UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da
atividade antitumoral**

Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Roberto Parise Filho

**SÃO PAULO
2014**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da
atividade antitumoral**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Roberto Parise Filho

SÃO PAULO
2014

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

D158p Damião, Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff
Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação
da atividade antitumoral / Mariana Celestina Frojuello Costa
Bernstorff Damião. -- São Paulo, 2014.
153p.

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

1. Química farmacêutica 2. Modelagem molecular I. T. II.
Parise Filho, Roberto, orientador

615.19 CDD

Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião

**Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da
atividade antitumoral**

Comissão Julgadora
da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
Orientador

Daniela Gonçalves Rando

Júlio Cezar Pastre

São Paulo, 14 de abril de 2014.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha avó,
Thereza A. Frojuello, meu exemplo
de caráter, determinação e força.*

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do presente trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho, primeiramente, por ter me incentivado, acreditado em mim e por me conceder a oportunidade de trabalharmos lado a lado. Suas aulas de Química Farmacêutica, na graduação, me inspiraram e me mostraram qual rumo tomar na minha vida profissional. Saiba que te tenho como pai e que nestes anos pude aprender valiosos ensinamentos em Química Medicinal, e que, além disso, levarei comigo os valores que me passou e boas lembranças. Obrigada pelo constante apoio, paciência e amizade.

À minha avó, pelo amor, extrema dedicação e apoio. Sem a senhora essa conquista não seria possível. Obrigada por ser um exemplo de vida, sabedoria e determinação.

À minha mãe, pelo grande incentivo aos estudos. Obrigada pelo amor incondicional, intensa participação na vida profissional, conversas encorajadoras e palavras de apoio.

À minha madrinha, Ana Maria Frojuello Capitani e padrinho, Roberto Capitani (in memoriam), por me incentivarem em momentos difíceis e me ensinarem a conduzir a vida com mais diversão e menos rigidez.

Ao homem da minha vida, Natanael Dante Segretti. Obrigada por me ensinar o que é o amor simples e verdadeiro e por estar ao meu lado acima de tudo. Você foi mais uma das grandes felicidades que a pós-graduação me trouxe e eu espero poder dividir o resto da minha vida com você.

Meu agradecimento especial à Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira, pelo amor à pesquisa e vida acadêmica. Obrigada pelos conselhos valiosos e por me ajudar em diversos momentos durante esses anos. A senhora é meu exemplo de educadora.

À pesquisadora Kerly Mesquita Pasqualoto, pelos ensinamentos na área de modelagem molecular e por me mostrar uma vertente

da Química Medicinal que me cativou profundamente. Seu otimismo e visão sobre o mundo científico me inspiraram e farão parte de decisões futuras.

À professora e amiga Michelle Polli, pelas conversas e incentivo profissional nestes anos. Você é um exemplo de educadora, esposa e mãe.

Às professoras Daniela Gonçalves Rando e Claudete J. Valuga, pela gentileza e grande contribuição no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Leoberto da Costa Tavares pela colaboração neste trabalho e por gentilmente conceder acesso ao software MOLSIM 3.2.

À Prof. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yaguí, pela amizade e conselhos valiosos.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, pela amizade e momentos de descontração.

Ao amigo e técnico de laboratório Charles de Lima Brito, pela ajuda, suporte e apoio em momentos difíceis.

À Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, pela oportunidade concedida e colaboração para meu processo de formação.

À aluna de doutorado Fanny Palace Berl, pela amizade e ajuda nos estudos de modelagem molecular.

Aos funcionários David, Elizabete e Alexandre, por sua cordialidade e presteza.

Ao amigo e irmão Michael Amorim. Obrigada por estar ao meu lado por tantos anos e por entender o meu jeito e me amar pelo que eu sou. Sua presença me faz uma pessoa mais feliz.

Ao amigo e companheiro de bancada Mauricio Temotheo Tavares, pelos anos de amizade, longas conversas e ótimos conselhos. Estamos juntos desde o começo neste árduo percurso, e assim, pudemos evoluir e amadurecer lado a lado. Obrigada por abrir meus olhos quando necessário e me falar aquilo que ninguém mais teve coragem de apontar. Nem sempre é fácil ouvir críticas, no entanto você me ajudou a crescer como ser humano.

Às amigas Rosânia Yang e Thaís Fernandes pelos momentos de descontração, pelos conselhos e constante apoio. A amizade que encontrei em vocês foi mais uma conquista da pós-graduação.

À amiga Marina Primi pela amizade e bons momentos vivenciados nesses anos.

Aos amigos e companheiros de laboratório Chimbica, Diego, Elys, Fernando, Fredson, Jeanine, Juliana Magalhães, Lorena, Marco, Ricardo, Soraya e Tacila. Obrigada por aguentarem minhas reclamações e fazer meus dias mais alegres. Sem vocês a pós-graduação não teria o mesmo significado.

Às amigas Livia Delgado, Paula Carvalho e Valéria Donato pelos momentos de descontração e pela compreensão. Vocês são meu porto seguro.

Aos amigos Carolina Brandão, Marcus Vinícius e Mayumi Marcela Machado Harada por entenderem meus períodos de ausência e não desistirem nunca de mim. Eu amo vocês.

A toda minha família e amigos que sempre foram fonte de apoio, compreendendo as muitas vezes em que se fez necessária minha ausência.

MEU AMOR!

“...Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes...”

Marthin Luther King

DAMIÃO, M. C. F. C. B. **Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da atividade antitumoral**. 2014. 153p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RESUMO

O número de casos de câncer tem aumentado significativamente em todo o mundo, principalmente a partir do século passado. Dessa forma, a busca por novas moléculas capazes de combater esta doença é cada vez maior, visto que muitos fármacos utilizados na terapêutica mostram-se tóxicos e pouco seletivos para células tumorais, causando efeitos adversos que muitas vezes alteram a qualidade de vida do paciente drasticamente. Muitos fármacos antineoplásicos tiveram sua origem relacionada aos produtos naturais. A capsaicina é o principal componente pungente das pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*, e seu efeito antitumoral é extensivamente discutido devido a sua capacidade de induzir apoptose seletivamente em diferentes linhagens de células cancerígenas. Este trabalho teve como objetivo utilizar a estratégia de modificação molecular para o planejamento racional de análogos funcionais da capsaicina, visando à obtenção de moléculas com atividade citotóxica superior. Os análogos foram sintetizados utilizando reações de uma única etapa baseadas em metodologias clássicas de acilação e caracterizados através de metodologias analíticas como espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , análise elementar e ponto de fusão. Posteriormente, foram avaliadas as atividades biológicas contra quatro linhagens tumorais (PC3, MACL-1, H1299, U138MG) e fibroblastos (3T3), utilizando o método de redução do MTT 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Três compostos (RPF306, 452 e 404) inibiram seletivamente o crescimento celular na faixa de concentração de micromolar (μM). Estudos teóricos adicionais revelaram que propriedades topológicas e eletrônicas influenciaram na discriminação de amostras e podem ser importantes no processo de reconhecimento molecular e, subsequentemente, na resposta biológica. Tais resultados indicam que amidas e ésteres aromáticos, como o RPF306 e 404 podem ser modelos interessantes para o planejamento de novas séries de moléculas seletivas e pouco tóxicas, que representem uma alternativa interessante no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Capsaicina, modificação molecular, atividade antitumoral, análise exploratória.

DAMIÃO, M. C. F. C. B. **Design and synthesis of capsaicin analogues and evaluation of antitumor activity.** 2014. 153p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ABSTRACT

Over the past century, the number of cancer cases has increased significantly worldwide. Therefore, the quest for discovery of new molecules able to treat the disease is increasing, since many drugs used in therapy are poorly selective and toxic to normal cells, causing adverse effects that often change dramatically the patient's quality of life. Many chemotherapeutic agents had its origin related to natural products. Capsaicin is the main component of pungent red peppers of the genus *Capsicum*, and its antitumor effect is extensively discussed, due to its ability to selectively induce apoptosis in several cancer cell lines. In this context, our research aims to use the strategy of molecular modification to the rational design of capsaicin functional analogues, in order to obtain molecules with superior cytotoxic activity. The analogues were synthesized using an one-step reaction, based on classical acylation methods and characterized by analytical methods such as ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, elemental analysis and melting point. Subsequently, their cytotoxicity were evaluated against four human cancer cell lines (PC3, MACL-1, H1299 and U138MG) and fibroblast (3T3) using the MTT - 3-(4,5 dimethyl thiazole-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium assay. Three compounds (RPF306, 452 and 404) selectively inhibited the growth of cancer cell lines at micromolar (μM) range. *In silico* studies revealed that topological and electronic properties mostly influenced the samples discrimination and also might be important for the molecular recognition process and, subsequently, biological response or function. The results indicate that aryl amides and esters, such as RPF306 and 404 might be interesting scaffolds to develop a novel series of compounds with higher selective and low toxicity that could represent an alternative in the treatment of cancer.

Keywords: Capsaicin, molecular modification, antitumor activity, exploratory analysis.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	22
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	CÂNCER	23
3.1.1	Aspectos Epidemiológicos	23
3.1.2	Fisiopatologia	25
3.1.3	Apoptose	28
3.1.4	Produtos naturais e terapia anticâncer	32
3.2	CAPSAICINA	38
3.3	PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS	42
3.3.1	Modelagem molecular	49
3.4	ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS	53
3.4.1	Análise de componentes principais (PCA, <i>principal component analysis</i>)	54
3.4.2	Análise de agrupamento hierárquico (HCA, <i>hierarchical clustering analysis</i>)	55
4.	PLANEJAMENTO DAS SÉRIES	57
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	60
5.1	MATERIAIS	60
5.1.1	Reagentes e solventes para síntese	60
5.1.2	Equipamentos para síntese	61
5.1.3	Reagentes, solventes e outros materiais para ensaios biológicos	61
5.1.4	Equipamentos para ensaios biológicos	62
5.1.5	Hardware e softwares para modelagem molecular	62
5.2	MÉTODOS SINTÉTICOS	63
5.2.1	Acilação com cloretos de ácido	64

5.2.2 Acilação com ácidos carboxílicos	65
5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	66
5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em Coluna (CC)	66
5.3.2 Espectrometria por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	66
5.3.3 Análise Elementar	66
5.3.4 Ponto de Fusão	66
5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS	67
5.4.1 Manutenção das culturas celulares	67
5.4.2 Citotoxicidade	67
5.5 MODELAGEM MOLECULAR	69
5.5.1 Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D)	69
5.5.2 Cálculo das propriedades moleculares	71
5.5.3 Análise exploratória de dados: HCA e PCA	74
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.1 SÍNTESE	74
6.1.1 Acilação com cloretos de ácido	76
6.1.2 Acilação com ácidos carboxílicos	78
6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	82
6.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN ^1H	82
6.2.1.1 Compostos da série I (ésteres)	82
6.2.1.2 Compostos da série II (amidas)	86
6.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – RMN ^{13}C	90
6.2.2.1 Compostos da série I (ésteres)	90
6.2.2.2 Compostos da série II (amidas)	93
6.2.3 Análise Elementar	95
6.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA	99

6.4	MODELAGEM MOLECULAR	104
6.4.1	Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D)	104
6.5.2	Cálculo das propriedades moleculares	108
6.5.3	Análise exploratória de dados: HCA e PCA	122
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	127
8.	REFERÊNCIAS	131
9.	ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS	150
10.	ANEXOS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas brutas de incidência das localizações primárias (exceto pele não melanoma) estimadas para 2014, em homens e mulheres, Brasil.	24
Figura 2 – Ciclo celular e suas fases.	26
Figura 3 – Vias bioquímicas indutoras da apoptose.	29
Figura 4 – Alcaloides da Vinca.	34
Figura 5 – Polifenóis com atividade antitumoral.	36
Figura 6 – Piplartina: produto natural com atividade antitumoral.	37
Figura 7 – Estrutura química da capsaicina.	38
Figura 8 – Análogo funcional da capsaicina com atividade antiproliferativa.	42
Figura 9 – Estruturas dos inibidores de histona desacetilase.	46
Figura 10 – Diagrama de Craig.	48
Figura 11 – Estrutura química da nifuroxazida.	49
Figura 12 - Modificações moleculares propostas.	57
Figura 13 – Estruturas de agentes antitumorais que possuem a subunidade 1,3-benzodioxólica.	58
Figura 14 - Esquema geral de síntese para obtenção dos análogos.	63
Figura 15 – Mecanismo de reação para obtenção das amidas e ésteres.	78
Figura 16 – Formação de ligação amida, utilizando EDC como agente acoplante.	80
Figura 17 – Utilização de DMAP para evitar a formação do subproduto <i>N</i> -aciluréia.	81
Figura 18- Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para identificação dos compostos da série I.	85
Figura 19 – Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para identificação dos compostos da série II.	89
Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C indicando os principais sinais para identificação dos análogos da capsaicina da série I.	93
Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C indicando os principais sinais para identificação dos análogos da capsaicina da série II.	95
Figura 22 – Representação da construção dos modelos moleculares 3D (capsaicina e análogos).	105
Figura 23 – Representação dos confôrmeros de menor energia dos análogos e capsaicina.	108
Figura 24 – Mapas de potencial eletrostático (MPEs) da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459.	110

Figura 25 – Mapas de potencial lipofílico (MPLs) da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459.	113
Figura 26 – Mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459.	116
Figura 27 – Vetores de dipolo da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459.	117
Figura 28 (A) – seleção de fatores.	124
Figura 28 (B) – gráfico de escores para a PC1 <i>versus</i> PC2.	124
Figura 28 (C) – pesos das variáveis independentes.	124
Figura 28 (D) – diagnóstico de <i>outliers</i> pela distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis.	124
Figura 29 – Dendrograma encontrado para a análise de HCA.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados na síntese dos análogos das séries I e II.	63
Tabela 2 – Resultados obtidos na síntese dos ésteres.	74
Tabela 3 – Resultados obtidos na síntese das amidas.	75
Tabela 4 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série Ia.	83
Tabela 5 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série Ib.	84
Tabela 6 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série IIa.	87
Tabela 7 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série IIb.	88
Tabela 8 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série Ia.	91
Tabela 9 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série Ib.	91
Tabela 10 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série IIa.	94
Tabela 11 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série IIb.	94
Tabela 12 – Valores teóricos e experimentais obtidos na Análise Elementar para a série I (ésteres).	97
Tabela 13 - Valores teóricos e experimentais obtidos na Análise Elementar para a série II (amidas).	98
Tabela 14 – Inibição do crescimento celular ($\text{IC}_{50}\mu\text{M}$) nas linhagens tumorais PC3, MACL-1, H1299, U138MG e 3T3 (fibroblasto).	99
Tabela 15 – Valores dos coeficientes de partição calculados no programa Marvin Beans.	112
Tabela 16 – Descritores calculados para os compostos da série I e II e capsaicina.	119

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Absorbância

AIF – *Apoptosis Induction Factor* (Fator indutor de apoptose)

AM1: *Austin model 1*

APAF-1: Fator de ativação de protease associado à apoptose 1

Apo2L: *Apoptosis antigen 2* (Antígeno de apoptose 2)

Apo3L: *Apoptosis antigen 3* (Antígeno de apoptose 3)

ASA: Superfície acessível à solvente

ASA+: Superfície acessível à solvente de todos os átomos com os átomos com carga parcial positiva

ASA-: Superfície acessível à solvente de todos os átomos com os átomos com carga parcial negativa

ASA_h: Superfície acessível à solvente de todos os átomos hidrofóbicos

ASA_p: Superfície acessível à solvente de todos os átomos hidrofílicos

B3LYP: Modelo do funcional de troca híbrido de 3 parâmetros de Becke e do funcional de correlação de Lee-Yang-Parr

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2* (Linfoma de células B)

Bcl-XL: *B-cell lymphoma extra large* (Linfoma de células B extra grande)

CAD: *Caspase Activated DNase* (DNase ativada por caspase)

CC: Cromatografia em coluna

CCD: Cromatografia em camada delgada

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CHELPG: *Charges from electrostatic potentials using a grid based method* (Cargas de potencial eletrostáticos baseado no método *grid*)

ClogP: Coeficiente de partição calculado

DCM: Diclorometano

DFT: *Density functional theory* (Teoria do funcional de densidade)

DIABLO: *Direct IAP - Binding Protein with Low pI* (Proteína de ligação-IAP direta com baixo pI)

DCU: Díciclo-hexiluréia

DM: Dinâmica molecular

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DR3: *Decoy Receptor 3* (Receptor Decoy 3)

DR4: *Decoy Receptor 4* (Receptor Decoy 4)

DR5: *Decoy Receptor 5* (Receptor Decoy 5)

E₁₋₄: Energias intramoleculares de interações do tipo 1-4

E_{BEND}: Energias intramoleculares de deformação angular

E_{CHARGE}: Energias intramoleculares de interações de energia eletrostática

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodi-imida

EDU: 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etiluréia

E_{HOMO}: Energia do orbital de fronteira HOMO

E_{ligH}: Energias intramoleculares de ligação de hidrogênio

E_{LUMO} : Energia do orbital de fronteira LUMO
 ERK: Quinases controladas pela sinalização extracelular
 ERO's: Espécies reativas de oxigênio
 E_{solv} : Energias intramoleculares de solvatação
 E_{STRETCH} : Energias intramoleculares de deformação axial
 Et_3N : Trietilamina
 E_{TORS} : Energias intramoleculares de deformação torsional
 E_{TOT} : Energia potencial total
 E_{vdW} : Energias intramoleculares de interações de van der Waals
 FADD: *Fas Associated Death Domain* (Domínio de morte associado ao Fas)
 FasL: Ligante Fas
 FasR: Receptor Fas
 FBDD: *Fragment-based drug design* (Desenvolvimento de fármacos baseado em fragmentos)
 GAP: Diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO}
 HCA: *Hierarchical cluster analysis* (Análise de agrupamentos hierárquicos)
 HCl: Ácido clorídrico
 HOMO: *Highest occupied molecular orbital* (Orbital molecular ocupado de maior energia)
 IAP – *Inhibitors of apoptosis proteins* (Proteínas inibidoras da apoptose)
 IC_{50} : *Half maximal inhibitory concentration*
 J : Constante de acoplamento
 JKN: Proteínas quinase c-Jun ativadas pelo estresse
 LBDD: *Ligand based drug design* (Planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante)
 LUMO: *Lowest unoccupied molecular orbital* (Orbital molecular desocupado de menor energia)
 MAPK: Família de proteínas quinase ativadas por mitógeno
 MPES: *Maps of electrostatic potential* (Mapas de potencial eletrostático)
 MLPs: *Maps of lipophilicity potential* (Mapas de potencial de lipofiliidade)
 MM2: Campo de força empírico
 MM+: Campo de força derivado do MM2
 MR: Refratividade molar
 MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
 PAC: Perfil de amostragem conformacional
 PBS: Phosphate buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)
 PC: Componente principal
 PCA: *Principal component analysis* (Análise de componentes principais)
 PLS: *Partial Least Squares* (Regressão por mínimos quadrados parciais)
 PM3: *Parametric Method 3* (Método Paramétrico 3)
 QSAR: *Quantitative structure-activity relationships* (Relações quantitativas estrutura-atividade)
 RMSD: *Root mean square deviation* (desvio médio da raiz quadrada)
 RMN ^{13}C : Ressonância magnética nuclear de carbono
 RMN ^1H : Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
 RPMI 1640: Meio de cultura desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial®
 SAHA: *Suberoylanilide hydroxamic acid* (Ácido hidroxâmico suberoilânilida)
 SAR: *Structure-activity relationship* (Relação estrutura-atividade)
 SIMCA – *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (Modelos independentes de similaridade utilizando componentes principais)
 SBDD: *Structure based drug design* (Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor)
 Smac: *Second mitochondria - derived activator of caspases* (Segundo ativador mitocondrial de

caspase)

TMS: Tetrametilsilano

TNF: *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF)

TRADD: *Tumor necrosis factor Receptor type 1 - Associated Death Domain* (Domínio de morte associado ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1)

TRPV1: *Transient receptor potential vanilloid 1* (Receptor de potencial transitório vanilóide 1)

UV: Ultravioleta

WHO/OMS: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

δ : Deslocamentos químicos em ressonância magnética nuclear

μ : Momento dipolo

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer ganhou grandes dimensões, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, espera-se 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, sofrerão com esta doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda, como o Brasil (INCA, 2014).

Apesar de muitos esforços na manutenção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia combinada, existe uma necessidade iminente no desenvolvimento de agentes mais seletivos e menos tóxicos (Geyer et al., 2006). Uma das características mais marcantes das células tumorais é a evasão à apoptose, processo controlado bioquimicamente para a eliminação definitiva de células danificadas (Jin, El-Deiry, 2005). A perda no controle da apoptose é observada em muitos tipos de câncer. Assim, as vias associadas a esse processo mostram-se fontes de alvos interessantes no desenvolvimento de fármacos (Fesik, 2005; Kaufmann, Earnshaw, 2000).

Produtos naturais, principalmente metabólitos secundários produzidos por plantas, têm sido muito utilizados como fonte de novos agentes farmacológicos. As estruturas de origem vegetal possuem grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que possibilitam que estas moléculas tornem-se compostos líderes e protótipos para o planejamento de análogos mais ativos (Koehn, Carter, 2005). Recentemente, a capsaicina ou *trans*-8-metil-*N*-vanilil-6-nonanamida, principal componente pungente e irritante das pimentas do gênero *Capsicum*, demonstrou inibir seletivamente o crescimento de células tumorais (Maity et al., 2010), além de induzir apoptose em uma variedade de linhagens celulares (Huang et al., 2009; Sánchez et al., 2007; Ito et al., 2004). No entanto, as vias bioquímicas associadas a estes efeitos não são totalmente conhecidas e estudos adicionais são

necessários para uma futura elucidação do mecanismo molecular. Além disso, existe uma real importância em desvendar se derivados da capsaicina, com similaridade química, apresentarão similaridade biológica e um perfil terapêutico equivalente ou superior.

Desta forma, a capsaicina pode ser considerada como um composto líder com potencial para o desenvolvimento de novas moléculas com ação anticâncer. Neste contexto, novos análogos funcionais da capsaicina foram sintetizados por metodologias simples que envolvem uma etapa reacional, partindo-se do álcool piperonílico para formação de derivados éster e de piperonilamina para obtenção de amidas. A identificação e caracterização dos produtos foram realizadas por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e por análise elementar. Estas moléculas foram ensaiadas frente a linhagens celulares de câncer de próstata (PC3), mama (MACL-1), pulmão (H1299), glioblastoma (U138MG) e culturas primárias de fibroblastos (3T3). Três moléculas apresentaram citotoxicidade promissora na concentração de micromolar. O análogo RPF306 mostrou-se ativo contra todas as linhagens testadas, enquanto o composto RPF452 foi ativo contra linhagens de câncer de mama e glioblastoma e o RPF404 inibiu o crescimento de linhagens tumorais de pulmão e próstata.

Além disso, estudos *in silico* foram realizados no intuito de estabelecer relações qualitativas entre estrutura e propriedade, uma vez que as propriedades moleculares previamente calculadas são diretamente relacionadas às estruturas químicas dos análogos. Os resultados obtidos na análise exploratória de dados indicam que descritores topológicos e eletrônicos possuem maior influência na discriminação das moléculas e assim, podem ser importantes no processo de reconhecimento molecular, ou seja, na interação do ligante com um provável alvo biológico.

Deste modo, os resultados obtidos revelam que análogos funcionais da capsaicina podem fornecer arcabouços estruturais interessantes no planejamento de agentes antitumorais potentes, com alta seletividade e pouco tóxicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver duas novas séries de análogos funcionais da capsaicina, visando explorar sua citotoxicidade e as propriedades moleculares mais relevantes para a atividade biológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Planejamento de novos análogos da capsaicina, utilizando as estratégias de modificação molecular;
- Síntese dos análogos, exploração e otimização de rotas sintéticas alternativas;
- Determinação da citotoxicidade dos compostos sintetizados em linhagens celulares humanas de câncer de próstata (PC3), câncer de mama (MACL-1), câncer de pulmão (H1299), glioblastoma (U138MG) e culturas primárias de fibroblastos (3T3);
- Construção de modelos moleculares tridimensionais, determinação das propriedades moleculares e realização de análise exploratória dos dados obtidos, na tentativa de estabelecer características importantes para o reconhecimento molecular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER

3.1.1 Aspectos Epidemiológicos

Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Esta situação vem mudando nas últimas quatro décadas, onde a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, como o Brasil (INCA, 2013).

Assim, o câncer ganhou maior dimensão e consolida-se, cada vez mais, como problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Guerra, Gallo, Mendonça, 2005). Existem mais de cem tipos de câncer e como exemplos, pode-se citar o de pele, pulmão, mama, fígado, estômago, rim, ovário, cérebro, próstata, pâncreas e ossos, sendo responsáveis anualmente pela morte de mais de sete milhões de pessoas em todo mundo (GLOBOCAN, 2014). Uma estimativa para o ano de 2014, realizada pelo Instituto Nacional de Câncer ou INCA, prevê a ocorrência de aproximadamente 580 mil novos casos de câncer em que os tipos mais incidentes serão, para o sexo masculino, o de câncer de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto, estômago, cavidade oral, leucemias e esôfago. Para o sexo feminino, destacam-se, entre os oito mais incidentes, os tumores de pele não melanoma, mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão, estômago, tireoide e ovário (INCA, 2014) (Figura 1). A prevalência desta doença tem aumentado de maneira significativa no último século e este resultado está relacionado, entre outros aspectos, à industrialização e urbanização ocorridas neste período (Garófolo et al., 2004).

Figura 1 – Taxas brutas de incidência das localizações primárias (exceto pele não melanoma) estimadas para 2014, em homens e mulheres, Brasil.

Fonte: INCA, Estimativa 2014 Incidência de Câncer no Brasil, 2014

Adicionalmente, seguindo a tendência mundial, notam-se no Brasil processos de transição que têm produzido importantes mudanças no perfil de enfermidades que acometem a população. Observa-se, a partir dos anos 1960, que as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças cardiovasculares e neoplasias (Schramm et al., 2004). Essa progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas, conhecida como transição epidemiológica, tem como principal fator o envelhecimento da população, resultante das ações de promoção e recuperação da saúde (INCA, 2013).

As doenças neoplásicas são uma das principais causas de morte no mundo e contabilizaram 7,6 milhões de óbitos (em torno de 13% do total) em 2008 (WHO, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com esta doença. O maior efeito deste aumento vai incidir em países de baixa e média renda (Rodrigues, Amaral, 2012).

Considerando a presente situação, a descoberta de novas alternativas para o combate ao câncer é urgente, visto que os tratamentos utilizados são muitas vezes ineficazes e que muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou

até mesmo desenvolvem resistência a estes agentes (Vechia, Gnoatto, Gosmann, 2009; Formariz et al., 2004).

3.1.2 Fisiopatologia

O termo câncer é utilizado para designar mais de uma centena de diferentes doenças heterogêneas, que surgem a partir de alterações essenciais na fisiologia da célula e que, coletivamente, contribuem para o crescimento de tumores malignos (Rubin, 2010). A neoplasia é definida como o crescimento autônomo de tecidos que escaparam das restrições normais da proliferação celular, exibindo graus variáveis de fidelidade aos seus tecidos originais, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro (National Cancer Institute, 2012). Os tumores são neoplasias sólidas que podem ser considerados benignos - ou seja, não penetram as margens do tecido adjacente, permanecendo localizados, ou malignos, que têm a propriedade de invadir tecidos contíguos e metastatizar locais distantes (Almeida et al., 2004; Formariz et al., 2004).

Uma série de estudos evidencia que a tumorigênese é um processo multi etapas que reflete alterações genéticas, levando a uma transformação progressiva de células normais em células filhas altamente malignas (Guembarovski, Mara, Cólus, 2008).

Os genes presentes no núcleo celular especificam sequências de aminoácidos que originarão proteínas essenciais para o funcionamento celular. Mutações em um gene podem perturbar a célula, alterando a quantidade ou função das proteínas sintetizadas, porém o aparecimento de um clone de células tumorais, ou seja, uma alteração genética é um evento relativamente raro. Isto ocorre porque a célula necessita romper uma série de barreiras para se tornar maligna. Os próprios pontos de controle ou *check points* são mecanismos de controle do ciclo celular que garantem a fidelidade no processo de

divisão e representam barreiras primárias ao surgimento de uma célula transformada (Tachibana, Gonzalez, Coleman, 2005; Ward, 2002).

O ciclo celular é tradicionalmente dividido nas fases: G_1 , G_2 , S e M, sendo que a mitose ocorre na fase M - dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 2). A replicação do DNA acontece especificamente na fase S (síntese), precedida pelo intervalo G_1 , onde a célula aumenta de tamanho e prepara-se para duplicar seu DNA e seguida pela fase G_2 , durante a qual ocorre o preparo para a mitose (fase M) (Vermeulen, Bockstaele, Berneman, 2003). Esta sequência de fases, com seus respectivos pontos de controle, permite que a célula complete seu ciclo normal sem dar origem a células anormais.

Figura 2 – Ciclo celular e suas fases.
Fonte: Virtual Genetics Education Centre, 2014 (modificado).

A divisão celular normal é positivamente regulada por meio de vias sinalizadoras e proteínas reguladoras que permitirão a progressão de uma fase a outra do ciclo celular. Por outro lado, um grupo de inibidores do ciclo atua impedindo ou

regulando negativamente essas vias sinalizadoras (Tachibana, Gonzalez, Coleman, 2005; Vermeulen, Bockstaele, Berneman, 2003).

Anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular – *proto-oncogenes* - como nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular – *genes supressores tumorais* – podem levar à desregulação do ciclo e conferir um crescimento descontrolado (Ward, 2002). Os genes que atuam de forma positiva, induzindo ou estimulando a progressão do ciclo, são chamados de proto-oncogenes, pois ao sofrerem mutações se tornarão oncogenes, cuja ação permitirá ganho de função à célula mutante. Em contrapartida, as proteínas envolvidas no controle negativo são codificadas pelos assim chamados, genes supressores tumorais. Mutações neste grupo de genes se manifestam pela falta de ação dos mesmos e como resultado geral destas alterações ocorre perda dos mecanismos controladores do ciclo celular normal, levando a uma característica marcante da maioria das células tumorais, a proliferação descontrolada (Costa-Lotufo et al., 2010; Guembarovski, Mara, Cólus, 2008; Kumar, Abbas, Fausto, 2005; Ward, 2002; Rivoire et al., 2001).

Hanahan e Weinberg (2011) sugerem seis alterações essenciais na fisiologia da célula normal, que coletivamente ditam o crescimento maligno: autossuficiência de sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais anti-crescimento, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase. Cada uma dessas alterações fisiológicas – habilidades adquiridas pela célula durante o desenvolvimento do tumor – representa a violação dos mecanismos de defesa contra a formação de células neoplásicas. As seis capacidades citadas são características em comum na maioria dos tipos de câncer (Rubin, 2010; Guembarovski, Mara, Cólus, 2008; Martinez et al., 2006).

A morte celular por apoptose serve como uma barreira natural contra o desenvolvimento de células tumorais e é ativada em resposta ao estresse fisiológico ou ao tratamento com agentes anticâncer. Como mencionado, muitas células desenvolvem formas de driblar e evadir à apoptose, onde nota-se um desequilíbrio neste mecanismo resultante de níveis elevados na sinalização de oncogenes e da hiperproliferação associada a danos no DNA. A elucidação da sinalização que governa o processo apoptótico é fundamental, uma vez que estudos revelam a atenuação deste em tumores que progridem a estágios malignos e resistentes à terapia (Grivicich, Regner, Rocha, 2007).

3.1.3 Apoptose

A morte celular programada ou apoptose é um processo natural para a remoção de células não desejadas (Grivicich, Regner, Rocha, 2007; Fesik, 2005; Hengartner, 2000). Ocorre normalmente durante o desenvolvimento, envelhecimento ou como um mecanismo homeostático na manutenção da população celular em tecidos. A desregulação deste processo pode romper o equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular, levando ao aparecimento de doenças como o câncer.

O mecanismo de apoptose é um processo coordenado, complexo e sofisticado, que basicamente envolve a ativação de cisteíno proteases, chamadas caspases e de uma cascata complexa de eventos que ligam o estímulo inicial à morte celular. As caspases são sintetizadas como pró-formas inativas, e quando ativadas clivam outras proteínas nas proximidades dos resíduos de ácido aspártico. Além disso, podem ativar umas às outras em uma cascata proteolítica e são divididas em iniciadoras e efetoras. Caspases iniciadoras (caspase-8 e 9) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras, e as caspases efetoras (caspases-3, 6 e 7) clivam outros substratos proteicos da célula resultando no processo apoptótico (Elmore, 2007).

As duas principais vias apoptóticas consideradas são: a *via extrínseca* ou *via do receptor de morte celular* e a *via intrínseca* ou *via mitocondrial* (Figura 3). No entanto, existem evidências de que estas vias estão interligadas e que moléculas de uma via podem influenciar a outra (Chen, Wang, 2002; Igney, Krammer, 2002; Hengartner, 2000; Kaufmann, Earnshaw, 2000).

Figura 3 – Vias bioquímicas indutoras da apoptose.
Fonte: Adaptado de Elmore, 2007.

A via extrínseca, iniciadora da apoptose envolve interações mediadas por receptores de morte transmembrânicos pertencentes à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*). Estes receptores possuem domínios extracelulares que, quando ativados por determinados ligantes, transmitem o sinal de morte da superfície celular para vias sinalizadoras intracelulares. Atualmente os ligantes e receptores correspondentes melhor caracterizados são: FasL/FasR, TNF- α /TNFR1,

Apo3L/DR3 (*Apoptosis antigen 3/Decoy Receptor 3*), Apo2L/DR4 (*Apoptosis antigen 2/Decoy Receptor 4*) e Apo2L/DR5 (*Apoptosis antigen 2/Decoy Receptor 5*) (Elmore, 2007; Kumar, Abbas, Fausto, 2005; Rubio-Moscardo et al., 2005; Amarante-Mendes, 2003; Suliman et al., 2001).

Após ativação dos receptores de morte pela interação com o respectivo ligante, proteínas citoplasmáticas adaptadoras são recrutadas e estas possuem domínios que se ligam aos receptores. Por exemplo, a interação do FasL com o FasR resulta na ativação e ligação da proteína adaptadora de domínio de morte associada a Fas (FADD – *Fas Associated Death Domain*), e a interação do ligante TNF ao receptor TNF resulta na ligação da proteína adaptadora de domínio de morte associada ao TNF (TRADD – *Tumor necrosis factor Receptor type 1 - Associated Death Domain*) que, por sua vez, recruta diretamente o FADD, e este forma um complexo indutor da sinalização de morte com a pró-caspase-8, resultando na ativação auto catalítica da mesma. Uma vez ativa a caspase-8, inicia-se a fase de execução da apoptose, onde caspases efetoras, assim como as caspases- 3, 6 e 7, são ativadas e esta cascata proteolítica resulta na morte celular (Fulda, Debatin, 2006; Fulda, Debatin, 2004; Wajant, 2002).

A via intrínseca envolve diversos estímulos não mediados por receptores, produtores de sinais intracelulares que são iniciados por eventos mitocondriais. Esses sinais podem agir de forma positiva ou negativa, sendo que sinais negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas levando à indução no mecanismo de apoptose. Em outras palavras, ocorre uma deficiência de fatores específicos, perda da supressão apoptótica e subsequente ativação da morte celular. Estímulos que atuam de maneira positiva incluem: radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (Elmore, 2007; Fulda, Debatin, 2006).

Todos esses estímulos causam mudanças na membrana mitocondrial interna e resultam na abertura de poros, perda do potencial de membrana da mitocôndria e liberação de dois grupos de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembrana para o citosol (Saelens et al., 2004). O primeiro grupo consiste nas proteínas: citocromo *c*, Smac/DIABLO (*Second mitochondria - derived activator of caspases/ Direct IAP - Binding Protein with Low pI*) e a serina protease HtrA2/Omi, que ativam a via mitocondrial dependente de caspases. Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com o fator de ativação de protease associado à apoptose 1 (APAF-1) e a pró-caspase-9, chamado apoptossomo. A formação deste aglomerado libera a caspase-9, ativadora da caspase-3 efetora. Adicionalmente, as proteínas Smac/DIABLO e HtrA2/Omi promovem a apoptose pela inibição de proteínas inibidoras da apoptose (IAP – *inhibitors of apoptosis proteins*) (Cande et al., 2002; Saelens et al., 2004).

O outro grupo de proteínas pró-apoptóticas, formado pelo fator indutor de apoptose (AIF – *Apoptosis Induction Factor*), a endonuclease G e a DNase ativada por caspase (CAD – *Caspase Activated DNase*), é liberado da mitocôndria tardiamente, após a célula ter iniciado o processo de morte. Neste caso, observa-se fragmentação do DNA e condensação da cromatina não dependente de caspases (Li, Luo, Wang, 2001; Susin et al., 2000).

O controle e regulação dos processos apoptóticos associados à via mitocondrial são realizados por membros da família de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), que governam a permeabilidade da membrana mitocondrial e podem ter efeito pró-apoptótico ou anti-apoptótico. A proteína supressora *p53* tem papel crucial na regulação desta família, entretanto o mecanismo regulatório exato não foi totalmente elucidado. Algumas das proteínas anti-apoptóticas incluem: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e algumas pró-apoptóticas incluem: Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim e Bik. Essas

proteínas têm uma significância especial, uma vez que podem determinar se a célula compromete-se com a apoptose ou aborta este processo. Assim, a essência desta via consiste no equilíbrio entre proteínas indutoras e inibidoras da apoptose e na ativação de vias bioquímicas que desencadeiam o processo de morte celular (Meça, 2010; Meiler, Schuler, 2006; Elmore, 2007; Kumar, Abbas, Fausto, 2005; Hengartner, 2000).

A compreensão dos mecanismos apoptóticos permite o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer, pois dentro deste complexo mecanismo de sinalização, novos ligantes podem caracterizar-se como moléculas promissoras, visando a restauração do processo natural da célula (Grivicich, Regner, Rocha, 2007; Amarante-Mendes, 2003; Kaufmann, Earnshaw, 2000).

3.1.4 Produtos naturais e terapia anticâncer

O aumento na recorrência de tumores malignos e efeitos adversos graves causados pelo tratamento com agentes quimioterápicos reduzem a eficiência clínica de uma variedade de fármacos utilizados na terapêutica antineoplásica atual. Portanto, existe uma necessidade constante de desenvolvimento de novas moléculas alternativas, complementares e sinérgicas que apresentem efeitos adversos mínimos.

A análise detalhada de vias bioquímicas e mecanismos celulares tem levado a grandes avanços na terapêutica. Além disso, o estabelecimento de linhagens celulares e estudo dos efeitos de compostos naturais e de origem sintética também têm contribuído significativamente. Apesar da importante toxicidade vinculada à quimioterapia, à irradiação e à imunoterapia, estas são alternativas consideradas “padrão ouro” no tratamento do câncer (Ali et al., 2012).

Além das opções clássicas, a utilização de compostos de origem natural, mostra-se interessante na busca por compostos líderes no controle do câncer. Devido à toxicidade dos agentes antitumorais atualmente empregados, muitos produtos naturais vêm sendo triados, mostrando-se menos tóxicos e mais seletivos, sendo fruto de estudos extensivos e aprofundados (Ali et al., 2012).

O uso de produtos naturais e seus derivados têm produzido compostos líderes importantes e o século XX representou um grande avanço neste campo de pesquisa, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica (Figura 4). Dentre estas se destacam, os alcaloides da Vinca, derivados da *Catharanthus roseus*, que compõe a classe de antineoplásicos mais estudada até o momento. Alcaloides diméricos em combinação com quimioterapia vêm sendo extensivamente utilizados no tratamento de tumores sólidos. Os alcaloides da Vinca atualmente disponíveis, vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina são usados diariamente na prática clínica. Dentre os vários derivados sintéticos, somente a vindesina e vinorelbina, análogos semi-sintéticos da vimblastina, são empregados na terapêutica, e recentemente um novo análogo, conhecido como vinflunina foi desenvolvido (Dumontet, Jordan, 2010; Fahy et al., 2008).

Figura 4 – Alcaloides da Vinca.

As propriedades antitumorais destas moléculas são atribuídas a sua interação com a tubulina, o componente majoritário dos microtúbulos no fuso mitótico. Esses fármacos interferem na dinâmica e organização dos microtúbulos, resultando em parada do ciclo celular na fase M, mais especificamente na metáfase. A vinorelbina e vinflunina são a segunda geração desta classe, e suprimem a taxa e extensão do crescimento dos microtúbulos, afetando as funções do fuso mitótico e levando a modificações na progressão do ciclo celular e consequente morte celular. Uma série de estudos relata a grande eficácia e superioridade da vinflunina em relação à vinorelbina

(Fahy et al., 2008; Hill, 1999; Kruczynski et al., 1998). A vinflunina foi descoberta pela superacidificação da vinorelbina com o ácido fluorídrico, em uma estratégia empregada para a obtenção de novos derivados dos alcaloides da Vinca. O tratamento de análogos, assim como a vinorelbina e a vincristina, com ácidos muito fortes, se mostrou como uma tentativa de modificar estas moléculas em posições não acessíveis em outros métodos sintéticos clássicos. Pequenas modificações, como por exemplo, a presença de flúor na molécula, estão associadas a alterações na interação com a tubulina. Desta forma, a vinflunina mostrou-se menos tóxica e mais potente em estudos *in vivo*. Sua aplicação associada a outros agentes antitumorais como gencitabina e capecitabina, no tratamento do câncer de mama metastático, é segura e apresenta efeitos adversos mínimos (Campone et al., 2012; Tournoux-Facon et al., 2011; Kruczynski et al., 2006; Kruczynski et al., 2002; Ngan et al., 2001).

Outras moléculas de origem natural também merecem atenção. Principalmente estruturas simples, que possuam uma rota sintética viável e, de preferência, sem centros quirais, os quais podem se tornar um problema nos processos de purificação. Um exemplo interessante de moléculas que representam compostos líderes com potencial atividade anticâncer são os polifenóis (Ramos, 2008). Mais de 8000 polifenóis de origem natural foram caracterizados e seus benefícios na prevenção do câncer são amplamente conhecidos. Alguns exemplos destas substâncias que possuem atividade antitumoral incluem: curcumina, resveratrol e genisteína (Figura 5) (Vauzour et al., 2010; Gopalakrishnan, Kong, 2008). O possível mecanismo antitumoral destes polifenóis é atribuído a remoção de agentes cancerígenos, modulação da sinalização intracelular e atividade enzimática antioxidante, indução da apoptose e parada do ciclo celular em diferentes linhagens celulares e modelos *in vivo* (Pan, Ho, 2008). Verificou-se a apoptose causada pelo aumento da expressão do ligante Fas e de caspases, assim

como pela inibição de proteínas reguladoras da apoptose, como Bcl-2 e Bcl-XL. Ou seja, esses agentes podem estar associados à modulação tanto da via intrínseca quanto da via extrínseca de indução da apoptose (Surh, 2008; Chen, Kong, 2004; Surh, 2003).

Figura 5 – Polifenóis com atividade antitumoral.

Outra molécula promissora, de origem natural é a piplartina (Figura 6), também conhecida como piperlongumina, um alcaloide/amida encontrado em espécies do gênero *Piper*, tais como *P. longum* L. (pimenta longa), *P. tuberculatum* L. (pimenta d'água) e *P. asborescens* Roxb. (pimenta do fruto ganchoso) (Govil, Singh, 2008). A piplartina pode ser obtida das raízes de *P. tuberculatum* num procedimento simples que envolve apenas duas etapas, com rendimento de 10,4%. Esta substância apresenta diversas propriedades biológicas, incluindo atividade citotóxica e antitumoral (Bezerra et al., 2005; Kong et al., 2008). Por comparação da citotoxicidade de moléculas com estruturas relacionadas, foi identificado que a presença da carbonila α,β -insaturada do anel amídico é essencial para a sua atividade citotóxica.

Figura 6 – Piplartina: produto natural com atividade antitumoral.

Com relação ao seu mecanismo de ação, a piplartina induziu apoptose em células leucêmicas HL-60, com participação da via intrínseca, de maneira dependente da concentração. No ensaio de atividade antitumoral *in vivo*, a piplartina mostrou eficácia em animais inoculados com Sarcoma 180, e efeitos tóxicos moderados e potencialmente reversíveis (Bezerra et al., 2008). Além disso, a combinação da piplartina com 5-fluorouracila levou ao aumento da inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Bezerra et al., 2008). Tais dados mostram o grande potencial de uma molécula de origem natural, estruturalmente simples, estudada por um grupo de pesquisa brasileiro (Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, LOE-UFC).

Apesar da introdução contínua de novos fármacos no arsenal terapêutico e da busca por protótipos de origem natural que sirvam como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas contra o câncer, vários tumores sólidos ainda não dispõem de tratamento adequado (Formariz et al., 2004). Muitos quimioterápicos mostram-se eficazes, entretanto a maioria destes agentes atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Nestes casos, o paciente sofre graves efeitos adversos causados pela alta toxicidade destas substâncias.

A química medicinal explora matérias primas naturais provenientes de diferentes fontes, com vistas à obtenção de compostos mais potentes, mais seletivos e menos tóxicos do que os fármacos já disponíveis no mercado (Koehn, Carter, 2005; Paterson, Anderson, 2005; Lee, 2004). Embora muitos estudos estejam voltados para as propriedades preventivas e antitumorais de compostos naturais, o exato mecanismo

molecular destes agentes ainda permanece incerto, particularmente a respeito do alvo biológico e das enzimas envolvidas neste processo. Entender a correlação entre os produtos naturais e as proteínas envolvidas nas diferentes vias bioquímicas é um passo relevante no desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos (Almeida et al., 2004; Capdeville et al., 2002; Gottesman, 2002).

3.2 CAPSAICINA

Capsaicinóides são compostos pungentes presentes nas pimentas, produzidos como metabólitos secundários. A capsaicina (Figura 7) (*trans*-8-metil-*N*-vanilil-6-nonanamida) é o principal componente das pimentas vermelhas que pertencem ao gênero *Capsicum* (família Solanaceae) (Aggarwal et al., 2008) e representa aproximadamente 60-70% dos capsaicinóides presentes em fontes naturais.

Figura 7 – Estrutura química da capsaicina.

Esta substância pode ser encontrada em estudos clínicos para dor neuropática e comercialmente em formulações tópicas (Capzasin-HP e Qutenza/NGX-4010) (Backonja, 2010) e injetáveis (Adlea/ALGRX-4975) (Szolcsányi; Sándor, 2012) para o tratamento da dor; aerossóis nasais para tratamento da rinite alérgica e enxaqueca (Civamide; Winston Laboratories) (Rapoport, 2012); suplementos alimentares para perda de peso (Inoue et al., 2007) e em aerossóis de pimenta para defesa pessoal (Reilly et al., 2012).

Diversas propriedades biológicas associadas aos capsaicinóides, e mais especificamente à capsaicina, vêm sendo relatadas como: atividade nematicida (Neves

et al., 2008); antibacteriana (Santos et al., 2011; Carvalho, Wiest, Cruz, 2010); anti-inflamatória (Kim et al., 2003; Surh, 2002); antioxidante (Lopes, Okura, 2005; Surh, 2002); gastroprotetora (Lopes, Okura, 2005; Omar et al., 1995); diminuição da gordura corporal, indução da termogênese e aumento na secreção de catecolaminas (Kang et al., 2010; Yoshioka et al., 2004; Yoshioka et al., 2000). A capsaicina mostra-se também como um potente analgésico, pois ao ser administrada prolongadamente causa dessensibilização e inativação dos neurônios sensoriais ou nociceptores pela indução seletiva dos receptores vanilóides do tipo 1 (TRPV1) (Caterina et al., 1997; Dray, 1992).

Recentemente, a capsaicina vem sendo investigada como agente antiproliferativo e seus efeitos nos vários estágios da carcinogênese e mutagênese têm sido extensivamente discutidos (Ip et al., 2012; Lee et al., 2012; Costa-Lotufo et al., 2010; Oyagbemi, Saba, Azeez, 2010; Chow et al., 2007). Pode-se observar atividade em células malignas: de próstata (Malagarie-Cazenave et al., 2011; Malagarie-Cazenave et al., 2009; Sánchez et al., 2007; Mori et al., 2006; Sánches et al., 2006); de cólon (Lee et al., 2012; Kim, Trudel, Wogan, 2009); da glia (Kim et al., 2010); de esôfago (Wu et al., 2006); de mama (Moon et al., 2012; Thoennissen et al., 2010); da nasofaringe (Ip et al., 2012); gástricas (Kim et al., 2009); hepáticas (Moon et al., 2012; Huang et al., 2009); pancreáticas (Zhang et al., 2008); leucêmicas (Tsou et al., 2006; Ito et al., 2004); e em melanócitos (Shin et al., 2009). O mecanismo pelo qual ocorre a inibição de células transformadas ainda permanece incerto, porém muitos estudos especulam e buscam esclarecer as vias bioquímicas responsáveis pela supressão do crescimento tumoral (Yang et al., 2009; Ito et al., 2004; Kim et al., 1997).

Um dos mecanismos propostos revela a indução de apoptose e parada do ciclo celular na fase G_0/G_1 em células tumorais, causadas através do aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular e de espécies reativas de oxigênio (ERO's), alteração no potencial de

membrana mitocondrial, liberação do citocromo *c*, ativação de caspase-3, promoção da expressão de Bax e redução nos níveis de Bcl-2 (Ip et al., 2012; Huang et al., 2009; Kim et al., 2009; Zhang et al., 2008; Sanches et al., 2006; Tsou et al., 2006; Wu et al., 2006).

A *p53* é uma proteína supressora de tumor que regula a resposta celular a danos no DNA, mediando interrupção do ciclo celular, reparo do DNA e morte celular (Grivicich, Regner, Rocha, 2007; Fett-Conte, Salles, 2004). Células tratadas com capsaicina podem apresentar uma superexpressão desta proteína, no entanto este mecanismo ainda permanece incerto (Ip et al., 2012; Mori et al., 2006; Wu et al., 2006). Evidências sugerem que em resposta a sinais de estresse, os níveis de *p53* são aumentados e sua atividade é aprimorada pela fosforilação do resíduo de serina-15, resultando na expressão de genes, que geram produtos pró-apoptóticos. Além disso, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) também está diretamente relacionada à fosforilação e ativação da *p53* (Chow et al., 2007; Ito et al., 2004).

Sánchez e colaboradores (2007) verificaram o aumento de ERO's em estudo feito com células de próstata cancerígenas PC-3 tratadas com capsaicina. O excesso desses radicais livres está associado ao acúmulo de ceramida intracelular e à ativação das proteínas quinase c-Jun ativadas pelo estresse (JKN), quinases controladas pela sinalização extracelular (ERK) e membros da família de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) (El-Najjar et al., 2010; Zhang et al., 2008; Fiorillo et al., 2005; Martínez-Salgado et al., 2005). Esta família possui importantes componentes da sinalização intracelular que regulam a proliferação celular, apoptose e diferenciação celular. Por sua vez, estes eventos levam a resposta apoptótica (Sánchez et al., 2007).

ERO's são mediadores de vias bioquímicas intracelulares. A produção excessiva dessas espécies leva ao estresse oxidativo, perda de função celular, e finalmente à

apoptose. Estudos mostram que a indução da apoptose causada pela capsaicina é iniciada pela produção de ERO's, seguida de superexpressão de Bax (proteína pró-apoptótica), disrupção do potencial de membrana mitocondrial, e liberação do citocromo *c* e fator indutor de apoptose (AIF) no citosol, ativando a cascata das caspases 9 e 3 (de-Sá-Júnior et al., 2013; Zhang et al., 2008).

Outro mecanismo relatado na literatura é o bloqueio da degradação de uma proteína denominada $I\kappa\beta$. A família desta proteína é responsável por manter o fator nuclear NF- $\kappa\beta$ inativo no citoplasma (Mori et al., 2006; Surh, 2002). O NF- $\kappa\beta$ pode ser ativado por agentes carcinogênicos e promotores de tumor, que causam a translocação do fator para o núcleo, onde este regula a expressão de vários genes envolvidos na tumorigênese (Maity, Sharma, Jana, 2010). Muitos agentes quimiopreventivos impedem a ativação do NF- $\kappa\beta$, assim como a capsaicina. Além disso, foi observado o bloqueio do fator de transcrição STAT-3, que pertence a uma família de proteínas responsáveis pela expressão de produtos envolvidos na sobrevivência celular, proliferação, quimioresistência e angiogênese (Aggarwal et al., 2008; Bhutani et al., 2007).

Aparentemente, a atividade observada nestes estudos não está relacionada à indução do receptor vanilóide TRPV1, indicando o envolvimento de outro alvo celular como relatado previamente (Maity, Sharma, Jana, 2010; Malagarie-Cazenave, et al., 2009; Mori, et al., 2006; Lee, Nam, Kim, 2000).

Adicionalmente, estudos demonstram que a capsaicina apresenta atividade diferenciada entre células normais e transformadas não causando efeitos colaterais nos testes realizados *in vivo*. Frente às diversas propriedades biológicas e o potencial citotóxico desta molécula, o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roberto Parise Filho vem desenvolvendo novas moléculas com base na estrutura química da capsaicina, e em

2013, um novo análogo funcional da capsaicina, RPF101 (Figura 8), apresentou atividade antitumoral superior na linhagem celular MCF-7 de adenocarcinoma mamário, induzindo parada do ciclo celular na fase G₂ e M, por causar distúrbios na rede de microtúbulos. Além disso, foram verificadas mudanças morfológicas características do processo apoptótico e diminuição no potencial de membrana mitocondrial (de-Sá-Júnior et al., 2013). Tal fato indica que a capsaicina pode ser utilizada como modelo para o planejamento de análogos com potencial atividade, representando alternativas de interesse na terapêutica do câncer (Kim et al., 2010; Aggarwal et al., 2008; Zhang et al., 2008; Kang et al., 2003).

RPF101
IC₅₀ = 32 μM

Figura 8 – Análogo funcional da capsaicina com atividade citotóxica.

3.3 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

Dentre os diversos métodos utilizados na busca de caminhos para o tratamento de doenças que afetam o ser humano, não há dúvidas de que o planejamento racional representa uma ferramenta importante (Silva, Silva, 2007; Montanari, Bolzani, 2001). Este processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, sendo profundamente ligado às inovações científicas e tecnológicas (Guido, Andricopulo, Oliva, 2010; Barreiro, 2002; Williams, 1993).

Para o desenvolvimento de novo candidato a fármaco elege-se o melhor alvo-farmacológico para aquela aplicação terapêutica e a escolha da estratégia de

planejamento mais adequada, depende do nível de conhecimento da estrutura do alvo biológico.

O conhecimento da macromolécula biológica permite a utilização do *planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor* (structure based drug design, SBDD) (Guido, Andricopulo, Oliva, 2010, Silva, Silva, 2007, Barreiro et al., 2002). Os grandes avanços da genômica e proteômica, associados aos avanços tecnológicos da biologia molecular proporcionam um aumento significativo no número de alvos moleculares com estruturas 3D disponíveis em bancos de dados (Hajduk, Greer, 2007).

As moléculas bioativas complementares ao alvo biológico cristalografado, podem ser encontradas a partir de triagens virtuais de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias. Bioensaios computadorizados propiciam a análise rápida de milhares de amostras, através de técnicas de ancoragem (*docking*) virtual (Barreiro, 2009). Uma alternativa mais recente é o *desenvolvimento de fármacos baseado em fragmentos* (fragment-based drug design, FBDD) que é realizado a partir da triagem de fragmentos moleculares (por exemplo, grupos funcionais) com o intuito de simplificar o processo e mapear diferentes elementos farmacofóricos necessários para uma alta afinidade entre o ligante e o alvo molecular. O conceito desta abordagem é otimizar adequadamente cada interação no sítio de ligação e subsequentemente incorporar em uma única molécula essas pequenas estruturas, gerando um composto com uma afinidade resultante da somatória de cada uma das interações individuais (Hajduk, Greer, 2007).

É importante ressaltar que em todos os casos, as propriedades biológicas devem ser determinadas experimentalmente, sendo necessário o desenvolvimento de ensaios padronizados e validados.

O *planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante* (ligand based drug design, LBDD) é utilizado na ausência da estrutura 3D do receptor e baseia-se no conhecimento de moléculas bioativas. Neste método, o planejamento de análogos é feito a partir de uma molécula conhecida e ativa, que serve como modelo para a realização de modificações moleculares, visando à otimização de propriedades como potência e segurança, garantindo um melhor perfil farmacodinâmico e farmacocinético dos derivados obtidos (Barreiro, 2009; Viegas Junior et al., 2009; Santos et al., 2007; Barreiro et al., 2002).

A modificação molecular apresenta-se como uma estratégia essencial no campo da Química Medicinal, pois é um dos métodos mais utilizados e recompensadores no planejamento de fármacos. Adicionalmente, novos análogos planejados podem apresentar perfil terapêutico superior, rota sintética viável e economicamente interessante. E ainda, as propriedades e características do composto ativo podem ser exploradas pelas alterações em sua estrutura de forma racional (Korolkovas, Burckhalter, 1988).

Dentre as modificações moleculares mais comuns efetuadas, com vistas à introdução de mudanças nas propriedades relacionadas às fases farmacodinâmicas e farmacocinéticas, estão a homologia linear e ramificada, que consiste na introdução de unidades metilênicas em uma cadeia hidrocarbônica presente na molécula e a introdução de grupos vinílogos, fenílogos e benzílogos. Tais modificações podem alterar propriedades moleculares interessantes como grau de flexibilidade da molécula,

volume e coeficiente de partição, consequentemente, modificando seu comportamento biológico (Barreiro, 2002).

Um planejamento de simplificação molecular pode ser efetuado para eliminação de centros estereogênicos, principalmente em moléculas de origem natural, que geralmente apresentam estruturas mais complexas. A abertura de anéis assim como o fechamento de anéis também representam modificações moleculares comumente empregadas. No último caso, algumas características podem ser manipuladas como graus de liberdade da molécula (Barreiro, 2002).

Outra modificação molecular amplamente utilizada é o bioisosterismo. Várias razões estão relacionadas à sua aplicação no planejamento de fármacos, incluindo a necessidade de otimizar a atividade farmacológica, ganho de seletividade em determinado subtipo de receptor ou isoforma de uma enzima, com redução simultânea de alguns efeitos adversos, ou até mesmo otimização de características farmacocinéticas (Lima, Barreiro, 2005).

A classificação de Burger define como bioisósteros clássicos átomos ou subunidades moleculares que possuam a mesma valência ou anéis equivalentes. Já os bioisósteros não clássicos abrangem subunidades que não obedecem à regra descrita anteriormente, porém que em alguma extensão possuem características semelhantes como: acidez, basicidade, tamanho ou número de grupo de doadores/aceptores de ligação de hidrogênio (Wermuth, 2008).

Uma aplicação interessante de diversas modificações moleculares e estudos de relação estrutura-atividade (REA) pode ser observada em trabalho realizado por Marks e Breslow (2007), ao desenvolver o vorinostat (Figura 9) ou ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA - *suberoylanilide hydroxamic acid*), membro da classe de

compostos inibidores das histonas desacetilases. Esta molécula causa parada do ciclo celular, morte de uma série de linhagens celulares tumorais e encontra-se em ensaios clínicos para o tratamento de tumores sólidos e hematológicos em doses bem toleradas pelos pacientes. A aplicação farmacológica deste composto para o tratamento de linfoma cutâneo de células-T foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2006 e a comercialização é feita pela Merck Sharp & Dohme (Lee et al., 2012; Butler, 2002).

Figura 9 – Estruturas dos inibidores de histona deacetilase.

A partir da observação da atividade citotóxica de um solvente polar, o dimetilsulfóxido (DMSO), iniciou-se o planejamento do vorinostate (Figura 9). Várias estruturas polares foram ensaiadas, sendo que as amidas simples apresentaram um perfil superior na atividade citotóxica. Foi feita a ligação de duas amidas por uma cadeia metilênica, sendo que o primeiro composto desta série foi a *bis*-acetamida hexametilênica (HMBA). Vários análogos com diferentes cadeias polimetilênicas entre as acetilamidas foram ensaiados, e o primeiro composto com seis unidades metilênicas, o HMBA, mostrou-se mais promissor. No entanto, esta molécula não foi suficientemente potente, e doses tóxicas eram requeridas para a observação do efeito antitumoral (Richon et al., 1998; Richon et al., 1996).

A forte correlação observada nos estudos de REA dos análogos foi um indicativo da interação destas moléculas com um alvo biológico específico. A partir

deste conhecimento introduziu-se o ácido hidroxâmico ou grupo *N*-hidroxiamida no lugar das amidas, visando estabelecer uma interação ion-dipolo com um íon metálico, possivelmente presente no alvo biológico, otimizando assim, a afinidade entre a molécula e seu receptor hipotético. Como esperado, o ácido subérico *bis*-hidroxâmico (SBHA) foi duas vezes mais potente que o análogo *bis*-amídico (HMBA) (Richon et al., 1998; You, Park, 2010).

Posteriormente, um dos ácidos hidroxâmicos da molécula foi substituído por um grupo lipofílico, com a finalidade de aumentar interações de natureza hidrofóbica com o alvo. Desta forma, foi desenvolvido o SAHA, seis vezes mais potente que o SBHA, comprovando que o uso de técnicas experimentais associadas a modificações moleculares bem planejadas pode auxiliar o químico medicinal no desenvolvimento de moléculas inovadoras altamente potentes. Após os estudos de REA, a enzima histona desacetilase foi reconhecida como alvo biológico do vorinostat, que é considerado um composto líder, amplamente estudado (Marks, Breslow, 2007).

O planejamento de fármacos pode ser guiado por metodologias que auxiliem na escolha das alterações a serem realizadas na molécula, como inserção ou remoção de grupos funcionais e substituintes. O diagrama de Craig é frequentemente utilizado e fundamenta muitas técnicas mais avançadas de planejamento de séries baseadas na estrutura do ligante. Este método baseia-se no emprego de um diagrama (Figura 10) que relaciona características estruturais analisadas em um plano cartesiano, e a partir deste são selecionados os grupos substituintes apropriados para o desenvolvimento de uma série (Tavares, 2004). Tradicionalmente as propriedades físico-químicas consideradas nesta abordagem são hidrofobicidade e efeito eletrônico. Como pode ser observado na figura 10, o diagrama é dividido em quadrantes, sendo que o quadrante **I** é constituído por substituintes aceptores de elétrons hidrofílicos, o quadrante **II** por aceptores de

elétrons lipofílicos, o quadrante **III** por doadores de elétrons hidrofílicos e o quadrante **IV** por doadores de elétrons lipofílicos.

Figura 10 – Diagrama de Craig.
Fonte: Adaptado de Craig, 1971.

O potencial biológico dos análogos pode ser avaliado experimentalmente através de ensaios *in vivo* e/ou *in vitro*. A utilização desta metodologia pode ser muito bem ilustrada na pesquisa desenvolvida pelo Prof. Dr. Leoberto da Costa Tavares, onde análogos funcionais da nifuroxazida (Figura 11) foram planejados empregando o diagrama de Craig e sua atividade biológica foi verificada em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi*. Foi verificado que o composto dissustituído 3-CF₃, 4-NO₂, apresentou maior atividade antibacteriana e compostos substituídos como 4-CF₃ e 3,4-Cl₂ demonstraram maior efeito na fase log de crescimento parasitário do *T cruzi* (Jorge, 2011).

Figura 11 – Estrutura química da nifuroxazida.

Paralelamente, metodologias de modelagem molecular podem ser aplicadas como auxílio na correlação entre as propriedades físico-químicas das moléculas e a atividade biológica verificada nos ensaios. No item a seguir, algumas metodologias de modelagem molecular aplicadas ao desenvolvimento de fármacos são descritas.

3.3.1 Modelagem molecular

A modelagem molecular é a investigação das estruturas químicas e de propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica. Esta ferramenta fornece informações importantes para o processo de planejamento de fármacos, pois permite a descrição detalhada da estrutura, das possíveis interações intermoleculares e, se for o caso, das reações químicas entre o ligante e o alvo biológico (Sant'Anna, 2009; Barreiro, Fraga, 2008; Sant'Anna, 2002).

Duas aproximações podem ser exploradas a partir dos estudos *in silico*: os métodos independentes do receptor/enzima e os métodos dependentes do receptor/enzima. No primeiro caso, as interações entre a molécula e seu alvo são consideradas indiretamente, por meio de modelos de correlação entre as atividades de compostos conhecidos e suas estruturas químicas ou variáveis associadas a essas estruturas. Estes são os métodos que compõem uma importante área do planejamento de fármacos, conhecidos em geral como QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) (Sant'Anna, 2009).

No segundo caso, as interações do bioligante com a biomacromolécula são consideradas explicitamente no processo de desenvolvimento. Desta forma, a estrutura do receptor ou enzima deve ser conhecida diretamente, por dados experimentais ou indiretamente, por um procedimento de modelagem adequado (geralmente modelagem por homologia) (Montanari, 2011; Sant’Anna, 2009).

Modelos moleculares podem ser construídos, visualizados, e editados com o auxílio de técnicas envolvendo mecânica molecular, dinâmica molecular, mecânica quântica e análise conformacional. Os métodos clássicos abrangem a mecânica molecular e dinâmica molecular, onde as moléculas são descritas como um conjunto de átomos conectados, desconsiderando os elétrons presentes (Burkert, Allinger, 1982). O que é feito no modelo de mecânica molecular é desenvolver o chamado campo de força, um conjunto de funções de energia que determinam penalidades energéticas para o afastamento da estrutura de valores “normais” de: distância de ligação, ângulo de ligação, diedros e interações de átomos não ligados (Sant’Anna, 2009). Estes valores normais são determinados experimentalmente e podem ser facilmente encontrados em tabelas descritas na literatura química.

A dinâmica molecular é um processo de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula, de acordo com as leis de movimento de Newton (Sant’Anna, 2002). Em um cálculo de dinâmica molecular, as moléculas que possuem certa energia cinética podem superar barreiras de energia potencial, o que permite a busca de outras conformações estáveis, que possivelmente não seriam encontradas por um processo de minimização de energia.

Os cálculos mecânico-quânticos, por sua vez, são cálculos de propriedades moleculares baseados na equação de Schrödinger que levam em conta as interações

entre os elétrons em uma molécula (Spoel et al; 2005; Leach, 1998). Alguns métodos mecânico-quânticos merecem destaque como: *ab initio* ou métodos mecânico-quânticos não empíricos, métodos semi-empíricos e funcional de densidade (DFT, *density functional theory*). Os cálculos *ab initio* utilizam equações exatas, sem aproximações, que envolvem a população eletrônica total da molécula e, por isso, demandam um custo computacional superior. Estes métodos são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico (Levine, 2008; House, 2004). Na prática, aproximações são necessárias para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar seu cálculo possível. Já os métodos semi-empíricos são cálculos de orbital molecular que usam vários graus de aproximação e dados experimentais para simplificar os cálculos computacionais e consideram apenas os elétrons de valência. Os métodos de maior uso até hoje foram AM1 (*Austing Model 1* ou Modelo Austin 1) e o PM3 (*Parametric Method 3* ou Método Paramétrico 3) (Guest et al., 2005; Young, 2001; Dewar et al., 1985). Por fim, o funcional de densidade consiste em um modelo alternativo ao baseado em orbitais moleculares. Neste modelo, considera-se que a energia de um conjunto de elétrons sob influência de um campo externo é um funcional único da densidade eletrônica. Alguns funcionais foram desenvolvidos a partir de mecânica quântica fundamental e outros a partir da parametrização de funções que melhor reproduzem resultados experimentais. Atualmente, um dos modelos mais utilizados é o modelo do funcional de troca híbrido de 3 parâmetros de Becke e do funcional de correlação de Lee-Yang-Parr (B3LYP), devido à qualidade dos seus resultados, particularmente para moléculas orgânicas (Heerdt, Morgon, 2011; Sant'Anna, 2009; Morgon, Custodio, 1994).

Portanto, os métodos listados anteriormente podem ser utilizados para a busca por conformações energeticamente mais estáveis que estejam mais próximas de

sistemas reais e para a simulação do comportamento molecular. Desta forma, é possível realizar o cálculo de propriedades moleculares, que representam uma importante ferramenta para prever propriedades de uma substância, classificar estruturas químicas ou procurar similaridade entre elas (Arroio, Honório, Silva, 2010). As propriedades específicas de um composto podem ser de natureza estérica, eletrônica ou hidrofóbica, como por exemplo, superfície de área polar, volume, área superficial, refratividade molar, mapa de potencial eletrostático, contorno da densidade eletrônica e energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO (Santos et al., 2007; Barreiro, 1997).

Sendo assim, os descritores moleculares são um reflexo da estrutura química de determinada molécula e podem ser considerados como variáveis independentes nos estudos das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationship*) previamente mencionados (Guido, Andricopulo, Oliva, 2010; Sonehara, 2009; Verli, Barreiro, 2005; Barreiro et al., 1997). Tais estudos são amplamente utilizados visando à identificação de valores ótimos para certas propriedades moleculares, e por meio destes, fundamentar o planejamento de novas substâncias que possuam um perfil terapêutico mais adequado (Ferreira, Oliva, Andricopulo, 2011; Andrade, 2010; Sonehara, 2009; Tavares, 2004; Ferreira, Montanari, Gaudio, 2002).

Além disso, estas relações podem ser abordadas de forma qualitativa, denominada estudos das relações estrutura atividade (REA ou SAR, *structure-activity relationships*), sendo que a correlação é feita pelo estudo qualitativo da influência de modificações realizadas em um composto protótipo e a atividade biológica avaliada.

Após a obtenção de um determinado número de descritores moleculares, torna-se necessária a utilização de métodos que permitam a análise simultânea de todos os

parâmetros obtidos. Assim, os métodos multivariados de análise são ferramentas de muita utilidade em estudos desse tipo, ou seja, análise de conjunto de dados que apresentam um elevado número de propriedades, o que dificulta a interpretação dos mesmos (Arroio, Honório, Silva, 2010). Adicionalmente, os métodos multivariados permitem o estudo de várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou não de diferenças espectrais marcantes entre estas nem a existência de alta correlação nos elementos (Moita Neto, Moita, 1998). Alguns métodos que frequentemente utilizam análise multivariada dos dados são: análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*), análise hierárquica de agrupamentos (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*) e modelos independentes de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA – *Soft Independent Modeling of Class Analogy*) (Arroio et al., 2009; Honório, Silva, 2005; Weber et al., 2006)

A seguir será abordada a análise exploratória de dados, utilizada como ferramenta neste trabalho, com o intuito de correlacionar as propriedades moleculares que mais influenciam na discriminação de amostras (compostos), ou seja no agrupamento destas, de acordo com o maior ou menor grau de similaridade.

3.4 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

A quimiometria é a combinação de métodos matemáticos e estatísticos para manusear e interpretar, de forma eficiente, dados derivados de sistemas moleculares. Sendo assim, a análise exploratória de dados, um método quimiométrico, será discutida em um item à parte do planejamento racional de fármacos.

3.4.1 Análise de componentes principais (PCA, *principal component analysis*)

Programas de modelagem molecular podem gerar um volume grande de dados, que muitas vezes devem ser processados e analisados. A maioria das análises de dados aplicadas à química é, por natureza, multivariada e um dos métodos mais utilizados é o PCA, que consiste na compressão de dados baseado na correlação entre as variáveis independentes. O objetivo final deste tipo de análise é correlacionar variáveis, reposicionando descritores originais por componentes principais (PCs, *principal components*), onde os dados inseridos serão projetados. As PCs são completamente descorrelacionadas e são construídas a partir da combinação linear das variáveis originais. Em outras palavras, as n -variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n -componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é a obtenção em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2 e assim por diante (Montanari, 2011; Moita Neto, Moita, 1998; Beebe, Pell, Seasholtz, 1998).

Assim, uma vez que a redundância (ruído) é removida, as primeiras componentes principais (PC1, PC2, PC3) são capazes de descrever a maior parte da informação contida no conjunto de dados original.

Desta forma, a matriz de dados original $\mathbf{X}$ ($I \times J$) que corresponde a I moléculas e J descritores, é decomposta em duas matrizes, uma de escores ($\mathbf{T}$) e outra de pesos (*loadings*) ($\mathbf{L}$). A matriz $\mathbf{T}$ representa a posição das amostras no novo sistema de coordenadas, onde as PCs são os eixos. Na matriz $\mathbf{L}$ as colunas descrevem como os novos eixos (PCs) são construídos a partir dos eixos antigos, ou seja, contém a

informação do quanto cada variável original contribui na formação de uma PC (Ferreira, 2002; Montanari, 2001). A equação 1 representa a obtenção das PCs.

$$X = TL^T \quad \text{equação 1}$$

Em que: X é a matriz de dados, T é a matriz de escores e L é a matriz de pesos.

Os pesos variam entre -1 e 1, desta maneira altos pesos significam que a PC gerada e o descritor original são aproximadamente lineares. Além disso, na geração das matrizes T e L é calculada a porcentagem de variância referente às PC's (Montanari, 2011; Ferreira, 2002).

3.4.2 Análise de agrupamento hierárquico (HCA, *hierarchical clustering analysis*)

A análise de agrupamento hierárquico é outro importante método multivariado de análise de dados. Sua proposta é expor os dados de forma que os agrupamentos naturais e padrões relativos ao conjunto sejam facilmente visualizados. Os resultados, de natureza qualitativa, são representados na forma de dendrograma, permitindo assim a visualização das amostras ou variáveis em um espaço bidimensional. Desta forma, a finalidade desta análise é agrupar um conjunto de dados de atributos semelhantes, sendo que o método matemático mais utilizado é agrupar os pares de pontos que estão mais próximos, usando a distância euclidiana, equação 2 (Montanari, 2011; Ferreira 2002).

$$d_{kl} = [\sum_{j=1}^m (x_{kj} - x_{lj})^M]^{1/M}$$

equação 2

Em que: d_{kl} é a distância entre dois vetores de amostras, k e l são as amostras, m é o número total de variáveis, M é a ordem da distância, sendo $M = 2$ para distância euclidiana, j é o descritor.

Este procedimento, quando repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, leva a construção do dendrograma, onde, no eixo horizontal são colocadas as amostras (compostos) e, no eixo vertical, o índice de similaridade (S_{kl}) entre os pontos k e l , calculado segundo a seguinte expressão:

$$S_{kl} = 1 - (d_{kl} / d_{max})$$

equação 3

Em que: S_{kl} é o índice de similaridade entre duas amostras k e l , d_{kl} é a distância entre duas amostras, d_{max} é a maior distância no conjunto de dados.

Os índices de similaridade variam entre 0 e 1, sendo o valor 1 equivalente à máxima similaridade.

As propriedades moleculares estão diretamente ligadas à estrutura química, e podem servir para o processo de reconhecimento molecular, e subsequentemente, atividade biológica. Desta forma, foi realizada a análise exploratória de dados decorrentes de 11 análogos da capsaicina com o intuito de estabelecer uma relação estrutura-propriedade molecular.

4. PLANEJAMENTO DAS SÉRIES

Para melhor entendimento do planejamento adotado no trabalho a molécula da capsaicina foi dividida em 3 regiões: região A, que possui grupos lipofílicos e aceptores e doadores de ligação de hidrogênio; região B, que possui função amida e grupos aceptores de ligação de hidrogênio e região C, constituída por cadeia volumosa e lipofílica. As modificações moleculares realizadas visam à obtenção de duas séries de análogos distintas (série I e II). A série I é constituída por compostos que possuem um grupo éster na região B e é dividida em **Ia** e **Ib**. A série **Ia** possui na região C uma cadeia lateral alifática, enquanto a série **Ib** possui uma cadeia aromática. A série II é formada por análogos amídicos e da mesma forma que a série I, subdividida em **IIa** e **IIb**, com cadeias laterais alquílicas e arílicas, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 - Modificações moleculares propostas.

O uso limitado da capsaicina como aditivo alimentar ou fármaco é causado pela sua forte pungência (Ohnuki et al., 2001), característica possivelmente fornecida pela hidroxila fenólica presente na região A. Para redução deste efeito, foi realizado fechamento de anel substituindo o grupo metilcatecólico pelo sistema bicíclico 1,3-benzodioxol. Não existem relatos na literatura sobre a pungência deste sistema, portanto a modificação molecular aplicada possibilitará administração dos compostos por via oral. Adicionalmente, o anel benzodioxol é um núcleo comum em uma série de substâncias com atividade antitumoral, como podofilotoxina, etoposida e teniposida (Figura 13) (Leite et al., 2004; You, 2005; Capilla et al., 2001). Assim, este grupo pode representar importância para a atividade antineoplásica e, além disso, pode assegurar adequado caráter lipofílico, facilitando o trânsito pelo organismo e passagem por barreiras biológicas e, ao mesmo tempo, caráterceptor de ligações de hidrogênio, útil na interação com alvos biológicos (Barreiro, Fraga, 1999).

Figura 13 – Estruturas de agentes antitumorais que possuem a subunidade 1,3-benzodioxólica.

Os grupos aceptores de ligação de hidrogênio da região A são mantidos, afinal o anel metilenodióxi é provido de dois átomos de oxigênio. A região B também mantém suas características, permitindo a conservação de possíveis interações entre os análogos e seu alvo biológico. Na região B da série I, a substituição funcional da amida pelo

grupo éster mantém o átomo aceptor de ligação de hidrogênio (oxigênio) e na série **II** a região B não sofre alterações.

A alteração na região C, por sua vez, permite avaliar a influência das diferentes cadeias laterais no perfil farmacodinâmico e farmacocinético das moléculas. Para escolha dos substituintes do anel benzênico das séries **Ib** e **IIb**, inicialmente foi adotado o diagrama de Craig (Tavares, 2004).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Reagentes e solventes para síntese

- Acetato de etila (*Synth*)
- Ácido clorídrico (*Synth*)
- Ácido 4-metóxi benzoico (*Sigma-Aldrich*)
- Ácido 4-nitro benzoico (*Sigma-Aldrich*)
- Clorofórmio deuterado (CDCl_3) (*Sigma-Aldrich*)
- Clorofórmio (*Synth*)
- Cloreto de acetila (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de 3,4-cloro benzoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de 3-metil butanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de 4-metil benzoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de 4-cloro benzoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de acetila (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de benzoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de butanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de heptanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de hexanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de nonanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de octanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de pentanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de propanoíla (*Sigma-Aldrich*)
- Cloreto de sódio (*Synth*)

- Diclorometano (*Synth*)
- 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) (*Sigma-Aldrich*)
- Dimetilformamida (DMF) (*Synth*)
- Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) (*Sigma-Aldrich*)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (*Sigma-Aldrich*)
- Hexano (*Synth*)
- Sulfato de sódio anidro (*Synth*)
- Trietilamina (*Sigma-Aldrich*)

5.1.2 Equipamentos para síntese

- Analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400 CHN
- Aparelho para ponto de fusão capilar, Büchi, modelo M565
- Agitadores magnéticos
- Bomba de vácuo Vacuubrand
- Câmara de luz ultravioleta (UV)
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUCKER, modelo Advanced DPX-300
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 75 MHz BRUCKER, modelo Advanced DPX-300
- Rotaevaporador Büchi

5.1.3 Reagentes, solventes e outros materiais para ensaios biológicos

- Álcool isopropílico (*Synth*)
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (*Sigma* M2128)

- Células H1299 (*Hemocentro da Unicamp*)
- Células PC3 (*ATCC – USA*)
- Células U138MG (*Hemocentro da Unicamp*)
- Células MACL-1 (*Departamento de Bioquímica e Imunologia – UFMG*)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (*Synth*)
- Meio de cultura RPMI 1640 (*Sigma R6504*)
- Paclitaxel (*Sigma-Aldrich*)
- Soro fetal bovino (*Gibco 16000044*)
- Tampão fosfato-salino (PBS)

5.1.4 Equipamentos para ensaios biológicos

- Pipetador automático ePMotion® 5070 Eppendorf (*Eppendorf*)
- Leitor de ELISA (*Biotek*)
- Estufa com controle automático de temperatura, umidade e atmosfera de CO₂

5.1.5 Hardware e softwares para modelagem molecular

- Gaussian G03 (Gaussian 03W for Windows, version 6)
- Hyperchem 8.0 (HyperChem Program Release 7 for Windows)
- Marvin Beans 5.0.4.1 (ChemAxon, 1998-2010)
- MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 1997)
- ViewerLite 5.0 (Accelrys Inc., 2002)
- Sistema operacional *Windows* de configuração Intel® Core i7™ 2.40 GHz,
RAM 6.0 GB

5.2 MÉTODOS SINTÉTICOS

As séries **I** e **II** de análogos da capsaicina foram sintetizadas pela acilação do álcool piperonílico e piperonilamina com cloretos de ácido (alifáticos e aromáticos) ou ácidos carboxílicos (aromáticos) (Figura 14) (Tabela 1).

Figura 14 - Esquema geral de síntese para obtenção dos análogos.

Tabela 1 – Reagentes utilizados na síntese dos análogos das séries I e II.

Composto	Material de partida	Composto	Material de partida
RPF401		RPF301	
RPF402		RPF302	
RPF403		RPF303	
RPF404		RPF304	
RPF451		RPF305	

Tabela 1 – Reagentes utilizados na síntese dos análogos das séries I e II (continuação).

<i>Composto</i>	<i>Material de partida</i>	<i>Composto</i>	<i>Material de partida</i>

RPF452		RPF306
RPF453		RPF351
RPF454		RPF352
RPF455		RPF353
RPF456		RPF355
RPF457		RPF356
RPF458		RPF357
RPF459		RPF358
		RPF359
		RPF360

5.2.1 Acilação com cloretos de ácido

A série de derivados da capsaicina foi obtida a partir de uma variação moderna da metodologia clássica para síntese de amidas, descrita por Schotten-Baumann, em 1884 (Schotten, 1884; Baumann, 1886). O método foi adaptado a partir de reações realizadas por Cunico et al., 2011. A acilação da piperonilamina e do álcool piperonílico, para obtenção dos produtos amídicos e ésteres, respectivamente, foi realizada em uma única etapa (Figura 14). Experimentalmente, 5 mmoles do nucleófilo

(0,76 g de álcool piperonílico ou 0,755 g de piperonilamina), 5,5 mmoles de trietilamina (Et_3N) (374 μL) e quantidades subestequiométricas (1 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,12g) foram dissolvidos em 20 mL de diclorometano (DCM). O sistema foi mantido sob agitação e atmosfera inerte de nitrogênio por 30 minutos. 5 mmoles do respectivo cloreto de ácido foram adicionados com auxílio de seringa, gota a gota e a formação dos produtos acilados foi verificada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) utilizando sistema hexano:acetato de etila como fase móvel.

Para purificação, a fase orgânica foi lavada com solução aquosa de HCl 5%, água destilada e solução salina e posteriormente seca com MgSO_4 anidro. O solvente foi removido por rotaevaporação e os produtos foram então recristalizados em hexano e, quando necessário, submetidos à coluna cromatográfica. Para armazenamento e realização de análise, o solvente foi evaporado das amostras em bomba de alto vácuo.

5.2.2 Acilação com ácidos carboxílicos

A síntese de alguns dos análogos da série **IIb** (amidas com substituintes arílicos) foi realizada utilizando ácidos carboxílicos como material de partida (Montalbetti, Falque, 2005). Foram solubilizados 2 mmoles (0,302g) de piperonilamina e 2 mmoles (0,24 g) de DMAP em 10 mL de diclorometano. Paralelamente, 2 mmoles do ácido carboxílico foram adicionados a 3 mmoles de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) em 10 mL de diclorometano. As soluções previamente preparadas foram misturadas e o sistema mantido sob agitação. A formação dos produtos acilados foi verificada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Para purificação, as mesmas metodologias de recristalização e cromatografia em coluna mencionadas no item anterior foram aplicadas.

5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em Coluna (CC)

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD, utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica GF254 (Merck). A revelação das placas foi feita por lâmpada de ultravioleta (UV). Foram utilizadas colunas de vidro e sílica gel 60 (Merck) para a separação e purificação dos produtos obtidos.

5.3.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises espectroscópicas de RMN de ^1H e de ^{13}C foram realizadas em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interno e os sinais espectrais foram descritos como: s, singleto; d, dubleto; dd, duplo dubleto; ddd, duplo duplo dubleto; t, tripleto; q, quarteto; quint, quinteto; sext, sexteto; m, multipletto; sl, singleto largo; tl, tripleto largo,

5.3.3 Análise Elementar

A análise elementar foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN.

5.3.4 Faixa de Fusão

A faixa de fusão foi determinada em triplicata, em aparelho para ponto de fusão capilar, modelo M565, da marca Büchi, disponível no Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

Universidade de São Paulo, para verificação do grau de pureza e caracterização dos compostos.

5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo farmacêutico Gilberto Carlos Franchi Júnior no Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI – UNICAMP/SP) em colaboração com o pesquisador e médico Dr. Alexandre Eduardo Nowill.

5.4.1 Manutenção das culturas celulares

As linhagens celulares PC3, MACL-1, H1299 e U138MG foram mantidas, como estoque, em nitrogênio líquido. As células foram descongeladas e dispostas em garrafas de 75 cm², contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma R6504), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco 16000044). As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37°C, umidade 90% e atmosfera de 5% de CO₂.

5.4.2 Citotoxicidade

Foi realizada a distribuição das células em placas de 96 poços (100 µl células/poço) com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma R6504), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco 16000044). Posteriormente, trataram-se as células com diferentes concentrações de capsaicina e seus análogos (1000, 200, 40, 8, 1,6 e 0,32µM) dissolvidos em 0,5% de DMSO. Além das amostras investigadas, paralelamente foram analisados o branco e o controle positivo, sendo que o branco consiste em uma solução do próprio meio de cultura contendo 0,5% de DMSO, enquanto o controle positivo utilizado foi o paclitaxel nas mesmas concentrações testadas para a capsaicina e análogos.

Para o tratamento das células todos os passos no ensaio foram automatizados utilizando o equipamento “ePMotion® 5070 Eppendorf” (Eppendorf, Vaudaux, Schonenbuch, Switzerland). As placas foram incubadas em estufa com controle automático de temperatura 37 °C, umidade 90% e atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de redução do MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - descrito por Mosmann, em 1983 (ATCC, 2012). O ensaio de MTT é baseado em absorção óptica e análise da diminuição da função celular, detectável por produtos de enzimas específicas que determinam atividades vitais. O sal solúvel brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma M2128) de coloração amarela é reduzido ao formazan, um precipitado insolúvel púrpura, liberado no meio de cultura. A sua formação é diretamente proporcional ao número de células viáveis na placa.

Para leitura das placas, primeiramente, após o período de incubação de 72 horas, as soluções contendo os compostos foram retiradas do interior dos pocinhos, com o auxílio de micropipeta, e em seguida os poços foram lavados com 200 µL de tampão fosfato-salino (PBS). Adicionaram-se 100 µL de MTT e as placas foram incubadas por 4h em estufa.

Após esta etapa a solução de MTT foi removida e em sequência adicionaram-se 150 µL de álcool isopropílico para solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância dos cristais foi feita em leitor de ELISA Biotek com comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata para todas as concentrações padronizadas. Em seguida os resultados foram normalizados conforme a equação 4 e expressos em porcentagem de células viáveis (% células viáveis).

$$\% \text{ células viáveis} = 100 - \left(\frac{A_a - A_b \times 100}{A_{C+} - A_b} \right) \quad \text{equação 4}$$

Em que: A_a é a absorbância das amostras, A_b é a absorbância do branco, A_{C+} é a absorbância do controle positivo.

Assim, cada concentração foi plotada no software OriginLab8 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) e calculou-se o IC_{50} segundo o tutorial fornecido pela OriginLab.

5.5 MODELAGEM MOLECULAR

Os estudos *in silico* dos análogos da capsaicina foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Kerly Mesquita Pasqualoto. Inicialmente, realizou-se a construção dos modelos moleculares tridimensionais destes compostos, subsequente cálculo de propriedades moleculares e análise exploratória dos dados. É importante ressaltar que somente 11 compostos (seis amidas e cinco ésteres) foram modelados juntamente à capsaicina, sendo estes: RPF452, RPF456, RPF459, RPF401, RPF404, RPF351, RPF353, RPF303, RPF304, RPF305 e RPF306.

Nesta etapa foi utilizado computador com sistema operacional *Windows* de configuração Intel® Core i7™ 2.40 GHz, RAM 6.0 GB.

5.5.1 Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D)

Os modelos moleculares 3D dos 11 compostos das duas séries e da capsaicina foram construídos, inicialmente, no programa Hyperchem 8.0 (Hypercube, Inc: 2008. Gainesville, FL, EUA). Utilizou-se como geometria de partida para os análogos pertencentes às séries **I** e **II**, a estrutura cristalografada da *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metilbenzamida (Maganhi et al., 2013). Já a capsaicina foi construída a partir

do cristal da 3-cloro-*N*-(4-hidroxi-3-metoxi-benzil)-2,2-dietilpropanamida (Huang et al., 2010).

A otimização de geometria foi realizada em campo de força empírico MM+ (derivado do MM2) (Allinger, 1977) (programa *Hyperchem 8.0*). As cargas atômicas parciais de ponto único foram calculadas para as estruturas com o método de mecânica quântica, semi-empírico Hamiltoniano AM1 (*Austing Model 1*) (Dewar et al., 1985).

Subsequentemente o programa MOLSIM 3.2 (Doherty, 2002; *MOLSIM 3.2; The Chem21 Group, Inc*: 1997, Lake Forest, IL, EUA), disponibilizado pelo Prof. Titular Leoberto Costa Tavares, foi utilizado para minimização de energia dos modelos moleculares 3D das estruturas. Utilizaram-se os métodos de declive máximo (*steepest descent*) e de gradientes conjugados (*conjugated gradient*) com critério de convergência de 0,01 kcal/mol.

As estruturas minimizadas seguiram para as simulações de dinâmica molecular (DM) de 1 ns (1.000.000 passos, cada passo de 1 fs), 310 K (37 °C), a fim de gerar um perfil de amostragem conformacional (PAC). Foi utilizada a constante dielétrica de 3,5 para simular o ambiente das membranas biológicas e o sítio de interação com o alvo biológico. Foi necessário adotar restrição de posição para alguns átomos a fim de manter a integridade estrutural dos modelos pela atribuição de massas fictícias de 5.000 u.m.a. Os arquivos trajetória foram salvos a cada 20 passos de simulação, resultando assim em 50.000 confôrmeros (PAC). Os confôrmeros de menor energia do PAC foram selecionados e comparou-se com o modelo molecular inicial e com o minimizado no intuito de verificar a integridade estrutural após a DM. O critério utilizado foi o valor do desvio quadrático médio de posições atômicas (RMSD, *root-mean-square deviation*). Quanto menor o valor de RMSD mais semelhantes são as estruturas. Esta medida

juntamente com a verificação da conformação mais frequente decorrente das simulações, ajudou na escolha do confômero de energia mais baixa para prosseguimento dos estudos. Desta forma, os confômeros selecionados foram submetidos novamente à minimização no programa MOLSIM 3.2.

5.5.2 Cálculo das propriedades moleculares

As propriedades termodinâmicas, obtidas com o programa *MOLSIM 3.2*, foram as seguintes: contribuições de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Waals (E_{vdW}), interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}), ligação de hidrogênio (E_{ligH}), solvatação (E_{solv}), utilizando o modelo de camada de hidratação proposto por Forsythe e Hopfinger (1973), e energia potencial total (E_{TOT}), que corresponde à somatória de todas as energias de contribuição intramolecular listadas anteriormente. As contribuições de energia intramolecular de ligação de hidrogênio e solvatação foram obtidas realizando-se uma simulação curta a 310 K com constante dielétrica de 3,5 e para o cálculo de E_{solv} utilizou-se como solvente a água.

As propriedades eletrônicas foram calculadas com o programa Gaussian 03W (*Gaussian 03W for Windows*, version 6; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA). Calcularam-se as cargas parciais atômicas ajustadas pelo potencial eletrostático (*CHELPG*, *Charges from Electrostatic Potentials using Grid based method*) (Breneman, Wiberg, 1990), momento de dipolo (total e nos eixos x, y, z) e energia de orbitais moleculares de fronteira (E_{HOMO} e E_{LUMO}), empregando o método funcional híbrido B3LYP (Becke, 1993) e o conjunto de bases 6-31(d,p).

Calculou-se com o programa Marvin Beans (*Marvin Beans*, version 5.0.4.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapeste, Hungria) as propriedades estéricas, topológicas e o ClogP, sendo este calculado pelo método de pesos do programa, que atribui pesos iguais para os métodos de Visvanadhan et al., 1989, Klopman et al., 1994 e da base de dados PHYSPROP.

Além disso, outras propriedades estéricas foram calculadas aplicando o programa Hyperchem 8.0 (Hypercube, Inc: 2008. Gainesville, FL, EUA): área superficial aproximada (SA_{aprox}), área superficial pelo método de *grid* (SA_{grid}), volume, massa, energia de hidratação (E_{hydr}) e polarizabilidade (α). Informações sobre os programas utilizados para realização dos cálculos serão detalhadas no item 6.5.2.

Uma tabela contendo 12 linhas, correspondentes às amostras (cinco moléculas pertencentes à série **I**, seis moléculas da série **II** e a capsaicina) e 48 colunas, correspondentes aos descritores moleculares foi construída e utilizada na análise exploratória de dados. Devido as diferentes ordens de magnitude entre as variáveis calculadas, o auto-escalamento foi empregado como pré-processamento dos dados.

As propriedades calculadas estão listadas no anexo 3 “Propriedades moleculares calculadas”.

5.5.3 Análise exploratória de dados: HCA e PCA

A etapa que consiste na análise exploratória de dados foi realizada no programa Pirouette 3.11 (*Pirouette 3.11*, Infometrix Inc., 1990-2003, Woodinville). A análise de HCA foi desenvolvida com método de agrupamento completo e as distâncias entre as amostras foram calculadas por meio da distância Euclidiana. Os dados foram apresentados em um gráfico bidimensional denominado dendrograma. As distâncias

calculadas entre as amostras foram definidas em uma matriz de similaridade cujos elementos são os chamados índices de similaridade que variam de 0 a 1, sendo 1 o valor de máxima similaridade (Pirouette, 2003; Moita Neto, Moita, 1998; Beebe, Pell, Seasholtz, 1998). O HCA foi realizado para as amostras sendo que estas são dispostas no eixo vertical do dendrograma, enquanto o índice de similaridade é observado no eixo horizontal.

Para a análise de PCA, os dados originais foram decompostos em duas matrizes, uma de escores, relacionando os compostos, e outra de pesos (*loadings*), relacionando as variáveis (Montanari, 2011; Ferreira, 2002; Beebe, Pell, Seasholtz, 1998). O direcionamento do estudo visou estabelecer a importância das propriedades físico-químicas para discriminação das estruturas e para o reconhecimento molecular.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE

Foram sintetizados 28 análogos da capsaicina (13 ésteres e 15 amidas) através de reações de acilação. Os valores de rendimento, fator de retenção e faixa de fusão podem ser verificados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Resultados obtidos na síntese dos ésteres

Composto	R
		Fator de Retenção	Rendimento (%)	Faixa de Fusão
RPF401		0,52	44	62,5-63,7
RPF402		0,60	48	61-61,8
RPF403		0,61	30	50,2-51,5
RPF404		0,70	41	97,2-98,1
RPF451		0,88	28	- ^a
RPF452		0,8	38	- ^a
RPF453		0,76	50	- ^a
RPF454		0,72	48	- ^a
RPF455		0,71	51	- ^a
RPF456		0,70	26	- ^a
RPF457		0,8	61	- ^a
RPF458		0,94	61	- ^a
RPF459		0,82	63	- ^a

^aprodutos líquidos.

Tabela 3 – Resultados obtidos na síntese das amidas

Composto	R
		Fator de Retenção	Rendimento (%)	Ponto de Fusão
RPF301		0,31	53	114,5-115,0
RPF302		0,38	78	142,0-142,7
RPF303		0,40	72	131,7-132,2
RPF304		0,44	60	124,9-125,6
RPF305		0,75	33	110,8-111,7
RPF306		0,5	22	113,7-114,6
RPF351		0,29	68	96,8-97,6
RPF352		0,44	44	78,8-79,3
RPF353		0,71	30	90,4-91,0
RPF355		0,15	26	95,4-96,7
RPF356		0,32	74	68,8-69,8
RPF357		0,6	60	69,9-71,1
RPF358		0,78	65	78,6-79,1
RPF359		0,81	54	86,1-86,5
RPF360		0,67	60	103,9-104,5

Para obtenção dos análogos, foram escolhidas reações de uma única etapa utilizando-se como material de partida a piperonilamina (para série das amidas) ou álcool piperonílico (para a série dos ésteres) e cloretos de ácidos ou ácidos carboxílicos.

As séries **Ia** e **IIa** são constituídas por cadeias laterais alifáticas de dois a nove carbonos, enquanto as séries **Ib** e **IIb** foram inicialmente planejadas pelo diagrama de Craig, no entanto como não foi possível realizar a síntese de análogos que fossem constituídos por substituintes pertencentes aos quatro quadrantes do diagrama, esta estratégia não será mais citada como parte do planejamento das séries de análogos arílicos.

6.1.1 Acilação com cloretos de ácido

Os cloretos de ácido foram escolhidos como material de partida devido a sua alta reatividade. Dentre os derivados de ácidos carboxílicos, os cloretos de ácido apresentam o melhor grupo abandonador (Cl^-), seguidos pelos anidridos ácidos (RCOO^-), ésteres (RO^-) e amidas (NH_2^-). Isto se deve ao fato do cloro gerar uma base conjugada estável que suporta melhor a carga negativa. Nestas reações, foi realizada a substituição nucleofílica do carbono carbonílico de cloretos de ácido pela amina ou álcool, e os produtos desejados foram obtidos de forma rápida e simples.

A acilação normalmente é realizada em solvente seco, atmosfera inerte e na presença de aminas terciárias não nucleofílicas, como a Et_3N , com o propósito de neutralizar o meio reacional (Carey et al., 2006; Montalbetti, Falque, 2005). O uso de catalisadores, como o DMAP, também é muito comum para aumentar o grau de acilação (Murugan, Scriven, 2003).

Os rendimentos descritos na literatura para síntese de amidas e ésteres, a partir de cloretos de ácido estão entre 80% e 100% (Clayden, Greeves, Warren, 2012; Taylor et al., 2012), e como observado nas tabelas 2 e 3, os rendimentos obtidos foram, em muitos casos, inferiores a esta faixa. Como esperado, as amidas apresentaram um

rendimento mais elevado em relação aos ésteres, pois a amina possui nucleofilicidade superior ao álcool promovendo o ataque à carbonila mais facilmente.

Os análogos arílicos das séries **Ib** (RPF401, 402, 403 e 404) e **IIIb** (RPF301, 302 303 e 304), obtidos a partir de cloretos de ácido apresentaram rendimentos superiores em relação às séries **Ia** e **IIa**. O estado físico destes produtos finais também contribuiu para os rendimentos observados, afinal estes apresentam carácter sólido, sendo mais facilmente isolados e purificados por recristalizações consecutivas em hexano.

Para otimização dos rendimentos obtidos, uma série de condições reacionais alternativas poderão ser aplicadas em trabalhos futuros, sendo que vários protocolos já foram desenvolvidos para a síntese de amidas e ésteres (Taylor et al., 2012; Clayden, Greeves, Warren, 2012; Carey et al., 2006). Por exemplo, a reação de Schotten-Baumann, descrita em 1884, entre aminas e cloretos de ácido, na presença de uma solução básica aquosa, é uma das alternativas interessantes que pode ser explorada (Taylor et al., 2012; Montalbetti, Falque, 2005). Variações mais modernas da reação original são realizadas em solventes orgânicos com o emprego de catalisadores como o DMAP e seus derivados (Taylor et al., 2012; Spivey, Arseniyadis, 2004; Murugan, Scriven, 2003). Estas substâncias funcionam como ativadores da reação e permitem a formação dos produtos desejados de forma mais rápida e menos complexa. O DMAP, por exemplo, ativa a carbonila e aumenta seu carácter eletrofílico, pois atua como um ótimo grupo de saída. Seu mecanismo catalítico encontra-se descrito no item **6.1.2**, que delinea a síntese com ácidos carboxílicos.

O mecanismo de reação para formação de amidas utilizando cloretos de ácido está representado na figura 15 e o mesmo aplica-se, de forma análoga, para a formação de ésteres.

Figura 15 – Mecanismo de reação para obtenção das amidas e ésteres.

A primeira etapa da reação é a adição do álcool/amina (nucleófilo) à carbonila (eletrófilo), onde o carbono carbonílico de baixa densidade eletrônica propicia o ataque nucleofílico (Morrison, Boyd, 1994). A base (Et₃N) mostra-se essencial e retira o próton do álcool ou amina gerando o intermediário alcóxido tetraédrico. Este, por sua vez, é altamente instável e leva a eliminação do cloro (grupo de saída), formando o éster ou a amida, juntamente com o cloreto de trietilamônio (subproduto) (Clayden, Greeves, Warren, 2012). Além disso, a base adicional é utilizada para capturar o HCl formado na *N*-acilação, evitando a conversão da amina (piperonilamina) em seu respectivo sal não reativo.

6.1.2 Acilação com ácidos carboxílicos

Visando à exploração de outras metodologias sintéticas e devido à disponibilidade dos reagentes, os compostos RPF305 e RPF306, foram obtidos a partir da acilação da piperonilamina com os respectivos ácidos. Por serem substâncias menos reativas e possuírem grupo abandonador (OH⁻) menos eficiente que os cloretos de ácido, sínteses com ácidos carboxílicos carecem de sistemas que aumentem a reatividade

destes reagentes (Clayden, Greeves, Warren, 2012). A seguir algumas alternativas são relatadas.

A esterificação e formação de amidas a partir de ácidos carboxílicos podem ser realizadas em condições ácidas, onde o hidrogênio proveniente do ácido age como catalisador tanto para formação dos produtos, quanto para a hidrólise dos mesmos, ou seja, para a reversão da reação nos materiais de partida (Morrison, Boyd, 1994). Essa é uma desvantagem na utilização de ácidos como catalisadores. A mistura de aminas com ácidos carboxílicos (para formação de amidas) – reação ácido-base – ocorre primeiramente formando um sal. De tal modo, a formação da ligação amídica é termodinamicamente desfavorável e o equilíbrio da reação desloca-se para o sentido da hidrólise e formação do respectivo sal (espécies carregadas). Por outro lado, estas metodologias de esterificação ou formação de amidas possuem algumas vantagens, pois são reações de uma única etapa e, adicionalmente, se um dos materiais de partida for comercialmente barato e disponível, pode ser utilizado em excesso, visando deslocar o equilíbrio da reação no sentido de formação dos produtos (Morrison, Boyd, 1994).

Uma alternativa interessante é ativar o ácido carboxílico ligando um grupo de saída ao carbono carbonílico do ácido, que facilitará o ataque nucleofílico pela amina ou álcool (Montalbetti, Falque, 2005). Como já mencionado na síntese com cloretos de ácido, a 4-dimetilaminopiridina (DMAP) tem papel especial na catálise de reações de acilação (Spivey, Arseniyadis, 2004). O grupo dimetilamino aumenta a natureza nucleofílica do nitrogênio aromático, que por sua vez realiza um ataque à carbonila (tanto de ácidos carboxílicos como cloretos de ácido), tornando-a mais eletrofílica e suscetível ao ataque de outro nucleófilo (Clayden, Greeves, Warren, 2012).

Outra possibilidade que pode ser considerada em paralelo, muito utilizada para a formação de ligações amídicas, a partir de ácidos carboxílicos, é a aplicação de agentes condensantes como as carbodiimidas (Yan et al., 2011; Smith, March, 2001). O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), por exemplo reage com o ácido carboxílico para gerar o intermediário *O*-acilisouréia (Figura 16), que pode reagir diretamente com a amina, resultando no produto desejado e no subproduto contendo a função uréia, 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etiluréia (EDU) (Spivey, Arseniyadis, 2004).

Figura 16 – Formação de ligação amida, utilizando EDC como agente condensante.

Muitas vezes uma reação paralela ocorre (Figura 17) e um intermediário não reativo *N*-aciluréia é gerado. Para evitar a formação deste subproduto podem-se empregar nucleófilos específicos como o DMAP, previamente mencionado no item 6.1.1, que são altamente nucleofílicos e reagem rapidamente com a espécie eletrofílica, gerando intermediários suficientemente reativos para se ligarem à amina (Montalbetti, Falque, 2005).

Figura 17 – Utilização de DMAP para evitar a formação do subproduto *N*-aciluréia.

A partir da observação de diferentes metodologias, decidiu-se utilizar o EDC como agente condensante e o DMAP como catalisador para a obtenção dos produtos RPF305 e 306.

O EDC e DMAP foram escolhidos pelas características descritas anteriormente e pela facilidade de purificação ao final das reações, afinal ambos podem ser retirados por extrações líquido/líquido, ao contrário de outras carbodiimidas como DCC (diciclohexilcarbodiimida), que gera o DCU (diciclohexiluréia), por exemplo, que é dificilmente separado dos produtos, deixando vestígios nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C .

Os rendimentos verificados para os produtos RPF305 e 306 foram 22 e 33%, respectivamente. Esses valores são considerados pouco apreciáveis e inferiores aos obtidos nas sínteses com cloretos de ácido, uma vez que estes são mais reativos, promovendo a acilação mais facilmente. Neste contexto, outro fator influente seria o método utilizado no processo de purificação, visto que substâncias mais difíceis de serem isoladas podem apresentar um rendimento inferior. No entanto, ácidos carboxílicos são economicamente vantajosos e condições reacionais, assim como

metodologias de purificação alternativas poderão ser testadas em outros trabalhos, a fim de otimizar os rendimentos obtidos.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os análogos da capsaicina tiveram suas estruturas confirmadas através de análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C e sua pureza foi avaliada pela faixa de fusão. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C encontram-se no *Anexo I*.

6.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN ^1H

6.2.1.1 Compostos da série I (ésteres)

As tabelas 4 e 5 apresentam os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^1H da série I.

Tabela 4 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série Ia.

<i>Composto</i>	R	4,5,7-ArH (m, 3H)	1—OCH₂O— (s, 2H)	8-CH₂ (s, 2H)	11-CH₂ (t ou q, 2H)
RPF451		6,86-6,78	5,97	5,03	2,35
RPF452		6,83-6,81	5,97	5,03	2,35
RPF453		6,86-6,78	5,97	5,03	2,37
RPF454^a		6,84-6,81	5,94	4,99	2,07
RPF455		6,84-6,79	5,95	5,00	2,33
RPF456		6,84-6,75	5,94	5,00	2,15
RPF457		6,84-6,76	5,95	5,00	2,32
RPF458		6,84-6,79	5,95	5,00	2,32
RPF459		6,84-6,76	5,95	5,01	2,31

Nota: s: singlete; d: duplete; t: tripleto; q: quarteto; m: multiplete.

a – O sinal referente a 11-CH₃ é um singlete, correspondente a 3 hidrogênios.

Tabela 5 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série Ib.

Composto	R	12,13-ArH (d, 2H ou 1H)	14,15-ArH (d ou t, 2H ou 1H)	4,5-ArH (d, 2H)
					7-ArH (d, 1H)	1—OCH ₂ O— (s, 2H)	8-CH ₂ (s, 2H)
RPF401		7,98	7,35	6,85	6,73	5,89	5,19
RPF402		8,01	7,42	6,94	6,83	5,92	5,27
RPF403		7,94	7,21	6,91	6,79	5,94	5,23
RPF404 ^a		8,07 (13-ArH) 7,90 (12-ArH)	7,78 (14-ArH)	7,06 (4-ArH) 6,91 (5-ArH)	6,98	6,03	5,25

Nota: s: singlete; d: duplete; t: tripleto; q: quarteto; m: multiplete.

a – Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO} - d_6$

Na figura 18, o espectro de RMN ^1H da molécula RPF451 foi escolhido como exemplo para visualização geral dos sinais apresentados pela série **I**. Os sinais confirmam a obtenção do derivado éster. Em 5,03 ppm observa-se um singlete referente ao carbono α ao oxigênio, por sua vez o singlete em 5,97 ppm é característico do CH_2 do anel metilenodioxi. Os sinais do anel benzênico encontram-se em 6,83 ppm, referentes aos hidrogênios dos carbonos 4 e 5, e 7. Finalmente, os hidrogênios da cadeia alquílica encontram-se entre 2,37 e 0,88 ppm, por serem mais blindados.

Figura 18- Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para identificação dos compostos da série **I**.

6.2.1.2 Compostos da série **II** (amidas)

As tabelas 6 e 7 apresentam os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^1H da série **II**.

Tabela 6 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série IIa.

Composto	R	4,5,7-ArH (m, 3H)	1—OCH ₂ O— (s, 2H)	9-NH (sl, 1H)
					8-CH ₂ (d, 2H)	11-CH ₂ (t, 2H)
RPF351		6,80-6,74	5,97	5,63	4,37	2,26
RPF352		6,78-6,73	5,97	5,71	4,35	2,21
RPF353		6,79-6,73	5,96	5,70	4,36	2,21
RPF355 ^a		6,76-6,74	5,93	5,90	4,31	1,99
RPF356		6,77-6,74	5,94	5,73	4,34	2,18
RPF357		6,76-6,71	5,94	5,73	4,33	2,20
RPF358		6,76-6,70	5,93	5,78	4,33	2,19
RPF359		6,76-6,73	5,93	5,76	4,33	2,19
RPF360		6,78-6,72	5,94	5,81	4,34	2,12

Nota: s: singlete; d: duplete; t: tripleto; q: quarteto; m: multiplete.

a – O sinal referente a 11-CH₃ é um singlete correspondente a 3 hidrogênios.

Tabela 7 – Principais sinais de RMN ^1H em CDCl_3 para a série IIb.

Composto	R	12,13 ArH (d, 2H)	14,15-ArH (d, 2H)	4,5,7-ArH (m, 3H)	9-NH (sl ou tl, 1H)
						1—OCH ₂ O— (s, 2H)	8-CH ₂ (d, 2H)
RPF301		7,80	7,48	6,88-6,78	6,37	5,97	4,57
RPF302		7,74	7,41	6,85-6,80	6,39	5,97	4,55
RPF303 ^a		7,79	7,27	6,89-6,78	8,87	5,98	4,38
RPF304 ^a		8,12 (13-ArH) 7,86 (12-ArH)	7,76 (14-ArH)	6,90-6,79	9,13	5,98	4,36
RPF305 ^a		8,60 (13-ArH) 8,19 (12-ArH)	7,66 (14-ArH)	6,86-6,78	6,58	5,97	4,59
RPF306		7,74	6,91	6,92-6,77	6,33	5,94	4,52

Nota: s: singlete; d: duplete; t: tripleto; q: quarteto; m: multiplete.

a – Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO} - d_6$

A análise de espectros de RMN ^1H permitiu constatar a conformidade dos espectros obtidos com as modificações estruturais propostas para os derivados amídicos da capsaicina. Na figura 19, apresenta-se o espectro de RMN ^1H da molécula RPF351, em que nota-se um singlete largo em 5,64 ppm correspondente ao hidrogênio ligado à amida, indicando a formação de uma nova ligação carbono-nitrogênio. Já em 5,97 ppm, há um singlete referente ao CH_2 do anel metilenodioxí. Em 4,38 e 4,36 ppm há um duplete com constante de acoplamento (J) de 5,7 Hz, referente ao carbono α à amida. O multiplete em 6,77 ppm, refere-se aos hidrogênios ligados aos carbonos sp^2 do anel aromático benzodioxólico. Na faixa entre 2,30 e 1,18 ppm encontram-se os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia lateral alquílica.

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para identificação dos compostos da série II

6.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – RMN ^{13}C

6.2.2.1 Compostos da série I (ésteres)

As tabelas 8 e 9 apresentam os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C da série **I** (ésteres).

Tabela 8 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série Ia.

<i>Composto</i>	C10	C3	C2	C6	C7	C4	C5	C1	C8	C11
RPF451	173,6	147,8	147,6	130,0	122,1	109,0	108,2	101,1	66,0	34,3
RPF452	173,5	147,8	147,6	130,0	122,1	108,9	108,2	101,1	66,0	34,3
RPF453	174,1	147,8	147,6	130,0	122,1	108,9	108,1	101,1	66,0	27,5
RPF454	170,8	147,8	147,6	129,8	122,2	109,0	108,2	101,2	66,2	21,0
RPF455	173,6	147,8	147,6	130,0	122,1	109,0	108,2	101,1	66,0	34,1
RPF456	172,9	147,8	147,6	130,0	122,2	109,0	108,2	101,1	65,9	43,4
RPF457	173,7	147,8	147,6	130,0	122,2	109,0	108,2	101,1	66,0	34,4
RPF458	173,7	147,8	147,6	130,0	122,2	109,0	108,2	101,1	66,0	34,4
RPF459	173,4	147,8	147,6	130,0	122,1	108,9	108,2	101,1	66,0	36,2

Tabela 9 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série Ib.

<i>Composto</i>	C10	C3	C2	C6	C7	C4	C5	C1	C8	C11	C12	C13
RPF401	166,4	147,9	147,7	130,2	122,2	109,0	108,3	101,2	66,7	129,9	128,4	128,4
RPF402	165,6	147,9	147,8	129,6	122,3	109,1	108,3	101,2	66,9	128,6	131,1	131,1
RPF403	166,5	147,9	147,6	130,0	122,1	109,0	108,3	101,2	66,5	127,5	129,7	129,7
RPF404^a	163,8	147,4	147,3	131,2	122,3	109,0	108,1	101,1	66,9	131,7	129,2	130,1

a – Espectro de RMN de ^{13}C feito em DMSO – *d*6

Os derivados amídicos e ésteres possuem nove carbonos pertencentes à região congênere das estruturas, sendo que um carbono é pertencente ao anel metilenodioxi (C1), seis carbonos são aromáticos (C2, C3, C4, C5, C6, C7), um carbono é alquílico (C8) e um carbono carbonílico (C10).

Na figura 20, apresenta-se o espectro de RMN ^{13}C do composto RPF459, evidenciando os sinais típicos da formação da série **I**. No espectro pode-se observar os sinais de carbono carbonílico em 173,4 ppm (C10), de carbonos aromáticos entre 147,8 e 108,2 ppm (C2, C3, C4, C5, C6, C7), do carbono do anel dioxólico em 101,1 ppm (C1) e do carbono alquílico em 65,9 ppm (C8). A região alquílica da cadeia lateral pode ser verificada em campo mais alto entre 36,2 e 13,6 ppm. Os espectros de RMN ^{13}C de todos os compostos obtidos estão em conformidade com as modificações propostas na molécula da capsaicina.

Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C indicando os principais sinais para identificação dos análogos da capsaicina da série I.

6.2.2.1 Compostos da série II (amidas)

As tabelas 10 e 11 apresentam os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C da série II (amidas).

Tabela 10 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série IIa.

<i>Composto</i>	C10	C3	C2	C6	C7	C4	C5	C1	C8	C11
RPF351	173,5	147,9	147,0	132,3	121,1	108,4	108,3	101,1	43,4	29,7
RPF352	172,9	147,9	147,0	132,4	121,1	108,4	108,3	101,1	43,4	36,8
RPF353	172,9	147,9	147,0	132,4	121,1	108,4	108,3	101,1	43,4	36,8
RPF355	169,9	148,0	147,0	132,2	121,1	108,5	108,3	101,1	43,6	23,2
RPF356	172,8	147,9	146,9	132,4	121,0	108,4	108,3	101,1	43,4	38,7
RPF357	172,9	148,0	147,0	132,4	121,1	108,4	108,3	101,1	43,4	36,5
RPF358	172,9	147,9	146,9	132,4	121,0	108,4	108,3	101,0	43,4	36,8
RPF359	172,9	147,9	147,0	132,4	121,1	108,4	108,3	101,0	43,4	36,8
RPF360	172,3	147,9	146,9	132,4	121,1	108,4	108,3	101,0	43,4	46,1

Tabela 11 – Principais sinais de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série IIb.

<i>Composto</i>	C10	C3	C2	C11	C16	C6	C14	C15	C12	C13	C7	C5	C4	C1	C8
RPF301	167,2	148,0	147,1	134,4	132,1	131,5	128,6	128,6	126,9	126,9	121,3	108,5	108,4	101,1	44,0
RPF302	166,2	148,1	147,2	132,7	137,8	131,8	128,4	128,4	128,8	128,8	121,3	108,5	108,4	101,1	44,1
RPF303^a	165,9	147,2	146,0	133,7	141,0	131,7	128,8	128,8	127,2	127,2	120,4	107,9	107,9	100,7	42,4
RPF304^a	163,8	147,2	146,1	134,0	134,6	127,6	121,2	133,0	129,2	130,7	120,6	108,0	108,0	100,8	42,7
RPF305^a	164,8	148,1	146,4	136,0	126,1	121,5	129,9	148,2	133,3	131,3	121,5	108,5	108,6	101,2	44,3
RPF306	166,8	148,0	147,0	126,7	162,3	128,8	113,8	113,8	132,3	132,3	121,2	108,3	108,5	101,1	43,9

a – Espectro de RMN de ^{13}C em $\text{DMSO} - d_6$.

Na figura 21, apresenta-se o espectro de RMN ^{13}C do composto RPF351, onde se verifica sinais característicos da formação dos produtos desejados. No espectro pode-se observar os sinais de carbono carbonílico em 173,5 ppm (C10), de carbonos aromáticos entre 147,9 e 108,3 ppm (C2,C3,C4,C5,C6,C7), do carbono do anel dioxólico em 101,1 ppm (C1), do carbono alquílico em 43,3 ppm (C8) e da cadeia alifática em 29,7 e 9,81 ppm (C11 e C12). Os espectros de RMN ^{13}C de todos os compostos obtidos indicam a obtenção dos análogos pertencentes à série **II**.

Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C indicando os principais sinais para identificação dos análogos da capsaicina da série II.

6.2.3 Análise Elementar

A análise elementar foi utilizada para caracterização e avaliação do grau de pureza das moléculas. Foi aceito um desvio de 0,5% entre o valor obtido experimentalmente e o valor teórico. Os resultados estão descritos na tabela 12 e 13.

Nota-se que os erros verificados na análise elementar são baixos, principalmente para a série **Ia**, de ésteres alquílicos, onde os produtos finais são óleos. Em geral, todas as amostras foram consideradas puras e mostraram desvios mínimos.

Tabela 12 – Valores teóricos e experimentais obtidos na Análise Elementar para a série I (ésteres).

<i>Composto</i>	%C		Desvio	%H		Desvio
	Teórico	Experimental		Teórico	Experimental	
RPF401	70,31	70,24	0,07	4,72	4,93	0,21
RPF402	62,01	61,98	0,03	3,96	3,81	0,15
RPF403	71,18	71,10	0,08	5,37	5,22	0,15
RPF404	55,42	55,45	0,03	3,10	2,89	0,21
RPF451	69,84	70,13	0,29	8,27	8,01	0,26
RPF452	67,18	67,54	0,36	7,25	7,46	0,21
RPF453	63,45	63,55	0,10	5,81	6,01	0,20
RPF454	61,85	62,03	0,18	5,19	5,24	0,05
RPF456	66,09	65,85	0,24	6,83	6,71	0,12
RPF457	68,16	68,03	0,13	7,63	7,85	0,22
RPF458	69,04	68,56	0,48	7,97	8,17	0,20
RPF459	64,85	64,85	0,00	6,35	6,35	0,00

Tabela 13 – Valores teóricos e experimentais obtidos na Análise Elementar para a série II (amidas).

<i>Composto</i>	%C		Desvio	%H		Desvio	%N		Desvio
	Teórico	Experimental		Teórico	Experimental		Teórico	Experimental	
RPF301	70,58	70,33	0,25	5,13	5,26	0,13	5,49	5,42	0,07
RPF302	62,19	62,04	0,15	4,17	4,21	0,04	4,83	4,77	0,06
RPF303	71,36	71,30	0,06	5,61	5,74	0,13	5,20	5,17	0,03
RPF304	55,58	55,46	0,12	3,42	3,53	0,11	4,32	4,28	0,04
RPF305	60,00	59,83	0,17	4,03	3,79	0,24	9,33	9,02	0,31
RPF306	67,36	66,86	0,50	5,30	5,53	0,03	4,91	4,84	0,07
RPF351	63,76	63,82	0,06	6,32	6,41	0,09	6,76	6,58	0,18
RPF352	67,45	67,31	0,14	7,68	7,45	0,23	5,62	5,61	0,01
RPF353	70,07	70,21	0,14	8,65	9,15	0,50	4,81	4,51	0,30
RPF356	65,14	65,35	0,21	6,83	6,78	0,05	6,33	6,42	0,09
RPF357	66,36	66,51	0,15	7,28	7,47	0,19	5,95	5,99	0,04
RPF358	68,42	68,61	0,19	8,04	8,31	0,27	5,32	5,31	0,01
RPF359	69,29	29,33	0,04	8,36	8,61	0,25	5,05	5,32	0,27
RPF360	66,36	66,45	0,09	7,28	7,21	0,07	5,95	5,91	0,04

6.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Para o desenvolvimento do método, foram utilizadas quatro linhagens de células humanas de câncer de próstata (PC3), câncer de mama (MACL-1), câncer de pulmão (H1299), glioblastoma (U138MG) e culturas primárias de fibroblastos (3T3). A citotoxicidade dos análogos da capsaicina foi constatada pelo método colorimétrico de redução do MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - descrito por Mosmann, em 1983 (ATCC, 2012) em uma faixa de concentração de 0,32 a 1000 μM (0,5% de DMSO). Nenhum efeito foi verificado no crescimento celular na presença de 0,5% de DMSO no meio de cultura.

A viabilidade celular foi determinada pela absorbância de cada poço, analisada por um leitor de microplaca em 570nm, proporcional à redução do MTT e formação dos cristais de formazan (Valadares, Castro, Cunha, 2007). Os valores foram dados em porcentagem de inibição de 50% do crescimento celular (IC_{50}) (Tabela 14).

Tabela 14 – Inibição do crescimento celular ($\text{IC}_{50}\mu\text{M}$) nas linhagens tumorais PC3, MACL-1, H1299, U138MG e 3T3 (fibroblasto).

		<div style="text-align: center;"> $\text{X} =$ <div style="display: inline-block; text-align: center; margin-right: 20px;"> série I RPF401-RPF459 </div> <div style="display: inline-block; text-align: center;"> série II RPF301-RPF360 </div> </div>				
Compostos	R	Linhagem				
		PC3	MACL-1	H1299	U138MG	3T3
PACLITAXEL		111	280	179	75	≥ 1000
CAPSAICINA		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF401		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF402		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF403		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF404		765	≥ 1000	876	≥ 1000	≥ 1000

Tabela 14 – Inibição do crescimento celular ($IC_{50}\mu M$) nas linhagens tumorais PC3, MACL-1, H1299, U138MG e 3T3 (fibroblasto) (continuação).

<div style="text-align: center;"> </div>						
<div style="text-align: center;"> $X = \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---O---} \end{matrix}$ (série I) $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---NH---} \end{matrix}$ (série II) </div>						
<div style="text-align: center;"> RPF401-RPF459 RPF301-RPF360 </div>						
Compostos	R	Linhagem				
		PC3	MACL-1	H1299	U138MG	3T3
RPF353		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF355		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF356		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF357		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF358		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF359		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
RPF360		≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000

Como pode ser observado, não houve diferença significativa na citotoxicidade dos análogos, ou seja, o tipo e tamanho da cadeia lateral parecem não ter influenciado formalmente o potencial inibitório destas moléculas. Também é válido ressaltar que o grupo funcional constituinte das séries planejadas (amida e éster) não proporcionou diferença na atividade observada.

Porém, três análogos, RPF306 ($X = NH$; $R = Ar-4-OMe$), RPF452 ($X = O$; $R = n$ -hexanoíla) e RPF404 ($X = O$, $R = Ar-3,4-Cl$) apresentaram atividade promissora e um nível de citotoxicidade apreciável quando comparados à capsaicina. Os resultados demonstram que o análogo amídico (RPF306) inibiu todas as linhagens ensaiadas, enquanto, ésteres (RPF452 e 404) apresentaram atividade específica nas células testadas. Ao comparar a capsaicina com o análogo para metoxilado, o último possui atividade superior em PC-3, MACL-1, H1299 e U138MG, com maior diferença em células de próstata (PC3) e glioblastoma humano (U138MG) ($IC_{50} = 381$ e $427 \mu M$,

respectivamente). A citotoxicidade do análogo éster *n*-hexanoíla (RPF452) não foi muito superior em comparação ao análogo 3,4-cloro frente às linhagens analisadas. No entanto, o éster alifático foi efetivo contra câncer de mama (MACL-1) e glioblastoma (U138MG), e o éster aromático inibiu células tumorais de próstata (PC-3) e pulmão (H1299).

Além disso, os análogos RPF306, 452 e 404 não foram tóxicos contra culturas primárias de fibroblastos (3T3), sugerindo que estas moléculas apresentam perfil de atividade seletivo.

Adicionalmente, duas das moléculas ativas apresentam substituição aromática (RPF306 e 404), implicando que a rigidez e menor grau de flexibilidade podem estar correlacionados com o comportamento biológico dos análogos. Ainda, a substituição do grupo metilcatecólico pelo sistema bicíclico 1,3-benzodioxol não causou inativação do conjunto de moléculas, fato que pode ser constatado pelo perfil citotóxico dos compostos RPF306, 452, 404 e 101 (de-Sá-Júnior et al., 2013). No entanto, para um melhor entendimento da influência destes grupos na citotoxicidade, análogos contendo o grupo vanilínico na região A poderão ser planejados futuramente. Como mencionado no item 4, a região A da capsaicina, foi substituída pelo sistema benzodioxol, o qual não possui o sítio doador de ligação de hidrogênio observado na estrutura do composto protótipo. A ausência da hidroxila fenólica, presente no metilcatecol, pode comprometer possíveis interações entre os compostos e proteínas presentes em sistemas biológicos, sendo assim, a investigação de análogos vanílicos que mantenham similaridades químicas com a capsaicina na região A, é fundamental para estudos de relação estrutura-atividade.

É importante enaltecer que as linhagens celulares foram escolhidas de acordo com sua agressividade e atividade previamente observada do composto protótipo (Malagarie-Cazenave et al., 2009; Sánchez et al., 2007; Lee, Nam, Kim, 2000). Sánchez e colaboradores (2006) relatam a indução de apoptose, produção de ROS, despolarização da membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 causadas pela capsaicina ($IC_{50} = 20 \mu M$) em células de próstata PC-3. Adicionalmente, a capsaicina inibiu o crescimento de células de glioma (U251MG e U87MG) em uma concentração de $200 \mu M$, sendo que quando administrada simultaneamente com o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) esse efeito era pronunciado em decorrência da sensibilização destas células ao TRAIL (Kim et al., 2010).

Outros estudos demonstram que a capsaicina (10mg/kg) foi capaz de prevenir o aparecimento de câncer pulmonar em camundongos albinos suíços tratados com benzo(a)pireno (Anandakumar et al., 2012). No entanto, a capsaicina não se mostrou ativa nas linhagens testadas e estes dados contradizem os resultados previamente observados por outros grupos de pesquisa. Uma explicação para a divergência de informações é a diferença nas metodologias biológicas utilizadas. Desta forma, os ensaios foram novamente realizados e novos resultados foram obtidos, demonstrando um perfil biológico mais interessante e promissor entre os análogos ensaiados. Tais dados poderão ser encontrados em manuscrito submetido para publicação pelo grupo (Anexo 5).

Por outro lado, os dados indicam que a estratégia empregada produziu análogos mais ativos e seletivos e que amidas e ésteres aromáticos, como o RPF306 e 404, são arcabouços estruturais interessantes para o desenvolvimento de novas séries promissoras de compostos aril-substituídos.

Para investigação do sistema molecular e determinação da relação estrutura propriedade foi realizada a modelagem molecular de alguns compostos, discutida a seguir nos estudos *in silico*.

6.4 MODELAGEM MOLECULAR

A discussão dos estudos *in silico* será dividida em: construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D), cálculo das propriedades moleculares e análise exploratória de dados: HCA e PCA, da mesma forma que o item 5.5. Somente 11 análogos foram modelados juntamente à capsaicina devido ao custo operacional e demanda de tempo para realização dos estudos. Sendo assim, os análogos foram eleitos de acordo com sua atividade nas células tumorais testadas (RPF306, 452 e 404) e variação estrutural da cadeia lateral, visando obter uma diversidade química e biológica no conjunto utilizado.

6.4.1 Construção dos modelos moleculares tridimensionais (3D)

A construção dos modelos moleculares iniciou com a estrutura cristalografada de um dos análogos (RPF303) (*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metilbenzamida), utilizada como molde para os compostos da série **I** e série **II** (Maganhi et al., 2013). Em contrapartida, a capsaicina foi construída a partir do cristal 3-cloro-*N*-(4-hidroxi-3-metoxi-benzil)-2,2-dietilpropanamida (Huang et al., 2010). A figura 22 ilustra a construção das séries de compostos e capsaicina baseadas nas coordenadas cartesianas (x, y, z) das estruturas cristalografadas.

Figura 22 – Representação da construção dos modelos moleculares 3D (capsaicina e análogos) a partir das coordenadas cartesianas das estruturas cristalografadas. Em vermelho, partes da estrutura dos cristais mantidas para construção dos compostos e capsaicina.

Após a construção das estruturas a partir dos cristais, otimização da geometria e cálculo de cargas atômicas parciais, procedeu-se as dinâmicas moleculares. Obtiveram-se 50000 confôrmeros e a partir destes foram escolhidos os de menor energia. Investigaram-se os confôrmeros de menor energia quanto à manutenção de integridade estrutural em relação à estrutura inicialmente utilizada na DM (*output* da minimização), utilizando como critério os valores de RMSD, calculados no programa *Hyperchem 8.0*. Quanto menor o valor de RMSD, menor a distância em Å entre as posições atômicas dos confôrmeros que estão sendo analisados, indicando assim, a integridade estrutural (Baber et al., 2009). Os valores de RMSD encontrados entre o confôrmero de menor energia (obtido após a DM) e a estrutura inicial minimizada da capsaicina e de seus análogos foi de 0,53 Å e menor que 0,09 Å, respectivamente. O valor obtido para o composto protótipo foi superior, fato já esperado, uma vez que sua estrutura foi construída a partir de um cristal que possui baixa similaridade com a capsaicina. Os valores de RMSD indicam que a integridade estrutural das moléculas foi mantida após as simulações de DM.

Um gráfico dos conformêros em relação às energias totais foi construído. A energia total (E_{TOT}) corresponde à somatória das contribuições de energias intramoleculares de deformação axial ($E_{STRETCH}$), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Waals (E_{vdW}), interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}). As contribuições de energia intramolecular de ligação de hidrogênio (E_{ligH}) e de solvatação (E_{SOLV}) não foram consideradas. Os gráficos obtidos e o conformêro escolhido para cada molécula estão ilustrados no anexo 2: “Representação gráfica dos conformêros contra suas energias totais obtidas por simulação de dinâmica molecular”.

Para a série de moléculas submetidas às simulações de DM, a capsaicina e o composto RPF353 apresentaram valores de E_{TOT} superiores (31,81 e 36,33 kcal/mol, respectivamente). Este fato reflete o maior grau de liberdade destas moléculas, uma vez que a cadeia lateral é constituída por nove carbonos.

A representação tridimensional dos conformêros de menor energia em modelos moleculares CPK (Corey–Pauling–Koltun) e tubo ou palito podem ser visualizadas na figura 23. O modelo preenchido CPK considera o raio de van der Waals de cada elemento químico presente na estrutura.

RPF353

RPF303

RPF304

RPF305

RPF306

RPF459

RPF456

RPF452

RPF401

RPF404

Figura 23 – Representação dos confôrmeros de menor energia dos análogos RPF 351, RPF 353, RPF 303, RPF 304, RPF 305, RPF 306, RPF 459, RPF 456, RPF 452, RPF 401, RPF 404 e capsaicina, selecionados a partir das simulações de DM, em CPK e tubo ou palito. Os átomos de carbono apresentam-se em cinza, oxigênio em vermelho, cloro em verde e hidrogênio em branco (ViewerLite 5.0, Accelrys, Inc., 2002).

Posteriormente, 48 descritores moleculares de diferente natureza foram calculados (termodinâmicos, hidrofóbicos, eletrônicos, topológicos, geométricos e estéricos) para cada confôrmero. A matriz composta por 12 linhas (compostos e capsaicina) e 48 colunas (variáveis independentes ou descritores ou propriedades moleculares) foi gerada e utilizada como *input* para a análise exploratória (PCA e HCA).

6.5.2 Cálculo das propriedades moleculares

O cálculo de propriedades moleculares das séries de análogos da capsaicina foi realizado visando comparar possíveis diferenças eletrônicas, hidrofóbicas e estéricas entre estas moléculas, na tentativa de determinar características importantes para a atividade biológica. No entanto, as representações gráficas de mapas de potencial eletrostático, lipofílico, de distribuição de orbitais moleculares, momento dipolo e vetor de dipolo serão apresentados somente para os compostos: RPF304, 306, 452, 459 e capsaicina, visando representar um composto ativo e inativo de cada série e o composto protótipo, visto o objetivo e aplicação da ferramenta em questão.

As propriedades termodinâmicas, obtidas no programa *MOLSIM* 3.2, foram: energia total (E_{TOT}) contribuições de energias intramoleculares de deformação axial ($E_{STRETCH}$), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do

tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Waals (E_{vdW}), interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}), ligação de hidrogênio (E_{ligH}) e solvatação (E_{SOLV}).

Algumas propriedades eletrônicas foram obtidas com o cálculo de carga de ponto único realizado com o método funcional híbrido B3LYP (Becke, 1993) e o conjunto de bases 6-31(d,p). O algoritmo CHELPG foi utilizado para calcular o potencial eletrostático das moléculas (Breneman, Wiberg, 1990). Este método tem o objetivo de avaliar cargas atômicas pontuais que representam de maneira satisfatória o potencial eletrostático molecular em um conjunto de pontos pré-definidos ao redor da molécula (Guadagnini, Bruns, Souza, 1996).

Uma representação dos mapas de potencial eletrostático (MPE) calculados em superfície molecular de Connolly pode ser visualizada para a amida ativa, RPF306 e inativa, RPF304, o análogo ativo da série **II** RPF452 e o análogo inativo da mesma série, RPF459, assim como para o protótipo. A interpretação destes mapas ocorre por um esquema de cores, neste caso, em uma faixa de -0,6 (vermelho intenso: regiões de maior distribuição de densidade eletrônica) a 0,6 (azul intenso: regiões de menor distribuição eletrônica). Os MPEs estão ilustrados na figura 24.

Figura 24 – Mapas de potencial eletrostático (MPEs) da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459. Coloração vermelha indica maior distribuição de densidade eletrônica (-0,6) e coloração azul denota menor distribuição de elétrons (0,6); as moléculas estão exibidas no modelo bola-palito (átomos de carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios em branco). Capsaicina: (*E*)-*N*-(4-hidróxi-3-metoxibenzil)-8-metilnon-6-enamida; composto RPF306: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metóxi benzamida; composto RPF304: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3,4-diclorobenzamida; composto RPF452: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil hexanoato; composto RPF459: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil butanoato.

Em princípio pode-se observar uma diferença na distribuição eletrônica na região A da capsaicina ao comparar sua estrutura com os derivados ésteres e amidas. O anel metilcatecólico possui a hidroxila fenólica de menor densidade eletrônica, caracterizada pela região mais azulada, que não pode ser visualizada no sistema benzodioxol. Tal particularidade e divergência nos mapas de potencial eletrostático pode, em alguns casos, conferir comportamento biológico distinto, e como previamente discutido no item 6.3, novos análogos vanílicos poderão ser sintetizados e ensaiados para estudos de relação estrutura-atividade mais aprofundados.

Em relação às amidas RPF306 (ativo) e RPF304 (inativo), a maior diferença pode ser verificada na cadeia lateral (região substituída), onde a metoxila caracteriza uma menor distribuição eletrônica (região azul), enquanto os átomos de cloro fornecem um caráter de maior densidade de elétrons (região verde). Além disso, o grupo metóxi presente no anel, apresenta um sítio aceptor de ligação de hidrogênio, o que pode aumentar a interação do RPF306 com um receptor hipotético, justificando assim, a diferença na atividade observada entre as moléculas em questão.

Os ésteres RPF452 (ativo) e RPF459 (inativo) não apresentaram diferenças significativas no mapa de potencial eletrostático, mostrando que a distribuição de elétrons destas moléculas não influenciou diretamente na atividade observada. Sendo assim, outras propriedades podem ter sido responsáveis pelo comportamento citotóxico destes análogos.

Ao comparar as amidas (RPF306 e 304), com os ésteres (RPF452 e 459) pode-se notar baixa distribuição eletrônica na região da ligação amídica (coloração azul claro), e ainda, maior densidade de elétrons na região correspondente à ligação éster, dos compostos pertencentes a série **I** (coloração amarela). Tal fato deve-se ao grupo constituinte destas moléculas, uma vez que a ligação amida possui um hidrogênio ligado

ao nitrogênio com carga pontual positiva (0,2419), fornecendo assim, caráter mais positivo a este grupo funcional.

Realizaram-se, também, estudos para explorar as propriedades hidrofóbicas dos compostos, a partir dos mapas de potencial lipofílico e cálculo dos valores de coeficiente de partição (ClogP) (para os 11 análogos e capsaicina), conforme descrito no item 5.5.2. Na tabela 15 estão relacionados os coeficientes de partição dos compostos.

Tabela 15 – Valores dos coeficientes de partição calculados no programa Marvin Beans.

Composto	ClogP	Composto	ClogP
capsaicina	3,75		
Série I		Série II	
RPF401	3,32	RPF303	2,91
RPF404	4,53	RPF304	3,60
RPF452	3,3	RPF305	1,36
RPF456	2,7	RPF306	2,24
RPF459	2,42	RPF351	1,24
		RPF353	3,91

Os valores de ClogP foram calculados com o intuito de verificar as características lipo-hidrofílicas das séries **I** e **II** de análogos. Observa-se que os valores obtidos para a série **I** são discretamente superiores aos valores da série **II**. A figura 25 ilustra os mapas calculados para os compostos RPF304, 306, 452, 459 e capsaicina.

Composto

capsaicina

ClogP = 3,75

RPF306

ClogP = 2,24

RPF304

ClogP = 3,60

RPF452

ClogP = 3,30

RPF459

ClogP = 2,42

Figura 25 – Mapas de potencial lipofílico (MPLs) da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459. Coloração azul indica regiões hidrofóbicas e coloração vermelha denota áreas hidrofílicas, as moléculas são exibidas no modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios em branco). Capsaicina: *(E)*-*N*-(4-hidróxi-3-metoxibenzil)-8-metilnon-6-enamida; composto RPF306: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metóxi-benzamida; composto RPF304: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3,4-diclorobenzamida; composto RPF452: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil hexanoato; composto RPF459: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil butanoato.

Os mapas foram construídos no programa Marvin Beans e avaliados segundo o esquema de cores, que varia entre azul (região mais lipofílica) e vermelho (região mais hidrofílica). Nota-se que em geral, a cadeia lateral das moléculas apresenta caráter mais lipofílico (região azul) e o anel aromático da região A possui menor lipofilicidade (coloração cinza), devido ao movimento eletrônico presente neste sistema. Os análogos substituídos por cadeia lateral aromática (RPF306 e 304) também apresentam esta parte de sua estrutura em coloração cinza, enquanto análogos alquílicos demonstram perfil de lipofilicidade na cadeia lateral mais similar ao observado na capsacina. Neste contexto, não é possível estabelecer uma correlação direta entre o ClogP e a atividade das moléculas, visto que os valores variaram bastante e tanto moléculas mais lipofílicas, como o RPF452 (ClogP = 3,30) como moléculas mais hidrofílicas RPF306 (ClogP = 2,24) apresentaram citotoxicidade.

De forma geral, vale a pena ressaltar que todos análogos apresentam valores de ClogP interessantes para uma absorção celular adequada (valores ≥ 5) (Lipinski et al., 2001).

Os dados indicam que o coeficiente de partição octanol-água calculado (ClogP) não influenciou diretamente na atividade biológica, no entanto o equilíbrio hidrofílico/lipofílico ainda se faz necessário para que estas moléculas possuam perfil farmacocinético e farmacodinâmico adequado.

Para melhor entendimento das contribuições eletrônicas, as energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO também foram calculadas. Estas duas propriedades eletrônicas permitem entender o caráter elétron-doador e/ou elétron-aceptor de um composto e, conseqüentemente, a formação de um complexo de transferência de carga (Arroio, Honório, Silva, 2010). A energia de HOMO (E_{HOMO}) está relacionada com o

potencial de ionização e mede o caráter elétron-doador de uma molécula, ou seja, sua susceptibilidade de atacar um eletrófilo, enquanto que a energia do LUMO (E_{LUMO}) está relacionada com a afinidade química e mede o caráter elétron-aceptor. Além disso, quanto maior a diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO} (GAP) maior é a estabilidade química do composto e menor sua reatividade em reações químicas. (Arroio, Honorio, Silva, 2010).

Na figura 26 estão ilustrados os mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) calculados com o método B3LYP/6-31(d,p) para os compostos RPF304, 306, 452, 459 e capsaicina. Nota-se o mesmo padrão ao observar as moléculas de acordo com a funcionalidade, ou seja, os mapas de HOMO e LUMO posicionaram-se em regiões similares nas amidas (ativa e inativa) e nos ésteres (ativo e inativo). Entretanto, observa-se uma diferença no mapa de LUMO ao comparar compostos de cadeia lateral alquílica e arílica. Por exemplo, os compostos aromáticos (RPF306 e 304) possuem seu mapa de LUMO concentrado na região da cadeia lateral, enquanto os análogos alquílicos (RPF452 e 459), assim como a capsaicina possuem o mapa de LUMO na região aromática A (benzodioxol para RPF452 e 459 e metilcatecol para capsaicina). Tais dados evidenciam que a mudança na cadeia lateral destas moléculas (alquil/aril) altera o caráter elétron-aceptor, que por sua vez pode influenciar na atividade. Desta forma, moléculas alquílicas provavelmente, apresentarão um mapa de LUMO mais similar ao observado para a capsaicina.

Figura 26 – Mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) calculados com o método B3LYP/6–31(d,p) da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459. A isossuperfície calculada foi de 0,02 eV. As moléculas são exibidas no modelo bola-palito (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios em branco). Capsaicina: (*E*)-*N*-(4-hidróxi-3-metoxibenzil)-8-metilnon-6-enamida; composto RPF306: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metóxi-benzamida; composto RPF304: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3,4-diclorobenzamida; composto RPF452: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil hexanoato; composto RPF459: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil butanoato.

Adicionalmente, o momento dipolo foi calculado e os vetores de dipolo podem ser observados na figura 27.

Figura 27 – Vetores de dipolo da capsaicina e compostos RPF306, 304, 452 e 459. Os dipolos foram calculados pelo método B3LYP/6–31(d,p) com o cálculo das cargas CHELPG. As moléculas são exibidas no modelo bola-palito (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios em branco). Capsaicina: (*E*)-*N*-(4-hidróxi-3-metoxibenzil)-8-metilnon-6-enamida; composto RPF306: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metóxi-benzamida; composto RPF304: *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3,4-diclorobenzamida; composto RPF452: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil hexanoato; composto RPF459: benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil butanoato.

Observa-se que os valores de momento dipolo total (μ), figura 27, para os compostos RPF306, 452 e capsaicina são maiores em relação aos análogos RPF304 e 459, inativos. Estes dados indicam que as moléculas ativas possuem maior polaridade e possivelmente, esta característica está associada ao perfil biológico das mesmas. A maior polaridade pode aumentar interações de natureza hidrofílica, como ligações de hidrogênio e também melhorar a solubilidade das moléculas em meio aquoso.

Adicionalmente, os vetores encontram-se em sentidos opostos para as amidas (RPF304 e 306) e em sentidos opostos para o éster ativo, RPF452 e inativo RPF459. A capsaicina possui o vetor no sentido do anel aromático.

As propriedades moleculares estudadas para a capsaicina e seus análogos abrangem descritores termodinâmicos, eletrônicos, hidrofóbicos, topológicos e estéricos e sua natureza, descrição e software utilizado podem ser observados na tabela 16.

Tabela 16 – Descritores calculados para os compostos da série I e II e capsaicina.

Descritores	Natureza	Descrição	Software
$E_{STRETCH}$	Termodinâmica	contribuição de energia de deformação axial	MOLSIM 3.2
E_{BEND}	Termodinâmica	contribuição de energia de deformação angular	
E_{TORS}	Termodinâmica	contribuição de energia de deformação torsional	
$E_{1,4}$	Termodinâmica	contribuição de energia de interações do tipo 1-4	
E_{vdW}	Termodinâmica	contribuição de energia de interações de van der Waals	
E_{CHARGE}	Termodinâmica	contribuição de energia de interações de energia eletrostática	
E_{ligH}	Termodinâmica	contribuição de energia de ligação de hidrogênio	
E_{SOLV}	Termodinâmica	contribuição de energia de solvatação	
E_{TOT}	Termodinâmica	energia potencial total (soma de todas as energias de contribuição)	
E_{HOMO}	Electrônica	energia do orbital de fronteira HOMO	Gaussian 03W
E_{LUMO}	Electrônica	energia do orbital de fronteira LUMO	
GAP	Electrônica	diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO}	
μ_{tot}	Electrônica	momento dipolo total	
μ_x	Electrônica	momento dipolo no eixo X	
μ_y	Electrônica	momento dipolo no eixo Y	
μ_z	Electrônica	momento dipolo no eixo Z	
$ChelpG1_{C_{21}}$	Electrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono carbonílico, calculada por CHELPG	
$ChelpG2_{O_3}$	Electrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio ligado à carbonila, calculada por CHELPG	
$ChelpG3_{N/O_4}$	Electrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio da ligação éster (série I) e nitrogênio da ligação amida (série II), calculada por CHELPG	
$ChelpG4_{C_{18}}$	Electrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono α à carbonila, calculada por CHELPG	

Tabela 16 – Descritores calculados para os compostos da série I e II e capsaicina (continuação).

Descritores	Natureza	Descrição	Software
<i>ClogP</i>	Hidrofóbico	coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de Visvanadhan et al., 1989; Klopman et al., 1993; PHYSPROP	Marvin Beans
<i>I_{Platt}</i>	Topológico	índice que descreve a soma dos graus de contorno da superfície molecular	
<i>I_{Randic}</i>	Topológico	índice que descreve a soma harmônica das médias geométricas dos graus dos vértices	
<i>I_{Balaban}</i>	Topológico	índice que descreve a média da somatória da distância de conectividade da molécula	
<i>I_{Harary}</i>	Topológico	índice que descreve a metade da somatória da diagonal externa, distância matricial recíproca, dos elementos da molécula	
<i>I_{Hyper Wiener}</i>	Topológico	descreve uma variação do índice de Wiener	
<i>I_{Szeged}</i>	Topológico	estende o índice de Wiener para gráficos cíclicos pela contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação (considera aqueles átomos que estão mais perto de um lado da ligação do que o outro)	
<i>I_{Wiewer}</i>	Topológico	índice que descreve a distância atômica topológica média (metade da soma de todas as distâncias atômicas) na molécula	
<i>P_{Wiener}</i>	Topológico	o número da distância de três ligações na molécula	
<i>Dreiding</i>	Estérico	energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula	
<i>PSA</i>	Estérico /Geométrico	área de superfície polar	
<i>V_{vdW}</i>	Estérico	volume de van der Waals	
<i>SA_{vdW}</i>	Estérico /Geométrico	cálculo da área superficial de van der Waals na molécula	
<i>ASA</i>	Estérico /Geométrico	superfície acessível ao solvente, calculada usando o raio do solvente (1,4 Å para a molécula de água)	
<i>ASA+</i>	Estérico /Geométrico	superfície acessível ao solvente de todos os átomos com carga parcial positiva	

Tabela 16 – Descritores calculados para os compostos da série I e II e capsaicina (continuação).

Descritores	Natureza	Descrição	Software
<i>ASA-</i>	Estérico /Geométrico	superfície acessível ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa	<i>Marvin Beans</i>
<i>ASA_h</i>	Estérico /Geométrico	superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos	
<i>ASA_p</i>	Estérico /Geométrico	superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofílicos	
<i>H_{donor}</i>	Topológico	número de sítios doadores/aceptores de ligação de hidrogênio na molécula	
<i>H_{acceptor}</i>	Topológico	refratividade molar	
<i>MR</i>	Estérico / Hidrofóbico	número de ligações rotáveis na molécula	<i>HyperChem 8.0</i>
<i>Rotable bond</i>	Topológico	área superficial aproximada	
<i>SA_{approx}</i>	Estérico	área superficial obtida pelo método de GRID	
<i>SA_{grid}</i>	Estérico	volume total	
<i>Volume</i>	Intrínseco/ Estérico	massa atômica	
<i>Mass</i>	Estérico	energia de hidratação	
<i>E_{hydration}</i>	Estérico	polarizabilidade	
<i>α</i>	Estérico /Eletrônico		

Paralelamente ao estudo das propriedades moleculares desta série de compostos realizou-se a análise exploratória de dados. A partir das propriedades calculadas, gerou-se uma matriz com 48 colunas (variáveis independentes) e 12 linhas correspondentes a capsaicina, cinco análogos ésteres (série **I**) e seis análogos amídicos (série **II**). Esta matriz serviu como *input* para a análise exploratória de dados.

6.5.3 Análise exploratória de dados: HCA e PCA

A etapa de análise exploratória, aplicação dos métodos de HCA e PCA, foi realizada com o programa Pirouette 3.11 (Infometrix, Ltd., 2003). Estes estudos tem o propósito de avaliar, agrupar e correlacionar os compostos, ou amostras, com base em suas propriedades moleculares e grau de similaridade.

Um ponto importante é o pré-processamento dos dados devido às distintas ordens de grandeza entre os descritores, necessitando uniformizá-las. A matriz gerada teve seus dados tratados por auto-escalamento, o qual implica em subtrair de cada elemento de uma coluna da matriz de dados o valor médio da respectiva coluna e dividir o resultado pelo desvio padrão da mesma.

O PCA, sendo uma análise de componentes principais não supervisionada teve como finalidade correlacionar os descritores, encontrando outras variáveis, as PCs, que possam descrever a informação dos dados originais (Montanari, 2011; Moita Neto, Moita, 1998).

Os resultados desta análise mostram que as duas primeiras componentes principais descrevem mais de 61 por cento (61,93%) da variância total dos dados originais (Figura 28A). A PC1 ou fator 1 discrimina 34,90% e a PC2 ou fator 2 descreve 27,03%. Adicionalmente, a PC3, PC4 e PC5 descrevem 15,28, 9,59 e 6,92 %, respectivamente.

respectivamente, da variância total, de modo que não influenciam significativamente no processo de discriminação sendo, portanto, excluídas da discussão de resultados.

A PC1, aparentemente, é responsável pela divisão das amostras de acordo com o seu grupo funcional (Figura 28B). Amidas, incluindo a capsaicina, foram posicionadas no lado positivo do eixo zero da PC1, enquanto os análogos da série **I** (ésteres) ficaram localizados no lado negativo do eixo vertical. Somente o composto RPF351 é uma exceção ao padrão estipulado pelo fator 1.

Interessantemente, a PC2 ou fator 2 considerou, para seu padrão discriminativo a substituição da ligação éster ou amida, uma vez que compostos aromáticos e alifáticos encontram-se em lados opostos do gráfico. Além disso, a PC2 separou os análogos em três grupos: grupo *vermelho*, que possui amidas de cadeia longa (capsaicina e RPF353); grupo *azul*, constituído por ésteres alquílicos (RPF459, 452 e 456); grupo *verde* com amidas e ésteres arílicos (RPF303, 304, 306, 401 e 404); e finalmente, os análogos RPF351 e 305, que não foram incorporados aos grupos previamente citados.

Nota-se que os compostos bioativos RPF306, 452 e 404, permaneceram posicionados próximos ao eixo vertical do fator 1. Tal informação pode ser de extrema relevância no desenvolvimento de novos análogos, visto que moléculas que localizarem-se perto do eixo em questão possuirão maior probabilidade de apresentarem atividade biológica em linhagens tumorais.

A tabela de pesos fornece informações sobre quais descritores ou propriedades moleculares mais influenciam na diferenciação das amostras (Figura 28C). Na PC1 (34,9%), descritores topológicos (índice de Randic, índice de Platt, número de ligações rotáveis e índice de Harary) e estéricos/hidrofóbicos (refratividade molar) possuem maior peso (valor absoluto >0,3). Na PC2 (27,03%) descritores eletrônicos (E_{LUMO}),

topológicos (aceptores de ligação de hidrogênio e índice de Harary) e estéricos/hidrofóbicos (refratividade molar) influenciaram mais na separação das amostras. Da mesma forma, seus valores absolutos variaram de 0,51 a 0,39.

Figura 28 – PCA (A) seleção de fatores – fator 1 e 2 discriminaram 61,93% da variância total dos dados originais; (B) gráfico de escores para a PC1 versus PC2 – as amostras foram classificadas em três grupos diferentes: grupo vermelho (amidas de cadeia alifática longa: capsaicina e RPF 353); grupo azul (ésteres alquílicos: RPF 459, 456 e 452); grupo verde (amidas e ésteres aromáticos: RPF 303, 304, 306, 401 e 404), os compostos RPF 305 e 351 não foram incorporados a nenhum grupo previamente citado; (C) pesos das variáveis independentes; (D) diagnóstico de outliers pela distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis. Linha limítrofe (verde) é baseada em 95% de limite de confiança (configuração interna do programa *Pirouette*).

Para diagnosticar possíveis amostras atípicas (*outliers*), foi avaliado o gráfico da distância residual das amostras em relação à distância de Mahalanobis, figura 28D.

Todos análogos apresentaram-se dentro da linha limítrofe (95% de confiança) em relação à distância de Mahalanobis, eixo x, e a distância residual das amostras, eixo y. Portanto nenhuma molécula foi descartada da análise.

Dados complementares foram obtidos para os métodos de PCA e HCA, reforçando o padrão estipulado pela componente principal 1 e componente principal 2. O dendrograma de amostras pode ser observado na figura 29. A análise de HCA apresentou maior distinção entre as amostras, classificando-as em cinco grupos (A, B, C, D e E) ao utilizar o cursor de similaridade em 0,6 (linha pontilhada) como referência.

Os análogos foram agrupados, em geral, de acordo com seus grupos funcionais (amida ou éster) e natureza da cadeia lateral (alifática ou aromática). Considerando ésteres, as estruturas foram divididas em dois grupos: A (68,8% de similaridade) e C (66,3% de similaridade), sendo que o grupo A é composto por ésteres alquílicos e o grupo C por ésteres arílicos. Já as amidas foram separadas em três grupos: B (69,8% de similaridade), D (21,5% de similaridade) e E (64,1% de similaridade). O agrupamento B é constituído por amidas aromáticas substituídas por grupos elétron-doadores (4-OCH₃, 4-CH₃), enquanto o grupo D é formado por amidas aromáticas substituídas por grupos elétron-aceptores (3-NO₂, 3,4-Cl). Por fim, o grupo E compreende amidas de cadeia lateral longa, como a capsaicina e RPF353. O composto RPF351, assim como na análise de componentes principais, não foi agrupado com o restante das moléculas.

Figura 29 – Dendrograma encontrado para a análise de HCA. Considerando o cursor de similaridade em 0,6 (linha pontilhada), a capsaicina e seus análogos foram agrupados em cinco grupos distintos: A (68,8% de similaridade, ésteres alquílicos), B (69,8% de similaridade, amidas substituídas por grupos elétron-doadores), C (66,3% de similaridade, ésteres arílicos), D (21,5% de similaridade, amidas substituídas por grupos elétron-aceptores) e E (64,1% de similaridade, amidas de cadeia longa). O composto RPF351 não foi agrupado às categorias anteriormente citadas.

As propriedades moleculares são diretamente dependentes da estrutura química. Propriedades estéricas, por exemplo, estão relacionadas ao formato e volume da molécula. Propriedades eletrônicas e estereoquímicas podem ser consideradas essenciais para o processo de reconhecimento molecular. De acordo com os resultados da análise de componentes principais (PCA), as variáveis que apresentaram maior peso (maior valor absoluto) são descritores topológicos (índice de Randic, índice de Platt e número de ligações rotáveis), na PC1, e energia de orbitais de fronteira (E_{LUMO}), na PC2. Assim, os resultados indicam que propriedades moleculares topológicas e eletrônicas possam ser relevantes para o processo de reconhecimento molecular.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho consta da síntese e identificação de compostos, referentes às séries **I** (ésteres) e **II** (amidas) de derivados da capsaicina, avaliação do seu potencial citotóxico e realização de estudos de modelagem molecular.

- Foram sintetizados, no total, 28 análogos, sendo 13 da série **I** (ésteres) e 15 da série **II** (amidas). As estruturas dos compostos sintetizados foram caracterizadas por meio de análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C , análise elementar e pela faixa de fusão;

- As metodologias sintéticas com cloretos de ácidos e ácidos carboxílicos, para realizar a *N*-acilação e *O*-acilação da piperonilamina e álcool piperonílico, mostraram-se adequadas, sendo que os rendimentos (22% - 78%) foram apreciáveis e as condições reacionais poderão ser otimizadas para um melhor aproveitamento dos materiais de partida;

- Quanto à resposta biológica avaliada, não houve diferença pronunciada na citotoxicidade dos análogos, ou seja, o tipo e tamanho da cadeia lateral não influenciaram de forma significativa o potencial inibitório destas moléculas. Assim, uma amida aromática, RPF306 ($\text{R} = \text{Ar-4-OCH}_3$) foi ativa em todas as linhagens tumorais ensaiadas e dois análogos ésteres, RPF452 ($\text{R} = n\text{-hexanoíla}$) e 404 ($\text{R} = \text{Ar-3,4-Cl}$) inibiram o crescimento celular de maneira específica, sendo o composto RPF452 citotóxico em células de câncer de mama (MACL-1) e glioblastoma (U138MG) e o composto RPF404 ativo contra células de câncer de próstata (PC3) e pulmão (H1299);

- Três análogos apresentaram perfil biológico promissor, sendo dois aril-substituídos (RPF306 e 404), implicando que a rigidez e menor grau de flexibilidade podem estar correlacionados com o comportamento biológico destas moléculas;

- Os compostos RPF306, 452 e 404 foram mais ativos que a capsaicina e apresentaram seletividade para células tumorais, pois não inibiram o crescimento de culturas primárias de fibroblastos;
- Considerando os dados obtidos na modelagem molecular, a determinação de propriedades moleculares revelou algumas diferenças entre os compostos ativos, RPF306 e RPF452, inativos, RPF304 e RPF459 e a capsaicina. Em relação aos mapas de potencial eletrostático e de orbitais moleculares verificou-se algumas diferenças entre o protótipo e seus derivados e entre análogos aquílicos e arílicos. Os valores de momento dipolo mostram-se superiores para as moléculas ativas (RPF 306, 452 e capsaicina) e menores que 1,6 debye, para as moléculas inativas RPF304 e 459, indicando que a atividade pode estar relacionada com a polaridade dos compostos. Os MPLs revelaram que no geral, a cadeia lateral dos análogos e capsaicina apresentaram maior caráter lipofílico, entretanto não foi possível estabelecer uma correlação direta entre o ClogP e a atividade das moléculas;
- Quanto à análise exploratória de dados, foram obtidos resultados coerentes na análise de componentes principais e análise hierárquica de agrupamento, visto que, em geral, os análogos foram separados de acordo com a constituição do grupo funcional (amida/éster) e substituição da cadeia lateral (alquil/aril);
- As propriedades topológicas e eletrônicas mostraram-se mais relevantes para o agrupamento das amostras na análise de componentes principais. Deste modo, alguns descritores como E_{LUMO} podem ser explorados para otimização das moléculas estudadas;
- Os resultados obtidos mostram-se promissores, pela obtenção de duas séries de análogos funcionais da capsaicina utilizando metodologias sintéticas simples e pela atividade biológica observada para os compostos RPF306, 452 e 404.

- Novos análogos aril-substituídos, como o RPF306 e 404, poderão ser planejados e modelados visando estudo mais aprofundado destas séries e entendimento das características físico-químicas mais influentes na resposta biológica;
- Novos derivados vanilínicos contendo cadeias laterais alquílicas e arílicas variadas, poderão ser sintetizados e avaliados frente às linhagens MACL-1, U138MG, H1299 e PC3 para ampliar e aprimorar os estudos de relação estrutura-atividade;
- A substituição da funcionalidade éster (série **I**) ou amida (série **II**) por grupos como: sulfonamidas, hidrazonas, sulfonil-hidrazonas, triazóis, uréia e tiouréia mostra-se como uma alternativa interessante no planejamento de novas séries de análogos funcionais da capsaicina;
- A modelagem molecular poderá auxiliar na exploração e entendimento do comportamento dos sistemas moleculares, assim como o estudo da relação entre a substituição dos grupos funcionais e a atividade biológica observada;
- A modificação molecular da capsaicina mostra-se como uma estratégia interessante, plenamente viável e promissora para a obtenção de novos compostos biologicamente ativos e a busca por moléculas inovadoras será continuada pelo grupo visando obter análogos sintéticos com atividade superior ao protótipo.

8. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; KUNNUMAKKARA, A. B.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; SUNG, B.; ANAND, P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. **Planta Médica**, v. 74, p. 1560-1563, 2008.
- ALI, R.; MIRZA, Z.; ASHRAF, G. M. D.; KAMAL, M. A.; ANSARI, S. A.; DAMANHOURI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; CHAUDHARY, A. G.; SHEIKH, I. A. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. **Anticancer Research**, v. 32, p. 2999-3006, 2012.
- ALLINGER, N. L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 8127-8134, 1977.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-128, 2004.
- AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptose: Programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 15, p. 15-18, 2003.
- ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I.; HOPFINGER, A. J. 4D-QSAR: Perspectives in drug design. **Molecules**, v. 15, p. 3281-3285, 2010.
- ANJOS, A. C. Y.; ZAGO, M. M. F. A experiência terapêutica quimioterápica oncológica na visão do paciente. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, p. 33-35, 2006.
- ARANOVICH, A.; LIU, Q.; COLLINS, T.; GENG, F.; DIXIT, S.; LEBER, B.; ANDREWS, D. W. Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. **Molecular Cell**, v. 45, p. 754-763, 2012.
- ARROIO, A.; HONORIO, K. M.; SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos de relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, p. 694-699, 2010.
- ARROIO, A.; LIMA, E. F.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. A chemometric study on the analgesic activity of cannabinoid compounds using SDA, KNN and SIMCA methods. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 577-585, 2009.
- ATCC. MTT Cell Proliferation Assay. Disponível em: <<http://www.atcc.org/attachments/2273.pdf>>. Acesso em 12 de outubro de 2012.
- BABER, J. C.; THOMPSON, D. C.; CROSS, J. B.; HUMBLET, C. GARD: A generally applicable replacement for RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 1889-1900, 2009.

BACKONJA, M. M. High-concentration capsaicin for the treatment of post-herpetic neuralgia and other types of peripheral neuropathic pain. **European Journal of Pain Supplements**, v. 4, p. 170-174, 2010.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, p. 1172-1174, 2002.

BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 26-31, 2009.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos, **Química Nova**, v. 32, p. 679-682, 2009.

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 antitrombóticos. **Química Nova**, v. 22, p.744-759, 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. (2001) **Química Medicinal, As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 2ª edição, Porto Alegre, 243 p.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, A. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A Química Medicinal de N-Acildrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 25, p. 129-130, 2002.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANT'ANNA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 1-2, 1997.

BARILLE-NION, S.; BAH, N.; VEQUAUD, E.; JUIN, P. Regulation of cancer cell survival by BCL2 family members upon prolonged mitotic arrest: opportunities for anticancer therapy. **Anticancer Research**, v. 32, p. 4225-4234, 2012.

BAUMANN, E. Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern, **Berichte**, v. 19, p. 3218, 1886.

BAYES, M.; RABASEDA, X.; PROUS, J. R. Gateways to clinical trials. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 303-311, 2003.

BECKE, A. D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 1372-1377, 1993.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. (1998) **Chemometrics: a Practical Guide**, Nova Iorque, 348 p.

BERTI, F. V.; PÉRTILE, R. A. N.; JUNIOR, J. M. S.; VALLE, R. M. R.; DIAS, P. F.; PORTO, L. M. Estudo *in vitro* do efeito antitumoral da aloína em cultura de células de melanoma. **Exacta**, v. 5, p. 169-172, 2007.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from *Piper* species. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 60C, p. 539-543, 2005.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the *Piper* species. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 599-607, 2008.

BEZERRA, D. P.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; VASCONCELLOS, M. C.; SILVA, A. C. R.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O.; HENRIQUES, J. A. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 652, p. 164-174, 2008.

BHUTANI, M.; PATHAK, A. K.; NAIR, A. S.; KUNNUMAKKARA, A. B.; GUHA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin inducible stat3 activation. **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 3024-3031, 2007.

BILLARD, C. Development of Noxa-like BH3 mimetics for apoptosis- based therapeutic strategy in chronic lymphocytic leukemia. **MolecularCancer Research**, v. 10, p. 673-676, 2012.

BODET, L.; GOMEZ-BOUGIE, P.; TOUZEAU, C.; DOUSSET, C.; DESCAMPS, G.; MAÏGA, S.; AVET-LOISEAU, H.; BATAILLE, R.; MOREAU, P. LE GOUILL, S.; PELLAT-DECEUNYNCK, C.; AMIOT, M. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. **Blood Journal**, v. 118, p. 3901-3910, 2011.

BRENEMAN, C. M.; WIBERG, K. B. Determining atom-centered monopoles from molecular eletrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, p. 361-373, 1990.

BURKERT, U. E.; ALLINGER, N. L. (1982) **Molecular Mechanics**, Washington, 340 p.

BUTLER, L. M.; ZHOU, X.; XU, W. S.; SCHER, H. I.; RIFKIND, R. A.; MARKS, P. A. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. **Cell Biology**, v. 99, p. 11700-11705, 2002.

CAMPONE, M.; ISAMBERT, N.; BOURBOULOUX, E.; ROCHE, H.; BONNETERRE, J.; MILANO, G.; FUMOLEAU, P. A phase I study of vinflunine in combination with capecitabine in patients with metastatic breast cancer previously treated with anthracyclines and taxanes. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, p. 871-879, 2012.

CANDE C.; CECCONI, F.; DESSEN, P.; KROEMER, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? **Journal of Cell Science**, v. 15, p. 4727–4734, 2002.

CAPILLA, A. S.; SÁNCHEZ, I.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D. Antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of new compounds related to podophyllotoxin, containing the 2,3-dihydro-1,4-benzodioxin system. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 389–393, 2001.

CAPDEVILLE, R.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; MATTER, A. GLIVEC (STI571, IMATINIB), A rationally developed, targeted anticancer drug. **Drug Discovery**, v. 1, p. 493-501, 2002.

CAREY, J. S.; LAFFAN, D.; THOMSON, C.; WILLIAMS, M. T. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 2337-2347, 2006.

CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M.; CRUZ, F. T. Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 12, n. 1, p. 8-10, 2010.

CASTRO, T. C.; LELLICIONE, V. L. B.; FIGUEIREDO, M. R.; SOARES, R. O. A.; BOZZA, M. T.; VIANA, V. R. C.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L. Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hoveniadelphicis* Thunb. Cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 96-98, 2002.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CHEN, C.; KONG, A. N: Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 1505-1516, 2004.

CHEN, M.; WANG, J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. **Apoptosis**, v. 7, p. 313-316, 2002.

CHONGHAILE, T. N.; LETAI, A: Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. **Oncogene**, v. 27, p. 149-157, 2009.

CHOW, J.; NORNG, M.; ZHANG, J.; CHAI, J. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells: mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 565-574, 2007.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. (2012) **Organic Chemistry**, 2ª edição, Oxford, 1512 p.

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

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 785-788, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 48-52, 2010.

CUNICO, W, GOMES, C. R. B.; FERREIRA, M. L. G.; FERREIRA, T. G.; CARDINOT, D.; SOUZA, M. V. N.; LOURENÇO, M. C. S. Synthesis and antimycobacterial activity of novel amino alcohol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 974-977, 2011.

DELFT, M. F.; WEI, A. H.; MASON, K. D.; VANDENBERG, C. J.; CHEN, L.; CZABOTAR, P. E.; WILLIS, S. N.; SCOTT, C. L.; DAY, C. L.; CORY, S.; ADAMS, J. M.; ROBERTS, A. W.; HUANG, D. C. S: The BH3 mimetic ABT-737 targets selective BCL2 proteins and efficiently induces apoptosis *via* BAK/BAX if MCL1 is neutralized. **Cancer Cell**, v. 10, p. 389-399, 2006.

DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, A. K.; TAVARES, M. T.; DAMIÃO, M. C. F. C. B.; AZEVEDO, R. A.; CÂMARA, D. A. D.; PEREIRA, A.; SOUZA, D. M.; PARISE FILHO, R. 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.

DEWAR, M. J. S. E.; ZOEBISCH, G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 3902-3909, 1985.

DOHERTY, D. MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software - User's Guide, version 3.2. The Chem21 Group Inc., Lake Forest, IL, 2002.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A: Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 790-803, 2010.

DRAY, A. Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. **Life Sciences**, v. 51, p. 1759-1761, 1992.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

EL-NAJJAR, N.; CHATILA, M.; MOUKADEM, H.; VUORELA, H.; OCKER, M.; GANDESIRI, M.; SCHNEIDER-STOCK, R.; GALI-MUHTASIB, H. Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. **Apoptosis**, v. 15, p. 183-184, 2010.

ETIEVANT C.; BARRET J. M.; KRUCZYNSKI A.; PERRIN D.; HILL B.T. Vinflunine (20',20'-difluoro-3',4'-dihydrovinorelbine), a novel Vinca alkaloid, which

participates in P-glycoprotein (Pgp)- mediated multidrug resistance *in vivo* and *in vitro*. **Investigational New Drugs**, v. 16, p. 3-17, 1998.

FAHY, J.; HELLIER, P.; BREILLOUT, F.; BAILLY, C. Vinflunine: Discovery and synthesis of a novel microtubule inhibitor. **Seminars in Oncology**, v. 35, p. 3-5, 2008.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 742-753, 2002.

FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis em QSAR. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 439-441, 2002.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1774, 2011.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Publishing Group**, v. 5, p. 876-883, 2005.

FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 85-87, 2004.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Cardiotônicos: Histórico e perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 182-185, 1996.

FIORILLO, C.; NEDIANI, C.; PONZIANI, V.; GIANNINI, L.; CELLI, A.; NASSI, N.; FORMIGLI, L.; PERNA, A. M.; NASSI, P. Cardiac volume overload rapidly induces oxidative stress-mediated myocyte apoptosis and hypertrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1741, p. 173-181, 2005.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**, 2006.

FORMARIZ, T. P.; WANCZINSK, B. J.; SILVA JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, p. 44-46, 2004.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798-4811, 2006.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 4, p. 569-576, 2004.

GARÓFOLO, A.; AVESANI, C. M.; CAMARGO, K. G.; BARROS, M. E.; SILVA, S. R. J.; TADDEI, J. A. A. C.; SIGULEM, D. M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de nutrição**, v. 17, n. 4, p.491-497, 2004.

GAUSSVIEW for Windows, versão 5.0. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.

GAUSSIAN 03, Revisão C.02, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY JR, J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚŁOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A., 2004. Gaussian, Inc., Wallingford, CT.

GEYER, C. E.; FORSTER, F.; LINDQUIST, D.; CHAN, S.; ROMIEU, G.; PIENKOWSKI, T.; JAGIELLO-GRUSZFELD, A.; CROWN, J.; CHAN, A.; KAUFMAN, B.; SKARLOS, D.; CAMPONE, M.; DAVIDSON, N.; BERGER, M.; OLIVA, C.; RUBIN, S. D.; STEIN, S.; CAMERON, D. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive advanced breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 2733–2743, 2006.

GLASER, K. B. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 659–671, 2007.

GLOBOCAN. Fast Stats. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>> Acesso em: 16 de fevereiro de 2014.

GOVIL, J. N.; SINGH, V. K. (2008) **Recent Progress in Medicinal Plants: Standardization of Herbal/Ayurvedic Formulations**, v. 24 Houston, 462 p.

GOPALAKRISHNAN, A.; KONG, A. N: Anticarcinogenesis by dietary phytochemicals: cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 in abnormal cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1257-1270, 2008.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, p. 767-776, 2007.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual Reviews**, v. 53, p. 615-627, 2002.

GRIVICICH, I; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-341, 2007.

GUADAGNINI, P. H.; BRUNS, R. E.; SOUZA, A. A. Cargas atômicas em moléculas. **Química Nova**, v. 19, p. 148-155, 1996.

GUEMBAROVSKI, R. L.; MARA, I.; CÓLUS, S. Câncer: uma doença genética. **Genética na Escola**, v. 3, n. 1, p. 4-6, 2008.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-228, 2005.

GUEST, M. F.; BUSH, I. J.; VAN DAM, H. J. J.; SHERWOOD, P.; THOMAS, J. M. H.; VAN LENTHE, J. H.; HAVENITH, R. W. A.; KENDRICK, J. The GAMESS-UK electronic structure package: algorithms, developments and applications. **Molecular Physics**, v. 103, p. 719-747, 2005.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 70, p. 81-83, 2010.

HAJDUK, P. J.; GREER, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. **Drug Discovery**, v. 6, p. 211-219, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 114, p. 646-674, 2011.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Macmillan Magazines**, v. 407, p. 770-775, 2000.

HEERDT, G.; MORGON, N. H. Validação computacional de métodos compostos no estudo de propriedades moleculares. **Química Nova**, v. 34, p. 868-873, 2011.

HILL B. Superior in vivo experimental antitumor activity of vinflunine, relative to vinorelbine, in a panel of human tumor xenografts. **European Journal of Cancer**, v. 35, p. 512-520, 1999.

HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. A study on the influence of molecular properties in the psychoactivity of cannabinoid compounds. **Journal of Molecular Modeling**, v. 11, p. 200-209, 2005.

HOUSE, J. E. (2004) **Fundamentals of Quantum Chemistry**, 2ª edição, San Diego, 291 p.

HUANG, S. P.; CHEN, J. C.; WU, C. C.; CHEN, C. T.; TANG, N. Y.; HO, Y. T.; LO, C.; LIN, J. P.; CHUNG, J. G.; LIN, J. G. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. **Anticancer Research**, v. 29, p. 165-173, 2009.

HUANG, Y.L.; WANG, W. L.; SHAN, S. 3-Chloro-N-(4-hydroxy-3-methoxy-benzyl)-2,2-dimethylpropanamide. **Acta Crystallographica Section E**, v. 66, p. 877, 2010.

HYPERCHEM Program release 8.0 for Windows. Hybercube, Inc., Gainesville, FL.

IGNEY, F.H, KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews in Cancer**, v. 2, p. 277-288, 2002.

INCA. Estimativa 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014> Acesso em: 15 de fevereiro de 2014.

INOUE, N.; MATSUNAGA, Y.; SATOH, H.; TAKAHASHI, M. Enhanced energy expenditure and fat oxidation in humans with high BMI scores by the ingestion of novel and non-pungent capsaicin analogues (capsinoids). **Bioscience. Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 380–389, 2007.

IP, S. W.; LAN, S. H.; LU, H. F.; HUANG, A. C.; YANG, J. S.; LIN, J. P.; HUANG, H. Y.; LIEN, J. C.; HO, C. C.; CHIU, C. F.; WOOD, W. G.; CHUNG, J. G. Capsaicin mediates apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through mitochondrial depolarization and endoplasmic reticulum stress. **Human Experimental Toxicology**, p. 2-9, 2012.

ITO, K.; NAKAZATO, T.; YAMATO, K.; MIYAKAWA, Y.; YAMADA, T.; HOZUMI, N.; SEGAWA, K.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. **Cancer Research**, v. 64, p. 1071-1077, 2004.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 139–163, 2005.

JORGE, S. D. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de derivados benzofuroxânicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KANG, J.; TSUYOSHI, G.; HAN, I.; KAWADA, T.; KIM, Y. M.; YU, R. Dietary capsaicin reduces obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet. **Obesity Journal**, v. 18, n. 4, p. 780-781, 2010.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 42-48, 2000.

KIM, J. Y.; KIM, E. H.; KIM, S. U.; KWON, T. K.; CHOI, K. S. Capsaicin sensitizes malignant glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis via DR5 upregulation and surviving downregulation. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 3, p. 367-374, 2010.

KIM, J. D.; KIM, J. M.; PYO, J. O.; KIM, S. Y.; KIM, B. S.; YU, R.; HAN, I. S. Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. **Cancer Letters**, v. 120, p. 235-240, 1997.

KIM, C. S.; KAWADA, T.; KIM, B. S.; HAN, I. S.; CHOE, S. Y.; KURATA, T.; YU, R. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IκB-α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. **Cellular Signaling**, v. 15, p. 299-300, 2003.

KIM, M. Y.; TRUDEL, L. J.; WOGAN, G. N. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. **Anticancer Research**, v.29, p. 3733-3739, 2009.

KLOPMAN, G.; LI, J. Y.; WANG, S.; DIMAYUGA, M. Computer Automated log P Calculations Based on an Extended Group Contribution Approach. **Journal of chemical information and modeling**, v. 34, p. 752-781, 1994.

KOEHN, F.E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v. 4, p. 206–220, 2005.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER J. H. (1988) **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro, 783 p.

KONG, E. H.; KIM, Y. J.; KIM, Y. J.; CHO, H. J.; YU, S. N.; KIM, K. Y.; CHANG, J. H.; AHN, S. C. Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. **Oncology Reports**, v. 20, 785-792, 2008.

KRUCZYNSKI, A.; BARRET J. M.; ETIEVANT C.; COLPAERT F.; FAHY J.; HILL B. T. Antimitotic and tubulin-interacting properties of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 635-648, 1998.

KRUCZYNSKI, A.; ETIEVANT, C.; PERRIN, D.; CHANSARD, N.; DUFLOS, A.; HILL, B. T. Characterization of cell death induced by vinflunine, the most recent Vinca alkaloid in clinical development. **British Journal of Cancer**, v. 86, p. 143-150, 2002.

KRUCZYNSKI, A.; POLI, M.; DOSSI, R.; CHAZOTTES, E.; BERRICHON, G.; RICOME, C.; GIAVAZZI, R.; HILL, B. T.; TARABOLETTI, G: Antiangiogenic, vascular-disrupting and anti-metastatic activities of vinflunine, the latest vinca alkaloid in clinical development. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 2821-2832, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (2005) **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**, Brasil. 1504 p.

LABI, V.; GRESPI, F., BAUMGARTNER, F.; VILLUNGER, A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 977–987, 2008.

LEACH, A. R. (1998) **Molecular Modelling, Principles and Applications**, 2ª edição, Edinburgh, 784 p.

LEE, K. H. Current developments in discovery and design of new drug candidates from plant natural. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 273–283, 2004.

LEE, Y. S.; NAM, D. H.; KIM, J. A. Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. **Cancer Letters**, v. 161, p. 121-128, 2000.

LEE, S.; RICHARDSON, R. L.; DASHWOOD, R. H.; BAEK, S. J. Capsaicin represses transcriptional activity of β -catenin in human colorectal cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 646–655, 2012.

LEE, Y. J.; WON, A. J.; LEE, J.; JUNG, J. H.; YOON, S.; LEE, B. M.; KIM, H. S. Molecular Mechanism of SAHA on Regulation of Autophagic Cell Death in Tamoxifen-Resistant MCF-7 Breast Cancer Cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, p. 881-893, 2012.

LEITE, A. C. L.; SILVA, K. P.; SOUZA, I. A.; ARAÚJO, J. M.; BRONDANI, D. J. Synthesis, antitumour and antimicrobial activities of new peptidyl derivatives containing the 1,3-benzodioxole system. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 1059–1065, 2004.

LEVINE, I. N (2008). **Quantum Chemistry**, 6ª edição, Englewood Cliffs, 1991.

LI, L. Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature**, v 412, p. 95–99, 2001.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

LIPINSKI, C.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, 2001.

LOPES, E. V.; OKURA, M. H. Estudo de vida-de-prateleira e análise sensorial de conserva e molho da pimenta biquinho. **Faculdades Integradas de Uberlândia**, n. 2, p. 97-99, 2005.

MAGANHI, S.H.; DAMIÃO, M.C.F.C.B.; TAVARES, M.T.; PARISE FILHO, R. N-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)meth-yl]-4-methyl-benzamide: an analogue of capsaicin., **Acta Crystallographyca Section E**, v. 69, p. 332, 2013.

MAITY, R.; SHARMA, J.; JANA, N. R. Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin–proteasome system dysfunction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, p. 933-941, 2010.

MALAGARIE-CAZENAVE, M.; OLEA-HERRERO, N.; VARA, D.; DÍAZ-LAVIADA, I. Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. **FEBS Letters**, v. 583, p. 141-147, 2009.

MALAGARIE-CAZENAVE, M.; OLEA-HERRERO, N.; VARA, D.; MORELL, C.; DÍAZ-LAVIADA, I. The vanilloid capsaicin induces IL-6 secretion in prostate PC-3 cancer cells. **Cytokine**, v. 54, p. 330-337, 2011.

MALIK S. A.; ORHON, I.; MORSELLI, E.; CRIOLLO, A.; SHEN, S.; MARIN, G.; BENYOUNES, A.; BÉNIT, P.; RUSTIN, P.; MAIURI, M. C.; KROEMER, G. BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. **Oncogene**, v. 30, p. 3918–3929, 2011.

MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos Naturais: um vôo da Europa Medieval ao Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 09, p. 2501-2502, 2009.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; NETO, C. F. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 405-410, 2006.

MARTÍNEZ-SALGADO, C.; RODRÍGUEZ-BARBERO, A.; ELENO, N.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. Gentamicin induces Jun-AP1 expression and JNK activation in renal glomeruli and cultured mesangial cells. **Life Sciences**, v. 77, p. 2285-2296, 2005.

MARVIN BEANS 5.8.0 software — Calculator Plugins. Chemaxon, Ltd., Budapeste 1037, Hungria.

MEILER, J.; SCHULER, M. Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 1361-1369, 2006.

MEÇA, K. K. O. L. Apoptose na maturação da placenta bovina. 2010. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

MODA, T. L. Modelagem *in silico* de propriedades farmacocinéticas para a avaliação de candidatos a novos fármacos. Tese (Doutorado em Física) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, p. 467-469, 1998.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide conjugation. **Tetrahedron**, v. 61, p. 827-852, 2005.

MONTANARI C. A. (2011). **Química Medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**, 1ª edição, São Paulo, 712 p.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-107, 2001.

MOON, D.; KANG, C.; KANG, S.; CHOI, Y.; HYUN, J.; CHANG, W.; KANG, H.; KOH, Y.; MAENG, Y.; KIM, Y.; KIM, G. Capsaicin sensitizes TRAIL-induced apoptosis through Sp1-mediated DR5 up-regulation: Involvement of Ca^{2+} influx. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 259, n. 1, p. 87-95, 2012.

MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. Teoria do funcional de densidade. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p. 44-55, 1995.

MORI, A.; LEHMANN, S.; O'KELLY, J.; KUMAGAI, T.; DESMOND, J. C.; PERVAN, M.; MCBRIDE, W. H.; KIZAKI, M.; KOEFFLER, H. P. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 6, p. 3222-3228, 2006.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. (1992) **Organic Chemistry**, 6ª edição, 1360 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, S. G. R.; BARROS, T. F.; CASTILHO, M. S. 2D QSAR studies of bifonazole derivatives with antifungal activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 451-452, 2009.

MURUGAN, R.; SCRIVEN, E. F. V. Applications of dialkylaminopyridine (DMAP) catalysts in organic synthesis. **Aldrichimica Acta**, v. 36, 21-27, 2003.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Defining Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>. Acesso em 03 de setembro de 2012.

NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; FABRY, C. F. S.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERREIRA, P. A.; FERRAZ, L. O.; DHINGRA, O. D.; FERRAZ, S. Ação nematocida de óleo, extratos vegetais e de dois produtos à base de capsaicina, capsainóides e alilisotiocianato sobre juvenis de *meloido gyne javanica* (treub) chitwood. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 93-94, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NGAN, V. K.; BELLMAN, K.; HILL, B. T.; WILSON, L.; JORDAN, M. A. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. **Molecular Pharmacology**, v. 60, p. 225-232, 2001.

OMAR M. E.; SALAM, A.; MOZSIK, G.; SZOLCSANYI, J. Studies on the effect of intragastric capsaicin on gastric ulcer and on the prostacyclin-induced cytoprotection in rats. **Pharmacological Research**, v. 32, n. 4, p. 209-211, 1995.

OYAGBEMI, A. A.; SABA, A. B.; AZEEZ, O. I. Capsaicin: A novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. **Indian Journal of Cancer**, v. 47, p. 53-58, 2010.

PAN, M. H.; HO, C. T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 2558-2574, 2008.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, p. 451-453, 2005.

PERES L. A. B.; DELFINO, V. D. A.; MOCELIN, A. J.; TUTIDA, L. A.; FAVERO, M. E.; MATSUO, T. Padronização do teste do MTT em modelo de preservação a frio como instrumento de avaliação da viabilidade celular renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 30, n. 1, p. 48-50, 2008.

PIROUETTE 3.11, Infometrix Inc.: Woodinville, WA, 1990-2003.

PHYSPROP database. <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>.

RAMOS, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 507-526, 2008.

RAPOPORT, A. M. The therapeutic future in headache. **Neurological Sciences**, v. 33, p. 119–125, 2012.

REILLY, C. A.; HENION, F.; BUGNI, T. S.; ETHIRAJAN, M. STOCKMANN, C.; PRAMANIK, K. C.; SRIVASTAVA, S. K.; YOST, G. S. Reactive intermediates produced from the metabolism of the vanilloid ring of capsaicinoids by P450 enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, v. xx, p. xx, 2012.

RICHON, V. M.; EMILIANI, S.; VERDIN, E.; WEBB, Y.; BRESLOW, R.; RIFKIND, R. A.; MARKS, P. A. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95, p. 3003–3007, 1998.

RICHON, V. M.; WEBB, Y.; MERGER, R.; SHEPPARD, T.; JURISIC, S.; NGO, L.; CIVOLI, F.; BRESLOW, R.; RIFKIND, R. A.; MARKS, P. A. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, p. 5705–5708, 1996.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. E.; SILVA, I. S. B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179–181, 2001.

RODRIGUES, F. A.; AMARAL, L. R. Aplicação de Métodos Computacionais de Mineração de Dados na Classificação e Seleção de Oncogenes Medidos por Microarray. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 241–249, 2012.

ROOSWINKEL, R. W.; KOOIJ, B.; VERHEI, M.; BORST, J. Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. **Cell Death and Disease**, v. 3, 2012.

RUBIN, E. (2010) **Patologia: Bases clínico patológicas da medicina**, Rio de Janeiro, 1648 p.

RUBIO-MOSCARDO, F.; BLESÁ, D.; MESTRE, C.; SIEBERT, R.; BALASAS, T.; BENITO, A.; ROSENWALD, A.; CLIMENT, J.; MARTINEZ, J. I.; SCHILHABEL, M.; KARRAN, E. L.; GESK, S.; ESTELLER, M.; LEEUW, R.; STAUDT, L. M.; FERNANDEZ-LUNA, J. L.; PINKEL, D.; DYER, M. J.; MARTINEZ-CLIMENT, J. A. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. **Blood**, v. 106, p. 3214–3222, 2005.

SAELEN, X.; FESTJENS, N.; WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, p. 2861–2874, 2004.

SÁNCHEZ, A. M.; MALAGARIE-CAZENAVE, S.; OLEA, N.; VARA D.; CHILOECHES, A.; DÍAZ-LAVIADA, I. Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. **Apoptosis**, v. 12, p. 2013–2022, 2007.

SÁNCHEZ, A. M. ; SÁNCHEZ, M. G.; MALAGARIE-CAZENAVE, S.; OLEA, N.; DÍAZ-LAVIADA, I. Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. **Apoptosis**, v. 11, p. 89-98, 2006.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 25, 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.

SANTOS, J. L.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; OLIVEIRA, H. P.; BUELONI, R. H.; BOFFO, E.; MACHADO, R. G. P.; LONGO, M. C.; CHUNG, M. C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 235-236, 2007.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-305, 2001.

SANTOS, M. M. P.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; GONÇALVES, P. S.; MARIA, E. J.; TERRA, W. S.; RODRIGUES, R.; SOUZA, C. L. M. Antibacterial activity of *Capsaicin annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. **Revista Nature Medicine**, 2011.

SCHOTTEN, C. Ueber die Oxydation des Piperidins. **Berichte**, v. 17, p. 2544, 1884.

SCHRAMM, J. M. A.; OLIVEIRA, A. F.; LEITE, I. C.; VALENTE, J. G.; GADELHA, A. M. J.; PORTELA, M. C.; CAMPOS, M. R. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, 2004.

SHIN, D. H.; KIM, O. H.; JUN, H. S.; KANG, M. K. Inhibitory effect of capsaicin on B16-F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 40, n. 5, p. 486-487, 2008.

SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 4, p. 15-16, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-38, 2002.

SMITH, M. B.; MARCH, J. (2001) **March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure**, 5ª edição, 2357 p.

SONEHARA, I. Y. Estudos de identificação de possíveis alvos para nitro-compostos azometínicos ou axodiazolínicos com atividade antifúngica e anti-*T. cruzi*. Tese

(doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308, 2004.

SPIVEY, A. C.; ARSENIYADIS, S. Nucleophilic catalysis by 4-(dialkylamino)pyridines revisited - the search for optimal reactivity and selectivity. **Angewandte Chemie**, v. 43, p. 5436, 5441, 2004.

SPOEL, D. V. D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C.; GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1701-1718, 2005.

STAUFFER, S. R. Small molecule inhibition of the Bcl-XL-BH3 protein-protein interaction: proof-of- concept of an *in vivo* chemopotentiator ABT-737. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 961-965, 2007.

SULIMAN, A.; LAM, A.; DATTA, R.; SRIVASTAVA, R. K. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. **Oncogene**, v. 20, p. 2122–2133, 2001.

SURH, Y. J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Pergamon**, v. 40, p. 1091-1095, 2002.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews in Cancer**, v. 3, p. 768-780, 2003.

SURH, Y. J. NF-kappa B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, p. 269-272, 2008.

SUSIN, S. A.; DAUGAS, E.; RAVAGNAN, L.; SAMEJIMA, K.; ZAMZAMI, N.; LOEFFLER, M.; COSTANTINI, P.; FERRI, K. F.; IRINOPOULOU, T.; PREVOST, M. C.; BROTHERS, G.; MAK, T. W.; PENNINGER, J.; EARNSHAW, W. C.; KROEMER, G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 92, p. 571–580, 2000.

SZOLCSÁNYI, J.; SÁNDOR, Z. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. xx, p. 1-10, 2012.

TACHIBANA, K. K.; GONZALEZ, M. A.; COLEMAN, N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. **Journal of Pathology**, v. 205, p. 123–129, 2005.

TAN, N.; MALEK, M.; ZHA, J.; YUE, P.; KASSEES, R.; BERRY, L.; FAIRBROTHER, W. J.; SAMPATH, D.; BELMONT, L. D. Navitoclax enhances the efficacy of taxanes in non-small cell lung cancer models. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 1394-1404, 2011.

TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T.; SILVA, B. M. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos – parte I. **Sitientibus**, n. 34m p. 47-53, 2006.

TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-632, 2004.

TAYLOR, J. E.; JONES, M. D.; WILLIAMS, J. M. J.; BULL, S. D. *N*-Acyl DBN tetraphenylborate salts as *N*-Acylating agents. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 2808-2818, 2012.

THOENNISSSEN, N. H.; KELLY, J. O.; LU, D.; IWANSKI, G. B.; LA, D. T.; ABBASSI, S.; LEITER, A.; KARLAN, B.; MEHTA, R.; KOEFFLER, H. P. Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and-negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. **Oncogene**, v. 29, p. 285-295, 2010.

TOURNOUX-FACON, C.; SENELLART, H.; LEMARIE, E.; TOURANI, J. M.; FAVREL, S.; POUGET, J. C.; PINEL, M. C.; BENNOUNA, J. Phase I and pharmacokinetic study of IV vinflunine in combination with gemcitabine for treatment of advanced non-small cell lung cancer in chemo-naïve patients. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 6, p. 1247-1253, 2011.

TSOU, M. F.; LU, H. F.; CHEN, S. C.; WU, L. T.; CHEN, Y. S.; KUO, H. M.; LIN, S. S.; CHUNG, J. G. Involvement of Bax, Bcl-2, Ca^{2+} and Caspase-3 in capsaicin induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. **Anticancer Research**, v. 26, p. 1965-1971, 2006.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 631-634, 2007.

VAUZOUR, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; CORONA, G.; ORUNA-CONCHA, M. J.; SPENCER, J. P. E. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**, v. 2, p. 1106-1131, 2010.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1247, 2009.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-97, 2005.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in câncer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131-149, 2003.

VIEGAS, JR.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-333, 2006.

VIEGAS JR., C.; NICASTRO, P. C.; FOSSALUZZA, P. C.; GOMES, C. P.; SANTOS, L. A.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; DA SILVA, D. J. C.; MELO, G. M. A.; SILVA, Y. K. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; COSTA, R. S.; AREAS, T. F. M.;

CASTRO, N. G. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 118-119, 2009.

VIEWERLITE 5.0, Accelrys, Inc., San Diego, CA, 2002.

VIRTUAL GENETICS EDUCATION CENTRE. Disponível em: <<http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgec/schoolscolleges/topics/cellcycle-mitosis-meiosis>> Acesso em: 15 de fevereiro de 2014.

VISWANADHAN, V. N.; GHOSE, A. K.; REVANKAR, G. R.; ROBINS, R. K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships **Journal of chemical information and modeling**, v. 29, p. 163-172, 1989.

VOGLER, M.; WEBER, K.; DINSDALE, D.; SCHMITZ, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DYER, M. J. S.; COHEN, G. M: Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. **Cell Death Differentiation** v. 16, p. 1030-1039, 2009.

WAJANT, H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. **Science**, v. 296, p. 1635-1636, 2002.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351-359, 2002.

WEBER, K. C.; HONÓRIO, K. M.; BRUNI, A. T.; SILVA, A. B. F. The use of classification methods for modeling the antioxidant activity of flavonoid compounds. **Journal of Molecular Modeling**, v. 12, p. 915-920, 2006.

WERMUTH, C. G. (2008) **The practice of medicinal chemistry**. 3ª edição, Academic Press, 982 p.

WHO. Cancer Treatment. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/palliative/definition/en>>. Acesso em: 28 de abril de 2013.

WILLIAMS, M. Strategies for drug discovery. **Research Monograph Series**, v. 134, p. 1-4, 1993.

WILLIAMS, D. A. (2012) **Foye's principles of medicinal chemistry**, 7ª edição, Estados Unidos, 1520 p.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 8329-8351, 2006.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Applications of total synthesis toward the discovery of clinically useful anticancer agents. **Journal of American Society**, v. 36, p. 1207-1226, 2007.

WU, C. C.; LIN, J. P.; YANG, J. S.; CHOU, S. T.; CHEN, S. C.; LIN, Y. T.; LIN, H. L.; CHUNG, J. G. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of

intracellular reactive oxygen species and Ca^{2+} productions and caspase-3 activation. **Mutation Research**, v. 601, p. 71-81, 2006.

YAN, Z.; SUN, J.; CHANG, Y.; LIU, Y.; FU, Q.; XU, Y.; SUN, Y.; PU, X.; ZHANG, Y.; JING, Y.; YIN, S.; ZHU, M.; WANG, Y.; HE, Z. Bifunctional Peptidomimetic Prodrugs of Didanosine for Improved Intestinal Permeability and Enhanced Acidic Stability: Synthesis, Transepithelial Transport, Chemical Stability and Pharmacokinetics. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 319–329, 2011.

YANG, K. M.; PYO, J. O.; KIM, G. Y.; YU, Y.; HAN, I. S.; JU, S. A.; KIM, W. H.; KIM, B. S. 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. 497-508, 2009.

YOSHIOKA, M.; IMANAGA, M.; UHEYAMA, H.; YAMANE, M.; KUBO, Y.; BOIVIN, A.; ST-AMAND, J.; TANAKA, H.; KIYONAGA, A. Maximum tolerable dose of red pepper decreases fat intake independently of spicy sensation in the mouth. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 991-992, 2004.

YOSHIOKA, M.; MATSUO, T.; LIM, K.; TRIMBIAY, A.; SUZUKI, M. Effects of capsaicin on abdominal fat and serum free-fatty acids in exercise-trained rats. **Nutrition Research**, v. 20, n. 7, p. 1041-1042, 2000.

YOU, Y. Podophyllotoxin Derivatives: Current Synthetic Approaches for New Anticancer Agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 1695-1717, 2005.

YOU, B. R.; PARK, W. H. Suberoyl bishydroxamic acid inhibits the growth of A549 lung cancer cells via caspase-dependent apoptosis. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 344, p. 203–210, 2010.

YOUNG, D. C. (2001) **Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems**, 1ª edição, Nova Iorque, 408 p.

ZHANG, R.; HUMPHREYS, I.; SAHU, R. P.; SHI, Y.; SRIVASTAVA, S. K. 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, p. 1465-1476, 2008.

9. ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS

✓ Participação em eventos

- *Participação como ouvinte da XX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal – FF/UFRJ (2014).*
- *Participação como ouvinte da XIX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal – FF/UFRJ (2013).*
- *Participação como ouvinte do Simpósio de Dendrímeros – FCF/USP (2012).*

✓ Apresentação de trabalhos

- *Apresentação de trabalho no III International Symposium on Drug Discovery – Design and synthesis of capsaicin analogues with potential antitumor activity - Araraquara/SP (2013).*
- *Apresentação de trabalho na XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia – Design and synthesis of capsaicin analogues with potential antitumor activity – São Paulo/SP (2013).*
- *Apresentação oral na XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia – Design and synthesis of capsaicin analogues with potential antitumor activity – São Paulo/SP (2013).*
- *Apresentação de trabalho na XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia – Design and synthesis of capsaicin-like sulfonamide analogues as potential antitumor agents – São Paulo/SP (2013).*
- *Participação em trabalho na XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia – Synthesis and Purification of N-(Benzodioxol-5-ylmethylene)aryl-sulfonylhydrazones– São Paulo/SP (2013).*

- *Apresentação de trabalho na 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* - Planejamento e síntese de análogos capsaicinóides com potencial atividade antitumoral - Águas de Lindóia/SP (2012).
- *Apresentação de trabalho no 6º Simpósio em Química Medicinal* - Design and synthesis of capsaicin analogues with potential antitumor activity – Canela/RS (2012).

✓ **Participação em bancas**

- *Participação de banca examinadora de trabalho de conclusão de curso* - Determinação dos parâmetros físico-químicos de fármacos de ação central e avaliação na tendência de uso frente à regra de Lipinski - PUC Campinas/ SP (2012).
- *Participação de banca examinadora de trabalho de conclusão de curso* - Determinação e avaliação das propriedades físico-químicas de fármacos benzodiazepínicos e correlação com suas propriedades farmacológicas - PUC Campinas/ SP (2012).
- *Participação de banca examinadora de trabalho de conclusão de curso* - Desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas - PUC Campinas/ SP (2012).

✓ **Realização de estágios**

- *Realização de estágio junto ao Programa de Aprimoramento Didático, sob supervisão da Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira* - FCF/USP (2013).
- *Estágio em culturas celulares no Laboratório de Patologia e Citologia, sob supervisão da Prof. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler* - FBC/USP (2012).

✓ **Produção científica**

FERREIRA, A. K.; SÁ-JÚNIOR, P. L.; PASQUALOTO, K. F. M.; AZEVEDO, R. A.; CÂMARA, D. A. D.; COSTA, A. S.; FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; MASSAOKA, M.H .; AUADA, A. V. V.; LEBRUN, I.; DAMIÃO, M. C. F. C. B.; TAVARES, M. T.; MAGRI, F. M. M. KERKIS, I.; FILHO, R. P. Cytotoxic effects of dillapiole on MDA-MB-231 cells involve the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway by inducing an oxidative stress while altering the cytoskeleton network. **Biochimie**, v. 99, p. 195-207, 2014.

DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, A. K.; TAVARES, M. T.; DAMIÃO, M. C. F. C. B.; AZEVEDO, R. A.; CÂMARA, D. A. D.; PEREIRA, A.; SOUZA, D. M.; PARISE FILHO, R. 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.

MAGANHI, S. H.; TAVARES, M. T. ;DAMIÃO, M. F. C. B.; PARISE FILHO, R. *N*-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]benzenesulfonamide: an analogue of capsaicin. **Acta Crystallographica**. v. 69, p. 1700-1700, 2013.

MAGANHI, S. H. ;DAMIÃO, M. C. F. C. B.; TAVARES, M. T. ; PARISE FILHO, R. -[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]-4-methylbenzamide: an analogue of capsaicin. **Acta Crystallographica**, v. 69, p. 332-332, 2013.

PARISE-FILHO, R.; PASQUALOTO, K. F. M. ; MAGRI, F. M. M. ; FERREIRA, A. K. ; DA SILVA, B. A. V. G.;DAMIÃO, M. C. F. C. B.; TAVARES, M. T.; AZEVEDO, R. A. ; AUADA, A. V. V. ; POLLI, M. C.; BRANDT, C. A. Dillapiole as Antileishmanial Agent: Discovery, Cytotoxic Activity and Preliminary SAR Studies of Dillapiole Analogues. **Archiv der Pharmazie**, v. 345, p. 934-944, 2012.

10. ANEXOS

ANEXO 1

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

Espectro de RMN ^1H do composto RPF301

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) benzamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 7,80 (2H, d, 12, 13-ArH), 7,52-7,42 (3H, m, 14, 15, 16-ArH), 6,88-6,78 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 6,37 (1H, sl, 9-NH), 5,97 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 4,57 (2H, d, J = 5,6 Hz 8- CH_2)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF301

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) benzamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 167,2 (C10), 148,0 (C3), 147,1 (C2), 134,4 (C11), 132,1 (C16), 131,5 (C6), 128,6 (C14, C15), 126,9 (C12, C13), 121,3 (C7), 108,5 (C5), 108,4 (C4), 101,1 (C1), 44,0 (C8)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF302

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-clorobenzamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 7,74 (2H, d, J = 8,4 Hz, 12, 13-ArH), 7,41 (2H, d, J = 8,4Hz, 14, 15-ArH), 6,85-6,80 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 6,39 (1H, *sl*, 9-NH), 5,97 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 4,55 (2H, d, J = 5,6 Hz 8- CH_2)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF302

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-clorobenzamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 166,2 (C10), 148,1 (C3), 147,2 (C2), 137,8 (C16), 132,7 (C11), 131,8 (C6), 128,8 (C12, C13), 128,4 (C14, C15), 121,3 (C7), 108,2 (C5), 108,4 (C4), 101,1 (C1), 44,1 (C8)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF303

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metilbenzamida:

RMN ^1H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ = ppm): 8,87 (1H, t*l*, J =5,8Hz, 9-NH), 7,79 (2H, d, J = 8,2 Hz, 12, 13-ArH), 7,27 (2H, d, J = 8,2Hz, 14, 15-ArH), 6,89-6,78 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,98 (2H, s, 1--OCH₂O-), 4,38 (2H, d, J = 6,0Hz, 8-CH₂), 2,36 (3H, s, 17-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF303

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metilbenzamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ = ppm): 165,9 (C10), 147,2 (C3), 146,0 (C2), 141,0 (C16), 133,7 (C11), 131,7 (C6), 128,8 (C14, C15), 127,2 (C12, C13), 120,4 (C7), 107,9 (C5), 107,9 (C4), 100,7 (C1), 42,4 (C8), 20,9 (C17)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF304

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3,4-diclorobenzamida:

RMN ^1H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ = ppm): 9,13 (1H, t, J = 5,8 Hz, 9-NH), 8,12 (1H, d, J = 2,1 Hz, 13-ArH), 7,86 (1H, dd, J = 8,4 Hz, J = 2,1 Hz, 12-ArH), 7,76 (1H, d, J = 8,4 Hz, 14-ArH), 6,90-6,79 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,98 (2H, s, 1--OCH₂O-), 4,38 (2H, d, J = 5,9 Hz, 8-CH₂)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF304

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3,4-diclorobenzamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ = ppm): 163,8 (C10), 147,2 (C3), 146,1 (C2), 134,6 (C16), 134,0 (C11), 133,0 (C15), 131,2 (C14), 130,7 (C13), 129,2 (C12), 127,6 (C6), 120,6 (C7), 108,0 (C4), 108,0 (C5), 100,8 (C1), 42,7 (C8)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF305

N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-nitrobenzamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ = ppm): 164,8 (C10), 148,2 (C15), 148,1 (C3), 146,4 (C2), 135,9 (C11), 133,3 (C12), 131,3 (C6), 129,9 (C14), 126,1 (C16), 121,7 (C13), 121,5 (C6), 108,6 (C4), 108,5 (C5), 101,2 (C1), 44,3 (C8)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF306

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmethyl)-4-metóxi benzamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm):
 7,74 (2H, d, J = 8,9 Hz, 12, 13-ArH), 6,91 (2H, d, J = 8,9 Hz, 14, 15-ArH), 6,92-6,77 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 6,33 (1H, t, 9-NH), 5,94 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 4,52 (2H, d, J = 5,6 Hz, 8- CH_2), 3,84 (3H, s, 14- OCH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF306

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmethyl)-4-metóxi benzamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm):
166,8 (C10), 162,3 (C16), 147,9 (C3),
147,0 (C2), 132,3 (C12, C13), 128,8 (C6),
126,7 (C11), 121,2 (C7), 113,8 (C14, C15),
108,5 (C4), 108,3 (C5), 101,1 (C1), 55,4
(C17), 43,9 (C8)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF351

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) propionamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,80-6,74 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,97 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,63 (1H, *sl*, 9-NH), 4,37 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8- CH_2), 2,26 (2H, q, J = 7,6 Hz, 11- CH_2), 1,20 (3H, t, J = 7,6 Hz, 12- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF351

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) propionamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 173,5 (C10), 147,9 (C3), 147,0 (C2), 132,3 (C6), 121,1 (C7), 108,4 (C4), 108,3 (C5), 101,1 (C1), 43,4 (C8), 29,7 (C11), 9,8 (C12)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF352

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) hexanamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,78-6,73 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,97 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,71 (1H, sl, 9-NH), 4,35 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8-CH₂), 2,21 (2H, t, J = 7,4 Hz, 11-CH₂), 1,72-1,64 (2H, m, 12-CH₂), 1,35-1,30 (4H, m, 13,14-CH₂), 0,91 (3H, t, J = 6,8 Hz, 15-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF352

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) hexanamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 172,9 (C10), 147,9 (C3), 147,0 (C2), 132,4 (C6), 121,1 (C7), 108,4 (C4), 108,3 (C5), 101,1 (C1), 43,4 (C8), 36,8 (C11), 31,5 (12), 25,4 (C13), 22,4 (C14), 12,9 (C15)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF353

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) nonanamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm):
 6,79-6,73 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,96 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,70 (1H, sl, 9-NH), 4,36 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8-CH₂), 2,21 (2H, t, J = 7,6 Hz, 11-CH₂), 1,68 (2H, m, 12-CH₂), 1,30-1,28 (10H, m, 13,14, 15, 16, 17-CH₂), 0,90 (3H, t, J = 6,7 Hz, 18-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF353

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) nonanamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm):
172,9 (C10), 147,9 (C3), 147,0 (C2), 132,4 (C6), 121,1 (C7), 108,3 (C4), 108,3 (C5), 101,1 (C1), 43,4 (C8), 36,8 (C11), 31,8 (C12), 29,3 (C13), 29,3 (C14), 29,1 (C15), 25,7 (C16), 22,6 (C17), 14,0 (C18)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF355

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) acetamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,76-6,74 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,93 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,90 (1H, *sl*, 9-NH), 4,31 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8- CH_2), 1,99 (3H, s, 11- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF355

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) acetamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 169,9 (C10), 148,0 (C3), 147,0 (C2), 132,2 (C6), 121,1 (C7), 108,5 (C4), 108,3 (C5), 101,1 (C1), 43,6 (C8), 23,2 (C11)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF356

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) butanamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,77-6,74 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,94 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,73 (1H, sl, 9-NH), 4,34 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8-CH₂), 2,18 (3H, t, J = 7,4 Hz, 11-CH₂), 1,68 (2H, sext, J = 7,4 Hz, 12-CH₂), 0,95 (3H, t, J = 7,4 Hz, 13-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF356

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) butanamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 172,8 (C10), 147,9 (C3), 146,9 (C2), 132,4 (C6), 121,1 (C7), 108,4 (C4), 108,3 (C5), 101,1 (C1), 43,4 (C8), 38,7 (C11), 19,1 (C12), 13,8 (C13)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF357

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) pentanamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,76-6,71 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,94 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,73 (1H, sl, 9-NH), 4,33 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8- CH_2), 2,20 (3H, t, J = 7,6 Hz, 11- CH_2), 1,70-1,58 (2H, m, 12- CH_2), 1,35 (2H, sext, 13- CH_2), 0,92 (3H, t, J = 7,3 Hz, 14- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF357

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) pentanamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 172,9 (C10), 148,0 (C3), 147,0 (C2), 132,4 (C6), 121,1 (C7), 108,4 (C4), 108,3 (C5), 101,1 (C1), 43,4 (C8), 36,5 (C11), 27,8 (C12), 22,4 (C13), 12,8 (C14)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF358

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) heptanamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm):
 6,76-6,70 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,93 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,78 (1H, *sl*, 9-NH), 4,33 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8-CH₂), 2,19 (2H, t, J = 7,3 Hz, 11-CH₂), 1,69-1,59 (2H, m, 12-CH₂), 1,29 (6H, m, 13,14, 15-CH₂), 0,88 (3H, t, J = 6,8 Hz, 16-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF358

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) heptanamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm):
172,9 (C10), 147,9 (C3), 147,0 (C2), 132,4 (C6), 121,0 (C7), 108,4 (C4), 108,3 (C5), 101,0 (C1), 43,4 (C8), 36,8 (C11), 31,5 (C12), 29,0 (C13), 25,7 (C14), 22,5 (C15), 14,0 (C16)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF359

***N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) octanamida:**

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,76-6,73 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,93 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,76 (1H, sl, 9-NH), 4,33 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8- CH_2), 2,19 (3H, t, J = 7,6 Hz, 11- CH_2), 1,66-1,62 (2H, m, 12- CH_2), 1,28 (8H, m, 13, 14, 15, 16- CH_2), 0,87 (3H, t, J = 6,7 Hz, 17- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF359

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil) octanamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm)
172,9 (C10), 147,9 (C3), 147,0 (C2), 132,4 (C6), 121,1 (C7), 108,4 (C4), 108,3 (C5), 101,0 (C1), 43,4 (C8), 36,8 (C11), 31,7 (C12), 29,3 (C13), 28,9 (C14), 25,7 (C15), 22,6 (C16), 14,0 (C17)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF360

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-metilbutanamida:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,78-6,72 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,94 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,81 (1H, *sl*, 9-NH), 4,34 (2H, d, J = 5,7 Hz, 8- CH_2), 2,15-2,06 (3H, m, 11, 12- CH_2), 0,97 (6H, d, J = 6,3 Hz, 14, 13- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF360

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-metilbutanamida:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 172,3 (C10), 147,9 (C3), 146,9 (C2), 132,4 (C6), 121,1 (C7), 108,4 (C4), 108,3 (C5), 101,0 (C1), 46,1 (C11), 43,4 (C8), 26,2 (C12), 22,5 (C13, C14)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF401

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil benzoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 7,98 (2H, d, J = 7,3 Hz, 12, 13-ArH), 7,48 (1H, t, J = 7,6, 16-ArH), 7,35 (2H, t, J = 7,7 Hz, 14, 15-ArH), 6,85 (2H, d, 4, 5-ArH), 6,73 (1H, d, 7-ArH), 5,89 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,19 (2H, s, 8- CH_2)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF401

benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil benzoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 166,4 (C10), 147,9 (C3), 147,7 (C2), 133,0 (C16), 130,2 (C6), 129,9 (C11), 129,7 (C14, C15), 128,4 (C12, C13), 122,2 (C7), 109,0 (C4), 108,3 (C5), 101,2 (C1), 66,7 (C8)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF402

benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil 4-clorobenzoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 8,01 (2H, d, J = 8,7 Hz, 12, 13-ArH), 7,42 (2H, d, J = 8,7 Hz, 14, 15-ArH), 6,94 (2H, d, 4, 5-ArH), 6,83 (1H, d, 7-ArH), 5,92 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,27 (2H, s, 8- CH_2)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF402

benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil 4-clorobenzoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 165,6 (C10), 147,9 (C3), 147,8 (C2), 139,5 (C16), 131,1 (C12, C13), 129,6 (C6), 128,7 (C14, C15), 128,6 (C11), 122,3 (C7), 109,1 (C4), 108,3 (C5), 101,2 (C1), 66,9 (C8)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF403

benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil 4-metilbenzoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 7,94 (2H, d, J = 8,2 Hz, 12, 13-ArH), 7,21 (2H, d, J = 8,0 Hz, 14, 15-ArH), 6,91 (2H, d, 4, 5-ArH), 6,79 (1H, d, 7-ArH), 5,94 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,23 (2H, s, 8- CH_2), 2,39 (3H, s, 17- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF403

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil 4-metilbenzoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 166,5 (C10), 147,9 (C3), 147,6 (C2), 143,7 (C16), 130,0 (C6), 129,7 (C12, C13), 129,1 (C14, C15), 127,5 (C11), 122,1 (C7), 109,0 (C4), 108,3 (C5), 101,2 (C1), 66,5 (C8), 21,6 (C17)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF404

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil 3,4-diclorobenzoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ = ppm):
163,8 (C10), 147,4 (C3), 147,3 (C2), 136,3 (C16), 131,7 (C11), 131,2 (C6), 130,8 (C14), 130,1 (C13), 129,2 (C15), 129,2 (C12), 122,4 (C7), 109,0 (C4), 108,1 (C5), 101,1 (C1), 66,9 (C8),

Espectro de RMN ^1H do composto RPF451

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil nonanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,86-6,78 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,97 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,03 (2H, s, 8-CH₂), 2,35 (2H, t, J = 7,5 Hz, 11-CH₂), 1,67-1,63 (2H, m, 12-CH₂), 1,29 (10H, m, 13, 14, 15, 16, 17-CH₂), 0,90 (3H, t, J = 6,7 Hz, 18-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF451

benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil nonanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 173,6 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,1 (C7), 109,0 (C4), 108,2 (C5), 101,1 (C1), 66,0 (C8), 34,3 (C11), 31,8 (C12), 29,2 (C13), 29,1 (C14), 29,1 (C15), 24,9 (C16), 22,6 (C17), 14,0 (C18)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF452

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil hexanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,86- 6,81 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,97 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,03 (2H, s, 8- CH_2), 2,35 (2H, t, J = 7,5 Hz, 11- CH_2), 1,68-1,63 (2H, m, 12- CH_2), 1,34-1,32 (4H, m, 13,14- CH_2), 0,91 (3H, t, J = 6,9 Hz, 15- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF452

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil hexanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 173,5 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,1 (C7), 108,9 (C4), 108,2 (C5), 101,1 (C1), 66,0 (C8), 34,3 (C11), 31,3 (C12), 24,6 (C13), 22,3 (C14), 13,8 (C15)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF453

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil propanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,86-6,78 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,97 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,03 (2H, s, 8-CH₂), 2,37 (q, 2H, J = 7,6 Hz, 11-CH₂), 1,16 (t, 3H, J = 7,6 Hz, 12-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF453

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil propanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) 174,1 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,1 (C7), 108,9 (C4), 108,1 (C5), 101,1 (C1), 66,0 (C8), 27,5 (C11), 9,0 (C12)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF454

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil acetato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,84-6,81 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,94 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 4,99 (2H, s, 8- CH_2), 2,07 (s, 3H, 11- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF454

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil acetato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) 170,8 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 129,6 (C6), 122,2 (C7), 109,0 (C4), 108,2 (C5), 101,2 (C1), 66,2 (C8), 21,0 (C11)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF455

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil pentanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,84-6,79 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,95 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,00 (2H, s, 8-CH₂), 2,33 (t, 2H, J = 7,5 Hz 11-CH₂), 1,62 (quint, 2H, J = 7,4 Hz, 12-CH₂), 1,34 (sext, 2H, J = 7,4 Hz, 14,9 Hz, 13-CH₂), 0,90 (t, 3H, J = 14, 6 Hz, 14-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF455

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil pentanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) 173,6 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,1 (C7), 109,0 (C4), 108,2 (C5), 101,1 (C1), 66,0 (C8), 34,1 (C11), 27,0 (C12), 22,2 (C13), 14,7 (C14)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF456

benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil 3-metilbutanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,84-6,75 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,94 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,00 (2H, s, 8-CH₂), 2,22-2,06 (m, 3H, 11,12-CH₂), 0,94 (d, 6H, 13,14-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF456

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil 3-metilbutanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) 172,9 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,2 (C7), 109,0 (C4), 108,2 (C5), 101,1 (C1), 65,9 (C8), 43,4 (C11), 25,7 (C12), 22,4 (C13, C14)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF457

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil heptanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,84-6,76 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,95 (2H, s, 1--OCH₂O-), 5,00 (2H, s, 8-CH₂), 2,32 (t, 2H, 11-CH₂), 1,65-1,58 (m, 2H, 12-CH₂), 1,30-1,28 (m, 6H, 13, 14, 15-CH₂), 0,87 (t, 3H, 16-CH₃)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF457

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil heptanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) 173,7 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,2 (C7), 109,0 (C4), 108,2 (C5), 101,1 (C1), 66,0 (C8), 34,4 (C11), 31,4 (C12), 28,8 (C13), 24,9 (C14), 22,4 (C15), 14,0 (C16)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF458

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil octanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,84-6,79 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,95 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,00 (2H, s, 8- CH_2), 2,32 (t, 2H, 11- CH_2), 1,65-1,60 (m, 2H, 12- CH_2), 1,29-1,27 (m, 8H, 13, 14, 15, 16- CH_2), 0,87 (t, 3H, 17- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF458

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil octanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) 173,7 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,2 (C7), 109,0 (C4), 108,2 (C5), 101,1 (C1), 66,0 (C8), 34,4 (C11), 31,6 (C12), 29,1 (C13), 28,9 (C14), 24,9 (C15), 22,6 (C16), 14,0 (C17)

Espectro de RMN ^1H do composto RPF459

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil butanoato:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm): 6,84-6,76 (3H, m, 4, 5, 7-ArH), 5,95 (2H, s, 1-- OCH_2O -), 5,01 (2H, s, 8- CH_2), 2,31 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, 11- CH_2), 1,66 (sext, 2H, $J = 7,4$ Hz, 12- CH_2), 0,84 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, 13- CH_3)

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF459

benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil butanoato:

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) 173,4 (C10), 147,8 (C3), 147,6 (C2), 130,0 (C6), 122,1 (C7), 108,9 (C4), 108,2 (C5), 101,1 (C1), 66,0 (C8), 36,2 (C11), 18,4 (C12), 13,6 (C13)

ANEXO 2

***Representação gráfica dos confôrmeros contra suas energias totais
obtidas por simulação de dinâmica molecular***

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros da capsaicina, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
37729	754580	9,74	18,11	6,26	12,22	-1,25	-6,44	-1,37	-5,46	31,81	0,53

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 303, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
21903	438060	3,51	14,63	-1,60	13,27	0,15	-3,51	-3,80	-1,46	21,19	0,07

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto RPF 304, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confôrmmero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
37197	743940	6,18	13,53	-1,07	20,50	0,35	-6,05	-5,93	-1,45	26,06	0,08

Dados: **Confôrmmero:** número do confôrmero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confôrmero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 305, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
32768	655360	9,10	14,81	1,21	28,43	0,54	-10,73	-9,72	-1,75	31,89	0,09

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, E_{STRETCH} : contribuição de energia de deformação axial, E_{BEND} : contribuição de energia de deformação angular, E_{TORS} : contribuição de energia de deformação torsional, E_{1-4} : contribuição de energia de interações do tipo 1-4, E_{vdW} : contribuição de energia de interações de van der Walls, E_{CHARGE} : contribuição de energia de interações de energia eletrostática, E_{solv} : contribuição de energia de solvatação, E_{ligH} : contribuição de energia de ligação de hidrogênio, E_{TOT} : energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 306, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
38809	776180	8,85	16,89	-1,27	15,45	1,38	-5,71	-5,42	-1,75	28,42	0,074

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

RPF 351

Confômero número 26.330 selecionado,
passo número 526.600

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 351, resultante da simulação de DM *versus* a engerial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
26330	526600	7,76	11,93	3,41	10,63	-1,44	-6,01	-3,48	-1,50	21,30	0,022

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

RPF 353

Confômero número 41.597 selecionado,
passo número 831.940

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 353, resultante da simulação de DM *versus* a engerial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
41597	831940	8,82	17,85	5,18	11,08	-1,57	-1,84	-1,73	-1,46	36,33	0,07

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

RPF 401

Confômero número 48.405 selecionado,
passo número 968.100

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 401, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
48405	968100	2,58	15,89	-7,75	18,42	-0,54	-4,21	-4,73	0,00	19,66	0,059

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solV} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

RPF 404

Confômero número 26.975 selecionado,
passo número 539.500

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 404, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
26975	539500	7,45	13,43	-9,4	21,63	-0,55	-6,36	-6,28	0,00	19,92	0,033

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confôrmeros do composto RPF 452, resultante da simulação de DM *versus* a engerial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confôrmero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
42302	846040	10,52	14,05	-4,03	10,97	-1,32	-2,16	-3,01	0,00	25,02	0,011

Dados: **Confôrmero:** número do confôrmero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confôrmero escolhido, E_{STRETCH} : contribuição de energia de deformação axial, E_{BEND} : contribuição de energia de deformação angular, E_{TORS} : contribuição de energia de deformação torsional, E_{1-4} : contribuição de energia de interações do tipo 1-4, E_{vdW} : contribuição de energia de interações de van der Walls, E_{CHARGE} : contribuição de energia de interações de energia eletrostática, E_{solv} : contribuição de energia de solvatação, E_{ligH} : contribuição de energia de ligação de hidrogênio, E_{TOT} : energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

RPF 456

Confômero número 28.032 selecionado,
passo número 560.640

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 456, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
28032	560640	7,12	15,87	-4,01	-27,28	-1,39	14,57	-2,18	0,00	2,70	0,02

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

RPF 459

Confômero número 21.652 selecionado,
passo número 433.040

Representação gráfica do perfil de amostragem conformacional com 50.000 confômeros do composto RPF 459, resultante da simulação de DM *versus* a energial total (kcal/mol). A energia total corresponde a somatória da contribuição de energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRETCH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Walls (E_{vdW}) e interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}).

Confômero	Passo	E_{STRETCH}	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{vdW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	RMSD
21652	433040	6,84	13,74	-4,55	9,47	-1	-2,23	-3,09	0	19,18	0,04

Dados: **Confômero:** número do confômero selecionado a partir do PAC, **Passo:** passo da simulação de DM correspondente ao confômero escolhido, **E_{STRETCH} :** contribuição de energia de deformação axial, **E_{BEND} :** contribuição de energia de deformação angular, **E_{TORS} :** contribuição de energia de deformação torsional, **E_{1-4} :** contribuição de energia de interações do tipo 1-4, **E_{vdW} :** contribuição de energia de interações de van der Walls, **E_{CHARGE} :** contribuição de energia de interações de energia eletrostática, **E_{solv} :** contribuição de energia de solvatação, **E_{ligH} :** contribuição de energia de ligação de hidrogênio, **E_{TOT} :** energia potencial total, **RMSD:** valor do desvio quadrático médio de posições atômicas.

ANEXO 3

Propiedades moleculares calculadas

	R	$E_{STRETCH}$	E_{BEND}	E_{TORS}	$E_{1,4}$	E_{vdW}	E_{CHARGE}	X= NH; O					
								E_{SOLV}	E_{ligH}	E_{TOT}	E_{HOMO}	E_{LUMO}	GAP
capsaicina		9.74	18.11	6.26	12.22	-1.25	-6.44	-1.37	-5.46	31.81	-130.89	1.66	132.55
RPF 351		7.76	11.93	3.41	10.63	-1.44	-6.01	-3.48	-1.50	21.30	-127.58	-0.78	126.80
RPF 353		8.82	17.85	5.18	11.08	-1.57	-1.84	-1.73	-1.46	36.33	-126.55	0.73	127.28
RPF 303		3.51	14.63	-1.6	13.27	0.15	-3.51	-3.8	-1.46	21.19	-125.45	-24.87	100.58
RPF 304		6.18	13.53	-1.07	20.5	0.35	-6.05	-5.93	-1.45	26.06	-128.63	-39.68	88.94
RPF 305		9.1	14.81	1.21	28.43	0.54	-10.73	-9.72	-1.75	31.89	-130.99	-64.43	66.57
RPF 306		8.85	16.89	-1.27	15.45	1.38	-5.71	-5.42	-1.75	28.42	-124.82	-20.90	103.92
RPF 459		6.84	13.74	-4.55	9.47	-1	-2.23	-3.09	0.00	19.18	-129.49	-2.13	127.37
RPF 456		7.12	15.87	-4.01	-27.28	-1.39	14.57	-2.18	0.00	2.70	-130.35	-3.37	126.98
RPF 452		10.52	14.05	-4.03	10.97	-1.32	-2.16	-3.01	0.00	25.02	-129.60	-2.51	127.09
RPF 401		2.58	15.89	-7.75	18.42	-0.54	-4.21	-4.73	0.00	19.66	-128.73	-32.58	96.15
RPF 404		7.45	13.43	-9.4	21.63	-0.55	-6.36	-6.28	0.00	19.92	-131.41	-42.29	89.13

Variáveis independentes: $E_{STRETCH}$: contribuição de energia de deformação axial, E_{BEND} : contribuição de energia de deformação angular, E_{TORS} : contribuição de energia de deformação torsional, $E_{1,4}$: contribuição de energia de interações do tipo 1-4, E_{vdW} : contribuição de energia de interações de van der Walls, E_{CHARGE} : contribuição de energia de interações de energia eletrostática, E_{solv} : contribuição de energia de solvatação, E_{ligH} : contribuição de energia de ligação de hidrogênio, E_{TOT} : energia potencial total, E_{HOMO} : energia do orbital de fronteira HOMO (eV), E_{LUMO} : energia do orbital de fronteira LUMO (eV), **GAP**: diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO} .

	μ_x	μ_y	μ_z	μ_{tot}	<i>ChelpG1_C₂₁</i>	<i>ChelpG2_O₃</i>	<i>ChelpG3_N/O₄</i>	<i>ChelpG4_C₁₈</i>	<i>ClogP</i>	<i>I_{Platt}</i>	<i>I_{Randic}</i>	<i>I_{Balaban}</i>	<i>I_{Harary}</i>
capsaicina	-1.442	-3.256	1.789	3.985	0.607786	-0.527538	-0.472568	0.047779	3.75	172	21.28	2.02	66.80
RPF 351	-0.845	0.270	3.320	3.437	0.302683	-0.465771	-0.484889	0.702662	1.24	100	12.36	1.60	41.73
RPF 353	-0.575	-0.388	-2.956	3.036	0.621978	-0.530903	-0.559980	0.188761	3.91	172	19.86	1.41	63.79
RPF 303	1.088	1.449	-3.150	3.634	0.637337	-0.513368	-0.684560	0.651163	2.91	124	15.75	1.26	64.06
RPF 304	-1.003	-0.935	0.928	1.656	0.583783	-0.533926	-0.310073	0.533686	3.60	112	14.54	1.22	69.12
RPF 305	-3.778	0.339	2.036	4.304	0.493961	-0.490576	-0.543059	0.277186	1.36	118	15.45	1.37	73.07
RPF 306	1.730	1.278	-2.055	2.974	0.578084	-0.539618	-0.540381	0.525077	2.24	126	16.23	1.19	68.32
RPF 459	0.585	0.328	-1.479	1.624	0.754228	-0.529624	-0.427500	0.251894	2.42	108	13.17	1.47	45.39
RPF 456	1.290	0.390	1.595	2.088	0.723520	-0.501869	-0.412285	0.252194	2.70	120	14.42	1.66	49.55
RPF 452	-0.060	1.470	1.292	1.958	0.736524	-0.537263	-0.353023	0.144273	3.30	132	15.67	1.50	52.69
RPF 401	0.139	-1.135	1.980	2.286	0.495574	-0.442374	-0.385484	0.608887	3.32	108	14.10	1.32	59.57
RPF 404	-1.425	-0.491	-0.053	1.508	0.650463	-0.500118	-0.399852	0.299325	4.53	108	14.10	1.22	69.12

Variáveis independentes: μ_x : momento dipolo no eixo X (debye), μ_y : momento dipolo no eixo Y (debye), μ_z : momento dipolo no eixo Z (debye), μ_{TOT} : momento dipolo total (debye), **ChelpG1_C₂₁**: carga do potencial eletrostático do átomo de carbono carbonílico calculada por CHELPG, **ChelpG2_O₃**: carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio ligado à carbonila, calculada por CHELPG, **ChelpG3_N/O₄**: carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio da ligação éster (série I) e nitrogênio da ligação amida (série II), calculada por CHELPG, **ChelpG4_C₁₈**: carga do potencial eletrostático do átomo de carbono α à carbonila, calculada por CHELPG, **ClogP**: coeficiente de partição calculado pelo método de pesos do programa, considerado pesos iguais para os métodos de Visvanadhan et al., 1989; Klopman et al., 1993; PHYSPROP, **I_{Platt}**: índice que descreve a soma dos graus de contorno da superfície molecular, **I_{Randic}**: índice que descreve a soma harmonica das médias geométricas dos graus dos vértices, **I_{Balaban}**: índice que descreve a média da somatória da distância de conectividade da molécula, **I_{Harary}**: índice que descreve a metade da somatória da diagonal externa, distância matricial recíproca, dos elementos da molécula.

	<i>I_{Hiper Wiener}</i>	<i>I_{Szeged}</i>	<i>I_{Wiener}</i>	<i>P_{Wiener}</i>	<i>Dreiding</i>	<i>PSA</i>	<i>V_{vdW}</i>	<i>SA_{vdW}</i>	<i>ASA</i>	<i>ASA+</i>	<i>ASA-</i>	<i>ASA_h</i>	<i>ASA_p</i>
capsaicina	6722	1675	1411	26	83.15	58.56	313.38	521.05	676.92	511.22	165.70	590.85	86.08
RPF 351	1222	574	401	18	45.56	47.56	188.73	314.64	421.40	320.29	101.11	330.07	91.32
RPF 353	5576	1500	1219	24	84.01	47.56	291.16	497.42	635.76	481.99	153.77	545.58	90.19
RPF 303	3474	1373	918	27	97.81	47.56	242.49	387.41	520.59	361.69	158.90	429.61	90.98
RPF 304	4002	1548	1039	30	71.83	74.56	253.22	387.13	510.09	324.18	185.91	419.29	90.80
RPF 305	5055	1809	1222	31	112.41	52.49	248.93	390.16	522.23	367.30	154.93	342.08	180.15
RPF 306	4263	1590	1069	29	82.07	56.79	251.36	402.31	544.47	391.37	153.11	434.74	109.74
RPF 459	1616	685	494	19	75.62	44.76	202.60	340.59	485.37	356.72	128.65	390.74	94.63
RPF 456	2013	798	589	20	79.78	44.76	219.70	368.67	494.93	366.73	128.20	403.40	91.53
RPF 452	2748	956	729	21	56.15	44.76	236.75	401.04	536.28	397.60	138.68	441.83	94.45
RPF 401	2836	1176	787	25	70.66	44.76	222.42	351.24	490.29	349.37	140.91	393.82	96.47
RPF 404	4002	1548	1039	30	60.32	44.76	249.89	385.24	525.45	325.84	199.62	429.62	95.84

Variáveis independentes: *I_{Hiper Wiener}*: descreve uma variação do índice de Wiener, *I_{Szeged}*: estende o índice de Wiener para gráficos cíclicos pela contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação, *I_{Wiener}*: índice que descreve a distância atômica topológica média (metade da soma de todas as distâncias atômicas) na molécula, *P_{Wiener}*: o número da distância de três ligações na molécula, **Dreiding**: energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula (kcal/mol), **PSA**: a área de superfície polar (PSA) é formada por átomos polares da molécula, *V_{vdW}*: volume de van der Waals ($\text{\AA}^3$), *SA_{vdW}*: cálculo da área superficial de van der Waals na molécula ($\text{\AA}^2$), **ASA**: superfície acessível ao solverte, calculada usando o raio do solvent (1,4 $\text{\AA}$ para a molécula de água) ($\text{\AA}^2$), **ASA+**: superfície acessível ao solverte de todos os átomos com carga parcial positiva ($\text{\AA}^2$), **ASA-**: superfície acessível ao solverte de todos os átomos com carga parcial negativa ($\text{\AA}^2$), **ASA_h**: superfície acessível ao solverte de todos os átomos hidrofóbicos ($\text{\AA}^2$), **ASA_p**: superfície acessível ao solverte de todos os átomos hidrofílicos ($\text{\AA}^2$).

	H_{donor}	$H_{acceptor}$	MR	<i>Rotable bond</i>	SA_{approx}	SA_{grid}	<i>volume</i>	<i>mass</i>	$E_{hydration}$	α
capsaicina	2	4	90.32	9	652.60	646.08	1049.1	305.42	-8.25	34.70
RPF 351	1	4	54.37	3	345.62	410.17	642.44	207.23	-6.35	21.41
RPF 353	1	4	81.98	9	585.65	604.4	977.04	291.39	-4.01	32.44
RPF 303	1	4	75.45	3	420.08	502.39	803.4	269.30	-7.36	18.85
RPF 304	1	4	80.02	3	444.38	519.36	834.16	324.16	-7.92	31.04
RPF 305	1	8	109.17	4	429.36	504.61	810.92	300.27	-13.45	29.03
RPF 306	1	5	76.88	4	436.70	514.67	828.56	285.30	-10.17	29.63
RPF 459	0	4	57.02	5	405.66	449.57	695.16	222.24	-5.35	22.81
RPF 456	0	4	61.57	5	437.21	468.41	740.31	236.27	-4.97	24.64
RPF 452	0	4	66.22	7	467.69	506.62	799.04	250.29	-4.22	26.48
RPF 401	0	4	68.46	4	381.08	474.16	745.46	256.26	-7.85	26.83
RPF 404	0	4	78.07	4	452.13	520.01	831.1	325.15	-7.23	30.80

Variáveis independentes: H_{donor} : número de sítios doadores de ligação de hidrogênio na molécula, $H_{acceptor}$: número de sítios aceptores de ligação de hidrogênio na molécula, **MR**: refratividade molar ($10^6 [m^3 mol^{-1}]$), **Rotable bond**: número de ligações rotáveis na molécula, SA_{approx} : área superficial aproximada ($\text{\AA}^2$), SA_{grid} : área superficial obtida pelo método de GRID ($\text{\AA}^2$), **volume**: volume total ($\text{\AA}^3$), **mass**: massa atômica (uma), $E_{hydration}$: energia de hidratação (kcal/mol), α : polarizabilidade ($\text{\AA}^2$).

ANEXO 4

Ficha da aluna

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 8056380/2 - Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião

Email:	marianafrojuello@usp.br
Data de Nascimento:	30/04/1988
Cédula de Identidade:	RG - 43.980.219-2 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2011

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	02/07/2012
Início da Contagem de Prazo:	02/07/2012
Data Limite para o Depósito:	02/01/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 02/07/2012 a 10/12/2012 E.Mail: hajudan@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Roberto Parise Filho - 11/12/2012 a 14/04/2014 E.Mail: roberto.parise@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 02/07/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 12/08/2013
Data do Depósito do Trabalho:	27/02/2014
Título do Trabalho:	"Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da atividade antitumoral"
Data Máxima para Aprovação da Banca:	28/04/2014
Data de Aprovação da Banca:	12/03/2014
Data Máxima para Defesa:	10/06/2014
Data da Defesa:	14/04/2014
Resultado da Defesa:	Aprovado

Acessar a tese no '[Banco de Teses](#)' da USP

A titulação é: Somente USP

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Titulado em 14/04/2014

Impresso em: 23/04/14 15:57:22

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 8056380/2 - Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5724-7/1	Latenciação	14/08/2012	26/10/2012	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-2/7	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	16/08/2012	28/11/2012	45	3	100	B	N	Concluída
FBF5705-5/1	Planejamento de Fármacos	20/08/2012	28/10/2012	90	6	90	A	N	Concluída
FBA5728-3/6	Aprimoramento Didático	16/10/2012	12/11/2012	60	4	75	A	N	Concluída
FBF5704-6/1	Análise Espectrométrica de Fármacos	04/03/2013	16/06/2013	150	10	100	A	N	Concluída
FBF5786-3/1	Metodologias e Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos (1)	17/09/2013	18/11/2013	90	6	94	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	35
Estágios:			
Total:	0	25	35

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

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: Titulado em 14/04/2014

Impresso em: 23/04/14 15:57:23

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 8056380/2 - Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3203551	Roberto Parise Filho	FCF - USP	Presidente
367413	Daniela Gonçalves Rando		Membro
9068030	Julio Cezar Pastre	UNICAMP - Externo	Membro

Última ocorrência: Titulado em 14/04/2014

Impresso em: 23/04/14 15:57:23

ANEXO 5

Artigos científicos publicados e submetidos

Research paper

Cytotoxic effects of dillapiole on MDA-MB-231 cells involve the induction of apoptosis through the mitochondrial pathway by inducing an oxidative stress while altering the cytoskeleton network

Adilson Kleber Ferreira^{a,1}, Paulo Luiz de-Sá-Júnior^{a,*,1},
Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto^{b,1}, Ricardo Alexandre de Azevedo^b,
Diana Aparecida Dias Câmara^a, André Santos Costa^a, Carlos Rogério Figueiredo^c,
Alisson Leonardo Matsuo^c, Mariana Hiromi Massaoka^c, Aline Vivian Vatti Auada^b,
Ivo Lebrun^b, Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião^d,
Maurício Temotheo Tavares^d, Fátima Maria Motter Magri^e, Irina Kerkis^a,
Roberto Parise Filho^{d,*}

^a Laboratory of Genetics, Butantan Institute, Vital Brasil Avenue 1500, 05503-900 Sao Paulo, Brazil

^b Biochemistry and Biophysical Laboratory, Butantan Institute, Vital Brasil Avenue 1500, 05503-900 Sao Paulo, Brazil

^c Experimental Oncology Unit (UNONEX), Microbiology, Immunology and Parasitology Dept, Federal University of São Paulo, Rua Botucatu 862, 04023-062 Sao Paulo, Brazil

^d Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, 05508-000 Sao Paulo, Brazil

^e Center for Biological Sciences and Health (CCBS), Mackenzie Presbyterian University, Consolação Avenue, 930, 01302-907 Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2013

Accepted 6 December 2013

Available online 16 December 2013

Keywords:

Piper aduncum

Dillapiole

Antitumoral

Apoptosis

Cell cycle

ROS

Molecular modeling

ABSTRACT

Breast cancer is the world's leading cause of death among women. This situation imposes an urgent development of more selective and less toxic agents. The use of natural molecular fingerprints as sources for new bioactive chemical entities has proven to be a quite promising and efficient method. Here, we have demonstrated for the first time that dillapiole has broad cytotoxic effects against a variety tumor cells. For instance, we found that it can act as a pro-oxidant compound through the induction of reactive oxygen species (ROS) release in MDA-MB-231 cells. We also demonstrated that dillapiole exhibits anti-proliferative properties, arresting cells at the G0/G1 phase and its antimigration effects can be associated with the disruption of actin filaments, which in turn can prevent tumor cell proliferation. Molecular modeling studies corroborated the biological findings and suggested that dillapiole may present a good pharmacokinetic profile, mainly because its hydrophobic character, which can facilitate its diffusion through tumor cell membranes. All these findings support the fact that dillapiole is a promising anti-cancer agent.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is one of the most common human malignancies and the second leading cause of cancer-related deaths among women [1]. Despite substantial improvements in survival, resistance to therapy and subsequent progression of disease are still observed in metastatic patients [2]. Therapeutic regimens against

breast cancer include both chemo- and radiotherapy, and in advanced stages of the disease surgery intervention can be required [3]. In spite of the many advances achieved in breast cancer treatment during the last ten years, many patients still succumb to this illness and new therapeutic approaches are needed [4]. Therefore, investigation of the molecular mechanisms involved in the development and progression of breast cancer is crucial for the discovery of effective and non-cytotoxic compounds for chemoprevention and treatment [5].

Natural products, mostly plant-derived products, occupy an important place in cancer chemotherapy [6]. Substances derived from medicinal plants are known to be effective chemo-preventive and/or antitumoral agents in experimental models of carcinogenesis [7]. The

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3793; fax: +55 11 3091 3815.

** Corresponding author. Tel.: +55 11 2627 9718; fax: +55 11 3091 3815.

E-mail addresses: paulsaj2001@yahoo.com.br (P.L. de-Sá-Júnior), roberto.parise@usp.br (R. Parise Filho).

¹ These authors contributed equally to this work.

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

Paulo Luiz de-Sá-Júnior ^{a,1}, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto ^{b,1}, Adilson Kleber Ferreira ^{a,1}, Maurício Temotheo Tavares ^c, Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião ^c, Ricardo Alexandre de Azevedo ^b, Diana Aparecida Dias Câmara ^a, Alexandre Pereira ^a, Dener Madeiro de Souza ^a, Roberto Parise Filho ^{c,*}

^a Laboratory of Genetics, Butantan Institute, Vital Brasil Avenue 1500, Postal Code: 05503-900, Sao Paulo, Brazil

^b Biochemistry and Biophysical Laboratory, Butantan Institute, Vital Brasil Avenue 1500, Postal Code: 05503-900, Sao Paulo, Brazil

^c Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, Postal Code: 05508-000, Sao Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2012

Revised 5 November 2012

Accepted 19 November 2012

Available online 10 December 2012

Keywords:

Capsaicin-like analogue

RPF101

Molecular modeling

Cell cycle

Antitumoral

Apoptosis

ABSTRACT

Breast cancer is the world's leading cause of death among women. This situation imposes an urgent development of more selective and less toxic agents. The use of natural molecular fingerprints as sources for new bioactive chemical entities has proven to be a quite promising and efficient method. Capsaicin, which is the primary pungent compound in red peppers, was reported to selectively inhibit the growth of a variety of tumor cell lines. Here, we report for the first time a novel synthetic capsaicin-like analogue, RPF101, which presents a high antitumor activity on MCF-7 cell line, inducing arrest of the cell cycle at the G2/M phase through a disruption of the microtubule network. Furthermore, it causes cellular morphologic changes characteristic of apoptosis and a decrease of $\Delta\psi_m$. Molecular modeling studies corroborated the biological findings and suggested that RPF101, besides being a more reactive molecule towards its target, may also present a better pharmacokinetic profile than capsaicin. All these findings support the fact that RPF101 is a promising anticancer agent.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Breast cancer is the leading cause of death among women worldwide. About 63,300 cases of breast carcinoma in situ are expected to be newly diagnosed in 2012 (Siegel et al., 2012). Despite many efforts made in surgical management, radiotherapy and new combined chemotherapy, there is a need for the development of more selective and less toxic agents (Geyer et al., 2006). One of the key hallmarks of cancer cells is their ability to evade apoptosis, which, among other important roles, is a controlled process of elimination of irreversibly damaged cells (Jin and El-Deiry, 2005). The loss of apoptosis control has been observed in many cancers. As a result, the apoptotic machinery is seen today as a promising target for drug development (Debatin and Krammer, 2004; Fesik, 2005; Kaufmann and Earnshaw, 2000).

Natural products, mainly secondary metabolites produced by living organisms, have a long history as a source of novel therapeutics. It has been recognized that natural product structures having high

chemical diversity, biochemical specificity and other molecular properties could turn out to be favorable as lead structures for drug discovery (Koehn and Carter, 2005). Recently, capsaicin (Fig. 1A) or N-vanillyl-8-methyl-1-nonenamide, the primary pungent and irritating ingredient present in a variety of red peppers of the genus *Capsicum* (Walpole et al., 1993a,b,c), was reported to selectively inhibit the growth of tumor cells (Maity et al., 2010). Despite previous discordant results from studies that determined its potential mutagenic and carcinogenic activity (Surh and Lee, 1996), subsequent investigations have shown that capsaicin induces apoptosis in a wide variety of tumor cells (Huang et al., 2009; Ito et al., 2004; Kim et al., 2010; Sánchez et al., 2007; Thoennissen et al., 2010; Wu et al., 2006). Additional studies reported that capsaicinoids displayed in vitro and in vivo antitumor activity (Oh et al., 2008). In cultured cells, capsaicin blocked the cell migration in breast cancer, while in mice, oral consumption of capsaicin decreased the size of MDAMB 231 breast cancer tumors by 50%, and inhibited the development of pre-neoplastic breast lesions by up to 80%. Also, direct injection of capsaicin led to an 80% reduction in tumor size (Thoennissen et al., 2010). Thus, capsaicin can be considered a potential lead against malignant tumors. However, the molecular mechanisms and the signaling pathways leading to capsaicin-induced

* Corresponding author. Fax: +55 11 3091 3815.

E-mail address: roberto.parise@usp.br (R. Parise Filho).

¹ These authors contributed equally to this work.

Acta Crystallographica Section E

Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

N-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]-benzenesulfonamide: an analogue of capsaicin

Stella H. Maganhi,^{a*} Maurício T. Tavares,^b
Mariana C. F. C. B. Damião^b and Roberto Parise Filho^b^aDepartment of Physics, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil, and ^bDepartment of Pharmacy, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence e-mail: stellamaganhi@gmail.com

Received 14 October 2013; accepted 16 October 2013

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 290$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.003$ Å; R factor = 0.051; wR factor = 0.149; data-to-parameter ratio = 14.7.

The title compound, $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$, an analogue of capsaicin, differs from the latter by having a 1,3-benzodioxole ring rather than a 2-methoxyphenol moiety, and having a benzene-sulfonamide group instead of an aliphatic amide chain. The five-membered ring is in an envelope conformation with the methylene C atom lying 0.221 (6) Å out of the plane formed by the other four atoms. The dihedral angle between the phenyl ring and the mean plane of the 1,3-benzodioxole fused-ring system is 84.65 (4)°. In the crystal, molecules aggregate into supramolecular layers in the ac plane through $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}$, $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ and $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ interactions.

Related literature

For background and the biological activity of capsaicin, see: Lee *et al.* (2011); Malagarie-Cazenave *et al.* (2011). For the synthesis and cytotoxicity of the title compound, see: De Sá-Junior *et al.* (2013). For ring conformational analysis, see: Cremer & Pople (1975).

Experimental

Crystal data

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$
 $M_r = 291.32$
 Orthorhombic, $Pbca$
 $a = 18.0158$ (4) Å
 $b = 5.9346$ (1) Å
 $c = 25.5480$ (8) Å

$V = 2731.51$ (11) Å³
 $Z = 8$
 Mo $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.25$ mm⁻¹
 $T = 290$ K
 $0.25 \times 0.22 \times 0.20$ mm

Data collection

Nonius KappaCCD diffractometer
 with Bruker APEXII CCD area-
 detector

Absorption correction: multi-scan
 (SADABS; Sheldrick, 1996)
 $T_{\min} = 0.930$, $T_{\max} = 0.948$

2652 measured reflections
 2652 independent reflections
 1860 reflections with $I > 2\sigma(I)$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.051$
 $wR(F^2) = 0.149$
 $S = 1.04$
 2652 reflections

181 parameters
 H-atom parameters constrained
 $\Delta\rho_{\max} = 0.26$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\min} = -0.29$ e Å⁻³

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

Cg1 and Cg2 are the centroids of the C2–C7 and C9–C14 rings, respectively.

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
$\text{N1}-\text{H1N}\cdots\text{O2}^{\text{i}}$	0.99	2.00	2.945 (3)	157
$\text{C14}-\text{H14}\cdots\text{O1}^{\text{ii}}$	0.93	2.59	3.486 (3)	161
$\text{C10}-\text{H10}\cdots\text{Cg1}^{\text{iii}}$	0.93	2.74	3.563 (3)	147
$\text{C8}-\text{H8B}\cdots\text{Cg2}^{\text{iv}}$	0.97	2.82	3.511 (3)	129

Symmetry codes: (i) $-x, y - \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$; (ii) $-x + \frac{1}{2}, y - \frac{1}{2}, z$; (iii) $-x, y + \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$; (iv) $x, -y - \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$.

Data collection: *COLLECT* (Nonius, 1999); cell refinement: *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997); data reduction: *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997) and *SCALEPACK*; program(s) used to solve structure: *SIR97* (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 2012); software used to prepare material for publication: MarvinSketch (ChemAxon, 2010) and *pubCIF* (Westrip, 2010).

We thank FAPESP (grant no. 2012/22524-9), the São Paulo Research Foundation (SMH), CNPq and CAPES for financial support.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: TK5268).

References

- Altomare, A., Burla, M. C., Camalli, M., Cascarano, G. L., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G. G., Polidori, G. & Spagna, R. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 115–119.
- ChemAxon (2010). *Marvinsketch*. <http://www.chemaxon.com>.
- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
- De Sá-Junior, P. L., Ferreira, A. K., Pasqualoto, K. F. M., Tavares, M. T., Damião, M. C. F. C. B., Azevedo, R. A., Camara, D. A. D., Pereira, A., Souza, D. M. & Parise-Filho, R. (2013). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **266**, 385–398.
- Farrugia, L. J. (2012). *J. Appl. Cryst.* **45**, 849–854.
- Lee, M., Kim, C., Kim, I. & Kim, Y. (2011). *Phytother. Res.* **25**, 935–939.
- Malagarie-Cazenave, S., Olea-Herrero, N., Vara, D., Morell, C. & Díaz-Laviada, I. (2011). *Cytokine*, **54**, 330–337.
- Nonius (1999). *COLLECT*. Nonius BV, Delft, The Netherlands.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods in Enzymology*, Vol. 276, *Macromolecular Crystallography, Part A*, edited by C. W. Carter Jr & R. M. Sweet, pp. 307–326. New York: Academic Press.
- Sheldrick, G. M. (1996). *SADABS*. University of Göttingen, Germany.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
- Westrip, S. P. (2010). *J. Appl. Cryst.* **43**, 920–925.

Acta Crystallographica Section E

Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

N-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]-4-methylbenzamide: an analogue of capsaicin

Stella H. Maganhi,^{a*} Mariana C. F. C. B. Damiano,^b
Maurício T. Tavares^b and Roberto Parise Filho^b

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil, and ^bDepartamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence e-mail: stellamaganhi@gmail.com

Received 21 January 2013; accepted 22 January 2013

Key indicators: single-crystal X-ray study; $T = 290$ K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.003$ Å; R factor = 0.050; wR factor = 0.149; data-to-parameter ratio = 14.3.

In the title compound, $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_3$, the five-membered 1,3-dioxole ring is in an envelope conformation with the methylene C atom as the flap atom [lying 0.202 (3) Å out of the plane formed by the other four atoms]. The benzene ring makes a dihedral angle of 84.65 (4)° with the best least-squares plane through the 1,3-benzodioxole fused-ring system, which substitutes the 2-methoxyphenol moiety in capsaicin. In the crystal, molecules are connected into a zigzag supramolecular chain along the c -axis direction by $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen bonds. These chains are connected into a layer in the ac plane by $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ interactions.

Related literature

For the biological activity of capsaicin, see: Okamoto *et al.* (2011). For ring conformational analysis, see: Cremer & Pople (1975).

Experimental

Crystal data

$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_3$
 $M_r = 269.29$
Monoclinic, $P2_1/c$
 $a = 4.9810$ (2) Å

$b = 26.652$ (1) Å
 $c = 10.0545$ (3) Å
 $\beta = 92.139$ (2)°
 $V = 1333.84$ (8) Å³

$Z = 4$
Mo $K\alpha$ radiation
 $\mu = 0.09$ mm⁻¹

$T = 290$ K
 $0.33 \times 0.24 \times 0.16$ mm

Data collection

Bruker APEXII CCD area-detector diffractometer
Absorption correction: numerical (SADABS; Sheldrick, 1996)
 $T_{\min} = 0.940$, $T_{\max} = 0.951$
4550 measured reflections
2602 independent reflections
1698 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{\text{int}} = 0.023$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.050$
 $wR(F^2) = 0.149$
 $S = 1.03$
2602 reflections
182 parameters
H-atom parameters constrained
 $\Delta\rho_{\max} = 0.21$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\min} = -0.20$ e Å⁻³

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

Cg1 and Cg2 are the centroids of the C1–C6 and C10–C15 rings, respectively.

$D-\text{H}\cdots A$	$D-\text{H}$	$\text{H}\cdots A$	$D\cdots A$	$D-\text{H}\cdots A$
$\text{N1}-\text{H1N1}\cdots\text{O3}^i$	0.91	2.08	2.958 (2)	162
$\text{C7}-\text{H7A}\cdots\text{Cg1}$	0.97	2.74	3.603 (3)	149
$\text{C16}-\text{H16C}\cdots\text{Cg2}$	0.96	2.96	3.829 (2)	151

Symmetry code: (i) $x, -y + \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$.

Data collection: *COLLECT* (Nonius, 1999); cell refinement: *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997); data reduction: *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997) and *SCALEPACK*; program(s) used to solve structure: *SIR97* (Altomare *et al.*, 1999); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 2012); software used to prepare material for publication: *Marvinsketch* (Chemaxon, 2010) and *publCIF* (Westrip, 2010).

We thank the Brazilian agencies CNPq (140925/2009–0 to SHM), FAPESP and CAPES for financial support. We also thank Professor Carlos A. De Simone for the data collection.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: TK5191).

References

- Altomare, A., Burla, M. C., Camalli, M., Cascarano, G. L., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Moliterni, A. G. G., Polidori, G. & Spagna, R. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 115–119.
- Chemaxon (2010). *Marvinsketch*. <http://www.chemaxon.com>.
- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
- Farrugia, L. J. (2012). *J. Appl. Cryst.* **45**, 849–854.
- Nonius (1999). *COLLECT*. Nonius BV, Delft, The Netherlands.
- Okamoto, M., Irii, H., Tahara, Y., Ishii, H., Hirao, A., Udagawa, H., Hiramoto, M., Yasuda, K., Takanishi, A., Shibata, S. & Shimizu, I. (2011). *J. Med. Chem.* **54**, 6295–6304.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods in Enzymology*, Vol. 276, *Macromolecular Crystallography*, Part A, edited by C. W. Carter Jr & R. M. Sweet, pp. 307–326. New York: Academic Press.
- Sheldrick, G. M. (1996). *SADABS*. University of Göttingen, Germany.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
- Westrip, S. P. (2010). *J. Appl. Cryst.* **43**, 920–925.

Full Paper

Dillapiole as Antileishmanial Agent: Discovery, Cytotoxic Activity and Preliminary SAR Studies of Dillapiole Analogues

Roberto Parise-Filho¹, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto², Fátima Maria Motter Magri³, Adilson Kleber Ferreira², Bárbara Athayde Vaz Galvão da Silva¹, Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião¹, Maurício Temotheo Tavares¹, Ricardo Alexandre Azevedo², Aline Vivian Vatti Auada², Michelle Carneiro Polli⁴, and Carlos Alberto Brandt²

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Laboratory of Biochemical and Biophysics, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

³ Center for Biological Sciences and Health (CCBS), Mackenzie Presbyterian University, São Paulo, Brazil

⁴ Center for Life Sciences (CCV), Pontifical Catholic University of Campinas, São Paulo, Brazil

In this paper, the isolation of dillapiole (**1**) from *Piper aduncum* was reported as well as the semi-synthesis of two phenylpropanoid derivatives [di-hydrodillapiole (**2**), isodillapiole (**3**)], via reduction and isomerization reactions. Also, the compounds' molecular properties (structural, electronic, hydrophobic, and steric) were calculated and investigated to establish some preliminary structure-activity relationships (SAR). Compounds were evaluated for *in vitro* antileishmanial activity and cytotoxic effects on fibroblast cells. Compound **1** presented inhibitory activity against *Leishmania amazonensis* (IC₅₀ = 69.3 μ M) and *Leishmania brasiliensis* (IC₅₀ = 59.4 μ M) and induced cytotoxic effects on fibroblast cells mainly in high concentrations. Compounds **2** (IC₅₀ = 99.9 μ M for *L. amazonensis* and IC₅₀ = 90.5 μ M for *L. brasiliensis*) and **3** (IC₅₀ = 122.9 μ M for *L. amazonensis* and IC₅₀ = 109.8 μ M for *L. brasiliensis*) were less active than dillapiole (**1**). Regarding the molecular properties, the conformational arrangement of the side chain, electronic features, and the hydrophilic/hydrophobic balance seem to be relevant for explaining the antileishmanial activity of dillapiole and its analogues.

Keywords: Antileishmanial activity / Cytotoxic activity / Dillapiole / Molecular modeling / SAR studies

Received: May 23, 2012; Revised: July 20, 2012; Accepted: July 24, 2012

DOI 10.1002/ardp.201200212

Introduction

Leishmaniasis is caused by parasites of the *Leishmania* genus and affects more than 12 million people in 88 countries. There are about two to three million new cases each year, and 350 million people are under risk of infection [1]. In the absence of a reliable vaccine, there is an urgent need for effective and safe drugs to replace those currently used, such as pentavalent antimonials, amphotericin B, and pentamidine. In this regard, the development of novel antileishmanial compounds is an imperative need. Many people who live in endemic areas use plants as an alternative to treat the

disease [2]. The study of plant-derived drugs, for instance, would be highly recommended for driving the discovery of new potential leishmanicidal agents [3–6].

The Piperaceae family comprises a large variety of species and it is known for producing several bioactive compounds [7, 8], which can provide quite attractive molecular modification approaches. Covering approximately 3000 species, the *Piper* genus is prominent for having distinct activities, such as insecticidal, antitumor, antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory activities [9–11]. This genus is widely used in popular medicine, and it is found in all tropical regions of the world, with approximately 170 of 700 species occurring in Brazil [11]. The antileishmanial activity of *Piper* species has already been reported [12–14]. In the last few years, the essential oils from *Piper* species have become an important source for searching novel therapeutic alternatives primarily regarding the neglected diseases [15]. Recently, Monzote et al. [16] have shown the antileishmanial activity of the essential

Correspondence: Roberto Parise-Filho, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508-900 São Paulo, Brazil
E-mail: roberto.parise@usp.br
Fax: +55 11 3815-4418.

Manuscript Number: EJMECH-D-14-00651

Title: Novel capsaicin analogues as potential anticancer agents: synthesis, biological evaluation and *in silico* approach

Article Type: Full Length Article

Keywords: Capsaicin analogues; Bioisosterism; Anticancer activity; Exploratory data analysis.

Corresponding Author: Dr. Roberto Parise Filho, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Sao Paulo

First Author: Mariana Celestina Frojuello Bernstorff C Damião, Msc

Order of Authors: Mariana Celestina Frojuello Bernstorff C Damião, Msc; Kerly Fernanda M Pasqualoto, PhD; Adilson K Ferreira, PhD; Sarah T Fernandes, Msc; Ricardo A Azevedo, PhD; José Alexandre M Barbuto, PhD; Fanny Palace-Berl, Msc; Gilberto C Franchi-Junior, Msc; Alexandre E Nowill, PhD; Maurício T Tavares, Msc; Roberto Parise Filho, PhD.

Abstract: A novel class of benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl alkyl/aryl amide and ester analogues of capsaicin were designed, synthesized and evaluated for their cytotoxic activity against human and murine cancer cell lines (B16F10, SK-MEL-28, NCI-H1299, NCI-H460, SK-BR-3 and MDA-MB-231) and human lung fibroblast (MRC-5). Three compounds (5f, 6c, and 6e) have selectively inhibited the growth of aggressive cancer cells at micromolar (μM) range. Furthermore, an exploratory data analysis pointed out the topological and electronic molecular properties as responsible for the discrimination process regarding the set of investigated compounds. The findings suggested the applied designing strategy, besides to provide more potent analogues, has indicated the aryl amides and esters as well as the alkyl esters, as interesting scaffolds to design and develop novel anticancer agents.