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

**Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da
atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da
capsaicina**

Maurício Temotheo Tavares

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

**Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da
atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da
capsaicina**

Maurício Temotheo Tavares

Versão Corrigida

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

T231c	<p>Tavares, Maurício Temotheo</p> <p>Candidatos a novos agentes antineoplásicos : síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina / Maurício Temotheo Tavares. -- São Paulo, 2014. 197p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador : Parise Filho, Roberto</p> <p>1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Produtos naturais 3. Relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica 4. Neoplasias I. T. II. Parise Filho, Roberto, orientador.</p> <p>615.19 CDD</p>
-------	--

Maurício Temotheo Tavares

Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
Orientador e Presidente

Profa. Titular Dra. Elizabeth Igne Ferreira

Prof. Dr. Júlio Cezar Pastre

São Paulo, 01 de Setembro de 2014

“ - Homens, as flechas dos persas são tão numerosas que cobrem o sol!

- Preparem-se pois lutaremos à sombra. ”

- Leônidas -

Dedicatória

Ao meu herói, meu querido pai. Pelos exemplos, por sua grandeza e perseverança. Minha admiração pelo senhor sempre será infinita.

À minha amada mãe. Por todo o seu amor, preocupação e dedicação incondicional. A senhora é, e sempre será, essencial em minha vida.

À minha namorada, Marina Candido Primi. Pelo apoio, companheirismo e conselhos dados nesta jornada. Por me dizer o que era preciso e não o que era fácil. Sua companhia fez de mim uma pessoa maior.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho. Por ser meu “pai científico”, parceiro e amigo. Sua didática e competência serão sempre exemplos e metas profissionais.

Essa conquista também é de vocês.

Agradecimentos

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro dispendido nos primeiros nove meses de trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido até a conclusão deste projeto. Ao assessor FAPESP ad hoc, por acreditar neste trabalho.

Aos meus pais, por todos os esforços e sacrifícios realizados, pela educação e valores transmitidos. Se cheguei até aqui, devo tudo ao apoio e alicerce que tive em toda a minha vida. Muito obrigado por estarem comigo e serem simplesmente incríveis, sensacionais e fantásticos.

Ao meu amor, Marina Cândido Primi, que de forma inesperada surgiu em minha vida e me resgatou de momentos em que estive perdido. Graças à sua personalidade e visão madura sobre os fatos, consegui manter-me focado, honrar prazos, compromissos e também mudar minha postura profissional. Mudanças de atitude e comportamento são extremamente difíceis de serem feitas. Você foi capaz de promovê-las, e por isso, tenho extrema admiração e orgulho de você. Muito obrigado pelo amor e companheirismo. “Estarei sempre com você”

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho. Suas arrebatadoras aulas de Química Farmacêutica Medicinal foram as grandes responsáveis pelo amor que sinto à “nossa” área. Obrigado pelos conselhos, pela confiança, pela amizade e pelas oportunidades. Sabíamos desde o início que não seria fácil e mesmo assim seguimos em frente, eu acreditando em seu potencial, você sempre expandindo meus limites. Disse-lhe que estaria contigo até o fim. Estamos apenas no começo. Obrigado por sempre me manter com os pés no chão e, acima de tudo, por apontar minhas limitações, fazendo eu não me esquecer delas. Muito obrigado “paifressor”.

À Profa. Titular Dra. Elizabeth Igne Ferreira. Pelos ensinamentos acadêmicos, pelo amor à pesquisa e à docência. Obrigado pelo apoio em diversos momentos e também pelos conselhos valiosos, sempre me tratando como um orientando seu. Nunca esquecerei tudo o que a senhora fez por mim.

À Profa. Michelle Carneiro Polli, pelo apoio, ensinamentos, amizade e oportunidades. Graças a você tive a possibilidade de vivenciar a área acadêmica em níveis que, apenas com a pós-graduação, não seria capaz de atingir. Espero um dia ser capaz de retribuir tudo o que fez por mim. Muito obrigado pelos ensinamentos.

Ao Prof. Titular Dr. Joaquín Maria Campos Rosa, pelo aprendizado, pelo caloroso acolhimento e pela grande oportunidade concedida. Carregarei os conhecimentos que obtive com o senhor, e com o seu laboratório, para sempre. Espero que possamos um dia trabalhar juntos novamente. Muito obrigado por tudo. “¡un saludo!”

À Profa. Dra. Claude Justina Valduga e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga, por gentilmente terem aceito o convite de serem os avaliadores do exame de qualificação deste projeto, pelas contribuições valiosas que deram, que auxiliaram a condução da etapa subsequente do mesmo. As considerações de vocês engrandeceram muito este projeto.

Ao Prof. Titular Dr. Leoberto Costa Tavares. Pela colaboração neste trabalho e por conceder acesso ao programa MOLSIM 3.2.

À Profa. Dra. Maria Beatriz Riverón Acosta pelo incentivo durante a graduação em Farmácia. Por ter me aberto as portas quando as demais estavam fechadas e ter, gentilmente, me aceito como seu aluno de iniciação científica, e assim ter me apresentado o fascinante mundo da pesquisa. Muito obrigado professora.

À Dra. Kerly F. M. Pasqualoto pelo grande auxílio e colaboração nos estudos de modelagem molecular. A sua contribuição foi de grande valia e fez toda a diferença. Sua visão sobre o mundo da pesquisa é ampla e admirável. Muito obrigado pelos ensinamentos e conselhos dados.

Ao Dr. Adilson Kleber Ferreira, Dr. Ricardo A. Azevedo, Dr. Paulo L. de Sá Jr. e Prof. Dr. José A. Barbuto, do Laboratório de Imunologia de Tumores do Instituto de Ciências Biomédicas, pela colaboração e auxílio na condução dos ensaios biológicos.

Aos colegas colaboradores, Prof. Dr. Júlio Zukerman Schpector, Dra. Stella Hernández Maganhi, Prof. Dr. Fábio Furlan Ferreira, Dr. Wilson Alves Ferreira Júnior, Profa. Dra. Yara Cury e Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra. A colaboração de todos vocês abrilhantou muito os trabalhos aqui descritos. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Gustavo H. G. Trossini pela amizade, risadas e pelos bons momentos de descontração.

À Profa. Dra. Silvy Maria Engler, pela calorosa recepção em seu laboratório e por sua importante contribuição em minha formação.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas David, Elizabete, Alexandre, Kelma, Inês, Irineu e Mirian, por serem prestativos e sempre educados comigo.

Ao amigo conquistado durante a pós-graduação, Natanael Dante Segretti. Pelos bons momentos que vivemos juntos, pelas discussões fervorosas sobre química farmacêutica, pelos gostos que temos em comum, pelas conversas mais variadas, pelas risadas e pelo nosso jogo de Magic, que nunca conseguimos jogar. Um dia conseguiremos, ainda tenho essa esperança!

À minha amiga e parceira das antigas, Mariana Frojuello, cujo nome completo não caberia nesta folha. Por nossa amizade, pelos momentos de dúvida e indecisão que vivemos juntos desde o início de nossa pós-graduação. Pela cumplicidade e parceria durante os anos que trabalhamos juntos. Você me ajudou muito, sempre que precisei, e sempre que pôde me ajudar. Trilhar esse caminho em sua companhia fez com que ele ficasse mais fácil. Saiba que haverá sempre um lugar para você ao lado da minha bancada. Muito obrigado.

À amiga Nawal Mahfoudh, por seu companheirismo no laboratório e pelos ensinamentos que pude aprender contigo. Sua disposição para o trabalho, humildade e perseverança são inspiradoras. Você terá um futuro brilhante, tenho certeza. Quem sabe um dia voltemos a trabalhar juntos, em um novo desafio. “as-salamu alaiķum”

Aos colegas e amigos de grupo Rosania Yang, Thais Fernandes, Gustavo Vasco, Diego Prieto e à recém integrada, Elys Lima, por partilharem as dificuldades e estarem junto comigo dando sugestões e conselhos. Não posso deixar de citar nossos momentos de descontração, risadas e parcerias. Espero conviver com vocês por muito tempo ainda. Saibam que cada um de vocês é especial para mim à sua maneira. Obrigado grupo!

Aos colegas e amigos de laboratório, Charles Brito, Fernando Gatti, Drielli Vital e Vinicius Maltarollo, pela ótima convivência, educação, momentos de descontração, conselhos e cordialidade. Considero-me uma pessoa de sorte por poder conviver com pessoas tão agradáveis como vocês, todos os dias.

Aos colegas de bloco 13, Juliana Magalhães, Fredson Silva, Marco Arribas, Tacila Pereira, Guilherme Dutra, Soraya Santos e Jeanine Giarolla. A conversa com vocês, nos mais diversos momentos, fez meus dias mais alegres e, muitas vezes, acabaram por me dar valiosos conselhos e dicas técnicas. Muito obrigado.

Um obrigado especial à colega e amiga, Lorena Paes, pelas conversas técnicas e não-técnicas, pelos ensinamentos cromatográficos, pelo extremo rigor analítico que possui e também pela humildade em tudo o que se propõe a fazer. Saiba que te admiro como profissional e tenho certeza de que um futuro promissor lhe aguarda. Espero trabalhar muito com você ainda. Obrigado.

Ao meu bom amigo Derek Moraes Lopes, pela amizade sincera, por sempre estar comigo, por ser otimista, pela honestidade com que leva a vida, o trabalho e, acima de tudo, pela perseverança longeva que possui. Obrigado pelas longas conversas que temos, que permanecerão firmes nos próximos cem anos, segundo o que você profere. Muito obrigado meu amigo.

Aos meus amigos e irmãos, Thiago Torrecilha dos Santos e Fernanda Barone. O que falar de vocês? Palavras não resumem o quanto amo vocês dois. Obrigado pela amizade, pelo companheirismo, pelos bons momentos que passamos juntos e por estarem comigo sempre que precisei, preciso e precisarei. Fui abençoado com a amizade de vocês e vou honra-las até o fim. Nós quatro sempre estaremos juntos. Obrigado meus irmãos.

À amiga, Vicky Forshaid. Sua amizade veio de forma inesperada e cresceu naturalmente. Obrigado pelo apoio nos meus momentos de solidão, por ser sincera sempre e por pedir meus conselhos. É muito bom saber que somos úteis a alguém. Você sabe que sempre pode contar com este amigo aqui também. Nós três ainda teremos muito o que conversar.

Ao amigo, Michael Amorim por estar comigo em momentos em que estive distante e solitário. Esta foi uma inesperada e excelente surpresa. Obrigado pelo caloroso apoio. Admiro-te por sua independência singular, tão atípica em nós, filhos únicos. Realmente o mundo é seu e você do mundo. Saudades.

A Leonice Alves dos Santos, pelos cuidados dispensados à mim e aos meus pais. Por todos os anos de dedicação e companhia. Hoje você é peça fundamental para nós e faz parte da nossa família, muito obrigado por tudo.

À companhia, amparo e amizade de Juan Carlos Lopes, Lílíana Campos e Marina. Os momentos vividos com vocês foi de extrema importância para mim. A companhia de vocês fez com que fosse mais fácil suportar os desafios. Muito obrigado por estarem comigo nos momentos que estiveram, sempre me lembrarei dos três.

À minha família, que sempre esteve comigo nos momentos que precisei e que sempre torceu muito por mim. Amo muito cada um de vocês.

*“ Se o fim é acabar em fogo. Então todos nós devemos queimar juntos (...)
Se devemos morrer esta noite. Então todos nós devemos morrer juntos (...)
E eu espero que você se lembre de mim. ”*

- Ed Sheeran -

Muito obrigado a todos!

- Maurício Temotheo Tavares -

*“ O importante é ganhar. Tudo e sempre.
Essa história que o importante é competir
não passa de demagogia. ”*

- Ayrton Senna -

Resumo

TAVARES, M. T. **Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina**. 2014. 200p. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O câncer é o segundo grupo de doenças que mais mata em todo o mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. No Brasil, esse panorama é preocupante devido ao período de acentuada tendência de envelhecimento, fase etária de maior incidência do câncer. Neste contexto, a atual terapia antineoplásica continua apresentando diversos vieses quanto à toxicidade e seletividade. Muitos dos fármacos empregados na clínica médica são de origem natural, ou tiveram em suas etapas iniciais de desenvolvimento, correlação com produtos naturais, enaltecendo a importância de fontes naturais no desenvolvimento de novos compostos bioativos. A capsaicina, substância responsável pela pungência apresentada pelos frutos de pimentas do gênero *Capsicum*, tem se mostrado um importante agente natural com atividade citotóxica à diversas linhagens neoplásicas, porém, sua ação pungente e baixa estabilidade físico-química, limitam seu emprego terapêutico. Com isso, a capsaicina apresenta grande potencial em servir como arcabouço para o planejamento de novas entidades químicas bioativas, análogas à mesma, para emprego no tratamento do câncer. Este trabalho propôs-se a planejar e sintetizar análogos sulfonamídicos e sulfonatos da capsaicina, promovendo variações moleculares no núcleo estrutural capsaicinóide. Após síntese em única etapa, os análogos foram obtidos e caracterizados por faixa de fusão, RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ e análise elementar. Posteriormente os compostos foram submetidos a ensaio de citotoxicidade nas linhagens tumorais: MDA-MB-231 e MCF-7 (de câncer de mama), B16-F10 (melanoma murino) e sobre linhagens sadias de fibroblasto (3T3), pelo método de avaliação da viabilidade celular por biorredução do sal de tetrazólio, o MTT. Quatro compostos apresentaram atividade biológica interessante, em concentrações micromolares (μM) inferiores à atividade apresentada pela capsaicina, destacando-se os compostos RPF-101 e RPF-151, os mais ativos e que tiveram seus mecanismos de indução de morte investigados. Estudos teóricos subsequentes realizados com os análogos de maior atividade (RPF-101 e RPF-151), revelaram que as modificações moleculares promovidas nas estruturas dos mesmos conferiram maior caráter hidrofílico e maior momento de dipolo, o que pode estar relacionado com o incremento na atividade biológica de ambos. A avaliação dos compostos ativos frente às propriedades constantes na Regra dos Cinco de Lipinski (RO5) revelou que estes respeitam todos os parâmetros da regra, enaltecendo assim o caráter *druglikeness* dos mesmos, em serem ativos via administração oral, visto que o RPF151 não apresentou ação pungente *in vivo*. A obtenção dos compostos RPF-101 e RPF-151 indicam o sucesso alcançado com a otimização estrutural promovida no arcabouço capsaicinóide, e enaltece o potencial destes análogos em inspirar o planejamento de novas estruturas, ainda mais otimizadas, que possuam maior potência e menor toxicidade associada.

Palavras-chave: Capsaicina. Modificação molecular. Bioisosterismo. Citotoxicidade. Câncer.

Abstract

TAVARES, M. T. **Novel anticancer candidates: synthesis and antitumor activity of capsaicin-like sulfonate and sulfonamide analogues.** 2014. 200p. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Cancer is the second most lethal group of diseases all over the world, just behind cardiovascular diseases. This scenery is worrying in Brazil due the pronounced aging trend observed, that presents the higher incidence of cancer. In this context, the current anticancer therapy still have several biases regarding toxicity and selectivity. Many current medicines correlate to natural products, even in its early stages of development, which highlight the importance of natural sources in the design of new bioactive compounds. Capsaicin is the substance responsible for the pungency of *Capsicum* genus' chili peppers. Capsaicin has been shown as an important natural agent because of its cytotoxic activity against several tumor cell lines. However, the pungency and poor stability presented by capsaicin restricts its therapeutic employments. Thus, the capsaicinoid scaffold has a great potential to inspire the design of new bioactive analog entities to be employed in anticancer therapy. This project aimed at designing and synthesizing sulfonamide and sulfonate analogues of capsaicin, performing molecular changes on capsaicinoid core. After a single step synthesis, the analogues were purified and characterized by melting point, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR and elementary analysis. Subsequently, cytotoxicity assays were performed by MTT method on tumor cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 (breast cancer), B16-F10 (murine melanoma) and on healthy fibroblast (3T3). Four compounds showed interesting biological activity at micromolar concentrations (μM) and their IC_{50} were lower than that presented by capsaicin. The most active compounds, RPF-101 and RPF-151, had their death induction mechanisms investigated. *In silico* subsequent studies with the most active compounds (RPF-101 and RPF-151) showed that molecular changes promoted on each one increased their hydrophilicity and raised their dipole moment, which may be related to the improvement on biological activity of both. The evaluation of active compounds for Lipinski's Rule of Five (RO5) properties revealed that they respect all properties presenting its druglikeness for oral administration since RPF151 did not presented *in vivo* pungency. The RPF-101 and RPF-151 indicate the success obtained by the structural optimization promoted on capsaicinoid scaffold and emphasizes the potential of these analogues to inspire the designing of new future optimized structures, with greater potency and less associated toxicity.

Keywords: Capsaicin. Molecular modification. Bioisosterism. Cytotoxicity. Cancer.

Lista de Figuras

Figura 1: Mortalidade global causada por câncer em milhões de habitantes no ano de 2012.	3
Figura 2: Esquema do ciclo celular normal, com os relativos pontos de checagem e com as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) envolvidas em cada etapa do processo.	6
Figura 3: Etapas de mutação celular envolvidas no surgimento de células malignas.	8
Figura 4: Via extrínseca e intrínseca de indução de apoptose.	16
Figura 5: Linha cronológica de inovações terapêuticas no tratamento do câncer.	18
Figura 6: Fórmula estrutural da capsaicina.	20
Figura 7: Obtenção do vorinostate a partir da tricotstatina, de origem natural.	25
Figura 8: Exemplos de bioisosterismo clássico e não clássico.	28
Figura 9: Otimização da estrutura do captopril até a obtenção do enalaprilato.	29
Figura 10: Representação esquemática da melhoria de interação obtida com o uso da estratégia homologia.	29
Figura 11: Esquema racional de monossustituição proposta por Craig (1971) para sistemas aromáticos.	31
Figura 12: Planejamento dos análogos capsaicinóides sulfonamídicos e sulfonatos.	36
Figura 13: Fórmula estrutural do fármaco bussulfano.	37
Figura 14: Estratégia sintética de obtenção dos análogos propostos. Condições reacionais: (i) RSO_2Cl , Na_2CO_3 , H_2O , t.a., 2-6 h; (ii) RSO_2Cl , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , t.a., 2-6 h.	44
Figura 15: Estrutura química do composto utilizado como molde na construção do modelo molecular 3D da capsaicina. Em vermelho: porção conservada da estrutura de referência utilizada para a construção do modelo molecular. Em azul: porção da estrutura capsaicinóide não presente na estrutura modelo.	53
Figura 16: Mecanismo geral de formação dos compostos da série sulfonamídica e sulfonato.	62
Figura 17: Suposta formação de sais orgânicos na reação de formação dos compostos sulfonatos.	64
Figura 18: Hipótese do mecanismo de liberação do grupo sulfonato do análogo RPF-252, semelhante à liberação do grupo acetato em cefalosporinas.	66

Figura 19: Padrão de enumeração estrutural dos análogos alquílicos (subsérie A) e arílicos (subsérie B).	69
Figura 20: Deslocamento de campo observado no sinal –NH do composto RPF-107.	74
Figura 21: Espectro de RMN ^1H obtido a partir do composto RPF-151.	75
Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C obtido a partir do composto RPF-101.	79
Figura 23: Análogos capsaicinóides sintetizados, que apresentaram atividade biológica.	88
Figura 24: RPF-101, primeiro análogo ensaiado em cultura celular a apresentar atividade citotóxica.	89
Figura 25: Comprometimento mitótico gerado pelo RPF-101, adaptado de De-Sá-Júnior <i>et al.</i> (2013).	91
Figura 26: RPF-151, o análogo mais ativo em MDA-MB-231, cujo estudo do mecanismo de indução apoptótica foi aprofundado.	92
Figura 27: Efeito do composto RPF-151 no crescimento celular de linhagens HUVEC.	93
Figura 28: Inibição da proliferação de células HUVEC promovida pelo RPF-151 a 10 μM . (a) Gráfico de pontos obtido na avaliação de proliferação celular por citometria de fluxo. Representação do tamanho celular (no eixo <i>forward scatter</i> - FSC) e da complexidade celular (no eixo <i>sideward scatter</i> - SSC). (b) Percentual comparativo de proliferação celular obtido por citometria de fluxo. (c) Como pode ser notado, o tratamento com RPF-151 não induziu mudanças morfológicas e nem morte celular, indicando ausência de efeito citotóxico em HUVEC.	93
Figura 29: RPF-151 induz parada celular em fase S, estímulo apoptótico e redução de moduladores celulares. (a) Citometria de fluxo do conteúdo celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com RPF-151 a 87 e 174 μM , e também de células não tratadas. Os tratamentos com RPF-151 a 87 e 174 μM induziu parada do ciclo celular em fase S, levando à apoptose (observada pela formação do sub pico G1 em azul claro). (b) Western blot realizado para os moduladores de ciclo celular ciclina A, D1, D3, p21 e β actina. RPF-151 a 25 e 50 μM causou redução das ciclinas A, D1, D3 e de p21.	94
Figura 30: (a) O composto RPF-151 gerou despolarização de membrana mitocondrial. (b) O tratamento com RPF-151 promoveu redução da expressão de Bcl-2 e elevação da atividade de caspase-3.	95
Figura 31: Avaliação da capacidade de indução de hiperalgesia do composto RPF-151.	96
Figura 32: Avaliação da atividade antitumoral do RPF-151 em modelo <i>in vivo</i> . (a) Os animais tratados por 15 dias com RPF-151 não apresentaram crescimento significativo da massa tumoral inicial, e indica que o mesmo promoveu ação supressora de crescimento superior à capsaicina. (b) O tratamento dos animais com o composto RPF-151 em menor concentração (70 mg/kg) promoveu inibição do crescimento da massa tumoral superior à inibição apresentada pela capsaicina (na concentração de 90 mg/kg).	97

Figura 33: Portfólio do composto RPF-151, o mais ativo análogo obtido neste trabalho.

98

Figura 34: Representação dos mapas de potencial eletrostático (MPE, à esquerda e ao centro), das cargas atômicas parciais de potencial eletrostático (ESP-CHELPG, à direita) e do vetor de momento de dipolo (representado pela seta azul, à direita) da capsaicina e dos análogos ativos RPF-101e RPF-151. ¹As regiões de coloração vermelho intenso (-0,080) possuem maior distribuição de densidade eletrônica. As regiões de coloração azul intensa (+0,080) possuem menor distribuição de densidade eletrônica. ²Átomos com coloração vermelha intensa (-0,594) mais negativos e átomos com coloração verde intensa (+0,594) mais positivos. ³As setas azuis indicam o vetor de momento de dipolo (μ). 3a: $\mu = 3,99$ Debye; 3b: $\mu = 6,80$ Debye; 3c: $\mu = 5,39$ Debye.

104

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais alterações morfológicas presentes nos processos de apoptose e necrose.	11
Tabela 2: Dados de caracterização dos compostos obtidos.	59
Tabela 3: Análogos sulfonatos sintetizados e que apresentaram problemas de estabilidade físico-química.	65
Tabela 4: Fator de retenção dos análogos pertencentes às séries IA e IIA. Eluente: CHCl ₃ .	67
Tabela 5: Fator de retenção dos análogos pertencentes à série IB. Eluente: CHCl ₃ .	67
Tabela 6: Faixa de fusão dos análogos sintetizados.	68
Tabela 7: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹ H em CDCl ₃ para a série IA.	70
Tabela 8: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹ H em CDCl ₃ ou DMSO- <i>d</i> ₆ para a série IB.	71
Tabela 9: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹ H em CDCl ₃ para a série IIA.	73
Tabela 10: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C em CDCl ₃ para a série IA.	76
Tabela 11: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³ C em CDCl ₃ ou DMSO- <i>d</i> ₆ para a série IB.	77
Tabela 12: Dados de análise elementar (% CHN) dos compostos da série IA.	80
Tabela 13: Dados de análise elementar (% CHN) dos compostos da série IB.	81
Tabela 14: Inibição do crescimento celular (IC ₅₀ em μ M) nas linhagens tumorais e em fibroblasto (linhagem 3T3).	83
Tabela 15: Determinação do IC ₅₀ nas linhagens tumorais adicionais e em fibroblasto (linhagem 3T3).	86
Tabela 16: <i>Screening</i> biológico realizado por De-Sá-Junior <i>et al.</i> (2013).	90
Tabela 17: Dados confôrmero escolhido e isolado na simulação de DM da capsaicina.	102
Tabela 18: Representação dos mapas de potencial lipofílico (MPL), ClogP e ClogD da capsaicina e dos análogos ativos RPF-101e RPF-151.	107
Tabela 19: Parâmetros da Regra dos Cinco (RO5) de Lipinski, calculados para os compostos RPF-101, 105, 151 e 152.	109

Lista de Gráficos

- Gráfico 1:** Perfil de amostragem conformacional (PAC) da capsaicina gerado na simulação de DM de 1 ns a 310 K: eixo x corresponde ao número de passos da simulação (cada passo igual a 1 fs), e o eixo y corresponde à energia (kcal/mol). A seta em vermelho indica o passo escolhido para isolamento do confômero. A energia corresponde à soma das contribuições de energia intramolecular de deformação axial (E_{STRECH}), de deformação angular (E_{BEND}), de deformação torsional (E_{TORS}), de tipo 1-4 (E_{1-4}), de van der Waals (E_{vdW}) e de carga ou eletrostática (E_{CHARGE}). As contribuições de energia de ligação de H e de solvatação não foram computadas durante a simulação, mas calculadas para os confômeros selecionados do PAC. **102**

Lista de Abreviaturas

3D: tridimensional

Apaf-1: *apoptotic protease activating factor 1* (fator apoptótico 1 de ativação de protease)

APO-1: receptor de antígeno de apoptose 1

ATCC: *American Type Culture Collection*

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 protein* (proteína de linfoma 2 de células B)

Bcl-w: *B-cell lymphoma w protein* (proteína de linfoma w de células B)

Bcl-XL: *B-cell lymphoma extra large protein* (proteína de linfoma extra grande de células B)

CCD: cromatografia em camada delgada

CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa

CDCl₃: clorofórmio deuterado

CDK: *cyclin-dependent kinase* (quinase dependente de ciclina)

CHELPG: *charges from eletrostatic potentials using a grid based method* (cargas de potencial eletrostático baseado no método *grid*)

CKI: *cyclin-dependent kinase inhibitor* (inibidor de quinase dependente de ciclina)

ClogD: coeficiente de distribuição calculado (coeficiente de partição com ionização)

ClogP: coeficiente de partição calculado

DM: dinâmica molecular

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

D-MEN: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-*d*6: dimetilsulfóxido deuterado

DNA: ácido desoxirribonucleico

DR3: *death receptor 3* (receptor de morte 3)

E₁₋₄: energia de interações do tipo 1-4,

E2F: *E2 transcription factor* (fator de transcrição E2)

EBEND: energia de deformação angular

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECHARGE: energia eletrostática

E_{ligH}: energia de ligação de hidrogênio

ESOLV: energia de solvatação

ESTRECH: energia intramolecular de deformação axial

ETORS: energia de deformação torsional

ETOT: energia total

E_{vdw}: energia de interações de van der Waals

FADD: *Fas-associated death domain protein* (proteína do domínio de morte associada à Fas)

Fas: proteína denominada Fas ou Fas-ligante

PVDF: *polyvinylidene fluoride* (fluoreto de polivinilideno)

G₀: *Gap 0* (intervalo celular 0)

G₁: *Gap 1* (intervalo celular 1)

G₂: *Gap 2* (intervalo celular 2)

HBA: *hydrogen bond acceptor* (sítio aceptor de ligação de hidrogênio)

HBD: *hydrogen bond donor* (sítio doador de ligação de hidrogênio)

HDAC: *histone deacetylase* (histona desacetilase)

HEGF: *human epidermal growth factor* (fator de crescimento epidermal humano)

HQSAR: *hologram quantitative structure-activity relationship* (relação estrutura-atividade quantitativa por holograma)

HUVEC: *human umbilical vein endothelial cell* (célula do endotélio de veia de cordão umbilical humano)

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC₅₀: concentração inibitória 50% (necessária para inibir 50% de determinada população em um ensaio)

I.P: intraperitônio

I.PL: intraplantar

LBDD: *ligand-based drug desing* (planejamento de fármacos baseado no ligante)

LDL: *low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

M: Mitose

MPE: mapa de potencial eletrostático

MPF: *mitosis promoting factor* (fator promotor da mitose)

MPL: mapa de potencial lipofílico

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

NADH: *nicotinamide and adenine dinucleotide* (dinucleotídio de nicotinamida e adenina)

NCI: *National Cancer Institute* (Instituto Nacional do Câncer)

OMS: Organização Mundial da Saúde

p15: proteína de 15 kDa

p16: proteína de 16 kDa

p18: proteína de 18 kDa

p19: proteína de 19 kDa

p21: proteína de 21 kDa

p27: proteína de 27 kDa

p53: gene que codifica a proteína p53

p53: proteína de 53 kDa

p57: proteína de 57 kDa

PABA: ácido *para*-aminobenzóico

PAC: perfil de amostragem conformacional

PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

ppm: partes por milhão

pRb: gene que codifica a proteína pRb

pRb: *retinoblastoma protein* (proteína de retinoblastoma)

QSAR: *quantitative structure-activity relationship* (relação estrutura-atividade quantitativa)

REA: relação estrutura-atividade

Rf: *retention fator* (fator de retenção)

RMN ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN: ressonância magnética nuclear

RMSD: *root-mean-square deviation* (desvio quadrático médio)

RO5: *Lipinski's rule of five* (regra dos cinco de Lipinski)

ROS: *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

S: Fase celular de síntese de DNA

SAR: *structure-activity relationship* (relação estrutura-atividade)

SBDD: *structure-based drug desing* (planejamento de fármacos baseado na estrutura)

SDS: *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

TL1A: *TNF-like 1A* (ligante semelhante ao TNF)

TMRE: *tetramethylrhodamine ethyl ester* (éster etílico de tetrametilrodamina)

TNF: *tumor-necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

TNFR: *tumor-necrosis factor receptor* (receptor de fator de necrose tumoral)

TNFR1: *tumor-necrosis factor receptor 1* (receptor de fator de necrose tumoral 1)

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

Tris-HCl: cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano

TRPV1: *transient receptor potential vanilloid subtype 1* (receptor vanilóide de potencial transitório subtipo 1)

UV: ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Câncer: aspectos gerais.....	02
1.2. A epidemiologia do câncer no Brasil e no mundo.....	03
1.3. Fisiopatologia oncológica.....	05
1.4. Apoptose: a morte celular programada.....	09
<i>1.4.1. Apoptose versus necrose.....</i>	<i>10</i>
<i>1.4.2. Vias bioquímicas e aspectos moleculares de indução de apoptose.....</i>	<i>11</i>
<i>1.4.2.1. Via extrínseca de indução de apoptose.....</i>	<i>14</i>
<i>1.4.2.2. Via intrínseca, ou mitocondrial, de indução de apoptose.....</i>	<i>15</i>
1.5. A terapia farmacológica do câncer: histórico e aspectos contemporâneos.....	17
1.6. Capsaicina: aspectos gerais e seu potencial na terapia antineoplásica.....	19
1.7. Planejamento racional de fármacos.....	24
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	33
3. PLANEJAMENTO DAS SÉRIES PROPOSTAS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Material.....	39
<i>4.1.1. Reagentes, solventes e demais materiais para síntese.....</i>	<i>39</i>
<i>4.1.2. Equipamentos para síntese e caracterização das moléculas.....</i>	<i>40</i>
<i>4.1.3. Reagentes, solventes e demais insumos para ensaio biológico.....</i>	<i>41</i>
<i>4.1.4. Equipamentos utilizados nos ensaios biológicos.....</i>	<i>42</i>
<i>4.1.5. Hardwares e softwares para modelagem molecular.....</i>	<i>43</i>
4.2. Métodos.....	43
<i>4.2.1. Estratégia sintética e identificação dos compostos planejados.....</i>	<i>43</i>
<i>4.2.2. Reação de sulfonilação.....</i>	<i>44</i>
<i>4.2.3. Reação de redução.....</i>	<i>45</i>
<i>4.2.4. Metodologia analítica e de caracterização.....</i>	<i>45</i>

4.2.4.1. Cromatografia em camada delgada.....	45
4.2.4.2. Faixa de fusão.....	46
4.2.4.3. Espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN).....	46
4.2.4.4. Análise elementar.....	46
4.2.5. Ensaios de avaliação da atividade citotóxica em cultura de células.....	46
4.2.5.1. Triagem expandida em linhagens adicionais.....	47
4.2.5.2. Avaliação de viabilidade celular por biorredução do MTT.....	47
4.2.6. Ensaios de elucidação mecanística dos análogos ativos.....	48
4.2.6.1. Estudo de indução apoptótica por alaranjado de acridina e iodeto de propídio..	48
4.2.6.2. Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi$).....	48
4.2.6.3. Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagem venosa endotelial.....	49
4.2.6.4. Análise de expressão de proteínas por Western blot.....	50
4.2.6.5. Ensaio de indução de hiperalgesia térmica de Hargreaves.....	51
4.2.6.6. Determinação da atividade antitumoral em modelo in vivo.....	51
4.2.7. Modelagem molecular.....	52
4.2.7.1. Construção do modelo molecular tridimensional (3D) da capsaicina.....	52
4.2.7.2. Construção dos modelos moleculares 3D dos análogos RPF-101 e RPF-151.....	54
4.2.7.3. Cálculo das propriedades moleculares.....	56
4.2.7.4. Cálculo das propriedades da “Regra dos Cinco” de Lipinski.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. Compostos sintetizados.....	59
5.1.1. Caracterização dos análogos sintetizados.....	66
5.1.1.1. Determinação de Rf.....	66
5.1.1.2. Faixa de fusão.....	68
5.1.1.3. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 – RMN ^1H e ^{13}C	69
5.1.1.4. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (%CHN).....	81
5.2. Atividade biológica in vitro.....	81
5.2.1. Atividade sobre MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10.....	83

5.2.2. <i>Triagem realizada em linhagens complementares</i>	86
5.3. Correlação entre os análogos ativos e a estrutura capsaicinóide.....	87
5.3.1. <i>RPF-101: estudos mecanísticos complementares</i>	89
5.3.2. <i>RPF-151: estudos mecanísticos complementares</i>	92
5.4. Estudos de modelagem molecular.....	99
5.4.1. <i>Construção dos modelos tridimensionais</i>	100
5.4.2. <i>Cálculo de propriedades moleculares</i>	101
5.4.3. <i>Cálculo das propriedades da “Regra dos Cinco” de Lipinski</i>	109
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	111
7. REFERÊNCIAS	116
ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS.....	132
ANEXOS.....	135
ANEXOS – I: Espectros de RMN.....	136
ANEXOS – II: Análises elementares.....	174
ANEXOS – III: Publicações científicas.....	184
ANEXOS – IV: Ficha do aluno.....	193
ANEXOS – V: Currículo Lattes do aluno.....	197

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: aspectos gerais

O câncer, doença classificada como neoplasia maligna ou tumor maligno, é o termo genérico utilizado para definir um amplo grupo de doenças que acometem diversas células e tecidos. As características básicas do câncer consistem no rápido surgimento de células anormais a um determinado tecido, capazes de se multiplicar desordenadamente, de forma acelerada, com potencial para invadir e se multiplicar em tecidos adjacentes e/ou distantes do seu local de surgimento (Hanahan; Weinberg, 2011, WHO, 2014).

Primeiramente considerado uma doença de países desenvolvidos, hoje o câncer é encarado como problema de saúde pública em diversos países em desenvolvimento, como a Índia, o Chile e o Brasil (INCA, 2014).

As causas que levam ao surgimento do câncer são extremamente variadas e podem, basicamente, ser divididas em duas vertentes: causas internas (genotípicas) e externas (fenotípicas) (ACS, 2014). Causas externas remetem às condições do meio ambiente, hábitos e costumes que determinado indivíduo possui, condições estas que podem induzir alterações celulares que, quando ocorridas em vias bioquímicas de controle, por exemplo, de morte celular programada (apoptose), podem desencadear a doença. As causas internas podem ser, na maioria dos casos, associadas a mutações genéticas, estando correlacionadas à capacidade de determinado organismo em tolerar e se defender de agressões externas diversas, como agressões promovidas por carcinógenos químicos (por exemplo o benzeno) e carcinógenos físicos, como a radiação ultravioleta (INCA, 2014).

Fatores econômicos e socioculturais corroboram o crescimento contínuo, ao longo dos últimos anos, dos casos de câncer registrados no mundo. Dados estatísticos e epidemiológicos sobre o câncer podem contribuir para a melhor elucidação desta tendência (Guerra *et al.*, 2005).

1.2. A epidemiologia do câncer no Brasil e no mundo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), após as doenças do aparelho circulatório, o câncer é a doença que mais mata em todo o mundo. Em 2012, cerca de 15% de todos os óbitos registrados pelas agências de saúde foram decorrentes de complicações neoplásicas, somando mais de 8,2 milhões de casos. Dentre os diversos tumores malignos existentes, os que lideram o *ranking* em vítimas fatais são os cânceres de pulmão, fígado, estômago, cólon e mama, como indica a Figura 1 (IARC, 2014). A projeção destes dados não se revela promissora, pois segundo a OMS, é estimado que em 2030 cerca de 12 milhões de pessoas virão a óbito, vítimas de neoplasias malignas (WHO, 2014).

MORTALIDADE GLOBAL CAUSADA POR CÂNCER EM 2012

(para indivíduos de ambos os sexos, com subdivisão pelo tipo de neoplasia)

em milhões de habitantes

Figura 1: Mortalidade global causada por câncer em milhões de habitantes no ano de 2012 (IARC, 2014).

No Brasil, em 2012, cerca de 225 mil brasileiros foram vítimas fatais de neoplasias malignas, configurando o câncer como a segunda maior causa de mortalidade do período e responsável por 17% dos óbitos totais registrados, ficando atrás somente das doenças que acometem o aparelho circulatório (DATASUS, 2014; IARC, 2014).

As internações oncológicas realizadas no Brasil crescem a cada ano. A taxa, que no ano de 2005 era de 423 mil internações, atingiu em 2009, valores superiores a 575 mil (DATASUS, 2014; INCA, 2014). Esse cenário revela forte tendência de crescimento para os próximos anos, visto que o

Ministério da Saúde prevê, ao longo de 2014, o diagnóstico de 576 mil novos casos, e estima que a taxa de mortalidade por neoplasias malignas será de 300 mil óbitos em 2020 (INCA, 2014; BRASIL, 2014).

Apesar de esta medida representar uma grande conquista para a população, ela também se mostra extremamente onerosa aos cofres públicos, que somente em 2009 gastou cerca de R\$ 1,3 bilhão apenas em cirurgias, sessões de quimioterapia e radioterapia (INCA, 2013). Além deste montante, os gastos com a aquisição de medicamentos oncológicos são responsáveis por consumir R\$ 116 milhões da verba pública, e os gastos com internações oncológicas superam a marca dos R\$ 731 milhões (DATASUS, 2014; IBGE, 2014; INCA, 2014).

As estimativas epidemiológicas brasileiras revelam forte tendência de envelhecimento da população. A projeção para 2050 é de o Brasil possuir, segundo estudos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 17 idosos com mais de 65 anos para cada criança, com idade inferior a 14 anos, o que evidencia em médio e longo prazo, a tendência de aumento da demanda por medicamentos para o tratamento do câncer (IBGE, 2014; INCA, 2014).

Neste contexto, os elevados custos da terapia antineoplásica, somados à tendência do câncer em acometer cada vez mais indivíduos (devido à tendência de envelhecimento populacional), vêm despertando a atenção de cientistas e pesquisadores nos últimos anos. Fato este, que pode ser comprovado pelo alto número de medicamentos inseridos na terapêutica para o tratamento de doenças oncológicas, correspondendo atualmente, a mais de 40% de todos os fármacos aprovados por agências sanitárias para o emprego terapêutico (EMA, 2014; FDA, 2014; IBGE, 2014).

A possibilidade de novas substâncias bioativas fornecerem novas estratégias e opções terapêuticas, pode aperfeiçoar a qualidade da atenção dispensada à saúde do paciente oncológico. Essa temática é uma constante no que tange o tratamento do câncer, visto que o atual arsenal terapêutico oncológico, ainda revela fortes vieses em relação à toxicidade, baixa seletividade, comprometendo assim, a eficácia do tratamento (Rosner *et al.*, 2011).

Para o planejamento de novos compostos ativos contra células tumorais, que apresentem certo grau de seletividade, e que assim venham a desencadear efeitos adversos mais tênues ao paciente, o pleno conhecimento dos aspectos fisiopatológicos deste complexo grupo de doenças é de vital importância à pesquisa sobre o câncer (Tachibana *et al.*, 2005).

1.3. Fisiopatologia oncológica

Como mencionado anteriormente, câncer é um termo genérico voltado a definir amplo grupo de doenças distintas, que apresentam certas características semelhantes. Essas doenças podem ser consideradas de origem genética pelo fato do fenótipo maligno resultar de alterações genotípicas, que são transferidas de determinada célula mutada às descendentes (Ward, 2002).

A homeostasia celular é um controle vital ao correto desenvolvimento de tecidos e sistemas. Durante o ciclo celular, na ocorrência de determinadas mutações ou deleções de informação genética, a célula em questão inicia um processo ativo, ou seja, dependente de energia, que visa através de uma cascata de eventos bioquímicos, a morte celular programada e consequente impedimento da transferência de tais mutações às linhagens filhas (Martinez *et al.*, 2006).

A carcinogênese pode ser dividida em quatro etapas: iniciação, promoção, manutenção e progressão tumoral. A principal característica das células cancerosas é apresentar mutações e/ou deleções de informações gênicas justamente em genes que inibem ou induzem a cascata apoptótica, fazendo com que estas células e suas respectivas linhagens adquiram descontrolada capacidade de proliferação, perda de resposta frente a fatores de inibição de crescimento celular e, em estágios mais avançados, onde são observadas alterações profundas na fisiologia normal, tais células ganham a capacidade de invadir tecidos vicinais e posteriormente colonizar regiões distantes ao seu local de origem, processo denominado como metástase, além dessas células serem capazes de estimular a produção de vasos sanguíneos, fenômeno denominado angiogênese (Tachibana *et al.*, 2005).

Para que determinada célula torne-se cancerosa é preciso que certas barreiras fisiológicas sejam transpostas. As barreiras primárias são impostas pelo próprio ciclo celular. O ciclo celular das

células eucariotas é basicamente dividido em quatro fases: G₁, S, G₂ e M. Denomina-se fase G₀ celular, aquela fase em que toda e qualquer célula, que já tenha realizado seu processo de diferenciação, se encontra quiescente, ou seja, sem responder a estímulos de crescimento ou proliferação. A exemplo dos neurônios, algumas células podem permanecer em G₀ por muitos anos e, dessa forma, raramente sofrerem divisão. As fases G₀, G₁, S e G₂, representadas na Figura 2, estão inseridas no período celular denominado intérfase, que corresponde ao intervalo entre duas fases mitóticas. A mitose por sua vez é subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, estando cada subdivisão relacionada a um evento celular específico (Guembarovski; Cólus, 2008).

As duas fases consideradas críticas ao desenvolvimento celular são as fases relativas à síntese do DNA (fase S), e a mitose (fase M), etapa em que o DNA replicado é dividido igualmente entre duas células filhas. A fase S é precedida pela já citada, etapa G₁ (a letra G é derivada do termo em inglês *gap*, que significa intervalo), nessa etapa há o preparo celular para a síntese de ácidos nucléicos. Em G₁ ocorre, dentre uma série de eventos bioquímicos, a checagem interna de processos e estruturas necessárias à próxima etapa, a fase S. As características das células nessa fase são o aumento do tamanho celular e síntese de proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), essenciais à síntese de DNA, como ilustra a Figura 2 (Vermeulen *et al.*, 2003).

Figura 2: Esquema do ciclo celular normal, com os relativos pontos de checagem e com as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) envolvidas em cada etapa do processo (Vermeulen *et al.*, 2003; Ward, 2002).

Na etapa (G_1) a célula mostra-se sensível às condições ambientais, e assim, caso estas não sejam favoráveis, o ciclo é automaticamente interrompido. Após o ponto de restrição, ilustrado na Figura 2, a fase S (de síntese de DNA) irá ocorrer independente das condições ambientais. Após a fase S têm-se a fase G_2 , onde haverá a replicação do DNA sintetizado na etapa anterior. No início desta fase há outro ponto de controle, destinado a verificar o conteúdo do material genético a ser replicado, para que posteriormente seja dividido igualmente na fase mitótica. A mitose celular pode ser inibida caso, durante a checagem do processo de divisão dos cromossomos, for constatado algum erro ou anormalidade (Ward, 2002).

De maneira geral, o ciclo celular é regulado por fatores externos que, ao se ligarem a receptores acoplados a proteínas G, disparam cascatas de sinalização que resultam na ativação de quinases. Estas quinases por sua vez, irão fosforilar fatores de transcrição. O controle das fases do ciclo celular, após a ativação dos fatores de transcrição, ocorre por meio de quinases dependentes de ciclinas. Essas quinases, ao se complexarem com suas ciclinas correspondentes (Figura 2), irão fosforilar um complexo proteico chamado pRb-E2F. A fosforilação da proteína pRb gera alteração conformacional da mesma, o que promove a liberação do fator E2F, responsável por realizar a progressão do ciclo da fase G_1 para S. De forma semelhante, o fator promotor da mitose (MPF), no final da fase G_2 , é o substrato que, ao ser fosforilado, dá sequência ao ciclo em sentido à fase M mitótica (Hanahan; Weinberg, 2011).

Assim como fatores de transcrição ativam as quinases dependentes de ciclina, na ocorrência de algum erro de síntese e/ou de replicação do DNA, há um grupo de proteínas responsável por inibir a cascata de progressão do ciclo celular. Os chamados inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKIs) inibem determinadas vias de sinalização quinase-dependentes, quando na existência de danos importantes na informação genética. Esses inibidores podem ser divididos em dois grupos, os específicos (por exemplo: p15, p16, p18, p19), os quais atuam em determinado grupo de quinases, e os inespecíficos (por exemplo: p21, p27, p53, p57), que atuam em diversos complexos ciclino-quinases alvo (Vermeulen *et al.*, 2003).

Tanto a síntese de proteínas indutoras quanto a de inibidoras do ciclo celular é controlada via material genético. Os chamados proto-oncogenes, são genes que codificam proteínas estimuladoras do ciclo celular (ciclins e quinases, por exemplo). Já as proteínas inibidoras do ciclo são expressas pelos genes supressores de tumor, a exemplo têm-se o *p53*, que expressa sua proteína homônima, cujo nome faz alusão à massa molecular da mesma, igual a 53 kDa. Mutações em genes estimuladores ou supressores do ciclo celular podem gerar alterações e descompasso no desenvolvimento celular. Quando essas mutações ocorrem em proto-oncogenes, os quais acabam superexpressando proteínas indutoras do ciclo celular, estes passam a ser denominados oncogenes, cuja ação confere à célula mutante vantagens proliferativas. Caso essas mutações ocorram em genes que codificam proteínas supressoras do ciclo, como o já citado *p53* e o gene *pRb*, que expressa sua respectiva proteína homônima, estas têm sua funcionalidade comprometida, colocando em cheque todo o controle de divisão celular (Gabrielli *et al.*, 2012; Vance *et al.*, 2005, Ward, 2002).

São necessárias pelo menos cinco mutações acumuladas (Figura 3), nos diferentes *locos* gênicos (citados anteriormente), para que determinada célula torne-se de fato maligna e agressiva ao organismo (Garraway; Lander, 2013).

Figura 3: Etapas de mutação celular envolvidas no surgimento de células malignas (Evan; Vousden, 2001).

Somente após esse número de mutações, tanto em proto-oncogenes (convertidos em oncogenes) quanto em genes supressores de tumor, a célula, agora neoplásica, apresentará suas características e habilidades clássicas, como imortalidade, proliferação descontrolada, resistência aos fatores de inibição de crescimento, angiogênese e metástase (Evan; Vousden, 2001).

A problemática acerca das mutações ocorridas em genes supressores de tumor, sendo o mais proeminente deles o *p53*, não reside somente no controle que as proteínas transcritas a partir destes, exercem no ciclo celular. Essas proteínas são sinalizadoras e mediadoras químicas de uma das principais vias de supressão proliferativa de células anômalas, a apoptose (Gabrielli *et al.*, 2012; Garraway; Lander, 2013; Vance *et al.*, 2005).

1.4. Apoptose: a morte celular programada

Kerr, Wyllie e Currie (1972) foram os pioneiros no emprego do termo apoptose para descrever um tipo bem distinto de morte celular. Nos dias atuais, sabe-se que a apoptose é um processo de eliminação celular geneticamente determinado, que visa manter o controle e a homeostase tecidual a fim de, por exemplo, ser mantida sob controle, a população celular basal do mesmo bem como sejam eliminadas as células mais envelhecidas, para que a integridade e funcionalidade do determinado tecido sejam mantidas. A apoptose pode ser considerada como um mecanismo de proteção do organismo frente a processos imunológicos, infecciosos ou contra agentes nocivos (Grivicich *et al.*, 2007).

Embora a apoptose seja geneticamente predefinida, há uma série de estímulos e condições que podem disparar vias sinalizadoras apoptóticas, a exemplo tem-se a radiação UV e agentes alquilantes que, ao provocar danos ao DNA, podem induzir a apoptose via *p53*. Já alguns hormônios, como os corticosteroides, podem induzir apoptose por sinalização direta, isto é, independente da ativação de genes supressores de tumor (Fulda; Debatin, 2006).

1.4.1. Apoptose versus necrose

A necrose é uma via de indução de morte celular alternativa à apoptose, considerada um processo não controlado, citotóxico e passivo, isto é, sua ocorrência independe de energia, e é um evento que afeta grandes áreas teciduais, diferentemente da apoptose, que acomete células de forma pontual e controlada, via cascatas de sinalização. Os processos normais de indução de necrose são mediados basicamente por dois mecanismos, via interferência no suprimento de energia da célula ou dano direto à membrana celular (Chaabane *et al.*, 2013).

São características morfológicas da necrose a turgidez celular, a formação de vacúolos e êmbolos citoplasmáticos, distensão do retículo endoplasmático, condensação ou ruptura da mitocôndria, desagregação dos ribossomos, lise da membrana de organelas e ruptura de lisossomos. Tais características, quando somadas, promovem extravasamento do conteúdo celular para o fluido intersticial, o que representa um fator quimiotático suficientemente capaz de desencadear processos inflamatórios, tipicamente associados aos eventos necróticos (Savill; Fadok, 2000).

Já o processo apoptótico tem por característica não desencadear respostas inflamatórias no tecido correspondente, consistindo então em um fenômeno “limpo”, que agride minimamente a população celular vicinal. Quando determinada célula entra em apoptose, processo ativo e assim, dependente de energia, há formação dos chamados corpos apoptóticos, os quais possuem em sua membrana, uma série de fatores de reconhecimento para fagocitose como a fosfatidilserina e, dessa forma, uma determinada célula que entrou em apoptose, é rapidamente fagocitada por macrófagos ou por células vizinhas, o que reduz muito o risco de possíveis inflamações *in loco*.

A Tabela 1 apresenta as principais diferenças e características dos processos necróticos e apoptóticos (Gonzalez *et al.*, 2009).

Tabela 1: Principais alterações morfológicas presentes nos processos de apoptose e necrose (Elmore, 2007).

Apoptose	Necrose
- Acomete uma célula ou pequeno número de células	- Acomete células vicinais
- Redução do tamanho celular por agregação	- Turgidez (inchaço) celular
- Piquinose (condensação do conteúdo nuclear)	- Eventualmente pode haver piquinose
- Cariorrexe (fragmentação do conteúdo nuclear)	- Cariolise (destruição do conteúdo nuclear)*
- Preservação da membrana celular	- Degradação da membrana celular
- Retenção do citoplasma em corpos apoptóticos	- Extravasamento do citoplasma
- Ausência de inflamação	- Associada a processos inflamatórios

* Em alguns casos pode também ser observada a fragmentação do conteúdo nuclear (cariorrexe).

Células que entram em apoptose possuem como característica bem expressiva a formação de núcleos piquinóticos. A fragmentação do conteúdo nuclear pode ser observada quando na formação dos corpos apoptóticos, onde alguns apresentam fragmentos nucleares e outros não. Durante o processo de apoptose é observada a preservação de organelas no interior dos corpos apoptóticos, os quais, ao serem fagocitados, são digeridos e degradados em fagolisossomos. Esses eventos são frequentemente observados nos folículos linfoides, local de maior concentração de macrófagos responsáveis por essas degradações (Savill; Fadok, 2000).

A sinalização de apoptose pode ser disparada por mecanismos independentes, porém inter-relacionados, podendo ocorrer basicamente por duas vias, denominadas extrínseca e intrínseca. A diferença entre essas duas vias está relacionada com o fator desencadeante de cada uma delas, a serem abordados na sequência (Grivicich *et al.*, 2007).

1.4.2. Vias bioquímicas e aspectos moleculares de indução de apoptose

Como citado anteriormente, o processo de apoptose revela-se uma complexa e sofisticada estratégia de controle de crescimento, funcionalidade e homeostase tecidual, sendo dependente de energia e fruto de uma série de eventos moleculares (Chen; Wang, 2002).

Embora duas vias sejam as principais responsáveis em desencadear a sinalização apoptótica, hoje são conhecidas quatro cascatas capazes de promover tal feito, a saber: via extrínseca (ou via receptor de morte celular), via intrínseca (também chamada de via mitocondrial), via da granzima B

e por fim, via da granzima A, sendo as duas primeiras, as vias extrínseca e intrínseca, as mais relevantes e representativas deste processo (Fulda; Debatin, 2006).

As vias extrínseca, intrínseca e a via da granzima B convergem em um mesmo evento celular: a fragmentação do DNA. Nessas três vias podem ser observadas algumas características e eventos semelhantes, no que tange a degradação do citoesqueleto e de certas proteínas nucleares, o *cross-linking* de proteínas citoplasmáticas, a formação de corpos apoptóticos, a expressão de ligantes para receptores de células fagocíticas (como a fosfatidilserina), com posterior exposição desses ligantes no exterior dos corpos apoptóticos e, por fim, o reconhecimento e captura destes corpos pelas células fagocitárias (Elmore, 2007).

A via da granzima A ativa a cascata de apoptose de maneira distinta, por meio de eventos caspase-independentes, que clivam complexos proteicos mitocondriais envolvidos na oxidação de NADH, gerando ânions superoxidantes que provocam danos à mitocôndria e ao DNA, levando consequentemente à morte celular, sem a necessidade de cisteíno-proteases, como as caspases, mediando os eventos de sinalização (Martinvalet *et al.*, 2005; 2008).

Dado a relevância das vias intrínseca e extrínseca de modulação da apoptose, dar-se-á maior atenção aos aspectos moleculares envolvidos nestas duas rotas caspase-dependentes de sinalização apoptótica.

A Figura 4, adaptada de Elmore (2007), Cain *et al.* (2002) e McIlwain *et al.* (2013) compila os principais mediadores e as cascatas de sinalização das vias extrínseca e intrínseca, fazendo correlação entre ambas.

Figura 4: Via extrínseca e intrínseca de indução de apoptose (Elmore, 2007; Cain *et al.*, 2002; McIlwain *et al.*, 2013).

Caspases são enzimas proteolíticas que em seu sítio catalítico possuem um aminoácido cisteína, responsável por clivar as ligações peptídicas após resíduos de ácido aspártico. O termo “caspase” deriva justamente dessa função característica (caspase = cisteína-ácido aspártico-proteases), e sua importância no sistema biológico está, não somente no controle de morte celular, mas também na modulação de processos imunológicos e inflamatórios (McIlwain *et al.*, 2013).

Em geral as caspases são amplamente expressas sob a forma monomérica inativa, sendo denominadas procaspases. Para que haja sua ativação, estas devem sofrer dimerização e posterior clivagem. Estando em sua conformação ativa, uma caspase é capaz de clivar outros dímeros de procaspases subsequentes, dando início à cascata de eventos que resultarão em apoptose ou na ativação de citocinas pró-inflamatórias, dependendo da célula e/ou tecido onde está ocorrendo esse processo. As caspases envolvidas em processos apoptóticos são divididas em duas famílias, de acordo com suas especificidades frente a diferentes substratos, bem como à resposta gerada por sua sinalização, sendo então classificadas como: caspases iniciadoras (caspase 2, 8, 9 e 10) e caspases efectoras (caspase 3, 6 e 7). As caspases envolvidas em processos inflamatórios são denominadas como caspase 1, 4 e 5 (Fulda; Debatin, 2006).

Na apoptose, as caspases iniciadoras são responsáveis por clivar os dímeros de caspases efetoras, tornando-os ativos e que por sua vez, são os principais responsáveis por destruir todo o arcabouço proteico celular. Inicialmente as caspases 8 e 9, principais proteases iniciadoras, tornam-se ativas somente por dimerização dos monômeros (denominado procaspases), sem a necessidade de clivagem posterior. Dessa forma, o simples aumento na expressão destes monômeros enzimáticos favorece a dimerização dos mesmos. A necessidade de clivagem, pelas caspases iniciadoras, para a ativação dos dímeros de caspases efetoras, consiste em um mecanismo que previne a catálise indevida das estruturas citossólicas. Ao serem clivadas, as caspases 3, 6 e 7 (efetoras) sofrem alteração de conformação, sendo convertidas em estruturas com alto potencial de clivagem proteica, capazes de se autoclivar e também de ativar outras caspases efetoras, resultando em um rápido processo de ativação autônoma (*feedback* positivo) e também de catálise de diferentes substratos. Estas enzimas, uma vez ativas, provocam de forma irreversível a morte celular (Elmore, 2007; Fulda; Debatin, 2006; McIlwain *et al.*, 2013).

1.4.2.1. Via extrínseca de indução de apoptose

A apoptose pela via extrínseca é disparada através de ligantes que interagem com receptores de morte. Como representantes desses receptores de morte pode ser citada a família de receptores associados ao fator de necrose tumoral (TNFR), e como exemplos desses receptores, tem-se o receptor TNFR1, receptor Fas (também chamado de receptor de antígeno de apoptose-1, o APO-1, ou ainda CD95) e por fim, o receptor de morte-3 (DR3). Cada um desses receptores possui o seu ligante específico, que são respectivamente o TNF, o ligante Fas/CD95 (Fas-L/CD95-L) e o ligante TNF-like 1A (TL1A) (Grivicich *et al.*, 2007; Kaufmann; Earnshaw, 2000).

Ao se ligarem em seus receptores, os ligantes indutores da apoptose promovem o recrutamento de procaspases 8 (monômeros iniciadores inativos). Esse recrutamento ocorre com o auxílio de proteínas adaptadoras, como a FADD (*Fas-associated death domain protein*), principal proteína envolvida nesse processo, presentes no domínio intracelular do receptor. A demanda de

procaspases 8 leva a dimerização das mesmas. Esses dímeros, agora ativos (caspase 8), iniciam a clivagem das procaspases efetoras (3, 6 e 7), que estando ativas, clivam as estruturas celulares e promovem a apoptose (Samraj *et al.*, 2006). Sabe-se que a ativação da via extrínseca também pode desencadear ativação da via apoptótica intrínseca, esse fenômeno acontece devido à ação da caspase 8 sobre proteínas proapoptóticas (nesse caso a proteína Bid), presentes na sinalização da via mitocondrial de sinalização de morte, apresentada a seguir (McIlwain *et al.*, 2013).

1.4.2.2. Via intrínseca, ou mitocondrial, de indução de apoptose

Essa cascata de eventos é comumente denominada de via mitocondrial pelo fato de que diversos fatores envolvidos na mesma estarem relacionados à mitocôndria. Esse processo é capaz de ser desencadeado por uma gama de estresses celulares como, por exemplo, depleção de fatores de crescimento, comprometimento do citoesqueleto, danos ao DNA, acúmulo de proteínas disfuncionais, hipóxia, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outros (Zhao *et al.*, 2013).

A via intrínseca inicia-se normalmente com estímulos extracelulares (não relacionados a receptores específicos), que afetam de forma positiva ou negativa a homeostase celular. Estímulos negativos estão relacionados com a ausência de hormônios e fatores de crescimento, que podem provocar falha no mecanismo normal de supressão da sinalização apoptótica e dessa forma induzir a morte celular; nesse caso há falha na inibição do estímulo de morte, o que leva a ocorrência dessa sinalização. Radiação, toxinas e hipóxia são estímulos positivos, que induzem a apoptose ao invés de afetar seu sistema de inibição, como observado nos estímulos negativos (Elmore, 2007).

Todos esses estímulos causam alterações no interior da mitocôndria, dentre eles a perda de potencial transmembrânico, que gera aumento da permeabilidade pela membrana da mesma. Este fato possibilita a liberação, para o citossol, do principal complexo proteico proapoptótico presente nessa via, o citocromo *c*. Ao se ligar a uma proteína adaptadora, denominada Apaf-1, que está presente somente no citossol, o citocromo *c* sofre alteração de sua conformação, bem como a Apaf-

1, tornando este complexo ativo e capaz de dimerizar monômeros de procaspase 9. Após a conversão dos monômeros em dímeros ativos (caspase 9), forma-se a principal caspase iniciadora presente na via mitocondrial. A tríade constituída por citocromo *c*, Apaf-1 e procaspase 9 é denominada como apoptossomo. Este complexo é essencial para a ativação de caspase 9, e mostra-se presente na célula somente quando esta, invariavelmente, está fadada à morte. Uma vez ativa, a caspase 9 irá clivar as procaspases efetoras (3, 6 e 7) e o processo a partir deste ponto, segue a mesma cascata de eventos observada na via extrínseca (Cain *et al.*, 2002).

O controle de indução apoptótica pela via mitocondrial ocorre principalmente por uma família de proteínas chamada Bcl-2. Essas proteínas modulam a permeabilidade da membrana mitocondrial, principalmente no que se refere à liberação de citocromo *c* ao citossol e, portanto, compreendem estruturas homólogas pró e antiapoptóticas. Dentre as proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, as mais representativas são a própria Bcl-2, a Bcl-XL e a Bcl-w, cujas funções basicamente estão relacionadas à redução da permeabilidade da membrana, o que impede o efluxo de citocromo *c* ao citoplasma. Já as representantes proapoptóticas desta família, que merecem destaque, incluem a proteína Bid, Bax e Bak, as quais possuem a capacidade de determinar o destino da célula sentido apoptose ou não, visto que, quando ativas, elevam a já citada, permeabilidade da membrana mitocondrial, viabilizando assim a saída do citocromo *c* (Rahman, 2012).

O conhecimento das bases fisiopatológicas acerca do câncer, torna possível a identificação de alvos potenciais para abordagens terapêuticas. A promoção da apoptose revela-se como uma importante estratégia para a eliminação de células cujo controle fisiológico de morte foi comprometido, e assim, diversos alvos foram e são utilizados, como base para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas (Fesik, 2005).

Podem ser citados como exemplos bem sucedidos no tratamento farmacológico do câncer, baseados na indução da apoptose, os agentes alquilantes (ex: ciclofosfamida), os antimetabólitos

(ex: gencitabina), hormônios (ex: fenretinida), antagonistas hormonais (ex: tamoxifeno), inibidores de síntese do citoesqueleto (ex: paclitaxel), inibidores de quinases dependentes de ciclinas (ex: flavopiridol), e mais recentemente, os inibidores de Bcl-2 (ex: oblimersen). Todos esses agentes farmacológicos baseiam-se no fato de, por mecanismos distintos, provocarem deturpações na maquinaria celular normal, e induzirem assim a apoptose, seja via comprometimento da estrutura da célula, via danos ao DNA, danos ao ciclo celular ou por depleção de fatores inibidores da cascata apoptótica. Essas abordagens terapêuticas são frutos de incontáveis pesquisas e anos de evolução no tratamento de pacientes oncológicos (Fesik, 2005; Fulda; Debatin, 2006; Kaufmann; Earnshaw, 2000; Meiler; Schuler, 2006).

1.5. A terapia farmacológica do câncer: histórico e aspectos contemporâneos

A quimioterapia começou a ser estudada como estratégia para o tratamento do câncer no início dos anos 1900, através de triagens conduzidas pelo químico alemão Paul Ehrlich, que objetivavam reduzir o número de substâncias que poderiam suprimir tumores transplantados em roedores, para que fossem conhecidos, mesmo com as limitações da época, agentes com menor potencial tóxico e maior capacidade de supressão de tumores. Os estudos de Ehrlich basicamente giravam em torno de anilinas, derivados arsênicos e estruturas primórdias aos, hoje conhecidos, agentes alquilantes (Papac, 2001).

O grande desafio dos pesquisadores no início do século 20 era propor modelos confiáveis e representativos, que fossem capazes de mensurar a eficácia de compostos ensaiados frente a diferentes linhagens tumorais. Evoluções significativas começaram a surgir em 1937, quando foi criado, nos Estados Unidos, o Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute* – NCI), e na década posterior, 1940, onde os trabalhos resultaram na inserção das mostardas nitrogenadas para o tratamento de linfomas, e de hormônios, primeiramente o estrógeno, para o tratamento de determinadas neoplasias associadas às gônadas. Entretanto, somente através de quatro programas de pesquisa, lançados durante o período da segunda guerra mundial, é que foram obtidas as evoluções

mais contundentes na descoberta de fármacos com maior efetividade no tratamento oncológico, o que culminou, em 1955, na criação do Centro Nacional de Serviços em Quimioterapia do Câncer, o primeiro núcleo mundial especializado no tratamento de pacientes acometidos por neoplasias malignas. Mais tarde, com o advento das pesquisas aplicadas, e de evoluções no ramo da biologia molecular e da biotecnologia, surgiram a fluorouracila no final dos anos 1950, os alcalóides da Vinca (nos anos 1960) e, posteriormente, na década de 1990, surgiram os anticorpos monoclonais, como o trastuzumabe. A Figura 5 mostra a linha cronológica de inserção dos principais fármacos para o tratamento do câncer, até hoje utilizados (Ali *et al.*, 2012; deVita; Chu, 2008).

Figura 5: Linha cronológica de inovações terapêuticas no tratamento do câncer (Ali *et al.*, 2012; DeVita; Chu, 2008).

Embora a quimioterapia ainda não seja curativa para muitos tipos de cânceres, esta mostra sua relevância no que tange a sobrevida do paciente, bem como no processo de regressão do quadro oncológico (McClellan *et al.*, 2011).

Os quimioterápicos antitumorais, de forma geral, atuam promovendo supressão do crescimento celular e atualmente são divididos em dois grupos, a saber: os quimioterápicos ciclo-celular específicos e os ciclo-celular não específicos. A principal característica dos fármacos ciclo-celular específicos está em atuar nas células cancerígenas que estão em processo de divisão. Em contrapartida, os ciclo-celular inespecíficos atuam em células que estão tanto em processo de divisão quanto em latência, ou seja, em fase G₀. São exemplos de classes terapêuticas que compõem o grupo ciclo-celular específico os antimetabólitos, como a fluorouracila e o metotrexato, e também os agentes antimitóticos, como o paclitaxel e a vimblastina. Os primeiros atuam na fase S,

constituente da intérfase do ciclo celular (vide Figura 2), atuam mais precisamente inibindo a replicação do DNA nas células tumorais. Já os agentes antimitóticos inibem a síntese de microtúbulos ou a degradação destes, quando já formados. Esses agentes exercem sua ação em células que se encontram na fase M (mitose), comprometendo então o processo de formação dos fusos mitóticos, essenciais para a divisão das cromátides em células que se encontram nessa fase (Hanahan; Weinberg, 2011; Harvey, 2008).

Como representantes de quimioterápicos ciclo-celular não específicos podem ser citados os agentes alquilantes, como as beta-haloalquilaminas, e também os antibióticos antitumorais, como a doxorrubicina. Independentemente do mecanismo de ação, esses fármacos atuam diretamente sobre a estrutura do DNA, não importando a fase em que a célula se encontra, seja repouso ou proliferação, comprometendo assim todas as vias metabólicas e de síntese proteica, atuando por alquilação da dupla fita nucleotídica, no caso das mostardas, ou por intercalação entre as bases nitrogenadas da dupla hélice de DNA, o que é observado no mecanismo de ação dos antibióticos ao nível molecular (Lemke *et al.*, 2012).

O surgimento dos antibióticos antitumorais, como a doxorrubicina, do paclitaxel e dos alcaloides da vinca, mostra o potencial dos produtos naturais em compor e aumentar o arsenal terapêutico de tratamento e cura de neoplasias malignas. Dentre as matrizes naturais que podem prover moléculas interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais estão as diferentes espécies de pimenteiros, junto aos seus produtos de metabolismo, como a capsaicina e seus derivados capsaicinóides (Gordaliza, 2007; Lin *et al.*, 2013).

1.6. Capsaicina: aspectos gerais e seu potencial na terapia antineoplásica

A capsaicina (Figura 6), ou *N*-vanilil-8-metil-1-nonenamida é um metabólito secundário natural, biossintetizado por plantas pertencentes à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum*. É um produto oriundo da condensação de ácidos graxos com a vanililamina e pode ser isolada principalmente a partir dos frutos dessas espécies (Hayman; Kam, 2008; Thiele *et al.*, 2008). Os

capsaicinóides são os principais responsáveis pela sensação pungente sentida na degustação de pimentas, apresentam característica atividade irritante às mucosas de mamíferos e possuem a capacidade de gerar termogênese em qualquer tecido ao qual entrem em contato (Carvalho; Wiest; Cruz, 2010). Esses compostos têm sido há muito tempo estudados, dado as diversas propriedades benéficas que podem trazer ao organismo humano (Carr *et al.*, 2006; Oyagbemi *et al.*, 2010).

Figura 6: Fórmula estrutural da capsaicina.

Dentre as diversas propriedades já conhecidas, a capsaicina possui atividade anti-inflamatória (Luo *et al.*, 2011), atividade imunossupressora (Lee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Sancho *et al.*, 2002), além de gerar gastroproteção (Luo *et al.*, 2011; Mózsik *et al.*, 2007; Peng; Li, 2010; Satyanarayana, 2006; Szolcsányi; Barthó, 2001). Estudos realizados por Gram *et al.* (2007) revelam o potencial da capsaicina como possível agente para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (Akiba *et al.*, 2004; Moesgaard *et al.*, 2005; Shu; Mendell, 2001; Van de Wall *et al.*, 2005).

A capsaicina apresenta também atividade antioxidante, a qual segundo estudos de Ochi *et al.* (2003) e Antonious *et al.* (2006), revela o alto potencial cardioprotetor que uma dieta rica em pimentas pode trazer ao indivíduo. Esse potencial de cardioproteção é atribuído à capacidade da capsaicina em neutralizar radicais livres, os principais responsáveis por promover a oxidação do LDL colesterol, que uma vez oxidados, podem causar danos à parede das artérias, desencadear processos inflamatórios e corroborar a redução da luz arterial, eventos estes que aumentam exponencialmente o risco de infarto do miocárdio (Rosa *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2010; Peng; Li, 2010; Ramirez-Romero *et al.*, 2000).

Estudos recentes indicam que os capsaicinóides podem apresentar atividade farmacológica frente ao combate da obesidade (Luo *et al.*, 2011; Vermaak *et al.*, 2011), promovendo termogênese, e assim, gasto de energia através da formação de calor, acelerando o metabolismo basal e alterando

o catabolismo de lipídeos. Corroborando este fato, Hsu e Yen (2007) observaram que a capsaicina inibe a adipogênese e induz a apoptose de adipócitos (Joo *et al.*, 2010; Kawabata *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Leung, 2008; Reinbach *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2010). A capsaicina também possui a capacidade de promover analgesia (Basbaum *et al.*, 2009). Ao estimular receptores capsaicinóides, chamados Receptores Vanilóides de Potencial Transitório subtipo 1 (TRPV1), a capsaicina promove depleção de substância P (Caterina *et al.*, 1997; Caterina; Julius, 2001), o que desencadeia uma série de eventos intracelulares que resultam na hiperpolarização nociceptiva e consequente interrupção da transmissão do estímulo nervoso (Anand, 2003; Conway, 2008; Finnerup *et al.*, 2010; Grégio *et al.*, 2008; Hayman; Kam, 2008; Lysy *et al.*, 2003; Szallasi *et al.*, 2007; Tominaga; Julius, 2000).

Os capsaicinóides, em destaque a capsaicina, tem atraído bastante a atenção da comunidade científica, dado seu potencial de prevenir e combater o câncer (Okano *et al.*, 2011; Pan; Ho, 2008; Surh; Lee, 1996). Diversos estudos *in vitro* e também *in vivo* têm demonstrado de maneira consistente que a capsaicina pode prevenir processos carcinogênicos em diferentes linhagens celulares (Surh, 2002a; Surh, 2002b; Thoenissen *et al.*, 2010).

Estudos realizados por Polnaszek (2010) revelaram que a administração de capsaicina induziu a apoptose de células tumorais de tecido urotelial (bexiga). Lee *et al.* (2004) relatou que a indução de morte celular gerada pelos capsaicinóides é causada por despolarização mitocondrial e mais tarde, Yang *et al.* (2009) complementou este fato, propondo que a formação de ROS seria o evento bioquímico responsável por provocar o estresse oxidativo celular, o que corrobora ao colapso total de sua viabilidade e consequente sinalização de mecanismo apoptótico pela via intrínseca, abordada no item 1.4.2.2 do presente trabalho (Sánchez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). Outros estudos apontam que a indução de apoptose promovida pela capsaicina seja causada por danos oxidativos diretos ao DNA, danos estes conferidos pelas anteriormente citadas, espécies reativas de oxigênio (Carragher, 2006; Kim; Moon, 2004; Oikawa *et al.*, 2006; Porter; Jänicke, 1999; Saez *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2001).

Galati e O'Brien (2003) evidenciaram que a capsaicina é útil no tratamento de neoplasias hepáticas e relataram sua atividade citoprotetora para células íntegras, isto é não tumorais. Em complementação a isso, Kim *et al.* (2005) e Lee *et al.* (2009) propuseram que, em células oriundas de hepatoma humano (HepG2), o mecanismo de indução apoptótica da capsaicina esteja ligado à elevação intracelular de íons Ca^{2+} , e atribuíram esse fenômeno à ativação da enzima calpaína, uma protease Ca^{2+} dependente, de ação homóloga às caspases, ou seja, esta cliva o citoesqueleto celular e compromete o funcionamento da maquinaria celular.

Jung *et al.* (2001) relatou que o processo de morte celular induzida pela capsaicina envolve caspase 3, que conforme citado anteriormente, é uma das principais proteases efetoras, envolvida na cascata bioquímica da apoptose, sendo esta ativada pela via intrínseca, tendo sido observada a superexpressão de Bax, uma proteína proapoptótica que complexa com a proteína Bid, gerando aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e assim liberação de citocromo *c*. Junto a estas observações, Gosh e Basu (2010) observaram que, além da superexpressão de proteínas proapoptóticas, culturas tratadas com capsaicina causam também depleção de Bcl-2, a principal proteína antiapoptótica responsável por manter a integridade da membrana mitocondrial, porém observaram que a ativação apoptótica ocorreu através da via extrínseca, ou seja, por sinalização via receptor de morte, neste caso o receptor Fas, cuja estrutura proteica apresenta elevada homologia com os receptores vanilóides do tipo TRPV (Gosh; Basu, 2010, Jun *et al.*, 2007).

Diversos estudos abordam o potencial quimiopreventivo dos capsaicinóides em relação à profilaxia do câncer, Anandakumar *et al.* (2009) relatou que a capsaicina foi capaz de prevenir processos carcinogênicos gerados em células pulmonares expostas ao benzopireno, substância presente no tabaco, inibindo o crescimento de células tumorais em modelos *in vivo*. Kang *et al.* (2003) complementado por Tuoya *et al.* (2006) relatou que a capsaicina promoveu em seus estudos indução seletiva de apoptose, somente em células neoplásicas, estas provenientes de tecido mamário. Esses estudos foram conduzidos nas linhagens MCF-7 (linhagem de tecido mamário tumoral) e H-has MCF-10A (linhagem mamária sadia).

Estudos *in vivo* mostraram que os capsaicinóides foram capazes de prevenir a teratogenicidade conferida pelo etanol quando administrado a ratas em período gestacional (Kim *et al.*, 2008). Em concordância a este fato, Malagarie-Cazenave *et al.* (2011) considerou a capsaicina e seus análogos, importantes componentes que podem ser usados nas estratégias de prevenção, tratamento e combate de neoplasias gástricas e prostáticas, fato ressaltado também por Sánchez *et al.* (2005), Chow *et al.* (2007) e Venier *et al.* (2009, 2010).

É conhecido que a capsaicina e seus análogos exercem atividade antitumoral frente a células neoplásicas pancreáticas, sobre células leucêmicas, células da região colorretal e por fim, é descrita também sua atividade supressora sobre gliomas e glioblastomas (Gil; Kang, 2008; Han *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2003; 2008).

Como pode ser observado, diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram conduzidos ao longo dos últimos anos a fim de elucidar o mecanismo de indução apoptótica promovido pela capsaicina, porém, a via de indução ainda não está totalmente elucidada, e o mecanismo envolvido na atividade antitumoral dos capsaicinóides ainda mostra-se divergente na literatura. Ziglioli *et al.* (2009) sugeriu que o mecanismo de indução apoptótica relativo às estruturas vanilóides, como a capsaicina, ocorra pelas duas vias principais de modulação da apoptose, ou seja, propôs que os capsaicinóides atuam tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca. Conforme ilustrado na Figura 4. Ambas as vias resultam na mesma sinalização, ou cascata, de apoptose celular, estando portanto, inter-relacionadas quanto à ativação das caspases efetoras. Maity *et al.* (2010) e Gosh e Basu (2010) endossaram essa hipótese ao observarem que a via extrínseca está relacionada a receptores TRPV1. Como exemplo tem-se o próprio Fas, cuja estrutura proteica é associada a receptores do tipo vanilóide (os TRPVs), que ao interagirem com a capsaicina, podem promover o influxo de íons Ca^{2+} ao citossol, que por sua vez dispara mecanismos inerentes às sinalizações que culminam na apoptose por via extrínseca. Esse evento pode também ativar a cascata relativa à via apoptótica intrínseca, caso haja clivagem da proteína Bid que, ao ser convertida em sua forma truncada (tBid) é capaz de se oligomerizar com a proteína Bax. Esse oligodímero tBid-Bax ao se

ligar à membrana mitocondrial aumenta a permeabilidade da mesma, promovendo então o efluxo de citocromo *c* (Grinberg *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2011).

Ainda que não seja totalmente elucidado o mecanismo de indução de apoptose acerca dos capsaicinóides, estes apresentam atividade antitumoral interessante e amplamente descrita na literatura. Portanto a capsaicina mostra-se um protótipo potencial ao desenvolvimento de novas moléculas que, sendo racionalmente planejadas a partir da estrutura capsaicinóide, possam obter seletividade e potência superiores as do protótipo, e que ainda apresentem menor número de efeitos adversos se comparados aos apresentados pela capsaicina, como sua ação pungente e sua baixa estabilidade físico-química (Thoennissen *et al.*, 2010).

1.7. Planejamento racional de fármacos

A descoberta de novas moléculas com potencial de se tornarem fármacos pode ocorrer através de quatro formas distintas, são elas: o acaso, fontes naturais, fontes sintéticas e virtuais, também chamadas de *in silico* (Drews, 2000).

O acaso pode ser exemplificado com a clássica descoberta da penicilina G em 1929 por Alexander Fleming (Fleming, 1929), que ao observar uma placa de *Staphylococcus aureus* contaminada com fungos do gênero *Penicillium*, constatou a presença de halo inibitório no entorno deste. Este fato levou Fleming a considerar presente naquele meio de cultura, alguma substância capaz de inibir o crescimento de *S.aureus* no entorno do fungo, substância esta que mais tarde viria a se tornar o primeiro antibiótico beta-lactâmico utilizado na terapêutica (Kardos; Demain, 2011).

A obtenção de moléculas bioativas por fontes naturais pode ser relacionada à determinação da morfina, alcaloide isolado e descoberto a partir do óleo-resina bruto da papoula em 1805 pelo farmacêutico alemão Friedrich Sertüner (Jordan; Devi, 1998). Esse hipnoanalgésico foi e é até os dias atuais, amplamente empregado no tratamento da dor e sedação, além de ter servido de protótipo para o desenvolvimento de vários fármacos introduzidos na clínica posteriormente (Duarte, 2005).

Como exemplo de obtenção de fármacos por fontes sintéticas, pode ser citado o ácido acetilsalicílico. Essa molécula foi sintetizada pela primeira vez por Félix Hoffmann em 1897, a partir do ácido salicílico em reação com anidrido acético. O resultado dessa reação gerou uma molécula não existente na natureza, cujas propriedades e efeitos no organismo são estudados até os dias atuais. Como efeitos farmacológicos bem estabelecidos, o ácido acetilsalicílico de Hoffmann possui atividade anti-inflamatória, antipirética, analgésica e ação antiagregante plaquetária (Vane; Botting, 2003).

O planejamento de fármacos *in silico*, ou seja, a partir de métodos computacionais de análise e validação, tem sido cada vez mais utilizado pela comunidade científica, dado a capacidade de correlação entre variáveis que programas computacionais são capazes de realizar, para propor a afinidade de um possível ligante para com seu respectivo alvo. Como exemplo de fármaco, que obteve sua gênese com o auxílio de métodos de planejamento *in silico*, tem-se o vorinostate (Figura 7), primeiro inibidor de histona desacetilase (HDAC) inserido na terapêutica (Gullo *et al.*, 2006).

Figura 7: Obtenção do vorinostate a partir da trichostatina, de origem natural.

Destinado ao tratamento antineoplásico, o vorinostate provém de modificações moleculares racionais realizadas a partir de um composto natural, a trichostatina (Chin *et al.*, 2006; Marks; Breslow, 2007).

Como exemplificado pela trichostatina e o vorinostate, matrizes de obtenção de fármacos podem ser, em seu processo de exploração científica, auxiliadas por técnicas e abordagens racionais de desenvolvimento de novas moléculas bioativas, gerando assim moléculas com atividade biológica superior (Barreiro; Fraga, 2005; 2008).

Essas abordagens racionais podem ser desenvolvidas através de estudos de complementaridade entre o ligante planejado e a estrutura de seu alvo, quando esta é conhecida. Esta técnica, denominada SBDD (acrônimo de *Structure-based drug desing*) utiliza princípios de complementaridades eletrostáticas, estéricas, hidrofílicas e hidrofóbicas entre a molécula planejada e a estrutura relativa ao alvo de interesse, sendo caracterizado como uma abordagem de planejamento racional baseada na estrutura da biomacromolécula (Amzel, 1998; Erlanson; McDowell; O'Brien, 2004).

Quando não se conhece a estrutura do alvo de ligação de determinado ligante, o planejamento racional de novas moléculas bioativas pode ser norteado pelos ligantes já existentes, visando com isso, otimizar sua ação, tornar a nova molécula menos tóxica, e/ou mais seletiva (Moro *et al.*, 2005). Esse tipo de planejamento, chamado de LBDD (acrônimo de *Ligand-based drug design*), baseia-se na estrutura da micromolécula, ou seja, na estrutura do ligante conhecido, que provoca ou suprime a ação biológica em questão. A partir deste, são planejadas modificações estratégicas na estrutura molecular bioativa, para que posteriormente sejam feitas as sínteses dessas moléculas modificadas, estas consideradas análogas ao protótipo. Essas modificações são realizadas valendo-se de similaridades físico-químicas entre análogo e protótipo, buscando a melhoria de interação *in loco* da molécula análoga, em relação a sua antecessora (Hajduk, 2006; Moro *et al.*, 2005).

Através dessas estratégias de modificação molecular empregadas, propriedades físico-químicas podem ser moduladas nas estruturas planejadas (Biot *et al.*, 2004). Lipinski *et al.* (2001) elencou, após um minucioso levantamento bibliográfico, as principais características que compostos bioativos administrados por via oral apresentavam, observando que quatro propriedades se mantinham dentro de limites específicos em cerca de 90% dos fármacos inseridos na terapêutica. Denominada como “Regra dos Cinco” de Lipinski, essa abordagem de planejamento racional prevê, para as moléculas planejadas, valores específicos de peso molecular, que deve ser menor ou igual a 500 Da, de sítios doadores de ligação de hidrogênio (HBD), que devem ser menores ou iguais a 5, de sítios aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), que devem ser menores ou iguais a 10, e por

fim estabelece valores limites para a lipofilicidade da molécula, limitando o LogP da mesma a valores menores ou iguais a 5.

Com essa abordagem Lipinski (2004) enaltece a característica *drug-like* que será intrínseca às novas moléculas, isto é, propriedades e características presentes na maioria dos fármacos administrados via oral (Lipinski *et al.*, 2001; Lipinski, 2004).

Diversas são as estratégias de modificação molecular que podem ser utilizadas no exercício do planejamento de novos compostos bioativos. Dentre as mais promissoras e empregadas na química medicinal contemporânea, podem ser citadas o bioisosterismo, a inserção de grupos volumosos e a homologia (Lima; Barreiro, 2005; Résimont; Liégeois, 2010).

Bioisósteros podem ser definidos como átomos, ou determinado grupo destes, que apresentam características eletrônicas e/ou físico-químicas semelhantes, podendo assim, apresentar bioatividade similar ou equivalente. Com a substituição de determinado átomo ou grupo químico de uma molécula por bioisósteros, é possível que ocorram alterações benéficas de parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos no análogo correspondente (Barreiro; Fraga, 2008). Bioisósteros podem ser subdivididos em duas categorias: clássicos e não clássicos. Átomos ou grupos funcionais que possuem mesma valência, e anéis equivalentes, são denominados bioisósteros clássicos. Bioisósteros que não se encaixam no grupo anterior são classificados como bioisósteros não clássicos. A Figura 8 apresenta a sulfanilamida, fármaco bioisótero não clássico de função orgânica do ácido *para*-aminobenzóico (PABA). Exemplo de bioisosterismo clássico de equivalência anelar, presente na natureza, é o apresentado pelos aminoácidos tirosina e histidina. Bioisósteros clássicos de mesma valência, presentes na natureza, podem ser exemplificados pelos aminoácidos cisteína e serina, onde o grupo sulfidríla do primeiro é substituído por hidroxila no segundo (Figura 8). Bioisósteros estrategicamente planejados e sintetizados podem apresentar maior estabilidade físico-química ou metabólica se comparados aos seus protótipos (Devereux; Popelier, 2010; Lima; Barreiro, 2005).

Figura 8: Exemplos de bioisosterismo clássico e não clássico (Lima; Barreiro, 2005).

A inserção de grupos volumosos em uma estrutura pode conferir diversas propriedades biológicas à molécula planejada. Como exemplo de efeitos que podem ser obtidos por introdução de grupos volumosos em moléculas bioativas está a resistência a ataques enzimáticos, que pode ser observado pelas penicilinas resistentes a ação das beta-lactamases (por exemplo a metecilina). A geração de antagonistas a partir de agonistas é outro exemplo de efeito obtido na inserção de grupos volumosos em uma estrutura, que pode ser exemplificado pelo pronetalol, planejado a partir da estrutura da epinefrina e que mais tarde originou o propranolol. Outro benefício que pode ser obtido com a introdução de grupos volumosos em uma estrutura, e que merece destaque, é a maior capacidade de interação da mesma com seu alvo biológico, isto porque a introdução destes grupos pode fazer com que a nova entidade química interaja com regiões não exploradas pela molécula protótipo, ou então, melhore o modo de interação em regiões já exploradas, o que pode ser exemplificado pelo enalaprilato (Figura 9), cujo grupo volumoso inserido em sua estrutura fez com que a nova molécula fosse capaz de interagir com um bolsão hidrofóbico da enzima conversora de angiotensina (ECA) não explorado pelo captopril, o que gerou redução em sua dosagem terapêutica (Patrick, 2008).

Figura 9: Otimização da estrutura do captopril até a obtenção do enalaprilato (Patrick, 2008).

Modificações planejadas por homologia consistem na alteração de uma ou mais unidades metilênicas (-CH₂-) na estrutura análoga, em relação a seu protótipo. Com estas alterações o composto final pode apresentar padrões físico-químicos de lipofilicidade diferentes do protótipo, sendo maior, caso haja aumento de unidades metilênicas na estrutura, também chamada de homologia superior, ou menor, se houver redução das mesmas, o que é chamado de homologia inferior (Huggins *et al.*, 2012). Além de lipofilicidade, a Figura 10 demonstra que o acréscimo ou decréscimo de unidades metilênicas altera as distâncias interatômicas da molécula análoga. Com isso, há modificação de padrões estéricos entre ambos, resultando em possíveis modificações em parâmetros farmacocinéticos e, principalmente, nos parâmetros farmacodinâmicos do análogo homólogo, o que pode alterar o modo de interação do mesmo no sítio de ação e assim melhorar sua afinidade no que diz respeito à formação do complexo ligante-alvo (Huggins *et al.*, 2012).

Figura 10: Representação esquemática da melhoria de interação obtida com o uso da estratégia homologia.

Em auxílio ao planejamento racional de fármacos por LBDD ou SBDD, podem ser usados métodos computacionais estatísticos, que correlacionam a estrutura dos análogos e suas respectivas atividades biológicas, obtidas normalmente por ensaios *in vitro*. Essa abordagem é chamada de relação estrutura-atividade, ou REA, termo oriundo do inglês *structure-activity relationship* (SAR) (Heim *et al.*, 2002). A correlação estabelecida entre a estrutura química e a atividade biológica pode ser quantitativa (QSAR – *Quantitative structure-activity relationship*), cuja vantagem é fornecer informações quanto à contribuição (positiva ou negativa) de cada substituinte em uma série de análogos, para a atividade biológica da molécula (Hansch *et al.*, 1995). Com esse tipo de análise é possível planejar análogos de maneira mais focada e objetiva, visto que a análise de QSAR norteará sobre quais propriedades físico-químicas, contribuirão positivamente para a atividade biológica, elevando as expectativas de sucesso na pesquisa de novas entidades químicas promissoras (So; Karplus, 1996; Zhao *et al.*, 2001).

Diversas são as técnicas de QSAR empregadas atualmente, dentre as utilizadas estão o QSAR clássico (2D) e o HQSAR (*Hologram quantitative structure-activity relationship*), que viabilizam o planejamento de novos compostos, mesmo quando não é conhecida a estrutura tridimensional do alvo de atuação dos mesmos. Técnicas de QSAR-2D se valem de cálculos de descritores e correlação destes com a disposição espacial dos análogos e do protótipo (que devem estar alinhados). Já o HQSAR correlaciona as atividades biológicas de cada análogo em relação às diversas características comuns entre todas as moléculas de determinada série, com isso, o HQSAR fornece informações quanto a quais grupos ou padrões químicos contribuem mais ou menos para a atividade biológica da molécula (Waller, 2004). Dentre esses fatores podem ser citados o comprimento da cadeia carbônica, distâncias interatômicas, grupos polares, regiões lipofílicas, regiões com elevada densidade eletrônica, distância entre grupos funcionais da molécula, entre outras (Waller, 2004).

Como já citado, o emprego dessas técnicas, que utilizam descritores para traçar correlações entre as estruturas das moléculas e suas respectivas atividades biológicas, mostram-se ainda mais

relevantes quando não é conhecida a estrutura cristalografada, ou seja, com disposição tridimensional, do alvo de atuação desses ligantes, o que é observado para a capsaicina, que não possui seu mecanismo de indução de morte celular totalmente elucidado, e assim, não possui alvo específico de atuação, o que inviabiliza a utilização de outras técnicas e abordagens de modelagem molecular (Eckert; Bajorath, 2007; Guido *et al.*, 2008).

Face às necessidades dos estudos de correlação entre os descritores físico-químicos e as respectivas estruturas químicas das moléculas ensaiadas, Paul Craig (1971) propôs uma abordagem racional de monossustituição de sistemas aromáticos, capaz de avaliar a influência da lipofilicidade e das propriedades eletrônicas de determinada molécula, em sua atividade biológica. Craig (1971) propôs em seus estudos um diagrama (Figura 11) de correlação entre π (π), uma constante de lipofilicidade, e sigma (σ), constante de parâmetro eletrônico relacionada a disposição dos elétrons em torno do substituinte inserido.

Figura 11: Esquema racional de monossustituição proposta por Craig (1971) para sistemas aromáticos.

Com essa abordagem, é possível estabelecer correlações entre as propriedades lipofílicas e eletrônicas, e suas respectivas influências sobre a atividade biológica da nova molécula, o que viabiliza o planejamento de moléculas subsequentes, com maior potencialidade em exercer

atividade biológica superior. Para tanto, devem ser planejadas moléculas que enalteçam a propriedade (eletrônica ou lipofílica) que mais contribui positivamente para a atividade biológica, o que configura o diagrama de Craig uma importante estratégia de triagem racional de compostos com atividade biológica superior (Tavares, 2004).

Para a correta determinação quantitativa da relação entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR) de uma série de compostos, é necessário que dois requisitos básicos sejam atendidos para que o modelo gerado seja robusto e confiável, são eles: a variabilidade estrutural da série estudada, e a variabilidade de atividade biológica, ou seja, a série em questão deve conter análogos ativos; análogos com atividade discreta; e análogos não ativos, ou com atividade biológica extremamente baixa, para que assim seja possível se determinar qual ou quais propriedades contribuem positiva ou negativamente para a atividade biológica (Castilho *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 2003).

Em situações onde uma série de compostos não apresenta variabilidade de atividade biológica, visto que se trata de uma variável determinada estritamente de forma experimental, a elaboração de um estudo de QSAR fica prejudicado. Nestes casos, uma estratégia alternativa que pode ser adotada é o cálculo das propriedades físico-químicas daqueles análogos que apresentaram atividade, bem como do protótipo dos mesmos, visto que neste estudo podem ser identificadas possíveis propriedades físico-químicas que estejam correlacionadas com a atividade biológica dos mesmos (Eckert; Bajorath, 2007; Guido *et al.*, 2008; Tavares, 2004).

Face ao exposto, a capsaicina pode ser considerada um protótipo proveniente de matrizes naturais que, quando somada às estratégias de planejamento racional e aos recursos de modelagem molecular, mostra extremo potencial para fornecer moléculas com atividade antitumoral interessante, capazes de fornecer novas alternativas e opções para o tratamento do câncer.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Abordadas as problemáticas acerca do câncer, é extremamente importante que sejam realizadas pesquisas que visam desenvolver novos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer.

Como a capsaicina apresenta atividade antitumoral relevante (em concentrações micromolares) frente às neoplasias de maior índice de mortalidade segundo a OMS, esta se mostra, como mencionado anteriormente, um importante protótipo para o planejamento e síntese de novas moléculas que podem apresentar bioatividade importante e redução de efeitos adversos.

Assim, este trabalho teve como objetivo central, através das estratégias de modificação molecular: bioisosterismo e homologia, sintetizar análogos da capsaicina, atingindo assim os seguintes objetivos específicos:

- I.** Sintetizar análogos funcionais sulfonamídicos e sulfonatos da capsaicina;
- II.** Avaliar a ação citotóxica desses análogos em comparação à capsaicina, frente a linhagens celulares afetadas (tumoriais) e sadias (fibroblastos), descritas no subitem 4.1.3 deste trabalho;
- III.** Realizar estudos de elucidação mecanística dos análogos que apresentaram atividade;
- IV.** Determinar, através de abordagens *in silico*, as propriedades físico-químicas dos análogos que foram ativos nos ensaios de citotoxicidade.

3. PLANEJAMENTO DAS SÉRIES PROPOSTAS

A capsaicina foi o protótipo sobre o qual todos os análogos foram planejados e sintetizados, conforme mostra a Figura 12.

Os compostos foram divididos em duas séries. A primeira, denominada série I, compreende os derivados sulfonamídicos da capsaicina, e a segunda, nomeada como série II, é relativa aos análogos capsaicinóides de função sulfonato, sendo estas moléculas análogos bioisostéricos não-clássicos da ligação amídica presente na estrutura capsaicinóide. Cada série foi dividida em duas subséries, que trazem consigo variações na região C (Figura 12) da estrutura protótipo. A subsérie IA compreende os análogos sulfonamídicos de cadeia lateral alquílica. A subsérie IB contém as sulfonamidas de cadeia lateral arílica. O mesmo raciocínio se aplica aos derivados sulfonatos, estando estes subdivididos nas subséries IIA e IIB, a primeira referente às moléculas de cadeia lateral alquílica, e a segunda, relativa às de cadeia lateral arílica.

Figura 12: Planejamento dos análogos capsaicinóides sulfonamídicos e sulfonatos.

A escolha dos grupos substituintes alquílicos foi realizada por variações de homologia, ou seja, de unidades metilênicas (-CH₂-), à cadeia lateral (região C) capsaicinóide. Os substituintes arílicos foram escolhidos a partir dos quatros quadrantes do diagrama de Craig (1971) (item 1.7. deste trabalho).

A escolha das funções orgânicas bioisostéricas à função amida presente na capsaicina, se deu por razões distintas. A escolha da função sulfonamídica ocorreu devido a inserção de um sítio adicional de acepção de hidrogênio, e também devido a maior estabilidade à hidrólise química que esta função possui.

Já a função bioisostérica sulfonato foi escolhida devido aos precedentes literários existentes de fármacos antitumorais que apresentam tal função, como por exemplo, o agente alquilante bussulfano (Figura 13). Esta função foi eleita na expectativa de se obter análogos bifuncionais, que pudessem atuar tanto por indução de morte celular, quanto por interrupção do ciclo celular normal, mecanismo atribuído aos agentes alquilantes clássicos (Patrick, 2008; Socié *et al.*, 2001).

Figura 13: Fórmula estrutural do fármaco bussulfano.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes, solventes e demais materiais para síntese

- 4-dimetilaminopiridina – DMAP (Merck[®])
- Acetato de etila (Synth[®])
- Acetona (Synth[®])
- Ácido clorídrico (Synth[®])
- Álcool piperonílico (Sigma-Aldrich[®])
- Bicarbonato de sódio (Synth[®])
- Carbonato de sódio (Synth[®])
- Carvão ativado (Synth[®])
- Cloreto de 3-nitro benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de 4-cloro benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de 4-fenil benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de 4-flúor benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de 4-metil benzenossulfonila ou 4-toluenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de 4-metoxi benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de 4-nitro benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de 4-*terc*-butil benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de benzenossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de estanho II (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de isobutanossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de isopropanossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de *n*-butanossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de *n*-etanossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de *n*-hexanossulfonila (Sigma-Aldrich[®])

- Cloreto de *n*-octanossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de *n*-propanossulfonila (Sigma-Aldrich[®])
- Cloreto de sódio (Synth[®])
- Clorofórimo deuterado – CDCl₃ (Tedia[®])
- Clorofórmio (Synth[®])
- Diclorometano (Synth[®])
- Dimetilsulfóxido deuterado – DMSO-*d*₆ (Tedia[®])
- Hexano (Synth[®])
- Hidróxido de sódio (Synth[®])
- Metanol (Synth[®])
- Piperonilamina (Sigma-Aldrich[®])
- Placa cromatográfica delgada de sílica gel 60 Å, fluorescente F-254 (Merck[®])
- Sílica gel 60 Å – 70-230 mesh (Merck[®])
- Sílica gel 60 Å – 230-400 mesh (Merck[®])
- Sulfato de magnésio anidro (Synth[®])
- Sulfato de sódio anidro (Synth[®])
- Trietilamina (Sigma-Aldrich[®])

4.1.2. Equipamentos para síntese e caracterização das moléculas

- Agitadores magnéticos
- Analisador elementar Perkin Elmer[®], modelo 2400 CHN
- Aparelho de ponto de fusão capilar Büchi[®], modelo M565
- Bomba de alto vácuo Edwards[®], modelo NXD6SI
- Bomba de vácuo Vacuubrand[®], modelo ME-1C
- Câmara de luz ultravioleta (254 nm)

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker®, modelo Advanced DPX-300. Frequências: 300 MHz e 75 MHz
- Evaporador rotativo Büchi®, modelo R-114, acoplado à bomba de vácuo Büchi®, modelo V-700 e banho-maria Büchi®, modelo B-480.

4.1.3. Reagentes, solventes e demais insumos para ensaio biológico

- Alaranjado de acridina (Chemical Co., St. Louis, MO)
- Álcool isopropílico (Synth®)
- Anticorpo anti-ciclina A de camundongo (Cell Signaling Technology®)
- Anticorpo anti- β -actina de coelho (Cell Signaling Technology®)
- Anticorpo anti-ciclina D1 de camundongo (Cell Signaling Technology®)
- Anticorpo anti-ciclina D3 de camundongo (Cell Signaling Technology®)
- Anticorpo IgG conjugado com peroxidase de rabanete (Cell Signaling Technology®)
- Anticorpo anti-p21 Waf/Cip 1 de coelho (Cell Signaling Technology®)
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – MTT (Sigma-Aldrich®)
- Camundongo *nude* atímico fêmea
- Capsaicina (Sigma-Aldrich®)
- Corante de actina (Sigma-Aldrich®)
- Dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma-Aldrich®)
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich®)
- Fluoreto de polivinilideno – PVDF
- Kit inibidor de proteases (Cell Signaling Technology®)
- Linhagem celular 3T3 – fibroblasto humano (ATCC®)
- Linhagem celular B16-F10 – melanoma murinho (ATCC®)
- Linhagem celular HUVEC – endotélio venoso de tecido umbilical humano (ATCC®)
- Linhagem celular MCF-7 – adenocarcinoma mamário (ATCC®)

- Linhagem celular MDA-MB-231 – adenocarcinoma mamário (ATCC®)
- Meio de cultura D-MEN (Sigma-Aldrich®)
- Meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich®)
- Penicilina (Sigma-Aldrich®)
- Pipetas graduadas descartáveis de 5 mL, 10 mL e 25 mL
- Placa de 96 poços para cultura celular
- Poliacrilamida
- Programa UVIBANDMAX™ 15.03A (UVItec Ltd., Cambridge, UK)
- Rato Wistar macho
- Soro fetal bovino (Gibco 16000044)
- Substrato Lumiata™ Forte Western HRP (Millipore®)
- Tampão fosfato salino – PBS (Sigma-Aldrich®)
- Tampão de amostra para Western blot (50 mM de cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), pH 6,8, 2% de dodecil sulfato de sódio-SDS, 10% de glicerol, 5% de 2-β-mercaptoetanol)
- Tripsina (Sigma-Aldrich®)
- Tubos Falcon de 15 mL
- Vial para congelamento de 1 mL

4.1.4. Equipamentos utilizados nos ensaios biológicos

- Aparato de Hargreaves
- Capela de fluxo laminar
- Centrífuga refrigerada Eppendorf®, modelo 5810-R
- Citômetro de fluxo FACScalibur®
- Estufa incubadora Thermo Scientific®, modelo FORMA – série 3
- Microscópio invertido Nikon®, modelo Eclipse TS100

- Paquímetro digital
- Ultra *Freezer* de armazenagem a -80 °C Indrel[®], modelo IULT 335D

4.1.5. Hardwares e softwares para modelagem molecular

- ChemBio Draw Ultra[™] 12.0 (CambridgeSoft[®], 2012)
- Gaussian[™] G03 6.0 (para Windows[®], Gaussian Inc., 2004)
- Gaussview[™] 5.0 (para Windows[®], Gaussian Inc., 2004)
- Hyperchem[™] 8.0 (para Windows[®], Hypercube, 2008)
- Marvin Beans[™] 5.3.8 (ChemAxon[®], 2010)
- MOLSIM[™] 3.2 (Doherty, 2002)
- OpenBabel[™] 2.1.1 (Free Software Foundation, Inc. 2006, Boston, MA, EUA)
- Sistema operacional Windows[®], com processador Intel[®] Core[™] i7 2.40 GHz, 8.0 GB de memória (RAM) e placa de vídeo Geforce[®] GT 2 GB, modelo 630M.
- ViewerLite[™] 5.0 (Accelrys Inc., 2002)

4.2. Métodos

4.2.1. Estratégia sintética e identificação dos compostos planejados

Os compostos foram obtidos em uma etapa sintética, utilizando-se como materiais de partida para as séries IA e IB, a piperonilamina e cloretos de sulfonila. Para as séries IIA e IIB foram usados o álcool piperonílico junto aos cloretos de sulfonila. Essa estratégia reacional foi traçada tanto para os compostos alquílicos quanto para os arílicos (Figura 14).

Figura 14: Estratégia sintética de obtenção dos análogos propostos. Condições reacionais: (i) RSO_2Cl , Na_2CO_3 , H_2O , t.a., 2-6 h; (ii) RSO_2Cl , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , t.a., 2-6 h.

4.2.2. Reação de sulfonilação

As moléculas sintetizadas foram obtidas em uma única etapa sintética, exceto os compostos RPF-110 e RPF-111 que foram obtidos em duas etapas, a primeira de formação dos análogos nitroderivados (RPF-102 e RPF-107) e posterior redução destes. As reações ocorreram em meio aquoso, segundo as condições de Deng e Mani (2006). Foram usadas quantidades equimolares de piperonilamina (série I) (Sigma-Aldrich®) ou álcool piperonílico (série II) (Sigma-Aldrich®) e dos cloretos de sulfonila (Sigma-Aldrich®).

Inicialmente 5 mmoles do nucleófilo (0,755 g de piperonilamina, ou 0,76 g do álcool piperonílico) foram suspensos em 20 mL de água destilada sob agitação constante. O sistema teve então o seu pH ajustado para 9,0 com a adição de solução saturada de Na_2CO_3 . Após 30 minutos de agitação, adicionou-se gota a gota 5 mmoles do cloreto de sulfonila ao meio reacional. Os cloretos de sulfonila que se apresentaram em estado sólido, foram previamente solubilizados em 2 mL de clorofórmio. O sistema foi mantido sobre agitação constante por 2 a 6 horas, em temperatura ambiente com constante verificação do pH, corrigido para 9,0 sempre que necessário. A formação de precipitados, indicou a provável formação dos produtos finais.

Posteriormente a formação dos compostos foram confirmadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) (Deng; Mani, 2006).

A purificação dos compostos foi realizada de acordo com Deng e Mani (2006), primeiramente por filtração simples, seguida por extrações líquido-líquido, utilizando clorofórmio como fase orgânica e como fases aquosas solução de HCl 5%, solução saturada de NaHCO₃ e salmoura (Brine). Após as extrações, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro ou sulfato de magnésio anidro. O solvente foi removido por rotaevaporação. Os produtos finais foram submetidos a recristalização em sistema hexano-clorofórmio (4:1) e, quando necessário, foi procedida a purificação em coluna cromatografia, valendo-se de sílica gel 60Å – 70-230 mesh ou 230-400 mesh (Merck®) como fase estacionária e clorofórmio ou hexano/acetato de etila (nas proporções 1:1, 1:2 ou 2:1) como eluente. Para armazenamento e posteriores caracterizações, o solvente residual foi removido em bomba de alto vácuo.

4.2.3. Reação de redução

Os análogos nitroderivados, RPF-102 e RPF-107, foram reduzidos a partir da metodologia proposta por Bellamy & Ou (1984) e originaram os compostos RPF-110 e RPF-111. Utilizou-se 6 equivalentes de cloreto de estanho II (SnCl₂) em solvente prótico (etanol) na proporção de 10 mL/mmol. O sistema foi mantido em refluxo por 1 h, sendo acompanhado por CCD (Bellamy; Ou, 1984).

Posteriormente deu-se início às etapas de purificação e caracterização.

4.2.4. Metodologia analítica e de caracterização

4.2.4.1. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi usada para o acompanhamento da reação, bem como para a obtenção dos fatores de retenção (R_f) dos produtos finais.

As cromatofolhas de alumínio (Merck®) utilizadas foram cobertas por sílica fluorescente (GF254) e a revelação das mesmas ocorreu por luz ultravioleta a 254 nm, vanilina e/ou iodo, de acordo com as características de cada composto.

O eluente utilizado para determinação do R_f foi o clorofórmio.

4.2.4.2. Faixa de fusão

A faixa de fusão de compostos sólidos foi obtida por aparelho de ponto de fusão capilar marca Büchi® – M565, sem valor corrigido com o uso de analito padrão.

4.2.4.3. Espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN ¹H e ¹³C (todas dispostas no ANEXO-I) foram realizadas em espectrômetro de marca Bruker®, modelo Advanced DPX-300, nas frequências 300 e 75 MHz respectivamente. As análises utilizaram tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interno e a multiplicidade dos sinais espectrais foram descritas como: s, singlete; sl, singlete largo; d, dubleto; dd, duplo dubleto; ddd, duplo duplo dubleto; t, tripleto; tl, tripleto largo; q, quarteto; quint, quinteto; sext, sexteto; m, multiplete.

4.2.4.4. Análise elementar

A análise elementar das moléculas foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP em analisador elementar Perkin Elmer® 2400 CHN. Como critério de exclusão para amostras puras, foi admitida uma variação dos valores experimentais de, no máximo, ± 0,4% sobre os valores teóricos (de cada composto).

4.2.5. Ensaios de avaliação da atividade citotóxica em cultura de células

A atividade antitumoral dos compostos sintetizados foi avaliada por meio de ensaio *in vitro*, em sextuplicata, a fim de se aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos. Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. José Alexandre Barbuto do Laboratório de Imunologia de Tumores do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP) sob a responsabilidade e supervisão do Dr. Adilson K. Ferreira e Dr. Ricardo A. Azevedo.

Os análogos sintetizados e a capsaicina foram testados nas linhagens celulares tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, ambas provenientes de adenocarcinoma mamário e obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC®), sendo cultivadas em meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Sigma-Aldrich®). Os compostos foram também testados em B16F10, linhagem tumoral proveniente de melanoma murinho (também obtida da ATCC®) e cultivada em meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Sigma-Aldrich®).

A avaliação de citotoxicidade em células sadias foi realizada sobre a linhagem 3T3 (ATCC®) de fibroblasto. Foi utilizado meio de cultura D-MEN (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Sigma-Aldrich®). As culturas foram cultivadas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ em atmosfera úmida. Para as linhagens de fibroblasto foram utilizados meio de cultura D-MEN (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Sigma-Aldrich®).

4.2.5.1. *Triagem expandida em linhagens adicionais*

Neste trabalho, foi possível realizar o ensaio dos análogos em linhagens celulares adicionais, sendo elas: A2058 (melanoma humano), HCT-116 (adenocarcinoma colorretal), HeLa (adenocarcinoma cervical) e U87 (glioblastoma). Os ensaios com as linhagens adicionais seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.2.5.

4.2.5.2. *Avaliação de viabilidade celular por biorredução do MTT*

As linhagens foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas. Após esse período as mesmas foram expostas a diferentes concentrações dos compostos sintetizados (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µM), por mais 24 horas. Com o término da exposição incubou-se as células com MTT,

sigla referente a brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich®), em concentração 5 mg/mL por 4 horas.

Após o período de incubação as placas foram então centrifugadas e tiveram o sobrenadante removido. Com a formação do formazan (insolúvel em água) no fundo dos poços, foi feita a diluição do mesmo em DMSO, e então a leitura das absorbâncias relativas a cada poço foi procedida em espectrofotômetro de microplaca a 570 nm.

A taxa de biorredução do MTT a azul de formazan reflete proporcionalmente a viabilidade das células presentes em cada poço. O ensaio de MTT foi realizado com diferentes concentrações dos compostos, entre 200 e 6,25 μ M, para assim ser determinado a curva de crescimento e as respectivas IC₅₀ dos análogos.

4.2.6. Ensaios de elucidação mecanística dos análogos ativos

4.2.6.1. Estudo de indução apoptótica por alaranjado de acridina e iodeto de propídio

As linhagens foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas. Após esse período, as mesmas foram tratadas com os compostos ativos nas concentrações relativas ao valor de IC₅₀ encontrados por 24 h.

Após a incubação, o meio contendo os compostos foi removido, e adicionou-se 1 mL de alaranjado de acridina (1 μ g/mL) em cada poço. As placas foram incubadas por 15 minutos.

A distinção das células apoptóticas foi determinada pela intensidade da coloração em microscopia de fluorescência.

4.2.6.2. Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta m\Psi$)

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta m\Psi$) foi medido utilizando o ensaio de éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE), e monitorado por citometria de fluxo. O TMRE é um corante

vermelho-alaranjado capaz de permear membranas celulares carregadas positivamente, que prontamente se acumula em mitocôndrias ativas, devido à sua natureza negativa natural. Mitocôndrias despolarizadas, ou inviáveis, não possuem diferença de potencial de membrana e assim não conseguem sequestrar o TMRE.

As células foram semeadas na concentração 10^6 células/poço em placas de 6 poços e incubadas por 24 h. Após o período inicial de incubação, as placas foram tratadas com os compostos e incubadas por 12 h. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de 20 nM de TMRE às culturas e incubou-se a 37 °C por 45 minutos.

A fluorescência foi medida por citometria de fluxo. O total de 10.000 células/amostra foram analisados por citometria. A intensidade média de fluorescência e percentual de células em cada população (M1 e M2) foram registrados.

4.2.6.3. Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagem venosa endotelial

A linhagem HUVEC, acrônimo de *human umbilical vein endothelial cell* (célula do endotélio de veia de cordão umbilical humano), foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas. Após esse período as mesmas foram expostas a diferentes concentrações do análogo RPF-151 (1,25; 2,50; 5,0; 10 μ M), por mais 24 horas. Com o término da exposição incubou-se as células com MTT, sigla referente a brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich®), em concentração 5 mg/mL por 4 horas.

Após o período de incubação as placas foram então centrifugadas e tiveram o sobrenadante removido. Com a formação do formazan (insolúvel em água) no fundo dos poços, foi feita a diluição do mesmo em DMSO, e então a leitura das absorbâncias relativas a cada poço foi procedida em espectrofotômetro de microplaca a 570 nm.

A taxa de biorredução do MTT a azul de formazan reflete proporcionalmente a viabilidade das células presentes em cada poço. O ensaio de MTT foi realizado com diferentes concentrações

dos compostos, para assim ser determinado a curva de crescimento e a respectiva IC₅₀ do composto RPF-151 sobre a linhagem HUVEC.

4.2.6.4. Análise de expressão de proteínas por Western blot

A técnica de Western blot se inicia com a cultura celular das células a serem investigadas, no caso, a linhagem MDA-MB-231. Após 24 horas de crescimento, as culturas foram lavadas com PBS frio e, em seguida, lisadas com tampão de lise, suplementado com 1 mmol de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), e com kit inibidor de proteases. O conteúdo lisado foi centrifugado, e as proteínas determinadas pelo método de Bradford (1976). O conteúdo proteico foi combinado com tampão de amostra de Western blot (50 mM Tris-HCl; pH 6,8; 2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de 2-β-mercaptoetanol) em quantidades equimolares e fervidos durante 5 minutos para clarificação do mesmo.

Por análise, 20 µg do conteúdo lisado e clarificado foi inserido em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,0%, transferido para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), e incubados durante 1 h com 5% de leite bovino em pó, e com o anticorpo primário específico da análise a ser realizada. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-β-actina (de coelho), anti-ciclina D1 (de camundongo), anti-ciclina D3 (de camundongo), anti-ciclina A (de camundongo), anti-p21 Waf/Cip 1 (de coelho).

A imunorreatividade foi detectada por anticorpos IgG conjugados com peroxidase de rabanete, utilizando como substrato o Lumiata™ Forte Western HRP (Millipore ®).

A medida foi realizada através de análise quantitativa de migração, usando o programa UVIBANDMAX 15.03A (UVItec Ltd., Cambridge, UK). Foi aplicada corrente elétrica para separação das estruturas proteicas, por diferença de peso molecular. A revelação foi feita com corante de actina.

4.2.6.5. Ensaio de indução de hiperalgesia térmica de Hargreaves

O limiar de dor causado por alta temperatura foi mensurado pelo teste plantar de Hargreaves (Hargreaves *et al.*, 1988). Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, de peso médio entre 170 g e 190 g, abrigados em ambiente com controle de temperatura (21 ± 2 °C) e luz (ciclo de 12 h/12 h luz e escuro). Os testes foram conduzidos entre as 9 h e 16 h. Alimentação e água foram disponibilizados *ad libitum*.

Foram injetados 50 µL via intraplantar (I.PL) da capsaicina e do análogo RPF-151, nas concentrações de 0,02 mM, resultando na injeção de 1 nmol (em 50 µL) por pata. A tolerância ao estímulo térmico foi mensurada nos tempos 0, 2, 15, 30 e 60 minutos após a administração dos compostos, e determinados pela latência (em segundos) de levantamento da pata traseira, após o estímulo térmico.

Os animais foram divididos randomicamente em três grupos de 3 animais cada, um grupo controle (tratado com solução salina 0,8%), um grupo tratado com capsaicina (1 nmol/50 µL), e um grupo tratado com RPF-151 (1 nmol/50 µL). Cada animal foi ambientado na câmara de execução do ensaio por 5 minutos, antes do início do teste. Posteriormente o estímulo térmico foi dirigido à pata traseira direita do animal até que este levantasse-a, indicando o tempo de tolerância (em s). Foi adotado tempo de tolerância máxima de 20 s, onde ocorreu a interrupção do estímulo térmico, a fim de preservar os animais, evitando danos teciduais.

4.2.6.6. Determinação da atividade antitumoral em modelo *in vivo*

A avaliação da atividade antitumoral em modelo *in vivo* foi procedida para o composto RPF-151. Inicialmente inoculou-se por injeção subcutânea, no flanco direito, 10^6 células/animal de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231. Utilizou-se nesse estudo fêmeas adultas de camundongo *nude* atímico (imunodeficiente), de 8 semanas de idade. A inoculação ocorreu no flanco direito. Aguardou-se a adesão e crescimento da massa tumoral nos animais, até esta ser palpável e com volume mensurável, igual a 50 mm^3 , aferidos por paquímetro digital.

Quando os tumores atingiram 50 mm³ iniciou-se os tratamentos. Os animais foram divididos randomicamente em três grupos de 5 animais cada, um grupo de animais não tratados, um grupo tratado com capsaicina (90 mg/kg) e um grupo tratado com RPF-151 (70 mg/kg). Os animais foram tratados por 15 dias por injeções diárias via intraperitoneal (I.P), e o volume dos tumores medidos a cada três dias, usando a fórmula $V = (a^2 \cdot b)/2$, onde a é a medida da largura do tumor (em mm), b é o comprimento do tumor (em mm). O grupo controle foi tratado somente com o veículo utilizado, neste caso, solução de DMSO a 0,5%.

4.2.7. Modelagem molecular

Os estudos *in silico* dos análogos capsaicinóides que apresentaram atividade biológica nos ensaios de citotoxicidade, foram realizados em colaboração com a Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. Inicialmente realizou-se a construção do modelo molecular tridimensional (3D) da capsaicina e dos análogos ativos, e então, realizou-se os cálculos de propriedades moleculares para cada molécula. As propriedades calculadas para os análogos foram então comparadas às da capsaicina. Além da estrutura capsaicinóide, os análogos que fizeram parte desse estudo foram o RPF-101 e RPF-151.

Esta etapa do trabalho foi realizada utilizando-se um computador com sistema operacional Windows®, com processador Intel® Core™ i7 de 2.40 GHz, 8.0 GB de memória RAM e placa de vídeo Geforce® GT 2 GB, modelo 630M.

4.2.7.1. Construção do modelo molecular tridimensional (3D) da capsaicina

Para a construção do modelo molecular 3D da capsaicina, utilizou-se como referência a estrutura cristalografada, por difração de raios-X, do composto 3-cloro-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-2,2-dietilpropanamida, publicado por Huang e colaboradores (2010). A Figura 15 ilustra a porção conservada da estrutura química do composto utilizado como referência, molde ou *template*, para construção do modelo molecular 3D da capsaicina.

Figura 15: Estrutura química do composto utilizado como molde na construção do modelo molecular 3D da capsaicina. Em vermelho: porção conservada da estrutura de referência utilizada para a construção do modelo molecular. Em azul: porção da estrutura capsaicinóide não presente na estrutura modelo.

O modelo molecular da capsaicina foi construído no programa Hyperchem[®] 8.0 (Hypercube, Inc. 2008, Gainesville, FL, EUA). A construção do modelo ocorreu considerando a forma neutra da capsaicina, em campo de força empírico MM+, derivado do campo de força MM2 (Allinger, 1977) no programa Hyperchem[®] 8.0. As cargas atômicas parciais de ponto único foram calculadas para as estruturas a partir do método de mecânica quântica semi empírico Hamiltoniano AM1 (*Austing Model 1*) (Dewar, et al., 1985).

Posteriormente, no programa MOLSIM[®] 3.2 (Doherty, 2002), gentilmente disponibilizado pelo Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, foi realizada a minimização de energia do modelo molecular tridimensional. Para tal, foi utilizado o método de declive máximo (*steepest descent*) e de gradientes conjugados (*conjugated gradient*) (Leach, 2001), utilizando como critério de convergência 0,01 kcal/mol. A fim de mimetizar o ambiente de membranas biológicas, foi utilizada constante dielétrica igual a 3,5.

Após a minimização da estrutura construída, foi procedida a sobreposição da mesma, a estrutura de saída do modelo molecular minimizado, com a estrutura de entrada (o modelo molecular inicial). Esta sobreposição foi realizada no programa Hyperchem[®] 8.0 (Hypercube, Inc. 2008, Gainesville, FL, EUA), com o objetivo de verificar se a integridade estrutural foi mantida durante o processo. Considerou-se, como critério de avaliação da integridade estrutural, o valor de desvio quadrático médio de posições atômicas, o RMSD (*root-mean-square deviation*). Pelo fato da capsaicina ser uma molécula pequena, valores de RMSD menores ou iguais a 0,1 Å (Leach, 2001;

Morgon; Coutinho, 2007) indicam que a integridade estrutural foi mantida durante o processo de minimização. Como pode ser observado na Figura 15, no caso da capsaicina, a porção do modelo molecular 3D construído de acordo com dados experimentais, não contempla a cadeia carbônica, que apresenta maior grau de liberdade. Então, valores de RMSD superiores a 0,1 Å seriam esperados neste tipo de comparação, considerando-se a molécula inteira.

A estrutura minimizada da capsaicina foi utilizada como arquivo de entrada para a simulação de dinâmica molecular (DM) de 1 ns (1.000.000 passos, sendo cada passo de 1 fs), à temperatura de 310 K (37 °C, temperatura corporal), também no programa MOLSIM (Doherty, 2002). Arquivos trajetória foram gerados a cada 20 passos, resultando em um perfil de amostragem conformacional (PAC) de 50.000 confôrmers. Foi necessário adotar restrição de posição para alguns átomos a fim de manter a integridade estrutural dos modelos gerados. Para restrição, adotou-se a massa fictícia igual 5.000 u para os átomos em questão.

A estrutura de energia mais baixa foi selecionada a partir do equilíbrio, em cada 100 ps de simulação. Os confôrmers selecionados foram sobrepostos e compararam-se os valores de RMSD e de energia. Cabe ressaltar que a energia potencial total (E_{TOT}) corresponde à soma das contribuições de energia intramolecular de deformação axial ou estiramento (E_{STRECH}), de deformação angular (E_{BEND}), de deformação torsional (E_{TORS}), de tipo 1-4 (E_{1-4}), de van der Waals (E_{vdW}), de carga ou eletrostática (E_{CHARGE}), de ligação de hidrogênio (E_{ligH}) e de solvatação (E_{SOLV}).

O arranjo conformacional mais frequente e com energia mais favorável foi selecionado para posterior minimização de energia e cálculo de propriedades moleculares.

4.2.7.2. Construção dos modelos moleculares 3D dos análogos RPF-101 e RPF-151

Os dados experimentais de arranjo espacial para os análogos RPF-101 e RPF-151 foram obtidos por Maganhi *et al.* (2013) e Tavares *et al.* (2014) utilizando método de difração de raios-X.

A transformação em coordenadas cartesianas pelo programa OpenBabel 2.1.1 (Free Software Foundation, Inc. 2006, Boston, MA, EUA), permitiu a visualização dos modelos tridimensionais destes análogos. Os modelos moleculares 3D dos análogos RPF-101 e RPF-151 foram reconstruídos em suas formas neutras, em campo de força empírico MM+ (Allinger, 1977) no programa Hyperchem[®] 8.0. As cargas atômicas parciais de ponto único foram calculadas para as estruturas a partir do método de mecânica quântica semi empírico Hamiltoniano AM1 (*Austing Model 1*) (Dewar, et al., 1985).

Posteriormente, no programa MOLSIM[®] 3.2 (Doherty, 2002), gentilmente disponibilizado pelo Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, foi realizada a minimização de energia dos modelos moleculares 3D. Para isso, foi utilizado o método de declive máximo (*steepest descent*) e de gradientes conjugados (*conjugated gradient*) (Leach, 2001), utilizando como critério de convergência 0,01 kcal/mol. A fim de mimetizar o ambiente de membranas biológicas, foi utilizada constante dielétrica igual a 3,5.

Após a minimização das estruturas, foi procedida a sobreposição das mesmas (estruturas de saída da minimização), com suas respectivas estruturas de entrada (os modelos moleculares iniciais). Esta sobreposição foi realizada no programa Hyperchem[®] 8.0 (Hypercube, Inc. 2008, Gainesville, FL, EUA), com o objetivo de verificar se a integridade estrutural dos análogos foi mantida durante o processo. Considerou-se, como critério de avaliação da integridade estrutural, o valor de desvio quadrático médio de posições atômicas, o RMSD (*root-mean-square deviation*). Pelo fato dos análogos serem moléculas pequenas, valores de RMSD menores ou iguais a 0,1 Å (Leach, 2001; Morgon; Coutinho, 2007) indicam que a integridade estrutural foi mantida durante o processo de minimização. Nestes casos, como os dados experimentais correspondem exatamente aos modelos moleculares dos análogos, não seriam esperados valores de RMSD maiores que 0,1 Å.

4.2.7.3. Cálculo das propriedades moleculares

As propriedades termodinâmicas da capsaicina foram calculadas no programa MOLSIM[®] 3.2. Foram calculadas as contribuições das energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRECH}), de deformação angular (E_{BEND}), de deformação torsional (E_{TORS}), de interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), de interações de van der Waals (E_{vdW}), e também interações de energia eletrostática (E_{CHARGE}), de ligação de hidrogênio (E_{ligH}), energia de solvatação (E_{SOLV}), a qual foi calculada utilizando-se o modelo de camada de hidratação proposto por Forsythe & Hopfinger (1973), e por fim foi calculado a energia total dos modelos (E_{TOT}), a qual corresponde à somatória de todas as energias de contribuição intramolecular citadas anteriormente. O cálculo de contribuição de energia intramolecular de ligação de hidrogênio (E_{ligH}) foi obtida em simulação curta a 310 K (37 °C) e constante dielétrica igual a 3,5. O mesmo procedimento foi utilizado para o cálculo de contribuição de energia intramolecular de solvatação (E_{SOLV}), que utilizou água como solvente padrão.

As propriedades eletrônicas dos análogos, e da capsaicina, foram calculadas com o programa Gaussian 03W[®] 6.0 (Gaussian, Inc. 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA). Foram calculadas as cargas parciais atômicas ajustadas pelo potencial eletrostático (*charges from electrostatic potentials using a grid based method - CHELPG*) de acordo com Breneman & Wiberg (1990), gerando assim o mapa de potencial eletrostático (MPE) dos análogos e da capsaicina. Para os cálculos foi empregado o método funcional de densidade híbrido B3LYP (Becke, 1993) e o conjunto de bases 6-31(d,p). O programa Gaussview 5.0 (Gaussian, Inc. 1995-2004, Pittsburgh, PA, EUA) foi empregado para visualizar os mapas de potencial eletrostático (MPE) calculados em superfície molecular Connolly.

As propriedades estéricas, topológicas, o ClogP e o logD dos análogos e da capsaicina foram calculadas no programa Marvin Beans[®] versão 5.3.8 (ChemAxon Ltd., 1998-2010, Budapeste, Hungria). A metodologia de cálculo empregada para a determinação dessas propriedades utilizou os métodos de Viswanadhan *et al.* (1989), Klopman *et al.* (1994) e a base de dados PHYSPROP (*PHYSPROP database*), todos utilizados em igualdade de pesos estatísticos para as determinações.

4.2.7.4. Cálculo das propriedades da “Regra dos Cinco” de Lipinski

Para a avaliação das propriedades contempladas pela “Regra dos Cinco” de Lipinski (2001) foi utilizado o pacote Marvin Beans[®] 5.3.8. O cálculo de ClogP foi realizado de acordo com Viswanadhan *et al.* (1989), Klopman *et al.* (1994) e a base de dados PHYSPROP (*PHYSPROP database*), todos utilizados em igualdade de pesos estatísticos para as determinações. Os sítios doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (HBD/HBA) foram mensurados excluindo-se átomos de enxofre e halogênios com sítios aceptores de ligação de hidrogênio, considerando a ocorrência de microespécies de acordo com a variação de pH, avaliado de 0 a 14, com intervalos de mensuração iguais a 0,5. Também foram determinados os sítios de HBD e HBA majoritários em pH 7,4.

A massa molecular exata dos compostos foi calculada pelo programa ChemBio Draw Ultra[®] 12.0 (CambridgeSoft Inc., 2012, Cambridge, MA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Compostos sintetizados

No total, dezenove compostos foram sintetizados, sendo dezoito pertencentes à série sulfonamídica (I) e um representante da série sulfonato (II).

Dos compostos da série sulfonamídica, sete são pertencentes à subsérie IA, de cadeia alquílica, nomeados de RPF-151 a RPF-156. Os onze compostos restantes da série I são pertencentes à subsérie IB, de cadeia arílica, e são nomeados de RPF-101 a RPF-111.

Por fim, o composto RPF-252 é representante da série IIA, ou seja, sulfonato de cadeia alquílica.

Os rendimentos reacionais e demais dados estão dispostos na Tabela 2. Dados complementares acerca da caracterização dos compostos seguem descritos no item 4.2. e no item “ANEXOS – I/II”.

Tabela 2: Dados de caracterização dos compostos obtidos.

Composto	R	R _f ¹	Aspecto físico	Faixa de fusão (°C)	Rendimento (%)
RPF-101		0,38	Sólido branco	77,1-77,6	80
RPF-102		0,22	Sólido amarelo	120,4-121,4	80
RPF-103		0,26	Sólido branco	135,0-135,8	80
RPF-104		0,34	Sólido branco	134,2-134,5	85
RPF-105		0,32	Sólido branco	135,5-136,1	85
RPF-106		0,30	Sólido branco	120,7-121,7	85
RPF-107		0,13	Sólido amarelo	131,3-132,3	90
RPF-108		0,20	Sólido amarelo	115,3-116,2	75

RPF-109		0,23	Sólido branco	133,1-135,3 ²	80
RPF-110		0,10	Líquido amarelo	não se aplica ³	75 ⁴
RPF-111		0,08	Sólido amarelo	141,7-142,5	90 ⁴
RPF-151		0,42	Sólido branco	60,2-61,2	70
RPF-152		0,46	Sólido branco	82,3-83,0	80
RPF-153		0,32	Sólido branco	74,4-75,0	85
RPF-154		0,30	Sólido branco	75,0-75,7	70
RPF-155		0,28	Sólido branco	95,2-95,9	65 ⁶
RPF-156		0,35	Sólido branco	100,0-100,7	70 ⁶
RPF-157		0,40	Sólido branco	73,3-74,1	75 ⁶
RPF-252⁵		0,48	Líquido amarelo	não se aplica ³	90 ⁶

¹Eluente: clorofórmio; Tempo de saturação: 5 minutos.

²O composto apresentou fusão com decomposição.

³Composto líquido.

⁴Rendimento global (relativo à reação de sulfonilação com isolamento do intermediário, e posterior redução)

⁵Composto pertencente à série sulfonato.

⁶Rendimentos obtidos na síntese em CH₂Cl₂, de acordo com as condições reacionais *ii* da Figura 10.

Como indicado na Tabela 2, todos os análogos foram obtidos dentro de valores apreciáveis de rendimento, estando estes entre 60 e 90%.

É possível observar que os compostos de menor cadeia alquílica lateral, a exemplo do RPF-151, RPF-154, RPF-155, RPF-156 e RPF-157, apresentaram menor rendimento. De forma lógica, é possível traçar uma correlação entre o tamanho e o caráter de lipofilicidade que a cadeia lateral destes compostos confere à molécula, sendo esta correlação diretamente proporcional. Neste caso o

n-butil, *n*-propil, etil e isopropil respectivamente, conferem menor lipofilicidade aos seus respectivos compostos, se comparados aos substituintes cuja cadeia lateral é composta por maior número de átomos de carbonos. A característica menos lipofílica desses análogos pode justificar os rendimentos menos apreciáveis obtidos após a purificação desses produtos, visto que, em extrações orgânicas, moléculas com menor caráter lipofílico possuem a tendência de, proporcionalmente, se concentrarem menos na fase orgânica extraída. Esse comportamento ocorre devido à característica inerente dos respectivos coeficientes de partição (logP) que, dado seus valores reduzidos, podem justificar maior perda natural de produto para a fase aquosa.

Então, para os análogos de menor cadeia alquílica (inferior a seis carbonos) procedimentos sintéticos e de purificação alternativos foram adotados. Evitou-se métodos extrativos que poderiam, possivelmente, provocar perda de produto para a fase aquosa. Ainda para ser evitada a perda de produto para a fase aquosa, o procedimento sintético desses compostos passou por adaptação. Foram adotadas condições adaptadas de acilação de Schotten-Baumann, ou seja, não foi empregada a água como meio reacional, como prevê Deng e Mani (2006), mas sim diclorometano (CH_2Cl_2). Algumas adaptações foram realizadas às condições de Schotten-Baumann, pois foram utilizados cloretos de sulfonila no lugar de cloretos de acila, como propõe a metodologia original (Schotten, 1884; Baumann, 1886; Georg *et al.*, 1994; Cunico, *et al.*, 2011; Goodman *et al.*, 2013).

Os produtos foram obtidos com elevado grau de pureza, o que pode ser observado pela estreita faixa de fusão obtida em todas as análises (Tabela 2), com variação máxima de 1,0 °C. Estreitas variações de faixa de fusão normalmente estão associadas a compostos com elevados índices de pureza. Os resultados obtidos pelas análises elementares (%CHN), dispostos no item “ANEXOS - II”, corroboram esse fato, visto que a variação entre os valores teóricos de %C, %H e %N, e os resultados experimentais obtidos foram menores que $\pm 0,50\%$, isso permite inferir o baixo teor de subprodutos presentes nas amostras, potencialmente capazes de alterar o perfil de %CHN estimado.

Dada à natureza simples das reações realizadas neste trabalho, não seriam esperados maiores problemas quanto à formação dos compostos planejados. O mecanismo de formação dos compostos é demonstrado na Figura 16, e trata-se de uma substituição nucleofílica similar à substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) de compostos carbonílicos.

O tempo reacional médio das sínteses variou entre 3 e 4 horas. Ao final da reação, formou-se precipitados que ficaram aderidos à parede do balão reacional, que seguiram à purificação.

Figura 16: Mecanismo geral de formação dos compostos da série sulfonamídica e sulfonato.

A relativa reatividade dos cloretos de sulfonila somada ao caráter altamente nucleofílico da piperonilamina resultou na formação dos compostos da série I em alto percentual de rendimento e pureza. Isto se deve ao fato do átomo de cloro ser um excelente grupo abandonador, o que viabiliza a formação do produto final com maior facilidade, podendo este seguir às etapas de purificação.

A purificação dos compostos da série I (sulfonamídicos) não apresentou dificuldades. Como estes compostos, ao se formarem precipitam em água, a purificação dos mesmos se iniciou com filtração simples. Após a filtração foram realizadas cromatografias em camada delgada comparativa (CCDC) para ser detectada a presença ou não de subprodutos. Na presença de impurezas, realizou-se extração orgânica ácida (5% de HCl), para remoção de traços de piperonilamina (de caráter básico), seguida de extração orgânica básica, com solução saturada de NaHCO_3 , para a remoção de possíveis traços de ácido sulfônico formado no processo (utilizando clorofórmio com fase orgânica). Tais extrações foram empregadas na expectativa de promover a ionização das espécies

contaminantes, fazendo com que estas se concentrassem em maior proporção nas respectivas fases aquosas extraídas. Quando os métodos extrativos não removeram totalmente os subprodutos, foram procedidas as recrystalizações dos compostos em sistema hexano-clorofórmio (4:1).

Em sínteses onde a recrystalização não foi capaz de fornecer o produto isolado, sucedeu-se a cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente clorofórmio e/ou acetato de etila, onde a proporção dos solventes foi determinada a partir do perfil de eluição do composto na CCDC, previamente efetuada.

A síntese em meio aquoso foi planejada devido ao apelo ambiental que a mesma apresenta. A ausência de solventes orgânicos, ou pelo menos a redução de seu emprego, traz consigo menores impactos aos mananciais e efluentes. Portanto o emprego de solvente orgânico como meio reacional foi utilizado somente nas reações em que a síntese em meio aquoso comprometeu a formação dos produtos ou o rendimento dos mesmos (Anastas; Warner, 2000; Tang *et al.*, 2005; Dichiarante *et al.*, 2010).

A síntese em fase aquosa não se mostrou eficiente para os compostos da série sulfonato (II). Em duas ocasiões em que foi realizada essa metodologia para o composto RPF-252, observou-se a formação de espuma no balão reacional, fato este incomum, dado à natureza destas reações de alquilação, além de não ser observada a formação do produto final. Em hipótese a esse fato, é possível que a água, um nucleófilo por definição, tenha competido juntamente com o álcool piperonílico para realizar o ataque nucleofílico aos cloretos de sulfonila e, devido a discrepante diferença de concentração entre material de partida (álcool piperonílico) e solvente, a água tenha atacado majoritariamente os cloretos, resultando na formação de ácidos sulfônicos, fato este não observado nas reações que empregam piperonilamina, devido ao caráter nucleofílico superior que aminas primárias possuem, quando comparadas aos álcoois.

Esses ácidos sulfônicos formados, estando em meio alcalino, conforme prevê a metodologia de Deng e Mani (2006), que se vale de Na_2CO_3 como agente alcalinizante, podem resultar na

formação de sais orgânicos com características detergentes. A Figura 17 demonstra o raciocínio proposto. Tal hipótese mostra sua relevância quando é comparada a nucleofilicidade do álcool piperonílico frente à da piperonilamina.

Figura 17: Suposta formação de sais orgânicos na reação de formação dos compostos sulfonatos.

Aminas primárias tendem a ser mais nucleofílicas e, portanto, mais reativas do que álcoois, que devido à eletronegatividade do átomo de oxigênio, atraem e assim retém com mais intensidade, o par de elétrons presente no oxigênio, em comparação ao nitrogênio presente nas aminas. Isso explica a formação dos produtos da série I em água, bem como a não formação dos análogos da série II, visto que os elétrons da camada de valência do átomo de nitrogênio das aminas estão mais disponíveis para atacar, de forma rápida os cloretos de sulfonila, se comparados ao par presente no oxigênio das hidroxilas.

Como alternativa, a formação dos compostos da série II passou a ser processada em solvente orgânico aprótico, neste caso, em diclorometano, o que viabilizou a formação do composto RPF-252 em percentual satisfatório de rendimento.

Os compostos sulfonatos, integrantes da série II, se mostraram extremamente reativos, o que exigiu cautela em suas purificações. Por se apresentarem no estado líquido, a purificação desses produtos ficou limitada somente a cromatografia em coluna, onde foi detectado, após a aplicação do produto bruto na fase estacionária (sílica), a degradação do composto sulfonato durante a sua eluição. Foram realizadas diversas sínteses, variando-se a metodologia de purificação.

Além do composto RPF-252, o único efetivamente purificado, tentou-se sintetizar os compostos RPF-251 (cuja cadeia lateral seria o *n*-butil), RPF-201 (fenil substituído), RPF-204 (cujo substituinte seria o *p*-toluil) e o RPF-258 (que teria *p*-metoxifenil como substituinte). Detectou-se

por CCDC que os produtos finais eram formados durante o tempo reacional, porém apresentavam problemas de estabilidade durante a purificação ou posterior à mesma.

As variações propostas na purificação dos análogos sulfonatos incluíram o emprego de coluna cromatográfica utilizando trietilamina ou NH_4OH como agentes aceptores de prótons, com o intuito de reduzir o caráter ácido da sílica e consequentemente evitar eventuais degradações ácidas destes compostos. Porém, a purificação dos compostos RPF-201, RPF-204, RPF-208 e RPF-251, não foram bem sucedidas.

Valendo-se de trietilamina a 1% como coeluyente, foi obtido sucesso na obtenção do composto RPF-252. Porém, 24 h após seu isolamento, o composto apresentou mudança de estado físico, passando do estado líquido para o estado sólido e também mudança de coloração, passando de coloração amarelo claro para amarelo escuro. Essa mudança de perfil, após ser analisada por CCDC indicou a degradação do composto. Essa degradação pode ser explicada pela elevada reatividade de compostos com função sulfonato (Clayden *et al.*, 2012).

Sulfonatos são espécies extremamente reativas, e por essa razão, são excelentes grupos de saída em reações de substituição nucleofílica, o que pode explicar a degradação destas espécies nos procedimentos de síntese e purificação, bem como pode justificar a baixa estabilidade apresentada pelo composto RPF-252 após sua purificação (Clayden *et al.*, 2012). A Tabela 3, lista os análogos sulfonatos sintetizados e que não apresentaram estabilidade durante ou após a purificação.

Tabela 3: Análogos sulfonatos sintetizados e que apresentaram problemas de estabilidade físico-química.

Código	Nucleófilo	Substituinte
RPF-201
RPF-204
RPF-208
RPF-251
RPF-252

Uma hipótese que pode ser levantada para a degradação do análogo RPF-252 é a ocorrência de reorganização intramolecular do mesmo. Essa hipótese de instabilidade levaria à liberação do grupo sulfonato, um excelente grupo abandonador. Um mecanismo de rearranjo estrutural semelhante a esse, que suportaria essa hipótese, ocorre com a estrutura das cefalosporinas, onde o processo resulta na liberação do grupo acetato (Jungheim; Shepherd, 1994; Blau *et al.*, 2006). A Figura 18 demonstra o raciocínio proposto.

Figura 18: Hipótese do mecanismo de liberação do grupo sulfonato do análogo RPF-252, semelhante à liberação do grupo acetato em cefalosporinas.

5.1.1. Caracterização dos análogos sintetizados

Abaixo segue descrita a caracterização dos análogos sintetizados. Foram procedidas as análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C), faixa de fusão, análise de fator de retenção (Rf) e análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (%CHN).

5.1.1.1. Determinação de R_f

Foram determinados os fatores de retenção (R_f) de cada análogo, usando clorofórmio como eluente, e tempo de saturação igual a 5 minutos. Os resultados seguem nas Tabelas 4 e 5.

5.1.1.2. Faixa de fusão

Após a determinação do fator de retenção, os compostos sólidos foram submetidos a cálculo de faixa de fusão. Esse procedimento foi realizado em triplicata, com taxa de aquecimento de 1,0 °C/minuto. Os resultados estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Faixa de fusão dos análogos sintetizados.

X = NH, O			X = NH, O		
Composto	R	Faixa de fusão (°C)	Composto	R	Faixa de fusão (°C)
RPF-101		77,1-77,6	RPF-111		141,7-142,5
RPF-102		120,4-121,4	RPF-151		60,2-61,2
RPF-103		135,0-135,8	RPF-152		82,3-83,0
RPF-104		134,2-134,5	RPF-153		74,4-75,0
RPF-105		135,5-136,1	RPF-154		75,0-75,7
RPF-106		120,7-121,7	RPF-155		95,2-95,9
RPF-107		131,3-132,3	RPF-156		100,0-100,7
RPF-108		115,3-116,2	RPF-157		73,3-74,1
RPF-109		não se aplica ¹	RPF-252 ⁵		não se aplica ²
RPF-110		não se aplica ²			

¹O composto apresentou fusão com decomposição.

²Composto líquido.

Os análogos da série IB, ou seja, os sulfonamídicos arílicos, quando substituídos, apresentaram uma faixa de fusão muito superior ao composto não-substituído, no caso o RPF-101.

Observou-se então que os substituintes tem alta capacidade de elevar a faixa de fusão dos compostos, independente da característica/natureza dos mesmos, como eletronegatividade e lipofilicidade, sendo o derivado *para*-amino (RPF-111) aquele que obteve maior faixa de fusão dentre os compostos desta subsérie, estando esta faixa entre 141,7-142,5 °C. O derivado *para*-metoxilado foi o que obteve menores valores de fusão, 115,3-116,2 °C. Forças de interação intermolecular, como interações entre orbitais π , interações íon-dipolo e principalmente, ligações de hidrogênio, podem estar relacionadas com essas diferentes faixas de fusão associada aos análogos aromáticos substituídos.

5.1.1.3. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 – RMN ^1H e ^{13}C

Com a determinação do Rf e da faixa de fusão das moléculas sintetizadas, deu-se prosseguimento a caracterização estrutural das mesmas com a realização das espectroscopias de ressonância magnética de hidrogênio (RMN ^1H), e de carbono 13 (RMN ^{13}C). Essa caracterização foi realizada para todos os compostos da série I sintetizados. O composto RPF-252 pertencente à série II foi caracterizado apenas por fator de retenção (Rf) e por RMN ^1H pois, conforme citado anteriormente, apresentou degradação 24 h após seu isolamento e se apresentou como líquido, inviabilizando a análise de faixa de fusão. Todos os espectros com suas devidas atribuições estão dispostos no item “ANEXOS – I” deste trabalho. A Figura 19 indica o padrão de numeração das estruturas propostas, para melhor entendimento dos dados tabelados.

Figura 19: Padrão de enumeração estrutural dos análogos alquílicos (subsérie A) e arílicos (subsérie B).

As Tabelas 7 e 8 apresentam os deslocamentos químicos comuns, à todos os análogos, obtidos nos espectros de RMN ^1H das séries IA e IB respectivamente.

Tabela 7: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H em CDCl_3 para a série IA.

Composto	R	3, 4, 6-ArH (m, 3H)	7-OCH ₂ O (s, 2H)	-NH (s/; t/, 1H)	8-CH ₂ (d, 2H)	9-CH ₂ (t, 2H)
RPF-151	<i>n</i> -butil	6,61-6,52	5,73	4,33	3,97	2,70
RPF-152	<i>n</i> -octil	6,86-6,78	5,98	4,40	4,22	2,95
RPF-153	<i>n</i> -hexil	6,83-6,75	5,95	4,65	4,18	2,90
RPF-154	<i>n</i> -propil	6,83-6,78	5,96	4,52	4,19	2,91
RPF-155	etil	6,83-6,75	5,96	4,49	4,19	2,96
RPF-156	isopropil	6,83-6,74	5,95	4,41	4,21	3,09
RPF-157	isobutil	6,83-6,75	5,96	4,43	4,20	2,94

Nota: s = singlete; s/ = singlete largo; t = tripleto; t/ = tripleto largo; d = dublete; m = multiplete.

Tabela 8: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H em CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$ para a série IB.

Composto	R	10, 14-ArH (dd; d; m, 2H)	11, 13-ArH (dd; d; m, 2H)	3, 4, 6-ArH (m, 3H)	7-OCH ₂ O (s, 2H)	-NH (s/l; t/l, 1H)	8-CH ₂ (d, 2H)
RPF-101		7,88	7,61-7,50	6,71-6,63	5,93	4,80	4,08
RPF-102		não se aplica ¹	não se aplica ¹	6,69-6,58	5,93	5,02	4,17
RPF-103		7,79	7,49	6,73-6,64	5,95	4,72	4,08
RPF-104		7,76	7,31	6,71-6,63	5,92	4,90	4,03
RPF-105		7,80-7,76	7,53-7,49	6,67-6,62	5,90	5,14	4,05
RPF-106		7,89-7,84	7,21-7,15	6,71-6,62	5,93	4,97	4,06
RPF-107		8,05-8,00	8,42-8,38	6,83-6,71	5,98	8,50	4,04

Nota: s = singlete; s/l = singlete largo; t = tripleto; t/l = tripleto largo; d = dublete; dd = duplo dublete; m = multipeto;

¹Os compostos RPF-102 e RPF-110 são metassubstituídos e, devido a esse fato, não possuem sinais equivalentes para os hidrogênios ligados ao anel aromático.

Continuação da Tabela 8: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H em CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$ para a série IB.

Composto	R	10, 14-ArH (dd; d; m, 2H)	11, 13-ArH (dd; d; m, 2H)	3, 4, 6-ArH (m, 3H)	7-OCH ₂ O (s, 2H)	-NH (s/l; t/l, 1H)	8-CH ₂ (d, 2H)
RPF-108		7,80	6,97	6,71-6,62	5,92	4,55	4,06
RPF-109		não se aplica ¹	não se aplica ¹	6,79-6,69	5,91	8,12	3,95
RPF-110		não se aplica ²	não se aplica ²	6,81-6,74	5,96	7,84	3,86
RPF-111		7,41	6,59	6,79-6,69 ³	5,96	7,53	3,79

Nota: s = singleto; s/l = singleto largo; t = tripleto; t/l = tripleto largo; d = dubleto; dd = duplo dubleto; m = multipeto;

¹O composto RPF-109 não apresentou o mesmo padrão de sinais observado nos demais produtos. Esses sinais mostraram-se como um único singleto aparente de quatro hidrogênios.

²Os compostos RPF-102 e RPF-110 são metassubstituídos e, devido a esse fato, não possuem sinais equivalentes para os hidrogênios ligados ao anel aromático.

³Para o composto RPF-111 o campo apresentado não corresponde a um multipeto mas sim a três sinais isolados, são eles: dois dubletos (3-ArH e 4-ArH) e um singleto (6-ArH), conforme consta no item “ANEXOS - I”.

A Tabela 9 traz os deslocamentos químicos de ^1H do composto RPF-252, o único representante da série II obtido até o momento.

Tabela 9: Principais deslocamentos químicos (δ = ppm) de RMN ^1H em CDCl_3 para a série IIA.

Composto	3, 4, 6-ArH (m, 3H)	7-OCH ₂ O (s, 2H)	8-CH ₂ (s, 2H)	9-CH ₂ (t, 2H)	15-CH ₂ (m, 2H)	11, 12, 13, 14-CH ₂ (m, 8H)	16-CH ₃ (t, 3H)
RPF-252	6,90-6,77	5,98	4,54	3,68	1,59-1,49	1,37-1,31	0,91

Nota: s = singleto; t = tripleto; m = multipeto.

Os compostos foram caracterizados, apresentando os sinais comuns a todas as estruturas, em regiões de campo semelhantes. Os sinais característicos dos análogos capsaicinóides de ambas as séries foram: um singleto de dois hidrogênios, atribuído ao grupo metilenodioxila ($-\text{OCH}_2\text{O}-$) do anel benzodioxólico, aparecendo sempre entre 6,00-5,91 ppm; um multipeto de três hidrogênios, referente aos hidrogênios 3, 4 e 6, ligados ao anel benzodioxólico, detectado entre 6,90-6,52 ppm; um dubleto de dois hidrogênios entre 4,22-3,79 ppm, relativo ao metileno (8-CH_2-), vizinho ao nitrogênio da ligação sulfonamídica, sinal esse atribuído somente para os compostos da série I, visto que para o composto sulfonato RPF-252, esse metileno apresentou-se como um singleto em 4,54 ppm (8-CH_2). Tal perfil de desproteção e multiplicidade são justificados, visto que para a série dos sulfonatos, os hidrogênios ligados ao carbono 8 não possuem outros hidrogênios em sua vizinhança, o que explica a formação do singleto. O fato do sinal ter se apresentado em campo mais baixo também é justificável. Esse fenômeno ocorreu devido a superior eletronegatividade do oxigênio vizinho a este metileno, quando comparada a eletronegatividade do nitrogênio das sulfonamidas da série I.

Para os compostos da série I, outro sinal mostrou-se comum a maioria das moléculas, se tratando justamente do hidrogênio da ligação sulfonamídica, o qual se apresentou como um tripleto ou singleto largo, típicos de hidrogênios ligados a nitrogênios, entre 5,14-4,41 ppm.

Alterações de campo foram observadas nos espectros de hidrogênio de determinados compostos. Foi detectado o deslocamento do sinal do hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação sulfonamida do composto *para*-nitro substituído (RPF-107), *para*-fenil (RPF-109), *meta* e *para*-amino (RPF-110 e RPF-111, respectivamente). A alteração ocorrida se deve a maior desblindagem eletrônica do hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação sulfonamídica. Foi constatado que, para estes compostos, o sinal do hidrogênio já citado foi deslocado da região de 4,50 ppm para uma região de campo mais baixo, em torno de 8,50-7,50 ppm. A Figura 20 demonstra a desblindagem eletrônica ocorrida no hidrogênio da ligação sulfonamídica do composto RPF-107 (*para*-nitro), em comparação com o sinal obtido para o composto RPF-106 (*para*-flúor).

Figura 20: Deslocamento de campo observado no sinal –NH do composto RPF-107.

O caráter elétron aceitor do grupo nitro, somado à sua *para*-substituição, pode estar envolvido na alteração deste perfil, visto que a natureza eletronegativa desses grupos confere forte densidade eletrônica aos mesmos, densidade esta intensificada pelo efeito ressonante, tipicamente observado em substituições promovidas na posição 4 do anel. O mesmo raciocínio se aplica para o composto *para*-fenil substituído (RPF-109), cujo forte caráter ressonante pode estar associado à desblindagem da ligação sulfonamídica. O efeito indutivo do grupamento amino, dos análogos RPF-110 e RPF-111, pode estar associado com a desblindagem promovida no nitrogênio

sulfonamídico, visto que o nitrogênio de aminas primárias aromáticas, por definição, compartilha seu par de elétrons livres com o sistema ressonante do anel, sendo pouco provável, portanto, que a ação ressonante esteja relacionada à desblindagem do hidrogênio sulfonamídico dessas moléculas (Clayden *et al.*, 2012).

O composto bifenílico RPF-109 apresentou sinais relativos à cadeia lateral destoantes dos demais compostos arílicos. Conforme demonstrado na Tabela 8, os hidrogênios ligados ao primeiro anel aromático, comum a todos os compostos da subsérie IB, sofreram, no caso do RPF-109, acúmulo de sinais, apresentando-se na forma de um singlete aparente (vide “ANEXOS - I”) de quatro hidrogênios, ao invés de dubleto ou duplo dubleto, como observado nos outros compostos. A característica ressonante do *para*-substituínte pode ser responsável por promover o acúmulo dos sinais relativos a estes hidrogênios.

A Figura 21 apresenta o espectro de RMN ^1H do composto RPF-151, como exemplo espectral dos compostos de cadeia alquílica (série IA).

Figura 21: Espectro de RMN ^1H obtido a partir do composto RPF-151.

As Tabelas 10 e 11 apresentam os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN ^{13}C das séries, IA e IB respectivamente.

Tabela 10: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C em CDCl_3 para a série IA.

Composto	R	C1	C2	C5	C4	C6	C3	C7	C9	C8
RPF-151	<i>n</i> -butil	148,1	147,4	130,8	121,4	108,4	108,3	101,2	53,1	47,1
RPF-152	<i>n</i> -octil	148,1	147,4	130,8	121,4	108,4	108,3	101,2	53,4	47,1
RPF-153	<i>n</i> -hexil	148,1	147,4	130,9	121,4	108,4	108,3	101,2	53,4	47,0
RPF-154	<i>n</i> -propil	148,1	147,4	130,8	121,3	108,4	108,3	101,2	55,1	47,1
RPF-155	etil	148,1	147,5	130,8	121,3	108,4	108,4	101,2	47,7	47,1
RPF-156	isopropil	148,1	147,4	131,2	121,3	108,4	108,3	101,2	53,9	47,4
RPF-157	isobutil	148,1	147,4	131,0	121,3	108,4	108,3	101,2	53,4	47,1

Tabela 11: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C em CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$ para a série IB.

Composto	R	C1	C2	C9	C5	C4	C6	C3	C7	C8
RPF-101		147,9	147,3	140,0	132,7	121,4	108,4	108,2	101,1	47,2
RPF-102		148,1	147,6	142,7	132,5	121,6	108,4	108,3	101,3	47,3
RPF-103		148,0	147,5	139,2	138,7	121,4	108,4	108,3	101,1	47,2
RPF-104		147,9	147,3	143,5	130,1	121,4	108,5	108,2	101,1	47,1
RPF-105		147,8	147,2	137,0	130,2	121,4	108,5	108,1	101,1	47,1
RPF-106		148,0	147,4	136,2	136,1	121,4	108,4	108,2	101,2	47,1
RPF-107		146,6	146,3	147,1	130,8	121,2	108,1	107,8	100,9	46,0
RPF-108		148,0	147,4	131,6	130,1	121,4	108,5	108,3	101,2	47,2

Continuação da Tabela 11: Principais deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C em CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$ para a série IB.

Composto	R	C1	C2	C9	C5	C4	C6	C3	C7	C8
RPF-109		147,1	146,2	143,8	131,3	121,0	108,1	107,8	100,8	46,0
RPF-110		147,1	146,2	141,1	131,6	120,8	108,0	107,8	100,8	45,8
RPF-111		147,1	146,2	128,4	131,6	120,8	108,0	107,8	100,8	45,8

Como pode ser observado, nos dados apresentados nas Tabelas 10 e 11, os sinais referentes aos carbonos comuns a todas as estruturas apresentaram padrões semelhantes de deslocamentos de campo. Os compostos RPF-107 (derivado *p*-nitro), RPF-109 (derivado *p*-fenil) e os compostos RPF-110 e RPF-111 (*m* e *p*-amino, respectivamente) foram os que apresentaram maior alteração de campo no carbono 8 (C-8), vizinho a ligação sulfonamídica. Era esperado o aumento de campo do sinal relativo ao C-8 desses compostos, uma vez que possuem substituintes capazes de provocar a desproteção do mesmo, e assim provocar a redução do campo desse sinal ao invés de sua elevação.

Para ilustrar o perfil dos espectros de RMN ^{13}C , a Figura 22 faz referência ao espectro do análogo RPF-101, representante da série arílica, e que assim, apresenta sinais dispostos em campo mais baixo que aqueles obtidos a partir de estruturas alquílicas, dada a desblindagem natural observada em sistemas aromáticos.

Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C obtido a partir do composto RPF-101.

Os sinais referentes ao carbono 9 (C-9) foram os que apresentaram maior variação de campo entre os compostos. Isso se deve ao fato do C-9 ser o primeiro carbono da cadeia lateral (região C), ligado ao átomo de enxofre da ligação sulfonamídica, tanto nas subséries IA e IB. Por se tratar de um carbono da cadeia lateral, onde há as variações de substituição aromática (subsérie IB), ou da ramificação/extensão da cadeia alquílica (subsérie IA), é esperado que o sinal do mesmo sofra variações de campo consideráveis, podendo se apresentar em regiões blindadas, entorno de 50 ppm, para C-9 alquílicos, como em regiões desblindadas, por volta de 140 ppm, para C-9 arílicos.

5.1.1.4. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (%CHN)

As análises elementares de todos os compostos sintetizados foram realizadas em duplicata e as médias aritméticas são apresentadas nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12: Dados de análise elementar (% CHN) dos compostos da série IA.

Composto	carbono			hidrogênio			nitrogênio		
	%teor.	%exp.	Δ%	%teor.	%exp.	Δ%	%teor.	%exp.	Δ%
RPF-151	53,12	53,13	0,01	6,32	6,39	0,07	5,16	5,14	0,02
RPF-152	58,69	58,68	0,01	7,70	7,85	0,15	4,28	4,25	0,03
RPF-153	56,16	56,66	0,50	7,07	7,13	0,06	4,68	4,58	0,10
RPF-154	51,35	51,44	0,09	5,88	6,11	0,23	5,44	5,55	0,11
RPF-155	49,37	49,18	0,19	5,39	5,54	0,15	5,76	5,68	0,08
RPF-156	51,35	51,64	0,29	5,88	6,15	0,27	5,44	5,33	0,11
RPF-157	53,12	53,14	0,02	6,32	6,42	0,10	5,16	5,10	0,06

Nota: teor. = teórico; exp. = experimental; Δ = variação (em módulo) entre os valores teóricos e experimentais.

Tabela 13: Dados de análise elementar (% CHN) dos compostos da série IB.

Composto	carbono			hidrogênio			nitrogênio		
	%teor.	%exp.	Δ%	%teor.	%exp.	Δ%	%teor.	%exp.	Δ%
RPF-101	57,72	57,77	0,05	4,50	4,61	0,11	4,81	4,79	0,02
RPF-102	50,00	49,95	0,05	3,60	3,69	0,09	8,33	8,25	0,08
RPF-103	51,62	51,60	0,02	3,71	3,87	0,16	4,30	4,18	0,12
RPF-104	59,00	58,65	0,35	4,95	4,94	0,01	4,59	4,56	0,03
RPF-105	62,23	62,18	0,05	6,09	6,22	0,13	4,03	3,92	0,11
RPF-106	54,36	54,12	0,24	3,91	3,97	0,06	4,53	4,45	0,08
RPF-107	50,00	50,03	0,03	3,60	3,80	0,20	8,33	8,10	0,23
RPF-108	56,06	56,06	-	4,70	4,76	0,06	4,36	4,33	0,03
RPF-109	65,38	64,49	0,11	4,66	4,91	0,25	3,81	3,50	0,31
RPF-110	54,89	54,86	0,03	4,61	4,60	0,01	9,14	9,14	-
RPF-111	54,89	54,89	-	4,61	4,61	-	9,14	9,14	-

Nota: teor. = teórico; exp. = experimental; Δ = variação (em módulo) entre os valores teóricos e experimentais.

Os resultados de análise elementar foram obtidos dentro dos limites de variação aceitáveis ($\pm 0,50\%$ de variação), o que corrobora os resultados obtidos na análise da faixa de fusão quanto ao grau superior de pureza obtido na purificação desses compostos. Nenhum composto apresentou problemas para ser avaliado.

5.2. Atividade biológica *in vitro*

O ensaio de biorredução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), ou sal de tetrazólio, é um método colorimétrico de avaliação da atividade metabólica celular (Azziz, 2006; Billack; Radkar; Adiabouah, 2008). O produto final, formazan, de cor azul escura, insolúvel em meio aquoso, pode ser quantificado por espectrofotometria, após lise celular induzida e

solubilização em solvente adequado, como o dimetilsulfóxido (DMSO) (Scherließ, 2011; Vituri *et al.*, 2008). O fundamento desta técnica baseia-se em traçar uma correlação entre a quantidade de formazan produzido e a concentração de células viáveis no meio, assim, quanto maior for a concentração de células vivas, maior será a taxa de biotransformação do MTT e dessa forma, a concentração do produto reduzido (Azziz, 2006).

Com isso, é possível se estimar a taxa de proliferação e viabilidade celular, estando estas células, expostas aos produtos sintetizados neste trabalho. O principal problema observado nos ensaios biológicos foi a dificuldade de solubilizar os compostos mais lipofílicos. Caso haja precipitação do produto no meio de cultura, não pode ser afirmado que este exerceu ação inibitória por interação ligante-alvo, ou por determinada via de indução apoptótica, visto que tal atividade possa estar associada com interações físicas com as células fixas à placa. Dessa forma estratégias de solubilização tiveram de ser adotadas para os compostos mais lipofílicos, para que então fossem viabilizados os ensaios *in vitro*. Primeiramente foram preparadas soluções 5 mM de todos os compostos em DMSO e a partir destas soluções, diluições sucessivas foram realizadas até a concentração de 10 µM. É importante para a correta condução dos ensaios que, a concentração final de DMSO seja de no máximo 1%, visto que é amplamente conhecido o potencial citotóxico deste solvente, quando em concentrações superiores a 2% (Brayton, 1986).

Como já citado, o ensaio de MTT se dá pela ação de redutases intracelulares que convertem o sal de MTT em formazan, detectado por espectrofotometria. Em situações onde o produto a ser testado possui características redutoras, como por exemplo, substâncias com comportamento antioxidante, este pode reduzir o MTT a formazan e ainda assim inibir o crescimento celular. O resultado deste evento é a geração de resultados falso-negativos, visto que o composto antioxidante estará mimetizando a atividade metabólica normal da célula. Caso algum composto apresentasse indícios de atividade antioxidante, seria utilizado como metodologia alternativa a contagem de células viáveis por azul de tripan, porém não foi necessário fazer uso da mesma, visto que nenhum composto apresentou indícios de ação antioxidante.

5.2.1. Atividade sobre MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10

Conforme proposto neste trabalho, todos os compostos sintetizados, purificados e totalmente caracterizados, foram ensaiados nas linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231), de melanoma murino (B16F10) e em linhagens sadias de fibroblasto (3T3). Para comparação de atividade, a capsaicina também foi ensaiada nas mesmas linhagens e nos mesmos experimentos.

Dos análogos ensaiados, sendo estes 17 no total, visto que o análogo sulfonato (RPF-252) não apresentou estabilidade, quatro compostos apresentaram atividade biológica e tiveram os seus respectivos IC_{50} determinados, como mostra a Tabela 14.

Tabela 14: Inibição do crescimento celular (IC_{50} em μM) nas linhagens tumorais e em fibroblasto (linhagem 3T3).

<div style="text-align: center;"> </div>					
Composto	R	Linhagens – IC_{50} em μM			
		MCF-7	MDA-MB-231	B16F10	3T3
capsaicina		53,0	21,7	117,0	83,0
RPF-101		32,0	14,2	50,0	> 200
RPF-105		> 200	75,0	120,0	> 200
RPF-151		28,0	10,4	38,0	> 200
RPF-152		> 200	109,0	75,0	> 200

Os compostos foram ensaiados nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50; 100 e 200 μM e, como pode ser observado da Tabela 14, nenhum dos análogos ativos mostrou citotoxicidade frente às culturas sadias de fibroblasto, o que pode sugerir ação seletiva destas moléculas frente a células

malignas, o que, do ponto de vista clínico, pode ser útil para a redução do elevado número de efeitos adversos, tipicamente associados aos tratamentos oncológicos.

O emprego de fibroblasto para determinação de citotoxicidade em linhagens saudáveis se deu devido à *expertise* do Laboratório de Imunologia de Tumores no cultivo de linhagens dessa natureza. Com os resultados obtidos, seria possível prever efeitos tóxicos, por parte dos análogos, sobre linhagens celulares saudáveis.

Os compostos RPF-101 e RPF-151 foram os únicos análogos que apresentaram atividade biológica sobre as três linhagens triadas (MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10). O menor valor de IC₅₀ obtido foi relativo ao composto RPF-151 quando aplicado em cultura de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231, igual a 10,4 µM.

A inibição promovida pelo análogo RPF-151 ocorreu na metade da concentração apresentada pela capsaicina, sendo os valores de IC₅₀ respectivamente: 10,4 e 21,7 µM. Esses resultados mostram que o análogo sintetizado apresentou incremento de atividade quando comparado ao seu protótipo.

Ao comparar os valores de inibição apresentados pelo análogo RPF-151 e RPF-152, o primeiro com 4 átomos de carbono em sua cadeia lateral e o segundo com 8 átomos de carbono, pode ser observada a redução de cerca de dez vezes a atividade do último em relação ao primeiro (IC₅₀ iguais a 10,4 e 109,0 µM, respectivamente). Esse fato chama a atenção quanto às propriedades lipofílicas e ao tamanho da cadeia lateral destes análogos, propriedades que podem estar intimamente correlacionadas com a importante alteração no perfil de atividade biológica dos mesmos.

O mesmo raciocínio se aplica aos análogos RPF-101 e RPF-105, os quais apresentaram ação inibitória sobre MDA-MB-231 de 14,2 e 75 µM respectivamente, onde a inserção do grupo *terc*-butila (volumoso e lipofílico) na posição *para* do anel pode ter gerado a redução da atividade do análogo RPF-105.

Os compostos RPF-151 e RPF-101 mostraram-se ativos frente a culturas de adenocarcinoma mamário caspase 3 mutada (linhagem MCF-7), bem como em linhagens mais invasivas, como é o caso da linhagem MDA-MB-231.

A MDA-MB-231 é conhecida por ser uma clássica linhagem tripla negativa, ou seja, por não expressar receptores de estrógeno, progesterona e de fator de crescimento transdérmico ou epidermal (HEGF), sendo classificado como um adenocarcinoma mamário mais agressivo e metastático quando comparado a outras linhagens neoplásicas de mama, como a MCF-7.

Este fato revela a importância dos resultados obtidos para as moléculas RPF-101 e RPF-151, que apresentaram atividade biológica duas vezes superior sobre células MDA-MB-231 ($IC_{50} = 14,2$ e $10,4 \mu M$, respectivamente) do que em MCF-7 ($IC_{50} = 32,0$ e $28 \mu M$, respectivamente), sendo estas atividades inibitórias superiores à apresentada pelo protótipo, a capsaicina, sobre a linhagem MDA-MB-231, a qual que obteve $IC_{50} = 21,7 \mu M$.

O fato dos compostos, em geral, terem apresentado atividade citotóxica inferior em MCF-7, quando comparado à MDA-MB-231, pode fornecer importantes indícios quanto ao mecanismo de indução de morte destes compostos. O fato da linhagem MCF-7 expressar caspase-3 em sua forma truncada, isto é, sem sua atividade proteolítica normal, faz com que essa linhagem seja naturalmente mais resistente à ação de fármacos que atuam induzindo direta, ou indiretamente, a atividade de caspase-3. Portanto, a evidência da atividade inferior dos análogos em linhagem caspase-3 truncada levantou indícios quanto à possível ação destes via ativação de caspase-3.

Face ao exposto, estudos complementares de elucidação mecanística foram procedidos para os análogos mais ativos, o RPF-101 e RPF-151, e os mesmos são apresentados nos itens 4.3.4. e 4.3.5. deste trabalho.

5.2.2. Triagem realizada em linhagens complementares

A triagem complementar foi realizada com o objetivo de se identificar linhagens em que os análogos sintetizados neste trabalho pudessem apresentar atividade. Assim, os 18 análogos sintetizados neste trabalho foram ensaiados em linhagens adicionais de melanoma, adenocarcinoma e glioblastoma. A Tabela 15 apresenta os resultados de atividade biológica complementar, também realizado pelo método de biorredução do MTT, sobre as linhagens A2058 (melanoma humano), HCT116 (adenocarcinoma colorretal), HeLa (adenocarcinoma cervical) e U87 (glioblastoma).

Tabela 15: Determinação do IC₅₀ nas linhagens tumorais adicionais e em fibroblasto (linhagem 3T3).

<div style="text-align: center;"> </div>						
Linhagens – IC ₅₀ em µM						
Composto	R	A2058	HCT116	HeLa	U87	3T3
capsaicina		200,0 ¹	ND	ND	ND	83,0
RPF-105		56,0	32,0	> 200	> 200	> 200
RPF-152	n-octil	34,0	30,0	100,0	> 200	> 200

¹Dado obtido por Jun *et al.* (2007), que utilizou a mesma metodologia usada neste estudo para determinação da IC₅₀.
ND – IC₅₀ não determinada.

Dois análogos sintetizados, RPF-105 e RPF-152, apresentaram atividade biológica na triagem expandida. Como pode ser observado na Tabela 15, nenhum dos 18 análogos ensaiados mostraram atividade frente à linhagem de glioblastoma (U87), a mais incidente e agressiva neoplasia cerebral conhecida, cujo prognóstico médio dos indivíduos acometidos raramente ultrapassa quinze meses (Clark *et al.*, 2010).

O análogo RPF-152 mostrou atividade citotóxica frente a adenocarcinoma colorretal, linhagem HCT116, e sobre melanoma humano, linhagem A2058, cujas IC₅₀ foram iguais a 30,0 e

34,0 μM , respectivamente. O análogo RPF-105 também apresentou atividade sobre A2058 e HCT116 ($\text{IC}_{50} = 56,0$ e $32,0 \mu\text{M}$, respectivamente).

Somente o composto RPF-152 apresentou modesta atividade sobre células HeLa, provenientes de adenocarcinoma cervical ($\text{IC}_{50} = 100,0 \mu\text{M}$).

Para a avaliação da capacidade, superior ou inferior, de indução de apoptose, é necessária a comparação dos valores de IC_{50} dos análogos sintetizados com o obtido pelo ensaio de seu protótipo, no caso a capsaicina. Portanto, a análise inicial dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade complementares deve ser feita com cautela, uma vez que não é possível se traçar comparativos com a atividade apresentada pela capsaicina, visto que a mesma não foi ensaiada sobre as linhagens adicionais. Portanto, a determinação da IC_{50} da capsaicina para essas linhagens é necessária para a prudente mensuração e comparação da atividade dos análogos sintetizados em comparação ao protótipo.

Em análise prévia, Jun *et al.* (2007) através do mesmo ensaio proposto neste estudo, o ensaio de MTT, obteve valores de citotoxicidade para a capsaicina, sobre linhagens de melanoma humano (A2058) da ordem de $200,0 \mu\text{M}$. Esse dado permite inferir a atividade duas vezes superior dos análogos RPF-152 e RPF-105, porém, para maior confiabilidade comparativa, a determinação da IC_{50} da capsaicina frente a linhagem A2058 deve ser procedida.

5.3. Correlação entre os análogos ativos e a estrutura capsaicinóide

A Figura 23 apresenta a fórmula estrutural dos quatro análogos sintetizados, que se mostraram ativos frente a diferentes linhagens celulares. Com os resultados de atividade biológica, algumas hipóteses podem ser levantadas quanto as modificações moleculares aplicadas à capsaicina.

O fechamento do anel proposto para a região A da estrutura dos análogos capsaicinóides, foi resultante da substituição do sistema 1-metil catecólico presente na capsaicina, por um anel

benzodioxólico. Esta modificação molecular, aparentemente não comprometeu a bioatividade destes análogos.

A região B do protótipo, que compreende a ligação amida proveniente da condensação de ácidos graxos com a vanililamina, metabolismo tipicamente observado em espécies do gênero *Capsicum* (Takikawa *et al.*, 2002), sofreu substituição bioisostérica por ligação sulfonamídica, presente em muitos antineoplásicos. Tal função, ao ser inserida às estruturas análogas, parece não ter comprometido a atividade biológica dos análogos.

Figura 23: Análogos capsaicinóides sintetizados, que apresentaram atividade biológica.

A região C dos análogos, principal subunidade de variação estrutural das séries planejadas, contempla substituintes que alteram principalmente a rigidez e a lipofilicidade das moléculas sintetizadas, permitindo assim que sejam avaliadas a influência de fatores estéricos e lipofílicos na atividade biológica dos compostos. Conforme mostra a Figura 23, dois compostos ativos possuem cadeia alquílica na região C, semelhante à cadeia capsaicinóide e, os outros dois, contém grupos aromáticos e rígidos. Esses dados caracterizam o fato de que a atividade destes análogos pode não estar associada à flexibilidade da estrutura capsaicinóide, visto que moléculas rígidas se mostraram ativas.

5.3.1. RPF-101: estudos mecanísticos complementares

O composto RPF-101 (Figura 24) foi a primeira molécula a dar início aos ensaios biológicos deste trabalho. Devido aos dados obtidos, estudos complementares foram realizados em parceria com o Laboratório de Genética do Instituto Butantan e com o Laboratório de Imunologia de Tumores do Instituto de Ciências Biomédicas, tendo-se em vista a elucidação mecanística da indução apoptótica causada pelo análogo.

RPF-101

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmetil)benzenosulfonamida

Figura 24: RPF-101, primeiro análogo ensaiado em cultura celular a apresentar atividade citotóxica.

Os estudos de elucidação mecanística acerca do RPF-101 renderam a primeira prova de conceito deste trabalho, publicada em periódico voltado para pesquisas desta natureza (De-Sá-Junior *et al.*, 2013). Em De-Sá-Junior *et al.* (2013) foi possível determinar que o composto RPF-101, ao ser exposto à linhagem MCF-7 de adenocarcinoma mamário, foi capaz de comprometer a formação da rede de microtúbulos, essencial para o surgimento dos fusos mitóticos, o que resultou na permanência das células tratadas em fase G₂/M, impedindo a proliferação destas, além de induzir a sinalização apoptótica.

Como pode ser observado na Tabela 16, o composto RPF-101 obteve valores de IC₅₀ superiores em outras linhagens triadas no estudo, porém os resultados mais expressivos e que foram discutidos, referem-se à atividade sobre MCF-7, que se mostra uma linhagem tumoral de grande incidência em pacientes do sexo feminino e que, portanto, desperta grande interesse científico (INCA, 2013). Para esta publicação foi realizado uma triagem mais abrangente frente a outras linhagens celulares, onde foi constatada atividade do composto em novas linhagens de melanoma (Tabela 16).

É válido ressaltar que os respectivos valores de atividade biológica obtidos mostraram-se superiores ou próximo aos obtidos nos ensaios com capsaicina, o que infere o potencial promissor da molécula RPF-101 em orientar estudos de otimização molecular, que possibilitam planejar novos compostos potencialmente mais ativos frente às linhagens tumorais abordadas neste trabalho.

Tabela 16: *Screening* biológico realizado por De-Sá-Junior *et al.* (2013).

Linhagens	concentração inibitória 50% (IC ₅₀) - μ M	
	RPF-101	Capsaicina
Adenocarcinoma mamário – MCF-7	32,0	53,0
Adenocarcinoma mamário – MDA-MB-231	14,2	21,7
Melanoma – SK-MEL-28	19,1	14,1
Melanoma – Sbc12	17,5	20,1
Melanoma – Mel-85	15,7	15,2

Além dos ensaios de viabilidade celular, foram realizados estudos de indução apoptótica por alaranjado de acridina e iodeto de propídio, que permitem diferenciar processos apoptóticos de sinalizações necróticas. Estudos adicionais foram feitos através do ensaio de fragmentação de DNA, determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta m\Psi$) e também cultura celular tridimensional (3D), para análise de possíveis alterações morfológicas nas células tumorais.

Os resultados desses ensaios indicaram que o RPF-101 promoveu, em cultura celular 3D, alterações morfológicas consideráveis nas células tumorais que, em condições normais, adquirem formato esferoide na matriz tridimensional, mas que, ao serem tratadas com RPF-101, não apresentaram tal característica, além de ter sido observado na cultura encolhimento celular e piquinose, indícios típicos de processos apoptóticos. Os ensaios de alaranjado de acridina e iodeto de propídio corroboraram esses fatos e foram capazes de detectar a indução superior de apoptose pelo RPF-101, se comparado com a sinalização de morte promovida pela capsaicina, que foi mediada majoritariamente via necrose.

A análise de fragmentação de DNA, feita através de eletroforese em gel de agarose 2%, confirmou a ocorrência de fragmentos de 200 pares de base (bp) em células tratadas com RPF-101, fato não observado no tratamento com capsaicina. Esses resultados sustentam a hipótese de indução apoptótica promovida por este composto e a distinta via de sinalização de morte celular mediada pelo análogo, o RPF-101, e seu protótipo, a capsaicina.

O ensaio de determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi$) é um método tradicional de avaliação de sinalização apoptótica mediada pela via intrínseca. O tratamento com RPF-101 gerou despolarização mitocondrial, evento essencial para o extravasamento de citocromo *c*, responsável por dar prosseguimento ao evento intrínseco de apoptose.

Em microscopia confocal foi possível detectar que as células tratadas com RPF-101 apresentaram estagnação entre as fases G₂ e M do ciclo celular, compreendendo a fase posterior a síntese de DNA (fase S) e anterior à mitose (fase M). Células que permanecem nessa fase do ciclo celular normalmente apresentam problemas de formação dos fusos mitóticos, comprometendo assim a correta divisão celular. Foi justamente esse fato que foi observado quando na exposição das células ao RPF-101, conforme mostra a Figura 25.

Figura 25: Comprometimento mitótico gerado pelo RPF-101, adaptado de De-Sá-Júnior *et al.* (2013).

Como podem ser observadas, as setas brancas indicadas na microscopia confocal da cultura não tratada mostra a correta formação das redes de tubulina, coradas por isotiocianato de fluoresceína (em verde), e a condensação das cromátides, coradas com iodeto de propídio (em vermelho), em células presentes na fase M, ocasionando a correta formação dos fusos bipolares. Já a cultura tratada com RPF-101 (32 μ M) apresenta total colapso da rede de microtúbulos, sugerindo (em vermelho) cariorrexe, ou seja, fragmentação do conteúdo nuclear.

5.3.2. RPF-151: estudos mecanísticos complementares

Com as informações coletadas a respeito do análogo RPF-101, decidiu-se expandir os estudos mecanísticos a respeito da atividade biológica dos análogos sulfonamídicos.

A sequência desses estudos foi conduzida sobre o arcabouço do análogo mais ativo sobre a linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231, tendo em vista a natureza agressiva e o péssimo prognóstico de tumores triplo negativos. Assim, os estudos complementares realizados enfocaram o RPF-151 (Figura 26), que foi ativo em MDA-MB-231 a 10,4 μ M.

RPF-151

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmetil)butano-1-sulfonamida

Figura 26: RPF-151, o análogo mais ativo em MDA-MB-231, cujo estudo do mecanismo de indução apoptótica foi aprofundado.

Em Tavares *et al.* (2014) além da caracterização por cristalografia de raios-X, foi avaliada a capacidade do análogo RPF-151 em atuar com agente antiproliferativo. Essa avaliação de capacidade antiproliferativa foi realizada em linhagem celular proveniente de veia de cordão umbilical (*human umbilical vein endothelial cell* – HUVEC, ATCC®).

O resultado desse estudo revelou que o análogo RPF-151 reduziu significativamente o crescimento celular da linhagem HUVEC a 10 μ M, como mostra a Figura 27.

Figura 27: Efeito do composto RPF-151 no crescimento celular de linhagens HUVEC.

Para confirmar a atividade inibitória, a ação do análogo RPF-151 sobre HUVEC, a 10 µM foi investigada por citometria de fluxo (Figura 28a). Surpreendentemente, o efeito antiproliferativo (Figura 28b) apresentado pelo análogo, não foi acompanhado de ação citotóxica, isto é, não foram observadas morte celular tampouco alterações na morfologia normal das células, apenas redução na taxa proliferativa (Figura 28c).

Figura 28: Inibição da proliferação de células HUVEC promovida pelo RPF-151 a 10 µM. **(a)** Gráfico de pontos obtido na avaliação de proliferação celular por citometria de fluxo. Representação do tamanho celular (no eixo *forward scatter* - FSC) e da complexidade celular (no eixo *sideward scatter* - SSC). **(b)** Percentual comparativo de proliferação celular obtido por citometria de fluxo. **(c)** Como pode ser notado, o tratamento com RPF-151 não induziu mudanças morfológicas e nem morte celular, indicando ausência de efeito citotóxico em HUVEC.

Esses resultados sugerem que o análogo sulfonamídico RPF-151 possa suprimir o desenvolvimento de vasos sanguíneos e assim impedir o desenvolvimento ou a evolução da angiogênese, em sua fase de crescimento e/ou de proliferação.

Com os resultados de atividade antiproliferativa, foram procedidos os estudos adicionais de elucidação mecanística da indução de apoptose promovida pelo composto. Estudos conduzidos por Ferreira *et al.* (2014) em cultura celular de MDA-MB-231 constatou que o composto RPF-151 promoveu interrupção do ciclo celular na fase S (Figura 29a), onde ocorre a síntese do DNA, fato este associado à redução da expressão de moduladores do ciclo celular, no caso, de ciclinas A, D1 e D3, e também da proteína p21, todos estes, fatores importantes para a progressão do ciclo celular, (Figura 29b).

Figura 29: RPF-151 induz parada celular em fase S, estímulo apoptótico e redução de moduladores celulares. **(a)** Citometria de fluxo do conteúdo celular da linhagem MDA-MB-231 tratada com RPF-151 a 87 e 174 µM, e também de células não tratadas. Os tratamentos com RPF-151 a 87 e 174 µM induziu parada do ciclo celular em fase S, levando à apoptose (observada pela formação do sub pico G1 em azul claro). **(b)** Western blot realizado para os moduladores de ciclo celular ciclina A, D1, D3, p21 e β actina. RPF-151 a 25 e 50 µM causou redução das ciclinas A, D1, D3 e de p21.

Como pode ser observado na Figura 29b, o análogo não reduziu a expressão de β actina, o que evidencia a indução de morte celular via apoptose e não por colapso ou comprometimento do citoesqueleto, mecanismo relacionado a atividade antitumoral de fármacos com o paclitaxel.

Face as evidências coletadas, os eventos relacionados aos estímulos de indução de apoptose passaram a ser investigados. Avaliado por microscopia fluorescente utilizando o corante MitoTracker Red, foi constatado que o análogo RPF-151 foi capaz de gerar despolarização da membrana mitocondrial de maneira dose-dependente (Figura 30a). Na Figura 30b é possível observar que o composto reduziu a taxa de expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e também elevou a taxa de atividade de caspase-3, levando a clivagem do citoesqueleto e consequente formação de corpos apoptóticos, ensaio realizado por citometria de fluxo.

Figura 30: (a) O composto RPF-151 gerou despolarização de membrana mitocondrial. (b) O tratamento com RPF-151 promoveu redução da expressão de Bcl-2 e elevação da atividade de caspase-3.

Como os análogos sintetizados neste trabalho tiveram seu planejamento baseado no arcabouço molecular da capsaicina, decidiu-se investigar a capacidade do análogo RPF-151 em promover estímulo de receptores do tipo TRPV, visto que este é o receptor responsável pela resposta pungente observada na exposição de mucosas (de mamíferos) à capsaicina (Caterina; Julius, 2001). O objetivo desta investigação se deve ao fato da ação pungente observada no tratamento com capsaicina ser um dos principais fatores limitantes do seu emprego na terapêutica (Ludy *et al.*, 2012).

Em Ferreira *et al.* (2014), a capacidade do análogo RPF-151 de estimular TRPV foi mensurada pelo método de Hargreaves (Hargreaves *et al.*, 1988). Inicialmente os animais, camundongos Wistar, foram tratados com 50 μ L de injeção intraplantar na pata posterior (traseira) de solução de capsaicina a 1 nM (grupo controle positivo) e com o composto RPF-151 na mesma concentração. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina 0,8%. A resposta de hiperalgesia térmica foi avaliada nos tempos 0, 2, 15, 30 e 60 minutos após o tratamento. A Figura 31 apresenta o resultado do ensaio.

Figura 31: Avaliação da capacidade de indução de hiperalgesia do composto RPF-151.

Como pode ser observado, o análogo RPF-151, diferente de seu protótipo, a capsaicina, não gerou hipersensibilidade nos animais tratados, sendo que estes foram mais tolerantes ao estímulo térmico se comparados ao grupo tratado com capsaicina. Esses resultados indicam a possibilidade do análogo não atuar sobre receptores vanilóides (TRPV) e, portanto, não possuir a mesma resposta nociceptiva observada pela capsaicina.

Faz-se necessário relatar que os ensaios procedidos em animais contaram com a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais do Instituto Butantan – CEUAIB, sobre o registro protocolar número 803/11.

O fato do composto RPF-151 não ter promovido hiperalgesia como a capsaicina, motivou a investigação da atividade antitumoral do composto em modelos *in vivo*. Ferreira *et al.* (2014) demonstrou que camundongos *nude* atímicos (que não possuem timo), previamente inoculados com injeção subcutânea de células MDA-MB-231 no flanco traseiro direito, quando tratados 15 dias com RPF-151, na dose de 70 mg/kg e administração intraperitoneal, apresentaram importante inibição do crescimento da massa tumoral. A Figura 32 ilustra o estudo realizado.

Figura 32: Avaliação da atividade antitumoral do RPF-151 em modelo *in vivo*. (a) Os animais tratados por 15 dias com RPF-151 não apresentaram crescimento significativo da massa tumoral inicial, e indica que o mesmo promoveu ação supressora de crescimento superior à capsaicina. (b) O tratamento dos animais com o composto RPF-151 em menor concentração (70 mg/kg) promoveu inibição do crescimento da massa tumoral superior à inibição apresentada pela capsaicina (na concentração de 90 mg/kg).

Como pode ser observado na Figura 32, 15 dias de tratamento com RPF-151 inibiu consideravelmente o crescimento e evolução da massa tumoral (linhagem é MDA-MB-231). A atividade inibitória observada para o análogo foi muito superior a apresentada pela capsaicina, a qual foi ensaiada em uma dose superior (90 mg/kg), o que enaltece a atividade obtida para o RPF-151.

Nos ensaios *in vivo* faz-se necessário ressaltar que a tolerabilidade de mucosas à exposição contínua a capsaicina é uma problemática constante, devido a sua ação pungente e irritante, principalmente em aplicações intraperitoneais, com as utilizadas nos estudos *in vivo*. Neste estudo, Ferreira *et al.* (2014) observou que o grupo de animais tratados com RPF-151 foram bem tolerantes ao mesmo, indicando uma vantagem adicional obtida pelo composto. A Figura 33 apresenta o portfólio de benefícios obtidos no desenvolvimento e estudo do composto RPF-151, construído ao longo da execução deste trabalho.

Figura 33: Portfólio do composto RPF-151, o mais ativo análogo obtido neste trabalho.

Como demonstra a Figura 25, os estudos realizados com o composto RPF-151 revelaram que o mesmo possui vantagens consideráveis no que se refere ao tratamento de massas tumorais em estágios avançados, que apresentam nutrição direta, ou seja, vascularização. Esta afirmação é comprovada pelo fato do RPF-151 induzir a apoptose (seletiva às células tumorais), e também possuir ação antiproliferativa de células HUVEC. Esta evidência demonstra a habilidade do análogo em atuar em processos tumorais distintos, sendo eles: a angiogênese e a proliferação da massa tumoral. É válido ressaltar que o benefício proveniente da suposta ação antiangiogênica apresentada pelo RPF-151, possui o complemento de não apresentar efeito citotóxico aos tecidos adjacentes ao

loco tumoral, fato comprovado pelos estudos de Tavares *et al.* (2014), que demonstraram ausência de morte e de alterações morfológicas de células íntegras e sadias.

Por fim, outra vantagem biológica importante que pode ser elencada no desenvolvimento do composto RPF-151, é o fato do mesmo apresentar atividade em modelos *in vivo*. Para Nicolaou (2014) esta etapa representa um dos principais gargalos do processo de desenvolvimento de fármacos, que é responsável por impedir a maioria dos compostos estudados em laboratório, aos ensaios pré-clínicos avançados, o que enaltece os resultados de atividade em modelo animal, obtidos para o composto RPF-151.

5.4. Estudos de modelagem molecular

Dentre os objetivos iniciais deste trabalho, foi proposto a construção de um modelo de HQSAR. Assim como outros métodos quantitativos de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos, o HQSAR necessita de dois requisitos básicos para que o modelo gerado seja robusto e confiável, sendo eles a variabilidade estrutural (da série estudada), e a variabilidade de atividade biológica, ou seja, a série deve conter análogos ativos; análogos com atividade discreta; e análogos sem atividade, ou com atividade biológica extremamente baixa (Castilho *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 2003).

Como pôde ser observado nos resultados de atividade biológica, apenas os compostos RPF-101 e RPF-151 apresentaram atividade superior ao protótipo frente a MDA-MB-231 e MCF-7, e somente dois compostos, o RPF-105 e RPF-152, apresentaram atividade inferior a da capsaicina em MDA-MB-231, sendo inativos em MCF-7. Portanto, dada a limitação de correlação estatística imposta pelo reduzido número de compostos ativos, foram aplicados estudos teóricos alternativos de determinação de propriedades físico-químicas.

Os resultados e discussões dos estudos *in silico* serão apresentados na seguinte ordem: construção dos modelos 3D da capsaicina e dos análogos RPF-101 e RPF-151; cálculo de propriedades moleculares e cálculo das propriedades da “Regra dos Cinco” de Lipinski.

5.4.1. Construção dos modelos 3D da capsaicina e dos análogos RPF-101 e RPF-151

Durante a realização da simulação de DM, foi avaliada a integridade estrutural dos confôrmeros isolados (arquivo *output* da minimização) em comparação à estrutura inicial utilizada (o arquivo de *input* utilizado na simulação de DM). Essa avaliação foi procedida utilizando como critério os valores de RMSD (*root-mean-square deviation*) calculados no programa Hyperchem 8.0.

A avaliação de integridade estrutural feita por cálculo de RMSD indica a diferença (em Å) entre os átomos da estrutura inicial e da estrutura posterior à simulação de DM. Assim, quanto menores forem os valores de RMSD, menores serão as distâncias em Å entre os confôrmeros, indicando assim a preservação da integridade estrutural após a DM (Baber *et al.*, 2009).

Neste trabalho o valor de RMSD obtido para o confôrmero de menor energia da capsaicina (obtido após a DM), e a estrutura minimizada da mesma, foi igual a 0,24 Å. Conforme dito no ítem 4.2.6.1, a cadeia carbônica da capsaicina (região C) não estava contida na estrutura utilizada como modelo 3D de construção. Assim, o valor de 0,24 Å, superior ao limite desejável de 0,1 Å, pode ser justificado, devido ao fato desta cadeia carbônica possuir elevado grau de liberdade o que, naturalmente, pode conferir valores de RMSD superiores a 0,1 Å.

Os valores de RMSD obtidos na comparação das estruturas pós minimização de energia dos análogos RPF-101 e RPF-151 com as estruturas cristalografadas iniciais, foram iguais a $2,5 \times 10^{-5}$ Å e $1,4 \times 10^{-3}$ Å, respectivamente. Esses valores de RMSD, inferiores ao limite máximo aceitável 0,1 Å, indicam que a integridade estrutural dos modelos foi mantida após minimização de energia.

O gráfico da simulação de DM realizada para a capsaicina, de seus confôrmeros em relação à energia total, foi construído. A energia total (E_{TOT}) corresponde à somatória das contribuições das energias intramoleculares de deformação axial (E_{STRECH}), deformação angular (E_{BEND}), deformação torsional (E_{TORS}), interações do tipo 1-4 (E_{1-4}), interações de van der Waals (E_{vdW}) e 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 para a construção dos gráficos de DM.

A contribuição das energias intramoleculares de ligação de hidrogênio (E_{ligH}) e de solvatação (E_{SOLV}) foram calculadas somente para os confômeros isolados do perfil de amostragem conformacional (PAC), visando a redução do custo computacional exigido na execução dos cálculos. O Gráfico 1 e a Tabela 17 apresentam a dinâmica realizada, bem como o confômero escolhido na simulação.

Com o isolamento do confômero de menor energia da capsaicina, e com as estruturas dos análogos minimizadas, foram realizados os cálculos de propriedades físico-químicas dos mesmos.

5.4.2. Cálculo de propriedades moleculares

Calcularam-se as propriedades eletrônicas (cargas CHELPG, mapa de potencial eletrostático e momento de dipolo) e lipofílicas (ClogP, mapa de potencial lipofílico e ClogD) dos análogos ativos e da capsaicina (composto protótipo) para fins de comparação e para tentar estabelecer possíveis tendências em relação aos dados biológicos observados.

Em relação às propriedades eletrônicas, as cargas CHELPG representam de forma satisfatória o potencial eletrostático molecular, em um conjunto de pontos pré-definidos ao redor da molécula (Guadagnini *et al.*, 1996). O programa Gaussview 5.0 (Gaussian, Inc. 1995-2004, Pittsburgh, PA, EUA) foi empregado para visualizar os mapas de potencial eletrostático (MPE), calculados em superfície molecular Connolly. A interpretação do MPE se baseia em um esquema de cores que varia de acordo com o programa utilizado para a visualização gráfica. Neste estudo, as regiões de maior distribuição de densidade eletrônica são indicadas em vermelho intenso (-0,08), enquanto que as regiões de menor distribuição de densidade eletrônica estão em azul intenso (+0,08), de acordo com a Tabela 20.

Gráfico 1: Perfil de amostragem conformacional (PAC) da capsaicina gerado na simulação de DM de 1 ns a 310 K: eixo x corresponde ao número de passos da simulação (cada passo igual a 1 fs), e o eixo y corresponde à energia (kcal/mol). A seta em vermelho indica o passo escolhido para isolamento do conformero. A energia corresponde à soma das contribuições de energia intramolecular de deformação axial (E_{STRECH}), de deformação angular (E_{BEND}), de deformação torsional (E_{TORS}), de tipo 1-4 (E_{1-4}), de van der Waals (E_{vdW}) e de carga ou eletrostática (E_{CHARGE}). As contribuições de energia de ligação de H e de solvatação não foram computadas durante a simulação, mas calculadas para os conformeros selecionados do PAC.

Tabela 17: Dados conformero escolhido e isolado na simulação de DM da capsaicina.

	E_{STRECH} (kcal/mol)	E_{BEND} (kcal/mol)	E_{TORS} (kcal/mol)	E_{1-4} (kcal/mol)	E_{vdW} (kcal/mol)	E_{CHARGE} (kcal/mol)	E_{SOLV} (kcal/mol)	E_{ligH} (kcal/mol)	E_{TOT} (kcal/mol)	RMSD^1 (Å)
capsaicina	+9,74	+18,11	+6,26	+12,22	-1,25	-6,44	-1,37	-5,46	+31,81	0,24

¹Valor de RMSD entre a estrutura minimizada e o conformero selecionado da simulação de DM.

O momento de dipolo (μ), por definição, é o vetor resultante da somatória de todos os vetores de carga parciais positivas e negativas da molécula em questão, que leva em conta as distâncias destas cargas em relação ao centro geométrico da molécula (centroide). Esta propriedade molecular está relacionada com a polaridade do composto e permite realizar análises quanto às características geométricas (Dugdale, 1993). A visualização dos vetores de momento de dipolo dos análogos ativos e da capsaicina seguem representados por setas azuis na Figura 34, e foi calculado no programa Gaussian 03W[®] 6.0 (Gaussian, Inc. 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA).

A interpretação das cargas atômicas parciais de potencial eletrostático (Figura 34, a direita), neste caso, é indicada pela coloração que cada átomo possui. Neste estudo, átomos com coloração vermelha intensa possuem elevada densidade eletrônica, e valor igual -0,594. Já os átomos com coloração verde intensa possuem baixa densidade eletrônica, e valor igual a +0,594.

Como mostra a Figura 34, a conversão do sistema metilcatecólico capsaicinóide (região A), no sistema benzodioxólico dos análogos, gerou alteração na distribuição eletrônica da região. Isto pode ser observado pela hidroxila fenólica presente na capsaicina, cuja densidade eletrônica ao redor do hidrogênio mostra-se bem reduzida, visto que a região apresenta intensa coloração azulada. Já o sistema dioxólico dos análogos, não apresentou o mesmo perfil de distribuição eletrônica nos estudos realizados, onde o anel benzodioxólico apresentou um perfil de menor disparidade de distribuição eletrônica, se comparado ao metilcatecol do protótipo.

A alteração do MPE de compostos análogos, em comparação com ao protótipo pode, em alguns casos, conferir comportamentos biológicos distintos dos primeiros em relação aos últimos, principalmente no que se refere ao processo de reconhecimento molecular entre o ligante e seu respectivo alvo biológico.

Figura 34: Representação dos mapas de potencial eletrostático (MPE, à esquerda e ao centro), das cargas atômicas parciais de potencial eletrostático (ESP-CHELPG, à direita) e do vetor de momento de dipolo (representado pela seta azul, à direita) da capsaicina e dos análogos ativos RPF-101e RPF-151. ¹As regiões de coloração vermelho intenso (-0,080) possuem maior distribuição de densidade eletrônica. As regiões de coloração azul intensa (+0,080) possuem menor distribuição de densidade eletrônica. ²Átomos com coloração vermelha intensa (-0,594) mais negativos e átomos com coloração verde intensa (+0,594) mais positivos. ³As setas azuis indicam o vetor de momento de dipolo (μ). 3a: $\mu = 3,99$ Debye; 3b: $\mu = 6,80$ Debye; 3c: $\mu = 5,39$ Debye.

Os análogos ativos RPF-101 e RPF-151 apresentaram certas semelhanças em seus perfis de distribuição eletrônica, em relação à cadeia lateral lipofílica. Além da semelhança entre seus mapas de potencial eletrostático, ambos apresentam vetor de momento de dipolo superiores ao apresentado pela capsaicina (3,99 Debye), sendo iguais a 6,80 Debye (RPF-101) e 5,39 Debye (RPF-151). Essas semelhanças entre os análogos ativos, e diferenças dos mesmos em relação à capsaicina, podem justificar o perfil de atividade biológica superior que os mesmos apresentaram quando comparados à atividade apresentada pelo protótipo.

A capsaicina possui cadeia alquílica longa e linear, quando comparada aos análogos, os quais possuem cadeias menores. O análogo mais ativo (sobre MDA-MB-231), o análogo RPF-151, possui a disposição de sua cadeia alquílica semelhante à disposição apresentada pela capsaicina. Este fato pode justificar o melhor reconhecimento molecular do mesmo com o seu respectivo alvo hipotético. Mesmo que tenha sido mais ativo do que a capsaicina, o composto RPF-101 apresentou maior arqueamento ou curvatura de sua cadeia lateral cíclica, volumosa e aromática, fatos que podem estar relacionados com sua atividade biológica inferior, se comparada a do análogo RPF-151.

A substituição da função amida presente na capsaicina, pela seu grupo bioisótero sulfonamida, além de conferir maior estabilidade físico-química aos análogos, manteve o caráter de elevada densidade eletrônica da região, porém com a inserção de um sítio aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) adicional à estrutura dos mesmos, o que pôde levar à melhor interação destes ligantes com o suposto alvo.

As cargas atômicas parciais de potencial eletrostático (CHELPG) indicam que o carbono carbonílico da estrutura capsaicinóide possui caráter positivo, e seu valor foi igual a +0,6119 (coloração verde intensa). A substituição bioisostérica da função amida (do protótipo) por sulfonamida (nos análogos) conferiu o mesmo perfil para o átomo de enxofre dos análogos, que também apresentaram caráter positivo e valores iguais a +0,8552 (RPF-101) e +0,6665 (RPF-151).

A cadeia alquílica inferior do análogo mais ativo RPF-151, apresentou caráter mais negativo do que a cadeia capsaicinóide, o que pode ser observado pela coloração avermelhada mais intensa do que a observada no protótipo. O átomo de carbono vicinal ao átomo de enxofre da ligação sulfonamídica, apresentou valor de carga atômica parcial cerca de duas vezes mais negativa (vermelho mais intenso) do que a observada para a capsaicina (vermelho escuro), sendo estes valores iguais a -0,351 e -0,148 respectivamente. O mesmo perfil foi observado para o átomo de carbono vicinal ao átomo de nitrogênio da ligação sulfonamídica. A carga atômica parcial deste átomo de carbono foi cerca de duas vezes mais negativa do que a do átomo de carbono correspondente, na estrutura da capsaicina, sendo estes valores iguais a -0,313 (para o análogo RPF-101), -0,275 (para o análogo RPF-151) e -0,170 (para a capsaicina).

Corroborando o observado na análise do MPE da capsaicina, o hidrogênio da hidroxila fenólica da mesma possui baixa densidade eletrônica, onde sua carga atômica parcial foi igual a +0,418. A conversão do sistema metilcatecólico no sistema benzodioxol, fez com que esse caráter fosse alterado. Essas alterações no perfil de distribuição das cargas atômicas parciais podem estar associadas ao ganho de atividade biológica apresentado pelos análogos ativos, no que se refere ao processo de reconhecimento molecular.

Após a análise das propriedades eletrônicas, foi realizado o estudo das propriedades hidrofóbicas dos análogos ativos. Na Tabela 18 seguem representados os mapas de potencial lipofílico (MPL) da capsaicina e dos compostos RPF-101 e RPF-151. Para a interpretação desses mapas, foi utilizado esquema de cores. A coloração verde intensa representa regiões da molécula de caráter hidrofóbico, e a coloração azul intensa representa as regiões de caráter hidrofílico.

A lipofilicidade pode ser expressa numericamente pelo valor calculado do coeficiente de partição *n*-octanol/água (ClogP). Então, além dos MPL, a Tabela 18 apresenta também os valores de ClogP e do coeficiente de partição de espécies ionizáveis (ClogD), calculados no programa Marvin Beans 5.3.8 (ChemAxon, 2010).

Tabela 18: Representação dos mapas de potencial lipofílico (MPL), ClogP e ClogD da capsaicina e dos análogos ativos RPF-101e RPF-151.

Mapa de Potencial Lipofílico (MPL) ¹ nas representações sólido, grade e transparente			ClogP	ClogD ²	
capsaicina				3,75	3,75
RPF-101				2,15	2,15
RPF-151				1,51	1,51

¹Coloração verde do mapa: regiões com caráter hidrofóbico. Coloração azul do mapa: regiões de caráter hidrofílico

²ClogD calculado utilizando os valores referência de pH = 1,5; 5,0; 6,5 e 7,4, onde não se observou ionização das espécies.

Os valores de ClogP e ClogD dos compostos ativos foram calculados com o intuito de se analisar o equilíbrio hidrófilo/lipófilo e, assim, compará-los ao protótipo, capsaicina, identificando semelhanças e diferenças.

Como pode ser observado na Tabela 18, o perfil de lipofilicidade do sistema benzodioxólico mostrou-se semelhante em ambos os análogos. Outra característica observada, é o balanço hidro-lipofílico da cadeia lateral dos compostos sintetizados, que se apresenta relativamente mais hidrofílica do que a cadeia da capsaicina, fato que pode ser explicado pela longa cadeia alquílica do protótipo, quando comparada à cadeia dos análogos sintéticos. O caráter hidrofílico dos análogos pode ser comprovado pelos valores inferiores de ClogP de cada um, sendo iguais a 2,15 para o análogo RPF-101, e 1,51 para o análogo RPF-151, valores inferiores aos 3,75 relativos ao ClogP da capsaicina.

Em geral, a redução do coeficiente de partição dos análogos sintéticos foi proporcional à atividade biológica apresentada, de forma que o análogo RPF-151, cujo ClogP = 1,51, apresentou IC₅₀ sobre MDA-MB-231 igual a 10,4 µM. Essa proporção se mantém para o composto RPF-101, onde o ClogP = 2,15 e o IC₅₀ na mesma linhagem igual a 14,2 µM, e também para a capsaicina, a qual possui ClogP igual a 3,75 e IC₅₀ = 21,7 µM.

Esses resultados mostram a tendência do aumento da atividade biológica, com o aumento da hidrofílicidade da molécula, indicando a alta probabilidade do caráter hidrofílico dos análogos, estar intimamente relacionado aos efeitos citotóxicos sobre células tumorais apresentado pelos mesmos.

Por fim, o cálculo do coeficiente de partição considerando ionização em diferentes pH (ClogD) indicou que, tanto os análogos quanto a capsaicina, nos valores de pH dos compartimentos fisiológicos (valores de referência), não apresentaram alteração de perfil, sendo pouco provável assim, a sua influência no implemento de atividade biológica dos análogos em comparação à capsaicina.

A partir dos resultados obtidos nos estudos das propriedades hidro-lipofílicas, realizou-se o cálculo das propriedades previstas na “Regra dos Cinco” (RO5) de Lipinski.

5.4.3. Cálculo das propriedades da “Regra dos Cinco” de Lipinski

Na expectativa de se realizar avaliações das propriedades físico-químicas dos análogos ativos, bem como de estimar a eficiência dos análogos ativos, por administração oral, foi realizado o estudo dos parâmetros abordados na “Regra dos Cinco” (RO5) de Lipinski (2001). Essa abordagem elenca propriedades importantes para que compostos com potencialidade de se tornarem fármacos, sejam passíveis de serem administrados via oral, sendo estes parâmetros: o coeficiente de partição (ClogP), sítios doadores de ligação de hidrogênio (HBD), sítios aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) e a massa molecular do composto.

A Tabela 19 apresenta os valores calculados dos parâmetros da RO5 dos compostos ativos e também da capsaicina.

Tabela 19: Parâmetros da Regra dos Cinco (RO5) de Lipinski, calculados para os compostos RPF-101, 105, 151 e 152.

Moléculas	Parâmetros da Regra dos Cinco de Lipinski			
	ClogP	HBD ¹	HBA ¹	Massa molecular (Da)
<i>Lipinski (2001)</i>	$\leq 5,00$	≤ 5	≤ 10	≤ 500
Capsaicina	3,75	2	3	305,41
RPF-101	2,15	1	4	291,32
RPF-105	3,70	1	4	347,42
RPF-151	1,51	1	4	271,33
RPF-152	3,29	1	4	327,44

¹HBD e HBA em pH 7,4.

Como é possível observar, os valores de ClogP, HBD, HBA e de massa molecular obtidos para todos os análogos bioativos se encontram dentro dos limites de valores máximos descritos por Lipinski para que essas moléculas tenham características *drug-like*, isto é, características físico-químicas presentes na maioria (90%) dos fármacos administrados via oral (Lipinski, 2001). Esses

limites são de massa molecular ≤ 500 Da, $\text{LogP} \leq 5,00$, $\text{HBD} \leq 5$ e $\text{HBA} \leq 10$. Esses resultados corroboram o grande potencial destes compostos em se tornar líderes em planejamentos subsequentes, além da viabilidade e alta probabilidade de serem ativos em formulações orais e potencialmente serem extrapolados para escalas industriais de produção.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, dezenove análogos funcionais da capsaicina, inéditos, foram propostos, sintetizados e caracterizados por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C , análise elementar e faixa de fusão, exceto o composto RPF-252, que apresentou problemas de estabilidade durante sua purificação.

Todos os análogos foram obtidos dentro de valores apreciáveis de rendimento, e elevado grau de pureza. A metodologia sintética em meio aquoso mostrou-se efetiva para a formação dos análogos sulfonamídicos. A síntese dos análogos da série sulfonato em meio aquoso apresentou problemas para formação do produto final e passou por adaptação. A metodologia sintética dos análogos sulfonatos foi adaptada e bem sucedida, porém, os produtos apresentaram problemas de estabilidade durante as etapas de purificação. Portanto, novas metodologias de purificação dos compostos sulfonatos deverão ser empregadas, visando evitar a degradação dos mesmos.

Foram realizados os ensaios de atividade biológica dos dezoito análogos capsaicinóides estáveis, sete deles derivados sulfonamídicos alquílicos (série IA) e onze derivados sulfonamídicos arílicos (IB).

Quatro análogos sulfonil-capsaicinóides apresentaram atividade biológica importante sobre as linhagens MDA-MB-231 (mama), MCF-7 (mama) e B16F10 (melanoma murino), inicialmente propostas neste projeto, sem terem apresentado citotoxicidade às linhagens sadias de fibroblasto (3T3), o que sugere seletividade por parte destes compostos sobre as linhagens afetadas, dado este que pode ser útil na orientação de planejamentos subsequentes.

Em triagem expandida, em linhagens tumorais adicionais, ou em trabalhos complementares, determinou-se a ação citotóxica dos análogos RPF-105 e RPF-152 sobre as linhagens A2058 (melanoma), HCT116 (cólon) e HeLa (adenocarcinoma cervical). Para a correta avaliação da atividade apresentada pelos análogos, a capsaicina deve ser ensaiada nestas linhagens adicionais.

Determinou-se a ação do análogo RPF-101 frente às linhagens SK-MEL-28, Sbc12 e Mel-85 todas provenientes de melanoma, o que comprova a ação deste análogo em linhagens de melanoma

humano, além de sua atividade sobre adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 e MCF-7. Estes resultados expandem o espectro de ação deste composto para tumores de tecidos distintos, no caso os tecidos cutâneo e mamário.

Em estudo adicional, descobriu-se que o análogo RPF-151, o mais ativo sobre adenocarcinoma mamário MDA-MB-231, apresentou ação antiproliferativa em cultura de células HUVEC de tecido umbilical venoso, sugerindo que o mesmo possua, além da ação citotóxica sobre linhagens tumorais, ação antiangiogênica.

Estudos mecanísticos realizados para os análogos RPF-101 e RPF-151, cujas IC_{50} foram superiores às obtidas para a capsaicina, sugerem que estes compostos geram o comprometimento da rede de microtúbulos celular e reduzem o potencial de membrana mitocondrial. As investigações acerca destes compostos apontaram que a indução de morte celular foi promovida mediante sinalização de apoptose por via intrínseca, ou mitocondrial, e que sua ação parece não estar envolvida com receptores vanilóides do tipo TRPV.

O análogo mais ativo sobre MDA-MB-231, o composto RPF-151, foi submetido a ensaios *in vivo* e apresentou importante inibição de crescimento da massa tumoral, sendo bem tolerado pelos animais expostos ao mesmo.

Foram calculadas as propriedades presentes na “Regra dos Cinco” de Lipinski dos compostos bioativos, estando todos dentro dos limites preconizados por essa abordagem.

Análises preliminares indicaram que a substituição do sistema metil-catecólico capsaicinóide pelo sistema benzodioxólico, não comprometeu a atividade biológica dos análogos, porém, para melhor avaliação deste indício, análogos com a região metil-catecólica preservada deverão ser sintetizados, testados e comparados aos compostos benzodioxólicos. Este fato também se aplica à substituição bioisostérica promovida na região B da capsaicina, onde a carbonila deu lugar ao grupo sulfona, mantendo-se a bioatividade dos análogos.

Foi constatado que variações na cadeia alquílica do protótipo, promovidas por homologia inferior e introdução de grupos volumosos elevaram a atividade dos análogos sintetizados, quando comparado à atividade obtida pela capsaicina.

Os estudos teóricos indicaram que o caráter hidrofílico superior, indicado pelos MPLs, e o maior valor do momento de dipolo, são propriedades comuns aos análogos ativos RPF-101 e RPF-151, se comparados aos valores observados para a estrutura capsaicinóide, podendo estas propriedades estar correlacionadas com a atividade biológica superior destes compostos.

Esta hipótese também se aplica à maior densidade eletrônica do sistema benzodioxólico dos análogos, em comparação ao sistema metil-catecólico da capsaicina, fatos que podem estar relacionados com a atividade biológica apresentada pelos análogos.

Para melhor fundamentação destes *insights*, e maior compreensão dos benefícios obtidos pelas modificações moleculares empregadas neste trabalho em relação à REA dos análogos, compostos com a porção metil-catecólica preservada poderão, eventualmente, ser sintetizados e ensaiados.

Devido ao fato dos estudos teóricos terem indicado que o ClogP foi inversamente proporcional a atividade biológica apresentada, análogos mais hidrofílicos, ou com perfil hidrolipofílico semelhante ao do RPF-151 e RPF-101, poderão ser sintetizados e avaliados.

Durante a execução deste trabalho foi possível responder certos questionamentos acerca do mecanismo de indução apoptótica promovido pelos compostos sintetizados, e também sobre a relação entre a estrutura química dos mesmos, e suas respectivas atividades biológicas. Com isso, a conclusão deste trabalho possibilita a proposição de certos estudos complementares, como perspectivas de trabalho. Objetivando a coleta de informações adicionais importantes acerca dos análogos ativos, bem como sobre a influência do sistema benzodioxólico na atividade dos mesmos, são propostos:

-
- Realizar estudos *in vitro* de permeabilidade dos análogos ativos RPF-101 e RPF-151;
 - Determinar o perfil farmacocinético dos análogos ativos, isto é, o comportamento dos mesmos nos eventos cinéticos de absorção, distribuição, metabolismo (ou biotransformação), eliminação e toxicidade (ADMET);
 - Realizar ensaios de citotoxicidade dos análogos ativos em coadministração a fármacos já inseridos na terapêutica, para análise de possíveis sinergismos de ação. Como sugestão de coadministração, podem ser citados o paclitaxel e a 5-fluorouracila;
 - Sintetizar os análogos ativos (RPF-101 e RPF-151) substituindo a região A dos mesmos, que compreende a subunidade benzodioxólica, pelo grupo metilcatecólico presente na capsaicina;
 - Avaliar a capacidade de estímulo do receptor capsaicinóide (TRPV) dos análogos metilcatecólicos sintetizados, bem como a citotoxicidade dos mesmos, para que REAs complementares possam ser realizadas.

7. REFERÊNCIAS

- ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. *What is cancer*. Disponível em:
<<http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 20 jun. 2014.
- AKIBA, Y.; KATO, S.; KATSUBE, K.; NAKAMURA, M.; TAKEUCHI, K.; ISHII, H.; HIBI, T. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet β cells modulates insulin secretion in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.321, p.219-225, 2004.
- 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. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *Journal of American Chemical Society*. v.99, p.8127-8134, 1977.
- ALTMAN, S.A.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology Progress*. v.9, p.671-674, 1993.
- AMZEL, L.M. Structure-based drug design. *Current Opinion in Biotechnology*. v.9, p.366-369, 1998.
- ANAND, P. Capsaicin and menthol in the treatment of itch and pain: recently cloned receptors provide the key. *Gut*. v.52, p.1233-1235, 2003.
- ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; RAMAKRISHNAN, G.; JAGAN, S.; DEVAKI, T. Chemopreventive task of capsaicin against benzo(a)pyrene-induced lung cancer in swiss albino mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. v.104, p.360-365, 2009.
- ANASTAS, P.T.; WARNER, J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. 1.ed. Oxford University Press, 2000. 30p.
- ANTONIOUS, G.F.; KOCHHAR, T.S.; JARRET, R.L.; SNYDER, J.C. Antioxidants in hot pepper: variation among accessions. *Journal of Environmental Science and Health*. v.41, p.1237-1243, 2006.
- AZZIZ, D.M. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. *Animal Reproduction Science*. v.92, p.1-8, 2006.
- 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.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). *Química Nova*. v.28, p.s56-s63, 2005
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares da terapêutica*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 271-341p.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. v.139, p.267-284, 2009.
- BAUMANN, E. Ueber eine einfache methode der darstellung von benzoësäureäthern. *Berichte*. v.19, p.3218, 1886.

- BECKE, A.D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *Journal of Chemical Physics*. v.98, p.1372-1377, 1993.
- BELLAMY, F.D.; OU, K. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Letters*. v.25, p.839-842, 1984.
- BILLACK, B.; RADKAR, V.; ADIABOUAH, C. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and anti-proliferative properties of resveratrol and several of its analogs. *Cellular & Molecular biology Letters*. v.13, p.553-569, 2008.
- BIOT, C.; BAUER, H.; SCHIRMER, R.H.; DAVIOUD-CHARVET, E. 5-substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.47, p.5972-5983, 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v.72, p.248-254, 1976.
- BLAU, L.; MENEGON, R.F.; CHUNG, M.C. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. *Química Nova*. v.29, n.6, p.1307-1317, 2006.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Gastos com câncer no Brasil*. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/03/16/ministerio-da-saude-aprimora-oferta-de-medicamento-para-cancer-no-sus>>. Acesso em: 29 jun. 2014.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*. v.76, p.61-90, 1986.
- BRENEMAN, C.M.; WIBERG, K.B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *Journal of Computational Chemistry*. v.11, p.361-373, 1990.
- CAIN, K.; BRATTON, S.B.; COHEN, G.M. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*. v.84, p.203-214, 2002.
- CARR, J.L.; WEASE, K.N.; VAN RYSSSEN, M.P.; PATERSON, S.; AGATE, B.; GALLAGHER, K.A.; BROWN, C.T.A.; SCOTT, R.H.; CONWAY, S.J. *In vitro* photo-release of a TRPV1 agonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v.16, p.208-212, 2006.
- CARRAGHER, N.O. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Current Pharmaceutical Design*. v.12, p.615-638, 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 Publicações Médicas*. v.12, p.8-12, 2010.
- CASTILHO, M.S.; GUIDO, R.V.; ANDRICOPULO, A.D. Classical and Hologram QSAR Studies on a Series of Tacrine Derivatives as Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery*. v.4, p.106-113, 2007.
- CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Reviews of Neuroscience*. v.24, p.487-517, 2001.

- 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.
- CHAABANE, W.; USER, S.D.; EL-GAZZAH, M.; JAKSIK, R.; SAJJADI, E.; RZESZOWSKA-WOLNY, J.; LOS, M.J. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. v.61, p.43-58, 2013.
- CHEMBIO DRAW ULTRA. CambridgeSoft, MA, EUA. 2012.
- CHEN, M.; WANG, J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*. v.7, p.313-319, 2002
- CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources, *The AAPS Journal*. v.8, n.2, 2006.
- 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.565-576, 2007.
- CLARK, M.J.; HOMER, N.; O’CONNOR, B.D.; CHEN, Z.; ESKIN, A.; LEE, H.; MERRIMAN, B.; NELSON, S.F. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *Plos Genetics*. v.6, p.1-16, 2010.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry*. 2.ed. Oxford University Press, 2012. 391; 659-664p.
- CONWAY, S.J. TRPing the switch on pain: an introduction to the chemistry and biology of capsaicin and TRPV1. *Chemical Society Reviews*. v.37, p.1530-1545, 2008.
- 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.
- 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 anti-mycobacterial activity of novel amino alcohol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.46, p.974-978, 2011.
- DATASUS. *Indicadores de Mortalidade*. Disponível em:
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 30 jun. 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 newcapsaicin-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.
- DEVITA-JR, V.T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*. v.68, p.8643-8653, 2008.
- DENG, X.; MANI, N.S. A facile, environmentally benign sulfonamide synthesis in water. *Green Chemistry*. v.8, p.835-838, 2006.

- DENT, R.; TRUDEAU, M.; PRITCHARD, K.I.; HANNA, W.N.; KAHN, H.K.; SAWKA, C.A.; LICKLEY, L.A.; RAWLINSON, E.; SUN, P.; NAROD, S.A. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. v.13, p.4429-4434, 2007.
- DEVEREUX, M.; POPELIER, P.L.A. *In silico* techniques for the identification of bioisosteric replacements for drug design. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v.10, p.657-668, 2010.
- DEWAR, M.J.S.; ZOEBISCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of American Chemical Society*. v.107, p.3902-3909, 1985.
- DICHIARANTE, V.; RAVELLI, D.; ALBINI, A. Green chemistry: state of the art through an analysis of the literature. *Green Chemistry and Reviews*. v.3, p.105-113, 2010.
- DOHERTY, D. MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software – User's Guide, version 3.2. The Chem21 Group Inc., Lake Forest, IL, 2002.
- DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. v.287, p.1960-1964, 2000.
- DUARTE, D.F. Uma breve história do ópio e dos opióides. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v.55, p.135-146, 2005.
- DUGDALE, D.E. *Essentials of Electromagnetism*. 1.ed. Springer Science & Business Media: Londres, 1993.
- ECKERT, H.; BAJORATH, J. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations; limitations and novel approaches. *Drug Discovery Today*. v.12, p.225-233, 2007.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. v.35, p.495-516, 2007.
- EMA – European Medicines Agency. *Cancer in europe*. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fdocument_library%2Flanding%2Fdocument_library_search.jsp&mid=&searchkwByEnter=true&isNewQuery=true&keyword=CANCER+EUROPE&referenceNum=&docType=All&inYear=All&committeeSelect=All&keywordSearch=Submit>. Acesso em: 28 fev. 2013.
- ERLANSON, D.A.; McDOWELL, R.S.; O'BRIEN, T. Fragment-based drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.47, p.3463-3482, 2004.
- EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. v.411, p.342-348, 2001.
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *The NME's of 2012*. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/UCM337830.pdf>>. Acesso em: 17 maio. 2013.
- FERREIRA, A.K.; TAVARES, M.T.; AZEVEDO, R.A.; DE-SÁ-JUNIOR, P.L.; PASQUALOTO, K.F.M.; DAMIÃO, M.C.F.C.B.; BARBUTO, J.A.M.; PARISE-FILHO, R. The discovery of a novel alkylsulfonamide capsaicin-like analogue with antitumoral activity: Design, synthesis, molecular modeling and apoptotic mechanism elucidation. *Chemical Biology & Drug Design*. Submetido, 2014.

- FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*. v.5, p.876-885, 2005.
- FINNERUP, N.B.; SINDRUP, S.H.; JENSEN, T.S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. v.150, p.573-581, 2010.
- FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*. v.3, p.3-13, 1929.
- FORSYTHE, K.H.; HOPFINGER, A.J. The Influence of Solvent on the Secondary Structures of Poly(L-alanine) and Poly(L-proline). *Macromolecules*. v.6, p.423-437, 1973.
- FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. v.25, p.4798-4811, 2006.
- GABRIELLI, B.; BROOKS, K.; PAVEY, S. Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies. *Frontiers in Pharmacology*. v.3, p.1-6, 2012.
- GALATI, G.; O'BRIEN, P.J. Cytoprotective and anticancer properties of coenzyme Q versus capsaicin. *BioFactors*. v.18, p.195-205, 2003.
- GARRAWAY, L.A.; LANDER, E.S. Lessons from the cancer genome. *Cell*. v.153, p.17-37, 2013.
- GAUSSIAN G03 6.0. Program release for Windows. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, EUA, 2004.
- GAUSSVIEW 5.0. Program release for Windows. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, EUA, 2004.
- GEORG, G. I.; BOGE, T. C.; CHERUVALLATH, Z. S.; HARRIMAN, G. C. B; HEPPELLE, M.; PARK, H.; HIMES, R. H. Schotten-Baumann acylation of *N*-debenzoyltaxol; an efficient route to *N*-acyl taxol analogues and their biological evaluation *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.4, n.2, p.335-338, 1994.
- GIL, Y.; KANG, M. Capsaicin induces apoptosis and terminal differentiation in human glioma A172 cells. *Life Sciences*. v.82, p.997-1003, 2008.
- GOODMAN, C.A.; EAGLES, J.B.; RUDAHINDWA, L.; HAMAKER, C.G.; HITCHCOCK, S.R. Synthesis, X-Ray Crystallography, and Reactions of N-Acyl and N-Carbamoyl Succinimides. *Synthetic Communications*.v.43, p.2155-2164, 2013.
- GONZALEZ, N.A.; BENSINGER, S.J.; HONG, C.; BECEIRO, S.; BRADLEY, M.N.; ZELCER, N.; DENIZ, J.; RAMIREZ, C.; DÍAZ, M.; GALLARDO, G.; GALARRETA, C.R.; SALAZAR, J.; LOPEZ, F.; EDWARDS, P.; PARKS, J.; ANDUJAR, M.; TONTONNOZ, P.; CASTRILLO, A. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of LXR. *Immunity*. v.31, p.245-258, 2009.
- GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticâncer drugs. *Clinical and Translational Oncology*. v.9, p.767-776, 2007.
- GOSH, A.K.; BASU, S. Fas-associated factor 1 is a negative regulator in capsaicin induced cancer cell apoptosis. *Cancer Letters*. v.287, p.142-149, 2010.

- GRÉGIO, A.M.T.; FARIAS, M.M.; GOMES, M.C.B.; AZEVEDO, L.R.; LIMA, A.A.S.; MACHADO, M.A.N. Capsaicina e sua aplicação em odontologia. *Arquivos em Odontologia*. v.44, p.45-48, 2008.
- GRINBERG, M.; SARIG, R.; ZALTSMAN, Y.; FRUMKIN, D.; GRAMMATIKAKIS, N.; REUVENY, E.; GROSS, A. tBid homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. v.277, p.12237-12245, 2002.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v.53, p.335-343, 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.; CÓLUS, I.M.S. Câncer: uma doença genética. *Revista Genética na Escola*. v.3, p.4-7, 2008.
- GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v.51, p.227-234, 2005.
- GUIDO, R. V. C; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies, *Current Medicinal Chemistry*, v.15, p.37-46, 2008.
- GULLO, V. P.; MCALPINE, J.; LAM, K. S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v.33, p.523-531, 2006.
- HAJDUK, P.J. Fragment-based drug design: How big is too big? *Journal of Medicinal Chemistry*. v.49, p.6972-6976, 2006.
- HAN, S.; KEUM, Y.; CHUN, K.; SURH, Y. Suppression of phorbol ester-induced NF- κ B activation by capsaicin in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Archives of Pharmacal Research*. v.25, p.475-479, 2002.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. v.144, p.646-674. 2011.
- HANSCH, C.; HOEKMAN, D.; LEO, A.; ZHANG, L.; LI, P. The expanding role of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in toxicology. v.79, p. 45-53, 1995.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. v.32, p.77-88, 1988.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v.13, n.19-20, p.894-901, 2008.
- HAYMAN, M.; KAM, P.C.A. Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care*. v.19, p.338-343, 2008.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry*. v.13, p.572-584, 2002.

- HSU, C.; YEN, G. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.55, p.1730-1736, 2007.
- HUANG, Y.L.; WANG, W.L.; SHAN, S. 3-Chloro-N-(4-hydroxy-3-methoxy-benzyl)-2,2-dimethyl-propanamide. *Acta Crystallogrica Section E*. v.66, p.0877, 2010.
- HUGGINS, D.J.; SHERMAN, W.; TIDOR, B. Rational approaches to improving selectivity in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.55, p.1424-1444, 2012.
- HYPERCHEM. Program release 8.0 for Windows. Hypercube, Inc., Gainesville, FL, EUA, 2008.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Globocan 2012*. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/pie_pop.asp?selection=224900&title=World&sex=0> Acesso em: 27 jun. 2014.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. *Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil 2009*. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/default.shtm>. Acesso em: 28 jun. 2014.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Câncer*. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 04 jul. 2014.
- JOO, J.I.; KIM, D.H.; CHOI, J.; YUN, J.W. Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. *Journal of Proteome Research*. v.9, p.2977-2987, 2010.
- JORDAN, B.; DEVI, L.A. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *British Journal of Anaesthesia*. v.81, p.12-19, 1998.
- JUN, H.; PARK, T.; LEE, C.K.; KANG, M.K.; PARK, M.S.; KANG, H.I.; SURH, Y.; KIM, O.H. Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of Bcl-2. *Food and Chemical Toxicology*. v.45, p.708-715, 2007.
- JUNG, M.; KANG, H.; MOON, A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 down regulation and caspase-3 activation. *Cancer Letters*. v.165, p.139-145, 2001.
- JUNGHEIM, L.N.; SHEPHERD, T.A. Design of antitumor prodrugs: substrates for antibody targeted enzymes. *Chemical Reviews*. v.94, p.1553-1566, 1994.
- KANG, H.; SOH, Y.; KIM, M.; LEE, E.; SURH, Y.; KIM, H.C.; KIM, S.H.; MOON, A. Roles of JNK-1 and p38 in selective induction of apoptosis by capsaicin in *ras*-transformed human breast epithelial cells. *International Journal of Cancer*. v.103, p.475-482, 2003.
- KARDOS, N.; DEMAINE, A.L. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.92, p.677-687, 2011.
- KAUFMANN, S.H.; EARNSHAW, W.C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*. v.256, p.42-49, 2000.
- KAWABATA, F.; INOUE, N.; MASAMOTO, Y.; MATSUMURA, S.; KIMURA, W.; KADOWAKI, M.; HIGASHI, T.; TOMINAGA, M.; INOUE, K.; FUSHIKI, T. Non-pungent capsaicin analogs (capsinoids) increase metabolic rate and enhance thermogenesis *via*

- gastrointestinal TRPV1 in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v.73, p.2690-2697, 2009.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. v.26, p.239-257, 1972.
- KIM, J.; KANG, Y.S.; LEE, Y.S. A phospholipase C dependent intracellular Ca^{2+} release pathway mediates the capsaicin-induced apoptosis in HepG2 human hepatoma cells. *Archives of Pharmacal Research*. v.28, p.73-80, 2005.
- KIM, M.; LEE, K.; YON, J.; LEE, S.; JIN, Y.; BAEK, I.; LEE, B.J.; YUN, Y.W.; NAM, S. Capsaicin prevents ethanol-induced teratogenicity in cultured mouse whole embryos. *Reproductive Toxicology*. v.26, p.292-297, 2008.
- KIM, S.; MOON, A. Capsaicin-induced apoptosis of H-ras-Transformed human breast epithelial cells is *rac*-dependent via ROS generation. *Archives of Pharmaceutical Research*. v.27, p.845-849, 2004.
- LEACH, A.R. *Molecular modelling: principles and applications*. 2.ed. Harlow, England: Prentice Hall, New York, 2001.
- LEE, E.; JEON, M.; KIM, B.; KIM, J.; KWON, Y.; LEE, H.; LEE, Y.S.; YANG, J.; KIM, T. Capsaicin inhibits ultraviolet B-induced skin inflammation by inhibiting Src family kinases and epidermal growth factor receptor signaling. *Free Radical Biology & Medicine*. v.48, p.1133-1143, 2010.
- LEE, I.O.; LEE, K.H.; PYO, J.H.; KIM, J.H.; CHOI, Y.J.; LEE, Y.C. Anti-inflammatory effect of capsaicin in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Helicobacter*. v.12, p.510-517, 2007.
- LEE, J.; CHANG, J.; LEE, J.Y.; KIM, J. Capsaicin-induced apoptosis and reduced release of reactive oxygen species in MBT-2 murine bladder tumor cells. *Archives of Pharmacal Research*. v.27, p.1147-1153, 2004.
- LEE, M.; KEE, K.; SUH, C.; LIM, S.; OH, S. Capsaicin-induced apoptosis is regulated by endoplasmic reticulum stress and calpain mediated mitochondrial cell death pathways. *Toxicology*. v.264, p.205-214, 2009.
- LEE, M.; KIM, C.; KIM, I.; KIM, Y. Effects of capsaicin on lipid catabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy Research*. v.25, p.935-939, 2011.
- LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A.; ROCHE, V.F.; ZITO, S.W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7.ed., Lippincott Williams & Wilkins, North American Edition, 2012. 929-938p.
- LEE, Y.S.; NAM, D.H.; KIM, J. Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. *Cancer Letters*. v.161, p.121-130, 2000.
- LEUNG, F.W. Capsaicin-sensitive intestinal mucosal afferent mechanism and body fat distribution. *Life Sciences*. v.83, p.1-5, 2008.
- 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.

- LIN, C.; LU, W.; WANG, C.; CHAN, Y.; CHEN, M. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. v.13, p.46-55, 2013.
- LIPINSKI, C.A.; 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.
- LIPINSKI, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. v.1, p.337-341, 2004.
- LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*. v.96, p.147-152, 2000.
- LU, H.; CHEN, Y.; YANG, J.; YANG, Y.; LIU, J.; HSU, S.; LAI, K.; CHUNG, J. Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells *in vitro* and colo 205 tumor xenografts *in vivo*. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. v.58, p.12999-13005, 2010.
- LUDY, M.J.; MOORE, G.E.; MATTES, R.D. The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans. *Chemical Senses*. v.37, p.103-121, 2012.
- LUO, X.; PENG, J.; LI, Y. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*. v.650, p.1-7, 2011.
- LYSY, J.; SISTIERY-ITTAH, M.; ISRAELIT, Y.; SHMUELI, A.; STRAUSS-LIVIATAN, N.; MINDRUL, M.; KERET, D.; GOLDIN, E. Topical capsaicin – a novel and effective treatment for idiopathic intractable pruritus ani: a randomized, placebo controlled, crossover study. *Gut*. v.52, p.1323-1326, 2003.
- MAGANHI, S.H.; TAVARES, M.T.; DAMIÃO, M.C.; PARISE-FILHO, R. *N*-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]benzenesulfonamide: an analogue of capsaicin. *Acta Crystallographica Section E*. v.69, p.o1700, 2013.
- MAITY, R.; SHARMA, J.; JANA, N.R. Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin-proteasome system dysfunction. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.109, p.933-942, 2010.
- MALAGARIE-CAZENAVE, S.; 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.
- MARKS, P.A.; BRESLOW, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature Biotechnology*. v.25, n.01, p.84-90, 2007.
- 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, p.405-419, 2006.
- MARTINVALET, D.; DYKXHOORN, D.M.; FERRINI, R.; LIEBERMAN, J. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*. v.133, p.681-692, 2008.
- MARTINVALET, D.; ZHU, P.; LIEBERMAN, J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. v.22, p.355-370, 2005.

- MARVIN BEANS 5.3.8. Calculator plugins. ChemAxon Ltd., Budapeste, Hungria, 2010.
- MCCLELLAN, M.; BENNER, J.; SCHILSKY, R.; EPSTEIN, D.; WOOSLEY, R.; FRIEND, S.; SIDRANSKY, D.; GEOGHEGAN, C.; KESSLER, D. An accelerated pathway for targeted cancer therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. v.10, p.79-80, 2011.
- MCILWAIN, D.R.; BERGER, T.; MAK, T.W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. v.5, p.1-28, 2013.
- MEILER, J.; SCHULER, M. Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. *Current Drug Targets*. v.7, p.1361-1369, 2006.
- MILLER, J.H.; ROUWÉ, B.; GAITANOS, T.N.; HOOD, K.A.; CRUME, K.P.; BÄCKSTRÖM, B.T.; LA FLAMME, A.C.; BERRIDGE, M.V.; NORTHCOTE, P.T. Peloruside A enhances apoptosis in H-ras-transformed cells and is citotoxic to proliferating T cells. *Apoptosis*. v.9, p.785-796, 2004.
- MOESGAARD, S.G.; BRAND, C.L.; STURIS, J.; AHRÉN, B.; WILKEN, M.; FLECKNER, J.; CARR, R.D.; SVENDSEN, O.; HANSEN, A.J.; GRAM, D.X. Sensory nerve inactivation by resiniferatoxin improves insulin sensitivity in male obese Zucker rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. v.288, p.1137-1145, 2005.
- MORGON, N.H.; COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 1.ed. Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007.
- MORO, S.; BRAIUCA, P.; DEFLORIAN, F.; FERRARI, C.; PASTORIN, G.; CACCIARI, B.; BARALDI, P.G.; VARANI, K.; BOREA, P.A.; SPALLUTO, G. Combined target-based and ligand-based drug design approach as a tool to define a novel 3D-pharmacophore model of human A₃ Adenosine receptor antagonists: Pyrazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pyrimidine derivatives as a key study. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.48, p.152-162, 2005.
- MÓZSIK, G.; SZOLCSÁNYI, J.; DÖMÖTÖR, A. Capsaicin research as a new tool to approach of the human gastrointestinal physiology, pathology and pharmacology. *Inflammopharmacology*. v.15, p.232-245, 2007.
- NJUGUNA, N.M.; MASIMIREMBWA, C.; CHIBALE, K. Identification and characterization of reactive metabolites in natural products-driven drug discovery. *Journal of Natural Products*. v.75, p.507-513, 2012.
- NICOLAOU, K.C. Advancing the drug discovery and development process. *Angewandte Chemie*. v.126, p.2-15, 2014.
- OCHI, T.; TAKAISHI, Y.; KOGURE, K.; YAMAUTI, I. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products*. v.66, p.1094-1096, 2003.
- OIKAWA, S.; NAGAO, E.; SAKANO, K.; KAWANISHI, S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper. *Free Radical Research*. v.40, p.966-973, 2006.
- OKANO, J.; FUJISE, Y.; ABE, R.; IMAMOTO, R.; MURAWAKI, Y. Chemoprevention against hepatocellular carcinoma. *Clinical Journal of Gastroenterology*. v.4, p.185-197, 2011.
- OPENBABEL 2.1.1. Free Software Foundation, Inc, Boston, MA, EUA, 2006.

- 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.; HO, C. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chemical Society Reviews*. v.37, p.2558-2574, 2008.
- PAPAC, R.J. Origins of cancer therapy. *Yale Journal of Biology and Medicine*. v.74, p.391-398, 2001.
- PARISE-FILHO, R.; PASQUALOTO, K.F.; MAGRI, F.M.; FERREIRA, A.K.; DA-SILVA, B.A.; DAMIÃO, M.C.F.C.B.; TAVARES, M.T.; AZEVEDO, R.A.; AUADA, A.V.; POLLI, M.C.; BRANDT, C.A. Dillapiol as antileishmanial agent: discovery, cytotoxic activity and preliminary SAR studies of dillapiol analogues. *Archiv der Pharmazie*. v.345, p.934-944, 2012.
- PARK, H.J.; ZHANG, Y.; GEORGESCU, S.P.; JOHNSON, K.L.; KONG, D.; GALPER, J.B. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Reviews*. v.2, p.93-102, 2006.
- PATRICK, G.L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4.ed. Nova Iorque: Oxford University Press, p.228, 2008.
- PENG, J.; LI, Y. The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *European Journal of Pharmacology*. v.627, p.1-7, 2010.
- PERKINS, R.; FANG, H.; TONG, W.; WELSH, W.J. Quantitative structure-activity relationship methods: perspectives on drug discovery and toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.22, n.8, p.1666-1679, 2003.
- POLNASZEK, N. 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide (capsaicin) induces apoptosis in bladder cells independent of p53 status: implication for therapy? *The Journal of Urology*. v.183, p.447, 2010.
- PORTER, A.G.; JÄNICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. v.6, p.99-104, 1999.
- RAHMAN, A. Bcl-2 family proteins: insight role of mitochondrial apoptosis pathway in cancer cells. *Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science*. v.1, p.743-748, 2012.
- RAMÍREZ-ROMERO, R.; GALLUP, J.M.; SONEA, I.M.; ACKERMANN, M.R. Dihydrocapsaicin treatment depletes peptidergic nerve fibers of substance P and alters mast cell density in the respiratory tract of neonatal sheep. *Regulatory Peptides*. v.91, p.97-106, 2000.
- REINBACH, H.C.; SMEETS, A.; MARTINUSSEN, T.; MØLLER, P.; WESTERTER-PLANTENGA, M.S. Effects of capsaicin, green tea and CH-19 sweet pepper on appetite and energy intake in humans in negative and positive energy balance. *Clinical Nutrition*. v.28, p.260-265, 2009.
- RÉSIMONT, M.; LIÉGEOIS, J. Synthesis and *in vitro* binding studies of piperazine-alkyl-naphthamides: impact of homology and sulphonamide/carboxamide bioisosteric replacement on the affinity for 5-HT_{1A}, α_{2A} , D4.2, D3 and D2L receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v.20, p.5199-5202, 2010.

- ROSA, A.; DEIANA, M.; CASU, V.; PACCAGNINI, S.; APPENDINO, G.; BALLERO, M.; DESSÍ, M.A. Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.50, p.7396-7401, 2002.
- ROSNER, K.; KASPRZAK, M.F.; HORENSTEIN, A.C.J.; THURSTON, H.L.; ABRAMS, J.; KERWIN, L.Y.; MEHREGAN, D.A.; MEHREGAN, D.R. Engineering a waste management enzyme to overcome cancer resistance to apoptosis: adding DNase1 to the anti-cancer toolbox. *Cancer Gene Therapy*. v.18, p.346-357, 2011.
- SAEZ, M.E.; RAMIREZ-LORCA, R.; MORON, F.J.; RUIZ, A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discovery Today*. v.11, p.917-923, 2006.
- SAMRAJ, A.K.; KEIL, E.; UEFFING, N.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SCHMITZ, I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. v.281, p.29652-29659, 2006.
- 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.89-99, 2006.
- SANCHO, R.; LUCENA, C.; MACHO, A.; CALZADO, M.A.; BLANCO-MOLINA, M.; MINASSI, A.; APPENDINO, G.; MUÑOZ, E. Immunosuppressive activity of capsaicinoids: casiate derived from sweet peppers inhibits NF- κ B activation and is a potent anti-inflammatory compound *in vivo*. *European Journal of Immunology*. v.32, p.1753-1763, 2002.
- SATYANARAYANA, M.N. Capsaicin and gastric ulcers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v.46, p.275-328, 2006.
- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. v.407, p.784-788, 2000.
- SCHERLIEß, R. The MTT assays as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. v.411, p.98-105, 2011.
- SCHOTTEN, C. Ueber die Oxydation des Piperidins. *Berichte*. v.17, p.2544, 1884.
- SHIN, K.O.; YEO, N.H.; KANG, S. Autonomic nervous activity and lipid oxidation postexercise with capsaicin in the humans. *Journal of Sports Science and Medicine*. v.9, p.253-261, 2010.
- SHU, X.; MENDELL, L.M. Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons of capsaicin. *Journal of Neurophysiology*. v.86, p.2931-2938, 2001.
- SINGH, S.; ASAD, S.F.; AHMAD, A.; KHAN, N.U.; HADI, S.M. Oxidative DNA damage by capsaicin and dihydrocapsaicin in the presence of Cu(II). *Cancer Letters*. v.169, p.139-146, 2001.
- SO, S.; KARPLUS, M. Evolutionary optimization in quantitative structure-activity relationship: an application of genetic neural networks. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.39, p.1521-1230, 1996.
- SOCIÉ, G.; CLIFT, R.A.; BLAISE, D.; DEVERGIE, A.; RINGDEN, O.; MARTIN, P.J.; REMBERGER, M.; DEEG, H.J.; RUUTU, T.; MICHALLET, M.; SULLIVAN, K.M.; CHEVRET, S. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus

- cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood*. v.98, p.3569-3574, 2001.
- SURH, Y. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food and Chemical Toxicology*. v.40, p.1091-1097, 2002.
- SURH, Y. More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*. v.94, p.1263-1265, 2002.
- SURH, Y.J.; LEE, S.S. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food and Chemical Toxicology*. v.34, p.313-316, 1996.
- SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A.; EID, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature Reviews on Drug Discovery*. v.6, p.357-372, 2007.
- 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.
- TAKIKAWA, A.; ABE, K.; YAMAMOTO, M.; ISHIMARU, S.; YASUI, M.; OKUBO, Y.; YOKOIGAWA, K. Antimicrobial activity of Nutmeg against *Escherichia coli* 0157. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.94, n.4, p.3315-20, 2002.
- TANG, S.L.Y.; SMITH, R.L. POLIAKOFF, M. Principles of green chemistry: productively. *Green Chemistry*. v.7, p.761-762, 2005.
- TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Química Nova*. v.27, p.631-639, 2004.
- TAVARES, M.T.; DAMIÃO, M.C.F.C.B.; FERREIRA, A.K.; RODRIGUES, C.P.; BARBUTO, J.A.M.; AZEVEDO, R.A.; DE-SÁ-JUNIOR, P.L.; PASQUALOTO, K.F.M.; PARISE-FILHO, R.; FERREIRA, F.F. RPF151 as a potential hit against cancer: synthesis, structural characterization, X-ray powder diffraction and antiproliferative activity. *RSC Advances*. Submetido, 2014.
- THIELE, R.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.56, p.4219-4224, 2008.
- 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.285-296, 2010.
- TOMINAGA, M.; JULIUS, D.; Capsaicin receptor in the pain pathway. *Japanese Journal of Pharmacology*, v.83, p.20-24, 2000.
- TUOYA, T; BABA, N.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y.; TADA, M.; KOSEKI, M.; TAKAHATA, K. Apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells. *Life Sciences*. v.78, p.1515-1519, 2006.
- UVIBANDMAX 15.03A. UVItec Limited, Cambridge, UK.

- VAN DE WALL, H.E.M.; GRAM, D.X.; STRUBBE, J.H.; SCHEURINK, A.J.W.; KOOLHAAS, J.M. Ablation of capsaicin-sensitive afferent nerves affects insulin response during an intravenous glucose tolerance test. *Life Sciences*. v.77, p.1283-1292, 2005.
- VANCE, K.W.; CARREIRA, S.; BROSH, G.; GODING, C.R. Tbx2 is overexpressed and plays an importante role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer Research*. v.65, p.2260-2268, 2005.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research*. v.110, p. 255-258, 2003.
- VENIER, N.; COLQUHOUN, A.; LOBLAW, A.; FLESHNER, N.; KLOTZ, L.; VENKATESWARAN, V. Capsaicin reduces proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells *via* TRPV6 mediated phenomenon. *The Journal of Urology*. v.183, p.460-461, 2010.
- VENIER, N.A.; JACOB, L.E.; LOBLAW, A.; FLESHNER, N.E.; KLOTZ, L.H.; VENKATESWARAN, V. Capsaicin in combination with micronutrients decreases cell proliferation in prostate cancer cells *in vitro*. v.181, p.53-54, 2009.
- VERMAAK, I.; VILJOEN, A.M.; HAMMAN, J.H. Natural products in anti-obesity therapy. *Natural Products Reports*. v.28, p.1493-1533, 2011.
- VERMEULEN, K.; VAN-BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. v.36, p.131-149, 2003.
- VIBIN, M.; VINAYAKAN, R.; JOHN, A.; RAJI, V.; REJIYA, C.S.; VINESH, N.S.; ABRAHAM, A. Citotoxicity and fluorescence studies of silica-coated CdSe quantum dots for bioimaging applications. *Journal of Nanoparticle Research*. v.13, p.2587-2596, 2011.
- VIEWERLITE 5.0. Accelrys Inc., San Diego, CA, 2002.
- VISWANADHAN, V.N.; GHOSE, A.K.; REVANKAR, G.R.; ROBINS, R.K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. v.29, p.163-172, 1989.
- VITURI, C.L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A.G.; BORELLI, P. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mieloides *in vitro* no modelo de desnutrição proteica em camundongos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.44, p.493-501, 2008.
- WALLER, C.L. A comparative QSAR study using CoMFA, HQSAR, and FRED/SKEYS paradigms for estrogen receptor binding affinities of structurally diverse compounds. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. v.44, p.758-765, 2004.
- WANG, H.; CHUANG, S.; SU, Y.; LI, Y.; CHUEH, P.J. Down-regulation of tumor-associated NADH Oxidase, Tnox (ENOX2), enhances capsaicin-induced inhibition of gastric cancer cell growth. *Cell Biochemistry and Biophysics*. v.61, p.355-366, 2011.
- WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J.K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro*. v.25, p.2147-2151, 2011.

- WARD, L.S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. v.46, p.351-360, 2002.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer*. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 04 mar. 2013.
- YANG, K.M.; PYO, J.O.; KIM, G.; YU, R.; HAN, I.S.; JU, S.A.; KIM, W.H.; KIM, B. 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, p.497-510, 2009.
- YANG, Z.; WANG, X.; WANG, H.; HU, L.; ZHENG, X.; LI, S. Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. *Urology*. v.75, p.735-741, 2009.
- ZHANG, J.; NAGASAKI, M.; TANAKA, Y.; MORIKAWA, S. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia Research*. v.27, p.275-283, 2003.
- 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.1465-1478, 2008.
- ZHAO, J.; BOWMAN, L.; MAGAYE, R.; LEONARD, S.S.; CASTRANOVA, V.; DING, M. Apoptosis induced by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *International Journal of Oncology*. v.42, p.1349-1359, 2013.
- ZHAO, Y.H.; LE, J.; ABRAHAM, M.H.; HERSEY, A.; EDDERSHAW, P.J.; LUSCOMBE, C.N.; BOUTINA, D.; BECK, G.; SHERBORNE, B.; COOPER, I.; PLATTS, J.A. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptor. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.90, p.749-784, 2001.
- ZIGLIOLI, F.; FRATTINI, A.; MAESTRONI, U.; DINALE, F.; CIUFFREDA, M.; CORTELLINI, P. Vanilloid-mediated apoptosis in prostate cancer cells through a TRPV-1 dependent and a TRPV-1 independent mechanism. *Acta Biomedica*. v.80, p.13-20, 2009.

ATIVIDADES ACADÊMICAS
DESENVOLVIDAS

➤ **Participação em congressos, eventos e simpósios - como ouvinte.**

- XX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal (2014);
- II Escuela Internacional de Química Medicinal y Farmacología. 2014;
- XLVIII Semana Universitária Paulista em Farmácia e Bioquímica (2012);
- I Simpósio de Dendrímeros (2012);
- XIX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal (2013).

➤ **Participação em congressos, eventos e simpósios – como participante.**

- XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia (2013)
Título: “*Synthesis and Purification of N-(Benzodioxol-5-ylmethylene)aryl-sulfonylhydrazones*”
- III International Symposium on Drug Discovery (2013)
Título: “*Desing and Synthesis of Capsaicin-like Sulfonamide Analogues as Potential Antitumor Agents*”
- 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ (2012)
Título: “*Planejamento e Síntese de Análogos Bioisostéricos da Capsaicina com Potencial Atividade Antitumoral*”
- 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem (2012)
Título: “*Design and Synthesis of Capsaicin-like Sulfonamide Analogues as Potential Antitumor Agents*”

➤ **Publicações de artigos científicos.**

[1] DAMIÃO, M.C.F.C.B.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, A.K.; TEIXEIRA, S.F.; AZEVEDO, R.A.; BARBUTO, J.A.M.; PALACE-BERL, F.; FRANCHI-JUNIOR, G.C.; NOWILL, A.E.; **TAVARES, M.T.**; PARISE-FILHO, R. Novel Capsaicin Analogues as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation and *in silico* Approach. **Archiv der Pharmazie**. V.347, p.1-11, 2014.

[2] FERREIRA, A.K.; DE-SA-JUNIOR, P.L.; PASQUALOTO, K.F.M. ; **TAVARES, M.T.**; DAMIAO, M.C.F.C.B.; AZEVEDO, R.A.; CAMARA, D.A.D.; PEREIRA, A.; SOUZA, D.M.; PARISE-FILHO, R. RPF-101, 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.

[3] FERREIRA, A.K.; DE-SÁ-JÚNIOR, P.L.; PASQUALOTO, K.F.M.; DE-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.; PARISE-FILHO, R. 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, 2013.

[4] MAGANHI, STELLA H.; TAVARES, MAURÍCIO T.; DAMIÃO, MARIANA C.F.C.B.; PARISE-FILHO, ROBERTO. N-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]benzenesulfonamide: an analogue of capsaicin. **Acta Crystallographica Section E**. v.69, p.o1700-o1700, 2013.

[5] MAGANHI, STELLA H.; DAMIÃO, MARIANA C.F.C.B.; TAVARES, MAURÍCIO T.; PARISE-FILHO, ROBERTO. N-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]-4-methylbenzamide: an analogue of capsaicin. **Acta Crystallographica. Section E**. v.69, p.o332-o332, 2013.

[6] PARISE-FILHO, R.; PASQUALOTO, K.F.M.; MAGRI, F.M.; FERREIRA, A.K.; SILVA, B.A.V.G.; DAMIAO, 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.

➤ **Artigos científicos submetidos a periódicos científicos.**

[7] TAVARES, M.T.; DAMIÃO, M.C.F.C.B.; FERREIRA, A.K.; RODRIGUES, C.; BARBUTO, J.A.; AZEVEDO, R.A.; DE-SÁ-JÚNIOR, P.L.; PASQUALOTO, K.F.M.; PARISE-FILHO, R.; FERREIRA, F.F. RPF151 as a potential hit against cancer: synthesis, structural characterization, X-ray powder diffraction and antiproliferative activity. **CrystEngComm**. Submetido.

[8] FERREIRA, A.K.; TAVARES, M.T.; AZEVEDO, R.A.; TEIXEIRA, S.F.; DE-SÁ-JÚNIOR, P.L.; PASQUALOTO, K.F.M.; DAMIÃO, M.C.F.C.B.; BARBUTO, J.A.M.; PARISE-FILHO, R. *In vivo* and *in vitro* studies of RPF151: a novel capsaicin-like compound, non-pungent, active in breast cancer via TRPV-independent pathway. **British Journal of Cancer**. Submetido.

ANEXOS

ANEXOS – I

Espectros de RMN

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-101

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 7,88 (2 H, dd, $J^1 = 1,5$ Hz, $J^2 = 1,6$ Hz, 10, 14-ArH), 7,61–7,50 (3 H, m, 11, 12, 13-ArH), 6,71–6,63 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,93 (2 H, s, 7- OCH_2O), 4,80 (1 H, *sl*, -NH), 4,08 (2 H, d, $J = 5,8$ Hz, 8- CH_2).

Nota:

s = singlete; *sl* = singlete largo; d = dublete; dd = duplo dublete; m = multipeto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-101

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 147,9 (C1), 147,3 (C2), 140,0 (C9), 132,7 (C5), 130,0 (C10, C14), 129,1 (C11, C13), 127,1 (C12), 121,4 (C4), 108,4 (C6), 108,2 (C3), 101,1 (C7), 47,2 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-102

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

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ = ppm) δ: 8,60 (1 H, t, *J* = 1,9 Hz, 14-ArH), 8,41 (1 H, d, *J* = 8,2 Hz, 12-ArH), 8,16 (1 H, d, *J* = 8,2 Hz, 10-ArH), 7,71 (1 H, t, *J* = 8,0 Hz, 11-ArH), 6,69-6,58 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,93 (2 H, s, 7-OCH₂O), 5,02 (1 H, t, *J* = 5,5 Hz, -NH), 4,17 (2 H, d, *J* = 5,9 Hz, 8-CH₂).

Nota:

s = singleto; d = dubleto; m = multipletto; t = tripleto; tl = tripleto largo.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-102

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,2 (C13), 148,1 (C1), 147,6 (C2), 142,7 (C9), 132,5 (C5), 130,4 (C10), 129,2 (C11), 126,9 (C12), 122,4 (C14), 121,6 (C4), 108,4 (C6), 108,3 (C3), 101,3 (C7), 47,3 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-103

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 7,79 (2 H, d, J = 8,7 Hz, 10, 14-ArH), 7,49 (2 H, d, J = 8,7 Hz, 11, 13-ArH), 6,73–6,64 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,95 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,72 (1 H, t, J = 5,5 Hz, -NH), 4,08 (2 H, d, J = 6,0 Hz, 8-CH₂).

Nota:

s = singlete; d = dublete; m = multiplete; t/l = tripleto largo.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-103

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,0 (C1), 147,5 (C2), 139,2 (C9), 138,7 (C5), 129,6 (C12), 129,3 (C11, C13), 128,6 (C10, C14), 121,4 (C4), 108,4 (C6), 108,3 (C3), 101,1 (C7), 47,2 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-104

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 7,76 (2 H, d, J = 8,2 Hz, 10, 14-ArH), 7,31 (2 H, d, J = 8,0 Hz, 11, 13-ArH), 6,71–6,63 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,92 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,90 (1 H, t, J = 5,8 Hz, -NH), 4,03 (2 H, d, J = 6,0 Hz, 8-CH₂), 2,45 (3 H, s, 15-CH₃).

Nota:

s = singleto; d = dubleto; m = multipeto; t/l = tripleto largo.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-104

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 147,9 (C1), 147,3 (C2), 143,5 (C9), 137,0 (C12), 130,1 (C5), 129,7 (C11, C13), 127,2 (C10, C14), 121,4 (C4), 108,5 (C6), 108,2 (C3), 101,1 (C7), 47,1 (C8), 21,5 (C15).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-105

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 7,80-7,76 (2 H, m, J = 8,5 Hz, 10, 14-ArH), 7,53-7,49 (2 H, m, J = 8,5 Hz, 11, 13-ArH), 6,67-6,62 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,90 (2 H, s, 7-OCH₂O), 5,14 (1 H, sl, -NH), 4,05 (2 H, s, 8-CH₂), 1,36 (9 H, s, 16, 17, 18-CH₃).

Nota:

s = singleto; sl = singleto largo; m = multipeto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-105

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 156,4 (C12), 147,8 (C1), 147,2 (C2), 137,0 (C9), 130,2 (C5), 127,0 (C10, C14), 126,0 (C11, C13), 121,4 (C4), 108,5 (C6), 108,1 (C3), 101,1 (C7), 47,1 (C8), 35,1 (C15), 31,1 (C16, C17, C18).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-106

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 7,89-7,84 (2 H, m, 10, 14-ArH), 7,21-7,15 (2 H, m, 11, 13-ArH), 6,71-6,62 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,93 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,97 (1 H, t, J = 5,4 Hz, -NH), 4,06 (2 H, d, J = 5,9 Hz, 8-CH₂).

Nota:

s = singlete; d = dublete; m = multiplete; t/ = tripleto largo.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-106

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 166,7 (C12), 148,0 (C1), 147,4 (C2), 136,2 (C9), 136,1 (C5), 129,9 (C10), 129,8 (C14), 121,4 (C4), 116,4 (C11), 116,1 (C13), 108,4 (C6), 108,2 (C3), 101,2 (C7), 47,1 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-107

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

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ = ppm) δ : 8,50 (1 H, *sl*, -NH), 8,42-8,38 (2 H, m, 11, 13-ArH), 8,05-8,00 (2 H, m, 10, 14-ArH), 6,83-6,71 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,98 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,04 (2 H, s, 8-CH₂).

Nota:

s = singlete; *sl* = singlete largo; m = multiplete.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-107

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

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ = ppm) δ : 149,3 (C12), 147,1 (C9), 146,6 (C1), 146,3 (C2), 130,8 (C5), 128,0 (C10, C14), 124,3 (C11, C13), 121,2 (C4), 108,1 (C6), 107,8 (C3), 100,9 (C7), 46,0 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-108

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 7,80 (2 H, d, J = 8,9 Hz, 10, 14-ArH), 6,97 (2 H, d, J = 8,9 Hz, 11, 13-ArH), 6,71–6,62 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,92 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,55 (1 H, t, J = 5,9 Hz, -NH), 4,06 (2 H, d, J = 6,1 Hz, 8-CH₂).

Nota:

s = singleto; d = dubleto; m = multipeto; t/ = tripleto largo.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-108

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 163,0 (C12), 148,0 (C1), 147,4 (C2), 131,6 (C9), 130,1 (C5), 129,3 (C10, C14), 121,4 (C4), 114,3 (C11, C13), 108,5 (C6), 108,3 (C3), 101,2 (C7), 55,6 (C15), 47,2 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-109

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

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ = ppm) δ : 8,12 (1 H, *tl*, J = 6,2 Hz, -NH), 7,83 (4 H, *sl*, 10, 11, 13, 14-ArH), 7,77 (2 H, *d*, J = 7,0 Hz, 16, 20-ArH), 7,54-7,44 (3 H, *m*, J = 7,0 Hz, 17, 18, 19-ArH), 6,79-6,69 (3 H, *m*, 3, 4, 6-ArH), 5,91 (2 H, *s*, 7-OCH₂O), 3,95 (2 H, *d*, J = 6,2 Hz, 8-CH₂).

Nota:

s = singlete; *sl* = singlete largo; d = dublete; m = multiplete; *tl* = tripleto largo.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-109

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

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\delta = \text{ppm}$) δ :
 147,1 (C1), 146,2 (C2), 143,8 (C9), 139,7 (C15),
 138,6 (C12), 131,3 (C5), 129,1 (C17, C19), 128,4
 (C16, C20), 127,2 (C10, C14), 127,1 (C18), 127,0
 (C11, C13), 121,0 (C4), 108,1 (C6), 107,8 (C3),
 100,8 (C7), 46,0 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-110

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

^1H NMR (300 MHz, , DMSO- d_6 , δ = ppm) δ : 7,84 (1 H, t, J = 6,2 Hz, -NH), 7,18 (1 H, t, J = 7,8 Hz, 11-ArH), 6,99 (1 H, t, J = 1,9 Hz, 14-ArH), 6,90 (1 H, d, J = 7,7 Hz, 10-ArH), 6,81-6,74 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 6,71 (1 H, d, J = 7,9 Hz, 12-ArH), 5,96 (2 H, s, -OCH $_2$ O), 5,52 (2 H, *sl*, -NH $_2$), 3,86 (2 H, d, J = 6,2 Hz, 8-CH $_2$).

Nota:

s = singleto; *sl* = singleto largo; d = dubleto; m = multipeto; t = tripleto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-110

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

^{13}C NMR (75 MHz, , DMSO- d_6 , δ = ppm) δ :
 149,2 (C13), 147,1 (C1), 146,2 (C2), 141,1 (C9),
 131,6 (C5), 129,4 (C11), 120,8 (C4), 117,1 (C10),
 113,1 (C14), 111,0 (C12), 108,0 (C6), 107,8 (C3),
 100,8 (C7), 45,8 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-1114-amino-*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)benzenosulfonamida:

^1H NMR (300 MHz, , DMSO- d_6 , δ = ppm) δ : 7,53 (1 H, t, J = 6,3 Hz, -NH), 7,41 (2 H, d, J = 8,7 Hz, 10, 14-ArH), 6,79 (1 H, d, J = 7,9 Hz, 4-ArH), 6,74 (1 H, s, 6-ArH), 6,69 (1 H, d, J = 7,9 Hz, 3-ArH), 6,59 (2 H, d, J = 8,7 Hz, 11, 13-ArH), 5,96 (2 H, s, -OCH₂O), 5,88 (2 H, sl, -NH₂), 3,79 (2 H, d, J = 6,3 Hz, 8-CH₂).

Nota:

s = singlete; sl = singlete largo; d = dublete; t = triplete.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-111

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

^{13}C NMR (75 MHz, , DMSO- d_6 , δ = ppm) δ :
 152,3 (C12), 147,1 (C1), 146,2 (C2), 131,6 (C5),
 128,4 (C9), 125,7 (C10, C14), 120,8 (C4), 112,6
 (C11, C13), 108,0 (C6), 107,8 (C3), 100,8 (C7),
 45,8 (C8).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-151

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,61-6,52 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,73 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,33 (1 H, t/l, J = 5,5 Hz, -NH), 3,97 (2 H, d, J = 5,9 Hz, 8-CH₂), 2,70 (2 H, t, J = 8,1 Hz, 9-CH₂), 1,57-1,46 (2 H, m, J = 8,2 Hz, 10-CH₂), 1,23-1,11 (2 H, m, J = 7,4 Hz, 11-CH₂), 0,68 (3 H, t, J = 7,3 Hz, 12-CH₃).

Nota:

s = singlete; d = dublete; m = multipeto; t/l = tripleto largo; t = tripleto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-151

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , $\delta = \text{ppm}$) δ : 148,1 (C1), 147,4 (C2), 130,8 (C5), 121,4 (C4), 108,4 (C6), 108,3 (C3), 101,2 (C7), 53,1 (C9), 47,1 (C8), 25,6 (C10), 21,5 (C11), 13,5 (C12).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-152

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,86-6,78 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,98 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,40 (1 H, t, J = 5,6 Hz, -NH), 4,22 (2 H, d, J = 5,9 Hz, 8-CH₂), 2,95 (2 H, t, J = 8,2 Hz, 9-CH₂), 1,83-1,73 (2 H, m, J = 7,6 Hz, 10-CH₂), 1,43-1,21 (12 H, m, 11, 12, 13, 14, 15-CH₂), 0,91 (3 H, t, 16-CH₃).

Nota:

s = singleto; d = dubleto; m = multipeto; t/ = tripleto largo; t = tripleto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-152

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,1 (C1), 147,4 (C2), 130,8 (C5), 121,4 (C4), 108,4 (C6), 108,3 (C3), 101,2 (C7), 53,4 (C9), 47,1 (C8), 31,7 (C14), 29,0 (C12), 28,9 (C13), 28,2 (C11), 23,6 (C15), 22,6 (C10), 14,0 (C16).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-153

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,83-6,75 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,95 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,65 (1 H, *sl*, -NH), 4,18 (2 H, d, 8-CH₂), 2,90 (2 H, t, J = 8,1 Hz, 9-CH₂), 1,79-1,69 (2 H, m, J = 7,6 Hz, 10-CH₂), 1,40-1,23 (6 H, m, 11, 12, 13-CH₂), 0,88 (3 H, t, 14-CH₃).

Nota:

s = singlete; *sl* = singlete largo; d = dublete; m = multiplete; t = tripleto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-153

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,1 (C1), 147,4 (C2), 130,9 (C5), 121,4 (C4), 108,4 (C6), 108,3 (C3), 101,2 (C7), 53,4 (C9), 47,0 (C8), 31,2 (C12), 27,9 (C11), 23,5 (C13), 22,3 (C10), 13,9 (C14).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-154

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,83-6,78 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,96 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,52 (1 H, *sl*, -NH), 4,19 (2 H, s, 8-CH₂), 2,91 (2 H, t, J = 7,9 Hz, 9-CH₂), 1,87-1,74 (2 H, m, J = 7,9 Hz, 10-CH₂), 1,01 (3 H, t, J = 7,5 Hz, 11-CH₃).

Nota:

s = singlete; *sl* = singlete largo; m = multiplete; t = tripleto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-154

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,1 (C1), 147,4 (C2), 130,8 (C5), 121,3 (C4), 108,4 (C6), 108,3 (C3), 101,2 (C7), 55,1 (C9), 47,1 (C8), 17,4 (C10), 12,9 (C11).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-155*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)etano-1-sulfonamida:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,83 (1 H, s, 6-ArH), 6,81-6,75 (2 H, dd, $J^1 = 8,0$ Hz, $J^2 = 7,9$ Hz, 3, 4-ArH), 5,96 (2H, s, 7-OCH₂O) 4,49 (1 H, *sl*, -NH), 4,19 (2 H, d, $J = 6,0$ Hz, 8-CH₂), 2,96 (2 H, q, $J = 7,4$ Hz, 9-CH₂), 1,33 (3 H, t, $J = 7,4$ Hz, 10-CH₃).

Nota:

s = singlete; *sl* = singlete largo; d = dublete; dd = duplo dublete; q = quarteto; t = tripleto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-155

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

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,1 (C1), 147,5 (C2), 130,8 (C5), 121,3 (C4), 108,4 (C6, C3), 101,2 (C7), 47,7 (C9), 47,1 (C8), 8,2 (C10).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-156*N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)propano-2-sulfonamida:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,83 (1 H, s, 6-ArH), 6,80-6,74 (2 H, dd, $J^1 = 8,0$ Hz, $J^2 = 8,1$ Hz, 3, 4-ArH), 5,96 (2H, s, 7-OCH₂O) 4,42 (1 H, t, $J = 5,3$ Hz, -NH), 4,20 (2 H, d, $J = 5,9$ Hz, 8-CH₂), 3,09 (1 H, m, $J = 6,8$ Hz, 9-CH), 1,35 (6 H, d, $J = 6,8$ Hz, 10, 11-CH₃).

Nota:

s = singlete; t/l = tripleto largo; d = dubleto; dd = duplo dubleto, m = multipeto.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-156

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)propano-2-sulfonamida:

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,1 (C1), 147,4 (C2), 131,2 (C5), 121,3 (C4), 108,4 (C3), 108,3 (C6), 101,2 (C7), 53,9 (C9), 47,4 (C8), 16,6 (C10, C11).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-157

***N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-2-metilpropano-1-sulfonamida:**

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,84 (1 H, s, 6-ArH), 6,84-6,74 (2 H, dd, $J^1 = 8,0$ Hz, $J^2 = 8,1$ Hz, 3, 4-ArH), 5,99 (2H, s, 7-OCH₂O) 4,42 (1 H, t, $J = 5,3$ Hz, -NH), 4,20 (2 H, d, $J = 5,9$ Hz, 8-CH₂), 2,91 (2 H, t, $J = 7,8$ Hz, 9-CH₂), 2,01-1,95 (1 H, m, $J = 7,8$ Hz, 10-CH), 0,89 (6 H, d, $J = 7,8$ Hz, 11, 12-CH₃).

Nota:

s = singlete; *tl* = tripleto largo; d = dublete; dd = duplo dublete, m = multiplete.

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF-157

N-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-2-metilpropano-1-sulfonamida:

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 148,0 (C1), 147,3 (C2), 131,1 (C5), 121,2 (C4), 108,4 (C3), 108,3 (C6), 101,1 (C7), 48,9 (C9), 47,3 (C8), 24,8 (C10), 21,5 (C11, C12).

Nota:

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto RPF-252benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil-octano-1-sulfonato:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 6,90-6,77 (3 H, m, 3, 4, 6-ArH), 5,98 (2 H, s, 7-OCH₂O), 4,54 (2 H, s, 8-CH₂), 3,68 (2 H, t, J = 7,6 Hz, 9-CH₂), 2,11-2,01 (2 H, m, J = 7,7 Hz, 10-CH₂), 1,59-1,49 (2 H, m, J = 7,0 Hz, 15-CH₂), 1,37-1,31 (8 H, m, J = 7,7 Hz, 11, 12, 13, 14-CH₂), 0,91 (3 H, t, J = 6,9 Hz, 16-CH₃).

Nota:

s = singlete; m = multiplete; t = triplete.

Padrão de referência interna: TMS

ANEXOS – II

Análises elementares

Análise elementar do composto RPF-101

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 18/12/2012 15:20

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF101	57,77	4,61	4,81
RPF101	57,77	4,61	4,77

Análise elementar do composto RPF-102

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 07/03/2013 10:24

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF102	49,89	3,67	8,24
RPF102	50,01	3,72	8,26

Análise elementar do composto RPF-103

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 07/03/2013 10:26

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF103	51,61	3,83	4,22
RPF103	51,59	3,91	4,14

Análise elementar do composto RPF-104

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 18/12/2012 15:22

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF104	58,68	4,94	4,56
RPF104	58,61	4,93	4,56

Análise elementar do composto RPF-105

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 07/03/2013 10:29

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF105	62,36	6,28	3,93
RPF105	61,99	6,17	3,91

Análise elementar do composto RPF-106

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 07/03/2013 10:48

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF106	54,11	3,96	4,45
RPF106	54,13	3,99	4,44

Análise elementar do composto RPF-107

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 07/03/2013 10:51

Analizado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF107	50,05	3,79	8,12
RPF107	50,01	3,81	8,08

Análise elementar do composto RPF-108

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 07/03/2013 10:52

Analizado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF108	56,01	4,81	4,34
RPF108	56,10	4,72	4,31

Análise elementar do composto RPF-109

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 20/06/2013 18:31

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF109	64,44	5,04	3,51
RPF109	64,54	4,79	3,49

Análise elementar do composto RPF-110

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 17/06/2013 18:35

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF110	54.85	4.59	9.15
RPF110	54.87	4.61	9.14

Análise elementar do composto RPF-111

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 17/06/2013 18:39

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF111	54.89	4.61	9.14
RPF111	54.88	4.60	9.15

Análise elementar do composto RPF-151

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 07/03/2013 10:55

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF151	53,21	6,37	5,15
RPF151	53,06	6,42	5,11

Análise elementar do composto RPF-152 **Central Analítica****Data:** 07/03/2013 10:56**Analizado por:** Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF152	58,65	7,81	4,28
RPF152	58,71	7,89	4,21

Análise elementar do composto RPF-153 **Central Analítica****Data:** 20/06/2013 18:45**Analizado por:** Luzia narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF153	56,47	6,93	4,61
RPF153	56,86	7,33	4,55

Análise elementar do composto RPF-154

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 20/06/2013 18:45

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF154	51,44	6,11	5,55
RPF154	51,44	6,11	5,55

Análise elementar do composto RPF-155

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 20/06/2013 18:45

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF155	49,18	5,54	5,68
RPF155	49,18	5,54	5,68

Análise elementar do composto RPF-156

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 20/06/2013 18:45

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF156	51,64	6,15	5,33
RPF156	51,64	6,15	5,33

Análise elementar do composto RPF-157

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Central Analítica

Data: 15/07/2013 15:12

Analisado por: Luzia Narimatsu

Amostra	%Carbono	%Hidrogênio	%Nitrogênio
RPF157	53,14	6,42	5,10
RPF157	53,14	6,42	5,10

ANEXOS – III

Publicações científicas

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 Damiano ^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.

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.

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. Damiano^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)
 $T_{\min} = 0.930$, $T_{\max} = 0.948$

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.

$D-\text{H}\cdots A$	$D-\text{H}$	$\text{H}\cdots A$	$D\cdots A$	$D-\text{H}\cdots A$
$\text{N1}-\text{H1N}\cdots\text{O2}^{\text{i}}$	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 *publCIF* (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., Damiano, 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 *pubCIF* (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.

Novel Capsaicin Analogues as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation and *in silico* Approach

Mariana C. F. C. B. Damião^a; Kerly F. M. Pasqualoto^b; Adilson K. Ferreira^c; Sarah F. Teixeira^c; Ricardo A. Azevedo^c; José A. M. Barbuto^{cf}; Fanny Palace-Berl^d; Gilberto C. Franchi-Junior^e; Alexandre E. Nowill^e; Maurício T. Tavares^a; Roberto Parise-Filho^{a*}

^a*Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, Postal Code: 05508-000, São Paulo, SP, Brazil;*

^b*Biochemistry and Biophysical Laboratory, Butantan Institute, Vital Brasil Avenue 1500, Postal Code: 05503-900, São Paulo, SP, Brazil;*

^c*Laboratory of Tumor Immunology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 1730, Postal Code: 05508-900, São Paulo, SP, Brazil;*

^d*Department of Biochemical-Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, Postal Code: 05508-000, São Paulo, SP, Brazil;*

^e*Childhood Onco-Hematological Research Center, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Postal Code: 13083-970, Campinas, SP, Brazil;* ^f*Cell and Molecular Therapy Center (NUCEL-NETCEM), Faculty of Medicine, University of São Paulo.*

Keywords: Capsaicin analogues; Bioisosterism; Citotoxic activity; Exploratory data analysis; Molecular modification.

***Corresponding author:** Dr. Roberto Parise-Filho. Assistant Professor, Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, Postal Code: 05508-000, São Paulo, Brazil.

Phone: +55 11 3091-3793, Fax: +55 11 3091-3815

E-mail: roberto.parise@usp.br

ARTICLE

RPF151 as a potential hit against cancer: synthesis, structural characterization, X-ray powder diffraction and antiproliferative activity

Cite this: DOI: 10.1039/x0xx00000x

Received 00th January 2012,
Accepted 00th January 2012

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Maurício T. Tavares,^a Mariana C. F. C. B. Damiano,^a Adilson K. Ferreira,^b Cecilia P. Rodrigues,^b José A. M. Barbuto,^{b,c} Ricardo A. Azevedo,^b Paulo L. de-Sá-Junior,^d Kerly F. M. Pasqualoto,^e Roberto Parise-Filho^{a*} and Fabio F. Ferreira^{f*}

RPF151, an alkylsulfonamide capsaicin analogue, was synthesized by a simple and efficient one-step methodology. Its chemical structure was confirmed by NMR and elemental analysis. The crystal structure was determined by X-ray powder diffraction and simulating annealing procedure, and the final structure refined by the Rietveld method. Hydrogen bonding interactions were established between two independent molecules, within the asymmetric unit, along the *c*-axis. Regarding the biological assay, RPF151 has significantly reduced the human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) growth at 10 μ M concentration. It was not observed any kind of changes on cell morphology. The findings have suggested that RPF151 probably acts in the angiogenesis process, but do not present cytotoxic effects, pointing out this molecule as a potential hit against cancer.

Introduction

Cancer is one of the major public health problem in developed and developing countries. Despite the increase of disease-free survival and overall survival in patients with cancer in the last years, it is still responsible for millions of death year-by-year.^{1,2} Unfortunately, most currently anticancer drugs cause toxicity to proliferating cells, which can severely limit its therapeutic value. Therefore, the interest in pharmacological effects of bioactive compounds on cancer treatment and prevention has been also increased.³ Natural product structures, for instance, have chemical diversity, biochemical specificity and other interesting molecular properties, which could become them potentially leads for drug discovery, mainly in cancer.⁴

Recently, capsaicin (Fig. 1a) or *N*-vanillyl-8-methyl-1-nonenamide, the primary pungent and irritating natural product found in a variety of red chilli peppers of the *Capsicum* genus, was reported to selectively inhibit the growth and to induce apoptosis in tumour cell lines.⁵⁻⁷ Our research group have already reported that an arylsulfonamide analogue of capsaicin (RPF101)^{8,9} has showed significant antitumor activity in breast cancer cell lines (MCF-7), supporting the use of natural molecular fingerprints as an inspiring source for designing new bioactive chemical entities.¹⁰ Then, following the path to develop more potent and selective anticancer agents, we designed a novel alkylsulfonamide capsaicin analogue

(RPF151) through the ligand-based drug design (LBDD) strategy (Fig. 1b).

In the present study, the synthesis, X-ray powder diffraction data for crystal structure determination (conformational arrangement), and antiproliferative activity were carried out for the capsaicin analogue, benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl)butane-1-sulfonamide, named RPF151.

Fig. 1 Structures of capsaicin (a) and its bioactive alkylsulfonamide analogue, RPF151 (b).

In vivo and in vitro studies of RPF151: a novel capsaicin-like compound, non-pungent, active in breast cancer via TRPV-independent pathway.

Adilson K. Ferreira^a, Maurício T. Tavares^b, Ricardo A. Azevedo^a, Sarah Fernandes Teixeira^a, Paulo L. de Sá-Junior^c, Kerly F. M. Pasqualoto^d, Mariana C. F. C. B. Damião^b, José A. M. Barbuto^{a,e}, Roberto Parise-Filho^b

^aLaboratory of Tumour Immunology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 1730, Postal Code: 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

^bLaboratory of Design and Synthesis of Bioactive Substances, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 580, Postal Code: 05508-000, São Paulo, SP, Brazil;

^cLaboratory of Genetics, Butantan Institute, Vital Brasil Avenue 1500, Postal Code: 05503-900, Sao Paulo, SP, Brazil;

^dBiochemistry and Biophysical Laboratory, Butantan Institute, Vital Brasil Avenue 1500, Postal Code: 05503-900, São Paulo, SP, Brazil;

^eCell and Molecular Therapy Center NUCEL/NETCEM, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Pangaré St., s/n, Postal Code: 05360-120, São Paulo, SP, Brazil.

ANEXOS – IV

Ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 8089709/2 - Maurício Temotheo Tavares

Email: mauricio.tavares@usp.br
Data de Nascimento: 12/02/1986
Cédula de Identidade: RG - 326513346 - 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 Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 02/07/2012 a 30/07/2012 E.Mail:
hajudan@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 31/07/2012 a 10/12/2012 E.Mail:
hajudan@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Roberto Parise Filho - 11/12/2012 até o presente. E.Mail:
roberto.parise@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 02/07/2012
**Data de Aprovação no Exame de
Qualificação:** Aprovado em 21/08/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
**Data Máxima para Aprovação da
Banca:**
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 02/07/2012
Matrícula de Acompanhamento em 10/07/2014

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/07/2014

Impresso em: 28/07/14 09:06:51

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 8089709/2 - Maurício Temotheo Tavares

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 I	16/08/2012	28/11/2012	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5705-5/1	Planejamento de Fármacos	20/08/2012	28/10/2012	90	6	80	A	N	Concluída
FBA5728-3/6	Aprimoramento Didático	16/10/2012	12/11/2012	60	4	88	A	N	Concluída
FBF5704-6/1	Análise Espectrométrica de Fármacos	04/03/2013	16/06/2013	150	10	90	A	N	Concluída

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

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/07/2014

Impresso em: 28/07/14 09:06:51

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 8089709/1 - Maurício Temotheo Tavares

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5808-1/2	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos (Planejamento de Fármacos: As Bases para o Desenvolvimento de Candidatos a Anti-neoplásicos)	02/07/2012	08/07/2012	30	2	100	A	S	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0		2
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:			2

Créditos Atribuídos à Tese: 0

Conceito até 31/12/1996:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 12 horas de atividade programada.

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:

Impresso em: 28/07/14 09:08:06

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 8089709/2 - Mauricio Temotheo Tavares

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3203551	Roberto Parise Filho	FCF - USP	Presidente
9068030	Julio Cezar Pastre	UNICAMP - Externo	Membro
43287	Elizabeth Igne Ferreira	FCF - USP	Membro

Última ocorrência: Titulado em 01/09/2014

Impresso em: 08/09/14 15:49:51

Irineu Ruel de Oliveira
Chefe Adm. de Serviço
SPG/FCF/USP
Nº USP 2115033

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 9138 - 8089709 - 2 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Mauricio Temotheo Tavares no Programa: Fármaco e Medicamentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 01 dias do mês de setembro de 2014, no(a) Auditório FCF/USP, realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Mauricio Temotheo Tavares, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Roberto Parise Filho	Presidente	FCF - USP	<u>APROVADO</u>
Julio Cezar Pastre	Titular	UNICAMP - Externo	<u>APROVADO</u>
Elizabeth Igne Ferreira	Suplente	FCF - USP	<u>APROVADO</u>

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Irineu Ruel de Oliveira _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 01 dias do mês de setembro de 2014.

Julio Cezar Pastre

Elizabeth Igne Ferreira

Roberto Parise Filho

Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 01.09.2014 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Fármaco e Medicamentos - Área de concentração: Insumos Farmacêuticos.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

CONFERE COM
O ORIGINAL

Irineu Ruel de Oliveira
Chefe Adm. de Serviço
SAG/FCF/USP
Nº USP 2115033

ANEXOS – V

Currículo Lattes do aluno

Maurício Temotheo Tavares Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2616860754160547>

Última atualização do currículo em 06/10/2014

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (2011) e mestrado em Fármaco e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP - 2014). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Química Farmacêutica Medicinal, atuando principalmente nos seguintes temas: planejamento e síntese de protótipos bioativos candidatos a fármacos e Modelagem Molecular de compostos orgânicos de interesse farmacêutico.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Maurício Temotheo Tavares
Filiação	Honorato Marques Tavares e Walquíria da Silva Temotheo Tavares
Nascimento	12/02/1986 - São Bernardo do Campo/SP - Brasil
Carteira de Identidade	326513346 SSP - SP - 13/09/1994
CPF	343.037.398-04

Formação acadêmica/titulação

- 2012 - 2014** Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina, Ano de obtenção: 2014
Orientador: Roberto Parise Filho
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2007 - 2011** Graduação em Farmácia.
Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, São Paulo, Brasil
Título: Prospecção de actinomicetos de solo produtores de antibióticos
Orientador: Maria Beatriz Riverón Acosta
Bolsista do(a): Instituto Presbiteriano Mackenzie

Formação complementar

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Novas Metodologias em Síntese Orgânica.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Modelagem Molecular Aplicada.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em História da Descoberta dos Fármacos.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Highlights in Medicinal Chemistry.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Efeitos Estruturais na Descoberta de Fármacos.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em Princípios de Farmacologia: Aspectos Moleculares.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Innovative Medicinal Chemistry in the Academic Lab.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Conceitos Gerais sobre HPLC - Técnica e aplicação.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em NR 13 - Vasos de pressão e unidades de processo.
SENAI - Departamento Regional de São Paulo, SENAI/DR/SP, São Paulo, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Técnicas de Imunoensaios.
Hospital das Clínicas de São Paulo (SP), HC, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Métodos cromatográficos.
Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, São Paulo, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Métodos espectrofotométricos.
Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Validação de Metodologias Analíticas.
XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos, XVI CPFAR, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Logística Farmacêutica.
XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos, XVI CPFAR, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Deontologia Farmacêutica.
Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, CRF-SP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Introdução a espectroscopia de infravermelho.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Montagem de Drogaria. XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, XV CPFAR, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Autoinspeção na Indústria Farmacêutica. XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, XV CPFAR, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Pesquisa Clínica no Brasil. XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, XV CPFAR, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Permacultura. Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Transporte e Armaz. de Insumos Farmacêuticos. XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, XV CPFAR, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 6, Regime: Parcial
- 2012 - 2012** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 12, Regime: Parcial
- 2012 - Atual** Vínculo: Mestrado , Enquadramento funcional: Mestrando / Pesquisador, Regime: Dedicação exclusiva

2. SENAI - Departamento Regional de São Paulo - SENAI/DR/SP

Vínculo institucional

- 2003 - 2012** Vínculo: Terceiro , Enquadramento funcional: Instrutoria e Docência, Regime: Parcial

3. Universidade Presbiteriana Mackenzie - MACKENZIE

Vínculo institucional

- 2010 - 2010** Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitor da Disciplina de Microbiologia , Carga horária: 6, Regime: Parcial
- 2010 - 2010** Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitor da Disciplina de Microbiologia , Carga horária: 6, Regime: Parcial
- 2009 - 2009** Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 8, Regime: Parcial
- 2009 - 2010** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 8, Regime: Parcial
- 2008 - 2008** Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitor de Tenda da Saúde , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2012 - Atual** Candidatos a Novos Agentes Antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina
- Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);
Integrantes: Maurício Temotheo Tavares; Roberto Parise-Filho (Responsável); Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff Damião
- 2009 - 2010** Prospecção de Actinomicetos de Solo Produtores de Antibióticos
- Descrição: Iniciação Científica - PIBIC / CNPq
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1);
Integrantes: Maurício Temotheo Tavares; Maria Beatriz Riverón Acosta (Responsável)
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq
- 2009 - 2009** Avaliação do Perfil Anti-inflamatório do extrato de Baccharis sp.
- Descrição: Iniciação Científica - PIVIC / CNPq
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1);
Integrantes: Maurício Temotheo Tavares; Daniela de Oliveira Toyama (Responsável)
- 2008 - 2008** Estudos de polimorfismos de DNA associados a distúrbios do desenvolvimento.
- Descrição: Iniciação Científica - MackPesquisa
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1);
Integrantes: Maurício Temotheo Tavares; Ana Paula Pimentel Costa (Responsável)

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- 1.** [doi](#) DAMIÃO, MARIANA C. F. C. B., PASQUALOTO, KERLY F. M., FERREIRA, ADILSON K., TEIXEIRA, SARAH F., AZEVEDO, RICARDO A., BARBUTO, JOSÉ A. M., PALACE-BERL, FANNY, FRANCHI-JUNIOR, GILBERTO C., NOWILL, ALEXANDRE E., **Tavares, Maurício T.**, PARISE-FILHO, ROBERTO
Novel Capsaicin Analogues as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and Approach. Archiv der Pharmazie (Weinheim). **UJR**, v.347, p.n/a - n/a, 2014.

2. [doi](#) FERREIRA, ADILSON KLEBER, DE-SÁ-JÚNIOR, PAULO LUIZ, PASQUALOTO, KERLY FERNANDA MESQUITA, DE AZEVEDO, RICARDO ALEXANDRE, CÂMARA, DIANA APARECIDA DIAS, COSTA, ANDRÉ SANTOS, FIGUEIREDO, CARLOS ROGÉRIO, MATSUO, ALISSON LEONARDO, MASSAOKA, MARIANA HIROMI, AJADA, ALINE VIVIAN VATTI, LEBRUN, IVO, DAMIÃO, MARIANA CELESTINA FROJUELLO COSTA B. **TAVARES, MAURÍCIO TEMOTHEO**, MAGRI, FÁTIMA MARIA MOTTER, KERKIS, IRINA, PARISE FILHO, ROBERTO
Cytotoxic effects of dillapiol 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 (Paris. Print)*. [JCR](#), v.99, p.195 - 207, 2013.
3. [doi](#) MAGANHÍ, STELLA H., **TAVARES, Maurício T.**, DAMIÃO, MARIANA C. F. C. B., PARISE FILHO, ROBERTO
N-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]benzenesulfonamide: an analogue of capsaicin. *Acta Crystallographica. Section E*. [JCR](#), v.69, p.o1700 - o1700, 2013.
4. [doi](#) FERREIRA, A. K., DE-SA-JUNIOR, P. L., PASQUALOTO, K. F. M., **TAVARES, M. T.**, DAMIAO, M. C. F. C. B., AZEVEDO, R. A., CAMARA, 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*. [JCR](#), v.266, p.385 - 398, 2013.
5. [doi](#) MAGANHÍ, STELLA H., DAMIÃO, MARIANA C. F. C. B., **TAVARES, Maurício T.**, PARISE FILHO, ROBERTO
-[(1,3-Benzodioxol-5-yl)methyl]-4-methylbenzamide: an analogue of capsaicin. *Acta Crystallographica. Section E*. [JCR](#), v.69, p.o332 - o332, 2013.
6. [doi](#) PARISE-FILHO, R., PASQUALOTO, K. F. M., MAGRI, F. M., FERREIRA, A. K., SILVA, B. A. V. G., DAMIAO, M. C. F. C. B., **TAVARES, M. T.**, AZEVEDO, R. A., AUADA, A. V. V., POLLI, M. C., BRANDT, C. A.
Dillapiol as Antileishmanial Agent: Discovery, Cytotoxic Activity and Preliminary SAR Studies of Dillapiol Analogues.. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*. [JCR](#), v.345, p.934 - 944, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **TAVARES, M. T.**, DAMIAO, M. C. F. C. B., FERREIRA, A. K., RODRIGUES, C., BARBUTO, J. A. M., AZEVEDO, R. A., DE-SA-JUNIOR, P. L., PARISE-FILHO, R., FERREIRA, F. F.
Synthesis and crystal structure of a new anticancer candidate: RPF151. In: 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 2014, Montreal, Québec.
2014 IUCr Book of Abstracts, 2014. v.A70. p.c1561 - c1561
2. **TAVARES, M. T.**, PARISE-FILHO, R.
Planejamento e Síntese de Análogos Bioisotéricos da Capsaicina com Potencial Atividade Antitumoral In: 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.
Livro de Resumos da 35ª Reunião Anual da SBQ. São Paulo: SBQ, 2012.
3. **TAVARES, M. T.**, ACOSTA, M. B. R.
Prospecção de Actinomicetos de Solo Produtores de Antibióticos In: VI Jornada de Iniciação Científica - Mackenzie, 2010, São Paulo.
Livro de Resumos da VI Jornada de Iniciação Científica - Mackenzie. São Paulo: Mackenzie, 2010. v.6.
4. **TAVARES, M. T.**, ACOSTA, M. B. R.
Prospecção de Actinomicetos de Solo Produtores de Antibióticos In: 10º Congresso Nacional de Iniciação Científica, 2010, São Paulo.
Livro de Resumos do 10º CONIC-SEMESP. São Paulo: SEMESP, 2010.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **TAVARES, M. T.**
Principais Riscos da Exposição Ocupacional à Insumos Farmacêuticos, 2012. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
2. **TAVARES, M. T.**
Emprego de Caldeiras e Unidades de Processo na Indústria Químico-Farmacêutica, 2011. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
3. **TAVARES, M. T.**
Processos Fermentativos na Produção de Bebidas, 2011. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **XX EVQFM - Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal**, 2014. (Oficina)
2. **II Escuela Internacional de Química Medicinal y Farmacología**, 2014. (Encontro)
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **5º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas**, 2013. (Simpósio)
DESIGN AND SYNTHESIS OF CAPSAICIN-LIKE SULFONAMIDE ANALOGUES AS POTENTIAL ANTITUMOR AGENTS.
4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **III International Symposium on Drug Discovery**, 2013. (Simpósio)
Design and Synthesis of capsaicin-like sulfonamide analogues as potential antitumor agents.
5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **5º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas**, 2013. (Simpósio)
Synthesis and Purification of N-(Benzodioxol-5-ylmethylene)aryl-sulfonylhydrazones.
6. **XIX EVQFM - Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal**, 2013. (Oficina)
7. **Química Computacional e Modelagem Molecular**, 2013. (Oficina)
8. **Preparo de amostras para técnicas espectro analíticas**, 2013. (Seminário)
9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem 2012**, 2012. (Simpósio)
Design and Synthesis of Capsaicin-like Sulfonamide Analogues as Potential Antitumor Agents.
10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012. (Congresso)
Planejamento e Síntese de Análogos Bioisotéricos da Capsaicina com Potencial Atividade Antitumoral.

11. Dendrimers Simposium, 2012. (Simpósio)
.
12. XLVIII SUPFAB - Semana Universitária Paulista em Farmácia e Bioquímica, 2012. (Simpósio)
.
13. Green Chemistry Program at University of Massachusetts - Boston, 2012. (Seminário)
.
14. Workshop - SBQMed, 2012. (Outra)
.
15. Apresentação Oral no(a) 10º Congresso Nacional de Iniciação Científica - CONIC, 2010. (Congresso)
Prospecção de Actinomicetos de Solo Produtores de Antibióticos.
16. 2º Congresso da Farmácia Brasileira, 2010. (Congresso)
.
17. Expofar, 2010. (Congresso)
.
18. 8º Seminário Internacional de Farmacêuticos, 2010. (Seminário)
.
19. 16º Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2010. (Congresso)
.
20. Pesquisa Clínica no Brasil, 2009. (Oficina)
.
21. Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 2009. (Outra)
.
22. Oficinas Farmacêuticas: Inflamação e Dor, 2008. (Oficina)
.
23. 15º Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2007. (Congresso)
.
24. 7º Seminário Internacional de Farmacêuticos, 2007. (Seminário)
.
25. Expofar, 2007. (Congresso)
.
26. Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2007. (Outra)
.
27. A Pesquisa Científica no Mackenzie e no Brasil, 2007. (Seminário)
.

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. TAVARES, M. T., POLLI, M. C.
Participação em banca de Leandro Lange e Lucas de Souza Santos. **Desenvolvimento de método de análise titulométrica do teor de alendronato de sódio em capsulas**, 2014
(Farmácia) Universidade São Francisco
2. TAVARES, M. T., POLLI, M. C.
Participação em banca de Lucas Vicentini Veríssimo e Thais Manfrinato Ferreira. **Edulcorantes: Aplicações e Toxocidade**, 2014
(Farmácia) Universidade São Francisco
3. TAVARES, M. T., POLLI, M. C.
Participação em banca de Ana Paula Borgo e Andressa Castelhamo Rodrigues. **Desenvolvimento e Evolução de Fármacos Antibacterianos na Última Década**, 2012
(Farmácia) Pontifícia Universidade Católica de Campinas
4. TAVARES, M. T., POLLI, M. C.
Participação em banca de Daniele Dias Camacho e Thaís Sandroni Dallora. **Desenvolvimento e Evolução de Fármacos Usados no Tratamento da Esquizofrenia**, 2012
(Farmácia) Pontifícia Universidade Católica de Campinas
5. TAVARES, M. T., POLLI, M. C.
Participação em banca de Aline Cruz Macedo e Isabela Paganelli Vettori. **Determinação de Parâmetros Físico-Químicos de Fármacos Introduzidos na Terapêutica Nacional e Avaliação Quanto a Tendência de Uso**, 2012
(Farmácia) Pontifícia Universidade Católica de Campinas

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 22/10/2014 às 15:21:58.