ESTUDO ESTRUTURA-ATIVIDADE DO TAXOL E DERIVADOS

por Ricardo Paupitz Barbosa dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Douglas Soares Galvão

Este exemplar corresponde à redação final da tese de mestrado defendida pelo aluno Ricardo Paupitz Barbosa dos Santos e aprovada pela comissão julgadora.

8/7/98

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Física pelo Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE FÍSICA
GLEB WATAGHIN

PARECER DE APROVAÇÃO

DEFESA DE TESE DE MESTRADO DE

RICARDO PAUPITZ BARBOSA DOS SANTOS

DATA : 05 / 03 / 98

BANCA EXAMINADORA:

- Prof. Dr. Douglas Soares Galvão (Orientador do Candidato)

- Prof. Dr. Paulo Monteiro Vieira Braga Barone

- Prof. Dr. Francisco das Chagas Marques

ESTUDO ESTRUTURA-ATIVIDADE DO TAXOL E DERIVADOS

por Ricardo Paupitz Barbosa dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Douglas Soares Galvão

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Instituto de Física "Gleb Wataghin" pelo apoio dado com sua infra-estrutura.

Ao meu orientador Douglas, pelo bom exemplo como físico e por sua paciência.

A todos os colegas do Grupo de Sólidos Orgânicos e Novos Materiais por sua colaboração e amizade. Também pelo programa "Chem2pac", desenvolvido pelo colega Márcio Cyrillo e que foi muito útil em várias etapas do trabalho.

Aos meus pais e minha irmã por todo o apoio durante tantos anos de estudos e por seu grande interesse por essa parte importante de minha vida.

Agradecimento especial a todos os companheiros de moradia, o pessoal da histórica "G1": Danny, Alfredo, Daniel, Emerson, Antônio, Roberto, Fábio, por 7 anos de convivência.

Não poderia deixar de citar os "agregados da G1": Shmoo, Hector, Flávia, Ida e tantos outros, que nos acompanharam durante as infindáveis discussões que ocorriam após as leituras exóticas que alguns de nós faziam.

Para a Lêni que esteve comigo em
todos os momentos importantes. Também
para a pequena Júlia, que acabou de
chegar nos trazendo muita alegria.

Índice

Resumo	VII
Abstract	VIII
Introdução	1
Cap. 1 - Taxol	4
Cap. 2 - Método de Índices Eletrônicos	25
Cap. 3 - Cálculos preliminares com o 10-Deacetil Baccatin III	37
Cap. 4 - Taxóides	51
Cap. 5 - Conclusões e Perspectivas	74

RESUMO

O Taxol, substância isolada a partir da casca do *Taxus brevifolia,* e de outras espécies do gênero Taxus, tem sido objeto de inúmeras pesquisas nos últimos anos. Esta molécula tem sido muito estudada principalmente por ser um forte agente anti-cancerígeno. Esta ação eficiente contra tumores, existe principalmente devido à interação destes compostos com uma proteína específica chamada Tubulina, que é responsável por vários processos da divisão celular. Neste trabalho é apresentada uma análise detalhada da estrutura eletrônica do Taxol e de alguns de seus derivados, que de maneira geral são chamados taxóides. Como ferramenta principal é utilizado o conceito de Densidade de Estados, que é calculada para algumas regiões específicas das moléculas. Esta análise tem como objetivo correlacionar a atividade biológica destes compostos com índices críticos da estrutura eletrônica. São analisados objetivamente dois índices experimentais, um relativo à capacidade dos compostos para estimular a polimerização da Tubulina e outro relacionado com a citotoxidade dos compostos em relação às células tumorais. São identificados comportamentos qualitativos que sugerem ligações entre os dados da estrutura eletrônica dos taxóides e estes dois índices.

ABSTRACT

Taxol is a substance isolated from the bark of *Taxus brevifolia* and from another species of generus taxus. It is the object of intense academic and industrial research. The reason for this interest in studying taxol is its strong anti-cancer activity. This efficient activity against tumors occurs because of its particular interaction with a specific protein, the tubulin, which is responsible for several processes of celular division. In this work we present a detailed analysis of taxol's electronic structure and of some of its derivatives, called taxoids. The main tool used is the concept of Densit of States, which is calculated for some specific regions of the molecules. The objective of this analysis is to correlate the biological activity of these compounds with critical indices calculated from their electronic structure. Two experimental indices are analysed, one is related to the taxol capacity for stimulating tubulin polymerization, and another is related to its citotoxic activity against tumor cells. Qualitative behaviour which suggests connections between these indices and the electronic structure calculations are identified.

Introdução

O Taxol, substância isolada a partir da casca do *Taxus brevifolia,* e de outras espécies do gênero Taxus, teve seu uso como droga comercial aprovado pela FDA (Federal Drug Administration dos EUA) em 1994, para o tratamento de pacientes com câncer de ovário e de mama. Além disso, os testes mostraram que a substância pode também trazer ótimos resultados contra os tumores nas regiões do pescoço, pulmão e cabeça[1]. A ação biológica do taxol estimulou muitos laboratórios a trabalhar na tentativa de entender as relações estrutura-atividade desta substância e seus análogos. Durante os inúmeros estudos realizados a respeito dele, foi descoberto que seu modo de ação é bem diferente (e, como veremos, oposto) daquele que se verifica para para a maioria dos compostos que eram utilizados usualmente antes de ser descoberta sua ação anti-tumoral. Enquanto que os últimos têm como princípio da sua ação biológica a propriedade de impedirem a polimerização de uma proteína específica, o taxol surpreendentemente, estimula justamente a formação de estruturas cujo principal componente é esta mesma proteína polimerizada[2]. É importante então entender, com certo detalhe, como agem tais produtos, qual é, objetivamente, sua função no tratamento do câncer, etc., de forma a se obter uma base mais sólida para o desenvolvimento de novos fármacos.

O objetivo principal deste trabalho é verificar se o método de índices eletrônicos, desenvolvido por Barone *et al*[3,4] para prever a ação tumoral dos

Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP), é de alguma maneira aplicável para substâncias anti-tumorais de estrutura mais complexa, no caso deste trabalho, o taxol e derivados.

Dentro deste espírito, no primeiro capítulo temos a apresentação do Taxol, contando um pouco da origem da substância, seu modo de ação, vantagens farmacológicas, dificuldades para sua utilização em larga escala, etc. Nesse capítulo também é explicada qual foi a motivação para este trabalho, além de conter um comentário resumido a respeito da metodologia. Essa última está explicada em detalhes no capítulo 2, onde são apresentados os resultados obtidos por Barone *et al* para os PAHs. São mostradas também as regras que, utilizando métodos relativamente simples como Hückel, ou mais sofisticados como PM3, foram obtidas para tais compostos[3]. Barone *et al* encontraram 3 regras que classificam os PAHs em ativos ou inativos/muito pouco ativos, baseando-se em dados relativos ao Índice de Iball[5] e à estrutura eletrônica das moléculas. O trabalho de extensão dessa teoria para compostos mais complexos começa no capítulo 3, onde é discutida a análise preliminar feita para o 10-Deacetil Baccatin III, molécula cuja estrutura é praticamente o Taxol sem a cadeia lateral. Esta análise foi feita como teste para verificar se seria promissora uma tentativa de trabalho com estruturas complexas e tridimensionais. Utilizando o PM3, foi realizada uma busca conformacional e, em seguida, um estudo da relação entre a estrutura eletrônica do composto e as indicações experimentais sobre atividade biológica. Como foram encontradas indicações de que seria

possível ligar a estrutura e a atividade dos taxóides, os cálculos prosseguiram com os compostos maiores. Então, completando o trabalho, no capítulo 4 apresentamos os resultados encontrados para o Taxol e seus derivados, em relação ao índice de estímulo à polimerização (chamado T_1) e ao de toxidade para as células B6 de melanomas[6] (chamado T_2). Finalmente, temos o capítulo 5, que contém comentários gerais sobre o trabalho e as perspectivas futuras.

Capítulo 1

Taxol

1.1 Introdução

Raramente uma molécula ganha tanta notoriedade quanto o taxol (figura 1.1) tem ganho nos últimos anos. Essa substância e a árvore que a produz, chamada *Pacific Yew* (nome científico Taxus Brevifolia), ganharam suas posições após longos séculos de associação com o ser humano[6,7]. Essa árvore, que é típica da região do pacífico noroeste, tem sido cultivada e protegida através dos tempos por diversas razões. Por exemplo, algumas religiões primitivas a cultuavam como um símbolo de longevidade. Além disso, sua madeira era importante para a confecção de arcos, razão pela qual foi cultivada nos jardins de igrejas antigas, onde ficava protegida do gado que consumia suas folhas dificultando o crescimento das plantas mais novas. Outra característica interessante era o seu uso como planta medicinal. Para ter uma noção melhor do significado desta substância para a medicina contemporânea, é interessante que façamos um breve histórico[6,7,8] desde sua descoberta por volta dos anos sessenta até a autorização para seu uso comercial já na década de 90.

Na década de 60, teve início um programa de varredura de produtos naturais para citotoxidade e ação anti-leucêmica, promovido pelo "Instituto

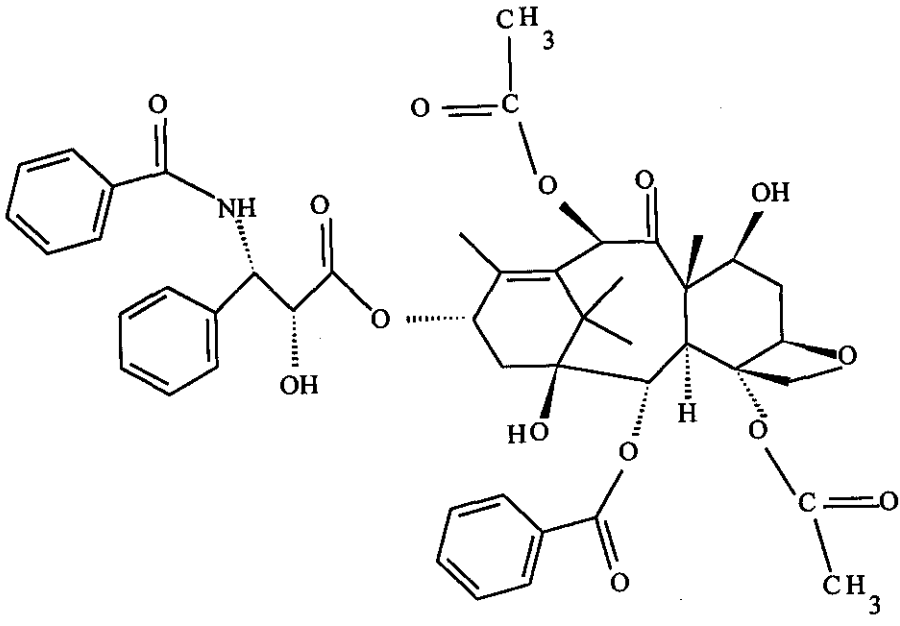


Figura 1.1 - Estrutura esquemática doTaxol

Nacional do Câncer" nos EUA e, por intermédio de tal programa, em 1969 a substância foi isolada pela primeira vez. Mas a primeira indicação de ação anti-leucêmica foi reportada dois anos mais tarde por Wani e Wall[6]. O mecanismo pelo qual se dá a ação da molécula sobre as células tumorais só começou a ser entendido muitos anos mais tarde (por volta de 1979), que foi quando surgiram as primeiras indicações de que o taxol estimula a polimerização da tubulina, proteína formadora dos microtúbulos (fig. 1.2) existentes nas células de todos os organismos eucariontes[9]. A partir dessa descoberta, se intensificou o estudo da sua ação anti-câncer, diversos testes foram feitos e o principal resultado, obtido já no início dos anos 90, foi a maior eficiência no tratamento do câncer de ovário e de mama. Tal eficácia estimulou os esforços para desenvolver o taxol como uma droga para ser usada em larga escala e obter a aprovação da "US-Federal Drug Administration" para o uso comercial. É importante ressaltar que, paralelamente a todos estes acontecimentos, havia uma verdadeira corrida para conseguir uma fonte alternativa da substância, seja através de sínteses químicas, seja via produção por microorganismos, tal era a dificuldade de produção em larga escala a partir da planta, como será explicado mais à frente. A síntese total, foi obtida em 1994[6], cerca de um ano antes de ser aprovada a utilização comercial do taxol, porém, como também será comentado à frente, tal síntese não surtiu o efeito esperado para a disponibilidade da droga.

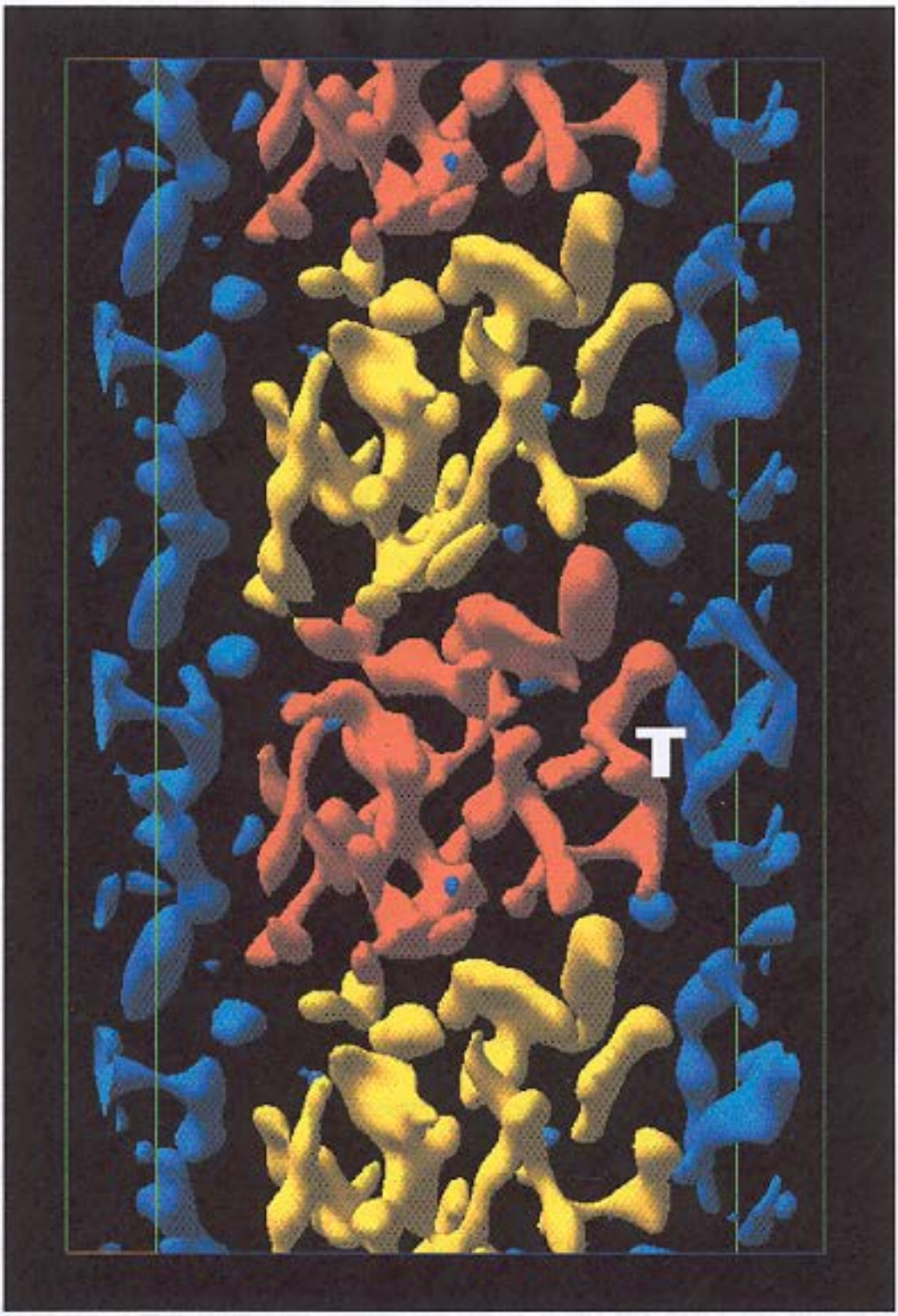


Figura 1.2 – Estrutura de um microtúbulo, com indicação do local onde age o Taxol (onde há um T).

O grande interesse em estudar o Taxol e explicar seus mecanismos de interação[1,10,11] com as células, os solventes, a tubulina, etc., tem várias razões para existir ainda hoje. Entre essas razões está a alta atividade anti-cancerígena que, após décadas de estudos, serve de referência para avaliar o poder de novas drogas. A razão principal para essa maior eficiência é o fato de sua ação poder se dar em praticamente todas as fases intermediárias da mitose (ao contrário das drogas comuns, que agem predominantemente na prófase, prometáfase e metáfase, que são as 3 primeiras fases da divisão celular), o que será discutido em detalhes a seguir.

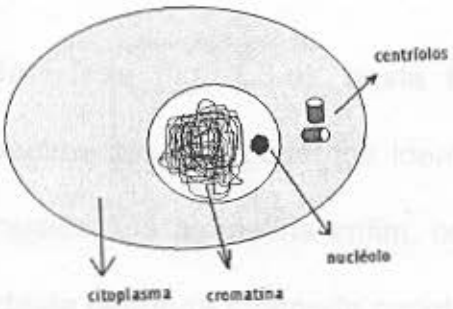
1.2 Mecanismo de ação

1.2.1 Divisão Celular

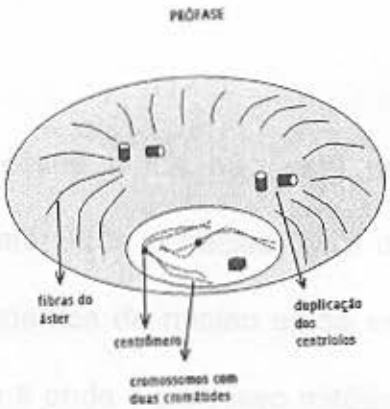
As substâncias utilizadas para interromper o crescimento de tumores têm como função específica paralisar o processo contínuo e desenfreado de divisão celular (mitose) no qual se encontram as células tumorais. Por causa desse modo de ação, tais substâncias são chamadas de agentes anti-mitóticos. Para entender como se dá a ação do taxol ou qualquer outro agente anti-mitótico, é interessante que façamos uma breve recordação das diversas fases pelas quais uma célula passa durante o processo de divisão celular, e que estudemos, ainda que de forma reduzida, as interações entre os agentes anti-mitóticos e uma proteína existente no citoplasma, a tubulina.

Todas as células eucarióticas, ou seja, aquelas que contém núcleo, têm em seu interior uma proteína chamada tubulina[9]. Esta proteína tem diversas funções dentro do citoplasma, funções estas que provêm de sua propriedade de se polimerizar para formar os chamados *microtúbulos*, que são estruturas cilíndricas, ocas[9] (ver fig. 1.2). Durante a intérfase (fig. 1.3-a), que é o período em que a célula não está se dividindo, os microtúbulos têm como função principal, participar da estrutura de uma espécie de esqueleto celular, ou seja, o citoesqueleto, que é formado por estruturas relacionadas com a manutenção da forma da célula e com os movimentos celulares. Para formar esta grande estrutura, juntamente com a tubulina formadora dos microtúbulos, existem outras duas estruturas proteicas que o compõem, que são os microfilamentos e a microtrabécula. Devido à grande flexibilidade da tubulina, os microtúbulos podem ser formados em vários formatos de acordo com sua função. Por isso, quando a mitose está ocorrendo, os microtúbulos são desmanchados e reorganizados de outra forma, agora como as fibras do fuso[9] que servirão para separar as células filhas, como pode ser visto nas figuras 1.3(a-f). Os microtúbulos podem, também, formar estruturas relativamente estáveis, como as organelas microtubulares, que são os centríolos, os cílios e os flagelos.

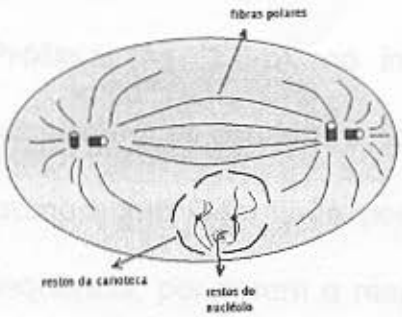
Para esclarecer as formas em que essa proteína é utilizada durante a divisão celular, recorreremos às fig.s 1.3 a-f para uma rápida explicação.



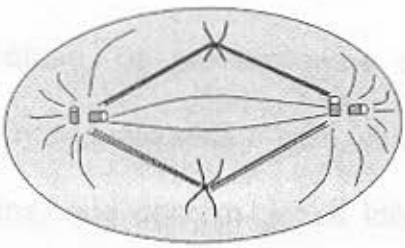
1.3-a Célula em intérfase



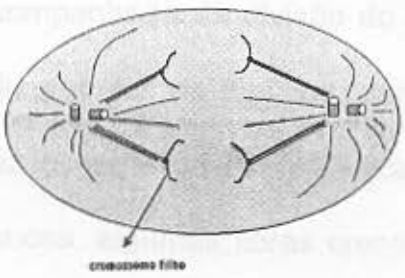
1.3-b Prófase



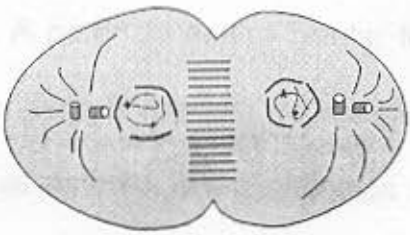
1.3-c Prometáfase



1.3-d Metáfase



1.3-e Anáfase



1.3-f Telófase

Figuras 1.3 (a-f) Fases da divisão celular

Intérfase (fig. 1.3-a): nesta fase, a célula ainda não está se dividindo realmente, pois podemos identificar claramente o núcleo, com carioteca, o nucléolo, a cromatina enfim, os componentes do núcleo ainda estão dentro desta estrutura chamada carioteca, que é onde o processo mitótico se inicia. Isso se dá com a divisão dos cromossomos, o que indica que a célula irá se dividir.

Prófase (fig. 1.3-b): no início da prófase, os cromossomos duplicados começam a se condensar, tornando-se individualizados e bem visíveis. Cada cromossomo é formado por duas partes, que contém genes idênticos em seqüência, por serem o resultado da duplicação de um único cromossomo, essas partes são as chamadas *cromátides irmãs*, que ficam ligadas entre si pelo *centrômero*. Ocorre ainda a divisão do centro celular, que é acompanhada da divisão do *centríolo*. A partir do centro celular formam-se microtúbulos de tubulina, dando ao conjunto o aspecto de estrela, que lhe traz o nome de *áster*[38]. Inicialmente, os ásteres estão próximos mas, aos poucos, algumas fibras crescem separando-os e dirigindo cada um deles a um pólo da célula. As fibras maiores são as *fibras polares*.

Prometáfase (fig. 1.3-c): Este é o momento em que ocorre a ruptura da carioteca, permitindo então que as fibras do áster atinjam a região antes pertencente ao núcleo. Nesta fase se formam as fibras cromossômicas, que partem da região dos centrômeros para se encontrar com as fibras polares,

possibilitando e orientando os deslocamentos dos cromossomos até a região equatorial da célula.

Metáfase (fig 1.3-d): agora, os cromossomos duplicados atingem a região equatorial da célula, alinhando-se num mesmo plano empurrados pelas fibras do fuso. Durante esta fase, ocorre intensa movimentação de organelas e partículas, que se dividem de maneira eqüitativa entre os dois pólos opostos da célula.

Anáfase (fig 1.3-e): inicia-se com a divisão longitudinal dos centrômeros, que permite a separação completa entre as duas cromátides irmãs, agora chamadas de cromossomos filhos. Então, as fibras do fuso começam a encurtar, separando os cromossomos filhos, dirigindo-os para pólos opostos da célula. Este é o final da anáfase.

Telófase (fig 1.3-f): aqui ocorrem transformações que são praticamente o inverso das que ocorreram na prófase e início da prometáfase. Os cromossomos se descondensam, o cinetócoro e as fibras cinetocóricas se desmancham, a carioteca e os nucléolos são reorganizados restando apenas as fibras polares no citoplasma. Neste ponto, só resta acontecer a citocinese, ou seja a divisão do citoplasma, para que consideremos completa a divisão.

Muitos agentes quimioterápicos, como por exemplo o vincristine, vinblastine, podophylotoxin e maytansine[6], têm como base de sua ação sobre

a célula tumoral uma interferência sobre a formação das fibras do fuso, impedindo que a polimerização da tubulina resulte em fibras do fuso normais. Em resumo, a ação dessas substâncias tem como objetivo final impedir que a tubulina se polimerize normalmente, como microtúbulos que sirvam para a divisão celular. Já o taxol, como foi demonstrado em 1979 por Suzan Horwitz do Albert Einstein College (EUA)[12], tem um papel inverso dentro da célula no diz respeito aos microtúbulos, pois sua função é estimular a formação dessas estruturas, e prevenir contra a despolimerização da tubulina que já se encontrar neste estado. A princípio soa estranho dizer que as substâncias de interação tão claramente opostas em relação a uma proteína específica tenham como resultado ação anti-cancerígena. Mas o que parece ser importante neste caso, é que a perturbação que tais substâncias provocam no delicado equilíbrio tubulina-microtúbulos afeta o trabalho de divisão celular e pode impedir que este se complete. Podemos entender então, a origem da grande potência do taxol, que é a principal razão para seu sucesso como fármaco anti-câncer. Observando as figuras da mitose (fig. 1.3), podemos notar que a ação dos agentes quimioterápicos comuns se daria principalmente quando a célula fosse atingida pela substância na Prófase ou Prometáfase, que são as fases onde há crescimento de fibras. Por outro lado, o taxol é eficiente na interrupção da mitose em maior número de fases, pois sua ação é "congeladora", depois de se ligar à tubulina polimerizada, impede que ocorra a despolimerização[13]. Por essa razão já fica claro que a substância tem sua maior eficiência ao interferir no bom andamento de três

fases: da Prófase, porque, mesmo sendo a célula atingida pela substância durante a intérfase, já ocorre o "congelamento", impedindo que o citoesqueleto se desmanche fornecendo tubulina despolimerizada para iniciar a divisão, e também bloqueia a divisão dos centríolos, que são formados pela tubulina; da Anáfase, pois é uma fase em que ocorre despolimerização de tubulina para encurtar as fibras que puxam os cromossomos até os pólos; da Telófase, pois as fibras polares precisam se despolimerizar para que o citoesqueleto se forme novamente. Contudo, mesmo a célula sendo atacada pela substância durante a Prometáfase ou Metáfase, a mitose será interrompida, pois o início da Anáfase será bloqueado. Em outras palavras, o taxol cumprirá sua função anti-mitótica seja qual for a fase da divisão celular em que ocorrer o ataque à tubulina. Essa versatilidade é a grande vantagem farmacológica do taxol em relação aos outros agentes quimioterápicos.

Outro aspecto que deve ser comentado, é que todos estes fármacos atingem não só as células tumorais, como também as normais. Essa é a razão para existirem os conhecidos e temidos efeitos colaterais, que são característicos de todos os agentes quimioterápicos, inclusive do Taxol. Infelizmente, é natural que a maioria das substâncias que são tóxicas para as células tumorais, também o sejam para as normais pois elas são bastante semelhantes (esse problema é discutido na seção 1.3). Assim, precisamos entender como uma substância tão tóxica quanto o taxol, pode não ser fatal para um ser humano, enquanto é extremamente eficiente no ataque a células tumorais deste mesmo organismo. Como vimos, esses agentes anti-mitóticos

têm sua ação tóxica mais evidenciada durante a mitose, notemos que uma célula somática normal passa a maior parte de sua vida crescendo ou mantendo seu metabolismo, sem entrar em mitose e, quando atinge a mitose, esta não se demora muito, é bastante breve se comparada com o tempo total de vida celular. Por outro lado, uma célula tumoral tem, como característica principal, o descontrole de seu processo reprodutivo. A mitose ocorre de maneira praticamente ininterrupta em todas as células de um tumor, o que forma rapidamente camadas superpostas de células que se tornam prejudiciais ao organismo originando um câncer. Ou seja, ao contrário das células normais, as células tumorais passam a maior parte de sua vida em mitose, possibilitando a uma substância tóxica que fique potencializada durante a mitose, seja mais nociva às células do tumor do que às do resto do organismo do paciente.

1.2.2 Mecanismo Bioquímico

Após a breve descrição a respeito do modo de ação do taxol, devemos entender como são os mecanismos pelos quais esta molécula concretiza sua ação anti-tumoral, que é baseada na ligação com a tubulina e subseqüente estabilização das estruturas do citoesqueleto[6]. O mecanismo de ligação é chamado reconhecimento molecular, e existem algumas maneiras bem definidas para uma molécula reconhecer outra[6].

- As interações eletrostáticas entre as cargas existentes nas moléculas interagentes;

- Pontes de hidrogênio, entre pares de elétrons de oxigênio e nitrogênio e átomos de hidrogênio em moléculas. Estas pontes são formadas por um átomo de Hidrogênio entre átomos de elementos não metálicos com maior eletronegatividade. São ligações como as conhecidas N-H...N e O-H...O.

- Outro mecanismo de interação entre moléculas, desde que elas possam ficar muito próximas devido à sua forma encaixante (como no caso clássico de reações tipo chave-fechadura), é a interação de van der Waals.

- Além dos três mecanismos citados acima, devemos citar as interações hidrofóbicas, que ocorrem quando as moléculas do fármaco perturbam as de água que hidratam uma proteína.

Cada um desses mecanismos de reconhecimento molecular[6] é fortemente influenciado pela estrutura da molécula. Isto porque, como veremos mais à frente, pequenas mudanças estruturais podem trazer efeitos drásticos na composição dos orbitais moleculares. Sendo assim, mudanças estruturais podem levar a análogos mais potentes, e a estrutura eletrônica dos compostos talvez possa nos dizer ao menos, quais substituições não são promissoras para aumentar a atividade. Estudar a estrutura eletrônica dessas substâncias e tentar relacioná-la com a atividade biológica é importante por ser bem mais simples que fazer estudos dos mecanismos bioquímicos de maneira direta. Esses mecanismos são extremamente complexos, envolvendo um número extremamente grande de reações, dificultando o

trabalho do ponto de vista computacional. Portanto, tentar encontrar correlações entre a estrutura eletrônica e a atividade bioquímica dos compostos de interesse biológico pode ser uma boa estratégia de trabalho. E é justamente esta a estratégia que usaremos neste trabalho, como será discutido em detalhes nos próximos capítulos.

1.3 Dificuldades para o uso farmacológico

Em 1991, o taxol era uma molécula de grande importância para a medicina, porque era de grande eficácia, parecia uma droga milagrosa, porém com um grande problema: sua disponibilidade era tão baixa que o uso comercial se tornava praticamente inviável[8]. Esta pouca produção se dá porque o rendimento na obtenção do material ativo a partir da árvore é extremamente baixo. Somente cerca de 0.01% a 0.03% do material colhido após a secagem resulta efetivamente em taxol. Para ter uma idéia mais clara da dificuldade enfrentada, basta citar que, para o tratamento de um único paciente, é necessário utilizar a casca de cerca de duas árvores adultas. Daí notamos que o uso dessa substância a partir da planta em larga escala se torna inviável, tendo em vista a demora para o crescimento da árvore. Além disso, há o problema causado por todo o impacto que haveria com a eliminação da Pacific Yew de seu ecossistema, prejudicando espécies animais e vegetais que têm íntima relação com ela[8].

A alternativa natural para tentar obter a substância em quantidade suficiente para o uso comercial era encontrar rotas de síntese total ou parcial. A síntese total se mostrou muito pouco produtiva, extremamente complexa e cara, com mais de 30 passos intermediários e tem sido considerada uma das maiores conquistas da química orgânica deste século, mas não contribuiu para o aumento da oferta do produto[13,16]. Apesar disso, essa síntese permitiu o surgimento de um número muito grande de compostos derivados do taxol para serem testados. Pelo menos dois sucessos parciais foram obtidos: o primeiro com a descoberta de uma síntese parcial a partir do 10-Deacetil Baccatin III, encontrada na "European Yew" ou "Taxus Baccata", planta semelhante à "Pacific Yew" e o outro foi a descoberta de um composto intermediário da síntese que é tão ativo quanto o próprio taxol, chamado taxotere[7] (fig. 1.4).

Existem ainda outras dificuldades a enfrentar no uso dessa droga, como a alta toxidade da substância para as células normais, que se deve principalmente à não seletividade do ataque químico. Essa característica é a principal razão para os efeitos colaterais que conhecemos dos tratamentos quimioterápicos. Neste ponto também é interessante comentar que, dentre os agentes quimioterápicos existentes, um dos que têm efeitos colaterais menos intensos é o taxol. O problema da não especificidade tem sido estudado intensamente, e uma molécula promissora na tentativa de minimização desses efeitos é o Protax[6] (fig. 1.5-a) derivado do taxol. Para garantir que ele deposite o taxol apenas nas células tumorais, os

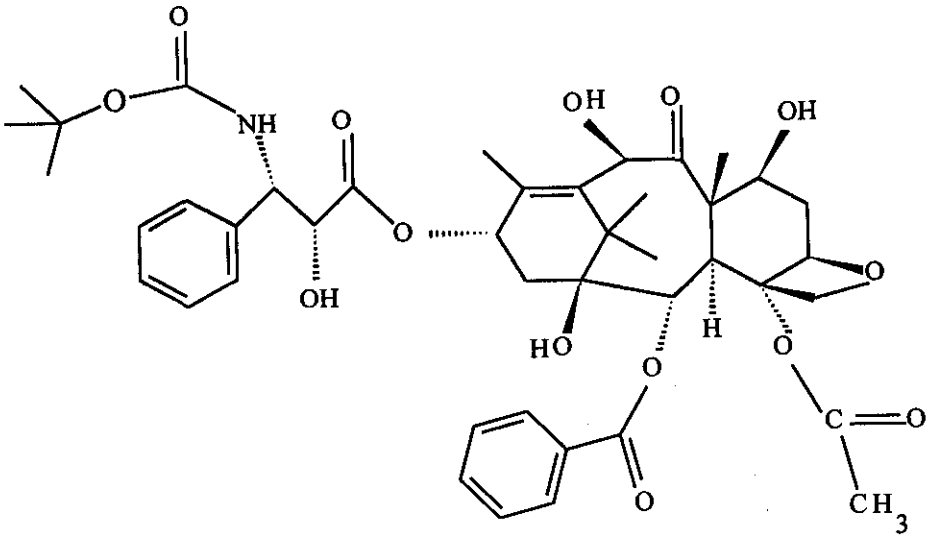
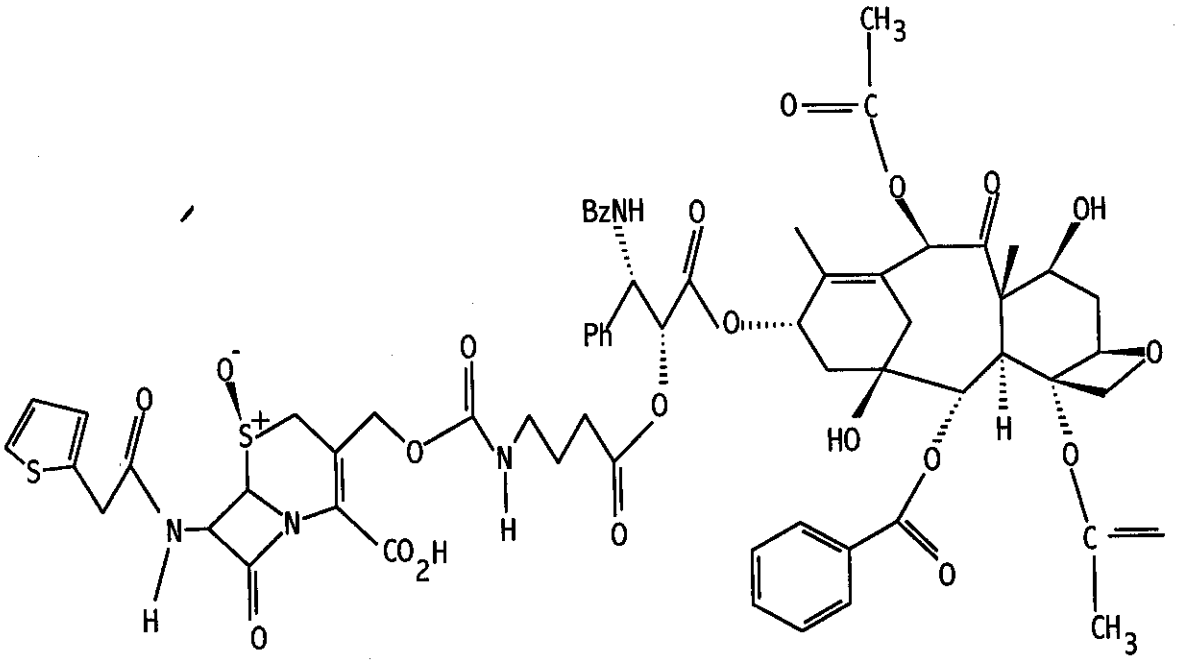
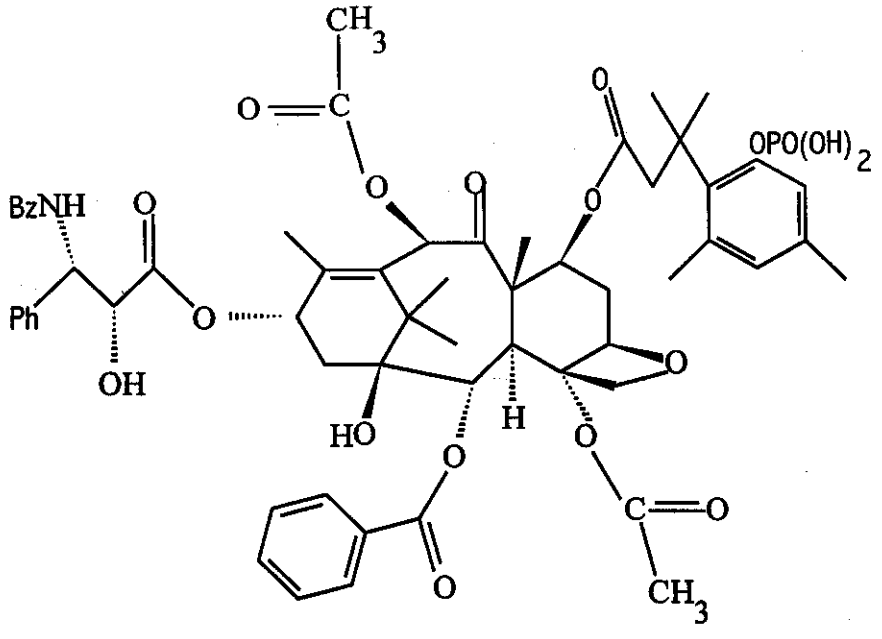


Figura 1.4 - Estrutura esquemática doTaxotere



1.5-a



1.5-b

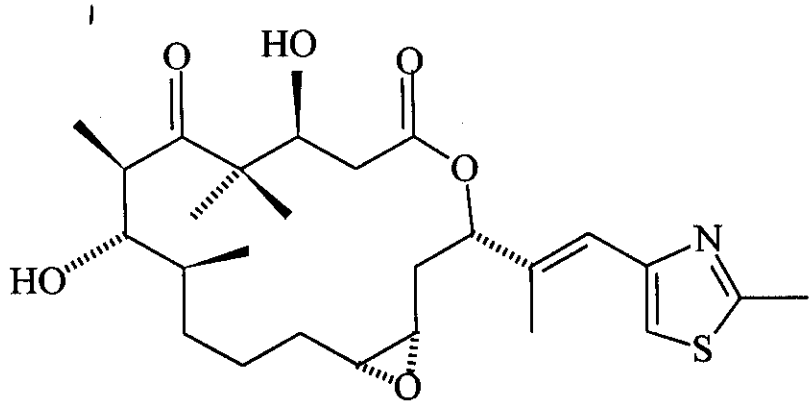
Figura 1.5 - Análogos do Taxol: (a) Protax, tentativa de aumentar a especificidade do ataque químico, (b) análogo solúvel do Taxol, desenvolvido pela Bristol-Meyers Squib.

pesquisadores desenvolveram um anticorpo que se prende a uma proteína específica de tais células. Neste anticorpo é presa uma enzima, a ß-lactamase, para que ela possa quebrar as moléculas de Protax, liberando o taxol de forma que sua ação seja específica.

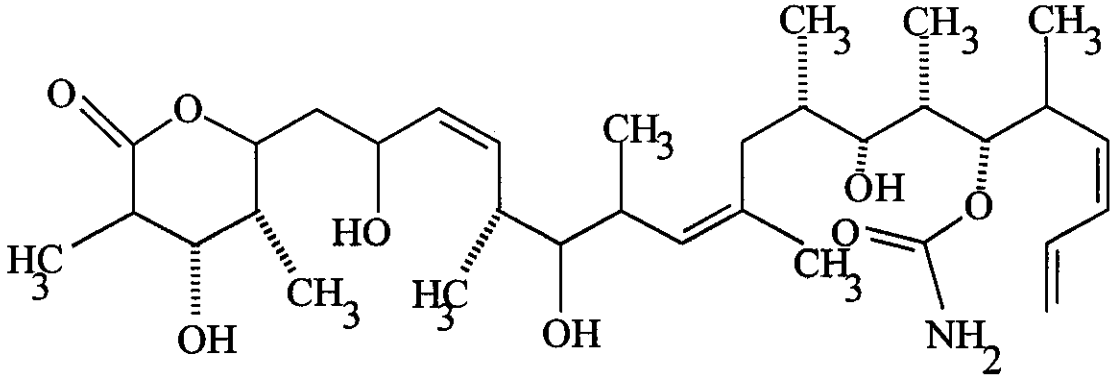
Outro problema que tem sido estudado é a baixa solubilidade do taxol[10,14,15] em água, que constitui uma grande dificuldade do ponto de vista farmacológico, por dificultar o transporte da substância até o alvo, no caso os tumores. Uma promessa para solucionar este problema, pode ser um novo taxóide desenvolvido pela Bristol-Meyers[6] (fig. 1.5-b). O grupo hidrofílico, faz com que o composto se torne solúvel em água. Enzimas no corpo do paciente quebram a molécula, deixando o taxol livre para agir sobre o tumor.

1.4 Motivação para o desenvolvimento deste trabalho

Ao mesmo tempo que se desenvolvem tais trabalhos, existe uma outra busca que tem trazido resultados interessantes. É a procura por substâncias que tenham ação mais eficiente contra os tumores. Nesta busca por maior atividade, surgiram alguns compostos interessantes, como o já citado taxotere, e outros análogos, derivados ou não do próprio taxol. Contudo, foram também descobertos outros agentes de ação semelhante sobre as células apesar de, pelo menos aparentemente, não possuírem nenhuma semelhança estrutural com os taxóides. Duas dessas substâncias são o Epothilone[16,17] (figura 1.6-a) e o Discodermolide[2] (figura 1.6-b), que têm até



1.6-a



1.6-b

Figura 1.6 - Substâncias de ação semelhante ao Taxol: (a) Epothilone, obtido a partir de uma bactéria, (b) Discodermolide, produzido a partir de uma esponja marinha.

mesmo algumas vantagens a seu favor para o uso em medicamentos. O Epothilone, de atividade mais intensa que o Taxol, tem a vantagem de ser mais solúvel em água. O Discodermolide, além de ser bem mais solúvel, apresentou resultados muito melhores nos testes de estímulo à polimerização da tubulina[2]. Ambos têm também em comum outra vantagem, a maior possibilidade de produção em larga escala, pois um é produzido naturalmente por uma bactéria (o Epothilone) enquanto o outro vem de uma esponja marinha. Como exemplo de vantagem para o uso farmacológico, basta citar um dos testes feitos por Haar *et al*[2] com células de câncer de mama, onde 10nM de Discodermolide se mostraram tão eficientes quanto 10 μM de Taxol para estimular a formação de microtúbulos. Apesar de fundamentais na pesquisa de substâncias de interesse biológico, estes métodos experimentais têm em comum um fator de limitação para o trabalho do pesquisador, principalmente aquele que tem poucos recursos e/ou pouco tempo para desenvolver suas pesquisas, que é o alto custo e a demora destes testes. Qualquer tentativa de síntese dessas substâncias ou mesmo de isolamento de novos compostos produzidos pela natureza demanda, invariavelmente, muito tempo e dinheiro, mas muitas vezes o que se deseja é produzir com certa urgência os fármacos. Dentro deste panorama, nota-se que seria bastante promissor encontrar um meio de saber, pelo menos em linhas gerais, como atacar o problema, ou que tipo de estruturas têm mais chance de apresentar a atividade biológica desejada, etc. O desenvolvimento de uma metodologia que permita predizer, pelo menos qualitativamente,

quais seriam as estruturas mais e menos promissoras dentro de um determinado grupo, seria de grande auxílio no desenvolvimento de novos e melhores fármacos. A investigação da existência dessa possibilidade para o taxol e derivados é o objetivo do presente trabalho. A idéia básica deste trabalho foi buscar, usando métodos semi-empíricos para estudar a estrutura eletrônica do taxol e derivados (em especial, métodos particularmente desenvolvidos para o estudo de propriedades geométricas e espectroscópicas de materiais orgânicos), índices eletrônicos que se relacionem com a atividade biológica desses compostos. Esta estratégia foi inspirada nos resultados do trabalho desenvolvido por *Barone et al*[3,4] para os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (capítulo 2, fig. 2.1), uma classe de compostos carcinogênicos muito conhecidos. Nesse estudo, utilizou-se o modelo de Hückel para determinar índices eletrônicos que estão ligados à atividade carcinogênica destes compostos. Então, numa extensão, utilizou-se um método mais sofisticado, o PM3[3], que trouxe essencialmente os mesmos resultados, porém com pequenas modificações, resultantes das diferenças de parametrização entre os dois métodos[3]. Esta correlação se traduziu em 3 regras, que envolvem considerações a respeito da contribuição relativa de algumas regiões das moléculas para a densidade de estados eletrônicos, principalmente envolvendo os orbitais de fronteira. Dentro deste panorama, o objetivo deste trabalho é tentar fazer uma extensão do trabalho realizado para os HAPs (que são moléculas aproximadamente planares) para compostos mais complexos como os Taxóides.

Capítulo 2

Teoria de Índices Eletrônicos

2.1- Introdução

Neste capítulo, faremos um estudo a respeito do método desenvolvido por Barone *et al*[3,4] para relacionar a atividade biológica e a topologia de um grupo de moléculas muito conhecido, o grupo dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP, fig 2.1). Isto será feito porque um dos objetivos deste trabalho é, justamente, verificar se podemos fazer uma extensão da metodologia desenvolvida para os HAP para o caso de moléculas mais complexas, no nosso caso o taxol e alguns derivados.

Os HAP têm sido objeto de intensas pesquisas nos últimos anos. Vários grupos trabalharam no intuito de obter parâmetros teóricos confiáveis que permitam distinguir, pelo menos qualitativamente, quais dos HAPs são carcinogênicos. Estes compostos têm estruturas muito semelhantes embora seu poder carcinogênico, medido pelo índice de Iball[5], varie muito. Este índice é definido como a porcentagem de câncer de pele ou papiloma induzidos em ratos submetidos à aplicação de tintura do composto carcinogênico na pele, dividido pelo período de latência e multiplicado por 100. A atividade cancerígena destes compostos foi estudada de maneira

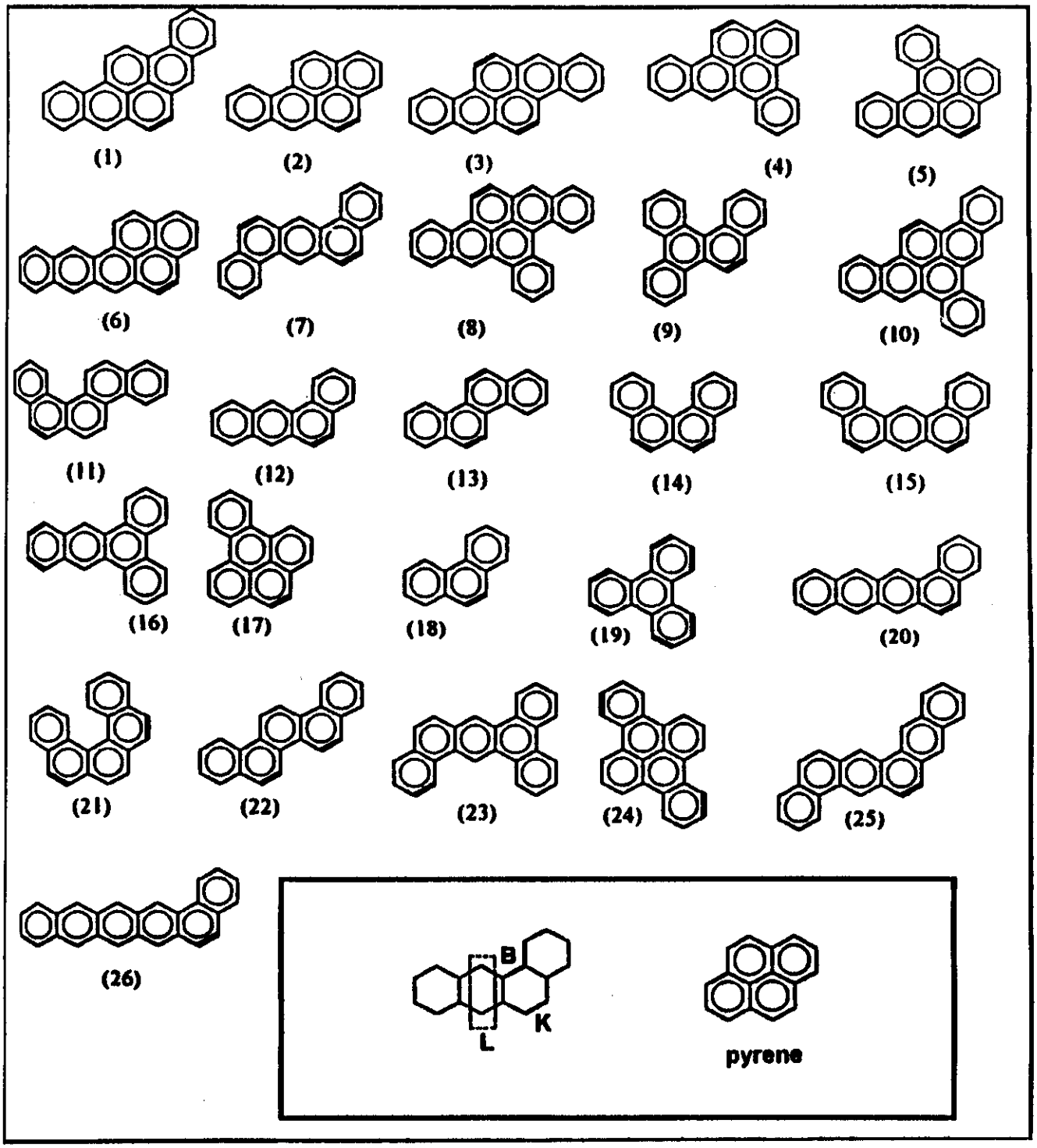
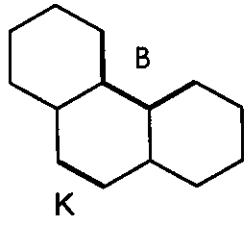


Figura 2.1 - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos, arranjados em ordem decrescente de atividade e com a ligação de maior ordem indicada em negrito.

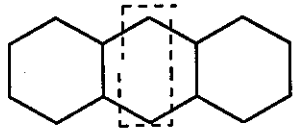
sistemática na década de 30 por Cook e colaboradores[18]. Testes experimentais demonstraram a existência de algumas correlações entre a intensidade da atividade biológica (expressa pelo índice de Iball) e certos aspectos topológicos dessas moléculas.

Os primeiros estudos teóricos, realizados por Coulson[18], Schmidt[19] e Svarthölm[20] exploraram estes aspectos, tentando correlacionar a geometria e características eletrônicas das moléculas. Schmidt e Svarthölm mostraram que certas regiões dos hidrocarbonetos aromáticos deveriam ter densidades eletrônicas mais altas que outras e, conseqüentemente, serem mais susceptíveis a reações eletrofílicas. Svarthölm calculou as valências livres dos elétrons π e associou com a reatividade das moléculas. Neste trabalho, surgiram os conceitos, que depois serviriam de base para a chamada teoria das regiões K,L e Baía[3] (fig 2.2).

Uma teoria completa de carcinogênese química, baseada em cálculos quânticos, foi desenvolvida pelos Pullmans[21,22] que demonstraram, utilizando o método de Hückel[23], que os HAPs apresentavam alta densidade eletrônica na região K. Os cálculos da energia de localização destes hidrocarbonetos indicam que a atividade cancerígena está associada à presença de valores específicos para as energias de localização. Esses valores deveriam ser pequenos para as energias de orto-localização(simetria esférica) na região K, e grandes para as energias de para-localização(simetria cilíndrica) na região L. Índices eletrônicos para os elétrons π das regiões K e L foram utilizados por Pullman para correlacionar os dados experimentais de ação

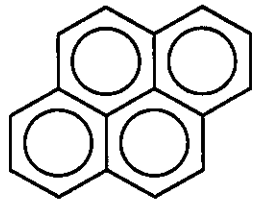


2.2-a



L

2.2-b



2.2-c

Figura 2.2 - Típicas regiões K,L e Baía: (a) Fenantreno com as regiões K e Baía indicadas, (b) Antraceno com a região L indicada, (c) pireno.

carcinogênica. Nenhum índice isolado foi suficiente para descrever os dados disponíveis, mas alguns índices compostos foram propostos[21,22].

2.2 Metodologia e cálculos com o Método de Hückel

A teoria das regiões K e L e teorias similares, baseadas em índices eletrônicos, têm sido testadas, mas nenhuma é totalmente consistente com os dados experimentais de carcinogênese disponíveis na literatura. O mesmo acontece com outras teorias mais recentes, que incluem um grande número de parâmetros e técnicas sofisticadas de análise de dados ou mesmo de redes neurais e inteligência artificial, enquanto outras tentam encontrar correlações por meio de análise estatística, ou reconhecimento de padrões[24-29]. Mesmo com o uso de todas essas técnicas sofisticadas, não foi possível encontrar, pelo menos de maneira satisfatória, correlações que esclarecessem de maneira completa o que distingüe as moléculas ativas das inativas. E justamente esta foi a busca de Barone *et al*[4]: desenvolver, com o uso de técnicas mais simples que as citadas acima e com um modelo relativamente simples (que é o modelo de Hückel) um método para resolver este problema. O método desenvolvido (ao qual chamaremos *Teoria de Índices Eletrônicos*), é baseado na densidade de estados calculada sobre regiões limitadas das moléculas, que resulta em regras simples de identificação da atividade carcinogênica dos HAPs. Foram estudados 26 HAP que já tinham sido investigados por Pullman[23,30].

Basicamente, a metodologia utilizada foi o estudo comparativo de estruturas eletrônicas das moléculas, tendo como ferramenta os cálculos de densidade de estados local e total. A Densidade de Estados (DE) é definida como o número de estados por unidade de energia, enquanto que a Densidade Local de Estados (DLE), é a densidade de estados calculada sobre uma região específica da molécula. Essas grandezas têm como vantagem o fato de trazer informações a respeito do comportamento bioquímico, reatividade química, etc., sem que seja necessário recorrermos aos conceitos de regiões K-L ou Baía. Procurou-se analisar a DE e a DLE calculada sobre diversas regiões das moléculas, incluindo as regiões K-L e Baía, que normalmente são usadas para definir índices críticos para a atividade carcinogênica. Esta primeira análise se revelou infrutífera, mas foram encontradas outras regiões mais promissoras levando em consideração o conceito de ordem de ligação. A ordem de ligação entre dois átomos mede a contribuição total dos elétrons π para a ligação entre eles[3] e fornece uma idéia de quão forte é a ligação. A análise da foi feita sobre os cálculos da DLE para o anel que contém a mais alta ordem de ligação nas moléculas. Com estes cálculos surgiu um padrão bem definido que englobou todas as 26 moléculas consideradas,que se traduziu em 3 regras simples que explicaremos de maneira breve. A primeira regra é baseada na arquitetura molecular e na diferença de energias entre os orbitais HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e seu antecessor em energia o HOMO-

1 (à qual chamaremos Δ), sendo aplicada somente às moléculas que contêm estruturas tipo pireno (figura 2.2-c):

1- **Se a molécula contém uma estrutura tipo pireno e $\Delta>0.25\beta$, é fortemente carcinogênica; do contrário, será inativa.**

Para as outras estruturas, são necessárias duas regras adicionais:

2- **Se a contribuição do HOMO para a DLE é a maior de todas (pico) a molécula será completamente inativa.**
3- **Se a contribuição do HOMO para a DLE é maior que a do HOMO-1 (mas não é o pico mais alto) e se $\Delta>0.15\beta$ a molécula tem atividade carcinogênica forte ou moderada; se a contribuição do HOMO-1 é maior que a do HOMO, a molécula apresenta atividade fraca ou é inativa.**

Onde β vale aproximadamente 2.4 eV. Tais regras podem ser utilizadas para qualquer uma das moléculas da fig. 2.1 com 100% de acerto.

A análise mostrou que a atividade carcinogênica dos HAPs é determinada basicamente por três fatores: a arquitetura molecular, um valor mínimo para a energia Δ e as contribuições relativas dos orbitais HOMO e HOMO-1 para a DLE sobre o anel de maior ordem de ligação. O resultado que mais se destaca neste trabalho é justamente a existência de um valor mínimo para a

diferença de energia Δ para que exista atividade carcinogênica. Esse índice indica que um orbital de fronteira bastante isolado, ou seja um HOMO bastante afastado do HOMO-1, é a primeira condição para que se determine a ação cancerígena da substância. No caso das moléculas pirênicas tal condição é suficiente, enquanto que para as outras é apenas condição necessária. Mas também se faz necessária a análise da competição entre as contribuições relativas para a DLE desses dois estados, conforme fica claro pelas regras 2 e 3.

Esses resultados revelam a importância da topologia molecular (principal ingrediente no modelo de Hückel) para a determinação da atividade biológica de um composto. Porém, o método utilizado apresenta uma desvantagem: não é aplicável a moléculas com estrutura tridimensional, o que vem de uma limitação natural do método de Hückel. Por isso, foi feita uma análise dessas substâncias com o uso de métodos semiempíricos mais sofisticados como o PM3[3]. O objetivo de tal esforço, foi desenvolver uma metodologia que pudesse ser aplicada também aos compostos não planares e, se possível, que utilizasse os mesmos indicadores eletrônicos na descrição dos HAPs.

2.3 Cálculos com método semi-empírico

As moléculas tiveram sua geometria otimizada com o uso do PM3[3,34]. Além disso, foi determinado o anel de maior ordem de ligação para cada uma

delas e calculada a densidade local de estados sobre tal região. Em todos os casos, o anel onde se encontrou a maior ordem de ligação coincidiu com o resultado obtido pelo método de Hückel. Como resultado para os HAPs, observou-se que os indicadores utilizados seriam os mesmos, e que a diferença entre as regras encontradas anteriormente e as obtidas com os métodos de maior sofisticação fica por conta de uma nova calibração no valor da diferença Δ. Esse novo valor do índice existe devido à diferença que existe entre os parâmetros de um método e de outro. Tais diferenças surgem, de certa maneira, pelo fato de haver uma diferença na qualidade da descrição da função de onda de um método para outro, como é o caso do método PM3, que leva em conta mais integrais que o método de Hückel e se torna mais preciso para alguns tipos de cálculo (como é o caso das moléculas tridimensionais). Dessa maneira, ficamos com as seguintes regras[3]:

1- **se a molécula contém uma estrutura tipo pireno e Δ>0.5 eV, será fortemente carcinogênica; do contrário, será inativa.**

Para as outras moléculas, a classificação é feita com a análise do Δ e também da competição de contribuição relativa dos orbitais HOMO e HOMO-1 para a DLE na região do anel com maior ordem de ligação:

2- **se a contribuição do HOMO para a DLE é maior que a do HOMO-1 e se Δ>0.3 eV a molécula apresentará atividade carcinogênica forte ou moderada; se Δ<0.3 eV, a molécula terá atividade fraca ou será completamente inativa.**

3- **se a contribuição do HOMO-1 é maior que a do HOMO, a molécula apresentará atividade fraca ou será inativa.**

Da mesma maneira que o anterior, esse conjunto de regras pode ser aplicado com 100% de eficácia aos HAPs da fig. 2.1. Assim temos que:

1- se aplica às moléculas 1,2,3,4,5,6,7,8,10,17 e 24;

2- se aplica a 14,18,19,21,22,25,7,9,13;

3- se aplica a 11,12,15,16,20,23 e 26.

O significado destas regras é o mesmo já determinado no cálculo com o método de Hückel. Os índices obtidos funcionam como uma identificação de atividade carcinogênica, classificando cada molécula em ativa ou inativa. A relevância do valor de Δ se torna maior, pois os carcinogênicos fortes têm um valor mínimo necessário para este índice.

2.4 Conclusões

Como conclusão destes estudos, temos que a arquitetura molecular e as relações entre os orbitais de fronteira parecem ser realmente essenciais para determinar, dentro de um grupo de compostos, a presença de substâncias cancerígenas ou não. As regras encontradas por Barone *et al* são extremamente simples e eficientes, ao contrário de outros métodos estudados anteriormente. Os dois métodos utilizados, o Hückel simplificado e o semiempírico sofisticado PM3, concordaram de maneira satisfatória no que diz respeito à formulação das regras. Tal concordância mostra, primeiramente, que as regras não são conseqüência direta dos métodos utilizados.Em outras palavras o método não "fabrica" falsas regras. Isso nos leva a concluir que a metodologia desenvolvida é consistente e, mais ainda, percebemos também que a topologia das moléculas é realmente o fator determinante para o entendimento da atividade biológica desse grupo de moléculas.

Devemos ressaltar que as estruturas derivadas do pireno, tiveram sua descrição muito simplificada com essa metodologia de busca de índices eletrônicos. Basta notar que, se tivermos que aplicar uma das teorias que levam em conta as regiões K-L e Baía a análise se torna mais difícil e bem menos eficiente[3] para esse grupo de compostos do que utilizar a regra 1, que se baseia apenas na análise da distância energética entre HOMO e HOMO-1.

O que é mais importante de todo este trabalho que levou ao desenvolvimento da Teoria de Índices eletrônicos é sua metodologia simples e extremamente eficiente. Esta simplicidade, foi a principal motivação para o desenvolvimento de trabalhos, que analisam a possibilidade de extensão desse tipo de metodologia para compostos mais complexos, como é o caso do presente estudo.

Capítulo 3

Cálculos preliminares com o Baccatin III

3.1 Introdução

Como já foi dito anteriormente, o maior problema encontrado pelos pesquisadores na tentativa de utilizar o taxol como uma droga anti-cancerígena, talvez tenha sido a dificuldade que é encontrada para sua produção em larga escala[7,8]. Essa dificuldade está relacionada ao baixo rendimento e alto custo operacional das rotas de síntese, bem como aqueles relacionados à produção a partir da secagem de material colhido da casca do *Taxus Brevifolia*. Por essa razão, vários esforços têm sido feitos ao longo dos anos para encontrar novas fontes dessa substância e novos caminhos de síntese[6,12]. Durante estas buscas surgiram algumas surpresas interessantes, como o taxotere (capítulo 1, fig. 1.4), um composto intermediário da síntese que é tão potente quanto o próprio taxol[6,7]. Este composto será tratado mais à frente, quando forem discutidos os resultados encontrados para os análogos do taxol (discutidos no capítulo 4). O taxotere é produzido durante uma semi-síntese desenvolvida por Potier e sua equipe no *Instituto Nacional de Química de Produtos Naturais*[31], na França. Eles descobriram que as folhas da "European Yew", árvore semelhante à "Pacific Yew", contém um

composto chamado 10-Deacetil Baccatin III (fig. 3.1) que é essencialmente o Taxol sem a cadeia lateral. Os pesquisadores franceses isolaram grandes quantidades de 10-Deacetil Baccatin III a partir das folhas da *Taxus Baccata* cortando suas folhas e ramos, sem precisar derrubar as árvores. Assim, foi possível construir a cadeia lateral que falta à substância para que se torne o taxol por meio de síntese química.

Este trabalho terminou por inspirar outras buscas do mesmo tipo. Recentemente uma série de novos taxóides foram sintetizados a partir de uma substância análoga ao 10-Deacetil Baccatin III, que é encontrada nas folhas do *Taxus Canadensis*[32]. Esta molécula, tem como vantagem uma solubilidade maior em água, o que traz novas esperanças na busca de análogos do taxol, pois seria razoável esperar uma maior possibilidade de produzir, a partir dessa nova substância, taxóides que sejam também mais solúveis. Isso acabaria favorecendo o surgimento de fármacos mais fáceis de administrar aos pacientes.

3.2 Método

O fato de o 10-Deacetil Baccatin III, ser composto basicamente por estruturas semelhantes às do taxol e de ser razoavelmente menor (o Taxol contém cerca de 60 átomos pesados enquanto que o Baccatin contém 38), são as principais razões para estudarmos sua estrutura eletrônica, antes de tentar fazer os cálculos com o taxol e seus derivados. Vale a pena ressaltar que foram utilizados métodos semi-empíricos nos cálculos de determinação

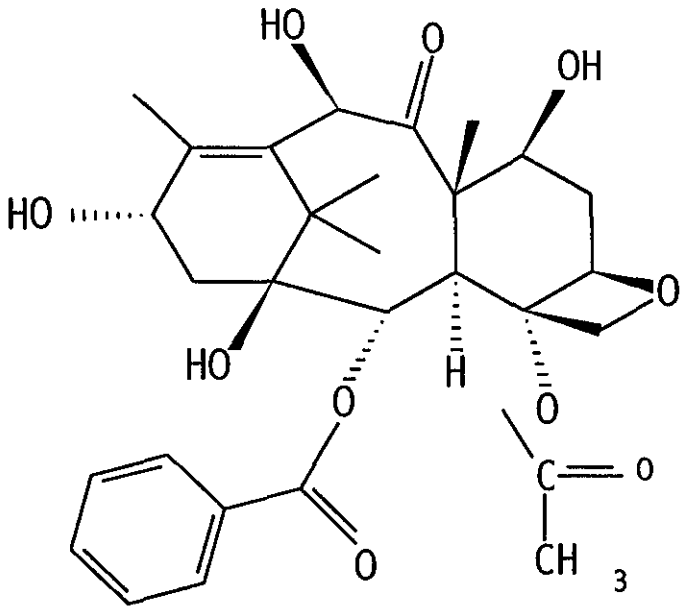


Figura 3.1 - 10-Deacetil Baccatin III

de estrutura eletrônica para estes compostos. Tais métodos, apesar de terem alguns parâmetros já ajustados, exigem cálculos muito extensos, por levarem em conta uma quantidade razoável de termos das integrais[23,33]. Este grande número de cálculos, faz com que o tempo de CPU necessário para uma otimização cresça de maneira não linear (tipicamente com N^3) com o número de átomos considerados[33]. No caso específico do Baccatin por exemplo, são necessárias cerca de duas horas para completar uma otimização (se feita numa estação SUN modelo *Sparc 4*). Depois foi possível verificar que, para otimizar o taxol e seus derivados esse tempo poderia até mesmo triplicar ou quadruplicar. Por essa razão, esta molécula menor foi tratada primeiramente, como um teste para termos alguma indicação que mostrasse se valeria a pena aplicar o método de índices eletrônicos para moléculas que fossem maiores e que tivessem, como base de sua estrutura, a substância que é estudada neste capítulo.

Como ponto de partida para este estudo, o que temos de concreto é o resultado dos inúmeros testes experimentais que têm sido feitos nos últimos 30 anos[6] (ver fig. 3.2). Como podemos notar na figura, algumas partes dos taxóides são consideradas essenciais no composto, para que ele apresente atividade anti-tumoral, como é o caso dos 3 anéis benzênicos Ar1, Ar2 e Ar3. Notamos que destes três anéis, apenas Ar3 está presente na estrutura do 10-Deacetil Baccatin III. Outra região importante a ser considerada é o anel Oxetano, também considerado essencial. Outras estruturas, como o Acetato que está ligado ao 10-Deacetil Baccatin III por um dos átomos que

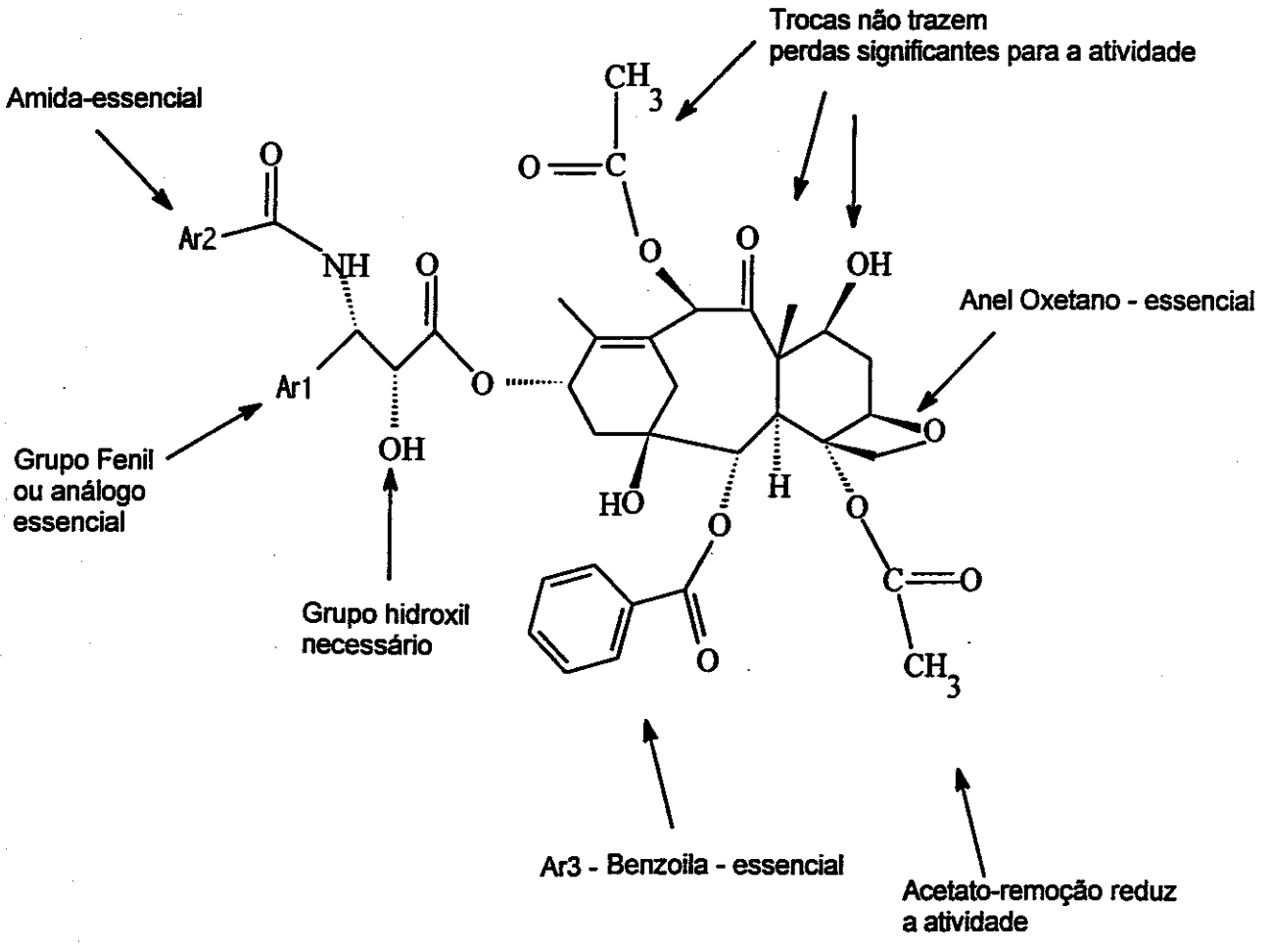


Figura 3.2 - Resumo dos resultados experimentais para os taxóides

formam o Oxetano, têm um papel regulador na atividade biológica de tais compostos (tal estrutura também está presente em nossa molécula de teste preliminar), pois sua retirada reduz o poder anti-mitótico da substância. Existem ainda as posições onde as substituições parecem ser inertes no que diz respeito à atividade, como a posição onde está o outro acetato no Taxol. Nessas posições a substituição ou retirada de estruturas parece não trazer mudanças significativas para a atividade biológica.

A análise da estrutura eletrônica do 10-Deacetil Baccatin III e das relações existentes entre esta estrutura e as indicações experimentais de atividade para os taxóides, são os principais pontos utilizados para avaliar, de maneira preliminar, a possibilidade de extensão dos métodos utilizados para desenvolver a *Teoria de Índices Eletrônicos,* a compostos mais complexos e de maior custo computacional.

Primeiramente, foi feita uma busca conformacional utilizando o método semi-empírico escolhido (PM3), para determinar qual seria a conformação de menor energia para a molécula. Neste ponto também há que se notar que existe outra importante razão para a escolha do Baccatin como molécula de teste preliminar: a ausência da cadeia lateral traz, pelo menos em princípio, uma redução drástica no número de confórmeros estáveis. Isso porque o esqueleto principal do 10-Deacetil Baccatin III, que é também a estrutura base para o taxol, tem pouca mobilidade, formando uma estrutura bem mais rígida que o resto da molécula, que tem grande liberdade para girar e se dobrar. A princípio, os métodos que trariam resultados mais confiáveis e

completos para as funções de onda, seriam os métodos ab initio[33]. Porém, além de não necessariamente trazer os melhores resultados para a geometria das moléculas, tal escolha tornaria o desenvolvimento do trabalho impraticável do ponto de vista computacional. Isso porque o custo de CPU para tais métodos é extremamente dependente do número de orbitais considerados e de funções da base[33] (dependência com a quarta potência do número de funções da base). Sendo assim, os métodos semi-empíricos são a nossa opção de trabalho, não só por limitação operacional, mas também porque trazem resultados confiáveis para compostos orgânicos. Essa busca é importante quando se estuda compostos com atividade biológica, pois sabe-se que o confórmero de menor energia livre é usualmente o que pode ser ativo. As otimizações e conformações foram calculadas com o uso do método semi-empírico PM3, implementado no pacote MOPAC 6.0[34]. Este método tem sido usado no cálculo de estrutura eletrônica de compostos orgânicos com sucesso, trazendo resultados de boa concordância com os dados experimentais[35] em várias de suas propriedades, como geometria, calor de formação, etc. Uma limitação para o uso deste método, é que ele tem a tendência de superestimar energias de estados excitados. Apesar disso, mesmo estes resultados superestimados podem ser utilizados, quando a análise a se fazer, for por comparação entre diversos compostos tendo em vista que o erro cometido é sistemático.

3.3 Resultados

Na estrutura eletrônica do 10-Deacetil Baccatin III, nota-se que há alguns indicativos importantes de como deverá ser a estrutura eletrônica de alguns dos taxóides. Na figura 3.3, temos um desenho da estrutura esquemática do Baccatin onde está indicada a região onde se localizam os orbitais HOMO e HOMO-1 na estrutura da molécula. Nesta figura, vemos que as principais contribuições de orbitais atômicos, responsáveis pela formação de tais orbitais moleculares, estão localizados no esqueleto da molécula. Sobretudo tais orbitais moleculares estão formados sobre partes do anel maior e do anel que contém a ligação dupla. Notemos que nenhum dos grupos indicados como essenciais para a existência de atividade anti-tumoral na figura 3.2 participa na formação destes orbitais, pelo contrário, estão do lado oposto da molécula.

Já na figura 3.4, temos as indicações da localização dos orbitais moleculares que estão logo acima do "gap", ou seja, o LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) e o LUMO+1, seu sucessor em energia. O LUMO tem como contribuições principais para sua formação, os orbitais atômicos provenientes dos átomos que formam o anel benzênico e suas adjacências. Já o LUMO+1 tem como átomos que contribuem para formá-lo, apenas 4 dos 6 átomos deste mesmo anel. Como primeiro resultado, tem-se que o oxetano e o acetato, pelo menos aparentemente, não contribuem significativamente para a formação de nenhum dos orbitais de fronteira, nem

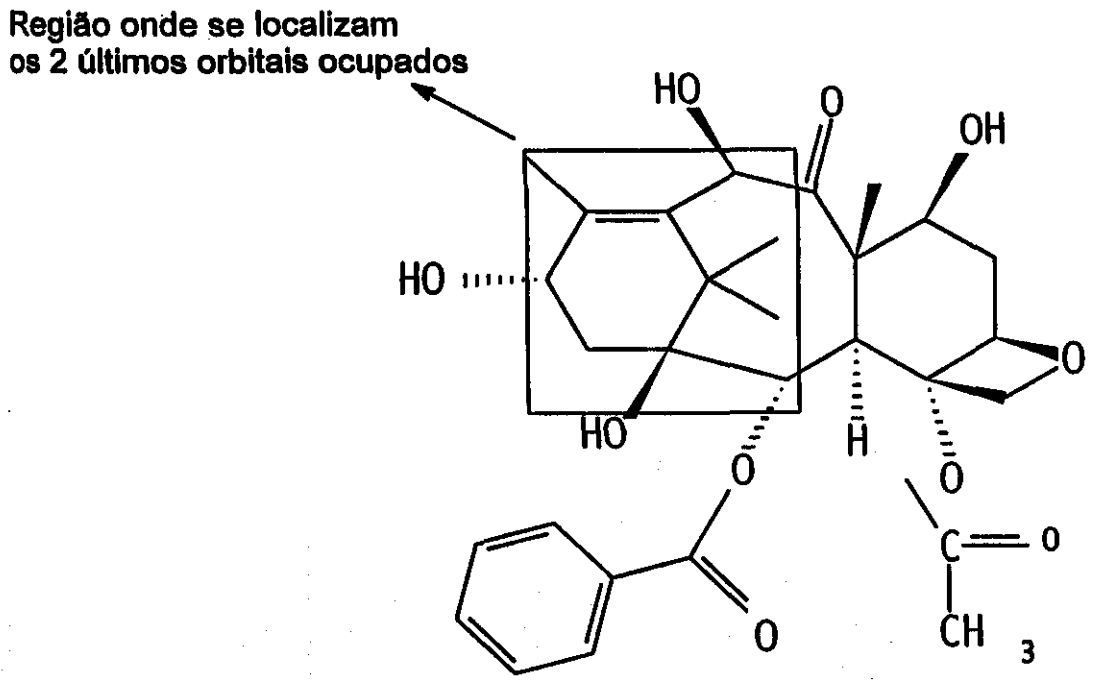
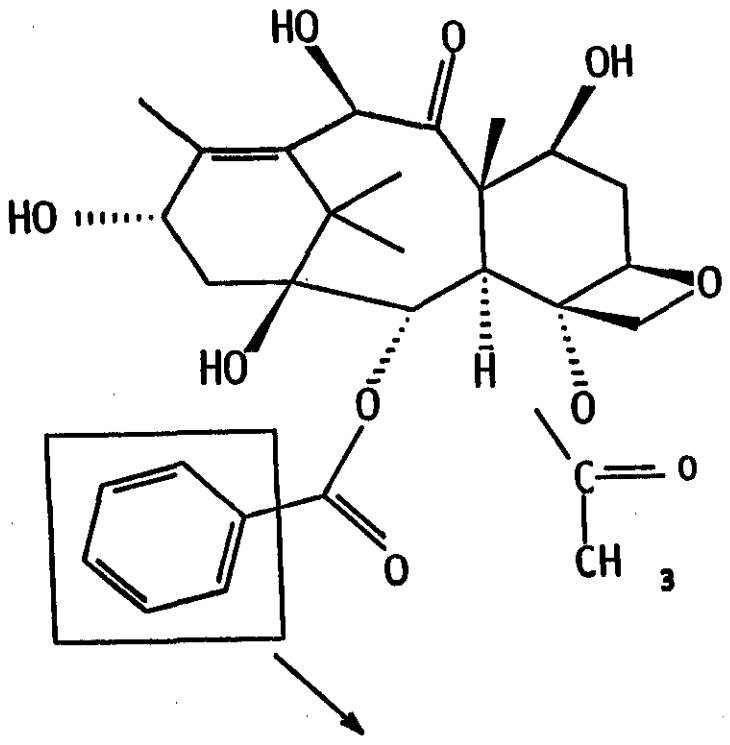


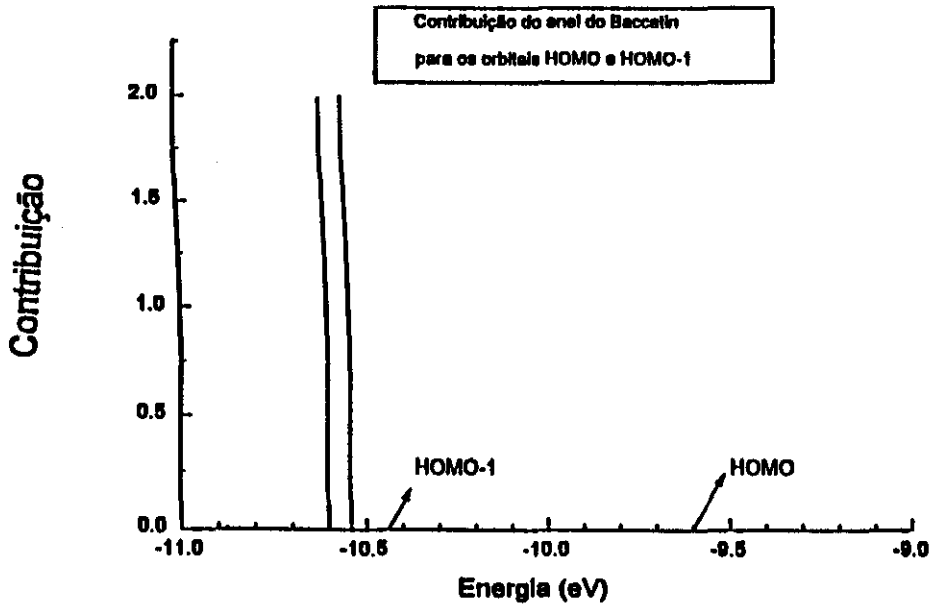
Figura 3.3 - Região onde se localizam os dois últimos orbitais ocupados, o HOMO e o HOMO-1.



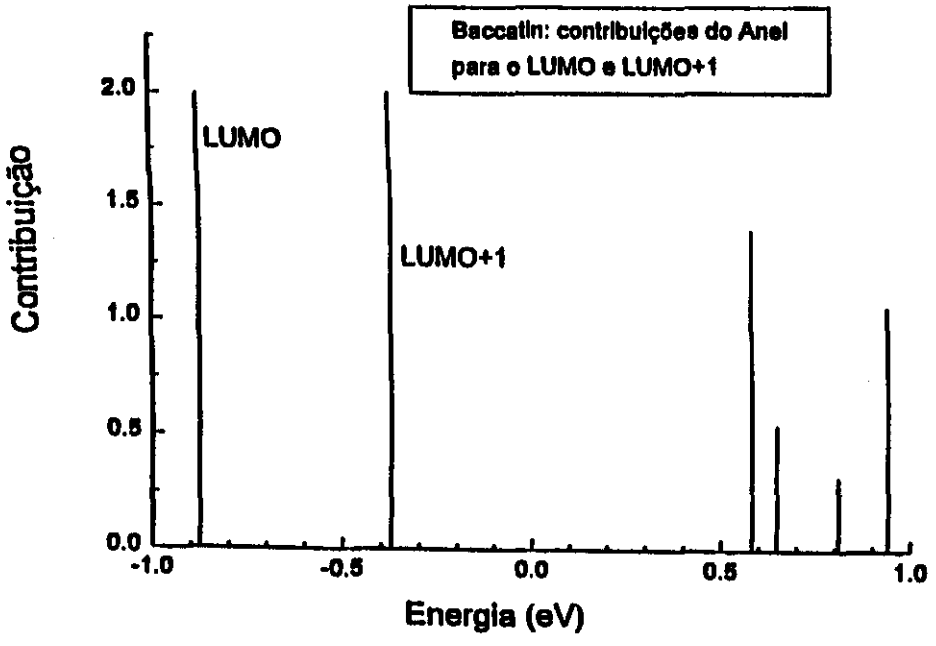
Região onde se localizam
os 2 primeiros orbitais desocupados

Figura 3.4 - Região onde se localizam os dois primeiros orbitais desocupados, o LUMO e o LUMO+1.

mesmo de seus adjacentes, no caso chamados HOMO-1 e LUMO+1. Essa análise nos mostra, ou melhor nos indica, que, possivelmente, o papel dos três anéis externos na determinação da atividade biológica dos taxóides pode estar ligado à formação dos orbitais LUMO e LUMO+1 que são os que estão diretamente ligados aos processos de aceitação de elétrons pelas moléculas. Neste ponto é necessário que se faça outra análise, desta vez um pouco mais precisa, a respeito da contribuição dos orbitais dos átomos integrantes de cada uma das partes que formam a molécula para a formação dos orbitais moleculares de fronteira e adjacências. Isso é feito, apenas para confirmar a ausência de participação de certas regiões, na determinação dos aspectos da estrutura eletrônica em que estamos interessados. A fig. 3.5-a mostra as contribuições relativas para os orbitais moleculares HOMO e HOMO-1 dos orbitais atômicos provenientes dos átomos das regiões do anel. Fica claro que a contribuição desta região para tais orbitais é desprezível. Por outro lado, podemos ver na fig. 3.5-b o análogo para o LUMO e LUMO+1. Nestes casos verificamos a presença de grandes contribuições provenientes da região do anel. Aliás, o anel tem contribuições bastante importantes para esses dois orbitais moleculares como era esperado, tendo em vista a análise feita a partir da localização desses orbitais dentro da arquitetura molecular (fig. 3.4). Outro detalhe que fica bastante evidente na fig. 3.5-b, é o distanciamento entre esses dois orbitais, e também o distanciamento deles dos outros, o que nos lembra, de certa forma, as estruturas encontradas por Barone *et al*[3,4], em sua análise dos HAPs. As



3.5-a



3.5-b

3.5-b

Figura 3.5 - Densidade de estados calculada sobre a região do anel: (a) Energias próximas ao HOMO e HOMO-1, (b) energias próximas ao LUMO e LUMO +1.

contribuições provenientes do acetato, do oxetano e do esqueleto central da molécula, foram também calculadas, porém não foram encontradas contribuições importantes para os orbitais de fronteira em nenhum dos casos. Já em relação às regiões sem importância na composição dos orbitais de fronteira, como o acetato e o oxetano, não podemos avaliar com certeza que tipo de função têm na determinação da atividade biológica destas moléculas. O fato é que essas estruturas não contribuem significativamente, para a formação dos orbitais diretamente envolvidos nos processos de reconhecimento de moléculas (que comentaremos no próximo capítulo). Talvez uma explicação para a importância dessas regiões, esteja no rearranjo que ocorre na estrutura eletrônica com sua retirada. Como os orbitais moleculares são construídos a partir de uma LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals), qualquer mudança em um ou mais orbitais atômicos poderia, em princípio, alterar a nuvem eletrônica em várias partes da molécula. Um exemplo de alteração seria a substituição de átomos na estrutura molecular. Esse tipo de alteração poderia se refletir na região dos orbitais de fronteira, modificando também a atividade bioquímica da molécula.

3.4 Conclusões

Os cálculos realizados com o Baccatin mostraram que sua estrutura eletrônica tem alguns indicativos que encorajam o uso do método de índices

eletrônicos para moléculas maiores. Os orbitais LUMO e LUMO+1 estão localizados sobre a região do anel, que é uma das partes consideradas essenciais para que exista a atividade nos taxóides (fig 3.2). Este resultado já traz uma possível explicação para que esses anéis sejam importantes para manter a atividade dos taxóides: eles devem ser responsáveis pela formação dos orbitais diretamente envolvidos com as interações entre moléculas. Os orbitais HOMO e HOMO-1 estão localizados sobre o esqueleto da molécula, não existindo nenhuma contribuição significativa dos átomos do anel para essas energias.

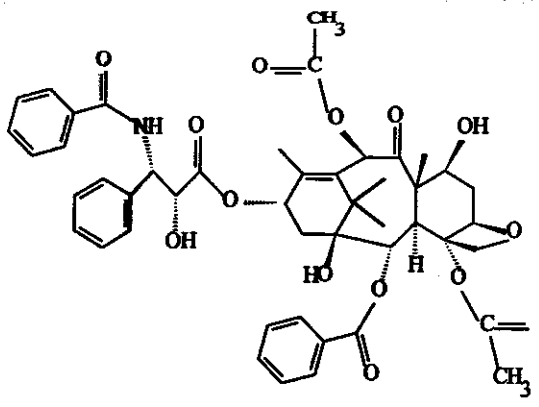
Capítulo 4

Taxóides

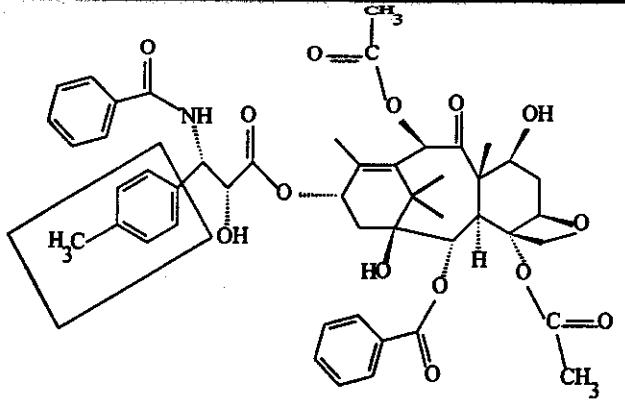
4.1 Introdução

Atualmente, um dos principais caminhos adotados para produzir compostos de ação anti-tumoral, é a obtenção de substâncias análogas ao taxol, os chamados taxóides. Grande parte dessas substâncias são produzidas a partir do próprio taxol, enquanto outras são sintetizadas a partir de outros compostos, como acontece com o taxotere, composto intermediário da síntese parcial do taxol, e que tem atividade anti-tumoral tão boa quanto a dele[7].

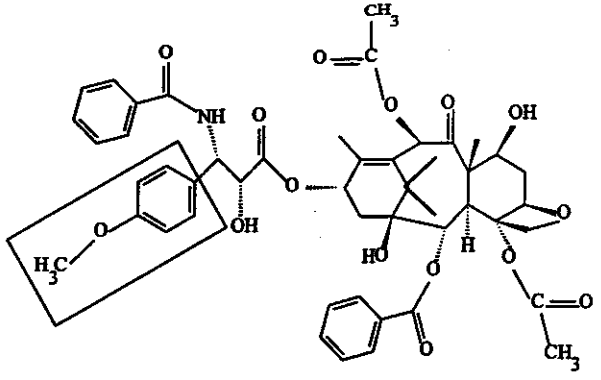
Neste capítulo, são estudados alguns desses análogos, em especial um conjunto de substâncias sintetizadas a partir do taxol, para as quais existem resultados experimentais confiáveis[6](fig. 4.1 e 4.2). Após mais de 20 anos de trabalhos experimentais, o que foi possível identificar como relações entre a estrutura e a atividade dos taxóides pode ser resumido no que está descrito na figura 3.2 (cap 3). Estes dados mostram que certas regiões são essenciais para que um taxóide seja ativo (como os 3 anéis), enquanto outras parecem não ter grande influência sobre este aspecto do comportamento dos compostos. Os grandes problemas deste tipo de estudo, são a grande demora e o custo dos métodos experimentais. Sendo assim, métodos de busca que procurem encontrar alternativas para a investigação



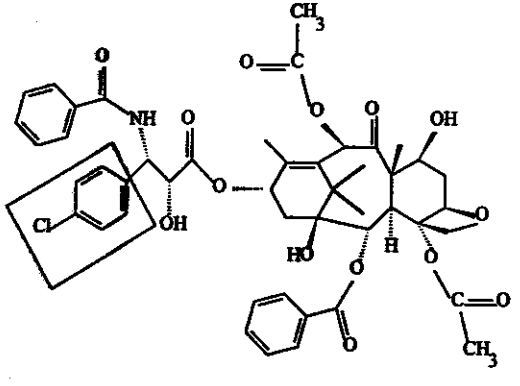
Taxol



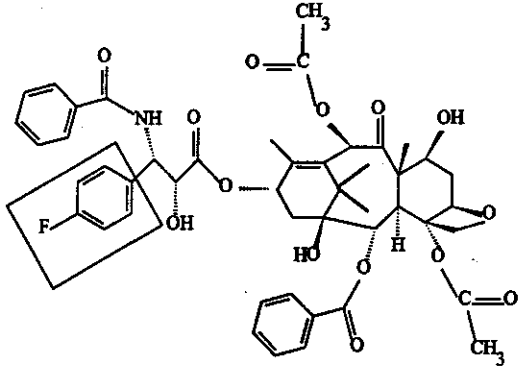
Taxol-f



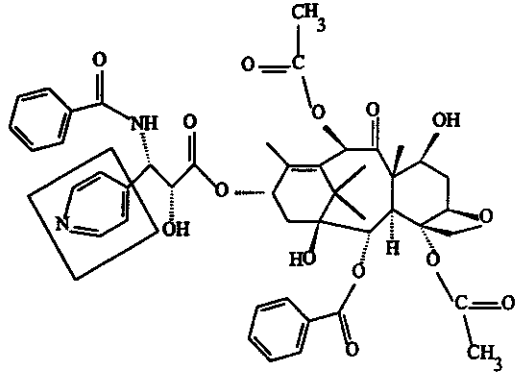
Taxol-g



Taxol-h

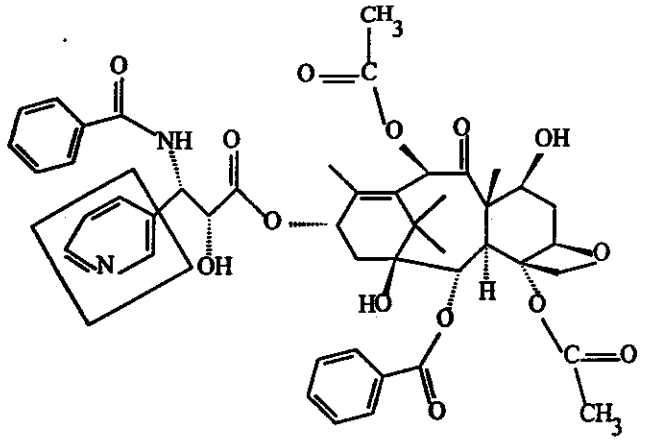


Taxol-i

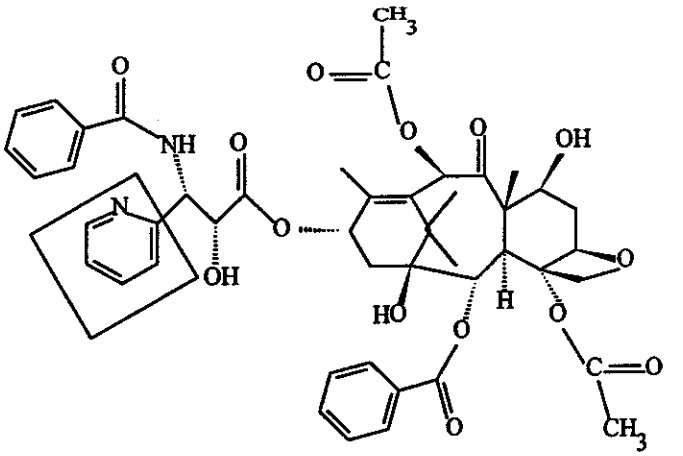


Taxol-a

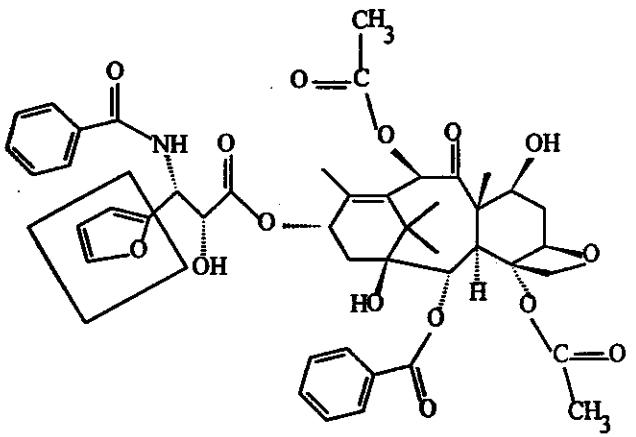
Figura 4.1 - 6 dos 10 taxóides estudados. Nomeados como Taxol, Taxol-f, Taxol-g, Taxol-h, Taxol-i e Taxol-a.
A região assinalada é onde é feita a substituição.



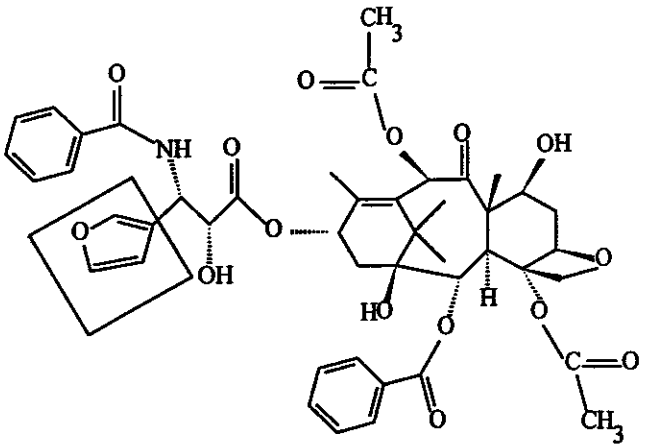
Taxol-b



Taxol-c



Taxol-d



Taxol-e

Figura 4.2 - 4 dos 10 taxóides estudados. Nomeados como Taxol-b, Taxol-c, Taxol-d e Taxol-e.
A região assinalada é onde ocorre a substituição.

experimental são bastante úteis. Por isso, o presente estudo pode ser interessante para produzir subsídios que ajudem no futuro o desenvolvimento de métodos teóricos para identificar atividade ou não de novos compostos a partir de cálculos sobre sua estrutura.

A idéia geral do trabalho é utilizar o método de índices eletrônicos como guia metodológico para fazer as análises de estrutura-atividade para os diversos compostos estudados. São calculadas as Densidades de Estados em várias regiões das moléculas, e através destes cálculos é feita uma busca por índices que sirvam para agrupar os compostos em dois grupos: ativos e inativos/muito pouco ativos.

Para avaliar a atividade desses compostos, são utilizados dois índices experimentais. Um está relacionado com o estímulo à polimerização dos microtúbulos, enquanto que outro está relacionado com a citotoxidade para células tumorais específicas, como as células de melanoma B16[6]. Para cada um dos dois casos, foi detectado um tipo de comportamento da estrutura eletrônica em relação à atividade. Posteriormente, é feita uma comparação entre os resultados obtidos para os taxóides e alguns cálculos preliminares com moléculas de ação bioquímica semelhante ao taxol. Uma dessas moléculas é o epothilone (cap 1, fig 1.6-a), composto produzido a partir de bactérias, que começou a despertar interesse recentemente[16]. Outra molécula importante que é estudada, é o discodermolide (fig 1.6-b), produzido naturalmente por uma espécie de esponja marinha[2]. Em ambos os casos, o que é analisado, é o encaixe ou não da estrutura eletrônica de tais

compostos em algum dos comportamentos identificados para os análogos do taxol.

4.2 Metodologia

São 10 os compostos estudados, entre eles o próprio taxol, que serve como referência na análise dos resultados. Todos diferem entre si pela substituição na posição do anel Ar1, conforme as figuras 4.1 e 4.2 indicam. Por simplicidade, os compostos estão nomeados como taxol, taxol-a taxol-b, taxol-c...taxol-i.

Para cada molécula, foi feita uma busca conformacional com o intuito de encontrar o provável confórmero de menor energia livre, que usualmente é aquele que pode ser considerado biológicamente ativo. Para calcular essas conformações, o método adotado foi o PM3[34]. Como auxiliar, utilizamos o programa comercial HyperChem, para montagem e pré-otimização das moléculas, bem como para os desenhos tridimensionais dos orbitais moleculares. O método PM3 não é o mais preciso, nem o mais rápido existente no mercado mas, por se tratar de um número razoavelmente grande de compostos, e de compostos relativamente complexos, é o que otimiza a relação entre tempo de cálculo e confiabilidade dos resultados. O método de Hückel não pode ser utilizado para tratar moléculas tridimensionais como as nossas[33], enquanto que, para utilizar métodos *ab initio*, essas moléculas são muito grandes, inviabilizando que o trabalho seja

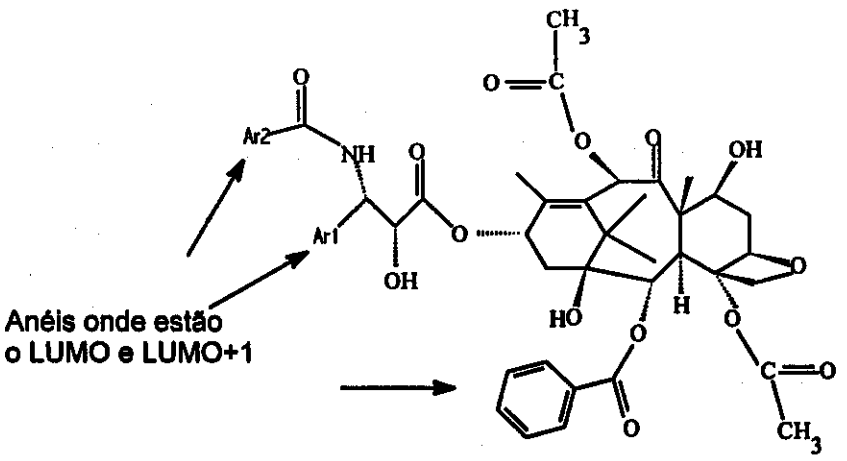
feito com as máquinas disponíveis[32]. Por isso, a escolha natural é o PM3 ou algum de seus análogos, pois esses métodos têm sido utilizados com grande sucesso para estudos de estrutura eletrônica e/ou otimização geométrica de moléculas orgânicas, inclusive de alguns taxóides.

A metodologia utilizada, foi praticamente a mesma aplicada na análise de estrutura do 10-Deacetil Baccatin III. Completada a otimização geométrica, foi feita uma análise dos orbitais de fronteira e de sua composição, em termos de orbitais atômicos. Essa análise, tem como objetivo principal, descobrir quais regiões da molécula são importantes para a construção dos orbitais moleculares envolvidos diretamente nos processos de reconhecimento molecular. Tais orbitais moleculares, como já foi citado anteriormente, são o HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1.

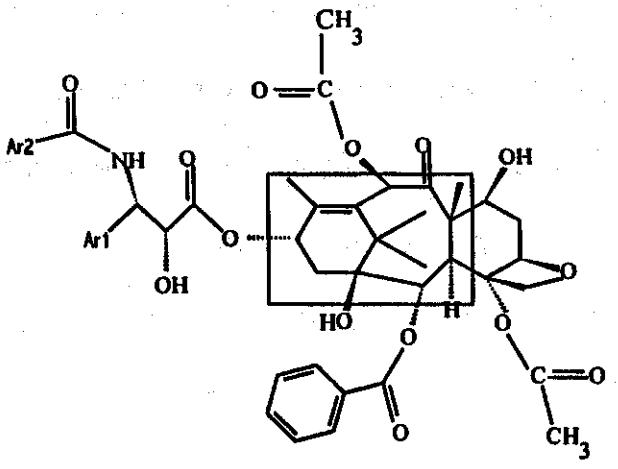
Nesta região de fronteira, é calculada a contribuição relativa dos orbitais atômicos, provenientes de átomos de algumas regiões geométricas importantes das moléculas. Por analogia ao método de índices eletrônicos descrito por Barone et al[3], esta análise faz parte da procura de indicações de coeficientes críticos para a atividade dos compostos.

4.3 Distribuição dos orbitais de fronteira

Inicialmente, como foi dito na seção anterior, analisamos a composição dos orbitais de fronteira. Em todos os casos, são os anéis os responsáveis pela formação dos orbitais LUMO e LUMO+1 (figura 4.3-a).



4.3-a



4.3-b

Figura 4.3 - Localização dos orbitais LUMO e LUMO+1 (4.3-a) e dos orbitais HOMO e HOMO-1 (4.3-b).

Enquanto que o HOMO e o HOMO-1 são formados principalmente por orbitais atômicos provenientes dos átomos do esqueleto das moléculas (figura 4.3-b).

Já nesta primeira análise, um dos resultados encontrados para o Baccatin se repete: as regiões do oxetano e dos acetatos não contribuem de maneira significativa para os orbitais de fronteira. Mais uma vez, a explicação para a importância dessas estruturas, no que diz respeito à atividade das substâncias, vem do fato de os orbitais moleculares serem construídos como uma combinação linear de orbitais atômicos. As modificações de um ou alguns átomos ou grupos de qualquer região de uma dessas moléculas pode perturbar toda a nuvem eletrônica. Tendo isso em mente, fica claro porque não é necessário que as citadas regiões, do acetato e do oxetano, tenham grandes contribuições para os orbitais de fronteira para que sua retirada tenha efeitos sobre a atividade dos compostos. A sensibilidade da nuvem eletrônica a essas mudanças poderá ser percebida facilmente pela comparação da estrutura eletrônica dos compostos que será feita. Outro fato interessante é que esta troca tem efeito diferente sobre a nuvem eletrônica para cada vértice do anel, além de trazer grandes variações na atividade biológica do composto (basta comparar os dados da tabela 4.1 com as figuras 4.1 e 4.2). Basta lembrar que os mecanismos de reconhecimento entre moléculas são extremamente sensíveis a mudanças na configuração da estrutura eletrônica (seção 1.2.2).

Molécula	Diferença Δ_H (eV)	Diferença Δ_L (eV)	Energia de Ionização (eV)	Índice T_1 estímulo à polimerização	Índice T_2 citotoxidade
Taxol	**0.25**	**0.44**	**9.36**	**1**	**1**
Taxol-a	**0.62**	**0.07**	**9.63**	**0.42**	**1.3**
Taxol-b	**0.34**	**0.14**	**9.40**	**0.5**	**27**
Taxol-c	**0.52**	**0.18**	**9.38**	**0.69**	**0.78**
Taxol-d	**0.12**	**0.06**	**9.77**	**0.85**	**0.31**
Taxol-e	**0.10**	**0.07**	**9.85**	**0.9**	**3.3**
Taxol-f	**0.10**	**0.20**	**9.63**	**2.4**	**3.0**
Taxol-g	**0.20**	**0.07**	**9.43**	**0.51**	**1.0**
Taxol-h	**0.13**	**0.27**	**9.74**	**1.9**	**2.2**
Taxol-i	**0.30**	**0.18**	**9.74**	**1.1**	**1.2**

Tabela 4.1 - Dados experimentais e de otimização para os taxóides. Onde Δ_H é dado pela diferença de energias entre HOMO e HOMO-1 e Δ_L é a diferença entre o LUMO e o LUMO+1.

A localização dos orbitais LUMO e LUMO+1 explica porque os anéis Ar_1 Ar_2 e Ar_3 são importantes para que exista ação anti-tumoral em um taxóide: sobre estes anéis estão localizados orbitais que estão diretamente ligados à transferência de elétrons para essas moléculas, o LUMO e o LUMO+1. Alterações na estrutura desses anéis podem modificar as interações eletrofílicas destes compostos. A sensibilidade da estrutura eletrônica a tais mudanças é um fato muito importante a considerar no momento de propor alterações estruturais para moléculas desse tipo. Como será mostrado na próxima seção, com os dados de otimização das moléculas e com os valores do índice que mede o estímulo à polimerização da tubulina, é possível estabelecer uma correlação qualitativa, como será explicado na próxima seção.

4.4 Correlações entre estrutura eletrônica e atividade dos compostos

Além dos dados experimentais resumidos na fig. 3.2 (cap 3), existem dois índices experimentais que estão tabelados para os taxóides que são estudados neste trabalho (tabela 4.1). Estes índices são bem diferentes entre si. O primeiro, que recebe o nome de T_1, mede a capacidade do composto de estimular a polimerização da Tubulina[6]. T_1 é medido em testes diretos, ou seja, o composto que se pretende estudar é misturado em várias doses diferentes a soluções de tubulina até que seja encontrada aquela que é necessária para obter 50% do efeito máximo. Dividindo-se o valor

encontrado para essa dose do composto pelo valor da dose de taxol necessária para produzir o mesmo efeito, é encontrado o valor chamado T_1. Sendo assim, quando este índice for menor que 1 para um certo composto, ele será considerado mais ativo que o taxol.

O índice T_2, é medido em testes *in vitro* com células tumorais[6]. Células cultivadas em laboratório são atacadas com soluções da substância em estudo com várias concentrações diferentes, novamente o objetivo é encontrar a dose que produz 50% do efeito máximo da substância para comparar com a dose equivalente de taxol e dividir um valor pelo outro. O valor encontrado será chamado de T_2.

Para o tipo de estudo que é feito neste trabalho, que se baseia em cálculos para moléculas no vácuo, o índice mais apropriado para estudarmos é o T_1, pois com ele a interação entre a tubulina e o composto estudado é medida de maneira direta. Se o objetivo do estudo fosse conseguir resultados para o índice T_2, seria necessário levar em conta processos mais complicados, como a dissolução dos compostos em água, interações com a membrana citoplasmática, etc. Isso porque esse índice é medido a partir da ação das moléculas sobre as células, esses processos são bem mais complicados, pois a potência não depende só da capacidade de estimular a polimerização da tubulina, depende também da capacidade para atravessar a membrana citoplasmática, interação com íons presentes no citoplasma, etc.

Com o auxílio dos resultados de otimização dos taxóides e dos valores para o índice T_1 da tabela 4.1, surge uma primeira correlação: a separação

entre os orbitais HOMO e HOMO-1 (chamada Δ_H) parece favorecer a melhora deste índice. O comportamento fica claro se separarmos os compóstos em dois grupos, heterocíclicos e homocíclicos (figura 4.4). De maneira esquemática, temos:

Homocíclicos

Δ_H<0.2 **menor atividade que o Taxol, $T_1 \approx 2$;**

Δ_H>0.2 **atividade igual ou superior à do Taxol, $T_1 \approx 1$.**

Heterocíclicos

Δ_H<0.3 **$T_1 \approx 1$;**

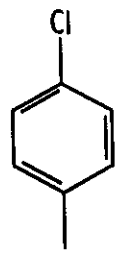
Δ_H>0.3 **$T_1 < 1$, mais ativos que o taxol.**

Os valores de T_1 estão especificados na tabela 4.1. Com estes dados, fica claro que a separação entre os orbitais HOMO e HOMO-1 é um fator importante. Tal comportamento é análogo ao encontrado para os HAPs de Barone *et al*, em especial à primeira regra, que também trata da separação entre esses orbitais[3,4].

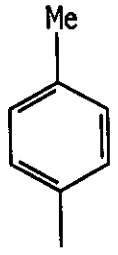
Mesmo tendo encontrado um comportamento indicativo para o índice que consideramos abordável para essa metodologia, um estudo mais refinado da estrutura eletrônica foi realizado. A Densidade de Estados foi calculada sobre várias regiões das moléculas, para a região de energias

Homocíclicos

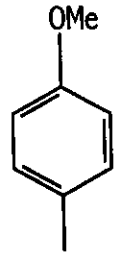
Ar1=



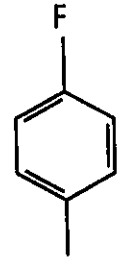
Taxol-h



Taxol-f



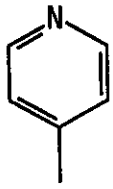
Taxol-g



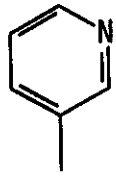
Taxol-i

Heterocíclicos

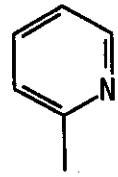
Ar1=



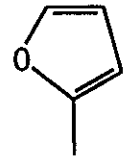
Taxol-a



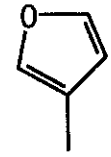
Taxol-b



Taxol-c



Taxol-d



Taxol-e

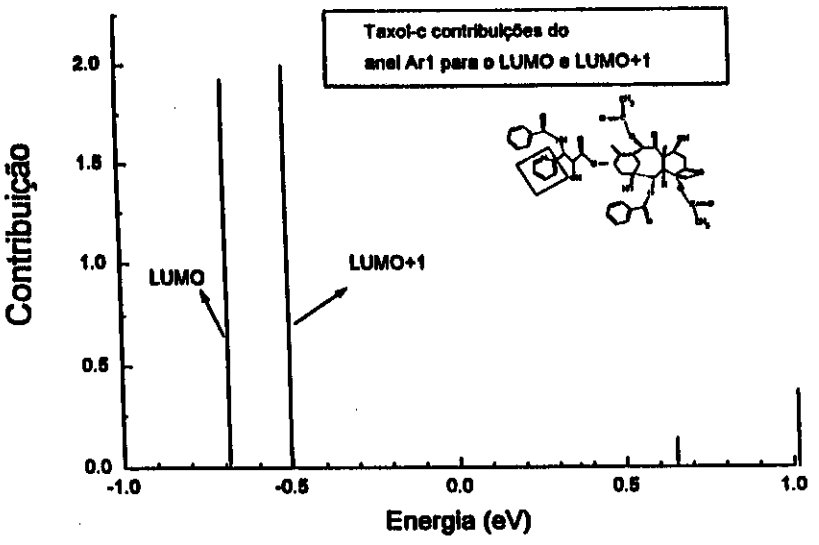
Figura 4.4 - Taxóides separados em homocíclicos e heterocíclicos de acordo com a substituição feita.

próxima àquelas do HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1. Mas uma região em especial trouxe resultados interessantes, a região do anel Ar_1, onde são feitas as substituições. Esses resultados não estão ligados ao índice para o qual seria natural esperar resultados a partir desta análise de moléculas no vácuo, mas sim ao índice T_2.

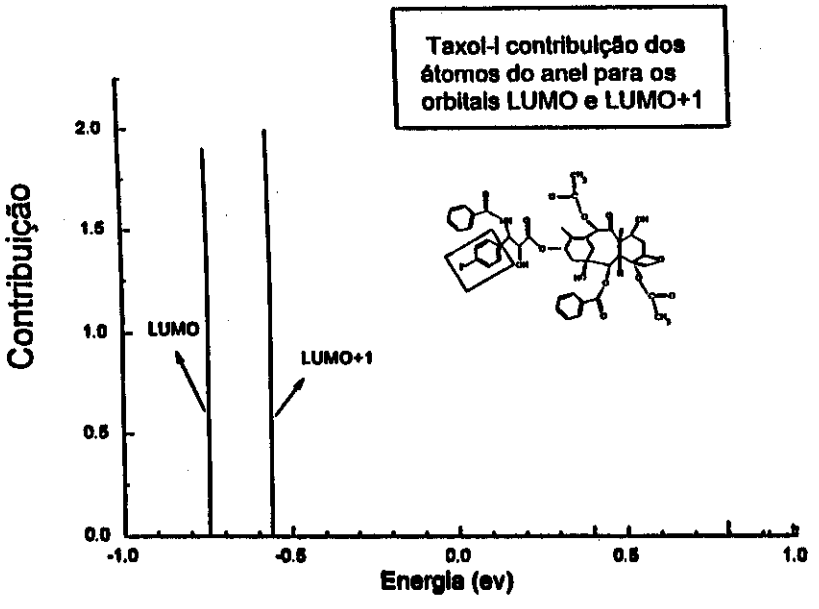
Os gráficos apresentados (figuras 4.5, 4.6 e 4.7) mostram o espectro discreto de densidades de estado para a região de substituição em cada molécula. Nestes gráficos, temos a densidade de estados modulada pela carga, assim o tamanho de cada pico está ligado com a contribuição dos orbitais atômicos da região considerada para o orbital molecular com a energia indicada no eixo x. O comportamento da DLE, para a região do anel 1, pode ser observado pelos gráficos das figuras 4.5, 4.6 e 4.7, onde estão os resultados para algumas moléculas.

Utilizando a tabela 4.1, em conjunto com os gráficos de DLE, ao menos uma tendência pôde ser identificada no que diz respeito a relação estrutura eletrônica-atividade destas moléculas:

Nos compostos de pouca atividade ($T_2 \geq 3$), a DLE calculada sobre o anel Ar_1 na região próxima ao LUMO é baixa, tendo no máximo 1 pico de contribuição significativa sobre o LUMO ou LUMO+1. Para os compostos mais ativos, o comportamento é diferente. A DLE é maior nesta mesma região, havendo pelo menos 1 pico significativo sobre o LUMO e/ou LUMO+1 e existindo grandes picos próximos sobre orbitais como LUMO+2 ou LUMO+3. Esse comportamento é um possível fator a considerar quando se pretender propor

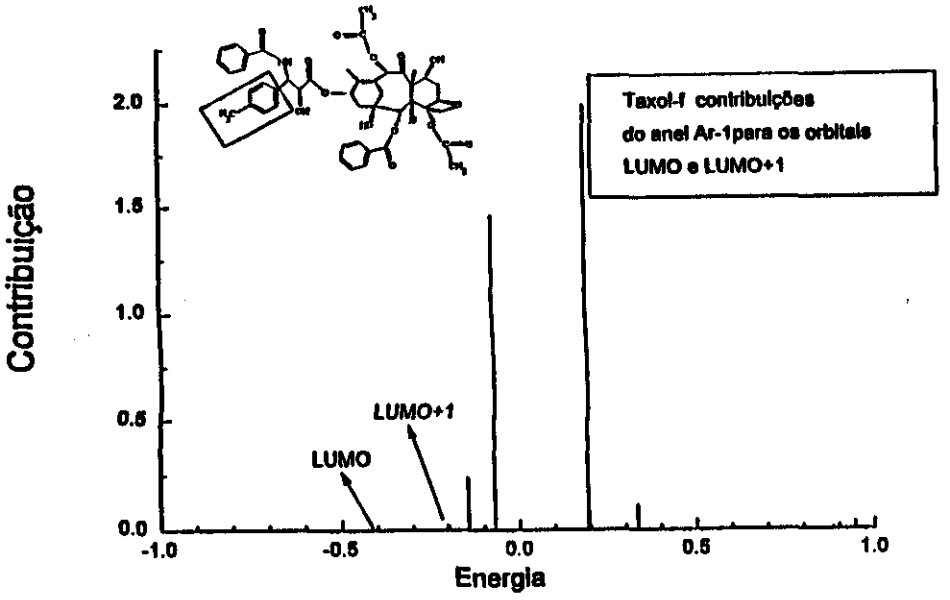


4.5-a

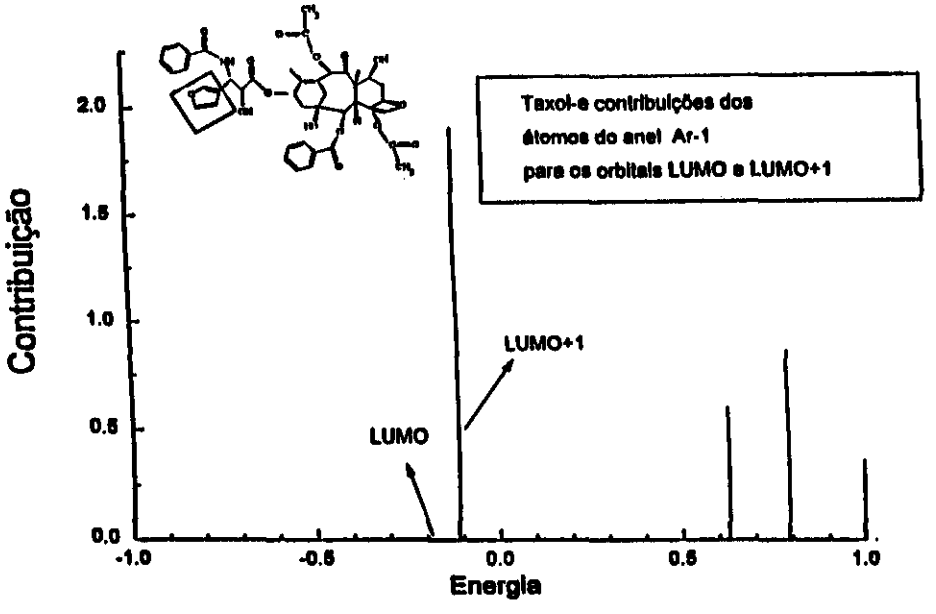


4.5-b

Figura 4.5 - Gráficos de Densidade de Estados calculada sobre a região do anel Ar_1, para energias próximas ao LUMO; (a) para o taxol-c, (b) para o taxol-I.

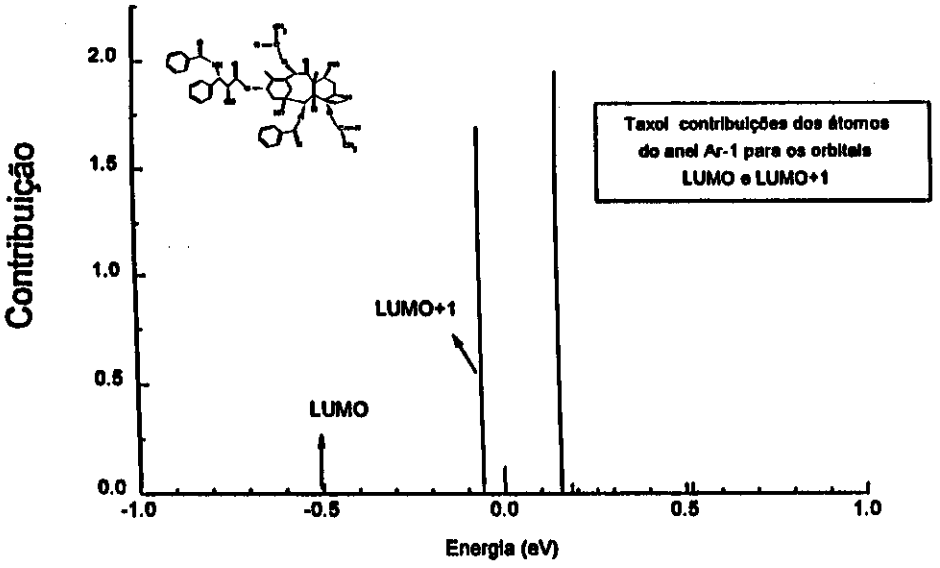


4.6-a

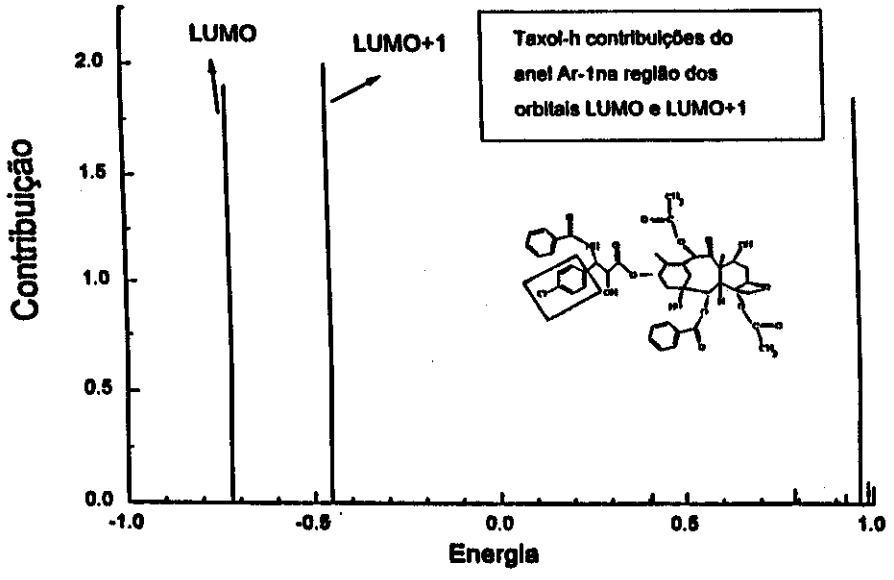


4.6-b

Figura 4.6 - Densidade de Estados calculada sobre a região do anel A_1, para energias próximas ao LUMO; (a) para o taxol-f, (b) para o taxol-e.



4.7-a



4.7-b

Figura 4.7 - Desidade de Estados para a região do anel Ar_1, para energias próximas ao LUMO; (a) para o taxol, (b) para o taxol-h

mudanças na arquitetura molecular em busca de maior citotoxidade. Mesmo que o método adotado não seja aplicável a princípio para estudos de índices de citotoxidade, como explicado no início desta seção, talvez seja uma alternativa interessante para estudar em futuros trabalhos, que usem como ferramenta métodos de índices eletrônicos para classificar compostos de ação anti-tumoral como os taxóides.

4.5 Comparação com moléculas de estrutura diferente

Depois de estudadas as relações estrutura-atividade para esse grupo de 10 moléculas, é interessante investigar se os comportamentos identificados se repetem em outras substâncias. Dois compostos importantes foram trabalhados, o Epothilone (fig1.6-a) e o Discodermolide (fig 1.6-b), que já foram citados no capítulo 1. O primeiro deles, foi descoberto recentemente, e tem se mostrado mais ativo que o próprio taxol, os testes de laboratório indicam atividade cerca de uma ordem de grandeza maior que a do taxol para estímulo de polimerização da tubulina (medida pelo índice T_1). O outro composto, o discodermolide, é produzido por uma esponja marinha e tem mostrado atividade cerca de 3 ordens de grandeza maior que a do taxol para este mesmo índice[2].

Foram utilizadas estas duas moléculas porque a despeito de suas estruturas, pelo menos em princípio[2,16], serem bem diferentes das dos taxóides, sua interação com a tubulina é do mesmo tipo. Outra razão para

essa escolha foi a grande atividade destes compostos. O epothilone tem sido testado também para citotoxidade, e mostrou-se também com atividade maior que a do taxol nestes testes. Por outro lado, o discodermolide apresentou citoxidade comparável à do taxol[2].

Após a otimização geométrica das duas moléculas (os resultados estão resumidos na tabela 4.2), foi calculada a diferença Δ_H para cada uma delas.

Como primeiro resultado, os Δ_H das duas moléculas se encaixaram nas faixas descritas na seção 4.3.2, para as estruturas heterocíclicas. O Epothilone tem $\Delta_H \approx 0.8$ eV, que concorda com o esperado, pois é mais ativo que o taxol para este índice. O Δ_H do Discodermolide, é da ordem de 0.5 eV, que também está dentro da faixa esperada para os Δ_H de substâncias com índice $T_1<1$.

Após a análise do comportamento da separação entre HOMO e HOMO-1 para esses dois novos compostos, é necessário investigarmos se há algum comportamento indicativo para a citotoxidade, descrita pelo índice T_2.

No gráfico da figura 4.8, está representada a DLE da região próxima ao LUMO, para a região do anel no Epothilone, a escolha desta região acontece por analogia ao que foi feito para os taxóides, e também porque o LUMO e LUMO+1 estão sobre esta região. Por estes dados, podemos notar que, mais uma vez, o Epothilone se encaixa no comportamento, pois há grandes contribuições para o LUMO e LUMO+1. Além disso, existem outros

Molécula	Calor de Formação (Kcal)	Diferença Δ-HOMO (eV)	Diferença Δ-LUMO (eV)	Energia de Ionização (eV)
Epothilone	**-197.2**	**0.852**	**0.505**	**9.31**
Discodermolide	**-345.3**	**0.529**	**0.233**	**9.39**

Tabela 4.2 - Dados resultantes das otimizações do Epothilone e Discodermolide.

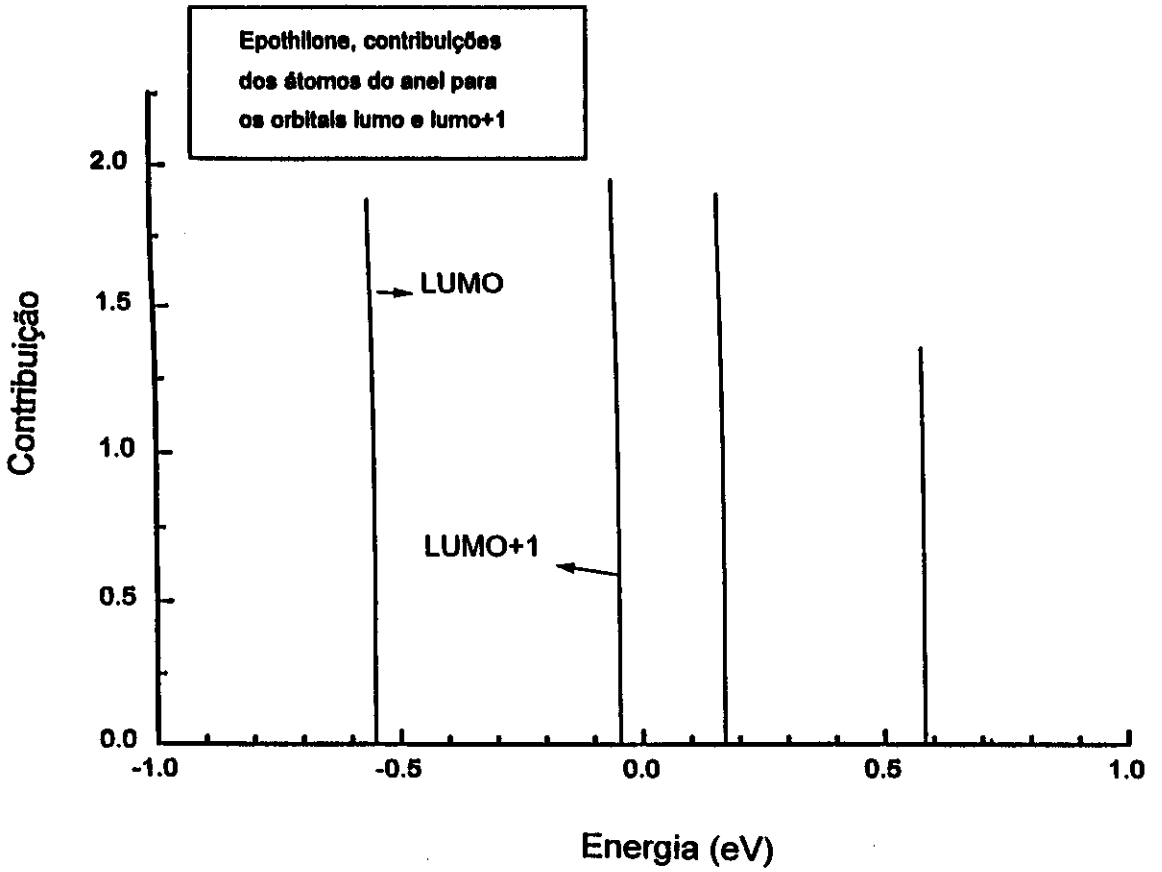


Figura 4.8 - Densidade de Estados calculada sobre o anel do Epothilone.

picos próximos, fazendo com que haja uma DLE razoavelmente grande nesta região.

Para o discodermolide não foi feita esta análise detalhada de DLE, pois não temos indicativos claros para escolher as regiões relevantes da molécula.

4.6 Conclusões e comentários

Pela localização dos orbitais de fronteira e adjacências (LUMO, LUMO+1, HOMO e HOMO-1) descrita na fig. 4.3, foi possível identificar a razão pela qual os anéis Ar_1, Ar_2 e Ar_3, são importantes para manter a atividade de taxóides. Porque essas estruturas contribuem de maneira significativa para a formação dos primeiros orbitais desocupados que, por sua vez, participam diretamente das reações eletrofílicas dessas moléculas. Reações deste tipo certamente estão envolvidas nos processos biológicos, por serem parte dos mecanismos de interação intermolecular.

O método de índices eletrônicos, utilizado por Barone *et al* foi aplicado a uma parte da classe dos taxóides, que são compostos de ação anti-tumoral. A diferença em energia entre os dois últimos orbitais ocupados (HOMO e HOMO-1) para estas moléculas, foi o parâmetro que trouxe indicação de um comportamento qualitativo ligando a estrutura eletrônica dos compostos e sua atividade biológica. Aparentemente a diferença de energia

entre esses dois orbitais moleculares, favorece o aumento da atividade para moléculas com estrutura do tipo dos taxóides.

Por outro lado, mesmo não sendo apropriado para tratar fenômenos mais complexos como os que determinam os valores para o índice T_2, um comportamento indicativo de relação estrutura-atividade foi encontrado. O aumento da Densidade de Estados calculada sobre a região do anel Ar_1, parece favorecer o aumento da atividade citotóxica dos taxóides.

Também foram testadas duas novas moléculas anti-tumorais, o discodermolide e o epothilone. Essas substâncias apresentaram separações entre HOMO e HOMO-1 compatíveis com as esperadas para taxóides muito ativos. Estudos mais completos precisam ser feitos, para determinar se tal comportamento é apenas coincidência ou se existem condições dentro das quais esse índice pode ser utilizado para determinar atividade ou inatividade.

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas

O estudo dos taxóides através de índices eletrônicos se revelou bastante trabalhoso, principalmente no que diz respeito à procura de confórmeros estáveis. Para o taxol, podemos encontrar mais de uma dezena de conformações, seja no vácuo (que é o nosso caso) seja em solução[35,36]. Para seus análogos, a situação é semelhante, pois todos têm estruturas muito parecidas.

Outra dificuldade que existe para o estudo destes compostos baseado no método de índices eletrônicos, é a escassez de trabalhos a respeito de relações estrutura-atividade que usem métodos semelhantes. Usualmente a técnica utilizada é tentar descrever, pelo menos em parte, os mecanismos envolvidos[10].

O fato de os anéis serem essenciais para manter a atividade foi entendido como resultado do fato de essas estruturas serem as responsáveis pela formação dos orbitais diretamente envolvidos com as reações de aceitação de elétrons ou seja, os dois primeiros orbitais desocupados. As indicações obtidas para a correlação entre capacidade de estimular a polimerização da tubulina e a estrutura eletrônica se revelaram como as mais promissoras. Grandes separações entre os últimos orbitais de fronteira parecem estar relacionadas com grande atividade. Outro indicativo

encontrado foi a Densidade Local de Estados para a região do anel Ar_1. Esse indicativo parece estar ligado à atividade descrita pelo segundo índice, T_2, que mede a citotoxidade dos compostos. Estes resultados são ainda bastante preliminares, mesmo porque o número de compostos conhecidos para estudarmos ainda é pequeno. À medida em que forem surgindo novos taxóides, a metodologia de índices eletrônicos poderá ser testada para confirmar ou não os indicativos descritos neste trabalho.

Uma análise que ainda deve ser feita diz respeito a um estudo mais direto do efeito das partes consideradas essenciais para manter a atividade. Estes testes podem ser feitos, por exemplo, com a investigação de moléculas em que foram retiradas tais partes. Isso está sendo feito para os 3 anéis, verificando nos primeiros resultados uma diminuição na separação entre o HOMO e o HOMO-1. Tal diminuição, coloca a separação $\Delta_H<0.3$, levando os novos compostos a estarem classificados entre os muito pouco ativos segundo o comportamento identificado no capítulo 4. Estes testes ainda precisam ser completados, mas os primeiros resultados trazem indicações animadoras para que a pesquisa seja continuada. Esperamos que o aparecimento de novos taxóides contribua para o esclarecimento dos efeitos destas partes para a atividade biológica de tais compostos.

REFERÊNCIAS

1. T. C. Boge *et al*, J. Med. Chem., 37, 3337-3343, **1994**.
2. Ernst ter Haar *et al*, Biochemistry, 35, 243-250, **1996**.
3. P. M. V. B. Barone, Tese de Doutorado - IFGW - UNICAMP **1996**.
4. P. M. V. B. Barone, A. Camilo Jr. e D. S. Galvão, Phys. Rev. Lett. 77(5),1186 **1996**.
5. Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol. 2 - Molecular and Cell Biology, H.V.Gelboin e P.O.P. Ts`O (Ed.), Academic Press, New York, **1978**.
6. P. Jenkins, Chemistry In Britain, 43-46, Nov. **1996**.
7. D. Guénard, F. Guérritte-Voegelein e P. Potier, Acc. Chem. Res., 26, 160-167, **1993**.
8. K. C. Nicolaou e R. K. Guy, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 34, 2079-2090, **1995**.
9. S. G. B. C. Lopes, Bio, Ed. Saraiva, **1995**.
10. H. Wang e A. Ben-Naim, J. Med. Chem., 39, 1531-1539, **1996**.
11. L. R. Jayasinghe *et al*, J. Med. Chem., 37, 2981-2984, **1994**.
12. P. B. Schiff, J. Faut e S. B. Horwitz, Nature (Londres), 277, 665, **1979**.
13. Chem. Br., p 260 Abril **1994**.
14. G. J. MacEachern-Keith, L.J. W. Butterfield e M.J. I. Mattina, Anal. Chem., 69,72-77, **1997**.
15. H. J. Williams *et al*, Can. J. Chem., 72, 252-260, **1994**.

16. J. D. Winkler e P. H. Axelsen, Bioorg. Med. Chem. Lett., 6, 2963-2966, **1996**.

17. Z. Yang *et al*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36, 525-527, **1997**.

18. C.A.Coulson, Adv. Cancer Res. 1, 1, **1953**.

19. O. Schmidt, Z.Physik Chem., 39, 59, **1938**.

20. N. V. Svartholm, Arkiv Kemi Mineral. Geol., A15, 1, **1942**.

21. A. Pullman, Bull. Soc. Chim. Fr., 21, 595 **1954**.

22. A. Pullman e B. Pullman, Adv. Cancer Res. 3, 117, **1955**.

23. A. Streitwieser, Molecular Orbital Theory, Wiley, N. Y. **1961**.

24. A. K. Debnath *et al*, J. Med. Chem., 34, 786, **1991**.

25. D. Villemin, D. Cherqaoui e A. Mesbah, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 34, 1288, **1994**.

26. U. E. Nordén e W. Svante, Acta Chem. Scand., B32, 602, **1978**.

27. L. V. Szentpály, J. Am. Chem. Soc., 106, 6021, **1984**.

28. X. -H. Song, M. Xiao e R. -Q. Yu, Comp. Chem., 18, 391, **1994**.

29. Y. Miyashita *et al*, An. Chim. Acta, 143, 35, **1982**.

30. J. Gayoso e S. Kimri, Int. J. Quant. Chem., 38, 461 **1990**; 38, 487 **1990**.

31. P. Potier, Chem. Soc. Reviews, 113, **1992**.

32. L. L. Klein *et al*, J. Med. Chem., 38, 1482-1492, **1995**.

33. J. P. Lowe, Quantum Chemistry, Academic Press Inc. N.Y., **1978**.

34. Mopac version 5.0 and 6.0, QCPE #455.

35. C. Alemán, F.J.Luque e M. Orozco, J. Comp. Chem. 14,7, 799-808, **1993**.

36. M. Lozynsky e D. Rusinska-Roszak, Tetrahedron Letters, 36,48, 8849-8852, **1995**.

37. J. Williams, A. I. Scott e R. A. Dieden, Tetrahedron, 49,30, 6545-6560, **1993**.