



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

**Estudo experimental e teórico das interações entre derivados de
bases de schiff e marcadores proteicos de neoplasias**

Thais Meira Menezes

Recife

2017

Thais Meira Menezes

**Estudo experimental e teórico das interações entre derivados de
bases de schiff e marcadores proteicos de neoplasias**

Dissertação apresentada como requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Química, do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco

Orientador: Prof. Jorge Luiz Neves

Coorientador: Prof. Maria do Carmo Alves de Lima

Recife

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB 4-1758

M514e Menezes, Thaís Meira.
Estudo experimental e teórico das interações entre derivados de bases Schiff e marcadores proteicos de neoplasias / Thaís Meira Menezes . – 2017.
89 f.: fig., tab.

Orientador: Jorge Luiz Neves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química fundamental, Recife, 2017.
Inclui referências e apêndice.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Schiff, bases de . 3. Interação proteína-ligante. I. Neves, Jorge Luiz. (Orientador). II. Título.

543.66 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2017-30

Thais Meira Menezes

Estudo experimental e teórico das interações entre derivados de bases de schiff e marcadores proteicos de neoplasias

Dissertação apresentada como requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Química, do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco

Trabalho aprovado. Recife, 15 de Março de 2017:

Prof. Jorge Luiz Neves (Orientador)

Prof. Gustavo Miranda Seabra

Prof. Ricardo Olimpio Moura

Agradecimentos

À minha família que sempre me apoiou nos estudos, e que cuida do meu filho enquanto estou na universidade.

Às Professoras Maria do Carmo Alves, Sinara Mônica e ao grupo do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica por conceder o laboratório e os reagentes para realização da parte sintética desta dissertação.

Ao César Amorim e Willams Leal pelo auxílio na síntese dos compostos na coleta de dados no RMN.

Ao meu orientador Jorge Neves pela orientação, paciência, amizade e incentivo desde os meus tempos de graduação.

Aos meus grandes amigos bagaços Roberto Carlos, Wilka Vale e Iedja Firmino, pelos bons momentos e pelo companheirismo ao longo dessa jornada acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Resumo

Para o desenho de drogas com maior compatibilidade com o sítio de ligação é extremamente importante ter conhecimento do alvo molecular a que se destina o fármaco e da sua maneira de interação, ou seja, é preciso estudar a região onde será feita a conexão com o ligante e o mecanismo da reação. A ampla gama de aplicações para compostos orgânicos derivados de base de Schiff na indústria química estende-se desde catalisadores, estabilizadores, intermediário de síntese e corantes. No contexto biológico, estes compostos tem sido empregado devido as suas atividade contra bactérias, fungos, virus, inflamação e neoplasias. Esta classe de moléculas apresentam relevante flexibilidade sintética e apresentam alta seletividade e sensibilidade em relação ao átomo de uma metaloenzima. Diante da relevância destes compostos no contexto biológico foram sintetizados e caracterizados nessa dissertação alguns derivados de base de Schiff. Visando estudar a biodisponibilidade do ponto de vista farmacocinético, estes compostos foram sujeitos a estudos de interação com a proteína BSA, através do mapeamento e monitoramento das mudanças das linhas de RMN frente a titulação com a proteína e os constantes de ligação K_d foram determinadas. Os compostos obtidos foram sujeito a estudos de interação teorico-experimental com a proteína tirosinase que esta envolvida com a melanogênese e um marcador neoplásico altamente relevante. A partir do estudo realizado, infere-se que os compostos devidamente sintetizados e caracterizados apresentaram moderada interação com a BSA, forte interação com íons cobre, indicando uma possível coordenação dos compostos com o metal, além da forte interação da NW-F e AMTAC 02 com a enzima tirosinase. Finalmente estudos de inibição de atividade enzimatica foram conduzidos com o composto acridínico AMTAC01 e os resultados mostraram que este composto inibe a proteína com valores de dose resposta IC_{50} de $8,8.10^{-8}$, mesma ordem de grandeza que o inibidor comercial ácido kójico, o que qualifica o composto AMTAC01 como um potente inibidor da enzima tirosinase.

Palavras chave: Interação. Schiff. Tirosinase. BSA. RMN.

Abstract

For the design of drugs with greater compatibility with the binding site, it is extremely important to the molecular target for which the drug is intended and its mode of interaction, that is, it is necessary to study the region where the connection with the ligand and the mechanism of the dog. The wide range of applications for organic compounds derived from Schiff base in the chemistry ranges from catalysts, stabilizers, synthesis intermediates and colorants. At the biological context, these compounds have been employed due to their activity against bacteria, fungi, viruses, inflammation and neoplasms. This class of molecules presents significant flexibility synthetic and have high selectivity and sensitivity to the atom of a metalloenzyme. In view of the relevance of these compounds in the biological context were synthesized and characterized in this dissertation some Schiff base derivatives. Aiming to study the bioavailability of the from a pharmacokinetic perspective, these compounds were subjected to interaction studies with the BSA protein, through the mapping and monitoring of the changes of the NMR lines against titration with the protein and the K_d binding constants were determined. The obtained compounds were subjected to studies of the theoretical-experimental interaction with the protein tyrosinase that is involved with the melanogenesis and a highly relevant neoplastic marker. Based on the study, it is inferred that The duly synthesized and characterized compounds presented moderate interaction with BSA, strong interaction with copper ions, indicating a possible coordination of the compounds with the As well as the strong interaction of NW-F and AMTAC 02 with the enzyme tyrosinase. Finally, studies of Inhibition of enzyme activity were conducted with the acridine compound AMTAC01 and the results showed that this compound inhibits the protein with IC 50 dose response values of $8.8 \cdot 10^{-8}$, same order of magnitude as the kojic acid commercial inhibitor, which qualifies the compound AMTAC 01 as a potent inhibitor of the enzyme tyrosinase.

keywords: Interaction. Schiff. Tyrosinase. BSA. NMR.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Etapas para o planejamento racional de fármacos.	12
Figura 2 – Interação cátion- π entre o ácido glutâmico e a tirosina.	14
Figura 3 – Configuração da proflavina entre os pares de bases Guanina: Citosina atuando como agente intercalador de DNA à esquerda e estrutura química da proflavina à direita (1).	15
Figura 4 – Gráfico de Michaelis-Menten (a) e sua linearização com o Gráfico de Lineweaver-Burk (b).	18
Figura 5 – diferença estrutural entre a albumina sérica humana (à esquerda) e albumina sérica bovina (à direita). Os locais indicados como Sudlow se referem ao sítio de ligação hidrofóbico.	20
Figura 6 – Representação do sítio ativo da enzima tirosinase (2).	21
Figura 7 – Reações envolvidas na melanogênese(2).	21
Figura 8 – Mecanismo de reação do substrato com a enzima tirosinase (2).	22
Figura 9 – Estrutura química de conhecidos inibidores da tirosinase. (a) Ácido Kójico (3) ; (b) Kaempferol (flavonoide) (4); (c) N-Benzilbenzamida (5); (d) Chalcona (6).	23
Figura 10 – Estrutura molecular geral de (a) uma base de Schiff, (b) uma tiosemicarbazona e (c) uma semicarbazona.	24
Figura 11 – Diferentes formas de coordenação entre semicarbazonas/ tiosemicarbazonas e átomos metálicos (adaptado da referência (7)).	25
Figura 12 – Tautomeria Tiol-Tiona em semicarbazonas/ tiosemicarbazonas	25
Figura 13 – Estrutura da molécula (A)acridina, (B)m-AMSA (N-[4- (acridin-9- ilamino- metóxi-fenil] -metanosulfonamida), (C) acridina- tiazolidin e (D) acridina- tiosemicarbazona.	27
Figura 14 – Esquema sintético das AMTACs.	30
Figura 15 – Esquema sintético das tiosemicarbazonas.	31
Figura 16 – Representação da ciclização das AMTACs.	35
Figura 17 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da (a) AMTAC01 e (b) AMTAC 02, (c) espectros de ^{13}C de ambos compostos	36
Figura 18 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da AMTAC01 e AMTAC 02	37
Figura 19 – Espectros (A) COSY e (B) HSQC da AMTAC01 (400 MHz, DMSO- d_6) mostrando as correlações e os assinalamentos.	38

Figura 20 – Numeração usada para a molécula de AMTAC01(A) e o diagrama mostrando as correlações de longa distancia (B) e as atribuições podem ser reconhecidas no espectro HMBC (C) da AMTAC01.	39
Figura 21 – Composto tiosemicarbazônicos.	39
Figura 22 – Espectro de ^1H dos compostos tiosemicarbazônicos.	41
Figura 23 – Espectro bidimensional COSY da molecula NW-F	41
Figura 24 – Espectro bidimensional HSQC da molecula NW-F	42
Figura 25 – Espectro bidimensional HMBC da molecula NW-F	42
Figura 26 – Efeito da titulação da proteína BSA no espectro de ^1H do composto acridínico AMTAC01, evidenciando os grupos de protons interagindo com a proteína.	44
Figura 27 – Regressão não linear para obtenção das constantes de ligação do K_d do composto AMTAC01(A), AMTAC02(B).	44
Figura 28 – Regressão não linear para obtenção das constantes de ligação do K_d dos compostos NW-F(A), NW-NO ₂ (B) e NW-Cl(C) com a proteína BSA.	45
Figura 29 – Mapeamento estrutural das interações de grupos de protons e a proteína tirosinase para as acridinas AMTAC01(A) e AMTAC02(B).	48
Figura 30 – Mapeamento estrutural das interações de grupos de protons ds tiosemicarbazonas NW-F (A), NW-NO ₂ (B), NW-Cl (C) e a proteína tirosinase	50
Figura 31 – Resultados de ancoramento molecular dos compostos acridínicos AMTAC01 (A) e AMTAC02 (B) à proteína tirosinase.	51
Figura 32 – Resultados de ancoramento molecular das tiosemicarbazonas NW-F(A), NW-NO ₂ (B) e NW-Cl(C) à proteína tirosinase.	53
Figura 33 – Estudo cinético da atividade enzimática da tirosinase frente ao substrato natural L-dopa, mostrando a conversão deste substrato ao produto dopaquinona para diferentes concentrações de substrato.	54
Figura 34 – Curva de Michaelis-Menten e gráfico de Lineweaver Burk. Através destes gráficos foi possível determinar as constantes $K_M = 0,37 \text{ M}$ e $V_{max} = 0,012 \text{ s}^{-1}$ da enzima tirosinase.	56
Figura 35 – Efeito inibitorio da atividade enzimática usando a acridina AMTAC01.	56
Figura 36 – Efeito inibitorio da atividade enzimática usando o inibidor natural ácido kójico.	57

Lista de tabelas

Tabela 1 – Dados cinéticos de reações enzimáticas.	18
Tabela 2 – Assinalamento dos compostos acridínicos.	37
Tabela 3 – Assinalamento dos compostos tiosemicarbazônicos.	40
Tabela 4 – Tabela com as constantes K_d para interação com a proteína BSA	45
Tabela 5 – Tabela com as constantes K_d para interação com Cu^{+2}	46
Tabela 6 – Tabela com as constantes K_d para interação com a proteína tirosinase.	51

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Estratégias de planejamento racional de fármacos	12
1.1.1	<i>Ligações de hidrogênio</i>	13
1.1.2	<i>Ligação iônica</i>	13
1.1.3	<i>Ligações cátion-π</i>	13
1.1.4	<i>Interação π-π stacking</i>	14
1.1.5	<i>Complexação com metais</i>	15
1.2	Termodinâmica de interações	15
1.3	Cinética enzimática	16
1.4	Proteínas alvo para o estudo de drogas antineoplásicas	19
1.4.1	<i>Albumina Sérica</i>	19
1.4.2	<i>Tirosinase</i>	20
1.4.3	<i>Inibidores da atividade catalítica da tirosinase</i>	22
1.5	Uso de bases de schiff e derivados como drogas terapêuticas	24
1.5.1	<i>Tiosemicarbazonas</i>	25
1.5.2	<i>Acridinas</i>	26
1.6	Técnicas de estudos de interação Ligante-Alvo Biológico	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Materiais e reagentes	30
3.2	Síntese dos compostos acridínicos	30
3.3	Síntese dos compostos tiosemicarbazônicos	30
3.4	Caracterizações estrutural dos compostos	31
3.5	Estudos de interação com proteínas	31
3.6	Estudo teórico de interação	32
3.7	Estudo de inibição da atividade enzimática	32
4	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS	34
4.1	Caracterizações dos compostos acridínicos	35

4.2	Caracterização dos Compostos tiosemicarbazônicos.	39
5	ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS	43
5.1	Estudos de interação com a proteína BSA	43
5.2	Investigação de interação com cobre	46
5.3	Estudos de interação a tirosinase	47
5.4	Estudo teórico das interações	51
6	ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	54
6.1	Obtendo os parâmetros cinéticos da tirosinase	55
6.2	Avaliação da atividade inibitória	56
7	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE	65

1 INTRODUÇÃO

A farmacocinética e a eficácia de drogas preparadas para o combate de doenças são bastante dependentes da interação destas com alvos biológicos específicos presentes no organismo humano. Por este motivo, se faz cada vez mais necessário o planejamento racional de fármacos baseado na estrutura (Figura 1), onde são feitas modificações estruturais em compostos de partida já estudados previamente, visando a melhoria da biodisponibilidade, redução de toxicidade e ampliação da especificidade do fármaco (8).

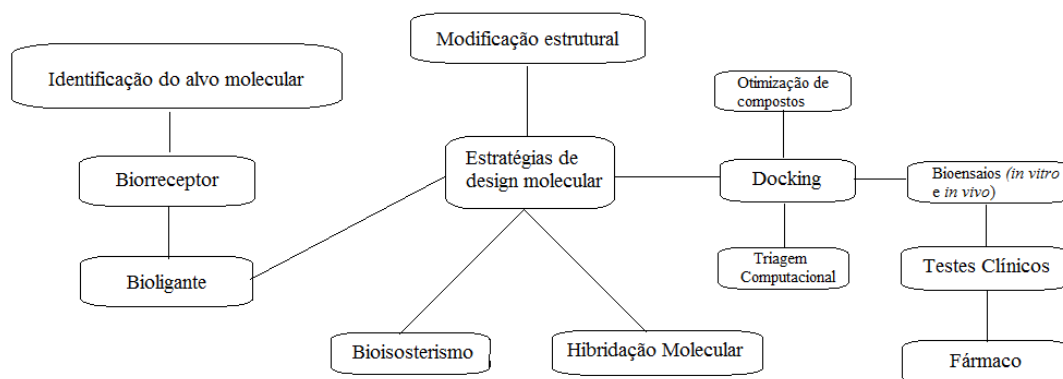


Figura 1 – Etapas para o planejamento racional de fármacos.

1.1 Estratégias de planejamento racional de fármacos

No planejamento racional de fármacos, é de suma importância ter conhecimento do alvo molecular a que se destina o fármaco e da sua maneira de interação, ou seja, é preciso estudar a região onde será feita a conexão com o ligante e o mecanismo da reação, pois desta forma tem-se o design de um composto com maior compatibilidade com relação ao seu sítio de ligação (9). Em geral, estes receptores/alvos moleculares são compostos de estruturas proteicas ou enzimas. Tais enzimas, compostas por aminoácidos, possuem átomos doadores de elétrons como enxofre e nitrogênio, possibilitam a proximidade e conseqüentemente proporcionam a ocorrência de ligações covalentes ou interações intermoleculares não covalentes com fármacos desenhados especificamente para garantir máxima eficiência.

Estes alvo biológicos proteicos fazem a ligação com a droga numa área específica da molécula responsável pela ativação ou bloqueio de alguma resposta biológica, chamada de sítio ativo.

Portanto, a formação do complexo receptor-ligante será realizada de acordo com alterações na conformação de cada molécula participante para o encaixe mais estável das mesmas e na forma mais bioativa da proteína. A etapa de análise conformacional é bastante enfatizada no estudo de modelagem molecular devido às inúmeras variações possíveis, tanto do substrato quanto da enzima trabalhada (10, 11). As possíveis interações não covalentes existentes entre o alvo biológico e o ligante são: ligações de hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas, interação cátion - π , interações π stacking e complexação por metais (12).

1.1.1 Ligações de hidrogênio

As ligações de hidrogênio possuem relevância biológica por possuírem interações de maior força dentre as interações não covalentes, ao contrário das demais interações intermoleculares, possuem o papel de direcionar as ligações de acordo com sua angulação, portanto, a nível intramolecular, são responsáveis pela manutenção da estabilidade de conformações bioativas de macromolécula. Além disso, a interação das ligações de hidrogênio presentes em moléculas de água auxiliam as interações soluto-soluto, pois dessa forma o ligante apolar é levado com maior facilidade ao sítio ativo apolar da proteína, fenômeno que gera o ambiente para a ocorrência de interações hidrofóbicas (12). As interações de hidrogênio ocorrem entre átomos aceitadores de elétrons e o átomo de hidrogênio quando ligados a átomos de grande eletronegatividade, e correspondem ao principal tipo de interação existente entre ligante e receptor.

1.1.2 Ligação iônica

As interações iônicas se tratam de forças eletrostáticas resultantes da interação de duas espécies polarizadas, as quais suas cargas se atraem ou se repelem. Sua força de ligação depende primordialmente da distância intermolecular das cargas e da constante dielétrica do meio. As forças eletrostáticas são interessantes na química de macromoléculas pela presença de grupos ionizáveis nos aminoácidos componentes de diversas proteínas, sendo possível manter interações eletrostáticas com fármacos constituídos de cargas positivas ou negativas, facilitando o reconhecimento molecular ligante-receptor (13, 14).

1.1.3 Ligações cátion- π

As interações cátion- π são determinadas por força eletrostática, envolvendo a ligação entre espécies catiônicas com compostos aromáticos. Geralmente resíduos de aminoácidos positivamente carregados costumam interagir com aminoácidos dotados de anel aromático, como por exemplo, a interação entre o ácido glutâmico (Glu) e a Tirosina (Tyr), ilustrado na Figura 2. Como descrito na lite-

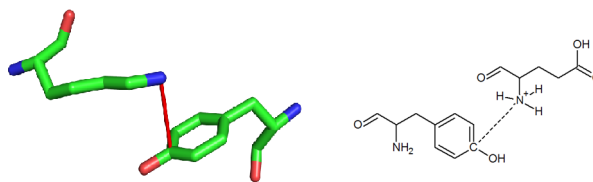


Figura 2 – Interação cátion- π entre o ácido glutâmico e a tirosina.

ratura, estas interações são relevantes primordialmente para resíduos de Arginina (Arg) e Triptofano (Trp) no estudo estrutural de enzimas do tipo catecol oxidases. Dentre as interações não covalentes constituintes deste tipo de enzima, 25% são oriundas de ligações entre resíduos de Trp. Apesar de ser bastante recorrente em sistemas biológicos, encontra-se uma grande dificuldade em reforçar a contribuição singular das ligações cátion- π nesses casos por conta da complexidade da interação, que decerto envolvem forças de Van der Waals e efeitos de polarização, isto é, devido ao número de interações que ocorrem ao mesmo tempo (15, 16).

1.1.4 Interação π - π stacking

Outro tipo de interação de alta relevância biológica é a π - π stacking, ligação não covalente entre duas moléculas aromáticas as quais suas ligações π se encontram paralelas ao plano (Figura 3). São interessantes por estabilizarem conformações estruturais com a agregação de cadeias laterais de proteínas e de ácidos nucleicos, bem como na atuação no reconhecimento de receptores, tendo em vista a recorrente presença de anéis aromáticos na estrutura química de fármacos em geral (16). Em particular, as interações π - π stacking são a base para o mecanismo de ação de compostos intercaladores de DNA, sendo o caso da acridina, grupo conhecido por suas propriedades anticancerígenas (1). Estudos teóricos utilizados para o cálculo das energias de interação de intercalação da proflavina com pares de bases do DNA corroboram com resultados experimentais relatados, onde a configuração do sistema se estabiliza quando o eixo principal do composto intercalador se encontra alinhado com os pares de bases do DNA, indicando interações π stacking entre os anéis aromáticos.

Adicionalmente, na literatura admite-se que a contribuição da densidade eletrônica do anel aromático tem efeito na relação de dependência com a força de interação. Interações stacking do tipo fracas são resultantes das repulsões elétron-elétron que ocorrem em moléculas ricas em elétrons devido ao aumento de densidade eletrônica sobre o anel. Com a presença de grupos retiradores de elétrons, a densidade eletrônica diminui e consequentemente as repulsões entre elétrons diminui, aumentando a força da interação. Por outro lado, moléculas menos favorecidas em elétrons tem sua interação stacking elevada com a presença de grupos eletrodoadores, e no caso da presença de grupos retiradores de elétrons, se diminui significativamente a força de interação π - π (17).

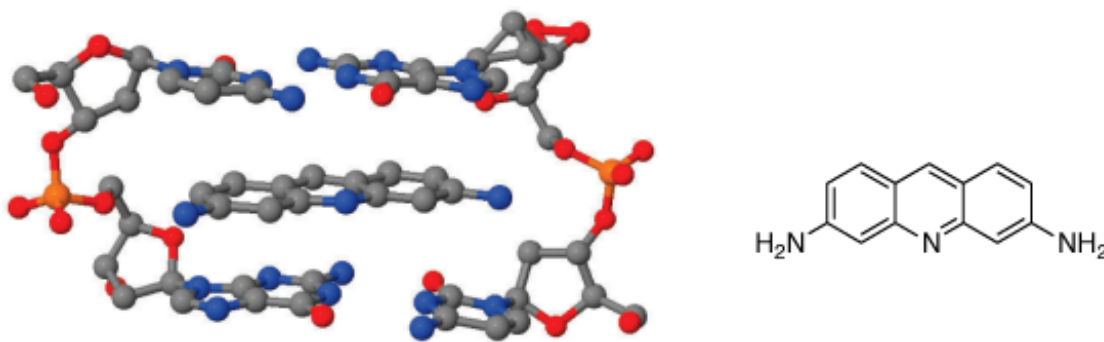


Figura 3 – Configuração da proflavina entre os pares de bases Guanina: Citosina atuando como agente intercalador de DNA à esquerda e estrutura química da proflavina à direita (1).

1.1.5 Complexação com metais

Por último temos a interação de complexação por metais, que é bastante recorrente em macromoléculas, evidentemente pela deficiência em elétrons do metal e a simétrica distribuição eletrônica nas moléculas biológicas. Este fato que faz com que proteínas se atraiam facilmente aos átomos metálicos (18). Em processos envolvendo metaloenzimas, ou seja, enzimas que possuem metal na sua constituição, tem-se a possibilidade de desenhar moléculas/fármacos com afinidade específica pelo metal em questão (19).

1.2 Termodinâmica de interações

A compatibilidade do receptor pelo fármaco é mensurada pela força destas ligações, sendo medida de acordo com a mudança na energia livre de Gibbs (ΔG) do sistema, quando se faz uma comparação das substâncias livres com o complexo formado (ligante-receptor). Para interações de importância biológica, a reação deve ser espontânea ($\Delta G < 0$) (20). A mudança na energia livre é composta de 2 componentes energias independentes, a entalpia (ΔH) e a entropia (ΔS), através da equação 1.1.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.1)$$

Nestes tipos de interações, a mudança na entalpia se correlaciona com as forças não covalentes, como as de Van der Waals, ligações de hidrogênio e iônicas. Já a entropia, a parte da energia do sistema que se transforma em calor, se modifica com o grau de desordem do sistema, ou seja, através de mudanças conformacionais/configuracionais ou relacionadas ao solvente, como por exemplo, a energia de solvatação ou interações hidrofóbicas. A energia livre de Gibbs está atrelada à constante de equilíbrio de dissociação K_d de uma reação, de acordo com a equação 1.2. Por conseguinte, podemos

afirmar que a atividade farmacodinâmica entre ligantes e receptores também podem ser definidas pelas constantes de associação $K_a = 1/K_d$, como ilustrado no esquema abaixo:

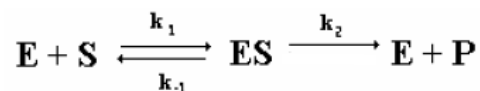
$$\Delta G = -RT \ln K_d \quad (1.2)$$

$$L + R \rightleftharpoons LR \quad K_a = \frac{[LR]}{[L][R]} \quad (1.3)$$

O esquema reflete a proporcionalidade das concentrações do ligante e do receptor biológico antes e após a interação. A concentração do complexo ligante-receptor é inversalmente proporcional à constante de dissociação da reação, isto é, quanto maior a K_d , menor é a possibilidade de encontrar o complexo ligante-receptor em solução, e consequentemente teremos maior concentração dos ligantes e receptores livres. Por outro lado, quanto menor o valor da K_d , maior é a interação entre a droga e a proteína. Em resumo, os valores para K_d nos casos de interação fraca tem valores acima de 10 mM, já em interações muito fortes se alcança valores de 10^{-16} M. Por outro lado, é válido usar outros parâmetros para medir a eficácia de um fármaco, como a sua taxa de inibição com relação ao seu receptor. Na inibição enzimática há uma mínima formação do complexo ligante-receptor e o substrato pode chegar a permanecer intacto no sistema. Seguindo esta linha de raciocínio, o inibidor irá desativar a ação biológica desencadeada pela reação do substrato com a enzima, evitando reações indesejadas para o organismo e isso é possível com o planejamento de fármacos com atuação inibidora para um dado receptor (21, 22, 23).

1.3 Cinética enzimática

Em termos de cinética enzimática de uma Enzima E , o mecanismo proposto para a reação de conversão de um substrato S a um produto P pode ser descrito pelas constantes de velocidade k_1, k_{-1} e k_2



A reação em geral se trata da conversão de um substrato a um produto catalisado pela enzima, porém é notável que parte do substrato não se une à enzima, ocasionando a reversibilidade de reação. A velocidade de formação do complexo ES é calculada pela variação da concentração do complexo por tempo de reação

$$V_f = k_1[E][S] \quad (1.4)$$

Com a formação do complexo ES, a reação pode caminhar para duas direções: pode ocorrer a reversibilidade do processo, separando o ligante (substrato) do receptor (enzima), ou pode formar o produto à medida que se libera a enzima, levando à equação de velocidade do desaparecimento do complexo, integrado pela soma da velocidade da reação reversível com a velocidade da formação do produto:

$$V_d = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (1.5)$$

Afirmando que a concentração do complexo permanece constante, em outras palavras, a velocidade da formação do complexo ES é equivalente à velocidade de desaparecimento (estacionária) temos então

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (1.6)$$

Tendo em vista que a concentração total de enzima utilizada para formar o complexo ES corresponde à soma da concentração da enzima livre e a concentração do complexo formado, $[E]_T = [E] + [ES]$, podemos facilmente calcular

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (1.7)$$

onde $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ é a constante de Michaelis-Menten (24, 25).

Em reações enzimáticas, a velocidade inicial está intimamente relacionada com a dissociação do complexo ES a enzima livre e produto. No ponto em que a enzima encontra-se totalmente complexada, podemos assumir que a velocidade máxima $V_{max} = k_2[E]_T$ e a velocidade inicial (25)

$$V_i = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}. \quad (1.8)$$

Assumindo a velocidade da reação $V = V_{max}/2$, podemos facilmente verificar que $K_M = [S]$. Em outras palavras, a equação de Michaelis-Menten descreve a partir de qual concentração de substrato a velocidade de reação é máxima. Isso é de extrema relevância para o cálculo de afinidade entre ligante-receptor, pois valores pequenos de K_M demonstram uma alta afinidade do substrato pela enzima, visto que a concentração de substrato se encontra baixa no momento em que a velocidade da reação é metade do seu valor máximo, em outras palavras, se a K_M é pequeno, significa que a enzima complexou em grande parte com o substrato. Do lado oposto, valores altos de K_M mostram que a enzima desenvolveu a metade da velocidade máxima apenas com concentrações altas de substrato, isto é, mesmo se houver bastante substrato, a enzima formará pouca quantidade de complexo ES. Para facilitar cálculos experimentais, se faz a linearização da curva de Michaelis-Menten, gerando a equação Lineweaver-Burk (Figura 4)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.9)$$

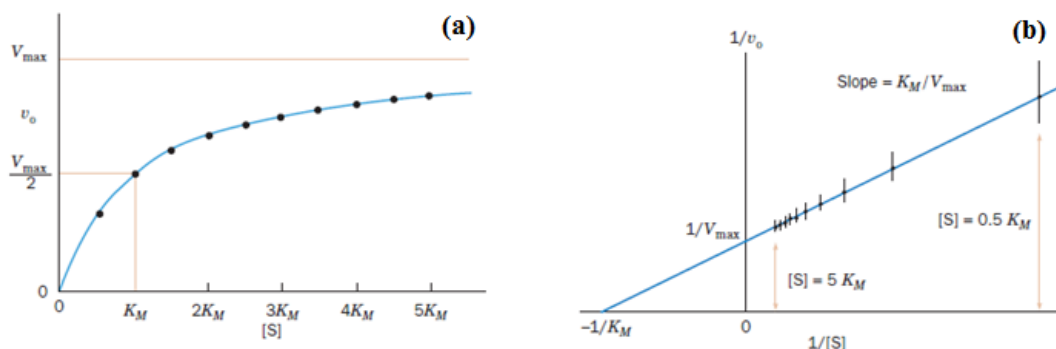


Figura 4 – Gráfico de Michaelis-Menten (a) e sua linearização com o Gráfico de Lineweaver-Burk (b).

No caso de uma inibição da atividade enzimática, é desejável obter valores altos da constante de Michaelis-Menten, dessa forma se terá conhecimento da eficiência do inibidor, pois se é necessária uma concentração maior de substrato para que a velocidade máxima da reação seja obtida, isso então significa que a enzima detém baixa compatibilidade com seu substrato. Por outro lado a constante $k_{cat} = V_{max}/[E]_T$ pode medir a eficiência enzimática, definindo a quantidade máxima de substrato que é convertida em produto em certa quantidade de tempo, Tabela 1 mostra valores típicos de parâmetros cinéticos de algumas enzimas.

Tabela 1 – Dados cinéticos de reações enzimáticas.

Enzima	Substrato	K_M (mol.L ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mol/L) ⁻¹ .s ⁻¹
Quimiotripsina	Éster N-acetiltirosinaetil	$1,5 \times 10^{-2}$	0,14	9,3
Pepsina	Ligações Peptídicas	$3,0 \times 10^{-4}$	0,5	$1,7 \times 10^3$
tRNA sintetase	Tirosina + tRNA	$9,0 \times 10^{-4}$	7,6	$8,4 \times 10^3$
Ribonuclease	Citidina-2',3'-fosfato cíclica	$7,9 \times 10^{-3}$	$7,9 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$
Anidrase carbônica	HCO ³⁻	$2,6 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$
Fumarase	Fumarato	5×10^{-6}	$8,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^8$
Tirosinase	L-DOPA	0,8	$1,0 \times 10^7$	133,75

Em síntese, os dados de cinética enzimática proporcionam a efetividade do planejamento racional de fármacos, pois definem se a estrutura molecular de determinada droga é compatível para a inibição do receptor para o qual foi desenhado de acordo com os parâmetros cinéticos. Com este fim, para o estudo preliminar de qualquer droga, inclusive das antineoplásicas, tem-se a preocupação em definir o alvo de estudo com base no tipo específico de doença e seu provável mecanismo de ação fisiológica.

1.4 Proteínas alvo para o estudo de drogas antineoplásicas

Em geral, os fármacos ao serem introduzidos no organismo podem existir na forma livre ou permanecer ligados a proteínas carreadoras presentes no plasma sanguíneo, e isso terá dependência das propriedades químicas da molécula. Porém a interação do fármaco com seu respectivo receptor (reação que gera atividade biológica) será realizada apenas no momento em que o ligante estiver em sua forma livre, pois através de processos de difusão e/ou transporte específico mediado pelo alvo biológico, a droga poderá alcançar o seu alvo molecular com eficácia.

Fortes interações entre o fármaco e proteínas carreadoras diminuem a biodisponibilidade da droga, ou seja, a fração do fármaco disponível para atuação é reduzida na corrente sanguínea quando há forte interação entre as mesmas, pois a distribuição da droga é afetada devido à formação do complexo proteína-droga. Interações fracas também diminuem a distribuição do fármaco, etapa determinante da farmacocinética. Portanto para a eficiência na biodisponibilidade, é recomendado o design de moléculas detentoras de moderada interação com proteínas carreadoras (26). A princípio, a presente dissertação terá foco no estudo de interações ligante-receptor com a albumina, pois a mesma auxilia na avaliação da biodisponibilidade do fármaco, e para alvo molecular enzimático, serão enfatizados os estudos com a proteína receptora Tirosinase.

1.4.1 Albumina Sérica

A albumina é a proteína mais importante constituinte do plasma sanguíneo, representando 60 % em termos de concentração das proteínas carreadoras não específicas presentes no sangue. É bastante conhecida a sua característica funcional de ligação à substâncias endógenas, como por exemplo, a bilirrubina, ácidos graxos, esteróides, cátions divalentes e toxinas, além de uma variedade de substâncias exógenas (drogas) (27, 28, 29). Devido a esta forte interação albumina-ligante, existe uma dependência destas ligações com a farmacocinética e os efeitos fisiológicos de drogas no organismo humano, afetando o processo de distribuição da droga.

A albumina sérica bovina (BSA) vem sendo bastante utilizada em estudos de interação devido ao seu baixo custo e disponibilidade (Figura 5). Sua homologia de aproximadamente 80% em relação à sequência de aminoácidos da Albumina Sérica Humana (HSA) a torna uma excelente proteína modelo para estudos biomiméticos (30, 31).

Estruturalmente a BSA é um polipeptídeo de cadeia única composto estruturalmente em 66% de α -hélices e 34% em conformação β e peso molecular de 66 kDa, possuindo 582 resíduos de aminoácidos em comparação com a HSA que possui 585. Dentre estes resíduos, uma grande porção é caracterizada pelos aminoácidos asparagina, ácido glutâmico, alanina, leucina e lisina, e em peque-

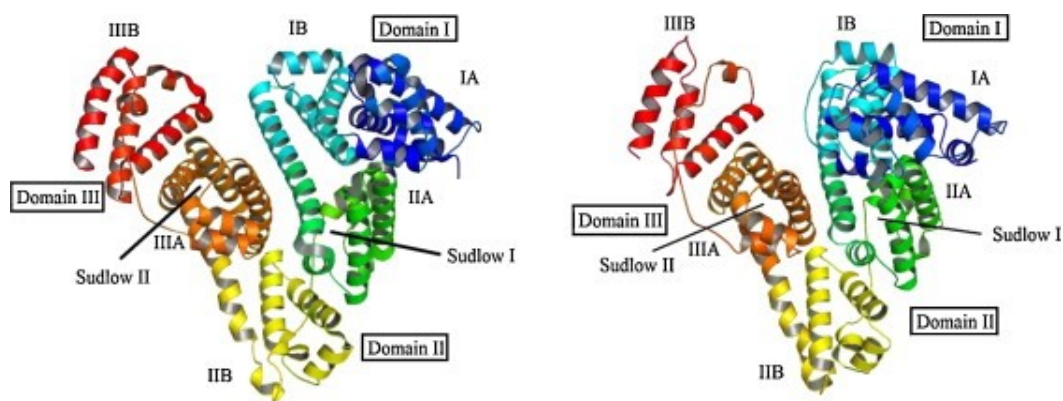


Figura 5 – diferença estrutural entre a albumina sérica humana (à esquerda) e albumina sérica bovina (à direita). Os locais indicados como Sudlow se referem ao sítio de ligação hidrofóbico.

nas proporções são encontrados em sua estrutura os resíduos de triptofano e metionina. A principal diferença estrutural entre as duas albuminas séricas é a distância entre os subdomínios I e II (Figura 5), além da presença de dois resíduos de triptofano na BSA e na HSA apenas um (32). Sua carga negativa em pH fisiológico confere à albumina o poder de carrear drogas carregadas positivamente com facilidade (33). Com relação à sua farmacodinâmica, estudos recentes identificam valores moderados da constante de dissociação K_d do complexo albumina-fármaco (intervalo de 10^{-3} - 10^{-4} M, enquanto valores de alta afinidade podem chegar a 10^{-7} M. Valores acima de 10^{-3} M indicam fracas interações entre a albumina e a droga (34).

1.4.2 *Tirosinase*

A tirosinase é reconhecida como uma metaloenzima por conter dois átomos de cobre acoplados em seu sítio ativo, tendo a função de catalisar a velocidade da reação de conversão de tirosina em melanina, composto responsável principalmente pela pigmentação da pele e consequentemente pela proteção da pele contra os raios ultravioletas do sol. A melanogênese ocorre dentro dos melanócitos, célula localizada na epiderme, constituindo o local em que se encontra a enzima tirosinase.

Contudo, alterações na atividade cinética desta enzima possibilitam a formação de distúrbios de pigmentação, chamados de melasma. A hiperpigmentação é caracterizada pelo aparecimento de manchas de pele causado pelo aumento de atividade da tirosinase, já a despigmentação é relativa à redução de síntese de melanina. A hiperpigmentação é um dos sintomas mais aparentes de câncer de pele, sendo conhecido por melanoma o câncer mais letal. O melanoma é formado pelo crescimento de melanócitos anormais, processo resultante de múltiplas mutações no DNA. Estudos realizados em melanócitos aberrantes inferem a presença exagerada da enzima tirosinase em 100% das células analisadas, fato que incita o uso da tirosinase como um alvo molecular para tratamento das células tumorais do melanoma (35, 36, 37).

Com relação à sua estrutura, os átomos de cobre da tirosinase estão fortemente acoplados antiferromagneticamente, ligados a uma ponte de íons hidroxila ou oxigênio molecular e cada metal se encontra conectado a três moléculas de histidina, como demonstrado na Figura 6.

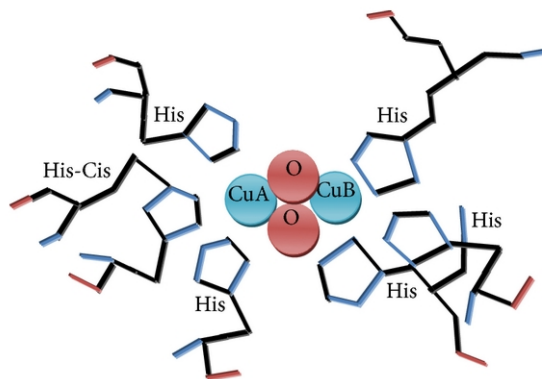


Figura 6 – Representação do sítio ativo da enzima tirosinase (2).

Encontrada em praticamente todos os seres vivos, a tirosinase foi amplamente caracterizada não só em mamíferos, como também em bactérias e fungos. Dentre estas, a que mais se assemelha à tirosinase dos mamíferos é a dos fungos (*Agaricus bisporus*) (38), fato este que a torna interessante para estudos preliminares de interação droga-receptor. Conhecida também como polifenol oxidase, a tirosinase participa de diversos processos catalíticos para a produção da melanina (Figura 7). A etapa determinante ocorre inicialmente com a hidroxilação da tirosina levando a formação da dopa (3,4-dihidroxilfenilalanina). Posteriormente a tirosinase oxida a dopa em dopaquinona, levando a uma cadeia de reações espontâneas em pH fisiológico.

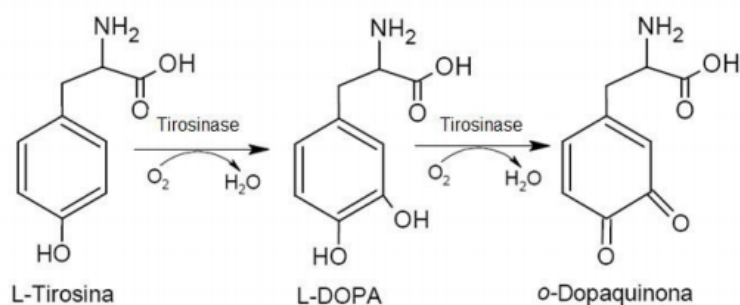


Figura 7 – Reações envolvidas na melanogênese(2).

O mecanismo completo pode ser encontrado na Figura 8 que mostra a ativação da enzima com um substrato fenólico reagindo com a ponte binuclear de cobre como etapa inicial, ocasionando a formação de um radical fenoxilo com a abstração do H^+ oriundo do substrato. Durante a transferência eletrônica ocorre a formação de duas espécies radiculares intermediárias, que seguidamente

darão origem à transferência de um oxigênio da enzima para o substrato formando o sistema enzima-substrato. Por fim, o complexo é desidrogenado levando à obtenção da quinona (39).

Durante a reação catalítica, os íons cobre da enzima se transformam 3 vezes. Iniciando a reação tem-se a forma met (Cu(II)-Cu(II)) que após a sua ativação é reduzida à espécie deoxy (Cu(I)-Cu(I)) a qual se liga ao oxigênio molecular para resultar na forma oxy-ligado em forma de ponte $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ [(Cu(II)-Cu(II).O₂]. A desestabilização da ligação O-O por fim ativa a ação de catálise. Em contrapartida, estudos recentes afirmam que a inibição da atuação da tirosinase consiste na monooxigenação dos compostos oxigenados utilizados como substrato, eliminando um dos íons cobre do sítio ativo através de redução, convertendo a oxy tirosinase à sua forma inativa (Cu(II)-Cu(0)) (40).

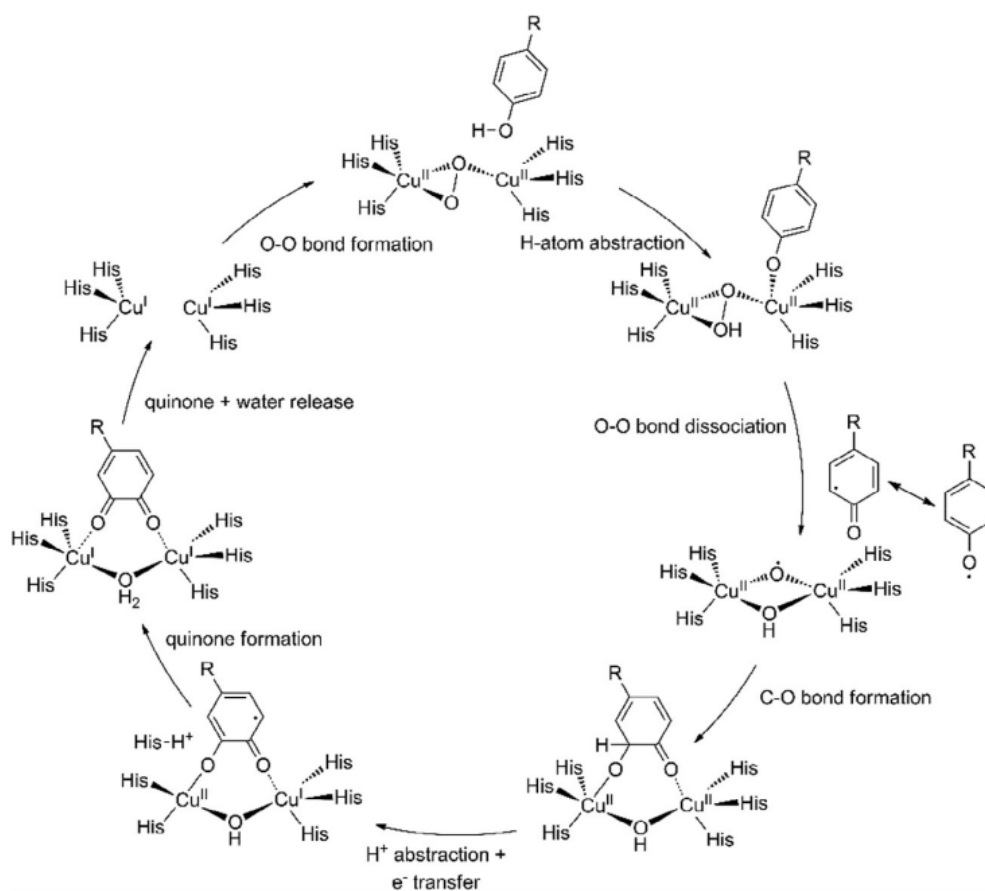


Figura 8 – Mecanismo de reação do substrato com a enzima tirosinase (2).

1.4.3 Inibidores da atividade catalítica da tirosinase

A inibição enzimática da tirosinase é relatada cientificamente de acordo com o seu alvo de atuação. Especificamente são abordadas as seguintes classificações de substratos inibidores:

- a) Agente redutor para a redução da dopaquinona a dopa, evitando a obtenção de dopacromo e consequentemente de melanina;

- b)** Compostos contendo tióis que consomem o substrato, desativando-o para a formação de melanina;
- c)** Uso de ácidos e bases (inativadores não específicos) para provocar a desnaturação da enzima, inibindo a atividade catalítica;
- d)** Uso de inibidores específicos para a tirosinase, os quais se ligam reversivelmente à enzima e reduzem sua atividade catalítica.
- f)** Substratos que formam ligação covalente com a tirosinase, inativando a enzima de forma irreversível (substrato suicida);

Em geral, os compostos utilizados para inibição da tirosinase e que são extensamente detalhados em literatura são dotados de grupos oxigenados (Figura 9), possibilitando assim sua interação com os íons cobre da enzima. Como exemplos conhecidos temos os flavonoides, as chalconas e as N-benzilbenzamidias, ou derivados dos citados. O ácido Kójico, composto padronizado como controle positivo experimentalmente, é um dos inibidores mais descritos em literatura devido à sua potência e efetividade na inibição da enzima. Possui um efeito competitivo inibitório na atividade da monofenolase e efeito misto inibitório na atividade da difenolase da tirosinase de cogumelo.

Dando espaço às novas perspectivas no que tange a descoberta de fármacos, a influência das semicarbazonas na atividade catalítica da tirosinase vem sendo cada vez mais analisada, tanto experimentalmente quanto através de medidas teóricas, tendo em vista a facilidade de quelação do enxofre presente no grupo com os íons cobre da enzima. Especificadamente, um grupo de tiosemicarbazonas aromáticas demonstrou forte atividade inibitória, inibindo em 50% (IC₅₀) a atividade da tirosinase com a concentração de $1,1 \times 10^{-6}$ M. Neste mesmo relato, estudos de relação estrutura-atividade (SAR) sugerem que a presença de grupo hidrofóbicos nas posições substituintes do anel melhoram a atividade inibitória destes compostos (41).

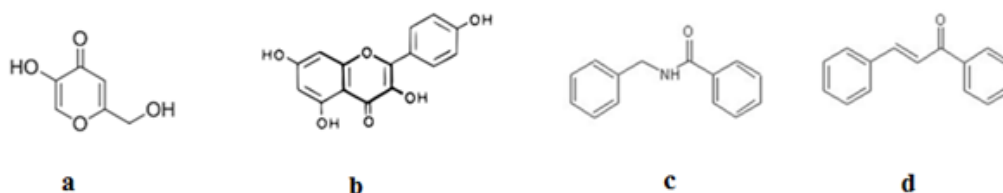


Figura 9 – Estrutura química de conhecidos inibidores da tirosinase. (a) Ácido Kójico (3) ; (b) Kaempferol (flavonoide) (4); (c) N-Benzilbenzamida (5); (d) Chalcona (6).

1.5 Uso de bases de schiff e derivados como drogas terapêuticas

As bases de Schiff possuem como característica um grupo azometina com ligação C=N (Figura 10(a), podendo haver no carbono dois substituintes de qualquer natureza e um substituinte qualquer no nitrogênio, excetuando-se o hidrogênio. Esse grupo confere ao composto características semelhantes às moléculas biológicas naturais, tendo em vista a presença desta funcionalidade em sítios ativos constituintes da célula animal, interferindo com facilidade em processos celulares (42). Dentre estas, existem duas classes que se destacam por suas interessantes atividades farmacológicas: as semicarbazonas Figura 10 (c) e tiosemicarbazonas, Figura 10 (b).

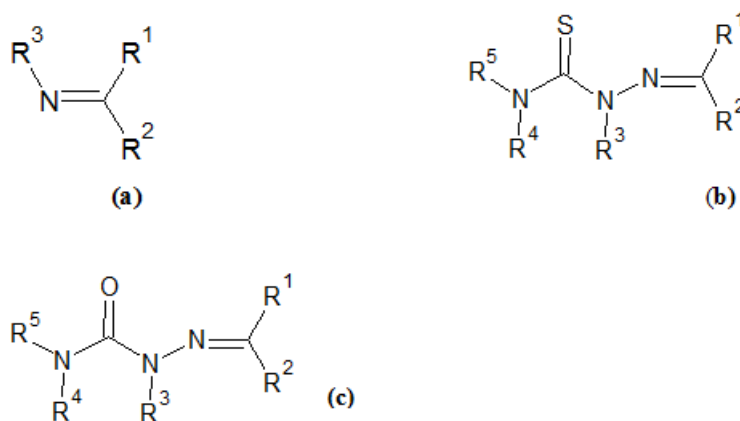


Figura 10 – Estrutura molecular geral de (a) uma base de Schiff, (b) uma tiosemicarbazona e (c) uma semicarbazona.

Características recorrentes nestas bases como, por exemplo, a extrema deslocalização eletrônica e constituição feita por átomos de distintas polarizabilidades permitem interações entre os mesmos e uma ampla variedade de ácidos de Lewis, favorecendo a formação de compostos de coordenação independente da natureza metálica (7). O átomo de nitrogênio (N) possui baixa polarizabilidade, enquanto o enxofre (S) e o oxigênio (O) é altamente polarizável devido ao seu tamanho (base mole). Este fato, de acordo com as propriedades doadoras ou aceitadoras de elétrons dos átomos presentes nos grupos substituintes R, pode proporcionar extensas possibilidades de coordenação (mono-, bi- ou poli-dentado) (43, 44, 45), como demonstrado na Figura 11.

Como resultado da deslocalização eletrônica, pode ocorrer um equilíbrio tautomérico, existindo na forma tiol ou tiona (Figura 12). A forma tiona tem característica neutra, já o tiol é representado na forma de ânion, e ambos possuem a capacidade de coordenar-se a centros metálicos de maneira eficaz (Figura 11). Este fato implica positivamente na interação entre estas bases e os sítios

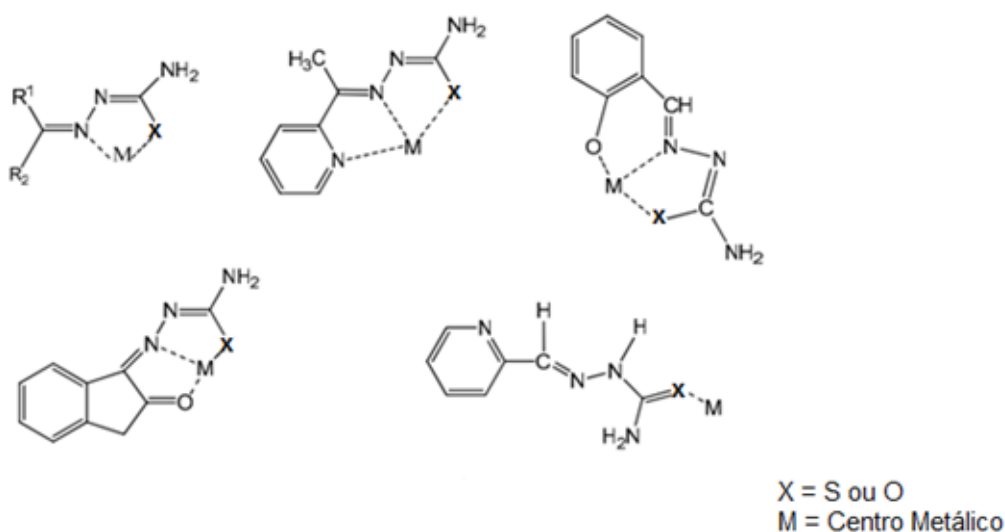


Figura 11 – Diferentes formas de coordenação entre semicarbazonas/ tiosemicarbazonas e átomos metálicos (adaptado da referência (7)).

ativos de enzimas importantes para o tratamento de células tumorais e consequentemente na sua inativação com relação à multiplicação de células tumorais (46).



Figura 12 – Tautomeria Tiol-Tiona em semicarbazonas/ tiosemicarbazonas

Com base nas características citadas, o sucesso na atividade biológica destas moléculas também depende da interação com as macromoléculas presentes no organismo humano. Portanto, aspectos físico-químicos como forças eletrostáticas, de Van Der Waals, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio são importantes para mensurar a força de ligação entre biomoléculas e tais bases de schiff, e consequentemente para elaborar um mecanismo de ação biológica de tais drogas (47).

Desta maneira, é possível inferir que a modificação de seus substituintes R promove uma variação significativa na sua atividade biológica por menor que seja a mudança estrutural em decorrência das alterações nas propriedades do composto, ampliando as possibilidades estruturais para estudo da obtenção destas substâncias na área da pesquisa oncológica.

1.5.1 Tiosemicarbazonas

As tiosemicarbazonas são amplamente estudadas por conterem uma grande variedade de efeitos farmacológicos, desde a ação antiinflamatória (48) até a inibição de células tumorais (49). O

interesse em tais moléculas surgiu entre as décadas de 40 e 50, quando Domagck (50, 51) obteve sulfonamidas derivadas de tiosemicarbazonas para o tratamento da tuberculose, com resultado em sua atividade biológica abaixo do nível satisfatório. Porém, as tiosemicarbazonas, também estudadas posteriormente por Behnisch e colaboradores (52), demonstraram uma forte resposta antituberculose, e desde então foram sintetizados inúmeros compostos tiosemicarbazônicos com finalidades terapêuticas e bastante eficazes em relação ao combate de uma série de microorganismos (bactérias, fungos, vírus e protozoários) (53, 54, 55, 56). Em especial deve ser ressaltada a grande contribuição desta classe de compostos na produção de moléculas que agem contra células cancerígenas, sendo a primeira destas a piridina-2-carboxaldeído tiosemicarbazona e derivados, sintetizada por Brockman et al em 1956.

Sua avaliação sobre a atividade antitumoral *in vivo* em células leucêmicas de linhagem L1210 induzida em camundongos mostra a redução do tumor em 50% em comparação a células não tratadas, porém, em seu trabalho, ainda seria desconhecido o mecanismo de ação de tais moléculas no sistema biológico (57). Atualmente são reportados os mecanismos de ação das tiosemicarbazonas em células tumorais sob diversas perspectivas, incluindo a inibição de enzimas primordiais para a síntese de DNA, impedindo a proliferação do tumor a nível celular (58), fato que será discutido mais adiante na presente dissertação. Diante do mencionado, é justificável o interesse na obtenção de novas estruturas moleculares baseadas em tiosemicarbazonas e acridinas, uma vez que a utilização das mesmas em sistemas biológicos e sua interação com enzimas podem ser favorecidas por suas propriedades químicas e físicas particulares citadas no capítulo anterior, que podem se alterar conforme a mudança estrutural de cada substância sintetizada.

1.5.2 Acridinas

As acridinas são compostos mesclados por três anéis aromáticos, sendo um destes piridínicos em sua posição central. Sua ação antitumoral conhecida a torna uma molécula atrativa para estudos com base na inibição enzimática de proteínas alvo para tratamento de drogas antineoplásicas.

A amsacrina (figura 13-B) é a melhor derivação da acridina (figura 13-A) já conhecida com relação à sua atividade antileucêmica. Desde sua descoberta em 1970, vêm sendo utilizado como um potente agente intercalador de DNA, atividade que impede que processos de replicação aconteçam, conduzindo as células tumorais à morte. Seu poder através da interferência na atividade da topoisomerase, enzima necessária para o crescimento celular que quebra e reorganiza as fitas de DNA, a torna uma das drogas mais estudadas para o tratamento de câncer (59). Estudos recentes relatam a função dos grupos funcionais existentes na amsacrina, onde a parte acridínica estaria responsável

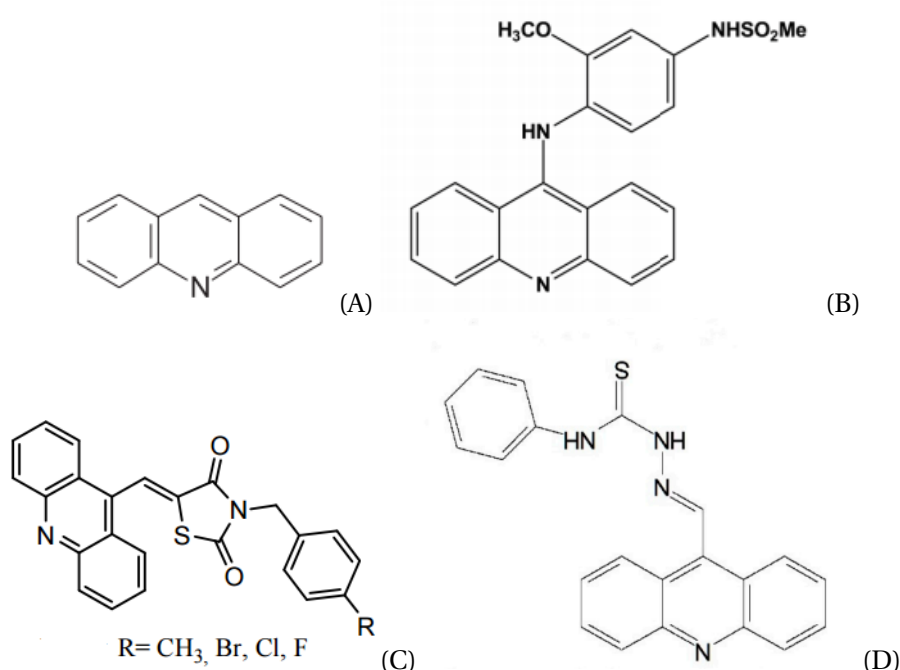


Figura 13 – Estrutura da molécula (A)acridina, (B)m-AMSA (N-[4- (acridin-9- ilamino- metóxi- fenil] -metanosulfonamida), (C) acridina- tiazolidin e (D) acridina- tiosemicarbazona.

pela interação com o DNA (intercalação) e restante da molécula teria a função de interagir com a proteína topoisomerase e realizar a clivagem do DNA (60).

Compostos acridínicos unidos à tiosemicarbazonas (figura 13- D) também foram descritos para atividade antitumoral obtendo valores satisfatórios de constante de ligação, indicando alta afinidade de interação com o DNA, com valores maiores do que a interação amsacrina-DNA citada anteriormente. Também foi notado que a substituição pelo anel aromático presente ao lado do grupo das tiosemicarbazonas afeta a interação do composto com o DNA devido ao volume do ligante e fatores rotacionais da molécula (61).

1.6 Técnicas de estudos de interação Ligante-Alvo Biológico

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas espectroscópicas mais poderosas em química e uma ferramenta indispensável para o estudo de complexos de sistemas tipo hóspede-hospedeiro ("host-guest"). Principalmente no que diz respeito a elucidar as estruturas dos vários complexos existentes na forma de agregados, pares de ions ou sistemas encapsulados. Sendo assim, a RMN identifica os diferentes núcleos nas moléculas, através do seu deslocamento químico. A presença de uma molécula hospede dentro do raio de interação de uma molécula hospedeira provoca uma alteração considerável nos ambientes eletrônicos dessas moléculas. Desde que os deslocamentos químicos dependem do ambiente eletrônico no qual este núcleo está imerso, uma mudança nos

sinais no espectro de RMN poderão ser observadas e este princípio básico é utilizado para estudar os fenômenos de interação tipo hóspede-hóspedeiro. As forças motrizes para este tipo de interação são as várias interações secundárias entre moléculas, tais como ligação de hidrogênio e interação pi-pi. Assim, a RMN também serve como uma técnica importante para estabelecer a presença destas interações num complexo hóspede-hóspedeiro (62).

Diversos fatores interferem nos resultados obtidos por RMN. Um aspecto crucial da análise por RMN nestas interações é o tempo necessário para a aquisição de dados em comparação com o tempo em que as moléculas permanecem interagindo ou ligadas umas a outras. Em muitos casos, os eventos de ligação são muito mais rápidos do que a escala de tempo de aquisição de dados, nesse caso a saída é um sinal médio para as moléculas individuais e o complexo. A escala de tempo de RMN é da ordem de milissegundos, o que em certos casos quando a reação de ligação é rápida, limita a precisão da técnica.

Diversos estudos demonstram a utilidade da técnica nestes tipos de aplicações. Em um destes estudos, usando as alterações nos deslocamentos químicos dos grupos amino e amido do sistema piridina-dendrimero PAMAN, foi possível calcular a energia de interação de hidrogênio neste sistema (63). Em outro estudo similar, foi possível determinar precisamente os átomos envolvidos (64), assim como a afinidade entre drogas aminadas e um dendrimero carboxilado, pela titulação do dendrimero com diversas drogas e posterior monitoramento dos deslocamentos químicos juntamente com experimentos NOESY bidimensionais. Foi possível demonstrar neste estudo que moléculas catiônicas do fármaco interage fortemente com a superfície aniônica do dendrimero enquanto fármacos aniônicos ficam localizados no núcleo e na superfície do dendrímero.

Em outro contexto molecular, interação de compostos de coordenação a base de rutênio e moléculas do tipo cucurbiturila foram estudas por RMN, sendo verificado que os modos de ligação para os complexos são completamente diferentes para diferentes moléculas de cucurbiturila. Por exemplo nos sistemas de cucurbiturila de sete membros somente quatro prótons aromáticos por molécula de ligante participam no processo de ligação, enquanto que todos os prótons aromáticos do ligante formam uma parte do complexo quando é utilizado um sistema de oito membros.

2 OBJETIVOS

Como objetivo geral, tem-se o intuito de analisar os derivados de bases de schiff (AMTAC's e NW's) como potenciais inibidores das enzima tirosinase, bem como a sua biodisponibilidade.

2.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar os derivados de bases de schiff;
- Caracterizar os derivados de bases de schiff;
- Verificar a interação dos compostos com a BSA, Cobre e a Tirosinase através da constante de dissociação;
- Testar a atividade inibitória dos compostos com relação à tirosinase;
- Realizar o docking molecular da interação dos compostos com a tirosinase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais e reagentes

Os reagentes: 4-Fluorfenil isotiocianato ($\text{FC}_6\text{H}_4\text{NCS}$), 4-Nitrofenil isotiocianato ($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NCS}$), 4-Clorofenil isotiocianato ($\text{ClC}_6\text{H}_4\text{NCS}$), 5-Hidroxi metil-1,3-benzodioxol ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$), Álcool piperonílico ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$), Dióxido de Manganês (MnO_2), fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4), fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), enzima tirosinase do cogumelo 1000 U/mg, Albumina Sérica Bovina (BSA) e sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) são da marca Sigma Aldrich. A Hidrazina Hidratada 80% ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) é proveniente da marca Acros Organics. Os solventes: Acetona, Acetato de Etila, Etanol e Hexano são da marca Sigma Aldrich.

3.2 Síntese dos compostos acridínicos

A AMTAC 01 ($\text{R} = \text{H}$) e AMTAC 02 ($\text{R} = \text{OCH}_3$) foram sintetizadas no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica tendo sua metodologia descrita em literatura (65). O esquema reacional é ilustrado na Figura 15.

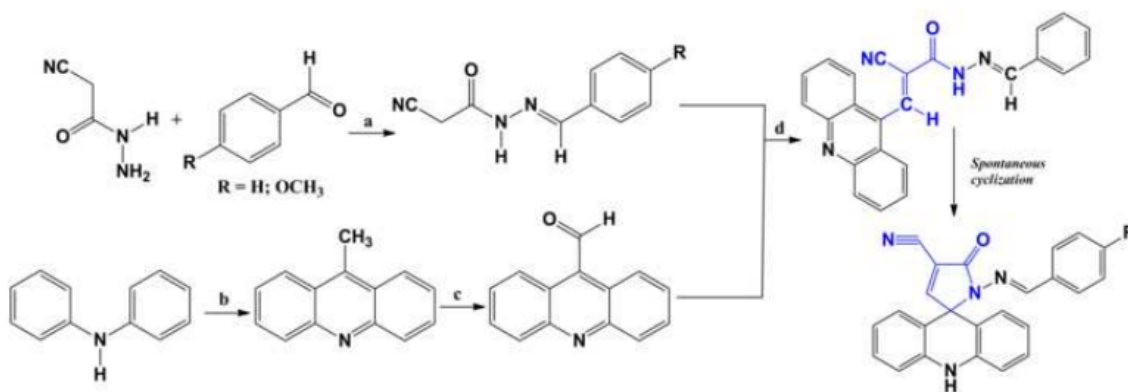


Figura 14 – Esquema sintético das AMTACs.

3.3 Síntese dos compostos tiosemicarbazônicos

Síntese do aldeído do safrol (piperonal) precursor

À 1 g de álcool piperonílico em 50 mL de diclorometano foram adicionados 8,55 g de dióxido de manganês. A mistura foi agitada durante 5 horas, onde a formação do produto foi acompanhada por CCD (Cromatografia em Camada Delgada).

Síntese das semicarbazidas precursoras

0,4 mL (0,5 g) de 4-fenilisotiocianato foi adicionado em 20 mL de diclorometano, seguida-mente 0,2 mL de hidrazina foi incorporada à mistura, notando-se imediatamente a formação de pre-cipitado. A reação foi agitada durante 1 hora e monitorada por CCD.

Síntese das tiosemicarbazonas

$6,6 \times 10^{-4}$ mol de piperonal foi adicionado em uma solução de $6,6 \times 10^{-4}$ mol de 4-fenil tiosemi-carbazida em 50 mL de etanol anidro. Em seguida foi acrescentado 1,5 mL de ácido acético. A reação foi deixada sob agitação e refluxo por 24 horas e após isto o produto lavado com etanol e monitorado por CCD.

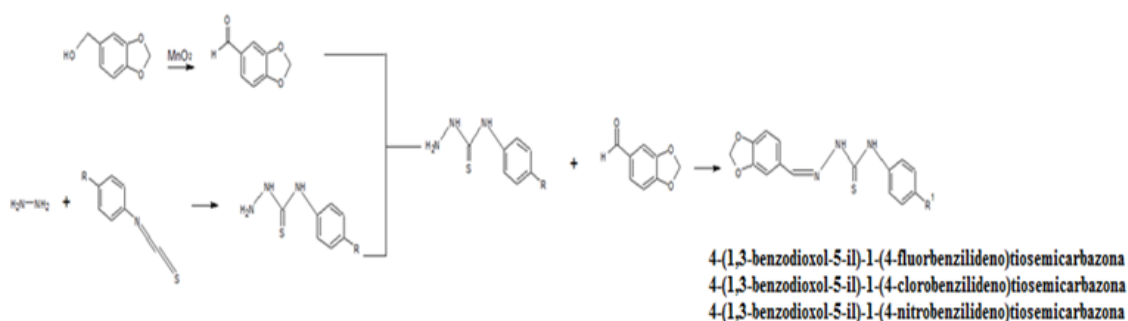


Figura 15 – Esquema sintético das tiosemicarbazonas.

3.4 Caracterizações estrutural dos compostos

Para caracterização das amostras e estudos de interação foi utilizado um espectrômetro de ressonância magnética nuclear da marca Varian Unity Plus 400 MHz da Central Analítica - Departamento de Química Fundamental (DQF). A caracterização das AMTACs foram realizadas em DMSO- d_6 , já o grupo das NWs foram caracterizadas em acetona- d_6 . Para a caracterização foram coletados os espectros unidimensionais de 1H e ^{13}C e bidimensionais: COSY, HMBC e HSQC de 10 mg de amostra numa solução de 500 μL de solvente.

3.5 Estudos de interação com proteínas

Os estudos de interação dos cinco compostos com BSA foram realizados com a titulação das amostras com proteína em 6 concentrações: 1,5, 3,0, 4,5, 6,0, 7,5 e 9,0 mM. Foram utilizadas 1,0 mL de acetona- d_6 para solubilizar 15 mg de cada amostra. Os estudo de interação das cinco amostras com a enzima tirosinase de cogumelo foram feitos titulando-se as amostras com a enzima em 5 concen-trações: 70, 140, 210, 290 e 350 μM . Foram utilizadas 1000 μL de acetona- d_6 para solubilizar 15 mg de

cada amostra. Obtendo-se o a diferença de deslocamento ($\Delta\delta$) a partir dos espectros em diferentes concentrações, foi realizado um fitting não-linear no programa Graphpad Prisma, onde se calculou a constante de dissociação para cada hidrogênio das moléculas. Todos os estudos de interação foram realizados à temperatura de 27°C.

3.6 Estudo teórico de interação

Partindo da estrutura de PDBID: 2y9x (tirosinase com ligando de tropolona), ao receptor foram removidas todas as cadeias. Também foi removido todos os hidrogênios e moléculas de água. Para assegurar a carga inteira, também foi removido a ligação tioéter entre His85 e Cys83. Os hidrogênios foram adicionados utilizando a ferramenta Quimera "AddH", e "Add Charges Tool" Foi utilizada para adicionar cargas ao receptor, utilizando cargas do campo de força de Amber ff14SB.

Para o ligante natural Tropolona foi removido todos os átomos da estrutura 2y9x de PDB, exceto a unidade tropolone na cadeia A. Em seguida, usamos a Ferramenta "AddFor" do programa Quimera para adicionar os hidrogênios e depois calculamos as cargas usando a ferramenta "Add Charge Tool" do Chimera. O resultado foi salvo no arquivo tropolone.mol2. O arquivo mol2 das moléculas foram baixados do "Zinc database" (ZINC 02506503). Para as outras tiosemicarbazonas foram usados usados a ferramenta "Build structure" do Chimera usando o SMILES R=F: S=C(NN=Cc2ccc1OCOc1c2)Nc3ccc(F)cc3 ZINC 02506503 R=NO2: O=N(=O) c3ccc (NC(=S)NN=Cc2ccc1OCO c1c2)cc3 R=Cl: S=C (NN=C c2ccc1OCOc1c2)N c3ccc(Cl)cc3. As cargas foram calculadas usando o SQM como disposto no Chimera, através da ferramenta "Add charges".

O ligante natural (tropolone) foi atracado a proteína. A tropolona foi posicionada no volume correcto e rodado o programa DockThor. A RMSD entre a estrutura original (raio X) e a tropolona acoplada foi de 3.129 Å. Para os calculos de docking, usamos o portal DockThor (<http://www.dockthor.lncc.br>). Em todos os casos, os parâmetros de acoplamento utilizados foram os mesmos. A grade foi centrada em 4,9; 25,1; 96,1 Å, com dimensões de 6 Å em cada sentido. O espaçamento da grade foi de 0,25 Å. Um algoritmo genético foi utilizado com 1.000.000 de avaliações, um tamanho inicial da população de 1.000 indivíduos e um total de 30 execuções. As estruturas finais não foram minimizadas de energia.

3.7 Estudo de inibição da atividade enzimática

A atividade da tirosinase foi realizada com um leitor de microplacas ELISA da marca Bio-rad, onde foram adicionados 50 µL de enzima tirosinase de concentração final 1,6 nM a 50 µL de soluções de L-DOPA EM 9 concentrações diferentes: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, e 0.9 mM. Após o feito,

os dados registrados foram tratados no programa Graphpad Prism chegando à obtenção do gráfico de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk.

As medidas foram realizadas com um leitor de microplacas ELISA da marca Bio-rad, onde cada poço da microplaca suportou 40 μ L da solução de L-DOPA 0,5 mM, 10 μ L da solução inibidora (AMTAC 01 e Ácido Kójico) em 5 concentrações (100, 80, 60, 40 e 20 nM) e 50 μ L de solução da enzima tirosinase resultando na concentração final de enzima na solução em 1,6 nM. A leitura foi realizada a cada 1 minuto durante 20 minutos e os dados foram tratados pelo programa Graphpad Prism.

4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS

Ressonância magnética nuclear (RMN) é sem dúvida a técnica espectroscópica mais poderosa para elucidar estruturas moleculares, uma vez que podem fornecer sob condições biológicas relevantes, não somente informações de estruturas conformacionais mas também informações detalhadas de interação. A maioria dos estudos por RMN inicia com obtenção e análise do espectro de próton da amostra, analisando parâmetros deslocamento químico, constantes de acoplamento e relação de intensidade de sinais. Ao tentar analisar a estrutura de uma molécula e / ou seu comportamento em solução por RMN, deve-se considerar como explorar diversos fenômenos para obter as informações desejadas e, a partir disso, selecione a (s) técnica (s) apropriada (s).

Desta forma, durante a elucidação estrutural de uma molécula, a primeira evidências de acoplamento entre núcleos pode ser usado para indicar a localização de ligações químicas. Quando a localização de todas as relações de ligação dentro da molécula for estabelecida, uma estrutura grossiera da molécula é definida. As proximidades espaciais entre núcleos e entre prótons em particular, podem ser usados para definir relações estereoquímicas dentro de uma molécula e assim resolver questões de configuração e conformação. A característica única da RMN Espectroscopia, a principal razão para sua superioridade sobre qualquer outra solução-estado Técnica de elucidação de estruturas, é a sua capacidade de definir relações dentro de uma molécula ou mesmo entre moléculas. Tais detalhes requintados são geralmente obtido correlacionando um núcleo com outro explorando os fenômenos de transferência de magnetização e polarização.

A experimentos de correlação homonuclear COSY ("COrrrelation Spectroscopy"), identifica núcleos que compartilham um acoplamento J entre os prótons, operando sobre duas ou três ligações químicas. Essas informações podem, portanto, serem usadas para indicar a caminho da ligação. Os experimentos de correlação heteronuclear de varias ligações HMQC ("heteronuclear multiple-quantum correlation") ou HSQC (heteronuclear single-quantum Correlação) identificam os heteroátomos aos quais os prótons estão diretamente ligados e podem, por exemplo, fornecer atribuições de carbono a partir de atribuições de prótons previamente estabelecidas. Os desvios químicos de prótons também podem ser dispersos de acordo com o heteroátomo, ajudando assim a atribuição do próprio espectro de prótons. As correlações heteronucleares de longo alcance sobre tipicamente duas ou três ligações, heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), fornecem informações importantíssima sobre o esqueleto da molécula e podem ser utilizado para inferir a localização de ligações carbono-carbono ou carbono-heteroátomo. Essas correlações podem ser particularmente valiosas quando as correlações próton-próton são ausentes.

Devido a complexidade estrutural dos compostos desenvolvidos nesta dissertação, foram coletados e analisados não somente espectros unidimensionais de ^1H e ^{13}C , mas também espectros bidimensionais do tipo COSY (que estabelece correlação entre prótons vizinhos), HSQC (que estabelece correlação entre prótons e carbonos quimicamente ligados), HMBC (que estabelece correlação entre prótons e carbonos quimicamente ligados a longa distância).

4.1 Caracterizações dos compostos acridínicos

Inicialmente a perspectiva de síntese para os compostos seria a obtenção de uma estrutura não ciclizada. Porém, através das análises de RMN, foi possível verificar que ocorreu uma ciclização espontânea das moléculas decorrente do ataque nucleofílico entre o nitrogênio do grupo da semicarbazona e o carbono C7, formando um anel de 5 membros ligado à acridina, como podemos observar na figura abaixo.

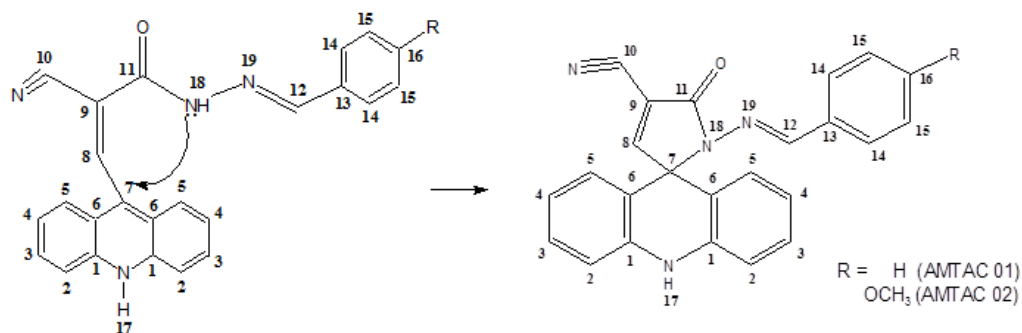


Figura 16 – Representação da ciclização das AMTACs.

A ciclização espontânea de acridinas é amplamente reportada em estudos prévios, fato que mostra sua grande susceptibilidade de formação devido à forte basicidade do N-H18, tornando-o um bom nucleófilo em comparação com o nitrogênio N19 vizinho. O nitrogênio N19 por sua vez está conectado a uma ligação dupla, onde consequentemente a força de ligação é maior e assim tem sua nucleofilicidade diminuída.

Os espectros de RMN ^1H da AMTAC 01 resultaram em picos em 9,82 ppm, provenientes do N-H17 da acridina. Tal grupo se encontra menos blindado por estar conectado próximo aos elétrons π ressonantes dos anéis aromáticos. Com isso, o deslocamento químico se dispõe para o lado esquerdo do espectro. Os picos correspondentes às ligações C-H alifáticas presentes no carbono C8 e C12 estão encontrados em 8,54 e 8,38 ppm. Por estarem localizados à distância acima de 3J de qualquer outro hidrogênio da molécula, todos os sinais relatados anteriormente aparecem como singletos no espectro. Os deslocamentos dos hidrogênios H2, H3, H4 e H5 localizados na área da acridina se posi-

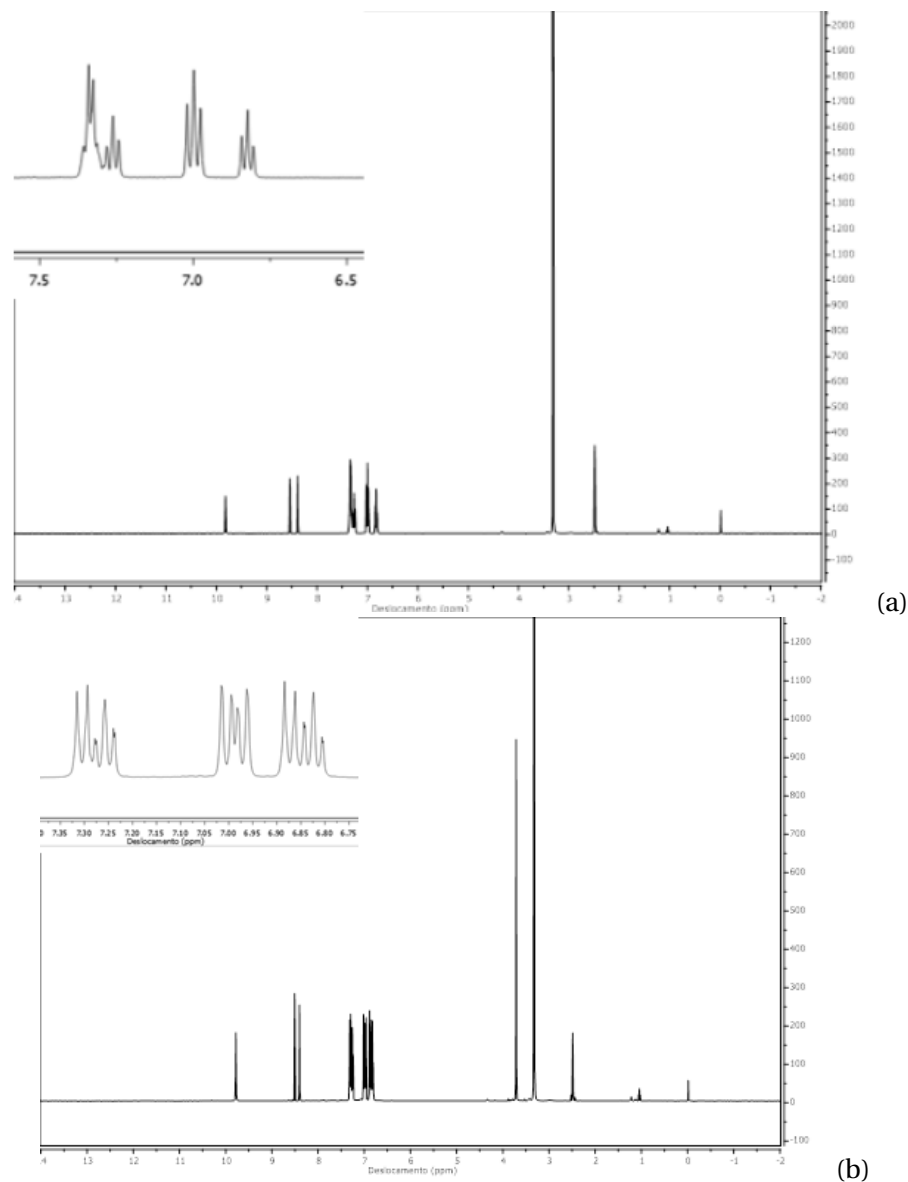


Figura 17 – Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da (a) AMTAC01 e (b) AMTAC 02, (c) espectros de ¹³C de ambos compostos .

cionam na região aromática do espectro (entre 6-8 ppm), estando sobrepostos os sinais multipletos dos H2 e H5 em 7,00 e 7,02 ppm. Os H3 e H4 estão dispostos em 7,26 e 6,82 ppm, aparecendo em forma de tripletos no espectro devido ao acoplamento com dois hidrogênios vicinais (3J). Também estão sobrepostos e acoplados entre si os deslocamentos entre 7,3 e 7,4 ppm referentes aos H14, H15 e H16, dificultando a identificação da multiplicidade. O espectro de RMN da AMTAC02 possui padrão de sinais semelhantes ao espectro da AMTAC 01, diferenciando-se pelo deslocamento relacionado à metoxila (OCH₃) presente no carbono C16. Na região aromática, temos uma grande sobreposição de sinais multipletos que evidenciam acoplamentos de longa distância entre os hidrogênios.

Apesar da sobreposição de sinais foi possível caracterizar cada hidrogênio aromático através das técnicas de RMN bidimensionais. Cada carbono foi assinalado conforme os espectros bidimen-

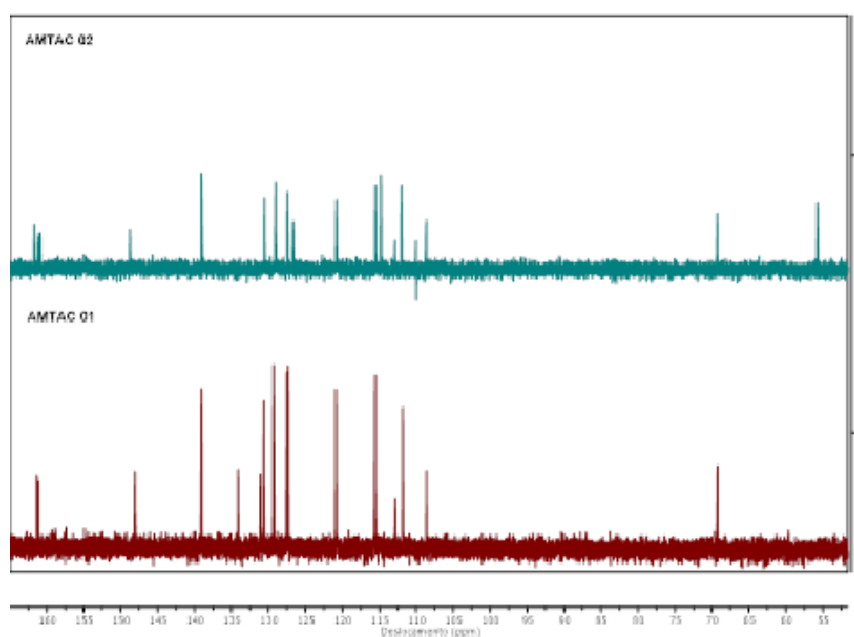


Figura 18 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da AMTAC01 e AMTAC 02 .

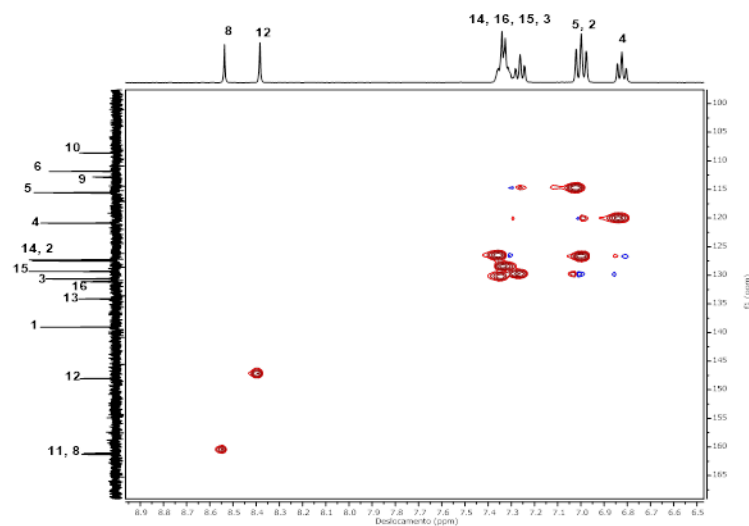
sionais de HSQC, os quais demonstram seus acoplamentos heteronucleares H-C via uma (1J) ligação, e o espectro unidimensional de RMN ^{13}C , apresentando os assinalamentos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Assinalamento dos compostos acridínicos.

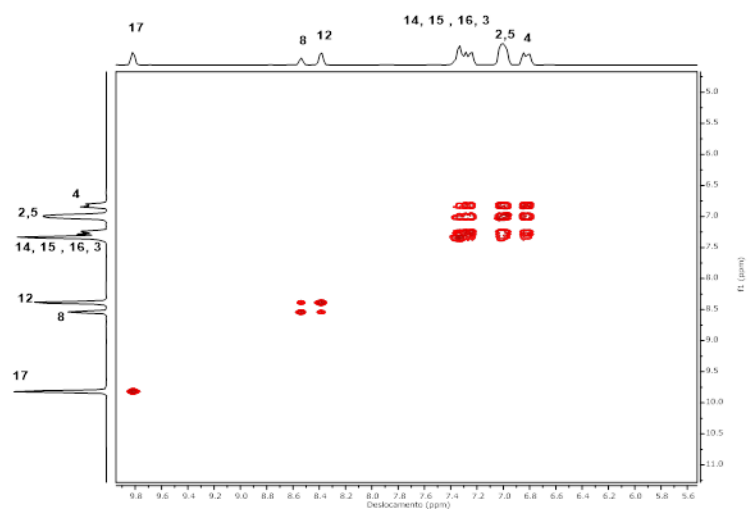
Assinalamento	AMTAC01		AMTAC02	
	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$
1	139.11	—	139.08	—
2	127.50	7.00	114.81	6.88
3	130.63	7.26	130.52	7.26
4	120.89	6.82	120.84	6.82
5	115.44	7.02	115.52	7.02
6	111.81	—	112.04	—
7	69.24	—	69.30	—
8	161.30	8.54	161.17	8.50
9	112.81	—	112.87	—
10	108.60	—	108.65	—
11	161.30	—	161.70	—
12	148.05	8.38	148.78	8.40
13	134.05	—	129.02	—
14	127.30	7.36	126.80	6.99
15	129.33	7.33	129.06	7.31
16	131.08	7.35	160.86	—
17	—	9.82	—	9.79
OCH3	—	—	55.76	3.71

O espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H (COSY) da AMTAC 01 demonstra a proximi-

dade entre H17 e H2. Também é notável no espectro de COSY a ausência de picos correlacionados aos hidrogênios H8 e H12, confirmando seu isolamento aos hidrogênios aromáticos numa distância de até 3J. Além disso, podemos identificar os deslocamentos referentes aos acoplamentos dos hidrogênios vicinais, onde o H3 correlaciona com o H2 e H4, já o H4 correlaciona com H3 e H5.



(A)



(B)

Figura 19 – Espectros (A) COSY e (B) HSQC da AMTAC01 (400 MHz, DMSO-d₆) mostrando as correlações e os assinalamentos.

A disposição do carbono C7 (foi definida pela análise do espectro de HMBC, indicando correlações à longa distância do mesmo com um hidrogênio do anel aromático da molécula acridina. Esta atribuição foi validada observando as correlações do hidrogênio H8 e H5 com o carbono quaternário em questão. O espectro de HMBC também foi capaz de deduzir a posição do carbono e hidrogênio H12 observando suas correlações de longa distância com o deslocamento do hidrogênio H14, diferenciando o H12 do H8.

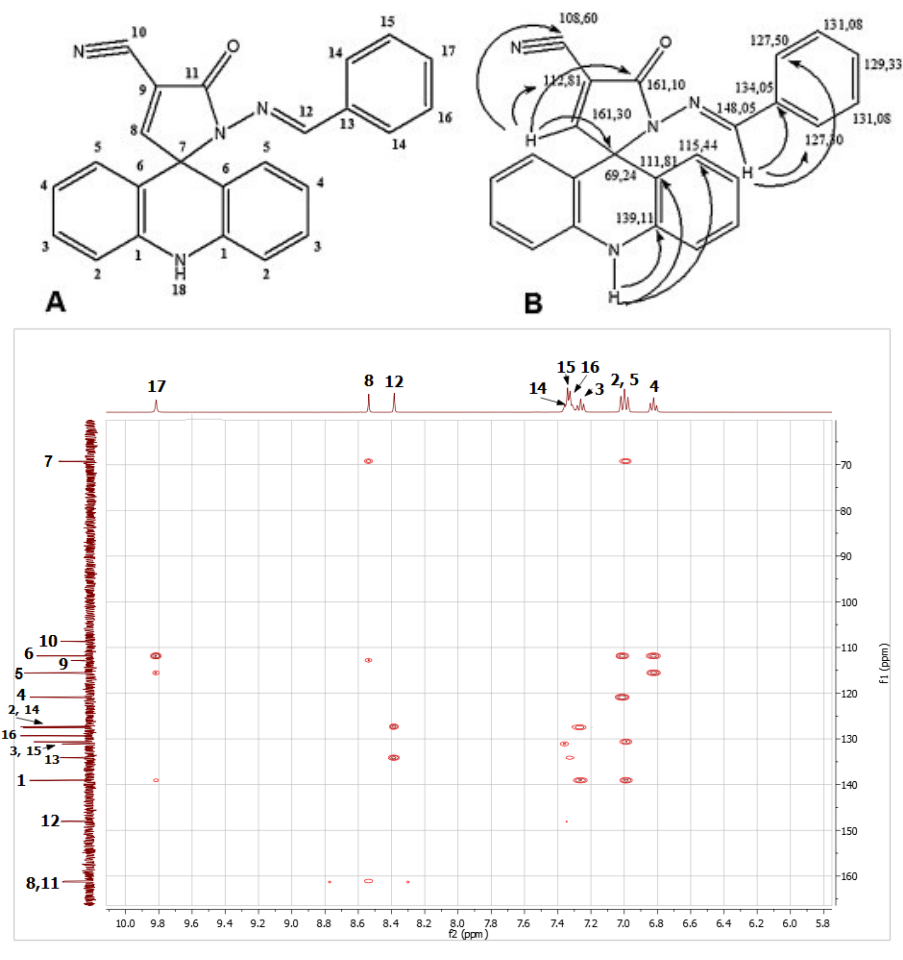


Figura 20 – Numeração usada para a molécula de AMTAC01(A) e o diagrama mostrando as correlações de longa distancia (B) e as atribuições podem ser reconhecidas no espectro HMBC (C) da AMTAC01.

4.2 Caracterização dos Compostos tiosemicarbazônicos.

Os espectros das moléculas 1,3-Benzodioxol-4fenil-tiosemicarbazona foram coletados em condições equivalentes aos compostos AMTACs, obtendo desta maneira informações sobre o perfil estrutural dos compostos.

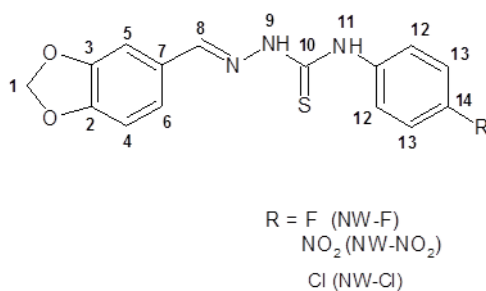


Figura 21 – Composto tiosemicarbazônicos.

Para a molécula isoestrutural contendo flúor, o H1 mostra um singlete em 6,07 ppm, sinal característico do grupo CH₂ no anel benzodioxol. O H4 (6,90 ppm) aparece no espectro como um dublete devido ao acoplamento com o H6 (7,17 ppm). Já o singlete do H5 em 7,59 ppm possui apenas 1 sinal por estar isolado de qualquer hidrogênio numa distância de até ³J da molécula, e está deslocado no espectro próximo ao hidrogênio H13 (7,69 ppm), sendo este último relacionado ao grupo fenil do lado oposto ao benzodioxol.

Tabela 3 – Assinalamento dos compostos tiosemicarbazônicos.

NW-F		NW-NO ₂		NW-Cl		Assinalamento	
¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
6,07	102,63	6,10	101,81	6,13	102,60	1 (CH ₂)	1
–	149,35	–	148,54	–	143,11	–	2
–	150,55	–	149,99	–	152,03	–	3
6,90	108,93	6,93	108,15	6,90	106,91	4 (CHar)	4
7,59	106,09	7,59	105,39	7,48	134,82	5 (CHar)	5
7,17	125,36	7,21	124,65	7,39	121,51	6 (CHar)	6
–	129,51	–	128,33	–	126,85	–	7
8,17	143,51	8,24	143,78	8,34	130,96	8	(=CH) 8
9,93	–	10,31	–	9,92	–	9 (NH)	9
–	177,67	–	175,63	–	133,20	–	10
10,65	–	10,93	–	10,81	–	11 (NH)	11
–	159,76	–	145,32	–	141,81	–	12
7,69	128,17	8,24	123,34	7,81	123,61	13 (CHar)	13
7,12	115,29	8,24	123,34	7,39	114,77	14 (CHar)	14
–	162,17	–	166,96	–	153,41	–	15

O sinal localizado em 8,17 ppm corresponde ao H8 tendo maior deslocamento de todas as ligações H-C devido à presença de ligação dupla no grupo HC=N, deixando o hidrogênio dessa ligação desblindado. Seguindo esta mesma linha de raciocínio, os sinais dos H9 e H11 se encontram deslocados em campo baixo por conta da ressonância do nitrogênio com o grupo tiol, fazendo referência aos deslocamentos 9,93 e 10,65 ppm, respectivamente. Por fim, o sinal 7,12 ppm correspondente ao H14 se encontra próximo à faixa de deslocamento do H5 no espectro, porém estruturalmente visualiza-se uma distância bastante significativa entre os hidrogênios, posições confirmadas pelos espectros bidimensionais.

Os outros dois compostos análogos ao NW-F foram assinalados da mesma maneira, diferenciando apenas o NW-NO₂ com sinais sobrepostos no deslocamento em 8,24 ppm, sinal constituído pelos hidrogênios H8, H13 e H14. Estes dois últimos sinais se encontram mais deslocados para a esquerda no espectro, diferente de seus compostos isoestruturais. Isso ocorre devido à presença do grupo NO₂, por ser um grupo retirador de elétrons acaba desblindando os hidrogênios próximos a ele. O espectro de COSY nos mostra as correlações entre os hidrogênios aromáticos vizinhos H13 e

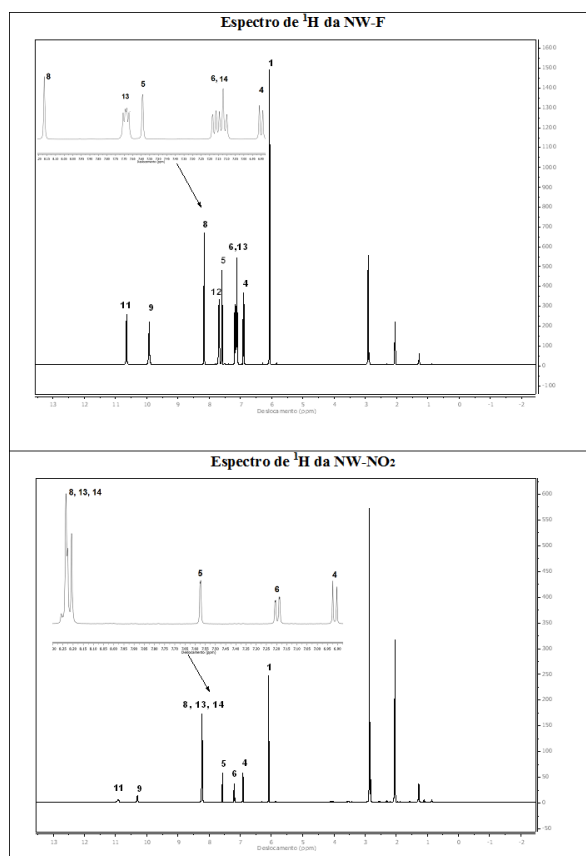


Figura 22 – Espectro de ^1H dos compostos tiosemicarbazônicos.

H14 e também entre os H4 e H6, proporcionando o correto assinalamento das estruturas sintetizadas.

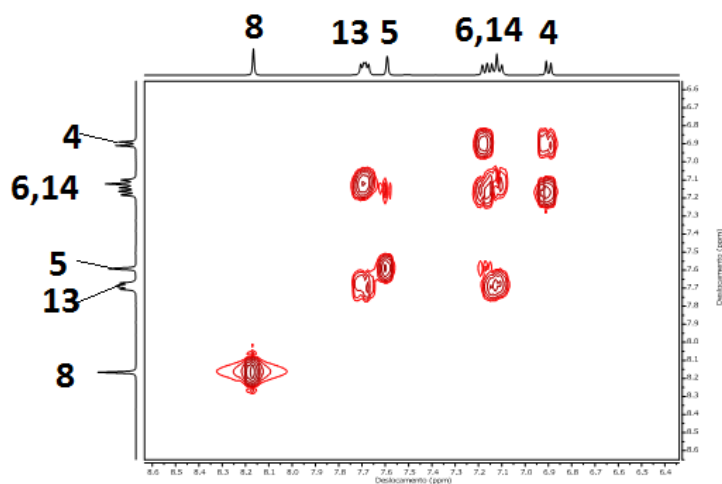


Figura 23 – Espectro bidimensional COSY da molécula NW-F.

Com relação ao espectro de HMBC, observam-se correlações de até 3J como a proximidade entre os hidrogênios e carbonos da parte benzodioxol da molécula: H n° 4 com os carbonos C2 e C7,

o H6 correlacionando com os H2, H8, e H5, e o H5 próximo aos carbonos C6, C8, e C2. O hidrogênio H8 correspondente ao H-C=N se mostra próximo aos H5, H6, e H7. Já a parte fenólica oposta ao benzodioxol apresenta correlações do H14 com os carbonos C12 e C15, e também do H13 com os carbonos C12 e C15. Finalizando, com o espectro de HSQC se tornou possível assinalar os carbonos correspondentes a cada hidrogênio. Os assinalamentos dos carbonos que apresentavam ausência de hidrogênio foram identificados pelo espectro de HMBC.

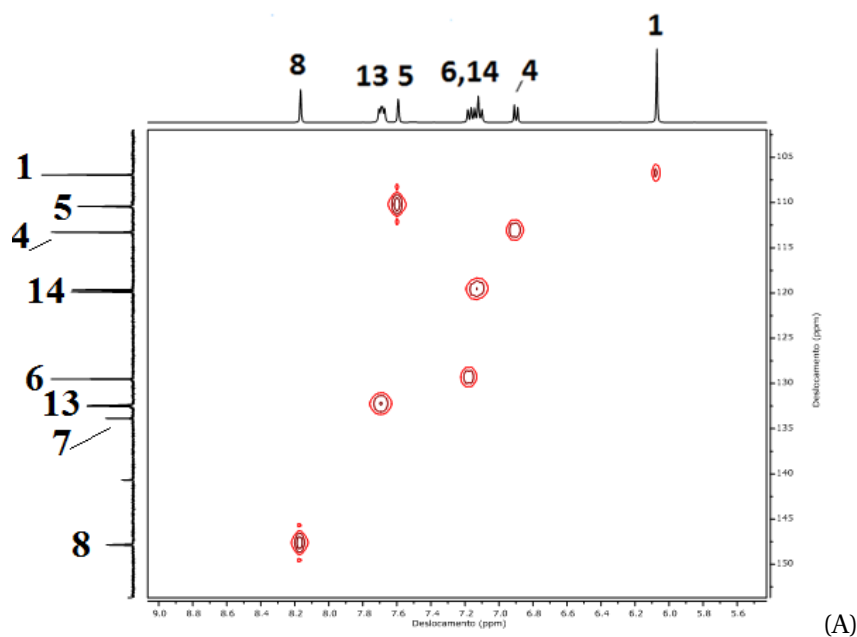


Figura 24 – Espectro bidimensional HSQC da molécula NW-F.

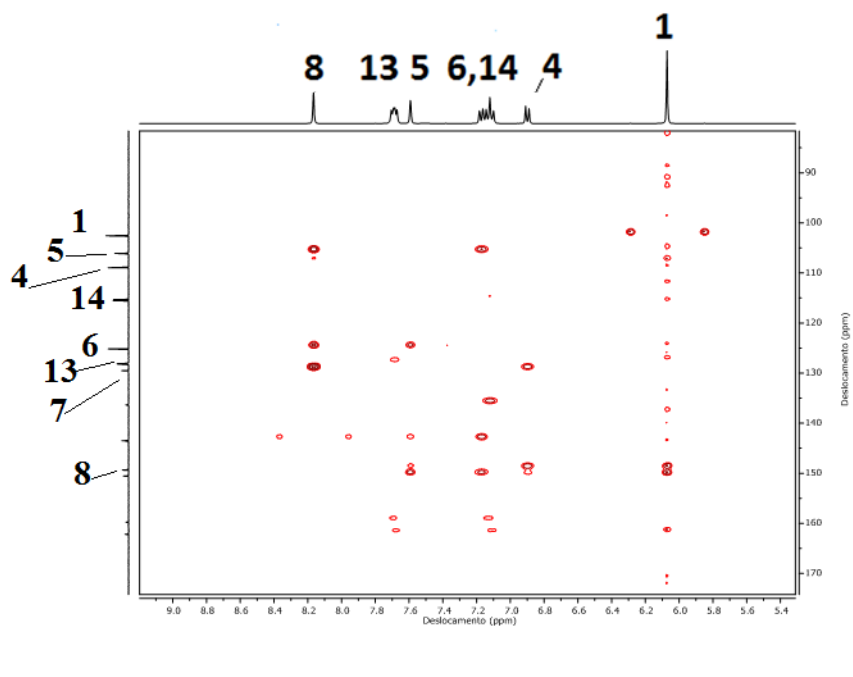


Figura 25 – Espectro bidimensional HMBC da molécula NW-F.

5 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS

5.1 Estudos de interação com a proteína BSA

De todas as moléculas encontradas nos organismos vivos, as proteínas são as mais abundantes e diversas do ponto de vista funcional. Quase todos os processos de vida se baseia nesta classe de moléculas, como por exemplo, a partir de enzimas controla-se o metabolismo, a estrutura formando colágeno nos ossos, e a presença as proteínas contráteis nos músculos. A albumina é a proteína mais abundante nos organismos vertebrados (até 40 mg / ml) e a proteína plasmática mais proeminente (cerca de 60% do teor total de proteínas do plasma). É uma das primeiras proteínas descobertas e mais intensamente estudadas (66). A investigação da amplitude de ligação e mecanismo de interação de pequenas moléculas com albuminas séricas é crucial para a compreensão da farmacodinâmica e farmacocinética do fármaco, uma vez que a natureza ea força dessa interação têm grande influência na absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco (67, 68). Ao abordar a avaliação da afinidade de pequenas moléculas pelas albuminas, a albumina sérica bovina (BSA) é geralmente selecionada como modelo relevante, devido à sua similaridade estrutural com a albumina sérica humana (76%) (69, 70), seu baixo custo e ampla disponibilidade.

Tendo em vista a importância de proteínas plasmáticas no contexto farmacológico, as moléculas obtidas neste trabalho foram submetidas a estudos de interação com a proteína BSA. Figura 26 mostra os espectros do composto AMTAC01 quando sujeito a concentrações de BSA variando de 0 a 9,0 mM. Inspeção visual do espectro revela a mudança nos deslocamentos químicos da molécula, confirmando a interação entre a AMTAC01 e a proteína BSA.

Por exemplo, o sinal relativo ao grupo $N-H_{17}$ (≈ 9.0 ppm) sofre modificações em sua posição revelando que este grupo participa diretamente na interação com a proteína. Levando em conta este sinal, podemos calcular as variações medidas para cada concentração específica de proteína, e o gráfico assume a forma mostrada na Figura 28(A) e (B) para as AMTACs. Para efeito de exemplificação, o mesmo tipo de gráfico foi levantado para o sinal relativo ao grupo NH_{11} dos compostos tiosemicarbazônicos NW-F, NW-NO2 e NW-Cl e são mostrados na Figura 28 (C,D e E).

O gráfico de regressão não linear evidencia a saturação na interação de formação complexo proteína-ligante, à medida em que se adiciona maior quantidade do composto. Isso significa que não há mais pontos de interação na proteína livres, ou seja, todos os sítios de interação estão ocupados interagindo com as drogas analisadas.

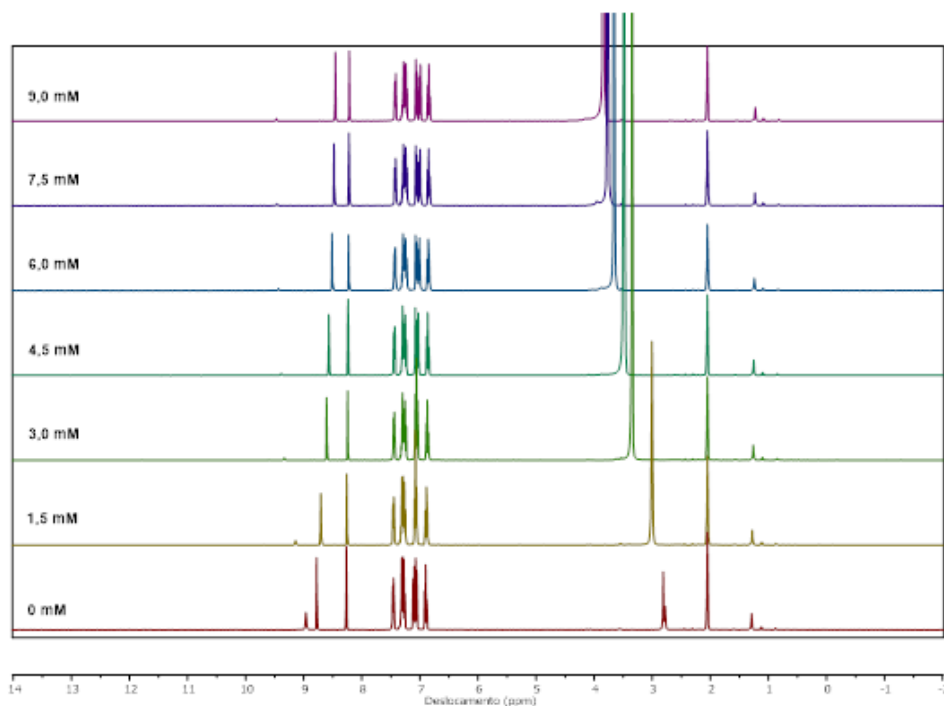


Figura 26 – Efeito da titulação da proteína BSA no espectro de ^1H do composto acridínico AMTAC01, evidenciando os grupos de protons interagindo com a proteína.

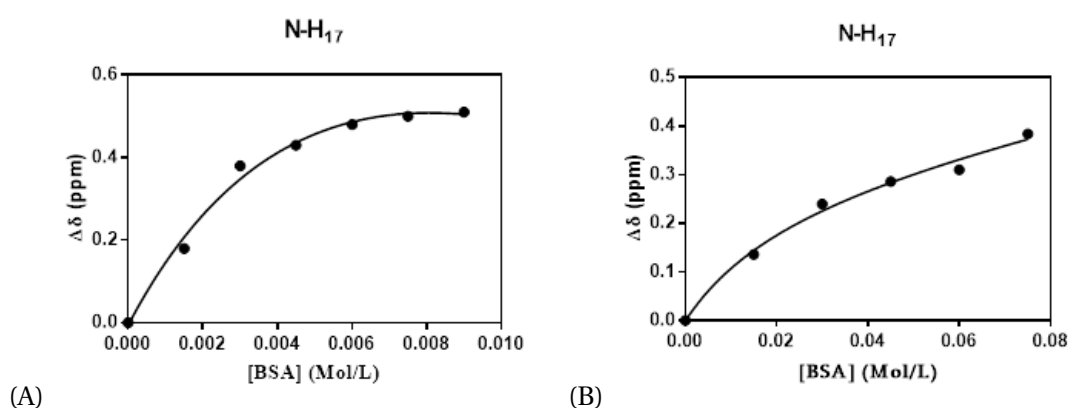


Figura 27 – Regressão não linear para obtenção das constantes de ligação do K_d do composto AMTAC01(A), AMTAC02(B).

As constantes de ligação K_d do complexo acridina-BSA e tiosemicarbazona-BSA foram calculadas a partir dos gráficos mostrados na Figura 28 e os resultados são resumidos na Tabela 4. Como pode ser verificado todos os compostos apresentam constantes na região de alguns milimolar, indicando interações moderadas com a proteína BSA, valores estes recomendados para uma boa disponibilidade deste fármaco do ponto de vista farmacocinético. Entre os compostos acridínicos, Tabela 4 permite nos concluir que o composto AMTAC01 interage em torno de 4 vezes mais fortemente com a BSA que o composto AMTAC02, fato que pode estar atribuído à presença do grupo metoxila na AMTAC 02, diminuindo de certa forma a interação entre a enzima e o composto. Dentre os compos-

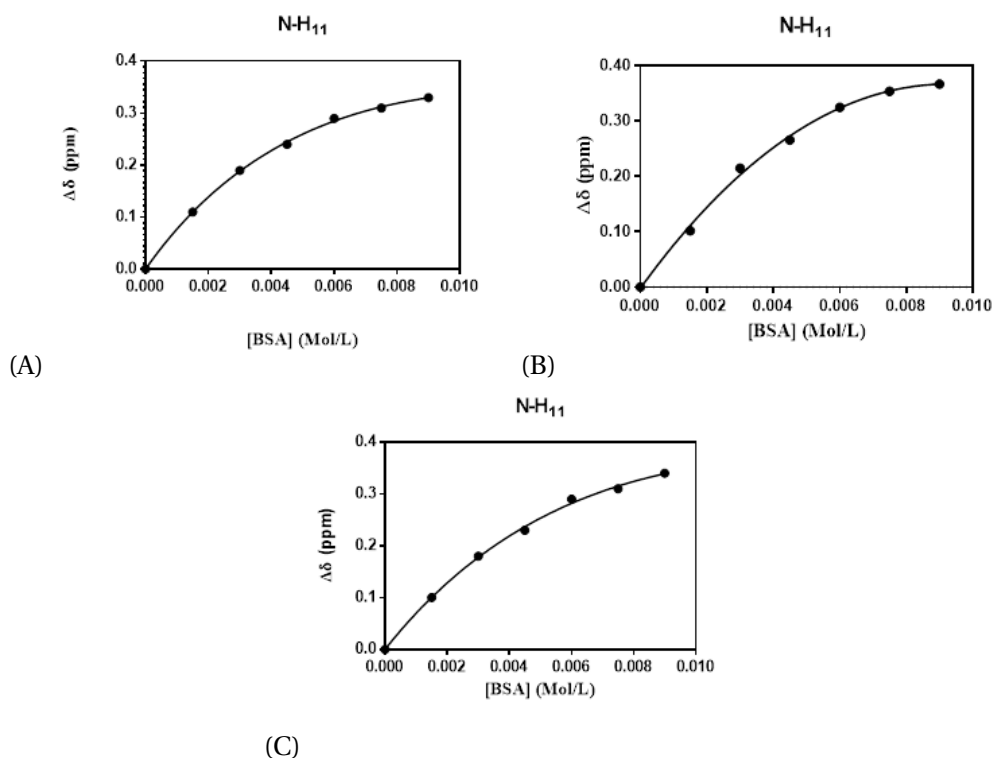


Figura 28 – Regressão não linear para obtenção das constantes de ligação do K_d dos compostos NW-F(A), NW-NO₂(B) e NW-Cl(C) com a proteína BSA.

tos tiosemicarbazônicos podemos concluir que NW-NO₂ interage mais fortemente com a proteína BSA, provavelmente pela presença do grupo NO₂, um forte grupo retirador de elétrons, possibilitando maior interação com áreas privilegiadas eletronicamente. Finalmente é notável que a molécula NW-Cl apresenta a interação mais fraca com a BSA, indicando que a mesma pode apresentar uma maior biodisponibilidade do ponto de vista farmacocinético, quando a mesma é comparada com as outras moléculas obtidas neste trabalho. Sendo assim, nota-se que grupos retiradores de elétrons podem favorecer a interação entre o BSA e os compostos, já grupos doadores de elétrons diminuem a interação analisada.

Tabela 4 – Tabela com as constantes K_d para interação com a proteína BSA

Molécula	K_d (mM)
AMTAC01	1.1
AMTAC02	4.1
NW-F	6.0
NW-NO ₂	2.0
NW-Cl	16.0

5.2 Investigação de interação com cobre

Em comparação a compostos orgânicos, a química inorgânica medicinal oferece oportunidades no design de agentes terapêuticos (71, 72, 73). Diversas potencialidades podem ser exploradas devido ao amplo número de coordenação, geometria, estados redox, características cinéticas e termodinâmicas dos metais. Exemplo deste sucesso no tratamento de várias neoplasias é o caso da cisplatina. Embora este composto seja bastante efetivo no tratamento de câncer, a cura através deste composto tem sido limitada por efeitos colaterais decorrentes da dosagem deste fármaco (74). Além disso o fenômeno de resistência ao tratamento tem encorajado estudos de desenvolvimento de novas drogas (75, 76, 77).

Diante tais desafios, houve um grande estímulo no desenvolvimento de novas estratégias de combate ao câncer baseado em outros metais capazes de fornecer propriedades farmacológicas melhoradas e objetivando diferentes alvos (78). Neste contexto, compostos a base de cobre tem sido extensivamente estudados (79, 80, 81, 82) partindo da premissa que metais endógenos podem ser menos tóxicos para células normais que células tumorais.

Diante da importância desses compostos organometálicos estudos de interação dos compostos obtidos neste trabalho foram feitos com cobre e novamente as constantes de ligação foram determinadas com base na variação dos deslocamentos químicos a medida que cobre foi titulado a estes compostos (Tabela 5). O objetivo desse estudo foi verificar a afinidade entre os compostos e o íon cobre, tendo em vista a presença deste metal no sítio ativo da enzima tirosinase. Embora estes estudos não possam confirmar a formação de um composto de coordenação, os valores de K_d extremamente baixos (nM), evidenciam uma grande afinidade destes compostos ao Cu^{+2} em todos os sítios contendo hidrogênio da molécula, sendo as diferenças dentro da margem de uma ordem de grandeza. Entretanto valores de K_d dentro desta ordem de grandeza (mM), fornecem uma forte evidência de interação destes compostos com o metal e não com outros grupos que compõem a molécula de um receptor.

Tabela 5 – Tabela com as constantes K_d para interação com Cu^{+2} .

Molécula	K_d (nM)
AMTAC01	2.3
AMTAC02	0.9
NW-F	2.8
NW-NO ₂	2.0
NW-Cl	0.2

Ao contrário da resposta de afinidade com a BSA, os compostos obtiveram resultados de forte afinidade, onde os compostos AMTAC 02 e NW-Cl que apresentaram menor compatibilidade com a

BSA em comparação com seus compostos isoestruturais, mostraram maior afinidade. Já a AMTAC 01 que demonstrou maior afinidade com a BSA se comparado com a AMTAC 02, neste caso tem-se o oposto, revelando menor afinidade da mesma com relação ao cobre. Esses resultados são importantes para se prever com antecedência uma possível interação com o sítio ativo da enzima estudada neste trabalho, portanto neste caso a AMTAC 02 e a NW-Cl são dois compostos com possível atividade de forte interação com a tirosinase e consequentemente com forte atividade inibitória.

5.3 Estudos de interação a tirosinase

Diante da importância tecnológica e farmacêutica em obter inibidores para a proteína tirosinase, estudos de interação dos compostos obtidos neste trabalho com a tirosinase foram efetuados por RMN. Diferentemente do que foi feito para os dois casos anteriores (proteína BSA e Cu^{+2}), todas as interações foram mapeadas e um valor de K_d foi atribuído a cada ^1H do ligante. Figura 29 mostra o resultado deste mapeamento para as moléculas de acridina. Analisando os resultados, que a interação destes compostos com a tirosinase se dá de forma difusa, onde diversos prótons participam da interação com a proteína com valores de K_d com valores variando de 10^{-5} a 10^{-8}Mol^{-1} .

Os valores relativos à constante de dissociação da amtac 02 demonstram uma alta afinidade à tirosinase (menor K_d da ordem de 10^{-8} - determinado via deslocamento do grupo metoxila 3.71 ppm), o que pode viabilizar seu uso como um potencial candidato a fármaco. Comparando os valores de K_d com as perceptíveis variações no deslocamentos químicos apresentadas no apêndice E, temos uma proporcionalidade entre estes dois parâmetros, ou seja, quanto maior a diferença de deslocamentos ($\Delta\delta$), menor a constante de dissociação e maior a afinidade entre o composto e a enzima. Tomemos como exemplo os hidrogênios H3 e H12 que demonstraram menor interação com a tirosinase, cujos valores são maiores para a constante de dissociação, já os hidrogênios H18 e H8 possuem maior interação apresentando valores de K_d 10 vezes menores se comparados com os hidrogênios citados anteriormente, devido à forte acidez destes dois hidrogênios citados em relação aos hidrogênios restantes. Como o grupo da metoxila apresentou maior afinidade dentre os demais hidrogênios, é sugestivo que a interação da enzima e a molécula amtac 02 ocorre nesta região. Alguns sinais no espectro de RMN ^1H se encontram sobrepostos ou com alta multiplicidade. Nestes casos não foi possível definir de forma não ambígua uma constante de dissociação para os hidrogênios correspondentes ao assinalamento, devido à imprecisão nos deslocamentos nestes sinais.

Afinidades similares foram obtidas com a molécula AMTAC01, porém diferenças foram observadas na região aromático do hidrogênio H14. AMTAC01 apresentou menor afinidade em comparação com AMTAC 02 nesta região. Este fato pode ser atribuído à ausência da metoxila na AM-

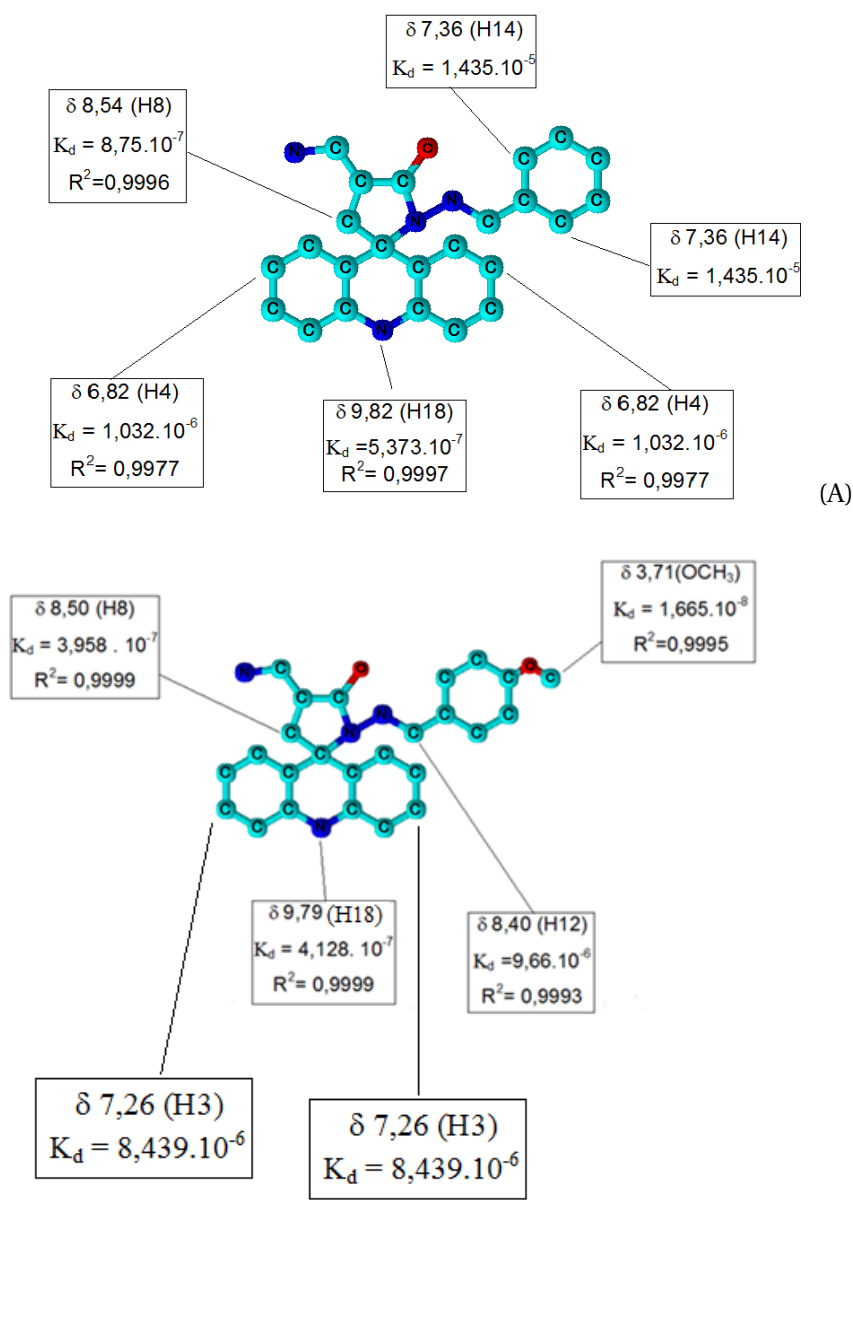


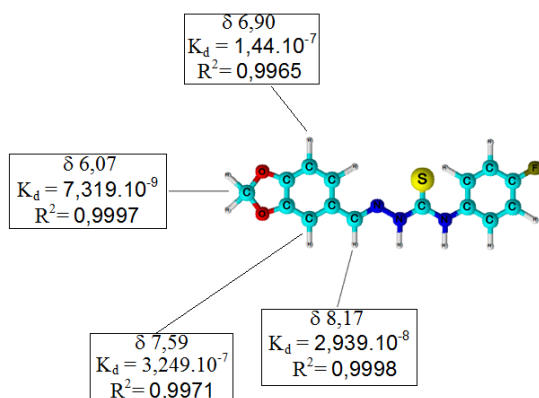
Figura 29 – Mapeamento estrutural das interações de grupos de protons e a proteína tirosinase para as acridinas AMTAC01(A) e AMTAC02(B).

TAC01, deduzindo-se que esse grupo desempenha um papel chave na interação com a tirosinase. Além destes, outras espécies químicas realizarem uma interação efetiva com a tirosinase. Por exemplo, hidrogênios H8 e H18 possuem altos valores de constante de dissociação (da ordem de 10^{-7}). As demais constantes de dissociação apresentaram valores 10-100 vezes maiores do que os hidrogênios anteriormente citados, tendo portanto menor interação com a proteína.

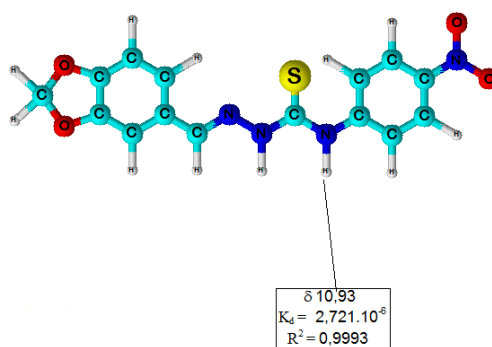
Por outro lado os resultados de mapeamento das interações das tiosemicarbazonas com a proteína tirosinase (Figura 30) revelam certas peculiaridades. A análise minuciosa e comparativa revela a presença de uma forte interação ($K_d = 7.319 \times 10^{-9}$ M) entre o grupo 1-3 benzo-dioxol da NW-F em relação ao mesmo grupo das moléculas NW-NO₂ ($K_d = 1,029 \times 10^{-4}$ M) e NW-Cl ($K_d = 9,253 \times 10^{-6}$ M). Interessantemente esta forte interação presente na molécula NW-F apresenta ordem de grandeza semelhante aos valores obtidos para as interações com cobre (região de nM-Tabela 5), sugerindo uma maior proximidade do grupo 1-3 benzo-dioxol ao centro metálico de cobre na proteína. Analogamente a molécula NW-Cl apresentam porções moleculares que interagem bastante análogas a NW-F, mas com interações menos pronunciadas ($K_d = 10^{-5}$ - 10^{-7} M). Finalmente é visível o número inferior de interações e de menor força ($K_d = 10^{-4}$ - 10^{-6} M) apresentadas pela molécula NW-NO₂ com a proteína tirosinase.

Realizando uma análise comparativa é possível perceber que o composto NW-F apresentou maior interação nas áreas mais distantes do átomo de flúor, pontualmente nos hidrogênios do grupo benzodioxol, indicando um possível efeito eletrônico indireto do flúor com relação à sua capacidade de interagir com o anel aromático fluorado, permitindo maior interação no lado oposto da molécula(83). No caso da NW-Cl tem-se a suposição que a interação mais forte com o sítio ativo da tirosinase ocorre em áreas diferentes, apresentando constantes de dissociação na mesma ordem de grandeza em diversos hidrogênios da molécula. Para a NW-NO₂ os valores de K_d pode nos dizer que a interação acontece no nitrogênio NH₁ 1 do grupo das tiosemicarbazonas, levando a crer que nesta molécula em particular o mecanismo de uma possível interação possa se dar devido à presença deste grupo tiol.

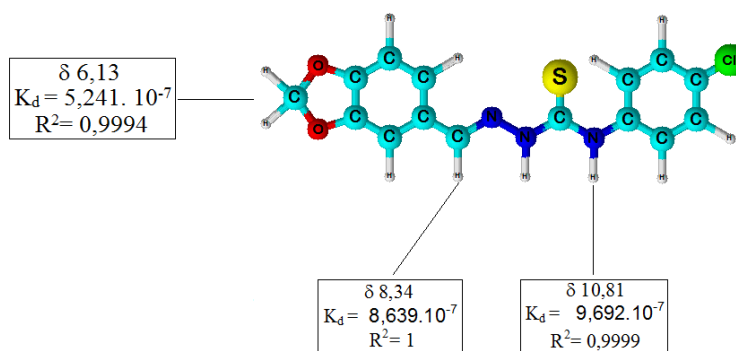
Sob outra perspectiva, na análise realizada não foi possível identificar se houve alguma interação entre a tirosinase e os grupos substituintes das tiosemicarbazonas (Cl, F e NO₂), então é possível que a interação possa ter acontecido pelos grupos citados e os dados coletados não serem suficientes para afirmar este fato. Além disso, alguns picos no RMN ¹H não puderam ser analisados devido à sobreposição de dois ou mais sinais, então alguns hidrogênios que poderiam realizar uma boa interação ligante-receptor não puderam ser identificados.



(A)



(B)



(B)

Figura 30 – Mapeamento estrutural das interações de grupos de protons ds tiosemicarbazonas NW-F (A), NW-NO2 (B), NW-Cl (C) e a proteína tirosinase .

Tabela 6 – Tabela com as constantes K_d para interação com a proteína tirosinase.

Molécula	K_d (μM)
AMTAC01	0.530
AMTAC02	0.016
NW-F	0.007
NW-NO ₂	2.700
NW-Cl	0.520

5.4 Estudo teórico das interações

A abordagem de atracamento molecular (docking molecular) foi usada neste trabalho para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação dos compostos tiosemicarbazônicos e a proteína tirosinase. Estes estudos se dão através de funções que avaliam a quantidade de energia despendida nestas interações (Lybrand, 1995). Tais funções levam em conta algumas variáveis tais como a polaridade da superfície de cada molécula e as suas formas geométricas. Portanto, não basta uma proteína ter a geometria necessária para interagir com um ligante se as energias não são compatíveis. Ou seja, devem-se levar em consideração tanto os locais de ligação de cada proteína como as energias destas interações. Esse processo de ancoramento molecular pode ser simulado por diferentes softwares, tais como o AutoDock 3.0 (84), DOCK (85), HEX (86) e HADDOCK (87).

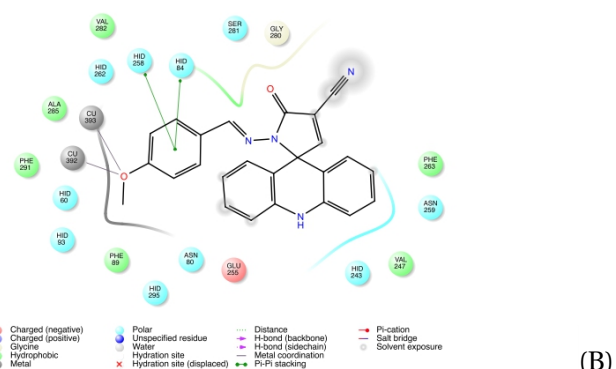
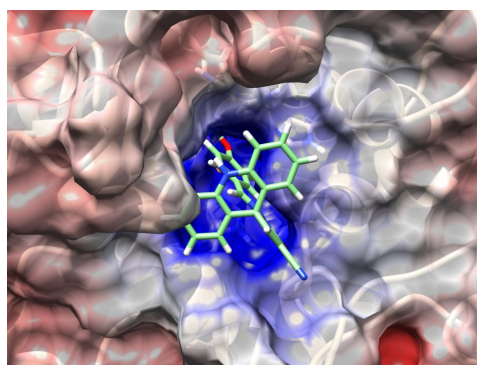
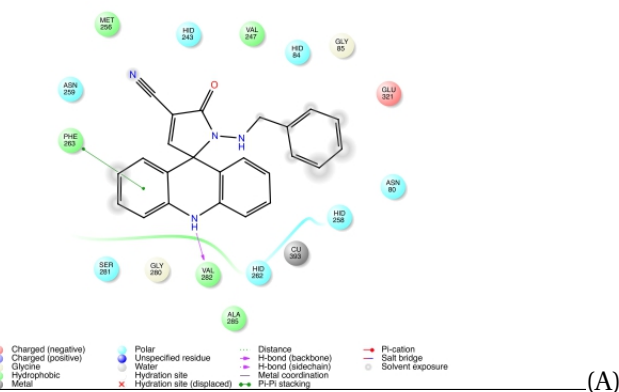
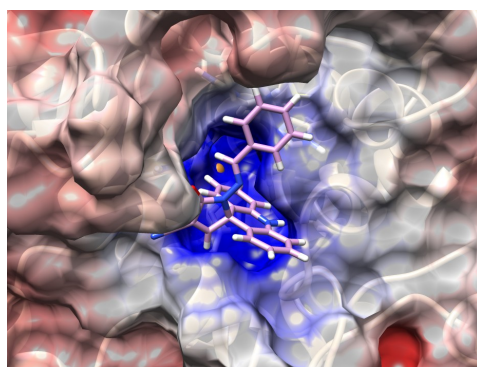


Figura 31 – Resultados de ancoramento molecular dos compostos acridínicos AMTAC01 (A) e AMTAC02 (B) à proteína tirosinase.

Figura 31 mostra as estruturas mais representativas obtidas pelo procedimento de ancoramento das acridinas a proteína tirosinase. Como pode ser verificados ambas proteínas apresentam modos distintos de ligação ao sítio ativo da enzima, onde o composto AMTAC01 interage com o sítio ativo da tirosinase via porção do anel acridínico Figura 31 (A), enquanto o composto AMTAC02 via grupo metoxila da porção benzênica (Figura 31 B), corroborando com o estudo de interação com íons cobre realizado previamente. Além disso, de acordo com estes resultados, o oxigênio da metoxila no composto AMTAC02 estaria coordenado ao cobre da enzima enquanto nenhuma ligação de coordenação estaria previsto para o composto AMTAC01.

Analogamente, Figura 32 mostra estruturas de menor energia (esquerda), assim como suas interações detalhadas (direita), dos complexos tiosemicarbazonas- tirosina, revelando alguns aspectos interessantes desta interação. Pode ser facilmente observado pelas estruturas geradas, que para todos os casos as moléculas de tiosemicarbazonas interagem com o sítio de metalo-proteico pela lado da porção benzo-dioxol destes compostos, ficando a porção restante da molécula exposta ao solvente, corroborando os resultados experimentais de interação (Figura 30). Embora a molécula NW-F não possua nenhuma ligação tipo π stacking com a proteína, a grande proximidade com o centro metálico e o grande número de interações polares estabilizam de forma efetiva a molécula no sítio ativo da proteína.

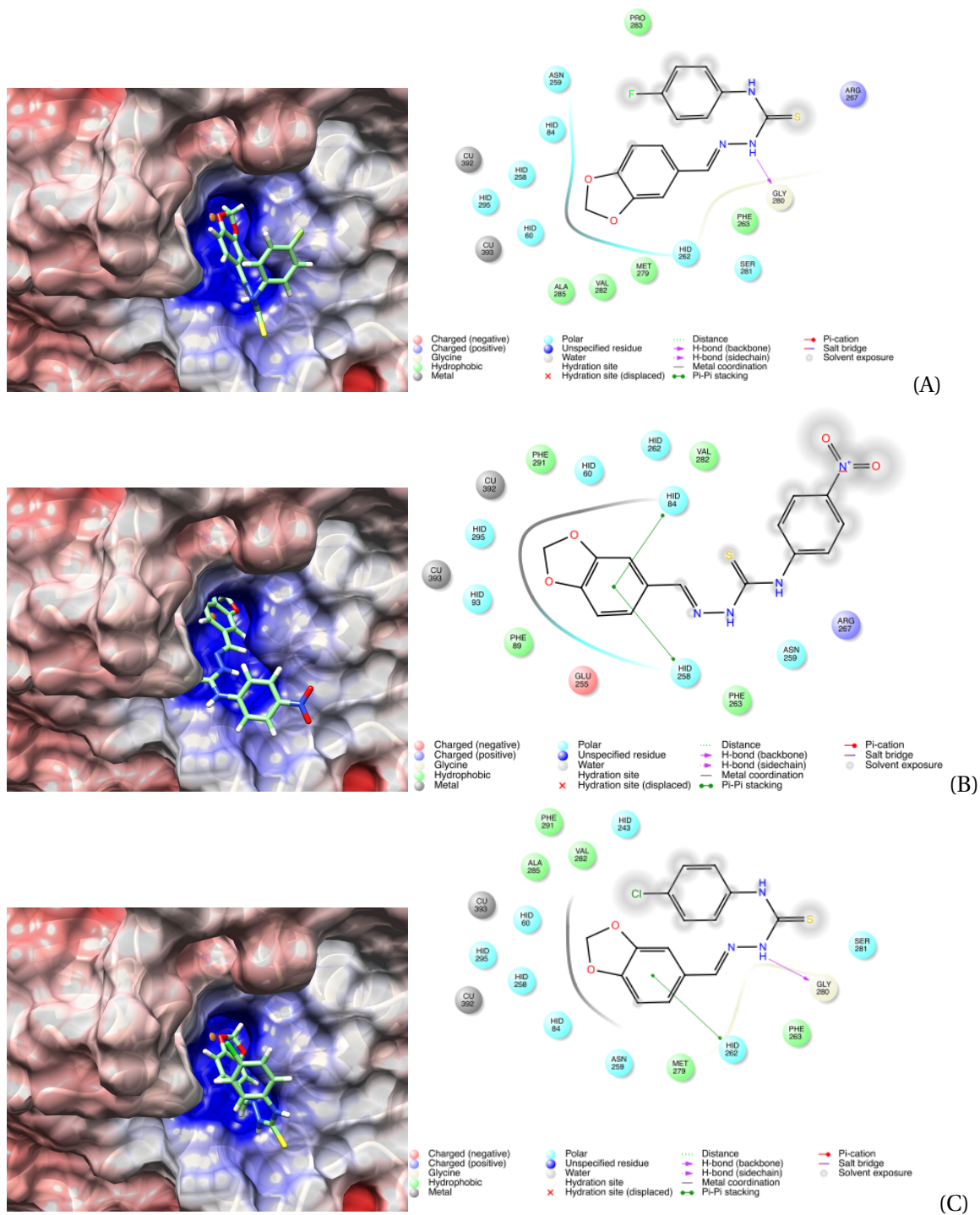


Figura 32 – Resultados de ancoramento molecular das tiosemicarbazonas NW-F(A), NW-NO₂(B) e NW-Cl(C) à proteína tirosinase.

6 ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Uma reação química é inerentemente acompanhada por mudanças na estrutura eletrônica das moléculas envolvidas e estas alterações podem ser detectadas diretamente, na maioria dos casos via métodos espectroscópicos. Nos casos mais simples, as medidas das propriedades óticas dos produtos e substratos serão feitas de forma independente.. Em tais casos, a formação do produto ou o consumo do substrato pode ser medida em tempo real, isto é, uma "curva de progresso" pode ser facilmente determinada. A magnitude da absorvância - ou, no caso da fluorescência, a intensidade da luz emitida - é linearmente proporcional à concentração da molécula absorvedora ou emissora de luz. Com base nessa linearidade, as variações na concentração do produto (ou do substrato) podem ser monitoradas em tempo real. Tendo em vista que o produto da reação enzimática da tirosinase é o composto dopaquinona e que este composto absorve radiação em 475 nm, não houve problema em obter uma curva de progresso para atividade enzimática da tirosinase (Figura 33), usando espectroscopia na região do UV-vis.

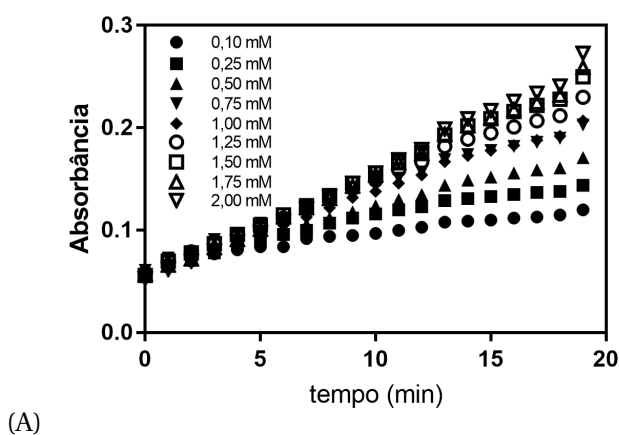


Figura 33 – Estudo cinético da atividade enzimática da tirosinase frente ao substrato natural L-dopa, mostrando a conversão deste substrato ao produto dopaquinona para diferentes concentrações de substrato.

Em casos mais complexos onde produtos e ou substratos não possuem propriedades espectroscópicas mensuráveis, existe ainda uma oportunidade para o monitoramento cinético de uma reação enzimática via métodos indiretos. Neste contexto, o procedimento se baseia em levar o produto a sofrer uma segunda reação química instantânea (não necessariamente enzimática) e que resulte em um composto opticamente ativo (absorvedor de luz ou fluorescente). Adicionalmente, se a segunda reação química é compatível com as condições físico-químicas da reação enzimática de interesse (pH, temperatura, etc.) e o seu produto não interfere com a atividade da enzima, esta abordagem

mais complexa também pode estabelecer uma medição em tempo real. Por outro lado, se a segunda reação não é compatível com a reação enzimática, a abordagem do tempo final pode ser aplicada ao invés da determinação em tempo real. Em tais casos, a reação enzimática é normalmente iniciada num volume relativamente grande e alíquotas são retiradas da reação em diferentes intervalos de tempo. Estas alíquotas são tratadas para parar imediatamente a reação enzimática (normalmente por aplicação de pH ou temperatura extremos, ou reagentes de desnaturação de proteínas fortes, por exemplo, ácido tricloroacético) e depois a segunda reação química de geração de sinal é realizada.

6.1 Obtendo os parâmetros cinéticos da tirosinase

Como prelúdio para determinação dos parâmetros cinéticos da enzima, é necessário determinar a velocidade inicial da reação. para tal tarefa a reação é iniciada pela adição do substrato ou da enzima à solução e, após mistura completa da amostra, a detecção é iniciada o mais rapidamente possível. Durante a reação enzimática, a concentração do substrato diminui gradualmente ao longo do tempo. Dessa forma, a medição da velocidade inicial deve ser realizada de modo a que a diminuição na concentração do substrato seja negligenciável. Isto é importante devido ao fato que a diminuição da concentração do substrato é acompanhada por uma diminuição da velocidade de reação (inclinação da reta tangente a curva de progresso). Como pode ser verificado na Figura 33, em altas concentrações de substrato, a curva de progresso é aproximadamente linear; Enquanto que em baixas concentrações de substrato, a velocidade inicial é quase independente da concentração do substrato L-dopa. Visando a determinação das velocidades iniciais com erros inferiores a 10%, usamos como regra geral, medidas de concentrações do produto durante o período que a concentração do substrato Ldopa não diminua mais de 10%. Além disso, para a determinação precisa dos parâmetros, os valores de concentração do substrato devem cobrir uma ampla faixa. Naturalmente, desde que não haja estimativa sobre o valor do K_M , deve ser realizada uma amostragem iterativa de tentativa e erro do intervalo certo. Uma vez que o K_M é estimado, as medições devem ser definidas de modo que os valores pré-ajustados de concentração de substrato cubram a região de aproximadamente $0,2-5 K_M$ com pelo menos 8 concentrações de substrato uniformemente colocadas.

Uma vez determinada as velocidades iniciais para cada concentração de substrato é possível plotar as curvas de Michaelis-Mentem e Lineweaver-Burk. Figura 34 mostra os gráficos resultantes, mostrando o comportamento típico de curvas deste tipo com pontos dispersos na faixa apropriada para determinação dos parâmetros cinéticos. e Após os procedimentos de ajustes não linear (Michaelis-Mentem) ou linear (lineweaver-Burk) foram determinados os principais parâmetros cinéticos, $V_{max}=0,012$ e $K_M=0,37$. Finalmente o parâmetro $K_{cat}=V_{max}/E_T= 1714,28$ foi calculado. Estes parâmetros foram calculados com o intuito de padronizar o experimento, validando a atividade da

enzima tirosinase sem a adição de possíveis inibidores para posteriormente se fazer a comparação da atividade inibitória com a atividade de catálise da enzima natural.

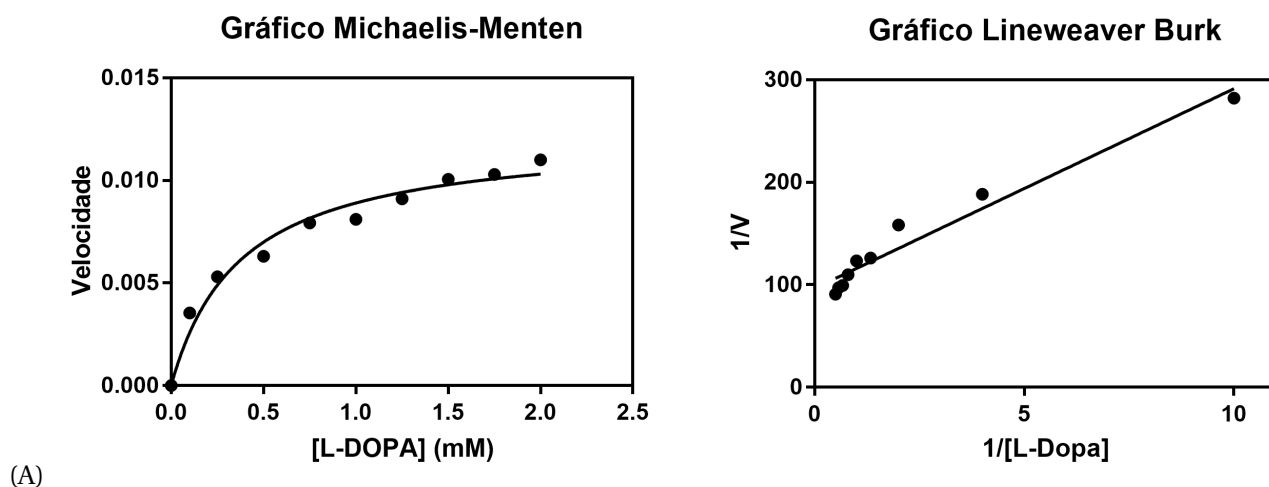


Figura 34 – Curva de Michaelis-Menten e gráfico de Lineweaver Burk. Através destes gráficos foi possível determinar as constantes $K_M = 0,37 \text{ M}$ e $V_{max} = 0,012 \text{ s}^{-1}$ da enzima tirosinase.

6.2 Avaliação da atividade inibitória

Diante da grande afinidade apresentada pelos compostos obtidos neste trabalho a tirosinase, foi também testado a capacidade de inibição desta enzima com o composto acridínico AMTAC01. Figura 36 mostra o efeito de inibição da atividade enzimática da tirosinase pelo composto AMTAC01. Assumindo um ajuste não linear para o comportamento da curva, foi possível concluir que a AMTAC01 inibiu a enzima com uma dose resposta $IC_{50}(\text{AMTAC01}) = 8.8 \times 10^{-8} \text{ M}$.

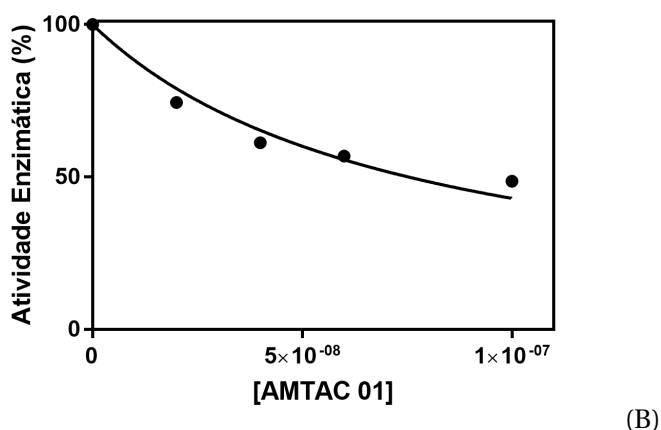


Figura 35 – Efeito inibitorio da atividade enzimática usando a acridina AMTAC01.

Para efeito de comparação estudos de inibição foram conduzidos também com o inibidor comercial da tirosinase (ácido kójico). A partir destes resultados (Figura 36) foi determinado o IC_{50} (kójico)

$= 2.0 \times 10^{-8} \text{M}$. Dessa forma o composto AMTAC01 executa a inibição da enzima na mesma ordem de grandeza que o ácido kójico o que qualifica o composto AMTAC01 como um potente inibidor da enzima.

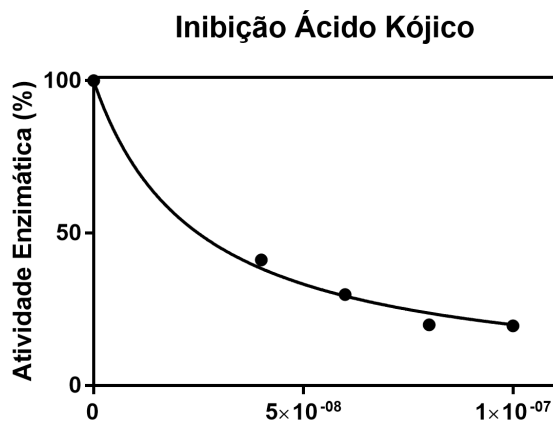


Figura 36 – Efeito inibitorio da atividade enzimática usando o inibidor natural ácido kójico.

7 CONCLUSÕES

Compostos acridínicos e tiosemicarbazônicos foram sintetizados e estruturalmente caracterizados usando não somente a ressonância magnética nuclear unidimensional. Diante da complexidade estrutural das moléculas apresentadas neste trabalho foi necessário lançar mão de técnicas de RMN bidimensionais (^1H , ^{13}C , espectroscopia de correlação homonuclear COSY, espectroscopia de correlação heteronuclear HSQC, HMBC). No caso dos compostos acridínicos observou-se uma ciclização espontânea da estrutura química e no caso das tiosemicarbazonas comprovou as estruturas propostas.

Estudos de interação dos compostos obtidos nessa dissertação com a proteína BSA, revelaram os compostos sintetizados apresentam interações moderadas com a proteína BSA, o que viabiliza sua biodisponibilidade do ponto de vista farmacocinético.

Embora os estudos de interação dos compostos obtidos com Cu^{+2} via NMR fornece evidência da formação de compostos de coordenação, valores obtidos de constante de ligação para estes sistemas mostraram-se bastante proveitoso para inferir aspectos estruturais da interação com a proteína tirosinase.

Estudos de interação com a proteína tirosinase evidenciaram a grande afinidade da tiosemicarbazona NW-F pela enzima tirosinase, quando comparada aos outros compostos obtidos nesta dissertação. Finalmente resultados de modelagem destas interações não somente corroboraram os resultados experimentais, mas também permitiu uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos envolvidos nestas interações, fornecendo explicações qualitativas dos resultados obtidos experimentalmente.

A grande afinidade dos compostos motivou testes de inibição de atividade enzimática da tirosinase. Resultados mostraram uma potente inibição da atividade enzimática pela AMTAC01, sendo comparável em ordem de grandeza ao inibidor comercial ácido kójico. Sendo assim, os resultados apresentados nesta dissertação mostra também o papel promissor destes compostos frente a inibição de enzimas envolvidas em neoplasias, contribuindo de forma significativa no desenvolvimento de drogas para esta finalidade. Como perspectiva futura temos a análise da atividade inibitória dos demais compostos sintetizados, visando a efetiva ação dos mesmos como potencial inibidor da tirosinase.

Referências

- 1 LI, S. et al. Stacking interactions and dna intercalation. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 113, n. 32, p. 11166–11172, 2009.
- 2 SÁNCHEZ-FERRER, Á. et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, Elsevier, v. 1247, n. 1, p. 1–11, 1995.
- 3 CHEN, J. S.; WEI, C. I.; MARSHALL, M. R. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ACS Publications, v. 39, n. 11, p. 1897–1901, 1991.
- 4 KUBO, I.; KINST-HORI, I. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *Journal of agricultural and food chemistry*, ACS Publications, v. 47, n. 10, p. 4121–4125, 1999.
- 5 CHO, S. J. et al. N-benzylbenzamides: a new class of potent tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Elsevier, v. 16, n. 10, p. 2682–2684, 2006.
- 6 YI, W. et al. Refinement of arylthiosemicarbazone pharmacophore in inhibition of mushroom tyrosinase. *European journal of medicinal chemistry*, Elsevier, v. 46, n. 9, p. 4330–4335, 2011.
- 7 LOBANA, T. S. et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals: an overview. *Coordination Chemistry Reviews*, Elsevier, v. 253, n. 7, p. 977–1055, 2009.
- 8 LOUNNAS, V. et al. Current progress in structure-based rational drug design marks a new mindset in drug discovery. *Computational and structural biotechnology journal*, Elsevier, v. 5, n. 6, p. 1–14, 2013.
- 9 BLUNDELL, T. L. et al. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, The Royal Society, v. 361, n. 1467, p. 413–423, 2006.
- 10 VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Quím. Nova*, SciELO Brasil, v. 28, n. 1, p. 95–102, 2005.
- 11 LEACH, A. R. *Molecular modelling: principles and applications*. [S.l.]: Pearson education, 2001.
- 12 DUNN, M. F. Protein–ligand interactions: general description. *eLS*, Wiley Online Library, 2007.
- 13 FRAGA, C. A. M. Razões da atividade biológica: Interações micro-e biomacro-moléculas. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 3, p. 33–42, 2001.
- 14 GARCÍA-BORRÓN, J. C.; SOLANO, F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Research*, Wiley Online Library, v. 15, n. 3, p. 162–173, 2002.
- 15 DOUGHERTY, D. A. The cation- π interaction. *Accounts of chemical research*, ACS Publications, v. 46, n. 4, p. 885–893, 2012.
- 16 DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions involving aromatic amino acids. *The Journal of nutrition*, Am Soc Nutrition, v. 137, n. 6, p. 1504S–1508S, 2007.

- 17 GUNG, B. W.; AMICANGELO, J. C. Substituent effects in c6f6 c6h5x stacking interactions. *The Journal of organic chemistry*, ACS Publications, v. 71, n. 25, p. 9261–9270, 2006.
- 18 HAAS, K. L.; FRANZ, K. J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 109, n. 10, p. 4921–4960, 2009.
- 19 BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. de P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. *Química Nova*, POLIMERO ISOLUVEL, v. 30, n. 8, p. 2062, 2007.
- 20 ADAMSON, A. *A textbook of physical chemistry*. [S.l.]: Elsevier, 2012.
- 21 TANG, Y. Examination of molecular recognition in protein-ligand interactions. 2010.
- 22 OLSSON, T. S. et al. The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: insights for ligand design. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 384, n. 4, p. 1002–1017, 2008.
- 23 BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 32, n. 1, p. 335–373, 2003.
- 24 BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. The michaelis-menten model accounts for the kinetic properties of many enzymes. *Biochemistry*, WH Freeman New York, p. 319–330, 2002.
- 25 VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentals of biochemistry*. [S.l.]: Wiley New York, 1999.
- 26 ESPÍN, J. C. et al. Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochemical journal*, Portland Press Limited, v. 331, n. 2, p. 547–551, 1998.
- 27 YAMASAKI, K. et al. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Elsevier, v. 1830, n. 12, p. 5435–5443, 2013.
- 28 NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances–nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, Elsevier, v. 14, p. 53–71, 2013.
- 29 KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, The Pharmaceutical Society of Japan, v. 25, n. 6, p. 695–704, 2002.
- 30 ERCELEN, S. et al. The binding of novel two-color fluorescence probe fa to serum albumins of different species. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, v. 35, n. 5, p. 231–242, 2005.
- 31 PATTERSON, J. E.; GELLER, D. M. Bovine microsomal albumin: amino terminal sequence of bovine proalbumin. *Biochemical and biophysical research communications*, Elsevier, v. 74, n. 3, p. 1220–1226, 1977.
- 32 SUDLOW, G.; BIRKETT, D.; WADE, D. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular pharmacology*, ASPET, v. 12, n. 6, p. 1052–1061, 1976.
- 33 KHODARAHMI, R. et al. Comparative spectroscopic studies on drug binding characteristics and protein surface hydrophobicity of native and modified forms of bovine serum albumin: possible relevance to change in protein structure/function upon non-enzymatic glycation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier, v. 89, p. 177–186, 2012.
- 34 JR, T. P. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. [S.l.]: Academic press, 1995.

- 35 KOVAL, I. A. et al. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry, v. 35, n. 9, p. 814–840, 2006.
- 36 DECKER, H. et al. Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*, Elsevier, v. 398, n. 1, p. 183–191, 2007.
- 37 BOYLE, J. L. et al. Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors: an immunohistochemical study. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 126, n. 7, p. 816–822, 2002.
- 38 ZAIDI, K. U.; ALI, A. S.; ALI, S. A. Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme research*, Hindawi Publishing Corporation, v. 2014, 2014.
- 39 INOUE, T.; SHIOTA, Y.; YOSHIZAWA, K. Quantum chemical approach to the mechanism for the biological conversion of tyrosine to dopaquinone. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 130, n. 50, p. 16890–16897, 2008.
- 40 CHANG, T.-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, Molecular Diversity Preservation International, v. 10, n. 6, p. 2440–2475, 2009.
- 41 LEE, K.-C. et al. Structural characteristics of thiosemicarbazones as inhibitors of melanogenesis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Elsevier, v. 20, n. 22, p. 6794–6796, 2010.
- 42 ZOUBI, W. A. Biological activities of schiff bases and their complexes: a review of recent works. *International Journal of Organic Chemistry*, Scientific Research Publishing, v. 2013, 2013.
- 43 BALASUBRAMANIAN, K. et al. Synthesis, characterization, electro chemistry, catalytic and biological activities of ruthenium (iii) complexes with bidentate n, o/s donor ligands. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier, v. 65, n. 3, p. 678–683, 2006.
- 44 ORYSYK, S. et al. Synthesis, structural and spectral characterization of zn (ii) complexes, derived from thiourea and thiosemicarbazide. *Inorganica Chimica Acta*, Elsevier, v. 382, p. 127–138, 2012.
- 45 FONSECA, A. d. S. *Síntese e caracterização de ligantes nitrogenados derivados de isatina, 4-benziltiossemicarbazida e seus complexos com metais d¹⁰*. Dissertação (Mestrado), 2009.
- 46 MICHAUD, R.; SARTORELLI, A. Antitumor and metal-coordinating activities of the thiosemicarbazone, semicarbazone and guanyldihydrazone of 1-formylisoquinoline. In: *Abstract of the American Chemical Society Meeting. San Francisco, California*. [S.l.: s.n.], 1968. v. 54.
- 47 SARTORELLI, A. C. et al. Characterization of the biochemical mechanism of action of α -(n)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Advances in enzyme regulation*, Elsevier, v. 15, p. 117–139, 1977.
- 48 KAUR, S.; ALI, B. Effect of anti-inflammatory thiosemicarbazone indoles on hyaluronidase, acid phosphatase and trypsin. *Pharmacology*, Karger Publishers, v. 24, n. 3, p. 162–168, 1982.
- 49 EL-FAHAM, A. et al. Synthesis, characterization, and anti-cancer activity of some new n-(2-oxindolin-3-ylidene)-2-propylpentane hydrazide-hydrazones derivatives. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 20, n. 8, p. 14638–14655, 2015.
- 50 DOMAGK, G. et al. thoe eine neue gegen tuberkelbazillen in vitro wirksame verbindungsklasse. *Natundssenschuften*, 33, v. 315, 1946.
- 51 DOMAGK, G. et al. Investigations on the antituberculous activity of the thiosemicarbazones in vitro and in vivo. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, v. 61, n. 1, p. 8–19, 1950.

- 52 BEHNISCH, R. et al. Chemical studies on thiosemicarbazones with particular reference to antituberculous activity. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, v. 61, n. 1, p. 1–7, 1950.
- 53 DOBEK, A. et al. Inhibition of clinically significant bacterial organisms in vitro by 2-acetylpyridine thiosemicarbazones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 18, n. 1, p. 27–36, 1980.
- 54 BHARTI, S. K. et al. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel schiff bases containing 2, 4-disubstituted thiazole ring. *European journal of medicinal chemistry*, Elsevier, v. 45, n. 2, p. 651–660, 2010.
- 55 JR, C. S. et al. Antiviral activity of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones against herpes simplex virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, American Society for Microbiology (ASM), v. 19, n. 4, p. 682, 1981.
- 56 AGUIRRE, G. et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite trypanosoma cruzi of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, Elsevier, v. 12, n. 18, p. 4885–4893, 2004.
- 57 BROCKMAN, R. W. et al. Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. *Cancer research*, AACR, v. 16, n. 2, p. 167–170, 1956.
- 58 HUANG, H. et al. A series of α -heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones inhibit topoisomerase α catalytic activity. *Journal of medicinal chemistry*, ACS Publications, v. 53, n. 8, p. 3048–3064, 2010.
- 59 ELMORE, R. H.; WADKINS, R. M.; GRAVES, D. E. Cooperative binding of m-amsa to nucleic acids. *Nucleic acids research*, Oxford Univ Press, v. 16, n. 20, p. 9707–9719, 1988.
- 60 KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a topoisomerase ii poison: importance of drug-dna interactions. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 51, n. 8, p. 1730–1739, 2012.
- 61 BARROS, F. W. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, Elsevier, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.
- 62 PINEIRO, A. et al. On the characterization of host-guest complexes: surface tension, calorimetry, and molecular dynamics of cyclodextrins with a non-ionic surfactant. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, n. 17, p. 4383–4392, 2007. PMID: 17428087. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp0688815>>.
- 63 SANTO, M.; FOX, M. A. Hydrogen bonding interactions between starburst dendrimers and several molecules of biological interest. *Journal of Physical Organic Chemistry*, John Wiley Sons, Ltd., v. 12, n. 4, p. 293–307, 1999. ISSN 1099-1395. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1395\(199904\)12:4<293::AID-POC88>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1395(199904)12:4<293::AID-POC88>3.0.CO;2-Q)>.
- 64 HU, J. et al. Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes. 2. effects of molecular properties of guests and surface functionalities of dendrimers. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, n. 31, p. 10650–10659, 2009. PMID: 19603764. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp9047055>>.
- 65 ALMEIDA, S. M. V. de et al. Synthesis, dna binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. *International journal of molecular sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 16, n. 6, p. 13023–13042, 2015.

- 66 PUTNAM, F. W. Foreword. In: PETERS, T. (Ed.). *All About Albumin*. San Diego: Academic Press, 1995. p. xi – xiii. ISBN 978-0-12-552110-9. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125521109500003>>.
- 67 LIU, H. et al. Transition metal complexes of 2, 6-di ((phenazonyl-4-imino) methyl)-4-methylphenol: Structure and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 5, p. 1638 – 1647, 2011. ISSN 0223-5234. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523411001206>>.
- 68 SATHYADEVI, P. et al. Studies on the effect of metal ions of hydrazone complexes on interaction with nucleic acids, bovine serum albumin and antioxidant properties. *Inorganica Chimica Acta*, v. 384, p. 83 – 96, 2012. ISSN 0020-1693. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169311009595>>.
- 69 URQUIZA, N. M. et al. Antioxidant activity of methimazoleâcopper(ii) bioactive species and spectroscopic investigations on the mechanism of its interaction with bovine serum albumin. *Polyhedron*, v. 31, n. 1, p. 530 – 538, 2012. ISSN 0277-5387. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538711006231>>.
- 70 XIANG, Y.; WU, F. Study of the interaction between a new schiff-base complex and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 77, n. 2, p. 430 – 436, 2010. ISSN 1386-1425. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138614251000301X>>.
- 71 HAMBLEY, T. J. *Chem Soc Dalton Trans.*, v. 2007, p. 4929, 2007.
- 72 ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chemical Reviews*, ACS Publications, v. 99, n. 9, p. 2201–2204, 1999.
- 73 THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Transactions*, Royal Society of Chemistry, n. 6, p. 761–764, 2006.
- 74 JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced dna damage. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 107, n. 5, p. 1387–1407, 2007.
- 75 BOULIKAS, T. et al. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Ther*, v. 5, p. 537–583, 2007.
- 76 ZUTPHEN, S. van; REEDIJK, J. Targeting platinum anti-tumour drugs: Overview of strategies employed to reduce systemic toxicity. *Coordination chemistry reviews*, Elsevier, v. 249, n. 24, p. 2845–2853, 2005.
- 77 GUST, R. et al. Optimization of cisplatin for the treatment of hormone dependent tumoral diseases: Part 1: use of steroidal ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, Elsevier, v. 253, n. 21, p. 2742–2759, 2009.
- 78 BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current opinion in chemical biology*, Elsevier, v. 12, n. 2, p. 197–206, 2008.
- 79 TISATO, F. et al. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev*, v. 30, n. 4, p. 708–749, 2010.
- 80 MARZANO, C. et al. Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, Bentham Science Publishers, v. 9, n. 2, p. 185–211, 2009.

- 81 TARDITO, S.; MARCHIO, L. Copper compounds in anticancer strategies. *Current medicinal chemistry*, Bentham Science Publishers, v. 16, n. 11, p. 1325–1348, 2009.
- 82 DUNCAN, C.; WHITE, A. R. Copper complexes as therapeutic agents. *Metallomics*, Royal Society of Chemistry, v. 4, n. 2, p. 127–138, 2012.
- 83 ZHOU, P. e. a. Fluorine bonding: How does it work in protein–ligand interactions? *Journal of chemical information and modeling*, 2009.
- 84 GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. *Journal of Molecular Recognition*, Wiley Online Library, v. 9, n. 1, p. 1–5, 1996.
- 85 OSHIRO, C. M.; KUNTZ, I. D.; DIXON, J. S. Flexible ligand docking using a genetic algorithm. *Journal of computer-aided molecular design*, Springer, v. 9, n. 2, p. 113–130, 1995.
- 86 RITCHIE, D. W.; KEMP, G. J. Protein docking using spherical polar fourier correlations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, v. 39, n. 2, p. 178–194, 2000.
- 87 BONVIN, A. M. Flexible protein–protein docking. *Current opinion in structural biology*, Elsevier, v. 16, n. 2, p. 194–200, 2006.

Apêndice A – Espectros da caracterização por RMN da NW- Cl

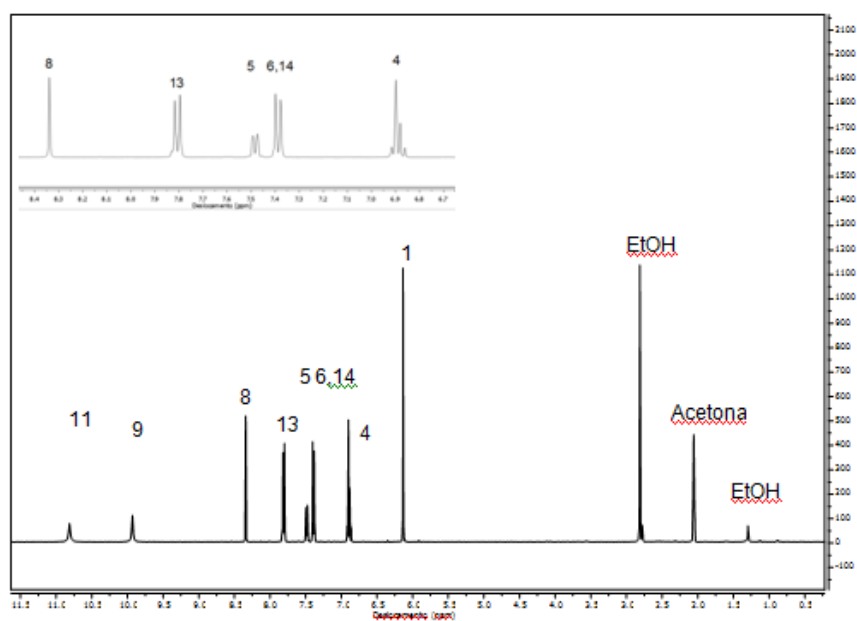
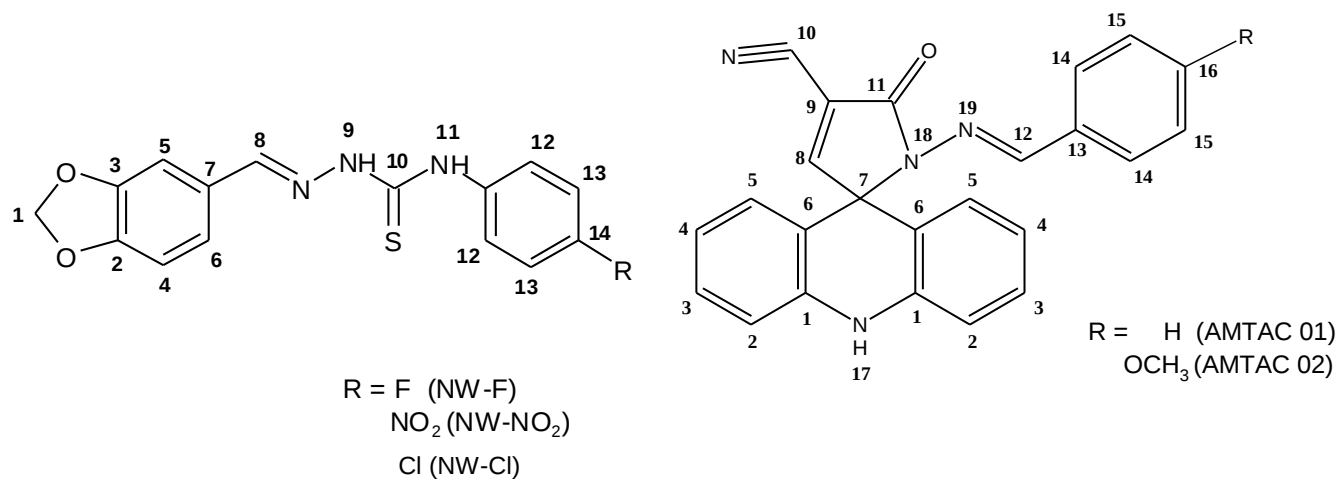


Figura A1. Espectro de RMN ¹H da NW-Cl

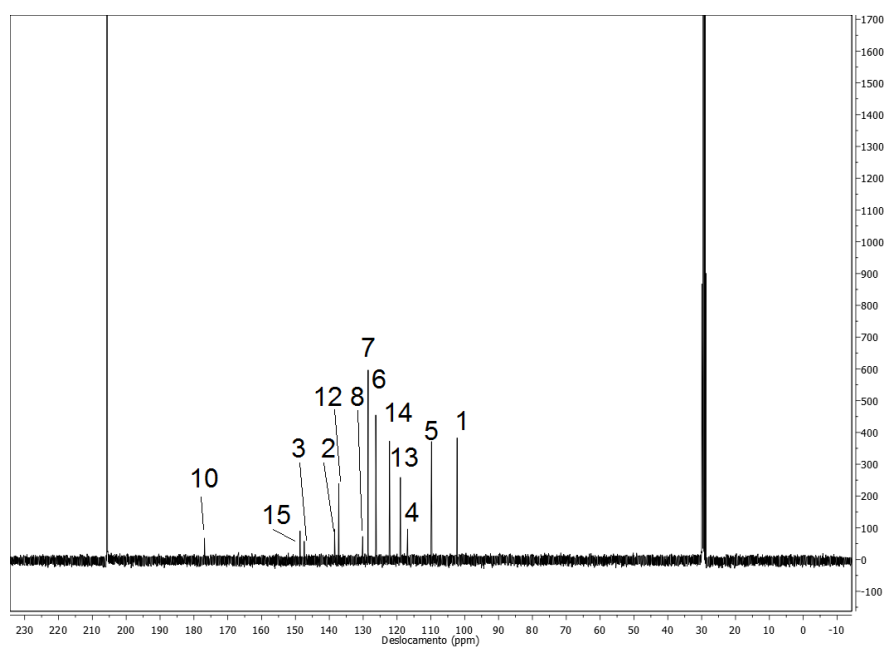


Figura A2. Espectro de RMN ^{13}C da NW-Cl

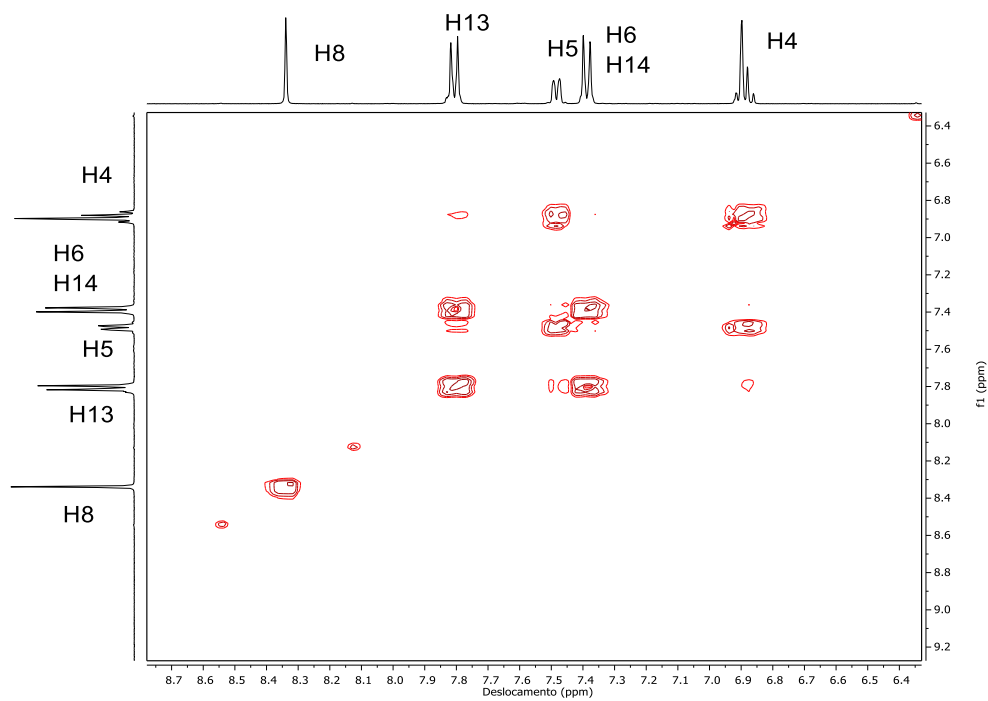


Figura A3. Espectro bidimensional COSY da NW-Cl

Apêndice B - Espectros da caracterização por RMN da NW-NO₂

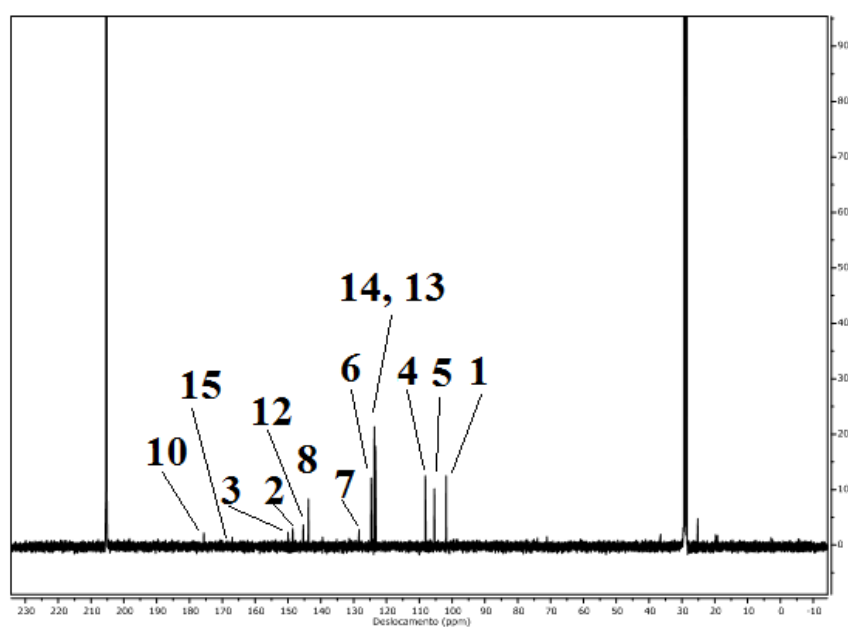


Figura B1. Espectro de RMN ¹³C da NW-NO₂

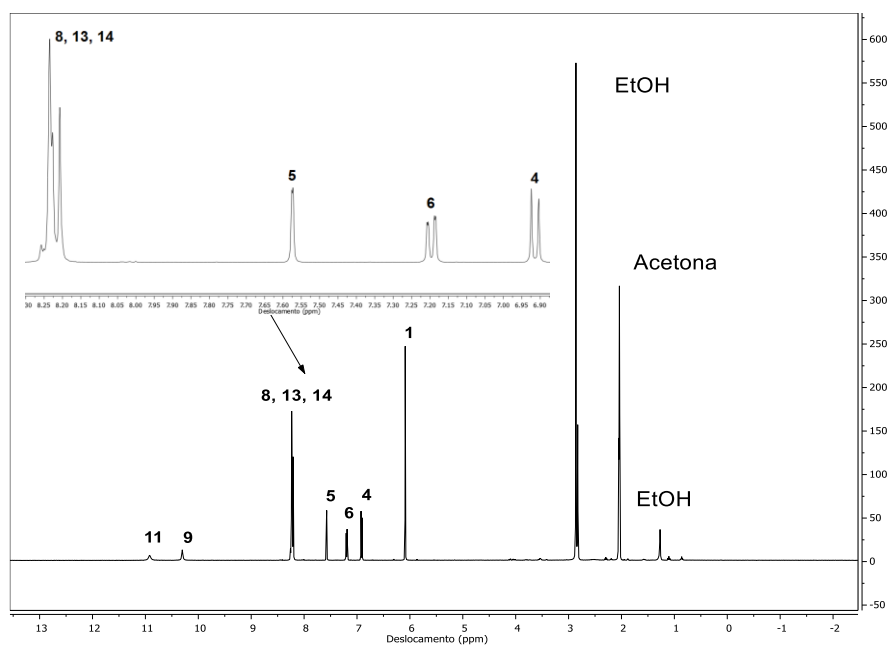


Figura B2. Espectro de RMN ^1H da NW-NO₂

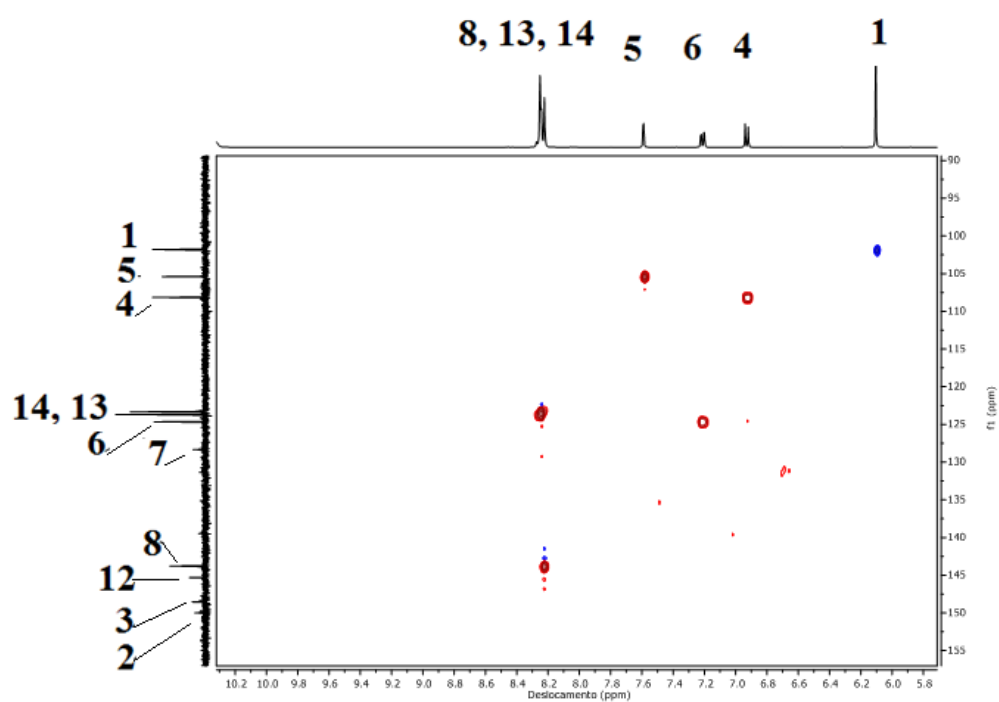


Figura B3. Espectro bidimensional HSQC da NW-NO₂

Apêndice C- Espectros e gráficos da interação com BSA

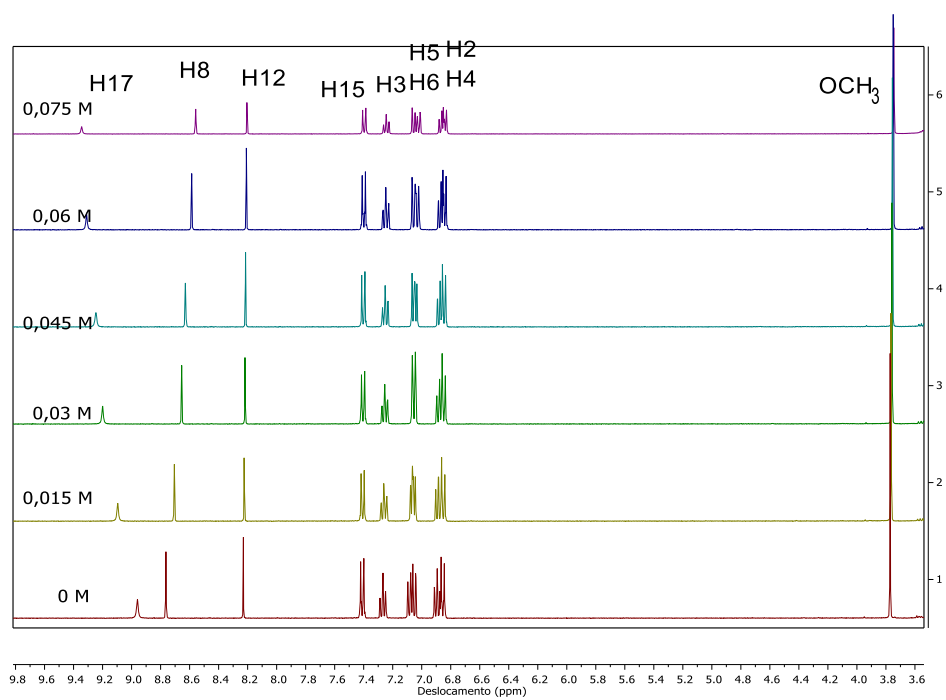


Figura C1. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 17, 8, 12, 15, 3, 5, 6, 2 e 4 do composto AMTAC 02 da interação com a BSA em 5 concentrações: 0,075, 0,06, 0,045, 0,03, e 0,015 M.

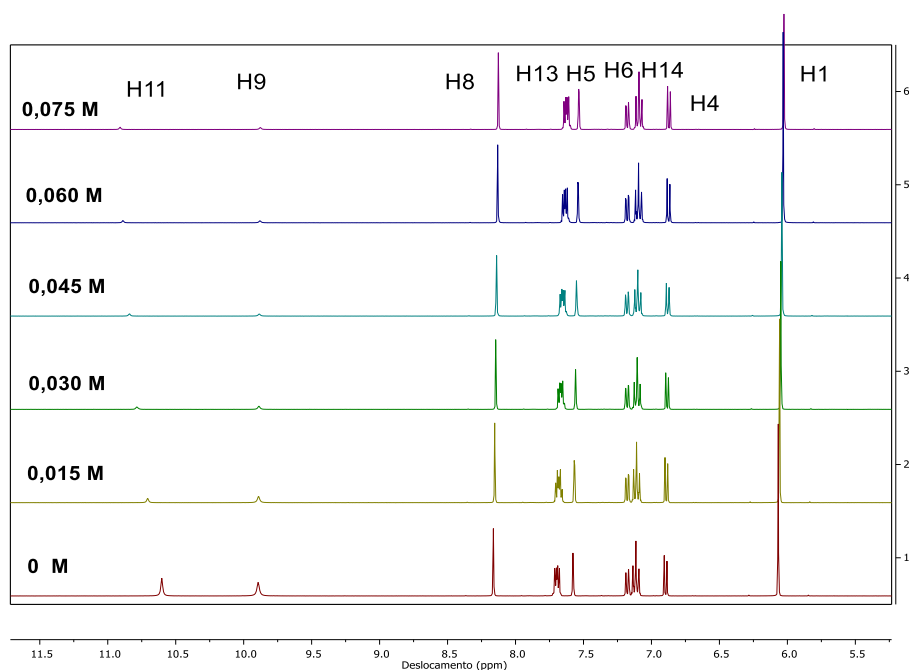


Figura C2. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 11, 9, 8, 13, 5, 6, 14, 4 e 1 do composto NW-F da interação com a BSA em 5 concentrações: 0,075, 0,06, 0,045, 0,03, e 0,015 M.

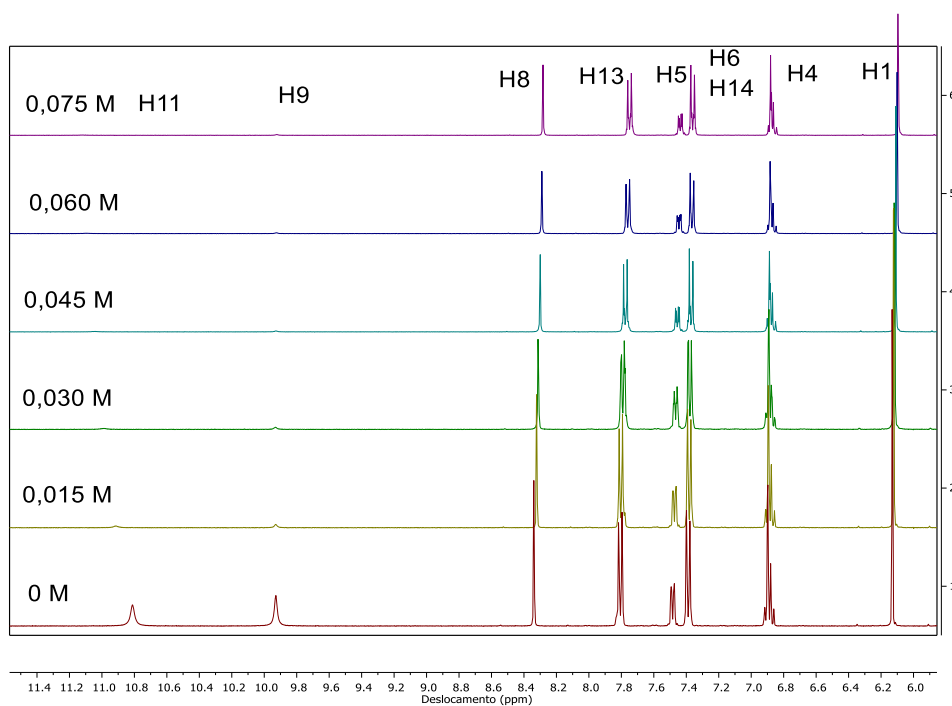


Figura C3. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 11, 9, 8, 13, 5, 6, 14, 4 e 1 do composto NW-Cl da interação com a BSA em 5 concentrações: 0,075, 0,06, 0,045, 0,03, e 0,015 M.

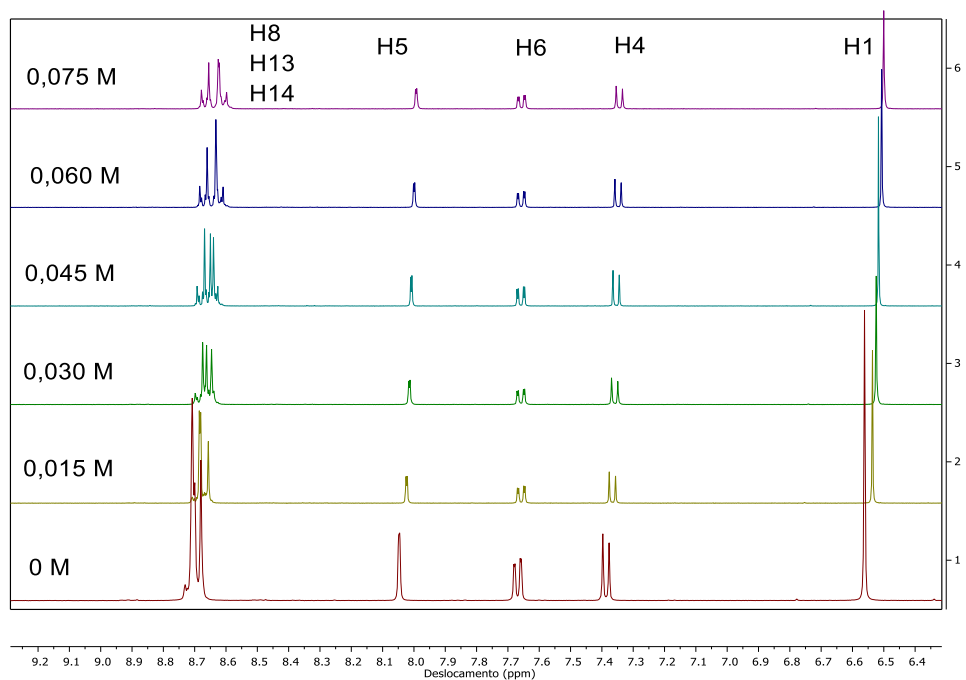


Figura C4. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 8, 13, 5, 6, 14, 4 e 1 do composto NW-NO₂ da interação com a BSA em 5 concentrações: 0,075, 0,06, 0,045, 0,03, e 0,015 M

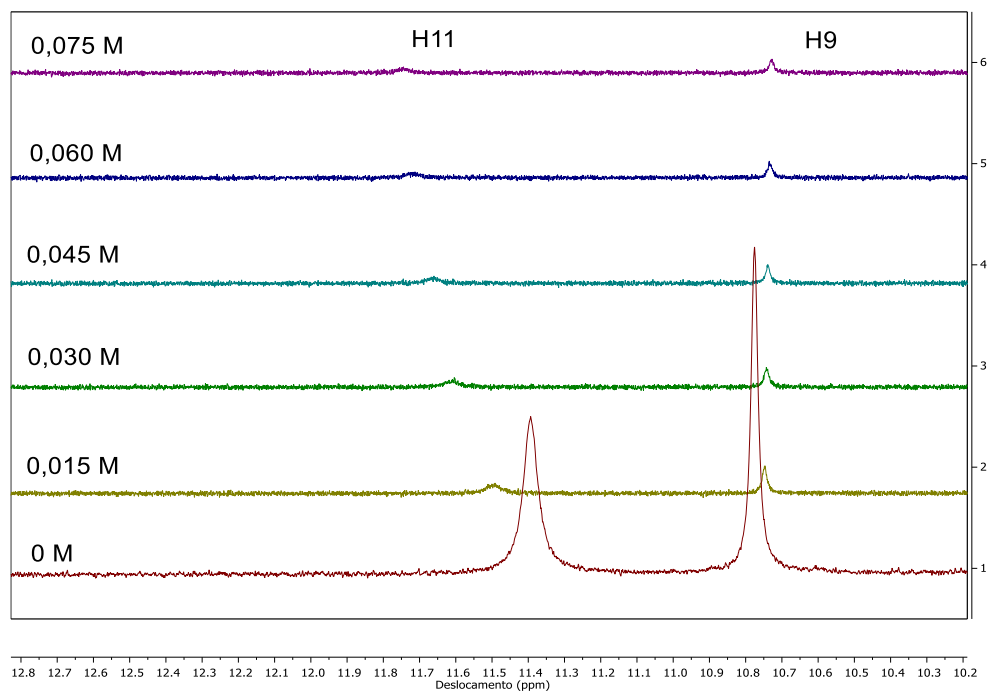


Figura C5. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 11 e 9 do composto NW-NO₂ da interação com a BSA em 5 concentrações: 0,075, 0,06, 0,045, 0,03, e 0,015 M

Apêndice D- Espectros e gráficos e constantes de dissociação da interação com Cobre

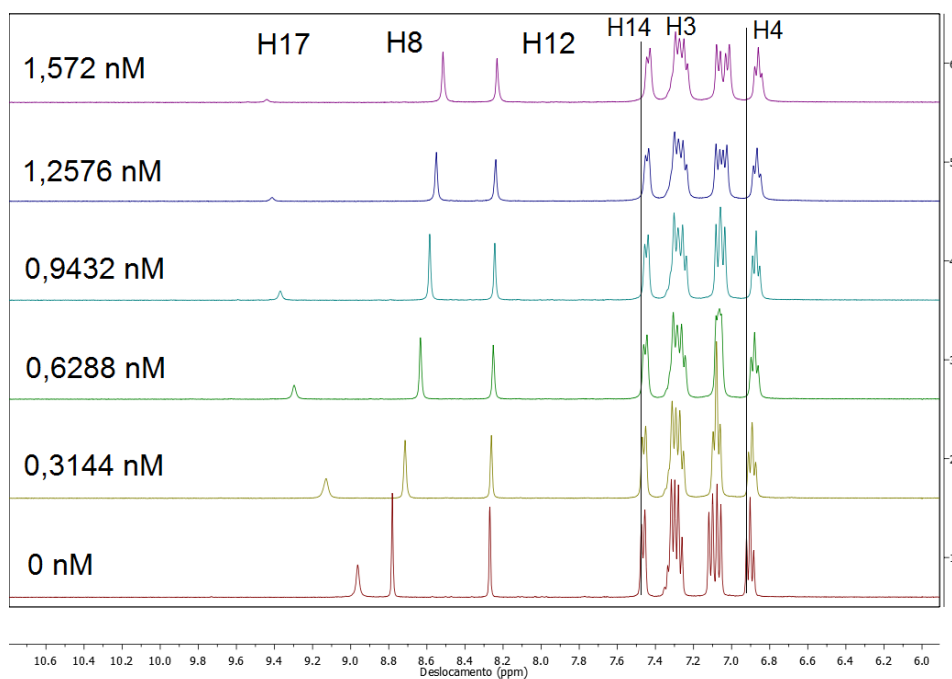


Figura D1. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 17, 8,12, 14 3 e 4 do composto AMTAC 01 da interação com íons cobre em 5 concentrações: 0,3144 nM, 0,6288 nM, 0,9432 nM, 1,2576 nM e 1,572 nM.

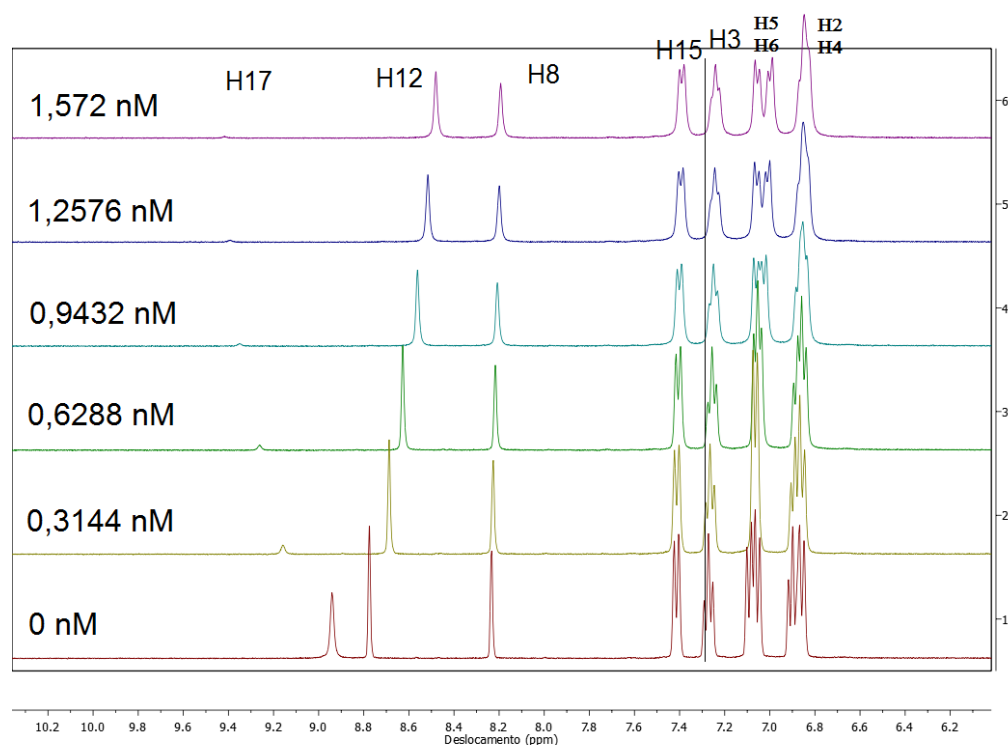


Figura D2. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 17, 8, 12, 15, 3, 5, 6, 2 e 4 do composto AMTAC 02 da interação com íons cobre em 5 concentrações: 0,3144 nM, 0,6288 nM, 0,9432 nM, 1,2576 nM e 1,572 nM.

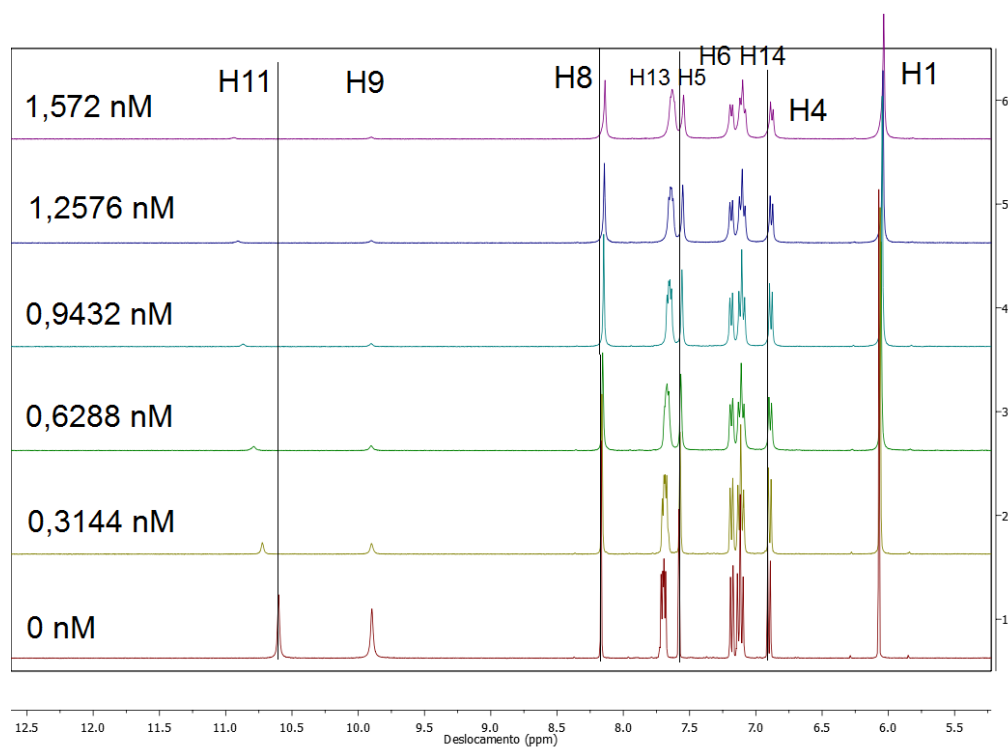


Figura D3. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 11, 9, 8, 13, 14, 5, 6, 14, 4 E 1 do composto NW-F da interação com íons cobre em 5 concentrações: 0,3144 nM, 0,6288 nM, 0,9432 nM, 1,2576 nM e 1,572 nM.

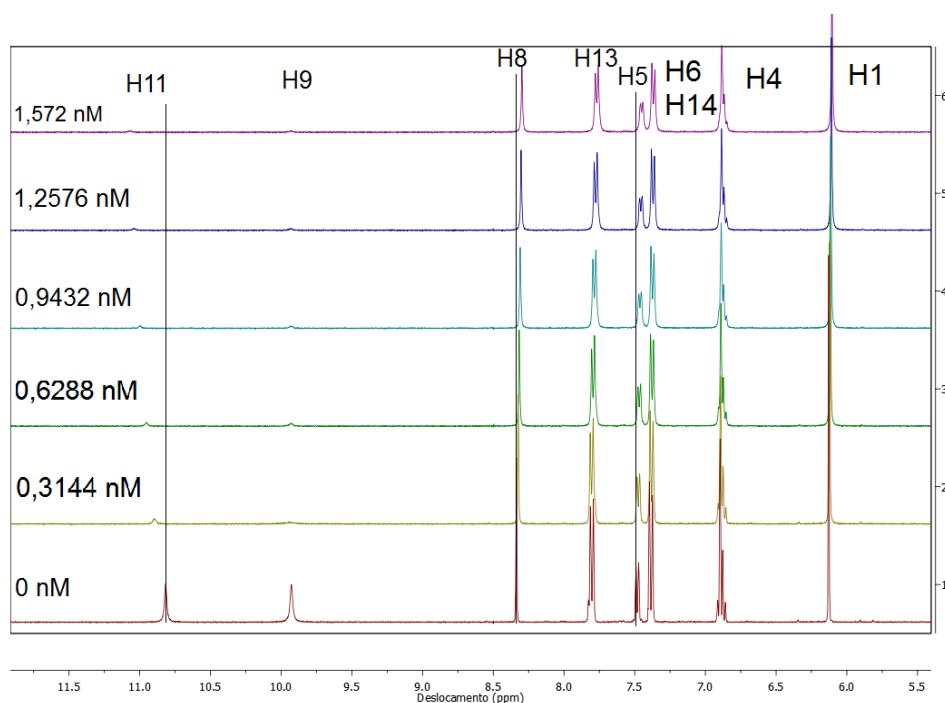


Figura D4. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 11, 9, 8, 13, 14, 5, 6, 14, 4 E 1 do composto NW-Cl da interação com íons cobre em 5 concentrações: 0,3144 nM, 0,6288 nM, 0,9432 nM, 1,2576 nM e 1,572 nM.

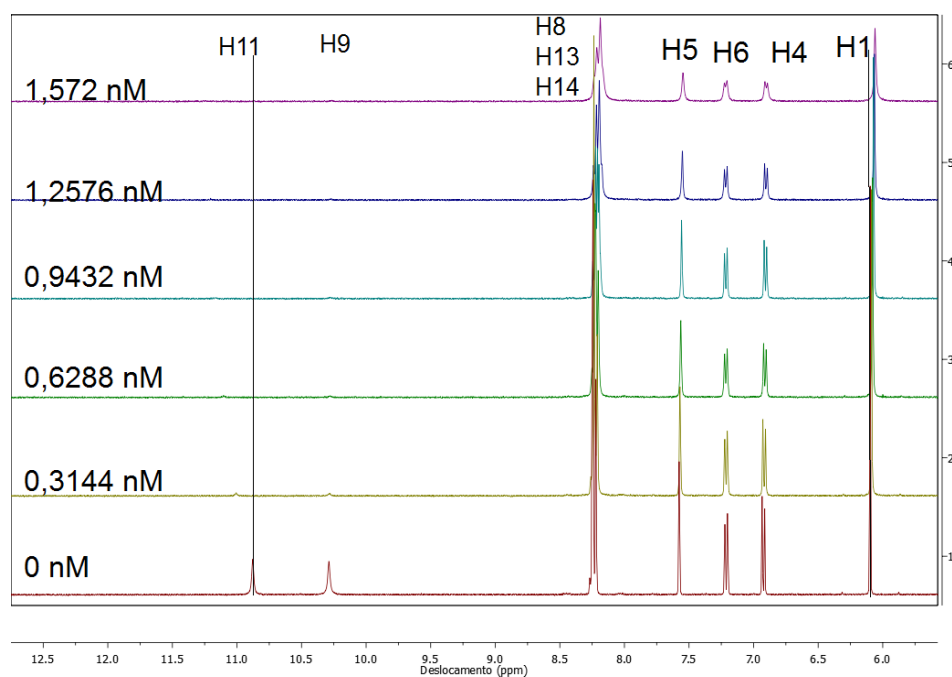


Figura D5. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 11, 9, 8, 13,14, 5, 6, 14, 4 e 1 do composto NW-NO₂ da interação com íons cobre em 5 concentrações: 0,3144 nM, 0,6288 nM, 0,9432 nM, 1,2576 nM e 1,572 nM.

Apêndice E- Espectros, gráficos e constantes de dissociação da interação das moléculas com a enzima tirosinase

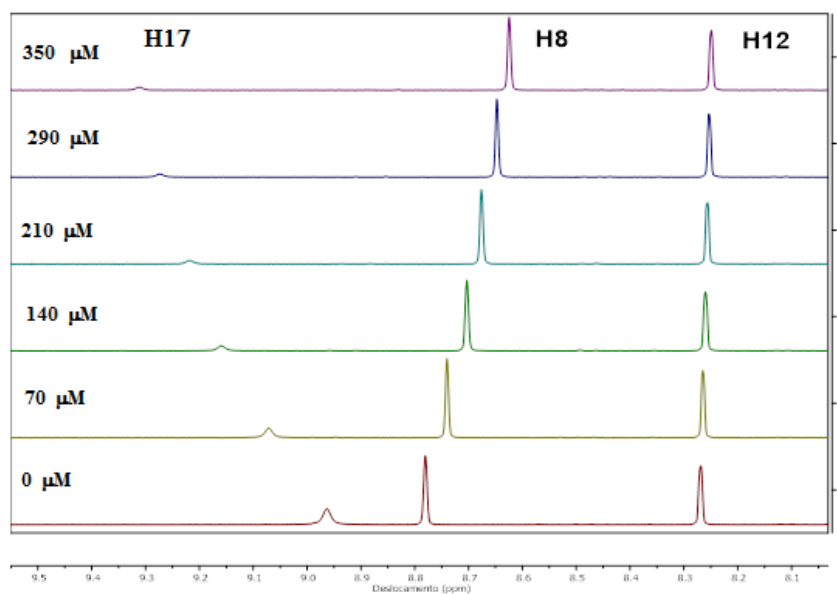


Figura E1. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 17, 8 e 12, do composto AMTAC 01 com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM

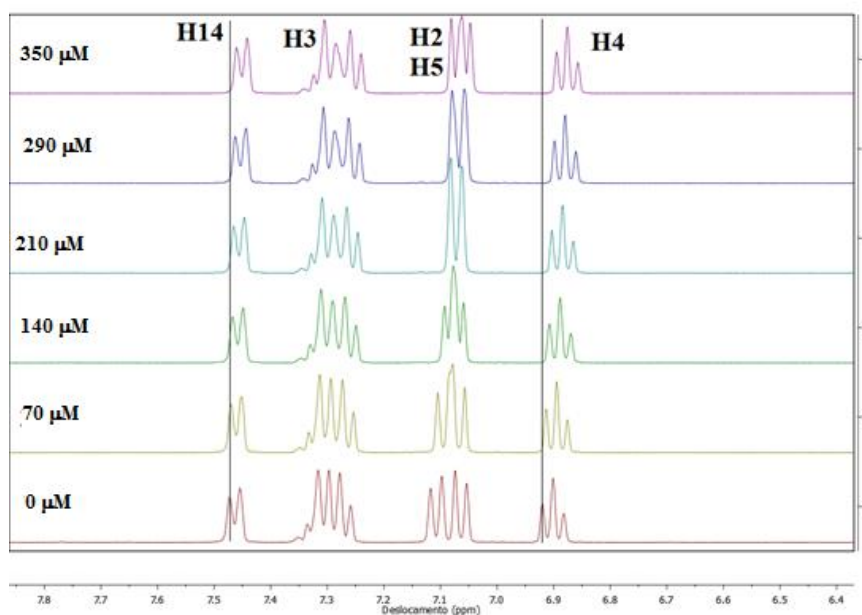


Figura E2. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 14, 3, 2, 5 e 4 do composto AMTAC 01 com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

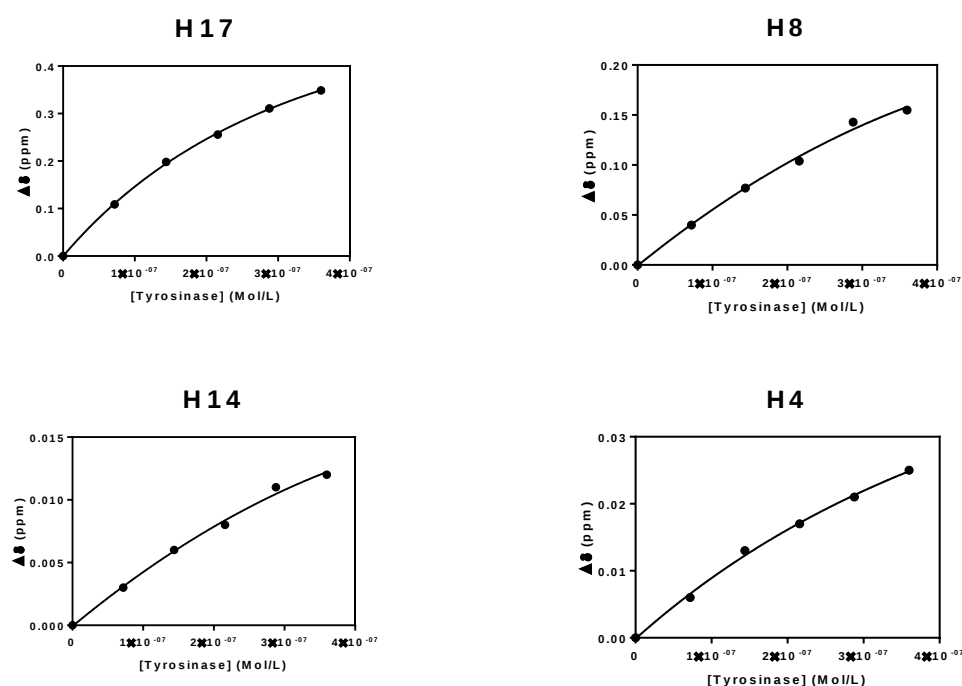


Figura E3. Gráficos de Regressão não linear para os H17, H8, H14 E H4 do composto AMTAC 01, relacionando a variação de deslocamento com a concentração de enzima tirosinase adicionada.

Deslocamento (ppm)	K_d	R^2
9,82 (H17)	$5,373 \cdot 10^{-7}$	0,9997
8,54 (H8)	$\sim 8,75 \cdot 10^{-7}$	0,9996
8,38 (H12)	$2,286 \cdot 10^{-5}$	-
7,36 (H14)	$1,435 \cdot 10^{-5}$	-
7,26 (H3)	$4,202 \cdot 10^{-7}$	0,9986
6,82 (H4)	$\sim 1,032 \cdot 10^{-6}$	0,9977

Tabela E1. Valores das constantes de dissociação K_d da interação com a tirosinase para cada hidrogênio da AMTAC 01

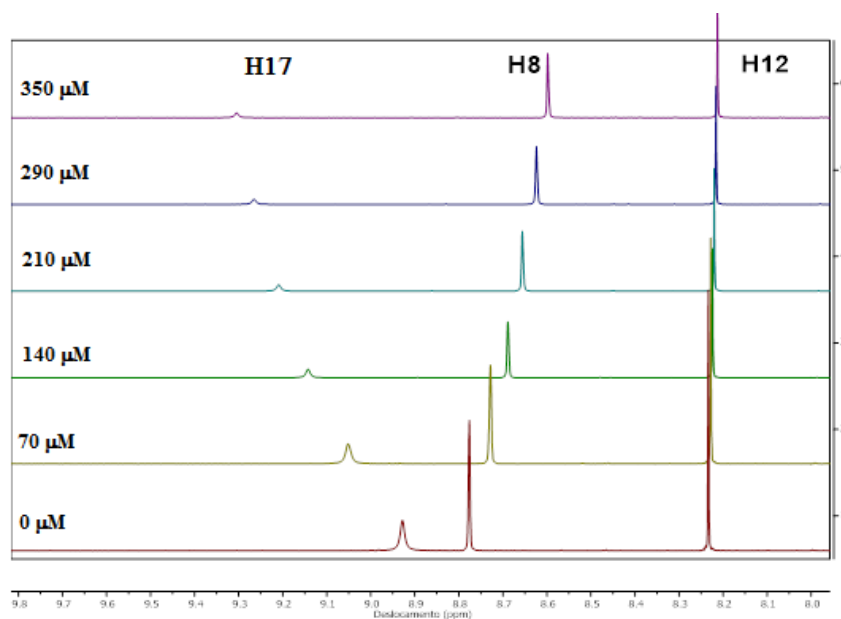


Figura E4. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 17, 8 e 12, do composto AMTAC 02 com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

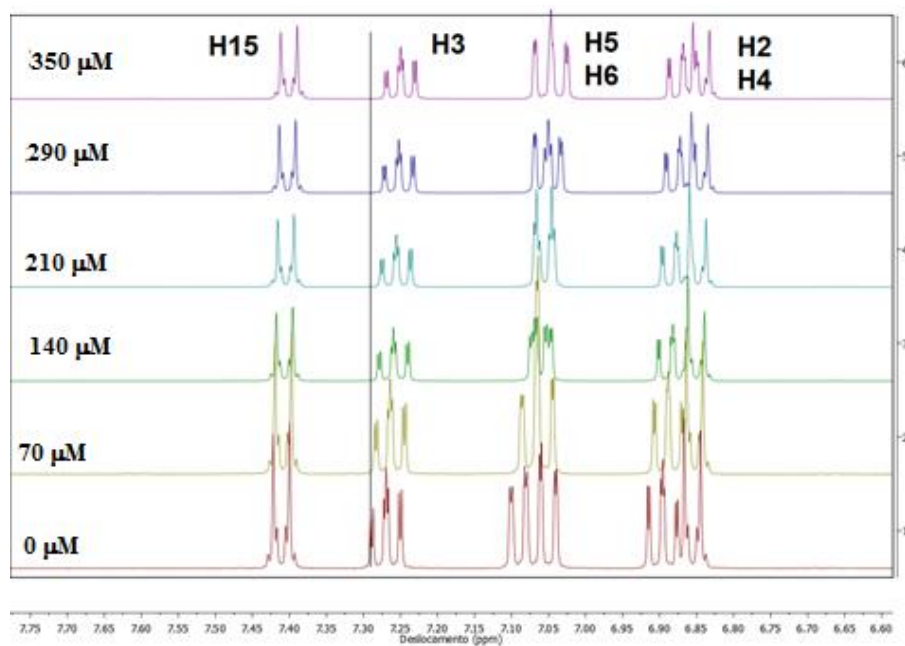


Figura E5. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 15, 3, 5, 6, 2, e 4 do composto AMTAC 02 com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

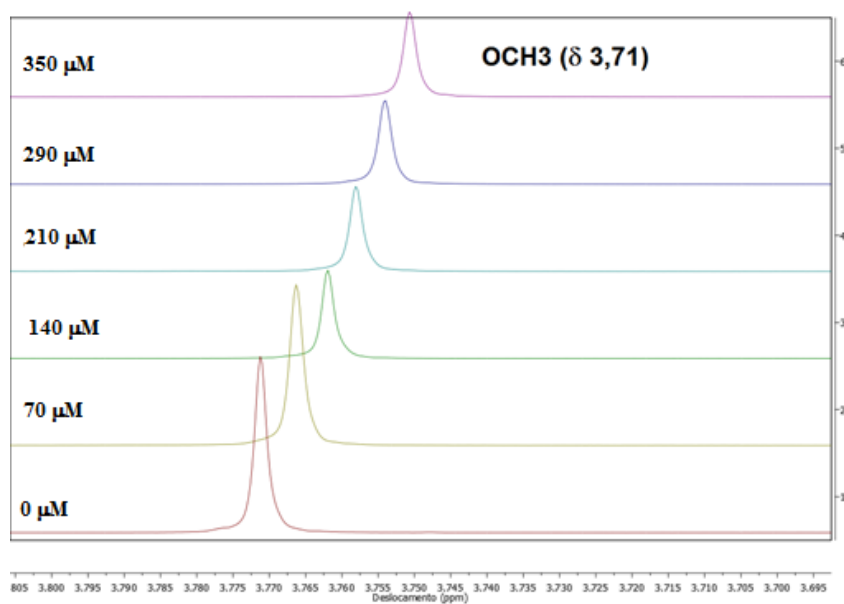


Figura E6. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios referentes ao grupo OCH_3 do composto AMTAC 02 com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

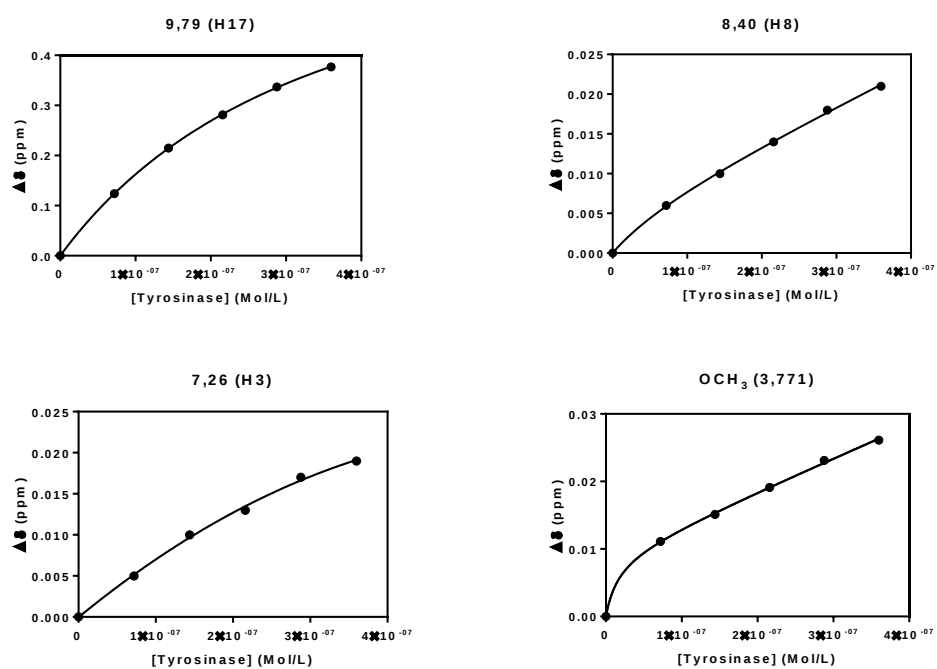


Figura E7. Gráficos de Regressão não linear para os H17, H8, H14 E H4 do composto AMTAC 02, relacionando a variação de deslocamento com a concentração de enzima tirosinase adicionada.

Deslocamento (ppm)	K_d	R^2
9,79 (H17)	$4,128.10^{-7}$	0,9999
8,50 (H8)	$3,958.10^{-7}$	0,9999
8,40 (H12)	$9,66.10^{-8}$	0,9993
7,31(H15)	$3,436.10^{-7}$	1
7,26 (H3)	$8,439.10^{-6}$	-
6,88 (H2)	$8,339.10^{-6}$	-
6,82 (H4)	$1,435.10^{-5}$	-
3,71 (OCH ₃)	$1,665.10^{-8}$	0,9995

Tabela E2. Valores das constantes de dissociação K_d da interação com a tirosinase para cada hidrogênio da AMTAC 02.

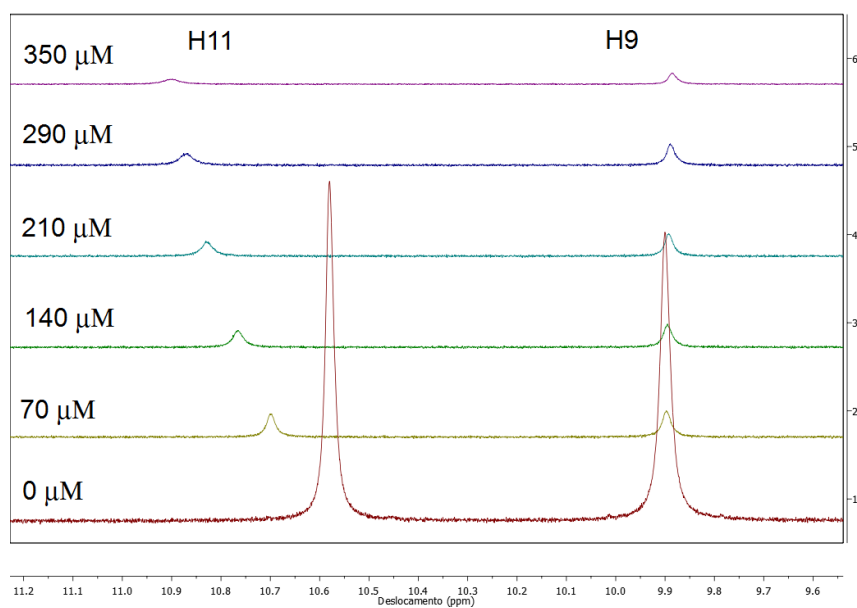


Figura E8. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 11 e 9 do composto NW-F com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

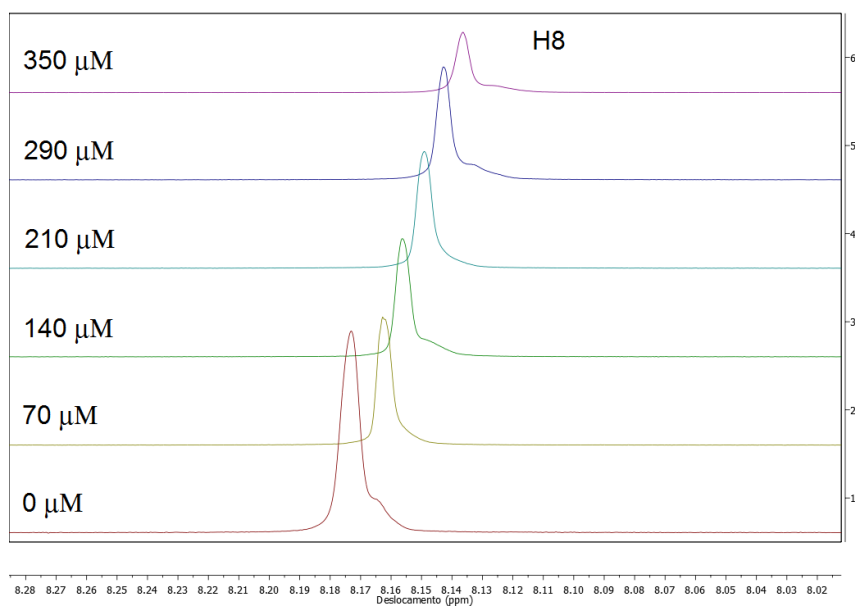


Figura E9. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 8 do composto NW-F com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

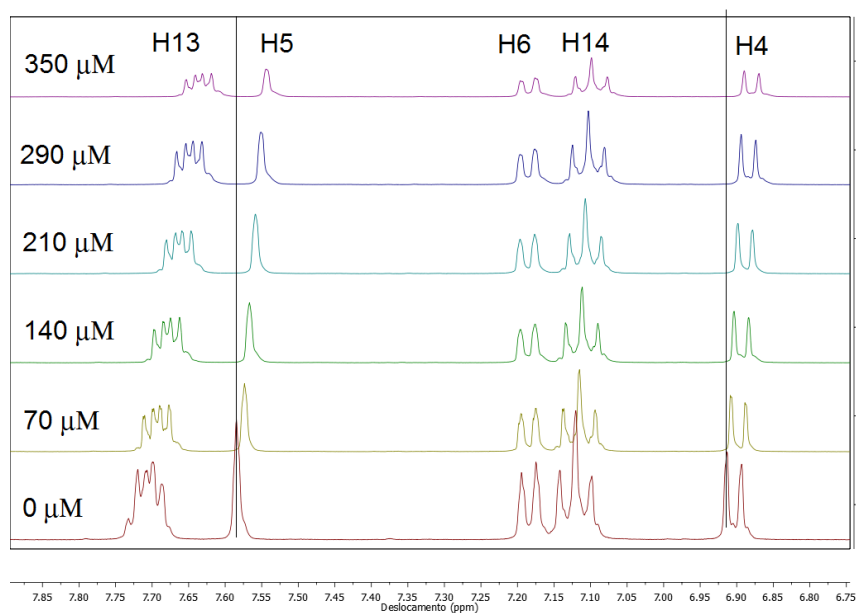


Figura E10. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 13, 5, 6, 14 E 4 do composto NW-F com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

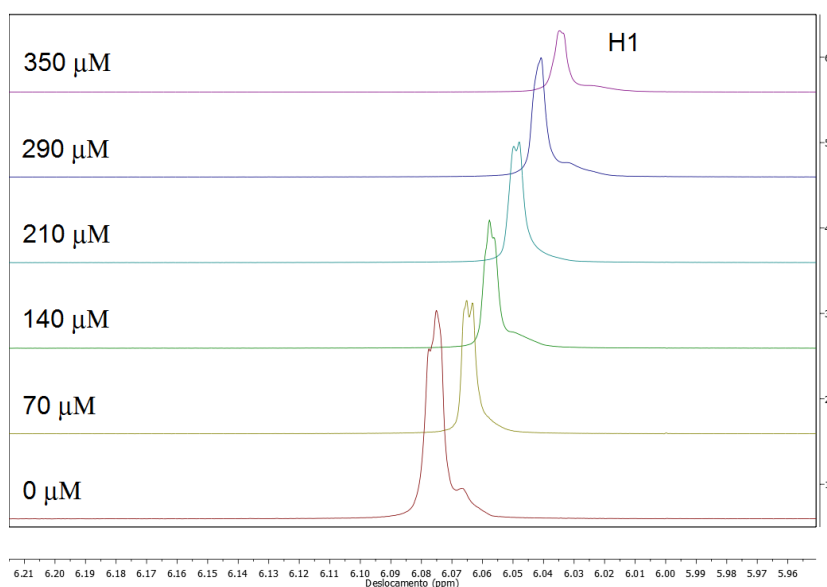


Figura E11. Espectro de RMN ^1H para o hidrogênio n° 1 do composto NW-F com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

Deslocamento (ppm)	K_d	R^2
10,65 (H11)	$5,175 \cdot 10^{-4}$	0,9755
8,17 (H8)	$2,939 \cdot 10^{-8}$	0,9998
7,69 (H13)	$1,496 \cdot 10^{-3}$	0,9971
7,59 (H5)	$3,249 \cdot 10^{-7}$	0,9971
7,12 (H14)	$\sim 2,8 \cdot 10^{-5}$	0,9989
6,90 (H4)	$1,44 \cdot 10^{-7}$	0,9965
6,07 (H1)	$7,319 \cdot 10^{-9}$	0,9997

Tabela E3. Valores das constantes de dissociação K_d da interação com a tirosinase para cada hidrogênio da NW-F.

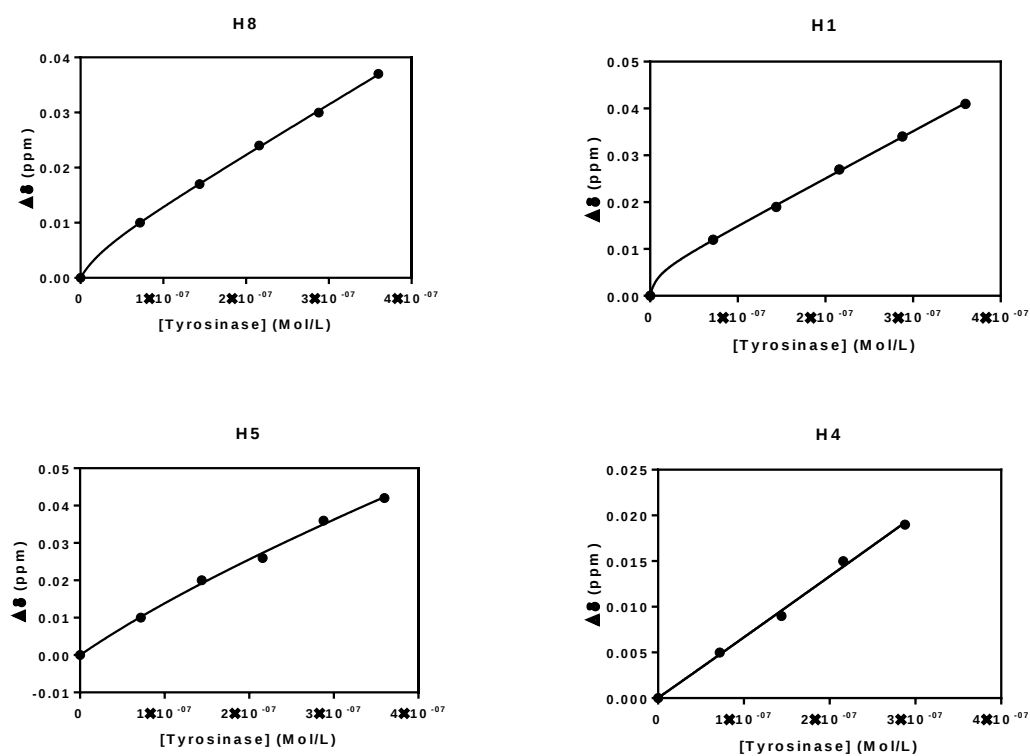


Figura E12. Gráficos de Regressão não linear para os H8, H5, H4 e H1 do composto NW-F, relacionando a variação de deslocamento com a concentração de enzima tirosinase adicionada.

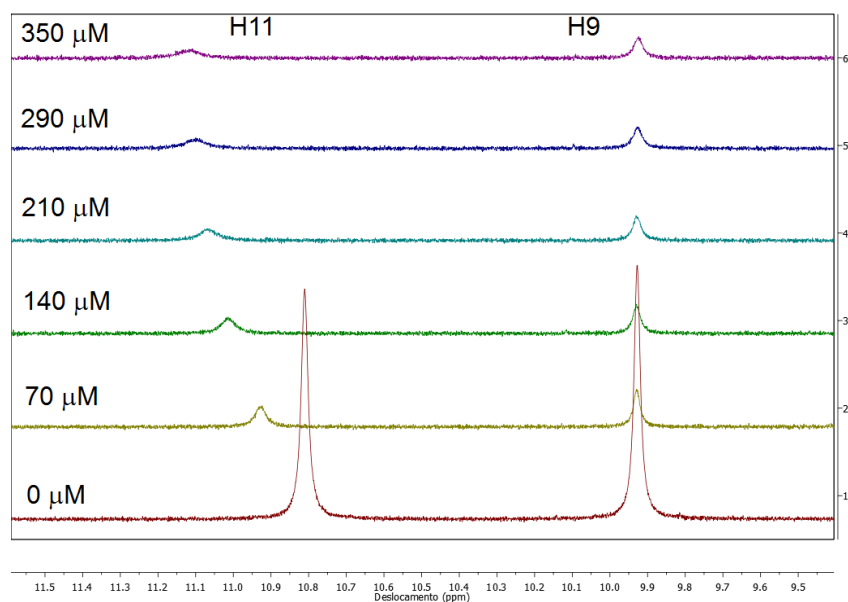


Figura E13. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 11 e 9 do composto NW-Cl com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

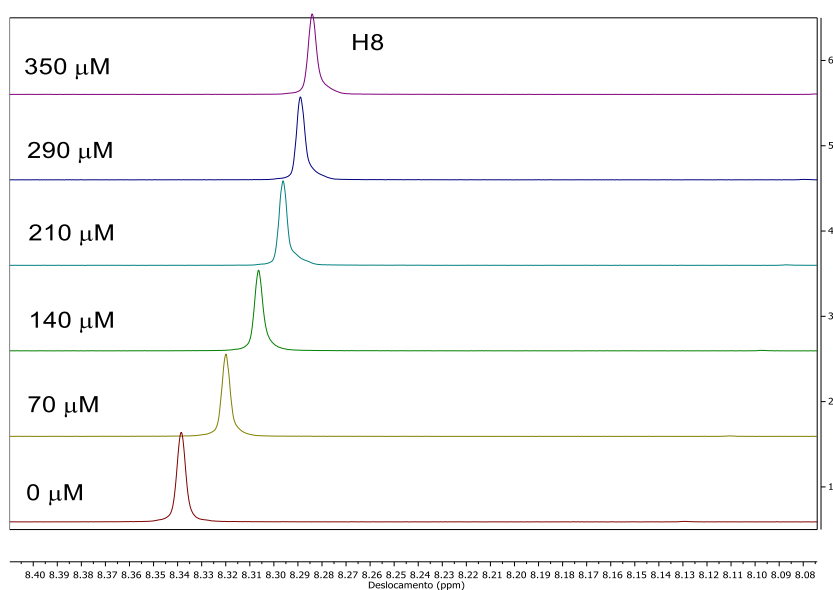


Figura E14. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 8 do composto NW-Cl com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

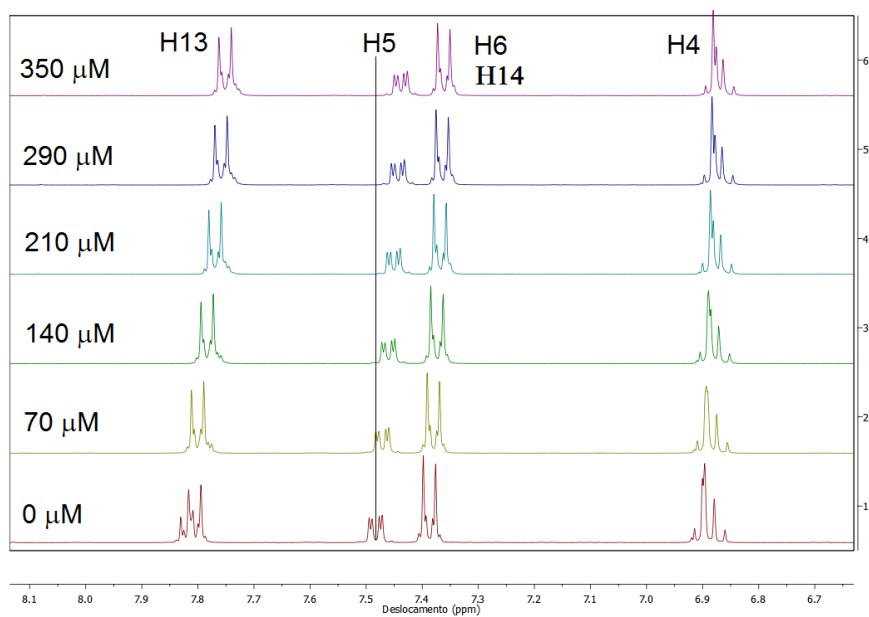


Figura E15. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 13, 5, 6, 14 E 4 do composto NW-Cl com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

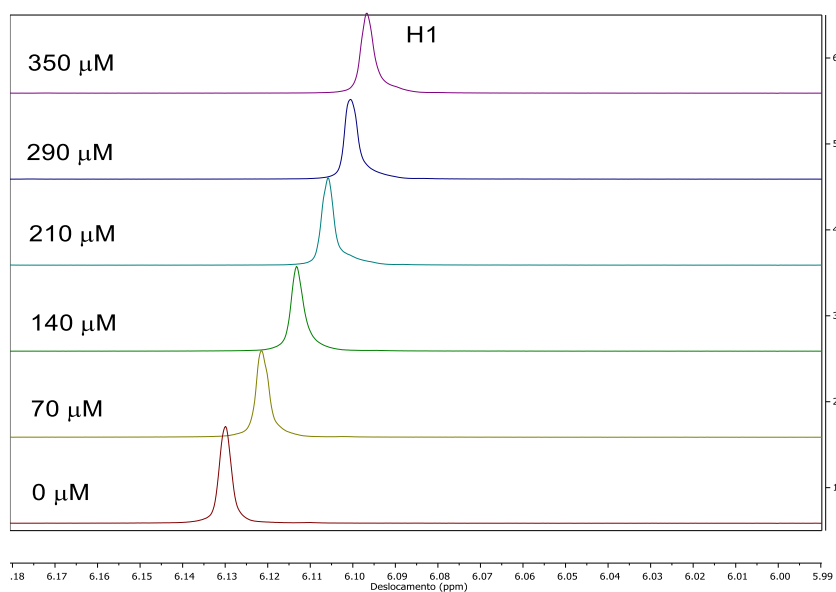


Figura E16. Espectro de RMN ^1H para o hidrogênio nº 1 do composto NW-Cl com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

Deslocamento (ppm)	K_d	R^2
10,81 (H11)	$9,692 \cdot 10^{-7}$	0,9999
8,34 (H8)	$8,639 \cdot 10^{-7}$	1
7,81 (H13)	$\sim 2,695 \cdot 10^{-5}$	0,984
7,48 (H5)	$\sim 4,943 \cdot 10^{-6}$	0,9985
6,13 (H1)	$5,421 \cdot 10^{-7}$	0,9994

Tabela E4. Valores das constantes de dissociação K_d da interação com a tirosinase para cada hidrogênio da NW-Cl.

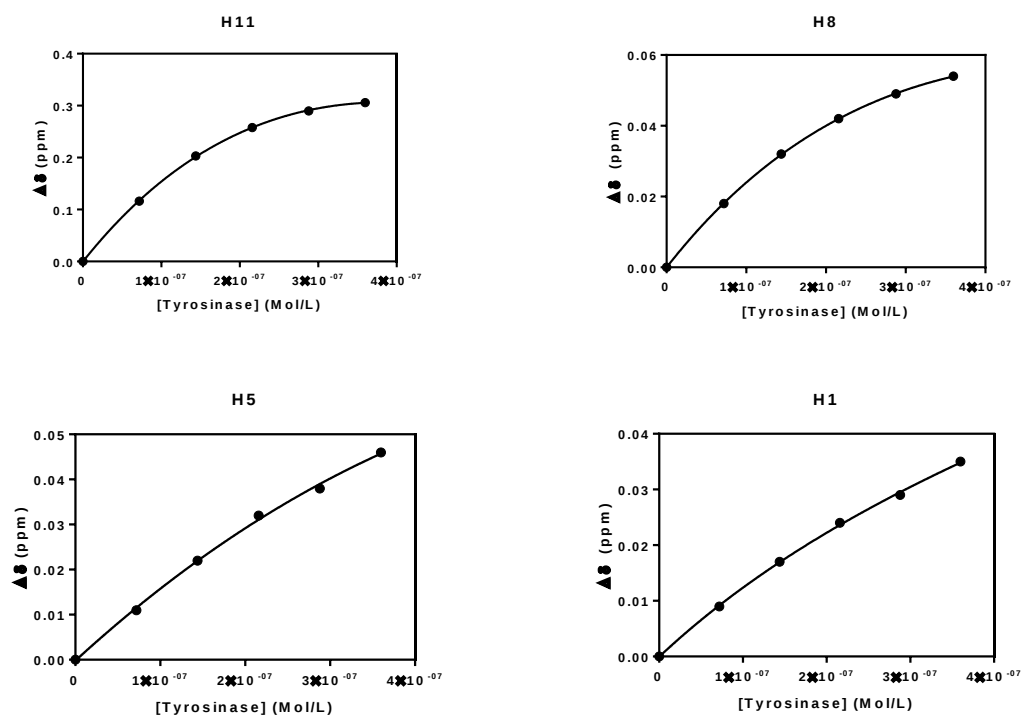


Figura E17. Gráficos de Regressão não linear para os H11, H8, H5 e H1 do composto NW-Cl, relacionando a variação de deslocamento com a concentração de enzima tirosinase adicionada.

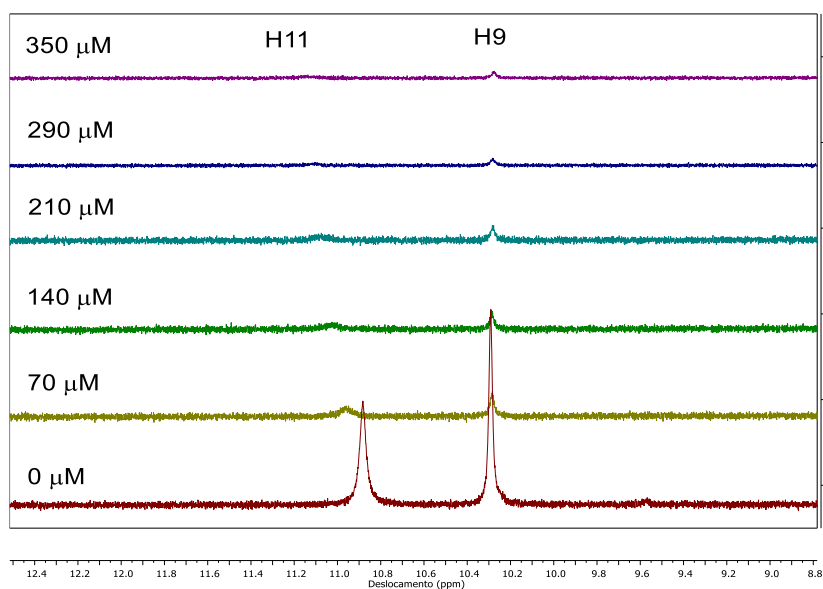


Figura E18. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios nº 11 e 9 do composto NW-NO₂ com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

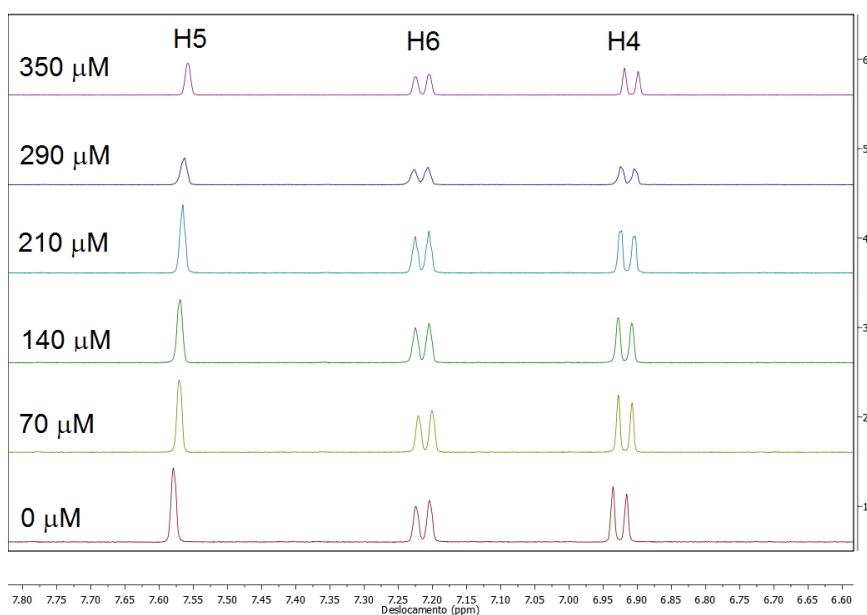


Figura E19. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 5, 6 e 4 do composto NW- NO_2 com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

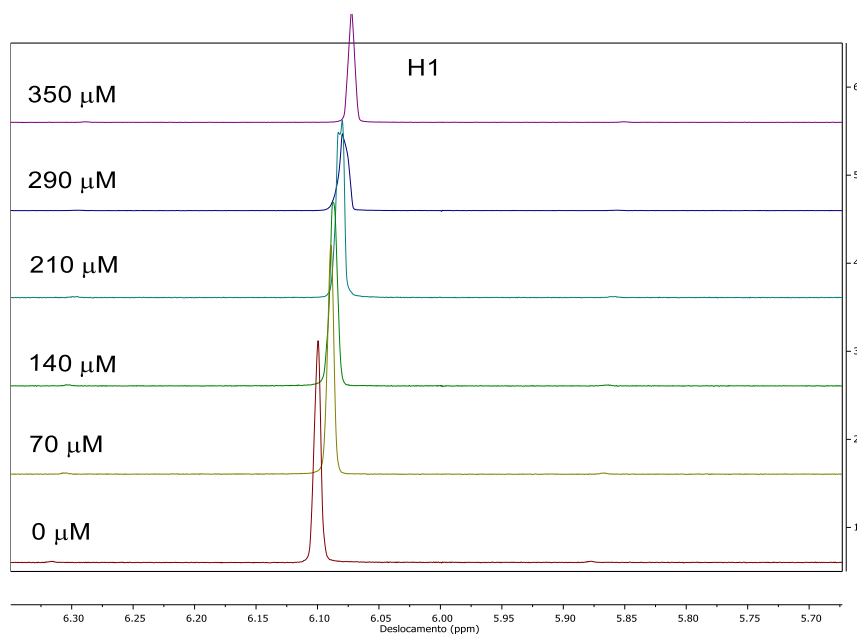


Figura E20. Espectro de RMN ^1H para os hidrogênios n° 1 do composto NW- NO_2 com a enzima tirosinase em 5 concentrações: 70 , 140, 210, 290 e 350 μM .

Deslocamento (ppm)	K_d	R^2
10,93 (H11)	$\sim 2,721 \cdot 10^{-6}$	0,9993
7,59 (H5)	$\sim 21,58$	0,9598
6,10 (H1)	$\sim 1,029 \cdot 10^{-4}$	0,9433

Tabela E5. Valores das constantes de dissociação K_d da interação com a tirosinase para cada hidrogênio da NW-NO₂.

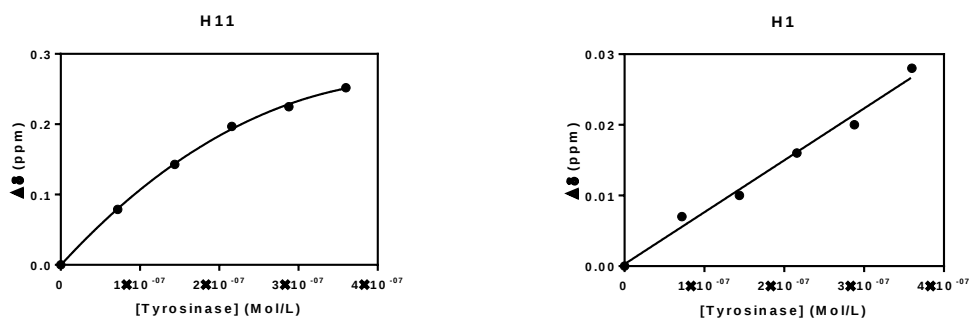


Figura E21. Gráficos de Regressão não linear para os H11 e H1 do composto NW-NO₂, relacionando a variação de deslocamento com a concentração de enzima tirosinase adicionada.