ancestral em comum, elas não podem ser consideradas homólogas e o tipo de modelagem empregado é considerado como modelagem comparativa (Filho & Alencastro, 2003).

As principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas são com certa frequência observadas em regiões constituídas pelas alças. Essas regiões têm se mostrado em muitos casos determinantes para a interação de diversos ligantes com as biomoléculas receptoras e o refinamento dessas regiões muitas vezes são essenciais para investigação da ação de anticorpos e a função de canais iônicos (Filho & Alencastro, 2003; López-Blanco *et al.*, 2016).

Sendo assim, esses métodos de modelagem apresentam como principal limitação a necessidade de haver pelo menos uma estrutura cristalográfica de boa qualidade disponível nos bancos de dados para atuar como molde. Em alguns casos as proteínas selecionadas como homólogo mais próximo podem não funcionar como um molde para modelar toda a sequência primária da proteína de interesse. Nesses casos, essas regiões podem ser modeladas empregando-se moldes alternativos ou pela aplicação dos métodos *ab initio*. As diferenças na conformação das cadeias principal e lateral entre as proteínas molde e modelo, podem, no entanto, serem corrigidas por procedimentos de refinamento estrutural (Maggio & Ramnarayan, 2001; Moulton *et al.*, 2016).

### 4.3 Glicosídeos Cardiotônicos

Alguns fitoesteroides encontrados na natureza apresentam uma alta especificidade e potente ação sobre o músculo cardíaco. Esses fitoesteroides atuam aumentando a força de contração do miocárdio (inotropismo positivo), promovendo elevação do volume de sangue ejetado e, conseqüentemente, alterando o aporte de oxigênio e nutrientes que chegam aos tecidos e órgãos periféricos. Devido à suas ações farmacológicas, esses metabólitos são chamados de glicosídeos cardioativos (GC) ou cardiotônicos (Rates *et al.*, 2017; Fraga & Barreiro 1995).

Muito antes da era cristã, populações nativas de várias partes do mundo já descreviam o potencial terapêutico de diversas plantas contendo esses glicosídeos cardiotônicos. Essas espécies vegetais foram usadas por mais de 1.500 anos como venenos de flechas, abortivos, diuréticos, eméticos e tônicos cardíacos. Os antigos egípcios já empregavam a *Drimys maritima* (cebola do mar) e, posteriormente os romanos (1 d.C.) também utilizaram o extrato desta espécie nativa da região do

mediterrâneo como diurético, tônico cardíaco e emético (Fraga & Barreiro, 1995; Newman *et al.*, 2008).

Na segunda metade do século XVIII, o médico inglês William Withering observou que os terapeutas tradicionais empregavam o extrato de um complexo de ervas para o tratamento de hidropisia. A busca por informações sobre as espécies vegetais que eram submetidas a decocção para obtenção do extrato permitiu que Withering fosse capaz de associar as folhas de uma planta conhecida na época como digital – descrita botanicamente por Fuchsis, em 1542, e nomeada de *Digitalis purpurea* – como as que forneciam o extrato mais ativo e que provavelmente continham a(s) substância(s) que propiciava(m) o aumento na capacidade do coração enfraquecido de bombear o sangue adequadamente. Em 1785, Withering publicou o livro “*An Account of the Foxglove and its Medical Uses*”, no qual descrevia minuciosamente como o extrato de *D. purpurea* deveria ser preparado e forneceu instruções precisas sobre a dosagem adequada – notavelmente semelhante à dose de digoxina administrada hoje – para tratamento de condições edematosas (Withering, 1785; Fraga & Barreiro, 1995; Wermuth, 2015; Newman *et al.*, 2008; Ziff & Kotecha, 2016; Buenz *et al.*, 2018).

Uma das principais dificuldades no uso terapêutico do extrato de *D. purpurea* consiste nos efeitos colaterais frequentemente observados nos pacientes em tratamento. Os vômitos e diarreia relatados e ocasionados em virtude da estreita janela terapêutica – variando de 0,5 a 0,9 ng/mL – dos cardiotônicos, confere à dose terapêutica e à dose tóxica valores próximos. Em 1835, Homolle e Quevenne, propuseram que o isolamento e purificação da substância ativa presente no extrato seria capaz de permitir a determinação da dose capaz de propiciar os efeitos desejados, minimizando os efeitos adversos. Mas foi só cerca de 30 anos mais tarde que Nativelle, farmacêutico francês, foi capaz de purificar o extrato e obter efetivamente uma substância cristalizada, a qual chamou de “digitalina”, atribuindo o sufixo “-ina” por acreditar se tratar de uma mistura de alcaloides. O reconhecimento da natureza glicosídica e esteroideal dessas substâncias só foi revelada, no entanto, em 1926, após o químico alemão Windaus realizar as primeiras análises estruturais e interpretar o comportamento dessa substância em condições de hidrólise, permitindo-lhe assim identificar moléculas de açúcares inéditos presentes na cadeia osídica

dessa substância que hoje em dia é conhecida como digitoxina (1) (Nativelle, 1872; Diefenbach & Meneely Jr., 1949; Wermuth, 2015).

Em 1799, quando o médico escocês John Ferriar constatou pioneiramente a ação direta do extrato da digital sobre o músculo cardíaco, essas substâncias passaram a ser consideradas para o tratamento de doenças cardiovasculares. Cerca de cem anos depois as bases moleculares da ação dessas substâncias foram desvendadas, após as descobertas inéditas de Skou e Post que trouxeram a luz o alvo molecular dos GC: a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Korolkovas & Burckhalter, 1988; Skou, 1957; Post *et al.*, 1960).

Os GC são considerados inibidores específicos da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, uma enzima transmembrana constituída por três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) que é responsável por promover a manutenção do potencial de repouso em células nervosas, musculares e cardíacas, por meio da troca de íons entre as duas faces da membrana plasmática. Em condições fisiológicas essa ATPase é responsável por promover o transporte ativo de três íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e dois íons  $\text{K}^+$  para o meio intracelular. Essa troca de íons se inicia com a ligação de uma molécula de ATP no seu respectivo sítio de ligação, presente na porção intracelular da subunidade alfa dessa enzima. Essa ligação provoca uma alteração conformacional que promove a abertura, na porção intracelular, da cavidade onde se encontram os sítios de ligação dos íons  $\text{Na}^+$ . A acomodação de três íons  $\text{Na}^+$  nessa cavidade, induz a hidrólise da molécula de ATP inserida anteriormente, resultando na liberação de uma molécula de ADP, permanecendo ligado à enzima apenas a unidade fosfato terminal. A energia desprendida em decorrência desse processo é suficiente para provocar uma nova alteração conformacional, levando a abertura da cavidade na porção extracelular. Nesse segundo estágio, a enzima apresenta baixa afinidade pelos íons  $\text{Na}^+$  e alta afinidade pelos íons  $\text{K}^+$ . Por essa razão, os três íons  $\text{Na}^+$  inseridos na cavidade são prontamente liberados no meio extracelular, permitindo a ocupação dos dois íons  $\text{K}^+$ . Essa ligação, por sua vez, induz a liberação do fosfato inorgânico e, conseqüentemente, a enzima passa a assumir a sua conformação inicial, cuja abertura da cavidade se encontra voltada para o meio intracelular e possui alta afinidade pelos íons  $\text{Na}^+$ . Dessa forma, os íons  $\text{K}^+$  são liberados e com os sítios de ligação livres, o ciclo pode ser novamente iniciado (Post & Jolly, 1957; Akera & Ng, 1991; Skou & Esmann, 1992).

Quando essa proteína transportadora se encontra com a cavidade aberta na porção extracelular, os GC são capazes de se ligar com alta afinidade em um sítio de ligação localizado próximo ao sítio de ligação dos íons  $K^+$ . Essa ligação impede a mudança conformacional que induz a expulsão do fosfato inorgânico inserido na porção intracelular dessa enzima. Sem a liberação desse eletrólito, essa ATPase não é mais capaz de alterar a sua conformação e a troca de íons através da membrana é interrompida, resultando em acúmulo de íons  $Na^+$  no citoplasma das células. Esse aumento na concentração de íons  $Na^+$ , no entanto, provoca uma inversão no funcionamento de um trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$ , que ao invés de transportar íons  $Ca^{2+}$  para fora da célula, passa a permitir a entrada desse íon por um mecanismo compensatório, resultando na expulsão de parte do excesso de íons  $Na^+$  no interior da célula. Dessa forma, também ocorre um aumento na concentração de íons  $Ca^{2+}$  citosólico (Schatazmann, 1953; Akera & Ng, 1991; Bers, 2002).

As fibras musculares são constituídas por unidades funcionais contráteis conhecidas como sarcômeros que, por sua vez, são compostos por várias estruturas cilíndricas alinhadas denominadas miofibrilas. Essa organela ocupa quase totalmente o citoplasma das células musculares e é formada por dois tipos de filamentos: os filamentos finos e os filamentos grossos. Esses primeiros são constituídos principalmente pela miosina, ao passo que os filamentos grossos são constituídos por três proteínas principais: a actina, a tropomiosina e a troponina (Guyton & Hall, 2017).

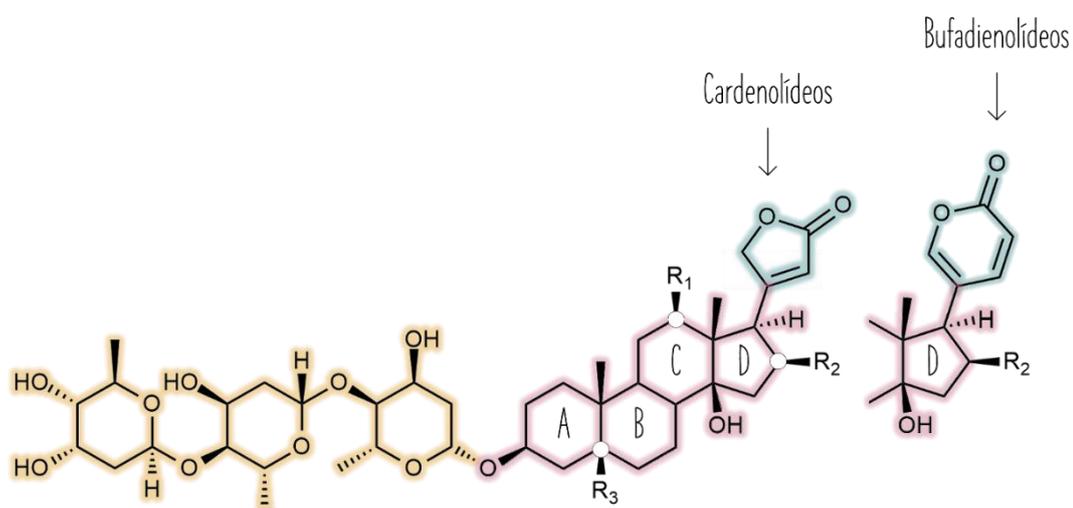
Quando um impulso nervoso é recebido pelo neurônio motor há a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular – estabelecida entre a porção terminal do neurônio e a célula muscular – ocasionando a transmissão do potencial de ação até alcançar o retículo sarcoplasmático. Essa organela, especializada no armazenamento de íons  $Ca^{2+}$ , tem a sua permeabilidade alterada mediante o recebimento do potencial de ação, culminando no aumento do fluxo desses íons para dentro do sarcômero. Os íons  $Ca^{2+}$  liberados se ligam à troponina nos filamentos finos, desencadeando uma mudança conformacional na tropomiosina, expondo assim os sítios de ligação da miosina existentes na estrutura da actina. Dessa forma, a actina é capaz de deslizar sobre a miosina, culminando na formação de um complexo que acarreta o encurtamento dos sarcômeros e, conseqüentemente, o encurtamento do músculo, caracterizando o estágio de contração muscular (Guyton & Hall, 2017).

Todavia, quando a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  se eleva além do observado em condições regulares – como no caso da ação de inibidores da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase – a quantidade excedente desse íon provoca um aumento na força de contração muscular e, conseqüentemente, induz uma diminuição na frequência cardíaca em razão de um aumento no período refratário da propagação do potencial de ação (Fraga & Barreiro 1995; Guyton & Hall, 2017).

Dessa forma, a ação inotrópica dos GC resulta em um aumento no débito cardíaco, melhorando o retorno venoso e diminuindo a resistência à ejeção, conseqüentemente alterando o aporte de oxigênio e nutrientes que chegam aos tecidos e órgãos periféricos (Gheorghiade, 2004).

Os GC são substâncias que apresentam uma estrutura química constituída por três segmentos principais (**Figura 5**) – anel lactônico, núcleo esteroidal e cadeia de açúcares – cujas variações interferem na afinidade pelo sítio de ligação. No entanto, embora os heterosídeos sejam mais potentes do que as agliconas correspondentes, essa porção aglicona é quem modula majoritariamente a atividade cardiotônica atribuída à essas substâncias, mesmo quando isoladas (Kreis *et al.*, 1998).

**Figura 5 – Estrutura química geral dos glicosídeos cardioativos e suas principais características.**

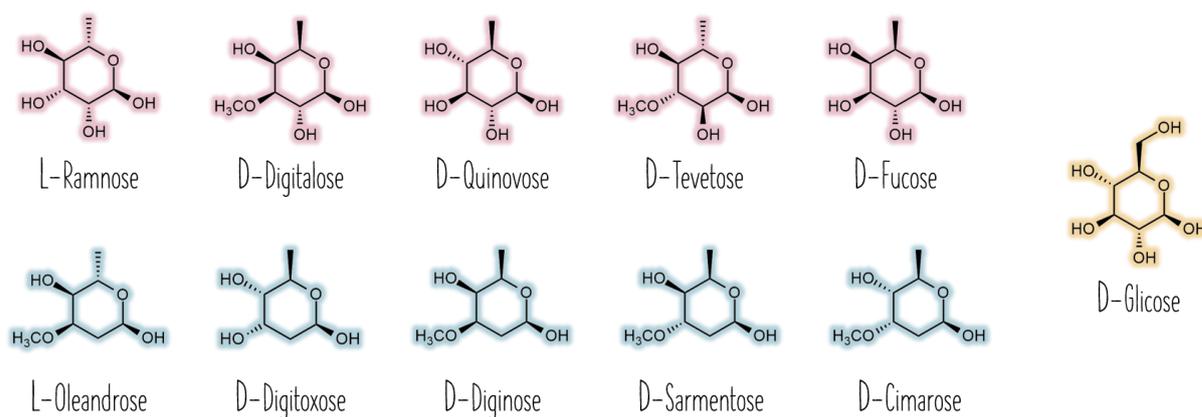


**Legenda:** representação esquemática da estrutura dos glicosídeos cardiotônicos composta por três segmentos principais: (1) anel lactônico em azul; (2) núcleo esteroidal em vermelho; (3) cadeia de açúcares em amarelo. O anel lactônico dos cardenolídeos corresponde a uma lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada e o anel dos bufadienolídeos corresponde a uma lactona  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada. O núcleo esteroidal é composto por quatro anéis fundidos (A, B, C e D) e pode apresentar diferentes substituintes principalmente nas posições C-12 ( $\text{R}_1$ ), C-16 ( $\text{R}_2$ ) e C-5 ( $\text{R}_3$ ).

A porção osídica, no entanto, confere maior solubilidade a esses metabólitos, contribuindo com os processos de absorção e distribuição, além de propiciar um aumento na afinidade pelo sítio de ligação e de conferir maior tempo de meia-vida ao proteger essas substâncias da ação das enzimas responsáveis pelo metabolismo e eliminação (Kreis *et al.*, 1998; Prassas & Diamandis, 2008; Schneider *et al.*, 2017).

O esqueleto esteroidal pode ser substituído na posição C-3 $\beta$  pelo terceiro elemento: uma cadeia lateral de açúcares. A maioria dos glicosídeos naturais apresenta de um a quatro resíduos de hexoses ligados entre si por meio de ligações 1,4 $\beta$ -glicosídicas. Os açúcares mais comumente observados são: L-ramnose, L-oleandrose, D-digitoxose, D-digitalose, D-diginose, D-sarmentose, D-cimarose, D-quinovose, D-tevetose, D-fucose e D-glicose (**Figura 6**). Esse último açúcar, quando presente, encontra-se sempre na porção terminal da cadeia. Os glicosídeos que apresentam uma molécula terminal de glicose são classificados como glicosídeos primários e os que não possuem são classificados como glicosídeos secundários (Kreis *et al.*, 1998; Kreis, 2017).

**Figura 6 – Principais monossacarídeos presentes na cadeia lateral osídica dos glicosídeos cardioativos.**



**Legenda:** dentre os monossacarídeos mais frequentemente observados na cadeia lateral dos glicosídeos cardiopônicos destacam-se as 6-desóxi-hexoses (em vermelho) e as 2,6-didesóxi-hexoses (em azul). Os açúcares D-digitoxose, D-cimarose e D-oleandrose só exclusivamente observados nessa classe de metabólitos secundários. A glicose (em amarelo), quando presente na molécula, ocupa sempre a porção terminal da cadeia osídica.

O núcleo esteroidal dos GC também apresenta outros grupos substituintes que influenciam na atividade cardiopônica. Além da hidroxila em C-3 $\beta$ , sítio de inserção da

cadeia osídica, todas as agliconas também apresentam uma hidroxila em C-14 $\beta$  e um grupo metila em C-13 $\beta$ . No caso dos cardenolídeos, a presença de substituintes em outras posições do núcleo esteroidal também permite a classificação das agliconas em diferentes séries de acordo com o padrão de substituição observado (**Tabela 1**).

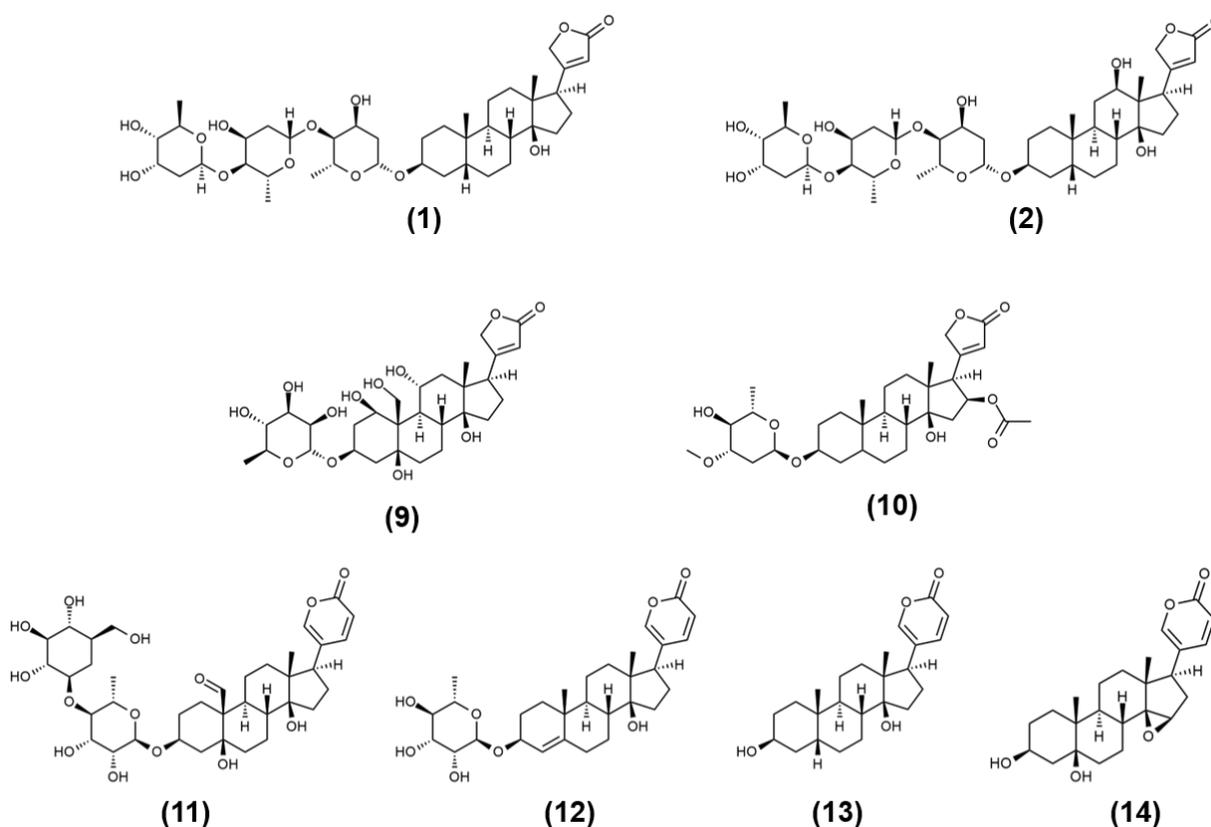
**Tabela 1 – Classificação das principais agliconas dos cardenolídeos digitálicos de acordo com o grau de substituição no núcleo esteroidal.**

AGLICONA	C-12	C-16	C-5	SÉRIE
Digitoxigenina	H	H	$\beta$ -H	A
Gitoxigenina	H	OH	$\beta$ -H	B
Digoxigenina	OH	H	$\beta$ -H	C
Diginatigenina	OH	OH	$\beta$ -H	D
Gitaloxigenina	H	O-CHO	$\beta$ -H	E
Oleandrigenina	H	OCOCH <sub>3</sub>	$\beta$ -H	F
Uzarigenina	H	H	$\alpha$ -H	–
Canarigenina	H	H	$\Delta^{4,5}$	–
Xysmalogenina	H	H	$\Delta^{5,6}$	–

**Fonte:** Kreis *et al.*, 1998; Luckner & Wichtl, 2000 (adaptado).

Alguns dos GC extraídos de fontes naturais mais conhecidos e estudados são a digitoxina (**1**), digoxina (**2**), ouabaína (**9**), oleandrina (**10**), hellebrina (**11**), proscillaridina A (**12**), bufalina (**13**) e marinobufagenina (**14**). No entanto, já são mais de 400 GC naturais descritos na literatura, sendo a grande maioria observada em espécies do reino vegetal. Essas substâncias estão exclusivamente presentes nas angiospermas e se concentram majoritariamente nos gêneros das famílias Scrophulariaceae (*Digitalis*), Asclepiadaceae (*Asclepias*), Apocynaceae (*Nerium*,

*Strophantus*, *Thevetia*), Liliaceae (*Urginea* e *Convallaria*), Ranunculaceae (*Helleborus* e *Adonis*) e em menor proporção nas famílias Brassicaceae, Celastraceae, Fabaceae, Moraceae e Tiliaceae. Os principais fármacos que abastecem o mercado farmacêutico são extraídos de duas espécies principais: a *Digitalis purpurea* e a *Digitalis lanata*. Essas espécies fornecem cerca de 90% da produção total dos GC obtidos exclusivamente de fontes naturais (Kreis, 2017; Rates *et al.*, 2017).



Os GC também podem ser encontrados no reino animal, como em algumas espécies de anfíbios (*Bufo* spp.), coleópteros e em alguns lepidópteros que se alimentam de espécies vegetais produtoras dessas substâncias. Avanços nas técnicas espectrométricas, como a espectrometria de massas, permitiram a detecção e identificação de GC endógenos como a ouabaína (9), digoxina (2), bufalina (13) e marinobufagenina (14) em matrizes biológicas, incluindo cérebro, glândula adrenal, coração, plasma sanguíneo, líquido cefalorraquidiano, placenta e urina em humanos. Investigadores independentes demonstraram que a biossíntese desses GC endógenos utiliza colesterol e progesterona como substratos e está sob o rigoroso

controle de outros hormônios, como a renina, angiotensina, endotelina e adrenalina, sugerindo que a detecção dessas substâncias no organismo pode ser resultante de um efeito cooperativo para estabelecimento da homeostase diante de diferentes condições patológicas, como infartos e hipertensão maligna. Aparentemente a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é usada por esses GC endógenos como um transdutor de sinal para ativação da proliferação de tecidos, controle da contratilidade cardíaca, hipertensão arterial, e natriurese por meio de várias vias de sinalização (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Prassas & Diamandis, 2008; Bagrov *et al.*, 2009).

Embora os GC não desempenhem atualmente um papel principal na farmacoterapia de doenças cardiovasculares, essas substâncias foram empregadas como tônicos cardíacos por mais de 200 anos, e até os dias atuais, digitoxina (1) e digoxina (2) ainda são prescritas por médicos ocidentais para o controle da insuficiência cardíaca congestiva (ICC). No Brasil, a digoxina (2) é o único fármaco pertencente a essa classe que ainda se encontra na relação de medicamentos essenciais para o tratamento dessa doença. Devido ao baixo índice terapêutico associado e a extensa lista de interações medicamentosas relatadas para esse fármaco, a digoxina não é considerada como primeira escolha no tratamento da ICC, sendo empregada como uma estratégia terapêutica adicional, e é frequentemente prescrita em associação com outros agentes terapêuticos. No geral, esse fármaco também é prescrito para o tratamento de condições envolvendo fibrilação atrial e em alguns casos de arritmias, como na taquicardia atrial paroxística e no choque cardiogênico (Newman *et al.*, 2008; Opie, 2013; Opie, 2015; Schneider *et al.*, 2017).

#### **4.3.1 Atividade Citotóxica, Antitumoral e Anticâncer dos GC**

A principal função associada ao alvo primário dos GC – a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase – envolve a estabilização e manutenção do gradiente eletroquímico nas células, por meio do transporte dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  entre as duas faces da membrana plasmática. Nas últimas décadas, no entanto, vários estudos têm demonstrado outras funções exercidas por esse transportador de membrana. Além de estar envolvida no controle osmótico celular, na condutividade em neurônios e músculos e de influenciar nos processos de adesão e motilidade celular, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase também pode

interagir com outras proteínas de membrana e desencadear uma cascata de processos de sinalização que enviam mensagens a outras organelas no interior das células. Essa habilidade de sinalização da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase parece variar em diferentes células e tecidos, principalmente em estados normais versus patológicos, em razão das diferenças na constituição estrutural e do sinergismo com outras proteínas de membrana (Mijatovic *et al.*, 2008; Mijatovic *et al.*, 2012).

Dessa forma, um aumento substancial no número de evidências acerca de novas possíveis aplicações terapêuticas para os GC vêm sendo observado nas últimas décadas, oferecendo uma “segunda chance” para essas substâncias no âmbito farmacêutico. Os efeitos antiproliferativos dos GC têm despertado o interesse não apenas pela sua potente capacidade de inibir o crescimento de células malignas, como também pela habilidade de desencadear efeitos distintos em células normais e em células cancerosas. *In vitro*, os GC têm se mostrado inativos ou mesmo pró-proliferativos em relação às células normais, sendo, portanto, capazes de induzir seletivamente a morte em diversos tipos de células tumorais (Elbaz *et al.*, 2012; Mijatovic *et al.*, 2012; Cerella *et al.*, 2013; Diedrich *et al.*, 2017; Schneider *et al.*, 2017).

Em razão das variações na composição das diferentes isoenzimas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e nas diferentes proteínas de membrana que se relacionam com essa enzima, os mecanismos de ação mediados por ação dos GC tendem a ser diferentes dependendo do tipo de célula envolvido, principalmente quando comparados entre células normais e células cancerosas. Diversas análises vêm demonstrando que em baixas concentrações várias vias de sinalização são potencialmente ativadas ou inibidas por ação dos GC, inclusive aquelas envolvidas em vários estágios da cascata metastática. A indução de apoptose por ativação de caspases, ativação de Src quinase e EGFR, inibição da topoisomerase II, inibição da via NF- $\kappa$ B, a geração de ROS e a interrupção do ciclo celular nas fases S e  $G_2/M$  são algumas das vias de atuação propostas para essas substâncias (Diederich *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2017; Mijatovic *et al.*, 2007).

As primeiras evidências dos efeitos antitumorais atribuídos aos GC advêm de estudo *in vitro* conduzidos no final da década de 1960 empregando-se células HeLa. Quase vinte anos depois, Stenkvist e colaboradores (1979) realizaram um estudo epidemiológico retrospectivo e observaram que as células malignas que compunham

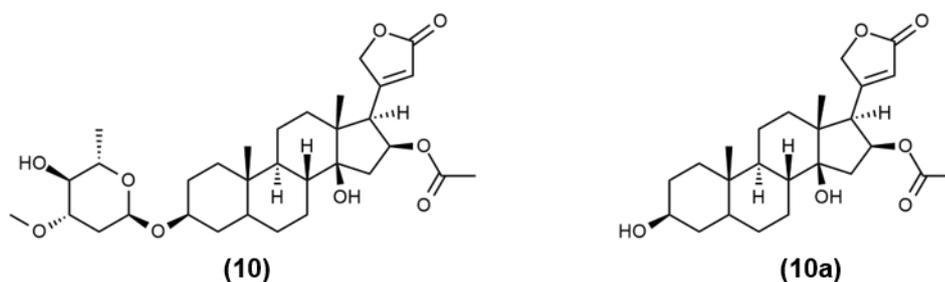
a massa tumoral coletada de pacientes mastectomizadas em decorrência do câncer de mama, apresentavam características morfológicas menos agressivas quando essas pacientes também eram tratadas com digitoxina (1) ou digoxina (2) para o controle de problemas cardíacos. Além disso, esses pesquisadores também relataram em um estudo posterior que as pacientes tratadas com digitálicos apresentavam uma taxa de recorrência da doença, cerca de dez vezes menor quando comparado as pacientes do grupo controle – não tratadas com digitálicos - após cinco anos da mastectomia do tumor primário. Em 2001, um estudo analítico-descritivo com 9.271 pacientes corroborou os efeitos antineoplásicos atribuídos à digitoxina no tratamento do câncer de rins, do trato urinário e leucemias, indicando que a dose necessária para observação dos efeitos antiproliferativos dessa substância é semelhante àquela admitida para o tratamento de problemas cardíacos (Shiratori, 1967; Stenkvis *et al.*, 1979; Stenkvis *et al.*, 1980; Stenkvis *et al.*, 1982; Stenkvis, 1999; Haux *et al.*, 2001).

Em consonância com esses relatos epidemiológicos promissores e os avanços no cultivo de várias linhagens de células tumorais humanas, muitos outros estudos foram publicados nos anos seguintes evidenciando o efeito citotóxico e pró-apoptótico de diferentes GC frente as células de câncer de mama, próstata, pulmão, pâncreas, do trato urinário, além de leucemias, neuroblastomas e melanomas (Newman *et al.*, 2008; Prassas & Diamandis, 2008; Elbaz *et al.*, 2012; Mijatovic *et al.*, 2012; De *et al.*, 2016; Diederich *et al.*, 2017; Boff *et al.*, 2019).

Embora o mecanismo pelo qual esses compostos exercem esses efeitos ainda não esteja completamente elucidado, diversos estudos têm sido conduzidos visando identificar as vias moleculares e os intermediários intracelulares envolvidos. Dentre as hipóteses levantadas, a mais promissora delas aponta o alvo primário desses GC como determinante na indução dos efeitos antiproliferativos observados, mas a interação direta desses GC com outras proteínas de membrana, além da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, não tem sido descartada. Não obstante, os GC parecem também interagir diretamente com a membrana plasmática por meio da hidrofobicidade do núcleo esteroidal e provocar alterações na fluidez, afetando indiretamente a função de várias outras proteínas e receptores inseridos na membrana das células. Do mesmo modo, a possibilidade de internalização desses compostos por meio de difusão pela membrana e interação com alvo no interior das células também já foi apontada como um possível mecanismo de ação desses compostos (Schneider *et al.*, 2017).

No entanto, apesar dessas particularidades promissoras dos GC, existe uma discrepância entre o número de publicações que tratam da identificação, isolamento e síntese de novos GC com potente atividade evidenciada em ensaios *in vitro* e àquelas relacionadas as investigações posteriores, envolvendo ensaios clínicos. A maioria dos ensaios *in vivo* realizados para avaliar essas substâncias são realizados em modelos xenográficos de tumores humanos em razão da escassez de modelos de experimentação confiáveis decorrente das diferenças interespecies na sensibilidade a essas substâncias por variações observadas na estrutura da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Mijatovic *et al.*, 2007; Carvalho, 2012).

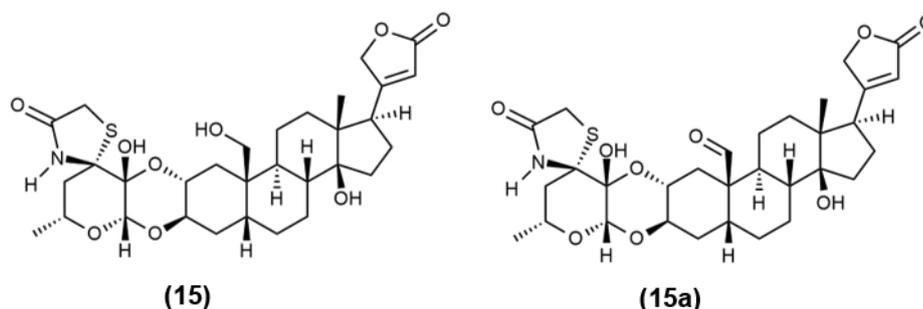
Alguns extratos vegetais contendo GC, derivados semissintéticos e/ou isolados de fontes naturais também vêm sendo investigados em ensaios clínicos de fase I e II. Até o momento, quatro produtos à base dessas substâncias foram investigados no tratamento de tumores sólidos. O primeiro produto investigado compreende um extrato aquoso liofilizado de *Nerium oleander* L. (espirradeira) rico em oleandrina (**10**) e oleandrigenina (**10a**), conhecido como Anvirzel™, o qual inibiu o ciclo catalítico da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, bem como a expressão do fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, FGF-2 – *Fibroblast Growth Fator 2*) em células de câncer de próstata e de pulmão (Mekhail *et al.*, 2006; Slingerland *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2017).



O segundo produto avaliado (PBI-02504) também corresponde a um extrato de *N. oleander* e é obtido por extração com dióxido de carbono supercrítico. Esse extrato foi considerado seguro no ensaio clínico de fase I e, após determinação da dose máxima tolerada (DMT) e dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos pertinentes, o ensaio clínico de fase II foi conduzido com 46 pacientes acometidos com diversos tipos de câncer em estágio avançados. Os resultados sugeriram uma aceitável tolerabilidade ao extrato até uma dose de 10,2 mg/dia e não foram observados efeitos cardiotóxicos. Em uma avaliação em ensaio clínico de fase II para

adenocarcinoma pancreático metastático PBI-05204 não foi se mostrou capaz de aumentar a sobrevida geral dos pacientes, embora tenha demonstrado melhorar a sobrevida dos pacientes que completaram os dois ciclos da monoterapia. Em contrapartida, dados pré-clínico recentes indicaram que PBI-05204 pode ser eficiente contra glioblastoma multiforme quando em combinação com outros agentes quimioterápicos ou radioterapia. Por essa razão, um estudo randomizado de fase II também foi delineado para avaliação dessa aplicabilidade (Henary *et al.*, 2011; Slingerland *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2017; Roth *et al.*, 2020).

O terceiro produto em avaliação corresponde a um derivado semissintético (**15**) da 2''-oxovuscharina (**15a**) – um cardenólídeo extraído da *Calotropis procera* – denominado UNBS1450, demonstrou potente atividade antiproliferativa *in vitro*, apresentando valores de  $CI_{50}$  variando de 10 a 50 nM em 58 linhagens de células tumorais humanas diferentes, sendo inclusive mais citotóxico que **15a**. Esse composto foi capaz de afetar várias vias de sinalização após ligação com a  $Na^+/K^+$ -ATPase e de induzir a ruptura dos filamentos de actina, podendo ser, portanto, considerado um agente antiproliferativo e antimigratório, visto que o citoesqueleto de actina é essencial para a citocinese e migração das células cancerígenas. Por essas razões, UNBS1450 foi conduzido para avaliação em ensaio clínico de fase I na Bélgica e na Holanda para o tratamento de pacientes com linfomas e tumores sólidos, mas o estudo foi encerrado em 2011 em decorrência do óbito de 23 pacientes, impossibilitando a definição da DMT (Van Quaakebeke *et al.*, 2005; Slingerland *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2017).



Na medicina tradicional chinesa um extrato de secreção de anfíbios do gênero *Bufo* spp. (HuaChanSu) é conhecido por seus notáveis efeitos antitumorais e tem sido empregado para o tratamento de doenças malignas desde o século VIII. Em um estudo clínico de fase I envolvendo pacientes acometidos com câncer de pulmão, fígado e pâncreas, esse extrato rico em bufadienólídeos foi bem tolerado e foi capaz

de promover uma estabilização. Posteriormente HuaChanSu foi avaliado em um ensaio clínico de fase II em combinação com gencitabina para o tratamento de câncer de pâncreas avançando e metastático e embora tenha sido bem tolerado, fracassou em outros aspectos relacionados ao tempo de progressão, qualidade de vida e sobrevida geral dos pacientes (Elbaz *et al.*, 2012; Menger *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2017).

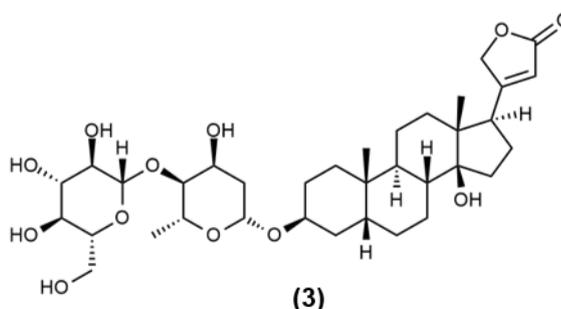
Além desses, outros 27 ensaios clínicos empregando a digoxina também foram iniciados para avaliação como única substância e em combinação com outros agentes quimioterápicos no tratamento de diversos tipos de tumores, incluindo cabeça e pescoço, próstata, câncer de mama e de pulmão, tumores sólidos malignos avançados, Sarcoma de Kaposi, e leucemia mieloide aguda. Desses, treze já foram concluídos, nove estão em fase de recrutamento e outros quatro estão ativos e em situação de avanço desconhecida (<https://clinicaltrials.gov> – acesso em Jun/2021).

#### 4.3.2 Atividade Antiviral dos GC

Outros estudos também trouxeram à luz a promissora ação antiviral dos GC. Recentemente, o efeito inibitório da digitoxina (1), digoxina (2) e ouabaína (9) frente as cepas do vírus herpético humano dos tipos I e II (do inglês, *HSV-1* e *HSV-2* – *Herpes Simplex Virus 1 and 2*) foi evidenciado em uma triagem antiviral envolvendo 960 compostos selecionados a partir de um banco de dados de moléculas bioativas, sendo a maioria aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA). Nesse estudo, a digitoxina exibiu um valor de  $CI_{50}$  de 0,05  $\mu$ M frente a cepa KOS do vírus HSV-1, uma concentração cerca de 63 vezes menor do que àquela observada pelo aciclovir (3,31  $\mu$ M), que segue sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento das infecções causadas pelo herpes vírus. Ensaio adicionais para avaliação do mecanismo de ação anti-herpético exercido pela digitoxina sugeriram que esse composto atua afetando o processo de replicação do DNA viral e de liberação das novas cepas virais (Su *et al.*, 2008)

Considerando o núcleo esteroidal dessas substâncias, uma nova triagem anti-herpética foi conduzida envolvendo uma seleção de 65 diferentes GC, obtidos por síntese, semissíntese, biotransformação ou isolados a partir de espécies vegetais.

Dentre esses, um glicosídeo isolado de *Digitalis lanata* conhecido como glicoevatromonosídeo (**3**), se destacou como o composto mais promissor da série, apresentando  $CI_{50}$  de  $0,13 \mu M$  frente a cepa KOS do vírus HSV-1 e se mostrou ser cerca de 3,6 vezes mais seletivo ( $IS = 2.107$ ) do que o controle positivo aciclovir ( $IS > 580$ ). Esse mesmo derivado também apresentou potente atividade frente a cepa 29-R do vírus HSV-1 ( $CI_{50}$  de  $0,06 \pm 0,01 \mu M$ ;  $IS = 4.566$ ), uma cepa resistente à ação do aciclovir, o que sugere que o mecanismo de inibição da replicação viral exercido pelos GC não envolve a mesma via observada para os representantes da classe dos análogos de nucleosídeos. Os autores sugerem que os GC são capazes de inibir tanto a síntese proteica viral, bloquear a liberação das novas cepas virais das células infectadas e reduzir a disseminação do vírus entre as células. Sendo assim, esses resultados apontam os GC como uma possível nova classe de fármacos anti-herpéticos, podendo ser utilizados isolados ou em associação com fármacos análogos de nucleosídeos (Bertol *et al.*, 2011).



A atividade antiviral da digoxina (**2**) foi, ainda, relatada para outros vírus de DNA (vírus da varicela, zoster, citomegalovírus, adenovírus) e RNA (vírus da influenza, vírus da doença de New Castle e vírus da estomatite vesicular). A oleandrina (**10**) também demonstrou capacidade de redução da infecciosidade do vírus HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) por inibir a expressão da glicoproteína viral Gp120 exposta na face externa no envelope viral, que permite a ligação do vírus aos receptores presentes na membrana dos linfócitos T auxiliares (Hartley *et al.*, 2006; Dodson *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2012).

Mais recentemente, os GC se destacaram em uma triagem *in vitro* que investigou o potencial antiviral de 5.406 fármacos e moléculas bioativas frente a uma cepa de coronavírus (MERS-CoV) semelhante a cepa do novo coronavírus (SARS-CoV-2). Nesse estudo foram identificadas 12 substâncias potencialmente eficazes no

tratamento das infecções causadas pelas cepas MERS-CoV e SARS-CoV-2, com destaque para os mesmos três GC apontados em estudos anteriores para atividade anti-herpética, podendo atuar em sinergismo com outros fármacos antivirais, como remdesivir, para um tratamento mais efetivo (Ko *et al.*, 2021).

Em estudos anteriores, a ouabaína (**9**) foi capaz de inibir o estágio de entrada de coronavírus (Cov) nas células hospedeiras, resultando no acúmulo dos vírions na superfície celular. Esse efeito antiviral da ouabaína parece ocorrer por meio da interação dessa substância com a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, em concentrações nanomolares, promovendo a ativação de uma via de sinalização intracelular por intermédio da proteína tirosina quinase Src, que interfere na capacidade do vírus de penetrar nas células via formação de endossomos. Consistente com esses relatos anteriores, os dados obtidos por Ko e colaboradores (2020) sugerem que **1**, **2** e **9**, também atuem dessa forma. No entanto, o estudo em questão ainda não foi publicado e novos estudos parecem ser necessários para elucidação do mecanismo exato pelo qual esses GC promovem seus efeitos antivirais (Burkard *et al.*, 2015; Ko *et al.*, 2021).

Em um outro estudo também em processo de análise, quatro GC – digoxina (**2**), digitoxina (**1**), ouabaína (**9**) e proscillaridina A (**12**) também se destacaram dentre outras 3.000 substâncias testadas frente ao SARS-CoV-2, sendo capazes de inibir a replicação viral em concentrações inferiores a 1,0 µM (Jeon *et al.*, 2020).

Apesar de ainda inconclusivos, os resultados desses estudos estão em consonância com o resultado de análises recentes de *docking* molecular, que sugerem que a digitoxina (**1**) e digoxina (**2**) apresentam alta afinidade de ligação à enzima Mpro expressa pelo SARS-CoV-2, uma protease altamente conservada entre diferentes cepas de coronavírus, que representa, portanto, um alvo ideal para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antivirais de amplo espectro. Esses resultados ainda fornecem uma outra rota de atuação, além de dar suporte para investigação mais profundas para estudos observacionais em pacientes em tratamento com digoxina para avaliação do potencial preventivo desse fármaco (Talluri, 2020).

#### 4.4 Bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

As bases moleculares envolvidas nas propriedades cardiotônicas dos glicosídeos cardioativos (GC) só vieram a luz cerca de um século depois do isolamento e identificação da digitoxina.

Em 1925, quando Gorter e Grendel evidenciaram que a membrana celular era composta por uma bicamada lipídica, não foram capazes de fornecer uma explicação para a reduzida tensão superficial que as células apresentavam quando comparadas a uma trivial interfase água-óleo. Danielli e Davson, no entanto, sugeriram – em 1935 – que essa diferença de tensão era explicada pela presença de proteínas adsorvidas em cada um dos lados na bicamada lipídica (Gorter & Grendel, 1925; Danielli & Davson, 1935).

No citoplasma celular existem proteínas carregadas negativamente que não são capazes de atravessar a membrana plasmática e se difundir para o meio extracelular. Dessa forma, a neutralização dessa carga negativa é garantida pela presença de íons  $\text{K}^+$  no interior da célula. Uma vez que esse íon é lipofóbico, a presença desses no citoplasma celular deu suporte a teoria de que existiam proteínas transportadoras inseridas ao longo da bicamada lipídica e que tornavam possível a passagem de solutos que não eram capazes de atravessar a membrana plasmática por difusão passiva (Boyle & Conway, 1941).

A diferença de concentração dos íons  $\text{K}^+$  é cerca de 40 vezes maior no interior das células, o que contribui para que a pressão osmótica seja significativamente maior no meio intracelular do que no meio extracelular. Por essa razão, uma vez que a membrana celular é permeável a água, a bicamada lipídica seria incapaz de resistir à pressão hidrostática gerada, o que resultaria na lise celular se nenhum mecanismo de compensação estivesse atuando (Boyle & Conway, 1941).

A alta pressão osmótica dentro da célula é, no entanto, apropriadamente equilibrada pela elevada concentração de íons  $\text{Na}^+$  no meio extracelular. Essa diferença de concentração de íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  nos meios intra e extracelular levou os pesquisadores Dean (1941) e Krogh (1946) a proporem que essas diferenças de concentração eram mantidas pela existência de um transportador dependente de energia capaz de bombear esses íons inorgânicos contra seus respectivos gradientes eletroquímicos (Dean, 1941; Krogh, 1946; Rapoport, 1970).

Ainda em meados da década de 40, Jens Christian Skou – um médico dinamarquês – havia conduzido uma série de experimentos na tentativa de elucidar o mecanismo de ação de anestésicos locais. Naquela época, os estudos de Meyer (1899) e Overton (1901) já haviam levantado a hipótese da existência de uma correlação entre a lipossolubilidade de anestésicos gerais e a potência anestésica. Skou, na tentativa de investigar se os anestésicos locais também seguiam a teoria de Meyer-Overton, conduziu um experimento adotando como modelo uma monocamada lipídica e observou que havia uma certa correlação positiva entre a permeabilidade e a potência anestésica apresentada por essas substâncias, mas sugeriu que essa correlação só se manifestaria se houvesse a participação de alguma lipoproteína de membrana, visto que considerava improvável que o bloqueio no aumento do influxo de  $\text{Na}^+$  na célula – observado na fase de despolarização de um impulso nervoso – estivesse conectado unicamente com a permeabilidade desses anestésicos na bicamada lipídica (Meyer, 1899; Overton, 1901; Lifnick, 1989; Katz, 1994).

A fim de testar sua teoria, Skou isolou pedaços da membrana de nervos extraídos de caranguejos, mesclou com uma enzima de membrana – inicialmente descrita por B. Libert – que supostamente operava mediante a hidrólise de moléculas de ATP e adicionou diferentes tipos de sais desse nucleotídeo para avaliar a atividade da enzima. Com isso, Skou concluiu que a enzima necessitava de uma combinação de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  no meio para sua ativação e foi só então que ele percebeu que essa enzima poderia estar envolvida no transporte ativo desses íons através da membrana plasmática (Skou, 1957).

Paralelamente aos estudos iniciados por Skou, Schatzmann, em 1953, já tinha demonstrado que a ouabaína – um dos mais conhecidos GC até aquele dado momento – era capaz de inibir especificamente o transporte ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  em hemácias. Robert Post, em 1957, também havia publicado um estudo aplicando esse mesmo inibidor, que o permitiu descobrir que esse transporte ativo respeitava uma estequiometria definida: a cada três íons de  $\text{Na}^+$  transportados para fora da célula, dois íons  $\text{K}^+$  eram bombeados para dentro da célula (Schatzmann, 1953; Post & Jolly, 1957).

Munido dessas observações, Skou conduziu um experimento para verificar se a ATPase, que vinha sendo seu objeto de estudo, também seria inibida pela ouabaína e Post repetiu seus experimentos para verificar se a ATPase também estava presente

na membrana dos eritrócitos. Com a confirmação dessas suspeitas, Post publicou, em 1960, um artigo que apresentou ao mundo científico a enzima de membrana mais notória dos últimos tempos e conferiu a Skou o Prêmio Nobel de Química (1997) pela sua descoberta (Post, 1960).

Nos anos seguintes à publicação, vários artigos foram publicados demonstrando que, além da membrana dos neurônios e dos eritrócitos, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase também poderia ser encontrada em células de vários outros tecidos humanos e de outros organismos, dando suporte aos indícios do envolvimento dessa enzima no transporte ativo. E com todas essas evidências aparecendo, foi ficando cada vez mais explícito quais eram os requisitos por trás desse sistema enzimático responsável pelo transporte ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana (Skou, 1965).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pertence à superfamília das ATPase do tipo P, um grupo de enzimas transmembranas assim denominadas pela sua capacidade de catalisar uma auto-fosforilação em um resíduo de aspartato presente na região do domínio P. Essas enzimas estão envolvidas na captação e efluxo de alguns cátions – como os íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  – e alguns fosfolípidos (Yatime *et al.*, 2008; Palmgren & Nissen, 2011).

Além do domínio P – região da ligação do ATP – outros domínios altamente conservados também são observados nessas enzimas, como a região de ligação de cofatores e as regiões que estabelecem uma comunicação entre a hidrólise do ATP e as mudanças conformacionais observadas. Todos os representantes dessa superfamília parecem se interconverter entre pelo menos duas conformações principais, frequentemente denotadas por  $E_1$  e  $E_2$  e que refletem a seletividade da enzima pelos íons importados e exportados (Kaplan, 2002; Yatime *et al.*, 2008; Palmgren & Nissen, 2011).

As ATPases do tipo P possuem uma única unidade catalítica, onde estão localizados os sítios de ligação do ATP, dos íons transportados e dos cofatores envolvidos. Algumas subfamílias dessa classe também estão associadas à subunidade adicionais para o funcionamento adequado da enzima. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é composta por três subunidade: alfa, beta e gama (Kaplan, 2002).

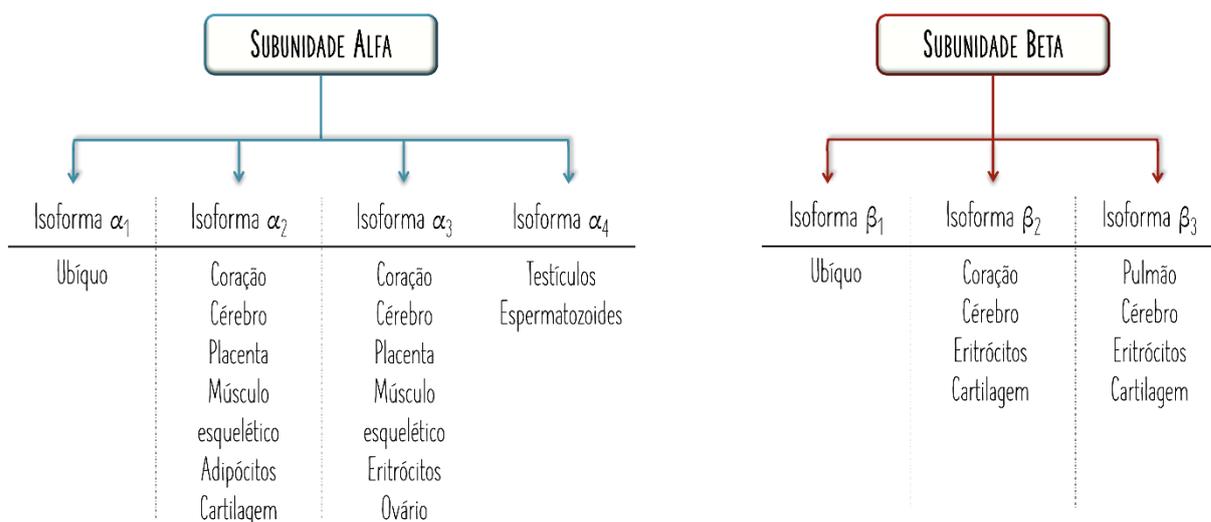
A subunidade alfa ( $\alpha$ ) corresponde a porção catalítica da enzima e é composta primordialmente por uma seção transmembrana e uma seção citoplasmática. A maior

parte dos segmentos dessa subunidade corresponde à seção transmembrana – também designada como domínio M – que consiste em 10 hélices transmembranas (TM1-TM10) unidas entre si por alças que estão localizadas tanto na porção extracelular, quanto na porção intracelular da enzima. As alças localizadas no interior da célula dão origem a seção citoplasmática da subunidade alfa. Essa seção é composta pelas porções N-terminal e C-terminal da subunidade e por três domínios principais: o domínio de ligação de nucleotídeo (N), o domínio de fosforilação (P) e o domínio atuador (A). Os domínios N e P são formados pela longa alça observada entre TM4 e TM5 e são responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP, resultando na formação do intermediário transiente fosforilado da enzima. A alça entre TM2 e TM3 e a porção N-terminal formam em conjunto o domínio A, que possui atividade antagônica à do domínio N, sendo responsável por controlar a desfosforilação do domínio P (Kaplan, 2002; Palmgren & Nissen, 2011; Albuquerque *et al.*, 2017).

A subunidade beta ( $\beta$ ) é classificada quanto a sua topologia como uma proteína de membrana do tipo II e, portanto, apresenta um único segmento transmembrana com seu domínio N-terminal localizado no citoplasma. Essa subunidade tem função reguladora e apresenta diversas regiões glicosiladas – incluindo o domínio C-terminal extracelular – o que parece contribuir para o envolvimento dessa glicoproteína na biogênese, estabilização e funcionamento do complexo enzimático (Kaplan, 2002; Mijatovic *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2017).

Existem, até o momento, quatro isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha 1 - 4$ ) e três isoformas da subunidade  $\beta$  ( $\beta 1 - 3$ ) identificadas, as quais apresentam graus de distribuição diferentes dependendo do tecido e do estágio de desenvolvimento do organismo (**Figura 7**). Todas as possíveis combinações dessas duas subunidades resultam em um complexo enzimático funcional, o que sugere que múltiplas isoenzimas podem ser expressas em uma única célula. O arranjo dos heterodímeros  $\alpha, \beta$  e a inserção desse na membrana plasmática é controlada pela subunidade  $\beta$  e a combinação  $\alpha 1 \beta 1$  tem sido a mais amplamente observada em células humanas normais. As demais combinações se manifestam em um padrão de expressão muito mais restrito (Mijatovic *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2017).

**Figura 7 – Expressão das diferentes isoformas das subunidades alfa e beta nos diferentes tipos de tecidos corporais em humanos.**

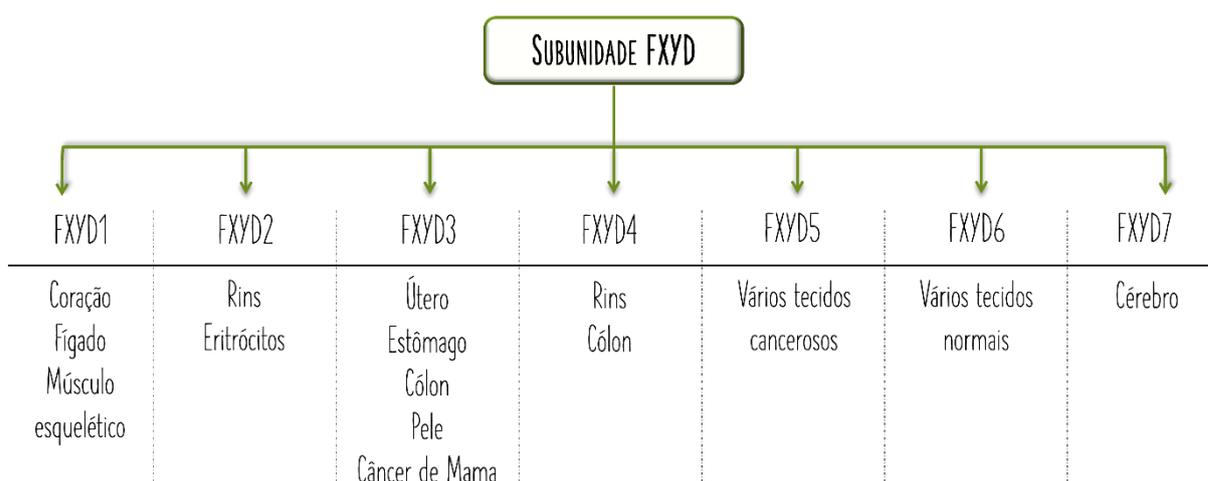


Adicionalmente, em alguns tecidos a constituição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase também pode contar com um terceiro tipo de subunidade. Assim como a subunidade beta, a maioria das variantes dessa subunidade – formalmente designada como subunidade  $\gamma$  – também apresenta apenas um único segmento atravessando a membrana e possui atividade regulatória, afetando a afinidade aparente da enzima pelos íons  $\text{K}^+$  na conformação  $\text{E}_2$ . Das sete isoformas (FXVD1 – 7) desse proteolípídeo identificadas até o momento todas pertencem a família FXVD e apenas duas (FXVD5 e 6) ainda não foram identificadas em associação com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase expressa em condições fisiológicas normais. Essas isoformas se diferem entre si nos resíduos de aminoácidos que constituem o domínio N-terminal e estão distribuídas em diferentes tecidos, conforme representado na **Figura 8** (Geering, 2005; Geering, 2006; Mijatovic *et al.*, 2008).

Desde a sua descoberta, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase tem sido amplamente estudada quanto as suas funções na manutenção do gradiente eletroquímico nas células. No entanto, embora as primeiras evidências acerca das funções desempenhadas já tenham sugerido a participação dessa enzima na regulação do crescimento celular e expressão de vários genes, só recentemente os mecanismos pelos quais essa proteína de membrana é capaz de se comunicar com o núcleo celular foram examinados, revelando que além da ação no transporte de íons, essa enzima também pode atuar como transdutor de sinal por meio da interação com outras proteínas de

membrana, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular, além de participar de processos de adesão e motilidade celular. Essa capacidade de converter sinais recebidos no exterior das células em estímulos intracelulares tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas e sugere que essa enzima pode ser um alvo interessante na terapia de vários tipos de condições patológicas, como o câncer (Boardman *et al.*, 1974; Scheiner-Bobis, 2002; Mijatovic *et al.*, 2012).

**Figura 8 – Expressão das diferentes isoformas da subunidade gama nos diferentes tipos de tecidos corporais em humanos.**



Estudos moleculares acerca do potencial sinalizador dessa enzima levaram os pesquisadores a propor que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é representada, na verdade, por dois espécimes distintos, que se localizam em porções diferentes nas células, apresentam composição diferencial quanto as isoformas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , podem interagir com diferentes proteínas na membrana plasmática e cujas expressões variam em diferentes células e tecidos, bem como em estados saudáveis e patológicos. A interação de moduladores da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase com as isoenzimas que representam o espécime conhecido como “sinalossomos”, são capazes, portanto, de desencadear uma série de vias de sinalização celular que interferem nos processos de proliferação, diferenciação e promoção de sistemas de renovação celular (autofagia e apoptose) sem necessariamente resultar em alterações nas concentrações intracelulares de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  decorrentes da bem conhecida função de bombeamento dessa enzima (Xie & Askari, 2002; Liu & Askari, 2006; Liu, 2011; Diederich *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2017).

Os mecanismos envolvidos na modulação da expressão e da atividade dessa enzima, mediante demanda fisiológica, são diversos e estão associados a um controle dependente do tempo. A regulação da expressão de curto prazo (do inglês, *short-term regulation*) influencia na quantidade de enzimas que são recrutadas para inserção na membrana plasmática, dependendo da demanda. Em contrapartida, a regulação de longo prazo (do inglês, *long-term regulation*) provoca alterações nos mecanismos de transcrição e pós-transcrição dos genes relacionados e é afetada pela ação de diversos estímulos gerados por reguladores específicos, tais como: hormônios, neurotransmissores, citocinas e fármacos (Mijatovic *et al.*, 2008).

Via de regra, a expressão da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é mais abundante em tecidos envolvidos no transporte de íons e em tecidos excitáveis, com uma variação que pode atingir uma diferença de até 160 mil vezes. Também são observadas diferenças na expressão em decorrência do estágio de desenvolvimento do organismo e nos estágios de progressão de algumas doenças. No câncer, no geral, são observados níveis de expressão mais baixos nos estágios iniciais da doença, com um aumento gradativo à medida que o tumor vai avançando (Geering, 2006; Mijatovic *et al.*, 2008).

Além disso, a expressão das diferentes isoenzimas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase também é regulada e especificadamente alterada em certas doenças. A variação na expressão das isoformas das subunidades em diferentes tipos de câncer humanos tem sido extensivamente investigada nas últimas décadas e embora a desregulação na distribuição das diferentes isoformas sob condições patológicas ainda não esteja totalmente elucidada, a subunidade alfa é considerada um potencial alvo molecular a ser explorado no combate a alguns tipos de câncer, especialmente os mais agressivos. No geral, tem sido constatado que a taxa de expressão da isoforma  $\alpha_1$  é significativamente maior nas células neoplásicas nos estágios iniciais da tumorigênese, em contraste com o que é observado nos tecidos normais correspondentes. Já em estágios mais avançados o que se observa é uma elevação na expressão da isoforma  $\alpha_3$  (Espineda *et al.*, 2003; Mijatovic *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase não só representaria um novo alvo terapêutico, como também atuaria como um marcador biológico para avaliação do estadiamento de alguns tipos de câncer. Por essa razão, um número crescente de estudos tem buscado avaliar o potencial terapêutico de moduladores conhecidos para

essa enzima, especialmente os GC. Nesse sentido, essas substâncias são capazes de desencadear uma série de vias de sinalização celular que interferem nos processos de proliferação e diferenciação, atuando na indução de processos de *turnover* (autofagia e apoptose) em diferentes tipos de células cancerígenas (Albuquerque *et al.*, 2017).

Essas substâncias inibem a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ao se ligarem em uma cavidade extracelular existente entre as alças formadas entre TM1–TM2 e TM3–TM4. Embora os GC se liguem à Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com maior estabilidade no estágio E<sub>2</sub> fosforilado (E<sub>2</sub>P) – estágio de alta afinidade pelos íons K<sup>+</sup> –, elas também são capazes de se ligar à enzima em diferentes estágios do ciclo catalítico com diferentes graus de afinidade. Apesar da ouabaína ser capaz de inibir a isoforma α<sub>1</sub> apenas no estado fosforilado, sua ligação à subunidade α<sub>2</sub> também pode ocorrer em um estado não-fosforilado. No entanto, a ligação estabelecida é muito menos efetiva quando comparada à ligação às isoenzimas formadas com as demais isoformas, refletindo em uma dissociação cerca de 5 – 10 vezes mais rápida (Crambert *et al.*, 2000; Mijatovic *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2009).

No entanto, comparações entre modelos cristalográficos da enzima em diferentes estágios sugerem que o sítio de ligação e suas características determinantes são essencialmente os mesmos, mesmo na presença de íons K<sup>+</sup>. Esse íon, além de acelerar o processo de desfosforilação dessa enzima – o que, dessa forma, converte a enzima a um estágio de menor afinidade aos GC –, também provoca um impedimento ao sítio de ligação desses inibidores, antagonizando ainda mais os efeitos provocados por essas substâncias (Kaplan, 2002; Mijatovic *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2009).

No geral, as mudanças desencadeadas pela ligação dos GC são pequenas e se limitam à região das hélices TM1–TM4. A diferença mais notável refere-se ao deslocamento da porção extracelular da hélice TM4, se afastando de TM6 e provocando uma ligeira mudança na posição das hélices TM1 e TM2 (Ogawa *et al.*, 2009).

A carbonila conjugada do anel lactônico é capaz de provocar o rompimento de ligações de hidrogênio originalmente estabelecidas entre o resíduo glicina e os resíduos valina e alanina – presentes na hélice TM4 – e estabelecer uma nova ligação de hidrogênio com a região amina desses resíduos, afastando o resíduo glicina devido

à repulsão eletrostática gerada. Em consequência desse novo arranjo, a coordenação do íon  $K^+$  é parcialmente alterada em um dos seus sítios de ligação, posicionando-o de tal forma que a proximidade com o anel lactônico impede a dissociação desse íon e, conseqüentemente, força à  $Na^+/K^+$ -ATPase a interromper seu funcionamento (Forbush, 1983; Ogawa *et al.*, 2009).

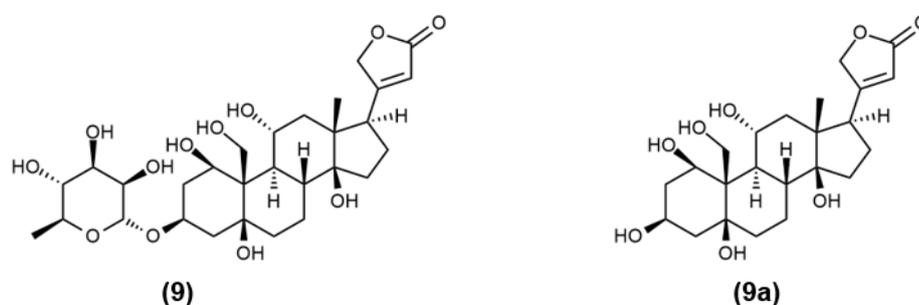
Os GC, no entanto, apresentam maior afinidade pela enzima no estágio  $E_2P$  no instante que antecede à coordenação dos íons  $K^+$ . A ligação desse íon ao seu sítio resulta em um desenovelamento da hélice TM4 que dificulta a acomodação do anel lactônico, reduzindo parcialmente a potência dessas substâncias nesse estágio do ciclo enzimático (Akera *et al.*, 1985; Ogawa *et al.*, 2009).

O núcleo esteroidal dos GC, por sua vez, se acomoda em uma cavidade revestida pelas hélices TM4–TM6. Originalmente, três resíduos de fenilalanina, um de leucina e um de isoleucina estão intimamente conectados, formando um bolsão hidrofóbico estreito. Para acomodar o núcleo esteroidal, as cadeias laterais dos dois resíduos de fenilalanina sofrem uma torção que resulta na formação de uma superfície capaz de estabelecer interações com um dos lados do esqueleto esteroidal ( *$\alpha$ -side*), com a premissa de que as junções entre os anéis AB e CD sejam do tipo *cis* (Ogawa *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2013).

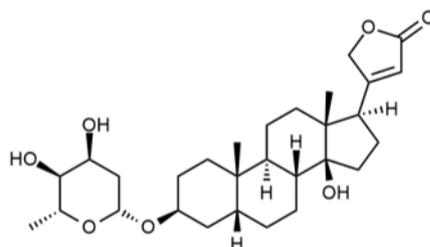
O núcleo esteroidal dos GC também apresenta outros elementos que podem ser essenciais para uma interação funcional com o sítio de ligação. A hidroxila da posição C-14 $\beta$  estabelece uma importante interação do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo de treonina. As agliconas do GC também podem apresentar oxidação em outras posições do núcleo. Hidroxilas na posição C-11 ou C-12 parecem ser prejudiciais para a ligação devido à falta de espaço para acomodação desses grupos. Em contraposição, parece haver espaço disponível próximo à posição C-16, permitindo que alguns grupos mais volumosos estejam presentes sem que isso ocasione grande impacto na afinidade (Paula *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2015).

O esqueleto esteroidal dessas substâncias pode ainda ser substituído na posição C-3 por um terceiro elemento: uma cadeia lateral de açúcares, resultando na formação dos heterosídeos. Embora essa porção osídica não seja diretamente responsável pela atividade cardiotônica desses GC, a estereoquímica e a quantidade de açúcares que compõem essa cadeia lateral também influencia na afinidade dessas

substâncias pelo seu sítio de ligação na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, principalmente entre as diferentes isoformas da subunidade de ligação. No geral, essa cavidade de ligação é bastante estreita e apenas cadeias laterais inseridas nas posições C-2 e C-3 do núcleo esteroidal são toleradas. De fato, a região do sítio de ligação em que as moléculas de açúcar geralmente se acomodam, possui uma área relativamente grande, capaz de acomodar adequadamente mais de um resíduo de açúcar, o que acaba contribuindo para aumentar a afinidade dessas substâncias. A presença de um resíduo de L-ramnose na cadeia lateral da ouabaína (**9**) confere a esse heterosídeo uma afinidade muito maior (cerca de 300 vezes) quando comparado à aglicona correspondente, a ouabagenina (**9a**). A principal explicação para essa diferença de afinidade pode estar correlacionada com a natureza estérica e hidrofílica dos resíduos constantemente observados na cadeia lateral dessas substâncias (Ogawa *et al.*, 2009; Katz *et al.*, 2010; Laursen *et al.*, 2013).



Os principais açúcares identificados na cadeia lateral desses compostos são 2-desóxiaçúcares que apresentam na posição C-6 da hexose um grupo metila. A substituição da digitoxose presente na molécula do evatromonosídeo (monodigitoxosídeo da digitoxigenina - **17**) por qualquer outro resíduo de açúcar desse grupo – L-ramnose, D-tevetose, D-fucose, L-oleandrose e outros – não provoca uma alteração significativa na afinidade dessas substâncias. Em contraste, a oxigenação da posição C-6 dessas moléculas de açúcar provoca um efeito deletério em razão da hidrofobicidade dessa região de ligação, que não suporta nenhum tipo de interação íntima com a porção hidrofílica desses resíduos de açúcar. Essa característica reforça a não essencialidade de uma cadeia osídica para a ação inibitória dessas substâncias (O'Brien *et al.*, 1993; Kreis *et al.*, 1998; Paula *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2013).



(17)

Entretanto, é válido salientar que atingir um índice terapêutico mais amplo ainda é um desafio a ser suplantado para aplicação terapêutica dos GC. Dessa forma, uma vez que o preenchimento dessa cavidade contribui para aumentar o tempo de permanência dessas substâncias no sítio de ligação em virtude de um aumento na afinidade de ligação, explorar a inserção de diferentes cadeias laterais nessas posições do núcleo esteroidal (C-2 e C-3) tem sido uma estratégia bastante aplicada para compreensão e farmacomodulação das interações dos GC com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. A simplificação das cadeias laterais nessas posições, substituindo os resíduos de açúcar por grupos mais simples, permite a síntese de novas substâncias em séries congêneres para construção de modelos preditivos, contribuindo assim para determinação dos substituintes mais apropriados em C-2 e C-3 para o planejamento de candidatos à fármacos mais promissores (Mijatovic *et al.*, 2012).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Equipamentos

- Agitador magnético, IKA C-MAG H87
- Balança analítica Denver Instrument
- Balança analítica Mettler, modelo AB 204.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de ultrassom Thornton, modelo T 50.
- Bombas de vácuo KnfLab Laboport, modelo N86KT.18
- Coluna fase reversa, Acquity UPLC BEH C18, Waters; 5,0 x 2,1 mm d.i. 1,7 µm.
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Evaporador rotatório Büchi, modelo R-114.
- Eppendorf Thermo Shaker Uniscience Biosan, modelo TS-100.
- Pré-coluna, Acquity UPLC BEH C18, Van Guard pre-column, Waters; 2,1 x 5 mm d.i. 1,7 µm.
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Lâmpada UV para cromatografia Spectroline, modelo 977 C (254 e 365 nm).
- Micropipetas HTL, volume ajustável de 1000 µL.
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), equipado com detector DAD na faixa de 200 a 500 nm e interface com espectrômetro de massas de triplo quadrupolo com fonte de ionização por electrospray (Acquity TQD, Waters).

### 5.2 Solventes e Reagentes

- Ácidos 3,5-dinitrobenzóico, Riedel-deHaën
- Ácidos grau P.A: ácido fórmico, ácido sulfúrico, ácido acético, Merck.
- Anisaldeído suflúrico, Sigma-Aldrich.
- Azida de sódio, Vetec.
- Bicarbonato de sódio, Fmaia.
- Boroidreto de sódio, Sigma-Aldrich.
- Carbonato de sódio, Vetec.
- Carbonato de Potássio, Vetec.

- Carvão ativado, Synth.
- Cloreto de cloroacetila, Sigma-Aldrich.
- Cloreto de p-toluenosulfonila, Sigma-Aldrich.
- Dioxano, Sigma-Aldrich.
- Dimetilformamida, Sigma-Aldrich.
- DIPEA, Sigma-Aldrich.
- Gelo pilado.
- Hidróxido de amônio P.A., Isofar.
- Hidróxido de sódio P.A., Grupo Química.
- Hidróxido de potássio P.A., Vetec.
- Peneira molecular 3Å, Sigma.
- Solventes grau P.A: clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, acetona, álcool metílico e álcool etílico, Neon.
- Solventes grau CLAE: acetonitrila e metanol, Tedia.
- Sílica gel 60, 70-230 mesh, Merck
- Sílica gel 60, 230-400 mesh, Merck.
- Sulfato de sódio anidro, Êxodo Científica.
- Trióxido de cromo, Sigma-Aldrich.
- Tetraidrofurano, Sigma-Aldrich.

### 5.3 Vidrarias e Materiais Diversos

- Microtubo plástico de 600 µL e 2.000 µL do tipo *safe-lock*, Sigma-Aldrich.
- Balão de fundo chato de 500 mL, Pyrex.
- Balões volumétricos de 10, 25 e 100 mL, Satelit e Blaubrand.
- Balão tritubulado de fundo redondo de 1.000 mL.
- Barra de agitação magnética.
- Borrifador de vidro, Hialoquímica.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Colunas cromatográficas de vidro de dimensões variadas, Hialoquímica.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 ×10 cm e de 10 ×10 cm.
- Condensador de bolas, Hialoquímica.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.

- Funil de büchner, Chiarotti.
- Funil de separação de 250 mL, 500 mL e 1.000 mL, Pyrex.
- Funil de vidro sinterizado (nº 01 – diâmetro dos poros de 100 a 160 µm), Js.
- Funil de vidro sinterizado (nº 04 – diâmetro dos poros de 10 a 16 µm), Js.
- Papel indicador de pH Universal, pH 0-14, Merck.
- Papel de filtro quantitativo 15 cm de diâmetro, Framex.
- Papel de filtro qualitativo 12,5 cm de diâmetro, Nalgon.
- Ponteiras plásticas, Corning.
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para injetor automático em sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência.
- Tubo de vidro de bola esmerilhada de 50 mL.

#### 5.4 Solventes e Reagentes

- **Reagente de Jones** (Kiliani *et al.*, 1913)

Em um frasco de vidro âmbar contendo 7,0 mL de uma solução aquosa de CrO<sub>3</sub> 3,7 mol/L foram adicionados 2,3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Todas as soluções foram preparadas em banho de gelo e a mistura final foi armazenada à temperatura ambiente e protegida da luz.

- **Ativação da Peneira Molecular**

Cerca de 100 gramas de peneira molecular 3Å em cápsula de porcelana foram mantidas por 2 horas em manta aquecedora à 300 °C. A cápsula preenchida foi então transferida para estufa à 100 °C por cerca de 12 horas até redução da temperatura e, posteriormente, foi mantida em dessecador sob vácuo e temperatura ambiente até utilização.

#### 5.5 Agentes Reveladores

- **Solução de Anisaldeído Sulfúrico** (Wagner *et al.*, 1996)

Em banho de gelo, foram adicionados 0,5 mL de anisaldeído à um béquer contendo 10,0 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, foram lentamente adicionados 85,0

mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, respectivamente, à solução anterior. A preparação foi mantida sob refrigeração e protegida da luz até o momento do uso.

- **Reagente de Kedde** (Wagner *et al.*, 1996)

Preparação extemporânea de uma mistura contendo as soluções A e B (1:1).

Solução A: solução metanólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico 2,0% p/v.

Solução B: solução hidrometanólica (1:1) de KOH 2M.

## 5.6 Identificação e Caracterização dos Derivados

### 5.6.1 Análises por UPLC-PAD-ESI-MS

As análises em UPLC-PAD-ESI-MS foram realizadas adotando um sistema ACQUITY Ultra Performace LC™ (Waters) acoplado simultaneamente a um detector de arranjo de fotodiodo PDA 2996 (Waters) e com interface para um espectrômetro de massas triplo quadrupolo ACQUITY TQ (Waters), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) por Z-Spray, operando em modo positivo e negativo no modo de varredura total (Full scan). O intervalo de massas avaliado foi da relação massa/carga ( $m/z$ ) de 200 a 1300 Da.

O *software* MassLynx™ (versão 4.1, Waters, Milford, MA, EUA) foi usado para controlar o sistema UPLC-PDA-ESI-MS, bem como para aquisição e processamento dos dados.

Para realização das análises, 3,0 µL das soluções amostra (1,0 mg/mL) foram injetadas em uma coluna de fase reversa (BEHC18, 1,7 µm, 50 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm), a um fluxo de 0,3 mL/minuto, adotando-se uma eluição em gradiente (Tabela 2). A fase móvel foi constituída de água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico, e a coluna foi mantida a 40 °C. A composição inicial da fase móvel apresentava 5,0% do solvente B, com gradiente linear até 95,0% do mesmo solvente até 10 minutos, retomando para 5,0% com 11 minutos de corrida. Em todas as etapas foram empregados solventes grau HPLC e

água destilada, filtrada em sistema Milli-Q. Metanol e acetonitrila foram utilizados como branco para as análises.

**Tabela 2 – Gradiente de eluição das análises por UPLC-PAD-ESI-MS.**

<b>Tempo</b>	<b>Água (%) (Solvente A)*</b>	<b>Acetonitrila (%) (Solvente B)*</b>
0 minutos	95,0	5,0
10 minutos	5,0	95,0
11 minutos	95,0	5,0
13 minutos	95,0	5,0

\* Acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico.

Os cromatogramas foram registrados pelo detector PDA no intervalo de 210-500 nm. Os espectros de massa foram obtidos utilizando a fonte ESI, operando nas seguintes condições: voltagem do capilar de 3,50 kV; voltagem do cone 60 volts; energia de colisão de 20 eV; temperatura da fonte de 120 °C, enquanto a temperatura e o fluxo do gás de dessolvatação foram de 350 °C e 600 L.h<sup>-1</sup>, respectivamente.

### **5.6.2 Análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Para realização das análises em CCD, 40 microlitros das soluções amostra preparadas na concentração 1 mg/mL foram aplicados em placas de alumínio revestidas por 0,20 mm de sílica gel 60 com indicadores de fluorescência a 254 nm (Macherey-Nagel) e eluídas em diferentes condições cromatográficas conforme descrito na **Tabela 3**.

**Tabela 3 – Condições cromatográficas de análises dos derivados obtidos.**

<b>Reação</b>	<b>Eluente</b>	<b>Proporção</b>	<b>Eluição<sup>1</sup></b>
<b>Mistura de CG</b>	Acetato de etila	100%	Duas vezes
<b>Reação I</b>	Acetato de etila	100%	Duas vezes
<b>Reação II</b>	Acetato de etila	100%	Duas vezes
<b>Reação III</b>	Acetato de etila/Hexano	3:2	Duas vezes
<b>Reação IV</b>	Acetato de etila/Hexano	3:2	Três vezes
<b>Reação V</b>	Acetato de etila/Hexano	3:2	Duas vezes
<b>Reação VI</b>	Acetato de etila/Metanol/Trietilamina	4,99:4,99:0,02	Duas vezes
<b>Reação VII</b>	Acetato de etila/Metanol/Trietilamina	4,99:4,99:0,02	Duas vezes
<b>Reação VIII</b>	Acetato de etila	100%	Duas vezes
<b>Reação IX</b>	Acetato de etila/Metanol/Trietilamina	48,95:0,05:1	Três Vezes

<sup>1</sup> Correspondente ao número de vezes em que cada cromatoplaça foi eluída no respectivo eluente.

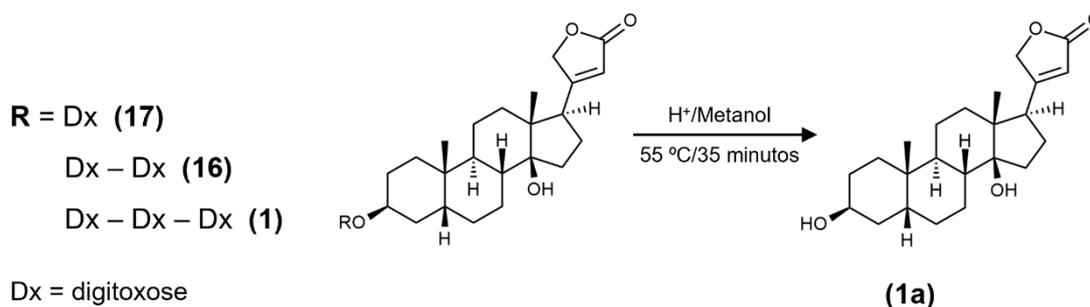
## 5.7 Síntese dos Derivados

### 5.7.1 Obtenção de Extrato Enriquecido em Cardenolídeos da Série A

Para obtenção de uma fração enriquecida em cardenolídeos da série A, foram adicionados 17,0 gramas de extrato metanólico seco de folhas de *D. lanata* rico em glicosídeos cardiotônicos – gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis da Universidade Erlangen-Nuremberg, Alemanha – em 200,0 mL de acetona. A suspensão obtida foi submetida a extração em banho ultrassônico por 30 minutos e o extrato acetônico obtido foi posteriormente filtrado, sob pressão reduzida, em funil de vidro sinterizado (nº 01 – diâmetro dos poros de 100 a 160 µm). O resíduo sólido retido no funil foi recolhido, ressuspendido em 100,0 mL e novamente submetido a extração em banho ultrassônico por 30 minutos para extração total dos glicosídeos cardiotônicos presentes no material de partida. Após nova filtração – nas mesmas condições descritas anteriormente – as frações do filtrado foram reunidas e filtradas, sob pressão reduzida, em 30 gramas de carvão ativado em pó depositados em um funil de vidro sinterizado (nº 04 – diâmetro dos poros de 10 a 16 µm). Adicionalmente, o carvão ativado foi lavado com 100,0 mL de acetona para dessorção dos glicosídeos cardiotônicos adsorvidos e o extrato enriquecido obtido foi levado ao evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho à 60 °C, até que todo o solvente tivesse sido eliminado. O extrato seco foi analisado por CCD e por UPLC-PDA-ESI-MS conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

### 5.7.2 Reação I – Hidrólise dos Glicosídeos Cardiotônicos

Figura 9 – Condições da reação de obtenção do derivado (1a).



A aglicona dos cardenolídeos pertencentes a série A – a 3β-hidroxi-digitoxigenina (**1a**) – foi selecionada nesse trabalho como material de partida para a sequência de reações de modificação que visa a obtenção dos derivados semissintéticos planejados. A obtenção dessa substância a partir do extrato de glicosídeos cardiotônicos obtida anteriormente foi realizada seguindo as condições de hidrólise ácida proposta por Pádua e colaboradores (2003).

Foram dissolvidos 10,0 gramas da mistura de cardenolídeos obtida anteriormente (item 4.1.1) em 400,0 mL de metanol em balão tritubulado de fundo redondo (1.000,0 mL de capacidade) e mantidos sob agitação magnética em banho de vaselina até que a mistura atingisse 55 °C. Em seguida, 350,0 mL de solução de HCl 1,0 mol/L foram adicionados lentamente e o meio reacional foi mantido sob agitação magnética e refluxo, à 55 °C, por 35 minutos. Transcorrido esse tempo, a reação foi interrompida pelo resfriamento do sistema em banho de gelo até que o meio reacional atingisse temperatura ambiente. A mistura reacional foi posteriormente elaborada por intermédio de uma extração líquido-líquido nas seguintes condições: a mistura foi inicialmente extraída com 3 x 200,0 mL de clorofórmio e a fração orgânica obtida foi neutralizada com 50,0 mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> 3,0% m/v. Posteriormente foi lavada com 3 x 100,0 mL de água destilada e sulfato de sódio anidro foi adicionado para eliminação da água residual presente. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e banho à 50 °C até obtenção do resíduo seco.

O produto de hidrólise obtido foi purificado empregando-se dois diferentes processos sequenciais conforme descrito a seguir. Para avaliação da eficiência dos processos foram feitas análises por CCD, conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6.2).

#### *Purificação 1 – Solubilidade Diferencial em Acetato de Etila*

Foram adicionados cerca de 20,0 mL de acetato de etila a um erlenmeyer de 100,0 mL de capacidade contendo todo o material obtido ao final da elaboração da reação de hidrólise (cerca de 7,0 gramas de 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina impura). A mistura foi submetida a sonificação em banho de ultrassom até que houvesse a ressuspensão de todo o material e em seguida, a suspensão obtida foi mantida em repouso a temperatura de aproximadamente 20 °C negativos por tempo suficiente para que todo o resíduo sólido se decantasse no fundo do frasco. O sobrenadante – rico em impurezas – foi recolhido por sucção e transferido para outro recipiente. Adicionalmente, mais 20,0 mL de acetato de etila foram adicionados ao erlenmeyer contendo o precipitado para que todo o processo fosse repetido por mais duas vezes.

#### *Purificação 2 – Dessorção Diferencial em Sílica Gel*

Foram reunidos os resíduos obtidos após purificação prévia – processo descrito acima – do material resultante de duas reações de hidrólise isoladas, totalizando cerca de 5,0 gramas de 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina pré-purificada. Todo esse material foi solubilizado em 300,0 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e incorporado em 15,0 gramas de sílica gel (0,04-0,063 mm) para composição do topo da coluna, que foi constituída por um funil de vidro sinterizado (nº 04 – diâmetro dos poros de 10 a 16  $\mu$ m) preenchido com 50,0 g do mesmo material adsorvente usado para composição do topo. A purificação foi procedida por meio da dessorção diferencial dos compostos a partir da eluição adotando-se mistura de solventes com polaridades crescentes, e sob condição de vácuo, conforme descrito na tabela a seguir:

**Tabela 4 – Gradiente de eluição da coluna de purificação do produto de hidrólise.**

Polaridade		Solventes	Volume	Frações
I	100%	Diclorometano	300,0 mL	1
II	18:2	Diclorometano/Acetato de etila	50,0 mL	2 – 10
III	9:1	Diclorometano/Acetato de etila	50,0 mL	11 – 30
IV	7:3	Diclorometano/Acetato de etila	50,0 mL	31 – 50
V	1:1	Diclorometano/Acetato de etila	50,0 mL	51 – 57
VI	1:1	Diclorometano/Metanol	200,0 mL	58

As frações foram coletadas em frascos de 250,0 mL previamente tarados e mantidas sob capela de exaustão até que todo o solvente fosse evaporado. As massas recuperadas foram registradas e uma amostra de cada uma das frações ímpares foram tomadas e dissolvidas em volume suficiente de acetona para obter uma solução de concentração de 1,0 mg/mL, que foi usada para as análises por CCD, conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6.2). As frações que apresentaram um perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e a massa foi novamente aferida para avaliação da eficácia da separação. As frações impuras foram combinadas e novamente submetidas ao processo de purificação. Apenas a massa final de 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina foi considerada para cálculo do rendimento da reação.

**Aspecto:** sólido branco

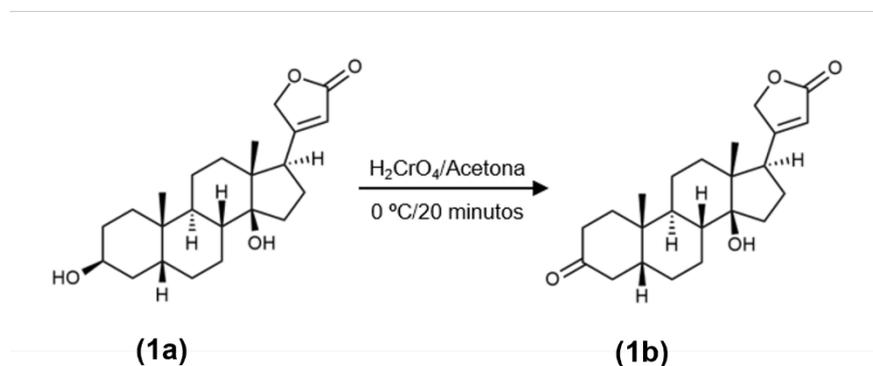
**Recuperação:** 14,3%

**Fórmula Molecular:** C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>

**Massa Molar:** 374,25 g/mol

### 5.7.3 Reação II – Síntese da digitoxigenona

Figura 10 – Condições da reação de obtenção do derivado (1b).



Foram dissolvidos 1,5 gramas de 3β-hidroxi-digitoxigenina (1 equivalente, 4,00 mmols) em 170,0 mL de acetona, em balão de fundo chato (250,0 mL de capacidade), e a solução resultante foi submetida à resfriamento, em banho de gelo, até que fosse alcançada a temperatura de 0 °C. Foram adicionados lentamente 2,1 mL de Reagente de Jones (1,5 equivalentes, 5,8 mmols de CrO<sub>3</sub>) e a reação foi mantida sob agitação magnética em banho de gelo por 20 minutos. Posteriormente, 30,0 mL de metanol foram adicionados ao meio reacional para consumo do excesso de CrO<sub>3</sub> e a reação foi novamente mantida sob agitação magnética em banho de gelo por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50,0 mL de água destilada para a diluição da solução final e, conseqüente, diminuição da acidez do meio. A solução diluída foi transferida para um balão de fundo redondo – a fim de separá-la do material precipitado formado – e levada a evaporador rotatório, sob pressão reduzida, para redução de aproximadamente 70% do seu volume (correspondendo a eliminação do solvente orgânico). A suspensão final formada foi transferida para um funil de separação e extraída com 5 x 30,0 mL de clorofórmio. A fração clorofórmica obtida foi neutralizada com 30,0 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3% p/v e, posteriormente, lavada com 3 x 30,0 mL de água destilada. Para eliminação da água residual, sulfato de sódio anidro foi utilizado, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório e banho à 55 °C. O resíduo seco foi transferido para um frasco previamente tarado e a massa obtida foi registrada para cálculo do rendimento da reação. O produto foi analisado por CCD e por UPLC-PDA-ESI-MS conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

**Aspecto:** sólido branco

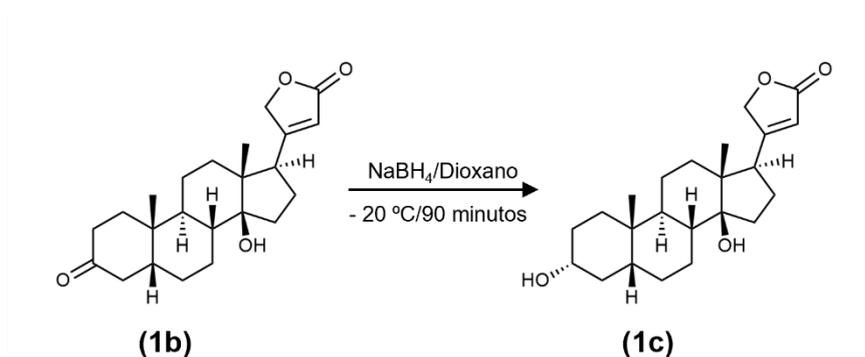
**Rendimento:** 95,0%

**Fórmula Molecular:** C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>

**Massa Molar:** 372,23 g/mol

#### 5.7.4 Reação III – Síntese da 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina

**Figura 11 – Condições da reação de obtenção do derivado (1c).**



Em um balão de fundo chato (250,0 mL de capacidade) foram dissolvidos 500 miligramas de digitoxigenona (1 equivalente, 1,34 mmols) em uma mistura de solventes contendo 20,0 mL de 1,4-dioxano e 5,0 mL de água destilada (4:1). A solução obtida foi submetida a resfriamento prévio por 30 minutos à 20 °C negativos e em seguida, uma solução extemporânea, constituída de 185,0 mg de NaBH<sub>4</sub> (3,6 equivalentes, 4,8 mmols) dissolvidos em 18,75 mL de dioxano 80% v/v (15,0 mL de dioxano e 3,75 mL de água destilada), foi adicionada ao meio reacional. A solução resultante foi mantida em repouso por 90 minutos a uma temperatura de cerca de 20 °C negativos. A reação foi interrompida pela neutralização do excesso de NaBH<sub>4</sub> com adição cautelosa de uma solução de ácido acético 5% v/v à solução, até que o meio atingisse um pH igual a 5,0 – medido com auxílio papel indicador de pH. Em seguida, a solução foi mantida sob fluxo de ar comprido e agitação à temperatura ambiente para eliminação do solvente orgânico – redução de cerca de 70% do volume – com o intuito de facilitar a etapa de elaboração. A suspensão formada foi transferida para um funil de separação e extraída com 5 x 30,0 mL de uma mistura clorofórmio/etanol (3:1). As frações orgânicas foram reunidas, lavadas com 3 x 30,0 mL de água destilada e sulfato de sódio anidro foi utilizado para eliminação da água residual. Após

evaporação do solvente, sob pressão reduzida em evaporador rotatório e banho à 50 °C, análises do produto obtido foram feitas por CCD e em UPLC-PDA-ESI-MS conforme condições descritas na secção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

Para purificação do produto de interesse, foram adicionados cerca de 30,0 mL de metanol previamente resfriado a um erlenmeyer de 100,0 mL de capacidade contendo todo o material obtido após algumas repetições da reação descrita acima, totalizando cerca de 8,1 gramas de 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina impura. A mistura foi mantida em banho ultrassônico por aproximadamente 5 minutos e o frasco foi posteriormente mantido no congelador e sob repouso até que todo o material particulado decantasse no fundo do recipiente. A separação das fases foi realizada por meio de uma filtração em funil de Büchner (450 mm) e kitassato (250 mL de capacidade), sob pressão reduzida. O precipitado retido no funil foi levado com 50,0 mL de metanol previamente resfriado e em seguida transferido para um frasco previamente tarado, que foi mantido em dessecador sob pressão reduzida por sete dias para eliminação do solvente residual. Transcorrido esse tempo a massa obtida foi registrada para cálculo do rendimento da reação. Para avaliação da eficiência dos processos foram feitas análises por CCD, conforme condições descritas na secção *Materiais e Métodos* (item 5.6.2).

**Aspecto:** sólido branco

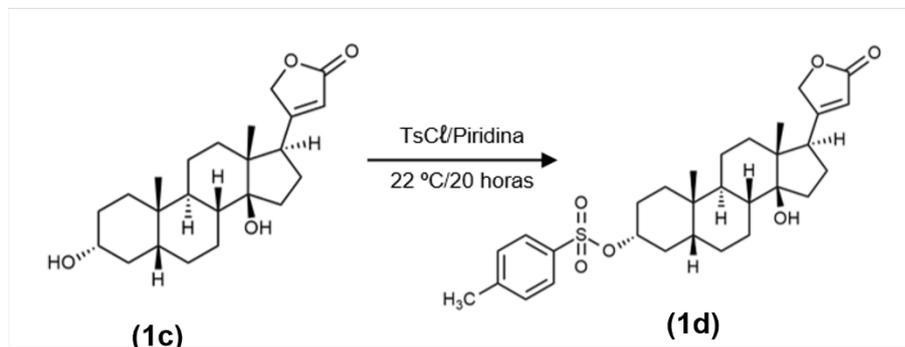
**Rendimento:** 89,6%

**Fórmula Molecular:** C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>

**Massa Molar:** 374,25 g/mol

### 5.7.5 Reação IV – Síntese da 3 $\alpha$ -O-tosil-digitoxigenina

Figura 12 – Condições da reação de obtenção do derivado (1d).



Foram adicionados 1.000 mg de 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (1 equivalente, 2,67 mmols) em um balão de fundo redondo de 50,0 mL de capacidade. O balão foi vedado com um septo de borracha e 24,0 mL de piridina anidra foram adicionados com auxílio de uma seringa (solução 1). Paralelamente, em um frasco de vidro (10 mL de capacidade) vedado com septo de borracha foi preparada uma solução contendo 3,0 gramas de cloreto de p-toluenossulfonila (4,5 equivalentes, 12,0 mmols) dissolvidos em 0,8 mL de piridina anidra (solução 2). Ambas as soluções preparadas foram mantidas à 20°C negativos por 20 minutos e a mistura foi realizada para transferência da solução 2 para o frasco da solução 1, com auxílio de uma seringa. O excesso de ar no sistema foi removido com o auxílio de uma seringa até o que o êmbolo dessa acusasse condição de vácuo no interior do frasco, assegurando assim a ausência de umidade. O meio reacional foi mantido sob agitação à 22 °C (temperatura controlada) por 20 horas. Transcorrido esse tempo, todo o volume reacional foi vertido em um béquer de 100,0 mL preenchido em 2/3 de sua capacidade com gelo pilado e o excesso de piridina foi neutralizado pela acidificação do meio com a adição de quantidade suficiente de uma solução de HCl 2 mol/L para que o meio atingisse um pH igual a 3,0. A conversão da piridina no íon pirídínio garantiu a precipitação do produto desejado, que posteriormente foi filtrado, sob pressão reduzida, em funil de Büchner (700 mm) coberto com papel de filtro e lavado com água gelada para eliminação dos resíduos de piridina. O precipitado foi adicionalmente lavado com 50,0 mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> 3% m/v previamente resfriada para eliminação do subproduto – o ácido p-toluenossulfônico. Após segunda lavagem com água destilada gelada, o funil foi mantido em dessecador, sob pressão reduzida, por sete dias para

eliminação do solvente residual. O precipitado seco foi transferido para um frasco previamente tarado e a massa obtida foi registrada para cálculo do rendimento da reação. O produto obtido foi analisado por CCD e por UPLC-PDA-ESI-MS conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

**Aspecto:** sólido branco

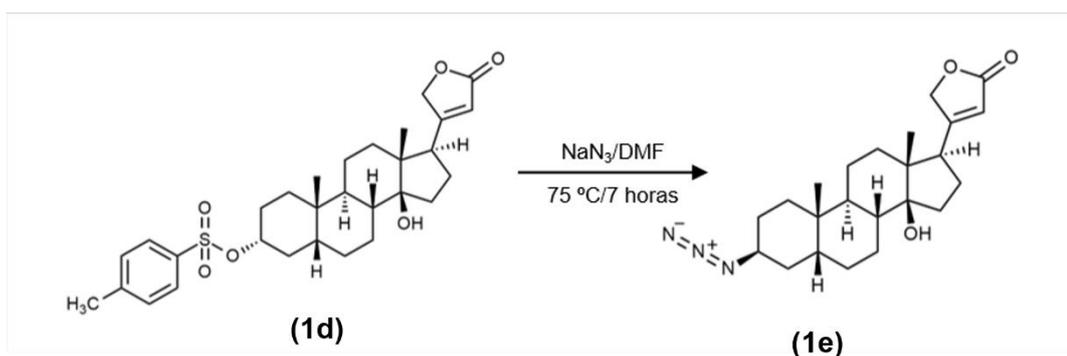
**Rendimento:** 99,2%

**Fórmula Molecular:** C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>S

**Massa Molar:** 528,25 g/mol

### 5.7.6 Reação V – Síntese da 3β-azido-3-desoxi-digitoxigenina

**Figura 13 – Condições da reação de obtenção do derivado (1e).**



Em um tubo de vidro de boca esmerilhada (50,0 mL de capacidade) foram dissolvidos 1000,0 mg de 3α-O-tosil-digitoxigenina (1 equivalente, 1,89 mmols) em 15,0 mL de dimetilformamida (DMF) e 1,47 gramas de NaN<sub>3</sub> (12 equivalentes, 22,68 mmols) foram adicionados à solução. A suspensão gerada foi mantida em banho de vaselina à 75 °C, sob agitação e condição de refluxo, por 7 horas. A reação foi interrompida pela adição de gelo pilado e 50,0 mL de água destilada gelada ao meio reacional, ocasionando instantaneamente a precipitação do produto desejado, que após filtração em funil de Büchner (700 mm) coberto com papel de filtro quantitativo, foi lavado com água destilada gelada para eliminação do excesso de NaN<sub>3</sub>. O papel de filtro foi transferido para uma placa de Petri tarada que foi mantida em dessecador sob pressão reduzida para eliminação do solvente residual. O precipitado seco foi então transferido para frasco previamente tarado e a massa foi registrada para cálculo

do rendimento da reação. O produto foi analisado por CCD e por UPLC-PDA-ESI-MS conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

**Aspecto:** sólido branco

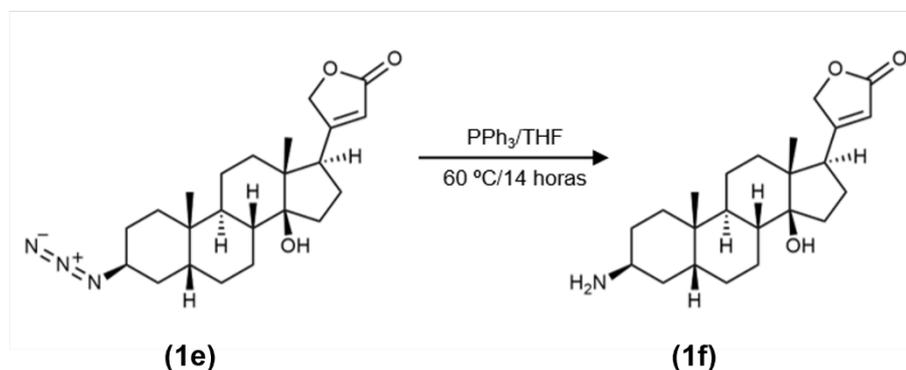
**Rendimento:** 95,0%

**Fórmula Molecular:** C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Massa Molar:** 399,25 g/mol

### 5.7.7 Reação VI – Síntese da 3β-amino-3-desoxi-digitoxigenina

**Figura 14 – Condições da reação de obtenção do derivado (1f).**



Foram dissolvidos 100,0 mg da 3β-azido-3-desoxi-digitoxigenina (1 equivalente, 0,27 mmols) e 105,0 mg de PPh<sub>3</sub> (1,5 equivalentes, 0,40 mmols) em 2,5 mL de tetraidrofurano (THF) e 2,0 mL de água destilada em tubo de vidro de boca esmerilhada (50,0 mL de capacidade). A reação foi mantida em banho de vaselina à 60 °C e agitação por 14 horas. Para evitar a diminuição do volume do meio reacional, um condensador de bolas também foi acoplado ao sistema. Transcorrido o devido tempo, a reação foi interrompida pelo resfriamento do sistema em água corrente até que o meio reacional atingisse temperatura ambiente e 60,0 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foram adicionados para diluição do meio reacional (fase orgânica I). A mistura foi transferida para um funil de separação e extraída com 5 x 50,0 mL de solução de HCl diluído (0,05 mol/L). Para eliminação de impurezas presentes por arraste mecânico, a fase aquosa ácida rica no produto ionizado foi extraída em sequência com 3 x 30,0 mL de acetato de etila e 2 x 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. As frações orgânica foram reunidas (fase orgânica II), secadas com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em

evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e banho à 55 °C até obtenção do resíduo. A fase aquosa ácida foi neutralizada pela adição de quantidade suficiente de solução de NH<sub>3</sub> 3,0% v/v para que fosse atingido um pH igual a 9 – medido com auxílio de papel indicador de pH – e, em seguida, foi extraída com 5 x 30,0 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (fase orgânica III). A fração orgânica reunida foi lavada com 1 x 50,0 mL de água destilada acrescida de 2,0 mL de solução de NH<sub>3</sub> 3,0% v/v (pH = 10) e sulfato de sódio anidro foi adicionado para eliminação da água residual e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida e banho à 55 °C até obtenção do resíduo. Cada um dos resíduos obtidos após eliminação do solvente das frases orgânica I, II e III foram transferidos para um frasco previamente tarado. As massas foram registradas e os materiais obtidos foram analisadas por CCD e por UPLC-PDA-ESI-MS conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

**Aspecto:** sólido branco

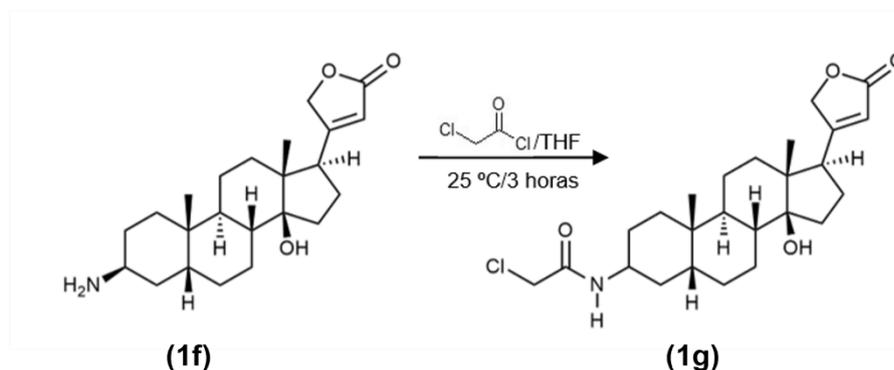
**Rendimento:** 65,0%

**Fórmula Molecular:** C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>3</sub>

**Massa Molar:** 373,26 g/mol

### 5.7.8 Reação VII – Síntese da 3β-(cloroacetil)amino-3-desoxi-digitoxigenina

**Figura 15 – Condições da reação de obtenção do derivado (1g).**



Em balão de fundo redondo (50,0 mL de capacidade) foram dissolvidos 150,0 mg (1 equivalente, 0,4 mmols) de 3β-amino-3-desoxi-digitoxigenina em 1,5 mL de tetraidrofurano e 1,0 mL de uma solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 14,4% p/v foi adicionado ao meio reacional propiciando um pH alcalino. Em seguida foram adicionados lentamente

150,0 µL de cloreto de cloroacetila (4,7 equivalentes, 1,88 mmols) diluídos em 1,0 mL de THF. A cada adição de aproximadamente 50,0 µL da solução foi realizada a verificação do pH do meio e, caso necessário, mais solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> era adicionada. Após 3 horas sob agitação e a temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela evaporação do THF sob pressão reduzida em evaporador rotatório e banho à 50 °C até que fosse observado a precipitação do produto desejado. O sólido foi então filtrado sob pressão reduzida em funil de Büchner e lavado com água destilada para eliminação do excesso de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> presente. O material retido no funil foi então transferido para um frasco previamente tarado e mantido em dessecador sob pressão reduzida para eliminação do solvente residual. Após verificação da massa obtida, uma amostra foi analisada por CCD e por UPLC-PDA-ESI-MS conforme condições descritas na seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

**Aspecto:** sólido branco

**Rendimento:** 80,6%

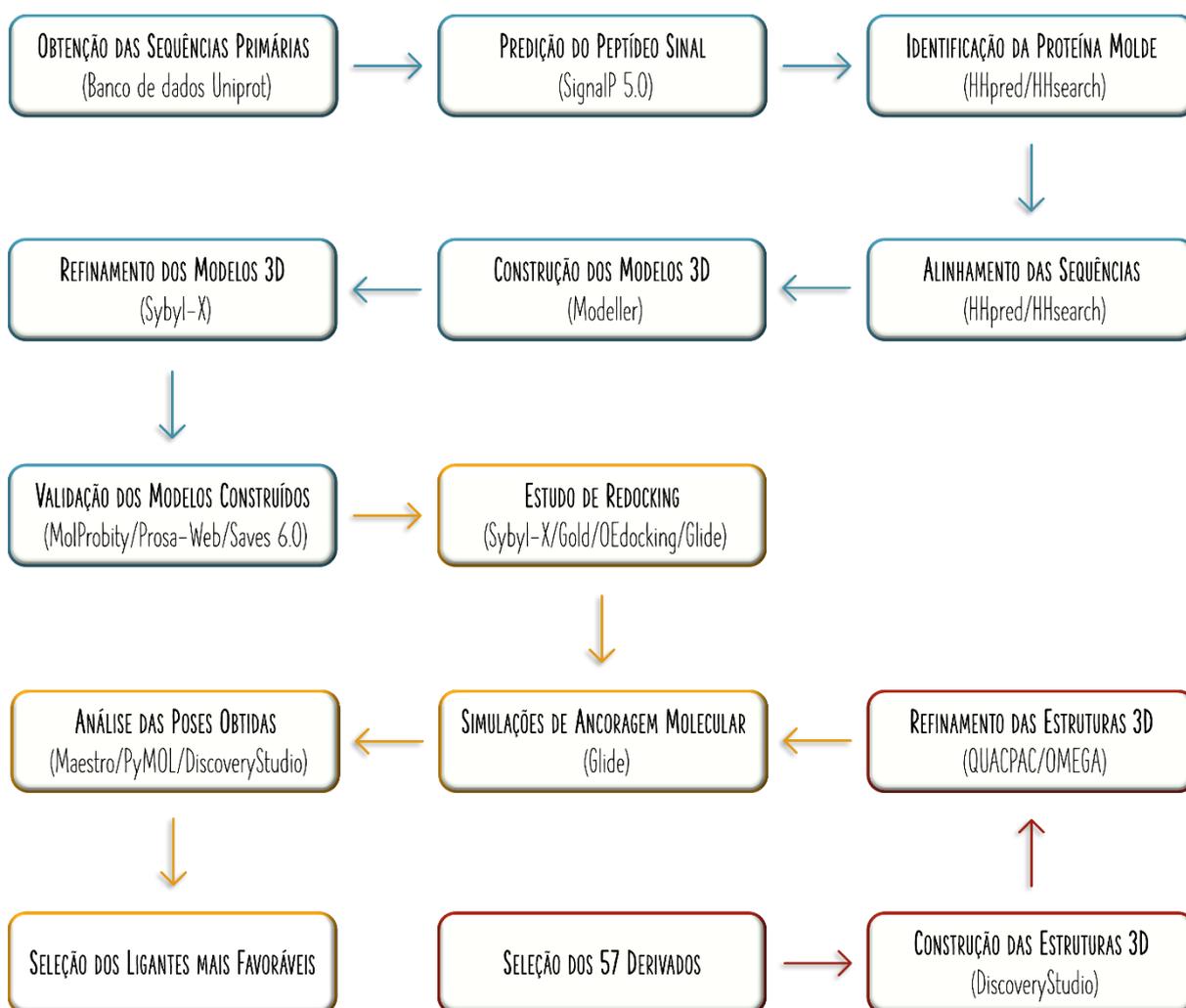
**Fórmula Molecular:** C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>ClNO<sub>4</sub>

**Massa Molar:** 449,23 g/mol

## 5.8 Análises *in silico*

Toda a metodologia utilizada nas análises *in silico* se encontra resumida no **esquema 1** e descrita a seguir.

**Esquema 1 – Resumo das análises *in silico*.**



**Legenda:** em azul está representada a sequência dos métodos aplicados na modelagem por homologia das proteínas; em vermelho está representada a sequência envolvida no preparo dos ligantes; e em amarelo estão representados os procedimentos envolvidos nas simulações de ancoragem.

### 5.8.1 Modelagem por Homologia

#### 5.8.1.1 Obtenção das Sequências Primárias e Predição do Peptídeo Sinal

As sequências de aminoácidos das quatro diferentes isoformas da subunidade alfa da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase humana ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ) foram obtidas no banco de dados

UniProt (<https://www.uniprot.org/>), apresentando os respectivos códigos de acesso: P05023, P50993, P13637 e Q13733. As estruturas primárias dessas proteínas possuem 1.023, 1.020, 1.013 e 1.029 aminoácidos, respectivamente e, são codificadas pelos genes ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3 e ATP1A4. A predição do peptídeo sinal das sequências foi realizada na plataforma SignalP 5.0 (<https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Armenteros, 2019).

### 5.8.1.2 Predição das Estruturas Tridimensionais

Até a presente data, nenhuma estrutura cristalográfica da proteína Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase humana foi depositada em banco de dados de proteínas (do inglês, *Protein Data Bank* – PDB), que compreende um repositório de arquivos contendo a estrutura tridimensional de proteínas, obtidas por métodos experimentais como difração de raios-X, cristalografia, espectroscopia de RMN ou microscopia crio-eletrônica (Berman *et al.*, 2000).

Por essa razão, as estruturas terciárias das diferentes isoformas da subunidade alfa foram preditas empregando o método de modelagem por homologia.

A estrutura molde utilizada no processo de modelagem foi identificada empregando o recurso HHpred disponível em MPI Bioinformatics Toolkit (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>).

O HHpred baseia-se na comparação pareada de Modelos Ocultos de Markov (do inglês, *Hidden Markov Models* – HMMs) utilizando as sequências extraídas dos principais bancos de dados com acesso aberto. Dessa forma, é fornecido como resultado uma série de proteínas similares ranqueadas de acordo com o grau de similaridade apresentado. A comparação em perfil das sequências primárias fornece análises detalhadas sobre a conservação da posição de cada um dos resíduos, permitindo observar as frequências de inserções e exclusões, o que conseqüentemente, aumenta a sensibilidade e a seletividade da busca. Além do mais, a comparação da estrutura secundária predita entre as sequências é realizada com o intuito de fornecer uma similaridade indireta do empacotamento. Quando uma proteína homóloga com estrutura conhecida é identificada e está disponível, o enovelamento observado pode ser usado como molde para modelar a estrutura

tridimensional de proteínas que só apresentam a sequência de bases nitrogenadas ou a sequência primária de aminoácidos disponíveis (Söding, *et al.*, 2005; Zimmermann, 2018).

As sequências primárias das quatro isoformas da subunidade alfa foram utilizadas, no formato FASTA, como *input* para a análise no HHpred, e os perfis HMM gerados foram comparados com os perfis HMM pré-calculados de proteínas contidas no banco de dados PDB\_mmCIF70, um filtro que fornece para consulta apenas as estruturas que apresentam uma identidade de sequência de no máximo 70%. O alinhamento da sequência de consulta com o homólogo mais próximo identificado foi selecionado e transferido como *input*, no formato PIR, para o recurso MODELLER implementado na mesma plataforma (Eswar *et al.*, 2006; Webb & Sali, 2016).

O MODELLER é um programa empregado para modelagem por homologia. Esse recurso é capaz de prever uma estrutura tridimensional para as sequências primárias em análise por mimetismo com o *folding* apresentado pela proteína homóloga selecionada. Após o alinhamento, as principais coordenadas da cadeia são identificadas por meio do mapeamento da sequência alvo de maneira comparativa à estrutura terciária da proteína homóloga selecionada como molde, permitindo obter informações acerca das restrições de distância e ângulos diedro envolvidos. Essas restrições são então descritas como funções de densidade de probabilidade e são posteriormente combinadas com os termos que reforçam a estereoquímica adequada para obtenção de uma função objetiva que é posteriormente otimizada no espaço cartesiano para fornecer a estrutura tridimensional da proteína de interesse (Eswar *et al.*, 2006; Webb & Sali, 2016).

Os modelos construídos foram sobrepostos a estrutura molde (PDB ID: 3A3Y) utilizando o programa PyMOL 0.99c (Schrödinger, Inc., DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA) e os três íons  $K^+$ , o co-fator  $Mg^{2+}$ , o análogo do íon fosfato ( $MgF_4^{2-}$ ) e o ligante cristalográfico (ouabaína) foram inseridos a cada um dos modelos seguindo as coordenadas experimentalmente determinadas na estrutura do molde.

### 5.8.1.3 Refinamento dos Modelos Construídos

Os modelos construídos também foram tratados pelo recurso Biopolymer implementado no pacote computacional Sybyl-X 2.1.1 (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA, 2012) para refinamento das estruturas tridimensionais. Todas as estruturas foram preparadas por ajuste dos seguintes parâmetros: (1) as porções N e C-terminal foram alteradas para o modo “ionizado”; (2) os átomos de hidrogênio foram adicionados seguindo o favorecimento das ligações de hidrogênio; (3) o tipo atômico foi corrigido e as cargas atômicas foram calculadas segundo o campo de força AMBER7 FF02; (4) as cargas atômicas dos ligantes (ouabaína e dos íons  $K^+$  e  $Mg^{2+}$ ) foram calculadas utilizando o método Gasteiger-Marsili e (5) minimização da energia. A energia das proteínas foi minimizada seguindo um protocolo de minimização em estágios, seguindo a seguinte ordem: (1) minimização da energia do ligante; (2) minimização da energia das cadeias laterais; (3) minimização da energia dos hidrogênios, (4) minimização de energia das cadeias laterais sem o C-alfa e (5) minimização do sistema completo. Cada um dos estágios de minimização foi realizado envolvendo 1.000 passos e os arquivos preparados foram salvos utilizando a extensão .mol2.

### 5.8.1.4 Avaliação e Validação dos Modelos Após Refinamento

Após construção e otimização das estruturas tridimensionais das diferentes isoformas da subunidade alfa, os modelos gerados foram submetidos à avaliação por ferramentas de diagnóstico que demonstram a qualidade do empacotamento global das proteínas e identificam os possíveis erros estruturais, além de verificar os parâmetros estereoquímicos relacionados. A validação desses modelos foi realizada mediante análise realizada pelos seguintes servidores *online*: MolProbity (<https://molprobity.manchester.ac.uk>), SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu>), e ProSA-Web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (Bowie *et al.*, 1991; Lüthy *et al.*, 1992; Colovos & Yeates, 1993; Sippl, 1993; Wiederstein & Sippl, 2007; Williams *et al.*, 2018).

### 5.8.2 Preparo dos Ligantes

Além dos 10 derivados propostos (1i – 1r) e dos 7 intermediários envolvidos na rota sintética (1a – 1g) descrita na secção 5.7, outros 40 derivados cardenolídeos – que foram obtidos por síntese total, semissíntese, biotransformação ou que foram isolados de espécies vegetais – também foram selecionados para compor o conjunto de dados. Dentro esses, 38 tiveram suas atividades anti-herpética e citotóxica avaliadas frente a cepa KOS do vírus HSV-1 e linhagem A549, respectivamente. Os outros dois derivados (Prod 1 e Prod 2) apenas foram avaliados quanto à atividade citotóxica (Bertol *et al.*, 2011; Carvalho, 2012; Ramos, 2018; Boff *et al.*, 2019).

Para fins práticos e de avaliação dos resultados, as 57 substâncias que compõem o conjunto de dados em análise foram inicialmente classificadas em duas categorias – ativas ou inativas – tomando como base as atividades anti-herpética e citotóxica determinadas nos experimentos *in vitro*. Foram consideradas ativas todas as substâncias que foram capazes de acarretar pelo menos 50% de inibição na replicação viral e induzir a morte celular em pelo menos 50% das células tumorais, quando testados a uma concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ .

As estruturas tridimensionais das substâncias selecionadas (Apêndice A) foram construídas utilizando-se o programa Discovery Studio 2020 (Bioavia, 2020). Para todos os compostos, as estruturas tiveram seus estados de ionização calculados de acordo com o pH fisiológico (pH = 7,4) empregando-se o recurso *fixpKa* implementado na plataforma QUACPAC 1.6.3.1 (OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM) e os confôrmeros de menor energia foram gerados utilizando o *software* OMEGA 2.5.1.4 (OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM). Já as cargas atômicas das moléculas foram calculadas segundo o método semi-empírico AM1BCC e campo de força AM1bccspt, empregando o recurso *molcharge*, também implementado na plataforma QUACPAC.

### 5.8.3 Simulações de Ancoragem Molecular (*Molecular Docking*)

As simulações de ancoragem com os ligantes preparados foram realizadas utilizando o programa Glide 7.7 (Schrödinger, LLC, New York, NY, USA), no modo ajuste

induzido e operando sob aplicação da função de pontuação na modalidade GlideScore XP (Friesner, *et al.*, 2004).

Uma etapa de minimização da cadeia lateral utilizando o recurso Prime também foi posteriormente executada e os ligantes foram ancorados dentro da cavidade de ligação seguindo as coordenadas do ligante cristalizado (PDB ID 3A3Y). A caixa foi mantida na configuração padrão (em torno de 12 Å) e foram geradas 20 *poses* para cada um dos ligantes. Na etapa posterior de refinamento dos complexos obtidos, os parâmetros foram mantidos nas configurações padrão, e todos os resíduos dispostos a uma distância de até 5 Å em relação a cada um dos ligante ancorados foram minimizados.

As poses foram analisadas por inspeção visual, assumindo como critério de seleção as principais interações comumente estabelecidas entre os inibidores cardioativos e a cavidade de ligação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, como Ala-320, Thr-794, Arg-877, Phe-780 e Leu-790.

#### **5.8.4 Visualização e Análise dos Resultados do Docking**

Os programas PyMOL 0.99c (Schrödinger, Inc., DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA) e Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, CA, USA, 2020) foram empregados para as análises visuais das poses obtidas e confecção de algumas das figuras apresentadas como resultado nesse trabalho.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Síntese dos Derivados

#### 6.1.1 Purificação de Extrato Enriquecido de Cardenólídeos da Série A

A extração e purificação da mistura de cardenólídeos foi realizada conforme descrito na secção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.1).

O extrato metanólico seco de folhas de *D. lanata*, utilizado como material de partida para obtenção da 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina, corresponde a um material de refugo do processo de isolamento da digoxina para fins comerciais. Esse resíduo industrial se apresenta como um pó de granulação variada e de coloração verde escura em razão da presença de pigmentos fotossintetizantes contidos nas estruturas foliares. A extração e purificação de 17,0 gramas desse material (**Figura 16 – A**) resultou na obtenção de 11,0 gramas da mistura de cardenólídeos da série A (**Figura 16 – B**), correspondendo a uma concentração aparente de 64,7% m/m.

**Figura 16 – Extração e purificação dos GC em resíduo do extrato de *D. lanata*.**



**Legenda:** (A) aspecto físico do extrato metanólico seco de folhas da espécie *D. lanata* (resíduo industrial); (B) aspecto físico da mistura de cardenólídeos da série A; (C) aspecto físico da 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (1a) obtida após processos sequenciais de purificação.

Tanto a suspensão obtida após sonificação da mistura de acetona com o resíduo industrial seco, quanto o extrato acetônico obtido após filtração em funil de vidro sinterizado (F-I), apresentavam intensa coloração verde. Para eliminação de parte das impurezas presentes no extrato, optou-se por empregar uma etapa de purificação em carvão ativado. Esse material adsorvente possui uma estrutura porosa apresentando uma extensa área superficial que varia de 500 a 2.000 m<sup>2</sup>/g. Embora a adsorção exercida não seja seletiva, uma vez que as ligações estabelecidas no interior dos poros são por forças de van der Waals, o carvão ativado é capaz de remover uma ampla variedade de poluentes e impurezas, tanto de natureza química, como de

natureza biológica, promovendo a clarificação, desodorização e/ou purificação de líquidos e gases (Grupta, 2009).

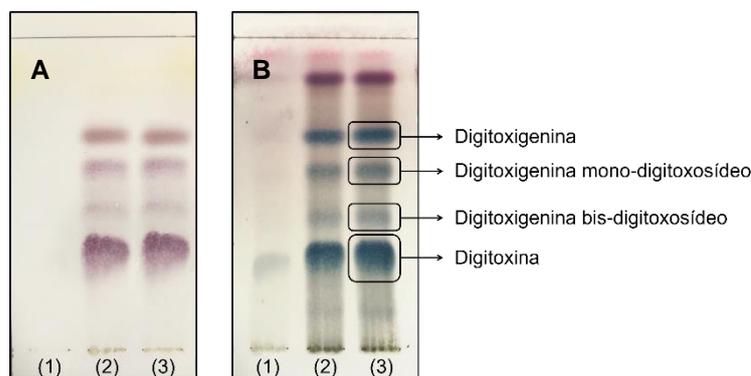
O filtrado obtido após purificação apresentava coloração amarelada (F-II) e as análises realizadas por UPLC-PDA-ESI-MS, antes e após a filtração do extrato em carvão ativado, demonstraram a eficiência do processo. As áreas sob os picos referentes as impurezas de natureza mais polar diminuíram expressivamente e as áreas sob os picos referentes aos glicosídeos cardiotônicos identificados não sofreram redução expressiva (dados não apresentados).

No entanto, uma vez que as impurezas são adsorvidas nos poros do material adsorvente por meio de ligações reversíveis e fracas, essas substâncias podem sofrer dessorção por competição com outras moléculas que estejam presentes em maior abundância (Annesini, 1987).

Dessa forma, após finalização da filtração, o carvão ativado ainda foi sonicado em 100,0 mL de acetona por 20 minutos e, posteriormente, a separação das fases foi realizada usando o mesmo sistema de filtração à vácuo empregado anteriormente. O filtrado obtido foi analisado por CCD. O perfil cromatográfico observado na cromatoplaça corroborou os resultados obtidos nas análises por UPLC-PDA-ESI-MS e não foi detectada a presença de nenhuma banda referente às substâncias de interesse.

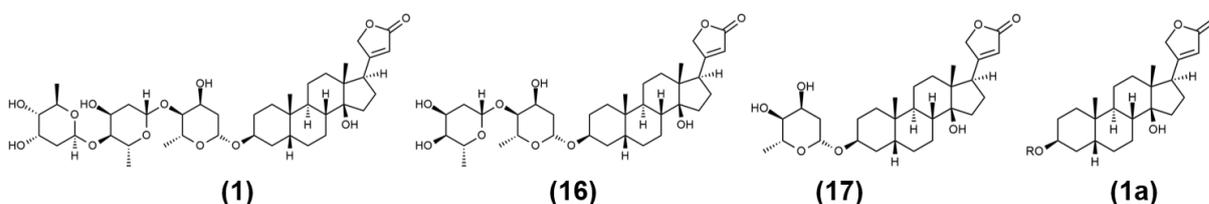
O sólido amarelo obtido após evaporação do solvente de F-II (**Figura 16 – B**) também foi analisado por CCD (**Figura 17**). Para fins de comparação, uma amostra da torta retida no funil após a primeira filtração e do extrato seco usado como material de partida também foram aplicados na cromatoplaça. O perfil cromatográfico foi compatível com as observações realizadas por meio das análises em UPLC-DAD-MS, demonstrando que ambas as técnicas de análises são adequadas para análises da eficiência da extração proposta.

**Figura 17 – Cromatoplasas da análise do processo de extração e purificação em carvão ativado.**



**Legenda:** (A e B) cromatoplasas de sílica gel obtidas após eluição com 100% acetato de etila e revelação com reagente de Kedde e anisaldeído sulfúrico, respectivamente; (1) material retido no funil após filtração da suspensão obtida após sonificação da mistura de acetona e resíduo industrial seco; (2) filtrado obtido após purificação em carvão ativado; (3) extrato metanólico seco de folhas da espécie *D. lanata* (resíduo industrial).

Por meio das análises em CCD e UPLC-PDA-ESI-MS foram identificados quatro glicosídeos cardiotônicos principais: digitoxina (1), digitoxigenina bis-digitoxosídeo (16), digitoxigenina mono-digitoxosídeo (17) e, em menor extensão, digoxina (2). Além desses, também se observa a presença da aglicona livre dos cardenólídeos da série A (3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina – 1a).



### 6.1.2 Reação I – Hidrólise dos Glicosídeos Cardiotônicos

A reação de hidrólise foi realizada conforme descrito na secção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.2).

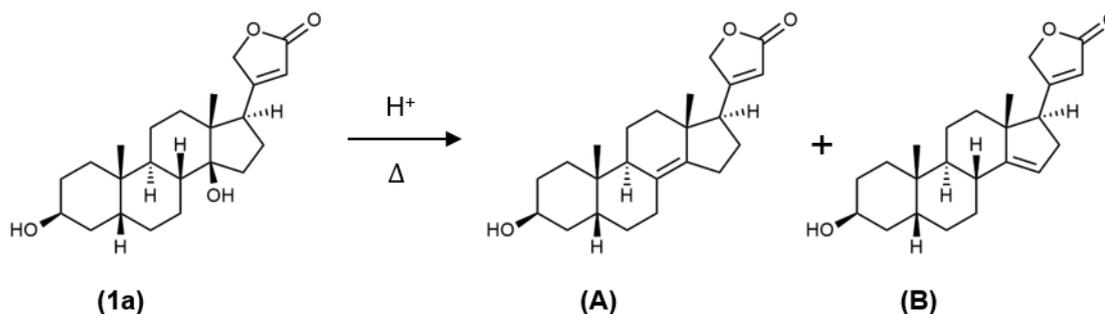
Foram submetidos à reação de hidrólise ácida 10,0 gramas da mistura de cardenólídeos (**Figura 16 – B**) obtida após extração e purificação do resíduo industrial, possibilitando a obtenção de 7,50 gramas do resíduo obtido após elaboração e eliminação do solvente orgânico. No entanto, considerando que o extrato obtido na

etapa anterior é composto por uma mistura de glicosídeos cardioativos, não foi possível calcular o rendimento da reação.

As condições de hidrólise propostas foram adaptadas do método descrito por Pádua e colaboradores (2005) para a hidrólise ácida da digitoxina, que tem como objetivo a clivagem das ligações O-glicosídicas estabelecidas entre as moléculas de açúcar e o núcleo esteroidal, liberando assim a aglicona livre. O controle minucioso dos parâmetros “pH do meio” e “temperatura”, no entanto, é determinante para assegurar a eficiência do processo. Em temperaturas inferiores a 55 °C observa-se a hidrólise parcial das ligações glicosídicas, resultando na obtenção majoritária da digitoxigenina mono-digitoxosídeo. Por outro lado, temperaturas elevadas e diminuição excessiva do pH do meio favorecem a desidratação da hidroxila inserida na posição C-14 $\beta$ , resultando na diminuição do rendimento devido a formação acentuada de produtos secundários (Pádua *et al.*, 2005).

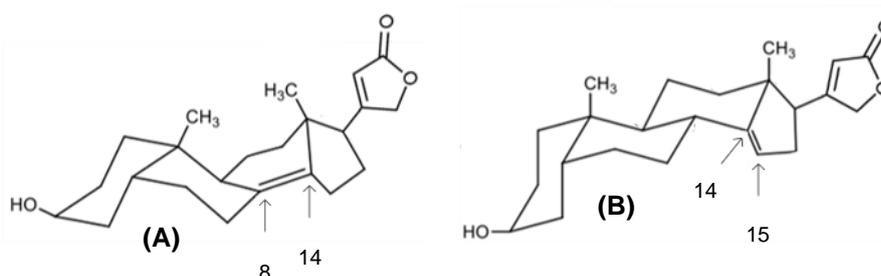
Após eliminação da hidroxila terciária e formação do carbocátion na posição C-14, dois grupos vizinhos podem doar o par de elétrons necessários para estabilização e consequente formação da dupla ligação (**Figura 18**): o grupo metina da posição C-8 ou o grupo metileno da posição C-15. Quando uma molécula de água capta o próton do grupo metina da posição C-8, o par de elétrons da ligação C-H desfeita é prontamente transferido para formação de uma ligação  $\pi$  entre os carbonos C-8 e C-14, resultando na formação do produto  $\alpha$ -anidrodigitoxigenina (**A**) – também denominada como  $\Delta^{8-14}$ -digitoxigenina. Em contrapartida, se o par de elétrons for fornecido em decorrência da quebra de qualquer uma das ligações C-H do grupo metileno em C-15, o alceno formado leva ao produto  $\beta$ -anidrodigitoxigenina (**B**) – ou  $\Delta^{14-15}$ -digitoxigenina. No entanto, contrariando as expectativas previstas por Zaitsev, que prevê a formação majoritária do alceno mais substituído, os dados espectrais obtidos após elucidação estrutural, realizada por meio de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , relevam que o produto majoritariamente formado foi **B** (Saytzeff, 1875; Pádua *et al.*, 2005; Ottoni, 2018).

**Figura 18 – Produtos formados pela desidratação da hidroxila em C-14 em 1a.**



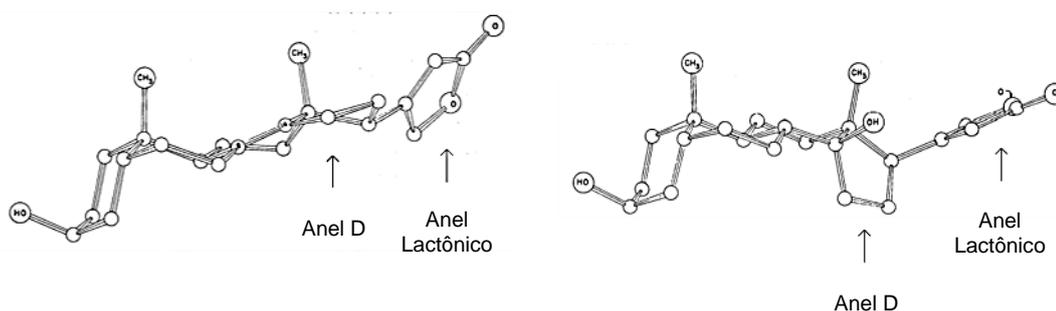
A explicação para essa idiosincrasia respalda-se na estabilidade dos produtos formados. A formação da dupla ligação entre os carbonos C-8 e C-14 (**Figura 19**) gera uma mudança na conformação do anel ciclo-hexano, que por ser fundido aos anéis B e D precisa assumir uma conformação de meia-cadeira – conformação energeticamente desfavorável – para comportar a dupla endocíclica. Nessa conformação os átomos de carbono são forçados a assumir uma coplanariedade que induz os grupos C-H vizinhos a se dispor de maneira eclipsada, o que, conseqüentemente, gera repulsão. Dessa forma, a formação dessa ligação dupla entre dois átomos de carbono em cabeça de ponte demanda mais energia e, portanto, não seria favorável. Em contrapartida, se a dupla ligação for formada entre C-14 e C-15, a conformação assumida pelo anel C será a de menor energia – conformação em cadeira – e, ainda assim, a conformação assumida pelo anel D não sofrerá alteração significativa para ocasionar um aumento expressivo na energia do produto formado. Dessa forma, **B** é energeticamente mais estável do que **A** (Nelson & Brammer, 2011; Ottoni, 2018).

**Figura 19 – Conformação assumida pelo anel C nos derivados  $\alpha$  e  $\beta$ -anidrodigitoxigenina**



O produto de desidratação formado, no entanto, não é desejado, visto que esse derivado é inativo quanto à atividade cardiotônica, anti-herpética e citotóxica. A hidroxila da posição C-14 $\beta$  estabelece uma importante interação com um resíduo de treonina presente no sítio de ligação dos glicosídeos cardiotônicos. A perda dessa interação, em virtude da desidratação, diminui drasticamente a afinidade dessas substâncias à Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, principalmente em razão de uma distorção que é ocasionada na disposição do anel lactônico no eixo da ligação entre C-17 e C-20 (**Figura 20**), levando a um prejuízo na interação da carbonila desse grupo com os resíduos de valina e alanina presentes na porção extracelular da hélice TM4. A cada 2,2 Å que a carbonila se afasta da sua posição originalmente observada na 3 $\beta$ -hidroxidigitoxigenina, observa-se a redução da atividade em uma unidade na escala logarítmica da CI<sub>50</sub>. Em **A** esse afastamento parece ser cerca de 5,7 Å, e um valor próximo a esse também é esperado para **B**, visto que a hibridização sp<sup>2</sup> em C-14 é que desencadeia a alteração na conformação do anel D responsável por deslocar a carbonila do seu plano original (Brown *et al.*, 1962; Gilardi & Karle, 1970; Fullerton *et al.*, 1979; Bertol *et al.*, 2011; Carvalho, 2012).

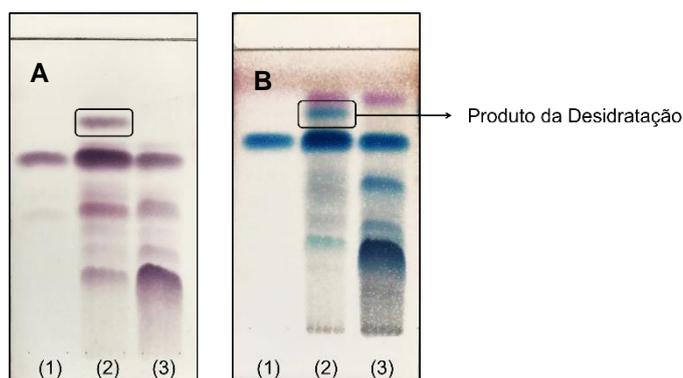
**Figura 20 – Distorção sofrida pelo anel lactônico em virtude da desidratação da hidroxila da posição C-14 $\beta$ .**



**Fonte:** Gilardi & Karle, 1970 (adaptado).

A análise em CCD (**Figura 21**) do produto obtido após execução da reação de hidrólise demonstrou a presença majoritária de **1a** (Rf = 0,65), sendo também possível identificar a presença de um composto de caráter mais apolar (Rf = 0,77) – referente ao produto de desidratação – e outras bandas que não foram reveladas após utilização de reagente específicos para detecção do anel  $\gamma$ -lactônico (reagente de Kedde), confirmando não se tratar das substâncias de interesse.

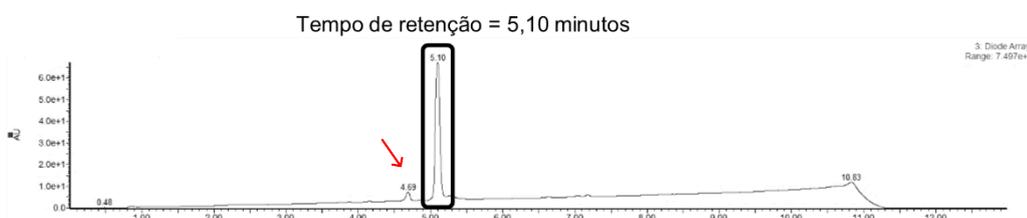
**Figura 21 – Cromatoplasmas da análise do produto da reação de hidrólise.**



**Legenda:** (A e B) cromatoplasmas obtidas após eluição com 100% acetato de etila e revelação com reagente de Kedde e anisaldeído sulfúrico, respectivamente. (1) produto da reação de hidrólise após ser submetido aos processos de purificação; (2) produto da reação de hidrólise antes das etapas de purificação; (3) material submetido a reação de hidrólise (mistura de cardenólídeos da série A).

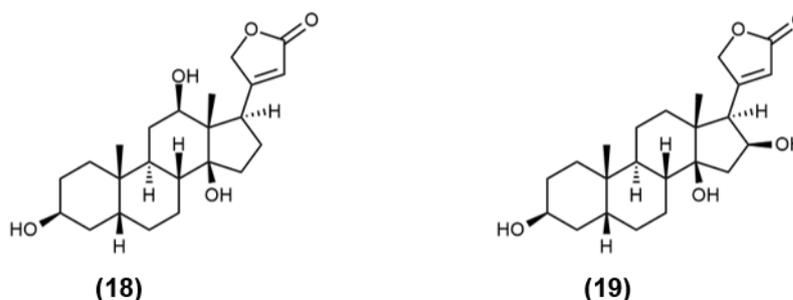
Para isolamento do produto de interesse (**1a**), o material obtido foi submetido a dois processos sequenciais de purificação. O precipitado recolhido (2,0 gramas) após purificação por solubilização diferencial em acetato de etila apresentava coloração levemente amarelada e após análise por CCD nas condições estipuladas, duas bandas foram observadas na cromatoplasca de sílica gel após revelação com reagente de Kedde: uma mais intensa, apresentando  $R_f$  compatível ao de **1a**, e uma de menor intensidade ( $R_f = 0,45$ ), correspondendo a uma impureza de natureza mais polar. Essa mesma impureza também foi observada no cromatograma obtido após análise por UPLC-PDA-ESI-MS, apresentando tempo de retenção de 4,69 minutos e área sob o pico cerca de 17 vezes menor em relação a área observada para o pico referente a **1a** (Figura 22).

**Figura 22 – Cromatograma obtido por UPLC-PDA-ESI-MS para o produto da reação de hidrólise após purificação.**



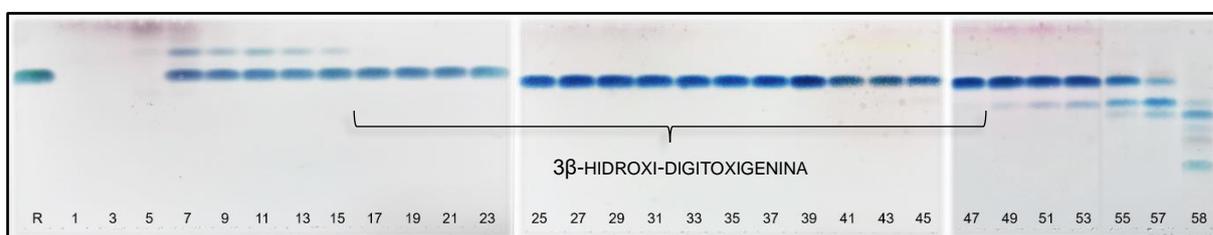
**Legenda:** pico referente ao produto de interesse (**1a**) apresentando tempo de retenção de 5,10 minutos e impureza de natureza mais polar (seta vermelha) apresentando tempo de retenção de 4,69 minutos. Condições cromatográficas: vide seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

O espectro de massas dessa impureza apresentou sinal com relação  $m/z$  compatível com uma aglicona di-hidroxilada (MM = 390,5), podendo corresponder à digoxigenina (**18**) ou à gitoxigenina (**19**), duas agliconas que apresentam um grupo hidroxila adicional substituindo a posição C-12 ou a posição C-16 do núcleo esteroidal, respectivamente.



Uma vez que a purificação pelo método de solubilização diferencial não foi suficiente para eliminação de todos os demais constituintes de natureza cardiotônica, o material recolhido em duas repetições da etapa anterior de pré-purificação foi reunido e submetido à purificação por dessorção diferencial em sílica gel. As frações foram analisadas por CCD de sílica gel (**Figura 23**) e reunidas de acordo com a semelhança apresentada no perfil cromatográfico.

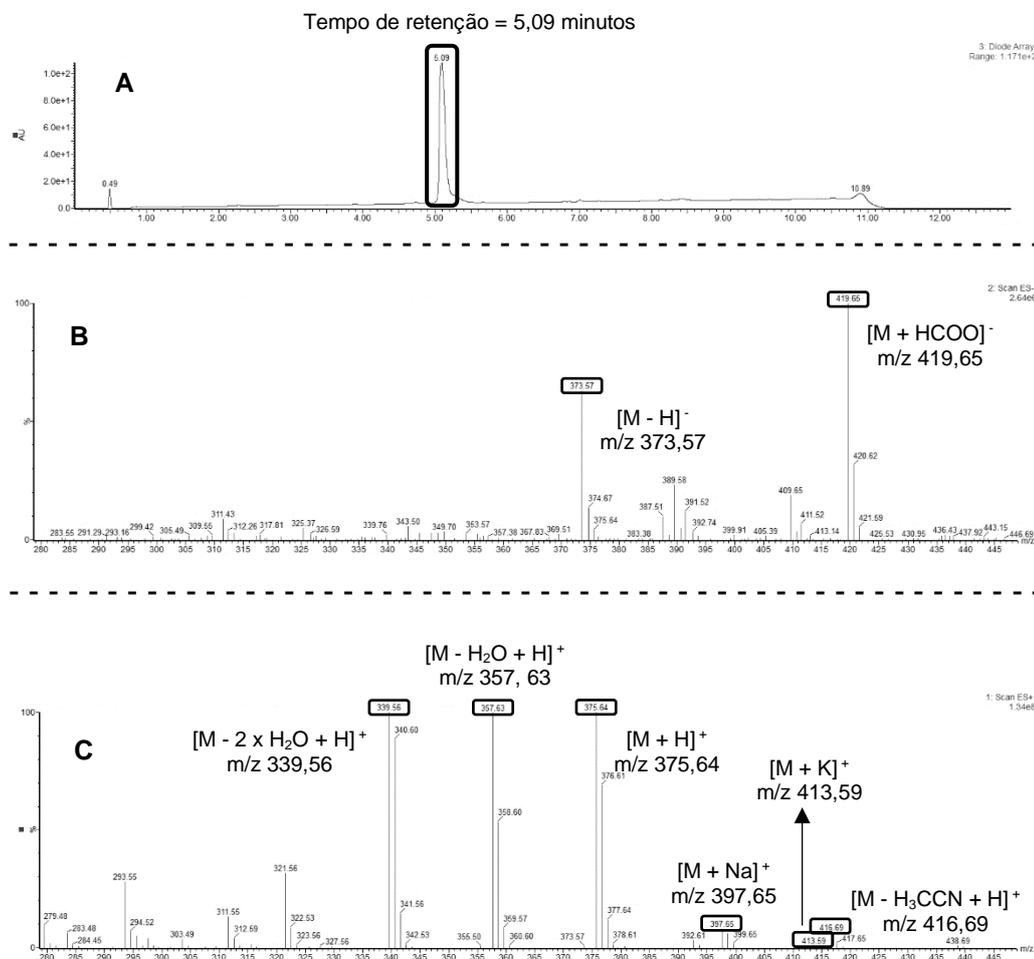
**Figura 23 – Cromatoplaça de sílica gel das frações ímpares obtidas após purificação em coluna aberta de sílica gel.**



**Legenda:** para condições cromatográficas vide seção *Materiais e Métodos* (item 5.6). Eluente: acetato de etila 100%; agente revelador: anisaldeído sulfúrico.

Ao todo foram recuperadas 3,5 gramas de **1a** puro (frações 17 – 43), correspondendo a uma obtenção média de 1,75 gramas a cada 10,0 gramas da mistura de cardenólídeos submetidas à reação de hidrólise. Uma amostra foi analisada por UPLC-PDA-ESI-MS para confirmação da pureza e apenas um pico foi detectado, apresentando tempo de retenção e espectro de massas compatível com o produto de interesse (**Figura 24**).

**Figura 24 – Análise por UPLC-PDA-ESI-MS do material obtido após purificação em coluna aberta de sílica gel.**



**Legenda:** (A) perfil cromatográfico do produto de hidrólise (1a) após ser submetido aos processos de purificação; (B) espectro de massas obtido no modo ESI-negativo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,09 minutos (principais adutos e fragmentos identificados); (C) espectro de massas obtido no modo ESI-positivo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,09 minutos (principais adutos e fragmentos identificados). Condições cromatográficas: vide seção *Materiais e Métodos* (item 5.6).

Após sete repetições da purificação em coluna de sílica, as frações impuras contendo **1a** (6,5 gramas) foram reunidas e novamente submetidas à purificação com alguns ajustes nas condições de eluição. As etapas II, IV e V foram estendidas em 10 frações de 50,0 mL de cada mistura de solventes e uma etapa intermediária, incluindo 20 frações de 50,0 mL do eluente composto por uma mistura de diclorometano/acetato de etila (8:2), também foi adicionada ao protocolo, totalizando 95 frações coletadas. Após análise em CCD, as frações contendo apenas **1a** foram reunidas, resultando na recuperação adicional de 3,6 gramas do produto de interesse.

Dessa forma, foram obtidos no total 28,7 gramas de **1a** isolado a partir de 200,5 gramas da mistura de glicosídeos cardiotônicos submetidos à reação de hidrólise ácida, correspondendo a uma recuperação de 14,3%.

### 6.1.3 Reação II – Síntese da digitoxigenona (1b)

A reação de oxidação foi realizada conforme descrito na seção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.3).

Quando as ligações glicosídicas da cadeia lateral dos GC são rompidas, expondo o grupo hidroxila em C-3, um dos metabólitos observados é resultado da epimerização desse grupo, o que além de reduzir a afinidade pelo sítio de ligação em cerca de 50%, ainda pode ser facilmente conjugado com ácido glicurônico e sulfato para gerar metabólitos inativos e rapidamente excretado pela urina (Lacarelle *et al.*, 1991).

Dessa forma, independentemente do grupo acoplado à posição C-3 do núcleo esteroidal, é necessário assegurar a orientação correta que propicia uma interação mais assertiva com o alvo molecular.

O derivado semissintético amantadig (**4**) – que foi adotado como protótipo nesse trabalho – apresenta como precursor sintético um derivado que apresenta um grupo NH<sub>2</sub> na posição C-3 $\beta$ , ao invés de um grupo OH. A metodologia proposta por Sawlewicz e colaboradores (1972) foi embasada na rota semissintética estereoespecífica de 3 $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-colestanos, que propunha a obtenção desses derivados a partir da redução de um derivado intermediário azida, que poderia ser obtido por meio de uma inversão de Walden, partindo-se tanto de um haleto secundário, quanto de um tosilato secundário, formado, por sua vez, a partir do álcool correspondente. No entanto, para que a inversão de Walden possibilite a obtenção do intermediário apresentando o grupo amino  $\beta$ -posicionado na posição C-3, a hidroxila naturalmente observada no composto de partida (3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina), precisava sofrer preliminarmente uma inversão no centro quiral dessa posição antes de ser submetida a sequência reacional proposta para obtenção estereoespecífica do derivado amina (Sawlewicz *et al.*, 1972; Bose *et al.*, 1962).

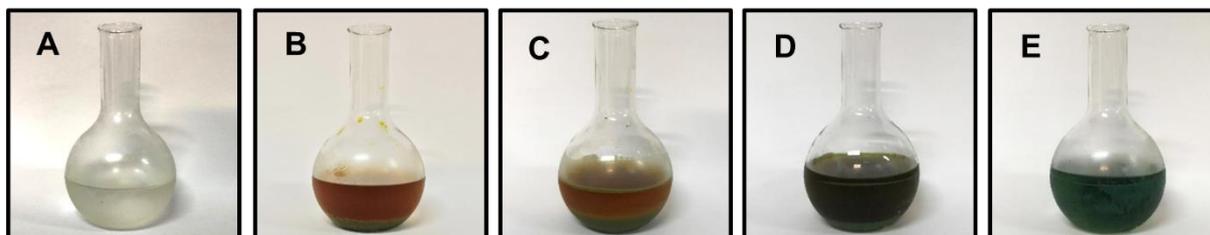
Gault e colaboradores (1982) demonstraram que a principal via de biotransformação da digoxina (**2**) compreende a hidrólise das ligações glicosídicas no estômago, seguida de reações sequenciais de oxidação e redução, que resultam na epimerização do centro quiral em C-3. Mimetizando essas transformações decorridas no meio fisiológico, Sawlewicz e colaboradores propuseram a conversão do grupo hidroxila em uma cetona secundária, por meio de uma reação de oxidação com ácido crômico ( $H_2CrO_4$ ), seguida da redução desse intermediário cetônico com borohidreto de sódio, para obtenção do intermediário 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (Sawlewicz *et al.*, 1972; Gault *et al.*, 1982; Gault *et al.*, 1984).

A solução de ácido crômico proposta para promover a oxidação da 3 $\beta$ -hidroxila-digitoxigenina (**1a**) obtida anteriormente foi originalmente desenvolvida por Jones e colaboradores (1946) e é constituída por uma solução aquosa de trióxido de cromo ( $CrO_3$ ) em ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado. Esse reagente é capaz de promover a oxidação seletiva de álcoois secundários em cetonas sem afetar duplas ligações presentes na molécula (Bowden *et al.*, 1946).

Assim como na reação de hidrólise, a reação de oxidação com reagente de Jones também é realizada em meio ácido, o que demanda um controle minucioso dos parâmetros “pH do meio” e “temperatura”, para evitar a desidratação da hidroxila na posição C-14 $\beta$  e assegurar a eficiência do processo. Por essa razão, a solução formada pela dissolução de **1a** em acetona foi mantida no congelador por cerca de 30 minutos antes da adição do agente oxidante. Além disso, o balão contendo a mistura reacional também foi mantido durante todo o tempo em banho de gelo para amenizar o aumento da temperatura ocasionado pelo processo exotérmico desencadeado. A temperatura do meio reacional era de 0 °C no início da reação e subiu para 6 °C ao final do processo (40 minutos).

Após 20 minutos de reação foi realizada uma análise por CCD de sílica gel para acompanhamento do curso reacional e foi observado o total consumo do material de partida (**1a**) e a formação de um único produto, de natureza menos polar ( $R_f = 0,72$ ). Nesse estágio, o meio reacional apresentava uma tonalidade castanho-alaranjada e foi possível evidenciar a presença de um precipitado de coloração verde no fundo do balão, correspondente a formação de íons  $Cr^{3+}$  gerados pela consequente redução do agente oxidante (**Figura 25 – C**).

**Figura 25 – Mudanças na coloração do meio reacional ao longo do curso reacional.**



**Legenda:** (A) meio reacional antes da adição do reagente de Jones; (B) meio reacional após adição do reagente de Jones; (C) meio reacional após 20 minutos de reação; (D) meio reacional após adição de metanol para consumo do excesso de ácido crômico; (E) meio reacional após consumo total do excesso de ácido crômico (após 40 minutos de reação).

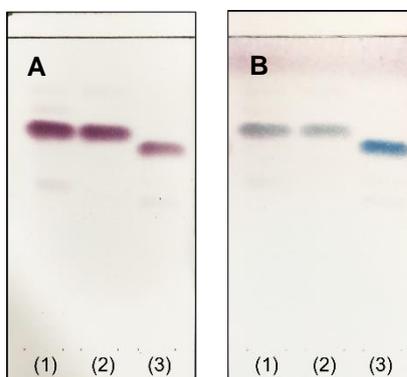
Para consumo do excesso de  $\text{H}_2\text{CrO}_4$  foi adicionado ao meio reacional quantidade suficiente de metanol, um solvente miscível com o solvente da reação e que também apresenta um grupo alcoólico susceptível à oxidação. Por essa razão, 20 minutos após a adição de metanol, foi possível observar uma mudança na coloração, correspondente a total conversão do cromo (VI) em cromo (III), o que confere uma coloração verde ao meio reacional (**Figura 25 – E**).

Uma vez transcorrido o tempo necessário para reação, o meio reacional foi diluído pela adição de água destilada antes de ser submetido a evaporação do solvente orgânico. Uma vez que o reagente oxidante é constituído por uma solução fortemente ácida, a diluição se faz necessária para preservar a integridade da hidroxila presente na posição C-14 $\beta$ . Dessa forma, mesmo após a concentração do solvente, o pH do meio reacional não ofereceu prejuízo a esse grupo susceptível a desidratação, não sendo observado, portanto, nenhum subproduto nas análises realizadas tanto por CCD, quanto por UPLC-PDA-ESI-MS.

Após eliminação de todo o solvente orgânico (cerca de 170,0 mL) foi observado a formação de um precipitado de coloração branca que foi dissolvido em 30,0 mL de diclorometano e particionado em funil de separação para purificação do resíduo reacional. A digitoxigenona (**1b**) – produto da oxidação de **1a** – foi obtida com rendimento de 95,0% e pureza adequada, que foi evidenciada por análises em CCD (**Figura 27**) e UPLC-PDA-ESI-MS (Apêndice B), conforme condições descritas. Os espectros de massas obtidos no modo positivo e negativo para o produto

apresentavam picos compatíveis com a massa molar esperada, confirmando a obtenção da substância desejado.

**Figura 26 – Cromatoplasacas da análise do produto da reação de oxidação.**



**Legenda:** (A e B) cromatoplasacas de sílica gel obtidas após eluição com 100% acetato de etila e revelação com reagente de Kedde e anisaldeído sulfúrico, respectivamente. (1) referência da digitoxigenona (**1b**); (2) produto obtido após reação de oxidação; (3) referência do material de partida (**1a**).

#### 6.1.4 Reação III – Síntese da 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (**1c**)

A reação de redução foi realizada conforme descrito na secção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.4).

Assim como a oxidação de álcoois fornece os correspondentes compostos carbonílicos, a redução desses produtos gerados pode também ser realizada quando se objetiva a obtenção de compostos apresentando um grupo hidroxila. Uma vez que compostos cetônicos – como a digitoxigenona (**1b**) – são altamente susceptíveis a sofrer reações de adição nucleofílica, uma das principais formas de promover a redução desse grupo se baseia na utilização de reagentes nucleofílicos que são fonte de íons hidretos. Os três agentes redutores desse tipo mais comumente empregados em síntese orgânica são o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) ou de lítio ( $\text{LiBH}_4$ ) e o hidreto de lítio-alumínio ( $\text{LiAlH}_4$ ). A diferença de reatividade observada entre esses reagentes está relacionada com a diferença de eletronegatividade observada entre o átomo do metal ou semimetal e o átomo de hidrogênio que será doado para o composto a ser reduzido. Essa diferença é cerca de 5 vezes maior para a ligação Al-H em relação a ligação B-H e, portanto, a reatividade do  $\text{LiAlH}_4$  é muito mais acentuada do que a do

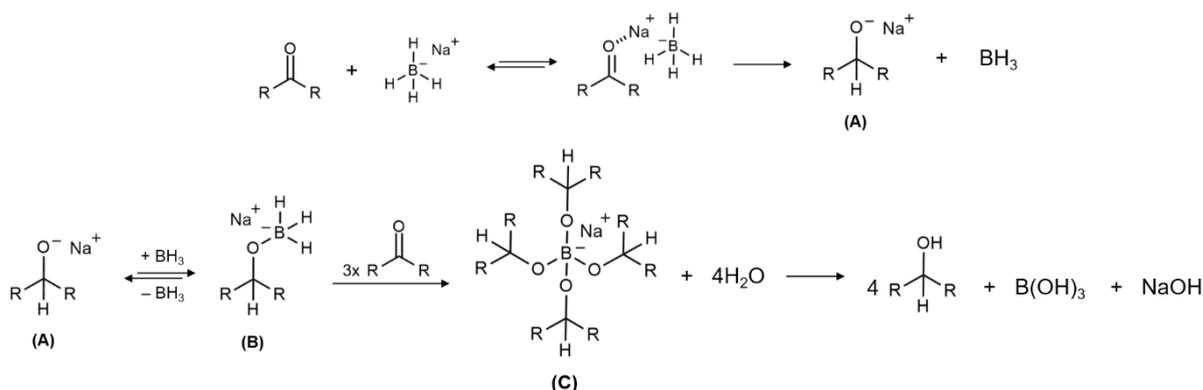
NaBH<sub>4</sub> ou do LiBH<sub>4</sub>. No entanto, devido sua alta reatividade, LiAlH<sub>4</sub> é menos seletivo do que os reagentes de borohidreto, sendo capaz de reduzir tanto aldeídos e cetonas, como derivados carboxílicos, como ésteres, ácidos carboxílicos, cloretos de ácido e aminas (Alves & Victor, 2010).

A metodologia originalmente proposta para redução da carbonila cetônica em **1b** emprega como reagente o borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). A condução da reação de redução com esse agente redutor, além de menos onerosa e de condução menos periculosa, é extremamente pertinente, visto que esse reagente, por ser menos reativo, é capaz de reduzir a carbonila em C-3 sem oferecer prejuízo a carbonila do anel lactônico da posição C-17β. A etapa chave na redução exercida pelo NaBH<sub>4</sub> é a transferência do íon hidreto do semimetal para o átomo de carbono carbonílico por meio de um ataque nucleofílico. Como o NaBH<sub>4</sub> possui quatro hidretos em sua composição, cada mol desse agente redutor, em tese, é capaz de reduzir 4 mols de **1b** mediante a presença de água. Uma análise cautelosa do mecanismo de reação, no entanto, permite considerar que um excesso desse reagente deve ser adicionado, visto que a espécie tetra-alcoxiboroidreto (**C**) dificilmente será formada em reações envolvendo moléculas mais volumosas.

O mecanismo (**Figura 28**) mais aceito para as reduções com esses reagentes que são fontes de hidreto propõe que inicialmente o contra-íon desses reagentes (Li<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup>) atuam como um ácido de Lewis e complexam com o átomo de oxigênio da carbonila. Esses metais, por serem deficientes em elétrons, puxam para si a densidade eletrônica, tornando o átomo de carbono ainda mais deficiente em elétrons e, portanto, ainda mais susceptível a sofrer um ataque nucleofílico.

Em seguida há a transferência de um hidreto e formação do alcóxido (**A**). Essa espécie ao borato por uma reação ácido/base, levando a formação do mono-alcoxiboroidreto (**B**), que também é um agente fortemente redutor e pode atuar, teoricamente, reduzindo mais três moléculas do composto carbonílico até haver a formação do tetra-alcoxiboroidreto (**C**). Esse último sofre então hidrólise por ação do próprio solvente prótico liberando as quatro moléculas do composto alcoólico formado (Glass *et al.*, 1980; Yadav *et al.*, 2000; Alves & Victor, 2010).

**Figura 27 – Mecanismo da reação com NaBH<sub>4</sub>.**



**Fonte:** Alves & Victor, 2010 (adaptado).

A dupla ligação estabelecida entre os átomos de carbono e oxigênio é constituída por uma ligação do tipo  $\sigma$  e outra ligação do tipo  $\pi$ . A ligação do tipo  $\pi$  é estabelecida em decorrência da combinação das funções de onda de um orbital atômico semipreenchido ( $2p_z$ ) do carbono e outro orbital semipreenchido ( $2p_z$ ) do oxigênio, resultando assim na construção de dois orbitais moleculares com níveis energéticos distintos: um orbital ligante ( $\pi$ ) e um orbital antiligante ( $\pi^*$ ). O orbital de menor energia ( $\pi$ ) é estabelecido por meio de uma interação construtiva entre os orbitais atômicos e, portanto, compreende a região do orbital molecular de maior probabilidade de localização do par de elétrons. O orbital de maior energia ( $\pi^*$ ), por sua vez, é formado por meio de uma interação desconstrutiva e apresenta um plano nodal, que representa uma região com probabilidade nula de localização dos elétrons. Dessa forma, esse orbital encontra-se desocupado no estado fundamental (Costa, 2019).

A adição do átomo de hidrogênio à carbonila correspondente ocorre pela doação do par de elétrons presente no orbital HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) do nucleófilo para o orbital LUMO (*Lowest Inoccupied Molecular Orbital*) da carbonila, que corresponde ao orbital antiligante do tipo  $\pi^*$ . No entanto, uma vez que o oxigênio é um átomo mais eletronegativo do que o carbono, seu orbital atômico é menos energético e contribui mais para a formação do orbital ligante ( $\pi$ ), ao passo que o orbital atômico do carbono, por ser mais energético, contribui mais para a formação do orbital antiligante ( $\pi^*$ ). É por essa razão que há maior probabilidade do par de elétrons se encontrar no orbital ligante ( $\pi$ ) e, portanto, mais próximo do átomo

de oxigênio. Com a densidade eletrônica deslocada em direção ao átomo mais eletronegativo, o átomo de carbono, deficiente em elétrons, se configura como o sítio eletrofílico da ligação e, portanto, é mais susceptível ao ataque nucleofílico. Dessa forma, como o orbital HOMO do nucleófilo é rico em elétrons, a sobreposição desse orbital com o orbital LUMO da carbonila se dá por meio da aproximação do nucleófilo seguindo uma trajetória em direção ao átomo de carbono, desviando-se assim da região de maior densidade eletrônica e minimizando a repulsão eletrônica (Burgi *et al.*, 1973; Alves & Victor, 2010; Costa *et al.*, 2019).

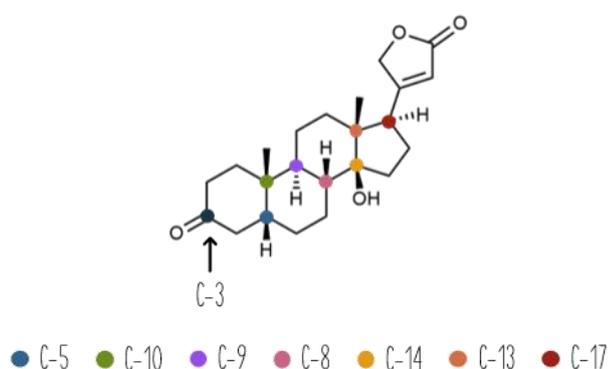
No entanto, uma vez que a hibridização do átomo de carbono eletrofílico é  $sp^2$ , a geometria das ligações envolvendo esse átomo é do tipo trigonal plana e, portanto, as ligações envolvidas estão todas no mesmo plano, distanciadas entre si por um ângulo de aproximadamente  $120^\circ$ . Dessa forma, o grupo carbonila possui duas faces (face Re e face Si) e a aproximação do nucleófilo pode ocorrer por qualquer uma delas, embora não ocorram com igual probabilidade. Na adição em uma reação de adição nucleofílica – como no caso da reação de redução envolvendo íons hidreto – a aproximação do nucleófilo faz com que o par de elétrons da ligação  $\pi$  se desloque ainda mais em direção ao átomo de oxigênio para evitar a repulsão eletrônica, desfazendo assim a combinação entre os orbitais do carbono e do oxigênio e estabelecendo uma nova combinação entre os orbitais do carbono e do agente nucleofílico. A nova ligação formada – agora do tipo sigma – faz com o ângulo entre as ligações seja alterado para comportar o novo grupo substituinte, minimizando assim a repulsão eletrônica. Com essa alteração, a geometria também é alterada e as ligações já não estarão mais todas no mesmo plano. Dessa forma, dependendo da face pela qual o nucleófilo se aproxima da carbonila, o grupo adicionado ocupará uma determinada posição na distribuição espacial dos grupos substituintes, e se todos os quatro substituintes ligados ao carbono forem distintos, a adição do nucleófilo por faces distintas poderá levar a formação de isômeros, dependendo da configuração observada no novo centro quiral (Suzuki *et al.*, 2009).

Em uma cetona assimétrica, as faces do grupo carbonila são classificadas como proquirais. Se não houver nenhum outro centro de quiralidade na molécula as faces também são chamadas de enantiotópicas e em uma reação de adição envolvendo um nucleófilo aquiral, uma mistura racêmica é obtida, desde que a espécie

nucleofílica seja diferente dos grupos substituintes ligados ao carbono carbonílico. Por outro lado, se o grupo carbonila faz parte de um sistema onde há outros centros quirais ou estereogênicos, as faces são chamadas de diastereotópicas e os produtos formados são diastereoisômeros entre si. No entanto, não raramente, os diastereoisômeros são obtidos em quantidades diferentes, tanto em condições cinéticas, quanto em condições termodinâmicas, visto que nem os respectivos estados de transição possuem a mesma energia e nem a energia de ativação necessária é a mesma para formação de cada um desses produtos. Nestes casos, as reações são classificadas como estereosseletivas ou diastereosseletivas (Martins *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2019).

A digitoxigenona (**1b**) é uma substância que além da carbonila proquiral em C-3 também apresenta outros sete centros quirais (C-5, C-8, C-9, C-10, C-13, C-14, C-17) distribuídos ao longo do núcleo esteroidal (**Figura 29**). Dessa forma, adição do íon hidreto à carbonila pode levar tanto a formação da 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (**1c**), quanto do seu diastereoisômeros, a 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**), dependendo da face de ataque. Felizmente, análises estruturais combinadas com alguns modelos de predição do produto majoritário permitem a determinação da diastereosseletividade facial por meio da determinação reatividade de ambas as faces.

**Figura 28 – Centros quirais no núcleo esteroidal dos cardenólídeos da série A.**



Embora em cetonas cíclicas a dedução do produto preferencialmente formado seja menos complexa em virtude das ligações rígidas, em certos casos, alguns parâmetros como “conformação do substrato”, “volume do nucleófilo” e “características estéricas remotas” podem afetar a estereosseletividade da reação,

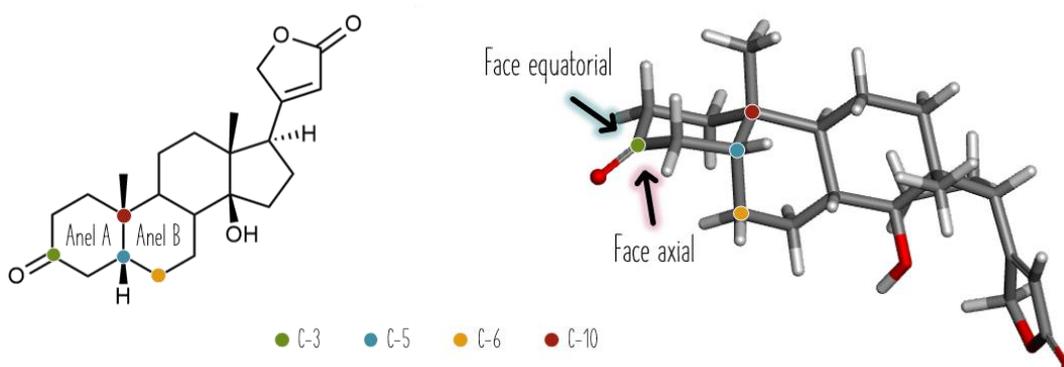
tornando a previsão do produto majoritário mais laboriosa. Nas ciclo-hexanonas – como o anel A de **1b** – há ainda uma certa flexibilidade que permite que o anel assuma duas possíveis conformações (cadeira e barco), o que parece influenciar a preferência facial de agentes nucleofílicos volumosos. Nesses sistemas, as faces da carbonila cíclica são chamadas de face endo (côncava) e face exo (convexa) e refletem a posição adotada pelo grupo adicionado nos produtos obtidos (Neufeldt *et al.*, 2014).

Vários estudos que avaliaram os fatores que regem a seletividade dessas reações apontam que nucleófilos volumosos tendem a promover o ataque pela face exo, minimizando assim a repulsão em decorrência das interações com os grupos substituintes em axial, presentes nas posições 3 em relação ao carbono eletrofílico. Dessa forma, a preferência facial desses nucleófilos segue um controle regido por questões estéricas. No caso de nucleófilos pouco volumosos – como o íon hidreto – esse controle é, no entanto, determinado pela estabilidade do produto formado. Por ser pequeno, a influência da repulsão 1,3-diaxial na formação do estado de transição é diminuída, contribuindo pouco para a energia dessa espécie. No entanto, quando esse nucleófilo é adicionado pela face endo, a hidroxila resultante da redução do grupo carbonila assume a posição equatorial, evitando assim a repulsão 1,3-diaxial desse grupo com os substituintes vicinais e conferindo maior estabilidade ao produto formado. Na adição pela face exo, o nucleófilo também não enfrentaria muita dificuldade para alcançar o orbital antiligante ( $\pi^*$ ) da ligação C=O, no entanto, o posicionamento do grupo hidroxila em axial culminaria em uma interação 1,3-diaxial repulsiva com os grupos vizinhos, o que, conseqüentemente, acarretaria um produto menos estável (Dauben *et al.*, 1956; Chérest *et al.*, 1968; Chérest, 1971; Neufeldt *et al.*, 2014).

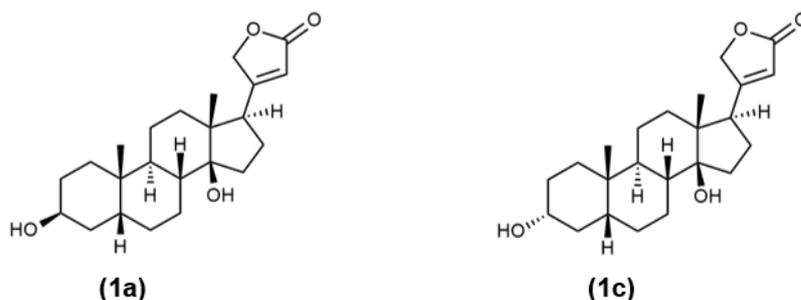
Essa tendência geral na seletividade facial não se mantém, entretanto, para algumas cetonas cíclicas que apresentem grupos substituintes nas posições 3 em relação ao carbono da carbonila. Esse é o caso do anel A da digitoxigenona (**1b**). O anel A no núcleo esteroidal dessa substância se funde ao anel B por meio dos carbonos beta (C-5) e gama (C-10) em relação à carbonila cetônica em C-3 (**Figura 30**). Dessa forma, uma vez que esses anéis se fundem em configuração *cis*, a aproximação do nucleófilo pela face endo é desfavorecida pela interação 1,3-diaxial repulsiva resultante da presença da ligação entre C-5 e C-6 do anel B. Esses fatores

estéricos, portanto, acabam suplantando a tensão de torção intrinsicamente maior gerada no ataque à face exo e, dessa forma, por ser menos impedida estericamente, essa face se torna a mais reativa em certas ciclo-hexanonas substituídas, levando a formação do produto correspondente de forma mais rápida e em maior proporção (Neufeldt *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2019).

**Figura 29 – Faces axial e equatorial do grupo carbonila na posição C-3 de 1b.**



Sendo assim, a 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**), formada a partir do ataque nucleofílico do hidreto a face endo da carbonila cetônica da digitoxigenona (**1b**) corresponde ao produto termodinâmico da reação, uma vez que a energia de ativação necessária para atingir o estado de transição precisa ser suficientemente alta para superar a repulsão ocasionada pelo impedimento estérico dos grupos vizinhos. No entanto, a adição do nucleófilo à essa face leva ao produto mais estável, visto que a hidroxila na posição equatorial não estabelece uma interação 1,3-diaxial repulsiva com os grupos vizinhos. Já o produto de interesse, a 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (**1c**) corresponde ao produto cinético e é formado após ataque do hidreto à face exo da carbonila. Como essa face se encontra menos impedida, a aproximação do nucleófilo é favorecida e como consequência, a energia de ativação para alcançar o estado de transição é menor. Dessa forma, dependendo do controle termodinâmico da reação, esse produto é majoritariamente formado, mesmo que a repulsão 1,3-diaxial resultante da hidroxila na posição axial atribua ao produto uma energia maior associada e, portanto, uma menor estabilidade.



A execução da reação em temperatura ambiente, conforme as condições reacionais descritas por Sawlewicz e colaboradores (1972), resultou na formação de uma mistura dos epímeros, com uma razão diastereoisomérica de aproximadamente 85:15 (**1c**:**1a**), o que é compatível com as previsões computacionais envolvendo substratos semelhantes a **1b**. Inicialmente, a análise em UPLC-PAD-ESI-MS do material obtido havia apontado a presença de um único produto, cujo espectro de massas correspondente apresentava picos com relação  $m/z$  compatíveis com o produto desejado (Apêndice B). No entanto, as condições cromatográficas empregadas na análise não foram capazes de permitir a distinção entre os dois possíveis epímeros formados, visto que a fase estacionária adotada era uma fase reversa do tipo C<sub>18</sub>, onde o mecanismo de separação é predominantemente do tipo partição, dependendo, portanto, majoritariamente do coeficiente de partição dessas substâncias nas cadeias hidrocarbônicas da fase estacionária. De fato, os epímeros **1a** e **1c** possuem o mesmo valor de logP (3,07) – *Software* utilizado: MarvinSketch, versão 16.9.5.0.

Por essa razão, também foram feitas análises em cromatografia de fase normal utilizando cromatoplaquetas de sílica gel. O mecanismo de separação envolvido nesse tipo de separação é conhecido como adsorção e a separação ocorre na interface entre as fases. Dessa forma, a interação diferencial dos produtos formados com os grupos silanóis, que compõem a superfície do material adsorvente, permite a separação dos epímeros, refletindo em bandas com diferentes fatores de retenção observadas após revelação. A primeira condição testada, empregando uma fase móvel composta por apenas acetato de etila, embora permitisse acompanhar o consumo do material de partida, não foi, no entanto, capaz de promover a separação dos epímeros formados (Snyder *et al.*, 1997).

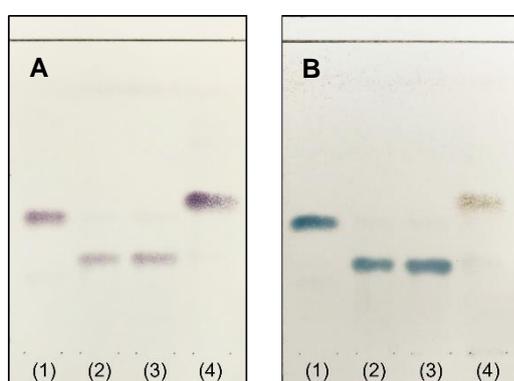
Quando os grupos funcionais das moléculas se posicionam diretamente sobre os sítios de adsorção, a molécula é dita estar localizada. Esse efeito de localização exercido pelas moléculas da amostra e do solvente podem influenciar significativamente a separação em cromatografia de fase normal. A deslocalização de algumas moléculas ocorre devido a uma restrição estérica que as impede de posicionar seus grupos funcionais em direção aos grupos silanóis. Dessa forma, a diferença espacial do grupo hidroxila em C-3 das substâncias obtidas contribui para que um dos epímeros esteja mais localizado do que o outro, permitindo assim uma separação. A fase móvel inicialmente adotada apresentava força suficiente para eluir os epímeros da amostra, mas não apresentava seletividade adequada, visto que as substâncias foram co-eluídas apresentando um fator de retenção de 0,58.

O solvente escolhido (acetato de etila), no entanto, é um solvente relativamente polar e localizante, dessa forma, para que qualquer um dos epímeros fosse adsorvido, teria que primeiramente ser capaz de deslocalizar uma das moléculas do solvente para liberar o sítio de adsorção. Se algum dos epímeros for um analito não-localizante, esse não é fortemente capaz de promover o deslocamento das moléculas do solvente e é, portanto, prontamente eluído. Esse deslocamento das moléculas do solvente é, no entanto, um processo termodinamicamente desfavorável, e mesmo se um dos epímeros for localizante, esse também apresentará uma eluição mais rápida em virtude da dificuldade em ser adsorvido (Snyder *et al.*, 1997).

Nessas condições o mais adequado foi incluir na composição da fase móvel um solvente não-localizante, visando melhorar a seletividade desse eluente. Quando moléculas de um solvente não-localizante também estão presentes, o analito não-localizante está apto a deslocar as moléculas desse solvente e interagir com o material adsorvente, mesmo que por meio de interações mais fracas. O analito localizante, em contrapartida, ainda precisa ser capaz de deslocalizar as moléculas do solvente localizante para conseguir interagir com os sítios de adsorção da fase estacionária. Dessa forma, o analito localizante, por não ser adequadamente adsorvido, apresentará um fator de retenção maior do que o analito não-localizante, que ficará retido. Após avaliar a eficiência da fase móvel incluindo hexano como solvente não-localizante, determinou-se que a proporção que promoveu a melhor separação entre os epímeros foi a de 3:2 (acetato de etila/hexano). Nessas condições, o epímero **1c** apresentou um R<sub>f</sub> de 0,29, enquanto o epímero **1a**, apresentou um R<sub>f</sub> de 0,42.

Apesar de não ser desejado a formação do epímero **1a**, a presença dessa substância no material obtido é facilmente contornada pela aplicação de uma etapa de purificação. Epímeros são diastereoisômeros que diferem na configuração espacial de um único centro quiral e, portanto, apresentam propriedades físico-químicas e espectroscópicas distintas, podendo ser facilmente caracterizados e separados por métodos convencionais. O epímero **1a** apresenta boa solubilidade em metanol, enquanto **1c** é muito pouco solúvel nesse solvente. Dessa forma, o material obtido após elaboração foi dispersado em metanol e a suspensão obtida foi mantida à uma temperatura de aproximadamente 20 °C negativos a fim de minimizar a solubilização de **1c**. Após filtração, o material foi novamente analisado em CCD (**Figura 31**) – adotando a nova fase móvel selecionada – e foi observado na cromatoplaça apenas a banda referente ao epímero **1c**, refletindo dessa forma a eficiência do processo de separação empregado. O filtrado obtido, por sua vez, foi submetido à evaporação do solvente até resíduo e posteriormente também foi analisado por CCD na condição estabelecida. O perfil cromatográfico observado, no entanto, apresentava uma mistura dos epímeros, com a presença majoritária de **1c**. As massas do produto purificado e do resíduo do filtrado foram consideradas para estimar a proporção diastereoisomérica.

**Figura 30 – Cromatoplaças da análise do produto da reação de redução.**



**Legenda:** (A e B) cromatoplaças de sílica gel obtidas após eluição com acetato de etila/ hexano (3:2) e revelação com reagente de Kedde e anisaldeído sulfúrico, respectivamente. (1) referência da 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (**1c**); (2) produto obtido após reação de redução; (3) referência do material de partida (**1b**); (4) referência do epímero 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**).

Na tentativa de melhorar ainda mais a seletividade da reação e, considerando que o produto desejado representa o produto cinético, a mistura reacional foi mantida em congelador (cerca de 20 °C negativos) e sem agitação, por 90 minutos.

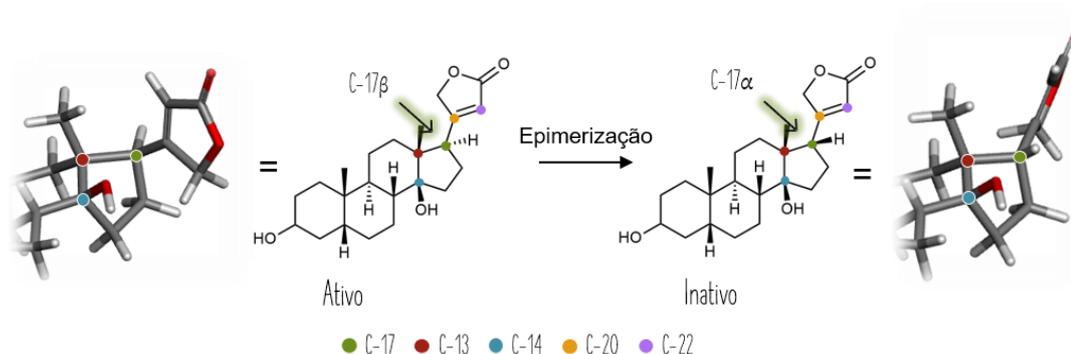
Transcorrido esse tempo, a mistura binária dos solventes da reação havia alcançado à temperatura de congelamento e passado da fase líquida para a fase sólida. Para acompanhamento da reação, foi realizada uma análise em CCD, onde foi possível concluir que mesmo com o congelamento da mistura reacional, todo o material de partida havia sido consumido e a banda referente a **1a** apresentava intensidade menor que aquela atribuída ao produto desejado, sugerindo que a redução na temperatura acentuou a estereosseletividade da reação.

A reação foi repetida várias vezes, submetendo-se um total de aproximadamente 8,4 gramas de digitoxigenona (**1b**) à condição estabelecida, o que possibilitou obter 8,1 do produto contendo apenas traços de **1a**. Após purificação, foram obtidos 7,3 gramas de 3 $\alpha$ -hidroxi-digitoxigenina (**1c**) pura, correspondendo a um rendimento real de 89,6%. A massa do resíduo do filtrado obtida foi de 0,55 gramas. Esse resultado representa razão diastereoisomérica de cerca de 93%, visto que uma pequena quantidade do epímero **1c** ainda estava presente no resíduo após eliminação do solvente do filtrado.

Esse resultado demonstra que embora a reação não seja capaz de fornecer exclusivamente o epímero desejado, o controle termodinâmico da reação, por meio do abaixamento da temperatura, permitiu obter **1c** com menos de 7,0% de contaminação pelo seu isômero **1a**.

A neutralização do excesso de NaBH<sub>4</sub> e redução do meio reacional, visando eliminar a maior parte do solvente orgânico na mistura reacional, compreendem as etapas críticas do processo de elaboração da reação. O íon hidreto, apesar de um excelente nucleófilo, também apresenta caráter básico acentuado e pode atuar capturando prótons dependendo das condições reacionais. A presença de um hidrogênio ácido na posição C-17 $\alpha$  do núcleo esteroidal dos derivados cardiotônicos representa mais um ponto da molécula que merece atenção em reação em condições básicas (**Figura 32**).

**Figura 31 – Isomerização do anel lactônico na posição C-17.**



A captura desse próton por uma base resulta na formação de um carbânion, que apresenta um par de elétrons não-compartilhados. No entanto, uma vez que o carbono não é um átomo com boa eletronegatividade, sua afinidade pelo par de elétrons é baixa e o base conjugada gerada seria altamente estável se a carga formada não fosse estabilizada pela carbonila presente no anel lactônico. A presença da insaturação entre os carbonos C-20 e C-22 torna essa estabilização ainda mais efetiva, em virtude da deslocalização dos elétrons estendida. Dessa maneira, a forma canônica que mais contribui para o híbrido de ressonância apresenta o par de elétrons não compartilhados concentrado no átomo de oxigênio, que por ser mais eletronegativo comporta adequadamente a carga negativa. Diante dessa espécie ionizada (enolato), dois possíveis caminhos podem ser seguidos. No primeiro deles, essa espécie captura um próton do solvente (água) em uma reação ácido/base e assume sua forma enólica. Em um outro caminho, o par de elétrons retorna ao átomo de carbono que então atua como uma base de Lewis e pode capturar um próton do meio, reestabelecendo o anel lactônico  $\alpha,\beta$ -insaturado. No entanto, nesse processo, o átomo de hidrogênio adicionado ao carbono C-17 assume com frequência a posição inversa àquela naturalmente observada nesses compostos (posição  $\beta$ ), obrigando o anel lactônico a assumir a posição C-17 $\alpha$ . Esse isômero, no entanto, é muito mais estável, uma vez que nessa disposição, o anel lactônico se orienta para baixo, evitando a repulsão eletrostática e estérica com os grupos hidroxila em C-14 e metila em C-13 (Stork *et al.*, 1996; Honma & Nakada, 2007).

Sendo assim, é fortemente recomendável neutralizar o excesso do agente redutor antes de promover a redução do volume do solvente orgânico, evitando assim uma condição fortemente básica na mistura reacional. Uma vez que os íons hidreto

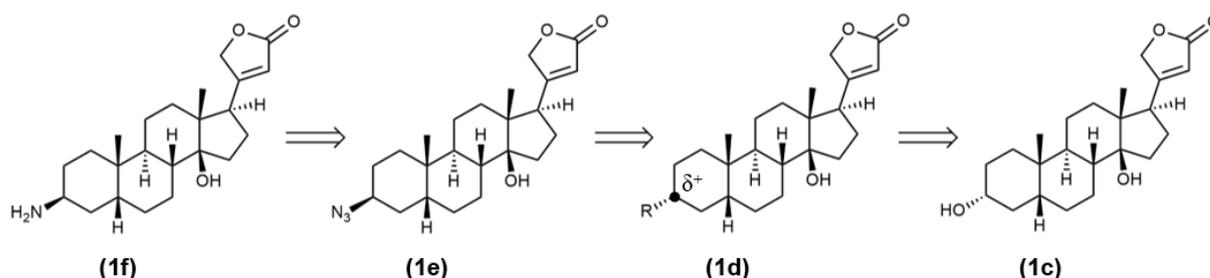
são altamente reativos, o ácido selecionado para esse processo não precisa ser forte, o que é conveniente para não acarretar danos à hidroxila da posição C-14 susceptível à desidratação. Para assegurar a completa neutralização do agente redutor, foi adicionado à mistura reacional quantidade suficiente de uma solução aquosa de ácido acético 5% v/v até que um pH igual a 5,0 fosse atingido. O produto gerado nessa reação de neutralização é o mesmo gerado após a solvólise do tetra-alcoxiboroidreto no mecanismo de redução da digitoxigenona e, portanto, é altamente solúvel em água, sendo facilmente eliminado durante a purificação por extração líquido-líquido.

### 6.1.5 Reação IV – 3 $\alpha$ -O-tosil-3-desoxi-digitoxigenina

A reação de tosilação foi realizada conforme descrito na seção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.5) e, após elaboração, foram obtidos 1,4 gramas de **(1d)**, correspondendo a um rendimento de 99,2%.

A estratégia sintética adotada visava obter um intermediário chave (**1f**), produzido pela redução de um grupo azida em C-3 (**Figura 33**). No entanto, como a hidroxila presente nessa posição do intermediário **1c** não é um bom grupo abandonador, foi necessário inicialmente converter este grupo em um bom grupo abandonador para então obter o intermediário azida (**1e**).

**Figura 32 – Análise retrossintética do intermediário chave (1f).**



A redução do grupo azida é um dos métodos clássicos para síntese de compostos contendo grupos aminas. O grupo azida, por ser um bom nucleófilo, pode ser facilmente inserido nas moléculas por meio de uma reação de substituição nucleofílica. No entanto, para que a reação seja efetiva, o grupo ligado ao carbono eletrofílico que sofrerá o ataque precisa ser um grupo abandonador melhor do que o

próprio íon azideto, evitando assim que a reação seja reversível (**Figura 33**). Grupos hidroxilas não são bons grupos abandonadores, pois seriam liberados da molécula como uma espécie altamente reativa e muito mais nucleofílica do que o íon azideto. Ambos os átomos de oxigênio e nitrogênio são muito eletronegativos, mas embora o oxigênio seja ainda mais eletronegativo do que o nitrogênio, no íon azideto o par de elétrons não-compartilhados se encontra deslocalizado entre os 3 átomos de nitrogênio presentes na estrutura, ao passo que no íon hidróxido toda a carga se concentra apenas em um átomo de carbono. Essa deslocalização promove uma estabilidade do íon azideto e, dessa forma, mesmo que o íon hidróxido chegue a ser liberado, essa espécie prontamente atacaria o mesmo átomo de carbono e expulsaria o grupo azida, restituindo a molécula original.

Grupos hidroxilas, no entanto, podem ser convertidos em bons grupos abandonadores por três caminhos distintos. O mais simples deles consiste em promover a protonação desse grupo, levando a formação de uma espécie cujo átomo de oxigênio apresenta uma deficiência em elétrons ( $-\text{OH}_2^+$ ). Na tentativa de neutralizar essa deficiência, esse átomo, por ser muito eletronegativo, puxa para si a densidade eletrônica da ligação que estabelece com o átomo de carbono (C–O), acentuando ainda mais o caráter eletrofílico desse átomo. Dessa forma, um ataque eletrofílico é ainda mais favorável, pois ameniza o momento de dipolo positivo do carbono e ainda transfere um par de elétrons para o átomo do oxigênio, que é liberado como  $\text{H}_2\text{O}$ , uma base fraca e bastante estável. Porém, apesar de simples, esse método não é adequado para as reações envolvendo os esteroides cardioativos. O grupo hidroxila em C-3 não é uma base muito forte, dessa forma, sua protonação só seria possível em condições empregando ácidos extremamente fortes, o que poderia prejudicar a integridade da hidroxila presente na posição C-14 $\beta$ , levando a formação de subprodutos, o que não é desejado.

Os outros dois métodos, embora um pouco menos simples, são amplamente empregados em síntese orgânica, e consistem na conversão do grupo hidroxila em haletos de alquila ou na formação de ésteres sulfonatos.

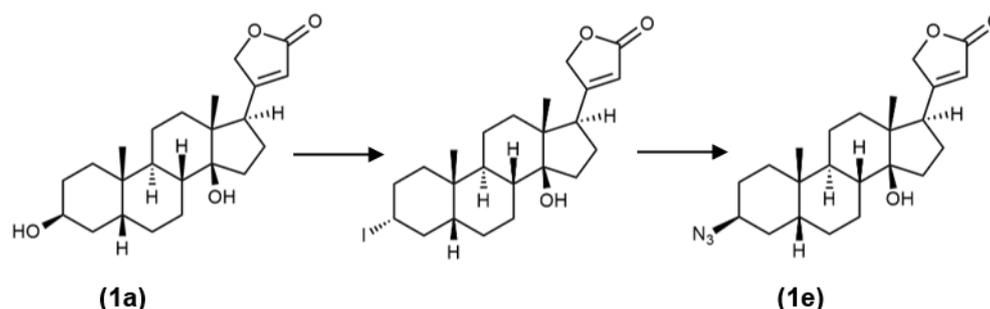
Os reagentes mais comumente usados para converter álcoois em haletos de alquila são os haletos de hidrogênio ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HBr}$  e  $\text{HI}$ ), o tribrometo de fósforo ( $\text{PBr}_3$ ), tricloreto ou pentacloreto de fósforo ( $\text{PCl}_3$  e  $\text{PCl}_5$ , respectivamente) e o cloreto de

tionila ( $\text{SOCl}_2$ ). Todos esses reagentes promovem uma clivagem da ligação estabelecida entre a hidroxila e o carbono do grupo alquila (ligação C–O) por meio de um ataque nucleofílico exercido por íons haleto, após conversão da hidroxila em um bom grupo abandonador por ação do próprio reagente. No entanto, todas essas reações são caracterizadas como reações de substituição nucleofílica, podendo ser realizadas tanto por mecanismo  $\text{S}_{\text{N}}1$ , quanto por mecanismo  $\text{S}_{\text{N}}2$ , o que indica que ou resultam em um produto com configuração invertida no carbono atacado, ou uma mistura de isômeros é obtida. Sendo assim, com exceção da reação envolvendo  $\text{SOCl}_2$ , que depende das condições pode resultar em um produto com retenção da configuração, a aplicação de nenhum desses métodos seria eficiente para transformar o grupo hidroxila em um bom grupo abandonador dentro da proposta da rota sintética sugerida (Carey & Giuliano, 2016).

O mecanismo pelo qual um íon azideto é adicionado a um substrato contendo um álcool secundário pode ocorrer por ambos os mecanismos de substituição nucleofílica ( $\text{S}_{\text{N}}1$  ou  $\text{S}_{\text{N}}2$ ), dependendo das condições reacionais empregadas. No caso de substratos como **1c**, em que não há uma boa estabilização caso haja formação de carbocátion, a reação ocorrerá preferencialmente por um mecanismo  $\text{S}_{\text{N}}2$ , levando assim a formação de um produto de configuração invertida do centro quiral atacado (C-3). Dessa forma, se ao invés de **1c**, a sequência reacional partisse de **1a**, a aplicação em sequência de uma reação de formação de um haleto de alquila e substituição do haleto por um grupo azida seria, no entanto, adequada, pois também resultaria na formação do intermediário planejado (**1e**).

Essa rota alternativa, apesar de promissora e ser capaz de fornecer **1e** por meio de apenas duas etapas reacionais, apresenta algumas complicações que a torna uma opção menos vantajosa. Em estudos anteriores, Ottoni (2018) e Andrade (2020) determinaram uma condição mais favorável para obter **1e** a partir de um intermediário contendo um grupo iodeto na posição C-3 $\alpha$  (**Figura 34**), mas esta não apresentou um rendimento adequado para a obtenção do intermediário desejado (Ottoni, 2018; Andrade, 2020).

**Figura 33 – Rota alternativa para obtenção do intermediário 1f a partir de 1a.**



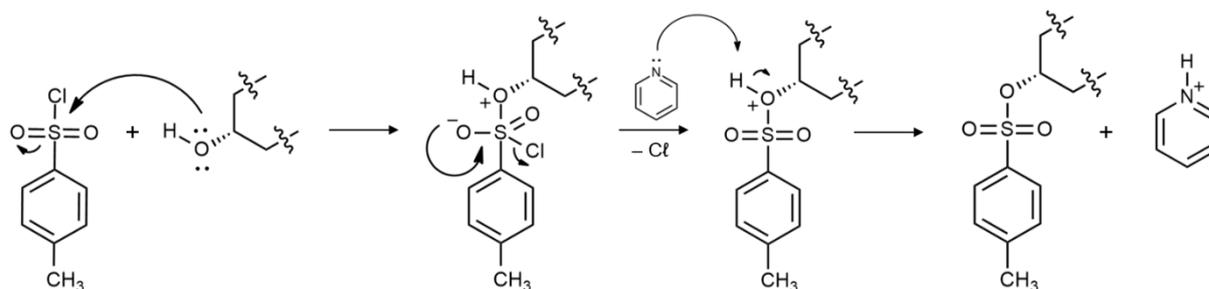
Os métodos mais amplamente empregados para obtenção de um bom eletrófilo a partir de um substrato alcoólico se baseiam na formação de um derivado de éster sulfonato, como os mesilatos, tosilatos e triflatos. Reações desse tipo são geralmente realizadas em piridina, um solvente de caráter básico que além de ser capaz de solubilizar adequadamente o cloreto de sulfonila apropriado, também dificulta a formação do ácido clorídrico, evitando assim variações do pH da mistura reacional que podem ser incompatíveis com alguns substratos. Essas reações também ocorrem por um mecanismo de substituição nucleofílica do tipo S<sub>N</sub>2. No entanto, a formação do éster sulfonato não afeta a estereoquímica, pois quem atua como nucleófilo é o grupo hidroxila do substrato, e o átomo eletrofílico não é o carbono, mas o átomo de enxofre. Dessa forma, os produtos são obtidos com retenção da configuração do centro quiral envolvido na ligação C–O. Por essa razão, a aplicação desses métodos para a conversão do grupo hidroxila na posição C-3α de **1c** em um bom grupo abandonador se mostrou ser o mais apropriado para cumprir a rota sintética proposta.

O mecanismo da reação de **1c** com o cloreto de *para*-toluenosulfonila (**Figura 35**) se inicia com um ataque nucleofílico, exercido pelo grupo hidroxila em C-3α, ao átomo de enxofre. O ataque é caracterizado pela sobreposição do orbital do átomo de oxigênio contendo os pares de elétrons não-compartilhados e do orbital antiligante ( $\pi^*$ ) da dupla ligação formada entre o átomo de enxofre e o átomo de oxigênio. Em virtude da aproximação do nucleófilo, o par de elétrons  $\pi$  dessa ligação se afasta ainda mais do átomo de enxofre e se concentra no átomo de oxigênio, levando a formação do intermediário da reação. Em seguida, espontaneamente o par de elétrons concentrado no átomo de oxigênio retorna regenerando a dupla ligação com o átomo de enxofre, ao passo que a ligação entre enxofre e cloro vai sendo quebrada, liberando o íon cloreto no meio reacional. Uma molécula de piridina então reage em uma reação

ácido/base com o produto formado e captura o próton ligado ao oxigênio, restaurando o par de elétrons não-compartilhados desse átomo e levando ao produto esperado (**1d**).

O produto obtido após reação de tosilação, assim como planejado, comporta-se como substrato em reações de substituição nucleofílica. Dessa forma, foi necessário empregar uma condição livre de moléculas de água, que pode atuar como nucleófilo e atacar o carbono eletrofílico. Como essa reação ocorre com inversão da configuração, a expulsão do grupo tosilato e a introdução de um grupo hidroxila resultante desse ataque levaria a formação do produto inicial da sequência reacional, a 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**). Por essa razão, antes que a reação fosse executada, o solvente foi mantido por 48 horas em peneira molecular 3 Å para garantir a condição anidra necessária. Além disso, após a mistura dos reagentes, o ar foi removido de dentro do frasco por sucção, com auxílio de uma seringa, até exaustão, assegurando assim uma condição de vácuo e, conseqüentemente, ausência de umidade proveniente do ar atmosférico.

**Figura 34 – Mecanismo da reação com cloreto de p-toluenossulfonila.**



**Fonte:** Solomons *et al.*, 2018 (adaptado).

A reação também foi mantida em temperatura controlada para evitar um aquecimento do sistema, o que poderia propiciar uma reação de eliminação e levar a formação de subprodutos – os alcenos  $\Delta^{2-3}$ -digitoxigenina e  $\Delta^{3-4}$ -digitoxigenina.

Uma análise por CCD da mistura reacional após 20 horas de reação demonstrou a formação de apenas um único produto, confirmando que as medidas adotadas foram eficientes para evitar reações indesejadas.

Para elaboração da reação, Sawlewicz e colaboradores (1972) propuseram uma extração líquido-líquido, realizada a temperatura ambiente, empregando sequencialmente soluções aquosas de um ácido e uma base. O material obtido após aplicação dessa abordagem, no entanto, apresentava o produto desejado (**1d**) contaminado com uma pequena porção de (**1a**), provavelmente formado em decorrência das condições empregadas no processo de elaboração. Por essa razão, algumas modificações foram adotadas, objetivando torná-la menos propícia a ocorrência de reações secundárias.

Dessa forma, a mistura reacional foi transferida para um béquer de 250,0 mL contendo cerca de 100,0 mL de uma mistura de água destilada e gelo pilado, o que resultou na precipitação do produto de interesse em virtude da sua baixa solubilidade em água. Para eliminação do excesso de piridina ainda presente, também foram adicionados ao frasco cerca de 160 mL de solução de HCl 2 mol/L previamente resfriada, conferindo à suspensão um pH igual a 3,0.

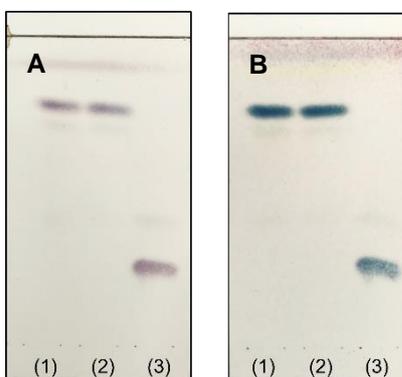
A piridina é um solvente polar aprótico, de coloração levemente amarelada e que possui odor característico. O ácido conjugado dessa base possui um pKa de 5,2. Dessa forma, a acidificação da mistura até um pH próximo de 3,0 garante que cerca de 99,5% das moléculas desse solvente serão devidamente ionizadas. O cloreto de piridínio formado pela neutralização da piridina com HCl é um sal solúvel em água e que não possui o odor típico das aminas. Além disso, o deslocamento do equilíbrio de ionização da piridina para a sua forma protonada contribui ainda mais para a precipitação do produto, visto que na sua forma ionizada a piridina não é capaz de solubilizar o produto formado e, portanto, não será capaz de promover um arraste mecânico significativo durante a filtração (Perrin *et al.*, 1981; PubChem, 2020).

Após neutralização, a suspensão obtida foi filtrada sob pressão reduzida e o material retido no funil foi lavado com cerca de 50,0 mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> 3% m/v previamente resfriada para eliminação do resíduo de ácido *para*-toluenossulfônico formado quando o excesso de cloreto de *para*-toluenossufonila reage com a água nas etapas iniciais da elaboração.

O sólido branco obtido após filtração foi analisado por CCD (**Figura 36**) e por UPLC-PAD-ESI-MS (Apêndice B) e apenas um produto foi observado em ambas as

análises. Nos espectros de massas também foram observados picos com reação  $m/z$  que confirmam a massa de **1d**, como o pico em  $m/z$  529,34 no modo de ionização positivo (ESI+), correspondendo ao cátion  $[M + H]^+$ .

**Figura 35 – Cromatoplasacas da análise do produto da reação de tosilação.**



**Legenda:** (A e B) cromatoplasacas de sílica geral obtidas após eluição com acetato de etila/hexano (3:2) e revelação com reagente de Kedde e anisaldeído sulfúrico, respectivamente. (1) referência do 3 $\alpha$ -O-hidroxi-digitoxigenina (**1d**); (2) produto obtido após reação de tosilação; (3) referência do material de partida (**1c**).

### 6.1.6 Reação V – Síntese da 3 $\beta$ -azido-3-desoxi-digitoxigenina

A reação de azidação foi realizada conforme descrito na seção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.6).

Após ativação da hidroxila da posição C-3 $\alpha$ , por meio da conversão em um bom grupo abandonador, o intermediário chave (**1f**) da reação de obtenção dos derivados estruturalmente semelhantes ao amantadig (**4**) pode ser alcançado por três caminhos principais. O mais simples deles, embora menos efetivo, seja por meio de um ataque nucleofílico direto da amônia ao carbono eletrofílico do substrato contendo um bom grupo abandonador. A amina resultante, no entanto, possui um caráter nucleofílico ainda mais potente do que a amônia em razão do efeito indutivo doador de densidade eletrônica exercido pelos grupos alquila vizinhos, aumentando assim a disponibilidade do par de elétrons não-compartilhados do átomo de nitrogênio. Dessa forma, o produto formado passa a competir com amônia, o que pode acabar resultando em alquilações múltiplas, com obtenção de uma mistura de aminas primárias, secundárias, terciárias e até do sal de amônio quaternário. Por essa razão, mesmo

que um excesso de amônia seja adicionado (acima de 50 equivalentes), é muito improvável que a reação se limite apenas à obtenção da amina primária, como desejado para a rota sintética proposta para obtenção de **1f** (Maddani *et al.*, 2010; Solomons *et al.*, 2018).

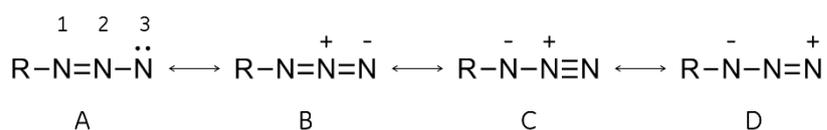
Um método mais eficiente para preparação de uma amina primária é conhecido como Síntese de Gabriel e se baseia na utilização de sais de ftalimida. No primeiro estágio dessa reação o ânion ftalimida reage com o substrato contendo um grupo abandonador ( $S_N2$ ) para fornecer um intermediário que posteriormente, no segundo estágio, pode ser hidrolisado – em meio ácido ou básico – ou, mais comumente, sofrer uma hidrazinólise. Os dois principais sais empregados no primeiro estágio dessa estratégia sintética são a ftalimida de sódio e de potássio, obtidas por meio da neutralização da ftalimida ( $pK_a = 8,3$ ) com hidróxido de sódio ou de potássio, respectivamente. No entanto, embora existam na literatura relatos de sucesso empregando bases mais fracas, como carbonato de potássio e de sódio, as reações desse tipo também são altamente susceptíveis aos impedimentos estéricos. Por ser uma espécie mais volumosa, o íon ftalimida raramente atua como nucleófilo na presença de substratos terciários e, frequentemente se comporta como uma base na presença de substratos secundários ou primários estericamente impedidos. Essa dificuldade em reagir com substratos mais impedidos pode ser compensada por um aumento na temperatura reacional, o que, no entanto, favorece reações secundárias decorrentes do comportamento adicional do íon. Dessa forma, são observados frequentemente produtos da reação de eliminação quando substratos mais volumosos são considerados. Por essa razão, mesmo que na literatura exista uma ampla gama de variações descritas para as condições reacionais empregadas, as evidências parecem sugerir que a aplicação dessa estratégia não seja a mais promissora para obtenção de derivados amino dos cardioativos (Gabriel, 1887; Sakellarios, 1946; Gibson & Bradshaw, 1968).

Um dos melhores e mais convenientes métodos para obtenção de aminas a partir de substratos como **1d** envolve inicialmente a conversão do substrato eletrofílico em alquilazidas e, em seguida, procede-se com a redução desse grupo funcional para obtenção das aminas correspondentes com bons rendimentos. Uma das principais vantagens dessa metodologia se respalda no controle regio e estereosseletivo que acompanha o preparo de muitas azidas orgânicas, o que conseqüentemente também

permite uma conversão controlada desse grupo nas amins desejadas (Maddani *et al.*, 2010).

Apesar de o grupo azida ligado covalentemente resultar na formação de substâncias relativamente explosivas, tóxicas e que se decompõem facilmente, a introdução desse grupo funcional em moléculas orgânicas tem se mostrado de grande aplicabilidade para obtenção de intermediários de síntese, em razão da ampla gama de transformações possíveis. Segundo Smith (2020), são estáveis e manipuláveis as substâncias cuja número de átomos de nitrogênio na molécula não excedem o número de átomos de carbono e que cumprem a relação  $(N^{\circ}_C + N^{\circ}_O)/N^{\circ}_N \geq 3$  (Bräse *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2020; Smith, 2020).

A estrutura linear desse grupo, definida por difração de elétrons e análises de raio-X, apresenta ligações covalentes entre três átomos de nitrogênio que admite a deslocalização dos elétrons  $\pi$  e pares de elétrons não-compartilhados, sugerindo a contribuição de quatro diferentes formas canônicas na determinação do híbrido de ressonância. Embora a forma canônica (**A**), seja a que fornece maior contribuição por não apresentar separação de cargas, é a estrutura mesomérica de (**D**) que explica a regioseletividade desse grupo em reações nucleofílica e eletrofílicas. Nessa representação dipolar, o grupo azida por atuar como eletrófilo e ser atacado no átomo de nitrogênio deficiente em elétrons (N3) ou atuar como nucleófilo e atacar, um ponto deficiente em elétrons em outra molécula, por meio do átomo de nitrogênio contendo um par de elétrons não-compartilhados (N1). Dessa forma, o comportamento desse grupo nas reações é determinado pelas condições reacionais propostas (Boyer & Canter, 1954; Bräse *et al.*, 2005).



A princípio, azidas orgânicas podem ser preparadas por uma ampla variedade de métodos sintéticos, sendo o principal deles por inserção do grupo por meio das supracitadas reações de substituição ou adição nucleofílica e eletrofílica. Na maioria dos casos, o método de escolha compreende uma clássica substituição nucleofílica

do tipo S<sub>N</sub>2, envolvendo um haleto de alquila ou éster sulfonato como substrato e a azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) como fonte do grupo azida (Bräse & Banert, 2010).

O solvente dimetilformamida (DMF), sob condições de temperatura controlada, é frequentemente empregado como solvente em reações seguindo esse mecanismo. Como a maioria dos substratos dessas reações não apresenta adequada solubilidade em solventes que geralmente promovem uma adequada solubilização da NaN<sub>3</sub>, o uso de DMF, um solvente polar aprótico tem apresentado notável capacidade de fornecer uma adequada homogeneidade da mistura reacional, sem comprometer a reatividade do íon azideto. Em reações do tipo S<sub>N</sub>2, é adequado que o nucleófilo esteja minimamente envolvido pelas moléculas do solvente. Quando mais solvatado, menos energeticamente favorável será a reação, visto que é necessário que o nucleófilo se desvencilhe primeiro das moléculas do solvente para só então ser capaz de promover a transferência do par de elétrons para o orbital antiligante da ligação estabelecida entre o átomo atacado e o grupo abandonador (Bräse & Banert, 2010; Louvis & Silva, 2016).

No entanto, o uso de DMF como solvente da reação também possui alguns inconvenientes. Esse tipo de solvente, além de ser tóxico, em alguns casos também representa uma dificuldade quanto ao isolamento do produto da reação por ser altamente miscível com a água e a maioria dos solventes orgânicos e, por apresentar ponto de ebulição alto (158 °C), o que na maioria das vezes não é compatível com as moléculas orgânicas de aplicação farmacêutica (Bräse & Banert, 2010; Louvis & Silva, 2016; O`Neil, 2006).

Com base nesse conhecimento e visando minimizar as perdas do material obtido no processo de elaboração da reação, o volume de DMF empregado para solubilização da mistura reacional foi reduzido em cerca de 80% em relação ao que foi proposto por Sawlewicz e colaboradores (1972). Essa quantidade foi suficiente para dissolver 1,0 grama de **1d** e promoveu a solubilização parcial de NaN<sub>3</sub>, assim como ocorreu na metodologia original. Uma vez que grande parte desse agente nucleofílico não se solubiliza no solvente da reação e considerando a redução significativa de solvente empregado, um excesso de NaN<sub>3</sub> foi adicionado para assegurar que quantidade suficiente estivesse disponível em solução para converter o substrato no produto esperado.

Além disso, assim como na reação anterior, a presença de água no sistema reacional é um ponto crítico e a ausência total de umidade deve ser garantida para evitar a ocorrência de reações secundárias – resultando na formação de **1a**. Por essa razão, um tubo conector contendo cloreto de cálcio anidro foi introduzido no topo do sistema de refluxo para impedir que o ar atmosférico introduzisse umidade no meio reacional.

Sawlewicz e colaboradores (1972) propuseram que a reação fosse mantida sob aquecimento (75 °C) por três horas e, em seguida, fosse mantida à temperatura ambiente por mais 16 horas. No entanto, levando em consideração que as condições reacionais (solvente e substrato) não favorecem a formação de carbocátion e, considerando que o íon azideto não apresenta a tendência de se comportar como uma base, a probabilidade de favorecimento de reação de eliminação em razão do aumento da temperatura pareceu não ser significativa. Dessa forma, considerando essas análises estruturais, ao invés de adotar as condições propostas pelos autores supracitados, a reação foi mantida a 75 °C ao longo de todo o curso reacional, a fim de avaliar os possíveis efeitos.

Após 7 horas de reação nessas condições, uma alíquota de 10 µL do meio reacional foi tomada e aplicada em uma cromatoplaça de sílica gel para análise em CCD. Devido os deslocamentos ocasionados nos valores de retenção dos compostos em decorrência da presença de DMF, também foram aplicados 10 µL desse solvente nos pontos de aplicação das referências de **1d** e de **1e**, para assegurar que os valores de R<sub>f</sub> observados fossem comparativos. Após revelação com reagente de Kedde, foi possível constatar o total consumo do material de partida (**1d**) e a formação de um único produto, de natureza menos polar.

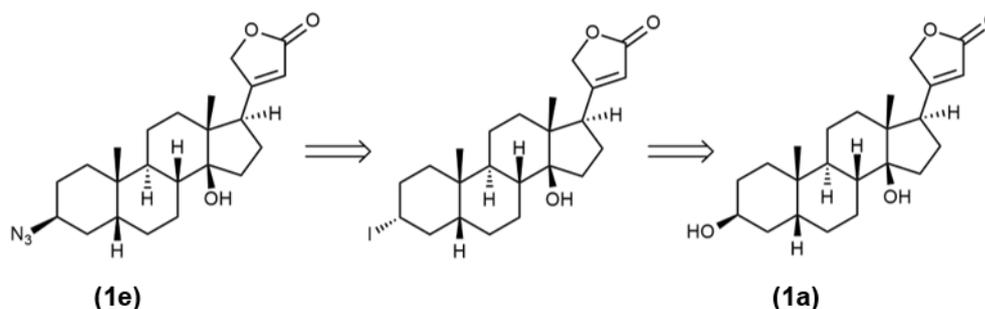
Para elaboração da reação, o frasco reacional foi preenchido com uma mistura de água e gelo pilado, considerando a baixa solubilidade de **1e** e alta solubilidade de NaN<sub>3</sub> nesse solvente. Dessa forma, foi possível promover a precipitação do produto desejado, enquanto o excesso de NaN<sub>3</sub> e do *para*-toluenossulfonato de sódio, formado após liberação do grupo abandonador, foram completamente solubilizados no meio aquoso, permitindo isolar **1e** por meio de um processo de filtração.

O material retido no funil ainda foi lavado com água gelada mais uma vez antes de ser mantido em dessecador para eliminação do solvente residual. Foram obtidos

716,5 mg de 3 $\beta$ -azido-3-desoxi-digitoxigenina (**1e**), correspondendo a um rendimento de aproximadamente 95,0%. Uma amostra do produto obtido foi novamente analisada por CCD e UPLC-PAD-ESI-MS (Apêndice B), confirmando a presença de uma única substância, apresentando massa molecular compatível com o produto e picos com *m/z* compatíveis com o esperado.

Como exposto anteriormente, em uma análise retrossintética mais simples, esse intermediário **1e**, poderia ser preparado por meio de uma reação de substituição eletrofílica do tipo S<sub>N</sub>2, empregando **1a** como composto de partida (**Figura 37**). Essa metodologia permitiria reduzir pela metade a quantidade de etapas sintéticas necessárias ou mesmo submeter o substrato da reação (**1a**) as duas etapas reacionais em um mesmo frasco de reação, considerando-se a estratégia *one-spot reaction*. Em estudos anteriores, Ottoni (2018) e Ribeiro (2020) se propuseram a determinar as condições reacionais mais adequadas para a obtenção de **1e** por meio dessas possíveis metodologias.

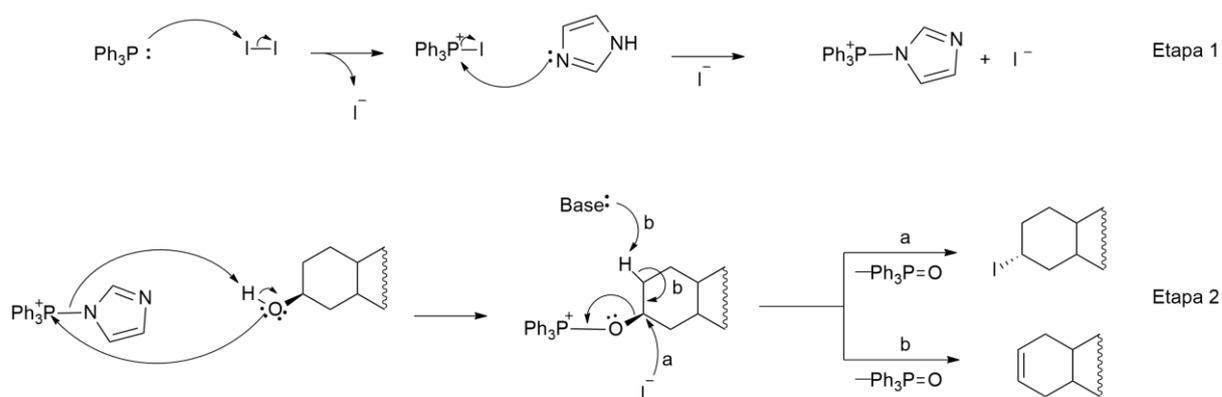
**Figura 36 – Análise retrossintética alternativa para obtenção de 1e.**



As metodologias propostas foram adaptadas do método descrito originalmente por Garegg-Samuelsson (1979) para substituição de grupos hidroxila por iodo em carboidratos, empregando como reagentes uma mistura de trifetilfosfina, iodo e imidazol, em tolueno. Nessas condições (**Figura 38**), forma-se inicialmente um complexo  $[\text{Ph}_3\text{P-Imidazol}]^+\text{I}^-$  resultante da reação dos três reagentes empregados, que é posteriormente atacado pela hidroxila alcoólica presente no substrato, resultando na conversão desse grupo em um bom grupo abandonador. Dessa forma, o íon iodeto gerado na etapa inicial da reação é capaz de atacar o carbono em uma reação de substituição eletrofílica (S<sub>N</sub>2) e assumir no substrato uma orientação contrária àquela

originalmente ocupada pelo grupo hidroxila (Garegg & Samuelsson, 1979; Oliveira, 2008; Andrade, 2020).

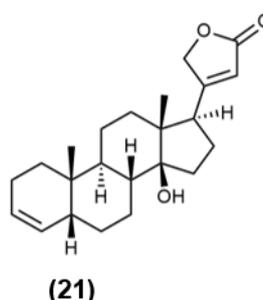
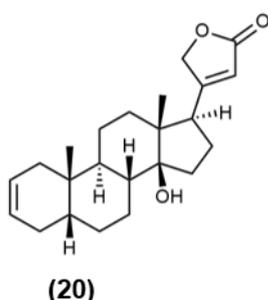
**Figura 37 – Proposta de mecanismo da reação de formação de um intermediário iodado.**



**Fonte:** Andrade, 2020 (adaptado).

O principal inconveniente enfrentando nesse tipo de reação é atribuído a alta reatividade desse derivado em virtude da fraca ligação estabelecida entre o iodo e o átomo de carbono. Quando elementos que apresentam raios atômicos com uma grande diferença de tamanho estão envolvidos na formação de uma ligação, essa ligação é altamente polarizada e, conseqüentemente, mais fraca, podendo ser facilmente quebrada. O iodo é um elemento que pertence ao grupo dos halogênios e possui uma eletrosfera composta por cinco níveis de energia. Já a eletrosfera do carbono é constituída por apenas dois níveis de energia. Sendo assim, em uma ligação C–I, os elétrons envolvidos estão muito mais próximos do núcleo do átomo de carbono do que do átomo de iodo, em razão da grande diferença no raio atômico desses elementos (140 pm e 70 pm, respectivamente para iodo e carbono). A nível orbital, isso significa que a formação dessa ligação C–I envolve a sobreposição de um orbital 5p, fornecido pelo átomo de iodo, com um orbital 2p, fornecido pelo átomo de carbono. A grande diferença de tamanho desses dois orbitais faz com que seja menos efetiva a sobreposição entre eles, resultando em uma ligação de fácil dissociação. Além disso, a volumosa nuvem eletrônica do iodo faz com que a dispersão da carga negativa gerada pela dissociação seja muito mais eficiente, tornando sua base conjugada (iodeto) bastante estável (Fossey *et al.*, 1995; Carey & Giuliano, 2016).

Por essas razões, dois subprodutos são frequentemente observados nas reações desse tipo, obtidos como resultado da reação de eliminação desse grupo em decorrência do excesso de imidazol na mistura reacional. A contaminação do produto com  $\Delta^{2-3}$ -digitoxigenina (**20**) e  $\Delta^{3-4}$ -digitoxigenina (**21**) diminui o rendimento global da reação de obtenção de **1e** empregando essa rota alternativa, que após purificação em coluna aberta de sílica gel foi ajustado para 64% (Ottoni, 2018). No entanto, embora forneça o intermediário desejado com um desprendimento de tempo menor e empregando uma quantidade ligeiramente menor de solventes nocivos, esse rendimento ainda está muito abaixo do obtido pela rota clássica após otimizações (cerca de 95%).



### 6.1.7 Reação VI – Síntese da 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina

A reação de redução do grupo azida foi realizada conforme descrito na secção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.7).

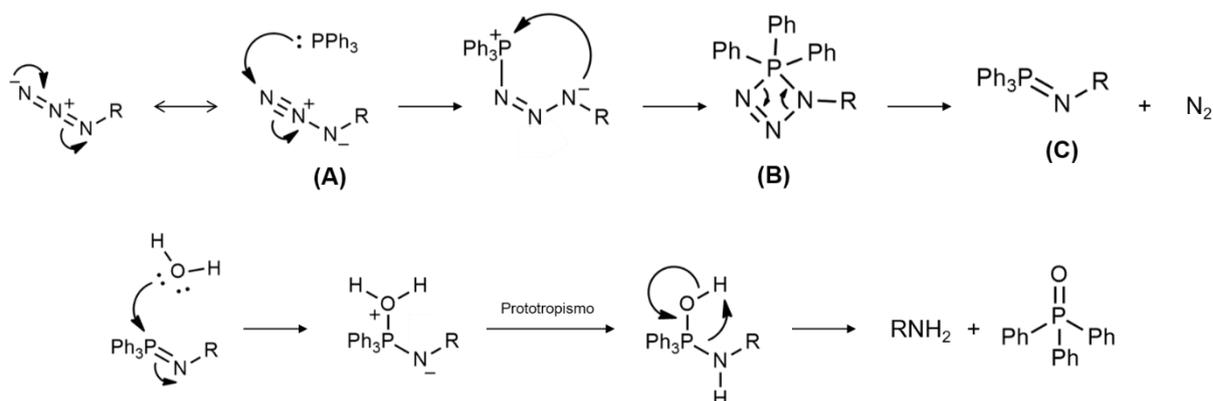
A redução de azidas orgânicas para obtenção das aminas correspondentes pode ser realizada por diversas metodologias. Agentes redutores clássicos como  $H_2/Ni$ ,  $H_2/Pd-C$ ,  $H_2/Pt$ ,  $Pd/CaCO_3$ ,  $LiAlH_4$ ,  $NaBH_4$ ,  $Na_2S$  e vários outros menos convencionais, como  $TiCl_4$  ou  $FeCl_3/NaI$ ,  $MoO_2(S_2CNEt_2)_2$ ,  $Zn$  ou  $Fe/NH_4Cl$ , são alguns dos reagentes descritos na literatura para obtenção de amino compostos a partir de intermediários azida. A maioria desses agentes redutores, no entanto, apresenta alguma limitação relacionada à falta de seletividade e incompatibilidade com outros grupos funcionais e de proteção, ou são executadas sob condições drásticas de temperatura e pressão, empregando muitas vezes reagentes caros e perigosos sob longos tempos reacionais, além de demandar procedimentos de purificação laboriosos em alguns casos. Todos esses aspectos acabam tornando a

eficiência desses métodos muitas vezes pouco satisfatórias, com aplicação limitada a moléculas mais simples (Brieger & Nestruck, 1974; Corey *et al.*, 1975; Lin *et al.*, 2002; Bräse *et al.*, 2005; Bartoli *et al.*, 2007; Maddani *et al.*, 2010).

Sawlewicz e colaboradores (1972) inicialmente propuseram que a redução do grupo azida no intermediário (**1e**) fosse realizada por um método de hidrogenação catalítica empregando Pd/CaCO<sub>3</sub> (catalisador de Lindlar) como agente catalizador. Esse método já havia sido aplicado anteriormente para redução de grupos azida em derivados dos bufadienólídeos e se mostrou eficiente, sendo capaz de reduzir seletivamente esse grupo sob condições amenas de temperatura e pressão. No entanto, quando a 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**) foi submetida a essas mesmas condições reacionais, o material analisado após 3 horas de reação, não apresentava mais um máximo de absorção característico na região do UV em cerca de 217 nm, típica do anel lactônico  $\alpha,\beta$ -insaturado dos derivados cardenólídeos. Isso sugere que esse método de redução não seria o mais adequado para conversão de **1e** em **1f**, em razão do risco de comprometimento de um dos grupos essenciais para a atividade dos derivados planejados.

Um método amplamente utilizado para conversão de azidas em aminas emprega trifenilfosfina em uma metodologia conhecida como Redução de Staudinger, desenvolvida em 1919 por Staudinger e Meyer. O mecanismo (**Figura 39**) proposto para essa reação envolve a formação de um intermediário fosfazina (**A**), resultante de um ataque nucleofílico do par de elétrons não-compartilhados do átomo de fósforo da trifenilfosfina ao átomo de nitrogênio eletrofílico do grupo azida. Nesse intermediário **A**, o átomo de fósforo deficiente em elétrons é atacado pelo átomo de nitrogênio nucleofílico em um ataque intramolecular, resultando na formação de um intermediário cíclico de quatro membros altamente instável (**B**), que imediatamente perde uma molécula de nitrogênio molecular para formação de um intermediário mais estável (**C**). A diferença de eletronegatividade entre os átomos de nitrogênio e fósforo nesse intermediário formado (**C**), torna a dupla ligação entre esses átomos altamente polarizada, com a nuvem eletrônica concentrada mais próxima ao átomo de nitrogênio. Dessa forma, na presença de água, esse intermediário é espontaneamente hidrolisado fornecendo a amina correspondente e o óxido de trifenilfosfina (Staudinger & Meyer, 1919; Clayden *et al.*, 2012).

**Figura 38 – Mecanismo da reação de redução com trifetilfosfina.**



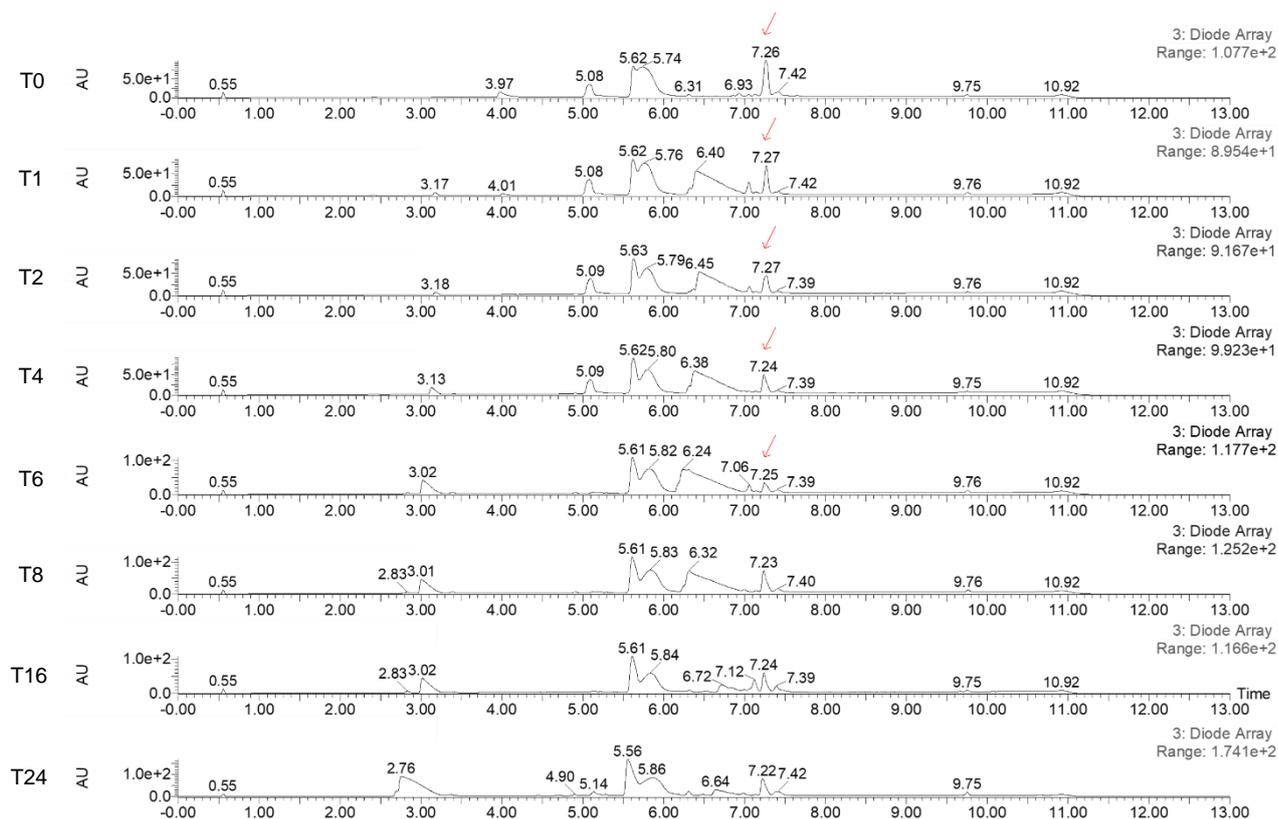
Fonte: Clayden *et al.*, 2012.

A redução de **1e** com trifetilfosfina foi realizada seguindo as condições propostas na patente WO2013000286, que descreve o método de preparação de derivados nitrogenados da bufogenina. A elaboração da reação, no entanto, foi realizada conforme procedimento descrito por Sawlewicz e colaboradores (1972), seguindo marcha química clássica para extração de aminas, com algumas modificações (Sawlewicz *et al.*, 1972; Hu, 2013)

A reação também foi monitorada por análises em UPLC-PAD-ESI-MS (**Figura 40**), por meio da coleta de amostras da mistura reacional em tempos determinados (0, 1, 2, 4, 6, 8, 16 e 24 horas), para otimização do tempo reacional e variações no protocolo de elaboração foram realizadas e avaliadas para determinação da metodologia mais eficiente para extração do produto de interesse.

No cromatograma gerado pelo detector de arranjo de diodos na análise da alíquota referente ao tempo 0 da reação (**Figura 40 – T0**) foi possível observar um pico com tempo de retenção de 7,26 minutos apresentando espectro de massas compatível com o composto de partida, a 3 $\beta$ -azido-3-desoxi-digitoxigenina (**1e**).

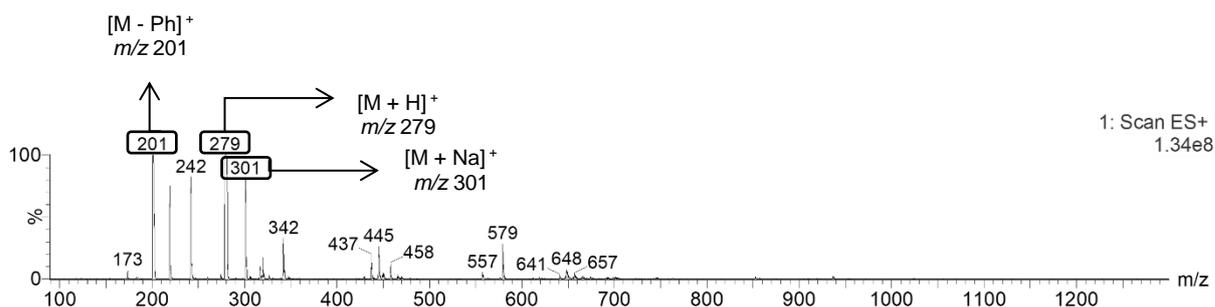
**Figura 39 – Perfis cromatográficos das alíquotas recolhidas durante o estudo da cinética da reação de obtenção do intermediário 1f.**



**Legenda:** cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS para o meio reacional nos tempos: (T0) 0 horas; (T1) 1 hora; (T2) 2 horas; (T4) 4 horas; (T6) 6 horas; (T8) 8 horas; (T16) 16 horas e (T24) 24 horas. Após 8 horas de reação todo o material de partida já havia sido consumido (setas vermelhas). A formação do óxido de trifenilfosfina é observado logo após a mistura dos reagentes. Condições analíticas: vide seção Material e Métodos (item 5.6).

No cromatograma obtido com detector de massas também foi possível observar um pico com tempo de retenção de 5,61 minutos, cujo espectro de massas correspondente apresentou sinal com  $m/z$  compatível com o coproduto da reação, o óxido de trifenilfosfina, tais como os picos em  $m/z$  279 e 301 correspondendo, respectivamente, aos adutos  $[M + H]^+$  e  $[M + Na]^+$ , além do pico  $m/z$  em 201, resultante da perda de um grupo fenila (**Figura 41**).

**Figura 40 – Espectro de massas no modo ESI-positivo para o pico com tempo de retenção de 5,61 minutos.**

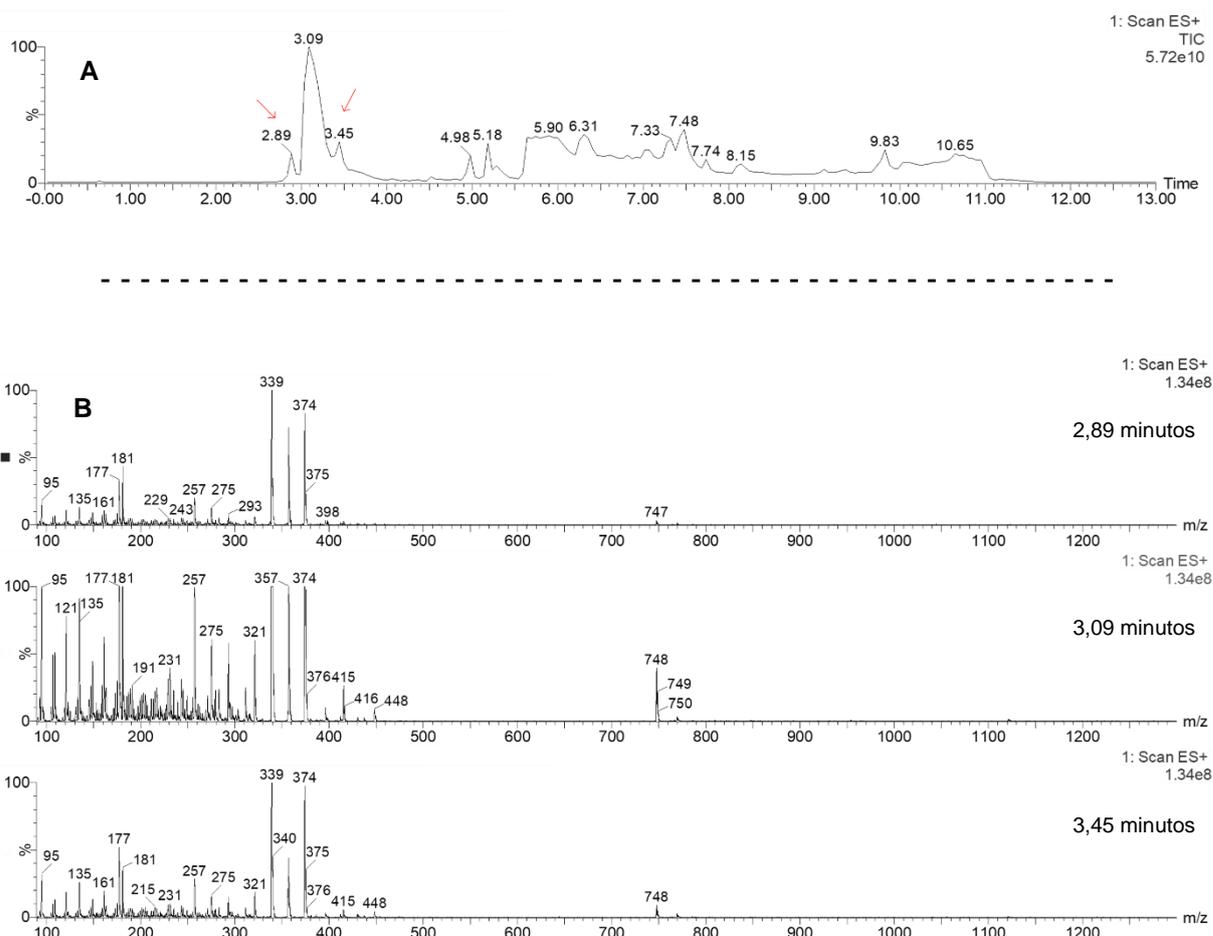


Em concordância com essa análise, o espectro de absorção na região do UV correspondente a esse pico apresentava perfil característico da presença do anel benzênico, sendo, portanto, observado três máximos de absorção (dados não apresentados). A ausência do produto esperado (**1f**) em T0 sugere que o óxido de trifenilfosfina detectado na análise corresponde, na verdade, a uma impureza do agente redutor empregado (trifenilfosfina), não sendo, portanto, um indicativo do início da reação (Armarego *et al.*, 1980).

Em uma outra análise realizada 1 hora após o início da reação (**Figura 40 – T1**) já foi possível observar a presença de um pico referente a uma substância de natureza mais polar (tempo de retenção = 3,17 minutos). Após 6 horas de reação, no entanto, no cromatograma gerado pelo detector de massas, esse mesmo pico foi observado com dois ombros, e os espectros de massas referentes aos três picos apresentavam o mesmo perfil de fragmentação, incluindo os picos com relação  $m/z$  compatíveis com o produto de interesse, como os picos com relação  $m/z$  de 339 e 357, que correspondem aos fragmentos  $[M - NH_3 - H_2O + H]^+$  e  $[M - NH_2 + H]^+$ , respectivamente (**Figura 42**).

A identificação das substâncias referentes a esses três picos, no entanto, não pôde ser realizada. A elucidação estrutural dessas substâncias depende de análises adicionais, como a obtenção de espectros de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$ .

**Figura 41 – Resultado da análise por espectrometria de massas do meio reacional após 6 horas de reação.**



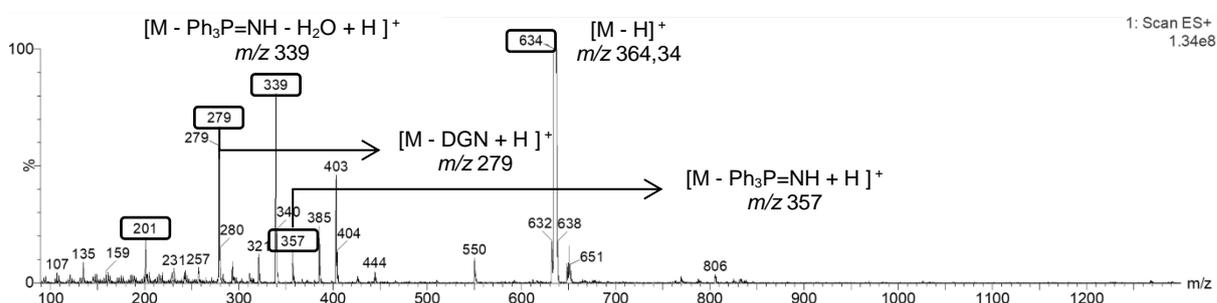
**Legenda:** (A) perfil cromatográfico referente ao meio reacional após 6 horas reação obtido pela análise com detector de MS; (B) espectros de massas no modo ESI-positivo referente aos picos com tempos de retenção de 2,89, 3,09 e 3,45 minutos.

Após 8 horas de reação, uma nova amostra da mistura reacional foi coletada e analisada (**Figura 40 – T8**). O cromatograma gerado ainda apresentava um pico com tempo de retenção de 7,23 minutos, cujo espectro de absorção da região do UV não apresentava um máximo de absorção em 220 nm característico do anel lactônico dos cardenólídeos e cujo espectro de massas gerado no modo ESI+ não evidenciava picos com relação  $m/z$  compatíveis com o composto de partida, permitindo concluir assim que **1e** já havia sido consumido totalmente.

No entanto, após 2 horas de reação (**Figura 40 – T2**), foi possível observar o aparecimento de um novo pico, com tempo de retenção de 6,31 minutos que ainda estava presente no cromatograma gerado na análise realizada após 8 horas do início da reação (**Figura 40 – T8**). O espectro de massas obtido no modo positivo (ESI+)

para este pico (**Figura 43**) indicou um sinal com  $m/z$  em 634, compatível com o aduto  $[M + H]^+$  do intermediário iminofosforano (**C**).

**Figura 42 – Espectro de massas no modo ESI-positivo referente ao pico com tempo de retenção de 6,31 minutos.**



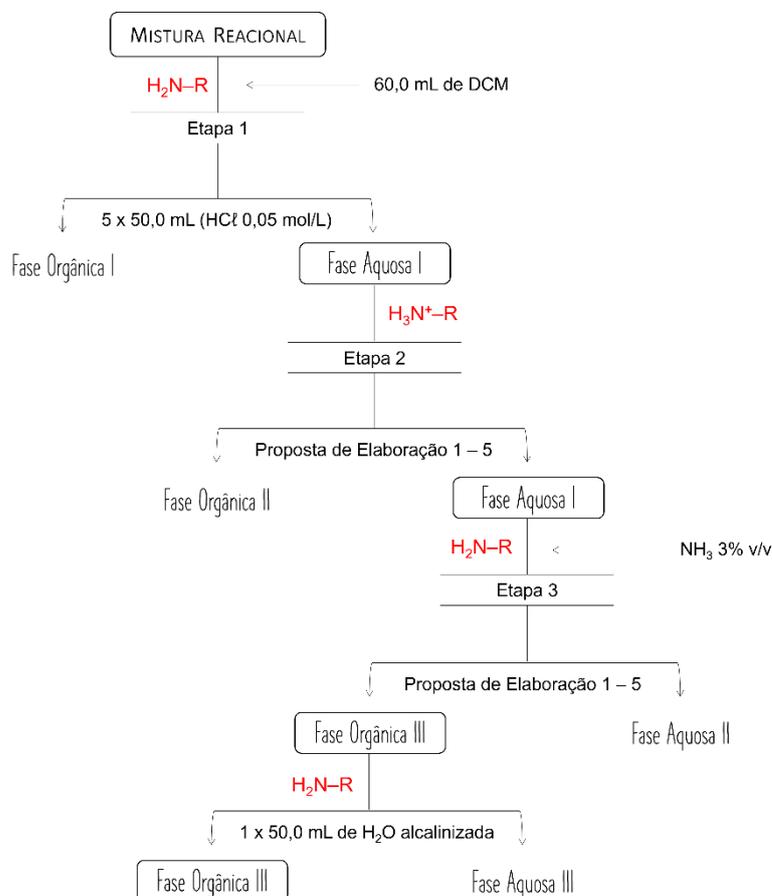
Considerando que após 16 horas de reação não se observou mais a presença do intermediário (**C**), a reação foi novamente realizada, empregando as mesmas condições anteriores, para avaliação do meio reacional após 10, 12 e 14 horas do início da reação (dados cromatográficos não apresentados). Foi possível constatar que todo o intermediário se converteu no produto desejado no intervalo entre 12 e 14 horas de reação. Por essa razão, todas as reações lançadas a posteriori, para otimização do processo de extração do produto de interesse, foram mantidas por 14 horas.

A execução da elaboração da reação conforme descrito por Sawlewicz (1972) e colaboradores não se mostrou eficiente para extração seletiva de **1f**. Uma análise por UPLC-PAD-ESI-MS da fase orgânica III obtida ao final do processo indicou a presença de óxido de trifenilfosfina, o coproduto da reação. No entanto, como essa substância possui um grupo cromóforo que apresenta uma absorvidade molar ( $\epsilon$ ) maior do que a absorvidade molecular característica do anel lactônico dos derivados cardioativos, não foi possível estimar uma relação entre área do pico dessa impureza e da área do pico referente a **1f**.

Algumas pequenas modificações no protocolo, no entanto, foram realizadas na tentativa de maximizar a eliminação do óxido de trifenilfosfina nas etapas iniciais da elaboração da reação (**Figura 44** e **Tabela 5**). Em todas as propostas de modificação realizadas, a primeira etapa da extração com solução aquosa ácida (HCl 0,05 mol/L) foi mantida sem alterações e se mostrou eficiente na extração de **1f**. Em nenhuma

das fases orgânica I, analisadas por UPLC-PAD-ESI-MS, foi observada a presença do produto de interesse. Além disso, em todas elas observou-se a presença majoritária do óxido de trifenilfosfina e outras impurezas não-identificadas.

**Figura 43 – Esquema geral da marcha química aplicada na purificação do intermediário 1f.**



Para extrair o produto de interesse da fase aquosa I, foi inicialmente proposto que essa fase ácida ( $\text{pH} \cong 3,0$ ) fosse previamente tratada com solução de amônia 3% v/v, provocando assim um deslocamento no equilíbrio de ionização dessa substância e favorecendo a presença majoritária do grupo amina na sua forma livre. Dessa forma, com o aumento no coeficiente de partição do produto de interesse, esse pôde ser facilmente extraído empregando-se um solvente orgânico imiscível em água.

No entanto, na tentativa de eliminar completamente o óxido de trifenilfosfina, ainda presente na fase aquosa I, antes de promover o tratamento dessa fase com

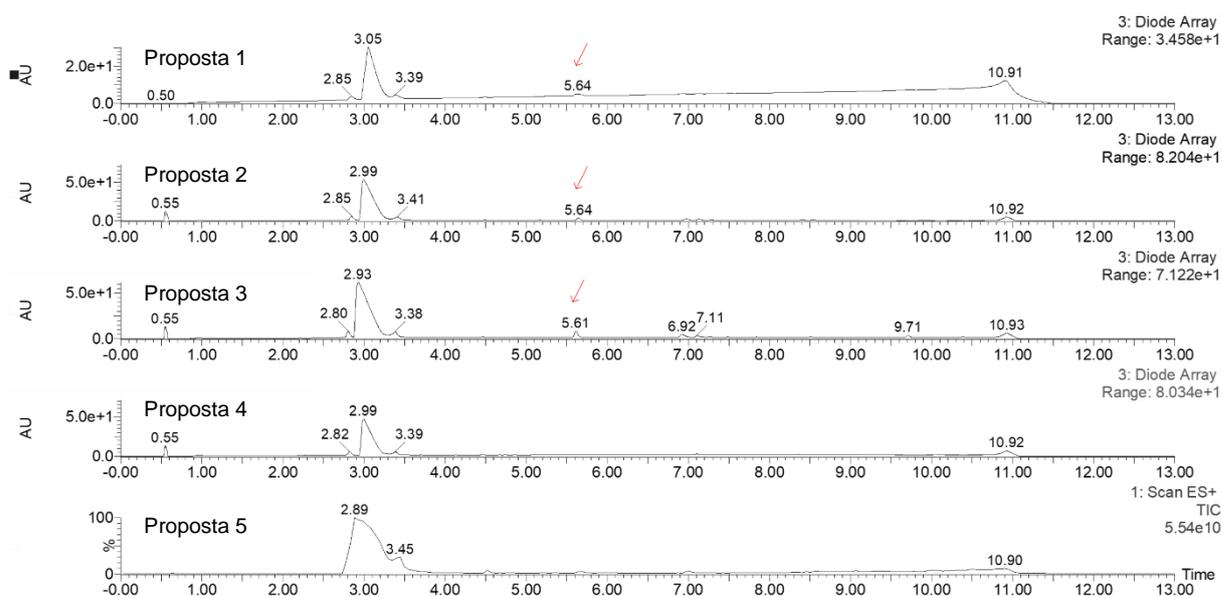
solução alcalina, procedeu-se com uma extração adicional com solvente orgânico conforme exposto na **Tabela 5**.

**Tabela 5 – Condições testadas nas etapas 2 e 3 no processo de elaboração da reação VI.**

Proposta de Elaboração	Etapa 2	Etapa 3
1	4 x 30,0 mL de DCM	5 x 30,0 mL de AcOEt
2	4 x 30,0 mL de AcOEt	5 x 30,0 mL de DCM
3	4 x 30,0 mL de DCM	5 x 30,0 mL de DCM
4	4 x 30,0 mL de AcOEt	5 x 30,0 mL de AcOEt
5	1 <sup>a</sup> - 3 x 30,0 mL de AcOEt 2 <sup>a</sup> - 2 x 30,0 mL de DCM	5 x 30,0 mL de DCM

As análises dos materiais obtidos após eliminação dos solventes das fases orgânica III demonstraram a eficiência das propostas 4 e 5 de elaboração (**Figura 45**). As fases orgânica II geradas também foram analisadas e em nenhuma delas o produto de interesse foi observado. No entanto, após a comparação entre as massas obtidas após a execução das sequências correspondentes as duas melhores tentativas (36,2 mg e 62,5 mg, respectivamente), foi possível concluir que a proposta 5 se mostrou mais adequada para extração seletiva do produto de interesse.

**Figura 44 – Perfil cromatográfico do material obtido após aplicação da marcha química de elaboração da reação empregando cada uma das propostas.**



**Legenda:** as setas indicam o pico referente ao óxido de trifenilfosfina.

A reação foi então realizada novamente nas condições estabelecidas por mais três vezes e em todas o rendimento obtido se manteve com uma média de 65%.

### 6.1.8 Reação VII – Primeiro Acoplamento

A reação do primeiro acoplamento foi realizada conforme descrito na secção *Materiais e Métodos* (Item 5.7.8).

Foram submetidos à reação do primeiro acoplamento aproximadamente 350,0 mg de 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina (**1f**), resultando na obtenção de 340,0 mg de 3 $\beta$ -(cloroacetil)amino-3-desoxi-digitoxigenina, com rendimento de 80,6%.

A reação entre o grupo amina presente na molécula do substrato (**1f**) e o cloreto de cloroacetila resulta na formação de ácido clorídrico em virtude do deslocamento do íon cloreto após o ataque nucleofílico à carbonila. Dessa forma, e considerando a susceptibilidade a desidratação da hidroxila em C-14 $\beta$ , o monitoramento do pH da mistura reacional foi um ponto crítico para execução da reação. A adição de cerca de 100,0  $\mu$ L da solução do reagente eletrofílico, no geral, resultou na diminuição no pH de 9,0 para 5,0. No entanto, a adição subsequente de 100,0  $\mu$ L dessa mesma solução,

promovia uma diminuição ainda mais acentuada, de 5,0 para 2,0. Dessa forma, a cada adição de 50,0  $\mu\text{L}$  da solução de cloreto de cloroacetila, foi realizada a verificação do pH do meio e a cada diminuição de duas unidades nesse, mais solução de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  foi adicionada até que o pH igual a 9,0 fosse novamente atingido.

A reação foi monitorada por análises em CCD, empregando-se as condições descritas anteriormente (secção *Materiais e Métodos* – item 5.6.2), e após três horas de reação não se observou mais a banda referente ao material de partida, indicando o fim da reação. A recuperação do produto formado foi realizada mediante eliminação do solvente orgânico da reação (THF) sob pressão reduzida em evaporador rotatório, ocasionando a precipitação do mesmo. Após filtração e lavagem do material retido do funil, uma amostra foi coletada e analisada por UPLC-PAD-ESI-MS (Apêndice B). Um único pico foi observado do cromatograma gerado pelo detector de arranjo de diodos, com tempo de retenção de 5,65 minutos e os picos observados do espectro de massas no modo ESI+ e ESI- também eram compatíveis com a massa esperada para o produto ( $\text{MM} = 450,02 \text{ g/mol}$ ).

Originalmente esse trabalho tinha como objetivo principal a obtenção de uma série de derivados estruturalmente semelhantes ao amantadig (**4**) visando a determinação *in vitro* da atividade citotóxica frente a diferentes linhagens tumorais de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e SKBR3), próstata (DU145 e PC-3) e pulmão (A549). No entanto, em virtude da impossibilidade de continuação da proposta inicial, em virtude do período de pandemia pela Covid-19, foi então proposto a aplicação de metodologia *in silico* da avaliação da capacidade inibitória dessas substâncias frente à  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ .

Dentre as hipóteses levantadas para o mecanismo da ação citotóxica desses derivados, a mais promissora delas aponta o alvo primário desses GC como determinante para a indução dos efeitos observados. Corroborando essa conjectura, Nolte *et al.* (2017), Silva *et al.* (2018) e Boff *et al.* (2019) também demonstraram que os efeitos antiproliferativos desencadeados pelo amantadig (**4**) e derivados relacionados, apresentavam relação com a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  (Nolte *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Boff *et al.*, 2019).

## 6.2 Análises *in silico*

Uma das principais vantagens das triagens em modo virtual é a possibilidade de avaliar moléculas cujas amostras não estejam fisicamente disponíveis. Isso é particularmente útil para tornar mais consciente o processo de tomada de decisão sobre as moléculas que serão adquiridas comercialmente, além de poupar tempo e o consumo desnecessário do material requerido para a síntese de novas entidades químicas (Sliwoski *et al.*, 2013; Piccirillo & Amaral, 2018).

Por essas razões, antes de proceder com a síntese da série de derivados da 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina (**1f**) e considerando que dentre as várias teorias propostas para os possíveis mecanismos de ação dos GC, as que sugerem a interação com a subunidade alfa da bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase são as mais promissoras, uma análise por *docking* molecular foi conduzida previamente, com o intuito de prever quais derivados apresentariam maior afinidade pelo sítio de ligação presente nas diferentes isoformas da subunidade alfa dessa proteína transmembrana. Com essa metodologia de *docking* foi possível determinar a conformação dos grupos farmacofóricos, permitindo evidenciar as interações intermoleculares estabelecidas e classificar os ligantes de acordo com a afinidade apresentada pelo alvo molecular.

### 6.2.1 Modelagem Por Homologia

Até o início desse trabalho, nenhuma estrutura cristalográfica da proteína transmembrana Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expressa em células humanas havia sido depositada nos bancos de dados de proteínas. No entanto, como o sítio de ligação dos GC, dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e do ATP estão todos localizados na subunidade alfa dessa macromolécula, uma busca pelas sequências primárias das diferentes isoformas dessa subunidade expressa na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase humana foi realizada nos principais bancos de dados. Todas as sequências obtidas correspondiam a sequência canônica, que compreende a sequência proveniente da tradução do genoma humano de referência (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Sequências primárias das isoformas.

Isoforma	Nº de Acesso	Sequência FASTA
$\alpha_1$	P05023	<p>MGKGVGRDKYEPAAVSEQGDKKGKKGKKDRDMDELKKEVSMDDHKLSLDELHRKYGTDLS  RGLTSARAAEILARDGPNALTPPPTTPEWIKFCRQLFGGFSMLLWIGAILCFLAYSIQAA  TEEEPQNDNLYLGVVLSAVVIITGCFSYYQEAQSSKIMESFKNMVPPQALVIRNGEKMSI  NAEEVVVGD LVEVKGGDRIPADLR IISANGCKVDNSSLTGESEPOTRSPDFTNENPLETR  NIAFFSTNCVEGTARGIVVYTGDRVTMGRIATLASGLEGGQTPIAAEIEHFIIHITGVAV  FLGVSFFILSLILEYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKN  LEAVETLSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTENQSGVSFDKTSATWLA  LSRIAGLCNRAVFQANQENLPIILKRAVAGDASESALLKCIELCCGSVKEMRERYAKIVEI  PFNSTNKYQLSIHKNPNTSEPQHLLVMKGAPERILDRCSILLHGKEQPLDEELKDAFQN  AYLELGGGLGERVLGFCHLFLPDEQFPEGFQFDTDVNFPIIDNLFCVGLIS MIDPPRAAVP  DAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAGVGI ISEGNETVEDIAARLNI PVSQVNPRDA  KACVVHGS DLKDMTSEQLDDILKYHTEIVFARTSPQQKLI IVEGCQRQGAIVAVTGDGVN  DSPALKKADIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGR LIFDNLKKS IAYTTL  TSNIPEITPFLFI IANIPLPLGTVTILCIDLGTDMVPAISLAYEQAESDIMKRQPRNP  TKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGF LPIHLLGLRVDWDRWINDVED  SYGQWQTYEQRKIVEFTCHTAFFVSI VVVQWADLVICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLFE  ETALAAFLSYCPGMGVALRMYPLKPTWWFCAFPYSLLIFVYDEVRKLI IRRRPPGGWVEKE  TYY</p>
$\alpha_2$	P50993	<p>MGRGAGREYSPAATTAENGGGKKKQKEKELDELKKEVAMDDHKLSLDELGRKYQVDLSKG  LTNQRAQDVLARDGPNALTPPPTTPEWVKFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAAME  DEPSNDNLYLGVVLAAVVITGCFSYYQEAQSSKIMDSFKNMVPPQALVIREGEKMQINA  EEVVVGD LVEVKGGDRVPADLR IISSHGCKVDNSSLTGESEPOTRSP EFTHENPLETRNI  CFFSTNCVEGTARGIVIATGDRVTMGRIATLASGLEVGRTPIAMEIEHFIIQLITGVAVFL  GVSFFVLSLILGYSWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLE  AVETLSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTEDQSGATFDKRSPTWTALS  RIAGLCNRAVFKAGQENISVSKRDTAGDASESALLKCIELSCGSVRKMRDRNPKVAEIPF  NSTNKYQLSIHEREDSPQSHVLVMKGAPERILDRCSITLVQKKEIPLDKEMQDAFQNA  YMEELGGGLGERVLGFCQLNLPSGKFPGRGKFDTDELNFPTEKLCFVGLMSMIDPPRAAVPDA  VAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAGVGI ISEGNETVEDIAARLNI PMSQVNPREAKAC  VVHGS DLKDMTSEQLDEILKNHTEIVFARTSPQQKLI IVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDS  PALKKADIGIAMGISGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGR LIFDNLKKS IAYTTLTS  NIPEITPFLFI IANIPLPLGTVTILCIDLGTDMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNSQTDK  LVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGF LPSRLLGIRLWDWDRMTMNDLSDSYG  QEWTYEQRKVVEFTCHTAFFASIVVVQWADLI ICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLLEETA  LAAFLSYCPGMGVALRMYPLKVTWWFCAFPYSLLIFIYDEVRKLI IRRYPPGGWVEKETYY</p>
$\alpha_3$	P13637	<p>MGDKKDDKDSPKKNKGKERRDLDDLKKEVAMTEHKMSVEEVC RKYNTDCVQGLTHSKAQE  ILARDGPNALTPPPTTPEWVKFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAGTEDDPSGDNL  YLGIVLAAVVIITGCFSYYQEAQSSKIMESFKNMVPPQALVIREGEKMQVNAEEVVVGD  LVEIKGGDRVPADLR IISAHGCKVDNSSLTGESEPOTRSPDC THDNPLETRNITFFSTNCV  EGTARGVVVATGDRVTMGRIATLASGLEVGKTPIAEIEHFIIQLITGVAVFLGVSFFILS  LILGYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLST  STICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTTEDQSGTSFDKSSHTWVALSHIAGLCNR  AVFKGGQDNIPVLKRDVAGDASESALLKCIELSSG SVKLMRERNKKVAEIPFNSTNKYQL  SIHETEDPNDNRYLLVMKGAPERILDRCSITLVQKKEQPLDEEMKEAFQNAYLELGGGLGE  RVLGFCHYYLPEEQFPKGFAFDCDDVNF TTDNLFCVGLMSMIDPPRAAVPDAVGKCRSAG  IKVIMVTGDHPITAKAIAGVGI ISEGNETVEDIAARLNI PVSQVNPRDAKACVIHGTDL  KDF TSEQIDEILQNHTEIVFARTSPQQKLI IVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDS PALKKADI  GVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGR LIFDNLKKS IAYTTLTSNIPEITP  FLFI IANIPLPLGTITILCIDLGTDMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNPRTDKLVNERLI  SMAYGQIGMIQALGGFFSYFVILAENGF LPGNLVGI RNLWDDRTVNDLSDSYGQWQTYE  QRKVVEFTCHTAFFVSI VVVQWADLI ICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSY  CPGMDVALRMYPLKPSWWFCAFPYSFLIFVYDEIRKLI IRRNPPGGWVEKETYY</p>

Tabela 6 – Sequências primárias das isoformas (continuação).

Isoforma	Nº de Acesso	Sequência FASTA
$\alpha_4$		<pre> MGLWGKGTVAPHDQSPRRRPKKGLIKKKMKREKQKRNMEELKKEVVMDDHKLTLEELS TKYSVDLTKGSHHQRAKEILTRGGPNTVTPPPTTPEWVKFCKQLFGGFSLLLWTGAILCF VAYSIQIYFNNEPTKDNLYLSIVLSVVVIVTGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPPQALVI RGGEKMQINVQEVVLGDLVEIKGGDRVPADLRLISAQGCKVDNSSLTGESEPOSRSPDFT HENPLETRNICFFSTNCVEGTARGIVVIATGDSTVMGRIASLTSGLAGVQTPIAAEIEHFI HLITVVAVFLGVTFFALSLLLGYGWLEAII FLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMA RKNCLVKNLEAVETLSTSTICSDKTGTTLTQNRMTVAHMWFDMTVYEADTTEEQTGKFTT KSSDTWFLARIAGLCNRADFKANQEILPIAKRATTGDASESALLKFIEQSYSSVAEMRE KNPKVAEIPFNSTNKYQMSIHLREDSSQTHVLMKMGAPERILEFCSTFLLNGQEYSMNDE MKEAFQONAYLELGGGLGERVLGFCFLNLPSSFSKGFPFNTDEINFPMDNLCFVGLISMIDP PRAAVPDAVSKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAGVGI ISEGTETAEEVAARLKIPIISK VDASAAKAI VVHGAEKDIQSKQLDQILQNHPEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRLGAVVAV TGDGVNDS PALKKADIGIAMGISGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLI FDNLKK SIMYTLTSLNIPEITPFLMFIILGIPPLPLGTITILCIDLGTDMVPAISLAYESAESDIMKR LPRNPKTDNLVNHRLIGMAYGQIGMIQALAGFFTYFVILAENGFRPVDLLGIRLHWEDKY LNDLEDSYGQQWTYEQRKVVEFTCQTAFFVTIVVVQWADLIISKTRRNSLFFQQGMRNKVL IFGILEETLLAAFLSYTPGMDVALRMYPLKITWWLCAIPYSILIFVYDEIRKLLIRQHPD GWVERETYY </pre>

Antes de submeter as sequências aos servidores específicos para identificação de uma proteína homóloga capaz de atuar como molde na construção dos modelos tridimensionais necessários para as simulações de *docking*, foram realizadas as análises necessárias para verificar a existência da sequência do peptídeo sinal.

A sequência do peptídeo sinal – composta por cerca de 15 a 30 aminoácidos – é responsável por sinalizar as proteínas que atuam em regiões celulares distintas daquelas onde foram sintetizadas. Durante ou após a translocação da membrana, essa sequência é reconhecida e clivada por ação de proteases para permitir o pleno funcionamento da proteína – com exceção de algumas proteínas que possuem a sequência do peptídeo sinal localizado internamente e não dependem da clivagem para ativação, mantendo-se assim presente na constituição da proteína mesmo após a exportação. Dessa forma, as sequências do peptídeo sinal, embora estejam codificadas nos genes encarregados, frequentemente não estão presentes na forma ativa da maior parte das proteínas e precisam ser removidas da sequência de aminoácidos que compõem a estrutura primária da proteína analisada (Armenteros *et al.*, 2019; Nielsen *et al.*, 2019).

Para as sequências primárias das quatro isoformas da subunidade em análise, não foi predita nenhuma sequência sinalizadora.

Dessa forma, as sequências primárias foram submetidas sem alteração ao recurso online HHpred/HHsearch para alinhamento das sequências e identificação do molde mais adequado para a modelagem dessas proteínas. A estrutura cristalográfica depositada no PDB sob o código de identificação 3A3Y foi apontada como o homólogo mais próximo para todas as sequências consultadas (Ogawa *et al.*, 2009) .

Essa proteína corresponde à bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase isolada de glândulas retais da espécie *Squalus acanthias* fixada em um estado análogo ao estágio  $\text{E}_2 \cdot 2\text{K}^+ \cdot \text{Pi}$ , cuja afinidade pelos íons  $\text{K}^+$  é acentuada e ainda se observa uma unidade fosfato ligada. A estrutura cristalográfica, apresentando resolução de 2,80 Å, foi obtida por difração de raios-X e o ligante complexado foi inserido no cristal mediante processo de *soaking* em solução tampão contendo ouabaína na concentração de 20 nM (Ogawa *et al.*, 2009).

A estrutura 3A3Y selecionada como molde apresentou 100% de probabilidade, identidade estrutural superior a 75% e similaridade acima de 1,2 quando comparada a todas as quatro diferentes isoformas analisadas (**Tabela 7**).

**Tabela 7 – Parâmetros para avaliação do grau de similaridade entre as sequências das isoformas e do cristal 3A3Y.**

Isoforma	Probabilidade	e-Value	Identidade	Similaridade
$\alpha_1$	100%	$2,2 \times 10^{-121}$	89%	1,395
$\alpha_2$	100%	$4,2 \times 10^{-121}$	86%	1,356
$\alpha_3$	100%	$1,5 \times 10^{-122}$	86%	1,362
$\alpha_4$	100%	$2,4 \times 10^{-117}$	78%	1,241

Proteína Molde: 3A3Y (PDB ID) – Cadeia A (Ogawa *et al.*, 2009)

Organismo: *Squalus acanthias*

Resolução: 2,8 Å

Os GC são capazes de inibir a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em vários estados assumidos por essa proteína durante o ciclo reacional. No entanto, devido ao antagonismo observado entre essas substâncias e o íon  $\text{K}^+$ , a estrutura fixada no estágio em que os sítios de ligação dos íons  $\text{K}^+$  estão ocupados representa, conseqüentemente, um

estágio de baixa afinidade por esses inibidores glicosilados. De acordo com modelos de homologia, a redução da afinidade de ligação ocorre essencialmente em decorrência da proximidade observada entre o sítio de ligação dos íons  $K^+$  e o sítio de ligação dos GC. Dessa forma, o que se observa é uma certa oclusão na abertura da cavidade de ligação dos cardiotônicos ocasionada pela ocupação dos íons  $K^+$  aos seus respectivos sítios de ligação. A maioria das estruturas fixadas no estado de alta afinidade ( $E_2P$ ) pela ouabaína, no entanto, são obtidas por estudos de metagênese e análises comparativas indicaram que o sítio de ligação dessas substâncias é essencialmente o mesmo em ambos os estágios assumidos. Por essa razão, a estrutura cristalográfica selecionada foi considerada adequada para servir de molde para a modelagem das estruturas tridimensionais das isoformas de interesse nesse trabalho (Ogawa *et al.*, 2009; Shinoda *et al.*, 2009).

Uma vez que a qualidade dos modelos construídos depende diretamente da proteína selecionada como molde, além da necessidade de avaliar alguns parâmetros experimentais relacionados à estrutura dessa proteína, também é necessário verificar se existem grandes diferenças conformacionais não explicadas entre os elementos da estrutura secundária da estrutura molde e da estrutura modelada. No geral, quando o grau de identidade é superior a cerca de 30%, os resíduos formados pelas hélices- $\alpha$  e fitas- $\beta$  apresentam um bom alinhamento com os resíduos correspondentes do molde. Além disso, o desvio mínimo da média quadrática das posições atômicas (do inglês, RMSD – *Root Mean Square Deviation*), que determina a medida da distância média entre os átomos na cadeia principal de proteínas sobrepostas, também é dependente do grau de identidade das sequências comparadas. Assim, quanto menor o RMSD, mais adequado é o molde selecionado. Proteínas que apresentam grau de identidade superior a 50%, no geral, apresentam um RMSD inferior a 1,0 Å. Dessa forma, diversos estudos que investigam estatisticamente a influência da identidade estrutural de proteínas determinaram que embora seja possível observar bons alinhamentos quando há baixa identidade estrutural, no geral, proteínas-moldes adequadas apresentam no mínimo 40% de identidade estrutural com relação às proteínas modelos (D'Alfonso *et al.*, 2001; Filho & Alencastro, 2003; Coutias *et al.*, 2004).

Todos os modelos tridimensionais construídos foram então sobrepostos à proteína molde (PDB ID: 3A3Y) com auxílio do software PyMOL e todos os ligantes

relevantes – como a ouabaína, os íons  $K^+$  e  $Mg^{2+}$  e o análogo do fosfato ( $MgF_4^{2-}$ ) – que interferem na afinidade de ligação, também foram incluídos nos modelos de cada uma das isoformas.

As estruturas obtidas após alinhamento e acoplamento com os ligantes de interesse foram então tratadas utilizando o programa Biopolymer implementado no pacote computacional Sybyl-X 2.1.1 para minimização da energia da estrutura terciárias. A minimização de energia auxilia na acomodação mais adequada dos resíduos de aminoácidos no espaço tridimensional, permitindo a determinar o arranjo molecular mais adequado e estável, tornando, portanto, a estrutura química energeticamente mais favorável (Roy *et al.*, 2015).

Em seguida, os modelos refinados obtidos foram avaliados por ferramentas de diagnóstico de modelos de proteínas de alta confiança capazes de relevar regiões problemáticas e errôneas de uma estrutura tridimensional que podem inferir na adequação dos modelos construídos.

Os gráficos de Ramachandran, gerados utilizando o programa MolProbity, são construídos com base na verificação dos parâmetros estereoquímicos dos modelos, como os ângulos diédricos ( $\phi$  e  $\psi$ ), estão dentro de limites aceitáveis. Com essa análise é possível identificar as regiões da proteína que precisam ser reavaliadas ou refinadas, dependendo do modo de obtenção da estrutura. Os gráficos obtidos após a análise dos modelos (Apêndice C) demonstraram que todos as estruturas obtidas por modelagem possuem mais de 90% de resíduos nas regiões mais favorecidas, o que pressupõem qualidade adequada aos modelos (Davis *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2018).

Outro recurso utilizado foi o Verify3D, capaz de determinar a compatibilidade de uma estrutura tridimensional (3D) com a sua respectiva sequência primária (1D) por aplicação de matrizes de pontuação e posterior comparação dos resultados com outras estruturas de boa qualidade disponíveis em banco. Um modelo é considerado adequado segundo o recurso Verify3D se pelo menos 80% dos aminoácidos apresentarem uma pontuação  $\geq 0,2$  no perfil gerado pela relação 3D/1D. Aproximadamente 83,52% dos resíduos na isoforma  $\alpha_1$ , 82,19% dos resíduos na isoforma  $\alpha_2$ , 81,72% dos resíduos na isoforma  $\alpha_3$  e 80,30% dos resíduos da isoforma

$\alpha_4$  apresentaram pontuação adequada para a relação 3D/1D, sendo todas as estruturas 3D, portanto, consideradas modelos de boa qualidade (Bowie *et al.*, 1991; Lüthy *et al.*, 1992).

O recurso ERRAT analisa as interações entre átomos não-covalentemente ligados presentes na estrutura e promove uma análise estatística por comparação com outras estruturas confiáveis de alta resolução para calcular a função de erro. O Fator de Qualidade Global (FQG) expressa o percentual de regiões da proteína na qual o erro calculado está abaixo do limite de rejeição de 95%, que corresponde às regiões da estrutura proteica que podem ser rejeitadas com um nível de confiança de 95% em razão do elevado erro associado. Uma estrutura proteica é considerada de alta qualidade se não mais do que 5% das regiões da estrutura puderem ser rejeitadas com um nível de confiança de 95%. Proteínas apresentando uma resolução em torno de 2,5 a 3,0 Å apresentam um FQG próximo de 91%. O fator de qualidade global ERRAT para as estruturas correspondentes foi de 88,1633 para  $\alpha_1$ , 86,4147 para  $\alpha_2$ , 87,7676 para  $\alpha_3$  e 87,7175 para  $\alpha_4$  (Colovos & Yeates, 1993).

Os modelos também foram avaliados pela ferramenta ProSA Web para uma verificação complementar dos potenciais erros associados às estruturas tridimensionais obtidas para cada uma das quatro diferentes isoformas. A análise dos modelos por esse avaliador permite determinar duas características relacionadas à energia das estruturas: o Z-Score e a Qualidade do Modelo Local. A primeira delas indica a qualidade geral do modelo e mede o desvio da energia total da estrutura em relação a uma distribuição de energia derivada de outras conformações aleatórias. Estruturas consideradas errôneas apresentam um valor de Z-Score fora do intervalo tipicamente observado para proteínas nativas de tamanho semelhante. Já os gráficos de energia referentes a Qualidade do Modelo Local traçam as energias como uma função das posições das sequências de aminoácidos. No geral, as regiões errôneas ou problemáticas dos modelos apresentam valores positivos no gráfico. O Z-Score calculado para cada um dos modelos construídos foi de - 11,25 ( $\alpha_1$ ), - 11,26 ( $\alpha_2$ ), - 11,44 ( $\alpha_3$ ) e - 10,57 ( $\alpha_4$ ), valores que estão contemplados dentro do intervalo de Z-Score tipicamente observado para conformações nativas semelhantes (**Figura C. 9** – Apêndice C). Além disso, os gráficos de energia correspondentes (**Figura C. 10** – Apêndice C) também demonstraram que a maior parte dos resíduos apresentam energia amplamente negativa, com algumas exceções, representadas pelos picos na

região positiva do gráfico. Suponha-se que esses picos correspondam às regiões da proteína que abrangem a membrana plasmática. Considerando que as funções de energia utilizadas para os cálculos via ProSA são derivadas principalmente de proteínas globulares solúveis, algumas incompatibilidades podem ser observadas na análise de proteínas contendo domínios que abrangem a membrana das células (Sippl, 1993; Wiederstein & Sippl, 2007).

O consenso dos resultados obtidos com a aplicação dessas ferramentas de validação sugere que a qualidade geral desses modelos é adequada e que os modelos construídos são aceitáveis para a execução do estudo de ancoragem molecular proposto neste trabalho. Os resultados das análises realizadas nos servidores online MolProbity, SAVES v6.0 e ProSA-Web estão expostos em detalhes nas figuras **C. 1 – C. 10** no apêndice C e resumidos na **Tabela 8**.

**Tabela 8 – Resultado da avaliação dos modelos construídos utilizando os servidores MolProbity, SAVES e ProSA-Web.**

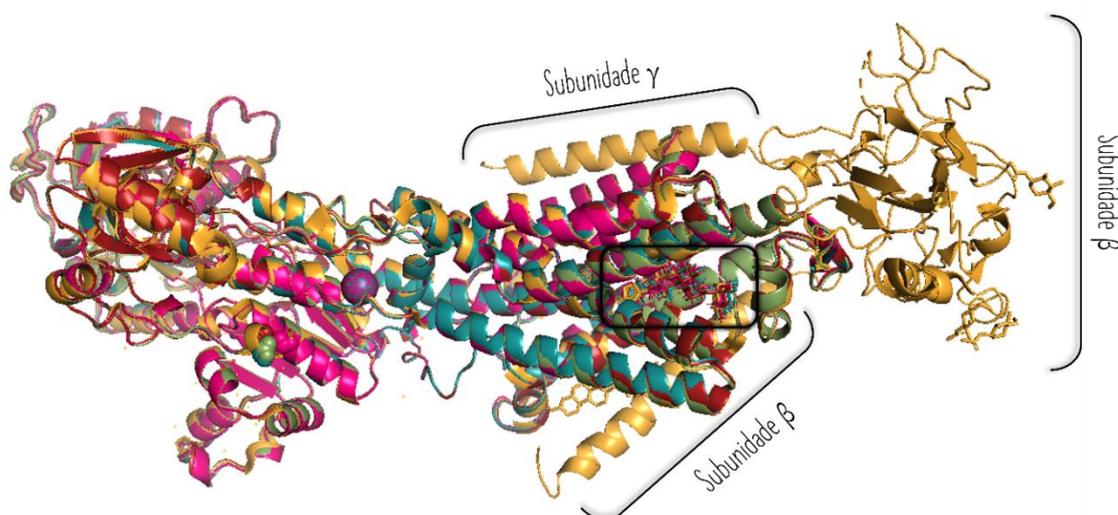
<b>Estrutura</b>						
<b>Servidor</b>	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_4$	3A3Y	
<b>MolProbity</b>	RAMACHANDRAN PLOT					
	Resíduos em região favorável (%)	93,5%	92,6%	93,5%	93,8%	91,1%
	Resíduos em região permitida (%)	99,2%	99,4%	99,6%	99,2%	99,0%
	Resíduos em região proibida (%)	0,8%	0,6%	0,4%	0,8%	1,0%
<b>SAVES</b>	VERIFY 3D					
		83,5%	82,2%	81,7%	80,3%	84,6%
	ERRAT					
	88,16	86,41	87,77	87,72	89,42	

**Tabela 8 – Resultado da avaliação dos modelos construídos utilizando os servidores MolProbity, SAVES e ProSA-Web (continuação).**

Servidor	Estrutura				
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_4$	3A3Y
ProSA-Web	Z-SCORE				
	- 11,25	- 11,26	- 11,44	- 10,57	- 10,80

Para avaliar a similaridade estrutural entre os modelos construídos após refinamento, as estruturas foram sobrepostas utilizando o programa PyMOL (**Figura 46**).

**Figura 45 – Sobreposição dos modelos construídos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ) e do molde selecionado (3A3Y).**



**Legenda:** isoforma  $\alpha_1$  (azul), isoforma  $\alpha_2$  (verde), isoforma  $\alpha_3$  (rosa), isoforma  $\alpha_4$  (vermelho) e molde 3A3Y (amarelo). Em evidência no retângulo preto o sítio de ligação dos GC.

A comparação realizada entre as sequências de aminoácidos das quatro diferentes isoformas demonstrou que as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  apresentam o maior grau de similaridade conformacional, com um valor de RMSD de 0,296 Å (**Tabela 9**). A isoforma  $\alpha_4$ , como esperado, apresenta a estrutura tridimensional que mais se difere

das demais, com valores de RMSD de 0,310, 0,386 e 0,441 Å em relação as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , respectivamente.

**Tabela 9 – Valores de RMSD (Å) referentes à comparação entre as diferentes isoformas modeladas.**

<b>Isoforma</b>	<b><math>\alpha_1</math></b>	<b><math>\alpha_2</math></b>	<b><math>\alpha_3</math></b>	<b><math>\alpha_4</math></b>	<b>3A3Y</b>
<b><math>\alpha_1</math></b>	–	0,348	<b>0,296</b>	0,310	0,298
<b><math>\alpha_2</math></b>	0,348	–	0,381	0,386	0,355
<b><math>\alpha_3</math></b>	<b>0,296</b>	0,381	–	0,441	0,351
<b><math>\alpha_4</math></b>	0,310	0,386	0,441	–	0,380
<b>3A3Y</b>	0,298	0,355	0,351	0,380	–

Considerando, no entanto, a extensa sequência de aminoácidos que compõem essas estruturas – mais de 1.000 resíduos – esses resultados ainda assim denotam uma expressiva similaridade entre essas isoformas e corrobora a elevada similaridade com o homólogo mais próximo encontrado. A isoforma  $\alpha_2$ , por outro lado, apresenta similaridade estrutural semelhante com todas as demais isoformas. Todas essas observações estão em consonância com os padrões de semelhança constatados por Blanco e colaboradores (2005).

As diferentes isoformas da subunidade alfa apresentam um elevado grau de conservação entre diferentes espécies, compartilhando uma similaridade de cerca de 90% em suas sequências de aminoácidos. Essa constatação corrobora os percentuais observados para o grau de identidade quando as diferentes isoformas expressas em humanos foram comparadas à estrutura homóloga – utilizada como molde – extraída de glândulas de uma espécie de tubarão. Em contraste, na comparação entre isoformas expressas por uma mesma espécie, observa-se um grau de homologia menor entre as isoformas da subunidade alfa, sendo de aproximadamente 87% entre as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , ao passo que a isoforma  $\alpha_4$  compartilha apenas de 76% a 78% de identidade com as demais isoformas (Blanco, 2005).

As três regiões que apresentam maior probabilidade de variabilidade estrutural entre as isoformas correspondem a: (1) a porção N-terminal que compõem o domínio A, (2) uma região específica na principal alça formada entre os domínios TM4 e TM5, e (3) a porção da alça extracelular formada entre os domínios TM1 e TM2, que faz parte da composição do sítio de ligação dos GC (Blanco, 2005).

Dessa forma, mesmo pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos das diferentes isoformas são capazes de promover alterações perceptíveis na interação das isoenzimas da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com GC e alterar consideravelmente a capacidade de inibição dessas substâncias.

A título de exemplo, a sensibilidade de roedores a ação dos GC varia expressivamente entre as isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . Uma dupla mutação genética na sequência que codifica o sítio de ligação na isoforma  $\alpha_1$  desses animais resulta em uma sensibilidade diminuída aos GC em cerca de 1.000 vezes, quando comparado a mesma variante em humanos. Essa resistência, decorrente de adaptações evolutivas, também é observada em algumas espécies de insetos que se alimentam de folhas de espécies vegetais produtoras desses metabólitos secundários, como no caso das lagartas da espécie *Danaus plexippus* e de duas espécies de besouros, a *Chrysococus auratus* e a *C. cobaltinus* (Mijatovic *et al.*, 2007).

Alguns estudos também apontam que todas as isoformas da subunidade alfa expressas em humanos são sensíveis a ouabaína – um dos mais conhecidos representantes dos derivados cardiotônicos. No entanto, o que se observa é uma diferença nas taxas de associação/dissociação que essas variantes apresentam em relação à essa substância. A ouabaína se liga com muito menos afinidade à isoforma  $\alpha_2$  quando comparado a afinidade de ligação às isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ . Essa diferença de afinidade pode ser evidenciada pelas taxas de dissociação correspondentes: as ligações estabelecidas entre esse glicosídeo e as isoenzimas formadas com  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  apresentam uma meia-vida que varia de 30 a 80 minutos, enquanto com aquelas formadas com a isoforma  $\alpha_2$  esse tempo é significativamente menor, por volta de 4 a 5 minutos (Crambert *et al.*, 2000; Mijatovic *et al.*, 2007).

Além disso, já está bem consolidado na literatura que as diferentes isoenzimas se caracterizam por apresentarem propriedades enzimáticas específicas e um padrão

de expressão que depende do tipo de célula, do estágio de desenvolvimento do organismo e de estimulação hormonal. As evidências apontam, que no caso das células tumorais, a sensibilidade alterada à ação dos GC pode ser tanto um reflexo do aumento da densidade de inserção dessa proteína na membrana plasmática, bem como devido as diferenças na proporção das diferentes isoformas na composição das isoenzimas (Mijatovic *et al.*, 2012).

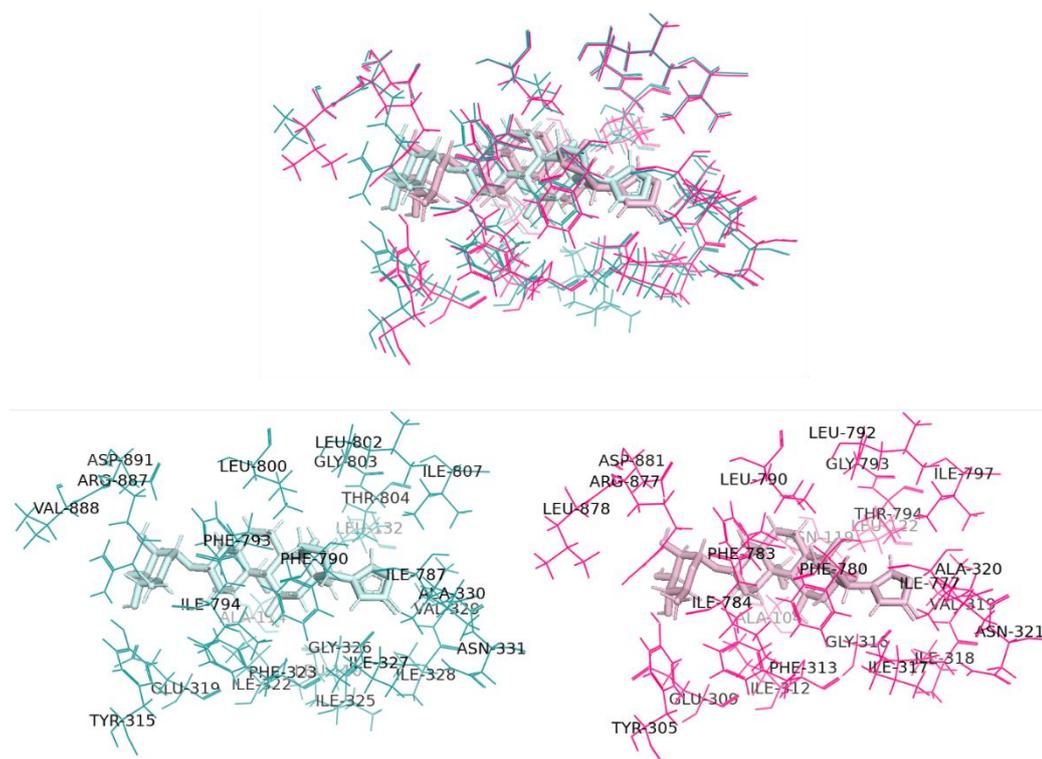
Durante o desenvolvimento de um método para determinação da eficácia do tratamento do câncer com GC (US0317541), os pesquisadores envolvidos constataram que uma resposta eficiente à ação dessas substâncias depende da proporção com que as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  estão presentes na constituição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase expressa em células cancerosas. No geral, a taxa de expressão da isoforma  $\alpha_1$  é significativamente maior nas células neoplásicas nos estágios iniciais da tumorigênese. Nos estágios mais avançados, em contraste, a expressão dessa isoforma é significativamente menor em favor de uma elevação na expressão da isoforma  $\alpha_3$ . Assim, os autores sugerem que as amostras coletadas por biópsia sejam analisadas em ensaios imuno-histoquímicos e de *western-blot* para determinação prévia dessa proporção e avaliação da possível capacidade de resposta à terapia com GC (Albuquerque *et al.*, 2017; Mijatovic *et al.*, 2012).

Por essa razão, considerando todas essas fortes evidências acerca da maior contribuição das isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  em células cancerosas, a determinação da afinidade e da capacidade de inibição dos GC para essas duas isoformas pode ser especialmente interessante para otimizar o processo de tomada de decisão da melhor terapia a ser empregada no tratamento do câncer. Sendo assim, para realização dos ensaios de *docking* propostos nesse trabalho, foram considerados apenas os modelos construídos para as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ .

Com os modelos sobrepostos, foi possível realizar uma análise visual dos resíduos que compõem a cavidade de interação dos GC, sendo evidenciado que as estruturas de ambas as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  apresentam uma similaridade quanto aos resíduos presentes que estão dispostos a uma distância de até 5,0 Å em relação ao ligante (ouabaína) inserido aos modelos, mas diferem ligeiramente quanto a posição relativa desses resíduos (**Figura 47**).

Na interação da ouabaína com cada uma dessas isoformas, o anel lactônico se encontra localizado próximo aos resíduos de Ile-327 e Ala-330 ( $\alpha_1$ ) e Ile-317 e Ala-320 ( $\alpha_3$ ); a face hidrofóbica do núcleo esteroidal se acomoda à cavidade interagindo com um *cluster* formado pelos resíduos Phe-323 e Phe-790 ( $\alpha_1$ ) e Phe-313 e Phe-780 ( $\alpha_3$ ), ao passo que a hidroxila em C-14 $\beta$  presente na face hidrofílica do núcleo esteroidal interage com o resíduo Thr-804 ( $\alpha_1$ ) e Thr-794 ( $\alpha_3$ ). Na interação com a isoforma  $\alpha_3$ , as hidroxilas em C-11 $\beta$  e C-19 $\beta$  também parecem estabelecer interações com os resíduos Ile-312 e Asn-119, respectivamente.

**Figura 46- Principais resíduos que compõem a cavidade de ligação dos GC nas isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ .**



**Legenda:** Leu-110, Ala-114, Leu-132, Tyr-315, Glu-319, Ile-322, Phe-323, Ile-325, Gly-326, Ile-327, Ile-328, Val-329, Ala-330, Asn-331, Ile-787, Phe-790, Phe-793, Ile-794, Leu-800, Leu-802, Gly-803, Thr-804, Ile-807, Arg-887, Val-888 e Asp-891 (**ISOFORMA  $\alpha_1$** ).

Ala-104, Asn-119, Leu-122, Tyr-305, Glu-309, Ile-312, Phe-313, Gly-316, Ile-317, Ile-318, Val-319, Ala-320, Asn-321, Gly-326, Ile-777, Phe-780, Phe-783, Ile-784, Leu-790, Leu-792, Gly-793, Thr-794, Ile-797, Asp-881 e Leu-878 (**ISOFORMA  $\alpha_3$** ).

Asn-129, Glu-319, Ile-322, Phe-323, Gly-326, Ile-327, Ile-328, Ala-330, Val-329, Asn-331, Tyr-315, Phe-790, Phe-793, Leu-800, Leu-802, Gly-803, Ile-807, Arg-887, Asp-891, Thr-804 (**3A3Y**).

## 6.2.2 Simulações de Ancoragem Molecular (*Molecular Docking*)

As simulações de ancoragem molecular têm por objetivo prever o modo e a afinidade de ligação de diferentes ligantes nas cavidades presentes nas biomoléculas receptoras. Um método de análise eficiente do modo de encaixe apropriado geralmente consiste em duas etapas principais: o estágio de amostragem e o estágio de pontuação. Ambas as etapas são complexas e apresentam consideráveis limitações (Yan & Zou, 2017).

Dessa forma, para a realização das simulações de *docking*, além da adequada seleção da estrutura tridimensional da biomolécula receptora e da qualidade das estruturas dos ligantes analisados, a escolha do programa também é uma etapa crucial para o sucesso das análises, visto que a definição do programa também implica na definição do modo de acoplamento que será executado, na definição do algoritmo de busca e da função de pontuação que serão utilizados para identificação dos ligantes mais promissores.

O conjunto constituído pelos 57 derivados selecionados – incluindo os dez novos derivados propostos – foi submetido às simulações frente aos modelos construídos para as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  (Apêndice A).

As simulações foram realizadas em quatro diferentes programas de simulações de ancoragem: Sybyl-X Suite 2.1.1, Gold 5.1, OEDocking 4.0 e Glide 7.7.

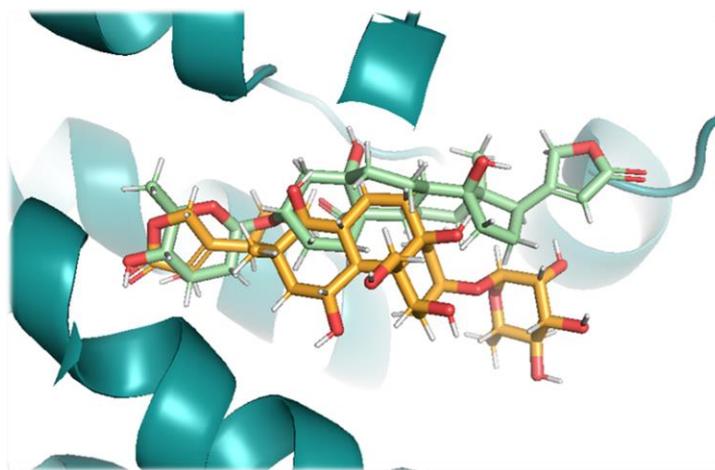
Nos protocolos definidos nesse trabalho usando os programas Sybyl-X, Gold e OEDocking, as estruturas das isoformas foram consideradas como uma estrutura rígida, enquanto o ligante foi considerado como uma estrutura flexível, possuindo vários graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional.

O primeiro programa testado foi o Sybyl-X 2.1.1 (Tripos Associates, Inc., St. Louis, MO, USA) sob o modo Surfex-Dock Geom (SFXC), que combina um método de ancoramento incremental (algoritmo de Hammerhead) com um algoritmo de busca por similaridade morfológica para a geração das poses putativas dos ligantes (Jain, 2003, Spitzer & Jain, 2012).

A cavidade de ligação (*protomol*) foi definida tomando como base a posição do ligante cristalográfico (ouabaína) e todos os demais parâmetros foram mantidos sem alteração.

Cada uma das soluções geradas foi sobreposta ao ligante cristalográfico para avaliação do posicionamento dos ligantes dentro da cavidade de ligação. No entanto, nenhum dos ligantes propostos se superpôs adequadamente ao ligante cristalográfico (ouabaína). Em todos os casos, poses irracionais foram obtidas, sendo observado uma inversão na posição de encaixe das moléculas (**Figura 48**). Ao contrário do que era esperado, a cadeia lateral em C-3 dos derivados selecionados foi predita para interagir na região mais interna da cavidade, enquanto o anel lactônico em C-17 foi posicionado na região próxima a abertura do sítio.

**Figura 47 – Sobreposição da conformação de menor energia de C-17 ao ligante cristalográfico na cavidade de ligação da isoforma  $\alpha_1$ .**



**Legenda:** ligante cristalográfico (amarelo), ouabaína (verde).

Em virtude desses resultados irracionais, optou-se por prosseguir com as simulações empregando outro recurso computacional. Assim, o segundo programa de ancoragem considerado foi o Gold 5.1 (Cambridge Crystallographic Data Center: Cambridge, UK), que opera sob aplicação de um algoritmo genético para explorar toda a flexibilidade conformacional dos ligantes e a flexibilidade parcial da biomolécula receptora. Além da função de pontuação ChemPLP – função padrão da versão empregada, – as simulações também foram executadas empregando-se outras funções disponíveis: GoldScore, ChemScore e ASP (*Astex Statistical Potential*). (Jones *et al.*, 1997; Verdonk *et al.*, 2003).

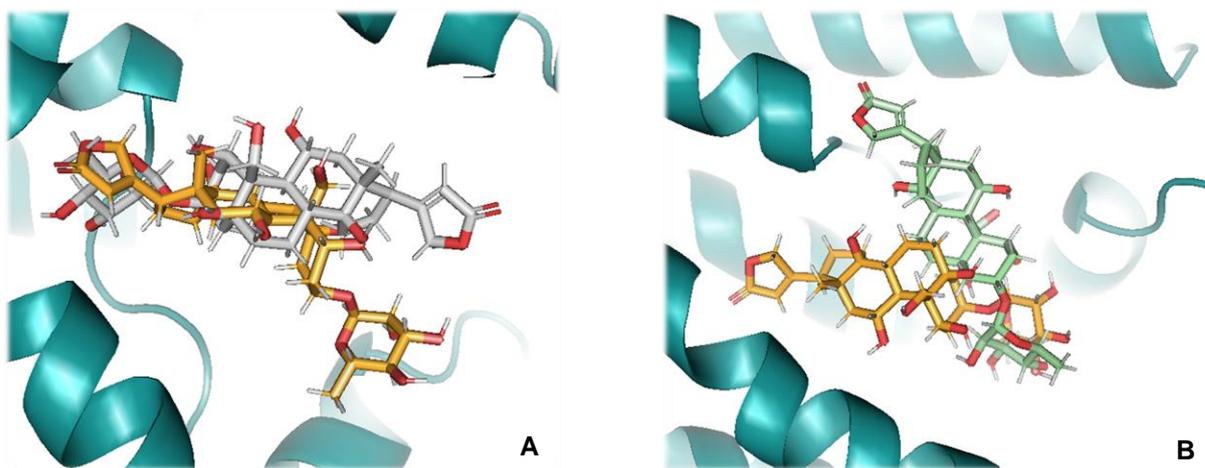
Para avaliar se os parâmetros adotados seriam adequados para o propósito das análises realizadas, um estudo de *redocking* foi inicialmente realizado. Para isso,

a ouabaína foi submetida aos mesmos procedimentos de preparo dos derivados selecionados e posteriormente foi submetida às simulações de ancoragem com o modelo construído e otimizado referente a isoforma  $\alpha_1$ . Foram desenvolvidas 100 corridas de busca e a eficiência máxima foi ajustada para 200%. Em todos os demais parâmetros foram mantidos os valores padrão.

As soluções obtidas foram agrupadas em *clusters* de acordo com RMSD calculado em relação à solução mais estável em cada conjunto. Foi estipulado um RMSD máximo de 1,5 Å por *cluster*. Foram obtidos ao todo 28 *clusters* e o *cluster* mais populoso era composto por 15 conformações previstas para a ouabaína.

Para a análise dos resultados do experimento, as soluções de menor energia presentes no *cluster* mais populoso (A) e segundo *cluster* mais populoso (B) foram então sobrepostas à estrutura do ligante cristalográfico para verificar se houve reprodutibilidade de posicionamento (**Figura 49**).

**Figura 48 – Sobreposição das conformações de menor energia da ouabaína ao ligante cristalográfico na cavidade de ligação da isoformas  $\alpha_1$ .**



**Legenda:** (A) solução de menor energia observado para o cluster mais populoso; (B) solução de menor energia para o segundo cluster mais populoso. A estrutura do ligante cristalográfico foi representando em amarelo.

O representante do *cluster* A não apresentou posicionamento compatível com a conformação observada para ligante cristalográfico. Como no experimento realizado anteriormente no modo Surflex-Dock, a cadeia lateral em C-3 e o anel lactônico em C-17 $\beta$  interagiram com os resíduos em regiões contrárias ao que era esperado. Para o representante do *cluster* B também não foi observado uma superposição adequada

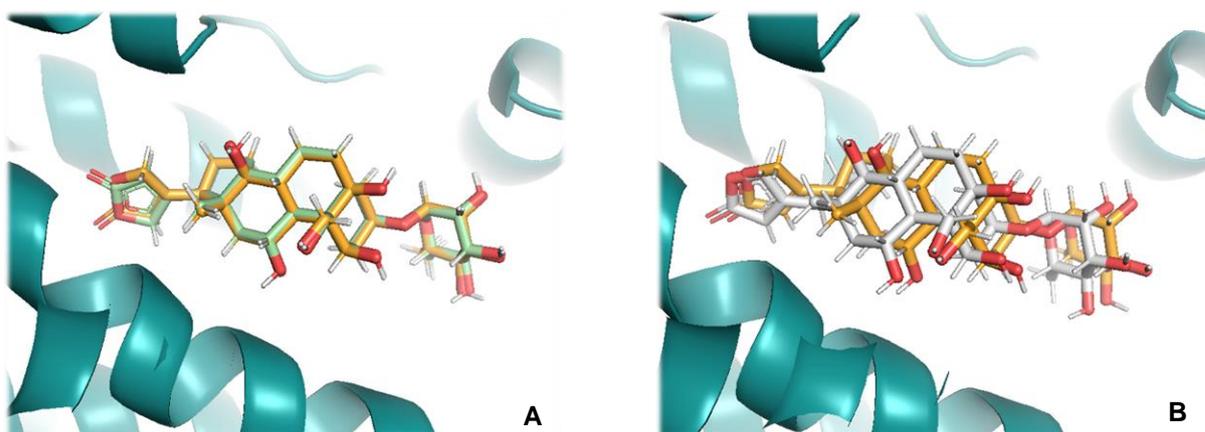
com o ligante cristalográfico. Embora os grupos em C-3 $\beta$  e C-17 $\beta$  tenham adotado uma posição esperada um em relação ao outro, o anel lactônico assumiu uma posição inversa em relação à posição observada no ligante cristalográfico.

O terceiro programa de simulações testado foi o OEDocking 4.0 (OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM). O recurso Posit, implementado no programa, emprega um algoritmo de busca baseado na complementariedade de forma, uma abordagem que representa uma extensão dos algoritmos de alinhamento de ligantes que são utilizados nos filtros de triagem virtual baseados em *shape* (do inglês, formato molecular) e que opera mediante a premissa de que moléculas que apresentam um formato similar, talvez possam também apresentar propriedades similares (Erickson *et al.*, 2004; Kelley *et al.*, 2015).

Assim como na simulação anterior, um estudo de *redocking* foi previamente conduzido para avaliar se os parâmetros adotados estavam de acordo com a proposta do trabalho. As cavidades de ligação nas isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  foram determinadas pelo recurso Make Receptor 3.3.0.3 e as conformações de amostragem foram geradas utilizando o programa OMEGA 2.5.1.4 (OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM), uma ferramenta que também está implementada na plataforma (Hawkins *et al.*, 2010).

Na comparação entre a conformação do ligante cristalográfico e a conformação que recebeu a melhor pontuação após o experimento de ancoragem, observou-se uma adequada superposição dos ligantes dentro da cavidade de ligação (**Figura 50**). Como as estruturas se posicionaram quase exatamente no mesmo local, as principais interações observadas na formação do complexo foram mantidas. Essa adequada superposição também sugere que os parâmetros utilizados para os cálculos estão devidamente ajustados para avaliação dos derivados selecionados.

**Figura 49 – Sobreposição da conformação de menor energia da ouabaína ao ligante cristalográfico inserido no modelo construído para  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ .**



**Legenda:** (A) sobreposição na cavidade de ligação na isoforma  $\alpha_1$  (B) sobreposição na cavidade de ligação na isoforma  $\alpha_3$ ; o ligante do cristalográfico foi representado em amarelo e as conformações de menor energia previstas para a ouabaína em verde (A) e branco (B).

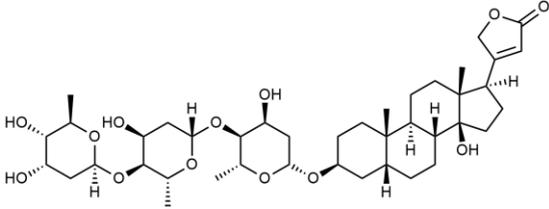
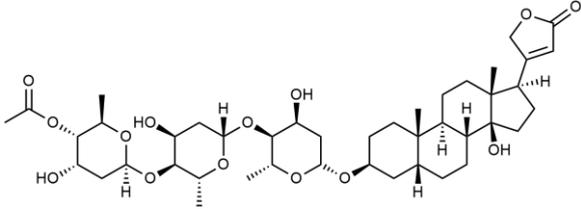
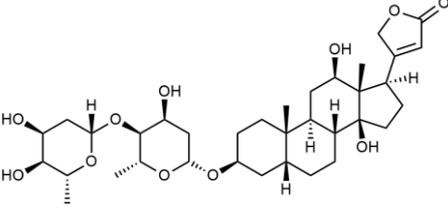
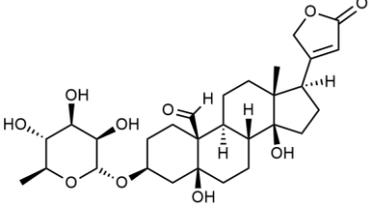
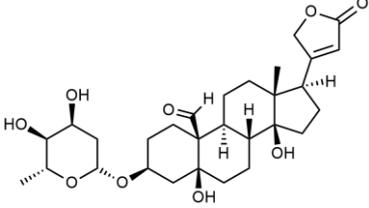
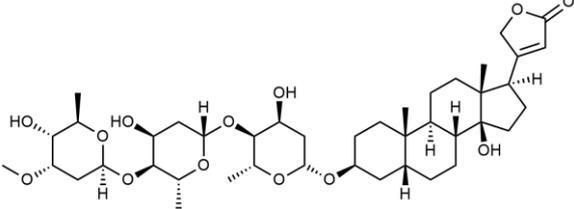
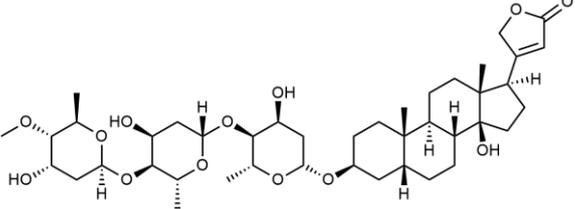
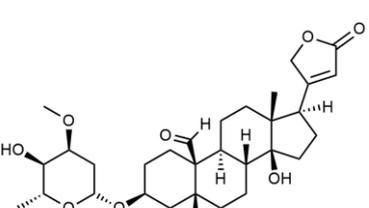
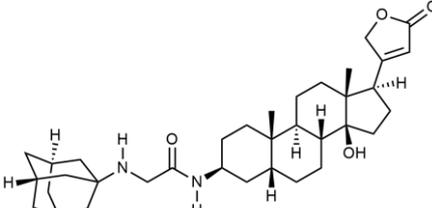
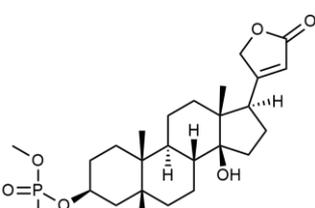
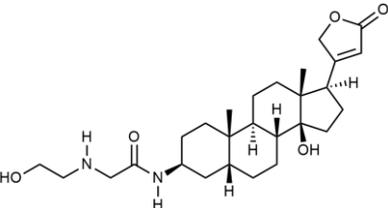
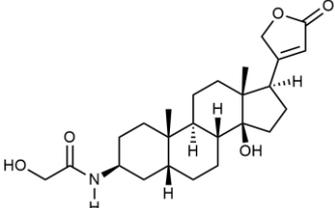
Diante desse resultado, os potenciais inibidores propostos nesse trabalho foram submetidos ao estudo de ancoragem com os modelos construídos para as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ . Para fins práticos e de avaliação dos resultados, as substâncias que compõem o conjunto de dados em análise foram inicialmente classificadas em duas categorias (ativas ou inativas) tomando como base as atividades anti-herpética e citotóxica previamente determinadas nos experimentos *in vitro* (Bertol *et al.*, 2011; Carvalho, 2012; Ramos, 2018; Boff *et al.*, 2019).

Assim, dentre as 31 substâncias que tiveram ambas as atividades determinadas previamente, 15 foram classificadas como ativas segundo os critérios pré-estabelecidos anteriormente (**Tabela 10**).

**Tabela 10 – Estrutura das moléculas selecionadas como “ativas”.**

C-02	C-03	C-04

Tabela 10 – Estrutura das moléculas selecionadas como “ativas” (continuação).

C-05	C-06	
		
C-09	C-16	C-17
		
C-14	C-15	
		
C-18	C-42	C-45
		
C-76	C-77	
		

Todas as 18 substâncias preditas como as de maior possibilidade de interagir de maneira favorável com a cavidade de ligação na estrutura da isoforma  $\alpha_1$  apresentaram reprodutibilidade de posicionamento dos grupos quando comparadas ao ligante cristalográfico (Apêndice C).

No entanto, entre essas soluções preditas apenas três das substâncias consideradas ativas (C-02, C-45 e C-77) foram selecionadas, o que representa uma assertividade de apenas 18,8%. Outras seis substâncias consideradas ativas (C-03, C-04, C-09, C-16, C-17 e C-18) foram apontadas como moléculas que embora tenham sido ancoradas no sítio de ligação, sofreram penalidades por questões de impedimento estérico. As diferenças estruturais mais significativas entre essas moléculas ativas preditas com ancoramento satisfatório e inadequado estão centradas no número de açúcares que compõem a cadeia osídica e o grau de oxidação na posição C-19. Tanto C-16, quanto C-17 e C-18 apresentam uma única molécula de açúcar ligada na posição C-3 do núcleo esteroidal (assim como C-02, C-45 e C-77), mas possuem um grupo aldeído na posição C-19. Alguns estudos que investigam a relação entre as características estruturais e a atividade, no entanto, têm demonstrado um efeito prejudicial de grupos polares substituindo as posições C-1 e C-19, em virtude do posicionamento em regiões hidrofóbicas do núcleo esteroidal (Paula *et al.*, 2005).

Dessa forma, era esperado que essas moléculas pudessem assumir conformações que visassem minimizar essa repulsão e acabassem se posicionando dentro da cavidade além das regiões delimitadas pela caixa. Suposição parecida também foi proposta para explicar a colisão das moléculas contendo dois ou mais resíduos de açúcar na cadeia lateral em C-3. Por essas razões, um ajuste na extensão da caixa definida para essa isoforma foi realizado, ampliando o volume de 7.000 Å para 12.000 Å e as simulações de ancoragem foram novamente executadas. Nenhuma alteração, no entanto, foi observada nos resultados obtidos.

Para as soluções preditas para as simulações processadas com o modelo construído para a isoforma  $\alpha_3$ , dentre as 14 substâncias selecionadas, além das três identificadas nas simulações com a isoforma  $\alpha_1$  (C-02, C-45 e C-77), uma outra substância (C-76) – que tem despertado a atenção dos nossos colaboradores pela potente atividade anti-herpética e citotóxica – também foi selecionada. Ainda assim, a baixa assertividade das simulações (28,6%) sugere que o poder preditivo do conjunto

de parâmetros definidos não foi adequado para a identificação fidedigna das moléculas com maior potencial de inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

Além das supracitadas limitações recorrentes para os algoritmos de amostragem e as funções de pontuação, alguns outros fatores também são determinantes para o desempenho dos estudos computacionais de ancoragem molecular.

Os desenvolvedores da maioria dos recursos computacionais testam e validam os parâmetros envolvidos nas predições executando testes com conjuntos de moléculas que podem estar fora do domínio de aplicabilidade requerido para a simulações dos usuários. Já é bem compreendido que o número de ligações rotacionáveis determina o grau de flexibilidade dos ligantes e tem mostrado exercer influência crítica no desempenho dos algoritmos de amostragem. Quanto maior o número de ligações rotacionáveis na estrutura molecular, menores são as taxas de sucesso na previsão corretas das *poses*. Em uma análise incluindo 1790 fármacos aprovados pelo FDA, mais de 90% possuíam não mais do que 10 ligações rotacionáveis, o que sugere que os candidatos mais promissores à fármaco são moléculas menos flexíveis. Por essa razão, frequentemente o desempenho dos programas de *docking* é determinado considerando moléculas contendo em torno de 20 ligações rotacionáveis. Dessa forma, no geral, as simulações envolvendo ligantes com maior massa molecular e mais ligações rotacionáveis – como aqueles que mimetizam peptídeos e os heterosídeos – apresentam menos chance de sucesso. Além disso, funções cuja entropia é considerada tendem a atribuir menos pontuação para moléculas mais flexíveis do que para moléculas rígidas, prejudicando a confiabilidade dos resultados (Kitchen *et al.*, 2004; Ekins *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016).

Os resíduos de açúcares que compõem as cadeias osídicas dos heterosídeos representam um espaço químico altamente complexo em virtude das centenas unidades monoméricas encontradas na natureza. Além de possuírem diferentes configurações e assumirem variadas conformações, esses monômeros também podem ser organizados em cadeias, unindo-se por ligações glicosídicas, resultando em carboidratos ainda mais complexos, como os oligossacarídeos e os polissacarídeos. No entanto, em contraste a essa extensa diversidade de

possibilidades estruturais, uma deficiência na representatividade dos carboidratos nos principais repositórios de estruturas 3D de biomacromoléculas tem sido observada. Apenas 9,4% de todas as estruturas depositadas compreendem biomoléculas receptoras glicosiladas ou complexadas com ligantes glicosilados. Dessas, menos de 40% apresentam resolução superior a 2,0 Å (Meirelles *et al.*, 2020).

Os estudos de ancoragem com os GC ainda apresentam mais um obstáculo a ser superado: a cadeia lateral osídica da maioria dos glicosídeos naturais é caracterizada pela presença de um a quatro resíduos de hexoses, incluindo alguns açúcares raros na natureza, como D-fucose, D-digitoxose, D-quinovose e D-digitalose (Kreis *et al.*, 1998; Kreis, 2017).

Na análise da ocorrência de cada monossacarídeo nas entradas do PBD, por exemplo, um dos mais abundantemente observados foi a D-glicose. No entanto, a D-xilose, um monossacarídeo amplamente encontrado na natureza, e o sexto resíduo mais abundante nas entradas do PBD, foi identificado em apenas 1,1% do total de todas as estruturas glicosiladas depositadas. Ademais, 63,1% de todas as informações estruturais coletadas são referentes aos monossacarídeos isolados. Quanto maior a quantidade de unidade monoméricas inseridas na cadeia osídica, menor a representatividade observada. Carboidratos complexos representam apenas 11% do total observado (Meirelles *et al.*, 2020).

Essas limitações impactam na elucidação do espaço conformacional representado por essas moléculas, o que acaba por afetar a parametrização dos campos de força, a modelagem e o desenvolvimento das técnicas de ancoragem.

Outro aspecto importante a ser considerado é que sempre que mudanças conformacionais estão envolvidas durante o mecanismo de ação dos ligantes analisados, as abordagens de ancoragem que mantêm a biomolécula receptora como uma espécie rígida, apresentam, conseqüentemente, uma limitação no seu potencial preditivo. Permitir, no entanto, que as estruturas do ligante e da biomacromolécula receptora se reorganizem para resultar em previsões mais robustas e precisas é, do ponto de vista computacional, substancialmente mais desafiador em virtude do aumento nos graus de liberdade associados (Kitchen *et al.*, 2004; Yan & Zou, 2017).

Em teoria, a correta estrutura do complexo gerado pela interação entre ligante e biomacromolécula receptora pode ser determinada por simulações de dinâmica

molecular. No entanto, a formação dos complexos muitas vezes se configura como um processo lento, demandando rearranjos nas cadeias laterais e principal e que geralmente são impraticáveis em triagens envolvendo muitas moléculas. Em virtude desse obstáculo, diversas abordagens têm sido desenvolvidas na tentativa de explorar a flexibilidade da biomolécula receptora de forma mais pontual nas regiões envolvidas na interação com o ligante (Carlson, 2002; Sherman *et al.*, 2006).

Considerando essas informações, foi então proposto explorar os graus de liberdade das cadeias laterais das isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$  por meio de uma metodologia de ajuste induzido (do inglês, *induced-fit*).

Embora a amostragem dos graus de liberdade dos ligantes e da biomolécula receptora possam ocorrer de forma simultânea, em métodos de ajuste induzido que envolvem principalmente alterações nas cadeias laterais e mínimas alterações na cadeia principal, a flexibilidade das estruturas explorada de forma independente tem se mostrado viável e mais eficiente computacionalmente. Por essa razão, foi proposto realizar um acoplamento interativo, empregando o módulo de refinamento implementado no programa Prime (Schrödinger, LLC, New York, NY, USA) para amostrar a flexibilidade da cavidade de ligação nas isoformas, e o programa Glide (Schrödinger, LLC, New York, NY, USA) para explorar a flexibilidade dos ligantes (Jacobson *et al.*, 2002; Friesner *et al.*, 2004; Sherman *et al.*, 2006).

O programa de acoplamento Glide (versão 7.7) opera executando uma metodologia de acoplamento que promove uma busca exaustiva no espaço conformacional mediante aplicação hierárquica de uma série de filtros que fornecem pontuações progressivamente mais precisas para as *poses* geradas (Friesner *et al.*, 2004).

No protocolo das simulações de acoplamento empregado por esse recurso, uma pesquisa conformacional exaustiva é realizada e as *poses* mais favoráveis identificadas nessa triagem inicial envolvendo um método sistemático de busca por aplicação de algoritmo incremental (função heurística), são submetidas a uma função de campo de força (OPLS-AA17) para minimização da energia. As *poses* de menor energia encontradas dessa maneira são então refinadas pelo algoritmo de Monte Carlo, um método estocástico de busca que gera várias *poses* aleatórias promovendo alterações arbitrárias nos ângulos de torção dos ligantes e por fim, todas as *poses* minimizadas são classificadas mediante aplicação de funções de pontuação empírica,

baseada na função desenvolvida por Eldridge e colaboradores (1997) com ajustes que incluem termos de penalização das interações que violando os princípios estabelecidos pela físico-química (Eldridge *et al.*, 1997; Friesner *et al.*, 2004; Halgren *et al.*, 2004).

Esse programa opera sob aplicação de duas funções de pontuação, que embora sejam semelhantes, foram formuladas para propósitos distintos: GlideScore SP e GlideScore XP. A modalidade SP da função é mais indulgente e identifica os ligantes mais propensos de interagir com a biomolécula receptora, mesmo nos casos em que as *poses* apresentam imperfeições significativas. Em contraste, a modalidade XP aplica severas penalidades para *poses* inadequadas, minimizando a obtenção de falsos *hits* e gerando informações mais precisas para a otimização de promissores candidatos à fármaco (Friesner *et al.*, 2004)

Embora alguns erros significativos na previsão das *poses* sejam observados em alguns casos, em comparações de performance com outros recursos computacionais alternativos, esse recurso tem fornecido resultados mais rápidos, robustos e com maior precisão na predição das afinidades de ligação (Halgren *et al.*, 2004; Kitchen *et al.*, 2004).

As simulações de ancoragem utilizando esse programa foram conduzidas pelo Dr. Thales Kronenberger do departamento de Oncologia Médica e Pneumonia do Hospital Universitário de Tübingen, na Alemanha.

Como resultado das simulações realizadas por esse recurso computacional, empregando como função de pontuação a modalidade XP, 49 substâncias foram preditas como as de maior possibilidade de interagir de maneira favorável com a cavidade de ligação na estrutura da isoforma  $\alpha_1$  e 45 foram preditas para a isoforma  $\alpha_3$  (**Tabelas 11 e 12**). Dentre essas, apenas uma das substâncias classificadas como ativas (C-14) não foi predita pelas simulações realizadas frente a isoforma  $\alpha_1$  e duas (C-06 e C-14) não foram selecionadas nas simulações frente a isoforma  $\alpha_3$ . Em todas as moléculas preditas foi observada reprodutibilidade de posicionamento dos grupos quando comparadas ao ligante cristalográfico.

Tabela 11 – Derivados selecionados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_1$ .

Código	NC	Intervalo de Pontuação
C-67	4	- 6,115 a - 4,360
C-68	6	- 6,084 a - 4,731
C-69	3	- 5,994 a - 5,260
C-80	13	- 5,234 a - 3,882
1D	10	- 5,363 a - 3,533
C-12	3	- 7,664 a - 5,462
C-78	15	- 4,715 a - 1,296
C-71	7	- 6,832 a - 4,659
1N	16	- 5,946 a - 4,020
C-79	10	- 5,247 a - 3,792
<b>C-05</b>	3	- 5,927 a - 5,604
C-82	13	- 5,651 a - 2,731

Código	NC	Intervalo de Pontuação
1O	19	- 6,146 a - 3,424
1M	17	- 6,057 a - 2,378
C-74	5	- 7,667 a - 6,468
<b>C-06</b>	1	- 5,881
<b>C-03</b>	19	- 7,273 a - 5,056
1P	18	- 5,302 a - 3,265
C-09	5	- 6,235 a - 4,768
C-43	15	- 4,689 a - 3,663
<b>C-42</b>	18	- 4,778 a - 2,820
C-72	7	- 5,200 a - 4,413
<b>C-04</b>	17	- 6,726 a - 4,643
Prod 2	19	- 5,342 a - 3,131

NC = Número de confôrmeros selecionados.

Em negrito estão destacados os derivados classificados como “ativos”

Tabela 11 – Derivados selecionados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_1$  (continuação).

Código	NC	Intervalo de Pontuação	Código	NC	Intervalo de Pontuação
Prod 1	19	- 5,326 a - 3,559	1J	19	- 5,466 a - 3,426
C-13	3	- 8,878 a - 7,459	1Q	17	- 5,054 a - 3,471
<b>C-15</b>	1	- 5,834	1E	12	- 5,503 a - 4,189
C-08	11	- 6,746 a - 4,706	<b>C-45</b>	19	- 4,530 a - 3,245
C-44	14	- 5,156 a - 3,542	1L	20	- 4,456 a - 3,438
1B	8	- 4,301 a - 6,734	<b>C-77</b>	20	- 5,295 a - 2,115
<b>C-16</b>	2	- 5,923 a - 4,694	<b>C-02</b>	15	- 5,000 a - 3,891
1G	16	- 5,133 a - 1,769	C-49	10	- 6,834 a - 4,330
1R	17	- 5,226 a - 2,911	1A	9	- 5,601 a - 5,032
<b>C-18</b>	2	- 4,620 a - 3,896	1c	9	- 5,392 a - 4,808
1K	14	- 5,126 a - 3,662	1F	3	- 5,408 a - 4,543
<b>C-17</b>	11	- 5,169 a - 4,511	C-73	1	- 4,734
<b>C-76</b>	19	- 6,182 a - 2,414			

NC = Número de confôrmeros selecionados.

Tabela 12 – Derivados selecionados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_3$ .

Código	NC	Intervalo de Pontuação
C-67	5	- 6,114 a - 4,920
C-69	4	- 5,758 a - 5,229
C-68	3	- 5,207 a - 4,990
C-78	19	- 5,637 a - 3,522
1N	18	- 6,037 a - 3,817
C-72	15	- 5,819 a - 4,845
<b>C-05</b>	2	- 7,931 a - 5,907
C-80	18	- 5,891 a - 2,023
C-79	9	- 5,647 a - 3,785
1M	13	- 6,180 a - 2,329
C-74	1	- 7,821
1P	19	- 5,623 a - 3,814

Código	NC	Intervalo de Pontuação
<b>C-09</b>	13	- 6,430 a - 5,070
C-71	14	- 6,198 a - 4,523
1D	7	- 4,328 a - 3,359
Prod 2	17	- 5,397 a - 3,856
<b>C-17</b>	15	- 5,194 a - 4,465
<b>C-42</b>	18	- 4,510 a - 3,291
1Q	13	- 5,034 a - 3,657
C-82	18	- 4,785 a - 3,153
<b>C-03</b>	19	- 6,599 a - 5,015
C-43	19	- 4,903 a - 3,016
Prod 1	20	- 5,353 a - 3,341
<b>C-04</b>	15	- 6,781 a - 4,681

NC = Número de confôrmeros selecionados.

Em negrito estão destacados os derivados classificados como “ativos”

Tabela 12 – Derivados selecionados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_3$  (continuação).

Código	NC	Intervalo de Pontuação
1R	20	- 5,106 a - 3,847
1B	13	- 7,147 a - 4,496
<b>C-15</b>	2	- 5,068 a - 6,798
C-08	13	- 5,732 a - 4,406
1O	17	- 5,195 a - 3,384
<b>C-16</b>	1	- 4,805
1C	4	- 5,140 a - 3,488
C-73	2	- 6,000 a - 4,016
1E	12	- 5,396 a - 4,313
<b>C-45</b>	17	- 4,647 a - 3,272
1L	20	- 4,647 a - 2,465

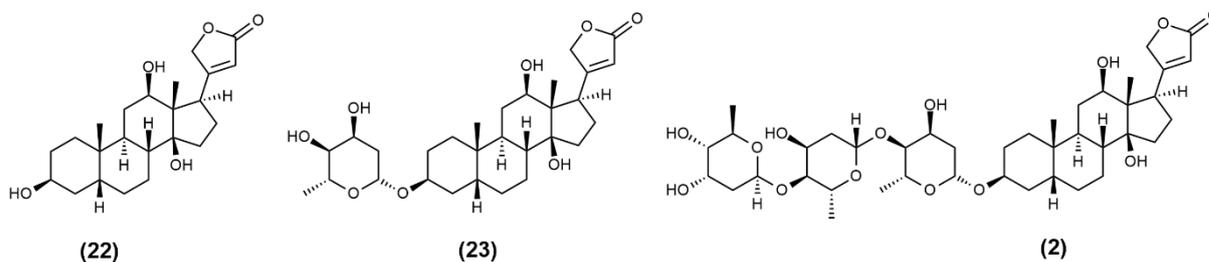
NC = Número de confôrmeros selecionados.

Código	NC	Intervalo de Pontuação
1K	18	- 4,722 a - 1,505
<b>C-18</b>	3	- 3,510 a - 3,125
C-44	16	- 4,849 a - 3,707
<b>C-76</b>	18	- 5,642 a - 2,244
<b>C-02</b>	12	- 5,188 a - 4,217
1J	18	- 4,826 a - 3,503
1A	4	- 4,394 a - 4,174
<b>C-77</b>	19	- 4,725 a - 2,057
C-49	3	- 5,094 a - 3,768
1G	13	- 3,005 a - 1,627

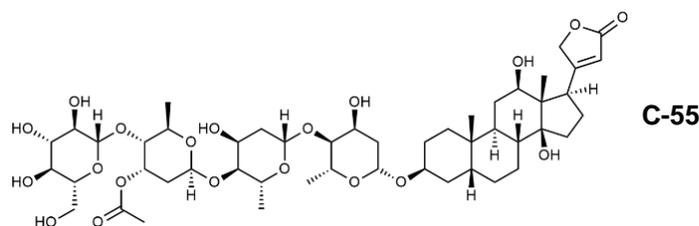
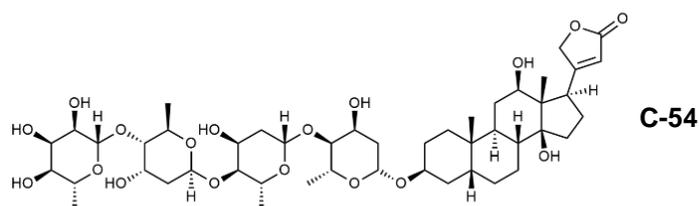
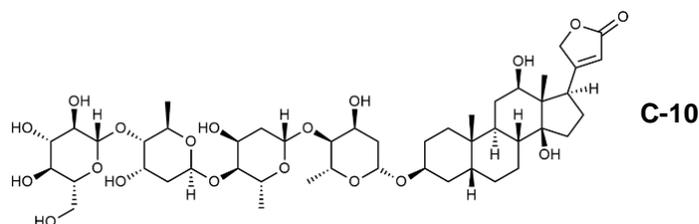
As duas substâncias consideradas ativas e que não receberam as melhores pontuações nas simulações frente isoforma  $\alpha_3$  (C-06 e C-14) correspondem a glicosídeos da 3 $\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**1a**) cuja cadeia lateral em C-3 $\beta$  apresenta três resíduos de D-digitoxose ligados em sequência. Esses derivados C-06 ( $\beta$ -acetil-digitoxina) e C-14 ( $\alpha$ -acetil-digitoxina) são glicosídeos naturalmente encontrados em espécies do gênero *Digitalis* e apresentam, respectivamente, um grupo acetil na posição C-4 e um grupo metoxila na posição C-3 da unidade terminal de D-digitoxose na cadeia lateral osídica (Rücker, 1988; Stoll & Kreis, 1952).

Em modelos de 3D-QSAR construídos para investigar as interações que medeiam a especificidade de ligação desses glicosídeos, os mapas de contorno hidrofóbicos revelam que a região da cavidade de ligação que permeia o resíduo de açúcar diretamente ligado na posição C-3 $\beta$  é revestida por resíduos polares, sugerindo que mesmo que a porção glicosídica não seja essencial para a atividade, a presença de pelo menos um resíduo de açúcar é determinante para uma alta afinidade. Os mapas de contorno para grupos doadores de ligação de hidrogênio corroboram essa evidência ao descrever uma interação favorável entre o grupo hidroxila substituinte na posição C-4' desse resíduo de açúcar ( $\alpha$ ) e um resíduo acceptor de ligação de hidrogênio presente na cavidade de ligação (Paula *et al.*, 2005).

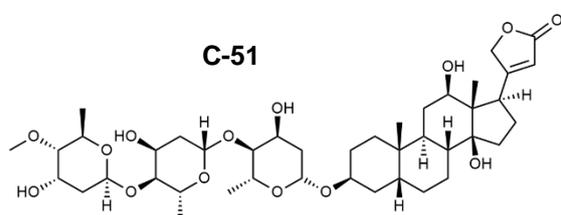
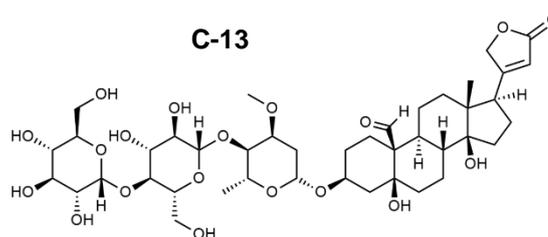
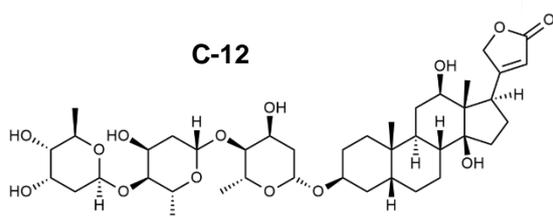
Por outro lado, os mapas de contorno estéricos demonstram que a região em que o terceiro resíduo de açúcar se acomoda na cavidade é estericamente restrita. Já os mapas de contorno para grupos doadores de ligação de hidrogênio sugerem uma significativa redução na afinidade pela adição de mais de dois resíduos de açúcar. De fato, na determinação experimental das afinidades, o derivado monossacarídeo da digoxigenina (**23**) demonstrou uma afinidade cerca de 2,5 vezes maior do que a digoxina (**2**) e cerca de 13,4 vezes maior do que a aglicona corresponde (**22**), evidenciando assim a alta afinidade de ligação exibida pelos derivados monossacarídeos (Paula *et al.*, 2005).



O conjunto de dados constituído pelos 57 derivados selecionados apresenta três glicosídeos (C-10, C-54 e C-55) cuja cadeia lateral é constituída por quatro resíduos de açúcar ligados em sequência e nenhuma delas foi classificada como ativa pelos critérios pré-estabelecidos. De forma esperada, também nenhuma dessas substâncias foi apontada como um ligante efetivo para os sítios de ligação observados em ambas as isoformas analisadas.



Dentre outros três derivados trissacarídeos também classificados como inativos (C-12, C-13 e C-51), nenhum deles foi apontado como um bom ligante para a isoforma  $\alpha_3$ . Dois deles (C-12 e C-13), no entanto, apresentaram pontuação suficiente para serem classificadas como possíveis inibidores para a isoforma  $\alpha_1$ .



O derivado codificado como C-12 corresponde a digoxina (**2**) o único representante dos GC que ainda é prescrito em algumas condições para o tratamento de paciente acometido com ICC. No entanto, apesar de apresentar atividade satisfatória frente a cepa KOS do vírus HSV-1 ( $IC_{50} = 0,13 \pm 0,01$ ) e frente a linhagem A549 ( $IC_{50} = 0,66 \pm 0,01$ ), em um estudo *in silico*, conduzido pelo nosso grupo de pesquisa para predição da afinidade (resultados não divulgados), esse derivado já havia demonstrado menor afinidade pelo sítio de ligação do que outros derivados com potência similar ou considerados menos potentes. O mesmo também foi observado para os derivados C-10 ( $IC_{50} = 0,13 \pm 0,01$  e  $IC_{50} = 0,94$ ), C-51 ( $IC_{50} = 0,21 \pm 0,01$  e  $IC_{50} = ND$ ), C-54 ( $IC_{50} = 0,24 \pm 0,01$  e  $IC_{50} = ND$ ) e C-55 ( $IC_{50} = 0,26 \pm 0,01$  e  $IC_{50} = 1,27$ ) (Bertol *et al.*, 2011, Carvalho, 2012).

Alguns estudos já demonstram anteriormente que a expressão das diferentes isoformas da subunidade alfa na composição da bomba de  $Na^+/K^+$ -ATPase sofre variação quando tecido recém-isolados e diferentes tipos de culturas celulares utilizadas os estudos *in vitro* (primárias, secundária ou contínua) são comparados entre si (Sharabani-Yosef *et al.*; 1999; Blanco, 2005).

Assim a divergência dos resultados para afinidade e potencial de inibição observada pode decorrer das condições das culturas *in vitro* utilizadas nas determinações. Não obstante, outras teorias também têm sido levantadas.

Em estudos moleculares que buscam explicar o mecanismo pelo qual os GC se ligam e promovem a inibição da  $Na^+/K^+$ -ATPase, um modelo proposto sugere que essas substâncias são especificamente reconhecidas por uma determinada região enzimática e uma vez ligados, exercem a atividade inibitória durante um momento específico do ciclo catalítico, restringindo a flexibilidade da alça formada pelos domínios TM5 e TM6 da subunidade alfa. Dessa forma, embora modelos 3D-QSAR construídos para previsão da afinidade e inibição dessas substâncias demonstrem que existe uma correlação considerável, é possível que a potência inibitória apresentada por essas substâncias e a afinidade de ligação observada não estejam totalmente correlacionadas (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Palasis *et al.*, 1996, Paula *et al.*, 2005).

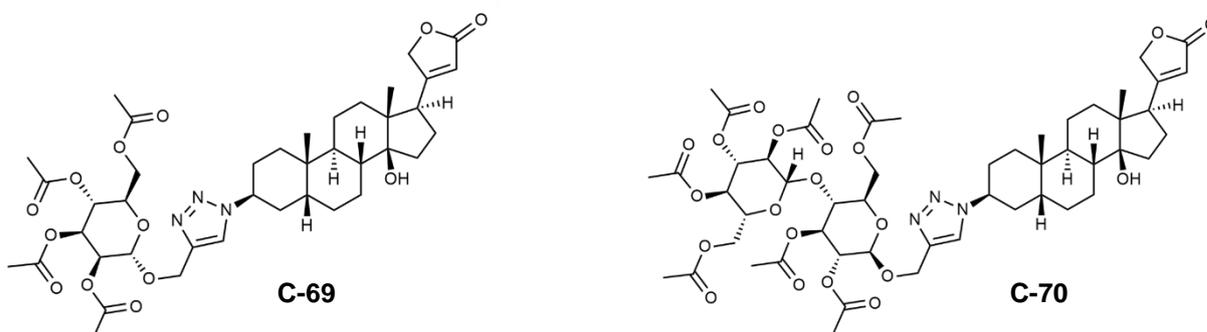
Em concordância com essa observação, a distinção acentuada da capacidade de inibição da  $Na^+/K^+$ -ATPase pelo amantadig (**4**) e seu derivado acetilado (**7**) não

pôde ser explicada pela abordagem proposta de ancoragem *in silico*, conforme relatado em estudo recente pelo nosso grupo (Silva *et al.*, 2018).

Além disso, é válido considerar que algumas investigações conduzidas acerca da atividade antiproliferativa demonstraram que o anel lactônico  $\alpha,\beta$ -insaturado não se mostrou essencial. Esse resultado sugere que os efeitos desencadeados por ação desses derivados cardenolídeos podem não estar relacionados com a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, visto que substâncias desprovidas desse grupo em C-17 $\beta$  não são capazes de se ligar a cavidade de ligação com afinidade suficiente para interromper o funcionamento dessa enzima. Dessa forma, outros alvos moleculares como as topoisomerases e as caspases podem estar envolvidos nas atividades biológicas dessas substâncias (Winnicka *et al.*, 2008).

Ainda assim, as substâncias mais promissoras para a atividade anti-herpética também são aquelas que apresentam maior potencial citotóxico, o que sugere que ambas as atividades estão relacionadas com interações com um mesmo alvo molecular.

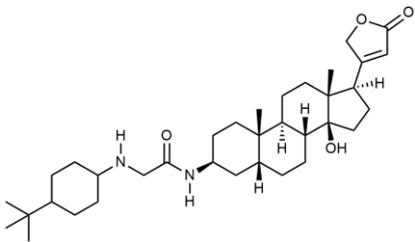
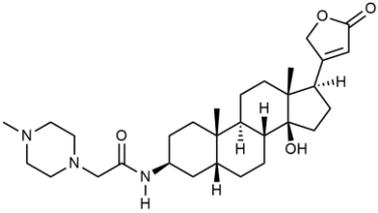
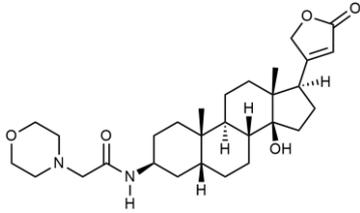
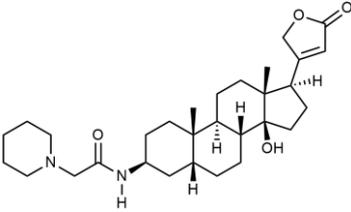
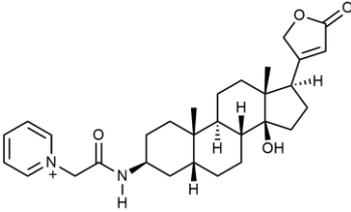
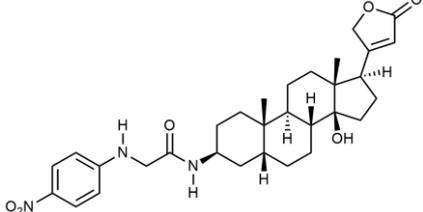
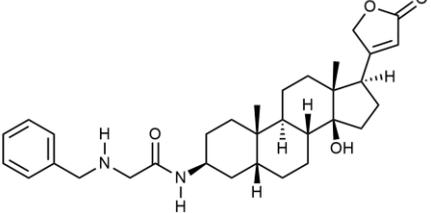
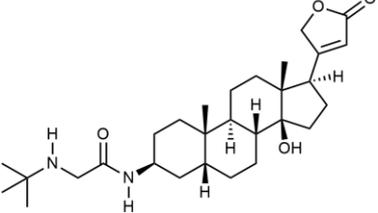
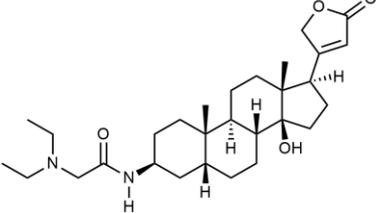
Além disso, os dois derivados menos ativos frente a linhagem de células A549 (C-69 –  $\text{IC}_{50} = 10,09 \pm 1,48$  e C-70 –  $\text{IC}_{50} = 26,33 \pm 4,45$ ) não apresentaram interação satisfatória com o sítio de ligação da isoforma  $\alpha_1$ , embora C-69 tenha sido predita para interagir com a isoforma  $\alpha_3$ .



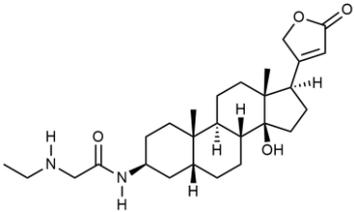
Vários estudos têm sugerido uma afinidade seletiva dos GC às diferentes isoformas da subunidade alfa, como a ouabaína pelas isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ . No entanto, de forma inesperada, no presente estudo, esse glicosídeo não foi predito para nenhuma dessas duas isoformas.

Entre os derivados semissintéticos da  $3\beta$ -hidroxi-digitoxigenina (**Tabela 13**) apenas um dos derivados que compõem a série proposta para síntese (**1I**) não estabeleceu interação adequada com os sítios de ligação de ambas as isoformas analisadas. Esse resultado corrobora as análises acerca da cavidade estericamente restrita em que o terceiro resíduo de açúcar dos glicosídeos comumente se acomoda. O volumoso grupo *terc*-butila, localizado na região terminal da cadeia lateral em C- $3\beta$  desse derivado, supostamente impede a ancoragem adequada à cavidade de ligação em virtude de um impedimento estérico.

**Tabela 13 – Estrutura dos derivados propostos para a síntese.**

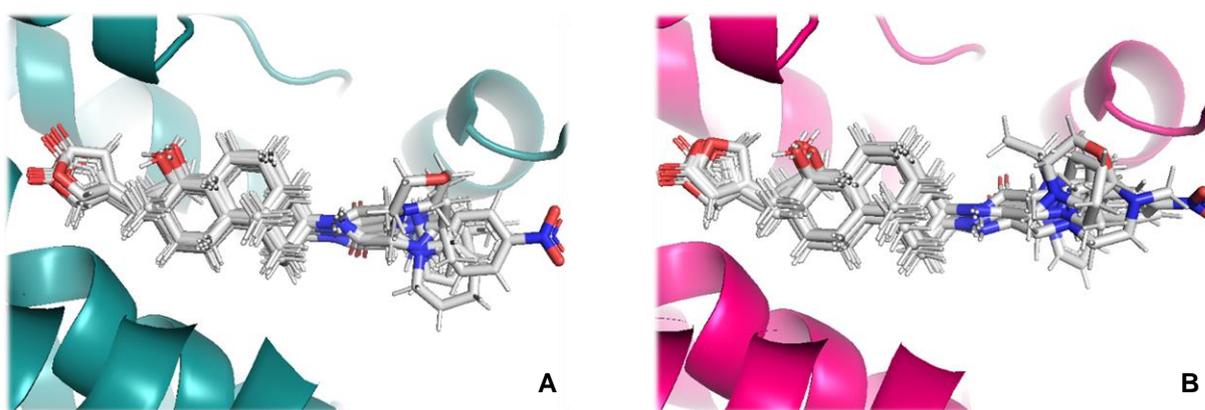
1I	1J	1K
		
1L	1M	1N
		
1O	1P	1Q
		

**Tabela 13 – Estrutura dos derivados propostos para a síntese (continuação).**

1R		
		

As moléculas selecionadas (**1J–1R**) apresentaram considerável diversidade de posicionamento ao longo da cavidade de ligação, principalmente em relação às porções mais flexíveis da molécula: a cadeia lateral em C-3 $\beta$  e o anel lactônico em C-17 $\beta$  (**Figura 51**). As poses de encaixe mais favoráveis aos ligantes foram selecionadas por inspeção visual tomando como base em suas interações comuns com resíduos como Ala-320, Thr-794, Arg-877 e Phe-780 e a pontuação de encaixe atribuída (**Tabela 14**).

**Figura 50 – Sobreposição das poses mais favoráveis para os derivados 1J – 1R.**



**Legenda:** (A) sobreposição na cavidade de ligação na isoforma  $\alpha_1$  (B) sobreposição na cavidade de ligação na isoforma  $\alpha_3$ .

A variação de pontuação apresentada pelas poses mais favoráveis também permitirá, após determinação *in vitro* da inibição enzimática Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, avaliar a capacidade preditiva do programa em classificar esses ligantes conforme seus respectivos potenciais de inibição. A interação hidrofóbica entre a face hidrofóbica do

núcleo esteroidal e o resíduo Phe-780 e a interação por ligação de hidrogênio entre o resíduo Arg-877 e a carbonila da amida presente na cadeia lateral dos derivados foram as únicas interações comuns a todas as poses selecionadas, em ambas as isoformas analisadas. Cabe salientar que a interação com o resíduo Arg-877 não foi evidenciada anteriormente em estudo de ancoragem realizado com o derivado amantadig (**4**) e seu derivado acetilado (**7**) na cavidade de ligação da estrutura cristalográfica (PDB ID: 4HYT) da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase extraída de rins de javali (Silva *et al.*, 2018; Laursen *et al.*, 2013).

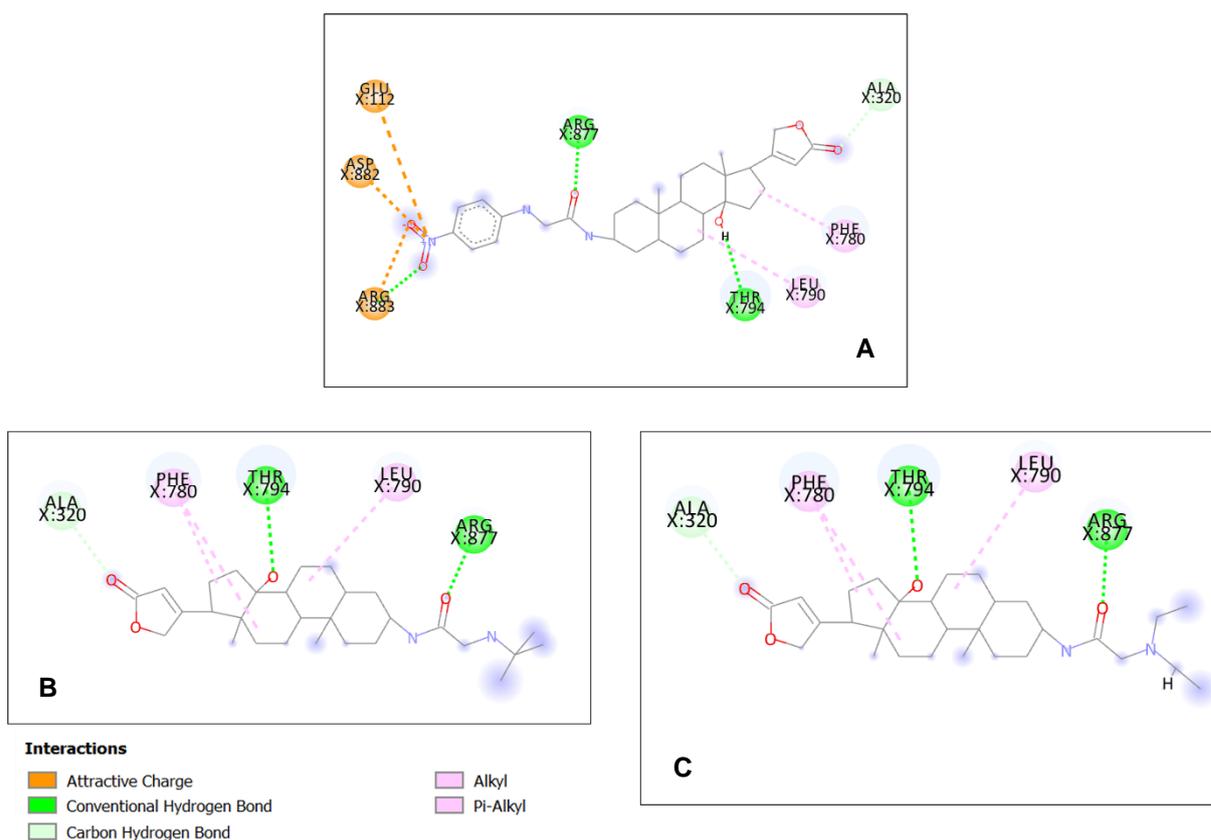
**Tabela 14 – Pontuação de encaixe das poses selecionadas e observância quanto as interações mais comuns.**

<b>ISOFORMA <math>\alpha_1</math></b>									
	1J	1K	1L	1M	1N	1O	1P	1Q	1R
<b>PONTUAÇÃO</b>	- 5,466	- 5,126	- 4,456	- 5,876	- 5,946	- 6,146	- 5,201	- 4,954	- 5,090
<b>ALA-320</b>									
<b>THR-794</b>	x	x	x	x	x		x	x	
<b>ARG-877</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>PHE-780</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>LEU-790</b>	x		x	x	x		x	x	
<b>ISOFORMA <math>\alpha_3</math></b>									
	1J	1K	1L	1M	1N	1O	1P	1Q	1R
<b>PONTUAÇÃO</b>	- 4,988	- 4,685	- 4,010	- 6,180	- 6,037	- 4,647	- 5,623	- 4,642	- 5,106
<b>ALA-320</b>									
<b>THR-794</b>				x	x		x	x	
<b>ARG-877</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>PHE-780</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>LEU-790</b>					x	x	x	x	x

Em contrapartida nenhuma das poses conservou a interação por ligação de hidrogênio entre a carbonila do anel lactônico e o resíduo Ala-320, embora para o derivado **1L** uma interação entre Ala-320 e o oxigênio saturado do anel lactônico tenha sido estabelecida na cavidade de ligação da isoforma  $\alpha_1$ .

Os derivados **1N**, **1P** e **1Q** foram os únicos que mantiveram exatamente os mesmos pontos de interação tanto com a isoforma  $\alpha_1$ , quanto com a isoforma  $\alpha_3$ . Os isômeros **1P** e **1Q** diferem apenas pela cadeia alquila ligada ao átomo de nitrogênio na posição 4': **1P** apresenta um grupo *terc*-butila e **1Q** apresenta dois grupos etila. Em ambas as poses selecionadas para esses derivados, observou-se as interações por ligação de hidrogênio entre a hidroxila em C-14 $\beta$  e o resíduo de Thr-794, e entre a carbonila da amida e o resíduo de Arg-877 (**Figura 52** – B e C). Além dessa, também foram observadas interações hidrofóbicas com os resíduos de Phe-780 e Leu-790. Todas essas interações também são observadas no complexo formado com o ligante cristalográfico (ouabaína).

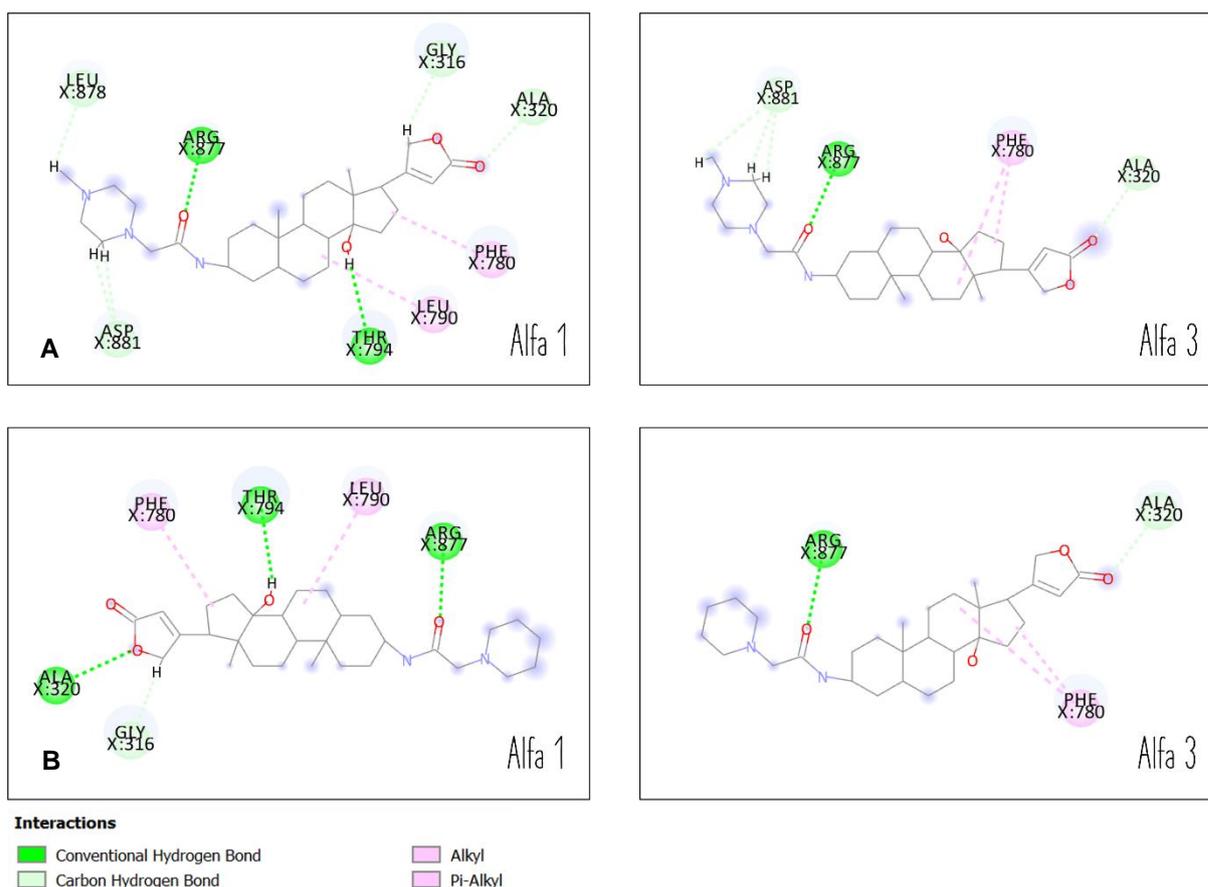
**Figura 51 – Representação das principais interações estabelecidas pelas ligantes 1N (A), 1P (B) e 1Q (C) em ambas as isoformas.**



O derivado **1N**, por sua vez, possui um grupo nitro *para*-posicionado no anel aromático presente na cadeia lateral. Em ambas as poses selecionadas, esse grupo foi ancorado próximo a um resíduo carregado positivamente (Arg-883), permitindo estabelecer uma interação eletrostática adicional (**Figura 52 – A**).

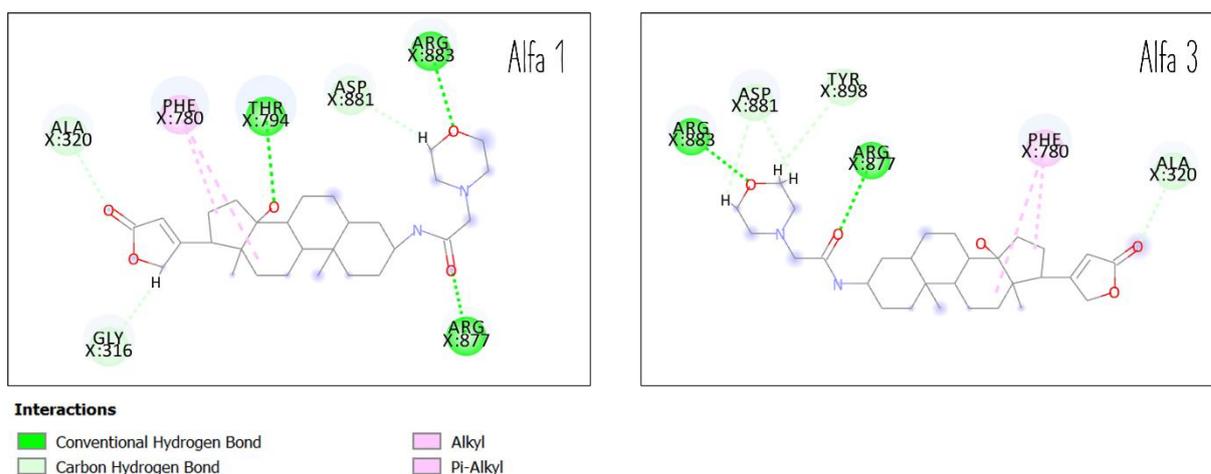
As poses selecionadas para os derivados **1J** e **1L** também foram ancoradas ao longo da cavidade de ligação na isoforma  $\alpha_1$  conservando as interações com a maior parte dos resíduos principais (Thr-794, Arg-877, Phe-780 e Leu-790). O anel lactônico em C-17 $\beta$  do derivado **1L** foi ancorado próximo ao resíduo de Ala-320, permitindo que uma interação por ligação de hidrogênio também fosse estabelecida. O mesmo, entretanto, não foi observado para a isoforma  $\alpha_3$  (**Figura 53**). Nas simulações com essa isoforma, para ambos os derivados, em nenhuma das poses geradas a interação por ligação de hidrogênio com o resíduo Thr-794 foi conservada. Também não foram observadas as interações hidrofóbicas estabelecidas com o resíduo de Leu-790.

**Figura 52 – Representação das principais interações estabelecidas pelo ligante 1J (A) e 1L (B) na cavidade de ligação das isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_3$ .**



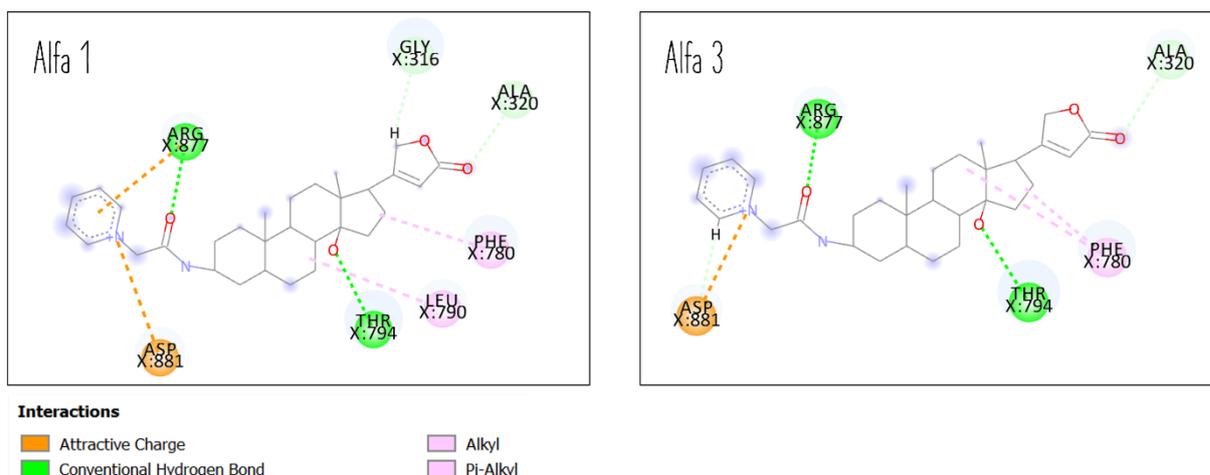
Nas simulações de ancoragem com o derivado **1K**, a interação da hidroxila em C-14 $\beta$  com o resíduo de Thr-794 também só foi conservada nas poses geradas na cavidade de ligação da isoforma  $\alpha_1$ . Nas poses mais favoráveis em ambas as isoformas, o grupo morfolina na porção terminal da cadeia lateral em C-3 $\beta$  foi ancorado próximo ao resíduo Arg-883, permitindo que uma interação por ligação de hidrogênio adicional fosse estabelecida com o átomo de oxigênio heterocíclico (**Figura 54**).

**Figura 53 – Representação das principais interações estabelecidas pelo ligante 1K em ambas as isoformas.**



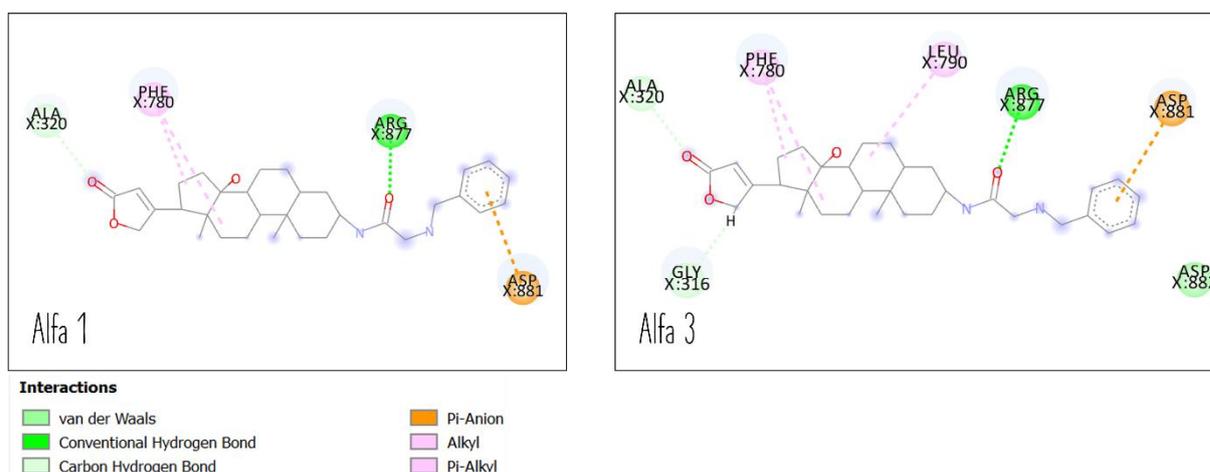
A presença de um anel piridínico na porção terminal da cadeia lateral em C-3 $\beta$  no derivado **1M** possibilita estabelecer uma interação eletrostática entre o nitrogênio quaternário e o carboxilato do resíduo de aspartato (Asp-881). Essa interação foi observada nas poses mais favoráveis para ambas as isoformas analisadas (**Figura 55**). Além dessa, também foram observadas interações estabelecidas com os resíduos Arg-877, Thr-794 e Phe-780, tanto para a isoforma  $\alpha_1$ , quanto para  $\alpha_3$ . A proximidade do resíduo de arginina (Arg-877) com os elétrons deslocalizados do anel piridínico também favorece uma interação tipo complexo  $\pi$ , evidenciada na pose mais favorável para a isoforma  $\alpha_1$ .

**Figura 54 – Representação das principais interações estabelecidas pelo ligante 1M em ambas as isoformas.**



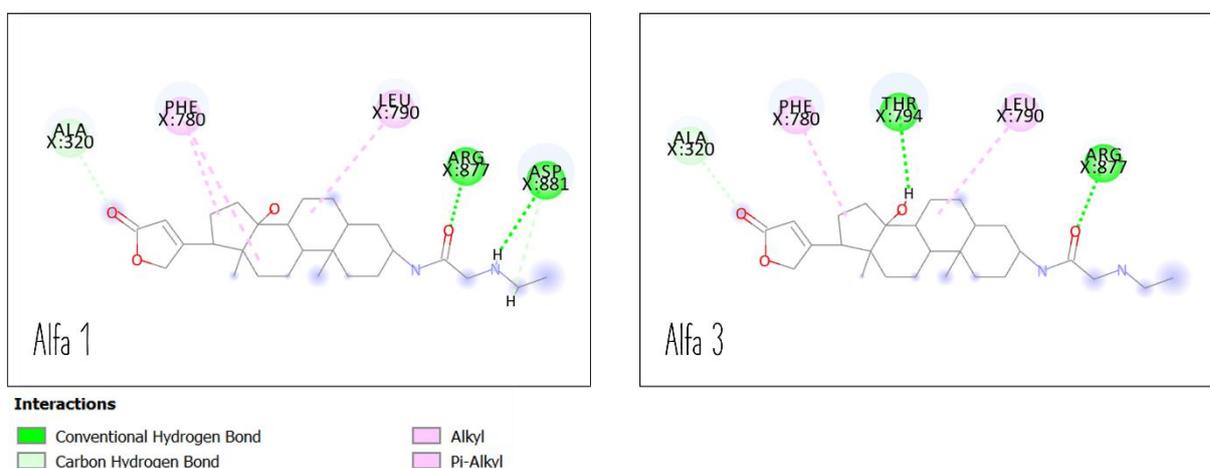
Nenhuma pose gerada para o derivado **1o** estabeleceu a interação por ligação de hidrogênio com o resíduo de Thr-794 (**Figura 56**). No entanto, a proximidade da hidroxila em C-14 $\beta$  a esse resíduo sugere que em um estudo de dinâmica molecular, essa interação se estabeleceria facilmente após o relaxamento e estabilização da estrutura do complexo. Para esse derivado, as poses mais favoráveis, tanto para a isoforma  $\alpha_1$ , quando para  $\alpha_3$ , sugerem que o anel aromático presente na porção terminal da cadeia lateral em C-3 $\beta$  estabelece uma interação tipo complexo  $\pi$  com o carboxilato do resíduo de aspartato (Asp-881).

**Figura 55 – Representação das principais interações estabelecidas pelo ligante 1o em ambas as isoformas.**



Embora estudos anteriores já tenham destacado a importante contribuição do grupo  $\text{NH}_2$  livre na posição 4' da cadeia lateral do amantadig (**4**), apenas na pose mais favorável para o derivado **1R** em  $\alpha_1$  foi observado a interação por ligação de hidrogênio entre esse grupo e o resíduo de Asp-881 (**Figura 57**). Em nenhuma das poses obtidas para os derivados propostos para síntese, esse grupo esteve envolvido em alguma interação que fosse capaz de justificar essa contribuição. Resultado semelhante já havia sido relatado na comparação das interações estabelecidas pelo derivado amantadig (**4**) e seu derivado acetilado (**7**), cuja capacidade de inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase a  $1,0 \mu\text{M}$  é nula. Estudos anteriores, no entanto, já haviam relatado que a substituição do grupo hidroxila por um grupo amino na posição C-4' no resíduo de ramnose da ouabaína provoca um aumento na afinidade pelo sítio ativo. É necessário considerar, no entanto, que essas constatações foram extraídas de estudos *in vitro* empregando a enzima isolada de tecido cardíaco humano. Dessa forma, a afinidade dessas substâncias apresentando grupo amino na cadeia lateral foi determinada considerando toda a cinética da interação. Importante reafirmar nesse caso, que as abordagens de ancoragem molecular apresentam algumas limitações e podem acabar ignorando as mudanças dinâmicas que possivelmente ocorrem ao longo do tempo, mesmo quando o método de ajuste induzido é considerado (Schönfeld *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 2018).

**Figura 56 – Representação das principais interações estabelecidas pelo ligante **1R** em ambas as isoformas.**



Dentre todas as 57 substâncias submetidas às simulações de ancoragem, apenas um dos intermediários (**1b**) da síntese proposta nesse trabalho originou poses

cuja interação entre o resíduo Ala-320 e a carbonila do anel lactônico pôde ser evidenciada. No complexo formado pela interação com o ligante cristalográfico (ouabaína), o anel lactônico também interage com um resíduo de valina (Val-329), que influencia na coordenação de íon  $K^+$  em conjunto com os resíduos Val-332 e Ala-330. O afastamento desse resíduo pela acomodação do anel lactônico provoca uma destruição parcial no sítio de coordenação do íon  $K^+$ , impedindo a dissociação desse. Isso sugere que a interação dos GC com esses resíduos pode ser determinante para o potencial de inibição dessas substâncias (Ogawa *et al.*, 2009; Shinoda, *et al.*, 2009).

Essas constatações, em conjunto com a observação de que alguns derivados também não estabeleceram a interação com o resíduo de Thr-794 – mesmo com a proximidade aparente – sugerem que o acréscimo nos graus de liberdade do complexo formado entre os ligantes e a biomolécula receptora, possa resultar na formação e estabilização dessas interações relevantes.

Essas limitações intrínsecas das simulações de ancoragem reforçam a necessidade de submeter as substâncias selecionadas aos ensaios biológicos apropriados para avaliação das atividades de interesse, além de encorajar a realização de estudos *in silico* adicionais que sejam capazes de fornecer um panorama mais fidedigno da dinâmica das interações estabelecidas entre essas substâncias e o sítio de ligação.

## 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O material de partida (**1a**) para as reações de modificação molecular propostas foi obtido em quantidade satisfatória a partir de processos sequenciais de extração, purificação e reação de hidrólise em meio ácido.
- A estratégia sintética proposta se mostrou eficiente, possibilitando a obtenção dos intermediários **1b** – **1e** com rendimentos superiores a 90%.
- Ainda que a obtenção da 3 $\beta$ -amino-3-desoxi-digitoxigenina tem sido alcançada nesse trabalho, é inegável a necessidade de ajustes adicionais na metodologia proposta para obtenção desse intermediário. Propostas de síntese ou de purificação alternativas também devem ser consideradas visando a obtenção de um produto mais puro.
- Os derivados propostos para síntese (**1I** – **1R**) foram previamente submetidos aos estudos de ancoragem molecular para seleção dos inibidores mais promissores. Além desses, também foram submetidos às simulações de ancoragem os 7 intermediários sintéticos obtidos experimentalmente nesse trabalho e outros 40 derivados cardiotônicos selecionados a partir de um banco de dados de moléculas do nosso grupo de pesquisa, totalizando 57 moléculas analisadas. Dessas, 15 foram classificadas como ativas segundo *cutoff* de atividade anti-herpética e citotóxica determinadas experimentalmente (*in vitro*).
- Os modelos tridimensionais utilizados nas simulações de ancoragem foram construídos aplicando-se método de modelagem por homologia, utilizando como molde a estrutura cristalográfica PDB ID 3A3Y. Após otimização os modelos foram validados por um conjunto de ferramentas de diagnóstico que atestaram a qualidade e confirmaram que as estruturas se mostravam adequadas para o propósito dos estudos.
- As simulações foram realizadas em quatro programas computacionais empregando algoritmos de amostragem e funções de pontuação distintos: Sybyl-X, Gold, OEDocking e Glide. Estudo preliminares de *redocking* foram realizados para avaliação dos parâmetros estabelecidos. Poses irracionais foram obtidas nas simulações utilizando os programas Sybyl-X e Gold, permitindo concluir que os conjuntos de

parâmetros disponíveis nesses programas não fornecem resultados confiáveis para análises de glicosídeos.

- No estudo de *redocking* realizado no programa OEDocking, as conformações de menor energia obtidas apresentaram adequada sobreposição com o ligante cristalográfico. No entanto, a capacidade preditiva desse programa não foi satisfatória. Dentre as 15 substâncias classificadas como ativas, apenas três foram previstas nas simulações com a isoforma  $\alpha_1$  e quatro foram selecionadas para a isoforma  $\alpha_3$ . No entanto, para ambas as isoformas apenas um glicosídeo (C-02) foi apontado como um ligante favorável. Entre as moléculas que sofreram penalidade por questões de impedimento estérico, apenas mono e dissacarídeos foram considerados. Dessa forma, trissacarídeos importantes clinicamente, como digitoxina (**1**) e digoxina (**2**) não foram apontados como bons ligantes. Esses resultados sugerem que esse pacote computacional também não está paramentado adequadamente para conduzir análises de ancoragem com glicosídeos.

- No programa Glide as conformações de menor energia obtidas no estudo de *redocking* também apresentaram grande semelhança de posicionamento com a *pose* estabelecida com o ligante cristalográfico, indicando o protocolo de análise estabelecido estava adequado para o estudo pretendido. Nas simulações conduzidas nesse programa, 14 das substâncias consideradas ativas foram preditas para interagir adequadamente com a cavidade de ligação na isoforma  $\alpha_1$  e 13 foram preditas para a isoforma  $\alpha_3$ , correspondendo a uma assertividade de 93,3% e 86,7%, respectivamente.

- Dentre os potenciais inibidores propostos nesse trabalho (**1I–1R**), apenas o derivado **1I** não foi predito como um bom inibidor para ambas as isoformas testadas. Interessante considerar que entre os derivados selecionados, todas as poses mais favoráveis estabelecem uma interação por ligação de hidrogênio entre o resíduo de Arg877 e a carbonila da amida presente na cadeia lateral. As poses selecionadas para os derivados **1M** e **1N** estão entre poses que receberam as maiores pontuações tanto nas simulações com a isoforma  $\alpha_1$ , quando com a isoforma  $\alpha_3$ . Em ambas as poses, uma interação eletrostática com o resíduo de Arg-881 foi observada, o que sugere que explorar a interação com esse resíduo pode ser interessante no planejamento de novos inibidores para a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. O derivado **1R**, por sua vez, foi o único cuja interação esperada entre o nitrogênio em 4' e o sítio de ligação foi evidenciada.

- Embora **1M**, **1N** e **1R**, tenham se mostrado mais promissores, todos os inibidores propostos nesse trabalho (**1I – 1R**) serão sintetizados posteriormente. Uma vez sintetizadas, essas substâncias serão submetidas aos testes biológicos pertinentes para avaliação da capacidade de inibição e das atividade anti-herpética e citotóxica. Esses resultados permitirão avaliar a capacidade preditiva do protocolo utilizado nas simulações de ancoragem, além de permitir a determinação da relação entre a estrutura e a atividade dessas substâncias, para que novos ligantes sejam planejados.
- Todos esses potenciais inibidores também serão submetidos às simulações de ancoragem com as isoforma  $\alpha_2$  e  $\alpha_4$  para avaliação da seletividade de inibição dessas substâncias. Dessa forma, será possível direcionar as substâncias para estudos subsequentes de acordo com o grau de expressão da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase previamente descrito para cada tipo de tumor, visando propiciar tratamentos mais seletivos.

## REFERÊNCIAS

- Akera, T.; Ng, Y. *Digitalis* sensitivity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, myocytes and the heart. **Life Sciences**, v. 48, n. 02, p. 97-106, 1991.
- Akera, T.; Ng, Y.; Shieh, I.; Bero, E.; Brody, T. M.; Braselton, W. E. Effects of K<sup>+</sup> on the interaction between cardiac glycosides and Na,K-ATPase. **European Journal of Pharmacology**, v. 111, n. 02, p. 147-157, 1985.
- Albuquerque, C. F. G.; Silva, A. R.; Silva, C. I.; Neto, H. C. C. F.; Burth, P. Na/K pump and beyond: Na/K-ATPase as a modulator of apoptosis and autophagy. *Molecules*, v. 22, n. 04, p. 578-596, 2017.
- Alves, P. B.; Victor, M. M. Reação cânfora com boroidreto de sódio: uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2274-2278, 2010.
- Alves, V. M.; Braga, R. C.; Muratov, E. N.; Andrade, C. H. Quimioinformática: uma introdução. **Química Nova**, v. 41, n. 02, p. 202-212, 2018.
- Amaral, P. A.; Farias, G. N.; Eifler-Lima, V. L. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipo de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 04, p. 351-363, 2003.
- Andrade, L. A. R. **Otimização da Obtenção de 3β-amino-3-desoxi-digitoxigenina, intermediário chave na síntese de cardenólídeos análogos do amantadig**. 2020. 76 p. Monografia de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Anfinsen, C. B.; Haber, E.; Sela, M.; White Jr., F. H. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 47, n. 09, p. 1309-1314, 1961.
- Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. **Modern Physical Organic Chemistry**. University Science Books, 2006. 1095 p.
- Armarego, W.L.E. Purification of Organic Chemicals. In: Armarego, W.L.E.; Perrin, D. D. **Purification of Laboratory Chemicals**. In: Butterworth-Heinemann, 8ª edição, 2017. Cap 3, p. 95-634.

Porto Alegre: Artmed, 1ª edição, 2017. Cap. 18, p. 271-284.

Armenteros, J. J. A.; Tsirigos, K. D.; Sønderby, C. K.; Petersen, T. N.; Winther, O.; Brunak, S.; Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 04, p. 420-423, 2019.

Ashburn, T. T.; Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 03, n. 08, p. 673-683, 2004.

Bagrov, A. Y.; Shapiro, J. I.; Fedorova, O. V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 01, p. 9-38, 2009.

Barreiro, E. J.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G.; Sant`Anna, C. M. R.; Alencastro, R. B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicina. **Química Nova**, v. 20, n. 01, p. 300-310, 1997.

Bartoli, G.; Di Antonio, G.; Giovannini, R.; Giuli, S.; Lanari, S.; Paoletti, M.; Marcantoni, E. Efficient tranformation of azides to primary amines using the mild and easily accessible  $CeCl_3 \cdot 7H_2O/Nal$  system. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 05, p. 1919-1924, 2008.

Berlinck, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 03, p. 27-30, 2012.

Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 01, p. 235-242, 2000.

Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002.

Bertol, J. W.; Rigotto, C.; Pádua, R. M.; Kreis, W.; Barardi, C. R. M.; Braga, F. C.; Simões, C. M. O. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cadenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, v. 92, n. 01, p. 73-80, 2011.

Blanco, G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a machanism for tissue-specific ion regulation. **Seminars in Nephrology**, v. 25, n. 05, p. 292-303, 2005.

Boardman, L.; Huett, M.; Lamb, J. F.; Newton, J. P.; Polson, J. M. Evidence for the genetic control of the sodium pump density in HeLa cells. **The Journal of Physiology**, v. 241, n. 03, p. 771-794, 1974.

Boff, L.; Munkert, J.; Ottoni, F. M.; Schneider, N. F. Z.; Ramos, G. S.; Kreis, W.; Andrade, S. F.; Filho, J. D. S.; Braga, F. C.; Alves, R. J.; Pádua, R. M.; Simões, C. M. O. Potential anti-herpes and cytotoxic action of novel semisynthetic digitoxigenin-derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 546-561, 2019.

Bose, A. K.; Kistner, J. F.; Farber, L. A convenient synthesis of axial amines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 08, p. 2925-2927, 1962.

Bowden, K.; Heilbron, I. M.; Jones, E. R. H.; Weedon, B. C. L. Research on acetylenic compounds. Part I. The preparation of acetylenic ketones by oxidation of acetylenic carbinols and glycols. **Journal of the Chemical Society**, p. 39-40, 1946.

Bowie, J. U.; Lüthy, R.; Eisenberg, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164-170, 1991.

Boyer, J. H.; Canter, F. C. Alkyl and aryl azides. **Chemical Reviews**, v. 54, n. 01, p. 1-57, 1954.

Boyle, P. J.; Conway, E. J. Potassium accumulation in muscle and associated changes, **The Journal of Physiology**, v. 100, n. 01, p. 1-63, 1941.

Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compound. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 5188-5240, 2005.

Bräse, S.; Banert, K. **Organic Azides: Syntheses and Applications**, 2010. John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 536 p.

Brieger, G.; Nestrick, T. J. Catalytic transfer hydrogenation. **Chemical Reviews**, v. 74, n. 05, p. 567-580, 1974.

Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 01, p. 335-373, 2003.

Brown, B. T.; Stafford, A.; Wright, S. E. Chemical structure and pharmacological activity of some derivatives of digitoxigenin and digoxigenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 18, n. 02, p. 311-324, 1962.

Bruneton, J. **Pharmacognosie. Phytochimie. Plantas Medicinales.** 4 ed. Paris, Lavousier, 2009.

Bucher, D.; Grant, B. J.; McCammon, J. A. Induced fit or conformational selection? The role of the semi-closed state in the maltose binding protein. **Biochemistry**, v. 50, n. 48, p. 10530-10539, 2011.

Buenz, E. J.; Verpoorte, R.; Bauer, B. A. The ethnopharmacologic contribution to bioprospecting natural products. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, n. 1, p. 509-530, 2017.

Burgi, H. B.; Dunitz, J. D.; Shefter, E. Geometrical reaction coordinates – II. Nucleophilic addition to a carbonyl group. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 15, p. 5065-5067, 1973.

Burkard, C.; Verheije, M. H.; Haagmans, B. L.; Kuppeveld, F. J.; Rottier, P. J. M.; Bosch, B.; Haan, C. A. M. ATP1A1-mediated Src signaling inhibits coronavirus entry into host cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 08, p. 4434-4448, 2015.

Carey, F. A.; Giuliano, R. M. **Organic Chemistry.** 10<sup>a</sup> edição, 2016. McGraw-Hill Education, 1248 p.

Carlson, H. A. Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 06, n. 04, p. 153-162, 2002.

Carvalho, A. **Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenolídeos em células tumorais.** 2012. 129 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Cerella, C.; Dicato, M.; Diederich, M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. **Mitochondrion**, v. 13, n. 03, p. 225-234, 2013.

Chen, V. B.; Arendall III, W. B.; Headd, F. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J. Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D – Biological Crystallography**, v. D66, p. 12-21, 2010.

Chérest, M.; Felkin, H.; Prudent, N. Torsional strain involving partial bonds. The stereochemistry of the lithium aluminium hydride reduction of some simple open-chain ketones. **Tetrahedron Letters**, v. 09, n. 18 p. 2199-2204, 1968.

Chérest, M.; Felkin, H. The influence of steric and torsional strain on the steric course of additions to cyclohexanones. The reaction between 4-T-butylcyclohexanone and T-butylallyl magnesium bromide. **Tetrahedron Letters**, v. 12, n. 05 p. 383-386, 1971.

Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I. I.; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y. C.; Todeschini, R.; Consonni, V.; Kuz`min, V. E.; Chamer, R.; Benigni, R.; Yang, C.; Rathman, J.; Terfloth, L.; Gasteiger, J.; Richard, A.; Tropsha, A. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 4977-5010, 2014.

Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. **Organic Chemistry**. 2ª edição, 2012. Oxford University Press, 1264 p.

Colovos, C.; Yeates, T. O. Verification of protein structure: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 02, n. 09, p. 1511-1519, 1993.

Contessoto, V. G.; Oliveira Jr., A. B.; Chahine, J. Oliveira, R. J.; Leite, V. B. P. Introdução ao problema de enovelamento de proteínas: uma abordagem utilizando modelos computacionais simplificados. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 04, p. 4306 (1-13), 2018.

Corey, E. J.; Nicolaou, K. C. Balanson, R. D.; Machida, Y. A useful method for the conversion of azides to amines. *Synthesis-Stuttgart Journal*, n. 09, p. 590-591, 1975.

Costa. P.; Pilli, R.; Pinheiro, S. **Substâncias Carboniladas e Derivados**. 2ª edição, 2019. São Paulo: EditSBQ, 465 p.

Coutsias, E. A.; Seok, C.; Dill, K. A. Using quaternions to calculate RMSD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 15, p. 1849-1857, 2004.

Crambert, G.; Hasler, U.; Beggah, A. T.; Yu, C.; Modyanov, N. N.; Horisberger, J.; Levièvre, L.; Geering, K. Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 03, p. 1976-1986, 2000.

D'afonso, G.; Tramontano, A.; Lahm, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n. 2-3, p. 246-256, 2001.

Danielli, J. F.; Davson, H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 05, n. 04, p. 495-508, 1935.

Dauben, W. G.; Fonken, G. J.; Noyce, D. S. The stereochemistry of hydride reductions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 11, p. 2579-2582, 1956.

Davis, I. W.; Leaver-Fay, A.; Chen, V. B.; Block, J. N.; Kapral, G. J.; Wang, X.; Murray, L. W.; Arendall, W. B.; Snoeyink, J.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 35W, p. W375-W383, 2007.

De, S.; Banerjee, S.; Babu, M. N.; Lakhmi, B. M.; Babu, T. M. S. Review on cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 06, n. 05, p. 51-60, 2012.

Dean, R. B. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. **Biological Symposia**, v. 03, p. 331-348, 1941.

Devienne, K. F.; Raddi, G.; Pozetti, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 06, n. 03, p. 11-11, 2004.

Dias, R. L. A.; Corrêa, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 24, n. 02, p. 236-242, 2001.

Diedrich, M.; Muller, F.; Cerella, C. Cardiac glycosides: from molecular targets to immunogenic cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 125, n. 01, p. 1-11, 2017.

DiMasi, J. A.; Grabowski, H. G.; Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20-33, 2016.

Dodson, A. W.; Taylor, T. J.; Knipe, D. M.; Coen, D. M. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v. 366, n. 02, p. 340-348, 2007.

Doman, T. N.; McGovern, S. L.; Witherbee, B. J.; Kasten, T. P.; Kurumbail, R.; Stallings, W. C.; Connolly, D. T.; Schoichet, B. K. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p.2213-2221, 2002.

Duarte, D. F. Opium and opioids: a brief history. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 01, p. 135-146, 2005.

Ekins, S.; Kaneko, T.; Lipinski, C. A.; Bradford, J.; Dole, K.; Spektor, A.; Gregory, K.; Blondeau, D.; Ernst, S.; Yang, J.; Goncharoff, N.; Hohman, M. M.; Bunin, B. A. Analysis and hit filtering of a very large library of compounds screened against *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular BioSystems**, v. 06, n. 11, p. 2316-2324, 2010.

Elbaz, H. A.; Stueckle, T. A.; Tse, W.; Rojanasakul, Y.; Dinu, C. Z. Digitoxin and its analogs as novel cancer therapeutics. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 1, n. 04, p. 4, 2012.

Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Roger, P. M. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, n. 05, p. 425-445, 1997.

Erickson, J. A.; Jalaie, M.; Robertson, D. H.; Lewis, R. A.; Vieth, M. Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 01, p. 45-55, 2004.

Espineda, C.; Seligson, D. B.; Ball Jr., W. J.; Rao, J.; Palotie, A.; Horvath, S.; Huang, Y.; Shi, T.; Rajasekaran, A. K. Analysis of the Na,K-ATPase  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. **Cancer**, v. 97, n. 08, p. 1859-1868, 2003.

Eswar, N.; Webb, B.; Marti-Redom, M. A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M. Y.; Pieper, U.; Sali, A. Comparative protein structure modeling with modeler. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 15, n. 05, p. 5-6, 2006.

Farias, R. R.; Mascarenhas, A. J. S.; Santos, T. J. Victor, M. M. Are diazides really dangerous compounds under ordinary conditions? **Tetrahedron Letters**, v. 61, n. 48, p. 152574, 2020.

Filho, O. A. S.; Alencastro, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 02, p. 253-259, 2003.

Filho S. B. **Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos no Brasil: Estratégias de Fomento**. 2006. 192 p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Finkelstein, H. Darstellung organischer Jodide aus den entsprechenden Bromiden und Chloriden. **Chemische Berichte**, v. 43, n. 02, p. 1528-1532, 1910.

Fischer, E. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 03, p. 2985-2993, 1894.

Forbush, B. Cardiotonic steroids binding to Na,K-ATPase. **Current Topics in Membrane and Transport**, v. 19, p. 167-201, 1983.

Fossey, J.; Lefort, D.; Sorba, J.; **Free Radicals in Organic Chemistry**, 1<sup>a</sup> edição, 1995. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 332 p.

Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Cardiotônicos: histórico e perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. **Química Nova**, v. 19, n. 02, p. 182-189, 1995.

Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring – 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 07, p. 1739-1749, 2004.

Fullerton, D. S.; Yoshioka, L.; Rohrer, D. C.; From, A. H.; Ahmed, K. *Digitalis* genin activity: side-group carbonyl oxygen position is a major determinant. **Science**, v. 205, n. 4409, p. 917-919, 1979.

Gabriel, S. Ueber eine darstellungweise primärer amine aus den entsprechenden halogenverbindungen. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 20, n. 02, p. 2224-2236, 1887.

Garegg, P. J.; Samuelsson, B. Novel reagent system for converting a hydroxyl-group into an iodo-group in carbohydrates with inversion of configuration. Part 1. **Journal of the Chemical Society**, v. 22, p. 978-980, 1979.

Gault, M. H.; Kaira, J.; Longerich, L.; Dawe, M. A. Digoxigenin biotransformation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 31, n. 06, p. 695-82, 1982.

Gault, M. H.; Longerich, L. L.; Loo, J. C. K.; Ko, P. T. H.; Fine, A.; Vasdev, S. C.; Dawe, M. A. Digoxin biotransformation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 35, n. 01, p. 74-82, 1984.

Geering, K. Function of FXFD proteins, regulators of Na,K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 37, n. 06, p. 387-392, 2005.

Geering, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 02, p. F241-F250, 2006.

Gheorghide, M.; Adams Jr., K. F.; Colucci, W. S. Digoxin in the management of cardiovascular disorders. **Circulation**, v. 109, n. 24, p. 2969-2964, 2004.

Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W. The Gabriel Synthesis of primary amines. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 07, n. 12, p. 919-930, 1968.

Gilardi, R. D.; Karle, I. The structure of  $\Delta$ -8,14-anhydrodigitoxigenin,  $C_{23}H_{32}O_3$ , by direct phase determination. **Acta Crystallographica**, v. B26, n.03, p. 207-218, 1970.

Glass, R. S.; Deardorff, D. R. Henegar, K. Highly stereoselective reductions of  $\alpha$ -alkoxy- $\beta$ -keto esters. Aspects of the mechanism of sodium borohydride reduction of ketones in 2-propanol. **Tetrahedron Letters**, v. 21, n. 26, p. 2467-2470, 1980.

Gonçalves, R. B. **Desenvolvimento e Validação de Novos Métodos de Distribuição da População Inicial em Algoritmos Genéticos Para o Problema de Docking Proteína-Ligante**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Modelagem Computacional) – Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis.

Gorter, E.; Grendel, F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. **Journal of Experimental Medicine**, v. 41, n. 04, p. 439-434, 1925.

Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **Revista Processos Químicos**, v. 02, n. 04, p. 24-26, 2008.

Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

Gupta, V. K. Application of low-cost adsorbents for dye removal – a review. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 08, p. 2313-2342, 2009.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13ª edição, 2017. Guanabara Koogan, 1176 p.

Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring – 2.

Enrichment factors in database screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 07, p. 1750-1759, 2004.

Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 02, p. 111-129, 2015.

Hartley, C.; Hartley, M.; Pardoe, I.; Knight, A. Ionic contra-viral therapy (ICVT); a new approach to the treatment of DNA virus infections. **Archives of Virology**, v. 151, n. 12, p. 2495-2501, 2006.

Hausmann, W.; Kreis, W.; Stuhlemmer, U.; Reinhard, E. Effects of various pregnanes and two 23-nor-5-cholenic acids on cardenolide accumulation in cell and organ cultures of *Digitalis lanata*. **Planta Medica**, v. 63, n. 05, p. 446-453, 1997.

Haux, J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. **Medical Hypotheses**, v. 53, n. 06, p. 543-548, 1999.

Haux, J.; Klepp, O.; Spigset, O.; Tretli, S. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-responded studies. **BMC Cancer**, v. 01, n. 01, p. 1-11, 2001.

Hawkins, P. C. D.; Skillman, A. G.; Warren, G. L.; Ellingson, B. A.; Stahl, M. T. Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Data Bank and Cambridge Structural Database. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 04, p. 572-584, 2010.

Henary, H. A.; Kurzrock, R.; Falchook, G. S.; Naing, A.; Moulder, S. L.; Wheler, J. J.; Tsimberidou, A. M.; Durand, J.; Yang, P.; Johansen, M. J.; Newman, R.; Khan, R.; Patel, U.; Hong, D. S. Final results of a first-in-human phase I trial of PBI-05204, an inhibitor of AKT, FGF-2, NF- $\kappa$ B, and p70S6K in advanced cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 3023, 2011.

Hoffmann, H. H.; Palese, P.; Shaw, M. L.; Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. **Antiviral Research**, v. 80, n. 02, p. 124-134, 2008.

Honma, M.; Nakada, M. Enantioselective total synthesis of (+)-digitoxigenin. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 12, p. 1541-1544, 2007.

Hu, L.; Guo, D.; Xiao, Z.; Liu, X.; Ma, B.; Lei, M.; Bufogenin derivatives, preparation methods, compositions containing such derivatives and uses thereof. in: C.A.o.S.

Shanghai Institute of Materia Medica (WO/2013/000286), Kingsound & Partners, Beijing, China, 03 jan 2013.

Huang, Y.; Chueh, S.; Teng, C.; Guh, J. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 04, p. 727-733, 2004.

Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Xiang, Z.; Honig, B. On the role of crystal packing forces in determining protein sidechain conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 320, n. 03, p. 597-608, 2002.

Jain, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 04, p. 499-511, 2003.

Jeon, S.; Ko, M.; Lee, J.; Choi, I.; Byun, S. Y.; Park, S.; Shum, D.; Kim, S. Identification of antiviral drug candidates against SARS-CoV-2 from FDA-approved drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 07, p. 00819-20, 2020.

Johnson, P. H.; Walker, R. P.; Jones, S. W.; Stephens, K.; Meurer, J.; Zajchowski, D. A.; Luke, M. M.; Eeckman, F.; Tan, Y.; Wong, L.; Parry, G.; Morgan, T. K.; McCarrick, M. A.; Monforte, J. Multiplex gene expression analysis for high-throughput drug discovery: screening and analysis of compounds affecting genes overexpressed in cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 01, n. 14, p. 1293-1304, 2002.

Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 03, p. 727-748, 1997.

Kaplan, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 01, p. 511-535, 2002.

Kapoor, A.; Cai, H.; Forman, M.; He, R.; Shamay, M.; Arav-Boger, R. Human cytomegalovirus inhibition by cardiac glycosides: evidence for involvement of the hERG gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 09, p. 4891-4899, 2012.

Katz, T. Anesthesia and the Meyer-Overton Rule II. A solution theory view of anesthesia and perturbations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 167, n. 02, p. 99-105, 1994.

Katz, A.; Lifshitz, Y.; Bad-Dinitz, E.; Kapri-Pardes, E.; Goldsgleger, R.; Tal, D. M.; Karlisch, S. J. D. Selectivity of Digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19582-19592, 2010.

Katz, L.; Baltz, R. H. Natural products discovery: past, present and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

Kelley, B. P.; Brown, S. P.; Warren, G. L. Muchmore, S. W. POSIT: flexible shape-guided docking for pose prediction. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 08, p. 1771-1780, 2015.

Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 03, n. 11, p. 935-949, 2004.

Ko, M.; Chang, S. Y.; Byun, S. Y.; Choi, I.; d`Orengiani, A. P. H. d`A.; Shum, D.; Min, J.; Windisch, M. P. Screening of FDA-approved drugs using a MERS-CoV clinical isolate from South Korea identifies potential therapeutic options for COVID-19. **Viruses**, v. 13, n. 04, p. 651, 2021.

Koehn, F. E.; Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 04, n. 03, p. 206-220, 2005.

Koshland, Jr., D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 44, n. 02, p. 98-104, 1958.

Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H. Fármacos que Atuam Sobre o Sistema Cardiovascular, Hematopoiético e Renal – Agentes Cardiovasculares Diversos. **Química Farmacêutica**. In: Guanabara Koogan, 1ª edição, 1988. Parte 4, Cap. 22, p. 319-328.

Krafts, K.; Hempelmann, E.; Skórska-Stania, A. From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. **Parasitology Research**, v. 111, n. 01, p.1-6, 2012.

Kreis, W.; Hensel, A. Stuhlemmer, U. Cardenolide biosynthesis in foxglove. **Planta Medica**, v. 64, n. 06, p. 491-499, 1998.

Kreis, W. The foxglove (*Digitalis*) Revisited. **Planta Medica**, v. 83, n. 12-13, p. 962-976, 2017.

Krogh, A. Croonian lecture: the active and passive exchanges of inorganic ions through the surfaces of living cells and through living membranes generally. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 133, n. 871, p. 140-200.

Kulikov, A.; Eva, A.; Kirch, U.; Boldyrev, A.; Scheiner-Bobis, G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biomembranes**, v. 1768, n. 07, p. 1691-1702, 2007.

Kumar, S.; Ma, B.; Tsai, C.; Sinha, N.; Nussinov, R. Folding and binding cascades: dynamic landscapes and population shifts. **Protein Science**, v. 09, n. 01, p. 10-19, 2000.

Lacarelle, B.; Rahmani, R.; Souza, G.; Durand, A.; Placidi, M.; Cano, J. P. Metabolismo of digoxin, digoxigenin digitoxosides and digoxigenin in human hepatocytes and liver microsomes. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 05, n. 07, p. 576-582, 1991.

Langedijk, J.; Mantel-Teeuwisse, A. K.; Slijkerman, D. S.; Schutjens, M. D. B. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discovery Today*, v. 03, n. 08, p. 1-8, 2015.

Laursen, M.; Yatime, L.; Nissen, P.; Fedosova, N. U. Crystal structure of the high-affinity Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-ouabain complex with Mg<sup>2+</sup> bound in the cation binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 10958-10963, 2013.

Laursen, M.; Gregersen, J. L.; Yatime, L.; Nissen, P.; Fedosova, N. U. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase compared with the ouabain-bound complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 06, p. 1755-1760, 2015.

Leach, A. R. **Molecular Modelling – Principles and Applications**. 2<sup>a</sup> edição, 2001. Prentice Hall, 784 p.

Li, J. W. H.; Vederas, J. C. Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5837, p. 161-165, 2009.

Lifnick, R. L. Hans Horst Meyer and the lipid theory of narcosis. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, n. 07, p. 265-269, 1989.

Lin, W.; Zhang, X.; He, Z.; Jin, Y.; Gong, L.; Mi, A. Reduction of azides to amines or amides with zinc and ammonium chloride as reducing agent. **Synthetic Communications**, v. 32, n. 21, p. 3279-3284, 2002.

Lindholm, P.; Gullbo, J.; Claeson, P.; Goransson, U.; Johansson, S.; Backlund, A.; Larsson, R.; Bohlin, L. Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extract. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 07, n. 04, p. 333-340, 2002.

Lingrel, J. B.; Kuntzweiler, T. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 19659-19662, 1994.

Liu, L.; Askari, A.  $\beta$ -subunit of cardiac Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase dictates the concentration of the functional enzyme in caveolae. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 291, n. 04, p. C569-C578, 2006.

López-Blanco, J. R.; Canosa-Valls, A. J.; Li, Y.; Chacón, P. RCD+: fast loop modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W395-W400, 2016.

López-Lázaro, M.; Pastor, N.; Azrak, S. S.; Ayuso, M. J.; Austin, C. A.; Cortés, F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1642-1645, 2005.

Louvis, A. R.; Silva, N. A. A. N,N-Dimetilformamida (CAS No. 68-12-2). **Revista Virtual de Química**, v. 08, n. 05, p. 1764-1785, 2016.

Lucey, B. P.; Nelson-Rees, W. A.; Hutchins, G. M. Henrietta Lacks, HeLa cells and cell culture contamination. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 09, p. 1463-1467, 2009.

Luckner, M.; Wichtl, M. **Digitalis: Geschichte, Biologie, Chemie, Physiologie, Molekularbiologie, medizinische Anwendung**. 352 p. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2000.

Lüthy, R.; Bowie, J. U.; Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, v. 356, n. 6364, p. 83-85, 1992.

Maddani, M. R.; Moorthy, S. K.; Prabhu, K. R. Chemoselective reduction of azides catalyzed by molybdenum xanthate by using phenylsilane as the hydride source. **Tetrahedron**, v. 66, n. 01, p. 329-333, 2010.

Maggio, E. T.; Ramnarayan, K. Recent developments in computational proteomics. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 266-272, 2001.

Martins, B. S.; Lüdtkke, D. S.; Moro, A. V. Modelos estereoquímicos de adição à carbonila. **Química Nova**, v. 40, n. 03, p. 342-352, 2017.

Mathieu, V.; Pirker, C.; Lassalle, E. M.; Vernier, M.; Mijatovic, T.; DeNeve, N.; Gaussin, J.; Dehoux, M.; Lefranc, F.; Berger, W.; Kiss, R. The sodium pump alpha1 subunit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 9b, p. 3960-3972, 2010.

Meirelles, J. L.; Nepomuceno, F. C.; Penã-García, J.; Schmidt, R. R.; Pérez-Sánchez, H.; Verlo, H. Current status of carbohydrates information in the Protein Data Bank. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 02, p. 684-699, 2020.

Mekhail, T.; Kaur, H.; Ganapathi, R.; Budd, G. T.; Elson, P.; Bukowski, R. M. Phase 1 trial of Anvirzel™ in patients with refractory solid tumors. **Invest New Drug**, v. 24, n. 05, p. 423-427, 2006.

Meyer, H. Zur theorie der alkoholnarkose. **Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 42, p. 109-118, 1899.

Menger, L.; Vacchelli, E.; Keep, O.; Eggermont, A.; Tartour, E.; Zitvogel, L.; Kroemer, G.; Galluzzi. Trial Watch – Cardiac glycosides and cancer therapy. **Oncolmunology**, v. 02, n. 02, p. 23082, 2013.

Mijatovic, T.; Beeck, A. O.; Quaquebeke, E. V.; Dewelle, J.; Darro, F.; Launoit, Y.; Kiss, R. The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor  $\kappa$ B-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 05, n. 02, p. 391-399, 2006a.

Mijatovic, T.; Mathieu, V.; Gaussin, J.; Néve, N.; Ribaucour, F.; Quaquebeke, E. V.; Dumont, P.; Darro, F.; Kiss, R. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrate therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. **Neoplasia**, v. 08, n. 05, p. 402-412, 2006b.

Mijatovic, T.; Quaquebeke, E. V.; Delest, B.; Debeir, O.; Darro, F.; Kiss, R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, n. 01, p. 32-57, 2007.

Mijatovic, T.; Ingrassia, L.; Facchini, V.; Kiss, R. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunits as new targets in anticancer therapy. **Oncologic, Endocrine & Metabolic**, v. 12, n. 11, p. 1403-1417, 2008.

Mijatovic, T.; Dufrasne, F.; Kiss, R. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and cancer. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 01, n. 01, p. 91-106, 2012.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 01, p. 105-111. 2001.

Moult, J.; Fidelis, K.; Kryshtafovych, A.; Schwede, T.; Tramontano, A. Critical assessment of methods of protein structure prediction: progress and new directions in round XI. **Proteins**, v. 84, p.4-14, 2016.

Munkert, J. **Synthese von digitoxigenine-amino-derivate und derem testa uf biologische aktivität**. 2016. 33 p. Relatório (People International Research Staff Exchange Scheme) – Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany.

Nassar, A. F.; Kamel, A. M.; Clarimont, C. Improving the decision-making process in the structural modification of drug candidates: enhancing metabolic stability. **Drug Discovery Today**, v. 09, n. 23, p. 1020-1028, 2004.

Nativelle, C. A. De la digitaline et de la digitale. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 2, p. 201, 1872.

Nelson, D. J.; Brammer, C. N. Toward consistent terminology for cyclohexane conformers in introductory organic chemistry. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 03, p. 292-294, 2011.

Neufeldt, S. R.; Jiménez-Osés, G.; Comins, D. L.; Houk, K. N. A twist on facial selectivity of hydride reductions of cyclic ketones: twist-boat conformers in cyclohexanone, piperidone, and tropinone reactions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 79, n. 23, p. 11609-11618, 2014.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drug over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 03, p. 461-477, 2007.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drug over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 03, p. 770-803, 2020.

Newman, R. A.; Yang, P.; Pawlus, A. D.; Block, K. I. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutics agentes. **Molecular Interventions**, v. 08, n. 01, p. 36-49, 2008.

Nielsen, H.; Tsirigos, K. D.; Brunak, S.; Heijne, G. A brief history of protein sorting prediction. **The Protein Journal**, v. 38, n. 03, p. 200-216, 2019.

Nolte, E.; Sobel, A.; Wach, S.; Hertlein, H.; Ebert, N.; Müller-Uri, F.; Slany, R.; Taubert, H.; Wullich, B.; Kreis, W. The new semisynthetic cardenolide analog 3 $\beta$ -[2-(1-Amantadine)-1-on-ethylamine]-digitoxigenin (AMANTADIG) efficiently suppresses cell growth in human leucemia and urological tumor cell lines. **Anticancer Research**, v. 35, n. 10, p. 5271-5275, 2015.

Nolte, E.; Silva, I. T.; Lukat, S.; Ekici, A. B.; Munkert, J.; Müller-Uri, F.; Kreis, W. Simões, C. M. O.; Vera, J.; Wullich, B.; Taubert, H.; Lai, X. A new semisynthetic cardenolide analog 3 $\beta$ -[2-(1-amantadine)-1-on-ethylamine]-digitoxigenin affects G2/M cell cycle arrest and miRNA expression profiles and enhances proapoptotic survivin-2B expression in renal cell carcinoma cell lines **Oncotarget**, v. 08, n. 07, p. 11676-11691, 2017.

O'Brien, W. J.; Wallick, E. T.; Lingrel, J. B. Amino acid residues of the Na,K-ATPase involved in ouabain sensitivity do not bind the sugar moiety of cardiac glycosides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 11, p. 7707-7712, 1993.

Oliveira, A. R. M.; Szczerbowski, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 07, p. 1971-1974, 2009.

Ogawa, H.; Shinoda, T.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 13742-13747, 2009.

Oliveira, G. C. B. **Reações de Carbociclização Radicalar Mediadas por Hidreto de Tri-N-butilestanho de Meta-iodoaliloxibenzamida Derivada de D-glicose**. 2008. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

O'Neil, M. J. **The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, 15ª edição, 2013. Merck & Co: Whitehouse Station, 2708 p.

Opie, L. H. Digitalis, yesterday and today, but not forever. **Circulation**, v. 06, n. 05, p. 511-513, 2013.

Opie, L. H. Digitalis reappraised: still here today, but gone tomorrow? **South African Medicinal Journal**, v. 105, n. 02, p. 88-89, 2015.

Otoni, F. M. **Síntese de Derivados Glicosídicos de Produtos Naturais Bioativos Como Candidatos a Novos Fármacos**. 2018. 361 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. How many drug targets are there? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 05, n. 12, p. 993-996, 2006.

Overton, E. Studie über die narkose, Zugleich ein Beitrag zur Allgemeiner Pharmakologie, Fischer, Jena: 1901.

Pádua, R. M. **Transformação de Cardenólídeos Digitálicos e da Solasodina por Cultura de Fungos**. 2003. 269 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Pádua, R. M.; Oliveira, A. B.; Filho, J. D. S.; Vieira, G. J.; Takahashi, J. A.; Braga, F. C. Biotransformation of digitoxigenin by *Furasium ciliatum*. **Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3B, p. 614-619, 2005.

Pádua, R. M.; Oliveira, A. B.; Filho, J. D. S.; Silva, M. A.; Takahashi, J. A.; Braga, F. Biotransformation of digitoxigenin by *Cochliobolus lanatus*. **Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 07, p. 1303-1310, 2007.

Palasis, M.; Kuntzweiler, T. A.; Argüello, J. M.; Lingrel, J. B. Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 24, p. 14176-14182, 1996.

Palmgren, M. G.; Nissen, P. P-type ATPase. **Annual Review of Biophysics**, v. 40, n. 01, p. 243-266, 2011.

Patrick, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 6ª edição, 2017. USA: Oxford University Press, 832 p.

Paula, S.; Tabet, M. R.; Ball Jr., W. J. Interaction between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E<sub>2</sub>-Pi form of the enzymes versus activity inhibition. **Biochemistry**, v. 44, n. 02, p. 498-510, 2005.

Perrin, D. R.; Dempsey, B.; Sergeant, E. P. **pKa Prediction for Organic Acids and Bases**, 1ª edição, 1981. Springer, 146 p.

Piccirillo, E.; Amaral, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, n. 06, p. 662, 677, 2018.

Post, R. L.; Jolly, P. C. The linkage of sodium, potassium and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 25, n. 01, p. 118-128, 1957.

Post, R. L.; Merritt, C. R.; Kinsolving, C. R.; Albright, C. D. Membrane Adenosine Triphosphatase as a participant active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 235, n. 06, p. 1796-1802, 1960.

Prassas, I.; Diamandis, E. P. Novel therapeutics applications of cardiac glycosides, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 07, n. 11, p. 926-935, 2008.

Ramos, G. S. **Obtenção de Derivados Semissintéticos das Digitoxigenina com Atividade Citotóxica Frente a Diferentes Linhagens de Células Tumorais**. 2018. 80 p. Monografia de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Rapoport, S. I. The sodium-potassium exchange pump: relation of metabolism to electrical properties of the cell: I. Theory. **Biophysical**, v. 10, n. 03, 246-259, 1970.

Rates, S. M. K.; Bridi, R.; Braga, F. C.; Simões, C. M. O. Heterosídeos Cardioativos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia – Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 1ª edição, 2017. Cap. 18, p. 271-284.

Rodrigues, R. P.; Mantoani, S. P.; Almeida, J. R.; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; Silva, V. B.; Silva, C. H. P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 04, n. 06, p. 739-776, 2012.

Rohde, L. E.; Montera, M. W.; Bocchi, M. E. A., Clausell, N. Albuquerque, D. C. Rassi, S. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 03, p. 436-539, 2018.

Roth, M. T.; Cardin, D. B.; Borazanci, E, H.; Steinbach, M.; Picozzi, V. J.; Rosemury, A.; Wadlow, R. C.; Newman, R. A.; Berlin, J. A Phase, Single-Arm, Open-Label, Bayesian Adaptive Efficacy and Safety Study of PBI-05204 in Patients with Stage IV

Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. **The Oncologist**, v. 25, n. 10, p. 1446-1450, 2020.

Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N. Computational Chemistry. **Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment**. In: Elsevier, 2015. Cap 5, p. 151-189.

Rücker, W. *Digitalis* spp.: *In Vitro* Culture, Regeneration, and the Oroduction of Cardenolides and Other Secondary Products. In: Bajaj, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry – Medicinal and Aromatic Plants I**. Berlin, Heidelberg: Springer, 4<sup>a</sup> edição, 1988, Cap. 21, p. 388-418.

Sakellarios, E. J. Phtalimidsynthesen mit hilfe von p-toluolsulfosäure-estern. **Helvetica Chimica Acta**, v. 29, n. 06, p. 1675-1684, 1946.

Sawlewicz, L.; Weiss, E.; Linde, H. H. A.; Meyer, K. 3 $\alpha$ - und 3 $\beta$ -amino-3-desoxy-digitoxigenin. **Helvetica Chimica Acta**, v. 55, n. 07, p. 2452-2460, 1972.

Saytzeff, A. Zur kenntniss der reihenfolge der analgerung und ausscheidung der jodwasserstoffelemente in organischen verbindungen. **Justus Liebings Annalen der Chemie**, v. 179, n. 03, p. 296-301, 1875.

Schatzmann, H. J. Cardiac glycosides as inhibitors for the active potassium and sodium transport across the red cell membrane. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v. 11, n. 04, p. 346-354, 1953.

Scheiner-Bobis, G. The sodium pump – Its molecular properties and mechanics of ion transport. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 09, p. 2424-2433, 2002.

Schneider, N. F.; Cerella, C.; Simões, C. M.; Diederich, M. Anticancer and immunogenic properties of cardiac glycosides. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1932- 1947, 2017.

Schoner, W.; Scheiner-Bobis, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. **American Journal Cardiovascular Drugs**, v. 07, n. 03, p. 173-189, 2007.

Schönfeld, W.; Weiland, J.; Lindig, C.; Masnyk, M.; Kabat, M. M.; Kurek, A.; Wicha, J.; Repke, K. R. H. The lead structure in cardiac glycosides is 5  $\beta$ ,14  $\beta$ -androstane-3  $\beta$ ,14-diol. **Naunyn-Schmiedeberg`s Archives of Pharmacology**, v. 329, v. 04, p. 414-426, 1985.

Sharabani-Yosef, O.; Bak, A.; Langzam, L.; Lui, Z.; Nir, U.; Braiman, L.; Sweadner, K. J.; Sampson, S. R. Rat skeletal muscle in culture expresses the  $\alpha 1$  but not the  $\alpha 2$  protein subunit isoform of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pump. **Journal of Cellular Physiology**, v. 180, n. 02, p. 236-244, 1999.

Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 02, p. 543-533, 2006.

Shinoda, T.; Ogawa, H.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 466-451, 2009.

Shiratori, O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *in vitro* and *in vivo* studies. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 58, n. 06, p. 521-528, 1967.

Silva, I. T.; Munkert, J.; Nolte, E.; Schneider, N. F. Z.; Rocha, S. C.; Ramos, A. C. P.; Kreis, W.; Braga, F. C.; Pádua, R. M.; Taranto, A. G.; Cortes, V.; Barbosa, L. A.; Wach, S.; Taubert, H.; Simões, C. M. O. Cytotoxicity of AMANTADIG – a semisynthetic digitoxigenin derivative – alone and in combination with docetaxel in human hormone-refractory prostate cancer cells and its effects on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 464-474, 2018.

Sippl, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, v. 17, n. 04, p. 355-362, 1993.

Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 23, p. 394-401, 1957.

Skou, J. C. Enzymatic basis for active transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  across cell membrane. **Physiological Reviews**, v. 45, p. 596-617, 1965.

Skou, J. C.; Esmann, M. The  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 24, n. 03, p. 249-261, 1992.

Slingerland, M.; Cerella, C.; Guchelaar, H. J.; Diedrich, M.; Gelderblom, H. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. **Invest New Drugs**, v. 31, n. 04, p. 1087-1094, 2013.

Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe Jr., E. W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 01, p. 334-395, 2013.

Smith, M. B. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. 8ª edição, 2020. John Wiley & Sons, 2144 p.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2ª edição, 1997. Wiley-Interscience, 800 p.

Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W244-W248, 2005.

Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B.; Snyder, S. A. **Química Orgânica**, Vol. I, 12ª edição, 2018. LTC, 656 p.

Spitzer, R.; Jain, A. N. Surflex-Dock: docking benchmarks and real-world application. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 06, p. 687-699, 2012.

Staudinger, H.; Meyer, J. Über neue organische phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und phosphinimine. **Helvetica Chimica Acta**, v. 02, n. 01, p. 635-646, 1919.

Stenkvist, B.; Bengtsson, E.; Eklund, G.; Eriksson, O.; Holmguist, J.; Nordin, B.; Westman-Naeser, S. Cardiac glycosides and breast cancer, **The Lancet**, v. 01, n. 8115, p. 563, 1979.

Stenkvist, B.; Bengtsson, E.; Eklund, G.; Eriksson, O.; Holmguist, J.; Nordin, B.; Westman-Naeser, S. Evidence of a modifying of hearts glucosides on the development of breast cancer. **Analytical and Quantitative Cytology**, v. 02, n. 01, p. 49-54, 1980.

Stenkvist, B.; Bengtsson, E.; Dahlqvist, B.; Eriksson, O.; Jarkrans, T.; Nordin, B. Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. **New England Journal Medicine**, v. 306, n. 08, p. 484, 1982.

Stenkvist, B. Is *Digitalis* a therapy for breast carcinoma? **Oncology Reports**, v. 06, n. 03, p. 493-496, 1999.

Stoll, A.; Kreis, W. Acetyldigitoxin- $\alpha$  und acetyldigitoxin- $\beta$ . **Helvetica Chimica Acta**, v. 35, p. 1318-1324, 1952.

Stork, G.; West, F.; Lee, H. Y.; Isaacs, R. C. A.; Manabe, S. The total synthesis of a natural cardenolide: (+)-digitoxigenin. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 118, n. 43, p. 10660-10661, 1996.

Su, C. T.; Hsu, J. T. A.; Hsieh, H. P. H.; Lin, P. H.; Chen, T. C.; Kao, C. L.; Lee, C. N.; Chang, S. Y. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v. 79, n. 01, p. 62-70, 2008.

Suzuki, Y.; Kaneno, D.; Tomoda, D. Theoretical study on the mechanism and diastereoselectivity of NaBH<sub>4</sub> reduction. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 11, p. 2578-2583, 2009.

Talluri, S. Virtual screening based prediction of potential drugs for COVID-19. **Preprints**, 2020.

Taylor, P. G. **Mechanism and Synthesis**, 1<sup>a</sup> edição, 2003. Royal Society of Chemistry, 368 p.

Tomazzoni, M. I.; Negrelle, R. R. B.; Centa, M. L. Popular phytotherapy: the instrumental Search as a therapy. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 01, p. 115-121, 2006.

Van Quaquebeke, E.; Simon, G.; André, A.; Dewelle, J.; El Yazidi, M.; Bruyneel, F.; Tuti, J.; Nacoulma, O.; Guissou, P.; Decaestecker, C.; Braekman, J.; Kiss, R.; Darro, F. Identification of a novel cardenolide (2''-Oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent *in vitro* antitumor activities and high *in vivo* tolerance: structure-activity relationship analyses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 03, p. 849-856, 2005.

Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 04, p. 609-623, 2003.

Verli, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1<sup>a</sup> edição, 2014. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 292 p.

Viegas Jr, C. V.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 02, p. 326-337, 2006.

Villhauer, E. B.; Brinkman, J. A.; Naderi, G. B.; Burkey, B. F.; Dunning, B. E.; Prasad, K.; Mangold, B. L.; Russell, M. E.; Hughes, T. E. 1-[[[3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 46, n. 13, p. 2774-2789, 2003.

Wagner, H.; Bladt, S. **Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2ª edição, 1996. Berlin: Springer Science & Business Media, 384 p.

Wang, G.; Guo, Y.; Feng, B.; Li, L.; Huang, C.; Jiao, B. Tanghinigenin from seeds of *Cerbera manghas* L. induces apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 01, p. 31-36, 2010.

Wang, Z.; Sun, H.; Xiaojun, Y.; Li, D.; Xu, L.; Li, Y.; Tian, S.; Hou, T. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, p. 12964-12975, 2016.

Webb, B.; Sali, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Protein Science**, v. 86, p. 2.9.1-2.9.37, 2016.

Wermuth, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 4ª edição, 2015. Academic Press: Elsevier, 904 p.

Wiederstein, M.; Sippl, M. J. ProSA-Web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35W, p. W407-W410, 2007.

Williams, C. J.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Prisant, M. G.; Videau, L. L.; Deis, L. N.; Verma, V.; Kreedy, D. A.; Hintze, B. J.; Chen, V. B.; Jain, S.; Lewis, S. M.; Arendall III, W. B.; Snoeyink, J.; Adams, P. D.; Lovell, S. C.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: more and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 01, p. 293-315, 2018.

Winnicka, K.; Bielawski, K.; Bielawska, A.; Surazynski, A. Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 06, p. 1131-1140, 2008.

Withering, W. **An Account of the Foxglove and Some of its Medical Uses with Practical Remarks on Dropsy, and Other Diseases**, 1785. Birmingham, England: M. Swinney. 238 p.

Wolf, Y. I.; Grishin, N. V.; Koonin, E. V. Estimating the number of protein folds and families from complete genome data. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, n. 04, p. 897-905, 2000.

Xie, Z.; Askari, A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 2434-2439, 2019.

Yadav, V. K.; Jeyaraj, D. A.; Balamurugan, R. The cation complexation model predicts the experimental  $\pi$ -facial selectivity of 2-ax- and 2-eq-substituted cyclohexanones. A detailed *ab initio* MO investigation. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 38, p. 7581-7589, 2000.

Yan, C.; Zou, X. Modeling Protein Flexibility in Molecular Docking. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**. In: Elsevier, 2017. Cap 3.13, p. 319-328.

Yatime, L.; Buch-Pedersen, M. J.; Musgaard, M.; Morth, P.; Winther, A. L.; Pedersen, B.; Olesen, C.; Andersen, J. P.; Vilsen, B.; Schiøtt, B.; Palmgren, M. G.; Møller, J. V.; Nissen, P.; Fedosova, N. P-type ATPases as drug targets: tools for medicine and science. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, n. 04, p. 207-220, 2009.

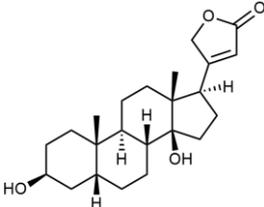
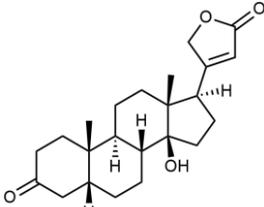
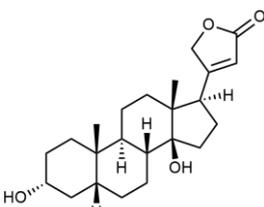
Zhang, L.; Song, J.; Kong, L.; Yuan, T.; Li, W.; Zhang, W.; Hou, B.; Lu, Y.; Du, G. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 216, 107686, 2020.

Ziff, O. J.; Kotecha, D. Digoxin: the good and the bad. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, n. 07, p. 585-595, 2016.

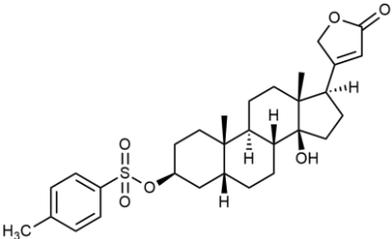
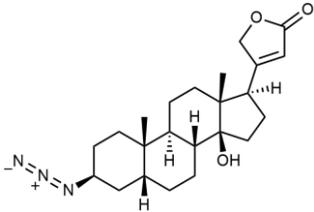
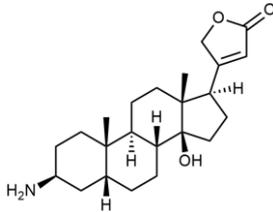
Zimmermann, L.; Stephens, A.; Nam, S.; Rau, D.; Kübler, J.; Lozajic, M.; Gabler, F.; Söding, J.; Lupas, A. N.; Alva, V. A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 15, p. 2237-2243, 2018.

**APÊNDICE A**

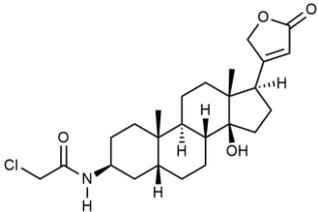
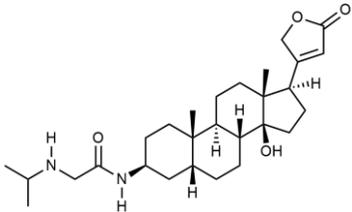
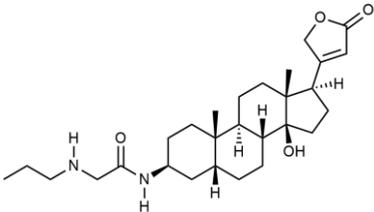
## A. 1 - Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem.

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	1A	374,51	—	0,63 ± 0,05 <sup>c</sup> 1,68 ± 0,52 <sup>e</sup>	3,04 ± 0,07 <sup>b</sup> 1,09 ± 0,02 <sup>e</sup>
	1B	372,50	—	—	—
	1C	374,51	—	> 1,0 <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>

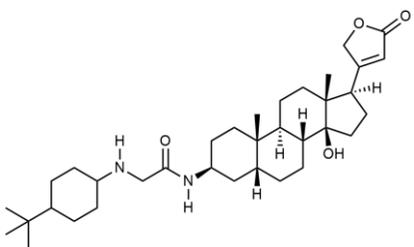
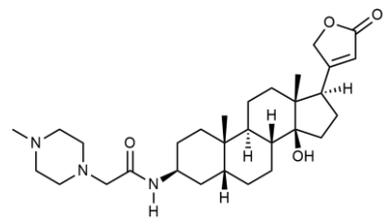
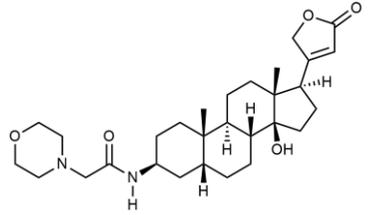
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	1D	528,70	–	–	–
	1E	399,53	–	> 1,0 <sup>c</sup>	–
	1F	373,53	–	> 1,0 <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>

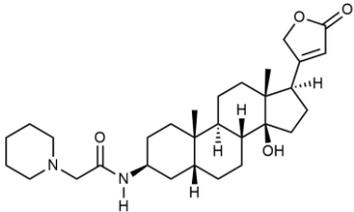
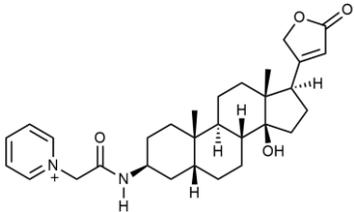
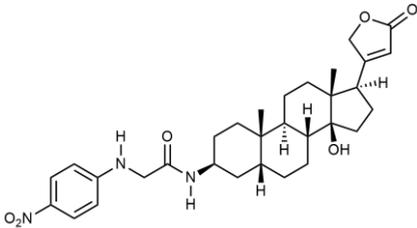
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	1G	450,01	–	–	0,69 ± 0,06 <sup>e</sup>
	Prod 1	472,66	–	0,123 <sup>d</sup>	–
	Prod 2	472,66	–	0,190 <sup>d</sup>	–

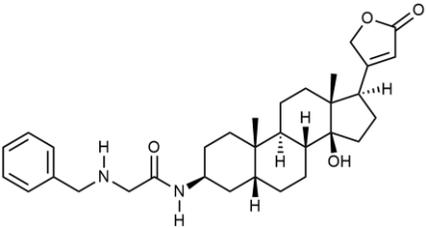
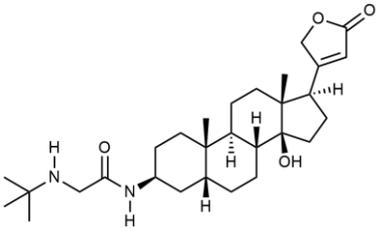
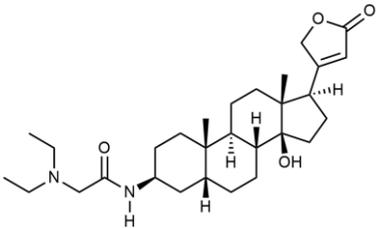
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	1I	568,83	—	—	—
	1J	513,71	—	—	—
	1K	500,67	—	—	—

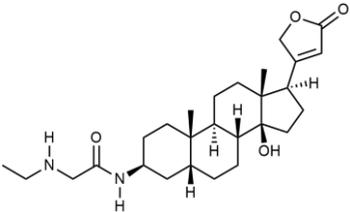
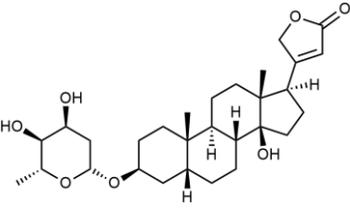
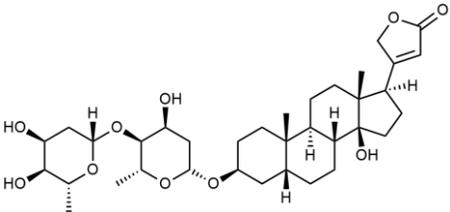
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	1L	498,70	—	—	—
	1M	493,66	—	—	—
	1N	551,67	—	—	—

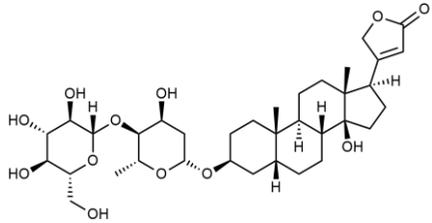
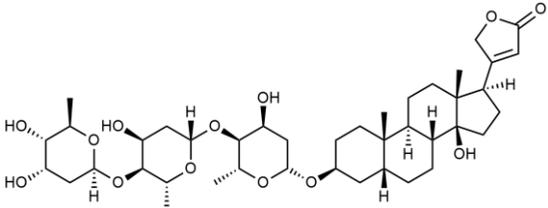
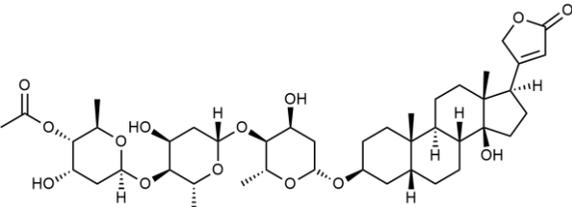
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	1O	520,70	—	—	—
	1P	486,69	—	—	—
	1Q	486,69	—	—	—

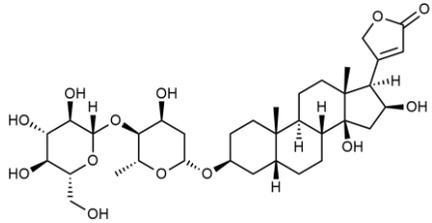
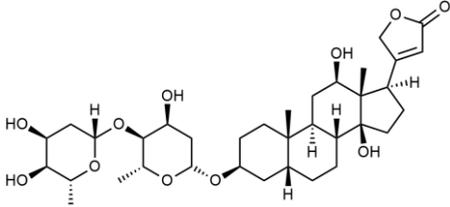
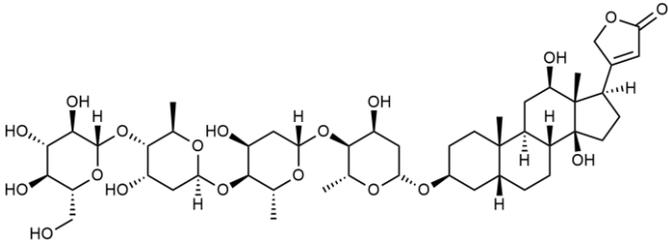
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	1R	458,63	—	—	—
	C-02	504,66	—	0,03 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>b</sup>
	C-03	634,80	—	0,06 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>b</sup>

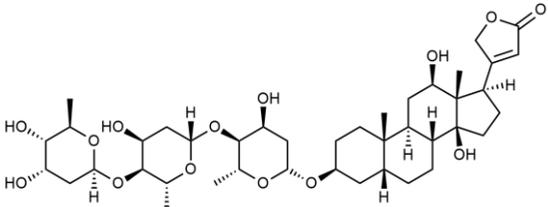
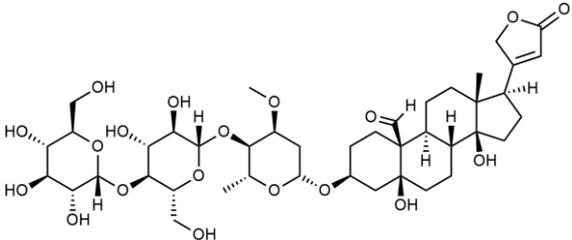
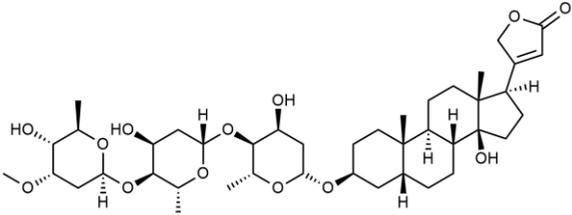
A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	<b>C-04</b>	666,80	–	0,02 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>
	<b>C-05</b> (digitoxina)	764,94	–	0,37 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,34 ± 0,06 <sup>b</sup>
	<b>C-06</b>	806,98	–	0,22 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>b</sup>

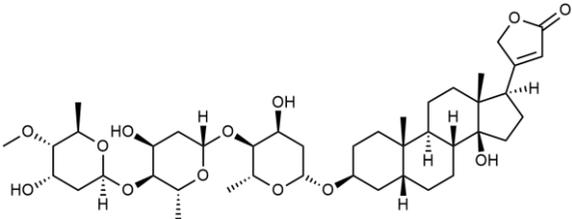
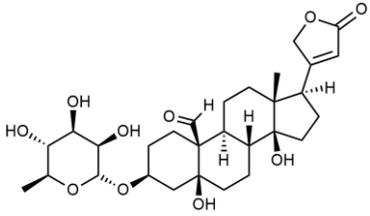
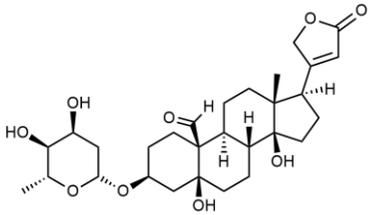
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-08	682,80	–	0,61 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>b</sup>
	C-09	650,80	–	0,15 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>
	C-10	943,08	–	0,13 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,94 ± 0,05 <sup>b</sup>

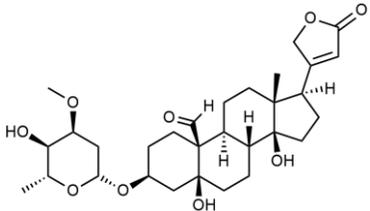
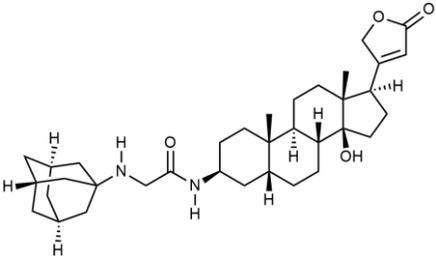
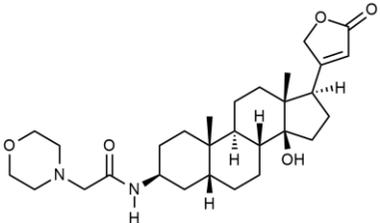
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-12 (digoxina)	780,94	–	0,13 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,66 ± 0,01 <sup>b</sup>
	C-13	872,95	–	0,61 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,03 <sup>b</sup>
	C-14	778,97	–	0,30 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,12 ± 0,02 <sup>b</sup>

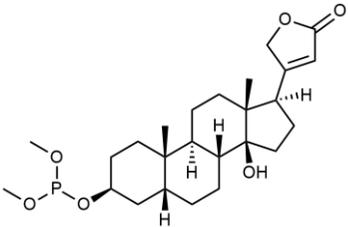
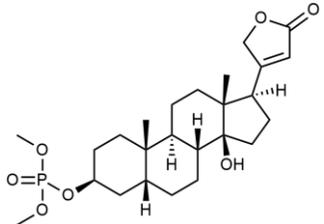
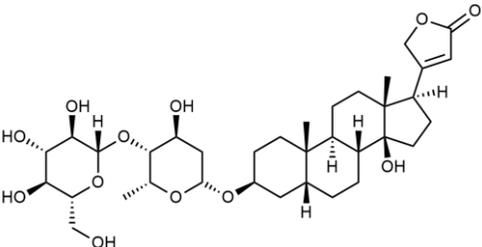
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	<b>C-15</b>	778,97	–	0,19 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>b</sup>
	<b>C-16</b>	550,64	–	0,03 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>b</sup>
	<b>C-17</b>	534,28	–	0,05 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>b</sup>

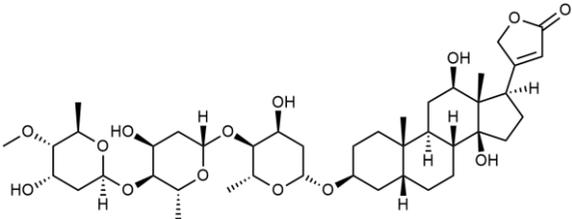
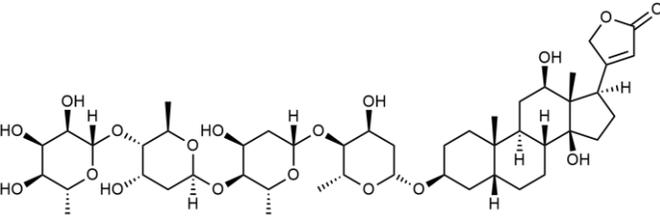
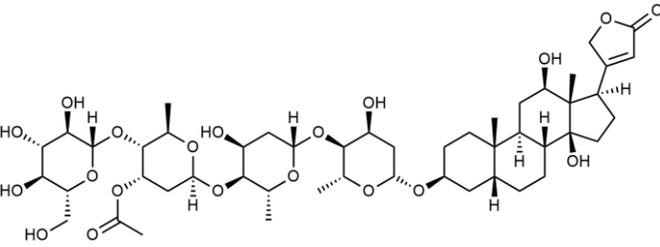
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	<b>C-18</b>	548,66	–	0,12 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>b</sup>
	<b>C-42</b> (amantadig)	564,80	–	0,09 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>b</sup>
	<b>C-43</b>	500,67	–	0,24 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,16 <sup>b</sup>

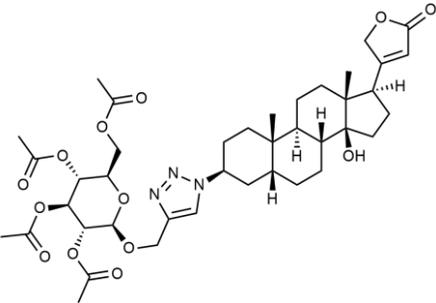
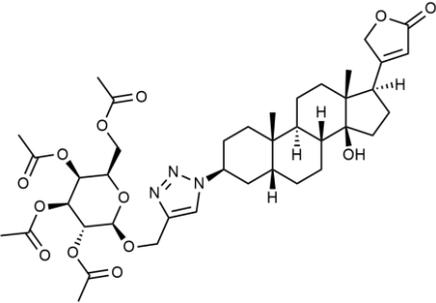
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-44	466,55	–	0,80 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>b</sup>
	C-45	482,55	–	0,28 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,39 ± 0,06 <sup>b</sup>
	C-49	666,80	–	0,63 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,37 ± 0,06 <sup>b</sup>

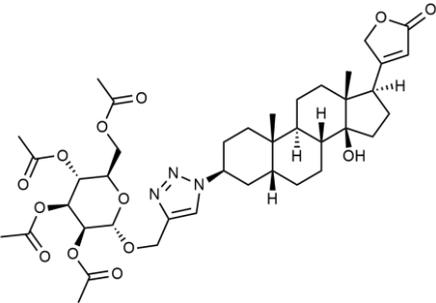
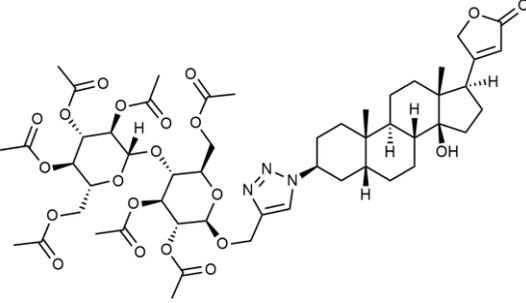
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-51	794,97	–	0,21 ± 0,00 <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>
	C-54	927,08	–	0,24 ± 0,01 <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>
	C-55	985,12	–	0,26 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,27 ± 0,07 <sup>b</sup>

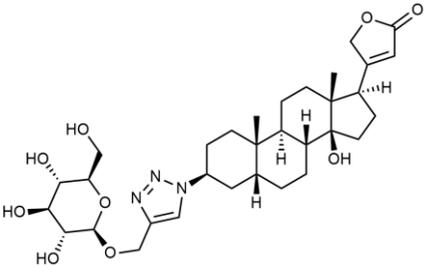
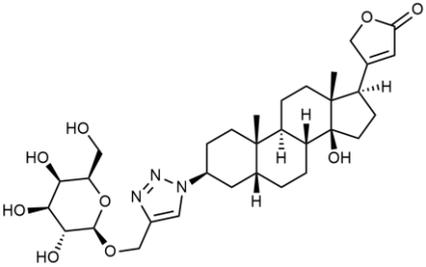
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-67	785,88	–	–	6,27 ± 0,94
	C-68	785,88	–	–	ND <sup>f</sup>

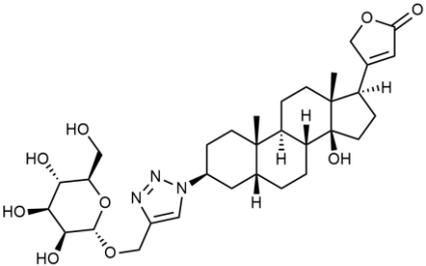
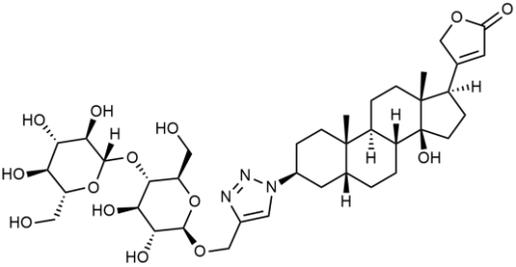
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-69	785,88	4,46 <sup>g</sup>	1,57 ± 0,58 <sup>e</sup>	10,09 ± 1,48 <sup>f</sup>
	C-70	1074,13	–	–	26,33 ± 4,45 <sup>f</sup>

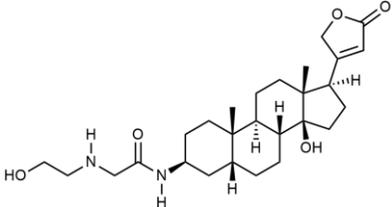
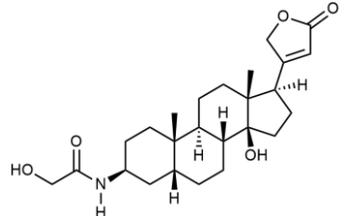
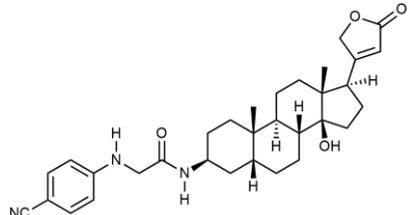
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-71	617,73	–	–	2,79 ± 0,10 <sup>f</sup>
	C-72	617,73	–	–	0,98 ± 0,17 <sup>f</sup>

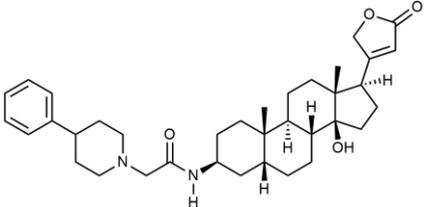
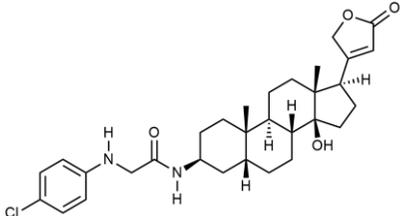
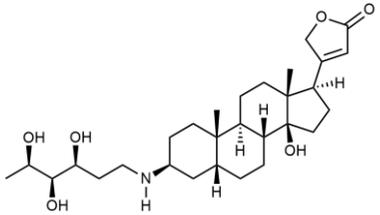
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-73	617,73	5,47 <sup>g</sup>	0,58 ± 0,15 <sup>e</sup>	0,55 ± 0,07 <sup>f</sup>
	C-74	779,87	–	–	4,29 ± 0,06 <sup>f</sup>

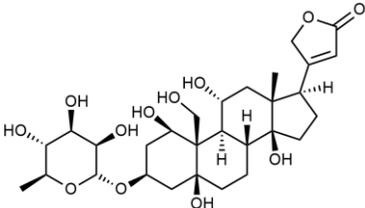
**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	<b>C-76</b>	474,63	1,99 <sup>g</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>f</sup>
	<b>C-77</b>	431,56	0,84 <sup>g</sup>	0,34 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>f</sup>
	<b>C-78</b>	513,69	4,16 <sup>g</sup>	0,54 ± 0,25 <sup>e</sup>	0,60 ± 0,11 <sup>f</sup>

**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (continuação).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	C-79	574,79	6,60 <sup>g</sup>	1,43 ± 0,36 <sup>e</sup>	0,44 ± 0,03 <sup>f</sup>
	C-80	541,12	10,82 <sup>g</sup>	1,38 ± 0,43 <sup>e</sup>	1,51 ± 0,14 <sup>f</sup>
	C-82	505,69	2,05 <sup>g</sup>	0,68 ± 0,13 <sup>e</sup>	1,46 ± 0,33 <sup>f</sup>

**A. 1 – Derivados selecionados para realização dos estudos de ancoragem (conclusão).**

Estrutura	Código	Massa Molar (g/mol)	Inibição da NaK IC <sub>50</sub> (μM)	Citotóxica	Antiviral
				IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
	Ouabaína	584,65	–	–	0,08 <sup>a</sup>

ND = Não definido.

<sup>a</sup> Atividade antiviral determinada pelo ensaio de placas de lise. A IC<sub>50</sub> corresponde a concentração capaz de inibir 50% da replicação da capa VR-733 (HSV-1) em células Vero após tratamento por (Su *et al.*, 2008).

<sup>b</sup> Atividade antiviral determinada pelo ensaio de placas de lise. A IC<sub>50</sub> corresponde a concentração capaz de inibir 50% da replicação da capa KOS (HSV-1) em células Vero após 72 horas de tratamento (Bertol *et al.*, 2011).

<sup>c</sup> Atividade citotóxica determinada pelo método colorimétrico MTT. A IC<sub>50</sub> corresponde a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular (linhagem A549) em 50% após 48 horas de tratamento (Carvalho, 2012).

<sup>d</sup> Atividade citotóxica determinada pelo método colorimétrico SRB. A IC<sub>50</sub> corresponde a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular (linhagem A549) em 50% após 48 horas de tratamento (Ramos, 2018).

<sup>e</sup> Atividade citotóxica determinada pelo método colorimétrico SRB. A IC<sub>50</sub> corresponde a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular (linhagem A549) em 50% após 48 horas de tratamento (Boff *et al.*, 2019).

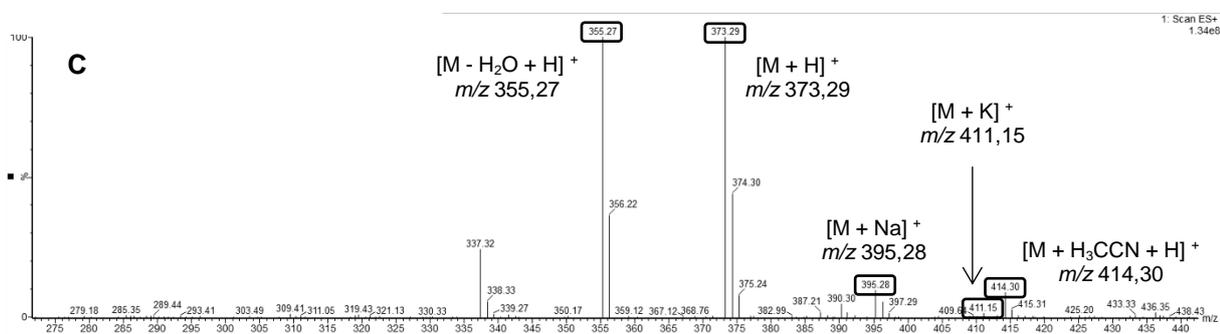
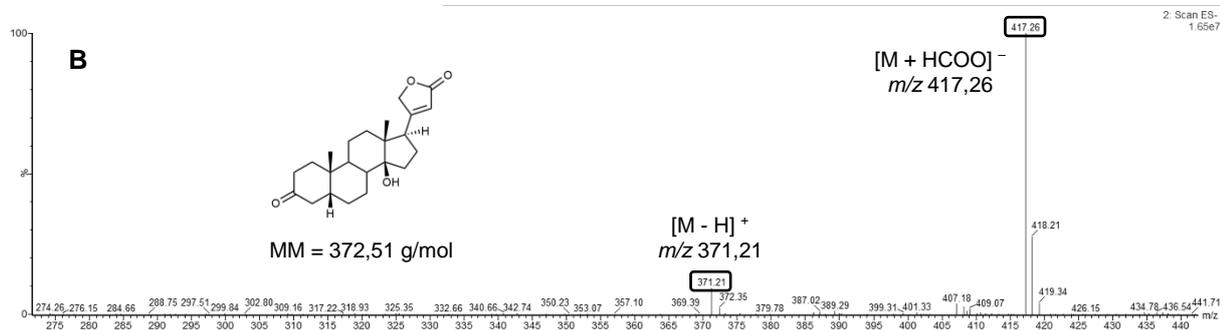
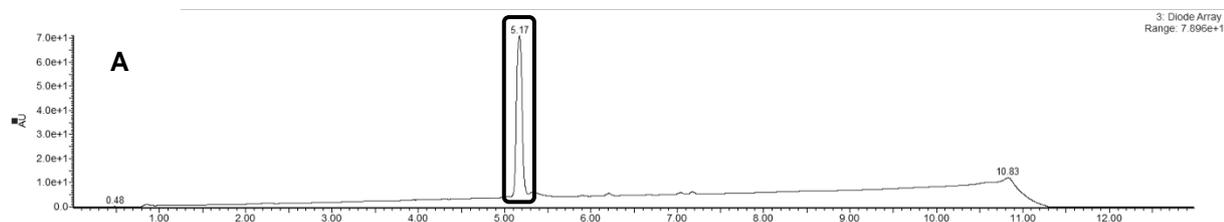
<sup>f</sup> Atividade antiviral determinada pelo ensaio de placas de lise. A IC<sub>50</sub> corresponde a concentração capaz de inibir 50% da replicação da capa KOS (HSV-1) em células Vero após 48 horas de tratamento (Boff *et al.*, 2019).

<sup>g</sup> Inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase determinada conforme metodologia descrita por Nolte *et al.*, 2017 (Boff *et al.*, 2019).

## APÊNDICE B

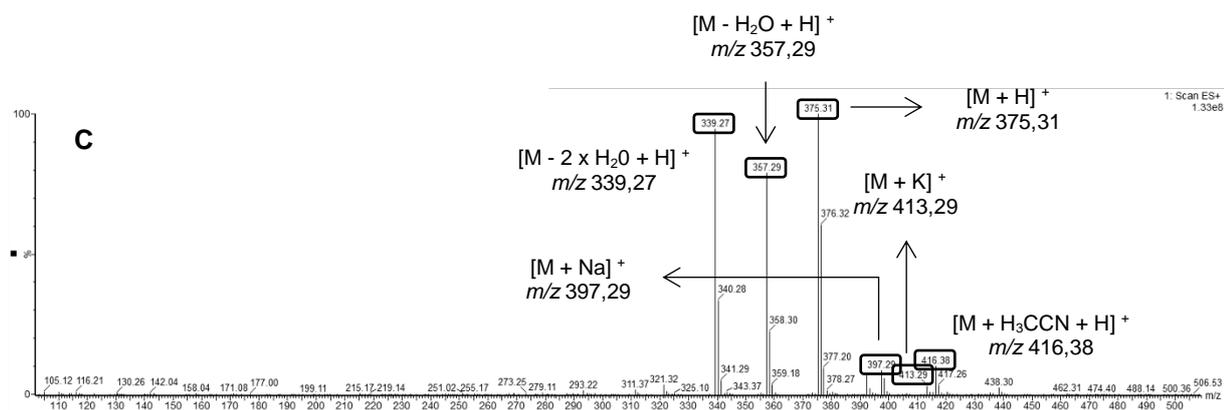
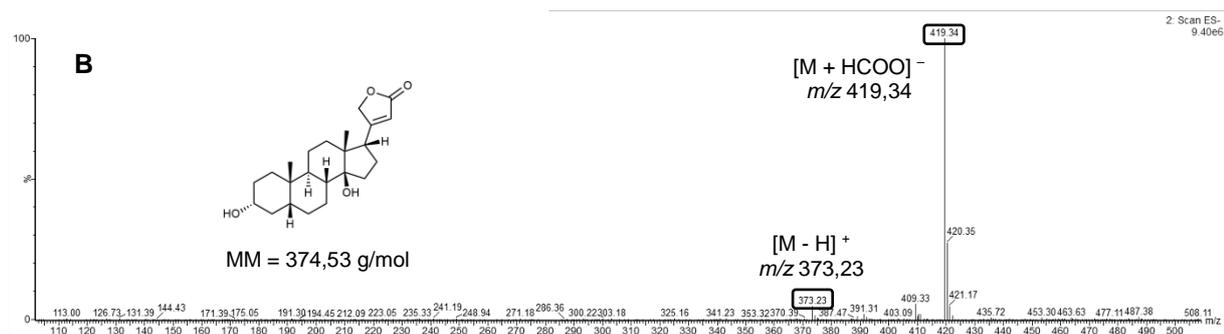
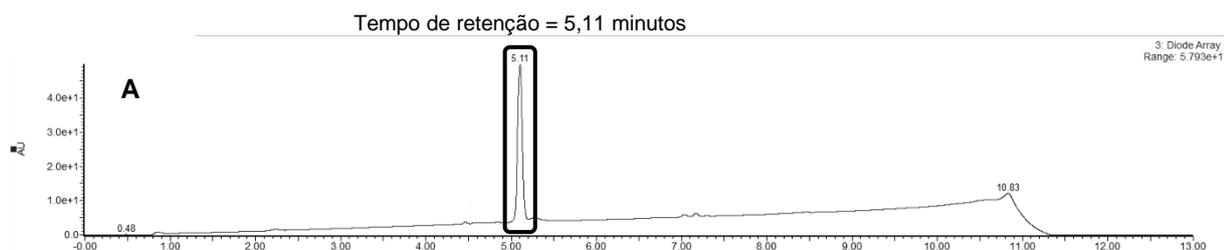
## B. 1 – Análise por UPLC-PDA-ESI-MS do material obtido após reação II.

Tempo de retenção = 5,17 minutos



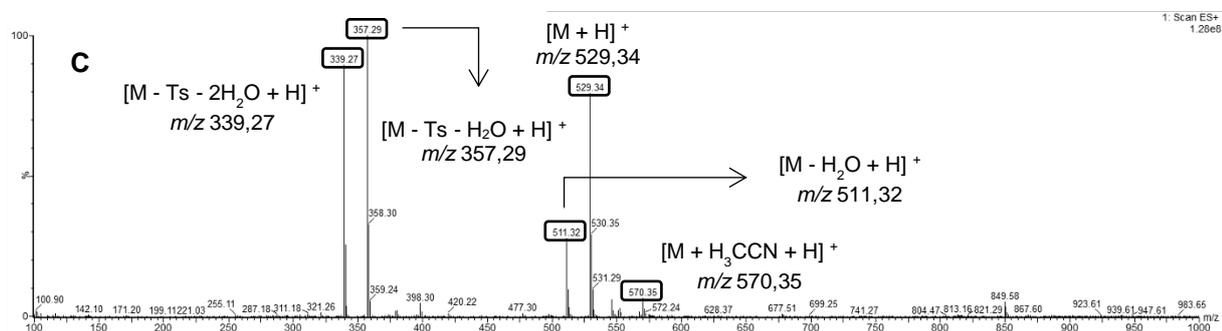
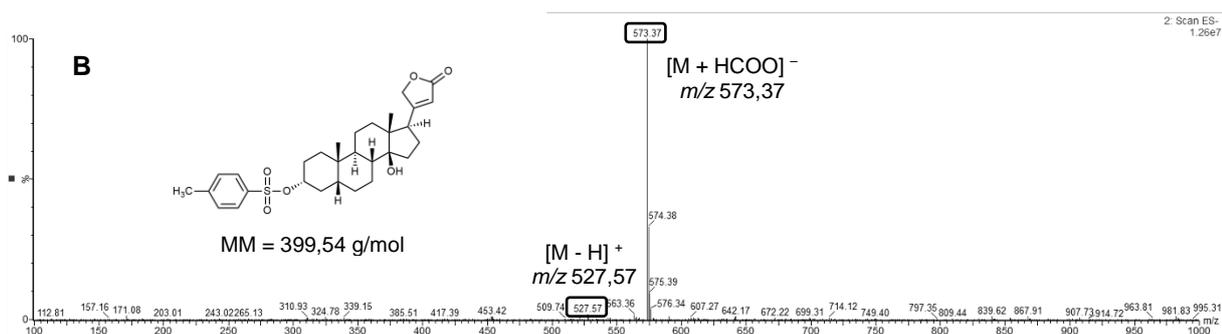
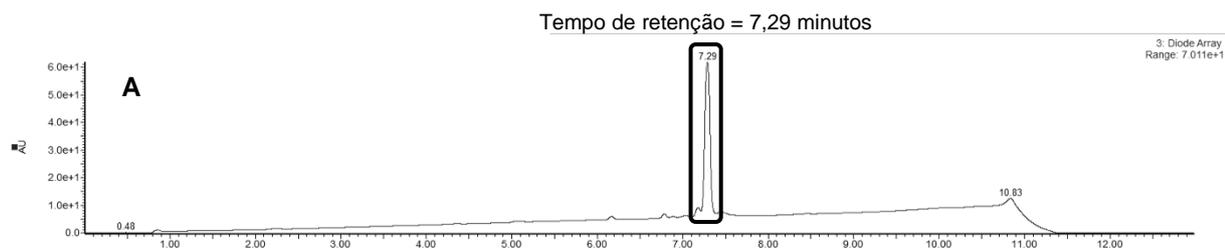
**Legenda:** (A) perfil cromatográfico do produto da reação de oxidação com  $H_2CrO_4$  (1b); (B) espectro de massas obtido no modo ESI-negativo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,17 minutos (principais adutos e fragmentos identificados); (C) espectro de massas obtido no modo ESI-positivo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,17 minutos (principais adutos e fragmentos identificados).

## B. 2 – Análise por UPLC-PDA-ESI-MS do material obtido após reação III.



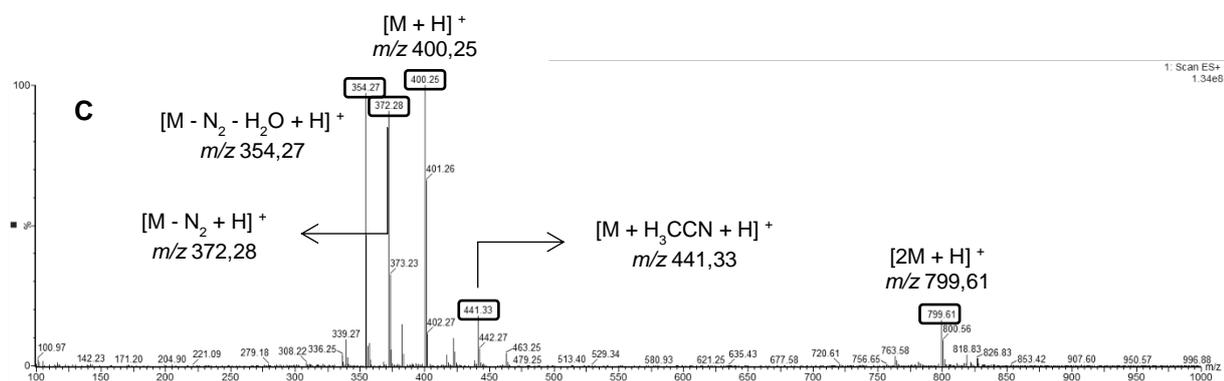
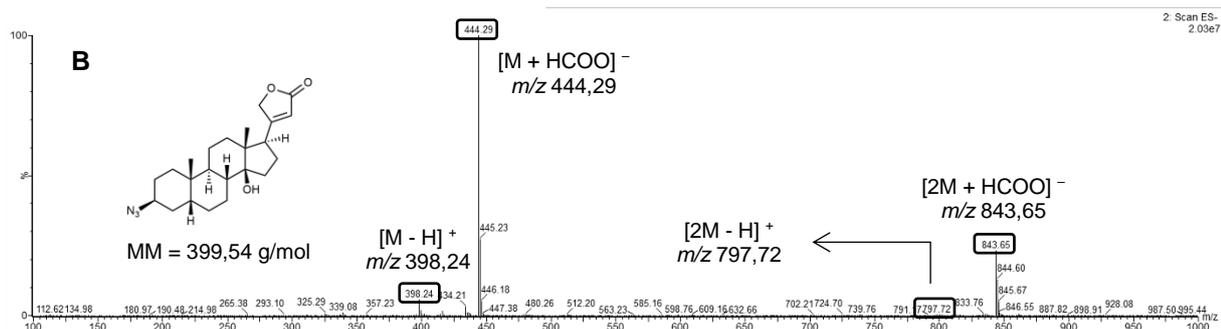
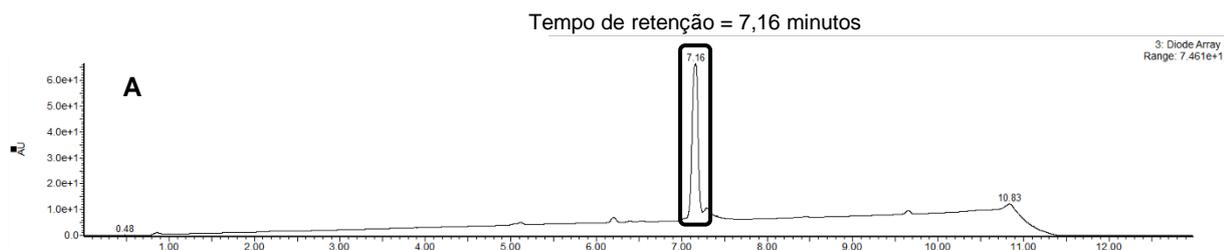
**Legenda:** (A) perfil cromatográfico do produto da reação de redução com  $NaBH_4$  (1c); (B) espectro de massas obtido no modo ESI-negativo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,11 minutos (principais adutos e fragmentos identificados); (C) espectro de massas obtido no modo ESI-positivo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,11 minutos (principais adutos e fragmentos identificados).

### B. 3 – Análise por UPLC-PDA-ESI-MS do material obtido após reação IV.



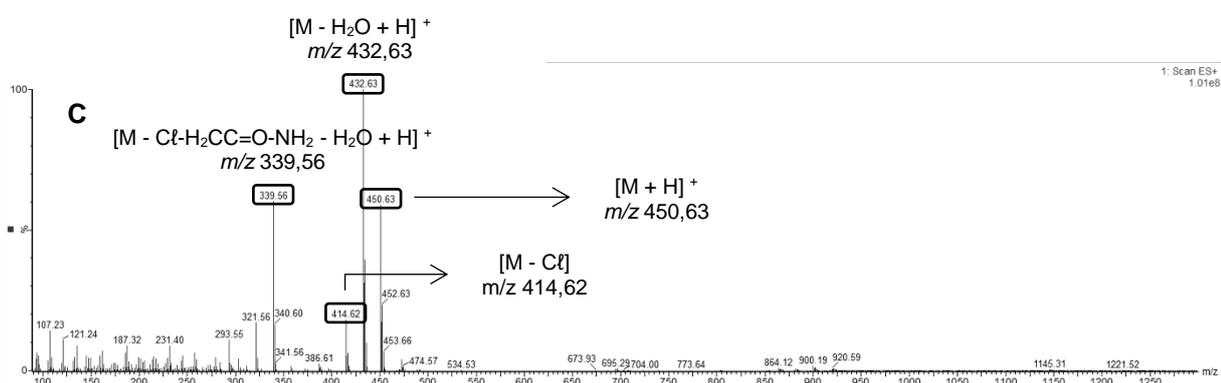
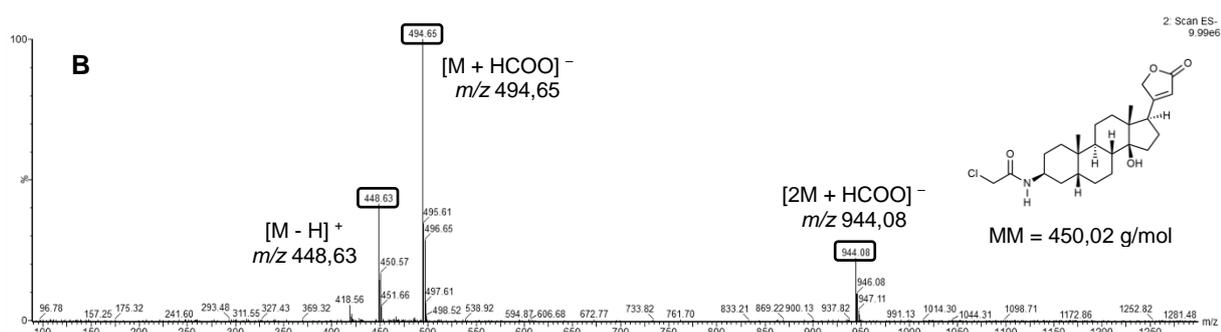
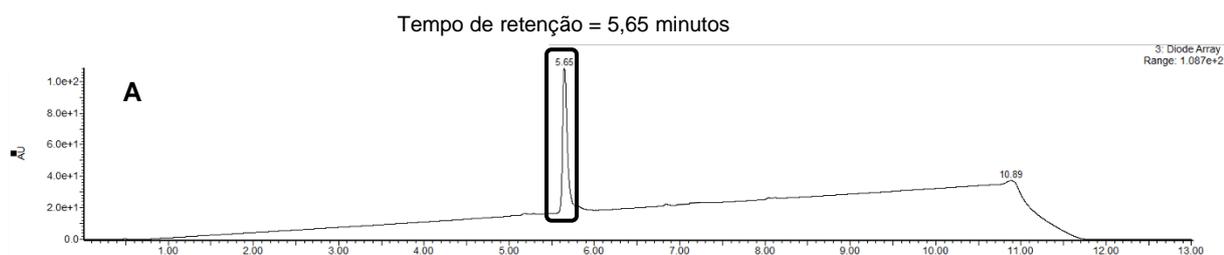
**Legenda:** (A) perfil cromatográfico do produto da reação de tosilção com cloreto de p-toluenossulfonila (1d); (B) espectro de massas obtido no modo ESI-negativo para o pico referente ao tempo de retenção de 7,29 minutos (principais adutos e fragmentos identificados); (C) espectro de massas obtido no modo ESI-positivo para o pico referente ao tempo de retenção de 7,29 minutos (principais adutos e fragmentos identificados).

### B. 4 – Análise por UPLC-PDA-ESI-MS do material obtido após reação V.



**Legenda:** (A) perfil cromatográfico do produto da reação de azidação com  $NaN_3$  (1e); (B) espectro de massas obtido no modo ESI-negativo para o pico referente ao tempo de retenção de 7,16 minutos (principais adutos e fragmentos identificados); (C) espectro de massas obtido no modo ESI-positivo para o pico referente ao tempo de retenção de 7,16 minutos (principais adutos e fragmentos identificados).

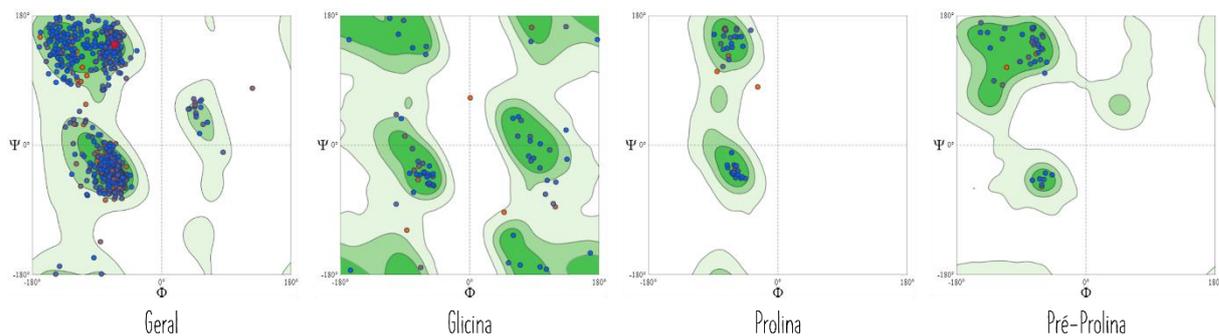
## B. 5 – Análise por UPLC-PDA-ESI-MS do material obtido após reação VII.



**Legenda:** (A) perfil cromatográfico do produto da reação do primeiro acoplamento com cloreto de cloroacetila (1g); (B) espectro de massas obtido no modo ESI-negativo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,56 minutos (principais adutos e fragmentos identificados); (C) espectro de massas obtido no modo ESI-positivo para o pico referente ao tempo de retenção de 5,56 minutos (principais adutos e fragmentos identificados).

## APÊNDICE C

### Modelo 1 (Isoforma $\alpha_1$ )



93,5% (923/987) de todos os resíduos de aminoácidos em região FAVORÁVEL.

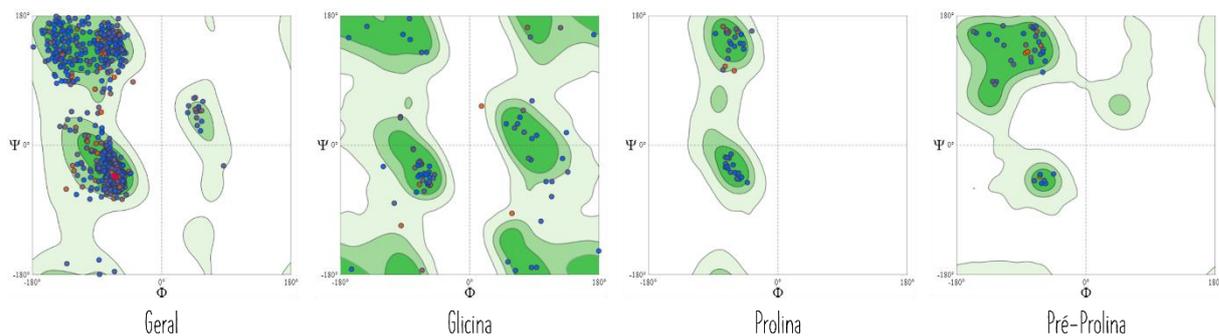
99,2% (979/987) de todos os resíduos de aminoácidos em região PERMITIDA.

Outliers: 8 aminoácidos

(98 Gly, 99 Gly, 314 Glu, 501 Pro, 506 Val, 566 Pro, 576 Val e 1016 Trp)



### Modelo 2 (Isoforma $\alpha_2$ )



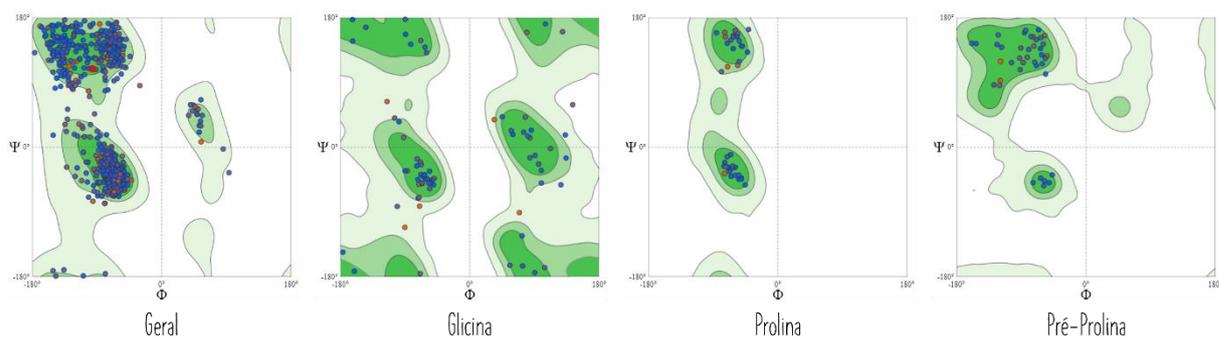
92,6% (913/986) de todos os resíduos de aminoácidos em região FAVORÁVEL.

99,4% (980/986) de todos os resíduos de aminoácidos em região PERMITIDA.

Outliers: 6 aminoácidos

(96 Gly, 97 Gly, 563 Pro, 573 Leu, 733 Ile e 1013 Trp)

### Modelo 3 (Isoforma $\alpha_3$ )



93,5% (924/988) de todos os resíduos de aminoácidos em região FAVORÁVEL.

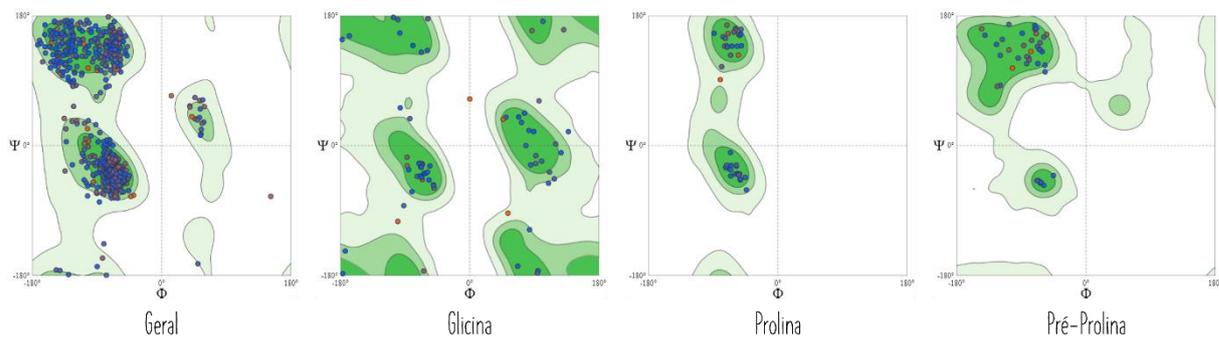
99,6% (984/988) de todos os resíduos de aminoácidos em região PERMITIDA.

Outliers: 4 aminoácidos

(304 Gly, 556 Pro, 566 Val e 976 Ser)

-----

### Modelo 4 (Isoforma $\alpha_4$ )



93,8% (922/983) de todos os resíduos de aminoácidos em região FAVORÁVEL.

99,2% (975/983) de todos os resíduos de aminoácidos em região PERMITIDA.

Outliers: 8 aminoácidos

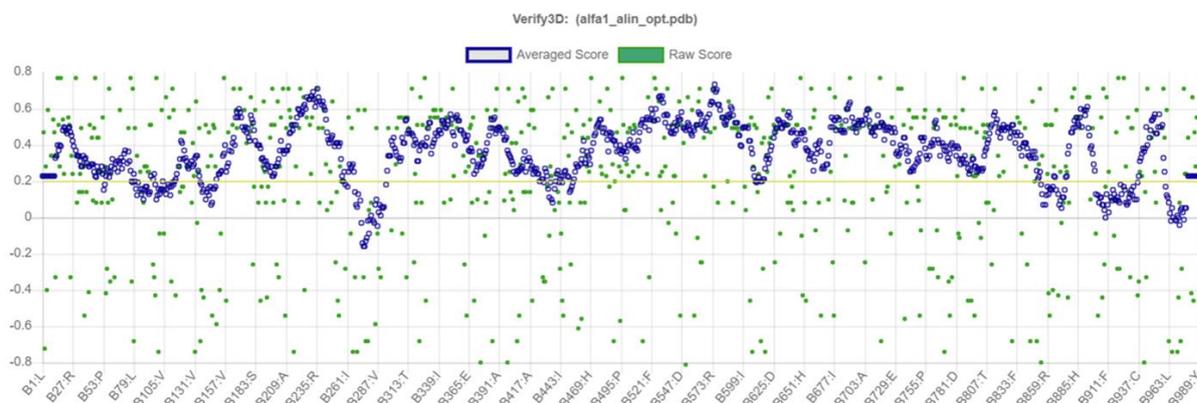
(106 Gly, 107 Gly, 217 Gln, 336 Ile, 473 Ser, 507 Ser, 582 Ile e 742 Ile)

## C. 1 – Análise Verify3D do modelo construído para a isoforma $\alpha_1$ .

83.52% of the residues have averaged 3D-1D score  $\geq 0.2$

**Pass**

At least 80% of the amino acids have scored  $\geq 0.2$  in the 3D/1D profile.

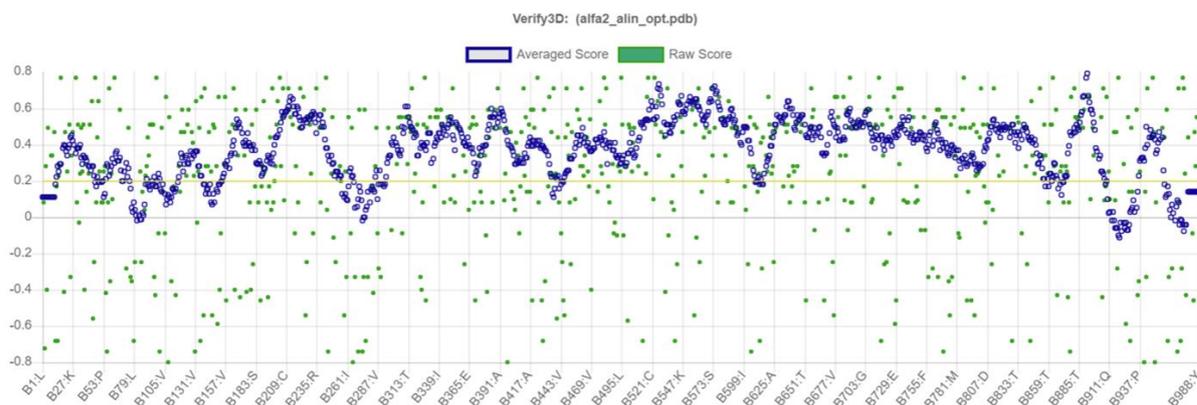


## C. 2 – Análise Verify3D do modelo construído para a isoforma $\alpha_2$ .

82.19% of the residues have averaged 3D-1D score  $\geq 0.2$

**Pass**

At least 80% of the amino acids have scored  $\geq 0.2$  in the 3D/1D profile.

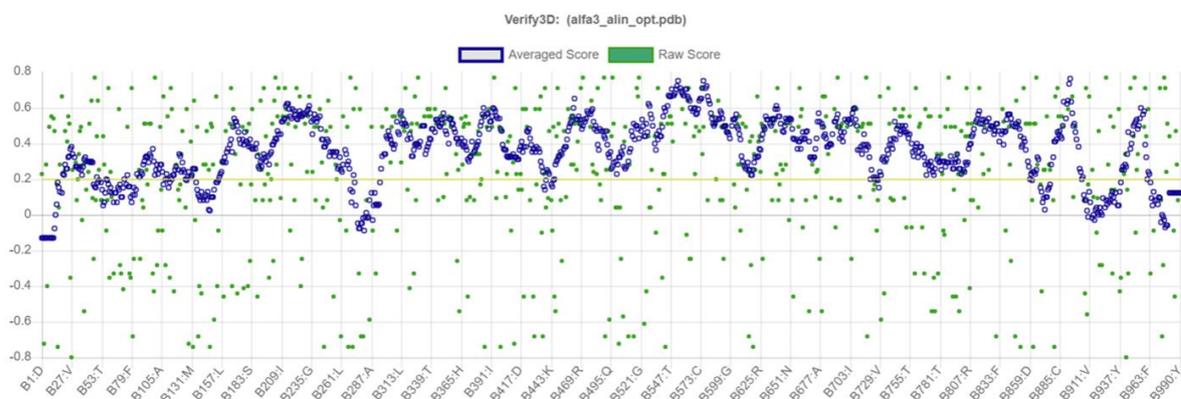


### C. 3 – Análise Verify3D do modelo construído para a isoforma $\alpha_3$ .

81.72% of the residues have averaged 3D-1D score  $\geq 0.2$

**Pass**

At least 80% of the amino acids have scored  $\geq 0.2$  in the 3D/1D profile.

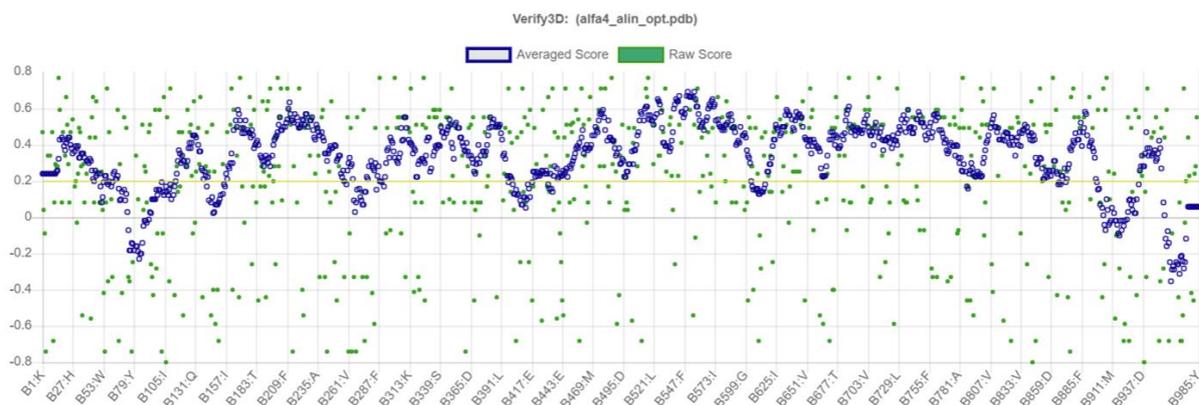


### C. 4 – Análise Verify3D do modelo construído para a isoforma $\alpha_4$ .

80.30% of the residues have averaged 3D-1D score  $\geq 0.2$

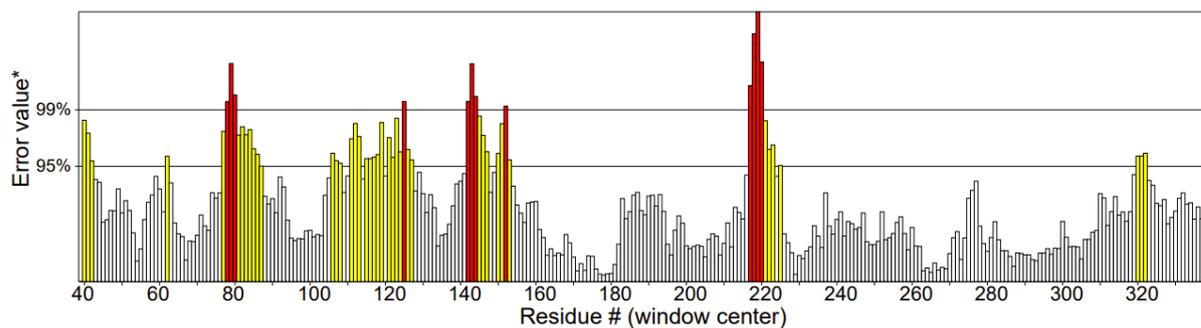
**Pass**

At least 80% of the amino acids have scored  $\geq 0.2$  in the 3D/1D profile.



### C. 5 – Análise ERRAT do modelo construído para a isoforma $\alpha_1$ .

Overall quality factor\*\*: 88.163

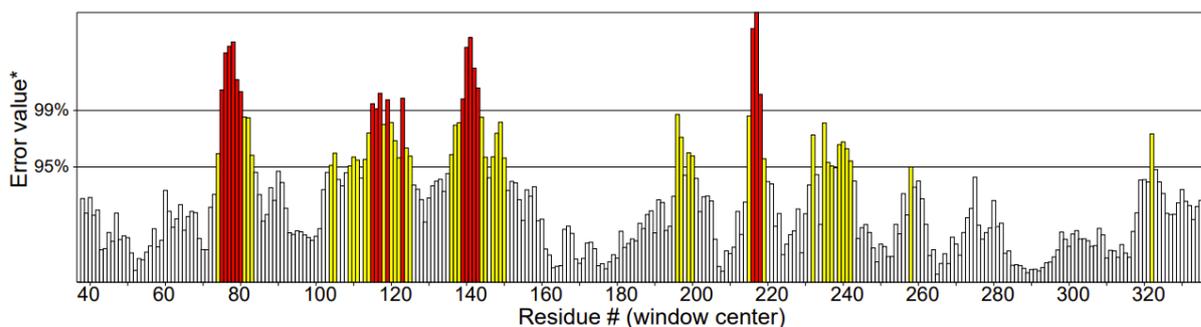


**Legenda:** as regiões aceitáveis são mostradas nas colunas cinzas e as regiões que podem ser rejeitadas em um nível de confiança de 95% e 99% são mostradas em colunas amarelas e vermelhas, respectivamente.

---

### C. 6 – Análise ERRAT do modelo construído para a isoforma $\alpha_2$ .

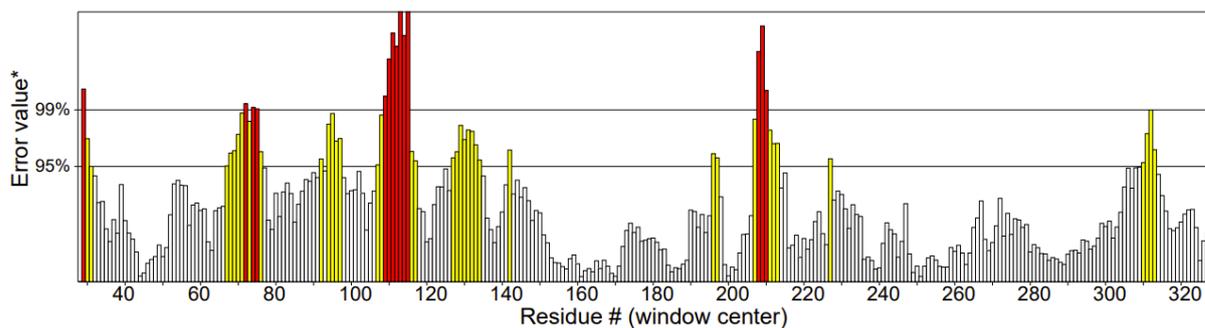
Overall quality factor\*\*: 86.415



**Legenda:** as regiões aceitáveis são mostradas nas colunas cinzas e as regiões que podem ser rejeitadas em um nível de confiança de 95% e 99% são mostradas em colunas amarelas e vermelhas, respectivamente.

### C. 7 – Análise ERRAT do modelo construído para a isoforma $\alpha_3$ .

Overall quality factor\*\*: 87.768

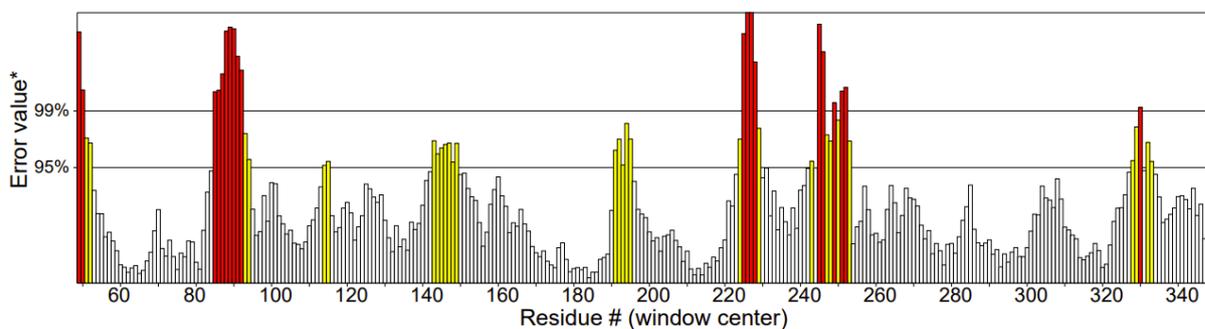


**Legenda:** as regiões aceitáveis são mostradas nas colunas cinzas e as regiões que podem ser rejeitadas em um nível de confiança de 95% e 99% são mostradas em colunas amarelas e vermelhas, respectivamente.

---

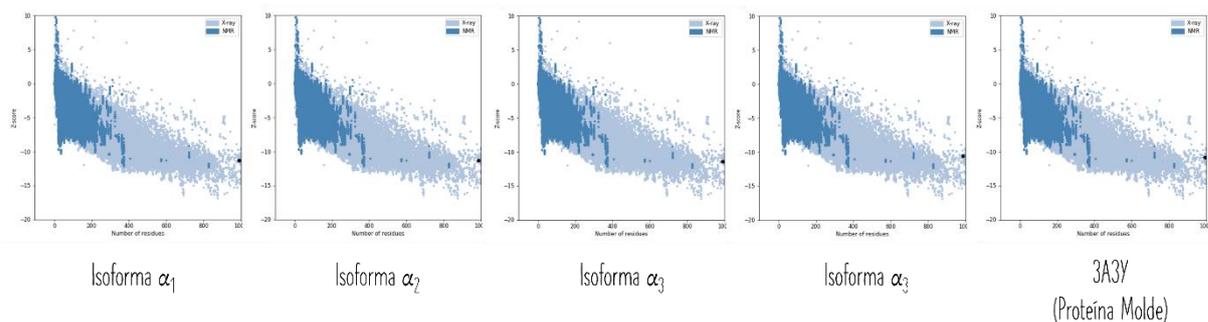
### C. 8 – Análise ERRAT do modelo construído para a isoforma $\alpha_4$ .

Overall quality factor\*\*: 87.718

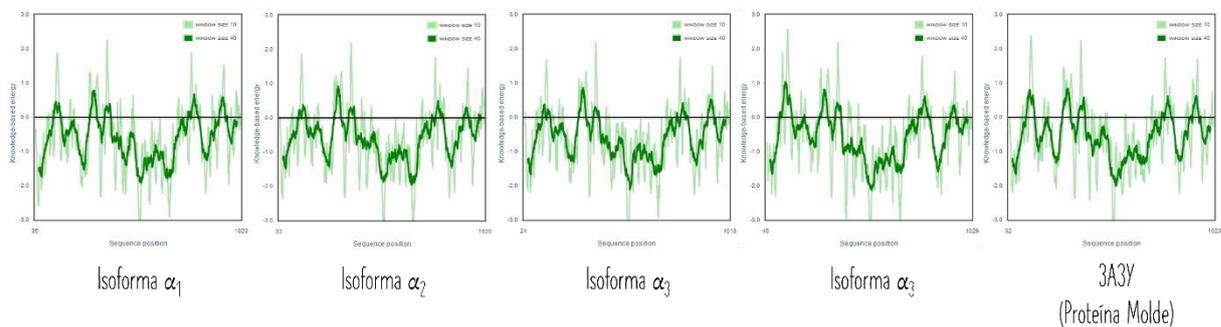


**Legenda:** as regiões aceitáveis são mostradas nas colunas cinzas e as regiões que podem ser rejeitadas em um nível de confiança de 95% e 99% são mostradas em colunas amarelas e vermelhas, respectivamente.

### C. 9 – Análise Z-Score dos modelos construídos.



### C. 10 – Análise da Qualidade do Modelo Local dos modelos construídos.



## APÊNDICE D

Tabela D. 1 – Derivados selecionados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_1$  empregando o pacote computacional *OE Docking*.

	Código	Probabilidade	Qualidade do Resultado	Pontuação Total
1	C-44	0,72	Bom	- 7,07
2	1D	0,50	Medíocre	- 6,99
3	1E	0,50	Medíocre	- 6,86
4	1F	0,42	Medíocre	- 6,73
5	<b>C-02</b>	0,85	Ótimo	- 6,44
6	1O	0,50	Medíocre	- 6,20
7	<b>C-45</b>	0,72	Bom	- 6,09
8	1L	0,50	Medíocre	- 6,07
9	1K	0,50	Medíocre	- 5,89
10	C-43	0,5	Medíocre	- 5,89
11	1G	0,72	Bom	- 5,33
12	<b>C-77</b>	0,72	Bom	- 5,06
13	Prod 2	0,50	Medíocre	- 4,75
14	1J	0,50	Medíocre	- 4,51
15	1P	0,50	Medíocre	- 4,42
16	C-79	0,42	Medíocre	

Os derivados considerados como “ativos” foram destacados em negrito.

**Tabela D. 2 – Derivados penalizados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_1$  empregando o pacote computacional *OEdocking*.**

	<b>Código</b>	<b>Probabilidade</b>	<b>Qualidade</b>	<b>Clash</b>	<b>Pontuação Total</b>
<b>1</b>	C-82	0,50	Medíocre	0,67	- 5,86
<b>2</b>	<b>C-03</b>	0,50	Medíocre	1,30	- 5,61
<b>3</b>	Ouabaína	0,91	Ótimo	0,65	- 5,31
<b>4</b>	<b>C-09</b>	0,42	Medíocre	0,70	- 4,30
<b>5</b>	<b>C-17</b>	0,42	Medíocre	1,34	- 3,10
<b>6</b>	<b>C-18</b>	0,50	Medíocre	1,43	- 2,54
<b>7</b>	C-78	0,42	Medíocre	0,99	- 1,99
<b>8</b>	<b>C-16</b>	0,82	Ótimo	0,82	- 1,76
<b>9</b>	<b>C-04</b>	0,50	Medíocre	1,18	- 1,43
<b>10</b>	C-08				
<b>11</b>	C-49				

Os derivados considerados como “ativos” foram destacados em negrito.

**Tabela D. 3 – Derivados selecionados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_3$  empregando o pacote computacional *OE Docking*.**

	<b>Código</b>	<b>Probabilidade</b>	<b>Qualidade do Resultado</b>	<b>Pontuação Total</b>
<b>1</b>	1F	0,42	Medíocre	- 5,69
<b>2</b>	C-82	0,42	Medíocre	- 5,51
<b>3</b>	<b>C-02</b>	0,85	Ótimo	- 5,31
<b>4</b>	C-44	0,72	Bom	- 5,04
<b>5</b>	1E	0,50	Medíocre	- 5,04
<b>6</b>	1B	0,50	Medíocre	- 4,92
<b>7</b>	<b>C-77</b>	0,50	Medíocre	- 4,89
<b>8</b>	Prod 1	0,50	Medíocre	- 4,87
<b>9</b>	1J	0,50	Medíocre	- 4,52
<b>10</b>	1C	0,50	Medíocre	- 4,44
<b>11</b>	Ouabaína	0,99	Ótimo	- 4,25
<b>12</b>	<b>C-76</b>	0,50	Medíocre	- 4,22
<b>13</b>	<b>C-45</b>	0,72	Bom	- 4,21
<b>14</b>	1G	0,72	Bom	- 4,16

Os derivados considerados como “ativos” foram destacados em negrito.

**Tabela D. 4 – Derivados penalizados na simulação de ancoragem frente a isoforma  $\alpha_1$  empregando o pacote computacional *OE Docking*.**

	<b>Código</b>	<b>Probabilidade</b>	<b>Qualidade</b>	<b>Clash</b>	<b>Pontuação Total</b>
<b>1</b>	<b>C-18</b>	0,50	Medíocre	2,20	- 4,20
<b>2</b>	<b>C-17</b>	0,50	Medíocre	2,45	- 3,96
<b>3</b>	<b>C-16</b>	0,82	Ótimo	1,04	- 2,41
<b>4</b>	C-49	0,50	Medíocre	0,98	- 1,36
<b>5</b>	1M	0,42	Medíocre	2,01	- 0,89
<b>6</b>	C-43	0,42	Medíocre	2,00	- 0,80
<b>7</b>	1K	0,42	Medíocre	2,00	- 0,80
<b>8</b>	1L	0,42	Medíocre	1,98	- 0,67
<b>9</b>	Prod 2	0,42	Medíocre	1,97	- 0,03
<b>10</b>	C-80	0,42	Medíocre	2,00	0,68
<b>11</b>	C-78	0,42	Medíocre	2,00	0,81
<b>12</b>	1Q	0,42	Medíocre	2,33	0,98
<b>13</b>	1P	0,42	Medíocre	2,33	1,09

Os derivados considerados como “ativos” foram destacados em negrito.