

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Sabrina Stefanie dos Santos

**Funcionalização de indóis através
da reação de heterohidroarilação de
alcinos: estudo metodológico e
avaliações farmacológicas**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2019

Sabrina Stefanie dos Santos

Funcionalização de indóis através da reação de heterohidroarilação de alcinos: estudo metodológico e avaliações farmacológicas

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de
Mestre.

Orientadora: Dra. Marla Narciso Godoi
Coorientadora: Dra. Dinara Jaqueline Moura

**Porto Alegre
2019**

Catálogo na Publicação

Santos, Sabrina Stefanie dos

Funcionalização de indóis através da reação de heterohidroarilação de alcinos: estudo metodológico e avaliações farmacológicas / Sabrina Stefanie dos Santos. -- 2019.

145 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Marla Narciso Godoi ;
coorientador(a): Prof.^a Dr.^a Dinara Jaqueline Moura.

1. Funcionalização do indol. 2. Heterohidroarilação de alcinos. 3. Ensaio in silico. 4. Biofilmes. 5. Citotoxicidade. I. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof.^a Marla Godoi, pela confiança que depositaste em mim para a realização deste projeto. Obrigada por compartilhar comigo o teu conhecimento, e ter tido paciência para me ensinar o que é a pesquisa acadêmica, a importância de sermos pesquisadores, bem como me incentivar a seguir em frente.

Ao meu amor, Thelmon Deken, pela parceria e principalmente compreensão nos diversos momentos que precisei me ausentar, ou me fechar na minha bolha, com o objetivo de concluir este mestrado. Foste parte fundamental para que eu alcançasse esta meta. Sem esquecer da Pupuka, que esteve presente, literalmente, em cima dos livros e artigos, durante todo o tempo.

À minha parceira de pesquisa, Ms. Fernanda Rossatto, obrigada pela paciência que tiveste ao me ensinar sobre o mundo dos biofilmes, bem como todo o apoio que me deste na redação e resultados deste trabalho. À professora Karine Zimmer, que possibilitou a realização dos ensaios microbiológicos.

À Danielle, pelos experimentos realizados e pela persistência em buscar conhecimento para que estes resultados saíssem em tempo da publicação desta dissertação. À minha coorientadora, prof.^a Dinara Moura, que oportunizou a realização dos ensaios nas células, no Laboratório de Genética e Toxicologia.

Aos colegas da Quimed que participaram, de alguma forma, da elaboração dos resultados aqui apresentados, em especial ao Matheus Ribeiro, que esteve ao meu lado no começo de tudo isso. E ao Matheus Panasuk, que esteve comigo durante o ano de 2017.

Às colegas Bianca Dalberto, Andressa Weber e Helena Salles, do LAMOCA – UFRGS, pela parceria infinita com as análises de RMN, troca de ideias e pela amizade que fizemos.

Ao professor Paulo Schneider, pelo incentivo que nos foi dado ao abrir as portas de seu laboratório, na UFRGS, para nossa pesquisa.

A todos os integrantes do laboratório 405, do prédio 3, da UFCSPA.

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPQ, pelo financiamento da pesquisa.

Aos colégios onde leciono, Colégio Sinodal Progresso e Colégio Miguel Lampert.

A todos os meus alunos, é principalmente por vocês que estou sempre me aperfeiçoando.

A Deus.

RESUMO

O indol é um heterociclo aromático amplamente empregado na indústria farmacêutica e também muito explorado como intermediário sintético em química orgânica, com a finalidade de obter-se novas moléculas com potencial bioatividade. Tendo em vista que núcleos indólicos estão presentes em diversos produtos de origem natural e sintética, diversas metodologias de funcionalização do indol estão disponíveis na literatura, como por exemplo, a heterohidroarilação de alcinos. Visto isso, este estudo teve como objetivo principal a síntese de moléculas indólicas para avaliação biológica, tendo como base o método de hidroarilação de Fujiwara.

A fim de otimizar resultados de tempo, rendimento e seletividade das reações, variáveis como sistemas de solventes e proporções estequiométricas dos reagentes, foram modificadas. Sendo que a melhor contribuição para o aumento do rendimento da reação foi advinda da variação da proporção estequiométrica, e a partir da variação dos sistemas de solventes, foi possível observar a diferença na seletividade das reações. Tais observações podem estar relacionadas ao mecanismo operante no curso da reação, sendo necessárias maiores investigações a esse respeito.

Ensaio de atividades biológicas *in vitro* foram realizados a fim de avaliar a citotoxicidade induzida pelas moléculas em células de glioblastomas resistentes e sensíveis a Temozolomida (TMZ), droga utilizada como primeira escolha na quimioterapia. Os resultados frente às duas linhagens, T98G e U87, apresentaram efeitos citotóxicos a todas as substâncias testadas.

Também foram realizados ensaios microbiológicos de avaliação do potencial de inibição e erradicação de biofilmes formados pelas bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, nos quais todas as moléculas apresentaram atividade antibiofilme frente às bactérias testadas, principalmente contra a *S. epidermidis*.

A partir da análise dos resultados obtidos, tanto *in silico* quanto *in vitro*, é possível concluir que moléculas contendo o núcleo indólico apresentam potencial atividade biológica.

Palavras-chave: Funcionalização do indol. Heterohidroarilação de alcinos. Ensaio *in silico*. Ensaio *in vitro*. Citotoxicidade. Biofilmes.

ABSTRACT

Indole is an aromatic heterocycle widely used in the pharmaceutical industry, and also wide exploited as a synthetic intermediate in organic chemistry, in order to obtain new molecules with potential bioactivity. Since indole nucleus are present in several products of natural and synthetic origin, several methodologies of indole functionalization are available in the literature, such as, heterohydroarylation of alkynes.

This study has as main focus the synthesis of indolic molecules for biological evaluation based on the hydroarylation method of Fujiwara.

In order to optimize results related to time, yield and selectivity of the reactions, variables such as solvent systems and stoichiometric proportions of the reactants were modified. As the best contribution to increase the reaction yield was due to the variation of the stoichiometric ratio, and from the variation of the solvent systems, which it was possible to observe the difference in the selectivity of the reactions. Such observations may be related to the operating mechanism in the course of the reaction, and further investigations are necessary in this subject.

In vitro biological activity assays were performed to evaluate the molecule-induced cytotoxicity in resistant and Temozolomide-sensitive (TMZ) glioblastoma cells, the drug used as the first choice in chemotherapy. The results against the two strains, T98G and U87, presented cytotoxic effects to all tested substances.

Microbiological tests were also carried out to evaluate the potential for inhibition and eradication of biofilms formed by bacteria *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*, in which all the molecules presented antibiofilm activity against the bacteria tested; moreover, mainly against *S. epidermidis*.

From the analysis of the results obtained, both *in silico* and *in vitro*, it is possible to conclude that molecules containing the indole nucleus have potential biological activity.

Keywords: Functionalisation of indole. Heterohydroarylation of alkynes. *In silico* assays. *In vitro* assays. Cytotoxicity. Biofilms.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOH	Ácido acético
ADME/Tox	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ALH	Aceptores de ligação de hidrogênio
Ar	Arila ou areno
ATCC	Coleção padrão de cultura americana
ATP	Trifosfato de adenosina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CN	Controle negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
Cu(OAc) ₂	Acetato de Cobre II
DLH	Doadores de ligação de hidrogênio
DMEM	Meio de cultura modificado <i>Dulbecco</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
EPS	Substância exopolimérica
ESI	Ionização por elétron <i>spray</i>
EtOH	Etanol
EWG	Grupo retirador de elétrons
FBS	Soro fetal bovino
GBM	Glioblastoma
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% das células
InBr ₃	Brometo de Índio
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LogP	Logaritmo de P (lipofilicidade)
OMOM	Grupo protetor
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MIC	Concentração inibitória mínima
NIH	Instituto Nacional de Saúde
Ni(OAc) ₂	Acetato de Níquel II
NRU	Captação de Vermelho Neutro
OECD	Organização para cooperação e desenvolvimento econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pd (0)	Paládio na oxidação zero (metálico)
Pd (II)	Paládio na oxidação +2
Pd(OAc) ₂	Acetato de Paládio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Ph	Fenila
PivOH	Ácido piválico
ppm	Parte por milhão
Pt(Cl) ₂	Cloreto de Platina II
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i>
R	Grupo substituinte
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SAR	Relação estrutura-atividade
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoracético
TMZ	Temozolomida
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
T98G	Linhagem celular resistente à Temozolomida
U87	Linhagem celular sensível à Temozolomida
UFC	Unidade formadora de colônia
μM	Micromolar
[M]	Metal

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reatividade da posição C-3 do indol.....	25
Esquema 2 – Reação de acoplamento de Stille.....	28
Esquema 3 – Reação de Sonogashira em 3-iodoindóis.....	29
Esquema 4 – Esquema geral para a reação de hidroarilação de alcinos.....	32
Esquema 5 – Proposta mecanística para hidroarilação de alcinos catalisada por paládio.....	33
Esquema 6 – Formação de alcenos aromáticos através da ativação do alcino.	34
Esquema 7 – Formação de alcenos aromáticos através da ativação do areno.	34
Esquema 8 – Reação de hidroarilação de alcinos terminais e areno.....	34
Esquema 9 – Reação de hidroarilação de alcinos internos e areno.....	35
Esquema 10 – Reação de hidroarilação do fenil propinoato de etila utilizando pirrol.	36
Esquema 11 – Dupla hidroarilação do pirrol e indol.	36
Esquema 12 – Hidroarilações inter e intramoleculares catalisadas por ferro.	37
Esquema 13 – Reação de hidroarilação entre indol e propinoato de metila.	38
Esquema 14 – Preparo do tratamento 1 mg/mL em DMSO 2%.....	66
Esquema 15 – Estudo metodológico para a obtenção dos alquenilindóis (3) e bis- arilados (4).	70
Esquema 16 – Formação de produtos de bisarilação do indol.....	72
Esquema 17 – Mecanismo proposto para hidroarilação de Fujiwara utilizando TFA.	76
Esquema 18 – Hidroarilação de alcinos por Perumal e colaboradores (2010).....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da reserpina.....	23
Figura 2 – Estruturas da vimblastina (a), vincristina (b) e vinflunina (c).	24
Figura 3 – Posições de reatividade do indol.....	24
Figura 4 – Produtos naturais e terapêuticos contendo indol.....	26
Figura 5 – Representação das moléculas L-triptofano, serotonina e naratriptano. ...	26
Figura 6 – Compostos bis-indólicos interessantes do ponto de vista biológico.	27
Figura 7 – Alquenilação de arenos através da ligação C-H.	30
Figura 8 – Aspecto das células T98G com baixa a alta confluência	42
Figura 9 – Aspecto das células U87 com baixa e alta confluência.....	43
Figura 10 – Infecções humanas relacionadas à formação de biofilme.....	48
Figura 11 – Agente antibacteriano contendo a estrutura indólica na sua composição.	49
Figura 12 – <i>S. epidermidis</i> . (a) Morfologia da colônia em ágar sangue. (b) Arranjo de cachos gram-positivos em microscópio óptico. (c) Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de <i>S. epidermidis</i>	51
Figura 13 – <i>P. aeruginosa</i> . (a) Morfologia da colônia com produção de pigmento em ágar cromogênico. (b) Arranjo de bacilos gram-negativos em microscópio óptico. (c) Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de <i>P. aeruginosa</i>	53
Figura 14 – Estruturas moleculares.....	71
Figura 15 – Espectro de RMN de ¹ H com ambos os sinais <i>E/Z</i> , nas condições de excesso de alcino e TFA como aditivo.	74
Figura 16 – Espectro de RMN ¹ H do bruto reacional de 3a em CH ₂ Cl ₂ + TFA (aditivo).....	79
Figura 17 – Cromatograma do bruto reacional de 3a em CH ₂ Cl ₂ + TFA (aditivo).	80
Figura 18 – Cromatograma do bruto reacional de 3a em CH ₂ Cl ₂	80
Figura 19 – Espectro de RMN ¹ H do bruto reacional de 3e em CH ₂ Cl ₂ + TFA (aditivo).....	81
Figura 20 – Cromatograma do bruto reacional de 3e em CH ₂ Cl ₂ + TFA (aditivo).	81
Figura 21 – Cromatograma do bruto reacional de 3e em CH ₂ Cl ₂ + AcOH (aditivo). .	82
Figura 22 – Cromatograma do bruto reacional de 3e em CH ₂ Cl ₂ + PivOH (aditivo)..	82
Figura 23 – Cromatograma do bruto reacional de 3e em CH ₂ Cl ₂	82
Figura 24 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3e em AcOH.....	86

Figura 25 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3e em AcOH.	86
Figura 26 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3e em PivOH.	87
Figura 27 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3e em PivOH.	87
Figura 28 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3a em AcOH.	88
Figura 29 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3a em AcOH.	89
Figura 30 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3b em AcOH.	89
Figura 31 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3b em AcOH.	90
Figura 32 – Estrutura molecular dos compostos avaliados	91
Figura 33 – Cromatograma de massas do composto 3a.....	107
Figura 34 – Espectro de RMN ¹ H do composto 3a.....	107
Figura 35 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 3a	108
Figura 36 – Espectro de IV do composto 3a	108
Figura 37 – Cromatograma de massas do composto 3b.....	109
Figura 38 – Espectro de RMN ¹ H do composto 3b.....	109
Figura 39 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 3b	110
Figura 40 – Espectro de IV do composto 3b	110
Figura 41 – Cromatograma de massas do composto 4c.....	111
Figura 42 – Espectro de RMN ¹ H do composto 4c.....	111
Figura 43 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 4c.....	112
Figura 44 – Espectro de IV do composto 4c	112
Figura 45 – Cromatograma de massas do composto 4d.....	113
Figura 46 – Espectro de RMN ¹ H do composto 4d.....	113
Figura 47 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 4d	114
Figura 48 – Espectro de IV do composto 4d	114
Figura 49 – Cromatograma de massas do composto 3e.....	115
Figura 50 – Espectro de RMN ¹ H do composto 3e.....	115
Figura 51 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 3e	116
Figura 52 – Espectro de IV do composto 3e	116
Figura 53 – Cromatograma de massas do composto 3f.....	117
Figura 54 – Espectro de RMN ¹ H do composto 3f.....	117
Figura 55 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 3f	118
Figura 56 – Espectro de IV do composto 3f	118
Figura 57 – Cromatograma de massas do composto 4g.....	119
Figura 58 – Espectro de RMN ¹ H do composto 4g.....	119

Figura 59 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 4g	120
Figura 60 – Espectro de IV do composto 4g	120
Figura 61 – Cromatograma de massas do composto 4h.....	121
Figura 62 – Espectro de RMN ^1H do composto 4h.....	121
Figura 63 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 4h	122
Figura 64 – Espectro de IV do composto 4h	122

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados de citotoxicidade dos compostos sintetizados frente à linhagem T98G.....	92
Gráfico 2 – Resultados agrupados de citotoxicidade dos compostos sintetizados (T98G).....	93
Gráfico 3 – Resultados de citotoxicidade dos compostos sintetizados frente à linhagem U87.....	95
Gráfico 4 – Resultados agrupados de citotoxicidade dos compostos sintetizados (U87).....	96
Gráfico 5 – Resultados referentes à inibição de biofilme formado pela bactéria <i>S. epidermidis</i>	99
Gráfico 6 – Resultados referentes à inibição de biofilme formado pela bactéria <i>P. aeruginosa</i>	100
Gráfico 7 – Resultados referentes à erradicação de biofilme formado pela bactéria <i>S. epidermidis</i>	101
Gráfico 8 – Resultados referentes à erradicação de biofilme formado pela bactéria <i>P. aeruginosa</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo da Regra dos Cinco de Lipinski.....	21
Tabela 2 – Parâmetros da Regra dos Cinco de Lipinski.	68
Tabela 3 – Efeitos tóxicos.	69
Tabela 4 – Reações de heterohidroarilação utilizando metodologia de Fujiwara ^a (2000).....	71
Tabela 5 – Resultados de hidroarilação de Fujiwara em diferentes meios reacionais.	77
Tabela 6 – Resultados de hidroarilação utilizando nova proporção estequiométrica (3e).....	84
Tabela 7 – Comparação dos resultados com variação da proporção estequiométrica (3e).....	85
Tabela 8 – Comparação dos resultados com variação da proporção estequiométrica (3a).....	88
Tabela 9 – Cálculo de IC ₅₀ na linhagem T98G após tratamento de 24 horas	94
Tabela 10 – Cálculo de IC ₅₀ na linhagem U87 após tratamento de 24 horas.....	97
Tabela 11 – Resultados <i>in silico</i> x IC ₅₀	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
	1.1 ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	20
	1.1.1 Estudo teórico das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade <i>in silico</i>	20
	1.1.2 O modelo de Lipinski: Regra dos Cinco	20
	1.2 A QUÍMICA DO INDOL	23
	1.2.1 Reatividade do indol.....	24
	1.2.2 A importância de indóis funcionalizados	25
	1.2.3 Alquenilindóis: métodos de funcionalização	28
	1.3 REAÇÃO DE HIDROARILAÇÃO DE ALCINOS	30
	1.3.1 A reação de Fujiwara	31
	1.3.2 Adição de heteroarenos a alcinos	35
	1.3.3 Dupla hidroarilação de alcinos	36
	1.4 CÂNCER	38
	1.4.1 Ensaio <i>in vitro</i> para determinação da eficácia antitumoral	39
	1.4.1.1 As linhagens celulares de glioblastoma	42
	1.5 MICROBIOLOGIA – AS BACTÉRIAS E OS BIOFILMES.....	44
	1.5.1 A formação de biofilmes: características e consequências	44
	1.5.2 Micro-organismos de importância médica formadores de biofilme	47
	1.5.3 Estratégias antibiofilme	48
	1.5.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
	1.5.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
2	OBJETIVOS	54
	2.1 GERAIS.....	54
	2.2 ESPECÍFICOS	54
3	EXPERIMENTAL	55
	3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
	3.1.1 Reagentes, solventes e <i>softwares</i>	55
	3.1.2 Métodos cromatográficos	55
	3.1.3 Métodos espectrométricos	55
	3.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS	57

3.2.1	Procedimento padrão de extração do bruto reacional.....	57
3.2.2	Procedimentos de sínteses.....	57
3.3	ENSAIOS DE TOXICIDADE CELULAR – VERMELHO NEUTRO.....	63
3.3.1	Células e tratamento.....	63
3.3.2	Medida de viabilidade celular.....	63
3.4	ENSAIOS DE ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA.....	65
3.4.1	Cepas bacterianas e condições de cultura.....	65
3.4.2	Crescimento bacteriano para avaliação da inibição de biofilme.....	65
3.4.3	Protocolo de inibição de biofilme.....	66
3.4.4	Protocolo de erradicação de biofilme.....	66
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
4.1	AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i>	68
4.1.1	Regra dos Cinco de Lipinski.....	68
4.1.2	Efeitos tóxicos.....	69
4.2	OBTENÇÃO DE ALQUENILINDÓIS ATRAVÉS DA HETEROHIDROARILAÇÃO DE ALCINOS.....	70
4.3	AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS METODOLÓGICAS DA SÍNTESE....	75
4.3.1	Influência do meio reacional utilizado.....	75
4.3.2	Influência da proporção estequiométrica.....	83
4.4	AVALIAÇÕES <i>IN VITRO</i>	91
4.4.1	Avaliação de citotoxicidade.....	91
4.4.2	Avaliação microbiológica.....	98
4.4.2.1	Inibição de biofilmes formados pelas bactérias <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98
4.4.2.2	Erradicação de biofilmes formados pelas bactérias <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101
5	CONCLUSÕES.....	104
6	PERSPECTIVAS.....	106
7	ESPECTROS.....	107
7.1	(<i>E,Z</i>)-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-3-fenilacrilato de metila (3a).....	107
7.2	(<i>E,Z</i>)-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-3-fenilacrilato de etila (3b).....	109

7.3	3,3-di(1 <i>H</i> -indol-3-il)propanoato de metila (4c)	111
7.4	3,3-di(1 <i>H</i> -indol-3-il)butanoato de etila (4d)	113
7.5	(<i>E/Z</i>)-3-(1-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)-3-fenilacrilato de metila (3e)	115
7.6	(<i>E/Z</i>)-3-(1-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)-3-fenilacrilato de etila (3f)	117
7.7	3,3-di(1-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)propanoato de metila (4g)	119
7.8	3,3-di(1-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)butanoato de etila (4h)	121
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
9	ANEXOS.....	135
9.1	PROTOCOLO DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME – INIBIÇÃO – EXTRATO RESSUSPENDIDO EM DMSO.....	135
9.2	PROTOCOLO DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME – ERRADICAÇÃO – EXTRATO RESSUSPENDIDO EM DMSO.....	137
9.3	RESULTADOS IN SILICO – DataWarrior.....	138

1 INTRODUÇÃO

A busca por novas moléculas com potencial atividade biológica tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos, visto que a pesquisa e desenvolvimento de compostos bioativos é um processo longo, de alto custo financeiro e de elevados riscos. Muitos anos e grandes grupos formados por químicos e biólogos são necessários para a descoberta de novos fármacos (HEFTI, 2008)

O tempo aproximado de pesquisa e desenvolvimento de um fármaco é de 10-24 anos, e as etapas podem ser classificadas em dois grandes grupos: estudos pré-clínicos e clínicos (LOMBARDINO; LOWE, 2004; MACHADO, 2011). O desenvolvimento de um fármaco exige o trabalho em conjunto de uma equipe multidisciplinar que envolve profissionais das ciências Químicas, Biológicas, Farmacêuticas e Médicas. O Químico Medicinal tem elevada importância na primeira fase do descobrimento de um fármaco, denominada *drug discovery*, onde corrobora na busca de estruturas químicas fundamentais (*lead compounds*) para a exploração, por exemplo, de novas metodologias sintéticas de estruturas análogas àquelas que já possuem propriedades biológicas conhecidas (*hits*) (HEFTI, 2008; LOMBARDINO; LOWE, 2004).

A partir do conhecimento destas estruturas, é interessante que se faça uma triagem virtual a partir de métodos *in silico* das mesmas, a fim de obter-se informações como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade no organismo, mais conhecido como ADME/Tox. O objetivo deste estágio é maximizar a eficácia, identificar os possíveis falsos-negativos produzidos por testes experimentais e minimizar os efeitos colaterais no modelo animal, analisando os dados obtidos computacionalmente, como por exemplo, o *logP* que é um dos fatores que compreende as cinco regras de Lipinski para prever propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade oral de moléculas (KIST, 2018; LIPINSKI et al., 2012). Os ensaios *in silico* compreendem uma etapa importante do desenvolvimento racional de fármacos, e os Químicos Medicinais devem direcionar sua atenção para o planejamento e síntese de novos compostos para testagem biológica, bem como investigar e desenvolver novas metodologias sintéticas, além de dominar técnicas relacionadas à caracterização de moléculas e relação estrutura-atividade (WESS, 1996).

A etapa seguinte, que pode ser ou não precedida pelos ensaios *in silico*, é a da síntese da molécula, com definição de metodologias de síntese, purificação e caracterização da molécula.

A seguir se inicia a etapa pré-clínica, que envolve o uso de ensaios *in vitro*, com células em cultura, e *in vivo*, utilizando modelos animais, da molécula para avaliação da eficácia, toxicidade e segurança da mesma em relação ao meio biológico. A etapa clínica é iniciada após a autorização da agência regulatória de saúde do país em questão, e compreende os ensaios com seres humanos, sendo subdividida em três etapas: fase I, fase II, fase III e fase IV. (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; LIPINSKI et al., 2012).

Após todos estes ensaios, um número muito pequeno de candidatos à fármaco se tornam fármacos, de fato, em torno de 4-7% das moléculas testadas são aprovadas em todos os testes realizados, e destas, uma quantidade menor ainda têm sucesso no mercado farmacêutico, pois o alto custo da pesquisa e do desenvolvimento não cobrem o custo de comercialização do medicamento, e por este motivo, o novo medicamento não se torna competitivo a nível de mercado (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

As moléculas sintetizadas neste trabalho possuem o anel indólico como principal unidade estrutural, e são denominadas alquenilindóis, nos tópicos a seguir serão apresentados os aspectos referentes à reatividade do núcleo indólico, à metodologia sintética, assim como, as avaliações farmacológicas para determinação do potencial antitumoral *in vitro* e de inibição e erradicação de biofilmes bacterianos.

1.1 ESTUDOS *IN SILICO*

A estrutura química de uma molécula pode revelar muitos fatores referentes ao perfil terapêutico de um fármaco. Através de modelos matemáticos conhecidos como SAR (*structure-activity relationship*) e QSAR (*quantitative structure-activity relationship*) é possível formular uma relação qualitativa e quantitativa entre estrutura química e a atividade biológica (BRESOLIN; FILHO, 2010).

Em termos gerais, pode-se dizer que o perfil ideal de um fármaco a ser desenvolvido reside em atender três requisitos: propriedades favoráveis de ADME/Tox (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade); quesitos intrínsecos (seletividade, biodisponibilidade, facilidade de síntese e baixo custo); cumprimento da Regra dos Cinco de Lipinski e as Regras de Veber (KIST, 2018).

Estes resultados são calculados a partir de bancos de dados *online*, dados estes disponibilizados pelas indústrias farmacêuticas e verificados de tempos em tempos a fim de garantir a confiabilidade destes resultados.

1.1.1 Estudo teórico das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade *in silico*

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADME/Tox atualmente, de modo que se consiga uma triagem inicial das moléculas, cujo objetivo é reduzir gastos em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (AFONSO, 2008).

1.1.2 O modelo de Lipinski: Regra dos Cinco

A partir da observação de um grande número de exemplos de candidatos a fármacos que, apesar de promissores, não obtiveram sucesso na indústria farmacêutica, Christopher Lipinski, químico medicinal, iniciou os seus estudos, em 1997, juntamente com seus colaboradores. Esses candidatos a fármacos foram abandonados em estágios avançados de desenvolvimento, por problemas

encontrados na fase clínica. Problemas estes, na maioria das vezes, relacionados a propriedades farmacocinéticas inadequadas.

A regra de Lipinski, também denominada Regra dos Cinco, foi assim denominada devido aos quatro parâmetros analisados serem múltiplos de cinco, sendo capaz de prever se uma molécula apresenta as características ideais de um fármaco. Esta regra é muito utilizada como filtro molecular em projetos de planejamento de fármacos devido à sua simplicidade conceitual e facilidade de aplicação (ALMEIDA et al., 2012; KIST, 2018).

O objetivo principal desta regra é estimar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos administrados pela via oral, predizendo a importância da estrutura molecular na absorção de um composto, pois estes dados são de extrema importância no que se refere ao processo farmacocinético de um fármaco (LIPINSKI et al., 2012).

No desenvolvimento de moléculas bioativas como agentes terapêuticos, um dos requisitos mais importantes é a alta disponibilidade oral, e os quatro parâmetros que devem ser atendidos através da Regra dos Cinco estão diretamente ligados à solubilidade e à permeabilidade, são eles: massa molar, logP (lipofilicidade), número de doadores de ligação hidrogênio (DLH) e número de aceptores de ligação hidrogênio (ALH). Um resumo da Regra dos Cinco de Lipinski é apresentado na tabela 1. Qualquer valor que exceda um ou mais parâmetros indicados na tabela pode prever uma molécula com solubilidade e permeabilidade pobres, ou seja, a molécula pode apresentar problemas de absorção (LIPINSKI et al., 2012).

Tabela 1 – Resumo da Regra dos Cinco de Lipinski.

Massa molar (g/mol)	< 500
LogP	< 5
DLH (expresso como somatórios de –OH e –NH)	< 5
ALH (expresso como somatório de N e O)	< 10

Fonte: Adaptado de BRESOLIN, FILHO, 2010.

Outros parâmetros têm sido propostos para aumentar ainda mais a propriedade de seleção, como o número de ligações rotacionáveis (deve ser menor ou igual a 10) e a área superficial polar (deve ser menor ou igual a 140 Å²).

Segundo Lipinski (2012), a massa molar é importante devido à literatura apresentar relações entre a fraca permeabilidade da barreira intestinal e hematoencefálica ao aumento da massa molar. A lipofilicidade, expressa em termos de logP, está diretamente relacionada à absorção do composto no organismo. Um grupo excessivo de doadores e receptores de ligações de hidrogênio prejudicam a permeabilidade através da membrana bicamada da célula.

A partir disso, surgiu o conceito de *lead-like* (líder similar) que é utilizado para as moléculas com propriedades semelhantes ao *lead compound* (composto líder). Mais especificamente, as tendências de alterações na massa molar, número de aceptores ou doadores de ligações de hidrogênios e logP tornaram possível a definição das características *lead-like*, que são muito empregadas na elaboração de bibliotecas de compostos (AFONSO, 2008; BRESOLIN; FILHO, 2010; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; KIST, 2018; LIPINSKI et al., 2012).

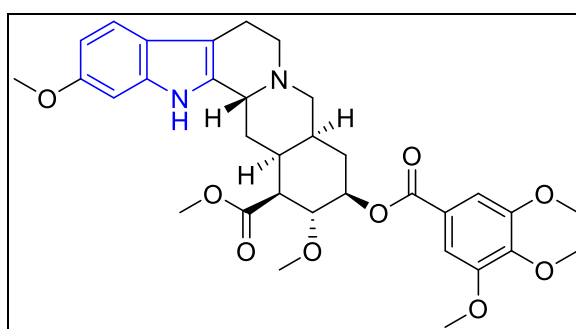
1.2A QUÍMICA DO INDOL

O indol é uma molécula que foi descoberta em 1869 a partir do isolamento de compostos aromáticos do corante natural índigo, e desde então vem sendo empregado em inúmeras pesquisas nas áreas farmacêuticas, agroquímicas e ciências dos materiais (BANDINI; EICHHOLZER, 2009). A unidade indólica está presente em uma série de compostos naturais, muitos dos quais têm importantes atividades fisiológicas (LAKHDAR et al., 2006). E assim como os pirróis, os indóis são uma classe importante de compostos heterocíclicos nitrogenados pelas atividades biológicas que apresentam e aplicação sintética, como análogos de produtos naturais e farmacêuticos.

Além disso, compostos bis-indólicos têm sido isolados, e os resultados têm demonstrado uma série de atividades biológicas importantes, como por exemplo, atividade antibacteriana (KUTUBI; KITAMURA, 2011).

O interesse por compostos contendo o núcleo indólico vem crescendo desde 1952, com o isolamento da reserpina (figura 1), uma droga que atua como depressora do sistema nervoso central e é utilizada até hoje para tratamento de hipertensão e distúrbios psiquiátricos (CHEN; HUANG, 2005).

Figura 1 – Estrutura da reserpina.

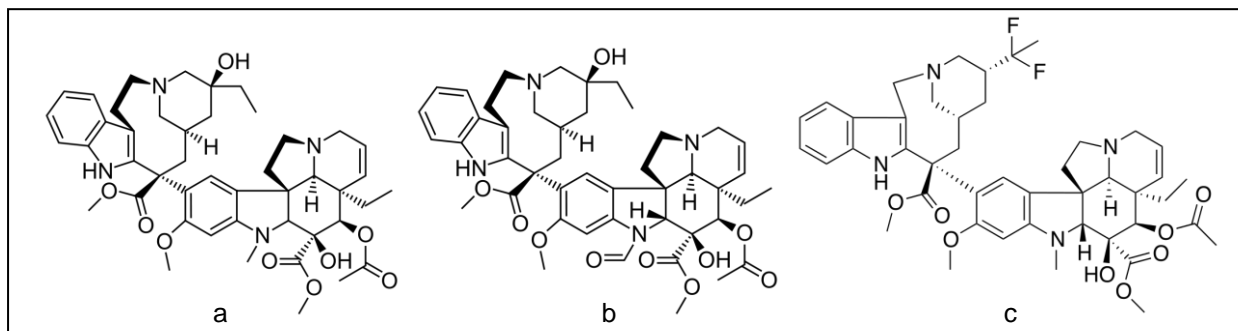


Fonte: Elaborada pela autora.

Quando o assunto é câncer, moléculas extraídas de produtos naturais e que tenham o núcleo indólico na sua estrutura também recebem destaque, neste ponto podemos citar os alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus*), vimblastina (figura 2a) e vincristina (figura 2b), que são utilizados para tratamento de linfomas e leucemia

infantil. A partir da vimblastina, desenvolveu-se a vinflunina (figura 2c), com o intuito de aumentar a eficácia terapêutica (BRESOLIN; FILHO, 2010).

Figura 2 – Estruturas da vimblastina (a), vincristina (b) e vinflunina (c).

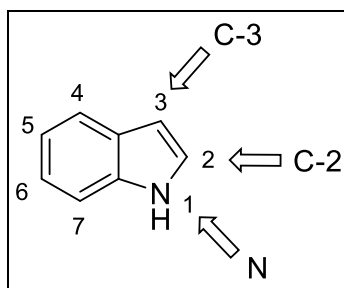


Fonte: Elaborada pela autora.

1.2.1 Reatividade do indol

O indol é um composto heteroaromático rico em elétrons e por esse motivo apresenta acentuada reatividade, quando comparada ao benzeno, em substituições eletrofílicas aromáticas, por exemplo (BANDINI; EICHHOLZER, 2009). O indol é um sistema bicíclico contendo um anel pirrólico e um anel benzênico fundidos. O par de elétrons não-ligante do nitrogênio participa da aromaticidade do núcleo indólico. As posições reativas do anel indólico (figura 3) são 1 (N), 2 (C-2) e 3 (C-3), sendo a posição C-3 mais reativa, seguida da posição C-2, de preferência quando a posição C-3 está ocupada por um substituinte (BUSCEMI et al., 2010).

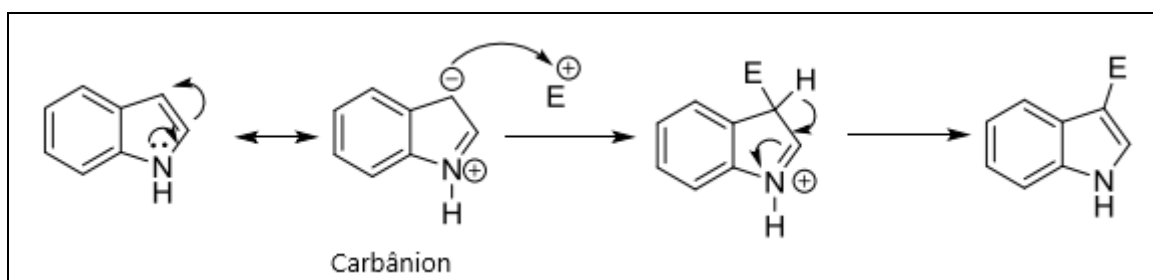
Figura 3 – Posições de reatividade do indol.



Fonte: Elaborada pela autora.

A reatividade da posição C-3 ocorre devido à conjugação do par de elétrons do nitrogênio do anel, o que leva à formação de um carbânion nessa posição, e conseqüentemente, é passível de reação eletrofílica aromática (esquema 1).

Esquema 1 – Reatividade da posição C-3 do indol.



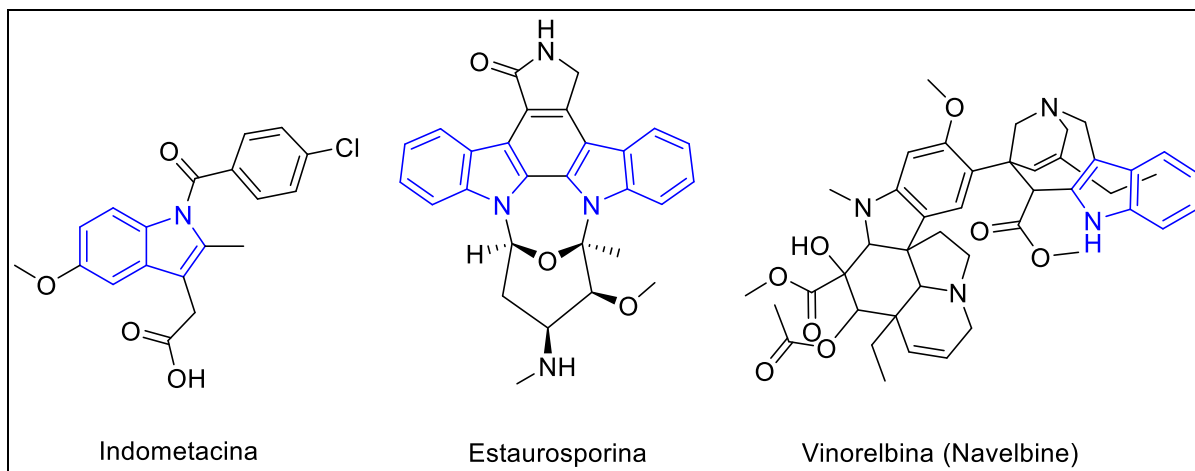
Fonte: Elaborada pelo autor

Por esta razão, o indol representa uma estrutura de particular interesse e importância, visto que a elevada reatividade do C-3 e mesmo a do C-2 permite que metodologias de funcionalização sejam utilizadas, possibilitando o acesso direto a uma série de derivados indólicos com diversidade estrutural na síntese destes derivados (LANE; BROWN; SAMES, 2007).

1.2.2 A importância de indóis funcionalizados

Os núcleos indólicos funcionalizados, bem como os núcleos pirrólicos, estão presentes em diversos produtos naturais e compostos medicinais, por este motivo, os métodos de síntese e de funcionalização de indóis têm sido objeto de pesquisa dos últimos anos (CACCHI; FABRIZI, 2011). Como exemplos de moléculas funcionalizadas (figura 4), tem-se a indometacina com ação analgésica e anti-inflamatória (MONTEIRO et al., 2008), a estaurosporina que é antifúngica, anti-hipertensiva e ultimamente foi descoberto seu potencial anticâncer (RAO; JUNIOR; VARALA, 2016), a vinorelbina possui largo espectro de atividades antitumorais, sendo especialmente ativa no câncer de mama e carcinoma de pulmão (BRANDÃO et al., 2010).

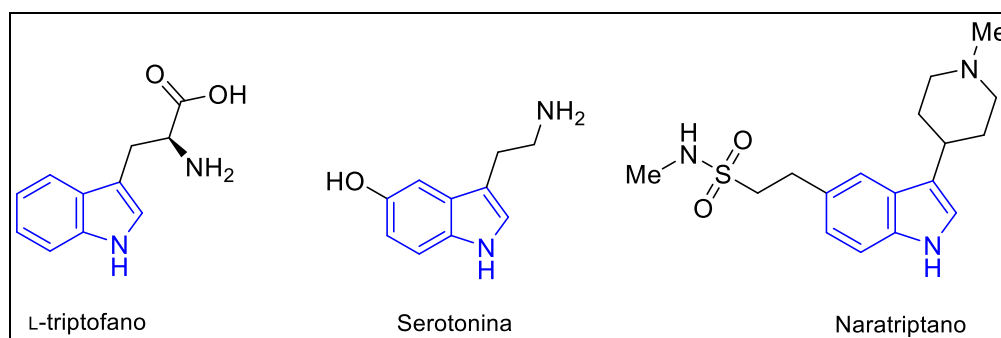
Figura 4 – Produtos naturais e terapêuticos contendo indol.



Fonte: Elaborada pela autora. Adaptado de Topics in Current Chemistry (BECK; HATLEY; GAUNT, 2008)

Muitos compostos derivados do indol (figura 5) apresentam papel fundamental no organismo humano, como por exemplo, o L-triptofano que é um aminoácido que participa da síntese proteica nos seres humanos, a serotonina que é um neurotransmissor relacionado às sensações de prazer, emoções e humor, comumente denominada molécula da felicidade. Entre outros, como o naratriptano, o qual pertence à classe de fármacos dos triptanos, e que é utilizado no tratamento da enxaqueca, sendo comercializado com o nome de Naramig (KOCHANOWSKA-KARAMYAN; HAMANN, 2010).

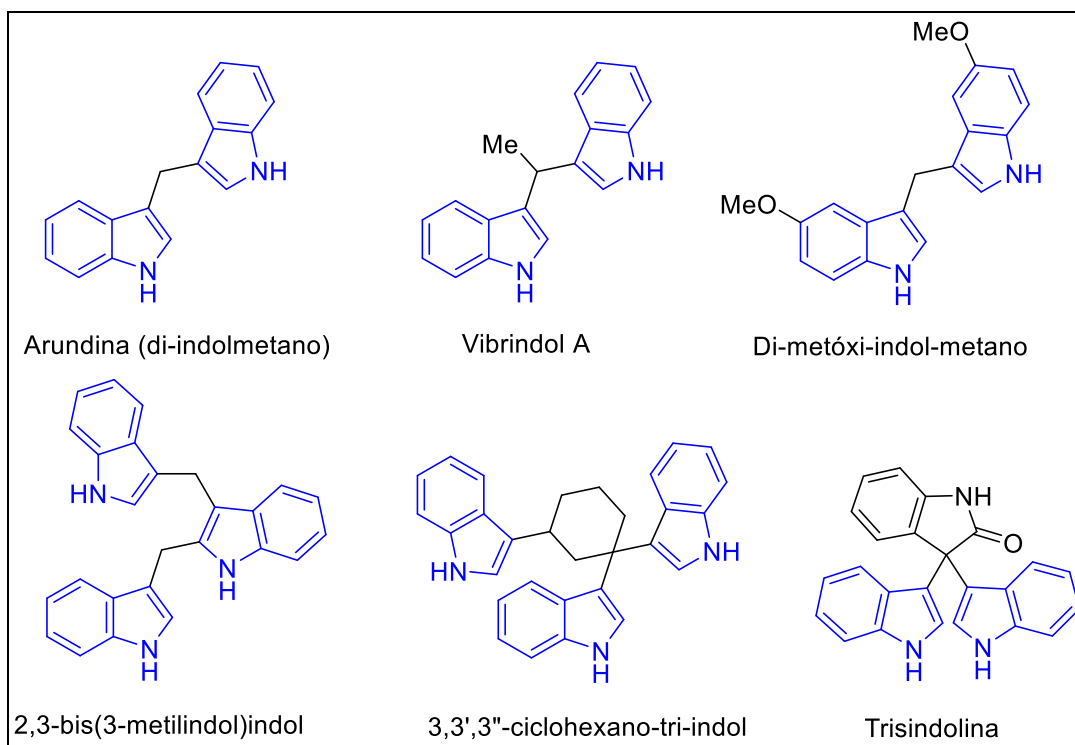
Figura 5 – Representação das moléculas L-triptofano, serotonina e naratriptano.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos bis-indólicos (figura 6) também possuem uma ampla variedade de propriedades biológicas e farmacêuticas. Como exemplo de compostos bis-indólicos com atividade biológica, têm-se os compostos abaixo, dentre eles o vibrindol A que atua no tratamento da fibromialgia (AN et al., 2015).

Figura 6 – Compostos bis-indólicos interessantes do ponto de vista biológico.



Fonte: AN et al., 2015.

São muitas as metodologias encontradas na literatura para a funcionalização de indóis, dentre estes métodos, aqueles mediados por metal de transição, especialmente paládio, têm sido desenvolvidos. Essas metodologias alcançaram uma ampla aplicação, pois geralmente permitem a introdução de grupos arila e vinila de maneira suave e, portanto, compatível com grupos funcionais mais sensíveis (CACCHI; FABRIZI, 2011; HOTA; JOSE; MANDAL, 2017).

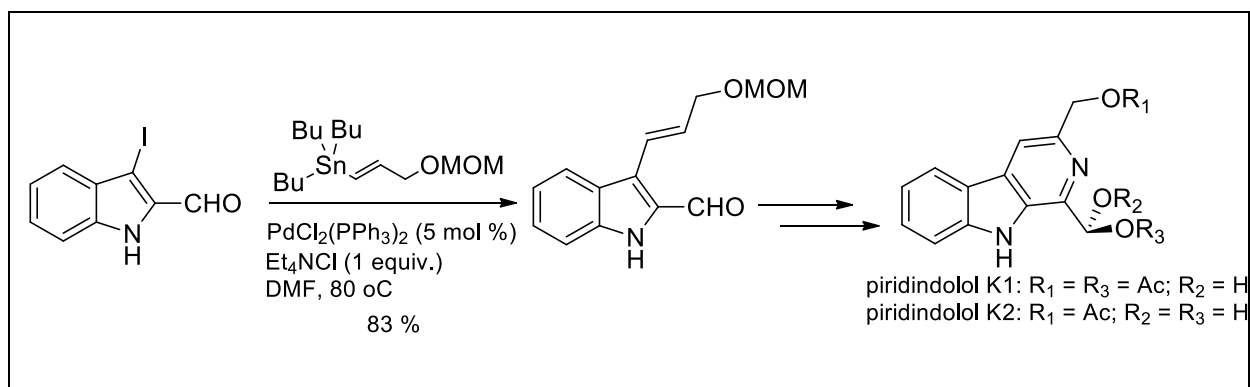
1.2.3 Alquenilindóis: métodos de funcionalização

Vários métodos têm sido desenvolvidos, nas últimas décadas, visando à síntese e à funcionalização de indóis. O indol é um heterociclo aromático amplamente empregado na indústria farmacêutica e é bastante explorado como intermediário sintético em química orgânica com a finalidade de obter-se novas moléculas com potencial bioatividade. Tendo em vista que núcleos indólicos, principalmente alquenilindóis, estão presentes em diversos produtos de origem natural e sintética, diversas metodologias de síntese destes compostos estão disponíveis na literatura como, por exemplo, os mediados por metais de transição, desenvolvidos a partir da década de 1970 (AZAMBUJA; CORREIA, 2011; CADIerno; FRANCOS; GIMENO, 2010; FERRER; ECHAVARREN, 2006; NEVADO; ECHAVARREN, 2005; POULSEN; JORGENSEN, 2008; YADAV et al., 2004; YAMAMOTO, 2014; YU; SHI, 2010).

Indóis alquenilados servem como plataforma útil para outras manipulações sintéticas, como cicloadição, adição de Friedel-Crafts e reações de funcionalização direta da ligação C-H (DING; YOSHIKAI, 2012).

São diversas as metodologias estabelecidas visando a olefinação do indol na posição 3, particularmente. A reação de acoplamento de Stille por Hibino e colaboradores (KANEKIYO et al., 2001) é um exemplo, onde eles desenvolveram a síntese de compostos heteroaromáticos biologicamente ativos, baseando-se em uma reação eletrocíclica, incorporando uma porção aromática ou heteroaromática principal em hexatrienos (esquema 2).

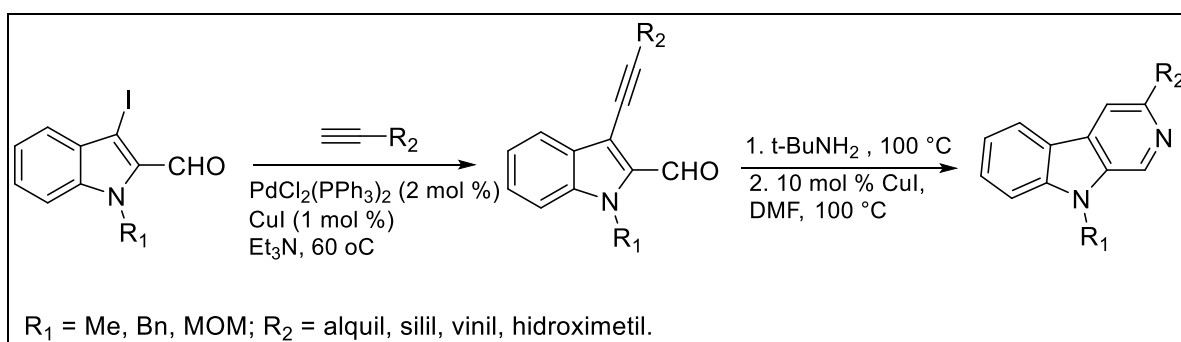
Esquema 2 – Reação de acoplamento de Stille.



Fonte: Adaptado de CHEN *et al*, 2012.

Larock e Zhang (2002), utilizando também 3-iodoindóis, realizaram acoplamentos de Sonogashira (com alcinos terminais) seguidos de ciclizações mediadas por cobre para a obtenção de compostos semelhantes àqueles descritos acima (esquema 2). A metodologia (esquema 3) tolerou uma grande gama de grupos R_2 , com rendimentos em torno de 80% para duas etapas (ZHANG; LAROCK, 2002).

Esquema 3 – Reação de Sonogashira em 3-iodoindóis.



Fonte: Adaptado de ZHANG, LAROCK (2002).

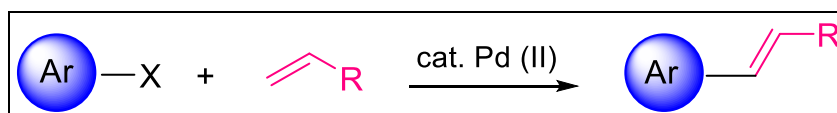
Entretanto, nas reações mostradas acima foi necessária a introdução de um haleto (iodo) nos indóis de partida. Assim como no caso de reagentes classicamente utilizados em acoplamentos cruzados, como ácidos borônicos e compostos de organozinco e organoestanho, a introdução destes átomos ou grupos funcionais nos materiais de partida nem sempre é fácil, sendo acompanhada de uma inevitável geração de resíduos químicos. Além disso, as próprias reações geram quantidades estequiométricas de materiais que serão fatalmente descartados, como os halogênios e sais de estanho, por exemplo.

Muitas metodologias utilizam paládio como catalisador nas reações que envolvem heterociclos, em especial núcleos indólicos. O paládio tem sido alvo das atenções na maioria das pesquisas em síntese orgânica, principalmente quando se trata da síntese e funcionalização de compostos heterocíclicos. A substituição C-H por C-C que gera um intermediário Pd-C pela ativação C-H é uma ferramenta muito importante para funcionalização do núcleo indólico, pois elimina a necessidade de introduzir funções reativas como ligações C-halogênios. E, seja qual for o modo de ativação, o paládio é o principal metal utilizado, embora ródio (AZAMBUJA; CORREIA, 2011; LEWIS; BERGMAN; ELLMAN, 2008; SCHIPPER; HUTCHINSON;

FAGNOU, 2010), ouro (FERRER; ECHAVARREN, 2006; SHEN, 2008), gálio (YADAV et al., 2004), níquel (NAKAO, 2011; NAKAO et al., 2006) e rutênio (CADIerno; FRANCOS; GIMENO, 2010; MARTINEZ et al., 2009) também sejam empregados com o mesmo propósito (AZAMBUJA; CORREIA, 2011; BHASKAR; SAIKUMAR; PERUMAL, 2010; CACCHI; FABRIZI, 2011; LYONS; SANFORD, 2010; MESSAOUDI; BRION; ALAMI, 2010; SAUNTHWAL et al., 2017).

Estudos mostram que os indóis podem ser alquenilados utilizando alcenos ou alcinos como eletrófilos a partir da hidroarilação da ligação insaturada carbono-carbono catalisada por metal (CADIerno; FRANCOS; GIMENO, 2010; FERRER; ECHAVARREN, 2006; YADAV et al., 2004). Também tem se destacado a ideia de que ligações C-H são também precursores viáveis para grupos funcionais diversos, através de reações catalisadas por metais de transição (AZAMBUJA; CORREIA, 2011). Neste caso, o processo envolve o acoplamento de um heteroareno ou areno com uma olefina (figura 7).

Figura 7 – Alquenilação de arenos através da ligação C-H.



Fonte: Adaptado de YU, SHI, 2010.

1.3 REAÇÃO DE HIDROARILAÇÃO DE ALCINOS

A funcionalização de unidades heteroaromáticas é uma ferramenta muito útil para a síntese orgânica, principalmente quando se trata da indústria química, e como já foi mencionado anteriormente, os heterociclos tem um papel versátil na síntese de moléculas com potencial bioatividade, sendo considerados blocos de construção para uma série de compostos.

A funcionalização direta das ligações C-H, ou ativação das ligações C-H como têm sido denominadas pela literatura, tem se mostrado vantajosa em relação ao uso de compostos halogenados, ou substratos que não são viáveis como material de

partida, como também em relação ao número de etapas, que é reduzido (HOTA; JOSE; MANDAL, 2017).

A heterohidroarilação de alcinos pode ser abordada sob duas maneiras: através da ativação de alcinos e através da ativação de arenos, e permite a funcionalização C-H direta sem a necessidade de reagentes pré-formados. Em síntese orgânica, vale ressaltar que a economia de átomos é um item extremamente relevante, e a (hetero)hidroarilação de alcinos catalisada por metal de transição é um exemplo de transformação com alta eficiência atômica (BUSCEMI et al., 2010; CIULLA; KUMAR, 2018; GODOI et al., 2017; LU et al., 2000).

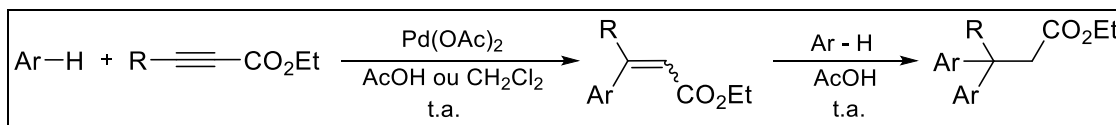
1.3.1 A reação de Fujiwara

Em 2000, Fujiwara e colaboradores foram os primeiros a realizar a hidroarilação, catalisada por paládio (II), da ligação insaturada C-C através da funcionalização direta das ligações C-H de arenos ricos em elétrons. E reportaram que muitos heterociclos aromáticos (metil-furanos, indóis e pirróis) reagem rapidamente com alcinos terminais e internos, à temperatura ambiente, em ácido acético, diclorometano (CH_2Cl_2) e éter etílico, empregando como catalisador o acetato de paládio, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, entre outros catalisadores, como PtCl_2 , $\text{Ni}(\text{OAc})_2$ e $\text{Cu}(\text{OAc})_2$. Deste modo, produtos formados a partir da hidroarilação da tripla ligação C-C são obtidos, e na maioria dos casos, (Z)-heteroarilalcenos (LU et al., 2000).

Nos estudos desenvolvidos por Fujiwara e colaboradores (2000), foi observado que este tipo de reação tem bons rendimentos quando se utiliza 5% de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, porém apresentou lentidão quando este foi reduzido a 1%, bem como a reação não ocorreu na ausência deste. Quanto aos outros catalisadores empregados no estudo, a reação foi muito lenta ou não ocorreu. Em relação ao solvente, a reação foi mais eficiente em ácido acético, AcOH (LU et al., 2000).

Vários heteroarenos e alcinoatos foram testados por Fujiwara em temperatura ambiente, em que produtos de monoarilação na configuração Z, na maioria dos casos, e produtos resultantes da bisarilação, dependendo dos substituintes (R) dos alcinoatos (esquema 4), foram formados através da reação de hidroarilação dos alcinos.

Esquema 4 – Esquema geral para a reação de hidroarilação de alcinos.



Fonte: Adaptada de LU, *et al.*, 2000.

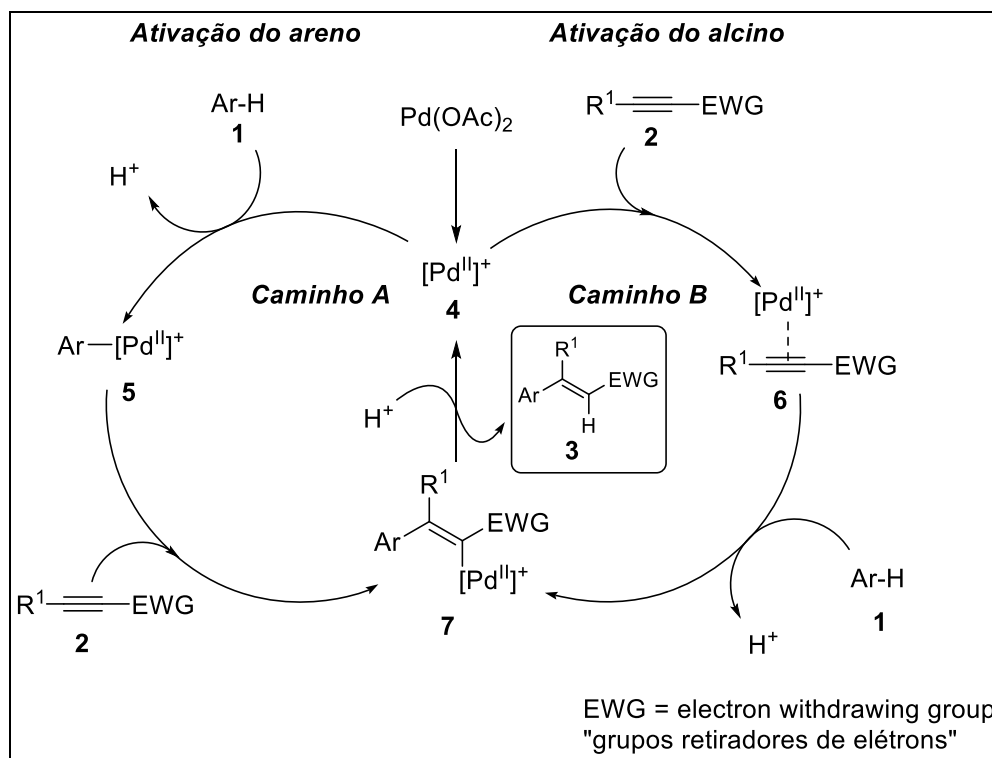
Ainda segundo Fujiwara (2000), quando o substituinte R é um grupo pequeno como metila, a reação em AcOH fornece produtos bisarilados, enquanto que um R com grupos volumosos, como Ph, a reação fornece produtos de monoadição, nas mesmas condições. É possível controlar a reação para formação de produtos de monoadição quando se tem um grupo R pequeno como Me ou H, utilizando CH₂Cl₂ como solvente, embora as reações sejam muito mais lentas.

Em diversos casos, o ácido trifluoracético (TFA) é empregado como solvente ou aditivo para viabilizar este tipo de reação (JIA; KITAMURA; FUJIWARA, 2001a).

Paras as reações utilizando indol e 1-metil-indol, a reação ocorreu na posição C-3 predominantemente, como era previsto pela própria reatividade do núcleo indólico. Entretanto, quando a posição C-3 do anel estava substituída por um grupamento metila, a reação se deu na posição C-2, embora essa não seja uma posição favorável para substituição eletrofílicas.

Dois tipos de mecanismos são sugeridos para este tipo de reação. Em seus trabalhos iniciais Fujiwara propôs que a hidroarilação catalisada por paládio iniciava pela metalação do areno seguida da coordenação do alcino e inserção migratória (esquema 5 – caminho A) (LU et al., 2000). Entretanto, um trabalho publicado por Tunge e colaboradores investigou o mecanismo reacional da versão intramolecular da reação de Fujiwara, e atribuiu ao Pd (II) o papel de ácido de Lewis em um mecanismo similar a bem conhecida reação de Friedel-Crafts. (esquema 5 – caminho B) (GODOI et al., 2017; SORIANO; MARCO-CONTELLI, 2006; TUNGE; FORESEE, 2005).

Esquema 5 – Proposta mecanística para hidroarilação de alcinos catalisada por paládio.



Fonte: Adaptado de GODOI, *et al.*, 2017.

Para Fujiwara, o mecanismo explica o motivo pelo qual a reação em AcOH é mais rápida que a reação em outros solventes. A formação do complexo aril-paládio é facilitada pela presença do ácido na etapa de protonação.

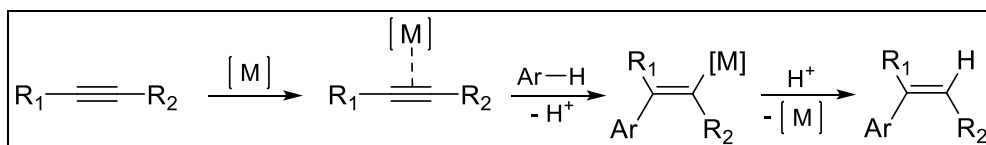
Para Buscemi e colaboradores (2010), o mecanismo geral desta reação se resume na coordenação inicial do alcino ao metal, seguido do ataque do heterociclo, resultando na ativação da tripla ligação, na sequência, o ácido acético fornece o próton necessário para a protonação da ligação Pd-vinil formada, fornecendo o produto de acoplamento (BUSCEMI *et al.*, 2010).

Estudos recentes apresentaram contribuições que demonstram que ambos os mecanismos podem ocorrer de forma simultânea, pois envolvem a paladação eletrofílica do indol em C3, bem como uma ativação do alcino empregado pelo ácido de Lewis mole que é o Pd (II) (GODOI *et al.*, 2017).

Considerando então, que a síntese de alquenilindóis pode ser realizada através da reação de hidroarilação de alcinos, e que este tipo de reação apresenta duas propostas mecanística distintas, seguem os esquemas 6 e 7, que resumem,

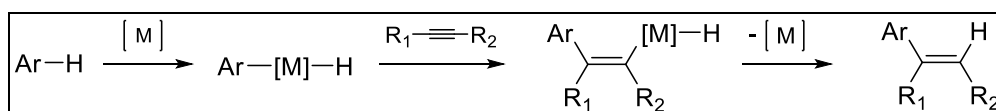
separadamente, a formação dos alcenos via ativação do alcino e via ativação do areno, respectivamente, onde podem ser observadas a mudança da estereoquímica dos produtos.

Esquema 6 – Formação de alcenos aromáticos através da ativação do alcino.



Fonte: Elaborado pela autora.

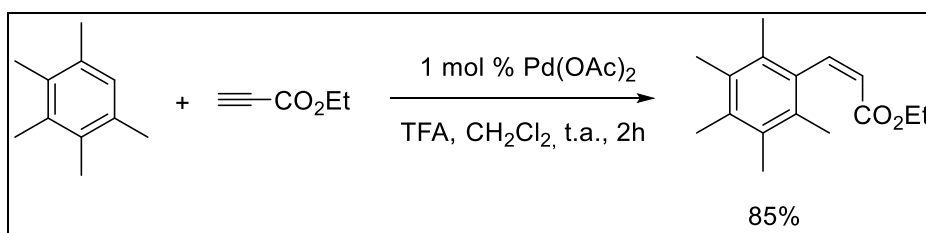
Esquema 7 – Formação de alcenos aromáticos através da ativação do areno.



Fonte: Elaborado pela autora.

As reações de hidroarilação também podem utilizar alcinos terminais, entre propinoato de etila e pentametilbenzeno (esquema 8), por exemplo, fornece um produto na configuração *Z* com bons rendimentos.

Esquema 8 – Reação de hidroarilação de alcinos terminais e areno.



Fonte: Adaptado de KITAMURA, 2009.

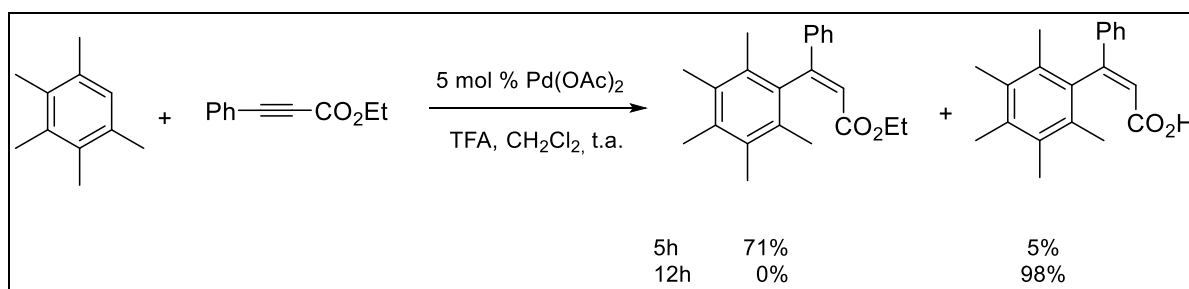
Arenos ricos em elétrons têm mostrado grande importância na reação de hidroarilação, visto que alcinos denotam alta eletrofilicidade quando são ativados por paládio catiônico, como catalisador (KITAMURA, 2009). Estudos utilizando

complexos de platina como catalisador, também têm sido reportados na literatura (VICENZI et al., 2013), revelando produtos olefínicos e bisarilados.

No trabalho de Kitamura (2011), a reação com alcinos internos, como fenil propinoato de etila, obteve comportamento semelhante à reação com alcinos terminais, porém, observou-se a formação de 5% do produto de hidrólise juntamente com o produto esperado, este produto hidrolisado foi obtido majoritariamente quando o tempo de reação foi prolongado (esquema 9).

O mesmo trabalho reportou o uso de outros arenos com propinoato de etila, que forneceram majoritariamente produtos de monoadição na configuração *Z* com bons rendimentos. Produtos bisarilados também foram formados em alguns casos (KUTUBI; KITAMURA, 2011).

Esquema 9 – Reação de hidroarilação de alcinos internos e areno.

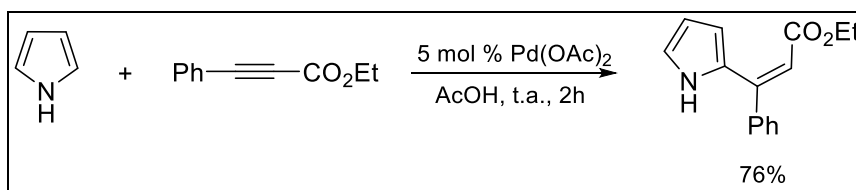


Fonte: Adaptado de KITAMURA, 2011.

1.3.2 Adição de heteroarenos a alcinos

Reações de hidroarilação de alcinos catalisadas por paládio também têm sido aplicadas utilizando heterociclos simples como indol (mencionado anteriormente) e pirrol (esquema 10) para formar produtos de configuração *Z*, utilizando AcOH ou CH₂Cl₂ em condições brandas, reportadas por Fujiwara e colaboradores.

Esquema 10 – Reação de hidroarilação do fenil propinoato de etila utilizando pirrol.



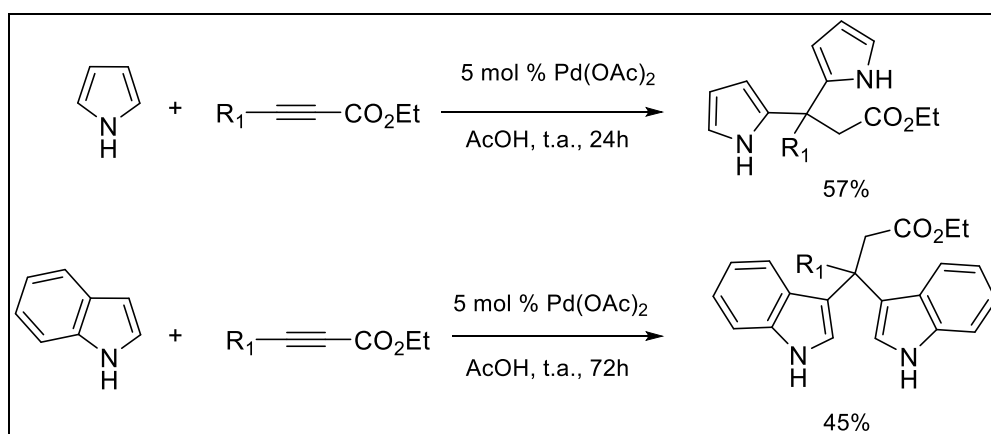
Fonte: Adaptado de KITAMURA, 2009.

Em heteroaromáticos como pirrol, metil-pirrol e metil-furano, a substituição das ligações C-H aromáticas ocorrem exclusivamente nas posições 2- ou 5- dos arenos, característico da substituição eletrofílica (LU et al., 2000).

1.3.3 Dupla hidroarilação de alcinos

Reações de hidroarilação de alcinos com arenos formam alcenos aromáticos, que nos casos de reações com arenos ricos em elétrons como benzenos alcóxi-substituídos e heteroaromáticos podem sofrer hidroarilação subsequente. A dupla hidroarilação surge nesses casos, como por exemplo, no trabalho reportado por Fujiwara e colaboradores, o pirrol e o indol sofreram dupla hidroarilação (esquema 11) na presença de catalisador Pd(OAc)₂ em AcOH, quando foram empregados os alcinos but-2-inoato e oct-2-inoato (KITAMURA, 2009; LU et al., 2000).

Esquema 11 – Dupla hidroarilação do pirrol e indol.

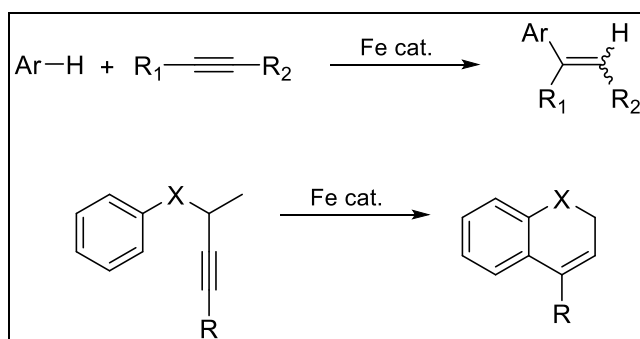


Fonte: Adaptado de LU et al., 2000b.

Muitos estudos têm reportado alternativas sintéticas para a síntese destas moléculas utilizando outros tipos de catalisadores. Biffis e colaboradores (2010) investigaram diferentes complexos ligantes de dicarbeno de paládio (II) e platina (II), isolados e combinados com sais de prata, com o objetivo de funcionalizar ligações C-H de substratos aromáticos a partir da hidroarilação de alcinos. Dentre os catalisadores testados, aquele que demonstrou melhor performance, I-AgBF₄ (BUSCEMI et al., 2010, p. 286) que é um dicarbeno à base de paládio, foi testado com diferentes heterociclos.

Dentre as inúmeras possibilidades de metais como catalisador de hidroarilação de alcinos, o ferro (III) também foi empregado para tal (esquema 12). Em um outro trabalho de Kitamura (2011), onde ele realizou a síntese de derivados bis-indólicos do ácido propanóico, o ferro (III) foi utilizado por razões de baixo custo, abundância, não-toxicidade e ambientalmente amigável, quando comparado a outros catalisadores que demonstram qualidades opostas a estas.

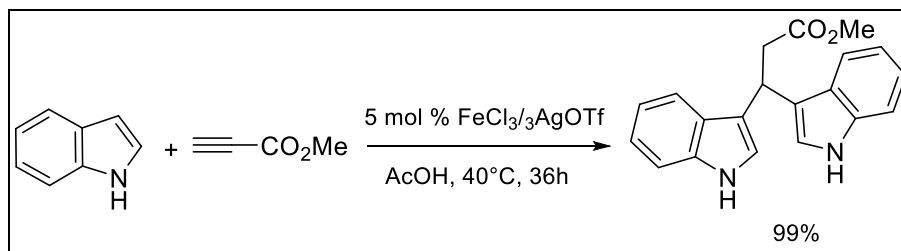
Esquema 12 – Hidroarilações inter e intramoleculares catalisadas por ferro.



Fonte: KITAMURA, 2011.

As reações entre os alcinos terminais e indol, 1-metil-indol e 2-metil-indol, formaram produtos de bisarilação (esquema 13) com ótimos rendimentos, mostrando que o sistema catalítico FeCl₃/3AgOTf em ácido acético pode ser muito eficiente neste tipo de hidroarilação (KUTUBI; KITAMURA, 2011).

Esquema 13 – Reação de hidroarilação entre indol e propinoato de metila.



Fonte: Adaptado de KITAMURA, 2011.

1.4 CÂNCER

No Brasil, dados de 2018-2019 estimaram o surgimento de 600 mil novos casos de câncer por ano (INCA, 2018), e em nível mundial, o período de 2012 a 2030, tem uma previsão de aumento de 50% em novos casos da doença, bem como de 60% nos óbitos (NIH, 2019).

Os gliomas compõem 28% de todos os tumores cerebrais primários e 80% de todos os tumores malignos, quando observados apenas os tumores do sistema nervoso central. De maneira geral, o termo glioma engloba todos os tumores benignos ou malignos que provém de células gliais, e embora sua incidência relativa seja baixa, possui um mau prognóstico prejudicando a qualidade de vida e a função cognitiva dos pacientes (GUNTUKU; YERRA, 2016).

Os gliomas têm origens celulares diferentes, e são classificados como oligodendroglioma, astrocitoma, ependimoma, glioblastoma, entre outros menos incidentes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas de grau I até IV de acordo com a taxa crescente de diferenciação e natureza maligna (GUNTUKU; YERRA, 2016). Glioblastoma, também conhecido como astrocitoma grau IV ou glioblastoma multiforme (GBM), é altamente prevalente (54,7%) entre todos os gliomas e é a forma mais agressiva com pior prognóstico (FERLAY et al., 2015). O GBM tem baixas taxas de sobrevivência com apenas 4,7% dos pacientes com sobrevida superior a cinco anos (EVANS et al., 2005).

A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia à base de temozolomida (TMZ) são opções de tratamento fundamentais no manejo clínico. No entanto, a maioria dos GBM's são cirurgicamente irresssecáveis e, quando diagnosticados em estágio avançado, o nível de resistência à quimioterapia convencional aumenta. Além disso,

pelo difícil acesso à radioterapia, os GBM's tornam-se um dos cânceres mais difíceis de tratar (OHKA; NATSUME; WAKABAYASHI, 2012). Embora não esteja relacionado entre os tumores de maior incidência na população em geral, os pacientes com GBM têm a peculiar e preocupante característica de baixa sobrevida (em média 14 meses), fato este que tem apresentado pouca alteração nas últimas quatro décadas, justificando a necessidade da obtenção de novos alvos terapêuticos para o tratamento desta neoplasia (BRODBELT et al., 2015).

Uma vez que a busca por alternativas terapêuticas para o câncer ainda representa um obstáculo no avanço clínico, é de suma importância o aprofundamento no estudo destes novos compostos, a fim de se encontrar novos meios de tratamento para diversos tipos tumorais, ainda mais àqueles com elevada mortalidade, como os GBM's.

O desenvolvimento de fármacos antineoplásicos geralmente seguem dos dois modelos classicamente utilizados para a descoberta de moléculas líder: o modelo fenotípico ou o modelo focado em um alvo terapêutico específico. No modelo fenotípico, as substâncias de interesse são investigadas quanto ao seu efeito biológico em modelos relevantes e validados (cultura de células tumorais, por exemplo), enquanto que no modelo focado em um alvo terapêutico é investigada a capacidade da substância de interagir com o alvo escolhido. O papel do alvo escolhido na doença a ser investigada precisa ser conhecido e validado (ANDRADE et al., 2016).

Ambos os modelos possuem suas vantagens e desvantagens. Porém, em doenças complexas e multifatoriais (como o câncer), a validação de um alvo farmacológico torna-se mais desafiadora, e muitas vezes é necessário que a molécula candidata ligue-se a mais de um alvo para produzir a resposta fisiológica desejada. Por este motivo, muitas indústrias estão revisitando o modelo fenotípico como principal ferramenta de triagem de novos fármacos para o tratamento destas doenças (ANDRADE et al., 2016).

1.4.1 Ensaios *in vitro* para determinação da eficácia antitumoral

A avaliação da atividade não-clínica de uma molécula candidata (prova de princípio) é uma das etapas essenciais durante o desenvolvimento de medicamentos. Esta inclui ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, que podem ser

conduzidos durante todas as fases de desenvolvimento. Ferramentas *in vitro* comumente utilizadas incluem os ensaios de citotoxicidade, proliferação e invasão celular, utilizando culturas 2D e 3D de diferentes células tumorais. A citotoxicidade é considerada principalmente como o potencial de um composto para induzir a morte celular (EISENBRAND et al., 2002).

Dados de sistemas de testes *in vitro* baseados em células são amplamente utilizados pela comunidade científica e órgãos reguladores em testes de eficácia farmacológica, toxicidade, avaliação de segurança e avaliação de risco. O maior uso de sistemas de teste *in vitro*, no entanto, é para elucidar os mecanismos de toxicidade e / ou demonstrar o processo biológico envolvido ao expor os sistemas de teste a vários tipos de substâncias (OECD, 2018).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são os primeiros testes realizados na avaliação farmacológica de novos compostos que possam ser usados como antitumorais, e por isso são extremamente úteis para a definição da eficácia terapêutica. Dessa forma, podem-se definir os limites de concentração das substâncias para ensaios posteriores e a partir disso é possível realizar um *screening* geral de substâncias químicas com potencial antitumoral aptas ou não para seguirem para os próximos testes, (EISENBRAND et al., 2002; FRESHNEY, 2006; HENN, 2016; PLANZ; LEHR; WINDBERGS, 2016).

A OECD (2018) lista, nos anexos do Guia de Boas Práticas de Métodos *In Vitro*, uma série de métodos que testam a viabilidade de culturas de células, utilizados para avaliar danos à estrutura celular, como tipo de morte celular, avaliação da citotoxicidade e da viabilidade celular através de corantes indicadores, podendo ser invasivos ou não invasivos. Bem como testes de avaliação do metabolismo celular, como o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) que avalia a função mitocondrial (respiração celular), o ensaio de Captação de Vermelho Neutro (*Neutral Red Uptake – NRU*) que avalia a função lisossomal e o ensaio de ATP (trifosfato de adenosina, relacionado às funções vitais básicas das células), que mede o teor total de ATP em uma população de células, cabe destacar que células não viáveis não produzem ATP, têm um aumento no consumo do mesmo e podem perder ATP através de perfurações da membrana plasmática (EISENBRAND et al., 2002; OECD, 2018).

O ensaio de vermelho neutro e o ensaio de MTT são os mais comumente empregados para a detecção de citotoxicidade ou viabilidade celular após a

exposição a substâncias tóxicas. A citotoxicidade é um marcador útil e amplamente utilizado para estabelecer níveis de concentração para o item de teste, bem como pode fornecer algumas informações de interação entre as células em cultura e o item de teste (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O ensaio de vermelho neutro é usado para medir viabilidade celular, mas também tem sido usado como indicador de citotoxicidade em linhagens celulares, servindo como teste preliminar na definição de doses e na condução dos ensaios subsequentes, principalmente os relacionados à toxicidade oral aguda sistêmica (HENN, 2016; TANER et al., 2014). Neste ensaio as células viáveis incorporam o corante vermelho neutro, que é fracamente catiônico, o qual permanece concentrado nos lisossomos das células, que possuem matriz aniônica. Agentes tóxicos podem modificar a superfície celular ou a membrana lisossomal, deixando seu sistema fragilizado e causando alterações que podem ser irreversíveis. Esses eventos acarretam na inibição do crescimento ou morte celular, ocasionando a redução da captação do corante e conseqüente queda da viabilidade celular (HENN, 2016; REPETTO; PESO; ZURITA, 2008). Com este ensaio é possível calcular o IC₅₀, que é a concentração do composto onde 50% das células são afetadas.

A maioria das células primárias e linhagens celulares humanas e de outras espécies podem ser utilizadas com o mesmo protocolo de testes desde que sejam selecionados meios de cultura apropriados e condições de incubação de acordo com a necessidade específicas de cada célula (REPETTO; PESO; ZURITA, 2008). O ensaio tem sido utilizado em muitas linhagens de células humanas, incluindo células de melanoma, células de neuroblastoma, hepatócitos, melanócitos e fibroblastos, além de células como queratinócitos normais e células endoteliais (MARCHETTI et al., 2018; REPETTO; PESO; ZURITA, 2008).

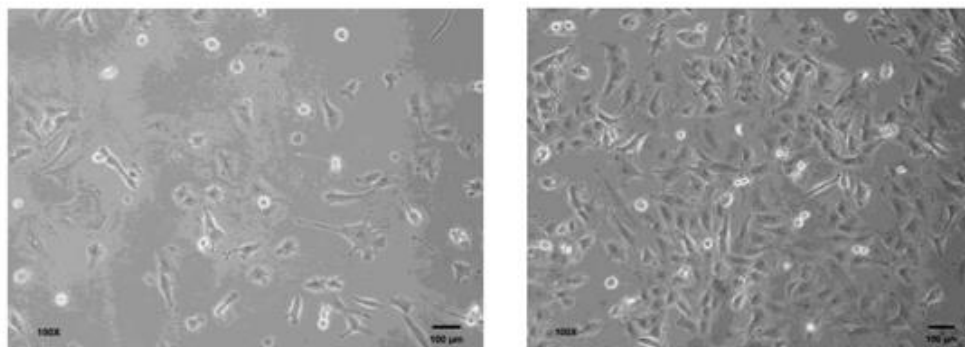
Portanto, o ensaio vermelho neutro é uma ferramenta útil para detectar danos lisossômicos quando usado em conjunto com outros testes, a fim de distinguir entre citotoxicidade e danos às organelas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Além de ser um ensaio mais sensível, mais simples e mais barato quando comparado a outros testes de viabilidade celular, além de utilizar reagentes mais estáveis quando comparado ao ensaio de MTT, por exemplo (REPETTO; PESO; ZURITA, 2008).

1.4.1.1 As linhagens celulares de glioblastoma

Os testes *in vitro* são sistemas biológicos que consistem no uso de tecidos ou linhagens celulares, e a *OECD* recomenda que estes materiais sejam provenientes de bancos de culturas de células reconhecidos para que sejam asseguradas sua rastreabilidade, bem como a ausência de infecções ou contaminações acidentais por vírus ou micoplasma, que podem alterar significativamente as características das células. Como estas contaminações não são evidentes, a documentação sobre a autenticidade da linhagem celular, incluindo a verificação de sua identidade e prova de que não houve contaminação cruzada com outras linhas de células e / ou contaminação causada por bactérias, leveduras, fungos ou micoplasma é de extrema importância (OECD, 2018). É pouco provável que os sistemas biológicos fornecidos por bancos de cultura de células estejam contaminados com micro-organismos, além de fornecerem certificado de análise e da origem das mesmas. A *OECD* cita em seu documento oito bancos reconhecidos de coleções de culturas células, dentre eles a *American Type Culture Collection* (ATCC), que é de onde provém as linhagens celulares de glioblastomas T98G e U87 utilizadas nesta pesquisa.

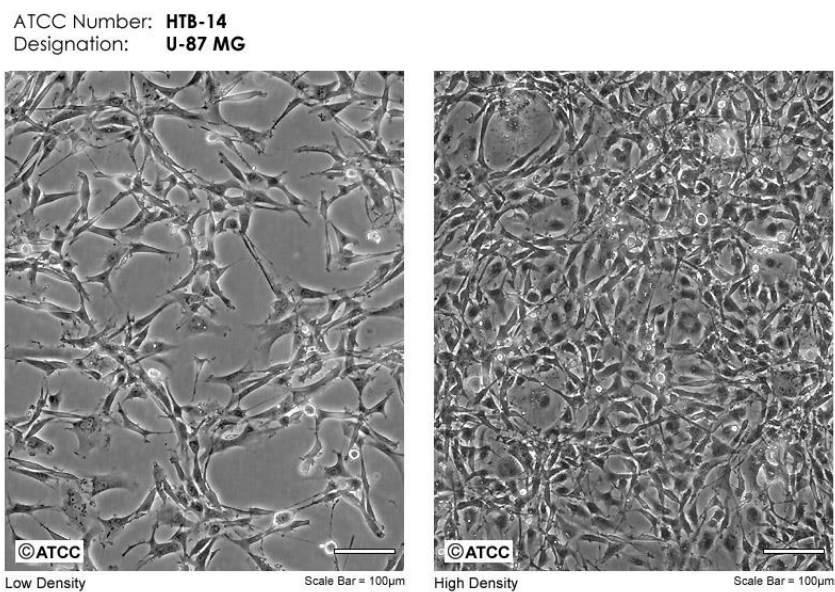
A T98G é uma linhagem celular encontrada em glioblastomas humanos, resistente à Temozolomida (TMZ), droga utilizada na quimioterapia como primeira escolha. A figura 8 apresenta o aspecto morfológico das células T98G em baixa e alta densidade.

Figura 8 – Aspecto das células T98G com baixa a alta confluência



A U87 é uma linhagem celular, de morfologia epitelial, encontrada em glioblastomas humanos, sensível à Temozolomida (TMZ). A figura 9 apresenta o aspecto morfológico das células U87 em baixa e alta densidade.

Figura 9 – Aspecto das células U87 com baixa e alta confluência



Fonte: <https://www.atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-14.ashx>

1.5 MICROBIOLOGIA – AS BACTÉRIAS E OS BIOFILMES

1.5.1 A formação de biofilmes: características e consequências

A descoberta das bactérias está relacionada a Van Leeuwenhoek e às suas observações de micro-organismos nos dentes, relatadas em meados do século XVII. Porém apenas em 1978, Costerton e colaboradores sugeriram o primeiro conceito de biofilme (JAIN et al., 2007).

Os biofilmes são definidos atualmente como comunidades de micro-organismos capazes de aderir, de maneira irreversível, a uma superfície biótica ou abiótica (FLEMMING; WINGENDER, 2010; GOLOVLEV, 2002). Muitos estudos relatam que a maioria dos micro-organismos podem existir naturalmente vivendo em biofilmes (JEFFERSON, 2004). Essa formação confere aos organismos uma capacidade de sobrevivência aumentada em diversos ambientes, e por este motivo as bactérias contidas nos biofilmes são extremamente resistentes aos tratamentos com antibióticos (JAIN et al., 2007; ROSSATTO, 2015).

A habilidade de adesão em superfícies pelos micro-organismos fornece uma vantagem evolucionária que permite a maturação, aumento da taxa de sobrevivência e o estabelecimento de relações simbióticas por meio do microambiente do biofilme. Além disso, aumenta a resistência contra condições ambientais hostis, como privação de nutrientes, excesso de salinidade, bem como temperatura e pH extremos (GIAOURIS et al., 2014; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; OTTO, 2013).

Um biofilme típico é constituído pelas células microbianas e pela matriz ou substância polimérica extracelular (*exopolymeric substance* – EPS). A matriz, por sua vez, é composta basicamente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, correspondendo a aproximadamente 50 a 90% da matéria orgânica do biofilme. As substâncias poliméricas produzidas pelos micro-organismos servem para manter as células sésseis unidas, bem como propiciam um ambiente de troca de material genético e formam a estrutura tridimensional do biofilme (ABDALLAH et al., 2014).

Os biofilmes podem ser formados em diversos tipos de superfícies e, por este motivo, podem ser encontrados em diferentes locais, que vão desde fermentadores de alimentos a tubos de perfuração de poços de petróleo, e também em tecidos

humanos. É suficiente dizer que os biofilmes têm sido associados a muitas condições, incluindo placa dentária, infecções do trato respiratório superior, infecções urogenitais e doenças associadas a dispositivos médicos, por exemplo, um coração artificial total, cateteres venosos, dispositivos intrauterinos, etc. Dispositivos médicos implantados, como válvulas cardíacas e veias artificiais e articulações, são especialmente vulneráveis a doenças associadas a biofilme microbiano. Além disso, estima-se que mais da metade das doenças humanas causadas por infecções bacterianas estejam relacionadas a biofilmes (ANTUNES et al., 2011; DONLAN; COSTERTON, 2002; MAGANA et al., 2018; ROSSATTO, 2015; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Devido à dificuldade no tratamento de infecções relacionadas a biofilmes, há o desenvolvimento de um processo infeccioso crônico e persistente, que eleva o número de internações e custo para o sistema de saúde, aumentando os índices de morbidade e mortalidade. Além disso, a formação de biofilme na indústria alimentícia é um problema sanitário, causando danos para alimentos, pois podem servir como reservatório de patógenos e manutenção de equipamentos devido à corrosão (GIBSON et al., 1999; JAIN et al., 2007; MAGANA et al., 2018).

Sistemas de biofilmes formados na água são muito mais complexos quando comparados a biofilmes formados em materiais médicos, devido a presença de produtos de corrosão, materiais argilosos, diatomáceas de água doce e bactérias filamentosas frente à composição simples dos biofilmes de materiais médicos que são compostos por bactérias cocóides e matriz polimérica extracelular associadas. Além disso, os biofilmes também são comumente associados a plantas e animais. Superfícies de tecidos que se encontram em meio rico em água, como dentes e mucosas intestinais e gástricas, desenvolvem rapidamente biofilmes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JAIN et al., 2007).

A formação do biofilme é um processo dinâmico e envolve basicamente as seguintes etapas: adesão inicial reversível, adesão irreversível com início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme, maturação e dispersão (ABDALLAH et al., 2014; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; OTTO, 2013; ROSSATTO, 2015; SREY; JAHID; HA, 2013).

A adesão inicial pode ocorrer em superfícies bióticas, como o tecido humano, ou abióticas, como dispositivos médicos e superfícies metálicas e plásticas de indústrias de alimentos. Nesta etapa, a adesão é mediada por fatores inespecíficos,

como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, e específicos, como moléculas de superfície. O depósito de material orgânico também favorece a formação de um filme condicionante que facilita a adesão microbiana (DUFOR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012; ROSSATTO, 2015).

Fatores como disponibilidade de adesão microbiana, superfície, nutrientes e estímulos ambientais regulam a formação de biofilme. A melhor abordagem para prevenir a formação de biofilmes ainda é impedir a adesão microbiana inicial. Essa adesão ocorre principalmente através de interações químicas entre as estruturas celulares e grupos moleculares do substrato onde as bactérias se aderem. A maioria dos micro-organismos é carregada negativamente, então, um substrato carregado negativamente exerce uma força eletrostática repulsiva sobre eles, porém, na maioria das vezes, a soma destas variáveis desloca o equilíbrio químico no sentido da adesão. O controle da carga e das propriedades hidrofóbicas das superfícies do substrato pode ser um caminho para influenciar a interação dos micro-organismos com a superfície, impedindo a adesão microbiana inicial (ABDALLAH et al., 2014; DUNNE, 2002).

A remoção total de biofilmes só é possível quando os biofilmes são diretamente acessíveis, como, por exemplo, nas partes externas do corpo humano. Os biofilmes dentais podem ser removidos por limpeza mecânica em combinação com o uso de substâncias ativas de superfície, como enxaguantes bucais. As bactérias que aderem às lentes de contato podem ser removidas esfregando as lentes entre os dedos em combinação com soluções de limpeza. Contudo, a partir da adesão inicial, as células replicam-se e a adesão torna-se irreversível, principalmente devido à secreção de EPS. As interações químicas estabelecidas são muito fortes e torna bastante complexa a remoção de um biofilme, além de haver a formação de agregados sobre o substrato (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007; SREY; JAHID; HA, 2013).

A força de adesão de um biofilme a uma superfície depende da força da ligação entre os organismos e a superfície, bem como da coesão do filme formado, sendo a adesão microbiana inicial e o crescimento superficial, importantes tópicos para pesquisa nesta área (JAIN et al., 2007).

As comunidades bacterianas são extremamente organizadas, apresentando resistência à terapia convencional por antibióticos e às defesas imunes do hospedeiro infectado, deste modo impedindo a penetração dos antimicrobianos e

erradicando apenas as populações existentes nas camadas superficiais do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002; SZOMOLAY et al., 2005).

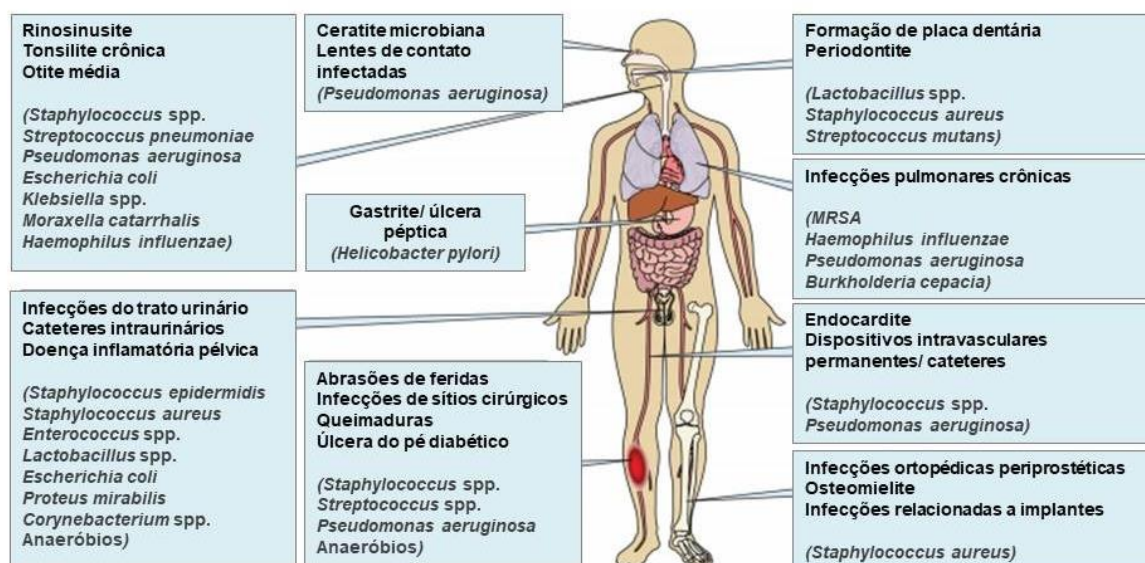
Diversos mecanismos estão envolvidos com a baixa suscetibilidade de células em biofilme aos antimicrobianos. Um destes fatores é a penetração diminuída de agentes químicos no biofilme, uma vez que as substâncias poliméricas agem como barreira impedindo a entrada, ou ainda, interagindo com os antimicrobianos. Uma segunda hipótese é que muitas células em um biofilme sobrevivem em limitação nutricional e, portanto, vivem em um estado metabólico mais lento. Esta heterogeneidade de estados fisiológicos significa que pelo menos algumas células serão resistentes, dado o fato de que muitos antibióticos atuam apenas sobre a fase de crescimento microbiano, agindo especificamente sobre a síntese proteica, de ácidos nucleicos ou da parede celular. Um terceiro mecanismo postula acerca da transferência de genes de resistência, por exemplo, por meio de plasmídeos, os quais podem codificar resistência para múltiplos agentes antimicrobianos. Uma quarta proposição sugere que a resistência ocorra por falha no reconhecimento dos biofilmes pela defesa imunológica, principalmente devido à presença do EPS, que protege as células (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; ROSSATTO, 2015; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

1.5.2 Micro-organismos de importância médica formadores de biofilme

Os procariontes, como as bactérias, são alvo da maioria dos estudos que envolvem formação de biofilme, porém leveduras, microalgas e protozoários também são capazes de integrar o arcabouço de um biofilme. E embora os biofilmes possam ser formados por uma única espécie, a maioria compreende muitas espécies e são essas interações que vão caracterizar a estrutura, função e desenvolvimento destas comunidades (GIAOURIS et al., 2014).

Dentre os principais micro-organismos relacionados à formação de biofilme em dispositivos médicos e ligados a infecções humanas (figura 10) encontram-se *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e a família das Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (BURMOLLE et al., 2010; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Figura 10 – Infecções humanas relacionadas à formação de biofilme.



Fonte: Adaptado de Magana *et al.*, 2018.

1.5.3 Estratégias antibiofilme

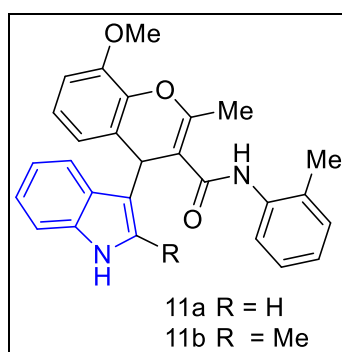
As pesquisas e avanços na descoberta de compostos antimicrobianos têm ocasionado mudanças significativas na vida da população. A natureza tem sido fonte de pequenas moléculas dotadas de variedade estrutural e ampla atividade biológica. A descoberta e o desenvolvimento de antibióticos contra uma variedade de infecções microbianas estão entre os maiores feitos da vida moderna. Embora o ser humano utilize antimicrobianos com finalidades médicas e agrícolas, os microorganismos têm desenvolvido e compartilhado mecanismos de defesa contra os mesmos (BRANNON; HADJIFRANGISKOU, 2016).

O constante surgimento de bactérias resistentes aos medicamentos, ocasionando altas taxas de mortalidade, tem sido um desafio para a síntese orgânica na busca de potentes e eficazes candidatos à fármacos antibacterianos. Fármacos com diferentes modos de ação e diferentes quimiotipos são extremamente desejáveis. O núcleo indólico é considerado um *scaffold* privilegiado, pois tem sido encontrado em pequenas moléculas bioativas naturais e sintéticas. O potencial de pequenas moléculas que contenham o núcleo indólico como agentes antibacterianos não tem sido tão explorado, como em outras áreas da medicina,

como na terapia do câncer, por exemplo. Embora a atividade biológica esteja frequentemente relacionada a estruturas moleculares complexas, muitas moléculas indólicas estruturalmente mais simples têm sido reportadas na literatura com atividade antimicrobiana. O potencial de estruturas indólicas pode influenciar funções biológicas de amplo espectro, como já foi mencionado anteriormente neste trabalho, e por este motivo, este tipo de estrutura torna-se adequada para o desenvolvimento de candidatos a fármacos capazes de superar o atual problema global de resistência bacteriana a diversos fármacos presentes no mercado (CIULLA; KUMAR, 2018).

Na figura 11 tem-se um exemplo de dois compostos antimicrobianos, onde 11a e 11b apresentaram excelente atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, com $MIC^1 = 9,3 \mu g / mL$ (CIULLA; KUMAR, 2018).

Figura 11 – Agente antibacteriano contendo a estrutura indólica na sua composição.



Fonte: Adaptado de CIULLA; KUMAR, 2018.

A ação de qualquer droga antibacteriana pode desencadear o aumento da resistência às bactérias e esse comportamento exige o desenvolvimento de antibióticos com diferentes mecanismos de ação. Esta é uma situação frustrante e economicamente inviável e também uma das razões para muitas empresas farmacêuticas abandonarem a pesquisa da descoberta de antibióticos (CIULLA; KUMAR, 2018).

Além da busca por compostos capazes de inibir o crescimento bacteriano, uma outra perspectiva que se tem lançado é a terapia antivirulência, que se baseia

¹ MIC (concentração inibitória mínima).

na prevenção ou interrupção de uma infecção através da neutralização dos fatores de virulência, ao invés do micro-organismo em si. Isto significa que não há morte bacteriana e, desta forma, reduz-se a aplicação de antimicrobianos e a emergência de isolados resistentes. Ainda, o desligamento da expressão de virulência, atrelado à manutenção das células em estado planctônico, pode tornar os micro-organismos mais sensíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, bem como aos antibióticos. Além disso, esta terapia pode ser empregada potencialmente em combinação com agentes antimicrobianos, de modo a estabelecer um efeito sinérgico (BRANNON; HADJIFRANGISKOU, 2016; RASKO; SPERANDIO, 2010).

Particularmente no que concerne ao controle de biofilmes, uma abordagem multidisciplinar tem apresentado papel crescente na medicina moderna. As estratégias de controle partem de basicamente dois pressupostos: (a) inibição da formação do biofilme, seja pela própria inibição do crescimento bacteriano através de compostos bactericidas ou bacteriostáticos, quanto pelo bloqueio da adesão microbiana via superfícies modificadas (por exemplo, por adição de compostos com tal atividade); (b) a erradicação ou tratamento do biofilme já formado, podendo ser através da dispersão das células e regresso à forma de vida planctônica, ou pela própria eliminação dos micro-organismos (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; COUGHLAN et al., 2016; ESCAICH, 2010).

1.5.4 *Staphylococcus epidermidis*

O principal representante dos *Staphylococcus* spp. é o *S. aureus*, embora outras espécies, como *S. epidermidis*, são emergentes e têm sido cada vez mais associadas com infecções oportunistas.

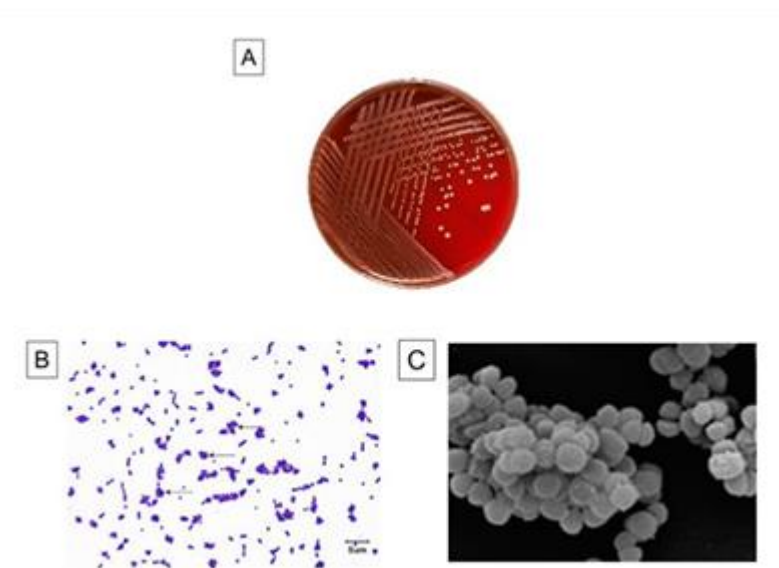
S. epidermidis é um patógeno gram-positivo oportunista, arranjado em cachos, anaeróbio facultativo, imóvel, e não esporulado pertencente à família *Staphylococcaceae* (figura 12). É produtor da enzima catalase e é o principal estafilococo coagulase-negativo de relevância clínica (BÜTTNER et al., 2015; OTTO, 2009, 2013; TRENTIN et al., 2011; ZIMMER et al., 2014).

A *S. epidermidis*, que é a cepa utilizada neste trabalho, é comumente isolada em infecções da corrente circulatória e àquelas associadas a implantes como cateteres, válvulas e próteses. Sua patogenicidade é devida principalmente à capacidade de formar biofilmes, e a partir da formação deste biofilme a bactéria está

protegida tanto do sistema imune do hospedeiro, quanto dos ataques dos antimicrobianos, o que deixa as infecções causadas por este micro-organismo muito difícil de controlar. Este tipo de bactéria costuma colonizar a pele e as mucosas de humanos e outros mamíferos (ROSSATTO, 2015).

Devido sua alta incidência em infecções relacionadas com a assistência à saúde e sua colonização natural na pele, *S. epidermidis* é uma importante causa de infecções associadas a implantes médicos, como válvulas e juntas protéticas, cateteres urinários e cardíacos e outros dispositivos. Em estudo de vigilância de infecções associadas a cateteres na África do Sul, foi demonstrado que *S. epidermidis* resistente à metilina foi o patógeno mais prevalente neste tipo de dispositivo. Dentre os fatores relacionados à infecção associada a estes aparelhos, a adesão bacteriana e a formação de biofilme representam os principais mecanismos de colonização e patogênese (BÜTTNER et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2017).

Figura 12 – *S. epidermidis*. (a) Morfologia da colônia em ágar sangue. (b) Arranjo de cachos gram-positivos em microscópio óptico. (c) Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *S. epidermidis*.



Fonte: Adaptado de (a) <http://www.bacteriainphotos.com/> (b) <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ0al8nAcZWAKWc8u0FIF3Jx8CO511vbWa3ctEeMQqrKqM3bZ37> (c) Adaptado de Zimmer *et al.*, 2014.

S. epidermidis está envolvido em um vasto número de infecções, dentre elas, podemos citar endocardites, infecções de sítios cirúrgicos, úlceras do pé diabético e

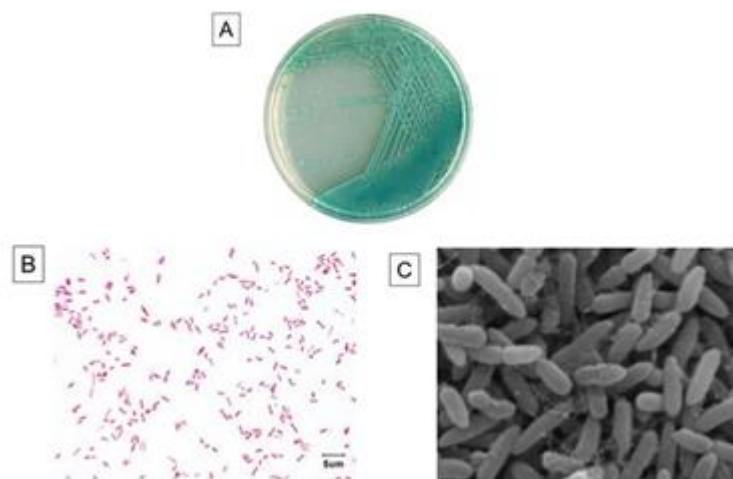
infecções do trato urinário e doença inflamatória pélvica (BÜTTNER et al., 2015; MAGANA et al., 2018; ROSSATTO, 2015).

1.5.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é um bacilo gram-negativo pertencente à família *Pseudomonadaceae*. É aeróbio estrito, não esporulado e possuidor de flagelo monotríqueo (figura 13), também é capaz de formar biofilmes não somente em superfícies sólidas e mucosas, mas também na interface ar-líquido de culturas estáticas, por esse motivo tem se tornado cada vez mais resistente aos medicamentos disponíveis no mercado. A *P. aeruginosa* é considerada uma bactéria ubíqua e oportunista, podendo ser virulenta para diferentes hospedeiros, incluindo plantas, nematoides, insetos e mamíferos. Em seres humanos, pode causar infecções crônicas progressivas em pacientes com fibrose cística em decorrência de sua capacidade de formar biofilmes robustos. Além de representar um risco para pacientes imunocomprometidos, este patógeno hospitalar é intrinsecamente resistente a uma ampla gama de antimicrobianos (KERR; SNELLING, 2009; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

P. aeruginosa é um patógeno versátil associado a um amplo espectro de infecções em humanos. Nos serviços de saúde, a bactéria é uma importante causa de infecção em indivíduos vulneráveis, incluindo aqueles com queimaduras ou que recebem cuidados intensivos. Nesses grupos, a morbidade e a mortalidade atribuíveis à infecção por *P. aeruginosa* podem ser altas. O manejo de infecções é difícil, pois a *P. aeruginosa* é inerentemente resistente a muitos antimicrobianos. Além disso, o tratamento está se tornando cada vez mais problemático devido ao surgimento e disseminação de resistência aos poucos agentes que permanecem como opções terapêuticas (ROSSATTO, 2015).

Figura 13 – *P. aeruginosa*. (a) Morfologia da colônia com produção de pigmento em ágar cromogênico. (b) Arranjo de bacilos gram-negativos em microscópio óptico. (c) Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *P. aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de (a) <http://www.chromagar.com/food-water-chromagar-pseudomonas-ps820-ps822-focus-on-pseudomonas-36.html#.W4wULuhKjIU> (b) <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab12/Psaeruginosa.html> (c) Zimmer *et al.*, 2013.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Este trabalho tem por objetivo sintetizar indóis alquenilados através da reação de hidroarilação e avaliar seu potencial antitumoral *in vitro* e de inibição e erradicação de biofilmes bacterianos.

2.2 ESPECÍFICOS

Sintetizar, purificar e caracterizar as moléculas.

Investigar as melhores condições reacionais para a reação de hidroarilação utilizando diferentes moléculas indólicas e diferentes alcinos.

Realizar os testes *in silico*, a fim de avaliar resultados farmacocinéticos das moléculas que se deseja sintetizar.

Avaliar a toxicidade das moléculas nas células tumorais T98G e U87 através do ensaio de Vermelho Neutro.

Avaliar o potencial de inibição e erradicação de biofilmes formados pelas bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

3 EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Reagentes, solventes e *softwares*

Todos os reagentes e solventes utilizados foram obtidos comercialmente. Os reagentes foram utilizados sem tratamento prévio.

A nomenclatura dos compostos foi dada baseando-se no programa Chem Draw Professional 17.1 (ChemOffice 2018).

Os espectros de RMN foram elaborados e editados MestReNova 8.0.

Os dados obtidos nos ensaios *in silico* foram elaborados pelo programa *DataWarrior* 5.0.

Os gráficos dos ensaios microbiológicos foram elaborados a partir do programa *GraphPad Prism* 8.0.

Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho digital da marca Maxim-LAB.

3.1.2 Métodos cromatográficos

As reações e purificações foram acompanhadas via cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando papel cromatográfico da marca Macherey-Nagel Xtra SIL G/UV₂₅₄. As placas foram reveladas em câmara com luz ultravioleta (UV) e cuba de iodo.

As purificações das moléculas foram realizadas através de cromatografia clássica em coluna de vidro utilizando-se sílica gel Macherey-Nagel (70-230 mesh). Os solventes empregados nos eluentes, bem como a proporção utilizada, estão descritos na parte experimental das sínteses de cada molécula.

3.1.3 Métodos espectrométricos

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram realizadas utilizando os espectrômetros da marca Varian VNMRS-300 (75) MHz, Varian 400 (100) MHz, o solvente utilizado para solubilizar as amostras foi

clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o padrão interno empregado foi o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS ($\delta = 0,00$ ppm) que foi utilizado como padrão interno para os espectros de RMN ^1H , e em relação ao CDCl_3 ($\delta = 77,23$ ppm) para os espectros de RMN ^{13}C . As multiplicidades dos sinais foram descritas entre parênteses (s = singlete, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, q = quarteto, m = multiplete), o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz)².

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro por transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo IR Prestige21 e as frequências estão relacionadas em cm^{-1} .

Os resultados das análises de massas de alta resolução (HRMS) foram obtidos em um espectrômetro marca Bruker Daltonics modelo micrOTOF-QIII, operando em modo ESI (Íon Electron Spray Ionization).

As análises de cromatografia gasosa acoplada a massas de baixa resolução foram realizadas em um equipamento da marca Shimadzu, modelo QP-2010 Ultra, compatível com sistema de cromatografia gasosa, equipado com coluna NST Nanoseparation Technology (30m x 0,25mm x 0,25 μm) acoplado a um detector espectrométrico de massas, utilizando a seguinte condição metodológica:

Condição padrão para análise por cromatografia gasosa acoplada à massas (CG-EM): T(injetor) = 250°C; T(detector) = 270°C; T (inicial) = 150°C; Tempo (inicial) = 0,33 minuto; taxa = 10 °C/minuto; T(final) = 200°C; Tempo (final) = 1,00 minuto; taxa A = 15°C/minuto; T(final) = 300°C; Tempo (final) = 4,00 minuto; gás de arraste: N_2 ;

² As análises de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizadas por pesquisadoras do LAMOCA (Instituto de Química da UFRGS), sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Schneider.

3.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

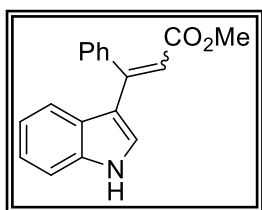
3.2.1 Procedimento padrão de extração do bruto reacional

Todas as reações após finalizadas, foram tratadas de modo a extrair qualquer componente de interesse da fase aquosa para a fase orgânica. O procedimento de extração foi igual para todas as reações e compreende as seguintes etapas:

- i. Adição de 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) para um funil de separação;
- ii. Realização de três lavagens da fase aquosa com 10 mL de éter etílico, cada;
- iii. Adição de agente secante à fase orgânica, como Na₂SO₄ ou MgSO₄ e realizar a filtração.
- iv. Evaporar o solvente em sistema de rotaevaporação.

3.2.2 Procedimentos de sínteses

3.2.2.1 (*E,Z*)-3-(1*H*-indol-3-il)-3-fenilacrilato de metila (**3a**) (GODOI, 2017).



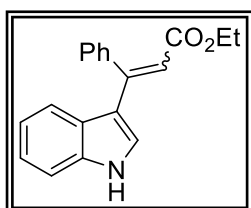
Em um balão de 10 mL foram adicionados indol (0,2343 g, 2 mmol), Pd(OAc)₂ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se fenil propinoato de metila (0,148 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi acompanhado via CCD (3:7 acetato de etila/hexano) até o consumo do alcino, em 8h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 15%. O produto obtido foi um sólido amarelo escuro. Isômero majoritário *E* (*E/Z* 1,5:1). Rendimento 54%. **PF**: 109-113°C. **Rf**: 0,34 (2:8 acetato de etila/hexano).

IV (cm⁻¹): ν 3350 (N-H), 1689 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,61 (s, 3H, CH₃), 6,57 (s, 1H, vinílico), 6,82 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H, arom), 7,18-7,39 (m, 9H, arom), 7,79 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 51,12; 111,70; 111,96; 118,78; 120,92; 121,47; 123,15; 125,15; 127,86; 127,98; 128,91; 129,53; 137,25; 140,18; 153,09; 167,46.
HRMS (ESI): Valor calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 278,1181; Valor encontrado: 278,1198.

3.2.2.2 (*E/Z*)-3-(1*H*-indol-3-il)-3-fenilacrilato de etila (3b) (BUSCEMI, 2010; GODOI, 2017; LU, 2000).



Em um balão de 10 mL foram adicionados indol (0,2343 g, 2 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se fenil propinoato de etila (0,165 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi acompanhado via CCD (2:8 acetato de etila/hexano) até o consumo do alcino, em 24h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 10%. O produto obtido foi um sólido amarelo. Isômero majoritário *E* (*E/Z* 1,7:1). Rendimento 56%. **PF:** 94-103°C. **Rf:** 0,34 (2:8 acetato de etila/hexano).

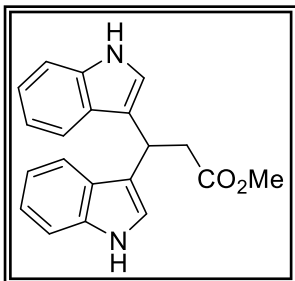
IV (cm^{-1}): ν 3321 (N-H), 1682 (C=O).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,13 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3), 4,05 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 6,56 (s, 1H, vinílico), 6,80 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, arom), 7,15-7,39 (m, 8H, arom), 7,79 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, arom), 8,55 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): 14,24; 59,79; 111,93; 112,40; 118,76; 120,96; 121,41; 123,10; 125,15; 127,82; 127,87; 128,93; 129,39; 137,25; 140,40; 152,57; 167,22.

HRMS (ESI): Valor calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_2$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 292,1338; Valor encontrado: 292,1356.

3.2.2.3 3,3-di(1*H*-indol-3-il)propanoato de metila (4c) (XU, 2013; ZHANG, 2015; ZHANG, 2016).



Em um balão de 10 mL foram adicionados indol (0,2343 g, 2 mmol), Pd(OAc)₂ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se propinoato de metila (0,089 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi acompanhado via CCD (3:7 acetato de etila/hexano) até o consumo dos reagentes, em 24h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 40%. O produto obtido foi um sólido dourado. Rendimento 30%. **PF:** 54-56°C. **Rf:** 0,17 (2:8 acetato de etila/hexano).

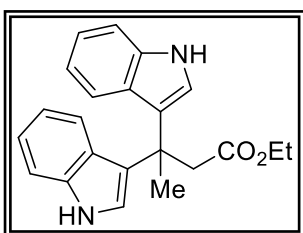
IV (cm⁻¹): ν 3406 (N-H), 1720 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,18 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, CH₂), 3,56 (s, 3H, CH₃), 5,10 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, CH), 6,92 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H, arom), 7,02-7,32 (m, 6H, arom), 7,56 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, arom), 7,98 (s, 2H, NH).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 30,91; 41,05; 51,78; 111,29; 118,71; 119,31; 119,56; 121,85; 122,03; 126,76; 136,69; 173,20.

HRMS (ESI): Valor calculado para C₂₀H₁₈N₂O₂Na (M + Na⁺): 341,1266; Valor encontrado: 341,1236.

3.2.2.4 3,3-di(1*H*-indol-3-il)butanoato de etila (4d) (KUMAR, 2017; SINGH, 2012).



Em um balão de 10 mL foram adicionados indol (0,2343 g, 2 mmol), Pd(OAc)₂ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se but-2-inoato de etila (0,117 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi acompanhado via CCD (3:7 acetato de etila/hexano) até o consumo dos reagentes, em 48h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna

cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 15%. O produto obtido foi um sólido rosado. Rendimento 50%. **PF:** 170°C. **Rf:** 0,28 (2:8 acetato de etila/hexano).

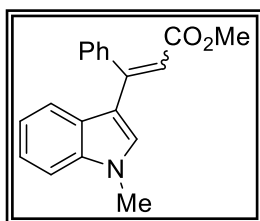
IV (cm⁻¹): ν 3404 (N-H), 3348, 1724 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 0,85 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH₃), 2,08 (s, 3H, CH₃), 3,38 (s, 2H, CH₂), 3,83 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH₂), 6,82-6,91 (m, 2H, arom), 7,02-7,38 (m, 8H, aromáticos), 7,98 (s, 2H, NH).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 13,86; 27,60; 37,99; 45,91; 59,87; 111,21; 118,98; 121,17; 121,46; 121,62; 123,10; 126,27; 137,12; 171,88.

HRMS (ESI): Valor calculado para C₂₂H₂₂N₂O₂Na (M + Na⁺): 369,1579; Valor encontrado: 369,1587.

3.2.2.5 (E/Z)-3-(1-metil-1H-indol-3-il)-3-fenilacrilato de metila (3e)



Em um balão de 10 mL foram adicionados 1-metil-indol (0,250 mL, 2 mmol), Pd(OAc)₂ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se fenil propinoato de metila (0,148 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi acompanhado via CCD (2:8 acetato de etila/hexano) até o consumo dos reagentes, em 4h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 10%. O produto obtido foi um sólido amarelo claro. Isômero majoritário *E* (*E/Z* 1,1:1). Rendimento 63%. **PF:** 120°C (isômero *E*). **Rf:** 0,47 (2:8 acetato de etila/hexano).

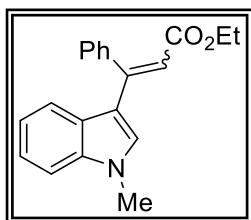
IV (cm⁻¹): ν 1707 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,60 (s, 3H, CH₃), 3,68 (s, 3H, CH₃), 6,55 (s, 1H, vinílico), 6,72 (s, 1H, arom), 7,20-7,43 (m, 8H, arom), 7,82 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 33,22; 51,03; 77,16; 110,07; 111,11; 117,31; 121,15; 121,35; 122,89; 125,78; 127,87; 128,88; 133,87; 138,21; 140,34; 152,89; 167,35.

HRMS (ESI): Valor calculado para C₁₉H₁₈NO₂ (M + H⁺): 292,1348; Valor encontrado: 292,1338.

3.2.2.6 (E/Z)-3-(1-metil-1H-indol-3-il)-3-fenilacrilato de etila (3f) (BIFFS, 2013; BUSCEMI, 2010; GODOI, 2017; LU, 2000).



Em um balão de 10 mL foram adicionados 1-metil-indol (0,250 mL, 2 mmol), Pd(OAc)₂ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se fenil propinoato de etila (0,165 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi acompanhado via CCD (2:8 acetato de etila/hexano) até o consumo dos reagentes, em 24h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 5%. O produto obtido foi um sólido laranja. Isômero majoritário *E* (*E/Z* 3:1). Rendimento 75%. **PF**: 95°C. **Rf**: 0,47 (2:8 acetato de etila/hexano).

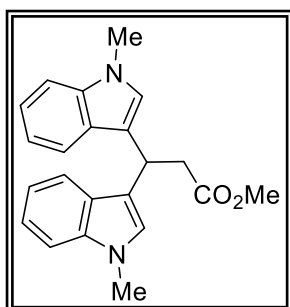
IV (cm⁻¹): ν 1705 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,12 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃), 3,65 (s, 3H, CH₃), 4,05 (q, *J* = 7,1 Hz 2H, CH₂), 6,54 (s, 1H, vinílico), 7,50-7,22 (m, 9H, arom), 7,83 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, arom).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 14,24; 33,12; 59,61; 77,16; 109,99; 111,79; 118,44; 121,24; 122,79; 125,73; 128,86; 128,97; 129,09; 138,14; 140,52; 152,31; 167,04.

HRMS (ESI): Valor calculado para C₂₀H₂₀NO₂ (M + H⁺): 306,1494; Valor encontrado: 306,1502.

3.2.2.7 3,3-di(1-metil-1H-indol-3-il)propanoato de metila (4g) (ZHANG, 2015; XHANG, 2016; ZENG, 2013).



Em um balão de 10 mL foram adicionados indol (0,250 g, 2 mmol), Pd(OAc)₂ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se propinoato de metila (0,089 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi acompanhado via CCD (3:7 acetato de etila/hexano) até o consumo dos reagentes, em 4h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento

da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 10%. O produto obtido foi um sólido castanho. Rendimento 70%. **PF:** 98-100°C. **Rf:** 0,37 (2:8 acetato de etila/hexano).

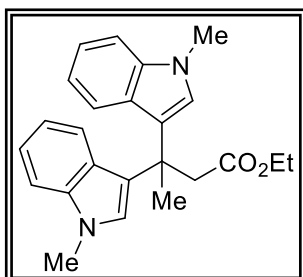
IV (cm⁻¹): ν 1739 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,17 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, CH₂), 3,57 (s, 3H, CH₃), 3,68 (s, 6H, CH₃), 5,11 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, CH), 7,28-6,83 (m, 8H, arom), 7,60 (s, 2H, arom).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 30,71; 32,82; 41,40; 51,76; 109,28; 117,42; 118,77; 119,70; 121,58; 126,51; 127,12; 137,38; 173,09.

HRMS (ESI): Valor calculado para C₂₀H₂₂N₂O₂Na (M + Na⁺): 369,1579; Valor encontrado: 369,1517.

3.2.2.8 3,3-di(1-metil-1H-indol-3-il)butanoato de etila (4h) (KUMAR, 2017).



Em um balão de 10 mL foram adicionados indol (0,250 g, 2 mmol), Pd(OAc)₂ (0,0112 g, 0,05 mmol), 1 mL de AcOH, agitou-se por alguns instantes e adicionou-se but-2-inoato de etila (0,117 mL, 1 mmol). O sistema foi deixado sob agitação à temperatura ambiente, o andamento da reação foi

acompanhado via CCD (2:8 acetato de etila/hexano) até o consumo dos reagentes, em 24h. Após o término da reação, realizou-se o tratamento da mesma conforme procedimento padrão já mencionado. A purificação foi realizada em coluna cromatográfica clássica com eluente acetato:hexano a 10%. O produto obtido foi um sólido laranja. Rendimento 46%. **PF:** 110°C. **Rf:** 0,47 (2:8 acetato de etila/hexano).

IV (cm⁻¹): ν 1716 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 0,81 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H), 2,06 (s, 3H), 3,35 (s, 2H), 3,70 (s, 6H), 3,81 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 6,87 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 6,92 (s, 2H), 7,10 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,23 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,36 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 13,75; 27,89; 32,77; 37,96; 46,12; 59,72; 77,16; 109,18; 118,34; 121,06; 121,32; 121,55; 126,30; 126,63; 137,74; 171,87.

HRMS (ESI): Valor calculado para C₂₂H₂₂N₂O₂Na (M + Na⁺): 397,1892; Valor encontrado: 397,1872.

3.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE CELULAR – VERMELHO NEUTRO

3.3.1 Células e tratamento

As linhagens de glioblastoma U87 e T98G foram adquiridas da ATCC® (*American Type Culture Collection*) e foram testadas negativamente para presença de micoplasma durante a execução deste estudo. As células U87 e T98G foram cultivadas sob condições padrão em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 0,2 mg/mL de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em garrafas de cultura a 37°C numa atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e foram colhidas para o tratamento com tripsina 0,15% mais EDTA (ácido etileno-diamino tetra-acético) 0,08%, em PBS (*phosphate buffered saline*).

Os tratamentos e soluções estoque das substâncias testadas foram preparadas imediatamente antes do uso. As concentrações apropriadas foram obtidas por diluição das soluções estoque em meio de cultura. O DMSO (dimetilsulfóxido) utilizado como solvente das drogas foi usado como controle negativo e nunca excedeu a concentração de 0,5% nos tratamentos.

3.3.2 Medida de viabilidade celular

O ensaio de absorção do vermelho neutro (*neutral red uptake, NRU*) foi utilizado para avaliação do potencial citotóxico das diferentes substâncias avaliadas neste estudo. As linhagens celulares T98G e U87 foram semeadas em uma placa de cultura de tecidos de 96 poços (1,3x10⁴/mL) em meio DMEM completo e cultivadas por 24h antes do tratamento com as moléculas testadas³.

O ensaio foi realizado de acordo com Borenfreund e Puerner (1985), com algumas modificações. As moléculas testadas foram dissolvidas em DMSO (2%) e nas concentrações de 1, 10, 50, 100 e 500 µM. Resumidamente, após o tratamento de 24h, as células foram lavadas com 250 µL de PBS antes da adição de 250 µL de

³ Os ensaios de viabilidade celular foram realizados pela pesquisadora Danielle Batista. Mestranda no PPG em Biotecnologia da UFCSPA.

corante vermelho neutro (25 µg/mL) dissolvidos em meio isento de soro e incubados durante 3h a 37°C numa incubadora com CO₂ a 5% umidificada. As células foram lavadas com PBS e a elas foram adicionados 125 µL de uma solução dessorvente (EtOH:AcOH:H₂O, 50:1:49), seguido de agitação suave durante 30 min para dissolução completa.

A absorbância foi medida em 540 nm usando um leitor de microplacas. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem do controle negativo (células tratadas com solvente 10% e 100%).

3.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

3.4.1 Cepas bacterianas e condições de cultura

As culturas utilizadas neste trabalho são ditas de referência e são chamadas cepas ATCC® (*American Type Culture Collection*). Foram previamente testadas no Laboratório de Microbiologia da UFCSPA quanto à capacidade de formação de biofilme e são reconhecidamente produtoras de biofilme.

As cepas ATCC® *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) e *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 27853) foram utilizadas como modelos bacterianos formadores de biofilmes e foram cultivadas *overnight* em meio triptona de soja (TSA – *Tryptic Soy Agar*) a 37°C.

Uma suspensão bacteriana de 3×10^8 UFC/mL em 0,9% de cloreto de sódio de cada bactéria foi utilizada para a realização dos ensaios.

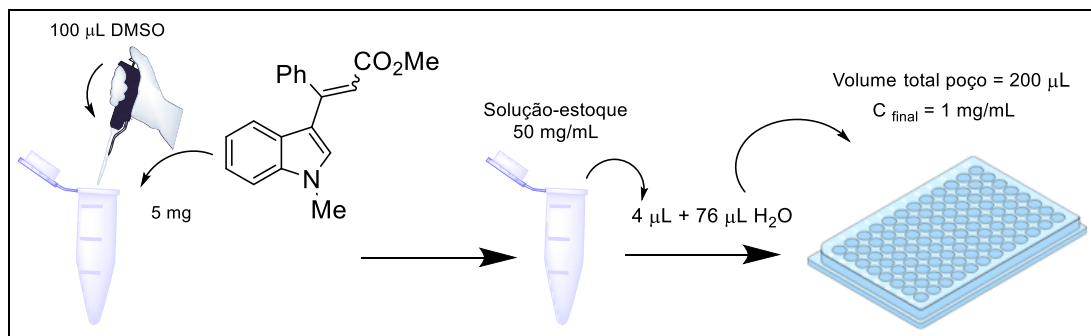
Os protocolos detalhados dos procedimentos⁴ de inibição e erradicação encontram-se nos anexos desta dissertação.

3.4.2 Crescimento bacteriano para avaliação da inibição de biofilme

O crescimento bacteriano foi avaliado como a diferença entre a densidade óptica em 620 nm no início (0h) e no final (24h) do tempo de incubação a 37°C, em placas estéreis de poliestireno de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 80 µL da suspensão bacteriana, 40 µL de caldo triptona de soja (TSB – *Tryptone Soy Broth*) e 76 µL de água e 4 µL do tratamento em DMSO (1 mg/mL), conforme esquema 13.

⁴ Os ensaios microbiológicos foram realizados por Ms. Fernanda Rossatto. Doutoranda no PPG em Biociências da UFCSPA.

Esquema 14 – Preparo do tratamento 1 mg/mL em DMSO 2%



Fonte: elaborado pela autora.

3.4.3 Protocolo de inibição de biofilme

A inibição de biofilme foi avaliada usando o ensaio cristal violeta dissolvido em água (4%), com pequenas modificações, em paralelo ao ensaio de crescimento bacteriano (TRENTIN et al., 2011). Após incubação durante 24h, o meio foi removido suavemente e os poços foram lavados três vezes com solução de NaCl 0,9% estéril. A fixação do biofilme foi feita a 60°C por 1h. Cada poço foi corado com 200 µL de indicador cristal violeta 0,4% em água, por 15 minutos e foi lavado em água corrente. O corante ligado às células foi ressuspensão com 99% de etanol e a absorbância foi medida a 570 nm (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader; Molecular Devices). Para representar 100% da formação de biofilme (amostra não tratada), os tratamentos foram substituídos por água estéril (76 µL) e DMSO (4 µL) reproduzindo as proporções dos testes.

Valores superiores a 100% representaram a estimulação da formação de biofilme em comparação com a amostra não tratada. Para o teste de inibição de biofilme foram utilizados como controle para o crescimento de *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, a rifampicina e sulfato de gentamicina (8 µL/mL), respectivamente.

3.4.4 Protocolo de erradicação de biofilme

A erradicação de biofilme também foi avaliada usando o ensaio do cristal violeta. Após 24h de incubação a 37°C de 100 µL do inóculo bacteriano e 100 µL de TSB, o meio foi removido suavemente e os poços foram lavados três vezes com

solução de NaCl 0,9% estéril. O tratamento foi realizado em uma concentração de 1 mg/mL, utilizando 5 µL em cada poço, acrescidos de 95 µL de água e 100 µL de TSB. Nos poços sem tratamento foram utilizados 5 µL de DMSO. As placas foram incubadas por mais 24h e, após incubação, o material dos poços foi retirado e cada poço foi lavado três vezes com 200 µL de solução de NaCl 0,9% estéril. A fixação do biofilme foi feita a 60°C por 1h. Cada poço foi corado com 200 µL de indicador cristal violeta 0,4% por 15 minutos e foi lavado em água corrente. O corante ligado às células foi ressuspendido com 99% de etanol e a absorbância foi medida a 570 nm (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader; Molecular Devices). Para o teste de inibição de biofilme foram utilizados como controle para o crescimento de *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, os antibióticos vancomicina (16 µL/mL) e sulfato de gentamicina (10 µL/mL), respectivamente.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de citotoxicidade nas células tumorais foram repetidos independentemente pelo menos três vezes, com amostras em triplicata para cada tratamento, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para os ensaios antibiofilme, para cada teste foram realizados duas replicatas independentes e os tratamentos foram testados em quadruplicata. A significância estatística foi determinada pelo *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey* para atividade antitumoral e pelo teste *T de Student*, considerando um $p \leq 0,05$, para a atividade antibiofilme.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AVALIAÇÃO *IN SILICO*

4.1.1 Regra dos Cinco de Lipinski

Todas as moléculas atendem às regras de Lipinski para solubilidade e permeabilidade, onde a massa molar deve ser inferior a 500 g/mol, o logP inferior a 5, a quantidade de aceptores de hidrogênio inferior a 10 e a quantidade de doadores de hidrogênio inferior a 5.

Frente aos parâmetros avaliados, em tese, nenhuma molécula terá problemas com biodisponibilidade (tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros da Regra dos Cinco de Lipinski.

Molécula	Massa Molar (g/mol)	LogP	Aceptores H	Doadores H
3a	277,32	2,49	3	1
3b	291,35	2,90	3	1
4c	318,37	3,63	4	2
4d	346,43	3,65	4	2
3e	291,35	2,62	3	0
3f	305,38	3,03	3	0
4g	346,43	3,90	4	0
4h	374,48	3,91	4	0
3i	291,35	2,89	3	1
3j	305,38	3,29	3	1
3k	215,25	2,34	3	1
3l	243,31	2,97	4	1

Fonte: elaborado pela autora a partir dos dados gerados pelo programa *DataWarrior* v.5.0.

4.1.2 Efeitos tóxicos

Os parâmetros correspondentes a efeitos tóxicos podem ser analisados na tabela 3.

Tabela 3 – Efeitos tóxicos.

Molécula	Mutagênico	Tumorigênico	Danos reprodutivos	Irritante
3a	X	X	X	X
3b	X	X	X	X
4c	X	X	X	X
4d	X	X	X	✓
3e	X	X	X	X
3f	X	X	X	X
4g	X	X	X	X
4h	X	X	X	✓
3i	X	X	X	X
3j	X	X	X	X
3k	X	X	X	X
3l	X	X	✓	X

Fonte: elaborado pela autora a partir dos dados gerados pelo programa *DataWarrior* v.5.0.

No que se refere aos riscos de toxicidade (efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e reprodutivos), as moléculas **4d**, **4h** e **3l** apresentaram, na avaliação *in silico*, efeitos indesejáveis (tabela 3). É relevante destacar que as três moléculas utilizaram o mesmo alcino (**2d**) em suas sínteses. As moléculas **4d** e **4h** são produtos bis indólicos, e ambas apresentaram efeitos irritantes (tabela 3) na avaliação. A molécula **3l** é olefínica e apresentou tendência a danos reprodutivos (tabela 3).

Estes dados são obtidos através de *softwares*, neste caso o *software DataWarrior* (SANDER T, FREYSS J, VON KORFF M, 2015), disponibilizado na *Internet*, foi utilizado para a geração dos dados aqui apresentados. Estes programas fazem uso de bancos de dados que contém milhares de estruturas moleculares com propriedades bioativas, e a partir de combinações e comparações de fragmentos

das estruturas que se deseja analisar com o banco de dados, é possível prever informações como *druglikeness* e riscos de toxicidade.

É de grande valia destacar que os ensaios *in silico* aqui realizados, são ensaios preliminares, sendo desejável prosseguir com outros testes, com o objetivo de classificar e enumerar os possíveis efeitos indesejados destas moléculas e com isso, otimizar e direcionar os ensaios *in vitro* que serão realizados neste trabalho e em projetos futuros.

4.2 OBTENÇÃO DE ALQUENILINDÓIS ATRAVÉS DA HETEROHIDROARILAÇÃO DE ALCINOS

Inicialmente, para a síntese dos alquenilindóis **3**, utilizou-se a metodologia de hidroarilação de alcinos em condições já estabelecidas na literatura (LU et al., 2000; VICENZI et al., 2013). A heterohidroarilação dos alcinos **2a-d** com indóis **1a-c** foi realizada em ácido acético sob catálise de paládio, conforme descrito no esquema 14 e as estruturas representadas na figura 14.

Esquema 15 – Estudo metodológico para a obtenção dos alquenilindóis (3) e bis-arilados (4).

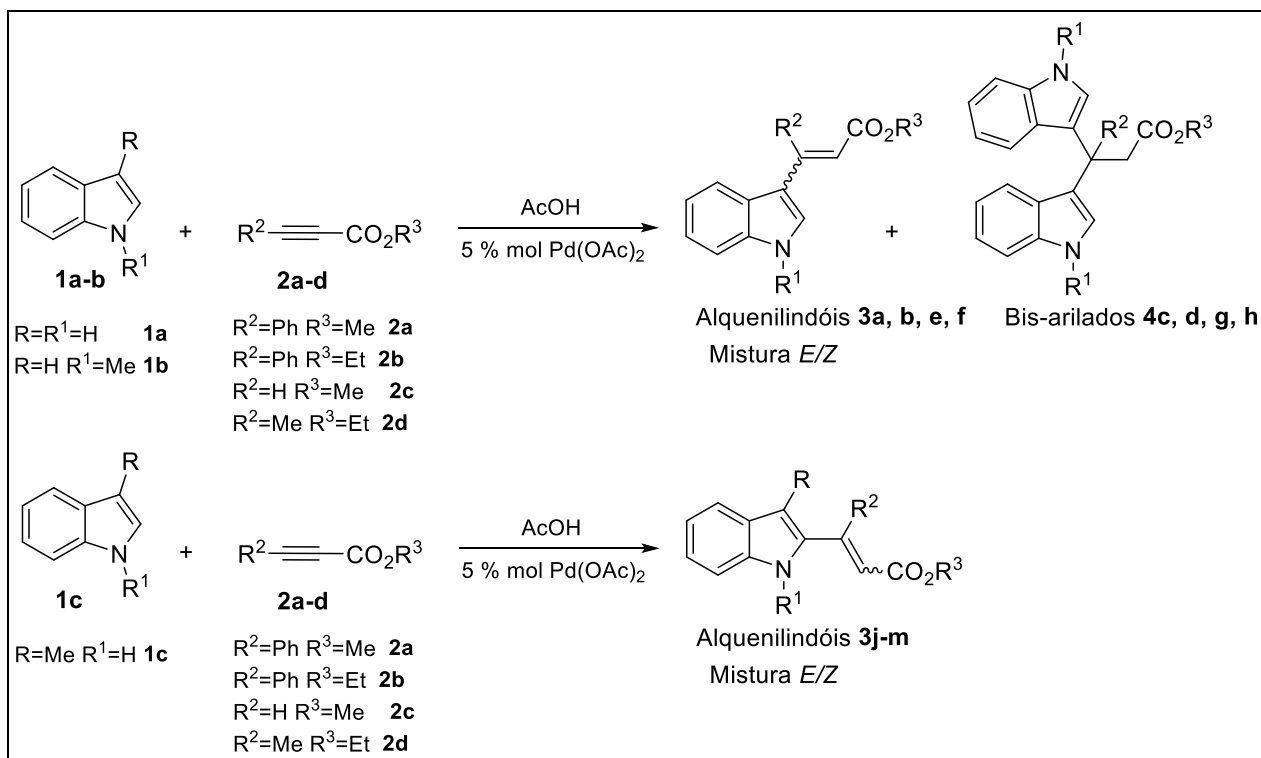
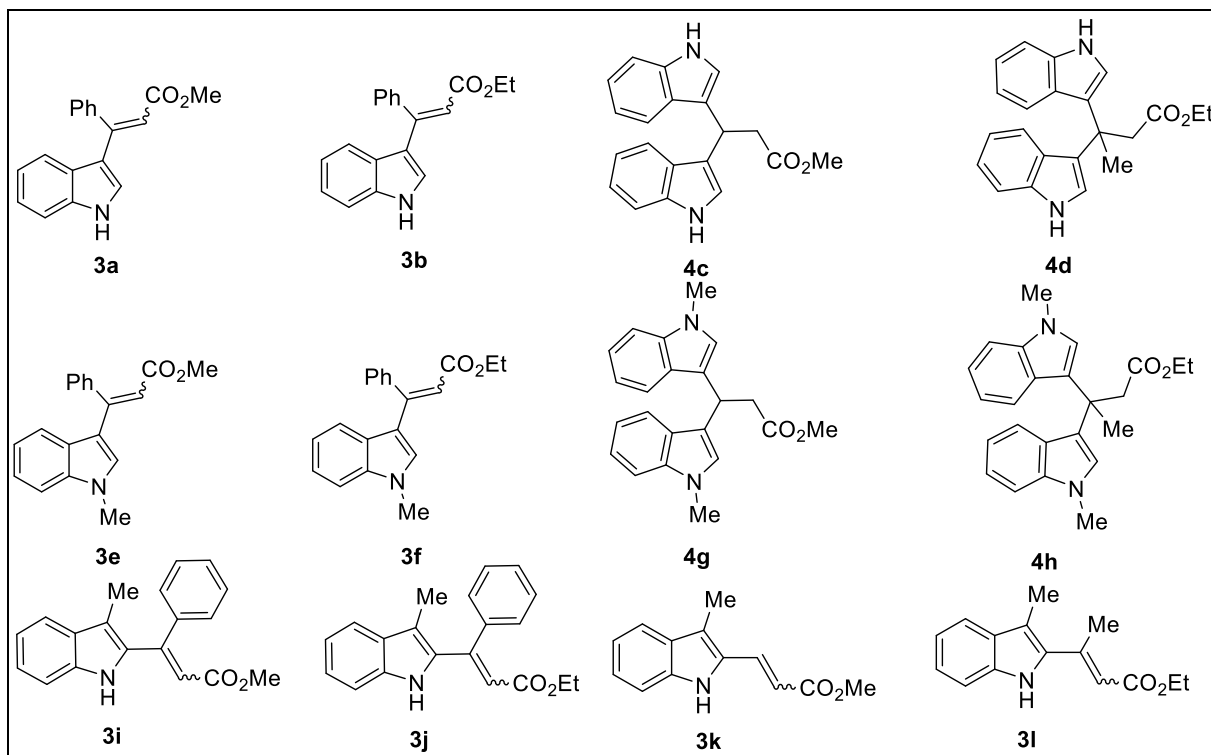


Figura 14 – Estruturas moleculares.

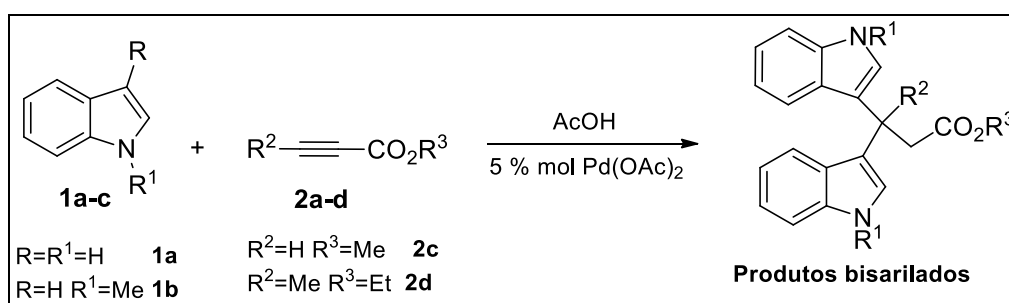
Tabela 4 – Reações de heterohidroarilação utilizando metodologia de Fujiwara^a (2000).

Entrada	R	R ¹	R ²	R ³	Produtos	Tempo (h)	Rendimento (%) ^b	Proporção ^c (E:Z)	Bis- arilado
1	H	H	Ph	Me	3a	8	54	1,5:1	-
2	H	H	Ph	Et	3b	24	56	1,7:1	-
3	H	H	H	Me	4c	24	30	-	Sim
4	H	H	Me	Et	4d	48	50	-	Sim
5	H	Me	Ph	Me	3e	4	63	1,1:1	-
6	H	Me	Ph	Et	3f	24	75	3:1	-
7	H	Me	H	Me	4g	4	70	-	Sim
8	H	Me	Me	Et	4h	24	46	-	Sim
9	Me	H	Ph	Me	3i	40 ^d	N/D ^e	E ^f	-
10	Me	H	Ph	Et	3j	24 ^d	N/D ^e	E ^f	-
11	Me	H	H	Me	3k	96 ^d	N/D ^e	N/D ^f	-
12	Me	H	Me	Et	3l	48 ^d	N/D ^e	N/D	-

^a Proporção estequiométrica 2:1 (indol:alcino), Pd(OAc)₂ 5%, 1 mL de AcOH, t.a. ^b Rendimentos da mistura *E/Z* calculados após purificação em coluna cromatográfica com sílica gel. ^c GC-MS do bruto reacional. ^d Reação não se completou. ^e Não foi possível separar os componentes da reação via coluna cromatográfica. ^f Não foi possível determinar a proporção *E/Z*. N/A = não aplicável. N/D = não detectável.

Como demonstrado na tabela 4, nas reações envolvendo o indol (**1a**) foi possível observar a formação do produto olefínico desejado em rendimentos de 54% e 56% quando fenil propinoato de metila (**2a**) e fenil propinoato etila (**2b**) foram utilizados, respectivamente (entradas 1 e 2). Em ambos os exemplos citados, foi possível evidenciar a formação do estereoisômero *E* como produto principal. Já no caso da reação do 1-metil-indol (**1b**) com estes mesmos alcinos, rendimentos um pouco superiores puderam ser observados, 63% para a reação de hidroarilação do alcino **2a** (entrada 5) e 75% para o alcino **2b** (entrada 6). Nestes casos, a proporção estereoisomérica dos alquenilindóis obtidos foi 1:1 e 3:1, respectivamente. Adicionalmente, quando os alcinos propinoato de metila (**2c**) e but-2-inoato de etila (**2d**) foram utilizados, foi possível observar a formação dos produtos resultantes da bisarilação com ambos indóis **1a** e **1b**. Os produtos bisarilados **4c** e **4d** foram obtidos em rendimentos de 30% em 24h (entrada 3) e 50% em 48h (entrada 4), respectivamente. Ainda em relação à hidroarilação dos alcinos **2c** e **2d**, quando 1-metil-indol (**1b**) foi utilizado, rendimentos um pouco superiores dos produtos bisarilados puderam ser constatados, 70% para o produto **4g** (entrada 7) e 46% para o produto **4h** (entrada 8, tabela 4).

Esquema 16 – Formação de produtos de bisarilação do indol.



Fonte: elaborado pela autora.

Cabe ressaltar que, esse comportamento diferenciado em relação à obtenção de produtos olefínicos ou bisarilados pode ser explicado através da observação dos grupos substituintes dos alcinos utilizados. Substituintes volumosos, como as fenilas presentes nos alcinos **2a** e **2b**, formam exclusivamente moléculas olefínicas, como mistura dos seus isômeros *E/Z*. No entanto, substituintes na tripla ligação menos

volumosos como metila e hidrogênio, presentes nos alcinos **2c** e **2d**, formam, preferencialmente, moléculas bisariladas (esquema 15).

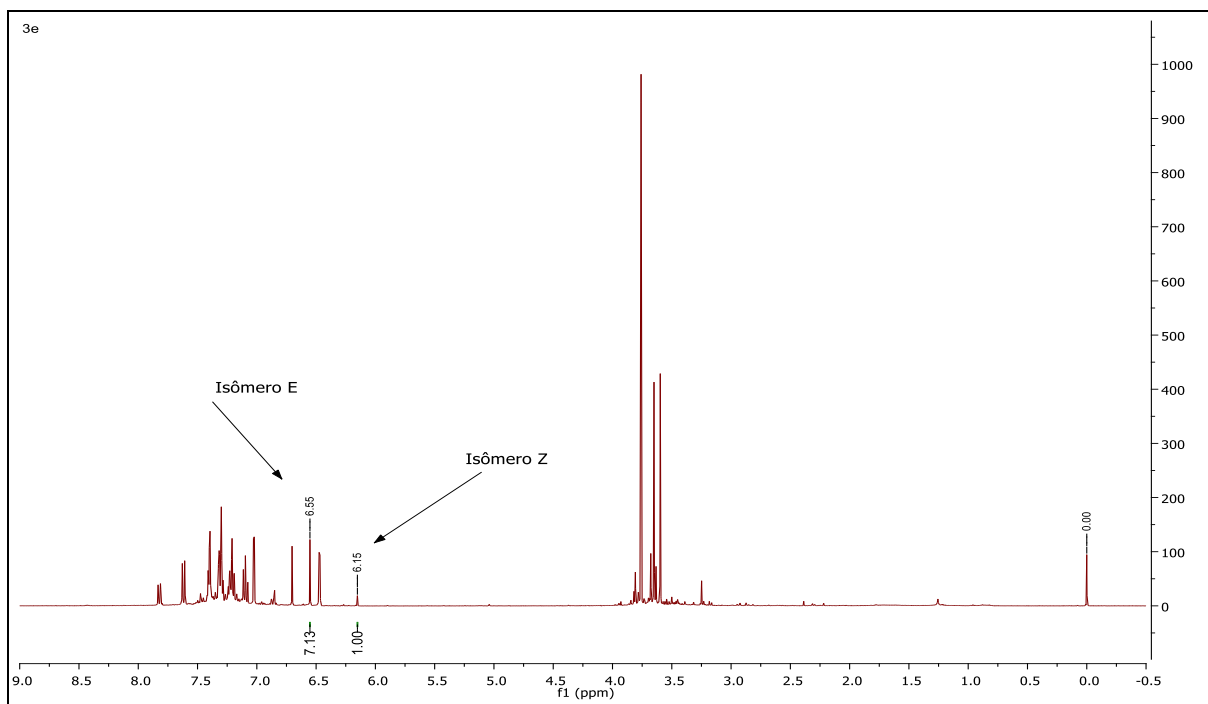
As reações entre **1a** e **2c** não apresentou formação de produto olefínico durante toda a reação (entrada 3, tabela 4), já a reação entre **1a** e **2d** (entrada 3, tabela 4) apresentou formação de produto olefínico, porém numa proporção inferior a 3% em relação ao produto **4d** advindo da bisarilação do indol, não sendo possível seu isolamento.

Nas reações entre **1b** e **2c** (entrada 7, tabela 4) foi possível observar a formação de produtos olefínicos numa proporção em torno de 10% de cada isômero em relação ao produto bisarilado **3g**, porém os produtos olefínicos formados não foram encontrados durante a purificação destas reações.

Quando utilizados os reagentes **1b** e **2d**, somente foi observada a formação do produto bisarilado **3h** (entrada 8, tabela 4).

A determinação da proporção dos isômeros *E/Z* foi realizada via observação do espectro de RMN de ^1H , por comparação com a literatura, no qual o sinal atribuído ao hidrogênio vinílico (dupla ligação C-C), referente ao isômero *E* (em torno de 6,5 ppm), está mais deslocado quando comparado ao sinal atribuído ao hidrogênio vinílico do isômero *Z* (em torno de 6,2 ppm) apresentados na figura 15. As atribuições de sinais de H e C estão condizentes com as atribuições descritas na literatura (BUSCEMI et al., 2010; GODOI et al., 2017; KUTUBI; KITAMURA, 2011; LU et al., 2000).

Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H com ambos os sinais *E/Z*, nas condições de excesso de alcino e TFA como aditivo.



(CDCl_3 ; 400 MHz)

No tocante às reações onde o 3-metil-indol (**1c**) foi utilizado, se observou apenas consumo parcial dos materiais de partida entre outras observações que serão relatadas nos próximos parágrafos.

Nas reações em que os alcinos **2a** (entrada 9, tabela 4) e **2b** (entrada 10, tabela 4) foram utilizados, houve a formação do produto olefínico de configuração *E*, sendo confirmado através da análise de GC-MS, porém durante a purificação por coluna cromatográfica, os produtos **3i** e **3j** não foram encontrados, possivelmente estes produtos podem ter sido hidrolisados durante o procedimento. Estas reações foram repetidas inúmeras vezes, em que as condições da coluna foram modificadas, com o objetivo de encontrar as moléculas de interesse, porém sem sucesso.

Na reação em que o alcino **2c** (entrada 11, tabela 4) foi utilizado, houve a formação do produto olefínico apenas em quantidade de traço, detectada por GC-MS, sem possibilidade de isolamento por coluna cromatográfica.

Por último, na reação em que o but-2-inoato de etila (**2d**) foi utilizado (entrada 12, tabela 4) foi possível observar que não houve consumo do material de partida

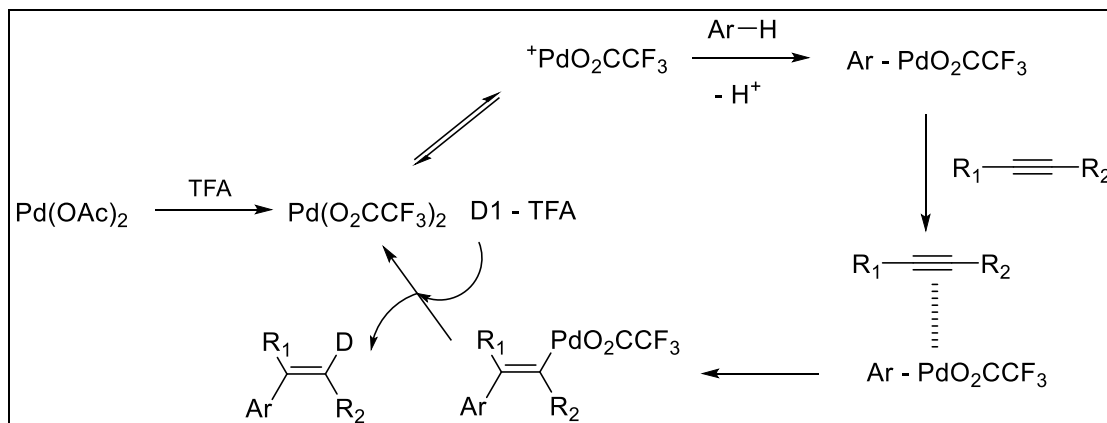
3a, bem como não foi observada formação de produto, nem olefínico, nem bisarilado.

4.3 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS METODOLÓGICAS DA SÍNTESE

4.3.1 Influência do meio reacional utilizado

A busca por um meio reacional mais eficiente a fim de otimizar a formação de novas ligações C-C também foi objeto de estudo de Fujiwara e colaboradores (2000), onde uma série de hidroarilações, com diferentes arenos simples, foram realizadas utilizando ácido trifluoracético (TFA) como aditivo com diclorometano, em uma proporção 4:1 (TFA + CH₂Cl₂), porém nenhum areno da família dos indóis foi utilizado. Com este estudo, foi possível verificar que o uso de TFA nas reações colaborava com o aumento do rendimento e diminuição do tempo reacional. Segundo este autor o mecanismo proposto para esta reação (esquema 16) envolvia uma metalação eletrofílica e o Pd(OOCCF₃)₂ era regenerado por protonólise da ligação C-Pd na última etapa do ciclo catalítico. A partir disso, vários trabalhos foram realizados utilizando TFA como meio ácido para acelerar as reações de hidroarilação de alcinos (CADIerno; FRANCOS; GIMENO, 2010; FUJIWARA et al., 2000; HOTA; JOSE; MANDAL, 2017; JIA et al., 2000; JIA; KITAMURA; FUJIWARA, 2001b; MENDOZA; ECHAVARREN, 2010; SARAVANAKUMAR; RAMKUMAR; SANKARARAMAN, 2011; VICIU et al., 2004).

Esquema 17 – Mecanismo proposto para hidroarilação de Fujiwara utilizando TFA.

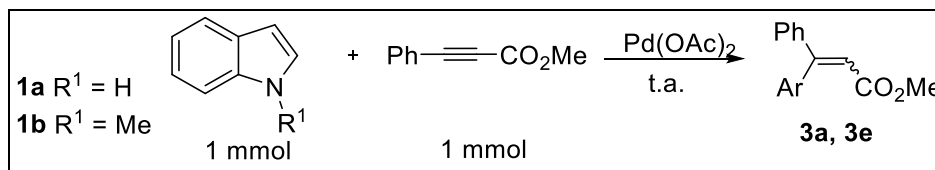


Fonte: Adaptado de HOTA, JOSE, MANDAL, 2000.

Outros sistemas de solventes utilizando ácido pívico para otimização da reação de hidroarilação de alcinos também já foram relatados na literatura (SCHIPPER; HUTCHINSON; FAGNOU, 2010; ZENG; ALPER, 2013)

Com o intuito de buscar a otimização da metodologia de hidroarilação de alcinos, diferentes sistemas de solventes para a obtenção dos produtos olefínicos **3a** e **3e** foram testados. A partir disso, foi possível comparar a influência da mudança do meio reacional em relação ao tempo de reação, rendimento e estereoseletividade (tabela 5). Vale lembrar que, a metodologia de heterohidroarilação clássica de Fujiwara consiste na utilização de AcOH puro como meio reacional. Além disso, todas as reações foram realizadas seguindo proporção estequiométrica constante, 2:1 heterociclo:alcino, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ como catalisador em quantidade 5 mol %, à temperatura ambiente.

Tabela 5 – Resultados de hidroarilação de Fujiwara em diferentes meios reacionais.



Entrada	R	Produto	Solvente	Aditivo	Tempo	Rendimento (%) ^b	E:Z (%) ^c
1	H	3a	AcOH	-	8h	54	60:40
2	H	3a	CH ₂ Cl ₂	TFA ^a	4h	25	55:45
3	H	3a	CH ₂ Cl ₂	AcOH ^a	6 dias	18	67:33
4	H	3a	CH ₂ Cl ₂	PivOH ^a	7 dias	51	65:35
5	H	3a	CH ₂ Cl ₂	-	7 dias	25	56:44
6	Me	3e	AcOH	-	4h	63	53:47
7	Me	3e	CH ₂ Cl ₂	TFA ^a	2h	32	75:25
8	Me	3e	CH ₂ Cl ₂	AcOH ^a	5 dias	29	30:70
9	Me	3e	CH ₂ Cl ₂	PivOH ^a	7 dias	26	44:56
10	Me	3e	CH ₂ Cl ₂	-	8 dias	21	25:75

^a Utilizados como aditivos (0,2 mmol). ^b Calculados após purificação em coluna cromatográfica.

^c Resultados obtidos no bruto reacional, através de GC-MS.

Inicialmente, as reações foram conduzidas de maneira tradicional, onde primeiramente foram adicionados 2 mmol do composto indólico e 5% em mol do catalisador Pd(OAc)₂ (0,0112g), seguidos da adição do sistema de solventes adequado. Na sequência, foi adicionado 1 mmol do alcino **2a**, e deixado sob agitação, à temperatura ambiente, até o consumo do alcino.

Analisando os resultados obtidos, é possível observar que ocorreram mudanças nos parâmetros tempo de reação, rendimento e estereoseletividade. Nas reações em que as condições clássicas foram empregadas, isto é, utilizando AcOH como solvente e sem a presença de aditivos (entradas 1 e 6, tabela 5), o tempo de reação é reduzido pela metade quando o metil-indol é utilizado no lugar do indol.

Com o uso de TFA como aditivo pode-se observar uma redução significativa dos tempos reacionais em ambos os casos (entradas 2 e 7, tabela 5). Já as reações que ocorreram sem a presença qualquer aditivo, somente em CH₂Cl₂ (entradas 5 e 10, tabela 5), apresentaram um tempo reacional cerca de vinte vezes superior quando comparado ao tempo reacional do método clássico utilizando AcOH como solvente. Porém, quando AcOH (entradas 3 e 8, tabela 5) e PivOH (entradas 4 e 9,

tabela 5) foram utilizados como aditivos, o tempo de reação diminuiu sensivelmente em alguns casos, quando comparado à reação sem aditivo algum, mas as reações continuaram sendo cerca de quinze vezes mais lentas em relação à metodologia clássica. No geral, constatou-se que houve um aumento do tempo reacional conforme reduziu-se a acidez do meio na seguinte ordem: TFA (aditivo) < AcOH < AcOH (aditivo) < PivOH (aditivo) < CH₂Cl₂.

Quando à acidez de ácidos carboxílicos é discutida, deve-se observar os grupos substituintes ligados ao grupo –COOH. Grupos retiradores de elétrons dispersam a carga negativa, estabilizando a base conjugada e, portanto, aumentando a acidez. Grupos doadores de elétrons devem intensificar a carga negativa, enfraquecendo a estabilidade da base conjugada e diminuindo, assim, a acidez do ácido carboxílico.

A reação do 1-metil-indol (**1b**) com fenil propinoato de metila (**2a**) também foi realizada utilizando somente TFA como solvente, nas mesmas condições citadas acima. Porém, muito embora o alcino **2a** tenha sido consumido em apenas 30 minutos o rendimento da reação foi inferior a 10%. Observou-se a formação de uma mistura complexa de produtos ao final da reação, o que dificultou muito a purificação.

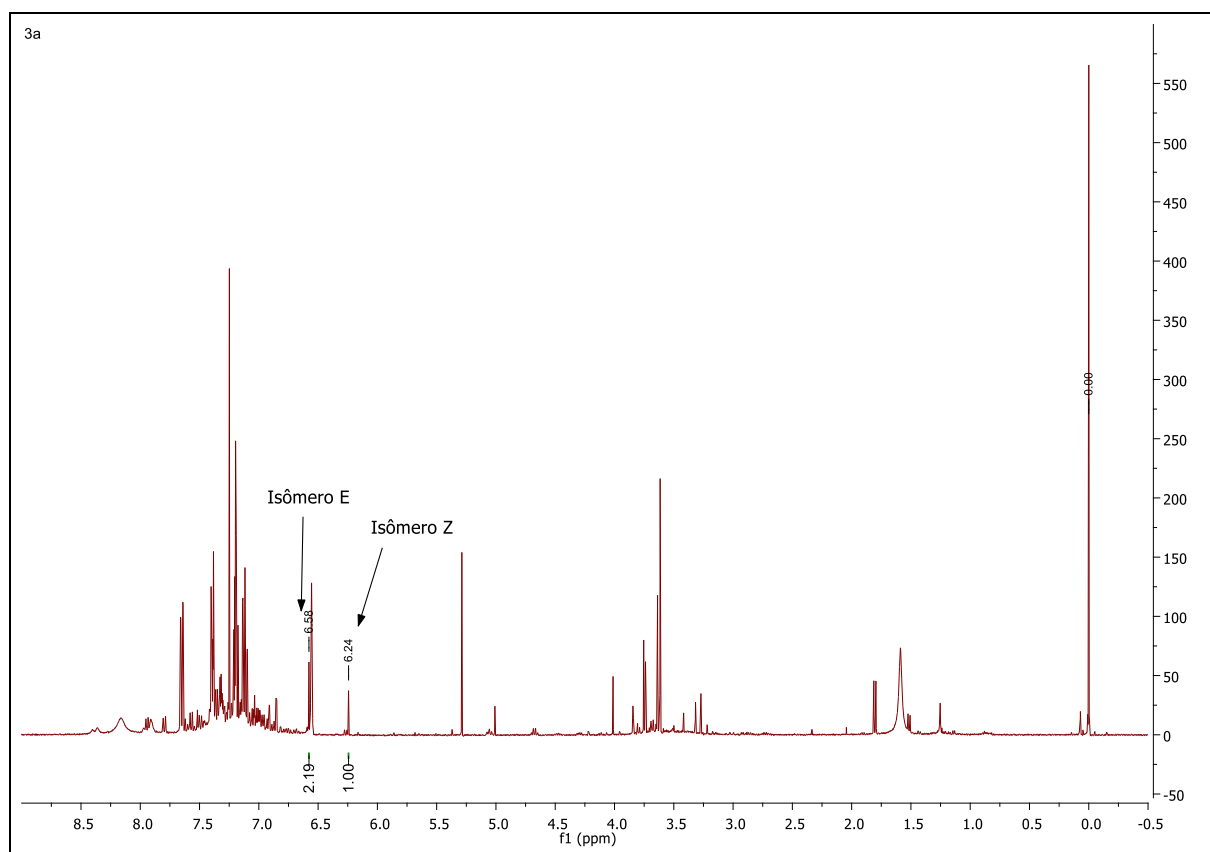
Quanto ao rendimento foi possível observar que em ambos os casos, tanto com indol (**1a**) quanto com 1-metil-indol (**1b**), o melhor rendimento ainda é aquele utilizado na metodologia clássica, isto é, a qual utiliza apenas AcOH como solvente entradas 1 e 6 (tabela 5), respectivamente. Em relação ao rendimento uma única exceção é observada na entrada 4 (tabela 5), em que foi empregado PivOH como aditivo (entrada 4, tabela 5), e o rendimento da reação foi semelhante àquele observado quando se utilizou AcOH, em torno de 50% (entrada 1, tabela 5). Ademais, todos os rendimentos foram inferiores quando empregados diferentes sistemas de solventes, principalmente quando são comparados os resultados de **3e** com ácido acético (entradas 6 a 10, tabela 5).

Diversos fatores podem ter contribuído para o baixo rendimento, lembrando que a comparação que está sendo feita aqui é em relação ao rendimento calculado após purificação em coluna. Dentre estes fatores, a hidrólise do produto pode ser considerada, visto que os produtos são ésteres, e ésteres podem ser hidrolisados quando expostos por longos períodos a meios ácidos ou mesmo durante a

purificação, em que a sílica utilizada proporciona tal ambiente, porém não foi detectado nenhum subproduto nas frações da purificação.

Em relação à seletividade, foi possível observar que na síntese de **3a** não houve mudança significativa na estereoseletividade, visto que a reação mais rápida (entrada 2, tabela 5) teve a proporção de isômeros semelhante à reação mais lenta (entrada 5, tabela 5). Estes resultados foram coletados a partir da análise de GC-MS dos brutos reacionais, onde o sinal com o tempo de retenção maior corresponde ao isômero *E-3a* e o sinal com o tempo de retenção menor, o isômero *Z-3a*. Além disso, após análise dos espectros de RMN ^1H das amostras **3a** brutas e purificadas, foi possível confirmar os sinais dos hidrogênios correspondentes a cada isômero (figura 16).

Figura 16 – Espectro de RMN ^1H do bruto reacional de **3a** em CH_2Cl_2 + TFA (aditivo).



(*E/Z*; CDCl_3 ; 400 MHz)

Nos cromatogramas representados pelas figuras 17 e 18, é possível verificar que o isômero com maior tempo de retenção aparece sempre em maior quantidade

em relação àquele com menor tempo, independente do meio utilizado, TFA ou CH_2Cl_2 .

Figura 17 – Cromatograma do bruto reacional de 3a em CH_2Cl_2 + TFA (aditivo).

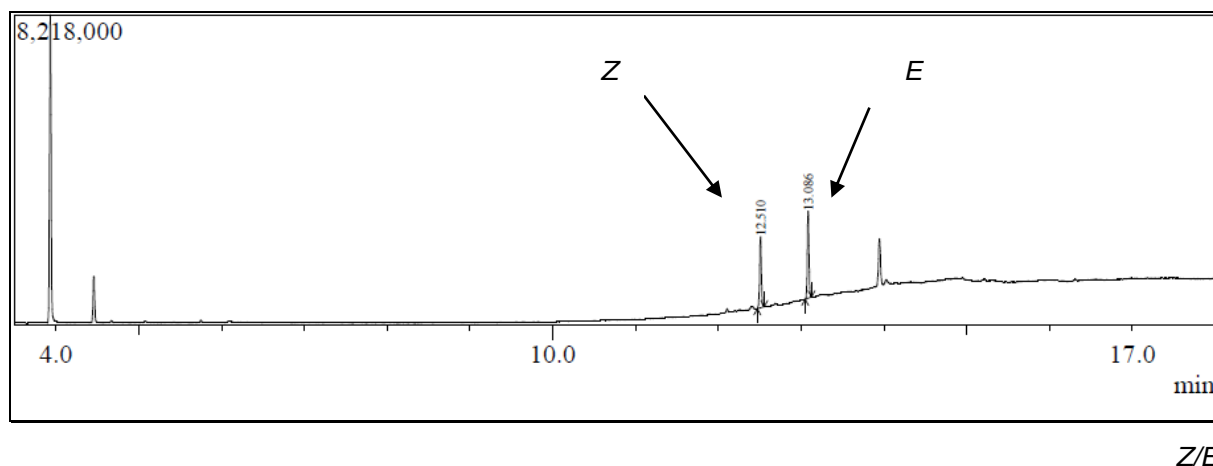
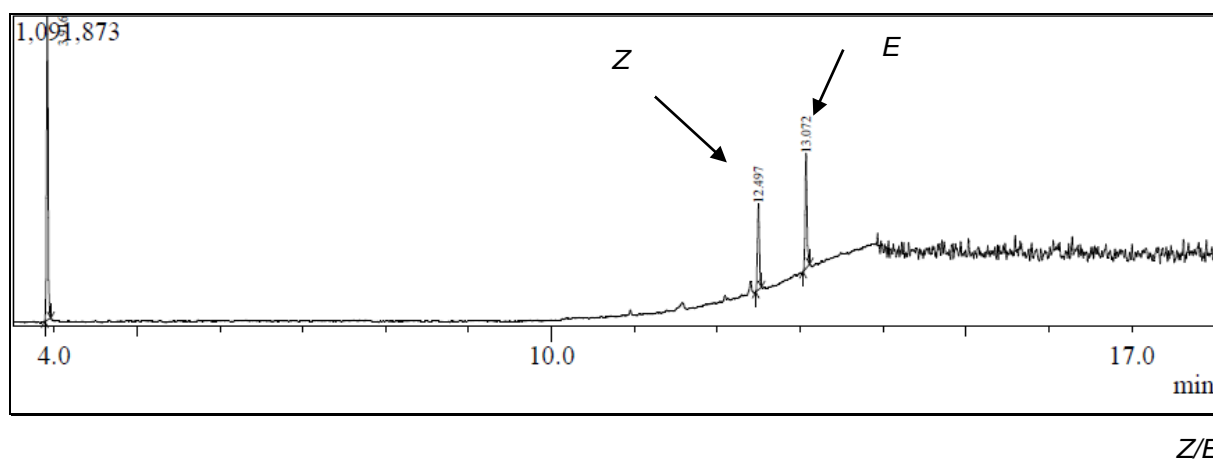
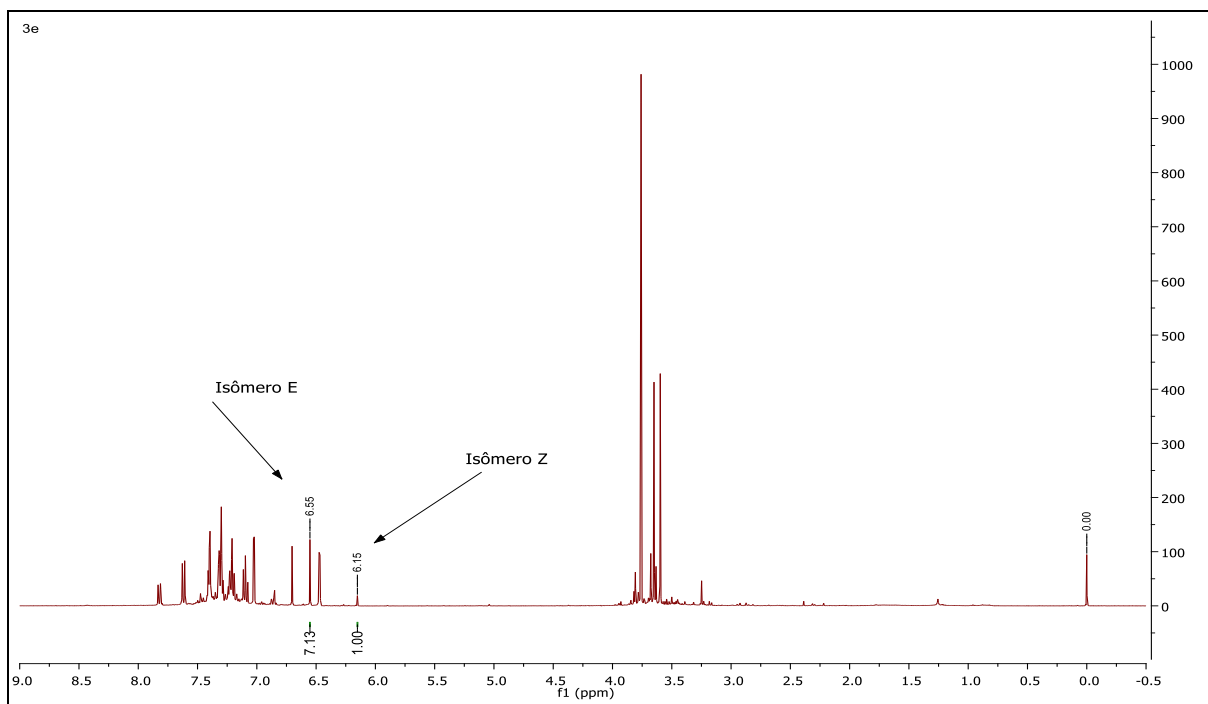


Figura 18 – Cromatograma do bruto reacional de 3a em CH_2Cl_2 .



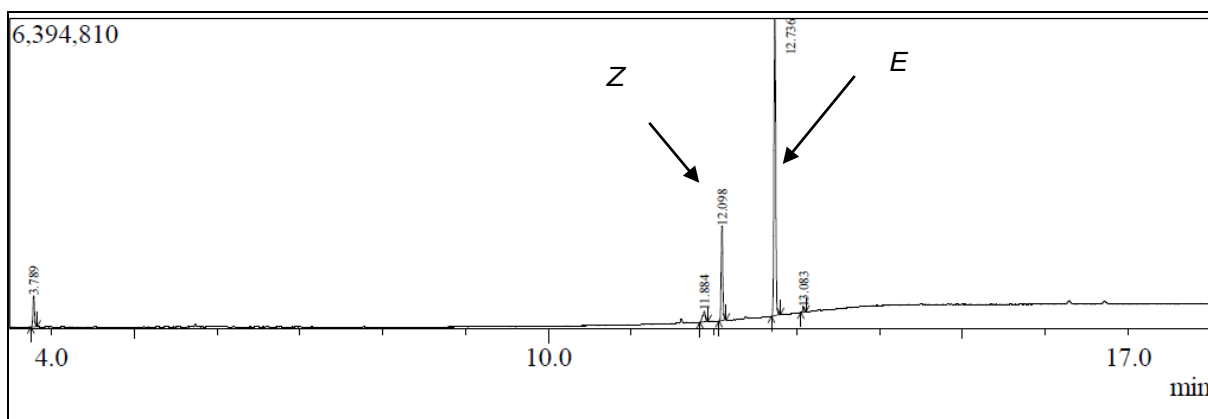
Como comentado anteriormente, de modo geral não se observou diferença significativa na estereosseletividade da reação de hidroarilação para obtenção da olefina **3a**, sendo que na maioria dos casos o isômero *E* apresenta-se como produto principal (entradas 1-5, tabela 5). No entanto, a estereosseletividade observada nas reações do 1-metil-indol (**1b**) para obtenção da olefina **3e** foi alterada utilizando-se diferentes sistemas de solventes. Foi possível observar que o uso de TFA como aditivo resultou em aumento da estereosseletividade em favor do isômero *E-3e* (entrada 7, tabela 5), quando comparados aos percentuais utilizando AcOH (entrada 6, tabela 5) (figuras 19 e 20).

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H do bruto reacional de **3e** em CH_2Cl_2 + TFA (aditivo).



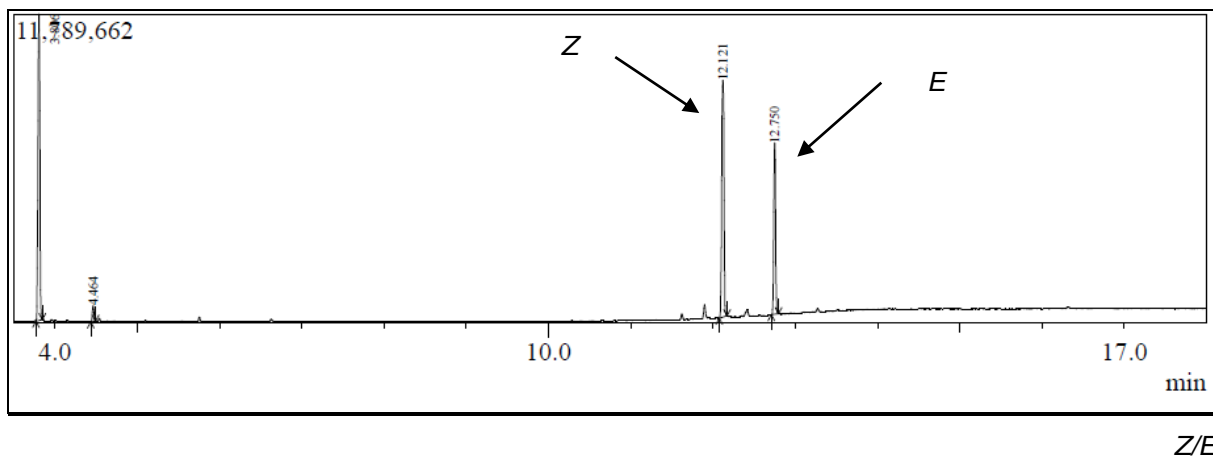
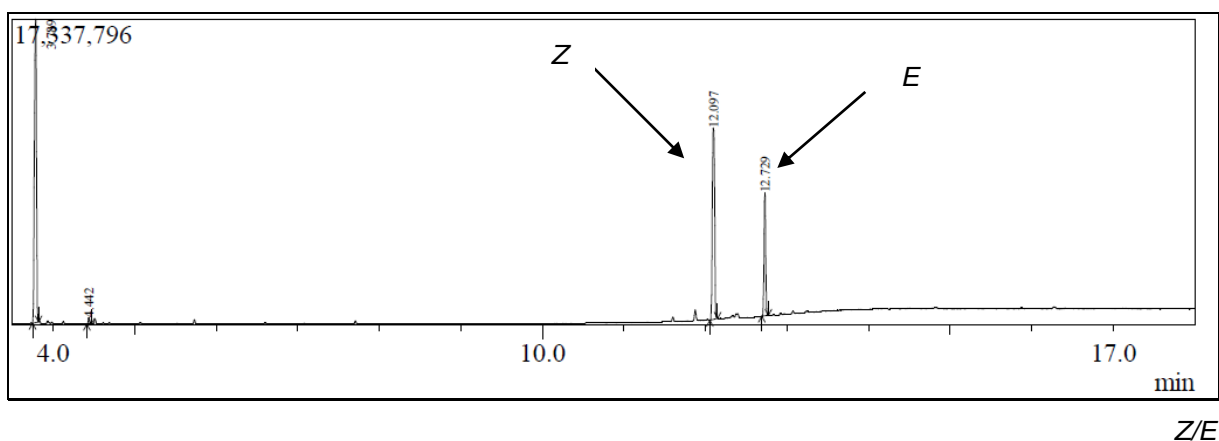
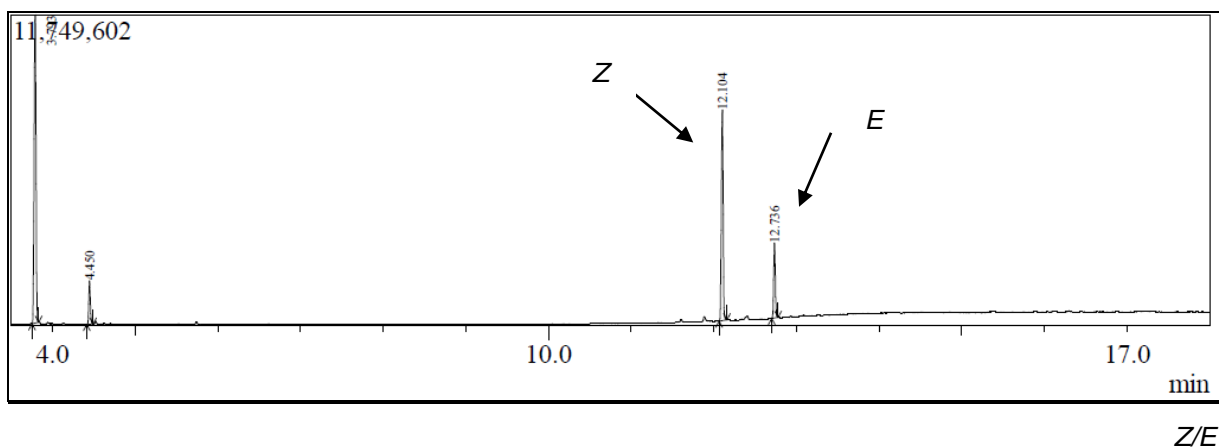
(*E/Z*; CDCl_3 ; 400 MHz)

Figura 20 – Cromatograma do bruto reacional de **3e** em CH_2Cl_2 + TFA (aditivo).



Z/E

Nas figuras 21, 22 e 23, é possível observar que, embora a seletividade tenha sido direcionada ao isômero *E-3e* pelo uso de AcOH e TFA como aditivo, os outros sistemas de solventes utilizados para essa reação levaram a formação do isômero *Z-3e* como principal (entradas 8, 9 e 10, tabela 5).

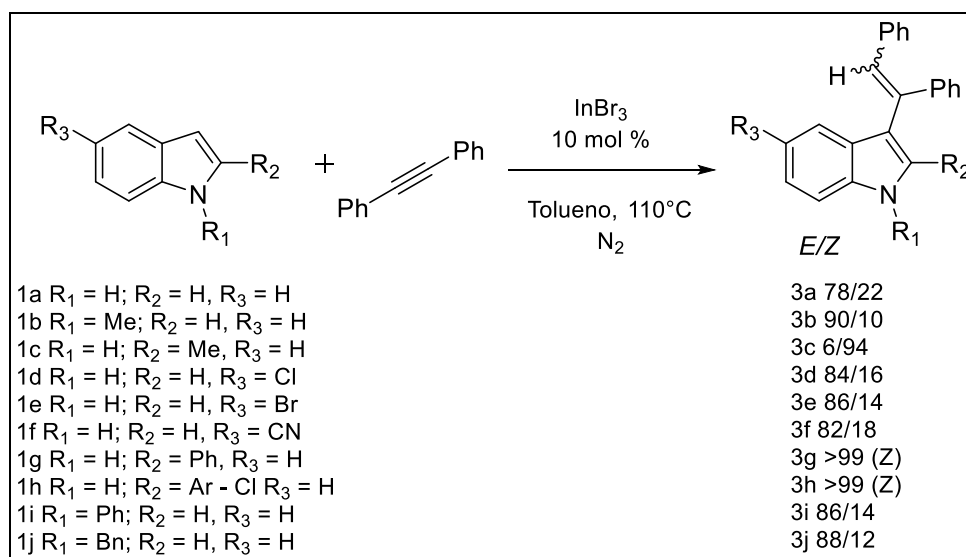
Figura 21 – Cromatograma do bruto reacional de 3e em CH_2Cl_2 + AcOH (aditivo).Figura 22 – Cromatograma do bruto reacional de 3e em CH_2Cl_2 + PivOH (aditivo).Figura 23 – Cromatograma do bruto reacional de 3e em CH_2Cl_2 .

4.3.2 Influência da proporção estequiométrica

A maior parte dos estudos de reações hidroarilação de alcinos a partir de compostos aromáticos, utilizam o alcino como reagente limitante da reação, em uma proporção de 2:1 (areno:alcino). Porém, alguns trabalhos relatam o uso de leve excesso do alcino, como por exemplo, o trabalho de Perumal e colaboradores (2010), em que utilizaram uma proporção estequiométrica de 2:3 (areno:alcino) para este tipo de reação, e obtiveram resultados satisfatórios de tempo (2 a 4 horas) e rendimento (74-92%) das reações desenvolvidas por eles. A maioria das reações formaram preferencialmente o isômero *E* quando indol e moléculas *n*-substituídas foram utilizadas, porém, foi observado que o isômero *Z* foi obtido como produto majoritário quando indóis 2-substituídos foram utilizados na reação.

Cabe ressaltar, que a metodologia utilizada por eles (esquema 17) envolve outras condições reacionais, que não a desenvolvida por Fujiwara.

Esquema 18 – Hidroarilação de alcinos por Perumal e colaboradores (2010).

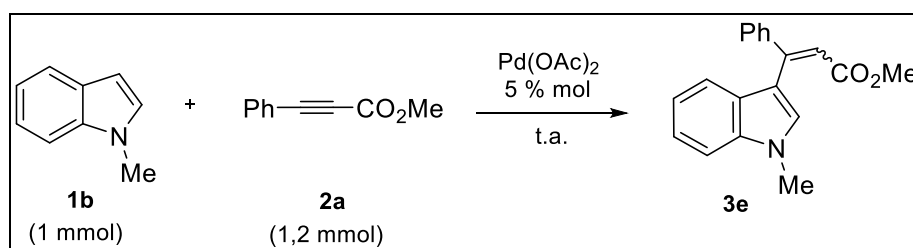


Fonte: elaborado pela autora, adaptado de Perumal, 2010.

Neste sentido, buscou-se alterar a proporção estequiométrica utilizada neste trabalho, a fim de verificar se esta modificação poderia otimizar, ou não, a reação de heterohidroarilação de alcinos em termos de tempo, rendimento e/ou seletividade.

Para isso, a reação de formação de **3e** foi avaliada quanto à variação estequiométrica, utilizando-se 1 mmol de 1-metil-indol (**1b**) e 1,2 mmol de fenil-propinoato de metila (**2a**), nos seguintes sistemas de solventes: AcOH puro, TFA como aditivo, AcOH como aditivo e PivOH como aditivo. Os resultados estão disponíveis na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados de hidroarilação utilizando nova proporção estequiométrica (**3e**).



Entrada	Solvente	Aditivo ^a	Tempo	Rendimento (%) ^b	<i>E:Z</i> (%) ^c
1	AcOH	-	4h	74	75:25
2	CH ₂ Cl ₂	TFA	4h	48	69:31
3	CH ₂ Cl ₂	AcOH	7 dias	68	30:70
4	CH ₂ Cl ₂	PivOH	7 dias	50	24:76

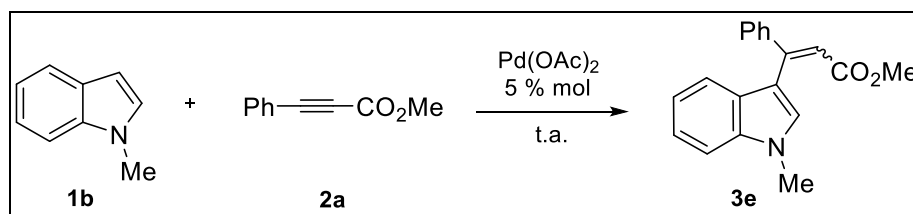
^a Utilizados como aditivos (0,2 mmol). ^b Calculados após purificação em coluna cromatográfica.

^c Resultados obtidos no bruto reacional, através de GC-MS.

Analisando os resultados acima isoladamente, é possível observar, que independentemente da estequiometria, o meio reacional continua alterando, principalmente, a seletividade da reação. Reações com o ambiente mais ácido levaram à formação do isômero *E*, majoritariamente (entradas 1 e 2, tabela 6). Em contrapartida, reações menos ácidas, levaram principalmente à formação do isômero *Z* (entradas 3 e 4, tabela 6).

A tabela 7, apresenta ambos os resultados referentes as variações estequiométricas testadas, com o objetivo de facilitar a comparação entre eles.

Tabela 7 – Comparação dos resultados com variação da proporção estequiométrica (3e).



Entrada	Solvente	Aditivo ^a	Tempo		Rend.		<i>E:Z</i> (%) ^c	
			(2:1)	(1:1,2)	(%) ^b	(%) ^b	(2:1)	(1:1,2)
					(2:1)	(1:1,2)		
1	AcOH	-	4h	4h	63	74	53:47	75:25
2	CH ₂ Cl ₂	TFA	2h	4h	32	48	75:25	69:31
3	CH ₂ Cl ₂	AcOH	5 dias	7 dias	29	68	30:70	30:70
4	CH ₂ Cl ₂	PivOH	7 dias	7 dias	26	50	44:56	24:76

^a Utilizados como aditivos (0,2 mmol). ^b Calculados após purificação em coluna cromatográfica.

^c Resultados obtidos no bruto reacional, através de GC-MS.

Analisando a tabela 7, é possível observar que as principais mudanças se encontram em relação ao rendimento e seletividade da reação. O rendimento da reação aumentou em todos os casos, independente do sistema de solventes utilizados.

Na entrada 1 (tabela 7), a seletividade da reação aumenta de 53% para 75% em relação à formação do isômero *E*, utilizando AcOH como solvente (figuras 24 e 25). O mesmo não ocorre na presença de TFA como aditivo, ao contrário, a seletividade diminui, em relação ao isômero *E* (entrada 2, tabela 7), mesmo assim ambas as reações continuam formando principalmente o isômero *E*.

Figura 24 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3e em AcOH.

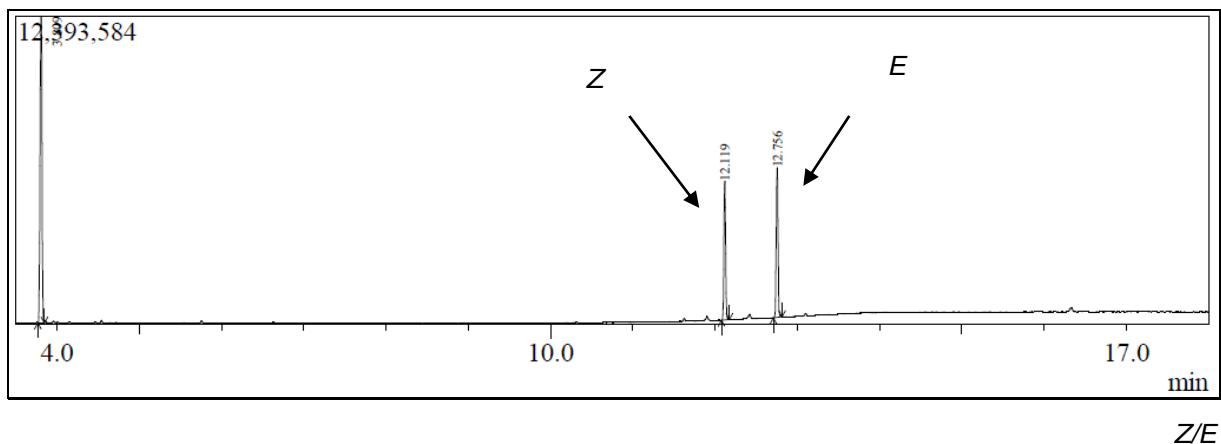
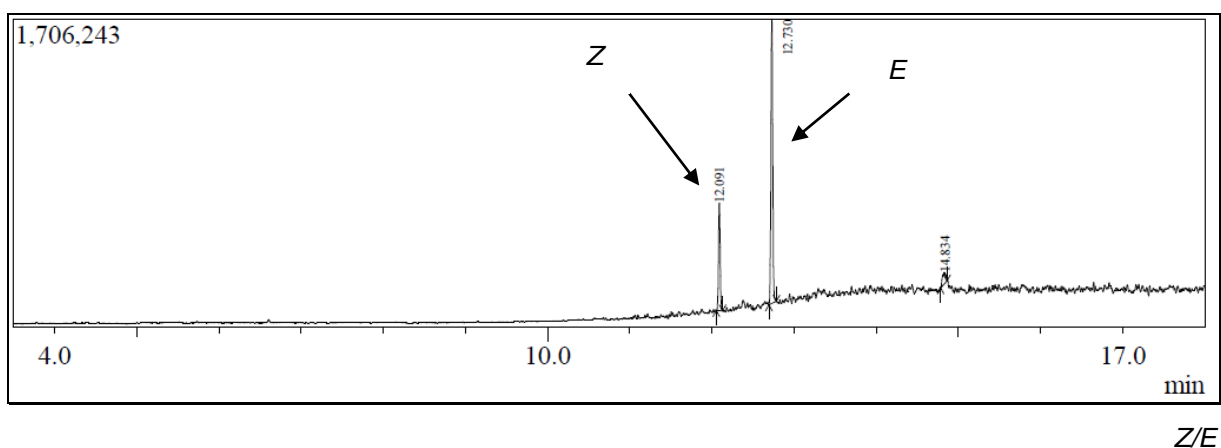


Figura 25 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3e em AcOH.



Quando se utilizou AcOH como aditivo, é possível observar que na nova proporção, o tempo de reação aumenta, além disso, o rendimento da reação também sofre acréscimo (entrada 3, tabela 7), sendo possível constatar que a estequiometria tem uma influência significativa no tempo reacional nestas condições, porém, a seletividade da reação é mantida.

Na entrada 4 (tabela 7), quando se utilizou PivOH como aditivo, foi possível observar que não há variação do tempo de reação, mas sim no rendimento, que aumentou consideravelmente de 25% para 50%. Além disso, a estereosseletividade da reação em relação à formação do isômero Z em maior proporção também foi observado (figuras 26 e 27).

Figura 26 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3e em PivOH.

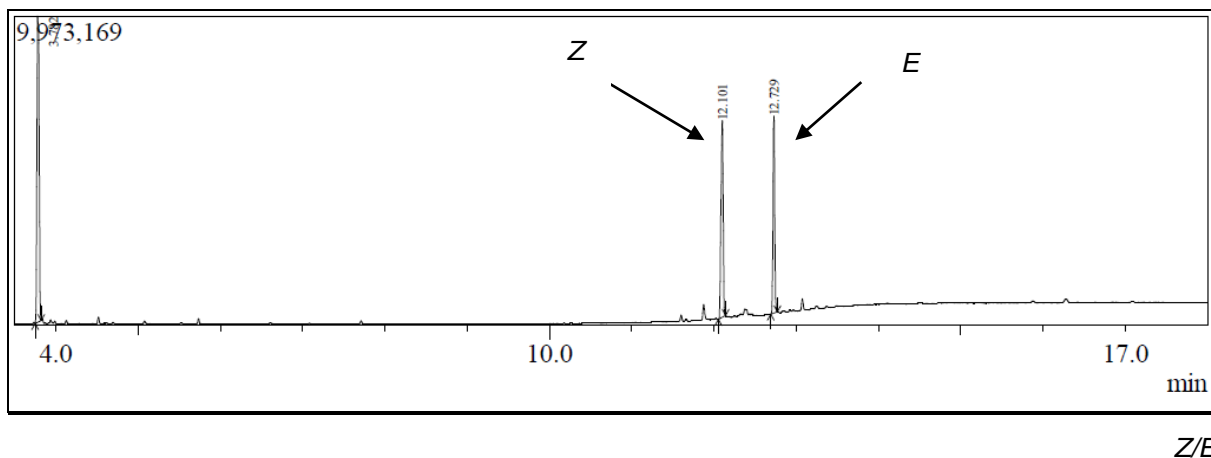
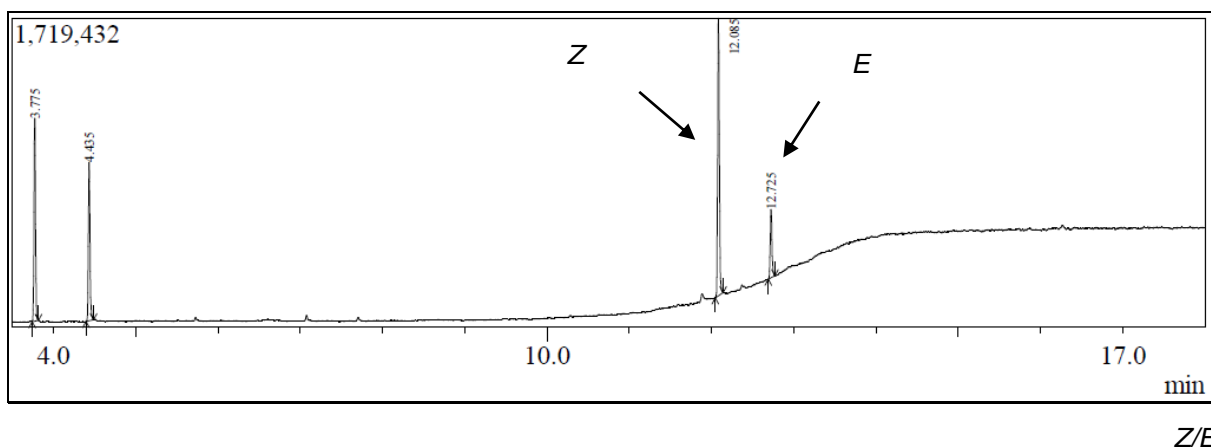
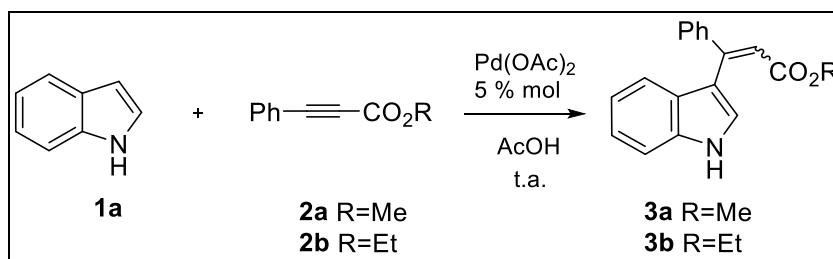


Figura 27 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3e em PivOH.



Considerando os resultados obtidos a partir da mudança na proporção estequiométrica 1:1,2 (areno:alcino) para a reação do 1-metil-indol (**1b**) na síntese de **3e**, decidiu-se verificar também a influência da proporção estequiométrica na síntese do composto **3a** e **3b**. Os resultados são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Comparação dos resultados com variação da proporção estequiométrica (3a).

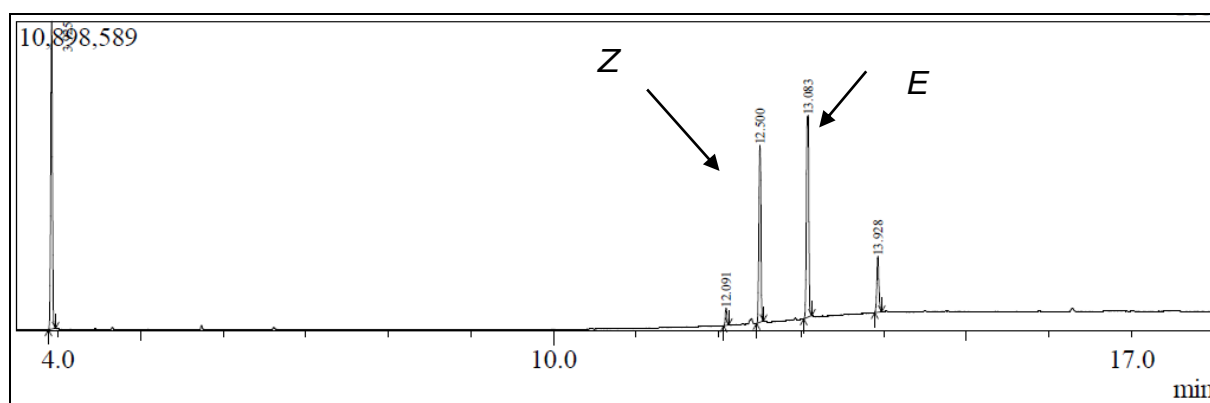


Entrada	R	Tempo (2:1)	Tempo (1:1,2)	Rendimento (%) ^a (2:1)	Rendimento (%) ^a (1:1,2)	<i>E:Z</i> (%) ^b (2:1)	<i>E:Z</i> (%) ^c (1:1,2)
1	Me	8h	8h	54	87	60:40	65:35
2	Et	24h	24h	56	54	64:36	85:15

^a Calculados após purificação em coluna cromatográfica. ^b Resultados obtidos no bruto reacional, através de RMN. ^c Resultados obtidos no bruto reacional, através de GC-MS.

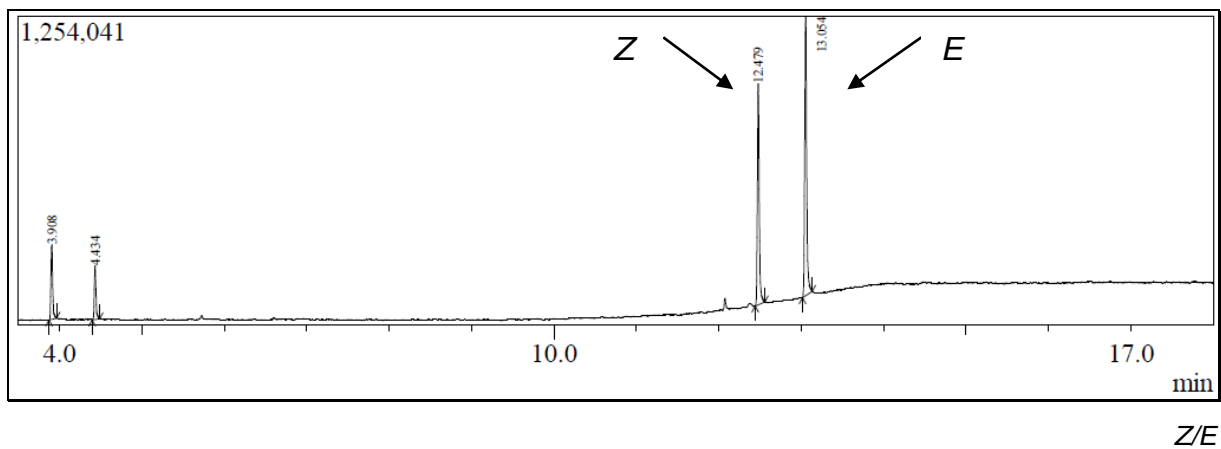
A mudança na proporção estequiométrica contribuiu para o aumento do rendimento da reação (entrada 1, tabela 8), bem como um sensível aumento na estereosseletividade da mesma, como é possível observar nas figuras 28 e 29.

Figura 28 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3a em AcOH.



Z/E

Figura 29 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3a em AcOH.



No caso da reação de hidroarilação do fenil propionato de etila (**2b**) com indol (**1a**), a mudança na proporção estequiométrica (entrada 2, tabela 8) resultou numa melhora na seletividade do produto olefínico *E-3b* obtido (figuras 30 e 31).

Figura 30 – Cromatograma do bruto reacional (2:1) de 3b em AcOH.

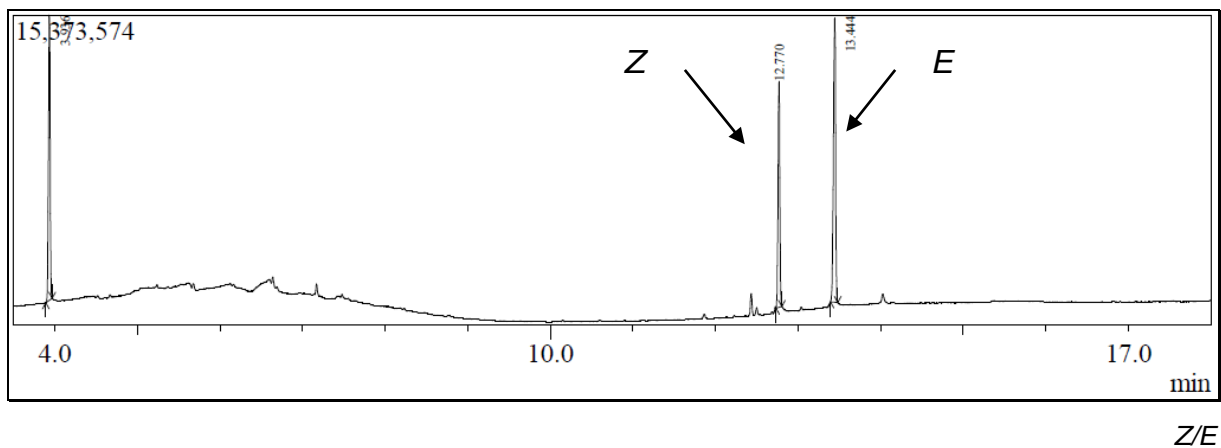
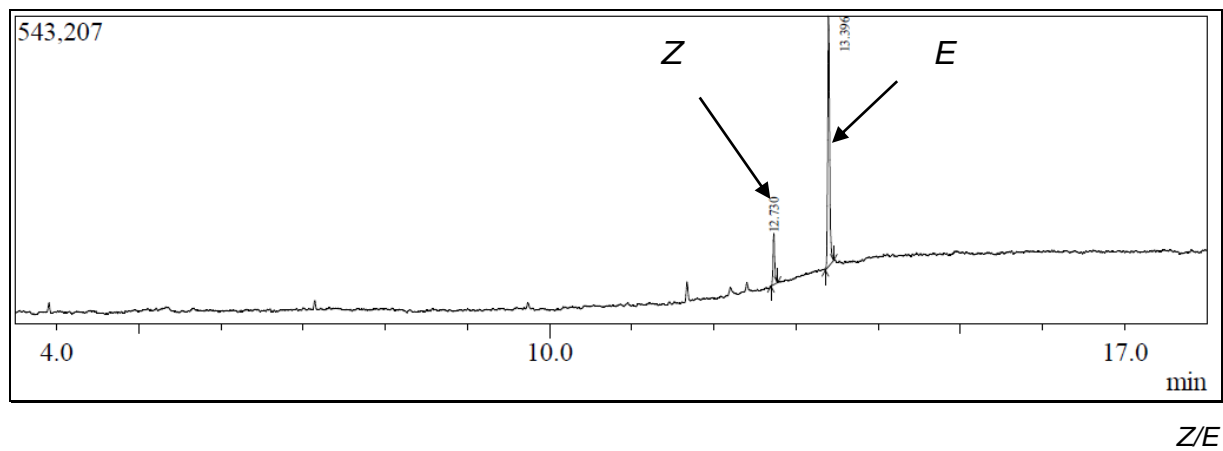


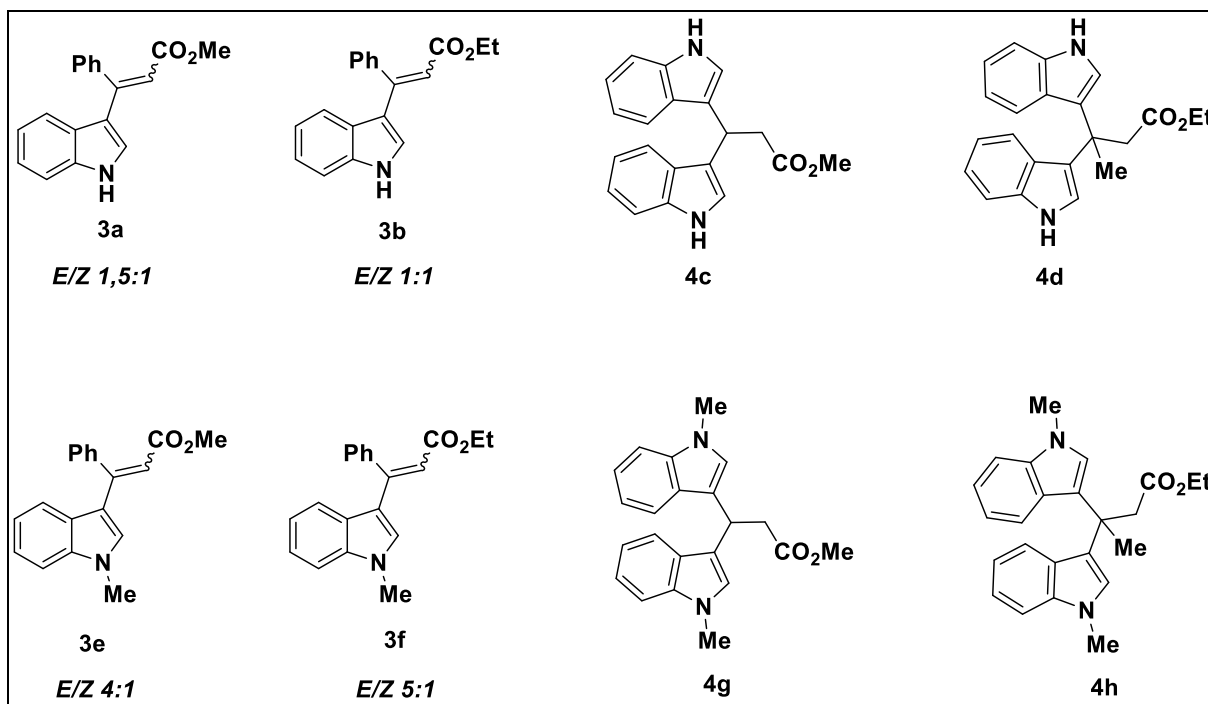
Figura 31 – Cromatograma do bruto reacional (1:1,2) de 3b em AcOH.



4.4 AVALIAÇÕES *IN VITRO*

As estruturas avaliadas nos ensaios *in vitro* estão representadas na figura 32 abaixo.

Figura 32 – Estrutura molecular dos compostos avaliados



Fonte: elaborado pela autora.

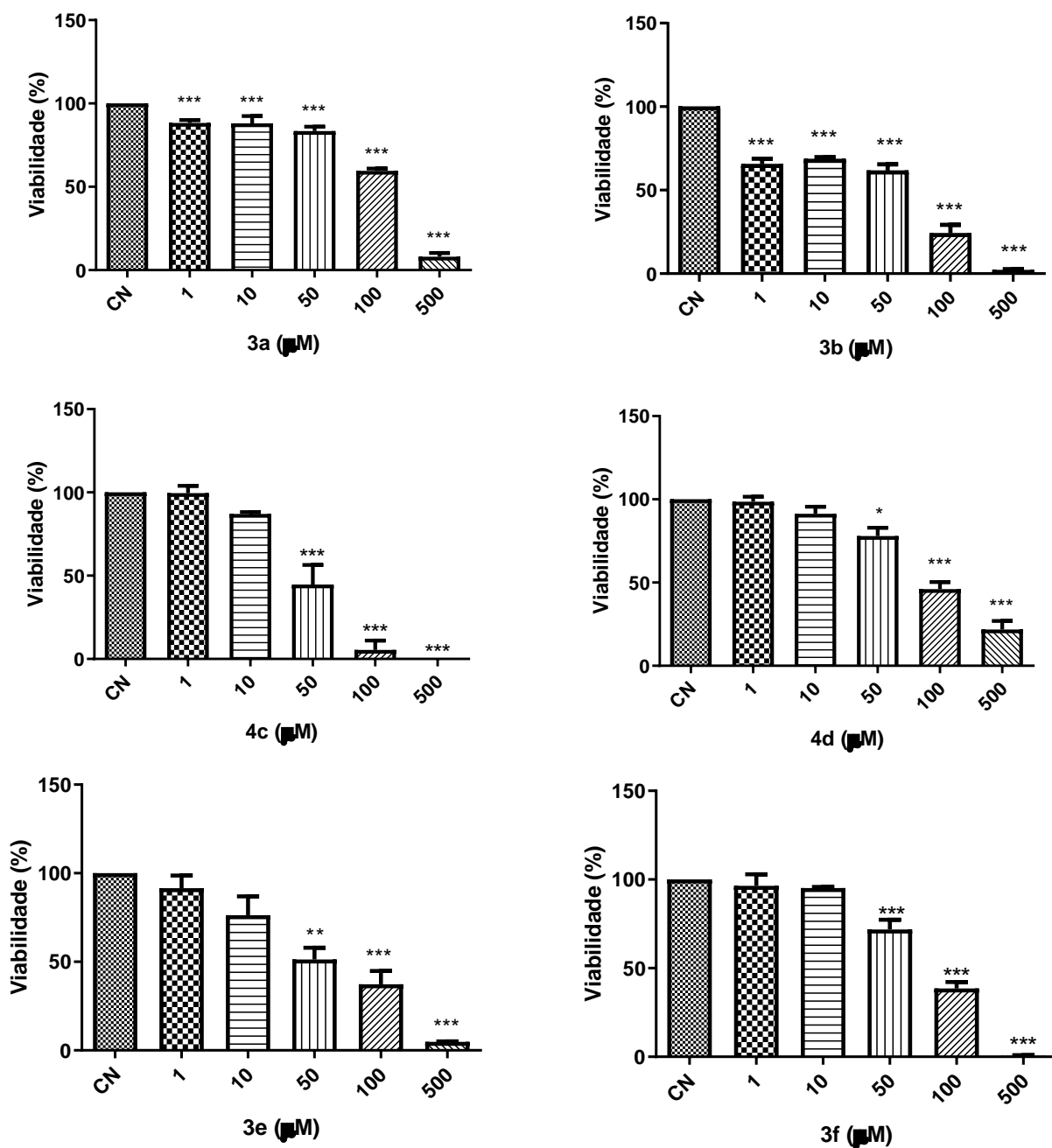
4.4.1 Avaliação de citotoxicidade

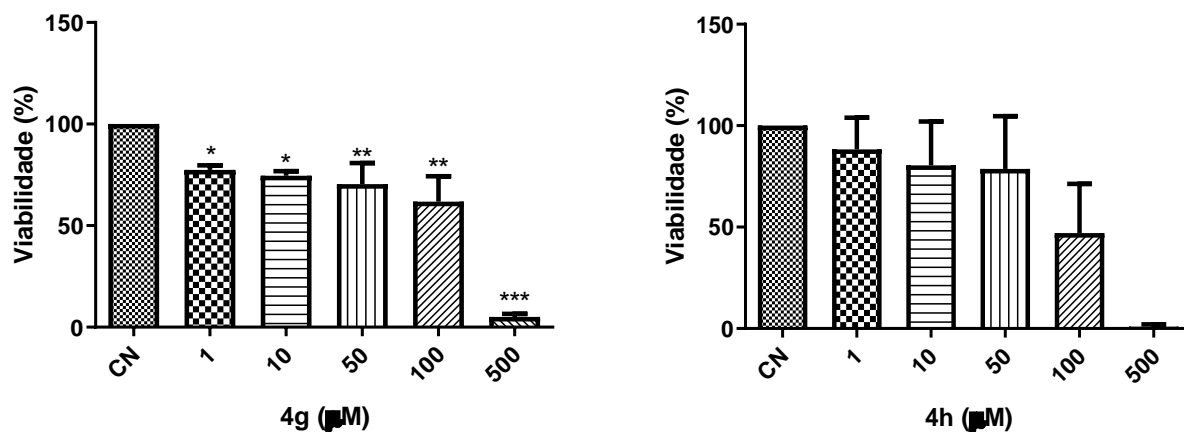
Os ensaios de citotoxicidade foram realizados por Danielle Batista, mestranda no PPG de Biociências da UFCSPA, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Dinara J. Moura.

Os resultados demonstram que todas as substâncias induziram citotoxicidade na linhagem T98G após 24 horas de tratamento (gráfico 1). A linhagem T98G é resistente ao quimioterápico padrão Temozolomida, primeira linha de escolha para o tratamento de glioblastomas. As moléculas **3a**, **3b** e **4g** induziram citotoxicidade a partir da menor concentração avaliada (1 μ M). As moléculas **4c**, **4d**, **3e** e **3f** exibiram uma citotoxicidade significativa a partir da concentração de 50 μ M. A substância **4h**

apresentou citotoxicidade significativa apenas na concentração mais alta avaliada (500 μ M).

Gráfico 1 – Resultados de citotoxicidade dos compostos sintetizados frente à linhagem T98G





Os asteriscos (*) representam a diferença estatística dos resultados em relação ao controle negativo (CN), com diferentes níveis de significância. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Com intuito de avaliar comparativamente o efeito da citotoxicidade destas substâncias na linhagem T98G, os resultados foram agrupados em um gráfico de dispersão, e com isso o efeito mais pronunciado das moléculas **3b**, **4c** e **3e** fica evidenciado (gráfico 2). Esta citotoxicidade mais pronunciada fica comprovada com o cálculo da concentração inibitória que diminui a viabilidade em 50% (IC_{50}) de cada uma destas moléculas (tabela 9).

Gráfico 2 – Resultados agrupados de citotoxicidade dos compostos sintetizados (T98G)

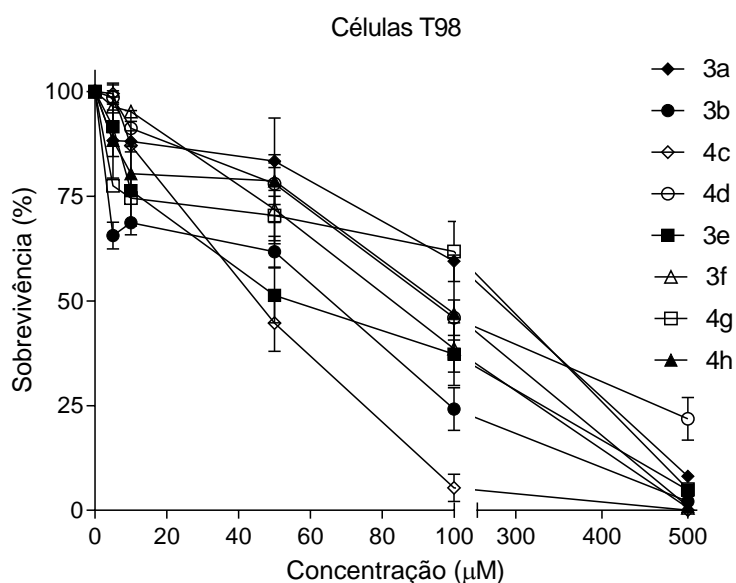


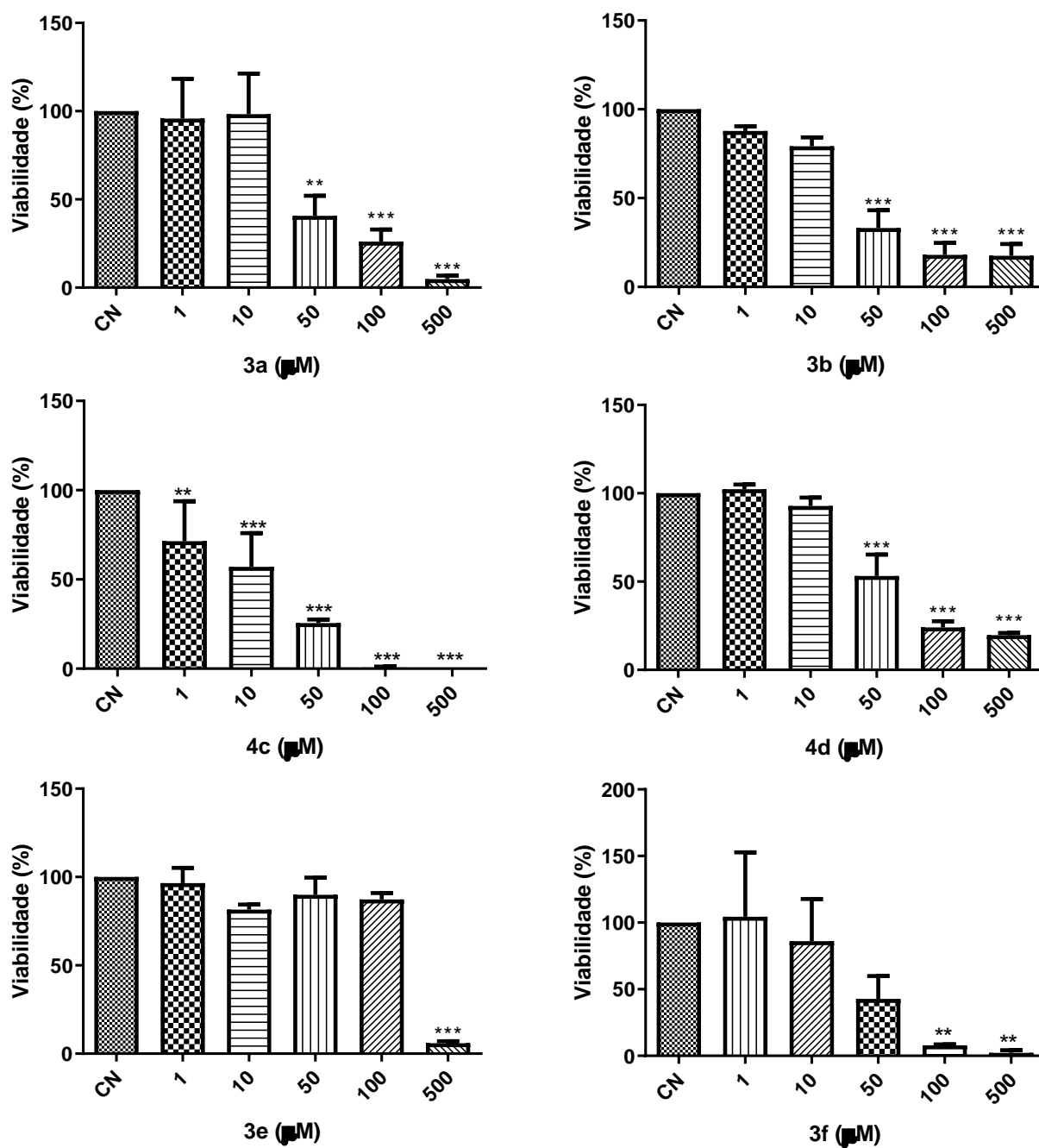
Tabela 9 – Cálculo de IC₅₀ na linhagem T98G após tratamento de 24 horas

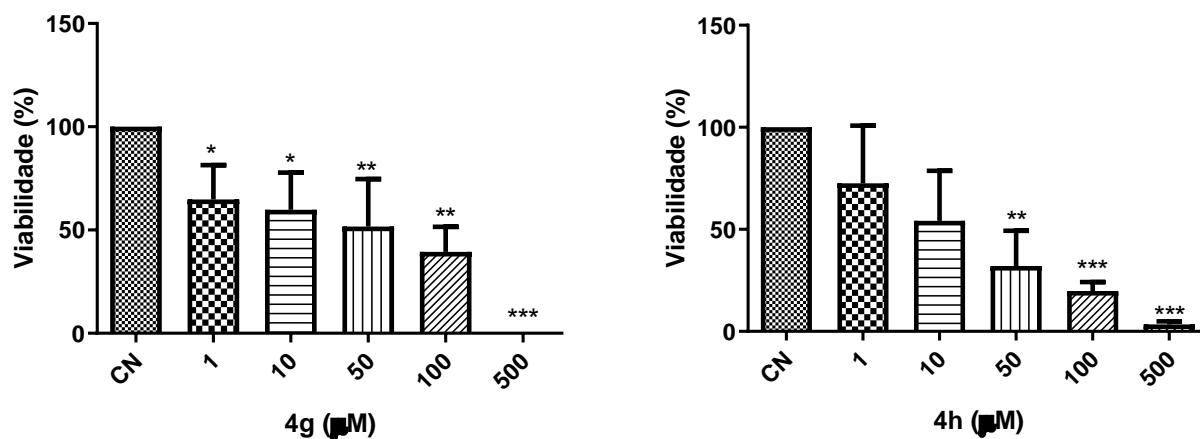
Substância	IC ₅₀ (µM)
3a	236,38
3b	57,9
4c	44,97
4d	95,94
3e	68,7
3f	82,9
4g	204,86
4h	99,7

O perfil de citotoxicidade das moléculas foi diferente para a linhagem U87, que se mostrou mais sensível de maneira geral às substâncias testadas, com exceção da molécula **3e**. É possível observar uma sensibilidade dose dependente para as moléculas **3a**, **3b**, **4c**, **4d**, **3f**, **4g** e **4h**. A citotoxicidade observada para as moléculas **4c** e **4g** aparecem significativas desde a concentração mais abaixo avaliada (1 µM) (gráfico 3).

É relevante observar que a diversidade estrutural é de extrema importância, visto que pequenas modificações nas estruturas levam a resultados muito distintos quando se trata de avaliar a atividade biológica de compostos. A influência de um grupo metila pode resultar em avaliações totalmente distintas, como por exemplo, nos casos das moléculas **3a** e **3e**.

Gráfico 3 – Resultados de citotoxicidade dos compostos sintetizados frente à linhagem U87





Os asteriscos (*) representam a diferença estatística dos resultados em relação ao controle negativo (CN), com diferentes níveis de significância. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os resultados de todas as moléculas para a linhagem U87 foram agrupados em um gráfico de dispersão (gráfico 4), da mesma maneira como foi elaborado para a linhagem T98G. Claramente é possível observar uma sensibilidade desta linhagem a partir das concentrações de 10 e 50 μM , com uma citotoxicidade mais pronunciada destas moléculas na linhagem U87 quando comparada com a linhagem T98G. As moléculas **3a**, **3b**, **4c**, **3f** e **4h** induzem uma citotoxicidade maior que as demais substâncias testadas, confirmado pelos valores de IC_{50} de cada linhagem (tabela 10).

Gráfico 4 – Resultados agrupados de citotoxicidade dos compostos sintetizados (U87)

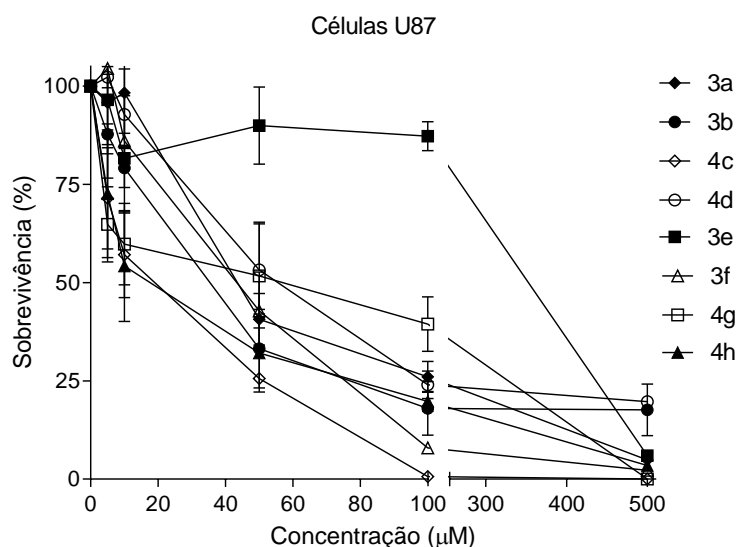


Tabela 10 – Cálculo de IC₅₀ na linhagem U87 após tratamento de 24 horas

Substância	IC ₅₀ (µM)
3a	43,5
3b	35,77
4c	26,83
4d	62,96
3e	261,37
3f	43,4
4g	64,96
4h	29,47

Com o intuito de facilitar a comparação e a análise dos resultados de IC₅₀ das moléculas frente às duas linhagens celulares T98G e U87, os resultados foram agrupados na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados *in silico* x IC₅₀

Substância	LogP	Irritante	T98G	U87
3a	2,49	X	236,38	43,5
3b	2,90	X	57,9	35,77
4c	3,63	X	44,97	26,83
4d	3,65	✓	95,94	62,96
3e	2,62	X	68,7	261,37
3f	3,03	X	82,9	43,4
4g	3,90	X	204,86	64,96
4h	3,91	✓	99,7	29,47

A partir dos resultados de IC₅₀ é possível observar que a molécula **4c** induziu citotoxicidade mais pronunciada em ambas as linhagens celulares, já a molécula **4h** induziu citotoxicidade apenas na linhagem celular mais sensível, U87.

Buscando fazer uma relação entre estrutura e atividade, estas duas moléculas, **4c** e **4h**, possuem em suas estruturas dois grupamentos indólicos. Neste sentido, grupos volumosos parecem favorecer a interação com algum ligante celular.

Porém, comparando os resultados dos ensaios *in silico* com o resultado de citotoxicidade estabelecido pelo IC₅₀ (tabela 11), a molécula **4c** apresentou resultados promissores por não apresentar efeito irritante, o mesmo não ocorreu

com a molécula **4h**, sendo necessários mais estudos a fim de comprovar seus efeitos antitumorais.

O alquenilindol **3b** também apresentou resultados satisfatórios nos ensaios *in silico*, bem como um baixo IC₅₀ em ambas as linhagens.

4.4.2 Avaliação microbiológica

Os ensaios de avaliação microbiológica foram realizados pela Ms. Fernanda Rossatto, doutoranda no PPG de Biociências da UFCSPA, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Karine Zimmer.

Os ensaios microbiológicos de inibição e erradicação de biofilmes bacteriológicos foram adaptados de TRENTIN (2011), empregando a técnica do Cristal Violeta, realizados em placas de 96 poços.

As culturas utilizadas como modelos bacterianos formadores de biofilmes são as cepas ATCC[®] (*American Type Culture Collection*) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Ambos os ensaios foram realizados a partir de suspensão bacteriana na concentração de 3×10^8 UFC/ML em 0,9% de cloreto de sódio.

4.4.2.1 Inibição de biofilmes formados pelas bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

No gráfico 5 são apresentados os resultados referentes à formação de biofilme e crescimento bacteriano da bactéria *S. epidermidis*. A coluna descrita como amostra não-tratada representa 100% de formação de biofilme (à esquerda) e 100% de crescimento bacteriano (à direita).

Cabe destacar que as moléculas **3a** e **4c** (gráfico 5) apresentaram excelentes resultados de inibição de biofilme, cerca de 25% de formação de biofilme quando comparadas à amostra não-tratada (100% de formação de biofilme). A molécula **3a** tem potencial antivirulência, sem inibir o crescimento bacteriano. Já a molécula **4c** inibiu o biofilme via inibição do crescimento bacteriano.

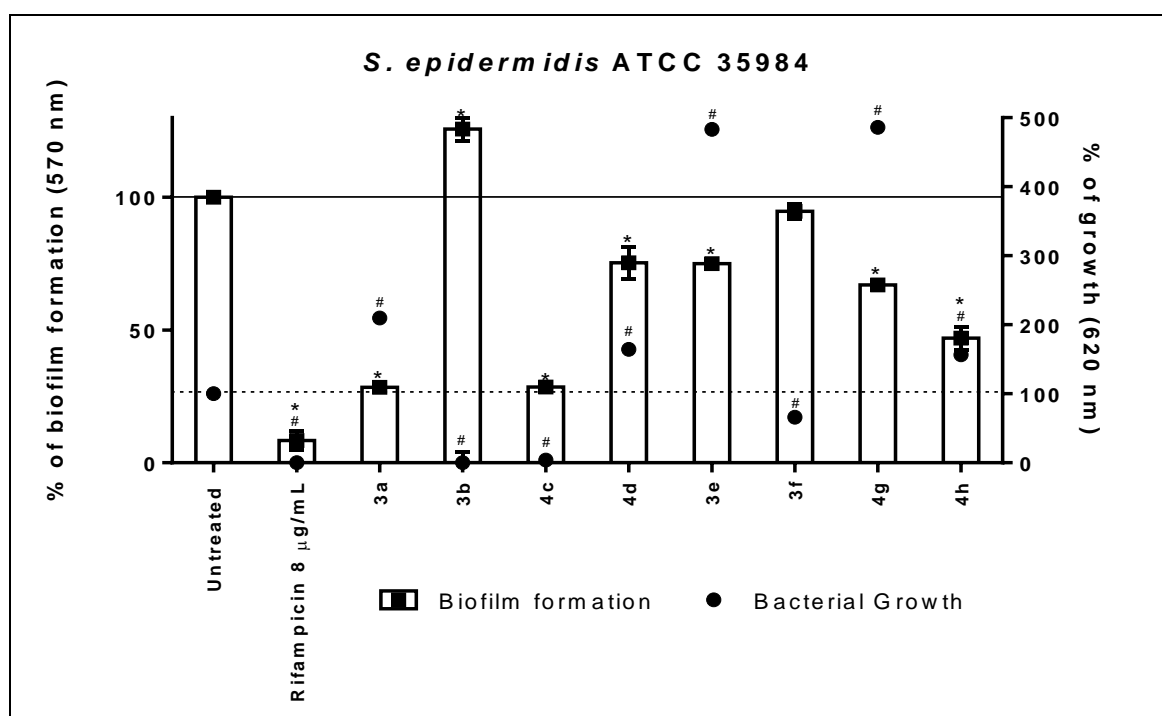
As moléculas **4d**, **3e**, **4g** e **4h** (gráfico 5) também apresentaram inibição de biofilme, sendo a **4h** em torno de 50%, resultado considerado satisfatório, já as

moléculas **4d**, **3e** e **4g** (gráfico 5) apresentaram pouca inibição de biofilme, sem inibir o crescimento bacteriano.

O crescimento microbiano é um dado de extrema importância, visto que, a partir deste dado é possível prever, mesmo que inicialmente, atividade antimicrobiana.

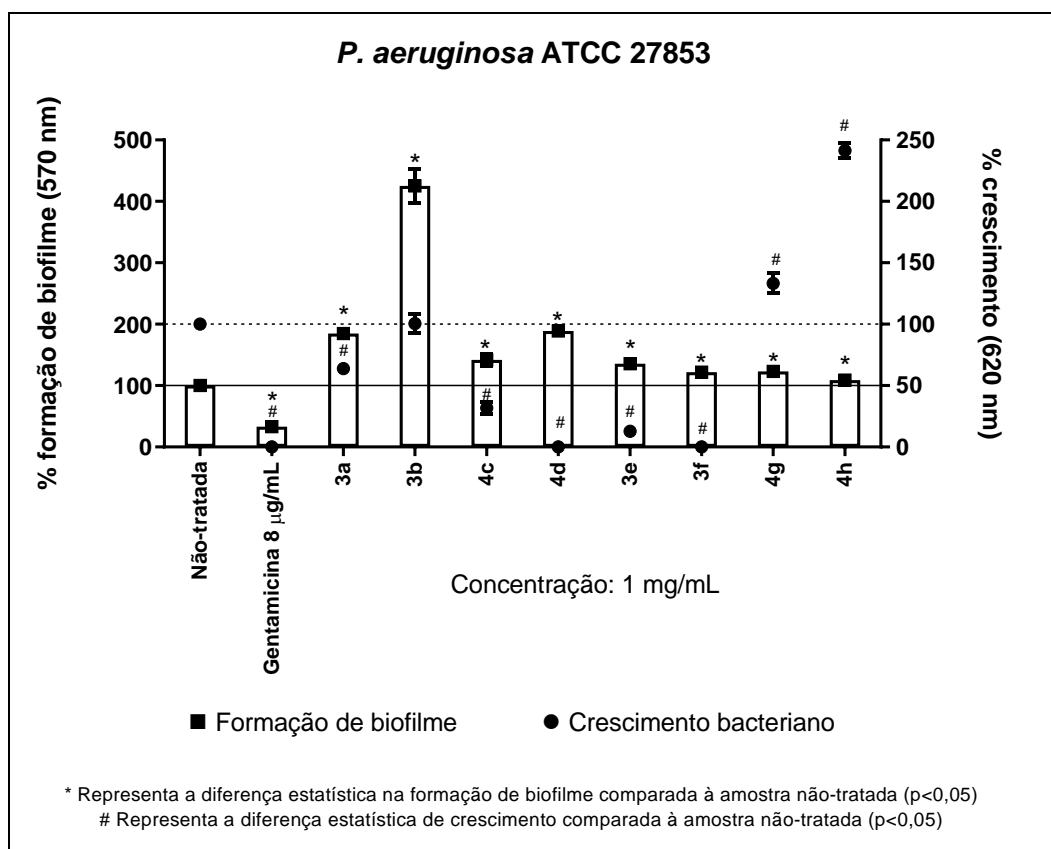
As moléculas **3b** e **4c** (gráfico 5) inibiram o crescimento microbiano tal qual o antibiótico Rifampicina, isto é, não houve crescimento da bactéria *S. epidermidis* na presença destas moléculas.

Gráfico 5 – Resultados referentes à inibição de biofilme formado pela bactéria *S. epidermidis*.



De um modo geral, a maioria das moléculas testadas apresentaram bons resultados antibiofilme, sendo a **3a** (gráfico 5) com melhor resultado antivirulência, podendo ser então considerada promissora para futuros estudos envolvendo performance *in vivo*.

O gráfico 6 apresenta os resultados referentes ao crescimento bacteriano e formação de biofilme da bactéria *P. aeruginosa*.

Gráfico 6 – Resultados referentes à inibição de biofilme formado pela bactéria *P. aeruginosa*.

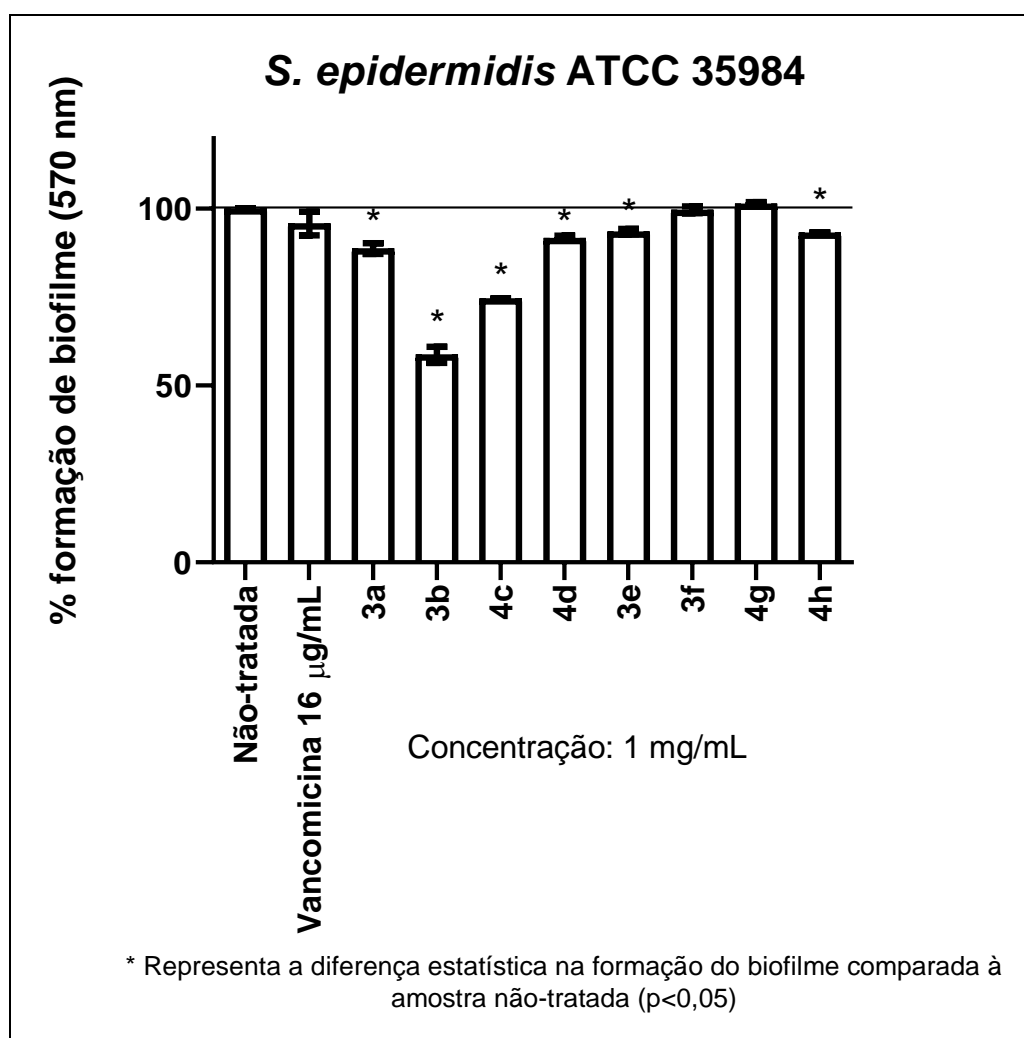
Em relação ao crescimento bacteriano, todas as moléculas apresentaram inibição de crescimento quando comparadas à amostra não-tratada, com exceção das moléculas **4g** e **4h**, onde houve aumento do crescimento bacteriano, e a molécula **3b** que não apresentou diferença estatística de crescimento bacteriano em comparação à amostra não tratada. Sendo as moléculas **4d**, **3e** e **3f** com maior potencial de inibição bacteriana (gráfico 6).

Nenhuma molécula foi capaz de inibir a formação de biofilme da *P. aeruginosa*. Contudo, este resultado já era esperado, considerando que a *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, possuindo membrana externa que dificulta a ação antimicrobiana de compostos. Já a *S. epidermidis* é uma bactéria gram-positiva, ou seja, não apresenta membrana externa e é, portanto, alvo mais fácil para ação antimicrobiana (LOPES et al., 2018).

4.4.2.2 Erradicação de biofilmes formados pelas bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os gráficos 7 e 8 apresentam os dados dos ensaios de erradicação de biofilme, que consistem em adicionar a molécula após a formação do mesmo com objetivo de verificar se a molécula é capaz de erradicar ou apenas diminuir o biofilme formado pelas bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Gráfico 7 – Resultados referentes à erradicação de biofilme formado pela bactéria *S. epidermidis*.

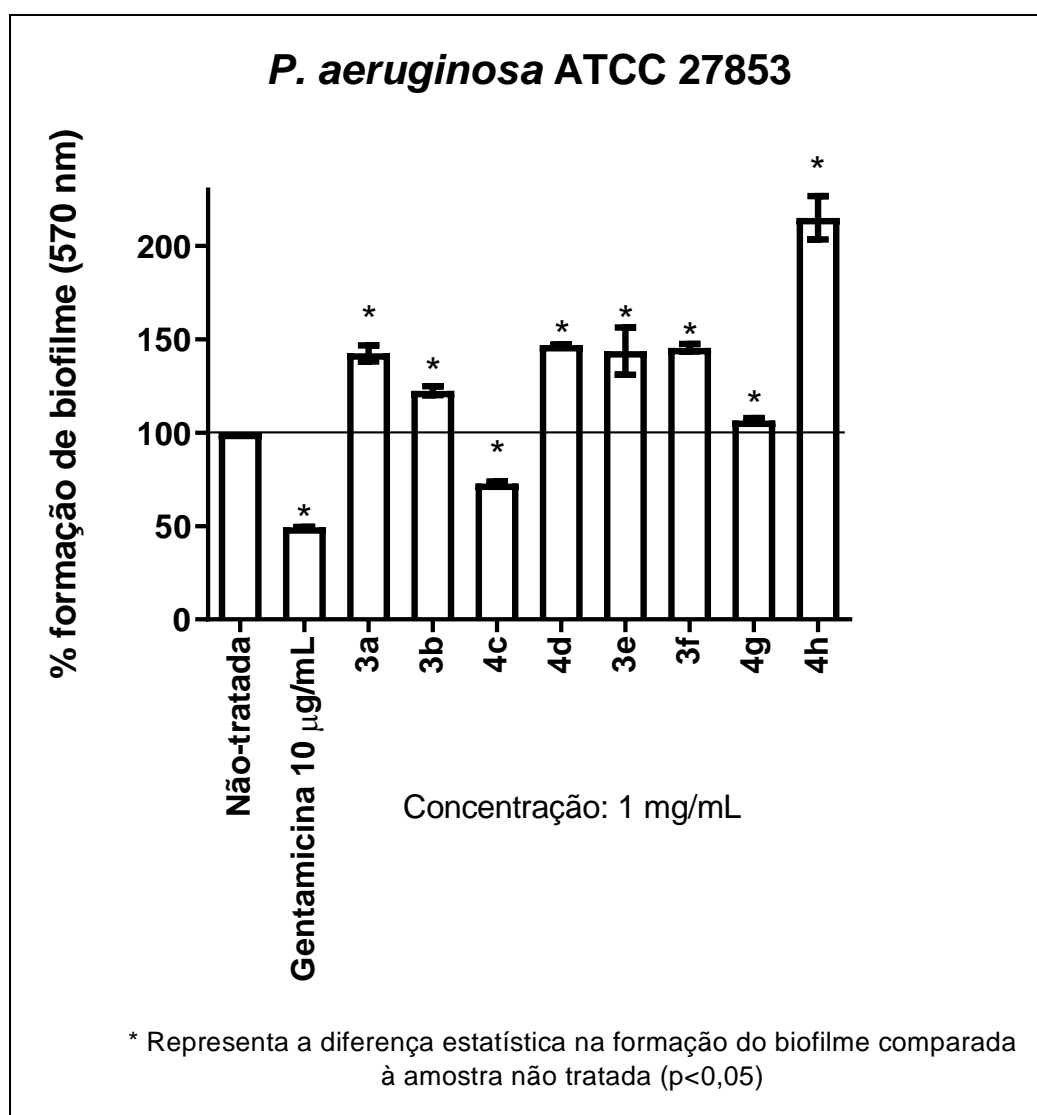


Em relação ao biofilme formado pela bactéria *S. epidermidis* (gráfico 7), a molécula **3b** tem melhor potencial erradicatório, em torno de 40%. Já as moléculas **4f** e **4g** não apresentaram diferença estatística nos resultados de erradicação quando comparadas à amostra não-tratadas.

No gráfico 8, que representa a formação de biofilme formado pela bactéria *P. aeruginosa*, somente a molécula **4c**, apresentou potencial erradicatório em torno de 30%, porém inferior ao potencial do antibiótico Gentamicina.

Embora os compostos **3b** e **4c** (gráficos 7 e 8) não tenham reduzido em grande extensão o biofilme de *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, respectivamente, ambos possuem potencial erradicatório, considerando que não existe composto – nem mesmo o próprio antibiótico testado (Vancomicina ou Gentamicina) – capaz de erradicar biofilmes de forma eficaz.

Gráfico 8 – Resultados referentes à erradicação de biofilme formado pela bactéria *P. aeruginosa*.



Já é bem estabelecido na literatura o potencial de compostos indólicos em inibir o crescimento e o biofilme de bactérias. Entretanto, este é o primeiro relato de alquenilindóis (**3**) e moléculas bis-indólicas (**4**), sintetizadas a partir da metodologia de heterohidroarilação de Fujiwara, apresentando atividade antimicrobiana e antivirulência.

Abraham et al. (2017) verificaram que um composto derivado do indol apresentou potencial antibiofilme contra *S. epidermidis* e antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Cascioferro et al. (2019) observaram que derivados indólicos são capazes de afetar a capacidade destas bactérias em se aderir a superfícies, sem afetar o crescimento, o que evidencia o potencial de indóis como agentes antivirulência.

Parai et al. (2018) demonstraram que a reserpina, um indol-alcaloide derivado de plantas, foi capaz de reduzir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, via inibição de genes relacionados com a regulação do biofilme. A reserpina também foi capaz de erradicar o biofilme na concentração de 300 µg/mL. Da mesma forma, Lee et al. (2016) observaram o potencial erradicatório de 36 derivados de indol contra *S. aureus* e *E. coli* (ABRAHAM et al., 2017; CASCIOFERRO et al., 2019; LEE et al., 2016; PARAI et al., 2018).

5 CONCLUSÕES

As moléculas sintetizadas durante o período desta dissertação tiveram como objetivo principal tornar este trabalho multi e interdisciplinar, reunindo os esforços de diferentes áreas e permeando entre as fronteiras de cada uma delas, a fim de usufruir todo o potencial que a UFCSPA apresenta, principalmente em relação aos estudos de bioatividade desenvolvidos pelos diversos grupos de pesquisa que nela se encontram.

Este estudo envolveu as grandes áreas da Química Medicinal, que compreendem os estudos *in silico*, desenvolvimento de metodologias de síntese para novas moléculas e caracterização das mesmas através de técnicas analíticas, bem como os ensaios *in vitro*, que envolveram testes em linhagens celulares e atividade antibiofilme bacteriano. Além dos ensaios *in vivo*, onde estas moléculas encontraram espaço dentro de projetos de outros grupos de pesquisa da própria universidade.

Circular entre diferentes áreas do conhecimento é fundamental para a formação de um químico orgânico sintético, bem como traduzir e interpretar o vocabulário utilizado em cada uma delas, a fim de que a comunicação dos resultados encontrados se faça clara e objetiva para toda a comunidade acadêmica, científica ou não.

E com esse propósito, utilizando a reação de hidroarilação de Fujiwara como ponto de partida, buscou-se otimizar resultados de tempo, rendimento e seletividade da reação, a partir de mudanças metodológicas simples, como variação no sistema de solventes do meio reacional e na proporção estequiométrica dos materiais de partida. Obtendo, assim, oito moléculas advindas da hidroarilação e dupla hidroarilação de alcinos a partir de diferentes moléculas indólicas.

As moléculas sintetizadas durante este trabalho não apresentaram na literatura resultados referentes à atividade biológica, inclusive algumas moléculas são consideradas inéditas, até mesmo no que se refere à síntese das mesmas, na metodologia de Fujiwara..

Os compostos obtidos foram purificados, caracterizados e passaram por avaliação de atividade biológica em células tumorais de glioma e ensaios microbiológicos com bactérias formadoras de biofilme.

Todas as moléculas testadas induziram citotoxicidade, em diferentes concentrações, em ambas as linhagens de glioblastomas, sendo os efeitos mais pronunciados observados na linhagem U87 que é sensível ao quimioterápico padrão Temozolomida (TMZ). Em ambas as linhagens testadas, U87 e T98G, a molécula que apresentou os melhores resultados de IC₅₀ foi a **4c**.

Em relação aos ensaios microbiológicos cabe destacar a molécula **3a**, que inibiu o biofilme formado pela bactéria *S. epidermidis*, sem inibir o crescimento bacteriano, o que demonstra seu potencial antivirulência. As moléculas **4c** e **4g** também apresentaram excelentes resultados em relação à inibição do biofilme formado pela *S. epidermidis*, porém com inibição do crescimento bacteriano.

Quando da erradicação de biofilme formado pela *S. epidermidis*, os resultados mais promissores foram aqueles obtidos pelas moléculas **3b** e **4c**, que apresentaram percentuais de erradicação de biofilme excelentes, nem mesmo o antibiótico padrão Vancomicina, apresentou resultado tão satisfatório.

Os mesmos ensaios foram realizados com a bactéria *P. aeruginosa*, nos quais as moléculas **4d**, **3e** e **3f** inibiram o crescimento bacteriano, e a molécula **4c** apresentou potencial erradicatório, merecendo destaque dentre as outras moléculas. Resultados menos pronunciados são esperados em relação à *P. aeruginosa*, pois é uma bactéria gram-negativa, ou seja, apresenta membrana externa, o que dificulta a ação antimicrobiana.

A partir da análise dos resultados obtidos, é possível concluir que moléculas que tenham como *scaffold* o núcleo indólico apresentam potencial bioatividade, reiterando o que afirmam as referências aqui citadas.

Todos os dados resultantes dos ensaios de atividade biológica realizados neste trabalho merecem devida atenção e continuidade de experimentos, a fim de elencar as moléculas mais promissoras para futuros testes *in vivo*, bem como avaliar-se a necessidade de mudanças estruturais com o objetivo de pronunciar a atividade biológica de cada molécula, de acordo com suas especificidades.

6 PERSPECTIVAS

Realizar modificações estruturais nas moléculas com o objetivo de aumentar a polaridade das mesmas;

Realizar outros ensaios *in silico* das moléculas sintetizadas, bem como realizar os testes nas modificações estruturais pretendidas, antes de iniciar a síntese em bancada;

Otimizar rendimento e seletividade da síntese com base nas variações metodológicas que apresentaram os melhores resultados;

Buscar metodologia para separação dos isômeros formados pela reação, a fim de esclarecer possíveis dúvidas quanto à seletividade da reação;

Avaliar o índice de seletividade dos compostos que apresentaram os menores IC₅₀ utilizando linhagens não-tumorais;

Avaliar a migração celular e capacidade de metástase;

Investigar os mecanismos de citotoxicidade das moléculas **4c** e **4h** utilizando ensaios de morte celular (Anexina V – 7AAD), toxicidade genética, formação de ERO (espécies reativas de oxigênio) e toxicidade mitocondrial;

Investigar possíveis mecanismos de ação com as moléculas que inibiram o crescimento bacteriano;

Avaliar a formação de colônias;

Investigar a atividade microbiológica contra outros modelos formadores de biofilme, como por exemplo, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Testar os compostos com atividade microbiológica mais promissoras em modelo *in vivo*, com nematoide *C. elegans*.

Receber o aceite da revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, do artigo submetido, cujas regras estão descritas no anexo 9.4.

7 ESPECTROS

7.1 (*E,Z*)-3-(1*H*-indol-3-il)-3-fenilacrilato de metila (*E/Z*-3a)

Figura 33 – Cromatograma de massas do composto 3a

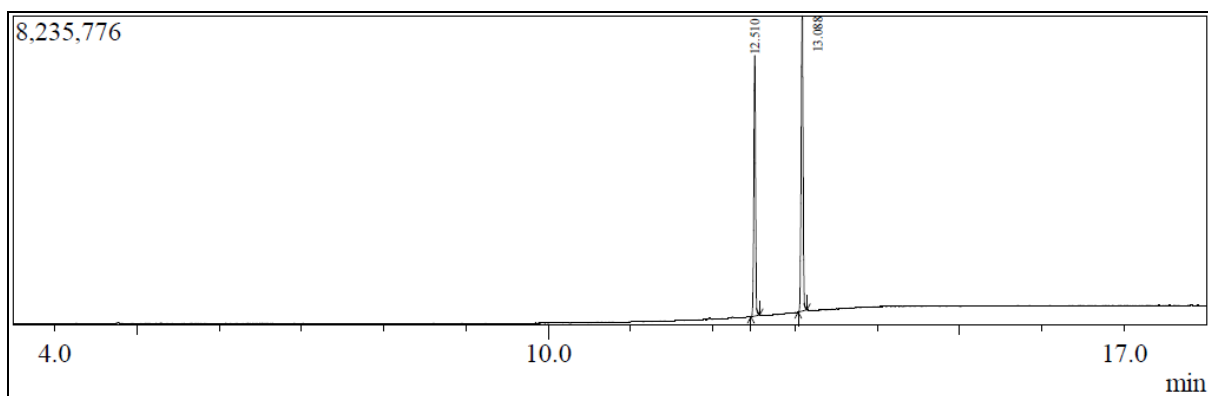
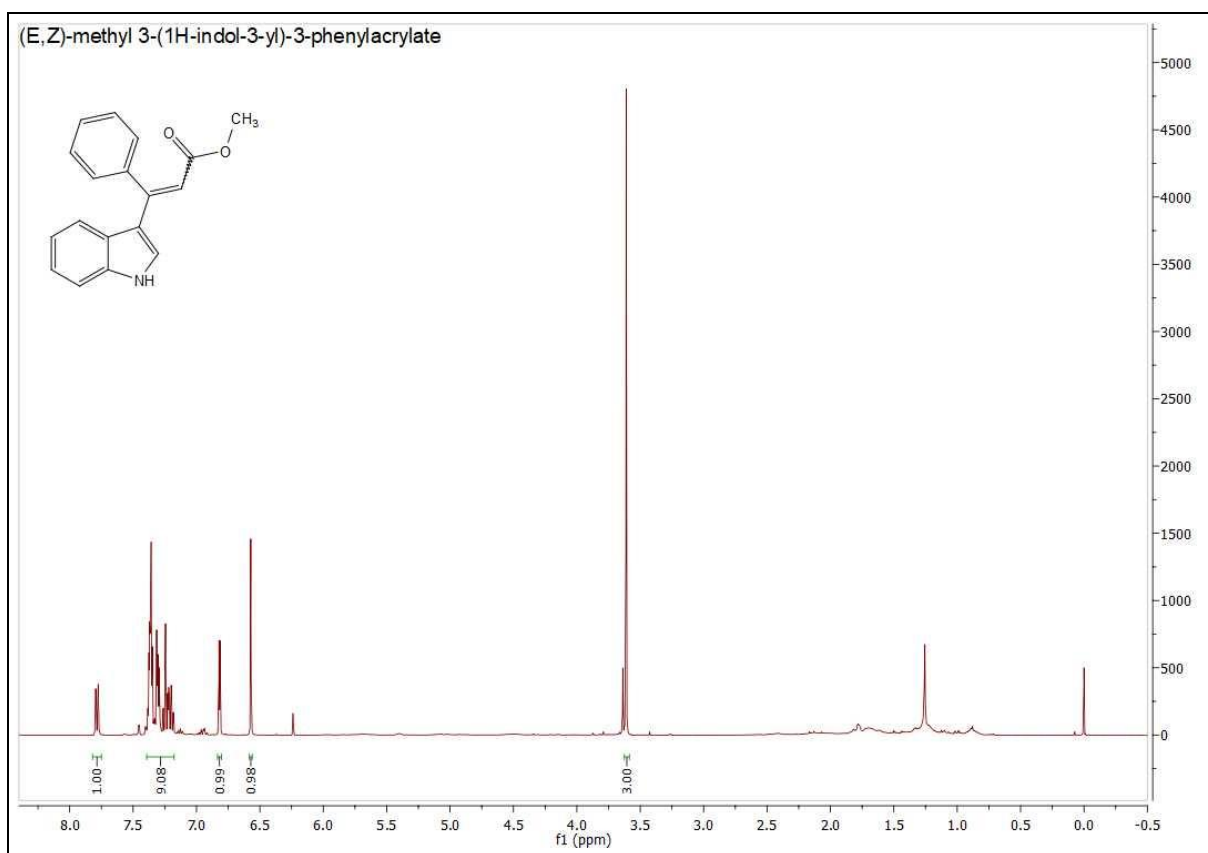


Figura 34 – Espectro de RMN ^1H do composto 3a



(CDCl_3 ; 400 MHz)

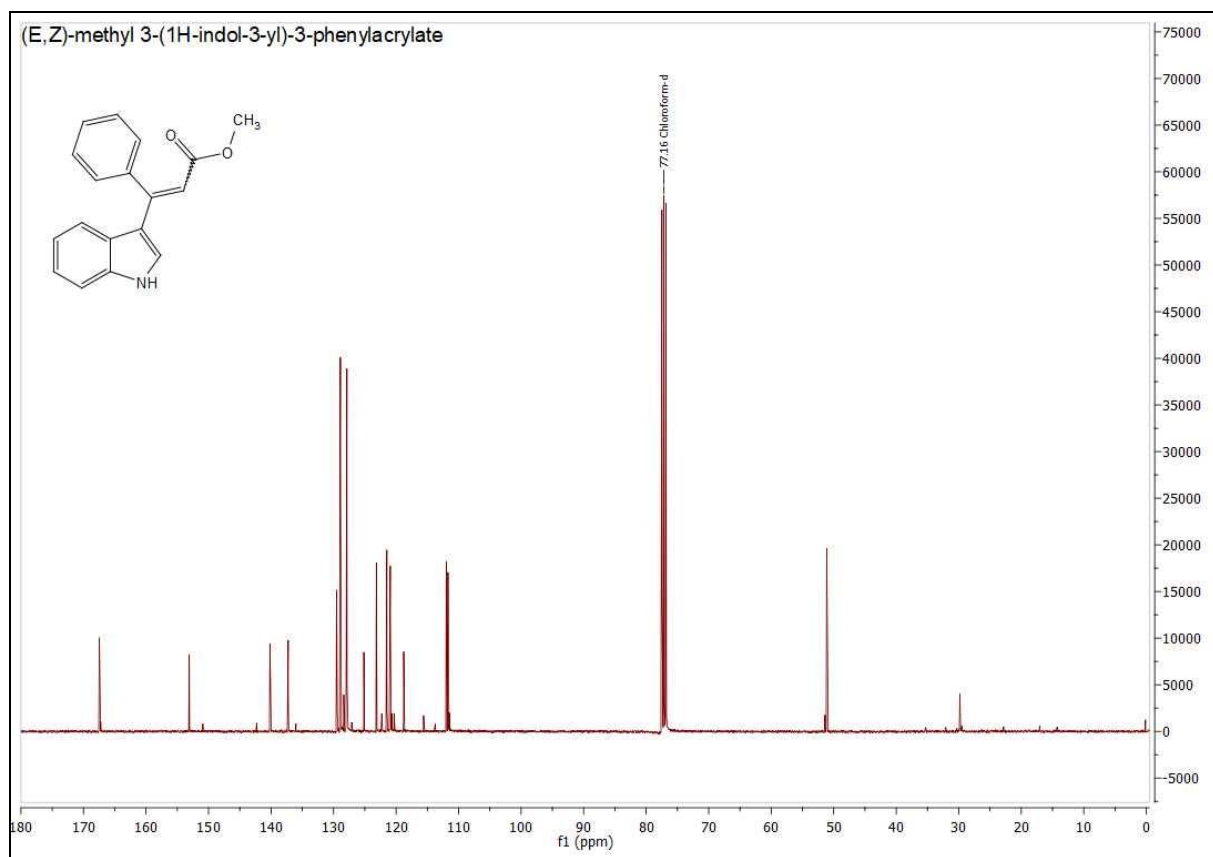
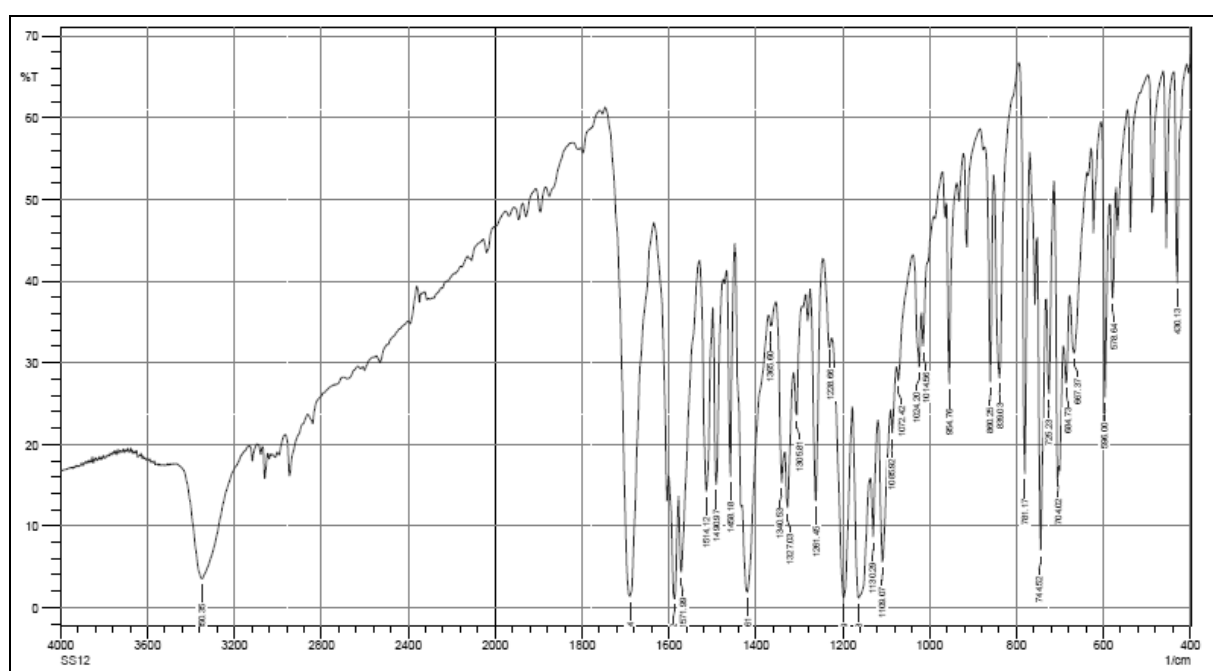
Figura 35 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 3a(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 36 – Espectro de IV do composto 3a



7.2 (E/Z)-3-(1H-indol-3-yl)-3-fenilacrilato de etila (E/Z-3b)

Figura 37 – Cromatograma de massas do composto 3b

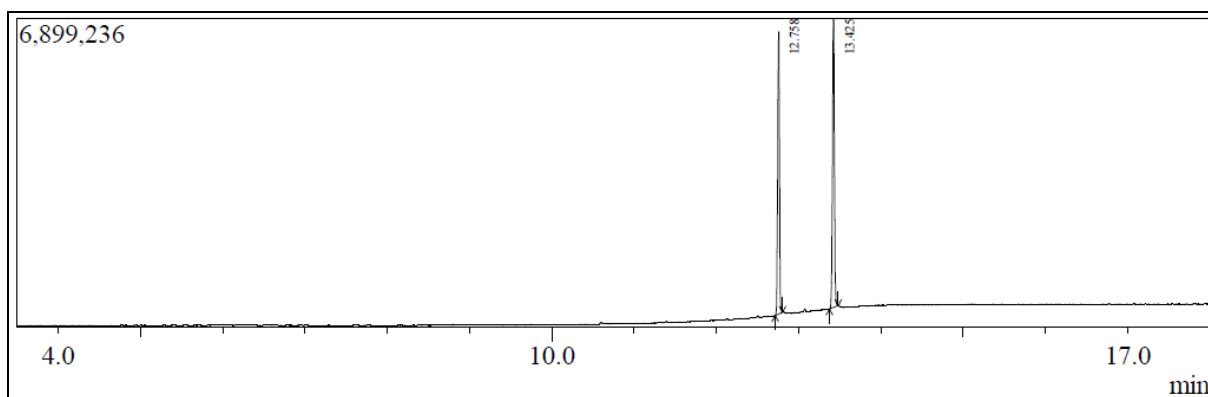
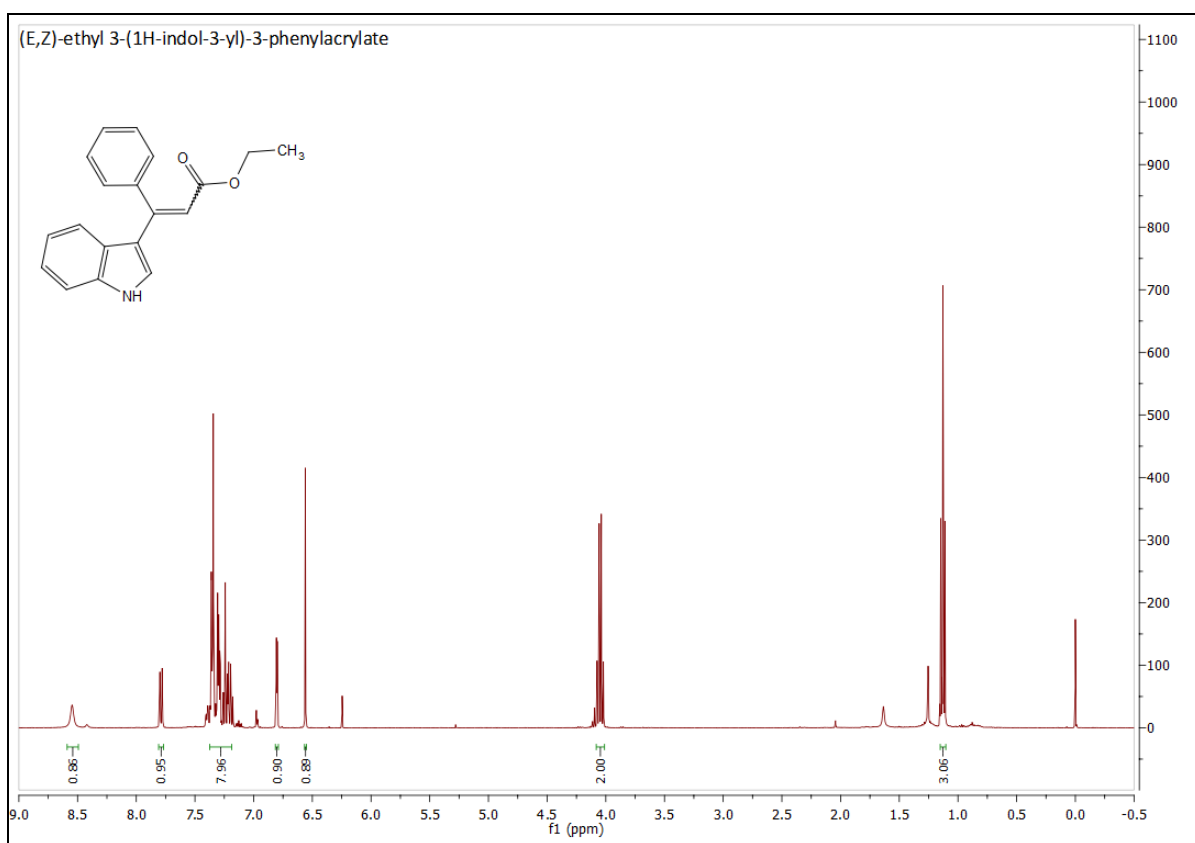
Figura 38 – Espectro de RMN ¹H do composto 3b(CDCl₃; 400 MHz)

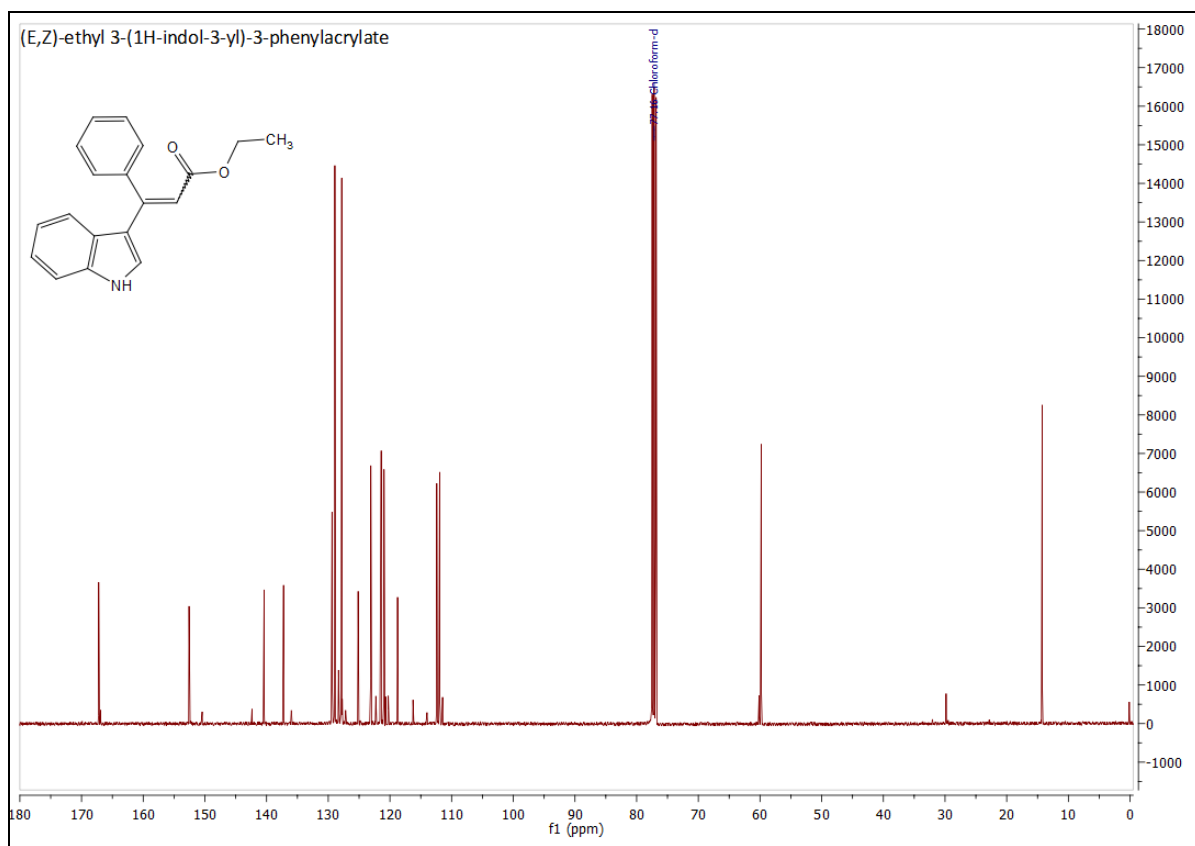
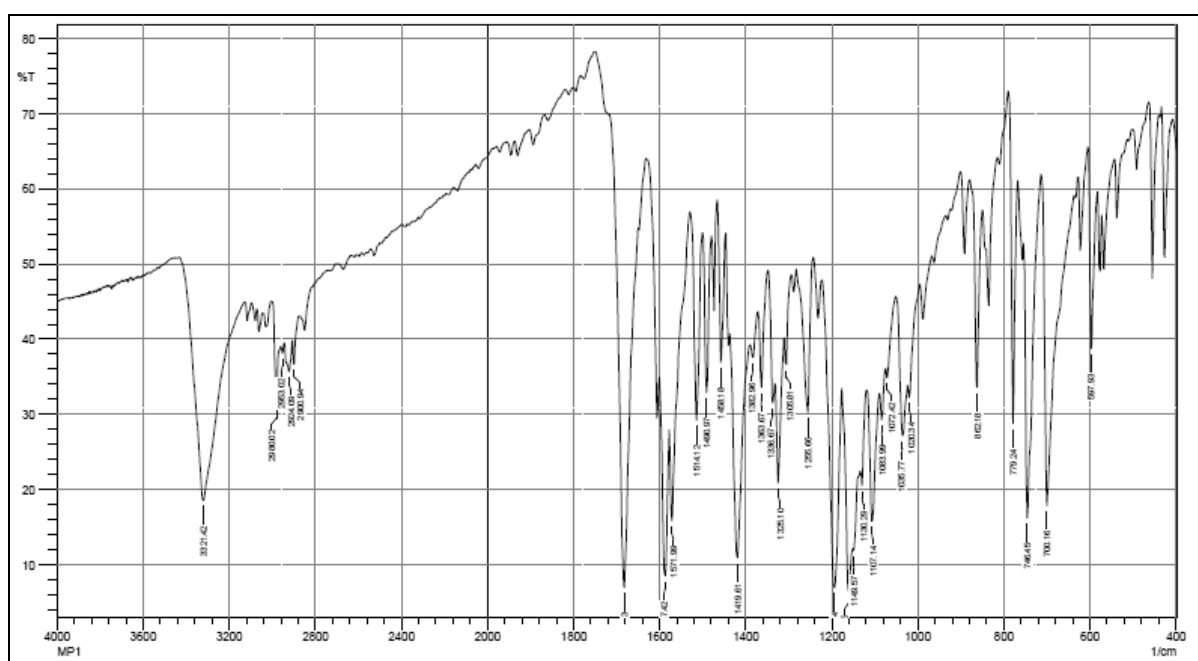
Figura 39 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 3b(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 40 – Espectro de IV do composto 3b



7.33,3-di(1*H*-indol-3-il)propanoato de metila (4c)

Figura 41 – Cromatograma de massas do composto 4c

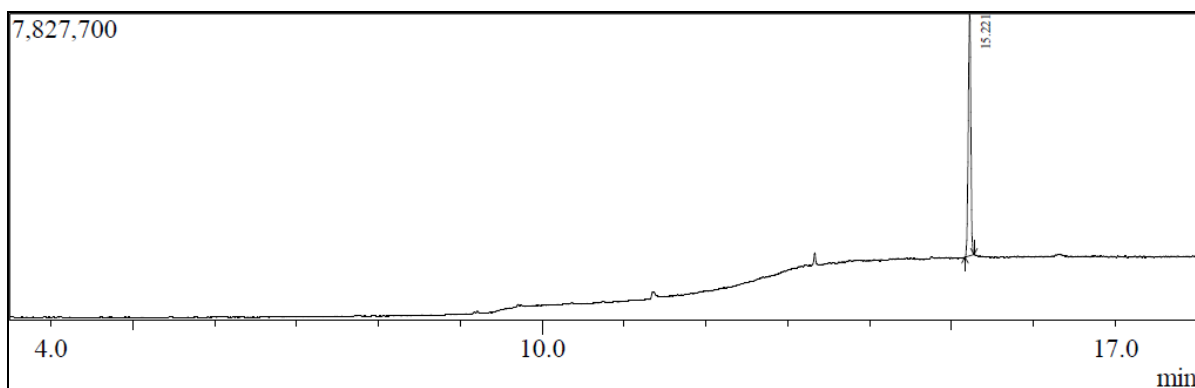
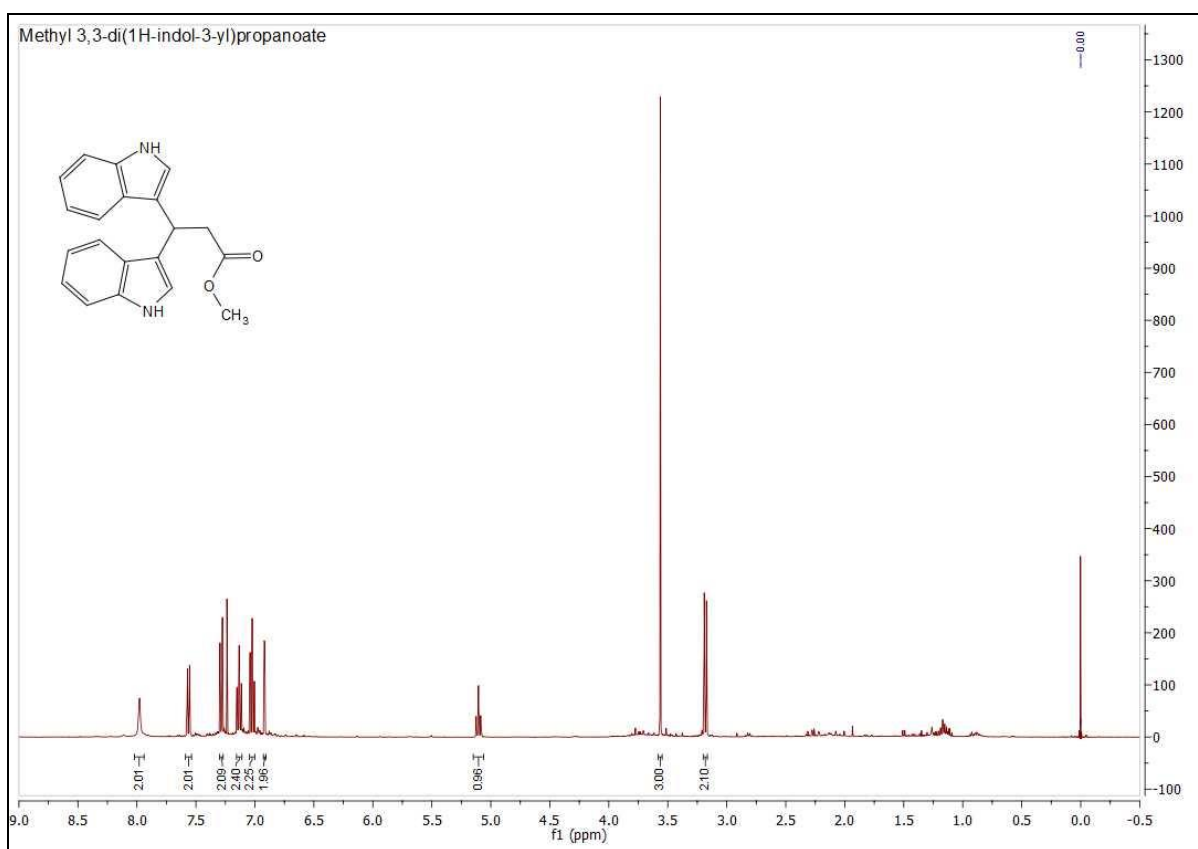
Figura 42 – Espectro de RMN ¹H do composto 4c(CDCl₃; 400 MHz)

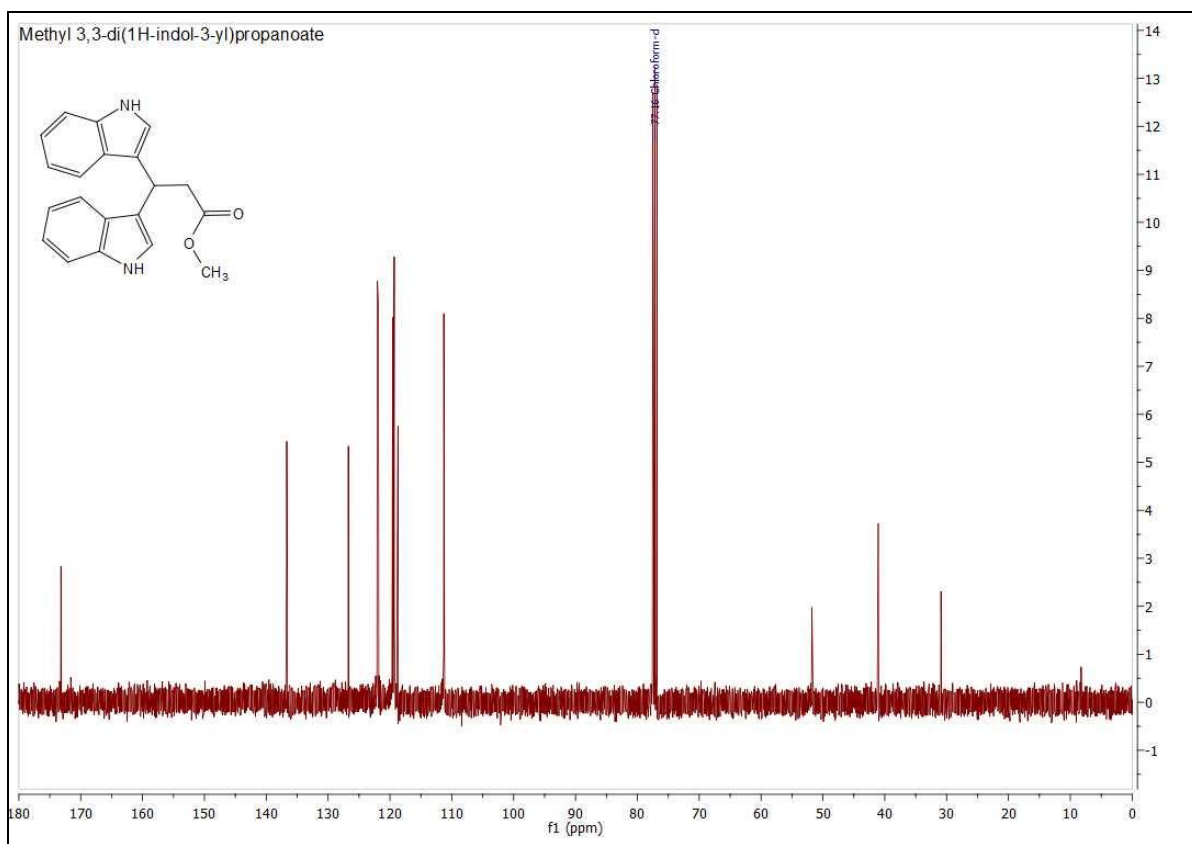
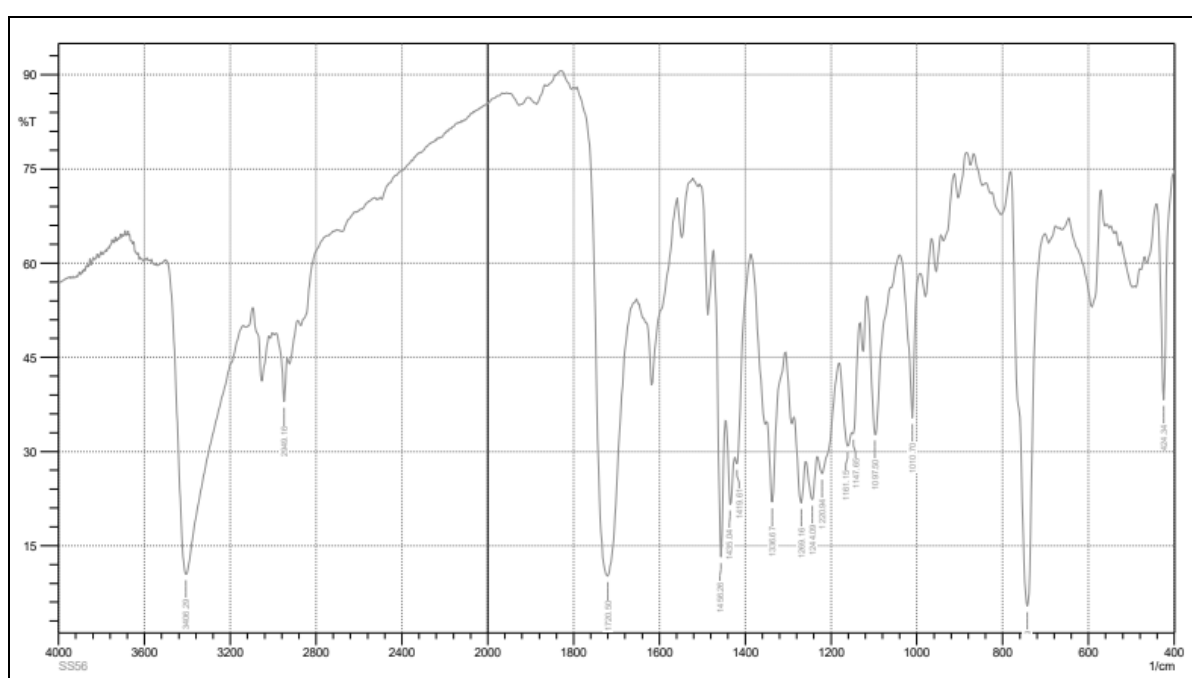
Figura 43 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 4c(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 44 – Espectro de IV do composto 4c



7.43,3-di(1*H*-indol-3-il)butanoato de etila (4d)

Figura 45 – Cromatograma de massas do composto 4d

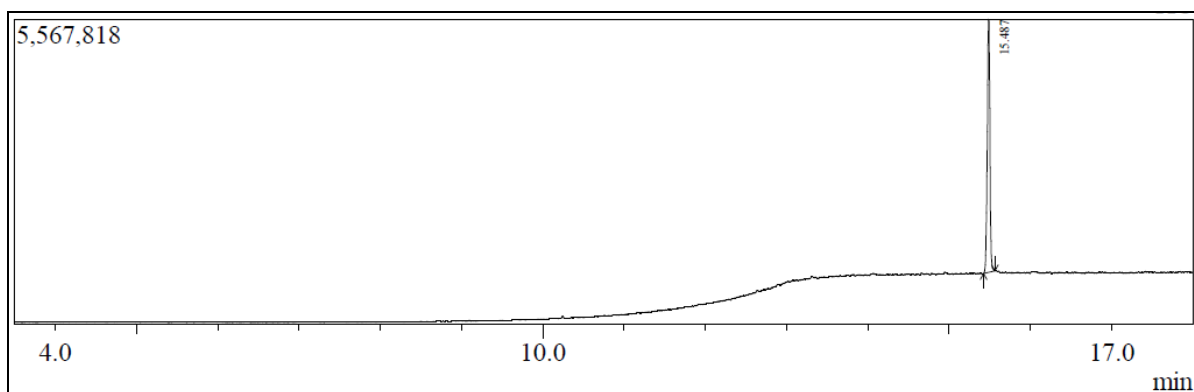
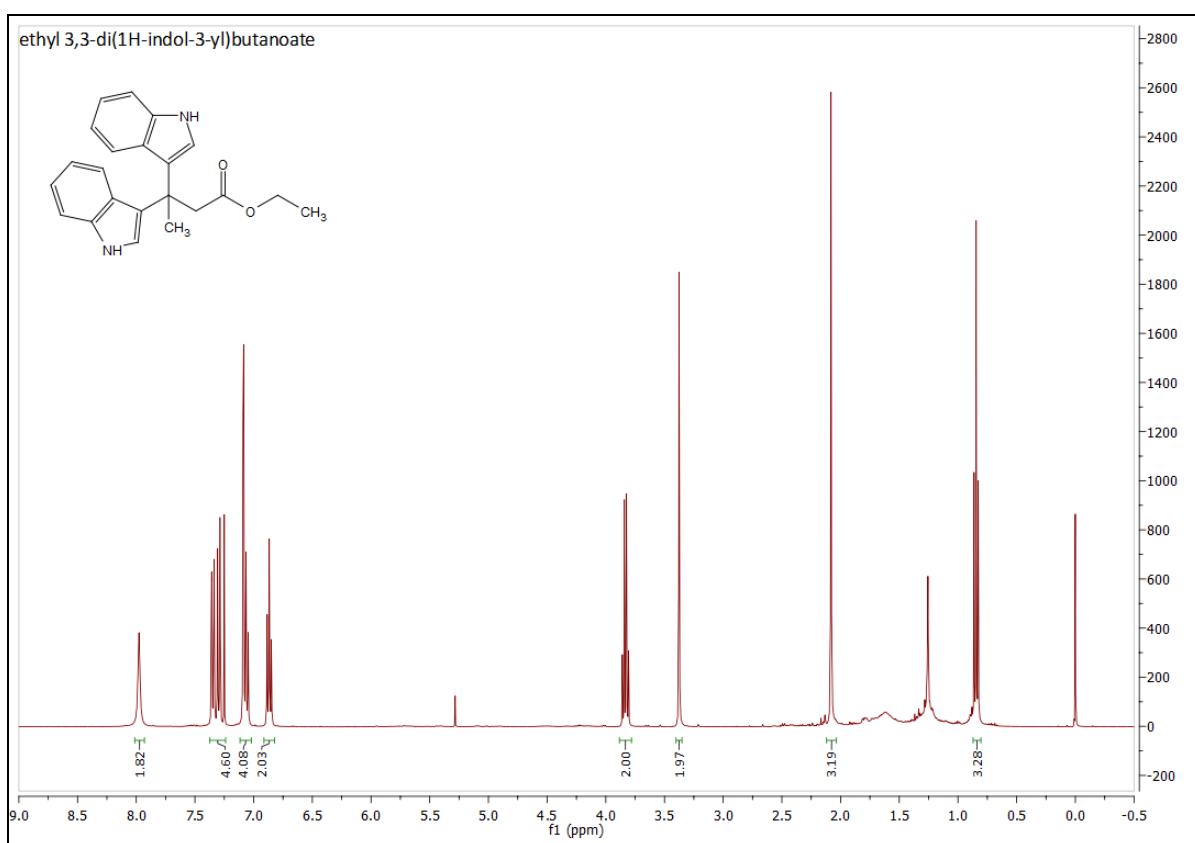
Figura 46 – Espectro de RMN ¹H do composto 4d(CDCl₃; 400 MHz)

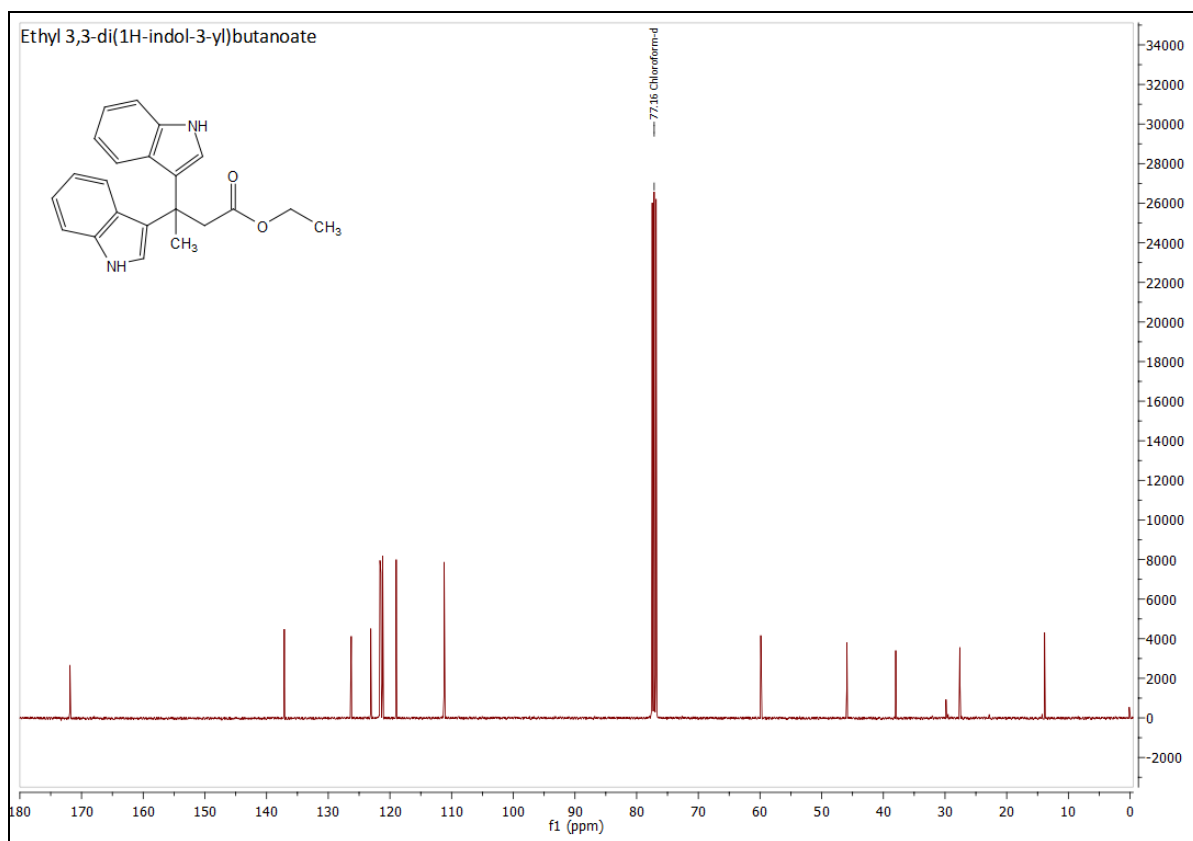
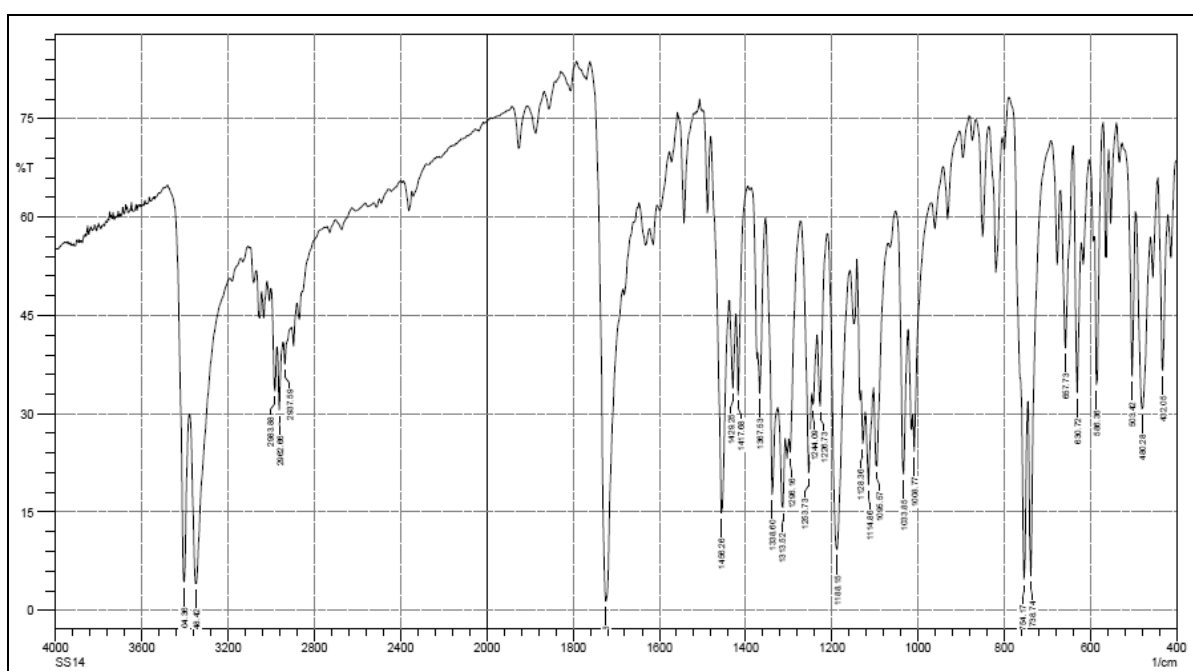
Figura 47 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 4d(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 48 – Espectro de IV do composto 4d



7.5 (E/Z)-3-(1-metil-1H-indol-3-il)-3-fenilacrilato de metila (E/Z-3e)

Figura 49 – Cromatograma de massas do composto 3e

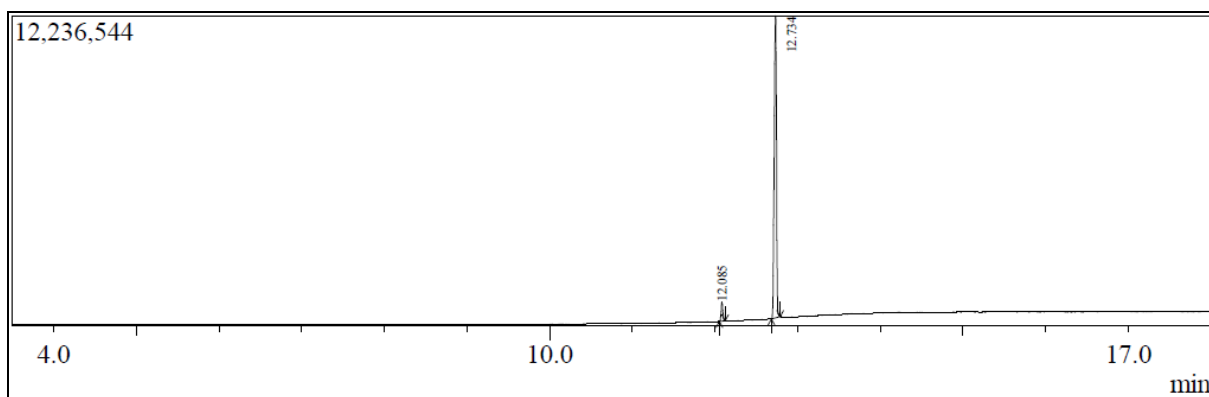
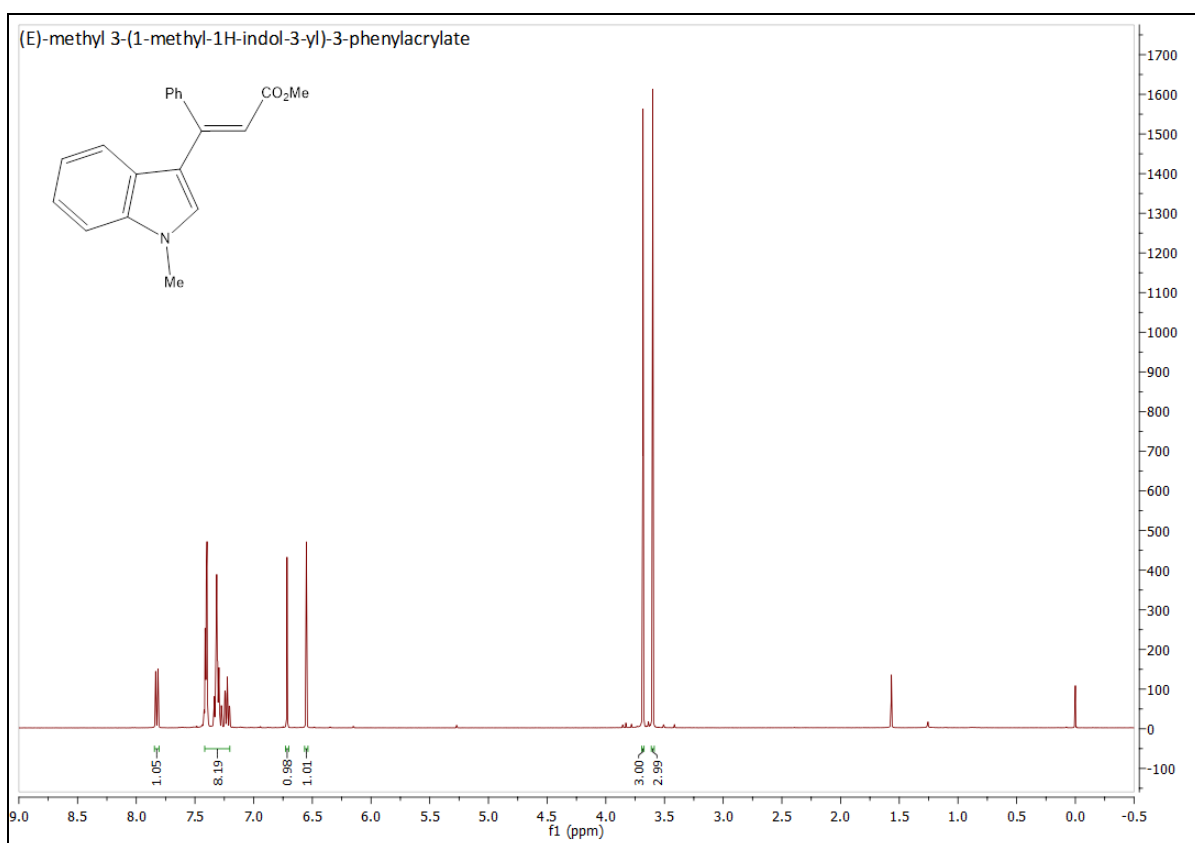
Figura 50 – Espectro de RMN ^1H do composto 3e(CDCl₃; 400 MHz)

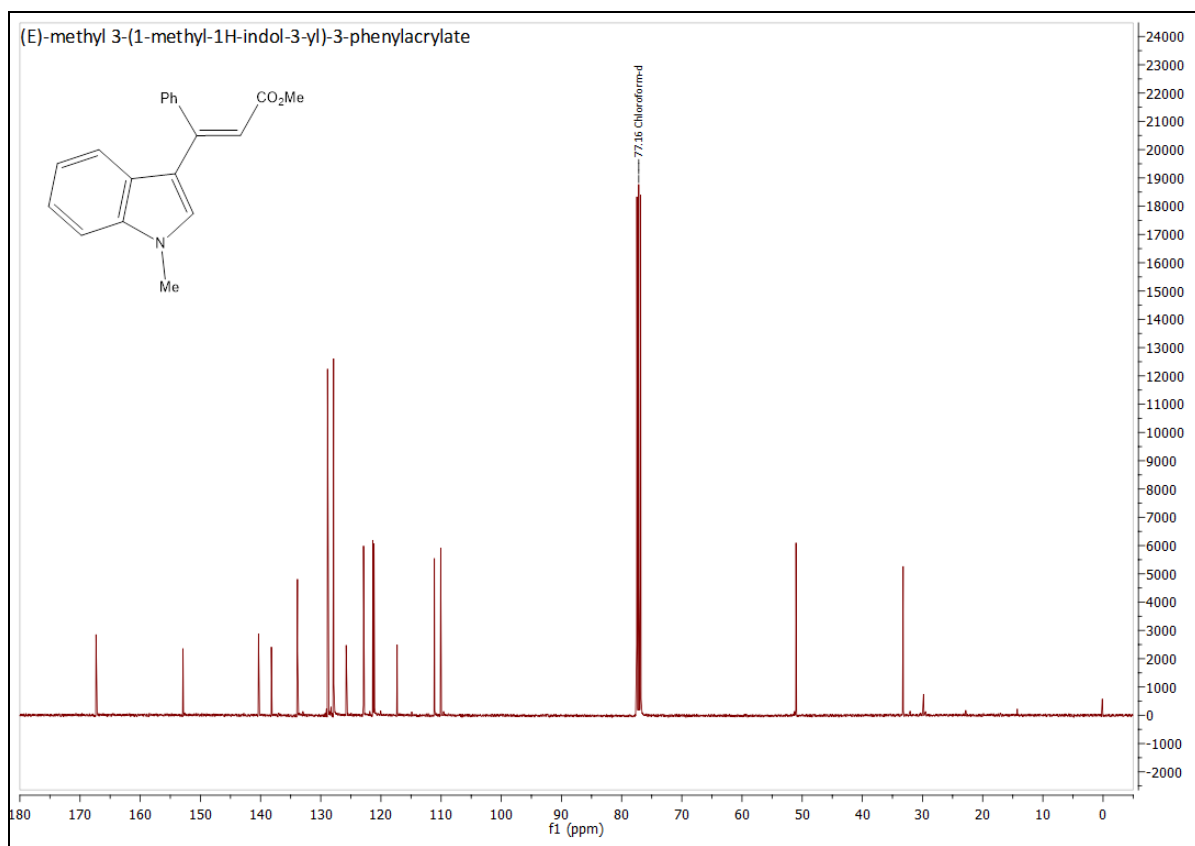
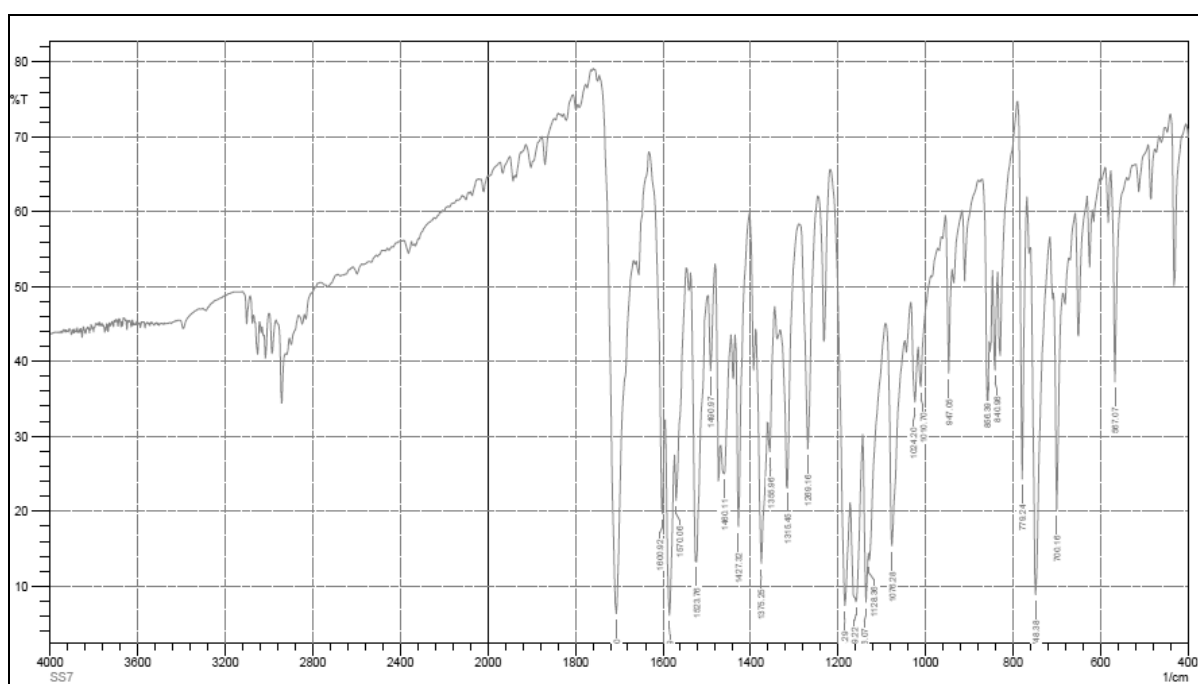
Figura 51 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 3e(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 52 – Espectro de IV do composto 3e



7.6 (E/Z)-3-(1-metil-1H-indol-3-il)-3-fenilacrilato de etila (E/Z-3f)

Figura 53 – Cromatograma de massas do composto 3f

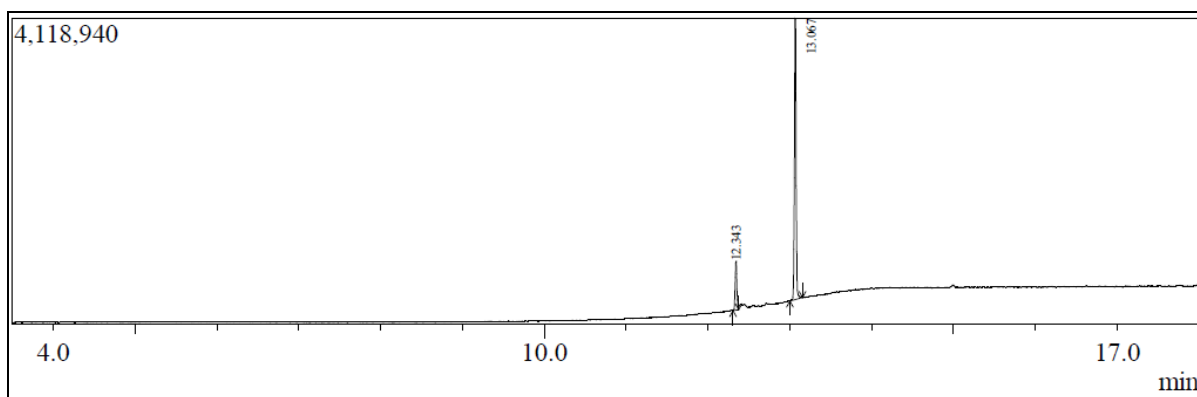
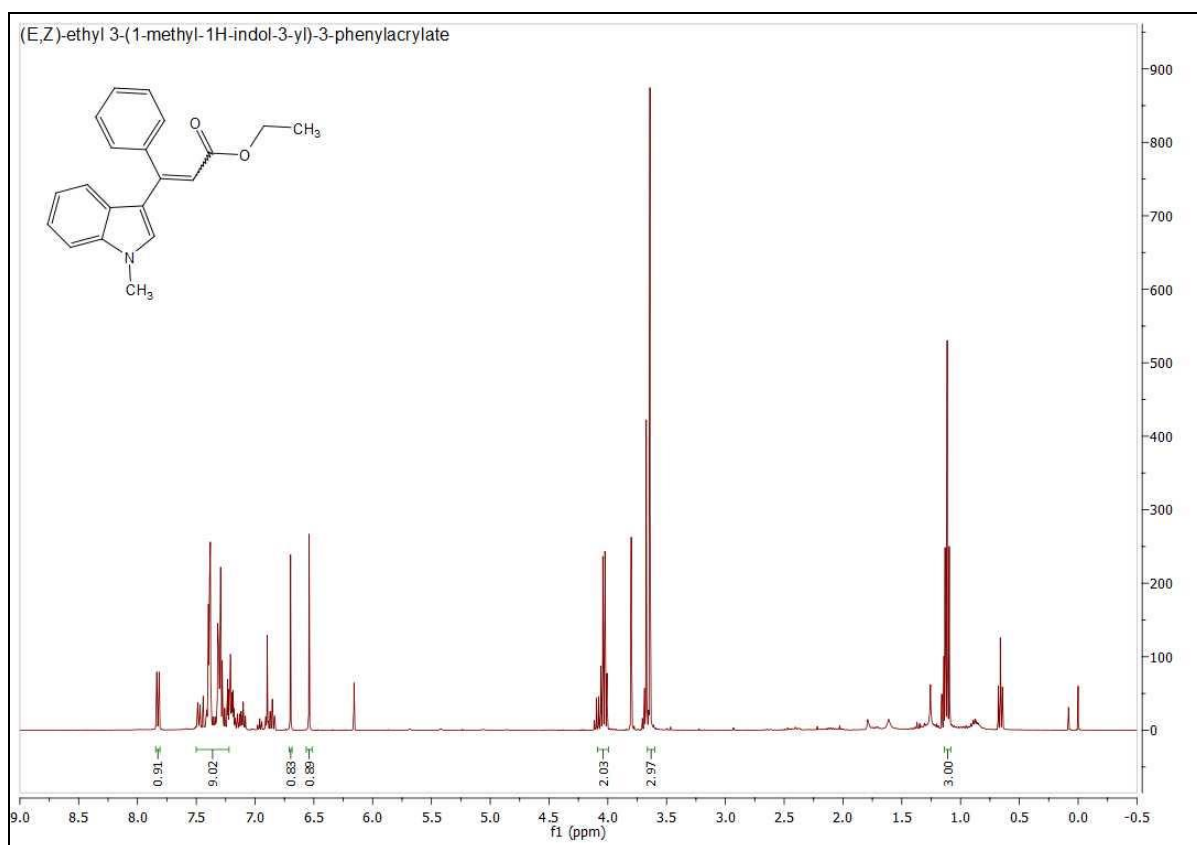
Figura 54 – Espectro de RMN ^1H do composto 3f(CDCl₃; 400 MHz)

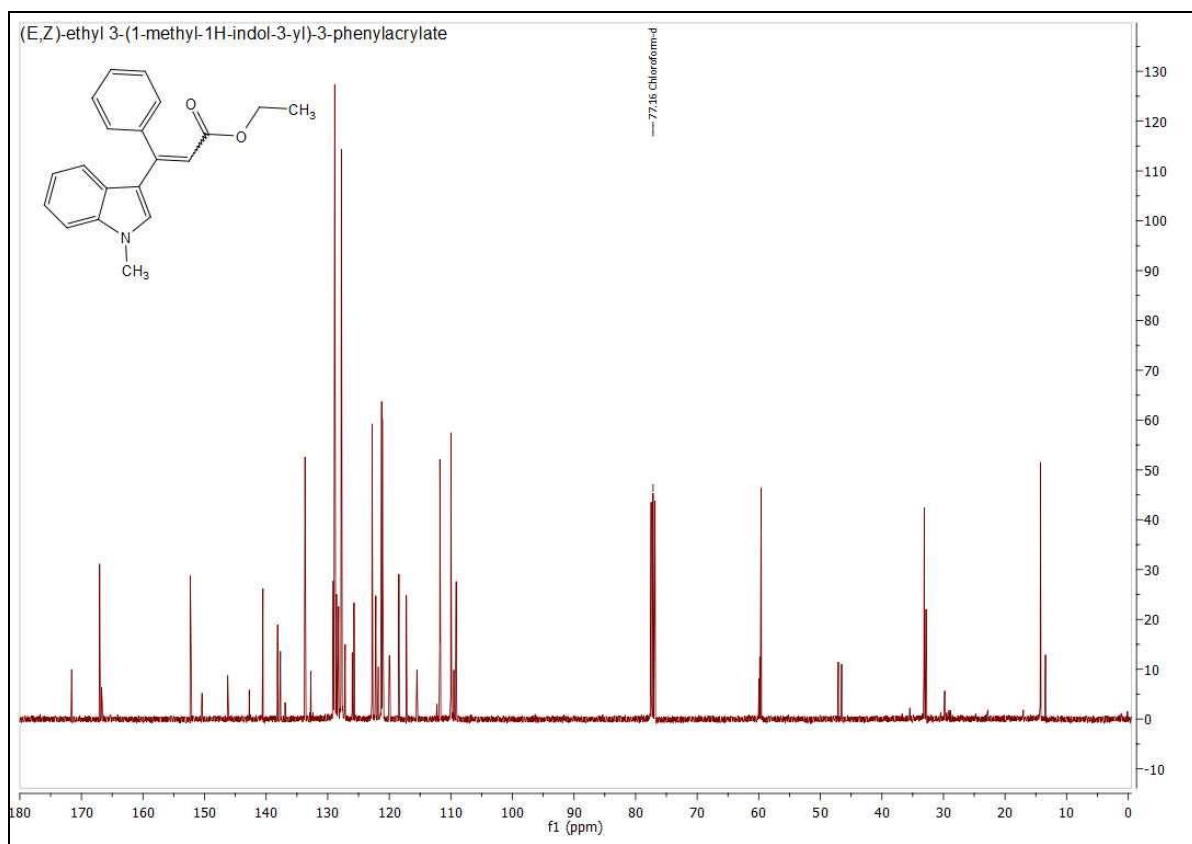
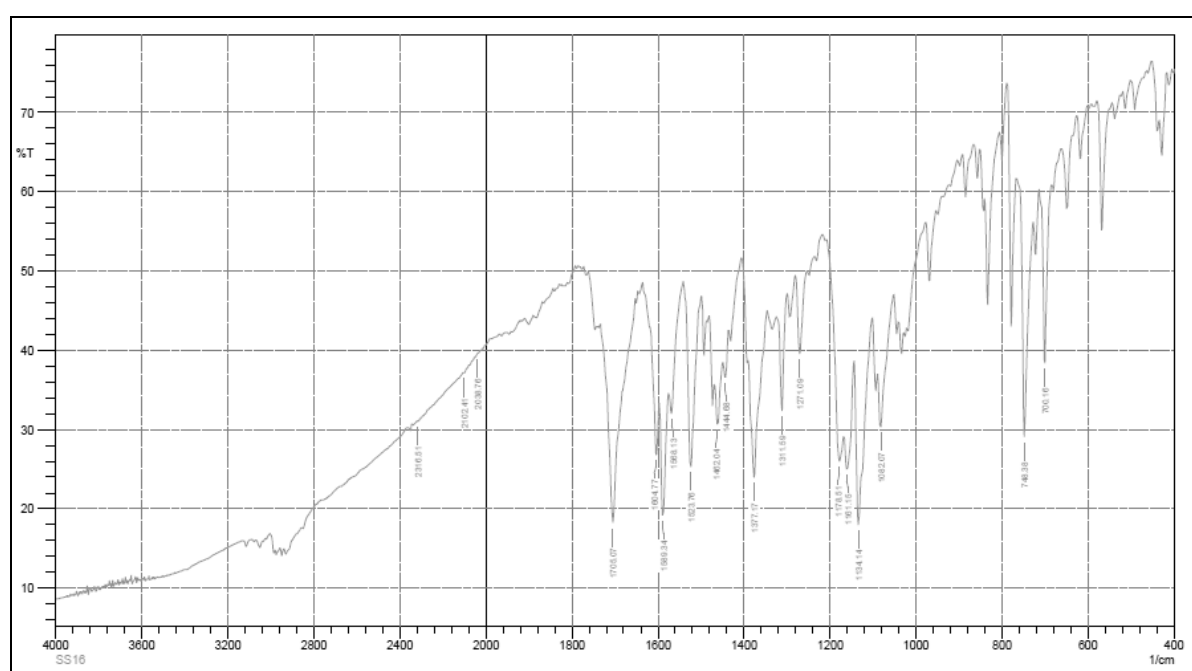
Figura 55 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 3f(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 56 – Espectro de IV do composto 3f



7.73,3-di(1-metil-1H-indol-3-il)propanoato de metila (4g)

Figura 57 – Cromatograma de massas do composto 4g

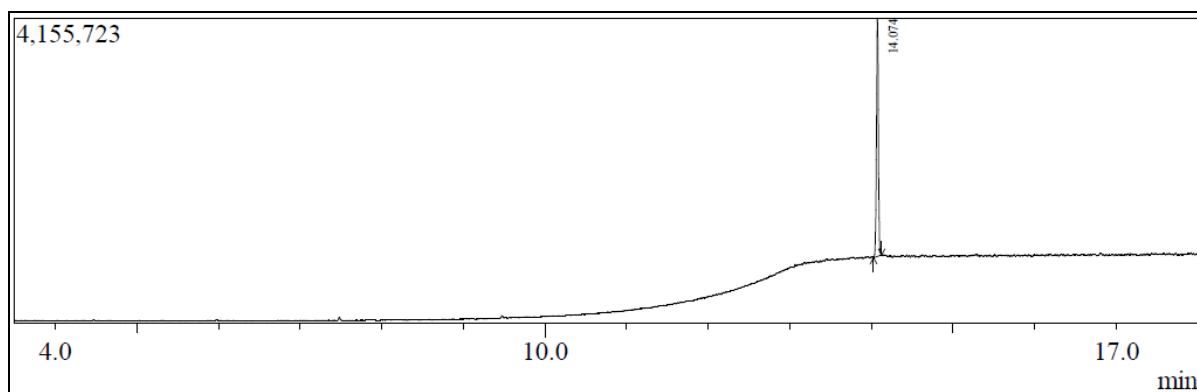
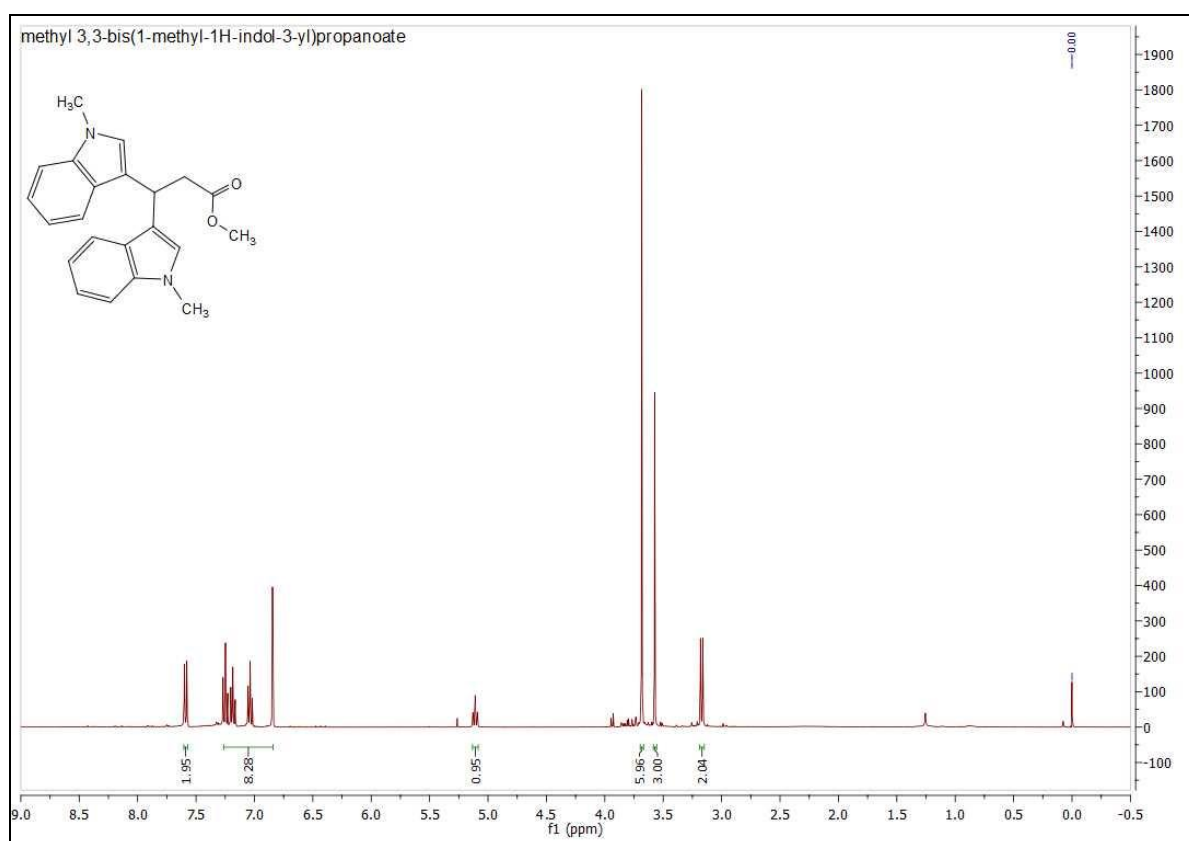
Figura 58 – Espectro de RMN ¹H do composto 4g(CDCl₃; 400 MHz)

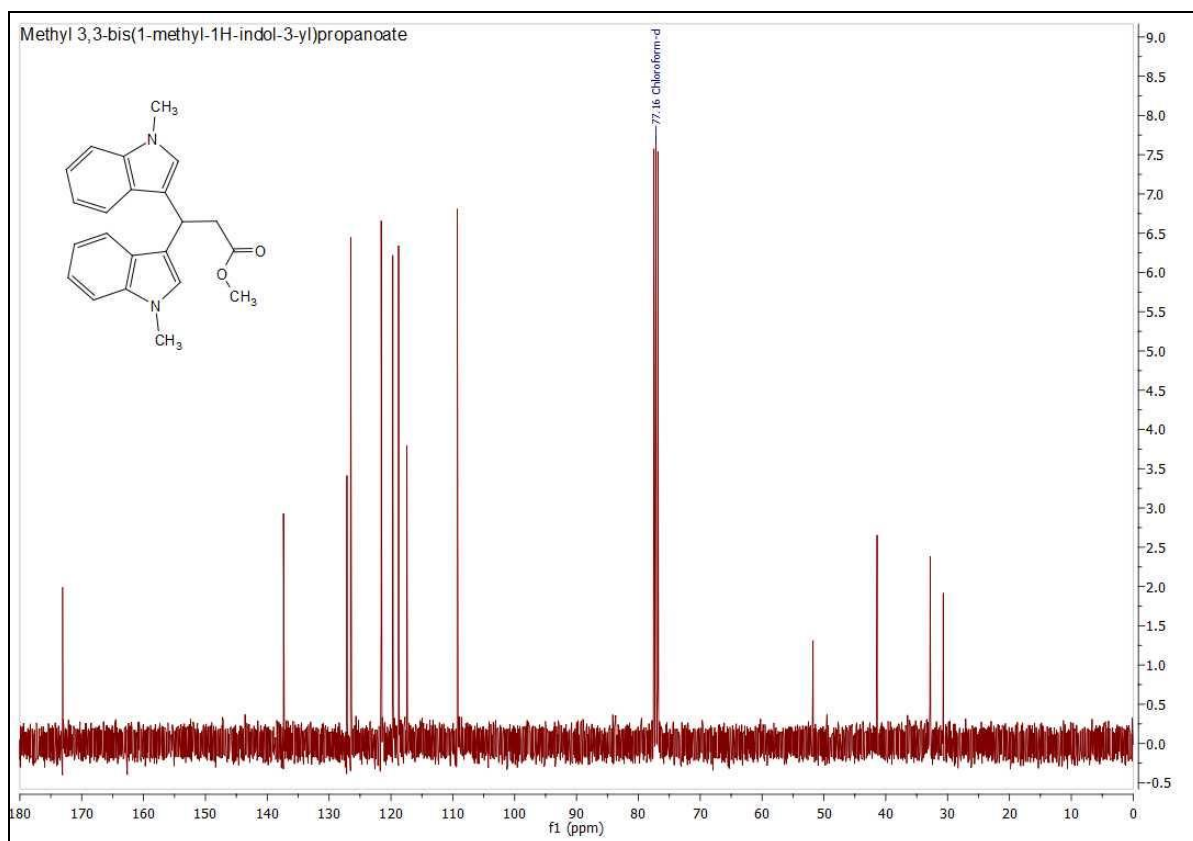
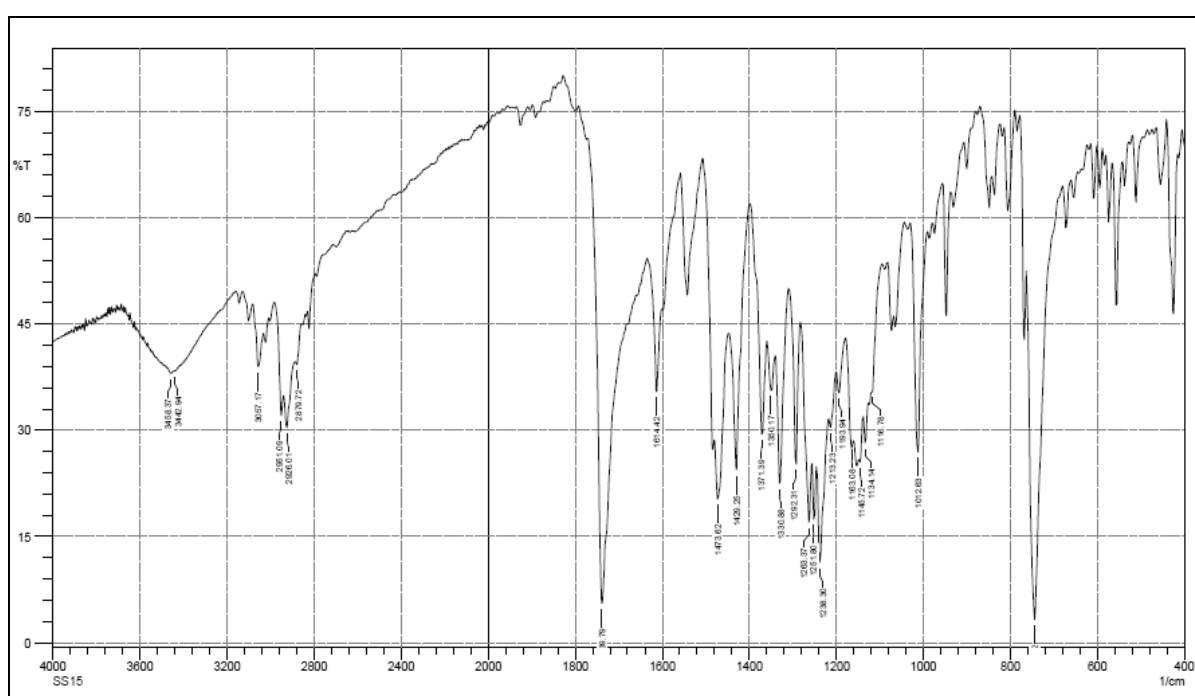
Figura 59 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 4g(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 60 – Espectro de IV do composto 4g



7.83,3-di(1-metil-1H-indol-3-il)butanoato de etila (4h)

Figura 61 – Cromatograma de massas do composto 4h

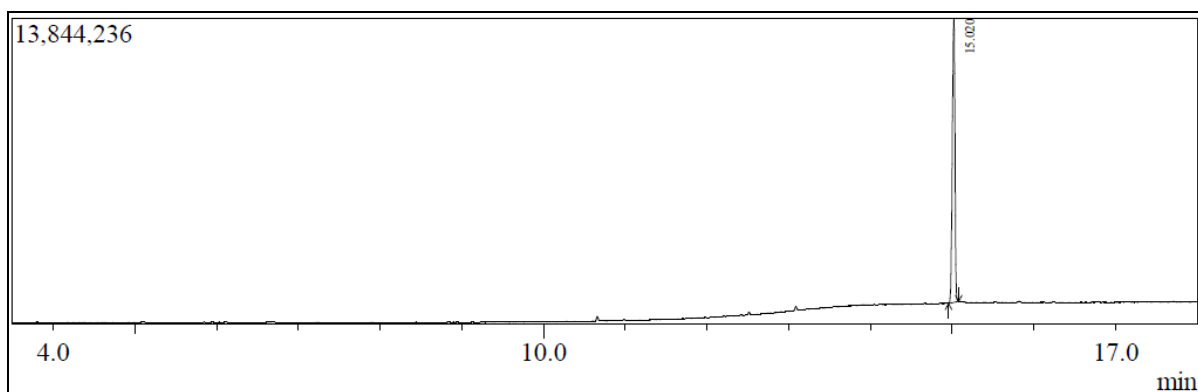
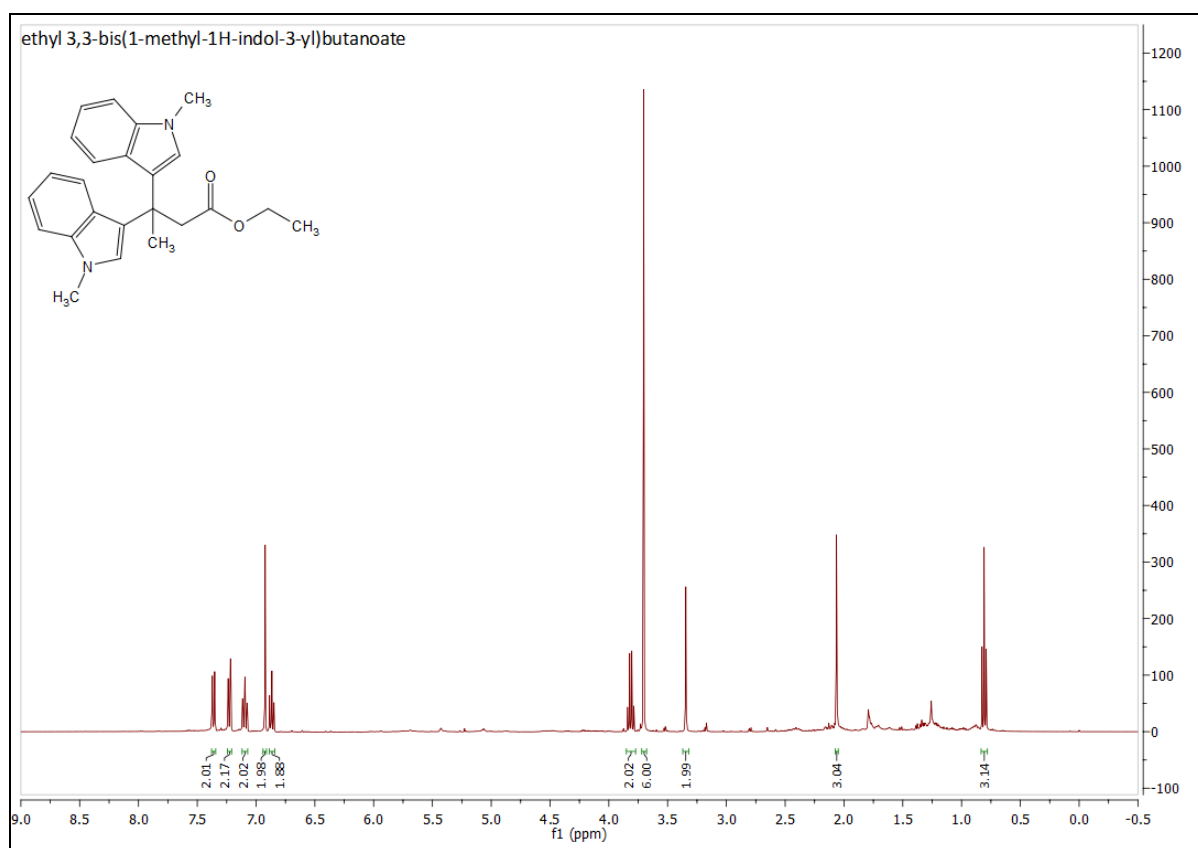
Figura 62 – Espectro de RMN ¹H do composto 4h(CDCl₃; 400 MHz)

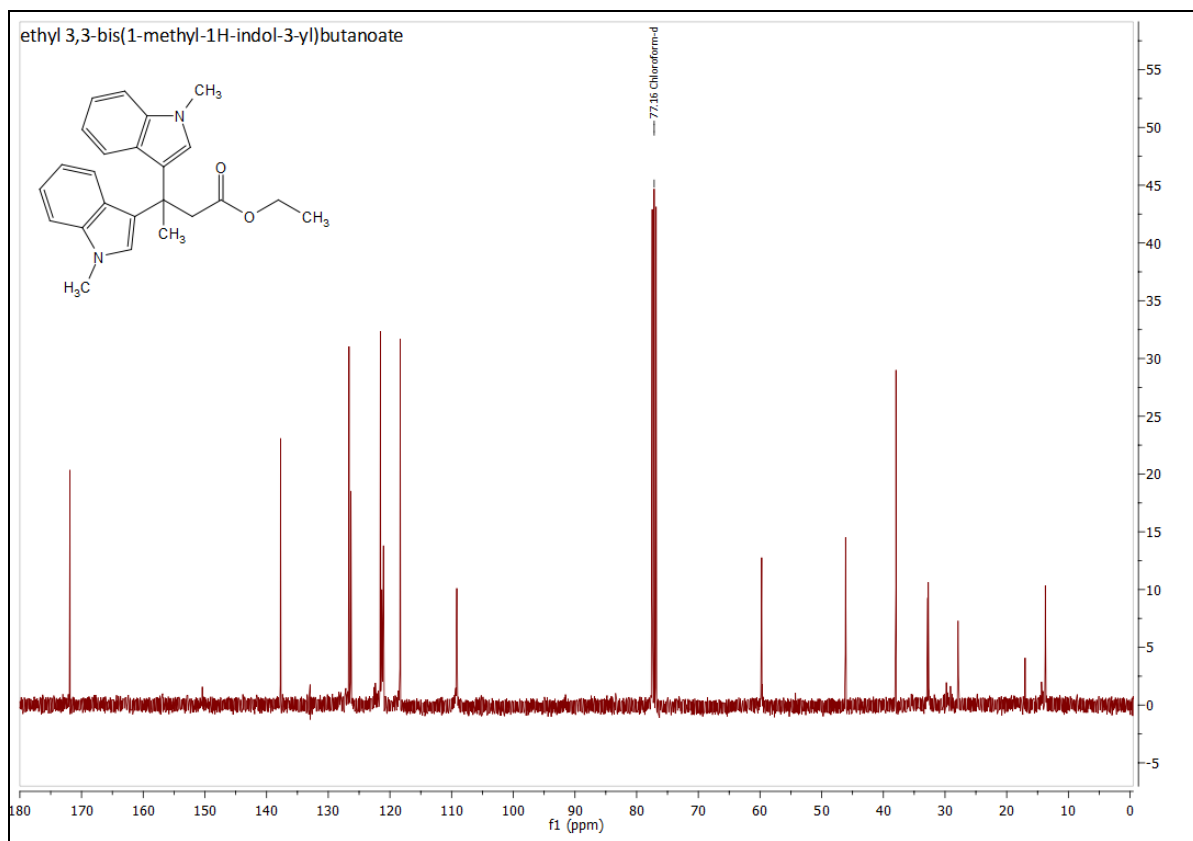
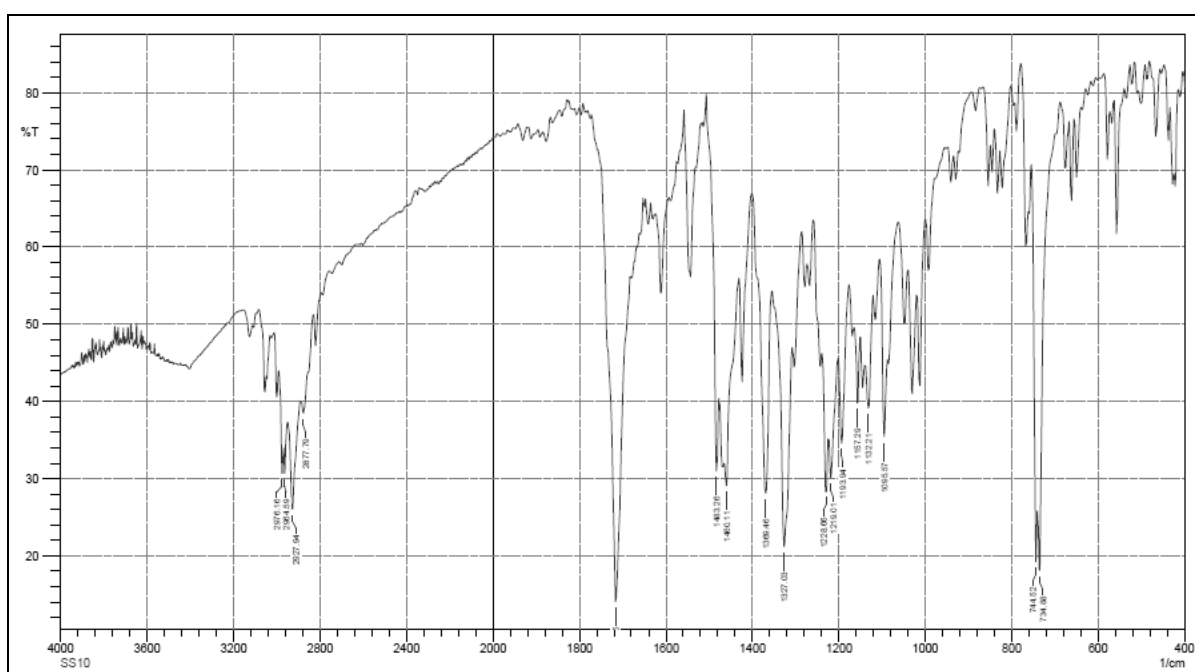
Figura 63 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 4h(CDCl₃; 100 MHz)

Figura 64 – Espectro de IV do composto 4h



8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Arch Microbiol**, v. 196, p. 453–472, 2014.

ABRAHAM, R. et al. A novel series of N-acyl substituted indole-linked benzimidazoles and naphthoimidazoles as potential anti inflammatory, anti biofilm and anti microbial agents. **Microbial Pathogenesis**, n. 2018, p. 1–40, 2017.

AFONSO, I. F. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

ALMEIDA, D. et al. Artigo Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.

AN, L. T. et al. Ga(DS)₃-catalysed double hydroarylation of acetylenic esters with indoles for the synthesis of bisindolyl propanoates. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 26, p. 3996–3998, 2015.

ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies required for new drug development – Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 11, p. 1–9, 2016.

ANTUNES, A. L. S. et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by Staphylococcus species isolated from central venous catheters. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 51–55, 2011.

AZAMBUJA, F. DE; CORREIA, C. R. D. O desafio da ativação das ligações C-H em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1779–1790, 2011.

BANDINI, M.; EICHHOLZER, A. Catalytic functionalization of Indoles in a new

dimension. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 51, p. 9608–9644, 2009.

BECK, E. M.; HATLEY, R.; GAUNT, M. J. Synthesis of Rhazinicine by a Metal-Catalyzed C-H Bond Functionalization Strategy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 16, p. 3004–3007, 2008.

BHASKAR, G.; SAIKUMAR, C.; PERUMAL, P. T. Indium (III) bromide-catalyzed hydroarylation of alkynes with indoles. **Tetrahedrin Letters**, v. 51, p. 3141–3145, 2010.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRANNON, J. R.; HADJIFRANGISKOU, M. The arsenal of pathogens and antivirulence therapeutic strategies for disarming them. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1795–1806, 2016.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V. C. **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: [s.n.].

BRODBELT, A. et al. Glioblastoma in England: 2007 – 2011. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 4, p. 533–542, 2015.

BURMOLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections - amatterof opportunity - monospeciesbiofilms in multispecies infections. **IMMUNOLOGY & MEDICAL MICROBIOLOGY**, v. 59, p. 324–336, 2010.

BUSCEMI, G. et al. C–H bond functionalization of aromatic heterocycles with chelating dicarbene palladium(II) and platinum(II) complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 24, p. 285–290, 2010.

BÜTTNER, H. et al. Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. February, p. 1–15, 2015.

CACCHI, S.; FABRIZI, G. Synthesis and functionalization of indoles through

palladium-catalyzed reactions. **Chemical Reviews**, v. 111, p. PR215-PR283, 2011.

CADIERNO, V.; FRANCO, J.; GIMENO, J. Ruthenium/TFA-catalyzed regioselective C-3-alkylation of indoles with terminal alkynes in water: Efficient and unprecedented access to 3-(1-methylalkyl)-1H-indoles. **Chemical Communications**, v. 46, n. 23, p. 4175–4177, 2010.

CASCIOFERRO, S. et al. 2,6-Disubstituted imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives as potent staphylococcal biofilm inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 200–210, 2019.

CHEN, F.-E.; HUANG, J. Reserpine: A Challenge for Total Synthesis of Natural Products. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 12, p. 4671–4706, 2005.

CIULLA, M. G.; KUMAR, K. The natural and synthetic indole weaponry against bacteria. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 34, p. 3223–3233, 2018.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 9, p. 541–548, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Microbes, immunity and disease**, v. 284, n. May, p. 1318–1323, 1999.

COUGHLAN, L. M. et al. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio) control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1641, p. 1–21, 2016.

DING, Z.; YOSHIKAI, N. Mild and efficient C2-alkenylation of indoles with alkynes catalyzed by a cobalt complex. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 19, p. 4698–4701, 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure,

function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics 2012**, v. 22, p. 2–16, 2012.

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion : Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193–236, 2002.

ESCAICH, S. Novel agents to inhibit microbial virulence and pathogenicity. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, v. 20, n. 10, p. 1401–1418, 2010.

EVANS, W. E. et al. Lymphoid Gene Expression as a Predictor of Risk of Secondary Brain Tumors. **GENES, CHROMOSOMES & CANCER**, v. 116, n. May 2004, p. 107–116, 2005.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer Cancer**, v. 136, p. E359–E386, 2015.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.

FERRER, C.; ECHAVARREN, A. M. Gold-catalyzed intramolecular reaction of indoles with alkynes: Facile formation of eight-membered rings and an unexpected allenylation. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 7, p. 1105–1109, 2006.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171–177, 2006.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. **In Vitro Ceil. Dev. Biol. Animal**, v. 42, n. 169, p. 672, 2006.

FUJIWARA, Y. et al. Efficient Activation of Aromatic C-H Bonds for Addition to C-C Multiple Bonds. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1992–1995, 2000.

GIAOURIS, E. et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 298–309, 2014.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 41–48, 1999.

GODOI, M. N. et al. Revisiting the Intermolecular Fujiwara Hydroarylation of Alkynes. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2017, n. 13, p. 1794–1803, 2017.

GOLOVLEV, E. L. The Mechanism of Formation of Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Type of Structured Population. **Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 249–254, 2002.

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.

GUNTUKU, L.; YERRA, V. G. Mitochondrial Dysfunction in Gliomas: Pharmacotherapeutic Potential of Natural Compounds. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 6, p. 567–583, 2016.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. February, p. 95–108, 2004.

HEFTI, F. F. Requirements for a lead compound to become a clinical candidate. **BMC Neuroscience**, v. 9, n. SUPPL. 3, p. 1–7, 2008.

HENN, J. G. **Desenvolvimento de um extrato hidroetanólico das folhas de Plantago australis (Kunth) Rahn padronizado em verbascosídeo e**

determinação de sua segurança toxicológica. [s.l.] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2016.

HOTA, P. K.; JOSE, A.; MANDAL, S. K. Stereo- and Regioselective Addition of Arene to Alkyne Using Abnormal NHC Based Palladium Catalysts: Elucidating the Role of Trifluoroacetic Acid in Fujiwara Process. **Organometallics**, v. 36, n. 22, p. 4422–4431, 2017.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: [s.n.].

JAIN, A. et al. Biofilms — A Microbial Life Perspective: a critical review. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 24, n. 5, p. 393–443, 2007.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **Elsevier Microbiology Letters**, v. 236, p. 163–173, 2004.

JIA, C. et al. Novel Pd(II)- and Pt(II)-catalyzed regio- and stereoselective trans-hydroarylation of alkynes by simple arenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 30, p. 7252–7263, 2000.

JIA, C.; KITAMURA, T.; FUJIWARA, Y. Pd (II) or Pt (II) -Catalyzed Hydroarylation of Alkynes by Arenes. v. 1052, n. li, p. 1052–1061, 2001a.

JIA, C.; KITAMURA, T.; FUJIWARA, Y. Catalytic Functionalization of Arenes and Alkanes via C–H Bond Activation. **Accounts of Chemical Research.**, v. 34, n. 8, p. 633–639, 2001b.

KANEKIYO, N. et al. Total Syntheses of B-Carboline Alkaloids, (R)-(-)-Pyridindolol K1, (R)-(-)-Pyridindolol K2, and (R)-(-)-Pyridindolol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 26, p. 8793–8798, 2001.

KERR, K. G.; SNELLING, A. M. *Pseudomonas aeruginosa* : a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 338–344, 2009.

KIST, R. **Triagem virtual de potenciais inibidores para o complexo**

enzimático mTOR (mechanistic target of rapamycin) empregando modelos farmacofóricos. [s.l.] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA, 2018.

KITAMURA, T. Transition-metal-catalyzed hydroarylation reactions of alkynes through direct functionalization of C-H bonds: A convenient tool for organic synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 8, p. 1111–1125, 2009.

KOCHANOWSKA-KARAMYAN, A. J.; HAMANN, M. T. Marine Indole Alkaloids: Potential New Drug Leads for the Control of Depression and Anxiety. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 8, p. 4489–4497, 2010.

KUTUBI, M. S.; KITAMURA, T. Regioselective synthesis of 3,3-bis(indolyl)propanoic acid derivatives by iron(III)-catalyzed hydroarylation of propynoic acid derivatives with indoles. **Tetrahedron**, v. 67, n. 42, p. 8140–8145, 2011.

LAKHDAR, S. et al. Nucleophilic reactivities of indoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 24, p. 9088–9095, 2006.

LANE, B. S.; BROWN, M. A.; SAMES, D. Direct palladium-catalyzed C-2 and C-3 arylation of indoles: A mechanistic rationale for regioselectivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 1, p. 241, 2007.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 8, p. 509–524, 2013.

LEE, J. H. et al. Halogenated indoles eradicate bacterial persister cells and biofilms. **AMB Express**, v. 6, n. 123, p. 1–12, 2016.

LEWIS, J. C.; BERGMAN, R. G.; ELLMAN, J. A. Direct Functionalization of Nitrogen Heterocycles via Rh-Catalyzed C–H Bond. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 8, p. 1013–1025, 2008.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, 2012.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.

LOPES, S. M. M. et al. Hetero-Diels-Alder reactions of novel 3-triazolyl-nitrosoalkenes as an approach to functionalized 1, 2, 3-triazoles with antibacterial profile. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1010–1020, 2018.

LU, W. et al. Pd-Catalyzed Selective Addition of Heteroaromatic C-H Bonds to C-C Triple Bonds Under Mild Conditions. **Organic Letters**, v. 2, n. 19, p. 2927–2930, 2000.

LYONS, T. W.; SANFORD, M. S. Palladium-catalyzed ligand-directed C-H functionalization reactions. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 1147–1169, 2010.

MACHADO, A. H. L. Reflexões sobre o perfil de um profissional da química que deseja atuar no desenvolvimento de um Ingrediente Farmaceuticamente Ativo. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 6, p. 484–495, 2011.

MAGANA, M. et al. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 1–49, 2018.

MARCHETTI, D. P. et al. Oxidative Imbalance, Nitritative Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of N-acetyl-l-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 8, p. 1505–1516, 2018.

MARTINEZ, R. et al. C-C bond formation via C-H bond activation using an in situ-generated ruthenium catalyst. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 22, p. 7887–7895, 2009.

MENDOZA, P. DE; ECHAVARREN, A. M. Synthesis of arenes and heteroarenes by hydroarylation reactions catalyzed by electrophilic metal complexes. **Pure Appl. Chem.**, v. 82, n. 4, p. 801–820, 2010.

MESSAOUDI, S.; BRION, J. D.; ALAMI, M. Transition-metal-catalyzed direct C-H alkenylation, alkynylation, benzylation, and alkylation of (Hetero)arenes.

European Journal of Organic Chemistry, n. 34, p. 6495–6516, 2010.

MONTEIRO, E. C. A. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, p. 33–37, 2008.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 39, p. 1–29, 2017.

NAKAO, Y. et al. Hydroheteroarylation of alkynes under mild nickel catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 25, p. 8146–8147, 2006.

NAKAO, Y. Hydroarylation of alkynes catalyzed by nickel. **Chemical Record**, v. 11, n. 5, p. 242–251, 2011.

NEVADO, C.; ECHAVARREN, A. M. Transition metal-catalyzed hydroarylation of alkynes. **Synthesis**, v. 2, p. 167–182, 2005.

NIH. **Cancer Statistics**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

OECD. **Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)**. OECD Serie ed. Paris: OECD Publishing, 2018.

OHKA, F.; NATSUME, A.; WAKABAYASHI, T. Current Trends in Targeted Therapies for GlioblastomaMultiforme. **Neurology Research International**, v. 2012, p. 13, 2012.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the accidental pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 555–567, 2009.

OTTO, M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175–188, 2013.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, p. 577–588, 2007.

PARAI, D. et al. Effect of reserpine on *Pseudomonas aeruginosa* quorum

sensing mediated virulence factors and biofilm formation. **Biofouling**, p. 1–15, 2018.

PLANZ, V.; LEHR, C.; WINDBERGS, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 89–104, 2016.

POULSEN, T. B.; JORGENSEN, K. A. Catalytic Asymmetric Friedel–Crafts Alkylation Reactions - Copper Showed the Way. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 8, p. 2903–2915, 2008.

RAO, B. P. C.; JUNIOR, O. O. N.; VARALA, R. Strategies Towards the Synthesis of Staurosporine Indolocarbazole Alkaloid and Its Analogues. In: **Scope of Selective Heterocycles from Organic and Pharmaceutical Perspective**. [s.l.: s.n.]. p. 83–114.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117–128, 2010.

RAYAN, A.; MARCUS, D.; GOLDBLUM, A. Predicting Oral Druglikeness by Iterative Stochastic Elimination. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 50, n. 3, p. 437–445, 2010.

REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

ROSSATTO, F. C. P. **Avaliação da formação de biofilme por Staphylococcus sp. e diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos**. [s.l.] UFRGS, 2015.

SANDER T, FREYSS J, VON KORFF M, R. C. **DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis**. **Journal of chemical information and modeling**. Disponível em: <<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

SARAVANAKUMAR, R.; RAMKUMAR, V.; SANKARARAMAN, S. Synthesis and structure of 1,4-diphenyl-3-methyl-1,2,3-triazol-5-ylidene palladium complexes and application in catalytic hydroarylation of alkynes. **Organometallics**, v. 30, n. 6, p.

1689–1694, 2011.

SAUNTHWAL, R. K. et al. Regioselective preferential C-H activation of sterically hindered 1,3-dienes over [4+2] cycloaddition. **Tetrahedron**, v. 73, n. 17, p. 2415–2431, 2017.

SCHIPPER, D. J.; HUTCHINSON, M.; FAGNOU, K. Rhodium(III)-catalyzed intermolecular hydroarylation of alkynes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 20, p. 6910–6911, 2010.

SHEN, H. C. Recent advances in syntheses of heterocycles and carbocycles via homogeneous gold catalysis . Part 1: Heteroatom addition and hydroarylation reactions of alkynes, allenes and alkenes. **Tetrahedron**, v. 64, n. 834, p. 3885–3903, 2008.

SORIANO, E.; MARCO-CONTELLAS, J. Mechanisms of the transition metal-mediated hydroarylation of alkynes and allenes. **Organometallics**, v. 25, n. 19, p. 4542–4553, 2006.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

SRIVASTAVA, A. et al. Microbial Pathogenesis Gut bio film forming bacteria in inflammatory bowel disease. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 5–14, 2017.

SZOMOLAY, B. et al. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1186–1191, 2005.

TANER, G. et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of lecithin/chitosan nanoparticles. **J Nanopart Res**, v. 16, n. 2220, p. 1–9, 2014.

TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

TRENTIN, D. D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113–238, 2013.

TUNGE, J. A.; FORESEE, L. N. Mechanistic studies of Fujiwara hydroarylation. C-H activation versus electrophilic aromatic substitution. **Organometallics**, v. 24, n. 26, p. 6440–6444, 2005.

VICENZI, D. et al. Platinum(II) complexes with novel diisocyanide ligands: Catalysts in alkyne hydroarylation. **Organometallics**, v. 32, n. 23, p. 7153–7162, 2013.

VICIU, M. S. et al. N-heterocyclic carbene palladium complexes bearing carboxylate ligands and their catalytic activity in the hydroarylation of alkynes. **Organometallics**, v. 23, n. 15, p. 3752–3755, 2004.

WESS, G. Challenges for medicinal chemistry. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 12, p. 529–532, 1996.

YADAV, J. S. et al. Gallium(III) halide-catalyzed coupling of indoles with phenylacetylene: Synthesis of bis(indolyl)phenylethanes. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 41, p. 7577–7579, 2004.

YAMAMOTO, Y. Synthesis of heterocycles via transition-metal-catalyzed hydroarylation of alkynes. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 5, p. 1575–1600, 2014.

YU, J.-Q.; SHI, Z. **Topics in Current Chemistry: C-H activation**. [s.l: s.n.].

ZENG, F.; ALPER, H. Pd-catalyzed direct coupling of indoles with carbon monoxide and alkynes: Selective synthesis of linear α,β -unsaturated ketones. **Organic Letters**, v. 15, n. 8, p. 2034–2037, 2013.

ZHANG, H.; LAROCK, R. C. Synthesis of β - and γ -Carbolines by the Palladium/Copper-Catalyzed Coupling and Cyclization of Terminal Acetylenes. **J. Org. Chem.**, v. 67, p. 7048–7056, 2002.

ZIMMER, K. R. et al. The Antibiofilm Effect of Blueberry Fruit Cultivars Against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **JOURNAL OF MEDICINAL FOOD**, v. 17, n. 3, p. 324–331, 2014.

9 ANEXOS

9.1 PROTOCOLO DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME – INIBIÇÃO – EXTRATO RESSUSPENDIDO EM DMSO

DIA 1: Preparação dos materiais (autoclavagem de ponteiros de 10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5 mL, solução salina 0,9%, eppendorf, meio TSB, água, falcon). Crescer bactérias em ágar TSA (em duplicata).

DIA 2:

Preparo do extrato

Considerando que a concentração final do extrato no poço ficou estabelecida em 1 mg/mL, preparar da seguinte maneira:

- 1) Pesar 5 mg do extrato em um eppendorf;
- 2) Adicionar 100 µL de DMSO;
- 3) Homogeneizar bem com vórtex/pipeta/agitando (se necessário, deixar no ultrassom);

Esta quantidade rende para dois aproximadamente, considerando que em 1 ensaio são feitos 2 inóculos e cada um destes em quadruplicata (mais controle de cor). O volume de cada poço é 4 µL (4x2x4 = 32 µL) deste extrato (o que corresponde a DMSO 2%), acrescido de 76 µL de água.

Preparo do inóculo

Preparar o inóculo numa OD de 0,145 a 0,155 em 620 nm:

- 1) Adicionar em um falcon estéril 10 mL de salina 0,9%
- 2) Adicionar a colônia bacteriana (pura);
- 3) Homogeneizar bem em vórtex/pipeta;
- 4) Pipetar em triplicata 200 µL do inóculo em uma microplaca estéril;
- 5) Ler em espectrofotômetro a 620 nm (fazer a média aritmética dos 3 inóculos)
- 6) Ajustar o inóculo:

- a. Se mais de 0,155, diluir com salina

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

$$[\text{média espectro}].10 = 0,150.V_2$$

V2 = volume a ser adicionado – 5 mL (ou 10 mL)

- b. Se menos de 0,145, adicionar mais bactéria

Ensaio de inibição de biofilme

- 1) Realizar teste em quadruplicata (uma coluna para cada), sendo que são preparados dois inóculos.

Controle de esterilidade	200 µL de TSB
Ccor = controle de cor	40 µL TSB + 80 µL extrato ressuspendido** + 80 µL salina
CC = controle de crescimento	40 µL TSB + 80 µL ATB + 80 µL inóculo
NT = não tratado	40 µL TSB + 80 µL solvente* + 80 µL inóculo
T = tratamento	40 µL TSB + 80 µL extrato ressuspendido** + 80 µL inóculo

ATB = rifampicina ou vancomicina para Gram-positivo (*S. epidermidis*) e gentamicina para Gram-negativo (*P. aeruginosa*), que estará preparado numa concentração (estoque) de 20 µg/mL. No poço ficará numa concentração de 8 µg/mL.

Extrato ressuspendido** = 4 µL do extrato em DMSO + 76 µL de água

Solvente* = 4 µL de DMSO + 76 µL de água

- 2) Ler em espectrofotômetro a 620 nm (corresponde ao tempo zero) e salvar esta informação;
- 3) Vedar e colocar em pote plástico;
- 4) Incubar a 37°C por 24h.

DIA 3:

- 1) No dia seguinte, ler em espectrofotômetro a 620 nm (corresponde ao tempo 24h) e salvar esta informação;
- 2) Descartar conteúdo da microplaca;
- 3) Realizar 3 lavagens com salina 0,9%, descartando líquido;
- 4) Fixar a 60°C por 1 hora;
- 5) Adicionar 200 µL por poço de cristal violeta 0,4% e deixar por 15 min;
 - Preparo do cristal violeta a 0,4%:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

$1.V_1 = 0,4.V_2$ (V_2 é o volume que se quer preparar para deixar em estoque).

V_1 = volume de cristal violeta a ser colocado, completa com água.

Recomenda-se filtrar.

- 6) Lavar em água corrente;
- 7) Adicionar 200 μ L de etanol absoluto por 30 min;
- 8) Ler em espectrofotômetro a 570 nm e salvar esta informação;
- 9) Analisar os resultados, sendo que deve ser descontado do controle de cor (média tratamento 24h – média controle de cor 24h). O T24-T0 representa se houve inibição do crescimento. Analisar considerando que o não tratado teve 100% de formação de biofilme. Verificar quanto % o tratamento inibe o biofilme (lembrar de descontar a cor para o biofilme também, sendo: leitura tratamento – leitura cor). Cuidar:
 - a. Controle de esterilidade, que não deve estar turvo
 - b. Controle de crescimento, que deve ter inibido o crescimento (não turvo) Não tratado, que deve ter havido o crescimento.

9.2 PROTOCOLO DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME – ERRADICAÇÃO – EXTRATO RESSUSPENDIDO EM DMSO

Dia 1: Preparação dos materiais (autoclavagem de ponteiros de 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, 5 mL, solução salina 0,9%, eppendorf, meio TSB, água, falcon). Crescer bactérias em ágar TSA (em duplicata).

Dia 2: Preparo do extrato: considerando que a concentração final do extrato no poço ficou estabelecida em 1 mg/mL, preparar da seguinte maneira:

- 1) Pesar 4 mg do extrato em um eppendorf;
- 2) Adicionar 100 μ L de DMSO;
- 3) Homogeneizar bem com vórtex/pipeta/agitando (se necessário, deixar no ultrassom);

Esta quantidade rende para dois ensaios aproximadamente, considerando que em 1 ensaio são feitos 2 inóculos e cada um destes em quadruplicata (mais

controle de cor, se necessário). O volume de cada poço é 5 μL ($5 \times 2 \times 4 = 40 \mu\text{L}$) deste extrato, acrescido de 95 μL de água.

Preparar suspensão bacteriana em salina estéril (OD: 0,150), conforme instruções contidas no protocolo de inibição

Inocular em placa de 96 poços 100 μL de inóculo bacteriano e 100 μL de TSB.

No controle de esterilidade: 200 μL de TSB. Manter a 37°C por 24 h.

Dia 3: Após 24h

- 1) Retirar o material dos poços e lavar cada poço com 200 μL de salina estéril (3X);
- 2) Tratamento: 5 μL de extrato ressuspendido em DMSO + 95 μL de água + 100 μL de TSB;
- 3) Controle Positivo: 100 μL de antimicrobiano + 100 μL de TSB;
Não tratado: 5 μL de DMSO + 95 μL de água + 100 μL de TSB;
Controle de esterilidade: 200 μL de TSB;
- 4) Manter a 37°C por 24 h.

Dia 4: Após 24h

- 1) Retirar o material dos poços e lavar cada poço com 200 μL de salina estéril (3X);
- 2) Fixação do biofilme: Manter a placa em estufa 60°C por 60 minutos;
- 3) Adicionar 200 μL de cristal violeta 0,4% (corar) e deixar por 15 minutos;
- 4) Lavar a placa cuidadosamente com a bacia e água corrente até que não saia mais corante;
- 5) Adicionar 200 μL de etanol (ressuspender);
- 6) Leitura em espectrofotômetro a 570nm.

9.3 RESULTADOS IN SILICO – DataWarrior

Molécula	3a	3b	4c	4d	3e	3f	4g	4h	3i	3j	3k	3l
Massa molecular	277,322	291,349	318,375	346,429	291,349	305,376	346,429	374,482	291,349	305,376	215,251	243,305
LogP	2,4899	2,8962	3,6315	3,648	2,6227	3,029	3,8971	3,9136	2,8878	3,2941	2,3391	2,9658
LogS	-3,857	-4,157	-4,191	-4,112	-3,52	-3,82	-3,517	-3,438	-4,225	-4,525	-3,02	-3,049
Aceptores H	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	3	3
Doadores H	1	1	2	2	0	0	0	0	1	1	1	1
Área superficial total	221,91	235,67	247,63	271,56	233,8	247,56	271,41	295,34	234,17	247,93	176,2	200,43
PSA relativo	0,16687	0,15713	0,20603	0,18788	0,12793	0,12082	0,13551	0,12453	0,15813	0,14936	0,21016	0,18475
Área superfície polar	42,09	42,09	57,88	57,88	31,23	31,23	36,16	36,16	42,09	42,09	42,09	42,09
Druglikeness	-2,7912	-5,4687	-4,9467	-9,4331	-1,6855	-4,3903	-3,8474	-8,4178	-2,5493	-5,168	-2,8841	-9,4465
Mutagênico	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
Tumorigênico	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none
Efeitos reprodutivos	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none	none	high
Irritante	none	none	none	high	none	none	none	high	none	none	none	none
Shape Index	0,47619	0,5	0,45833	0,42308	0,45455	0,47826	0,42308	0,39286	0,45455	0,47826	0,625	0,61111
Flexibilidade molecular	0,38489	0,3822	0,36221	0,40325	0,38662	0,38392	0,36009	0,402	0,38662	0,38392	0,35526	0,38584
Complexidade molecular	0,79105	0,79438	0,81339	0,84594	0,81578	0,81859	0,84972	0,87713	0,81672	0,81951	0,71863	0,76455
Fragmentos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Átomos (exceto H)	21	22	24	26	22	23	26	28	22	23	16	18
Átomos (exceto C/H)	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	3	3
Átomos de metal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Átomos eletronegativos	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	3	3
Estéreo centros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ligações rotacionáveis	4	5	5	6	4	5	5	6	4	5	3	4
Anéis	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	2	2
Pequenos anéis	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	2	2
Anéis aromáticos	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	2	2
Átomos aromáticos	15	15	18	18	15	15	18	18	15	15	9	9
Átomos sp3	2	3	4	6	3	4	6	8	3	4	3	5
Átomos simétricos	2	2	9	9	2	2	10	10	2	2	0	0
Amidas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aminas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrênicos aromáticos	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1