UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de
compostos arilsulfonil-hidrazônicos

Thais Batista Fernandes

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de
compostos arilsulfonil-hidrazônicos

Thais Batista Fernandes

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre

Orientador: Prof. Dr Roberto Parise Filho

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Fernandes, Thais Batista
F363pl Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de
compostos arilsulfonil-hidrazônicos / Thais Batista Fernandes. --
São Paulo, 2015.
172p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Parise Filho, Roberto

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Neoplasias
I. T. II. Parise Filho, Roberto, orientador.

615.19 CDD

Thais Batista Fernandes

Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de
compostos arilsulfonil-hidrazônicos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
orientador/presidente

Prof. Dr. Roberto Parise Filho

Daniela Gonçalves Rando

Wanda Pereira Almeida

São Paulo, 18 de setembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Ao Senhor, meu Deus, meu abrigo e fonte de sabedoria.

Aos meus queridos pais, André Gonçalves Fernandes e Lucimar Batista Fernandes, exemplos de caráter, dedicação, esforço e profissionalismo. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permite novos passos, novos caminhos e novas conquistas.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido durante a execução deste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho, pelo voto de confiança, pela orientação, por ser sempre presente, disposto e preocupado em ajudar. Obrigada por mostrar dar valor ao que merece ser valorizado e por saber criticar quando é necessário. Seus esforços são não só em formar um mestre, mas um profissional de excelência e uma pessoa de virtudes. Seu dom e amor pelo ensino são inspiradores.

À professora Michelle Carneiro Polli Parise, que mostrou a beleza da docência e da química farmacêutica e me guiou até este caminho. Obrigada por acreditar em mim.

Aos meus pais Lucimar Batista Fernandes e André Gonçalves Fernandes, que sempre me apoiaram, me incentivaram e se esforçaram pela realização dos meus sonhos. Obrigada pelo seu amor, por darem o seu melhor como pais e procurar fazer de mim a melhor pessoa que eu posso ser.

Ao meu irmão Thales Augusto Batista Fernandes, por me incentivar através do seu carinho e admiração.

Ao meu namorado Daniel Cunha Coelho, por ser meu amigo e companheiro e por cuidar de mim no que se refere à vida acadêmica e pessoal. Obrigada por compreender e apoiar a minha escolha e por trazer serenidade nos momentos de dificuldade.

Aos meus tios Valéria Batista e Nicanor Vieira, que mesmo de longe me acompanham e me auxiliam neste caminho rumo ao conhecimento e formação profissional.

Aos amigos e companheiros de laboratório Mariana Celestina Frojuello Segretti e Natanael Dante Segretti, pelos conselhos científicos e pessoais, por trazerem o equilíbrio entre o otimismo e a realidade e por estarem presentes nos momentos bons e ruins.

À amiga e companheira de grupo Rosania Yang, que sempre se dispôs a colaborar no que foi necessário, pela paciência, risadas e ombro amigo dentro e fora da universidade.

Ao colega Maurício Themoteo Tavares, pela ajuda no meu cotidiano acadêmico e por sempre mostrar consideração.

Aos companheiros e “vizinhos” de laboratório Juliana Galottini Magalhães, Fredson Torres Silva, Elys Juliane Cardoso Lima, Fernando Moura Gatti, Marina Cândido Primi, Luciana Moura Bueno, Juliana Pachioni, Diego Vinicius Lopes Decleva, Ricardo Massarico Serafim, Marco Arribas, Lorena Cristine Paes, Stanley Nunes Siqueira Vasconcelos, Gustavo Vasco, Drielli Gomes Vital, Silvestre Modestia, Vinicius Maltarollo, Glaucio Monteiro, Micael Rodrigues Cunha e Nuno Tavares, os quais foram parte da minha formação e por contribuírem, cada qual na sua medida, nesta jornada com seu conhecimento e auxílio. Obrigada pela presteza e bons momentos.

Aos pesquisadores Dr. Adilson Kleber Ferreira, Dr. José Alexandre Barbuto e Sarah Fernandes Teixeira, pela colaboração para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo, pela colaboração, orientação e paciência, ensinando os métodos para a execução dos ensaios biológicos.

Ao prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, pela disposição e orientação nos estudos de modelagem molecular.

Ao professor André Rolim Baby e à aluna Thalita Marcílio Cândido pela colaboração para o desenvolvimento dos estudos de avaliação de atividade antioxidante.

Aos professores João Paulo Fernandes e Claudete Valduga pela participação e contribuição no exame de qualificação

À professora Elizabeth Igne Ferreira, por humildemente compartilhar do seu conhecimento e experiência acadêmica durante o programa de aperfeiçoamento de ensino .

Aos funcionários David Olimpio, Inês, Irineu e Charles Brito pelo auxílio e presteza.

Aos poucos e bons amigos santistas que me restaram, por me lembrarem que existe vida além da USP.

Aos amigos da Igreja Presbiteriana do Butantã, por me acolherem e tornarem minha vida paulistana mais descontraída e dinâmica.

Aos meus amigos e familiares, por fazerem parte do processo de construção da pessoa e profissional que sou hoje. Obrigada por estarem ao meu lado.

“O temor do Senhor é o princípio do saber, mas os loucos desprezam a sabedoria e o ensino.”

Provérbios 1:7

FERNANDES, T. B. **Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de compostos arilsulfonil-hidrazônicos**. 2015. 172 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RESUMO

A capsaicina é um componente pungente das pimentas do gênero *Capsicum* que possui atividade antitumoral. Na busca por compostos antineoplásicos mais eficazes e seletivos em relação aos disponíveis atualmente, foi desenvolvido um análogo sulfonamídico sintético da capsaicina, o RPF101, que apresentou atividade citotóxica superior em linhagens de adenocarcinoma de mama. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a atividade do RPF101 a partir da síntese de análogos sulfonil-hidrazônicos planejados por bioisosterismo. Treze análogos foram sintetizados em três etapas, baseando-se na reação entre cloreto de sulfonila e hidrato de hidrazina para obtenção do intermediário sulfonil-hidrazida; oxidação do álcool piperonílico para obtenção do piperonal; e reação de adição nucleofílica entre sulfonil-hidrazida e piperonal ou vanilina, que apresentaram rendimentos entre 23 e 85%. Os compostos foram caracterizados por metodologias de RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, faixa de fusão e análise elementar e avaliados quanto sua capacidade citotóxica em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) pelo método do MTT. Dois análogos mostraram-se ativos nas duas linhagens, dos quais o mais promissor, RPF906 (IC_{50} em MDA-MB-231 = 104,6 μM) foi submetido a estudos de elucidação mecanística, onde observou-se indução de apoptose, causando interrupção do ciclo celular na fase G0/G1. Os resultados obtidos mostraram que o grupo benzodioxol favorece a atividade biológica quando comparado ao grupo metilcatecol. Estudos de modelagem molecular sugerem que uma maior hidrofilicidade esteja relacionada com uma atividade superior. Embora menos ativas que seu protótipo, as sulfonil-hidrazonas apresentaram efeito biológico e mostram-se promissoras no desenvolvimento de compostos com potencial antitumoral. Novas modificações moleculares devem ser planejadas com o intuito de otimizar a atividade e seletividade destes compostos.

Palavras-chave: Câncer. Antineoplásicos. Bioisosterismo. Sulfonil-hidrazona. Análogos da capsaicina.

FERNANDES, T. B. **Design, synthesis and antitumor evaluation of arylsulfonylhydrazone compounds**. 2015. 172 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ABSTRACT

Capsaicin is a primary pungent compound in red peppers, which has antitumor activity. In view of demand for more selective and less toxic anticancer agents, our group reported a synthetic sulfonamide capsaicin-like analogue, RPF101, which presents higher cytotoxicity in adenocarcinoma cell line than its prototype. Thus, the aim of this work is to optimize RPF101 activity by the synthesis of sulfonylhydrazone analogues, using the bioisosterism as molecular modification strategy. Thirteen analogues were synthesized in three reaction steps: oxidation of piperonyl alcohol to the piperonyl aldehyde; nucleophilic substitution reaction between sulfonyl chloride and hydrazine hydrate to obtain the intermediate sulfonylhydrazide; nucleophilic addition reaction between sulfonylhydrazide and piperonal or vanillin to obtain sulfonylhydrazones, which showed yields from 23 to 85%. All compounds were characterized by NMR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, melting point and elemental analysis and evaluated for their cytotoxic activity in breast tumor cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7). Two analogues showed cytotoxic effect although RPF906 (IC_{50} in MDA-MB-231 = 104.6 μM) had been the most promising and was further evaluated about its mechanistic properties. This compound induced apoptosis and cell cycle arrest at the G0/G1 phase. Results showed that the introduction of benzodioxol group increases cytotoxicity. Molecular modeling studies suggest that superior hydrophilicity is related to superior activity. Sulfonyl-hydrazone analogues were less cytotoxic than their prototype, but they are still promising compounds. Molecular modifications strategies should be done to optimize the activity and selectivity of these compounds.

Key words: Cancer. Antineoplasics. Bioisosterism. Sulfonylhydrazone. Analogues from capsaicin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estimativa da incidência de câncer no mundo em mulheres.	22
Figura 2.	Esquema do ciclo celular normal.	24
Figura 3.	Diagrama representativo simplificado dos mecanismos de apoptose.	29
Figura 4.	Mecanismo de ativação e inibição de proteínas da família Bcl-2.	32
Figura 5.	Estruturas de antineoplásicos de origem natural.	35
Figura 6.	Estruturas dos antineoplásicos paclitaxel e docetaxel.	36
Figura 7.	Estrutura da capsaicina, destacando as regiões A, B e C.	36
Figura 8.	Estrutura do análogo RPF101, destacando as regiões A, B e C.	37
Figura 9.	Estrutura geral de compostos sulfonil-hidrazônicos com atividade antineoplásica.	39
Figura 10.	Modificações incorporadas à estrutura da podofilotoxina para obtenção do etoposídeo.	41
Figura 11.	Diagrama de Craig.	42
Figura 12.	Exemplos de substituições bioisostéricas.	45
Figura 13.	Aplicação do bioisosterismo em EXP-7711 para melhora da atividade e obtenção da losartana.	45
Figura 14.	Métodos para o estudo de modelagem molecular.	47
Figura 15.	Modificações estruturais em RPF101 para obtenção dos análogos sulfonil-hidrazônicos.	51
Figura 16.	Síntese das séries sulfonil-hidrazona.	53
Figura 17.	Espectro de RMN ^1H do piperonal.	61
Figura 18.	Mecanismo de oxidação alílica com MnO_2 .	62
Figura 19.	Comparativo dos deslocamentos dos sinais de RMN ^1H do anel aromático do cloreto de sulfonila e sulfonil-hidrazida.	64
Figura 20.	Mecanismo de substituição nucleofílica para formação dos intermediários sulfonil-hidrazídicos.	64
Figura 21.	Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para a identificação dos análogos sulfonil-hidrazônicos da série I.	66

Figura 22.	Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para a identificação dos análogos sulfonil-hidrazônicos da série II.	67
Figura 23.	Mecanismo de formação de imina por adição à carbonila com perda de oxigênio.	68
Figura 24.	Relação entre estrutura química e atividade biológica dos análogos sulfonil-hidrazônicos.	72
Figura 25.	Avaliação do efeito apoptótico do RPF906 utilizando coloração dupla de anexina e PI.	74
Figura 26.	Avaliação das mudanças morfológicas da apoptose por coloração com Hoechst.	75
Figura 27.	Efeito do RPF906 sobre a progressão do ciclo celular de linhagem MDA-MB-231.	76
Figura 28.	Representação de propriedades eletrônicas da capsaicina, RPF101 e RPF906.	78
Figura 29.	Representação dos mapas de potencial lipofílico da capsaicina, RPF101 e RPF906.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Aspectos morfológicos de diferentes tipos de morte celular.	27
Tabela 2.	Fármacos originados de produtos naturais.	34
Tabela 3.	Condições reacionais empregadas na obtenção dos intermediários sulfonil-hidrazídicos.	55
Tabela 4.	Condições reacionais empregadas na obtenção dos análogos sulfonil-hidrazônicos.	56
Tabela 5.	Resultados obtidos na síntese dos intermediários sulfonil-hidrazídicos.	63
Tabela 6.	Resultados obtidos na síntese dos análogos sulfonil-hidrazônicos.	65
Tabela 7.	Inibição do crescimento celular (IC_{50} em μM) nas linhagens tumorais e fibroblasto (3T3).	70
Tabela 8.	Parâmetros físico-químicos calculados para capsaicina, RPF101 e RPF906.	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A1	<i>Bcl-2 related gene A1</i> (gene A1 relacionado ao Bcl-2)
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i> (fator indutor de apoptose)
AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i> (construção de modelos assistidos com refinamento de energia)
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor</i> (fator apoptótico 1 de ativação de protease)
Apo2L	<i>Apoptosis antigen 2</i> (antígeno de apoptose 2)
Apo3L	<i>Apoptosis antigen 3</i> (antígeno de apoptose 3)
BAD	<i>Bcl-2-Associated Death promoter</i> (promotora de morte associada à Bcl-2)
BAK	<i>Bcl-2 Antagonist/Killer protein</i> (antagonista/assassino de Bcl-2)
BAX	<i>Bcl-2-Associated X protein</i> (Bcl-2 associada à proteína X)
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma 2 protein</i> (proteína de linfoma 2 de células B)
Bcl-b	<i>B-Cell Lymphoma b protein</i> (proteína de linfoma b de células B)
Bcl-w	<i>B-Cell Lymphoma w protein</i> (proteína de linfoma w de células B)
Bcl-xL	<i>B-Cell Lymphoma-Extra Large protein</i> (proteína de linfoma de células B extra grandes)
BH3	<i>Bcl-2 homology region 3</i> (homólogo da região 3 de Bcl-2)
BID	<i>BH3-interacting domain Death agonist</i> (agonista de morte que interage com o domínio BH3)
BIK	<i>Bcl-2-Interacting Killer</i> (assassino que interage com Bcl-2)
BIM	<i>Bcl-2-Interacting Mediator of cell death</i> (mediador de morte celular que interage com Bcl-2)
BMF	<i>Bcl-2-Modifying Factor</i> (fator modificador de Bcl-2)
CAD	<i>Caspase-Activated Deoxyribonuclease</i> (caspase ativada por deoxirribonuclease)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Cel	Célula
CLog P	Logaritmo do coeficiente de Partição Calculado

cyt c	Citocromo c
DIABLO	<i>Direct IAP-Binding Protein with Low pI</i> (proteína de ligação-IAP direta com baixo pI)
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i> (complexo de sinalização indutor de morte)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DR3	<i>Decoy Receptor 3</i> (Receptor Decoy 3)
DR4	<i>Decoy Receptor 4</i> (Receptor Decoy 4)
DR5	<i>Decoy Receptor 5</i> (Receptor Decoy 5)
FADD	<i>Fas-Associated Protein with Death Domain</i> (proteína do domínio de morte associada à Fas)
FasL	Ligante Fas
FasR	Receptor Fas
G0	<i>Gap 0</i> (intervalo celular 0)
G1	<i>Gap 1</i> (intervalo celular 1)
G2	<i>Gap 2</i> (intervalo celular 2)
HBA	<i>Hydrogen Bond Acceptor</i> (sítio aceptor de ligação de hidrogênio)
HBD	<i>Hydrogen Bond Donor</i> (sítio doador de ligação de hidrogênio)
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular ocupado de maior energia)
HRK	Harakiri
HtrA2	High Temperature Required protein A2
IAP	<i>Inhibitors of Apoptosis Protein</i> (proteínas inibidoras de apoptose)
IC₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50%</i> (Concentração necessária para reduzir o crescimento populacional em 50%)
IS	Índice de Seletividade
LBDD	<i>Ligand-Based Drug Design</i> (planejamento de fármacos baseado no ligante)
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (orbital molecular não ocupado de menor energia)

Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia-1 protein</i> (proteína de célula mieloide de leucemia 1)
MMFF	<i>Merck Molecular Force Field</i> (campo de força molecular Merck)
MPE	Mapa de potencial Eletrostático
MPL	Mapa de Potencial Lipofílico
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
p15	proteína de 15 kDa
p16	proteína de 16 kDa
p18	proteína de 18 kDa
p19	proteína de 19 kDa
p53	proteína de 53 kDa
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato salino)
PIA	Proteínas Inibidoras da Apoptose
PI	<i>Propidium Iodide</i> (iodeto de propídio)
PM3	<i>Parametric Method 3</i> (método paramétrico 3)
PM6	<i>Parametric Method 6</i> (método paramétrico 6)
PUMA	<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i> (proteína moduladora de apoptose modulada positivamente por p53)
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> (Relação estrutura-atividade quantitativa)
REA	Relação Estrutura-Atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN 13C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
Ro5	<i>Lipinski's Rule of Five</i> (regra dos cinco de Lipinski)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RPM	Rotações Por Minuto

S	Fase celular de Síntese de DNA
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i> (planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor)
Smac	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i> (segundo ativador mitocôndrial de caspase)
SFB	Soro Fetal Bovino
THF	Tetraidrofurano
TNF	<i>Tumor-Necrosis Factor</i> (fator de necrose tumoral)
TNFR	<i>Tumor-Necrosis Factor Receptor</i> (receptor de fator de necrose tumoral)
TNFR1	<i>Tumor-Necrosis Factor Receptor 1</i> (receptor de fator de necrose tumoral 1)
TRADD	<i>TNFR1 Associated Protein with Death Domain</i> (proteína TNFR1 associada ao domínio de morte)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Câncer	21
1.1.2 Epidemiologia	21
1.1.2 Fisiopatologia	22
1.1.3 Apoptose	26
1.1.4 Tratamento	33
1.2 Planejamento de Fármacos	40
1.2.1 Bioisosterismo	43
1.2.2 Modelagem molecular	46
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	50
2.2 Objetivos específicos	50
3 PLANEJAMENTO DOS ANÁLOGOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Material	52
4.2 Método sintético	53
4.2.1 Obtenção do aldeído piperonílico	54
4.2.2 Síntese e purificação dos intermediários sulfonil-hidrazídicos	54
4.2.3. Síntese e purificação dos análogos sulfonil-hidrazônicos	55
*Utilizado HCl 5% como catalizador	56
4.3 Métodos Analíticos	56
4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	56
4.3.2 Ponto de fusão	56
4.3.3 Análise Elementar	57
4.3.4 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear	57
4.4 Métodos Biológicos	57
4.4.1 Cultura de células	57
4.4.2 Ensaio de citotoxicidade	58
4.4.3 Estudo de indução apoptótica por anexina e iodeto de propídio	59
4.4.4 Análise do ciclo celular	59
4.4.5 Microscopia por coloração de Hoechst	60
4.5 Modelagem molecular	60

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Compostos sintetizados	61
5.1.1 Piperonal.....	61
5.2 Intermediários sulfonil-hidrazídicos	63
5.1.3 Análogos sulfonil-hidrazônicos	64
5.2 Atividade biológica <i>in vitro</i>	68
5.2.1 Estudos mecanísticos.....	72
5.3 Modelagem molecular	76
6 CONCLUSÕES	83
8 REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

1.1.2 Epidemiologia

“Câncer” é um termo genérico para um grupo de doenças que se caracteriza pela proliferação desordenada de células alteradas. Também chamado de “tumor maligno” ou “neoplasia”, a doença pode se manifestar em diversos tecidos do organismo, como pulmão, próstata, estômago e mama, e invadir partes adjacentes, se espalhando para outros órgãos, processo este referido como “metástase”, que se torna a principal causa de morte por câncer (WHO, 2013a, 2013b).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e foi responsável por 8,2 milhões de óbitos em 2012. Europa e América se destacam como as regiões com maior incidência de todos os tipos de câncer, o que está relacionado, entre outras coisas, com o aumento da expectativa de vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2014), em 2012 a incidência de câncer, excluindo-se câncer de pele não-melanoma, foi de mais de quatorze milhões de casos no mundo. No Brasil, foram cerca de 347 mil novos casos de câncer, e 224 mil óbitos pela doença.

Seguindo tendência mundial, nota-se no Brasil uma mudança no perfil de enfermidades que acometem a população. Até os anos 1960, as doenças infecciosas eram a principal causa de morte. Desde então, as principais causas de morte são doenças do aparelho circulatório e neoplasias. Isto é devido, principalmente, ao aumento da expectativa de vida da população (INCA, 2014a).

Estima-se para 2014/2015 a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no Brasil, incluindo os casos de câncer de pele não-melanoma, o que reforça a magnitude do problema da doença no país. Sem os casos de câncer

da pele não melanoma, estima-se um total de 394 mil casos novos, dos quais 57 mil correspondem ao de mama, o tipo de câncer que mais acomete as mulheres. Cerca de 1,67 milhões de novos casos desta neoplasia foram esperados para o ano de 2012 em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer em mulheres, conforme ilustra a figura 1 (INCA, 2014b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Figura 1. Estimativa da incidência de câncer no mundo em mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

1.1.2 Fisiopatologia

Embora “câncer” seja um termo que pode designar doenças distintas, os diversos tipos de neoplasias compartilham uma patogênese comum. Dois conceitos na área da tumorigênese são amplamente aceitos. Primeiramente, o câncer é resultado de mudanças genéticas sequenciais que, eventualmente, transformam células normais em células malignas, um modelo que é referido como carcinogênese multietapas. Em segundo lugar, processos biológicos específicos devem estar desregulados durante a evolução tumoral para permitir e sustentar a tumorigênese (LABI; ERLACHER, 2015).

A carcinogênese pode ser dividida em três etapas: iniciação, promoção, progressão. A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese, onde as células sofrem modificações em alguns de seus genes, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. No segundo estágio, de promoção, as células

geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes oncopromotores, e tornam-se, gradualmente, células malignas. A suspensão do contato com os agentes oncopromotores pode interromper o processo neste estágio. O estágio de progressão, último estágio, caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (DE ALMEIDA et al., 2005).

Da mesma forma que as células sadias, uma célula tumoral é proveniente da divisão mitótica de uma dada linhagem celular. No entanto, tal célula apresenta uma sequência de DNA do genoma alterada, que pode ser proveniente da substituição de uma base nitrogenada por outra, inserções ou exclusões de segmentos de DNA, aumento ou diminuição do número de cópias a partir dos exemplares presentes no genoma diploide normal, entre outros (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

Estas alterações estão geralmente relacionadas a fatores ambientais, como tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares, medicamentos, radiações e fatores ocupacionais. Eventualmente, o câncer pode estar relacionado a fatores genéticos, sendo este caso menos comum (INCA, 2014a).

As mutações encontradas no genoma da célula tumoral são acumuladas ao longo da vida do paciente com câncer. Algumas destas células foram originadas a partir de células normais, que não apresentam características fenotípicas de uma célula cancerosa. Porém o DNA de células normais é continuamente danificado por agentes mutagênicos internos e externos. A maioria destes danos é reparado. Entretanto, parte deles pode ser convertida em mutações fixas (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

A célula precisa transpor uma série de barreiras fisiológicas para se tornar maligna, tendo em vista que o nosso organismo apresenta diversos mecanismos de reparo. Estes mecanismos podem ser executados, primariamente, a partir do próprio ciclo celular (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008).

O ciclo celular é composto de 4 estágios (figura 2). Na fase G1 (gap 1 = interfase), a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar seu DNA. A cópia (replicação) ocorre na fase seguinte, chamada de S (síntese) e permite que a célula

duplique precisamente seus cromossomos. Depois de replicados os cromossomos, inicia-se a fase G₂ (gap 2), durante a qual a célula prepara-se para a fase M (mitose) – na qual a célula-mãe, aumentada, finalmente divide-se ao meio, para produzir duas células-filhas, com igual número de cromossomos. As células-filhas imediatamente entram em fase G₁ e podem reiniciar o ciclo celular ou interromper o ciclo de forma temporária ou definitiva (RIVOIRE et al., 2001).

Figura 2. Esquema do ciclo celular normal.

No processo de proliferação celular, a progressão pelas diversas fases é regulada por uma rede bioquímica de sinalização. Esse controle é importante para garantir a replicação correta do material genético, segregação dos cromossomos e coordenar a diferenciação, senescência e morte celular. Falhas nessas vias favorecem o surgimento e perpetuação de mutações genéticas, capazes de causar câncer (MALUMBRES; BARBACID, 2009; OGINO et al., 2005; SOUZA, 2011).

A síntese de DNA (fase S) e mitose (fase M), são fases críticas do ciclo celular. Anteriormente à fase S, ocorre a fase G₁ (gap ou intervalo), onde a célula é preparada para a síntese dos ácidos nucleicos. Durante esta etapa, ocorre a checagem interna de processos e estruturas necessárias à fase S. Na fase G₁, a célula encontra-se sensível às condições ambientais e, caso as mesmas não sejam

favoráveis, o ciclo é interrompido, a não ser que seja ultrapassado o ponto de restrição, onde a fase S ocorrerá independente das condições ambientais (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008; WARD, 2002).

O controle do ciclo e da proliferação celular, está relacionado com a expressão de diversas proteínas, que são reguladas geneticamente. A progressão da fase G1 para a fase S, por exemplo, é mediada por quinases dependentes de ciclinas, ativadas por fatores de transcrição. Quando há erro na síntese e/ou replicação do DNA, estas quinases podem ser inibidas pelas proteínas p15, p16, p18 e p19, interrompendo a progressão do ciclo celular (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Portanto, mutações em genes supressores de tumor, que inibem a proliferação celular ou induzem a apoptose, podem alterar o ciclo celular e favorecer o aparecimento de tumores. Da mesma forma, mutações em proto-oncogenes podem levar a sua ativação à oncogene, causando uma superexpressão de proteínas indutoras do ciclo celular (KARAYI; MARKHAM, 2004).

A expressão de oncogene é requerida não só para a iniciação do câncer, como também para sua manutenção, tendo em vista que está relacionada com a expressão de proteínas que inibem ou induzem a cascata apoptótica, de modo que estas células alteradas adquirem capacidade de proliferação descontrolada (VICENTE-DUEÑAS et al., 2013)

Células tumorais apresentam, ainda, mutações que levam à produção de moléculas antigênicas associadas a tumor, contra as quais o sistema imunitário pode reagir. Inicialmente, esta resposta permite a eliminação de células que sofreram alteração e levariam ao câncer. Porém, as células neoplásicas muitas vezes são capazes de evadir a estes mecanismos, por meio de sua influência sobre células imunitárias que apresentam função regulatória, como as células T (HIRSCH; NOVELLI, 2014).

Outras diversas alterações são observadas nas células neoplásicas, relacionadas com sua proliferação desordenada, como autossuficiência de sinais de crescimento, perda da sensibilidade aos sinais anticrescimento, evasão à apoptose, aumento do potencial replicativo, angiogênese, invasão tecidual e metástase. Todas

estas alterações estão relacionadas com o comprometimento dos mecanismos de defesa do organismo contra a formação de células mutantes (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011; RUBIN, 2006).

Neste contexto, outros mecanismos de regulação da proliferação celular podem ser citados, como o mecanismo de contagem do número, limitado, de vezes que determinada célula se reproduz. Neste mecanismo as pontas dos cromossomos (telômeros) marcam o número de divisões, e no momento apropriado iniciam senescência e morte. Também a apoptose mostra-se um mecanismo particularmente importante para o controle da divisão celular, e está intimamente relacionado com a fisiopatologia e tratamento do câncer (RIVOIRE et al., 2001).

1.1.3 Apoptose

Os achados histológicos da apoptose foram descritos pela primeira vez por Walther Flemming em 1885 ao estudar folículos ovarianos maduros de mamíferos. Posteriormente, Ludwig Graper (1914), ao pesquisar células de endométrio, propôs que a apoptose seria um processo oposto à mitose, passível de ocorrer em qualquer tecido que necessite eliminar células. Glucksmann, em 1950, ao examinar embriões, observou que este é um processo que ocorre nesta fase do desenvolvimento, concluindo que esta poderia ser uma forma especial de morte limitada a tecidos embrionários. Foi a partir de 1971 que Kerr, ao analisar fígado de ratos submetidos à ligadura de segmentos dos vasos portais, verificou as mesmas alterações histológicas descritas anteriormente, porém em células não germinativas ou embrionárias. Kerr, Wyllie e Currie (1972) foram então quem desenvolveram o termo “apoptose” para designar um tipo especial de morte celular. “Apoptose” é um termo de origem grega, que se refere à perda de pétalas ou folhas caindo no outono, numa alusão a uma perda aceitável, para uma posterior renovação (MAJNO; JORIS, 1995; ROSSER; GORES, 1995; SPENCER-NETTO; FERRAZ, 2000).

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada que desempenha papel fundamental na homeostase de diferentes tecidos, eliminando células supérfluas ou defeituosas. Esse processo é caracterizado por diversas

alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância, entre outras coisas, na eliminação de tumores (BERGANTINI; SOUZA; FETT-CONTE, 2005; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Alterações bioquímicas e morfológicas da apoptose a diferenciam dos demais mecanismos de morte celular e a tornam um dos principais alvos de estudo para o tratamento do câncer. Os diferentes tipos de morte celular e suas características são descritos na tabela 1. As mudanças morfológicas que definem a morte celular por apoptose incluem picnose nuclear (condensação de cromatina) e cariorrexe (fragmentação nuclear). Células apoptóticas formam pequenos corpos redondos que estão circundados por membranas e contam organelas citoplasmáticas intactas ou fragmentos de núcleo. Estes corpos apoptóticos resultam de condensações celulares progressivas e, eventualmente são tragados por células fagocíticas (GALLUZZI et al., 2007; SPENCER-NETTO; FERRAZ, 2000).

Tabela 1. Aspectos morfológicos de diferentes tipos de morte celular (GALLUZZI et al., 2007).

Tipo de morte	Descrição	Características morfológicas
Apoptose	Morte celular programada.	Arredondamento da célula; Diminuição do volume celular e nuclear (picnose); Retração de pseudópodes; Fragmentação nuclear (cariorrexe); Pouca modificação das organelas citoplasmáticas; Protuberância da membrana citoplasmática (bleb).
Autofágica	Morte que ocorre <u>com</u> autofagia (não <u>através</u> de autofagia).	Não há condensação de cromatina; Vacuolização do citoplasma.
Necrose	Necrose identifica, de uma maneira negativa, a morte celular sem as características de apoptose ou autofagia, e geralmente aparece como oncose.	Aumento do citoplasma; Ruptura da membrana plasmática; Aumento das organelas citoplasmáticas; Moderada condensação de cromatina.
Catástrofe mitótica	Morte celular que ocorre durante ou logo após uma mitose que falhou.	Micronucleação; Multinucleação.

Diante de algumas características dos outros tipos de morte celular, a apoptose ganha especial atenção no que se refere ao câncer. No processo de necrose, por exemplo, ocorre a liberação de sinais proinflamatórios para o microambiente que circunda o tecido, o que não ocorre nos demais tipos de morte celular. Como

consequência, ocorre o recrutamento de células inflamatórias do sistema imune, cuja função é examinar a extensão do dano tecidual e remover os resíduos necróticos. Entretanto, existem evidências de que estas células inflamatórias podem favorecer a progressão tumoral, uma vez que são capazes de promover angiogênese, proliferação celular e capacidade de invasão tecidual (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A morte autofágica, por sua vez, apresenta algumas limitações. A autofagia consiste num processo de degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas danificadas para a manutenção da homeostase em condições adversas, como presença de toxinas ou ausência de nutrientes. Quando este processo ultrapasse um certo limiar, ocorre a morte autofágica. Entretanto, as células tumorais podem entrar em um estado de “dormência” reversível durante a autofagia e retomar o crescimento e proliferação quando as condições do microambiente tornam-se novamente favoráveis. Isto implica no fato de que a indução de autofagia nas células tumorais pode não resultar em morte autofágica (GALLUZZI et al., 2007; GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O mecanismo da apoptose envolve basicamente a ativação de uma cascata proteases, denominadas caspases, que culminarão na morte celular. Caspases são altamente expressas em uma forma de proenzima inativa na maioria das células e, uma vez ativadas, podem também ativar outras procaspases, permitindo a iniciação de uma cascata de proteases. Algumas procaspases podem também se agregar e autoativar. Esta cascata proteolítica, na qual uma caspase pode ativar outras caspases, amplifica a via de sinalização apoptótica e leva, rapidamente, à morte celular. Caspases possuem atividade proteolítica e podem clivar proteínas nos resíduos de ácido aspártico, embora diferentes caspases apresentem diferentes especificidades envolvendo o reconhecimento de aminoácidos vizinhos. Uma vez que as caspases são inicialmente ativadas, a morte celular parece tornar-se irreversível. As principais caspases conhecidas incluem as caspases iniciadoras (caspase-2,-8,-9,-10) e caspases efetoras (caspase-3,-6,-7) (ELMORE, 2007).

Diferentes processos bioquímicos e moleculares podem causar apoptose. Os mecanismos da apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma

cascata de eventos moleculares dependentes de energia. Atualmente, são conhecidas duas vias apoptóticas, que podem ser desencadeadas por estímulos externos por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular chamados receptores da morte (via extrínseca ou mediada por receptor de morte), ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial), conforme ilustrado na figura 3. Embora distintas, estas vias estão inter-relacionadas, de modo que moléculas de uma via podem influenciar na outra. As células apoptóticas exibem diversas alterações bioquímicas como clivagem proteica, *cross-linking* de proteína, fragmentação do DNA e reconhecimento fagocítico, que juntas resultam em uma característica estrutural específica (ELMORE, 2007).

Figura 3: Diagrama representativo simplificado dos mecanismos de apoptose (CZABOTAR et al., 2014; ELMORE, 2007). À esquerda da linha pontilhada é ilustrada a via extrínseca, mediada por receptor de morte. À direita da linha pontilhada é ilustrada a via intrínseca, na qual estão envolvidas proteínas da família Bcl-2. O quadro I apresenta as principais proteínas da família Bcl-2.

A via extrínseca envolve a ativação de receptores transmembrânicos, os quais a partir da ativação do seu domínio extracelular, transmitem o sinal de morte por meio de vias de sinalização intracelulares. Os principais ligantes e seus respectivos receptores desta via incluem FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3 (*Apoptosis antigen 3/ Decoy receptor 3*), Apo2L/DR4 (*Apoptosis antigen 2/ Decoy receptor 4*), Apo2L/DR5 (*Apoptosis antigen 2/ Decoy receptor 5*) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; KAUFMANN; EARNSHAW, 2000).

A interação do ligante ao seu receptor resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras com consequente ativação de caspase. A ligação de FasL ao seu receptor resulta na ligação da proteína adaptadora FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) e a ligação do TNF ligante ao receptor de TNF resulta na ligação da proteína adaptadora TRADD (*TNFR1 Associated Protein with Death Domain*), com o recrutamento de FADD. FADD então associa-se à procaspase-8 e forma um complexo de sinalização indutor de morte (DISC) que converte procaspase-8 em caspase-8. Esta, por sua vez, ativa uma cascata de caspases efetoras (3, 6 e 7), que clivam outras proteínas celulares vitais. O resultado final inclui a ativação de endonucleases que causam a fragmentação do DNA e morte celular. A atividade das caspases pode ser modulada pela família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP) (ELMORE, 2007; PORTH; MATFIN, 2010; XU; SHI, 2007).

A via intrínseca, ou via mitocondrial, de apoptose, é ativada por condições que podem agir de maneira positiva ou negativa. Sinais negativos envolvem a ausência de fatores de crescimento, hormônios e certas citocinas que podem inibir a supressão da morte programada, desencadeando a apoptose. Outros estímulos, que atuam de forma positiva, incluem dano do DNA, espécies reativas de oxigênio (ROS), hipoxia, níveis diminuídos de ATP e senescência celular. Estes estímulos provocam alterações na membrana mitocondrial interna, resultando na abertura de poros permeáveis na membrana mitocondrial e liberação de proteínas próapoptóticas. Um primeiro grupo inclui Smac/DIABLO, HtrA2/Omi e citocromo c (cyt c), o qual ativa Apaf-1 e procaspase-9, formando o “apoptossomo”. A aglomeração de procaspase-9 ativa caspase-9. Smac/DIABLO e HtrA2/Omi, por sua vez, promovem apoptose pela inibição de IAP. O segundo grupo de proteínas próapoptóticas, AIF (Fator Indutor de Apoptose), endonuclease G e CAD (Caspase

Ativada por Desoxirribonuclease) - proteínas proapoptóticas tardias - é liberado a partir da mitocôndria durante a apoptose, e causam fragmentação do DNA e condensação da cromatina (ELMORE, 2007; PORTH; MATFIN, 2010).

O controle e a regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorrem através de membros da família de proteínas Bcl-2. A proteína supressora de tumor p53 tem um papel crítico na regulação da família de proteínas Bcl-2, porém, os mecanismos exatos ainda não foram completamente elucidados. A família Bcl-2 de proteínas regula a permeabilidade da membrana mitocondrial e pode ser próapoptótica ou antiapoptótica. Acredita-se que o principal mecanismo da família de proteínas Bcl-2 seja a regulação da liberação do citocromo c a partir da mitocôndria através de alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (CZABOTAR et al., 2014; ELMORE, 2007).

Existem diversas proteínas reguladoras da apoptose que se constituem como proteínas da família Bcl-2, que estão divididas em três subfamílias de acordo com sua função e similaridade de sequência de aminoácidos: proteínas proapoptóticas efetoras (BAX e BAK), proteínas proapoptóticas BH3-*only* (BID, BIM, PUMA, Noxa, HRK, BIK, BMF, BAD) e proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, A1, Bcl-b, Bcl-w). As proteínas da família BH3-*only* podem ser subdivididas em ativadoras (ativam diretamente BAX/BAK) ou sensibilizadoras (neutralizam a ação antiapoptótica das proteínas Bcl-2) (CZABOTAR et al., 2014; LABI; ERLACHER, 2015; LOPEZ; TAIT, 2015).

A permeabilidade da membrana mitocondrial externa se dá a partir das proteínas BAX e BAK. Geralmente, a ativação destas proteínas requer a sua interação com uma proteína do subtipo BH3-*only* (figura 4), que causa uma alteração conformacional de BAX e BAK, levando à sua oligomerização na membrana mitocondrial. Estes oligômeros tornam a membrana mitocondrial permeável, possivelmente de forma indireta, pela indução de poros lipídicos, ou diretamente, pela formação de poros, propriamente. A abertura destes poros permite, então, o extravasamento de proteínas proapoptóticas, como citocromo c (JENG; CHENG, 2013).

Figura 4. Mecanismo de ativação e inibição de proteínas da família Bcl-2 (adaptado de CZABOTAR et al., 2014). Proteínas BH3-only ativadoras (BIM) ligam-se às proteínas efetoras (BAX), causando uma alteração conformacional que leva à oligomerização de BAX na membrana mitocondrial, o que resulta na permeabilidade da mesma, com extravasamento de proteínas proapoptóticas (p. ex. citocromo c). Proteínas sensibilizadoras (BAD) inibem a ação das proteínas antiapoptóticas (BCL-2) sobre as proteínas efetoras (BAX).

A apoptose celular, quando reduzida, pode predispor ao aparecimento de neoplasias, pois tem debilitada a sua função de eliminar as células com material genético defeituoso (FERREIRA *et al.*, 2009). Alguns fatores contribuem para esta redução, como por exemplo, mutações em genes supressores de tumor, que regulam negativamente a proliferação celular ou positivamente a apoptose, impedindo a proliferação celular desordenada. Alguns exemplos destes genes incluem o BRCA1 e BRCA2, relacionados à susceptibilidade ao câncer de mama (AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

Tendo em vista que a resistência à apoptose é uma das características comum à maioria dos tumores malignos, as vias apoptóticas tornam-se um alvo de interesse ao tratamento do câncer, e diversos quimioterápicos utilizados para este fim têm seu efeito antineoplásico baseado na indução da apoptose em células cancerosas, de forma direta ou indireta, como por exemplo o etoposídeo, teniposídeo, vimblastina e vincristina (BRANDÃO et al., 2010; FULDA; DEBATIN, 2006; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; OKADA; MAK, 2004).

1.1.4 Tratamento

Diversas estratégias são empregadas no tratamento do câncer, incluindo intervenção cirúrgica e radioterapia para o tratamento loco-regional e quimioterapia para o tratamento sistêmico, as quais têm sua utilização determinada por fatores como diâmetro do tumor, comprometimento dos linfonodos, entre outros (INCA; CEDC, 2012).

Dentre tais intervenções contra o câncer, a quimioterapia se destaca pelo fato de que se trata de uma terapia sistêmica e, portanto, empregada na doença metastática. Entretanto, quimioterápicos empregados nos protocolos de tratamento de câncer, como ciclofosfamida, metotrexato, fluorouracila e adriblastina não possuem especificidade, e agredem, além das células tumorais, os tecidos de proliferação rápida. Isto implica na ocorrência de efeitos adversos ou toxicidades, como efeitos hematológicos, gastrintestinais, hepatotoxicidade, toxicidade renal, alterações metabólicas, reações alérgicas, entre outras (MACHADO; SAWADA, 2008).

Estes problemas decorrentes da quimioterapia têm estimulado a busca por fármacos antineoplásicos mais seletivos e efetivos, e os avanços na biologia do câncer propiciam o desenvolvimento de pesquisas nesta área (BRANDÃO et al., 2010).

Neste contexto, as plantas são importantes fontes de fármacos, considerando-se a grande diversidade de moléculas com potencial medicinal, e por representarem uma contribuição efetiva na busca de novos produtos bioativos e fármacos semissintéticos. Certamente a utilização de produtos naturais tem sido uma estratégia muito bem sucedida na descoberta de novos fármacos, o que é evidenciado pelas diversas entidades químicas aprovadas pelas autoridades reguladoras em todo o mundo (AMARAL et al., 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009; MONTANARI; BOLZANI, 2001). A tabela 2 lista alguns fármacos importantes obtidos a partir de compostos naturais.

Tabela 2. Fármacos originados de produtos naturais (BARREIRO, BOLZANI, 2009).

Protótipo natural	Fármaco descoberto	Classe terapêutica
quinina	mefloquina	Antimalárico
pilocarpina	pilocarpina	Colinesterásico
tubocurarina	hexametônio	Bloqueador ganglionar
papaverina	sildenafil	Proerétil
reserpina	reserpina	Antiarrítmico
mescalina	anfetamina	Anorexígeno
vincristina	vincristina	Antineoplásico
galantamina	galantamina	Antialzheimer
camptotecina	exatecan	Antineoplásico
huperzina-A	selagina*	Antialzheimer
epibatidina	ABT-418	Analgésico periférico

*selagina é sinonímia de huperzina-A

Os alcalóides se destacam como fármacos ou protótipos de origem natural. Morfina, pilocarpina, reserpina, galantamina e selagina são exemplos de alcalóides aprovados para o tratamento de diversas doenças. Em se tratando de câncer, a camptotecina e os alcalóides da vinca, bem como produtos naturais de outras naturezas químicas como o etoposídeo e paclitaxel, são importantes fármacos de origem natural e bastante empregados (figura 5) (BARREIRO; BOLZANI, 2009; BRANDÃO et al., 2010).

Figura 5. Estruturas de antineoplásicos de origem natural (BRANDÃO *et al.* 2010).

A descoberta de novos antineoplásicos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área. Exemplo de destaque é o paclitaxel, um diterpeno complexo da família dos taxanos que foi extraído da casca da árvore conhecida como yem, *Taxus brevifolia* Nutt. O paclitaxel mostrou excelente atividade antineoplásica, tornando-se parte integrante da terapêutica contra os cânceres de ovário, mama, pulmão e sarcomas. Este composto passou a ser obtido por métodos semissintéticos a partir da 10-desacetilbacatina III, precursor natural isolado de *Taxus baccata*, do qual foi também possível obter e identificar as propriedades antineoplásicas do docetaxel (figura 6), seu análogo mais potente. A substituição da amida por um carbamato e do anel aromático por uma butila conferiu maior meia-vida (maior estabilidade metabólica), absorção mais rápida e maior retenção intracelular (menor susceptibilidade aos mecanismos de resistência relacionados às bombas de efluxo) em relação ao paclitaxel (BARREIRO; FRAGA, 2008; BRANDÃO *et al.*, 2010; CROWN; O'LEARY; OOI, 2004).

Figura 6. Estruturas dos antineoplásicos paclitaxel e docetaxel (BRANDÃO *et al.* 2010).

Além do paclitaxel, outras substâncias isoladas de plantas já foram relatadas apresentando atividade antitumoral, como por exemplo a capsaicina (figura 7) (MAITY, SHARMA, JANA, 2010).

Figura 7. Estrutura da capsaicina (WALPOLE *et al.*, 1993a).

Isolada em 1876, a capsaicina é um composto produzido por pimentas do gênero *Capsicum*, denominado *N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-8-metilnon-6-enamida (figura 3), e possui propriedades analgésica e antitumoral, a qual já foi observada sobre vários tipos de células de câncer humano (WALPOLE *et al.*, 1993a, 1993b, 1993c). Estudos já demonstraram sua ação sobre câncer de língua (IP *et al.*, 2010), pâncreas (ZHANG *et al.*, 2008), cólon (YANG *et al.*, 2009) e pulmão (BROWN *et al.*, 2010).

A capsaicina também teve sua ação comprovada sobre o câncer de mama. Chang e colaboradores (2011) avaliaram o efeito inibidor da capsaicina sobre crescimento tumoral em células de linhagens de câncer de mama MCF-7 e BT-20. O estudo concluiu que a capsaicina inibiu o crescimento das células do câncer de mama através da indução da apoptose e interrupção do ciclo celular na fase S.

O mecanismo pelo qual a capsaicina atua nas vias apoptóticas é ainda desconhecido. Algumas hipóteses, porém, têm sido propostas, incluindo a indução

do aumento da expressão da proteína p53, que regula a resposta celular a danos do DNA, atuando sobre a interrupção do ciclo celular, reparo do DNA e morte celular (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; IP et al., 2010). Outro mecanismo proposto envolveria a produção de ROS induzida por capsaicina, tendo em vista que o excesso de espécies reativas de oxigênio causa estresse oxidativo, com consequente perda da função celular e morte por apoptose (ZHANG et al., 2008).

As propriedades terapêuticas da capsaicina têm despertado o interesse na obtenção de análogos desta molécula. Para o desenvolvimento destes análogos e estudos de Relação Estrutura-Atividade (REA) para atividade analgésica, Walpole e colaboradores partiram da divisão da molécula de capsaicina em três regiões, a saber: sistema metilcatecol (região A), ligação amida (região B) e cadeia lateral lipofílica (região C), conforme ilustrado na figura 4 (WALPOLE et al., 1993a, 1993b, 1993c).

A partir desta proposta, outros estudos de análogos da capsaicina têm sido desenvolvidos baseados neste modelo, porém com o objetivo de se descobrir entidades moleculares semelhantes com potencial antineoplásico. Sá-Júnior e colaboradores (2013) desenvolveram um análogo sintético da capsaicina, denominado RPF101 (figura 5), que apresentou atividade antineoplásica sobre linhagem de células MCF-7.

Figura 8. Estrutura do análogo RPF101, destacando as regiões A, B e C (adaptado de SÁ-JÚNIOR et al., 2013).

O planejamento deste análogo fundamentou-se em modificações moleculares empregando-se estratégias de hibridação, bioisosterismo e homologia. Primeiramente, na região A, foi realizado o fechamento do anel do grupo metilcatecol, a fim de se obter o sistema bicíclico 1,3-benzodioxol. Este tipo de modificação pode proporcionar vantagens importantes ao análogo, uma vez que o sistema benzodioxol é uma estrutura apresentada em uma série de substâncias

com atividade antineoplásica, como o etoposídeo e teniposídeo (BRANDÃO et al., 2010).

A região B sofreu uma substituição bioisostérica de sua ligação amida por um grupo sulfonamida. Particularmente a substituição de ligações amida por bioisósteros adequados, que mantenham as semelhanças geométricas, propriedades de ligação eletrônica, ou de hidrogênio, tem sido bem sucedida e amplamente aplicada (BLACK et al., 2005).

A cadeia alquílica lateral na região C foi modificada por homologia e estratégias de rigidificação, mantendo-se o caráter lipofílico e relativamente volumoso desta parte da molécula (SÁ JUNIOR et al., 2013).

Nos ensaios biológicos, RPF101 apresentou IC₅₀ (Concentração Inibitória 50%) de 32 µM em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7, enquanto a capsaicina foi citotóxica no patamar de 53 µM. Tanto nas células tratadas com capsaicina como com RPF101, foram observadas alterações características da apoptose, tais como encolhimento celular, picnose, marginação nuclear, despolarização da mitocôndria, externalização de fosfatidilserina e formação de vesículas apoptóticas. Ademais, observou-se a fragmentação do DNA em cerca de 200 pares de base nas células MCF-7 tratadas com RPF101, característica comumente associada à apoptose em muitos tipos de células, o que não foi verificado no tratamento com capsaicina. As células tratadas com RPF101 exibiram número reduzido de mitoses e a interrupção dos fusos mitóticos, caracterizando interrupção do ciclo celular na fase G2/ M, o que não ocorreu com as células não tratadas (SÁ-JUNIOR *et al.*, 2013).

Tomados em conjunto, os resultados demonstram que o RPF101 induz efeitos antitumorais em células MCF-7, por apoptose. Assim, a otimização molecular com a finalidade de se desenvolver análogos de RPF101 pode ser uma estratégia interessante na obtenção de compostos com atividade antineoplásica.

Desde a década de 1970 é relatada a atividade antitumoral de substâncias similares ao RPF101. Sartorelli e colaboradores sintetizaram uma série de arilsulfonil-hidrazonas (figura 9) (I), que incluiu a 1-oxidopiridina-2-carboxialdeído-*p*-tolueno-sulfonil-hidrazona. Este composto mostrou-se potente em inibir sarcoma 180

in vivo aumentando o tempo de sobrevivência de ratos em mais de três vezes. O composto apresentou, ainda, atividade antineoplásica em hepatoma 129, carcinoma de Ehrlich e leucemia L1210 (SARTORELLI et al., 1976).

Figura 9. Estrutura geral de compostos sulfonil-hidrazônicos com atividade antineoplásica (BASELGA, 2011; LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980; MAY; SARTORELLI, 1978; SARTORELLI et al., 1976; ZHANG et al., 2014).

Posteriormente, o grupo de Sartorelli observou que derivados 3-formilpiridazina-2-óxido-arilsulfonil-hidrazônicos apresentaram excelente atividade antineoplásica em sarcoma 180 *in vivo*. Em 1980, verificou-se então atividade de 2,4-dimetoxi-, 3,4-dimetoxi-, e 2,4,6-trimetilbenzeno-sulfonil-hidrazona, contra leucemia *in vivo* (LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980; MAY; SARTORELLI, 1978).

Desde então, sulfonil-hidrazonas têm sido testadas quanto a sua atividade antitumoral. Uma série de sulfonil-hidrazonas imidazol[1,2-a]piridinas substituídas apresentou atividade inibitória sobre PI3 quinase p110 α , enzima que fosforila fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato na posição 3-OH para formar fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato. Esta enzima, ativada por receptores de tirosina quinase de fatores de crescimento, está relacionada com a síntese e crescimento celular, participando de processos que envolvem o metabolismo, proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula e encontra-se desregulada em diversos tipos de câncer. Um destes derivados sulfonil-hidrazônicos (II) apresentou atividade inibitória com IC₅₀ de 0,30 nM e suprimiu o crescimento de câncer cervical humano (HeLa) em modelos de camundongos. Uma dose intraperitoneal de 50 mg/kg por dia durante duas semanas suprimiu o crescimento do tumor em 62% (BASELGA, 2011; CHALHOUB; BAKER, 2009; HAYAKAWA et al., 2007).

Derivados sulfonil-hidrazônicos 3-nitrocromenos (III) apresentaram efeito citotóxico por indução de apoptose em diversas linhagens tumorais, com valores de IC₅₀ entre 4,97 e 53,32 µM em linhagens de adenocarcinoma de pulmão (A549), além de apresentar atividade citotóxica em KG-1 (leucemia), A2780 (câncer ovariano) e K562 (leucemia mielóide crônica), em patamares de IC₅₀ que variaram entre 0,14 e 2,99 µM (ZHANG et al., 2014).

Tais estudos sugerem, portanto, que a pesquisa de compostos sulfonil-hidrazônicos ligados a anéis aromáticos pode ser promissora no desenvolvimento de moléculas com atividade antineoplásica.

1.2 Planejamento de Fármacos

Embora existam diversos métodos alternativos para reduzir ou erradicar doenças que afetam o ser humano, indubitavelmente o planejamento de fármacos não deixa de ser uma ferramenta importante para este fim, e conta com diferentes estratégias. O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*). Desta forma, faz-se necessário o conhecimento prévio do processo fisiopatológico envolvido e na escolha correta do melhor alvo terapêutico, representado por uma biomacromolécula (enzima ou receptor). Conhecendo-se a topografia molecular tridimensional (3D) do biorreceptor, particularmente do sítio de interação, torna-se possível desenhar inibidores/ativadores enzimáticos ou antagonistas/agonistas de receptores por processos de complementaridade molecular planejada (BARREIRO; FRAGA, 2008; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de ligantes bioativos. Neste caso, o desenho molecular do inibidor/ativador enzimático ou do antagonista/agonista de receptor desejado pode iniciar-se, por exemplo, a partir da

estrutura da micromolécula endógena envolvida na fisiopatologia do processo em estudo, ou de compostos de origem natural com atividade biológica comprovada, como foi o caso do etoposídeo (figura 10), um fármaco antineoplásico obtido pela modificação estrutural da podofilotoxina, molécula com propriedades antineoplásicas isolada de *Podophyllum peltatum* e de *P. emodi* (ACHARYA et al., 2011; BARREIRO; FRAGA, 2008; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; LEMKE; WILLIAMS, 2008).

Figura 10. Modificações incorporadas à estrutura da podofilotoxina para obtenção do etoposídeo (BARREIRO, FRAGA, 2008).

Nem sempre o bioligante identificado neste processo apresenta bom perfil farmacocinético e/ou farmacodinâmico, tornando necessárias novas modificações moleculares. O ligante ou análogo-ativo de baixa afinidade ou eficácia, são designados pelo termo *hit* (BARREIRO, 2002).

O *hit* ou composto descoberto pode ser otimizado por modificações moleculares subsequentes, introduzidas de forma planejada. Diante disto, grupos substituintes podem ser inseridos numa molécula, não de uma maneira aleatória, mas com bases racionais.

No que tange a compostos que contenham anel benzênico, uma estratégia que se destaca é a utilização do diagrama de Craig, que norteia a escolha de substituintes a serem introduzidos neste anel. Este método baseia-se na correlação de parâmetros eletrônicos (constante de Hammet – σ) e hidrofóbicos (constante de Hansch – π) organizando diversos substituintes num plano cartesiano bidimensional de acordo com estas características físico-químicas, conforme ilustrado na figura 11.

Neste sentido, quanto maior o valor da constante de Hammet e da constante de Hansch (constante de hidrofobicidade), maior é a característica elétron-aceptora e lipofílica do grupo, respectivamente (CRAIG, 1971)

Figura 11. Diagrama de Craig (CRAIG, 1971).

Estudando correlações entre descritores estruturais, Craig (1971) demonstrou que a constante de hidrofobicidade é estatisticamente independente da constante de Hammet. Tendo isto em vista, e a necessidade de critérios na seleção de substituintes para estudos de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*), Craig então propôs o diagrama, cujas coordenadas são descritores estruturais independentes. Esta metodologia visa o delineamento de série de compostos análogos, especialmente para o estudo de QSAR (CRAIG, 1971; TAVARES, 2004)

Através destes estudos de QSAR, é possível descrever quantitativamente as relações entre a estrutura química de moléculas e a atividade biológica por elas desempenhadas, identificando-se os valores ideais para determinadas propriedades físico-químicas e, por meio deles, nortear o planejamento de novos compostos (TAVARES, 2004).

Para tanto, faz-se necessário que a seleção dos substituintes seja feita buscando-se o maior grau de dispersão possível dentro do diagrama, isto é, grupos dos diferentes quadrantes, que apresentem variação no caráter hidrofóbico e

eletrônico. Deste modo, torna-se possível quantificar a influência destes parâmetros para a atividade (KUBINYI, 1993).

Outras metodologias podem ser empregadas a fim de se obter informações a respeito da relação entre a estrutura química de uma molécula e sua atividade biológica. Tendo isto em vista, estratégias de modelagem molecular mostram-se uma importante ferramenta na correlação de propriedades físico-químicas de um composto e a atividade por ele desempenhada. Ademais, além do diagrama de Craig, existem outras diversas estratégias que podem ser utilizadas no direcionamento de modificações moleculares e nortear o planejamento de novos compostos bioativos, como por exemplo o bioisosterismo (WERMUTH, 2008).

1.2.1 Bioisosterismo

Também com o intuito de modificar uma molécula, o bioisosterismo tem sido uma estratégia largamente empregada e permitido importantes descobertas. Este conceito é relativamente recente, e veio como uma aplicação do conceito de isósteros à atividade biológica (LIMA; BARREIRO, 2005).

Inicialmente, em 1919, Langmuir definiu “isósteros” como átomos ou moléculas orgânicas ou inorgânicas que apresentam o mesmo número e/ou arranjo de elétrons. Posteriormente, Grimm formulou a Regra do Deslocamento do Hidreto, segundo a qual a adição de um átomo de hidrogênio com um par de elétrons (hidreto) a um átomo produziria um pseudoátomo apresentando as mesmas propriedades físicas do elemento da família imediatamente após a sua na tabela periódica. O conceito mais recente foi instituído em 1932 por Erlenmeyer, que definiu isósteros como “elementos, moléculas ou íons em que as camadas periféricas de elétrons podem ser consideradas idênticas (ERLENMEYER; BERGER, 1932; GRIMM, 1925; LANGMUIR, 1919).

Foi apenas em 1951 que Friedman aplicou este termo ao campo biológico e instituiu o conceito de bioisosterismo propriamente dito. Segundo ele, bioisósteros seriam “entidades estruturais que se encaixam na definição mais ampla de isósteros

e tem o mesmo tipo de atividade biológica” (FRIEDMAN, 1951). Posteriormente, Thorbner definiu bioisósteros como “grupos ou moléculas que possuem similaridades químicas e físicas que produzem propriedades biológicas amplamente similares” (THORNBUR, 1957). Na década de setenta, Burger conceituou bioisósteros como "Compostos ou grupos que possuem formas e volumes moleculares similares, aproximadamente a mesma distribuição de elétrons e que exibem propriedades físico-químicas similares" (BURGER, 1970). Em 1998 a IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* - estabeleceu que “bioisósteros é um composto resultante da substituição de um átomo ou grupo de átomos por outro átomo ou grupo de átomos amplamente semelhantes. O objetivo da substituição bioisostérica é criar um novo composto que apresente propriedades biológicas semelhantes ao protótipo. A substituição bioisostérica pode ser físico-química ou topologicamente fundamentada” (WERMUTH et al., 1998).

Resumidamente, bioisosterismo compreende uma estratégia de modificação molecular de um composto protótipo, baseada na troca de determinado(s) fragmento(s) molecular(es) por outro(s) que apresente(m) propriedades físico-químicas ou topológicas semelhantes, como volume molecular, forma e distribuição eletrônica, capazes de apresentar propriedades biológicas similares (BARREIRO; FRAGA, 2008; MEANWELL, 2011).

O bioisosterismo é bastante aplicado na obtenção de análogos. Este termo, derivado do grego “analogia”, é empregado para apontar semelhanças estruturais e funcionais. Em se tratando de compostos bioativos, tem-se que um análogo de um composto apresenta similaridades químicas e terapêuticas com seu protótipo. Esta definição implica em três categorias, a saber: compostos que apresentam similaridades químicas e terapêuticas; compostos que apresentam similaridades químicas; e compostos que apresentam apenas o mesmo efeito farmacológico, porém com estruturas completamente distintas. Logo, o bioisosterismo é o termo que pode ser aplicado a análogos que se enquadram na primeira categoria (WERMUTH, 2008).

Bioisósteros podem ser classificados como clássicos ou não clássicos, de acordo com o grau de similaridade estérica e eletrônica. Bioisósteros clássicos

consistem, basicamente, em isósteros que se enquadram nas definições de Erlenmeyer, e na regra do deslocamento do hidreto de Grimm, enquanto bioisósteros não-clássicos consistem em isósteros estruturalmente diferentes, porém com comportamento químico semelhante, e inclui bioisósteros funcionais e retroisósteros (inversão de grupos funcionais). A figura 12, a seguir, ilustra os diversos tipos de bioisósteros (WERMUTH, 2008).

Figura 12. Exemplos de substituições bioisotéricas.

Esta é uma estratégia bastante útil na otimização de compostos bioativos, tendo aplicação na melhoria de todas as fases de ação do fármaco, incluindo a farmacodinâmica. Um exemplo a ser citado é o da losartana (figura 13). A substituição da carboxila do composto EXP-7711 pela tetrazoila, que gerou a losartana, fármaco anti-hipertensivo antagonista do receptor AT1 de angiotensina II, aumentou drasticamente a atividade da molécula (LIMA; BARREIRO, 2005).

Figura 13. Aplicação do bioisosterismo em EXP-7711 para melhora da atividade e obtenção da losartana.

Percebe-se que as ferramentas disponíveis atualmente na química medicinal norteiam o desenvolvimento de novas entidades moleculares com propriedades terapêuticas, haja vista que permitem o desenho de moléculas racionalmente planejadas e/ou sua otimização, direcionadas ao tratamento de uma doença de interesse.

1.2.2 Modelagem molecular

Durante o desenvolvimento de compostos bioativos, métodos computacionais mostram-se de grande valia na otimização deste processo. Neste sentido, têm-se o planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD – *Computer-Assisted Drug Design*), que é definido como o uso de técnicas computacionais para descobrir, planejar e otimizar compostos biologicamente ativos (SANT'ANNA, 2002).

Neste contexto, a modelagem molecular utiliza-se de métodos computacionais, que fornecem informações e modelos mais refinados, úteis na investigação de estruturas e propriedades moleculares. Ou seja, por meio da modelagem molecular, é possível, com o auxílio de programas computacionais, criar modelos de estrutura molecular e prever suas propriedades (NADENDLA, 2004; OOMS, 2000; SANT'ANNA, 2002).

Técnicas de modelagem molecular podem ser aplicadas ao planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor, onde é conhecido o arranjo topológico da biomacromolécula-alvo a partir de dados experimentais, como cristalografia de raio-X (MONTANARI, 2000; SANT'ANNA, 2009).

Estudos de modelagem molecular podem também ser desenvolvidos numa abordagem independente da estrutura da biomacromolécula, considerando as interações fármaco-receptor de forma indireta a partir de modelos que correlacionam a estrutura química do ligante e com sua atividade biológica (SANT'ANNA, 2009).

Para tais estudos, duas principais aproximações podem ser utilizadas: a aproximação clássica, que inclui métodos de mecânica molecular e dinâmica molecular; e a aproximação quântica, que inclui os métodos *ab initio* e semiempírico

(figura 14). Por meio destes métodos é possível otimizar uma estrutura e calcular dados e propriedades estruturais, como a energia de um arranjo de átomos em particular (conformação), modificar a estrutura para minimizar energia e calcular propriedades como carga, momento dipolo e calor de formação (CARVALHO et al., 2003).

Figura 14. Métodos para o estudo de modelagem molecular.

O métodos clássicos de modelagem molecular fundamentam seus cálculos no núcleo do átomo, sem considerar os elétrons. Métodos de campo de força, nos quais se baseiam a mecânica molecular, calculam a energia de um sistema como uma função de posições nucleares. Os campos de força consideram, basicamente, quatro componentes-chave, a saber: estiramento de ligação, ângulo de ligação, ângulo de torção e interações de átomos não ligados (interações eletrostáticas e de van der Waals), gerando um conjunto de funções de energia que determinam penalidades energéticas para o afastamento da estrutura dos valores “normais” atribuídos a estes componentes (CARVALHO et al., 2003; LEACH, 2001; SANT’ANNA, 2009). A expressão de energia da mecânica molecular pode ser dada pela equação:

$$v(\mathbf{r}^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsões}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))$$

$$+ \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right)$$

Onde $v(\mathbf{r}^N)$ denota a energia potencial, a qual é uma função das posições ($\mathbf{r}$) de N partículas (átomos). O primeiro termo da equação expressa a interação entre pares de átomos ligados. O segundo termo é a soma de todos os ângulos de valência na molécula. O terceiro termo é o potencial torsional, onde mudanças energéticas são observadas conforme a ligação gira. Por fim, o quarto termo consiste nas interações “não ligadas” (LEACH, 2001).

Exemplos de métodos de mecânica molecular incluem MM (MM2 e versões posteriores), AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) e MMFF (*Merck Molecular Force Field*). Estes métodos são usualmente empregados para minimização de energia, conformação mais estável e cálculos de energia simples. Os métodos clássicos demandam um menor custo operacional e são menos precisos, além de não ser possível calcular propriedades eletrônicas. Para suprir estas limitações, métodos quânticos podem ser empregados. Estes, porém, requerem a disponibilidade de uma maior capacidade de cálculo.

A mecânica quântica utiliza-se da física quântica para calcular as propriedades de uma molécula, considerando as interações entre os elétrons e o núcleo da mesma. Este método consiste, basicamente, no cálculo dos orbitais moleculares, e oferece uma descrição mais detalhada do comportamento químico de uma molécula. A mecânica quântica é baseada na ampliação da equação de Schrödinger, a seguir, que descreve o trânsito do núcleo e dos elétrons em uma superfície de energia potencial (LEMKE; WILLIAMS, 2008; PATRICK, 2013)

$$H\Psi = E\Psi$$

Onde: H = Hamiltoniano; E = energia do sistema; ψ = função de onda.

A partir da mecânica quântica, é possível executar cálculos de energia de orbital molecular, calor de formação, cargas atômicas parciais, mapas de potencial

eletrostático e momento dipolo. Os métodos de mecânica quântica podem ser subdivididos em *ab initio* e semiempírico. Métodos *ab initio* consideram toda a população eletrônica da molécula e baseiam-se em equações exatas, sem aproximações. É um método mais demorado, restringindo-se a pequenas moléculas. Inclui métodos baseados na teoria da perturbação de Møller-Plesset, interação de configuração e o método Hartree-Fock (LEACH, 2001; SANT'ANNA, 2009). O método semiempírico, por sua vez, considera apenas os elétrons de valência, utilizando aproximações e parâmetros armazenados, a partir de simplificações baseadas em resultados experimentais e em outros resultados teóricos (PATRICK, 2013). Os principais métodos semiempíricos incluem MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*), AM1 (*Austin Model 1*) e PM3 (*Parametric Method 3*). Novos métodos de acurácia superior foram desenvolvidos posteriormente, como PM6 (*Parametric Method 6*) (STEWART, 2008, 2009).

Aplicando-se técnicas de modelagem molecular, é possível obter um conjunto de propriedades moleculares, por meio do qual adquiri-se informações a respeito das interações entre um ligante e seu receptor. Tais propriedades estão relacionadas às forças intermoleculares envolvidas na interação entre um composto e o seu alvo, além serem fundamentais no que tange à farmacocinética de uma molécula, inclusive em se tratando de atingir o seu local de ação. Portanto, o uso de métodos apropriados de modelagem molecular pode fornecer dados importantes a respeito de um composto bioativo, que podem ser aplicados ao seu desenvolvimento bem como no planejamento de novas moléculas (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O câncer é um importante problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, e seu diagnóstico traz impactos de ordem física e emocional na vida do paciente. Além dos problemas gerais relacionados à doença em si, o indivíduo pode enfrentar diferentes tratamentos para a doença, entre cirurgias, radioterapia e quimioterapia, que lhe acarretam baixa qualidade de vida.

Diante da relevância epidemiológica da doença e dos problemas relacionados à quimioterapia convencional, o objetivo do presente trabalho foi otimizar o protótipo RPF101, o qual já teve sua atividade antitumoral comprovada (SÁ-JUNIOR *et al.*, 2013). Para a otimização deste composto, foram sintetizados análogos planejados por bioisosterismo, os quais foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico. O composto mais promissor foi submetido a estudos para elucidação mecanística ao nível celular e de modelagem molecular para se determinar suas propriedades físico-químicas e correlacioná-las com a sua atividade biológica.

2.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar a atividade citotóxica do composto RPF101, a partir da substituição bioisostérica do grupo sulfonamida pelo grupo sulfonil-hidrazona;
- b) Avaliar o potencial antitumoral dos análogos sintetizados em linhagens tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e realizar estudos de elucidação mecanística ao nível celular em relação aos compostos ativos;
- c) Realizar estudos de modelagem molecular, avaliando as propriedades eletrônicas e lipofílicas dos análogos e correlacionando-as com a atividade citotóxica.

3 PLANEJAMENTO DOS ANÁLOGOS

Utilizando RPF101 como protótipo, as modificações moleculares empregadas visam a obtenção de duas séries de análogos distintas (**I** e **II**), que diferem entre si de acordo com a região A. A série **I** é constituída por compostos que possuem o grupo benzodioxol na região A, enquanto a série **II** compreende análogos que possuem o grupo metilcatecol neste região, a fim de verificar a influência do fechamento do anel na atividade da molécula. Em ambas as séries, foi realizada a substituição do grupo sulfonamida pelo grupo sulfonil-hidrazona na região B (bioisosterismo não clássico) e a introdução de grupos substituintes (R) na posição *para* do anel aromático presente na região C, conforme ilustrado na figura 15.

Figura 15. Modificações estruturais em RPF101 para obtenção dos análogos sulfonil-hidrazônicos.

A escolha dos substituintes “R” baseou-se no diagrama de Craig, buscando-se obter diversidade de substituintes com parâmetros estereoeletrônicos e constantes de hidrofobicidade variados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para o desenvolvimento da etapa de síntese do presente trabalho utilizou-se os materiais listados a seguir, além de equipamentos, vidrarias e utensílios comuns à rotina laboratorial:

Reagentes

- Álcool piperonílico (Sigma-Aldrich);
- Vanilina (Sigma-Aldrich)
- Dióxido de manganês (Sigma-Aldrich);
- Hidrato de hidrazina 80% (Merk);
- Cloreto de benzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de 4-metilbenzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de 4-nitrobenzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de 4-metoxibenzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de 4-clorobenzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de 4-fluorbenzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de 4-*t*-butilbenzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de 4-acetamidobenzeno-sulfonila (Sigma-Aldrich);
- Ácido clorídrico (Nuclear).

Solventes

- Diclorometano (Synth);
- Tetraidrofurano (Synth);
- Acetato de etila (Synth);
- Metanol (Synth);
- Água deionizada;
- Clorofórmio (Synth);

- Hexano (Synth)
- Clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.);
- Dimetilsulfóxido deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.);
- Etanol (Synth).

4.2 Método sintético

A metodologia sintética dos análogos sulfonil-hidrazônicos se deu basicamente em três etapas reacionais para a obtenção dos análogos da série I, e em duas etapas para a obtenção dos compostos da série II, conforme ilustrado na figura 16.

Condições reacionais: *i*: MnO₂ (15 eq), CH₂Cl₂, t.a., 4h; *ii*: N₂H₂ (2,1 eq), CH₂Cl₂, -8 °C, 0,5h; *iii*: HCl 5%, CH₃OH, refluxo, 2h.

Figura 16. Síntese dos compostos arilsulfonil-hidrazônicos

Para a síntese da série I, o álcool piperonílico (1) (Sigma-Aldrich) foi submetido à oxidação alílica para obtenção de seu respectivo aldeído, o piperonal (2). O cloreto de sulfonila (3) (Sigma-Aldrich), por sua vez, sofreu substituição nucleofílica a partir da reação com hidrazina, obtendo-se a sulfonil-hidrazida (4), intermediário comum às séries I e II. Finalmente, o produto 4 (sulfonil-hidrazida) foi acoplado ao produto 2 (piperonal) por meio de adição nucleofílica à carbonila, obtendo-se *N*-(benzodioxol-5-ilmetil) arilsulfonil-hidrazona (5) (CLAYDEN et al., 2001; LOUDON, 2009).

Os análogos da série **II** foram obtidos por adição nucleofílica da sulfonil-hidrazida (**4**) à vanilina (**6**), obtendo-se N-(hidroxi-3-metoxibenzilideno) arilsulfonil-hidrazona (**7**) (CLAYDEN et al., 2001; LOUDON, 2009).

Os experimentos sintéticos foram realizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

4.2.1 Obtenção do aldeído piperonílico

A oxidação do álcool piperonílico foi realizada por condições adaptadas de Aoyama e colaboradores (1998). A uma solução de álcool piperonílico (Sigma-Aldrich) (3,97 g; 26 mmol) em diclorometano (10 mL) adicionou-se 15 equivalentes de MnO₂ (34,088 g; 392 mmol), permanecendo sob agitação constante durante 4 h à temperatura ambiente. Para purificação, realizou-se filtração em sílica gel 60 (Merck) e cromatografia de coluna, empregando-se hexano/acetato de etila 1:1.

4.2.2 Síntese e purificação dos intermediários sulfonil-hidrazídicos

Para a síntese das sulfonil-hidrazidas (**4a-4i**), descritas na tabela 2, empregou-se uma adaptação da metodologia descrita por Friedman e colaboradores. A 2,1 equivalentes de hidrato de hidrazina 80% (Merck) (0,1 mL; 2,1 mmol), adicionou-se, gota a gota, cloreto de sulfonila (Sigma-Aldrich) (1 mmol) em diclorometano ou THF (5 mL), permanecendo sob agitação constante a -8 °C durante 0,5-2 h. Variações das condições reacionais são especificadas na tabela 3. O produto foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi decantada em MgSO₄ anidro, sendo em seguida filtrada e o solvente evaporado. Quando necessário, o intermediário foi purificado por cromatografia de coluna, utilizando-se clorofórmio/ metanol 9,4: 0,6 para remoção de subproduto da reação (FRIEDMAN; LITTLE; REICHLE, 1960).

Tabela 3. Condições reacionais empregadas na obtenção dos intermediários sulfonil-hidrazídicos.

Estrutura	Código	R	Condições reacionais	
			Solvente	Tempo (h)
4a	-H	CH ₂ Cl ₂	0,5
	4b	-CH ₃	THF	0,5
	4c	-F	CH ₂ Cl ₂	0,5
	4d	-Cl	THF	2
	4e	-NO ₂	THF	0,5
	4f	- <i>tert</i> -butil	CH ₂ Cl ₂	0,5
	4g	-OCH ₃	THF	2
	4i	-NHCOCH ₃	THF	2

4.2.3. Síntese e purificação dos análogos sulfonil-hidrazônicos

Para síntese dos análogos sulfonil-hidrazônicos (**5a-5i** e **7b-7i**), foram testadas duas metodologias semelhantes. No primeiro método (compostos **5a**, **5e** e **5g**), à uma solução de piperonal (1 mmol) em metanol (5 mL), adicionou-se solução do intermediário sulfonil-hidrazida (1 mmol) em metanol (5mL) e HCl 5% (50 µL), mantendo-se a reação sob aquecimento (CUEVAS-YAÑEZ et al., 2004). Os compostos cristalizaram e foram filtrados a vácuo. Alguns análogos não se apresentaram puros após cristalização, de forma que sua purificação foi realizada por cromatografia de coluna utilizando-se hexano/acetato 2:1. Variações nas condições reacionais são descritas na tabela 4.

Em um segundo método (compostos **5b**, **5c**, **5d**, **5f**, **5i** e **7b-7i**) a uma solução de sulfonil-hidrazida (1 mmol) em metanol (5 ml) previamente aquecida a 50 °C, adicionou-se, gota a gota, solução de piperonal ou vanilina (1 mmol) em metanol (5 ml), mantendo-se a reação sob aquecimento (tabela 4). Ao término da reação, adicionou-se água gelada, deixando posteriormente em repouso a -20 °C para a formação dos cristais e subsequente filtração (ASIRI; ZAYED; NG, 2010). Quando os análogos formaram precipitado viscoso que não pôde ser filtrado, o solvente foi removido e o precipitado lavado com hexano, que foi posteriormente decantado. O processo resultou na obtenção de um precipitado sólido.

Tabela 4. Condições reacionais empregadas na obtenção dos análogos sulfonil-hidrazônicos.

Código	Região A	R	Condições reacionais		
			Solvente	Tempo (h)	Temperatura (°C)
*5a	benzodioxol	-H	CH ₃ OH	24	65
5b	benzodioxol	-CH ₃	CH ₃ OH	1	65
5c	benzodioxol	-F	CH ₃ OH	1,5	60
5e	benzodioxol	-NO ₂	CH ₃ OH	24	60
5f	benzodioxol	- <i>t</i> -butil	CH ₃ OH	1,5	60
*5g	benzodioxol	-OCH ₃	CH ₃ OH	2	50
5i	benzodioxol	-NHCOCH ₃	CH ₃ OH	1,5	60
7b	metilcatecol	-CH ₃	CH ₃ OH	1	50
7c	metilcatecol	-F	CH ₃ OH	1,5	50
7d	metilcatecol	-Cl	CH ₃ OH	3	65
7f	metilcatecol	-OCH ₃	CH ₃ OH	1,5	50
7g	metilcatecol	- <i>t</i> -butil	CH ₃ OH	1,5	50
7i	metilcatecol	-NHCOCH ₃	CH ₃ OH	1,5	50

*Utilizado HCl 5% como catalizador

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD, utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica GF254 (Merck). A revelação das placas será feita por lâmpada de ultravioleta (UV) e iodo.

4.3.2 Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos produtos sólidos foram obtidos em aparelho para determinação de ponto de fusão capilar, modelo M565, da marca Büchi, disponível no Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos Contra Doenças Negligenciadas (LAPEN) da FCF-USP.

4.3.3 Análise Elementar

A análise elementar dos compostos obtidos foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da USP em analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN.

4.3.4 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

As análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C foram realizadas em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, disponível na FCF-USP.

4.4 Métodos Biológicos

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados em colaboração com os pesquisadores Dr. Adilson Kleber Ferreira, Dr. Ricardo Alexandre Azevedo e Sarah Fernandes Teixeira, vinculados ao Laboratório de Imunologia de Tumores do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP).

4.4.1 Cultura de células

Foram utilizadas as células do adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (tripla negativa) e MCF-7 (deficiente em caspase-3) (*American Type Culture Collection* - ATCC®) e como linhagem não tumorigênica, fibroblastos 3T3. As foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² meio de cultura RPMI-1640 (MCF-7 e MDA-MB-231) ou DEMEN (3T3) em pH 7.0, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich®), além de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma Aldrich®). Os frascos de cultura de 75 cm² foram mantidos em estufa contendo atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C (MATSUO et al., 2010, 2011).

4.4.2 Ensaios de citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é baseado na redução deste sal pelo sistema enzimático mitocondrial, através das atividades de desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, o qual reflete o normal funcionamento da mitocôndria e consequentemente a viabilidade celular. As células foram colocadas em placas de 96 poços (10^4 cel/poço) e incubadas com diferentes concentrações dos compostos-teste diluídos em RPMI/DEMEN durante 24 horas, sendo utilizado o fármaco 100 μ M de paclitaxel como controle positivo. Após esse período, adicionou-se 10 μ L de uma solução de 5 mg/ml de MTT, mantendo-se sob incubação durante 2 horas para a formação do formazan (precipitado). As placas foram centrifugadas, o meio de cultura removido, e 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para solubilizar o precipitado formado (DENIZOT; LANG, 1986).

Os análogos foram testados nas concentrações de 200, 100 e 50 μ M, a fim de se verificar os compostos ativos (viabilidade celular $\leq 50\%$). Estes tiveram sua IC_{50} determinada a partir da elaboração de uma curva dose-resposta por ensaios utilizando os compostos nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e 25 μ M.

A absorbância de cada poço foi lida por um leitor de microplaca ELISA Biotek em 570 nm. Os resultados de citotoxicidade, em triplicada intra e interexperimento, foram transformados em porcentagem de células viáveis, conforme a equação a seguir:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{(A_a - A_b) \times 100}{A_c - A_b}$$

Onde: A_a = absorbância das amostras; A_b = absorbância do branco; A_c = absorbância do controle positivo.

Os dados foram plotados no software Prism 5 versão 5.03 (GraphPad Software, Inc, 2009), onde calculou-se a IC_{50} segundo o tutorial fornecido pelo Prism.

4.4.3 Estudo de indução apoptótica por anexina e iodeto de propídio

O aparecimento de células apoptóticas e necróticas foi monitorizado por coloração dupla com anexina e iodeto de propídio (PI) (Sigma, St. Louis, MO) utilizando-se um citômetro de fluxo (FACSCalibur). Células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 12 poços (1×10^5 cel/ poço) e tratadas com os análogos sulfonil-hidrazônicos nas concentrações relativas aos valores de IC_{50} diluídos em RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 24 h de incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas por 10 min a 1200 RPM. As células foram incubadas com $4\mu\text{g/mL}$ anexina V e $1,8\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PI por 1 hora a 37°C , centrifugadas por 10 min a 1200 RPM e ressuspensas em $400\mu\text{L}$ de tampão de ligação fornecido pelo fabricante. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra no citômetro FACSCalibur e a leitura dos dados realizada utilizando-se o software FlowJo (TresStar Inc., Ashland, OR, EUA).

4.4.4 Análise do ciclo celular

Para o estudo das fases do ciclo celular, as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 1×10^5 cel/poço. Para sincronização, as células foram plaqueadas com meio RPMI sem adição de soro fetal bovino. Após 12 h de incubação, o meio sem SFB foi removido e as células foram tratadas com os análogos sulfonil-hidrazônicos nas concentrações relativas aos valores de IC_{50} , diluídos em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e incubadas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C . Após 24 h de incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas por 10 min a 1200 RPM. O pellet foi ressuspenso em $300\mu\text{L}$ de HSF (0.1% DE Triton X-100, 0.1% de citrato de sódio e $50\mu\text{g/mL}$ de Iodeto de Propídeo, $10\mu\text{g/mL}$ de RNase (Sigma) e incubado a 37°C por 1h na ausência de luz. Os dados foram adquiridos em citometria de fluxo (FACSCalibur). Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o algoritmo Dean Jett-Fox, do software FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

4.4.5 Microscopia por coloração de Hoechst

Células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 na concentração de 1×10^4 cel/poço foram cultivadas em placa de 96 poços e tratadas com os análogos sulfonil-hidrazônicos nas concentrações relativas aos valores de IC_{50} . As células foram incubadas em estufa contendo 5% de CO_2 a $37^\circ C$ e após 24 h de incubação, coradas com 1 μL de solução de Hoechst (10 mg/mL) por dez minutos para avaliação da cromatina. Após este período as células foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon.

4.5 Modelagem molecular

Os estudos de modelagem molecular foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, do Departamento de Farmácia da FCF-USP. Para tanto, utilizaram-se os programas Spartan'10 versão 1.1.0 (Wavefunction Inc, 2011) e Sybyl-X versão 2.1.1 (Certara, L.P. 2012) em computador PC *Windows 7 professional* de configuração Intel(R) Xeon(R) CPU 31270, 3.40 GHz, RAM 12.0 GB, sistema operacional de 64 bits.

Os modelos tridimensionais das estruturas dos compostos foram construídos considerando-se sua forma neutra. A otimização da geometria se deu, sequencialmente, pelos métodos de mecânica molecular MMFF, semi-empírico PM6 e Hartree-Fock 3-31G* no programa Spartan'10. A partir das estruturas otimizadas foram calculados os mapas de potencial eletrostático (carga Mulliken), mapas de orbital molecular, vetor de momento de dipolo, valores de cargas atômicas parciais (carga eletrostática), CLog P (logaritmo do coeficiente de partição calculado), peso molecular, HBA (sítios aceptores de ligação de hidrogênio) e HBD (sítios doadores de ligação de hidrogênio) utilizando o método Hartree-Fock 3-31G*. O programa Sybyl-X foi utilizado na elaboração do mapa de potencial lipofílico (SANT'ANNA, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Compostos sintetizados

Foram sintetizados e caracterizados o piperonal (**1**), oito intermediários sulfonil-hidrazídicos (**4a-i**) e treze análogos sulfonil-hidrazônicos (**5a-i**; **7b-i**). Os dados de rendimento e caracterização são descritos nos itens subsequentes e os espectros de RMN encontram-se no item “anexos”.

5.1.1 Piperonal

Baseando-se na proposta sintética de Aoyama e colaboradores, o piperonal (**1**), intermediário comum à série I, foi sintetizado com sucesso, com rendimento de 75%, apresentando-se como um sólido branco (AOYAMA et al., 1998).

A formação do piperonal foi verificada por meio de RMN ^1H (figura 17). O produto pôde ser identificado especialmente pelo aparecimento do singlete em 9,81 ppm, referente ao hidrogênio em C10, que encontra-se em campo mais baixo em relação ao material de partida, uma vez que a carga sobre a carbonila está mais polarizada que no álcool. Ademais, há diminuição da integral, indicando que há um próton e não mais os dois iniciais.

Figura 17. Espectro de RMN ^1H do piperonal.

O aldeído piperonílico foi obtido a partir de uma metodologia clássica de oxidação alílica descrita por Baal e colaboradores (1948), em que os autores oxidam retineno ao seu respectivo aldeído utilizando como agente oxidante o dióxido de manganês (MnO_2).

Empregou-se o MnO_2 como agente oxidante devido a sua seletividade para álcoois alílicos, reduzindo-os a aldeído e não a ácido carboxílico. Tal seletividade deve-se ao fato de que a ressonância estabiliza o intermediário radicalar originado durante o processo de oxidação, conforme ilustra a figura 18 (GRITTER; DUPRE; WALLACE, 1964).

Figura 18. Mecanismo de oxidação alílica com MnO_2 .

O oxigênio da hidroxila possui um par de elétrons por meio do qual ocorre sua ligação com o manganês (Mn), formando um éster manganato. Em seguida, Mn (IV) recebe um elétron, reduzindo a Mn (III), ao mesmo tempo em que um hidrogênio é transferido do álcool para um oxigênio do oxidante. O produto tem um elétron desemparelhado no álcool, sendo um radical estabilizado por ressonância. A estabilidade do intermediário radicalar aumenta a velocidade desta etapa da reação. A seletividade ocorre porque o intermediário radicalar análogo na oxidação de um álcool “ordinário” é menos estável e é formado mais lentamente (LOUDON, 2009).

Na etapa final, Mn (III) é reduzido a Mn (II), mais estável, e uma forte dupla ligação carbono-oxigênio é formada para dar o produto aldeídico, o qual é lavado da superfície do oxidante pelo solvente.

A reação deve ocorrer sob condições anidras, uma vez que a água compete com o álcool pelos sítios no MnO₂. Vale ressaltar que o oxidante é insolúvel nos solventes utilizados na reação.

5.2 Intermediários sulfonil-hidrazídicos

Os intermediários sulfonil-hidrazídicos (**4a-i**) foram obtidos, em sua maioria, como sólidos brancos e com rendimentos que variaram entre 69 e 96%, dependendo do substituinte presente no anel aromático (tabela 5).

Tabela 5. Resultados obtidos na síntese dos intermediários sulfonil-hidrazídicos.

Composto	R	% η	Faixa de fusão (experimental) (°C)	Faixa de fusão (literatura) (°C)	Aspecto físico
4a	-H	90	102-104	102-104 ¹	sólido branco
4b	-CH ₃	74	107-109	108-110 ¹	sólido branco
4c	-F	81	88-89	90-92 ²	sólido branco
4d	-Cl	94	110-112	115-116 ³	sólido branco
4e	-NO ₂	83	144-145	150-152 ⁴	sólido amarelo
4f	- <i>tert</i> -butil	77	92-94	72-75 ⁵	sólido branco
4g	-OCH ₃	84	101-103	108-110 ⁶	sólido branco
4i	-NHCOCH ₃	69	177 ^d	181-182 ¹	sólido branco

d = decomposição

¹SAFAEI-GHOMI, 2007

²ABERNETHY et al., 1962

³HOUSE; GAA; VANDERVEER, 1983

⁴DAVIES; STORRIE; TUCKER, 1931

⁵LUZINA; POPOV, 2013

⁶POSHKUS; HERWEH; MAGNOTTA, 1963

A formação dos intermediários sulfonil-hidrazídicos foi observada pelo sinal referente aos hidrogênios ligados ao nitrogênio, que pode, eventualmente, apresentar-se como um sinal largo de baixa intensidade em campo alto, e por um discreto deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático para campo mais alto em comparação ao material de partida (figura 19). A formação das sulfonil-hidrazidas foi também corroborada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD).

Figura 19. Comparativo dos deslocamentos dos sinais de RMN ^1H do anel aromático do cloreto de sulfonila e sulfonil-hidrazida. **A.** cloreto de benzeno-sulfonila. **B.** benzenosulfonil-hidrazida.

A reação para obtenção dos intermediários sulfonil-hidrazídicos se deu por um mecanismo simples de substituição nucleofílica, com formação de ácido clorídrico como subproduto (figura 20). O excesso de hidrazina é utilizado para remover o ácido, evitando a protonação do produto, para que o mesmo possa ser purificado por extração com solvente orgânico (CLAYDEN et al., 2001; FRIEDMAN; LITTLE; REICHLE, 1960).

Figura 20. Mecanismo de substituição nucleofílica para formação dos intermediários sulfonil-hidrazídicos.

A adição gradual do cloreto de sulfonila à hidrazina é de suma importância para a minimização da formação de subproduto, uma vez que a hidrazina pode ligar-se a duas moléculas de cloreto de sulfonila, formando um dímero. O subproduto formado não pode ser removido por meio de metodologias de extração, tornando necessário o emprego da técnica de cromatografia de coluna para purificação.

5.1.3 Análogos sulfonil-hidrazônicos

A síntese de treze análogos sulfonil-hidrazônicos (**5a-i** e **7b-i**) foi bem-sucedida, com rendimentos que variaram de acordo com o substituinte (23-85%). Os

produtos se apresentaram como sólidos brancos ou amarelos de diferentes tonalidades (tabela 6).

Tabela 6. Resultados obtidos na síntese dos análogos sulfonil-hidrazônicos.

Composto	% η^*	% η global*	Aspecto físico	Faixa de Fusão (°C)	Faixa de Fusão [†] (°C)	Análise elementar		
						Teórico	Amostra	Desvio
5a	95	85	Sólido amarelo	185-186	-	C = 55,25 H = 3,97 N = 9,21	C = 55,03 H = 3,82 N = 9,15	C = 0,22 H = 0,15 N = 0,06
5b	77	57	Sólido amarelo	136-137	143-145 ¹	C = 56,59 H = 4,43 N = 8,80	C = 56,61 H = 4,56 N = 8,69	C = 0,02 H = 0,13 N = 0,11
5c	49	40	Sólido branco	142-143	-	C = 52,17 H = 3,44 N = 8,69	C = 52,62 H = 3,67 N = 8,65	C = 0,45 H = 0,23 N = 0,04
5e	53	44	Sólido amarelo	189-190	189-190 ^{d2}	C = 48,14 H = 3,17 N = 12,03	C = 48,07 H = 3,27 N = 12,05	C = 0,07 H = 0,1 N = 0,02
5f	65	50	Sólido branco	133-134	-	C = 59,98 H = 5,59 N = 7,77	C = 60,15 H = 5,73 N = 7,77	C = 0,17 H = 0,14 N = 0
5g	28	23	Sólido branco	122-124	-	C = 53,88 H = 4,22 N = 8,38	C = 54,36 H = 4,46 N = 8,28	C = 0,48 H = 0,24 N = 0,10
5i	36	25	Sólido branco	n.d.	-	C = 53,18 H = 4,18 N = 11,63	C = 52,68 H = 4,31 N = 11,50	C = 0,50 H = 0,13 N = 0,13
7b	82	61	Sólido amarelo	100-101	-	C = 56,24 H = 5,03 N = 8,74	C = 55,87 H = 5,21 N = 8,43	C = 0,37 H = 0,18 N = 0,31
7c	79	64	Sólido amarelo	121-122	-	C = 51,85 H = 4,04 N = 8,64	C = 52,32 H = 4,28 N = 8,33	C = 0,47 H = 0,24 N = 0,31
7d	64	60	Sólido branco	117-119	-	C = 49,34 H = 3,85 N = 8,22	C = 49,23 H = 3,83 N = 8,14	C = 0,11 N = 0,02 H = 0,08
7f	86	66	Sólido amarelo	74-76	-	C = 59,65 H = 6,12 N = 7,73	C = 59,34 H = 6,24 N = 7,48	C = 0,31 H = 0,12 N = 0,25
7g	65	55	Sólido branco	139-141	-	C = 53,56 H = 4,79 N = 8,33	C = 53,87 H = 4,94 N = 8,33	C = 0,31 H = 0,15 N = 0
7i	46	32	Sólido branco	173-175	-	C = 52,88 H = 4,72 N = 11,56	C = 52,80 H = 4,87 N = 11,37	C = 0,08 H = 0,15 N = 0,19

n.d. = não determinado (amostra insuficiente)

*Rendimento obtido na etapa *iii* (obtenção das sulfonil-hidrazonas)

**Rendimento = (rendimento etapa *ii* x rendimento etapa *iii*) / 100. Onde: etapa *ii* = obtenção das sulfonil-hidrazidas; etapa *iii* = obtenção das sulfonil-hidrazonas.

[†]Dados extraídos da literatura

d = decomposição

¹CUEVAS-YÁÑEZ et al., 2004

²DAVIES; STORRIE; TUCKER, 1931

A figura 21 apresenta o espectro de RMN ¹H do composto **5a**, tomado como exemplo para visualização geral dos sinais apresentados pelos análogos sulfonil-

hidrazônicos da série I. A formação do análogo é verificada por um singlete em 7,82 ppm referente ao hidrogênio do carbono da imina (10-CH). Sinais característicos da molécula são observados em 6,04 ppm, que corresponde aos hidrogênios do metileno da porção benzodioxólica (8-CH₂), e em 11,31 ppm, que se refere ao hidrogênio do nitrogênio hidrazônico (12-NH). Ademais, na faixa de 6,90 a 7,09 ppm, observam-se os sinais dos hidrogênios do anel aromático benzodioxólico (3, 4, 6-ArH), enquanto entre 7,57 e 7,89 ppm verificam-se os hidrogênios do anel aromático diretamente ligado ao grupo sulfonila (15, 16, 17, 18, 19-ArH).

Figura 21. Espectro de RMN ¹H indicando os principais sinais para a identificação dos análogos sulfonil-hidrazônicos da série I.

Os análogos pertencentes à série II diferenciam-se pela ausência do sinal em 6,04 ppm referente aos hidrogênios do metileno da porção benzodioxólica (8-CH) e a presença do sinal em 3,78 ppm, que corresponde aos hidrogênios da metoxila do grupo metilcatecol (20-CH₃), e de um singlete largo em 9,49 ppm, atribuído ao

hidrogênio da hidroxila deste mesmo grupo (21-OH), conforme pode ser verificado na figura 22, a seguir, que toma como exemplo o espectro do composto **7d**.

Figura 22. Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para a identificação dos análogos sulfonil-hidrazônicos da série II.

A faixa de fusão para os produtos foi estreita (tabela 7), indicando provável pureza dos compostos, que foi corroborada pela análise elementar. Em relação aos dados obtidos na análise elementar, os mesmos estão próximos do valor teórico esperado, uma vez que considera-se aceitável um desvio de 0,5. Tomados em conjunto, os resultados obtidos mostram que os análogos estão puros e aptos a serem avaliados quanto a sua atividade citotóxica.

A obtenção da sulfonil-hidrazona se dá, basicamente, pela formação da dupla ligação entre o nitrogênio da sulfonil-hidrazida com o carbono terminal do piperonal ou vanilina, caracterizando uma imina. Iminas podem ser obtidas pela reação de uma amina com um aldeído ou cetona sob condições apropriadas. Neste sentido, é preciso catálise ácida para a formação da imina. Sem um catalisador ácido, a reação é muito lenta, uma vez que este é necessário para a eliminação de água nas etapas tardias da reação (figura 23). É importante observar, porém, que o uso de ácido muito forte pode protonar completamente a amina, comprometendo sua nucleofilicidade, o que justifica o uso do HCl em solução a 5%, que pode ser substituído pelo uso de solvente prótico (MCMURRY, 2011).

Figura 23. Mecanismo de formação de imina por adição à carbonila com perda de oxigênio.

Embora iminas sejam facilmente hidrolisadas, o nitrogênio acompanhado de um grupo eletronegativo tende a ser mais estável, uma vez que este pode participar da conjugação da dupla ligação da imina. Esta conjugação diminui a carga δ^+ no carbono da dupla ligação imina e aumenta a energia do LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), tornando-a menos susceptível a um ataque nucleofílico. Desta forma, oximas, semicarbazonas e hidrazonas requerem catálise ácida ou básica para serem hidrolisadas (CLAYDEN et al., 2001).

5.2 Atividade biológica *in vitro*

Como citado anteriormente, a avaliação da citotoxicidade pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), ou sal de tetrazólio, baseia-

se na avaliação da atividade metabólica da célula, a partir da redução deste sal pelo sistema enzimático mitocondrial, que converte o MTT em formazan. Este produto final, de cor azul escura, pode ser quantificado por método espectrofotométrico, após lise celular induzida e solubilização em solvente adequado, como o DMSO. Desta forma, é possível correlacionar a quantidade de formazan produzida e a concentração de células viáveis, ou seja, quanto maior for a concentração de células vivas, maior será a taxa de biotransformação do MTT e, conseqüentemente, a concentração do produto reduzido (AZIZ, 2006).

Tendo isto em vista, a determinação da atividade citotóxica dos compostos pôde ser verificada a partir do seu efeito sobre a viabilidade das células tratadas quando comparadas ao grupo controle (não tratado).

Os treze análogos sulfonil-hidrazônicos foram submetidos à triagem inicial para determinação da atividade citotóxica em linhagens de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), a fim de se verificar seu potencial citotóxico. O efeito citotóxico dos compostos foi também verificado em fibroblastos (3T3), linhagem não tumorigênica utilizada para verificação da seletividade dos análogos em células neoplásicas em relação às células normais.

Dos treze análogos sulfonil-hidrazônicos testados, dois apresentaram atividade biológica e tiveram determinada sua IC₅₀. Foram considerados ativos os compostos que apresentaram resultados de viabilidade celular inferiores a 50% na concentração de 200 µM na etapa de triagem.

Tanto o protótipo RPF101 como a capsaicina apresentaram atividade superior aos análogos sulfonil-hidrazônicos nas duas linhagens tumorais (tabela 7). Enquanto os grupos amida e sulfonamida apresentam caráter ligeiramente ácido, o grupo sulfonil-hidrazônico apresenta caráter anfotérico. Além disso, observa-se que as sulfonil-hidrazonas apresentam um nitrogênio a mais na cadeia em relação à sulfonamida, o que implica em uma maior distância entre os anéis metilcatecol/benzodioxol e aromático *p*-substituído, além de um novo sítio aceitor de ligação de hidrogênio. Há, ainda, uma dupla ligação no nitrogênio da sulfonil-hidrazona, que confere maior rigidez à molécula, maior extensão da conjugação,

além de alterar a planaridade da molécula. Estas modificações das propriedades da molécula podem influenciar na interação com o receptor e, conseqüentemente, na atividade biológica.

Tabela 7. Inibição do crescimento celular (IC₅₀ em µM) nas linhagens tumorais e fibroblasto.

Composto	Estrutura	Linhagens – IC ₅₀ em µM			Índice de seletividade*	
		MCF-7	MDA-MB-231	3T3	MCF-7	MDA-MB-231
RPF101		32,0	14,2	> 200	> 6,25	> 14,08
RPF105¹		> 200	75,0	> 200	-	> 2,67
capsaicina		53,0	21,7	> 200	> 3,77	> 9,22
5f (RPF906)		142,4	104,6	165,9	1,16	1,59
7f (RPF956)		144,6	173,2	108,42	0,75	0,63

*Índice de seletividade = $\frac{IC_{50} (\mu M) \text{ linhagem não-tumorigênica}}{IC_{50} (\mu M) \text{ linhagem tumoral}}$

¹TAVARES, 2014

Observaram-se dois compostos ativos em MDA-MB-231, a saber, os compostos **5f** (RPF906) e **7f** (RPF956) os quais apresentaram IC₅₀ de 104,6 e 173,2 µM, respectivamente. A atividade nesta linhagem específica é particularmente interessante, uma vez que trata-se de uma linhagem tripla negativa, ou seja, não apresenta receptores de estrogênio, progesterona e de fator de crescimento transdérnico (HER-2). Isto implica no fato de que este tipo de tumor não responde à terapia hormonal ou a fármacos que atuam sobre receptores HER-2. Neste sentido, o desenvolvimento de compostos ativos nesta linhagem ganha destaque, uma vez que a ausência desses receptores limita as opções terapêuticas aplicáveis neste tipo de tratamento. Adicionalmente, é possível inferir que o mecanismo pelo qual estes compostos atuam, não envolvem receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (BADVE et al., 2011).

RPF906 e RPF956 também apresentaram atividade em linhagem MCF-7 (IC_{50} = 142,4 e 144,6 μ M, respectivamente), linhagem tumoral de grande incidência em pacientes do sexo feminino. Observa-se que os compostos sulfonil-hidrazônicos apresentam valores de IC_{50} bastante próximos no que se refere a esta linhagem, o que não acontece em MDA-MB-231. Tal fato pode ser um indício de que a presença do grupo benzodioxol em detrimento do grupo metilcatecol é mais importante para a atividade nesta linhagem do que em MCF-7. Comparando-se os resultados encontrados para as duas linhagens tumorais, nota-se, ainda, que ambos os compostos apresentam atividade superior em MDA-MB-231. Este dado pode ser um indício quanto ao mecanismo de ação deste composto, uma vez que a linhagem MCF-7 apresenta deficiência de caspase-3. Isto implica na resistência desta linhagem frente a compostos que atuam induzindo, de forma direta ou indireta, a atividade desta caspase. Logo, uma menor atividade nesta linhagem quando comparada à MDA-MB-231 pode indicar que o mecanismo de ação dos compostos envolve modulação da atividade de caspase 3. Porém, outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese (ZHANG et al., 2013).

Interessante observar que o análogo sulfonamídico RPF105, contendo o substituinte *terc*-butil, apresentou atividade inferior em linhagem MCF-7, mostrando que, dependendo do substituinte no anel aromático, o grupo sulfonil-hidrazona pode ser mais favorável à atividade biológica em comparação a outros isósteros. Isto reforça o fato de que estudos de REA devem levar em conta todos os fatores estruturais das moléculas avaliadas, e não uma modificação molecular isoladamente (BARREIRO; FRAGA, 2008; LEVOIN et al., 2015; LOWINGER et al., 2002; PATRICK, 2013).

Tanto RPF906 como RPF956 apresentaram citotoxicidade em fibroblastos 3T3, mostrando que estes compostos não são seletivos para linhagens tumorais. A partir dos dados de IC_{50} nesta linhagem, é possível estabelecer o índice de seletividade (IS). O IS é a relação entre IC_{50} em linhagem tumoral e linhagem não tumorigênica. Este valor pode ser utilizado para estimar a segurança do composto, de modo que quanto maior o valor deste índice (acima de 1), maior a diferença entre a IC_{50} em células tumorais e células não tumorigênicas e, portanto, maior seletividade do composto para uso nas células neoplásicas. É considerado significativo para

compostos antitumorais um IS igual ou superior a 2, que indica que o composto em análise pode ser aplicado no dobro da concentração sem apresentar citotoxicidade na célula não tumorigênica (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). Neste sentido, os análogos sulfonil-hidrazônicos não foram considerados seguros para as células não-tumorigênicas, uma vez que apresentaram índices de seletividade inferiores a 2. Vale ressaltar que o composto 906, mais ativo, apresentou índice de seletividade nos patamares de 1,25 e 1,7, enquanto RPF956 apresentou IS inferiores a um.

Em relação à estrutura dos compostos, os resultados mostram que os compostos ativos apresentam substituintes volumosos e de caráter hidrofóbico. Compostos não substituídos, com substituintes hidrofílicos ou aceptores de elétrons ou com substituintes que não contribuem de maneira significativa para a lipofilicidade não apresentaram atividade. Desta forma, é possível que uma melhora da atividade biológica esteja relacionada com a introdução de grupos hidrofóbicos e volumosos ao anel aromático (figura 24).

Figura 24. Relação entre estrutura química e atividade biológica dos análogos sulfonil-hidrazônicos.

Os compostos RPF906 e RPF956 apresentam o substituinte do anel aromático em comum (*tert*-butil). Em linhagem MDA-MB-231, é possível verificar que os compostos RPF906 e RPF956 apresentaram IC₅₀ nos valores de 104,6 e 173,2 µM, respectivamente, ou seja, o composto benzodioxólico apresentou atividade superior em relação ao composto metilcatecólico, sugerindo que a presença do grupo benzodioxol em detrimento do grupo metilcatecol favorece a atividade antitumoral.

5.2.1 Estudos mecanísticos

Estudos complementares foram realizados a fim de se obter informações a respeito do mecanismo de ação dos compostos ativos. Para tanto, o composto

RPF906 (104,6 μ M) foi empregado em tais testes, em linhagem MDA-MB-231, uma vez que este foi o composto mais ativo, apresentando atividade superior nesta linhagem em relação à MCF-7. Ademais, MDA-MB-231 é uma linhagem tripla negativa e, portanto, muito agressiva e de grande interesse no desenvolvimento de compostos contra tumores de mama (BADVE et al., 2011).

A indução da apoptose foi verificada por coloração dupla com anexina e iodeto de propídio (PI). A anexina cora a partir da externalização da fosfatidilserina, um fosfolípido presente na face interna da membrana celular. Durante a apoptose, este fosfolípido é externalizado, de modo que a célula possa ser reconhecida por macrófagos e fagocitada. A anexina possui a capacidade de se ligar à fosfatidilserina externalizada, permitindo observar a ocorrência de apoptose. O iodeto de propídio, por sua vez, não possui capacidade de penetrar uma membrana celular íntegra. Desta forma, a marcação com PI permite a identificação da população que apresentou perda da integridade da membrana plasmática, que indicaria dano ou morte celular. Portanto, células coradas em verde (anexina) foram consideradas células apoptóticas em estado inicial (apoptose precoce), aquelas coradas em vermelho (PI) foram consideradas células necróticas, e células viáveis não apresentam marcação (KOOPMAN et al., 1994).

A partir da leitura da fluorescência em citômetro de fluxo e plotagem dos dados no software FlowJo, foi então possível quantificar células em apoptose. A figura 25 mostra que o tratamento com RPF906 aumentou em três vezes o percentual de células apoptóticas, evidenciando sua propriedade de induzir este fenômeno.

Figura 25. Avaliação do efeito apoptótico do RPF906 utilizando coloração dupla de anexina e PI. **(A)** O gráfico de pontos mostra a população de células em apoptose após 12 h de tratamento. Q1 = células necróticas; Q2 = células em apoptose tardia; Q3 = células em apoptose precoce; Q4 = células viáveis. **(B)** O Gráfico de barras ilustra o aumento do número de células em apoptose após o tratamento com RPF906 quando comparado com o grupo controle (não tratado).

Coloração por Hoechst foi utilizada a fim de se visualizar o núcleo celular. Hoechst é um corante fluorescente que cora o DNA por meio de sua intercalação com o mesmo e permite a visualização do núcleo, sendo possível observar picnose, evento celular característico da apoptose, que consiste na condensação da cromatina. Na figura 26, a seguir, é possível observar uma menor quantidade de células e um núcleo reduzido no grupo tratado quando comparado com o controle, indicando picnose nuclear e caracterizando morte celular por apoptose (GUAN et al., 2007; HUANG et al., 2015).

Figura 26. Avaliação das mudanças morfológicas da apoptose por coloração com Hoechst. **(A)** Grupo controle (não tratado) – aumento 10x. **(B)** Grupo tratado com RPF906 – aumento 10x. **(C)** Grupo controle (não tratado) – aumento 20x. **(D)** Grupo tratado com RPF906 – aumento 20x. As setas brancas indicam o núcleo, sendo possível observar picnose nuclear provocada por RPF906 em MDA-MB-231.

Procedeu-se com análise do ciclo celular a fim de verificar alterações no ciclo celular induzidas por RPF906. A análise do ciclo celular mostrou que RPF906 causou um aumento na porcentagem de células na fase G0/G1 (+8,5%) (figura 27). Isto caracteriza interrupção do ciclo celular em tal fase, o que implica no impedimento da progressão celular mitótica, causando redução do número de células na fase S.

Isto pode indicar que a molécula atuaria como um composto ciclo celular não-específico, porém outros estudos são necessários. Compostos ciclo celular não-específicos, atuam tanto em células que estão em divisão quanto células latentes, ou seja, em fase G0. Agentes alquilantes, por exemplo, como beta-haloalquilaminas, atuam diretamente sobre o DNA da célula tumoral latente ou em proliferação, comprometendo as vias metabólicas e síntese proteica. Os ciclo celular específicos, por sua vez, atuam nas células cancerígenas que estão em processo de divisão, ou seja, fase M (mitose). Exemplo de fármacos ciclo específicos são os agentes

antimitóticos, como paclitaxel e vimblastina, que atuam sobre microtúbulos (HANAHAAN; WEINBERG, 2011; HARVEY, 2008; LEMKE; WILLIAMS, 2008).

Figura 27. Efeito do RPF906 sobre a progressão do ciclo celular de linhagem MDA-MB-231. **(A)** As fases do ciclo celular são mostradas em histogramas representativos obtidos a partir da citometria de fluxo. **(B)** O gráfico de barras ilustra o percentual de células em cada fase do ciclo celular, verificando-se que RPF906 induz interrupção do ciclo celular na fase G0/G1.

5.3 Modelagem molecular

A capsaicina, o protótipo RPF101 e o análogo sulfonil-hidrazônico mais ativo, RPF906, foram submetidos aos estudos de modelagem molecular para determinação de propriedades físico-químicas e posterior correlação com a atividade biológica. Após a construção e otimização do modelo tridimensional dos compostos,

foram calculadas propriedades eletrônicas (mapa de potencial eletrostático, cargas atômicas parciais, mapas dos orbitais moleculares HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia) e LUMO (orbital molecular não ocupado de menor energia), e vetor de momento dipolo) e hidrofóbicas (mapa de potencial lipofílico, logaritmo do coeficiente de partição calculado – CLog P).

Estudos de modelagem molecular associados a dados de atividade biológica são de grande valia na elucidação da relação estrutura-atividade (REA). Características físico-químicas de uma molécula determinam seus perfis farmacocinético e farmacodinâmico. Tais propriedades, por sua vez, estão relacionadas com a estrutura química de um composto. Logo, estrutura e propriedades de uma molécula podem explicar sua interação com um determinado alvo e podem ser correlacionadas com sua atividade biológica. Neste sentido, modificações moleculares podem resultar na alteração de propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, na atividade biológica, e a modelagem molecular, por meio da determinação de propriedades, auxilia nesta discussão (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010)

O mapa de potencial eletrostático (MPE) (figura 28) ilustra a distribuição eletrônica das moléculas a partir da coloração apresentada, de modo que as regiões de coloração vermelho intenso (-265,702 kJ/mol) possuem maior distribuição de densidade eletrônica, enquanto regiões de coloração azul escuro (265,702 kJ/mol) possuem menor distribuição de densidade eletrônica. Desta forma, é possível verificar que o grupo metilcatecol da capsaicina apresenta uma região de densidade eletrônica reduzida ao redor do hidrogênio da hidroxila fenólica em comparação com o composto RPF101 e seu análogo sulfonil-hidrazônico, devido ao grupo metilenodioxí. A carga atômica parcial (carga eletrostática = +0,441 eV) encontrada neste hidrogênio corrobora o observado no MPE. Este dado, associado ao fato do composto RPF906 ser mais ativo que o composto RPF956, sugere que o aumento da densidade eletrônica desta região pode favorecer a atividade biológica, reforçando a REA proposta anteriormente.

Figura 28. Representação de propriedades eletrônicas da capsaicina, RPF101 e RPF906. **(A)** Mapas de potencial eletrostático. As regiões de coloração vermelho intenso (-265 kJ/mol) possuem maior distribuição de densidade eletrônica. As regiões de coloração azul escuro (265 kJ/mol) possuem menor distribuição de densidade eletrônica. As estruturas são apresentadas em duas poses. **(B)** Mapas de orbital molecular (HOMO). Capsaicina = -186,56 kcal/mol; RPF101 = -194,17 kcal/mol; RPF906 = -195,32 kcal/mol. **(C)** Mapas de orbital molecular (LUMO). Capsaicina = 86,02 kcal/mol; RPF101 = 58,57 kcal/mol; RPF906 = 54,88 kcal/mol. **(D)** Vetor de momento dipolo. As setas amarelas indicam o vetor de momento dipolo (μ). Capsaicina = 1,87 Debye; RPF101 = 7,51 Debye; RPF906 = 7,69 Debye.

As substituições bioisostéricas na região B, mantiveram a elevada densidade eletrônica nesta região nos três compostos. O caráter positivo observado no carbono carbonílico da capsaicina (+0,871 eV) é mantido em RPF101 (+1,153 eV) e RPF906 (+1,209 eV). O valor superior de carga atômica parcial em RPF906 pode ser justificado pela presença de um átomo de nitrogênio a mais no grupo sulfonil-hidrazona em comparação com o protótipo. Ademais, tal nitrogênio representa um novo sítio aceptor de ligação de hidrogênio (HBA), que pode influenciar na interação da molécula com seu alvo. Na região lipofílica “C”, observa-se que os compostos apresentam perfil de densidade eletrônica semelhante.

Os valores de HOMO não apresentaram diferenças significativas. Em contrapartida, os valores de LUMO da capsaicina foram superiores aos dos compostos benzodioxólicos. Adicionalmente, o mapa de distribuição de LUMO encontra-se na região “A” para a capsaicina, enquanto nos demais compostos, ele é visto na região “C”. Isto implica no fato de que os derivados benzodioxólicos teriam uma propriedade elétron-aceptora mais acentuada em relação à capsaicina e que esta propriedade predomina em regiões distintas da molécula quando comparados capsaicina e os compostos benzodioxólicos. Observa-se, ainda, que há uma maior extensão do mapa de distribuição de HOMO em direção ao grupo sulfonil-hidrazona no composto RPF906, bem como uma maior extensão do mapa de LUMO em direção ao grupo benzodioxol. Tais diferenças em relação aos demais compostos podem justificar a atividade inferior do RPF906 em comparação com a capsaicina e RPF101.

O valor encontrado de vetor de momento dipolo (μ) apresentou-se consideravelmente distinto entre a capsaicina e os compostos benzodioxólicos. O vetor de momento dipolo consiste no produto da soma total de cargas positivas ou negativas e a distância entre seus centroides. Capsaicina apresenta valor $\mu = 1,87$ Debye, enquanto RPF101 e RPF906 apresentam valores semelhantes entre si, de 7,51 e 7,69 μ , respectivamente. O momento dipolo também fornece informações a respeito da geometria da molécula. A capsaicina possui um menor valor μ em comparação A RPF101 e RPF906, e apresenta geometria molecular mais linear que os derivados benzodioxólicos, de cadeia mais curta e mais arqueada (SÁ JUNIOR et al., 2013).

A lipofilicidade foi ilustrada por meio do mapa de potencial lipofílico (MPL) (figura 29), onde a coloração azul representaria regiões de caráter hidrofílico e a cor marrom escura representa regiões de caráter hidrofóbico. É possível verificar que RPF906 apresenta um perfil mais lipofílico que seu protótipo e a capsaicina. Observa-se uma coloração azul clara ou verde clara na região “B” dos compostos, caracterizando uma região de maior hidrofilicidade devido aos grupos amida, sulfonamida e sulfonil-hidrazona. As cadeias laterais lipofílicas apresentam-se na cor marrom, observando-se que há uma maior distribuição da lipofilicidade na capsaicina e RPF906.

Figura 29. Representação dos mapas de potencial lipofílico da capsaicina, RPF101 e RPF906. O MPL de cada composto é apresentado em duas poses, dentro de uma escala entre 0,01 e 0,1.

O mapa de potencial lipofílico é corroborado pelos valores de CLog P (tabela 8). RPF906 apresenta o maior valor, seguido da capsaicina e RPF101. Estes valores sugerem que um aumento da atividade pode estar relacionado com a diminuição da lipofilicidade, uma vez que menores valores de IC₅₀ foram encontrados nos compostos menos lipofílicos. Ademais, RPF906 apresenta alta lipofilicidade (CLog P = 4,45), fato que pode dificultar sua solubilidade em meio aquoso, o que também pode justificar uma atividade reduzida em comparação ao protótipo.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos calculados para capsaicina, RPF101 e RPF906.

	PM	CLog P	HBA	HBD
capsaicina	305,42	3,66	3	2
RPF101	291,33	2,29	4	1
RPF906	360,43	4,45	5	1

Considerando que o análogo sulfonil-hidrazônico **5a** (composto da série piperonil sem substituinte no anel aromático) não apresentou atividade e que o análogo sulfonamídico RPF105 (que apresenta o substituinte *terc*-butil) apresenta em MCF-7 atividade inferior ao RPF906 e RPF956, é possível inferir a influência do grupo sulfonil-hidrazônico na atividade biológica depende de outras características químicas da molécula, e que o grupo *terc*-butil, por seu caráter lipofílico e volumoso, pode ser um fator importante na atividade biológica, haja vista que os compostos ativos RPF906 e RPF956 foram os únicos compostos que apresentaram atividade.

Os parâmetros calculados apresentados na tabela 8 permitem estimar a biodisponibilidade oral dos compostos com base na Regra dos Cinco de Lipinski (Ro5). Lipinski, utilizou um banco de dados de 2500 fármacos de administração oral para determinar parâmetros que pudessem ser utilizados na estimativa do potencial de permeabilidade e solubilidade de um fármaco no seu processo de desenvolvimento. Assim, foi criada a “Regra dos cinco de Lipinski” – Ro5 -, que é definida como um conjunto de parâmetros capazes de identificar compostos com problemas de absorção e permeabilidade (LIPINSKI et al., 1997).

Esta regra abrange características físico-químicas como massa molecular, lipofilicidade e sítios doadores e aceptores de ligação hidrogênio, e determina que uma boa absorção e permeação sejam mais comuns quando:

- o peso molecular é menor ou igual a 500 Daltons (Da);
- o CLog P é menor ou igual a 5;
- o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 10;
- o número de grupos doadores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 5.

É possível verificar, portanto, que o composto RPF906 apresenta valores compatíveis com o determinado por Lipinski, com probabilidade de apresentar atividade quando administrado por via oral.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho consistiu no planejamento, síntese e avaliação da atividade citotóxica de compostos arilsulfonil-hidrazônicos. Foram sintetizados o piperonal, utilizado na obtenção dos análogos da série I, oito intermediários sulfonil-hidrazídicos, comuns às séries I e II, sete análogos sulfonil-hidrazônicos da série I e seis análogos da série II.

As condições reacionais requeridas foram simples e os produtos obtidos com sucesso, apresentando-se em rendimentos variados. Os processos sintéticos para a obtenção dos compostos têm se mostrado vantajosos pelo fato de que, em alguns casos, é possível obter produtos puros utilizando-se metodologias de filtração, extração e recristalização, eventualmente dispensando-se técnicas mais onerosas e demoradas como cromatografia de coluna.

O rendimento da etapa de oxidação alílica foi bom, 75%. Tanto as sulfonil-hidrazidas como as sulfonil-hidrazonas foram obtidas em rendimentos que variaram de 28 a 95%, de acordo com o substituinte do anel.

Os treze compostos sulfonil-hidrazônicos foram testados quanto a sua atividade citotóxica em linhagens de adenocarcinoma de mama MCF-7 e MDA-MB-231 e fibroblasto 3T3. Os compostos RPF906 (**5f**) (N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-*tert*-butilbenzeno-sulfonil-hidrazona) e RPF956 (**7f**) ((E)-4-*tert*-butil-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona) apresentaram atividade em linhagem MDA-MB-231, com valores de IC₅₀ de 104,6 e 173,2 µM, respectivamente. RPF906 e RPF956 também apresentaram atividade em linhagem MCF-7 (IC₅₀ = 142,4 e 144,6 µM, respectivamente). Entretanto, tal atividade foi inferior a do protótipo RPF101 (IC₅₀ em MDA-MB-231 e MCF-7 = 14,2 e 32,0 µM, respectivamente) e capsaicina (IC₅₀ em MDA-MB-231 e MCF-7 = 21,7 e 53,0 µM, respectivamente). Ademais, ambos, os análogos sulfonil-hidrazônicos mostraram efeito citotóxico em linhagem não tumorigênica (fibroblasto 3T3), indicando que não seriam seletivos para as células tumorais.

O composto mais promissor, RPF906, foi submetido a estudos complementares para elucidação mecanística, através dos quais foi possível observar que o composto induz apoptose, causando externalização de fosfatidilserina, picnose e interrupção do ciclo celular na fase G0/G1.

Os resultados obtidos sugerem que o bioisótero sulfonamida e a presença do grupo benzodioxol em detrimento do grupo metilcatecol favorecem a atividade antitumoral. Os achados dos estudos de modelagem molecular sugerem uma correlação entre atividade biológica e lipofilicidade, tendo em vista que RPF101 apresentou atividade superior, seguido da capsaicina e RPF906, enquanto RPF906 apresentou maior lipofilicidade, seguido da capsaicina e RPF101.

As sulfonil-hidrazonas apresentaram efeito biológico e mostram-se promissoras no desenvolvimento de compostos com potencial antitumoral. Novas modificações moleculares devem ser planejadas com o intuito de otimizar a atividade e a seletividade destes compostos e fornecer novas moléculas com propriedades antitumorais.

Tendo em vista os resultados obtidos, propõe-se ampliar a série de compostos benzodioxólicos, a fim de se identificar novos análogos mais ativos e menos tóxicos. Para tanto, sugere-se:

- Obter novos compostos com outros grupos substituintes em diferentes posições no anel aromático;
- Sintetizar análogos sulfonil-hidrazônicos substituindo o anel aromático na região "C" por cadeias alquílicas de diferentes tamanhos;
- Propor novos bioisóteros da sulfonil-hidrazona, como por exemplo, acil-hidrazonas.

8 REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, J. L. et al. The use of arenesulfonhydrazides as amino-containing bases in papain- and ficin-catalyzed reactions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 2528–2534, 1962.
- ACHARYA, C. et al. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 1, p. 10–22, 2011.
- AMARAL, F. M. M. et al. Revisão Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 696–720, 2006.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama BRCA Genes Contribution in the hereditary predisposition for breast cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325–330, 2005.
- AOYAMA, T. et al. Chemical Manganese Dioxide (CMD), an efficient activated manganese dioxide. Application to oxidation of benzylic and allylic alcohols. **Synlett**, v. 1998, n. 01, p. 35–36, 1998.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. DA. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.
- ASIRI, A. M.; ZAYED, M. E. M.; NG, S. W. (E)-N'-(2-Thienyl-methyl-idene)-p-toluene-sulfono-hydrazide. **Acta Crystallographica**, v. 66, n. Pt 9, p. o2360, 2010.
- AZIZ, D. M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 1-2, p. 1–8, 2006.
- BADVE, S. et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Modern Pathology**, v. 24, n. 2, p. 157–167, 2011.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1172–1180, 2002.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal - as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BASELGA, J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. **The Oncologist**, v. 16, p. 12–19, 2011.
- BERGANTINI, A. P. F.; SOUZA, A. M.; FETT-CONTE, A. C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 2, p. 120–125, 2005.
- BLACK, W. C. et al. Trifluoroethylamines as amide isosteres in inhibitors of cathepsin K. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 21, p. 4741–4, 2005.

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

BROWN, K. C. et al. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10243, 2010.

BURGER, A. **Medicinal Chemistry**. 3. ed. New York: Wiley-Interscience, 1970.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428–438, 2003.

CHALHOUB, N.; BAKER, S. J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 4, p. 127–150, 2009.

CHANG, H. C. et al. Capsaicin may induce breast cancer cell death through apoptosis-inducing factor involving mitochondrial dysfunction. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1657–65, 2011.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2001.

CRAIG, P. N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 680–684, 1971.

CROWN, J.; O'LEARY, M.; OOI, W.-S. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. **The Oncologist**, v. 9, n. 2, p. 24–32, jan. 2004.

CUEVAS-YAÑEZ, E. et al. Copper carbenoid mediated N-alkylation of imidazoles and its use in a novel synthesis of bifonazole. **Tetrahedron**, v. 60, n. 42, p. 9391–9396, 2004.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2014.

DAVIES, W.; STORRIE, F. R.; TUCKER, S. H. The reactions of nitrosulphonyl chlorides. Part II. The separation of nitrosulphonyl chlorides by means of hydrazine hydrate. **Journal of Chemical Society**, p. 624–629, 1931.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ERLENMEYER, H.; BERGER, E. Studies on the significance of structure of antigens for the production and the specificity of antibodies. **Biochemical Zoology**, v. 252, p. 22–36, 1932.

FRIEDMAN, H. Influence of isosteric replacements upon biological activity. **Symposium on Chemical-Biological correlation**, v. 206, p. 295–358, 1951.

FRIEDMAN, L.; LITTLE, R. L.; REICHLE, W. R. p-toluenesulfonylhydrazide. **Organic Syntheses**, v. 40, p. 93, 1960.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798–811, 2006.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1237–1243, 2007.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. February, p. 3–12, 2010.

GRIMM, H. G. On construction and sizes of non-metallic hydrides. **Zeitschrift fuer Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie**, v. 31, p. 474–480, 1925.

GRITTER, R. J.; DUPRE, G. D.; WALLACE, T. J. Oxidation of Benzyl Alcohols with Manganese Dioxide. **Nature**, v. 202, n. 4928, p. 179–181, 1964.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GUAN, Y. et al. Multiple binding modes for dicationic hoechst 33258 to DNA. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 25, p. 7336–7344, 2007.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Revista Genética na Escola**, v. 3, p. 4–7, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894–901, 2008.

HAYAKAWA, M. et al. Synthesis and biological evaluation of sulfonylhydrazone-substituted imidazo[1,2-a]pyridines as novel PI3 kinase p110alpha inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 17, p. 5837–5844, 2007.

HIRSCH, E.; NOVELLI, F. Cancer: Natural-born killers unleashed. **Nature**, v. 510, p. 342–343, 2014.

HOUSE, H. O.; GAA, P. C.; VANDERVEER, D. Perhydroazulenes. 3. Conformations of the 4-Oxoperhydroazulenes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 1661–1670, 1983.

HUANG, G.-M. et al. Gambogic acid induces apoptosis and inhibits colorectal tumor growth via mitochondrial pathways. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 20, p. 6194–6205, 2015.

INCA. **Prevenção e Fatores de Risco**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13>. Acesso em: 20 jun. 2014a.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2014b.

INCA; CEDC. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 2. ed. [s.l.] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. organização Luiz Claudio Santos Thule, 2012.

IP, S. et al. Capsaicin induces apoptosis in SCC-4 human tongue cancer cells through mitochondria- dependent and -independent pathways. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 332–341, 2010.

JENG, P. S.; CHENG, E. H. Cancer therapeutics: Pulling the plug on BCL-XL. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 6, p. 351–352, 2013.

KARAYI, M. K.; MARKHAM, A. F. Molecular biology of prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 7, n. 1, p. 6–20, 2004.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 42–49, 2000.

KOOPMAN, G. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415–1420, 1994.

KUBINYI, H. **Hansch analysis and related approaches**. New York: VCH, 1993.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 3, p. e1675, 2015.

LANGMUIR, I. Isomorphism, isosterism and covalence. **Journal of the American Chemical Society**, v. 41, p. 1543–1559, 1919.

LEACH, A. R. **Molecular modeling - principles and applications**. 2. ed. Edinburgh: Pearson, 2001.

LEMKE, T.; WILLIAMS, D. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. v. 3

LEVOIN, N. et al. A combination of in silico and SAR studies to identify binding hot spots of Bcl-xL inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1747–1757, 2015.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.

LIPINSKI, C. A et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3–25, 1997.

LOH, W.; COSBY, L. A.; SARTORELLI, A. C. Synthesis and antineoplastic activity of phenyl-substituted benzenesulfonylhydrazones of 2-pyridinecarboxyaldehyde 1-oxide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 631–634, 1980.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957–962, 2015.

LOUDON, M. **Organic Chemistry**. 5. ed. Greenwood Volage: Roberts and Company Publishers, 2009.

LOWINGER, T. B. et al. Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 25, p. 2269–2278, 2002.

LUZINA, E. L.; POPOV, A. V. Synthesis of 1-aryloyl(1-arylsulfonyl)-4-bis(trifluoromethyl)alkyl semicarbazides as potential physiologically active compounds. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 148, p. 41–48, 2013.

MACHADO, S. M.; SAWADA, N. O. Avaliação da qualidade de vida de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico adjuvante. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 750–757, 2008.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MATSUO, A. L. et al. A novel melanoma-targeting peptide screened by phage display exhibits antitumor activity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 12, p. 1255–1264, 2010.

MATSUO, A. L. et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, n. 2, p. 449–454, 2011.

MAY, J. A.; SARTORELLI, A. C. Antineoplastic properties of arylsulfonylhydrazones of 3-formylpyridazine 2-oxide and 4-formylpyrimidine 3-oxide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1333–1335, 1978.

MCMURRY, J. E. **Organic Chemistry**. 8. ed. Belmont: Brooks Cole, 2011.

MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2529–2591, 2011.

MONTANARI, C. A. A química medicinal na próxima década. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 134–137, 2000.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001.

NADENDLA, R. R. Molecular modeling: A powerful tool for drug design and molecular docking. **Resonance**, v. 9, n. 5, p. 51–60, 2004.

OGINO, A. et al. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 64, n. 5, p. 398–403, 2005.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592–603, 2004.

OOMS, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 141–158, 2000.

- PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. New York: Oxford University Press, 2013.
- PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- POSHKUS, A. C.; HERWEH, E.; MAGNOTTA, F. A. The synthesis of aromatic sulfonyl bromides from sulfonylhydrazides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2766–2769, 1963.
- PYUN, C. W. et al. In vivo protective effects of dietary curcumin and capsaicin against alcohol-induced oxidative stress. **Biofactors**, v. 50, n. 5, p. 494–500, 2014.
- RIVOIRE, W. A. et al. Molecular Basis of Cervical Oncogenesis. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179–184, 2001.
- ROSSER, B. G.; GORES, G. J. Liver Cell Necrosis: Cellular Mechanisms and Clinical. **Gastroenterology**, v. 108, p. 252–275, 1995.
- RUBIN, E. **Patologia: As bases patológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- SÁ JUNIOR, P. L. et al. RPF101 , a new capsaicin-like analogue , disrupts the microtubule network accompanied by arrest in the G2 / M phase , inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, p. 385–398, 2013.
- SAFAEI-GHOMI, J. An efficient synthesis of sulfonylhydrazides and sulfonylsemicarbazides by utilizing alumina as a catalyst. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 54, p. 1561–1563, 2007.
- SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505–512, 2002.
- SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 49–57, 2009.
- SARTORELLI, A. C. et al. Antineoplastic and Biochemical Properties of Arylsulfonylhydrazones of. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 830–833, 1976.
- SI, W. et al. Antioxidant activity of capsaicinoid in canola oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 6230–6234, 2012.
- SOUZA, F. DA C. **Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.
- SPENCER-NETTO, F. A. C.; FERRAZ, E. M. Apoptose , neutrófilos e o cirurgião. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 28, n. 1, p. 56–61, 2000.
- STEWART, J. J. P. Application of the PM6 method to modeling the solid state. **Journal of Molecular Modeling**, v. 14, p. 499–535, 2008.

- STEWART, J. J. P. Application of the PM6 method to modeling proteins. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, p. 765–805, 2009.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719–724, 2009.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. **Methods in Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press Inc, 1991.
- TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.
- TAVARES, M. T. **Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.
- THORNER, C. W. Isosterism and molecular modification in drug design. **Chemical Society Reviews**, v. 8, p. 563–580, 1957.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–149, 2003.
- VICENTE-DUEÑAS, C. et al. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 11, p. 1502–13, 2013.
- WALPOLE, C. S. et al. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond “B-region”. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 16, p. 2373–80, 1993a.
- WALPOLE, C. S. J. et al. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain “C-Region”. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 16, p. 2381–2389, 1993b.
- WALPOLE, C. S. J. et al. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond “A-region”. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 16, p. 2362–2372, 1993c.
- WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351–360, 2002.
- WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129–1143, 1998.
- WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. New York: Academic Press, 2008.
- WHO, W. H. O. **Cancer - What is cancer?** Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>. Acesso em: 10 fev. 2013a.
- WHO, W. H. O. **Health Topics - Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2013b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 20 fev. 2014.

XU, G.; SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. **Cell Research**, v. 17, n. 9, p. 759–771, 2007.

YANG, K. M. et al. Capsaicin induces apoptosis by generating reactive oxygen species and disrupting mitochondrial transmembrane potential in human colon cancer cell lines. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 14, n. 3, p. 497–510, 2009.

ZHANG, D. et al. Synthesis of Sulfonylhydrazone- and Acylhydrazone-Substituted 8-Ethoxy-3-nitro-2 H -chromenes as Potent Antiproliferative and Apoptosis Inducing Agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 8, p. 576–588, 2014.

ZHANG, J. et al. Visualization of caspase-3-like activity in cells using a genetically encoded fluorescent biosensor activated by protein cleavage. **Nature Communications**, v. 4, p. 2157, 2013.

ZHANG, R. et al. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. **Apoptosis**, v. 13, n. 12, p. 1465–78, 2008.

ANEXOS

Anexo 1
Espectros de RMN ^1H e ^{13}C

Espectro de RMN ^1H do composto Piperonal

benzo[d][1,3]dioxol-5-carbaldeído

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,07 (1H, s, 8- CH_2); 6,92 (1H, d, J = 7,8 Hz, 3-ArH); 7,32 (1H, s, 6-ArH); 7,40 (1H, d, J = 7,8 Hz, 4-ArH); 9,81 (1H, s, 10-CH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto Piperonal

benzo[d][1,3]dioxol-5-carbaldeído

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 102,2 (C8); 106,2 (C6); 108,5 (C3); 128,4 (C4); 131,4 (C5); 148,3 (C1); 152,7 (C2); 190,8 (C10).

Espectro de RMN ^1H do composto 4a

Benzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 3,62 (2H, s, 9-NH₂), 5,62 (1H, s, 8-NH) 7,57 (2H, t, J = 7,3 Hz, 3, 5-ArH); 7,65 (1H, t, J = 7,3 Hz, 4-ArH); 7,93 (2H, d, J = 7,0 Hz, 2, 6-ArH)

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4a

Benzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm):
128,2 (C2, C6); 129,3 (C3, C5); 133,5 (C4); 136,3 (C1).

Espectro de RMN ^1H do composto 4b

4-metilbenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 1,96 (1H, s, 8-NH); 2,45 (3H, s, 12- CH_3); 7,35 (2H, d, J = 8,2 Hz, 3, 5-ArH); 7,8 (2H, d, J = 8,2 Hz, 2, 6-ArH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4b

4-metilbenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 21,5 (C12); 128,2 (C2, C6); 129,9 (C3, C5); 133,2 (C1); 144,5 (C4).

Espectro de RMN ^1H do composto 4c

4-fluorbenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ δ = ppm): 4,06 (2H, s, 9-NH₂); 7,42 (1H, d, J = 8,86 Hz, 3 ou 5-ArH); 7,45 (1H, d, J = 8,86 Hz, 3 ou 5-ArH); 7,85 (1H, d, J = 5,3 Hz, 2 ou 6-ArH); 7,88 (1H, d, J = 5,3 Hz, 2 ou 6-ArH); 8,39 (1H, s, 8-NH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4c

4-fluorbenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ δ = ppm): 115,9 (C3, C5); 130,5 (C2, C6); 134,5 (C1); 162,6 (C4).

Espectro de RMN ^1H do composto 4d

4-clorobenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 2,05 (2H, s, 9-NH₂); 5,74 (1H, s, 8-NH); 7,53 (2H, d, J = 8,5 Hz, 3, 5-ArH); 7,86 (2H, d, J = 8,5 Hz, 2, 6-ArH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4d

4-clorobenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 129,0 (C3, C5); 129,5 (C2, C6); 137,0 (C1); 137,5 (C4).

Espectro de RMN ^1H do composto 4e

4-nitrobenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 8,05 (2H, tt, J = 8,9 Hz, 2, 6-ArH); 8,42 (2H, tt, J = 8,9 Hz, 3, 5-ArH); 8,74 (1H, s, 8-NH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4e

4-nitrobenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 124,1 (C3, C5); 129,2 (C2, C6); 144,1 (C1); 149,7 (C4).

Espectro de RMN ^1H do composto 4f

4-*terc*-butilbenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 1,35 (9H, s, 13, 14, 15- CH_3); 7,57 (2H, tt, J = 8,7 Hz, 3, 5-ArH) 7,83 (2H, tt, J = 8,7 Hz, 2, 6-ArH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4f

4-*terc*-butilbenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm): 31,0 (C13, C14, C15); 35,2 (C12); 126,3 (C3, C5); 128,1 (C2, C6); 133,1 (C1); 157,5 (C4).

Espectro de RMN ^1H do composto 4g

4-metoxibenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 1,96 (1H, s, 9-NH₂); 3,88 (3H, t, J = 3,56 Hz, J = 7,12 Hz, 13-CH₃); 5,60 (1H, s, 9-NH₂); 7,02 (2H, tt, J = 8,9 Hz, 3, 5-ArH); 7,84 (2H, tt, J = 8,9 Hz, 2, 6-ArH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 4g

4-metoxibenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 55,6 (C13); 114,1 (C3, C5); 129,5 (C1); 129,7 (C2, C6); 162,3 (C4).

Espectro de RMN ^1H do composto 4i

4-acetamidabenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 2,09 (3H, s, 14- CH_3); 4,04 (1H, s, 9- NH_2); 7,73 (2H, d, J = 9,0 Hz, 2, 6-ArH); 7,77 (2H, d, J = 9,0 Hz, 3, 5-ArH); 8,21 (1H, s, 8-NH); 10,29 (1H, s, 12-NH).

Espectro de RMN ^1H do composto 4i

4-acetamidabenzeno-sulfonil-hidrazida

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 24,0 (C14); 118,4 (C3, C5); 128,7 (C2, C6); 131,5 (C1); 142,9 (C4); 169,9 (C13).

Espectro de RMN ^1H do composto 5a

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)benzeno-sulfonil-hidrazona

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 6,04 (2H, s, 8-CH₂); 6,91 (1H, d, J = 8 Hz, 3-ArH); 7,03 (1H, dd, J = 1,4 Hz, J = 8 Hz, 4-ArH); 7,09 (1H, d, J = 1,4 Hz, 6-ArH); 7,57-7,68 (3H, m, 16, 17, 18-ArH); 7,82 (1H, s, 10-CH); 7,87 (2H, dd, J = 1,5 Hz, J = 8 Hz, 15, 19-ArH); 11,31 (1H, s, 12-NH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5a

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)benzeno-sulfonil-hidrazona

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 106,7 (C8); 110,1 (C6); 113,6 (C3); 128,2 (C4); 132,4 (C15, C19); 133,2 (C5); 134,4 (C16, C18); 138,2 (C17); 144,2 (C14); 152,2 (C10); 153,1 (C1); 154,3 (C2).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^1H do composto 5b

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-metilbenzenosulfonil-hidrazona

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 2,40 (3H, s, 20-CH₃) 5,97 (2H, s, 8-CH₂); 6,75 (1H, d, J = 8 Hz, 3-ArH); 6,91 (1H, dd, J = 1,5 Hz, J = 8 Hz, 4-ArH); 7,19 (1H, d, J = 1,5 Hz, 6-ArH); 7,30 (3H, d, J = 8,0 Hz, 16, 18-ArH) 7,67 (1H, s, 10-CH); 7,85 (2H, d, J = 8 Hz, 15, 19-ArH); 7,90 (1H, s, 12-NH).

Espectro de RMN ¹³C do composto 5b

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-metilbenzenosulfonil-hidrazona

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ = ppm): 21,5 (C20); 101,4 (C8); 105,7 (C6); 108,0 (C3); 123,7 (C4); 127,8 (C16, C18); 127,9 (C15, C19); 129,6 (C5); 135,3 (C10); 144,2 (C1); 148,0 (C14); 148,2 (C2); 149,7 (C17).

Espectro de RMN ^1H do composto 5c

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-fluorbenzenosulfonil-hidrazona

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm):
 6.05 (2H, s, 8-CH₂); 6.92 (1H, d, J = 8 Hz, 3-ArH); 7.04 (1H, d, J = 8 Hz, 4-Ar-H); 7,11 (1H, s, 6-Ar-H); 7.45 (2H, t, J = 8.8 Hz, 16, 18-ArH); 7.83 (1H, s, 10-CH); 7.93 (2H, dd, J = 5.24 Hz, J = 8.8 Hz, 15, 19-ArH); 11.33 (1H, s, 12-NH).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^1H do composto 5e

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-nitrobenzenosulfonil-hidrazona

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm):
 6,06 (2H, s, 8-CH₂); 6,93 (1H, d, J = 8 Hz, 3-ArH); 7,06 (1H, dd, J = 1,6 Hz, J = 8,1 Hz, 4-ArH); 7,14 (1H, d, J = 1,5 Hz, 6-ArH); 7,87 (1H, s, 10-CH); 8,14 (2H, dt, J = 8,9 Hz, 15, 19-ArH); 8,43 (2H, dt, J = 8,9 Hz, 16, 18-ArH); 11,66 (1H, s, H-12).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5e

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-nitrobenzenosulfonil-hidrazona

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 101,5 (C8); 104,9 (C6); 108,3 (C3); 123,3 (C4); 124,4 (C16, C18); 127,6 (C5); 128,8 (C15, C19); 144,2 (C10); 147,8 (C1); 148,1 (C14); 149,2 (C2); 149,9 (C17).

Espectro de RMN ^1H do composto 5f

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-*tert*-butilbenzenosulfonil-hidrazona

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 1,28 (9H, s, 21, 22, 23-CH₃); 6,05 (2H, s, 8-CH₂); 6,92 (1H, d, J = 8 Hz, 3-ArH); 7,04 (1H, dd, J = 1,29 Hz, J = 8 Hz, 4-ArH); 7,11 (1H, d, J = 1,29 Hz, 6-ArH); 7,63 (2H, d, J = 8,56 Hz, 16, 18-ArH); 7,80 (2H, d, J = 8,56 Hz, 15, 19-ArH); 7,83 (1H, s, 10-CH); 11, 29 (1H, s, 12-NH).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^1H do composto 5g

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-metoxibenzenosulfonil-hidrazona

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 3,85 (3H, s, 21- CH_3); 5,98 (2H, s, 8- CH_2); 6,76 (1H, d, J = 7,9 Hz, 3-ArH); 6,91 (1H, d, J = 7,9 Hz, 4ArH); 6,97 (2H, d, J = 8,5 Hz, 16, 18-ArH); 7,19 (1H, s, 6-ArH); 7,67 (1H, s, 10-CH); 7,70 (1H, s, 12-NH); 7,90 (2H, d, J = 8,5 Hz, 15, 19-ArH).

Espectro de RMN ¹³C do composto 5g

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-metoxibenzenosulfonil-hidrazona

RMN ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂SO, δ = ppm):
 55,6 (C21); 101,4 (C8); 104,8 (C6); 108,3 (C3); 114,3 (C16, C18); 122,8 (C4); 128,1 (C5); 129,4 (C15, C19); 130,6 (C14); 146,7 (C10); 147,8 (C1); 148,9 (C2); 162,5 (C17).

Espectro de RMN ¹H do composto 5i

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-acetamidabenzenosulfonil-hidrazona

RMN ¹H (300 MHz, DMSO, δ = ppm):
 2,07 (3H, s, 23-CH₃); 6,05 (2H, s, 8-CH₂);
 6,92 (1H, d, *J* = 7,93 Hz, 3-ArH); 7,02 (1H,
 dd, *J* = 1,20 Hz; *J* = 7,93 Hz, 4-ArH); 7,10
 (1H, d, *J* = 1,20 Hz, 6-ArH); 7,78 (3H, d, *J*
 = 3,71 Hz, 10-CH, 16, 18-ArH); 7,81 (2H,
 t, *J* = 3,71 Hz, 15, 19-ArH); 10,29 (1H, s,
 20-NH); 11,16 (1H, s, 12-NH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5i

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)4-acetamidabenzenosulfonil-hidrazona

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO, δ = ppm):
 24,0 (C23); 101,4 (C8); 104,8 (C6); 108,3 (C3); 118,4 (C16, C18); 122,9 (C4); 128,0 (C5); 128,4 (C15, C19); 132,4 (C14); 143,2 (C10); 146,7 (C17); 147,8 (C1); 148,9 (C2); 168,9 (C21).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^1H do composto 7b

(E)-4-metil-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ = ppm):
 2.40 (3H, s, 22-CH₃); 3.88 (3H, s, 20-CH₃); 6.83 (1H, d, J = 8.13 Hz, 3-ArH); 7.04 (1H, dd, J = 1.55 Hz, J = 8.13 Hz, 4-ArH); 7.27 (1H, d, J = 1.55 Hz, 6-ArH); 7.39 (2H, d, J = 8.10 Hz, 15, 17-ArH); 7.84 (d, 2H, J = 8.10 Hz, 14, 18-ArH); 7.89 (1H, s, -CH); 9.79 (1H, s, 21-OH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 7b

(E)-4-metil-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ = ppm):
 21,4 (C22); 56,2 (C20); 109,8 (C6); 115,8 (C3); 122,6 (C4); 127,0 (C5); 128,6 (C14, C18); 130,2 (C15, C17); 137,6 (C16); 144,5 (C13); 148,6 (C7); 148,7 (C1); 149,8 (C2).

Espectro de RMN ^1H do composto 7c

(E)-4-fluor-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm):
 3.83 (3H, s, 20-CH₃); 6.82 (1H, d, J = 8.13 Hz, 3-ArH); 7.03 (1H, dd, J = 1.55 Hz, J = 8.13 Hz, 4-ArH); 7.15 (1H, d, J = 1.55 Hz, 6-ArH); 7.50 (2H, t, J = 8.84 Hz, 15, 17-ArH); 7.86 (1H, s, 7-CH); 7.99 (2H, m, 14, 18-ArH); 9.53 (1H, s, 21-OH); 11.26 (1H, s, 9-NH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 7c

(E)-4-fluor-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ = ppm):
 56,2 (C20); 109,8 (C6); 115,8 (C15, C17);
 116,7 (C3); 117,0 (C4); 122,8 (C14, C18);
 126,8 (C5); 131,5 (C13); 131,7 (C7); 148,7
 (C1); 149,2 (C2); (149,9 (C16).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^1H do composto 7d

(E)-4-cloro-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm):
 3,78 (3H, s, 20-CH₃); 6,78 (1H, d, J = 8,1 Hz, 3-ArH); 6,98 (1H, dd, J = 1,8 Hz, J = 8,1 Hz, 4-ArH); 7,11 (1H, d, J = 1,8 Hz, 6-ArH); 7,69 (2H, tt, J = 2 Hz, J = 8,7 Hz, 15, 17-ArH); 7,81 (1H, s, 7-CH); 7,89 (2H, tt, J = 2 Hz, J = 8,7 Hz, 14, 18-ArH); 9,49 (1H, s, 21-OH); 11,27 (1H, s, 9-NH).

Espectro de RMN ^1H do composto 7f

(E)-4-*terc*-butil-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 1,28 (9H, s, 23, 24, 25-CH₃); 3,8 (3H, s, 20-CH₃); 6,77 (1H, d, J = 8,11 Hz, 3-ArH); 6,98 (1H, dd, J = 1,55 Hz, J = 8,11 Hz, 4-ArH); 7,10 (1H, d, J = 1,55 Hz, 6-ArH); 7,62 (2H, d, J = 8,48 Hz, 15, 17-ArH); 7,80 (2H, d, J = 8,48 Hz, 14, 18-ArH); 7,80 (1H, s, 7-CH); 9,46 (1H, s, 21-OH); 11,16 (1H, s, 9-NH).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^{13}C do composto 7f

(E)-4-*tert*-butil-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm):
 31,2 (C23, C24, C25); 35,6 (C22); 56,2 (C20); 109,8 (C6); 115,8 (C3); 122,6 (C4); 126,7 (C15, C17); 127,0 (C5); 128,4 (C14, C18); 137,7 (C13); 148,6 (C7); 148,7 (C1); 149,8 (C2); 157,2 (C16).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^1H do composto 7g

(E)-4-metoxi-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ = ppm): 3,88 (3H, s, 23- CH_3); 3,88 (3H, s, 20- CH_3); 6,83 (1H, d, J = 8,13 Hz, 3-ArH); 7,04 (1H, dd, J = 1,7 Hz, J = 8,13 Hz, 4-ArH); 7,09 (2H, dd, J = 1,94 Hz, J = 7,02 Hz, 15, 17-ArH); 7,27 (1H, d, J = 1,7 Hz, 6-ArH); 7,88-7,91 (3H, m, 7-CH, 14, 18-ArH); 9,72 (1H, s, 21-OH).

Espectro de RMN ^1H do composto 7g

(E)-4-metoxi-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ = ppm): 56,0 (C23); 56,2 (C20); 109,7 (C6); 114,8 (C15, C17); 115,8 (C3); 122,6 (C4); 127,1 (C5); 130,7 (C14, C18); 132,1 (C13); 148,5 (C7); 148,7 (C1); 149,7 (C2); 164,0 (C16).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Espectro de RMN ^1H do composto 7i

(E)-4-acetamida-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 2,07 (3H, s, 25- CH_3); 3,78 (3H, s, 20- CH_3); 6,77 (1H, d, J = 8,11 Hz, 3-ArH); 6,97 (1H, d, J = 8,11 Hz, 4-ArH); 7,10 (1H, s, 6-ArH); 7,76 (2H, d, J = 9,0 Hz, 15, 17-ArH); 7,79 (1H, s, 7-CH); 7,81 (2H, d, J = 9,0 Hz, 14, 18-ArH); 9,45 (1H, s, 21-OH); 10,29 (1H, s, 22-NH); 11,04 (1H, s, 9-NH).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 7i

(E)-4-acetamida-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)benzenosulfonil-hidrazona.

RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ = ppm): 24,0 (C25); 55,5 (C20); 109,5 (C6); 115,4 (C3); 118,4 (C15, C17); 121,0 (C4); 125,1 (C5); 128,4 (C14, C18); 132,5 (C13); 143,1 (C7); 147,5 (C16); 147,8 (C1); 148,3 (C2); 169,9 (C23).

*O sinal do solvente extrapolou a linha para melhor visualização.

Anexo 2
Análise Elementar

Análise elementar do composto 5a

Data: 05/12/2014 07:09

Analizado por Vânia

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF901	55,03	3,82	9,15

Análise elementar do composto 5b

Data: 05/12/2014 06:38

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF902	56,74	4,64	8,71
RPF902	56,49	4,48	8,67

Análise elementar do composto 5c

Data: 05/12/2014 06:43

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF903	52,60	3,64	8,52
RPF903	52,63	3,71	8,78

Análise elementar do composto 5e

Data: 05/12/2014 06:46

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF905	48,08	3,25	12,10
RPF905	48,06	3,29	11,99

Análise elementar do composto 5f

Data: 05/12/2014 06:49

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF906	60,12	5,72	7,86
RPF906	60,19	5,74	7,69

Análise elementar do composto 5g

Data: 05/12/2014 06:50

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF907	54,39	4,50	8,27
RPF907	54,34	4,43	8,30

Análise elementar do composto 5i

Data: 05/12/2014 06:52

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF909	52,65	4,29	11,49
RPF909	52,71	4,32	11,51

Análise elementar do composto 7b

Data: 05/12/2014 06:53

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF952	55,90	5,20	8,48
RPF952	55,84	5,22	8,38

Análise elementar do composto 7c

Data: 05/12/2014 06:55

Analizado por Vânia Bueno

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF953	52,28	4,29	8,33
RPF953	52,36	4,27	8,33

Análise elementar do composto 7d

Data: 05/12/2014 06:57

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF954	49,07	3,79	8,14
RPF954	49,39	3,88	8,14

Análise elementar do composto 7f

Data: 05/12/2014 07:01

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF956	59,29	6,30	7,52
RPF956	59,39	6,17	7,44

Análise elementar do composto 7g

Data: 05/12/2014 07:04

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF957	53,87	4,97	8,25
RPF957	53,88	4,90	8,41

Análise elementar do composto 7i

Data: 05/12/2014 07:05

Analizado por Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF959	52,71	4,88	11,36
RPF959	52,88	4,86	11,37

Anexo 3

Estudos complementares

Durante o desenvolvimento do projeto, foram iniciados estudos de avaliação do potencial antioxidante dos análogos sulfonil-hidrazônicos, em colaboração com o

Prof. Dr. André Rolim Baby do Departamento de Farmácia da FCF-USP. Tais estudos estão em andamento e pretende-se publicar os resultados obtidos.

A seguir, tem-se um breve relatório referente a este estudo.

Síntese e avaliação da atividade antioxidante de análogos sulfonil-hidrazônicos da capsaicina

Atualmente, compostos fenólicos têm atraído o interesse de pesquisadores devido a suas propriedades antioxidantes que podem proteger contra a ação de radicais livres. Existem diversos produtos naturais que apresentam grupo fenol em sua estrutura e que tem sido estudados quanto o seu potencial antioxidante (figura 1) (SRINIVASAN,2012).

Figura 1. Compostos fenólicos de origem natural com atividade antioxidante.

Isolada em 1876, a capsaicina é um capsaicinoide que possui propriedades analgésica, antitumoral e antioxidante. Os capsaicinoides consistem num grupo de compostos responsáveis pela pungência e sabor picante das pimentas *Capsicum annuum* e *Capsicum frutescens*. A família dos capsaicinoides é primariamente composta pela capsaicina, di-idrocapsaicina, nondi-idrocapsaicina,

homoidrocapsaicina, homodi-idrocapsaicina e nonivamida, os quais apresentam o anel metilcatecol em sua estrutura (ROLLYSON et al., 2014).

A atividade antioxidante da capsaicina tem sido extensamente estudada, sendo relacionada com o sequestro de radicais livres, inibição da oxidação lipídica, além de seu efeito na prevenção da oxidação do LDL quando inserida na dieta (AKHILENDER NAIDU; THIPPESWAMY, 2002; ANTONIOUS, 2014; HASSAN et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014).

Recentemente, Nascimento e colaboradores (2014) verificaram a propriedade antioxidante da capsaicina a partir do método de redução do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), que mensura a capacidade de um composto sequestrar radicais livres. Antioxidantes reduzem o DPPH (de cor roxa) a difenilpicril-hidrazina, um composto amarelo, pelo recebimento de um elétron ou de um radical hidrogênio. Neste estudo, a capsaicina apresentou uma EC_{50} de $23,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em um segundo método, a saber, ABTS [ácido 2,2-azinobis-(etilbenzotiazolona)-6 sulfônico], foi verificada a capacidade da capsaicina inibir a peroxidação lipídica, obtendo-se $EC_{50} = 3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A atividade antioxidante da capsaicina foi observada em biomembrana a partir da mensuração da oxidação de micelas de metil-linoleato em membrana lipossomal fosfatidilcolina de soja. Os resultados mostram que a capsaicina inibiu a oxidação de forma quase tão eficiente quanto o α -tocoferol (OKADA; OKAJIMA, 2001).

Diversas pesquisas mostram os benefícios da capsaicina na dieta. A influência do benefício da dieta contendo capsaicina na susceptibilidade da oxidação do LDL foi observada em um estudo animal. A dieta com capsaicina também inibiu de forma significativa a oxidação de LDL induzida por ferro *in vitro* (MANJUNATHA; SRINIVASAN, 2006). Acredita-se que a capsaicina possa ser um potente antioxidante sempre que consumida por um curto período. Foi demonstrada a influência da capsaicina como hipolipidêmico no estado antioxidante das hemácias e fígado em ratos hiperlipidêmicos (KEMPAIAH; SRINIVASAN, 2004). Ratos wistar tratados com capsaicina (i.p. 3 mg/kg) por 3 dias consecutivos apresentaram uma redução do estresse oxidativo, mensurado a partir de MDA (malondialdeído) no

fígado, pulmões, rins e músculos (LEE et al., 2003). Um estudo demonstrou que a introdução de capsaicina na dieta de camundongos reduziu o estresse oxidativo induzido por álcool (PYUN et al., 2014). Foi observado que a capsaicina inibe a peroxidação lipídica induzida por íon cobre em LDL humano, sugerindo que um efeito antioxidante eficaz na proteção contra a oxidação de LDL humano (AKHILENDER NAIDU; THIPPESWAMY, 2002)

Assim como sua propriedade antioxidante, o potencial citotóxico da capsaicina também têm sido bastante estudado. Pesquisas já demonstraram sua atividade sobre câncer de língua (IP et al., 2010), pâncreas (ZHANG et al., 2008), cólon (YANG et al., 2009); e pulmão (BROWN et al., 2010). A atividade antitumoral da capsaicina inspirou o planejamento do análogo sulfonamídico RPF101, que apresentou atividade citotóxica em linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 (figura 2) (SÁ JUNIOR et al., 2013).

Figura 2. Planejamento de análogos da capsaicina.

O planejamento do RPF101 fundamentou-se em modificações moleculares empregando-se estratégias de hibridação, bioisosterismo e homologia. Primeiramente, na região A, foi realizado o fechamento do anel do grupo metilcatecol, a fim de se obter o sistema bicíclico 1,3-benzodioxol. Este tipo de modificação pode proporcionar vantagens importantes ao análogo, uma vez que o sistema benzodioxol é uma estrutura apresentada em uma série de substâncias com atividade antineoplásica, como o etoposídeo e teniposídeo (BRANDÃO et al., 2010). Além disso, esta alteração molecular proporciona propriedades lipofílicas mais adequadas e um sítioceptor de hidrogênio, características relevantes para melhorar os perfis farmacocinético e farmacodinâmico (BARREIRO; BRAGA, 1999).

Utilizando RPF101 como protótipo, análogos sulfonil-hidrazônicos foram planejados. As modificações moleculares empregadas visaram a obtenção de duas séries de análogos distintas (I e II), que diferem-se de acordo com a região A. A série I é constituída por compostos que possuem o grupo benzodioxol na região A, enquanto a série II compreende análogos que possuem o grupo metilcatecol nesta região, a fim de verificar a influência do fechamento do anel na atividade da molécula. Em ambas as séries, foi realizada a substituição do grupo sulfonamida pelo grupo sulfonil-hidrazona na região B (bioisosterismo não clássico) e a introdução de grupos substituintes (R) na posição para do anel aromático presente na região C.

A escolha dos substituintes “R” baseou-se no diagrama de Craig, buscando-se obter diversidade de substituintes com parâmetros estereoeletrônicos e constantes de hidrofobicidade com bom grau de dispersão, a fim de correlacionar tais propriedades com a atividade biológica.

Embora planejados em busca de compostos ativos contra o câncer, seis análogos sulfonil-hidrazônicos foram testados quanto o seu potencial antioxidante, tendo em vista a propriedade antioxidante da capsaicina. Os resultados, apresentados na tabela 1, mostraram dois compostos ativos, a saber, RPF952 e RPF957, com valores de IC₅₀ de 78,182 e 72,629 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1. Valores de IC₅₀ para a atividade antioxidante dos análogos sulfonil-hidrazônicos.

Composto	Estrutura	IC ₅₀ (µg/mL)	CLog P	tPSA	pKa
RPF902		4067,053	3,574	76,99	-
RPF905		6097,718	2,818	128,8	-
RPF907		3781,264	2,994	86,22	-
RPF952		78,182	2,7912	87,99	9,225
RPF956		2093,333	4,1182	87,89	9,224
RPF957		72,629	2,2112	97,22	9,225

Os dois compostos ativos pertencem à série II, onde a estrutura apresenta o grupo metilcatecol. Portanto, a presença do anel benzodioxol em detrimento do metilcatecol nos análogos RPF902 e RPF907, de estrutura similar às moléculas ativas, pode justificar a ausência da atividade antioxidante e indicar que a mesma está relacionada com a hidroxila fenólica.

Alguns mecanismos para a atividade antioxidante da capsaicina tem sido propostos. Em um estudo pelo método do DPPH, que verificou o sequestro destes radicais em membranas, observou-se que vanilina e 8-metil-6-noneamida foram os principais produtos de reação da capsaicina com os radicais DPPH, sugerindo que o sítio de sequestro de radical livre da capsaicina é o carbono benzílico C7 (SATYA PRASAD et al., 2004). Outras hipóteses também foram consideradas, como a transferência de um único elétron (SET) e formação de aduto radicalar (RAF). O estudo de Galano e Martinez (2012), no entanto, demonstra que o mecanismo de sequestro de radicais livres envolve a transferência de hidrogênio, proveniente da hidroxila fenólica. Este mecanismo também foi observado num estudo sobre a

prevenção da oxidação lipídica de óleo de canola pela capsaicina(Si et al., 2012). De acordo com Si e colaboradores (2012), O grupo hidroxil em um anel aromático é mais vulnerável à doação de um próton, resultando num intermediário radicalar, que possui alta estabilidade devido a delocalização da ressonância. Acredita-se que o grupo hidroxil do anel aromático seja responsável pela atividade antioxidante dos compostos capsaicinoides. A fim de se avaliar esta relação entre a estrutura química e a atividade antioxidante, Si e colaboradores testou o derivado capsaicinoide trimetilsiloxi, onde o grupo [-O-Si(CH₃)₃] substitui a hidroxila do anel aromático. Os resultados mostraram que o bloqueio da hidroxila leva o capsaicinoide a perder sua atividade antioxidante, indicando que o grupo hidroxila estaria relacionado à atividade antioxidante dos capsaicinoides.

Ademais, observa-se que, ao contrário dos compostos benzodioxólicos, os análogos com grupo metilcatecol apresentam constante de ionização. Entretanto, apesar de ionizável, o composto RPF956 apresenta alta lipofilicidade (ClogP = 4,1182) o que pode ter comprometido sua solubilidade e justificaria a ausência de atividade antioxidante. Adicionalmente, o grupo *terc*-butil interfere negativamente na ressonância dos elétrons captados, tendo em vista que é doador por indução, o que também pode ter prejudicado na capacidade antioxidante do composto.

Tomados em conjunto, é possível aferir que compostos metilcatecólicos podem ser promissores como compostos antioxidantes. Novos compostos podem ser avaliados e estudos complementares podem ser feitos a fim de se obter informações mais detalhadas a respeito de tal atividade.

Informação suplementar – Procedimento para determinação do potencial antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante dos compostos se deu pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Este método está fundamentado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Por ação de um antioxidante, uma espécie radicalar, o DPPH, de cor púrpura, é reduzido a difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. Este processo

implica no desaparecimento da absorção, que pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (BAUHINIA et al., 2011; DUARTE-ALMEIRA et al., 2006).

Os análogos sulfonil-hidrazônicos foram diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) em concentrações entre 10 e 4000 µg/ mL. 1 mL da solução contendo o composto sulfonil-hidrazônico foi adicionado a 3 mL de uma solução a 100 µM de DPPH em DMSO. A absorbância de cada amostra foi verificada por espectrofotômetro em 515 nm em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico após 1 h de reação à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Como controles negativo e positivo, foram utilizados, respectivamente, DMSO e soluções de butil hidroxi tolueno (BHT) e do flavonóide rutina, os últimos com reconhecida atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Os valores de platô de sequestro de radicais livres, em triplicata, foram transformados em porcentagem, conforme a equação a seguir:

$$\% \text{ sequestro de radicais livres} = \frac{(A_c - A_a) \times 100}{A_c}$$

Onde: A_a = absorbância das amostras; A_c = absorbância do controle negativo.

A partir dos resultados obtidos nas diferentes concentrações testadas, foi elaborada uma curva de calibração por meio do programa *Microsoft Excel*, pela qual foi possível determinar os valores de IC₅₀ dos compostos.

Referências

AKHILENDER NAIDU, K.; THIPPESWAMY, N. B. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 229, n. 1-2, p. 19–23, 2002.

ANTONIOUS, G. F. Impact of soil management practices on yield, fruit quality, and antioxidant contents of pepper at four stages of fruit development. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 10, p. 769–774, 2014.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 744–759, 1999.

BAUHINIA, L. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327–332, 2011.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BROWN, K. C. et al. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10243, jan. 2010.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

GALANO, A.; MARTÍNEZ, A. Capsaicin, a tasty free radical scavenger: Mechanism of action and kinetics. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 3, p. 1200–1208, 2012.

HASSAN, M. H. et al. Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 5, p. 428–438, 2012.

IP, S. et al. Capsaicin induces apoptosis in SCC-4 human tongue cancer cells through mitochondria- dependent and -independent pathways. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 332–341, 2010.

KEMPAIAH, R. K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on the antioxidant status of red blood cells and the liver in high-fat-fed rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 48, n. 5, p. 314–320, 2004.

LEE, C. Y. J. et al. Short-term control of capsaicin on blood and oxidative stress of rats in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 454–458, 2003.

MANJUNATHA, H.; SRINIVASAN, K. Protective effect of dietary curcumin and capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein, iron-induced hepatotoxicity and carrageenan-induced inflammation in experimental rats. **FEBS Journal**, v. 273, n. 19, p. 4528–4537, 2006.

NASCIMENTO, P. L. A. et al. Quantification, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Phenolics Isolated from Different Extracts of Capsicum frutescens (Pimenta Malagueta). p. 5434–5447, 2014.

OKADA, Y.; OKAJIMA, H. Antioxidant effect of capsaicin on lipid peroxidation in homogeneous solution, micelle dispersions and liposomal membranes. **Redox report : communications in free radical research**, v. 6, n. 2, p. 117–122, 2001.

PYUN, C. W. et al. In vivo protective effects of dietary curcumin and capsaicin against alcohol-induced oxidative stress. **Biofactors**, v. 50, n. 5, p. 494–500, 2014.

ROLLYSON, W. D. et al. Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 196, p. 96–105, 2014.

SÁ JUNIOR, P. L. et al. RPF101 , a new capsaicin-like analogue , disrupts the microtubule network accompanied by arrest in the G2 / M phase , inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2013.

SATYA PRASAD, N. et al. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 6, p. 521–528, 2004.

SI, W. et al. Antioxidant activity of capsaicinoid in canola oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 6230–6234, 2012.

SRINIVASAN, K. Antioxidant Potential of Spices and Their Active Constituents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 352–372, 2012.

YANG, K. M. et al. Capsaicin induces apoptosis by generating reactive oxygen species and disrupting mitochondrial transmembrane potential in human colon cancer cell lines. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 14, n. 3, p. 497–510, jan. 2009.

ZHANG, R. et al. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. **Apoptosis**, v. 13, n. 12, p. 1465–78, dez. 2008.

Anexo 4
Ficha da aluna

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 8616039/1 - Thais Batista Fernandes

Email:	thaisbf@usp.br
Data de Nascimento:	30/04/1990
Cédula de Identidade:	RG - 462733683 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmácia - Pontifícia Universidade Católica Campinas - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	01/07/2013
Início da Contagem de Prazo:	01/07/2013
Data Limite para o Depósito:	01/01/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Roberto Parise Filho - 01/07/2013 até o presente. Email: roberto.parise@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 01/07/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 29/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 01/07/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2015

Impresso em: 04/08/2015 15:32:11

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 8616039/1 - Thais Batista Fernandes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ENC5883-3/4	Prática Pedagógica no Ensino Superior (Escola de Enfermagem - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	11/11/2013	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5777-3/1	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	15/08/2013	27/11/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5754-1/1	Atualização em Ciências Farmacêuticas	21/10/2013	27/10/2013	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0336 - Planejamento de Fármacos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	01/02/2014	30/06/2014	-	3	-	-	-	-
FBF5734-7/3	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	04/02/2014	19/05/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5704-6/2	Análise Espectrométrica de Fármacos	17/02/2014	01/06/2014	150	10	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participação no 7º Simpósio Brasileiro em Química Medicinal (BrazMedChem2014), com o trabalho intitulado: "Design and synthesis of sulfonylhydrazide analogues as potential antitumor agents", com trabalho Publicado, Campos do Jordão, São Paulo - SP -Brasil – 2014 (2)	09/11/2014	12/11/2014	-	1	-	-	-	-
FBF5817-1/1	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos - Planejamento de Fármacos: As Bases para o Desenvolvimento de Candidatos a Antineoplásicos	11/05/2015	17/05/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

- 1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 05/09/2014.
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o Artigo 64 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 06/02/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2015

Impresso em: 04/08/2015 15:32:11

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 8616039/1 - Thais Batista Fernandes

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3203551	Roberto Parise Filho	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2015

Impresso em: 04/08/2015 15:32:11

Anexo 5
Currículo *Lattes*

Thais Batista Fernandes

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3856930593868249>

Última atualização do currículo em 04/05/2015

Farmacêutica Generalista, graduada pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Universidade de São Paulo, com ênfase em Química Farmacêutica e Química Medicinal, atuando em síntese e caracterização espectroscópica de compostos bioativos candidatos a fármacos e síntese orgânica. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Thais Batista Fernandes
Nome em citações bibliográficas	FERNANDES, T. B.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes, 580, BL 13 Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br/index.asp
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2013	Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Planejamento, síntese e avaliação da atividade antitumoral de compostos N-(benzodioxol-5-ilmetil) arilsulfonil-hidrazônicos, Orientador: Roberto Parise Filho. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
2009 - 2012	Graduação em Ciências Farmacêuticas. Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Brasil. Título: Determinação dos parâmetros físico-químicos de fármacos de ação central e avaliação na tendência de uso frente à Regra de Lipinski. Orientador: Michelle Carneiro Polli Parise.
2008 interrompida	Graduação interrompida em 2009 em Farmácia. Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil. Ano de interrupção: 2009

Formação Complementar

2011 - 2011	Medicina Baseada em Evidências. (Carga horária: 34h). Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Brasil.
2011 - 2011	Otimização da Adesão ao Tratamento Médico-Clínico. (Carga horária: 17h). Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Brasil.
2009 - 2009	Medicina Legal. (Carga horária: 34h). Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.
2007 - 2007	Agente Sanitário de Alimentos. (Carga horária: 500h).

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2014

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, Carga horária: 6

Outras informações

Aprimoramento Didático em Planejamento de Fármacos

Vínculo institucional

2014 - 2014

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Monitor Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, Carga horária: 6

Outras informações

Aprimoramento didático em química farmacêutica

Vínculo institucional

2013 - 2013

Vínculo: Prática profissionalizante, Enquadramento Funcional: Aluno, Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações

Planejamento e síntese de candidatos a fármacos.

GT Comercial Importadora e Distribuidora LTDA, GT NUTRITION, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2013

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40
Departamento Técnico

Outras informações

Atividades

08/2012 - 01/2013

Estágios , Departamento Técnico, .
Estágio realizado
Assuntos Regulatórios.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estágio em análises clínicas, Carga horária: 17

Outras informações

Laboratório de Bioquímica do Exercício - LABEX

Atividades

02/2012 - 07/2012

Estágios , Instituto de Biologia, .
Estágio realizado
Análises Clínicas.

Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2012

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

Atividades

08/2010 - 07/2012

Pesquisa e desenvolvimento , Centro de Ciências da Vida, .
Linhas de pesquisa
Implantes, Biomateriais, Odontologia.

Hospital e Maternidade Celso Pierro, HMCP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2011

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 5

Atividades

02/2011 - 12/2011

Estágios , AMI - Ambulatório de Moléstias Infecciosas, .
Estágio realizado
Atenção Farmacêutica.

08/2009 - 10/2009

Estágios , HMCP - Hospital e Maternidade Celso Pierro, .
 Estágio realizado
 Assistência Farmacêutica - Farmácia Hospitalar.

Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Brasil.

Vínculo institucional**2008 - 2009**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

Atividades**08/2008 - 07/2009**

Pesquisa e desenvolvimento , Comitê Institucional de Iniciação Científica, .
 Linhas de pesquisa
 Avaliação da Assistência Farmacêutica em Santos - SP.

Linhas de pesquisa

1. Avaliação da Assistência Farmacêutica em Santos - SP.
2. Implantes, Biomateriais, Odontologia.

Projetos de pesquisa

2013 - Atual

Planejamento, síntese e avaliação da atividade antitumoral de compostos N-(benzodioxol-5-ilmetil) arilsulfonil-hidrazônicos

Descrição: Atualmente, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Embora existam diversos fármacos para o controle do câncer, problemas como a baixa seletividade e alta toxicidade estimulam a busca por novas moléculas antitumorais. Neste contexto, produtos naturais têm desempenhado papel importante na introdução de novos fármacos na terapêutica, sejam per si ou até mesmo por serem utilizados como padrões moleculares para obtenção de novas substâncias bioativas. Estudos recentes relatam que a capsaicina (um capsaicinóide) e algumas substâncias correlatas (os capsinóides), encontradas em várias espécies de pimentas e pimentões, têm apresentado considerável ação antiproliferativa pela indução de apoptose seletiva em tumores. Assim, a utilização da capsaicina como modelo estrutural para a síntese de análogos com atividade potencialmente superior é tema de bastante interesse. Dessa forma, este projeto tem como objetivo a síntese de análogos capsaicinóides e capsinóides, utilizando como estratégia norteadora a modificação molecular, a avaliação da potencial atividade antitumoral das substâncias planejadas e a previsão de novos protótipos a partir de modelos teóricos de relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationships). Os análogos serão avaliados quanto sua capacidade citotóxica em células normais (fibroblastos humanos) e tumorais (células do adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231 e MCF-7)).

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (3) .

Integrantes: Thais Batista Fernandes - Integrante / Roberto Parise Filho - Coordenador / Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião - Integrante / Maurício Temotheo Tavares - Integrante.

Número de produções C, T & A: 2

2011 - 2012

Avaliação da atividade regeneradora de implante intraósseo de guta-percha revestido por microdiluição dinamizada de Arnica montana

Descrição: Avaliar in vivo a atividade regeneradora do tecido ósseo após realização de implante, em falha óssea tibial, de um tipo de material biocompatível, o guta-percha, revestido com solução microdiluída e dinamizada de Arnica montana.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Thais Batista Fernandes - Integrante / Pedro Paulo Barros - Coordenador / Leonardo Oliveira Aguiar - Integrante / Gustavo Henrique da Silva - Integrante.

2010 - 2011

Número de produções C, T & A: 2

Avaliação da atividade regeneradora de implantes intraósseo e subcutâneo de guta-pecha revestidos com extrato de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa).

Descrição: Avaliar in vivo a atividade regeneradora do tecido ósseo e conjuntivo subcutâneo após realização de implante, em falha óssea tibial e região subcutânea dorsal, de um tipo de material biocompatível, o guta-percha, revestido com extrato mole de *Maytenus ilicifolia*..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

Integrantes: Thais Batista Fernandes - Integrante / Pedro Paulo Barros - Coordenador / Leonardo Oliveira Aguiar - Integrante / Gustavo Henrique da Silva - Integrante.

2008 - 2009

Número de produções C, T & A: 2

Proposição e implementação de uma metodologia de programação de medicamentos em unidades básicas de saúde.

Descrição: Avaliação da Assistência Farmacêutica na cidade de Santos, com ênfase em programação de medicamentos pelas unidades municipais de saúde e almoxarifado central.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (3) .

Integrantes: Thais Batista Fernandes - Integrante / Paulo Ângelo Lorandi - Coordenador / Nathália do Carmo Começanha - Integrante / Priscila Lima de Araújo - Integrante.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Número de produções C, T & A: 6

Outros Projetos

2012 - 2012

Determinação dos parâmetros físico-químicos de fármacos de ação central e avaliação na tendência de uso frente à Regra de Lipinski

Descrição: A Regra de Lipinski apresenta aplicabilidade como um screening rápido no planejamento de fármacos administrados por via oral. Neste sentido, a avaliação das propriedades físico-químicas de fármacos que atuam no SNC, a determinação da biodisponibilidade e sua correlação com a regra de Lipinski possibilitam a avaliação da aplicabilidade da regra e auxílio no planejamento de fármacos de ação central..

Situação: Concluído; Natureza: Outra.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Thais Batista Fernandes - Coordenador / Michelle Carneiro Polli - Integrante.

Número de produções C, T & A: 2

Áreas de atuação

Idiomas

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2012

1 lugar na categoria "Painéis de Trabalhos de Conclusão de Curso" do I Simpósio de Ciências Farmacêuticas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. BARROS, P. P. ; **FERNANDES, T. B.** . Avaliação da atividade regeneradora de implantes intraósseo de guta-percha revestida por microdiluição dinamizada de Arnica montana. In: XVII Encontro de Iniciação Científica, 2012, Campinas. Anais do XVII Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas, 2012.

2. **FERNANDES, T. B.** ; BARROS, P. P. . Avaliação da atividade regeneradora de implantes intraósseo e subcutâneo de guta-percha revestidos por extrato de Maytenus ilicifolia (Espinheira Santa). In: XVI Encontro de Iniciação Científica, 2011, Campinas. Anais do XVI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas, 2011.

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ **FERNANDES, T. B.** ; POLLI, M. C. . Determinação dos parâmetros físico-químicos de fármacos de ação central e avaliação na tendência de uso frente à Regra de Lipinski. In: I Simpósio de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, 2012, Campinas. I Simpósio de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, 2012.

2. ★ **FERNANDES, T. B.** ; LORANDI, P. A. ; SILVA, M. J. da ; COMECANHA, N. do C. . A Assistência Farmacêutica em Santo SP. Análise da Programação de Compras de Medicamentos pela Secretaria de Saúde.. In: I Simpósio Internacional de Farmacoeconomia no SUS, 2009, Belo Horizonte. I Simpósio Internacional de Farmacoeconomia no SUS - Avaliação Tecnológica em Saúde. Trabalhos aprovados.. Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2009. p. 13-13.

3. **FERNANDES, T. B.** ; CASEIRO, M. M. ; CASTRO, C. D. ; NORIDUKI, C. M. ; LAURINDO, E. T. ; VIEIRA, M. R. S. ; COLEGÃ, A. A. C. ; LIMA, P. L. ; COSTA, S. O. P. ; FERREIRO, R. M. . Estudo de Caso sobre o Custo da Terapia Antiretroviral em Pacientes em Início de Tratamento.. In: I Simpósio Internacional de Farmacoeconomia no SUS, 2009, Belo Horizonte. I Simpósio Internacional de Farmacoeconomia no SUS - Avaliação Tecnológica em Saúde. Trabalhos aprovados.. Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2009. p. 23-23.

4. **FERNANDES, T. B.** ; COMECANHA, N. do C. ; ARAÚJO, P. L. de ; LORANDI, P. A. . Assistência farmacêutica em Santos SP. Análise da programação de medicamentos pelo almoxarifado central e unidades de saúde.. In: IV Jornada de Iniciação Científica - Universidade Católica de Santos, 2009, Santos. IV Jornada de Iniciação Científica. Ambiente costeiro, energia e desenvolvimento social.. Santos: Universidade Católica de Santos, 2009. p. 41-41.

Outras produções bibliográficas

1. ★ **FERNANDES, T. B.** ; DAMIÃO, M.C.F.C.B. ; TAVARES, M.T. ; PARISE FILHO, R. . Synthesis and purification of N-(benzodioxol-5-ylmethylene) aryl-sulfonylhydrazones. São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013 (Resumo).

2. ★ **FERNANDES, T. B.** ; LORANDI, P. A. ; SILVA, M. J. da ; COMECANHA, N. do C. . Pharmaceutical care in Santos SP: an analysis of programming purchases of medicines by the Department of Health. Rio de Janeiro: Jornal Brasileiro

de Economia da Saúde, 2009 (Resumo).

3. ★ **FERNANDES, T. B.** ; CASEIRO, M. M. ; CASTRO, C. D. ; NORIDUKI, C. M. ; LAURINDO, E. T. ; VIEIRA, M. R. S. ; COLEGÃ, A. A. C. ; LIMA, P. L. ; COSTA, S. O. P. ; FERREIRO, R. M. . Case study about the cost of antiretroviral therapy in patients at initial treatment in the city of Santos-SP. Rio de Janeiro: Jornal Brasileiro de Economia da Saúde, 2009 (Resumo).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Transition metal catalysis as an entry to diversity-oriented synthesis of heterocycles. 2015. (Seminário).
2. I workshop de jovens pesquisadores em planejamento e desenvolvimento de fármacos.Design and synthesis of sulfonylhydrazone analogues as potential antitumor agents. 2015. (Outra).
3. BrazMedChem.Design and synthesis of sulfonylhydrazone analogues as potential antitumor agents. 2014. (Simpósio).
4. XIX semana farmacêutica de ciência e tecnologia.Design and synthesis of sulfonylhydrazone analogues as potential antitumor agents. 2014. (Simpósio).
5. XX Escola de Verão de Química Farmacêutica e Medicinal. 2014. (Outra).
6. XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Synthesis and purification of N-(benzodioxol-5-ylmethylene) aryl-sulfonylhydrazone. 2013. (Congresso).
7. Desafios e oportunidades no planejamento de novos fármacos. 2013. (Seminário).
8. III Simpósio - Câncer e suas Interfaces. 2013. (Simpósio).
9. III Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases. 2013. (Simpósio).
10. Aplicação de bioengenharia de glicosiltransferases e do desenho de drogas baseados em fragmentos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. 2013. (Outra).
11. VI Seminário Nacional de Orientação no ao Setor Regulado na Área de Alimentos. 2012. (Seminário).
12. I Simpósio de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.Determinação dos parâmetros físico-químicos de fármacos de ação central e avaliação na tendência de uso frente à Regra de Lipinski. 2012. (Simpósio).
13. XVII Encontro de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.Avaliação da atividade regeneradora de implante intraósseo de guta-percha revestida por microdiluição dinamizada de Arnica montana. 2012. (Encontro).
14. IX Jornada Farmacêutica. 2011. (Congresso).
15. XVI Encontro de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.Avaliação da atividade regeneradora de implantes intraósseo e subcutâneo de guta-percha revestidos com extrato de Maytenus ilicifolia (Espinheira Santa). 2011. (Encontro).
16. IV Jornada Científica da Saúde. 2010. (Congresso).
17. XV Encontro de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.Avaliação da atividade regeneradora de implantes intraósseo e subcutâneo de guta-percha revestidos de extrato de Maytenus ilicifolia

(espinheira santa). 2010. (Encontro).

18. 10º Congresso de Farmácia e Bioquímica de Minas Gerais. 2009. (Congresso).

19. 11º Congresso Paulista de Saúde Pública. Assistência Farmacêutica em Santos SP. Análise da Programação de medicamentos pelo Almoxarifado Central e Unidades de Saúde. 2009. (Congresso).

20. I Simpósio Internacional de Farmacoeconomia no SUS: Avaliação Tecnológica em Saúde. A Assistência Farmacêutica em Santos SP. Análise da programação de Compras de Medicamentos pela Secretaria de Saúde.. 2009. (Simpósio).

21. I Simpósio Internacional de Farmacoeconomia no SUS: Avaliação Tecnológica em Saúde. Estudo de Caso Sobre o Custo da Terapia Antiretroviral em Pacientes em Início de Tratamento no Município de Santos - SP. 2009. (Simpósio).

22. II Simpósio de Geriatria e Gerontologia da PUC - Campinas. 2009. (Simpósio).

23. IV Jornada de Iniciação Científica. Assistência Farmacêutica em Santos SP. Análise da Programação de Medicamentos pelo Almoxarifado Central e Unidades de Saúde. 2009. (Outra).

24. IV Jornada de Iniciação Científica. 2009. (Outra).

25. II Jornada Científica da Saúde. 2008. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **FERNANDES, T. B.** . I workshop de jovens pesquisadores em planejamento e desenvolvimento de fármacos. 2015. (Outro).

2. **FERNANDES, T. B.** . 8ª feira de profissões da USP. 2014. .

3. **FERNANDES, T. B.** ; **VIEIRA, M. R. S.** . III Jornada Científica da Saúde. 2009. (Congresso).

Outras informações relevantes

Atuação como monitor voluntário nas disciplinas Toxicologia I e Toxicologia II do curso de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, focando a organização de material didático.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 24/07/2015 às 9:52:38

[Imprimir currículo](#)