

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MATHEUS DE FREITAS SILVA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS  
COMPOSTOS PLANEJADOS POR HIBRIDAÇÃO MOLECULAR DA CURCUMINA  
E DO RESVERATROL**

Alfenas/MG

2016

**MATHEUS DE FREITAS SILVA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE NOVOS  
COMPOSTOS PLANEJADOS POR HIBRIDAÇÃO MOLECULAR DA CURCUMINA  
E DO RESVERATROL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Orientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Jr. Coorientadora: Profa. Dra. Marisa Ionta.

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Matheus de Freitas

Síntese e avaliação da atividade antiproliferativa de novos compostos planejados por hibridação molecular da Curcumina e do Resveratrol / Matheus de Freitas Silva. -- Alfenas/MG, 2016.  
116 f.

Orientador: Claudio Viegas Jr.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2016.  
Bibliografia.

1. Neoplasias. 2. Curcumina. 3. Hibridação. I. Viegas Jr., Claudio.  
II. Título.

CDD-615.19

**MATHEUS DE FREITAS SILVA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE  
NOVOS COMPOSTOS PLANEJADOS POR HIBRIDAÇÃO  
MOLECULAR DA CURCUMINA E DO RESVERATROL**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 26/02/16


Prof<sup>a</sup>. Dra. Aline Guerra Manssour Fraga.

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Assinatura: 

Prof<sup>o</sup>. Dr. Diogo Teixeira Carvalho.

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

Assinatura: 

Prof<sup>o</sup>. Dr. Claudio Viegas Junior.

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

Assinatura: 

Alfenas/MG

2016

Dedico esta dissertação a toda minha família e amigos, que me apoiaram em todas as fases desta jornada.

Em especial dedico aos meus pais por acreditarem neste sonho e a Josidel, meu amor, por me apoiar e não me deixar desistir nas horas mais difíceis!

## AGRADECIMENTOS

Eu seria incapaz de nomear todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso desta etapa da minha vida, portanto inicio agradecendo de todo meu coração a todos os amigos e familiares pelo apoio, porém, alguns eu gostaria de pontuar.

Agradeço de início ao professor Dr. Claudio Viegas Jr., o professor que se tornou orientador, e o orientador que se tornou um amigo, claro que sou grato, pelos conselhos, ensinamentos e até pelas broncas, mas minha maior gratidão é pela confiança que depositou em minha pessoa, desde a iniciação científica até agora, conclusão do meu mestrado. Dar oportunidade a alguém que tem bagagem é trivial, mas acreditar em quem tem apenas a vontade de construir essa bagagem, isso é confiança.

Agradeço aos meus pais, José Pereira e Cristina, e ao meu irmão, Thiago, pois é desta tríade que vem meus alicerces, que possibilitam a construção de qualquer sucesso em minha vida.

Agradeço ao meu amor, Josi, pela confiança, paciência, amor, dedicação, compreensão, companheirismo, em fim, por tudo que dividimos desde 2009.

Agradeço aos colegas de laboratório e amigos de coração Flávia, Kris, Vanessa, Bruno, Sarah, Carla, Luiz, Nathalia, Laís, Leticia, Isadora, Rafa, Suellem e Thiago pela ajuda, dicas, ensinamentos, conversas, risadas, cafés e todas as outras maravilhas de ser família PeQuiM.

Agradeço a minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Marisa Ionta, pela paciência em ensinar algo novo e completamente fora dos meus domínios, pelas horas dedicadas a este trabalho e toda colaboração com o mesmo.

Por fim, mas não menos importante agradeço as alunas de iniciação científica, Letícia e Isadora, sem a dedicação e o trabalho de vocês nada aqui seria possível, muito obrigado, de coração, pela amizade e trabalho duro nestes 2 anos.

Agradeço a UNIFAL-MG por toda a estrutura proporcionada, a FAPEMIG, CNPQ e capes pelo financiamento de toda minha pesquisa.

Sou, também, muito grato a Deus, pois, tudo posso nele que me fortalece.

“A fé desempenha em nossa vida um papel mais importante do que supomos, e é o que nos permite fazer mais do que pretendemos. Creio que aí está o elemento precursor de nossas ideias. Sem a fé não se teriam elaborado jamais hipóteses e teorias, nem se teriam inventado as ciências ou as matemáticas. Estou convencido de que a fé é um prolongamento do espírito: negar a fé é condenar-se e condenar o espírito que engendra todas as forças criadoras de que dispomos” (CHAPLIN; 1965).

## RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células que tem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e formar metástase. A quimioterapia representa uma abordagem clínica importante no tratamento do câncer, contudo sua eficácia é limitada devido a baixa seletividade dos medicamentos utilizados e o desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais. Diante do contexto, é crucial a busca por novas substâncias que possam melhorar as propostas terapêuticas para o tratamento do câncer. A atividade antitumoral da curcumina (**5**), um composto natural derivado da *Curcuma longa*, tem sido amplamente relatada. Da mesma forma, o resveratrol (**7**), um polifenol presente em uma variedade de fontes alimentares tem sido considerado um potencial agente quimiopreventivo/quimioterapêutico. Contudo, a aplicação clínica desses compostos tem sido limitada, devido a baixa solubilidade e biodisponibilidade. Dessa forma, este trabalho visou à síntese, caracterização e avaliação da atividade antiproliferativa de oito diferentes compostos (**PQM-160-167**), dos quais 6 contêm domínios estruturais em analogia à curcumina (**5**) e ao resveratrol (**7**); e 2 são análogos da curcumina (**5**). O potencial antiproliferativo dos compostos sintetizados foi avaliado sobre diferentes linhagens derivadas de tumores humanos e os resultados mostraram que as substâncias **PQM-162** e **PQM-163**, que são híbridos de curcumina-resveratrol, foram mais efetivos em reduzir a viabilidade de células MCF 7 ( $IC_{50}$  para **PQM-162** =  $40,49 \pm 1,01 \mu\text{M}$  e **PQM-163** =  $19,09 \pm 0,67 \mu\text{M}$ ) e HT 144 ( $IC_{50}$  de **PQM-163** =  $25,23 \pm 2,93 \mu\text{M}$ ), as quais são derivadas de câncer de mama e de melanoma, respectivamente. O efeito de **PQM-162** e **PQM-163** sobre as linhagens MCF 7 e HT144 foi superior ao observado para a curcumina ( $IC_{50}$  para MCF 7 =  $47,32 \pm 2,33 \mu\text{M}$  e para HT 144 =  $42,76 \pm 3,79 \mu\text{M}$ ). Além disso, foi demonstrado que a redução na viabilidade induzida pela substância **PQM-162** em culturas de células MCF 7 foi devido, pelo menos em parte, a sua capacidade de bloquear o ciclo celular em G2/M. Estudos adicionais devem ser realizados para avaliar o perfil de toxicidade desses compostos sobre células normais, bem como o possível mecanismo de ação.

Palavras-chave: Câncer. Resveratrol. Curcumina. Híbridos Moleculares.



## ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled proliferation of cells that have the ability to invade surrounding tissues and form metastases. Chemotherapy is an important clinical approach in the treatment of cancer, but their effectiveness is limited due to low selectivity and the development of resistance by tumor cells. On the context, it is crucial the search for new substances, that can improve the therapeutic approaches to cancer treatment. The antitumor activity of curcumin (**5**), a natural compound derived from *Curcuma longa*, has been widely reported. Similarly, resveratrol (**7**), a polyphenol present in a variety of food sources, has been considered as a potential chemoprotective/chemotherapeutic agent. However, clinical application of such compounds has been limited due to low solubility and poor bioavailability. Thus, this work aimed at the synthesis, characterization and evaluation of the antiproliferative activity of eight different compounds (**PQM-160-167**), of which six contain structural domains of analogy with curcumin (**5**) and resveratrol (**7**); and two are analogs of curcumin (**5**). The proliferative potential of these compounds was evaluated on different cell lines derived from human tumors. The results showed that substances **PQM-162** and **PQM-163**, which are hybrids of curcumin and resveratrol, were more effective in reducing the viability of MCF 7 cells ( $IC_{50}$  for **PQM-162** =  $40.49 \pm 1.01 \mu\text{M}$  and **PQM-163** =  $19.09 \pm 0.67 \mu\text{M}$ ) and HT 144 ( $IC_{50}$  **PQM-163** =  $25.23 \pm 2.93 \mu\text{M}$ ), which are derived from breast cancer and melanoma, respectively. The effect of **PQM-162** and **PQM-163** on lines MCF 7 and HT144 was higher than that observed for curcumin ( $IC_{50}$  for MCF 7 =  $47.32 \pm 2.33 \mu\text{M}$  and HT 144 =  $42.76 \pm 3.79 \mu\text{M}$ ). Furthermore, it was shown that the reduction in viability induced by **PQM-162** substance in MCF 7 cell cultures was due, at least in part, its ability to block the cell cycle in G2/M stage. Additional studies should be conducted to assess the toxicity profile of these compounds on normal cells and the possible mechanism of action.

Keywords: Cancer. Resveratrol. Curcumin. Molecular hybrid compounds.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Incidência de câncer no Brasil.....	20
<b>Figura 02</b> - Mortalidade por câncer no Brasil.....	20
<b>Figura 03</b> - Características frequentemente observadas em células tumorais.....	21
<b>Figura 04</b> - Mecanismos relacionados às regulações, positiva e negativa, do ciclo celular.....	22
<b>Figura 05</b> - Estrutura química de alguns fármacos utilizados no tratamento do câncer: taxol (1), vimblastina (2a), vincristina(2b), cisplatina (3) e carboplatina (4).....	24
<b>Figura 06</b> - Fórmula estrutural da curcumina (5).....	25
<b>Figura 07</b> - Equilíbrio ceto-enólico da curcumina em meio fisiológico.....	26
<b>Figura 08</b> - Sítios funcionais da curcumina (5).....	27
<b>Figura 09</b> - Alvos moleculares da curcumina.....	29
<b>Figura 10</b> - Via metabólica da curcumina em ratos.....	30
<b>Figura 11</b> - Fórmula estrutural do resveratrol (7).....	31
<b>Figura 12</b> - Resveratrol (5) e seu análogo metoxilado (4) bioativo.....	32
<b>Figura 13</b> - Planejamento por hibridação molecular das estruturas <b>PQM160 – PQM165 e PQM167</b> .....	35
<b>Figura 14</b> - Rota sintética das substancias alvo <b>PQM160-164 e PQM167</b> .....	38

<b>Figura 15</b> - Rota sintética das substâncias alvo <b>PQM-165</b> e <b>PQM-166</b> .....	39
<b>Figura 16</b> - Obtenção da hidrazida intermediária ( <b>9a</b> ) via cloreto de acila ( <b>10</b> ) com adição de trietilamina a partir do ácido <i>trans</i> -ferúlico ( <b>8</b> ).....	39
<b>Figura 17</b> - Reação de acoplamento da hidrazida ( <b>9</b> ) com benzaldeídos funcionalizados ( <b>12a-e</b> ) para obtenção da série alvo <b>PQM-160-165</b> .....	40
<b>Figura 18</b> - Reação de síntese do dímero curcumina- <i>like</i> ( <b>PQM-165</b> e <b>PQM 166</b> )...	41
<b>Figura 19</b> - Formação do produto de Michael ( <b>13</b> ) e estratégia utilizada para garantir a obtenção da substância alvo <b>PQM160-164</b> .....	44
<b>Figura 20</b> - Estruturas das substâncias alvo sintetizadas e testadas neste trabalho.....	46
<b>Figura 21</b> - Síntese do intermediário ( <i>E</i> )-3(4-hidróxi-3-metoxifenil)acrilidrazida ( <b>11a</b> ).....	48
<b>Figura 22</b> - Espectro na região do infravermelho da ( <i>E</i> )-3(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilidrazida <b>11a</b> .....	49
<b>Figura 23</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H. (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da ( <i>E</i> )-3(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilidrazida <b>11</b> .....	50
<b>Figura 24</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da ( <i>E</i> )-3(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilidrazida <b>11</b> .....	51
<b>Figura 25</b> - Síntese da 2- <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-160</b> ).....	53
<b>Figura 26</b> - Espectro na região do infravermelho da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-160</b> ).....	54

<b>Figura 27</b> - Síntese da 2- <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-161</b> ).....	55
<b>Figura 28</b> - Espectro na região do infravermelho da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(3, 5-dihidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-161</b> ).....	56
<b>Figura 29</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H. (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da (2)- <i>N</i> -(3, 5-dihidroxibenzaldeido)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-161</b> ).....	57
<b>Figura 30</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da (2)- <i>N</i> -(3, 5-dihidroxibenzaldeido)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-161</b> ).....	58
<b>Figura 31</b> - Síntese da 2- <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-162</b> ).....	60
<b>Figura 32</b> - Espectro na região do infravermelho da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3-(4-hidroxy-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-162</b> ).....	61
<b>Figura 33</b> - Síntese da 2- <i>N</i> -(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-163</b> ).....	62
<b>Figura 34</b> - Espectro na região do infravermelho da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-163</b> ).....	63
<b>Figura 35</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H. (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-163</b> ).....	64
<b>Figura 36</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-163</b> ). .....	65

<b>Figura 37</b> - Mapa de correlação HSQC (300MHz, DMSO-d6) de (2 <i>E</i> )-N-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-163</b> ).	66
<b>Figura 38</b> - Mapa de correlação HMBC (300MHz, DMSO-d6) de (2 <i>E</i> )-N-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-163</b> ).	67
<b>Figura 39</b> - Comparação dos isômeros geométricos <i>Z</i> ( <b>PQM-163a</b> ) e <i>E</i> ( <b>PQM-163b</b> ).	67
<b>Figura 40</b> - Síntese da 2- <i>N</i> -(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-164</b> ).	69
<b>Figura 41</b> - Espectro na região do infravermelho da (2 <i>E</i> )-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidraziae ( <b>PQM-164</b> ).	70
<b>Figura 42</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H. (300 MHz, DMSO) da (2 <i>E</i> )-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidraziae ( <b>PQM-164</b> ).	71
<b>Figura 43</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO) da (2 <i>E</i> )-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidraziae ( <b>PQM-164</b> ).	72
<b>Figura 44</b> - Mapa de correlação gHSQC (300MHz, DMSO d6) de (2 <i>E</i> )-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidraziae ( <b>PQM-164</b> ).	73
<b>Figura 45</b> - Mapa de correlação gHMBC (300MHz, DMSO d6) de (2 <i>E</i> )-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-164</b> ).	74
<b>Figura 46</b> - Síntese da (2 <i>E</i> )-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloil)acrilohidrazida ( <b>PQM-165</b> ).	76

<b>Figura 47</b> - Espectro no infravermelho da (2 <i>E</i> )-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N-(( <i>E</i> )-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida ( <b>PQM-165</b> ).....	77
<b>Figura 48</b> - Síntese da (2 <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-N-(( <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida ( <b>PQM-166</b> ).....	78
<b>Figura 49</b> - Espectro na região do infravermelho da (2 <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-N-(( <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida ( <b>PQM-166</b> ).....	79
<b>Figura 50</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H. (300 MHz, DMSO) da (2 <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-N-(( <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida ( <b>PQM-166</b> ).....	80
<b>Figura 51</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO) da (2 <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-N-(( <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida ( <b>PQM-166</b> ).....	81
<b>Figura 52</b> - Síntese 2- <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3-(3-hidróxi-4-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-167</b> ).....	83
<b>Figura 53</b> - Espectro na região do infravermelho da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(4-metoxibenzil)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM-167</b> ).....	84
<b>Figura 54</b> - Viabilidade celular determinada a partir dos ensaios de MTS para a triagem de substâncias potencialmente ativas após 48h de tratamento com os diferentes compostos.....	86
<b>Figura 55</b> - Viabilidade celular determinada a partir dos ensaios de MTS em culturas de MCF 7 e HT144 tratadas por 48h com os compostos <b>PQM - 162</b> e <b>PQM - 163</b> em diferentes concentrações.....	87
<b>Figura 56</b> - Análise da Progressão do ciclo celular por Citometria de fluxo frente MCF 7 das substancias <b>PQM - 162</b> e <b>PQM - 163</b> .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Dados experimentais da preparação da série alvo ( <b>PQM160 - 164</b> ).....	47
<b>Tabela 2</b> - Dados experimentais da preparação da série alvo curcumina-like ( <b>PQM165 - 166</b> ).....	47
<b>Tabela 3</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da hidrazida <b>11</b> .....	52
<b>Tabela 4</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(3, 5-dihidroxibenzaldeido) -3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida ( <b>PQM-161</b> ).....	59
<b>Tabela 5</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e de HMBC do (2 <i>E</i> )- <i>N</i> - (3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida ( <b>PQM- 163</b> ).....	68
<b>Tabela 6</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e de HMBC da (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(4-hidroxi-3- metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidraziae ( <b>PQM-164</b> ).....	75
<b>Tabela 7</b> - Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e de HMBC da (2 <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4- metoxifenil)- <i>N</i> -(( <i>E</i> )-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acriloil)acrilohidrazida ( <b>PQM-166</b> ).....	82
<b>Tabela 8</b> - Valores de $\text{IC}_{50}$ das substâncias mais promissoras e da curcumina ( <b>5</b> )..	87
<b>Tabela 9</b> - Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular determinados por citometria de fluxo em culturas de células MCF 7 tratadas por 24h com as substâncias <b>PQM-162</b> e <b>PQM-163</b> .....	88

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
2.1	CÂNCER.....	19
2.2	ABORDAGEM TERAPÊUTICA.....	23
2.3	CURCUMINA .....	25
2.3.1	A Química da Curcumina.....	26
2.3.2	Alvos Moleculares da Curcumina Como Agente Antiproliferativo .....	27
2.3.3	Limitações da Curcumina no uso terapêutico .....	29
2.4	RESVERATROL .....	31
2.4.1	A Química do Resveratrol.....	31
2.4.2	Alvos Moleculares do Resveratrol Como Agente Antiproliferativo .....	32
2.4.3	Limitações do Resveratrol no uso terapêutico.....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>37</b>
4.1	QUÍMICA .....	37
4.1.1	Generalidades.....	37
4.1.2	Abordagem Sintética.....	38
4.1.3	Síntese do intermediário hidrazídico (11a e 11b) .....	39
4.1.4	Reação de Acoplamento da Hidrazida Intermediária (11) com Aldeídos Funcionalizados Para a Obtenção de PQM-160-164 e PQM-167.....	40
4.1.5	Síntese dos derivados curcumina-like PQM165 e PQM166 .....	41
4.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS .....	42
4.2.1	Condições de Cultivo e Linhagens Celulares.....	42
4.2.2	Viabilidade Celular – Ensaio Colorimétrico (MTS) .....	42
4.2.3	Análise de Progressão de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo.....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>



5.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO QUÍMICOS.....	44
5.1.1	Síntese do intermediário (E)-3(4-hidróxi-3-metoxifenil)acrilidrazida (11a). 48	
5.1.2	Síntese da 2-N-(4-hidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-160). .....	53
5.1.3	Síntese da 2-N-(3,5-diidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3- metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-161). .....	55
5.1.4	Síntese da 2-N-(4-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-162). .....	60
5.1.5	Síntese da 2-N-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3- metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-163). .....	62
5.1.6	Síntese da 2-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3- metoxifenil)acriloidrazida (PQM-164). .....	69
5.1.7	Síntese da (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N-((E)-3-(4-hidroxi-3- metoxifenil)acriloil)acrilohidrazida (PQM-165). .....	76
5.1.8	Síntese de (2E)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-N-((E)-3-(3-hidroxi-4- metoxifenil)acriloil)acrilohidrazida (PQM-166). .....	78
5.1.9	Síntese de 2-N-(4-metoxibenzil)-3-(3-hidróxi-4-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-167). .....	83
5.2	TESTES BIOLÓGICOS.....	85
6	CONCLUSÕES.....	90
7	PERSPECTIVAS .....	91
	REFERÊNCIAS .....	92
	APENDICES.....	101

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer compreende um grupo diversificado de doenças considerando que pode se originar de diferentes tipos celulares. Embora cada caso clínico apresente características peculiares, as células malignas compartilham algumas características como capacidade de induzir angiogênese, resistência a apoptose, produção contínua de sinais de crescimento, capacidade de replicar por tempo indeterminado, capacidade de invasão tecidual e metástase, e resistência a sinais de inibição de crescimento. ((HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A quimioterapia representa uma abordagem terapêutica amplamente empregada no tratamento do câncer, entretanto ainda existem algumas limitações como, por exemplo, pouca seletividade que indiretamente está relacionada aos drásticos efeitos colaterais, e resistência do tumor aos fármacos até então utilizados. Assim sendo, é crucial o desenvolvimento de novas substâncias que possam melhorar as propostas terapêuticas do câncer (YANG et al., 2014).

Os tratamentos quimioterápicos, em geral, empregam mais de um medicamento, cujos mecanismos de ação são diferentes (AMERICAN CANCER SOCIETY STAFF, 2015). Essa estratégia é importante na tentativa de modular a atividade de diferentes alvos relacionados ao comportamento maligno.

A natureza foi durante muitos anos a única fontes de substâncias para a cura de doenças (NEWMAN; CRAGG, 2007, 2012; VIEGAS et al., 2005). Com o desenvolvimento da síntese orgânica, a natureza passou a fornecer, além de matérias-prima para a preparação de substâncias semissintéticas, também metabólitos ativos que tem servido de inspiração molecular para o planejamento de análogos sintéticos inéditos, com propriedades terapêuticas, toxicidade, seletividade e mecanismos de ação otimizados (CAMPOS et al., 2011; GALLIFORD; SCHEIDT, 2007; WENDER; MILLER, 2009).

Entre os processos úteis para a identificação de novos protótipos de candidatos a novos fármacos, temos a hibridação molecular de substâncias bioativas, representando uma alternativa bastante atraente (Poderia mudar esse termo-FORMALIZAR) de planejamento molecular e de acesso a novos padrões moleculares (BARREIRO et al., 2002).

Os produtos naturais (PNs), de maneira geral, desempenham um papel muito importante na descoberta de novas substâncias com atividade antitumoral. Muitos fármacos utilizados no tratamento do câncer são oriundos de PNs ou foram inspirados em estruturas moleculares de compostos naturais (DU; TANG, 2014). A curcumina (**5**) e o resveratrol (**7**) são duas substâncias provenientes de fontes naturais que apresentam importantes propriedades biológicas, as quais incluem atividade quimiopreventiva e antitumoral (HAN et al., 2015; LEE; SHEHZAD; 2013).

A curcumina (**5**) é um composto polifenólico presente no açafrão, que apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante (LEE; REHMAN; SHEHZAD, 2013) e antitumoral (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Atividade antiproliferativa e citotóxica da curcumina (**5**) foram evidenciadas em muitos estudos que utilizaram linhagens celulares derivadas de diferentes tumores: pulmão (H460, A549, H1975, HCC827, e HL7702), mama (MCF 7), fígado (HSC-T6) e próstata (LNCaP, PC-3, e DU145). Estudos pré-clínicos demonstraram que a capacidade da curcumina (**5**) de inibir o crescimento e de induzir apoptose em células tumorais está relacionada à inibição do fator de NF- $\kappa$ B e regulação epigenética ( CHEN, B. et al., 2014; CHEN, Q.-H., 2015; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; VERA-RAMIREZ et al., 2013; WU et al., 2015).

Estudos estruturais demonstraram importância das estruturas dicetônicas e as  $\alpha$ - $\beta$  insaturações são indispensáveis para a ação biológica da curcumina (**5**) (CHEN, 2015).

O resveratrol (**7**) é um polifenol abundante em uvas vermelhas que também apresenta propriedades biológicas importantes como atividades anti-inflamatória e antioxidante. Além disso, é efetivo em aumentar a atividade de defesa do organismo e inibir o processo de carcinogênese (HSIEH; HUANG; WU, 2011).

Em alguns estudos, o resveratrol (**7**) demonstrou ação preventiva e quimioterápica contra o câncer, efeitos estes relacionados ao fato do composto inibir eventos celulares relacionados às fases de iniciação, promoção e progressão dos tumores (CHAO et al., 2014).

As hidroxilas presentes na estrutura do resveratrol (**7**) são importantes para sua ação biológica, contudo, a substituição das mesmas por metoxilas levaram a um incremento desta atividade, demonstrando a importância dos substituintes, mas possibilitando uma variação da mesma (HSIEH; HUANG; WU, 2011).

Considerando os efeitos do resveratrol (7) e da curcumina (5) sobre células tumorais, este trabalho visou à síntese de oito compostos, planejados por hibridação molecular das estruturas da curcumina (5) e do resveratrol (7), com padrão molecular inédito e inovador para avaliar os seus efeitos sobre células tumorais derivadas de diferentes tumores humanos com o objetivo de estabelecer uma correlação de estrutura-atividade.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir teremos uma revisão da literatura abordando os assuntos do câncer, abordagem terapêutica para o tratamento de neoplasias, resveratrol e curcumina.

### 2.1 CÂNCER

O câncer é um problema de saúde pública em todo mundo. Atualmente, é a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos, e deve superar doenças cardíacas como a principal causa de morte nos próximos anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2012, última estatística divulgada, foram contabilizados no mundo mais de 8 milhões de casos de câncer, sendo cerca de 225 mil casos no Brasil. Este ano a OMS publicou uma estimativa de novos casos para os anos de 2015 e 2020, na qual o Brasil deve atingir a marca de 245 mil e 288 mil novos casos em 2015 e 2020, respectivamente, enquanto que, no mundo, deve ultrapassar a casa dos 10 milhões em 2020 (WHO, 2015).

No Brasil, as maiores incidências são de câncer de próstata (16,6%) e de mama (15,4%) (figura 01, pg 20). Porém, quando analisamos a mortalidade atribuída aos diferentes tipos de câncer (figura 02, pg 20) o câncer de pulmão aparece como o mais letal, sendo responsável por cerca de 12,6% dos óbitos por câncer (WHO, 2012).

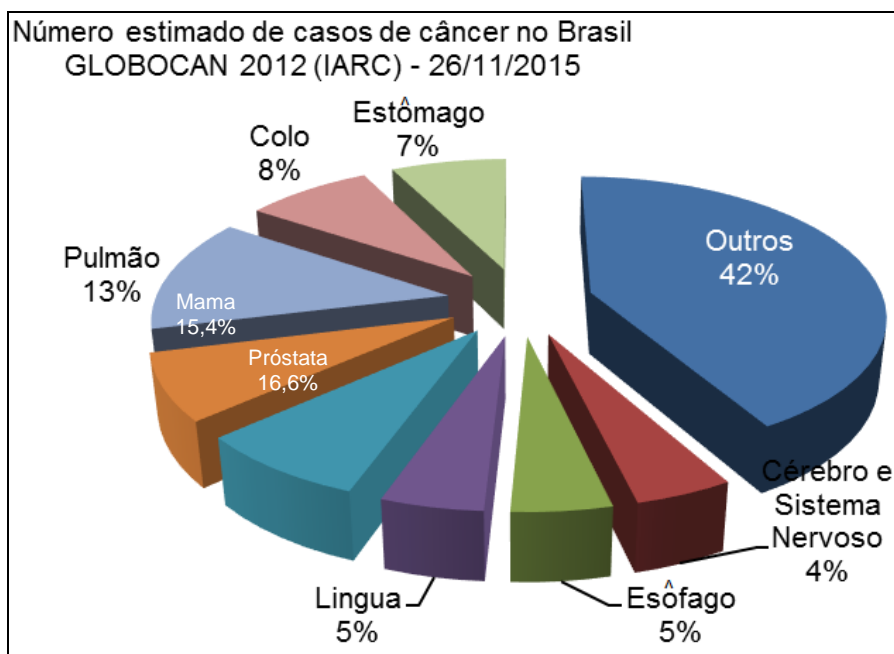


Figura 01 - Incidência de câncer no Brasil.  
Fonte: Adaptado de WHO, 2012.

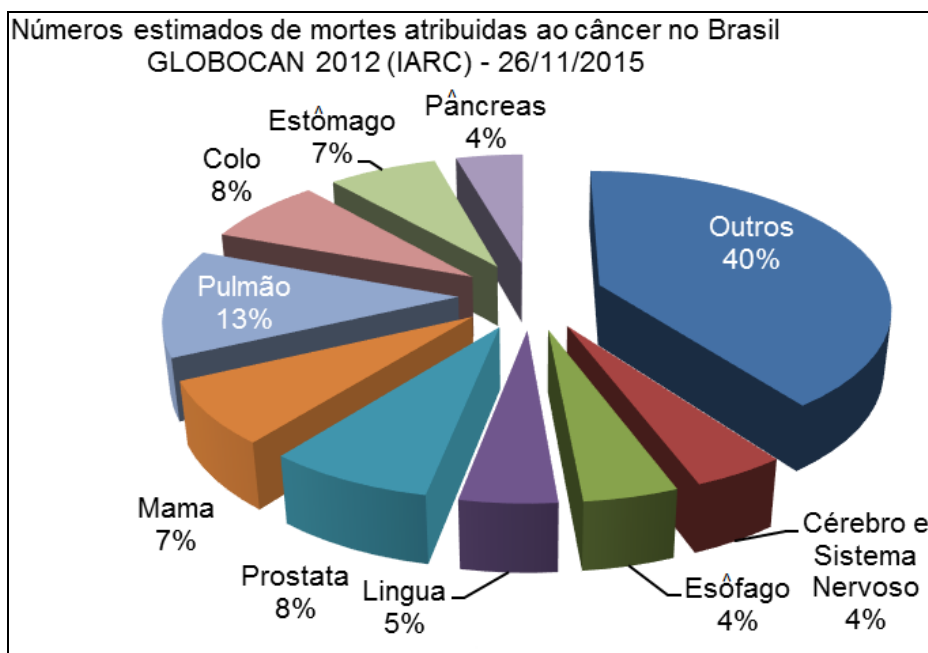


Figura 02 - Mortalidade por câncer no Brasil.  
Fonte: Adaptado de (WHO, 2012).

O processo de carcinogênese é complexo, e envolve várias modificações no fenótipo celular que, por sua vez, são decorrentes de alterações genéticas e/ou epigenéticas. Os eventos relacionados a alterações no genoma incluem mutações de ponto, deleções, amplificação e rearranjo gênico. Já as alterações epigenéticas levam às mudanças no perfil de expressão gênica e, conseqüentemente, na modulação do comportamento celular, sem que sequências de DNA tenham sido alteradas (AMES; GOLD, 1990). Características comumente observadas em células tumorais (figura 03) como alta taxa de proliferação, resistência à morte, capacidade de invasão, angiogênese e metástase são eventos decorrentes de alterações no perfil genético e epigenético (CASTELLO et al., 2012; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

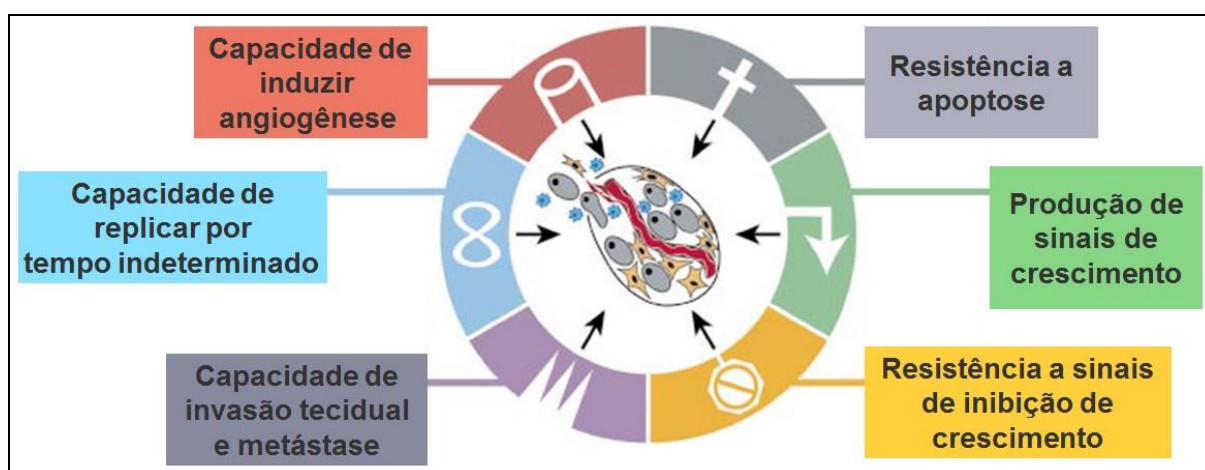


Figura 03: Características frequentemente observadas em células tumorais.  
Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2000.

Estudos sobre carcinogênese realizados em modelos animais mostram que a patogênese do câncer inclui três principais estágios, a saber: iniciação, promoção e progressão (TROSKO, 2003). Classicamente, a fase de iniciação é caracterizada pelo surgimento de células que apresentam alterações genéticas, ao passo que durante a promoção há intensa atividade proliferativa, estimulada por agentes não mutagênicos, que leva a expansão clonal de células iniciadas e o estabelecimento de lesões pré-malignas. A alta taxa de proliferação associada à instabilidade genômica favorecem novos eventos de mutação, os quais são críticos para o estabelecimento do fenótipo maligno (TROSKO, 2003; AMES; GOLD, 1990). Ordem cronológica. Estudos mais recentes mostram modificações genéticas e epigenéticas

operam em conjunto ao longo das diferentes fases do processo de transformação maligna (SADIKOVIC et al., 2008; LEE, G. E. et al., 2010).

A progressão normal do ciclo celular (figura 04) é principalmente regulada pela ativação sequencial de quinases dependentes de ciclina (CDK, do inglês *cyclin-dependent kinase*), as quais são ativadas pela interação molecular com as ciclinas. Dessa forma, a progressão do ciclo celular depende da formação de complexos proteicos que apresentam uma subunidade catalítica (CDK) e uma subunidade regulatória (ciclina). Os complexos CDK-ciclinas são capazes de fosforilar uma variedade de proteínas-alvo, que determinarão a progressão do ciclo e, portanto, são considerados reguladores positivos (LUNDBERG et al., 2000; ASGHAR et al., 2015).

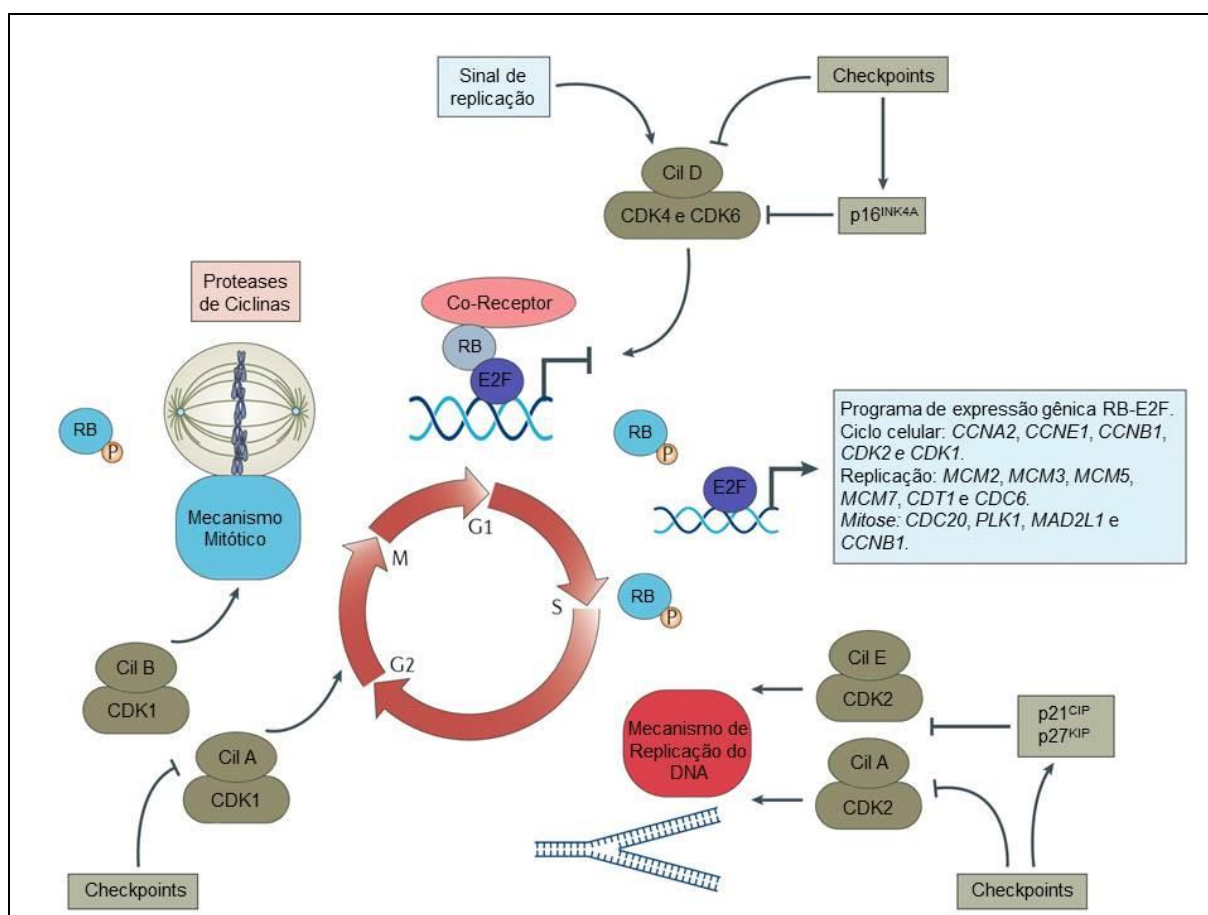


Figura 04 - Mecanismos relacionados às regulações, positiva e negativa, do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de ASGHAR et al., 2015.

O ciclo celular compreende classicamente quatro fases (G1, S, G2 e M) de modo que a progressão pelas diferentes fases está relacionada ao perfil diferencial de expressão de ciclinas e ativação de complexos ciclina-CDK específicos. Fatores



mitogênicos estimulam a expressão de ciclina D e, conseqüentemente, a ativação do complexo ciclina D-CDK4/6, o qual é responsável por fosforilar diferentes alvos incluindo a proteína Rb. Esta, por sua vez, em seu estado hiperfosforilado libera membros da família E2F, fatores de transcrição que estimulam a expressão da própria ciclina D e da ciclina E. A ativação do complexo ciclina E-CDK2 representa um evento crítico para a passagem do ponto de restrição e transição G1/S. A progressão pelas fases S e G2 depende da formação dos complexos ciclina A-CDK2 e ciclina A-CDK1, enquanto a transição G2/M é regulada pelo complexo ciclina B-CDK1. Diante do exposto, o comprometimento com o processo de divisão ocorre à medida que a células progridem na fase G1 e passam pelo ponto de restrição (DURONIO; XIONG, 2013; ASGHAR et al., 2015). Assim sendo, amplificação gênica e alterações no perfil de expressão de moléculas que regulam a progressão do ciclo são eventos frequentemente observados em diferentes cânceres humanos (BATES; PETERS, 1995; ASGHAR et al., 2015) e compostos capazes de inibir a progressão do ciclo celular são promissores agentes antitumorais (IONTA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2015; SALES et al., 2015; ZANIN et al., 2015) ordem cronológica.

## 2.2 ABORDAGEM TERAPÊUTICA

As abordagens clínicas utilizadas no tratamento do câncer consideram o tipo de tumor, bem como as características genéticas das células que o constituem (LEE, S. C.; TAN; CHUNG, 2014). O estágio de desenvolvimento da doença também representa um fator importante na definição da proposta terapêutica (HENDERSON, 2003). Em geral, são empregadas técnicas cirúrgicas, radioterapia, terapia hormonal, imunoterapia e quimioterapia (GERMANO, 2014; NISHINO M et al., 2014). Esta última abordagem compreende uma variedade de protocolos clínicos que, em geral, empregam substâncias com propriedades citotóxicas (MCGROGAN et al., 2008). Dentre eles estão os compostos de platina, inibidores de topoisomerase, agentes alquilantes, antimetabólitos e antimetabólitos (SANDULACHE et al., 2012). A

figura 05 mostra a estrutura química de alguns fármacos que compõe o arsenal terapêutico utilizado na quimioterapia do câncer.

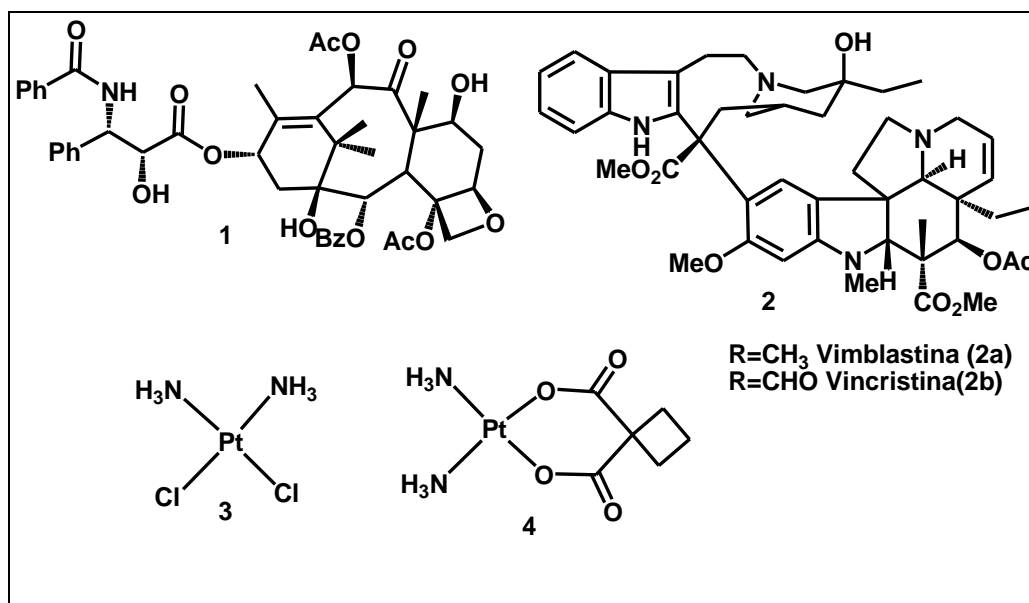


Figura 05 - Estrutura química de alguns fármacos utilizados no tratamento do câncer: taxol (1), vimblastina (2a), vincristina(2b), cisplatina (3) e carboplatina (4).  
Fonte: Do autor.

Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) e os alcaloides da vinca (vimblastina (2a) e vincristina (2b)) são antimitóticos que interferem na dinâmica de polimerização dos microtúbulos, causando bloqueio do ciclo celular e apoptose (VAN VUUREN et al., 2015). O paclitaxel foi originalmente isolado de *Taxus brevifolia*, contudo, após a elucidação estrutural e identificação de suas propriedades anticancerígenas, a produção em larga escala foi realizada a partir de derivados semissintéticos (MCGROGAN et al., 2008).

Paclitaxel e docetaxel são fármacos muito utilizados no tratamento de alguns tipos de tumores sólidos (ovário, mama e pulmão), contudo não devem ser utilizados rotineiramente devido aos seus efeitos tóxicos (MATESANZ et al., 2014).

A química de produtos naturais tem identificado, ao longo do tempo, uma variedade de substâncias com potencial terapêutico. No caso particular dos antineoplásicos, substâncias como o taxol, vincristina, vimblastina, etoposídeo, dentre outros, são exemplos de como a natureza é prodiga na produção de substâncias com potencial anticâncer. Entretanto, em geral, baixas concentrações dessas substâncias são obtidas a partir de fontes naturais, de modo que a química sintética desempenha relevante papel na busca de alternativas economicamente

viáveis para a obtenção de tais substâncias. Ademais, a modificação estrutural de produtos naturais, a produção de novas moléculas híbridas inspiradas em protótipos naturais e a semissíntese tem sido ferramentas úteis na Química Medicinal a fim de obter novos compostos farmacologicamente ativos, seguros e capazes de oferecer melhoras nas propostas terapêuticas atualmente disponíveis para o combate ao câncer.

### 2.3 CURCUMINA

Dentre milhares de compostos naturais, inicialmente testados quanto ao potencial anticâncer, apenas cerca de 40 substâncias promissoras avançaram para ensaios clínicos. A curcumina (**5**, figura 06, pg 25), um composto dicetônico isolado a partir do rizoma de *Curcuma longa* no continente Indiano, é uma substância sob investigação clínica quanto a sua atividade antitumoral (AMIN et al., 2015; PARK et al., 2013). Relatos na literatura mostram que a curcumina é eficaz em inibir proliferação e induzir apoptose em células provenientes de câncer de cabeça e pescoço, de pele, de próstata, de mama, de pulmão e de pâncreas (WU et al., 2015). Além da atividade sobre células tumorais, foi demonstrado que a curcumina tem propriedades antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante. Estudos mostram que a curcumina é capaz de modular diferentes vias de transdução de sinais envolvidas na progressão do tumor, de modo que seus efeitos estão relacionados à inibição dos sinais de sobrevivência e proliferação, bem como a redução de estresse oxidativo e inflamação do microambiente tumoral (DEGUCHI, 2015). No entanto, a curcumina pode ser facilmente metabolizada (figura 10, pg 30) e tem baixa biodisponibilidade, devido à estrutura dicetônica (figura 07, pg 26) (WU et al., 2015).

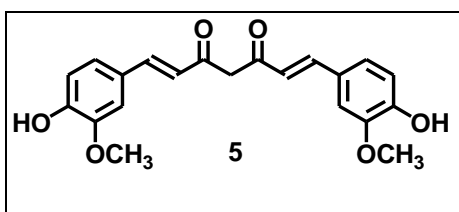


Figura 06 - Fórmula estrutural da curcumina.  
Fonte: Do Autor.

### 2.3.1 A Química da Curcumina

A curcumina (**5**) é uma  $\beta$ -cetona-di- $\alpha,\beta$ -insaturada com peso molecular 368,38; faixa de fusão 179-183 °C e fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_6$  (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008).

Em meio fisiológico a curcumina (**5**) encontra-se em equilíbrio ceto-enólico (figura 07), sendo estabilizada em sua forma enólica (**6**) por ligação de hidrogênio intramolecular, enquanto em forma cetônica apresenta os oxigênios carbonílicos como fortes aceptores de ligação de hidrogênio intermolecular (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008).

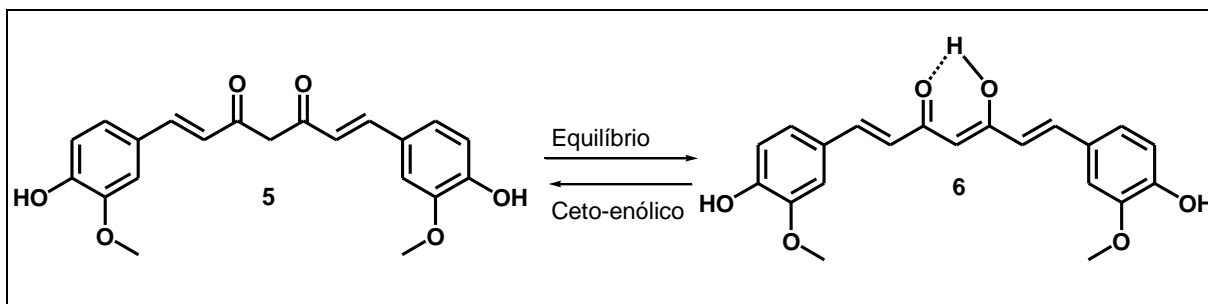


Figura 07 - Equilíbrio ceto-enólico da curcumina em meio fisiológico.  
Fonte: Do autor.

Um estudo realizado recentemente explorou a relação estrutura atividade da curcumina (**5**) e de uma série de análogos, reunindo várias informações acerca de suas características químicas mais importantes para a ação citotóxica, como a manutenção das insaturações  $\alpha$ - $\beta$  carbonílicas, que a forma enol-cetona é mais ativa que a forma dicetônica, que compostos com apenas uma carbonila apresentaram uma melhor ação citotóxica e que a adição de um heteroátomo  $\alpha$ -carbonílico aumenta a atividade antiproliferativa. Foi evidenciado ainda que os anéis laterais da curcumina (**5**) não possuem substituições indispensáveis para a ação citotóxica, com vários grupos substituintes influenciando na modulação da atividade (figura 08, pg 27) (CHEN, 2015).

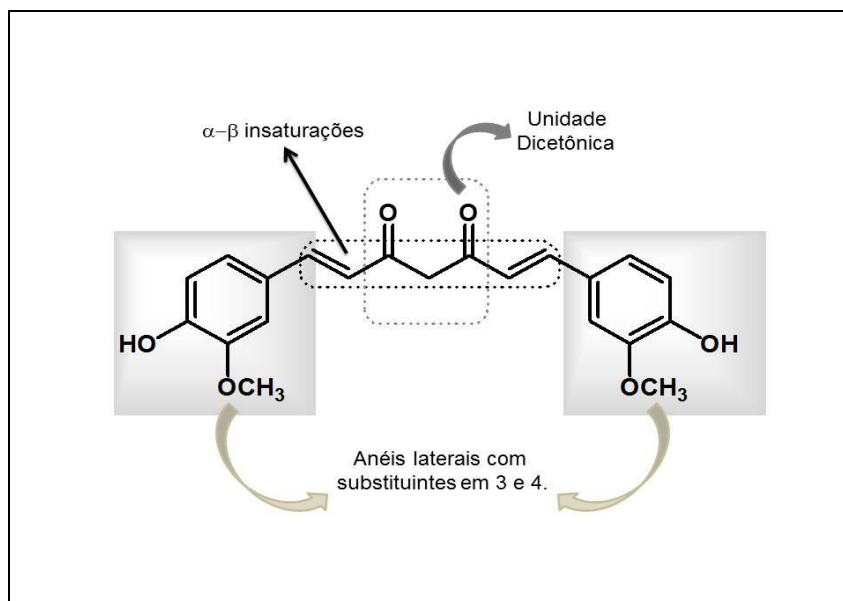


Figura 08 - Sítios funcionais da curcumina (5).  
Fonte: Do autor.

### 2.3.2 Alvos Moleculares da Curcumina Como Agente Antiproliferativo

O fator de transcrição AP-1 é conhecido por induzir a expressão de genes relevantes para no processo de transformação maligna, os quais estão relacionados ao estímulo da proliferação e angiogênese bem como a resistência a apoptose. Membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) fosforilam e ativam AP-1, que regula positivamente a expressão de ciclina D (ARNOTT et al., 2002; EFERL; WAGNER, 2003; LOPEZ-BERGAMI; LAU; RONAI, 2010; ROUX; BLENIS, 2004; SHANMUGAM et al., 2015).

A curcumina (5) tem sido usada para sensibilizar células para o tratamento com radioterapia e inibir sinais das vias ativadas por AP-1 e fator nuclear de transcrição  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). A curcumina (5) (20  $\mu$ M) foi capaz de regular negativamente fatores pró-angiogênicos AP-1 (DHANDAPANI; MAHESH; BRANN, 2007; SHANMUGAM et al., 2015; WOO et al., 2005). A curcumina (5) também mostrou-se capaz de regular negativamente a atividade dessas quinases, em estudos recentes a curcumina (5) pode inibir p38 MAPK e induzir caspase 3 (SEGER; KREBS, 1995; SHANMUGAM et al., 2015).

O NF- $\kappa$ B, por sua vez, pode ser ativado por uma série de fatores como vírus, fatores de crescimento, estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias e fatores

ambientais tais como luz ultravioleta e peróxido de hidrogênio. Na via canônica, a fosforilação de NF- $\kappa$ B e de seu repressor (I $\kappa$ B) induz a dissociação deles e permite que NF- $\kappa$ B migre para o núcleo e ative a transcrição de oncogenes relacionados com a resistência a apoptose, indução de proliferação celular, invasão, quimiorresistência, radiorresistência e angiogênese (CHATURVEDI et al., 2010; GHOSH et al., 2012; LOW; TERGAONKAR, 2013; SETHI; TERGAONKAR, 2009; SHANMUGAM et al., 2015; SHEN; TERGAONKAR, 2009). A curcumina (**5**, figura 6, pg 26) mostrou-se bastante eficiente na inibição de NF- $\kappa$ B ativados por várias vias, tais como, por peróxido de hidrogênio, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e algumas quinases (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) (AGGARWAL et al., 2005; SHANMUGAM et al., 2015; SHISHODIA et al., 2005).

Ciclina D1 é superexpressa em vários tipos de câncer como de pulmão, cabeça e pescoço, fígado, próstata, mama e melanomas. Os níveis de expressão de ciclina D1 pode ser regulado por diferentes mecanismos, os quais incluem a ativação de NF- $\kappa$ B. Assim sendo, a inibição de NF- $\kappa$ B induz bloqueio do ciclo celular em G1 devido à redução nos níveis de expressão de ciclina D1 (MUKHOPADHYAY et al., 2002; SHANMUGAM et al., 2015; SHISHODIA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2007).

Inativação de p53, proteína transcrita pelo gene supressor de tumor *TP53*, e ativação de NF- $\kappa$ B são eventos comumente observados, os quais representam fatores críticos na progressão do tumor (CHOUDHURI et al., 2002; JEE et al., 1998; SHANMUGAM et al., 2015). A curcumina (**5**) demonstrou uma ação dupla, sendo capaz de ativar o gene p53 e inibir a ação de NF- $\kappa$ B induzindo, portanto, apoptose. Em células MCF 7, proveniente de câncer de mama, a apoptose induzida por curcumina (**5**) foi acompanhada de um aumento nos níveis de p53 (DEY; TERGAONKAR; LANE, 2008; SHANMUGAM et al., 2015).

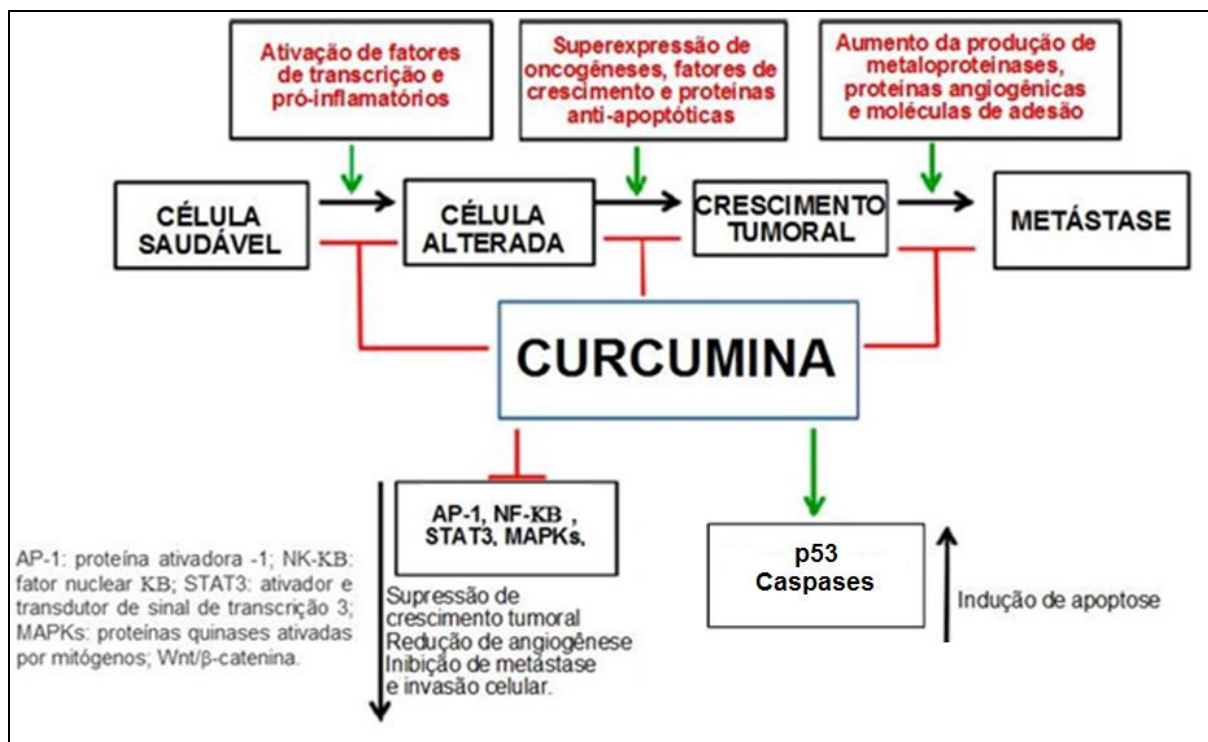


Figura 09 - Alvos moleculares da curcumina.

Fonte: Adaptado de SHANMUGAM et al., 2015.

### 2.3.3 Limitações da Curcumina no uso terapêutico

Estudos mostram que a curcumina (5) apresenta importantes propriedades farmacológicas, entretanto alguns problemas são observados quando esta é utilizada em estudos *in vivo*. Os principais desafios a serem vencidos estão relacionados à sua baixa taxa de absorção, distribuição tecidual limitada, rápida metabolização e baixa meia vida (ANAND et al., 2007; LI; LEE; et al., 2015).

A absorção da curcumina (5) quando administrada via oral é lenta, pela dificuldade de absorção no trato gastrointestinal e sua estrutura sofre metabolismo de primeira passagem, fato este que leva a uma drástica diminuição de sua concentração sanguínea (figura 10, pg 30). Esse aspecto limita o uso da curcumina (5) como agente terapêutico (IRESON et al., 2002; LI; SHIN; et al., 2015).

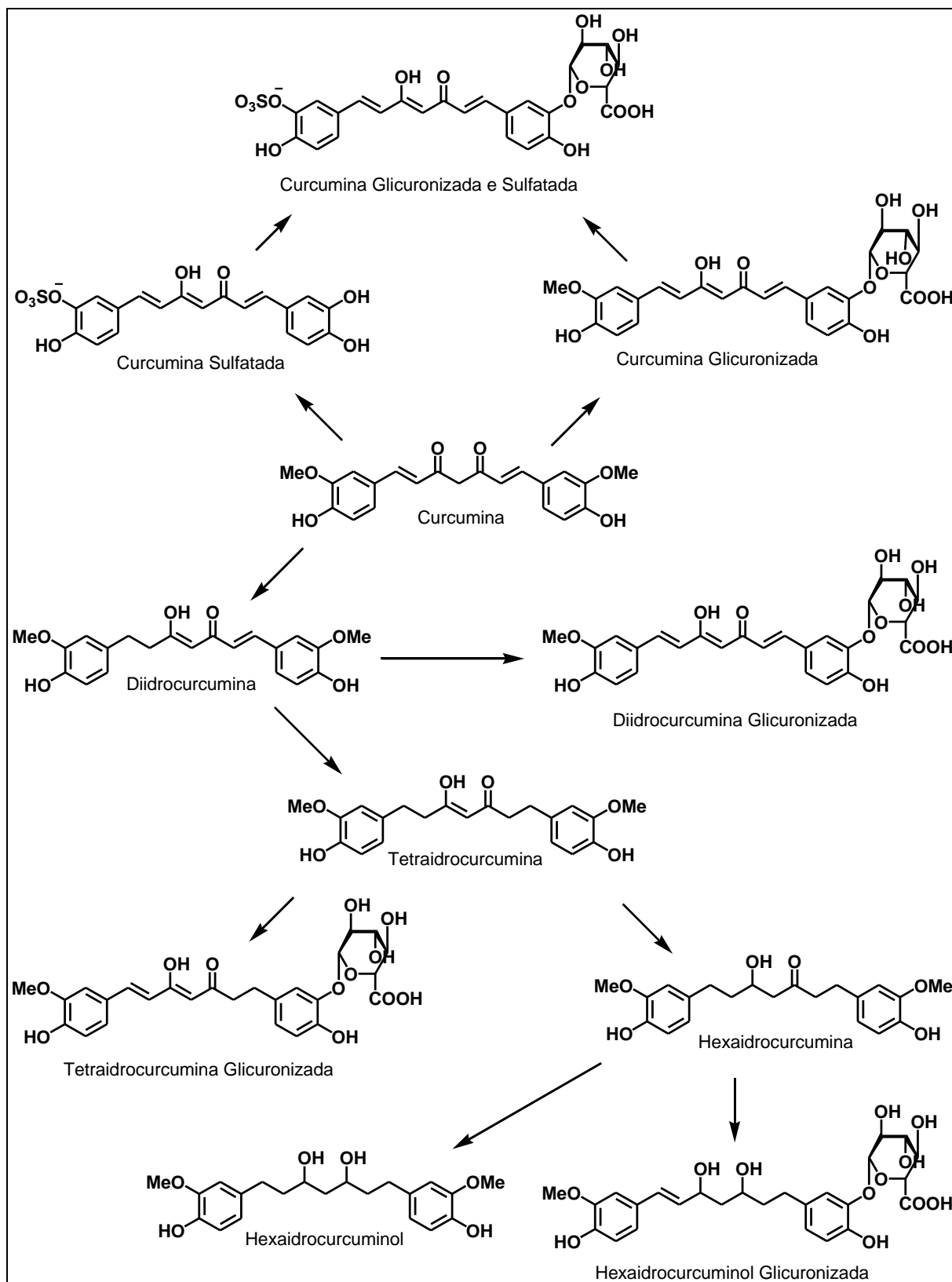


Figura 10 - Via metabólica da curcumina em ratos.  
 Fonte: Adaptado de (BELKACEMI et al., 2011)



## 2.4 RESVERATROL

O resveratrol (**7**, figura 11, pg 31) foi isolado a primeira vez por Takaoka e colaboradores, das raízes do *Hellebore* branco em 1939. Desde então tem sido encontrado em uvas, vinhos, amendoim, amoras, pinheiros e outras fontes naturais. Numerosos estudos têm demonstrado uma atividade de cito proteção em doenças cardíacas, metabólicas e neurodegenerativas (XU et al., 2015). Ao logo dos últimos anos, muitos relatos ressaltam o efeito quimiopreventivo do resveratrol para o câncer, tendo sido observado que esta substância pode inibir as diferentes fases do processo carcinogênico, ou seja, iniciação, promoção e progressão (JANG *et al.*, 1997; XU et al., 2015).

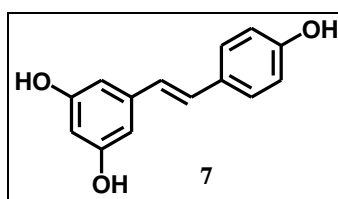


Figura 11 - Fórmula estrutural do resveratrol.

Fonte: Do Autor.

### 2.4.1 A Química do Resveratrol

O Resveratrol (**7**) (3,4',5-trihidroxiestilbeno  $C_{14}H_{12}O_3$ ), é um derivado do resorcinol, que foi isolado pela primeira vez de uma planta japonesa, *Veratrum grandiflorum*, ele está presente na natureza na forma *E* e *Z*, sendo que a forma *E* é a mais estável e conseqüentemente a mais abundante (AGGARWAL et al., 2004). A atividade biológica do resveratrol foi atribuída, principalmente, a insaturação *E* e a hidroxila na posição 4', fato este que está atrelado aos híbridos de ressonância do resveratrol, enquanto as hidroxilas nas posições 3 e 5 são menos reativas (CAI et al., 2003; CAO et al., 2003; MATSUOKA et al., 2002; OHGUCHI et al., 2003).

Recentemente, estudos em linhagens celulares de câncer hepático (HepG2), pulmão (A549) e de mama (MCF 7) sugerem um efeito citotóxico ao mostrarem que

o resveratrol (**7**) aumenta os níveis de expressão de genes supressores de tumor (p21 e p53) e induz apoptose (HAN et al., 2015). Estudos envolvendo análogos do resveratrol (**7**) demonstraram, via análise de citometria de fluxo, que compostos com as hidroxilas nas posições 3, 5 e 4' substituídas por metoxilas (**8**) (figura 12) são mais efetivos em inibir o ciclo celular, inibindo passagem da fase S para G2/M, e induzir apoptose (HSIEH; HUANG; WU, 2011).

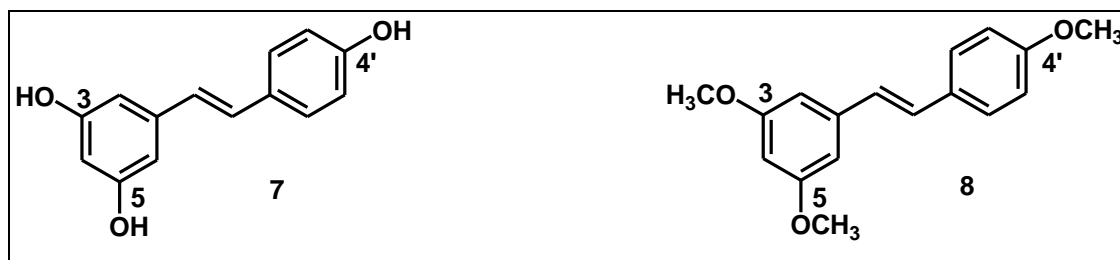


Figura 12 - Resveratrol (**7**) e seu análogo metoxilado (**8**) bioativo  
Fonte: (HSIEH; HUANG; WU, 2011)

#### 2.4.2 Alvos Moleculares do Resveratrol

O potencial anticâncer do resveratrol (**7**) já é conhecido desde 1997 quando (ATHAR et al., 2009). O resveratrol (**7**) mostrou-se capaz de modular a atividade de proteínas críticas que regulam a progressão do ciclo celular como Cdk1 e outras proteína que atuam na fase S do ciclo celular. Assim sendo, o resveratrol tem se mostrado efetivo em inibir a progressão do ciclo celular (BENITEZ et al., 2007; GOGA et al., 2007; SHIH et al., 2002).

O resveratrol (**7**) também mostrou-se capaz de regular apoptose (CLÉMENT et al., 1998), inibir metástase e angiogênese (IGURA et al., 2001). Estudos mostram que o efeito antitumoral do resveratrol está associado à sua capacidade de modular a atividade de NF- $\kappa$ B, p53 e (KUNDU et al., 2006), cinases ativadas por mitógenos (KUNDU; SHIN; SURH, 2006; SHE; BODE; MA, 2001; SHIH et al., 2002).

O resveratrol (**7**) quando usado como terapia conjunta com etoposídeo (TEVAETOPO®) foi capaz de induzir apoptose de células resistentes ao quimioterápico de câncer de cólon via ativação de proteína ativadora de caspase da adenosina monofosfato ativada por cinase (AMPK) (XU et al., 2015).

### 2.4.3 Limitações do Resveratrol no uso terapêutico

Apesar dos bons resultados biológicos e farmacológicos, o resveratrol (7) apresenta uma baixa biodisponibilidade *in vivo*, dificultando que este atinja seu tecido alvo. Apesar de ser rapidamente absorvido, apenas 30% da dose administrada via oral atinge a circulação, uma vez que o restante sofre conjugação com sulfatos e ácido glicurônico ou é metabolizado pela microbiota intestinal, e é rapidamente excretado (BELLINA et al., 2015; NEVES et al., 2012).

### 3 OBJETIVOS

Em seguida encontram-se descritos os objetivos gerais e específicos deste trabalho.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo a síntese de uma nova série de compostos híbridos moleculares da curcumina (**5**) resveratrol (**7**) e a avaliação dos seus efeitos sobre células derivadas de cânceres humanos, com a finalidade de investigar a relação estrutura-atividade e identificar novos protótipos com potencial antitumoral.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- a) Sintetizar uma série de derivados híbridos da curcumina (**5**, figura 6, pg 26) e do resveratrol (**7**) (figura 13, pg 35).
- b) Avaliar os efeitos de diferentes compostos frente as linhagens derivadas de cânceres humanos HepG2 (hepatoma), A549 (carcinoma de pulmão), MCF 7 (Carcinoma de mama) e HT 144 (melanoma);
- c) Investigar os possíveis mecanismos relacionados à atividade antiproliferativa e/ou citotóxicas dos compostos estudados.

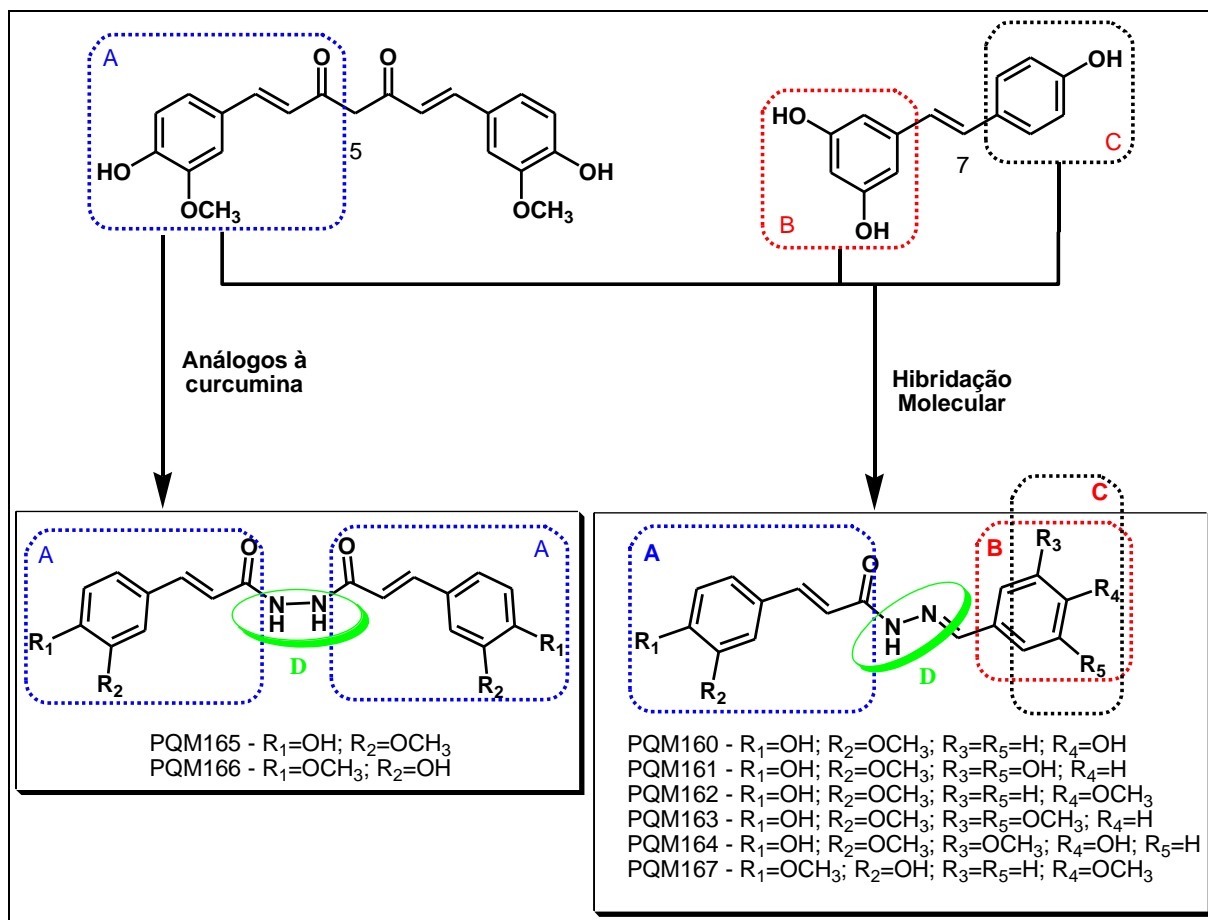


Figura 13 - Planejamento por hibridação molecular das estruturas **PQM160-165** e **PQM167**.  
 Fonte: Do autor.

O teve-se como objetivo com o trabalho sintetizar híbridos moleculares da curcumina (5) e resveratrol (7), dois produtos naturais abundantes e com reconhecida atividade antiproliferativa e antitumoral. Essa proposta foi planejada em um padrão molecular que conservasse as subunidades estruturais farmacofóricas dos modelos 5 e 7, de modo que efeitos biológicos destas duas substâncias pudessem serem expressos concomitantemente, além da inserção de um unidades espaçadoras acilidrazônicas que pudessem contribuir para um aumento da solubilidade e das propriedades ADME. Nesta concepção, acredita-se que a inserção do espaçador acilidrazônico (D, figura 13, pg 35), um grupo polar, com propriedades doadoras e aceptora de ligação de hidrogênio, poderia facilitar a interação molecular com biomacromoléculas nos sítios-alvo do organismo e, eventualmente, com biomoléculas carreadoras, melhorando o perfil farmacodinâmico e farmacocinético dos ligantes, uma vez que a literatura aponta estes fatores como as principais limitações do uso terapêutico da curcumina (5, figura 6, pg 26) e do

resveratrol (**7**) (ANAND et al., 2007; BELLINA et al., 2015; LI; LEE; et al., 2015; NEVES et al., 2012).

Os análogos a curcumina (**PQM-165** e **PQM-166**, figura 20, pg 46) foram planejados, a fim de testar sua atividade antiproliferativa, sendo esta estrutura inédita e derivada da curcumina (**5**, figura 6, pg 26). Trabalhos na literatura afirmam que a inserção de um heteroátomo entre os grupos carbonila da curcumina tem a capacidade de incrementar a atividade antiproliferativa da estrutura (CHEN, 2015), a presença de um espaçador hidrazídico entre as carbonilas de sua estrutura possui o objetivo de melhorar a distribuição biológica das substâncias e fazer das mesmas mais resistentes aos metabolismos sofridos pela curcumina (**5**, figura 6, pg 26).

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

Neste tópico abordaremos os experimentos realizados no decorrer deste trabalho, do ponto de vista químico e biológico.

### 4.1 QUÍMICA

Em seguida todas as descrições dos processos químicos envolvidos na obtenção das substâncias estudadas.

#### 4.1.1 Generalidades

Os espectros na região do infravermelho foram gerados em um espectrômetro de infravermelho Nicolet iSso FTIR (Thermo Scientific USA) acoplado a Pike Gladi ATR technologies e os perfis cromatográficos das substâncias foram obtidos por aparelho de UHPLC modelo Ultimate 3000 (Thermo Scientific) no laboratório de análises e caracterização de fármacos (LACFar) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), as amostras **PQM-160-164** e **PQM-167**, tiveram seu nível de pureza calculado e foram enviadas para obtenção dos espectros de RMN somente com pureza igual ou superior a 95% (Apendice C). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC-300 operando a 300 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e de 75 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$  do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética da UNIFAL-MG. Todos os reagentes utilizados na síntese foram adquiridos da Sigma-Aldrich, sem purificações adicionais. As cromatografias em camada delgada foram realizadas em folha de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>, da marca Merck e as purificações por cromatografia em coluna foram realizadas em gel de sílica flash (220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm), da marca Sigma-Aldrich. A visualização das substâncias foi feita em câmara de UV ( $\lambda = 254$  ou 365 nm) ou com

revelador de iodochloroplatinado. Os solventes diclorometano, etanol, trietilamina e dimetilformamida foram secos ou destilados de acordo com a literatura (PERRIM; ARMARENGO, 1988). As faixas de fusão foram estabelecidas em equipamento Marte (PFM II) com amostra triturada e empacotada em tubo capilar, sem correção. Os prováveis mecanismos de reação da síntese dos compostos deste trabalho estão no apêndice A, no fim deste manuscrito (pg 101).

#### 4.1.2 Abordagem Sintética

A rota sintética proposta para a série-alvo **PQM-160-164** e **PQM-167** está baseada na preparação do intermediário hidrazídico **11**, obtido por conversão do ácido 3-metóxi-4-hidroxi-cinâmico (ácido ferúlico) **9a** ou ácido 3-hidroxi-4-metóxi-cinâmico (ácido isoferúlico) **9b** no respectivo cloreto de ácido **10**, seguido da adição de hidrato de hidrazina, fornecendo o intermediário-chave hidrazídico **11a** e **11b**. A reação da hidrazida **11** com aldeídos fenólicos adequadamente substituídos **12a-e** levou aos derivados acilidrazônicos-alvo **PQM-160-164** e **PQM-167** (figura 14).

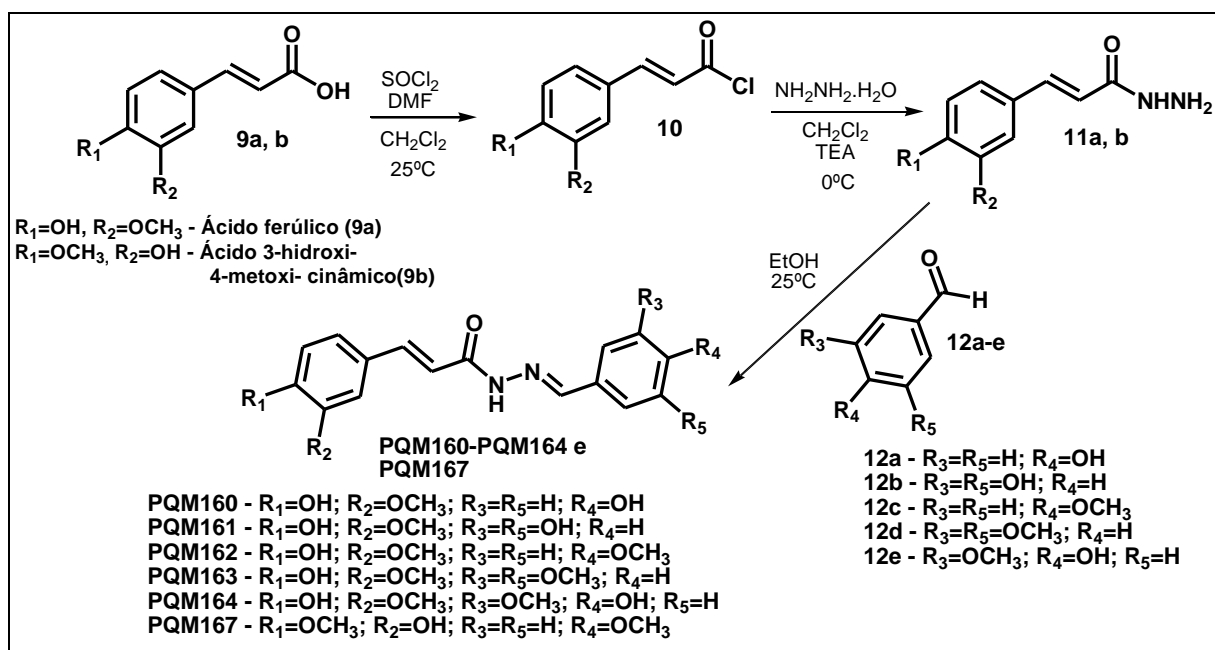


Figura 14 - Rota sintética das substâncias alvo **PQM160-164** e **PQM167**.

Fonte: Do autor.



A rota sintética proposta para os análogos à curcumina **PQM-165** e **PQM-166** está baseada na preparação do intermediário hidrazídico **11**, obtido por conversão do ácido 3-metóxi-4-hidroxi-cinâmico (ácido ferúlico) **9a** ou ácido 3-hidroxi-4-metoxi-cinâmico (ácido isoferúlico) **9b** no respectivo cloreto de ácido **10**, seguido da adição de hidrato de hidrazina (figura 15).

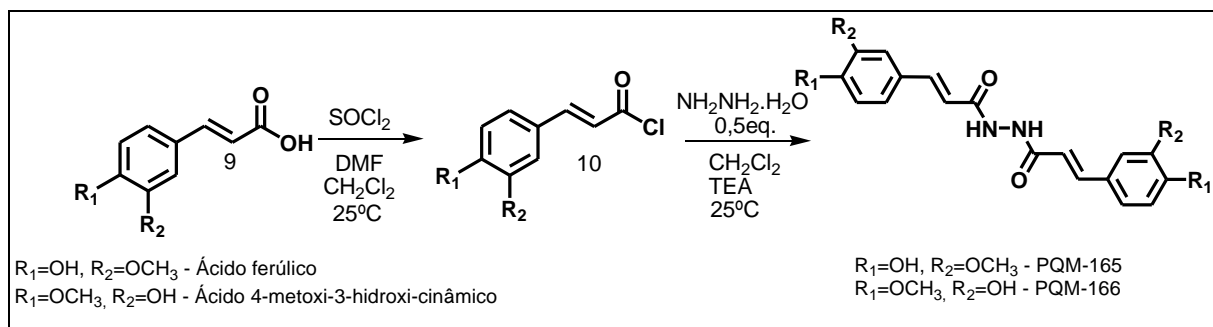


Figura 15 - Rota sintética das substâncias alvo **PQM-165** e **PQM-166**.

Fonte: Do autor.

#### 4.1.3 Síntese do intermediário hidrazídico (11a e 11b)

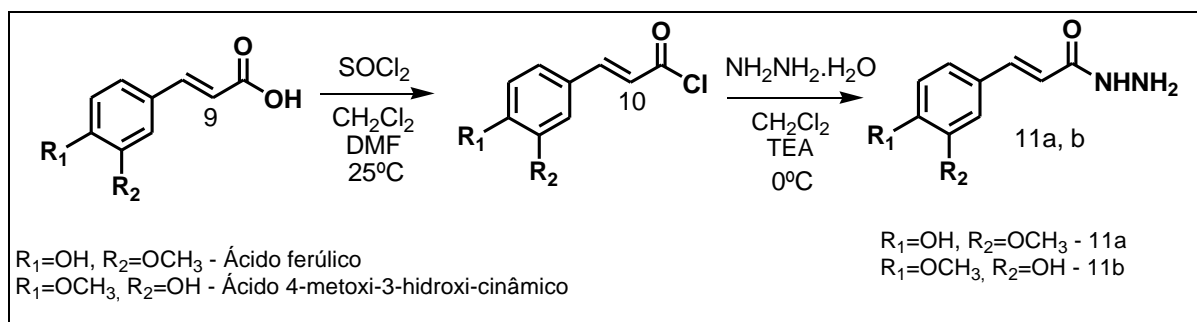


Figura 16 - Obtenção da hidrazida intermediária (**11**) via cloreto de acila (**10**) com adição de trietilamina a partir do ácido *trans*-ferúlico (**9a**) ou do ácido 3-hidroxi-4-metoxi-*trans*-cinâmico (**9b**).

Fonte: Do autor.

Em um balão monotubulado de 50 mL, foram adicionados 300 mg do ácido *trans*-ferúlico (1 eqv, 1,546 mmol) ou ácido 3-hidroxi-4-metoxi-*trans*-cinâmico (1 eq., 1,546 mmol), 800  $\mu$ L de cloreto de tionila (6,5 eq) e 100  $\mu$ L de DMF em diclorometano (15 mL). O sistema foi mantido sob agitação por 2 horas a 25°C, até consumo total do ácido de partida observado em cromatografia de camada delgada

(CCD) sob luz UV ( $\lambda = 254$  ou  $365$  nm), eluída com fase móvel acetato de etila/hexano na proporção de 7/3. Ao término das 2 horas o meio reacional foi concentrado em rota-evaporador e, em seguida em linha de alto vácuo, a fim de garantir a remoção de todo o excesso de cloreto de tionila. Em outro balão monotubulado de 50 mL, adicionou-se 2,5 mL de hidrato de hidrazina (30 eq), 280  $\mu$ L de trietilamina (1,2 eq) e diclorometano (3 mL). Este sistema foi mantido em agitação em banho de gelo. Um sólido formado no primeiro balão foi solubilizado em diclorometano (15 mL) e transferido gota-a-gota, lentamente, neste balão. Ao término da adição, o produto foi concentrado em evaporador rotatório, solubilizado em etanol, filtrado e seco sob vácuo.

#### 4.1.4 Reação de Acoplamento da Hidrazida Intermediária (11) com Aldeídos Funcionalizados Para a Obtenção de PQM-160-164 e PQM-167

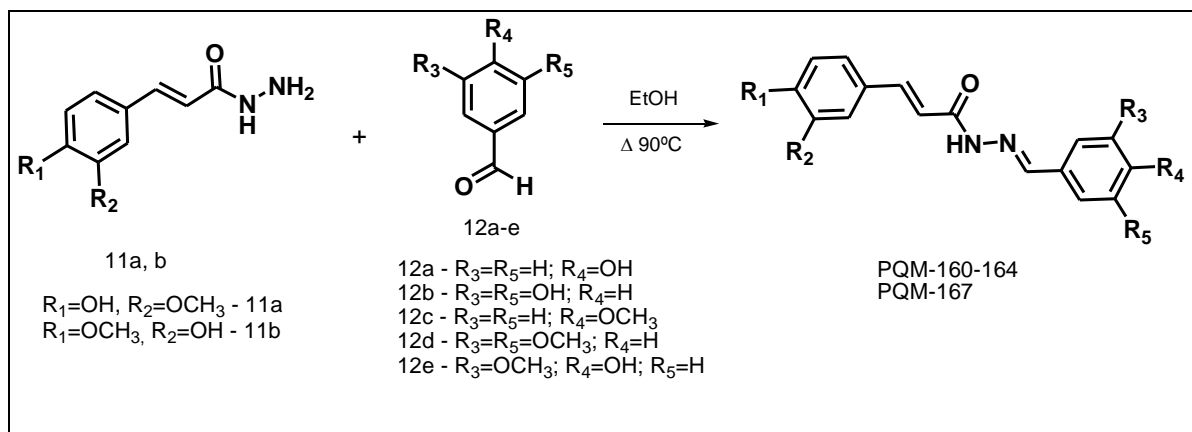


Figura 17 - Reação de acoplamento da hidrazida (**11a** ou **11b**) com benzaldeídos funcionalizados (**12a-e**) para obtenção da série alvo **PQM-160-164** e **PQM-167**.

Fonte: Do autor.

Em um balão monotubulado de 50 mL adicionou-se a hidrazida **11a** ou **11b**, o aldeído adequado (1,2 eq) em 15 mL de etanol. O sistema foi mantido sob agitação, em refluxo a 90°C, por aproximadamente 12 horas. O consumo total da hidrazida foi verificado em placa cromatográfica empregando-se diferentes proporções de eluente (tabela 1, pg47). Após confirmação do término da reação, o solvente foi retirado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, sendo o produto da reação purificado em

coluna cromatográfica (CC) com gel de sílica flash (220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm) e eluente adequado, fornecendo rendimentos razoáveis (tabela 1, pg 47).

#### 4.1.5 Síntese dos derivados curcumina-*like* PQM165 e PQM166

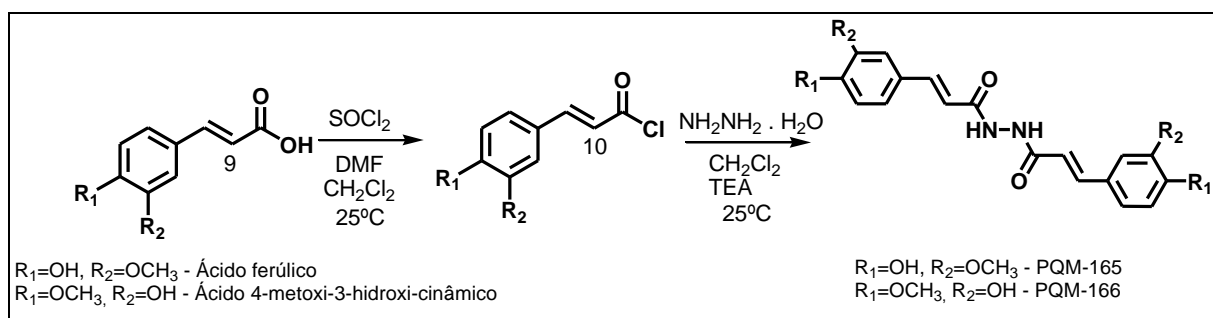


Figura 18 - Reação de síntese do dímero curcumina-*like* (PQM-165 e PQM 166).

Fonte: Do autor.

Em um balão monotubulado de 50 mL, foi adicionado 300 mg do ácido *trans*-ferúlico ou ácido 3-hidroxi-4-metoxi-*trans*-cinâmico (1 eqv, 1,5460 mmol), 800  $\mu$ L cloreto de tionila (6,5 eq) e 100  $\mu$ L de DMF em diclorometano (15 mL). O sistema foi mantido sob agitação por 2 horas a 25°C, até consumo total do ácido de partida. Após o terminio da reação o meio reacional foi concentrado em rota-evaporador sob pressão reduzida e, em seguida direcionado à uma linha de alto vácuo, a fim de garantir a remoção do excesso de cloreto de tionila. Uma solução contendo 280  $\mu$ L de trietilamina (1,2 eq), 5 mL de diclorometano e 50  $\mu$ L (0,5 eq) de hidrato de hidrazina foi preparada e acomodada em funil de adição, o sólido do balão foi solubilizado em diclorometano e colocado sob agitação, o conteúdo do funil de adição foi então adicionado ao balão, gota a gota, o sistema ficou sob agitação por 30 min a 25°C. O produto da reação foi levado ao evaporador rotatório sob pressão reduzida para remoção do solvente e a reação foi purificada por CC com gel de sílica flash (220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm) empregando-se proporções eluente adequado fornecendo rendimentos razoáveis (tabela 2, pg47).

## 4.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

A seguir os métodos de estudos e avaliações biológicas das substâncias estudadas.

### 4.2.1 Condições de Cultivo e Linhagens Celulares

Diferentes linhagens celulares derivadas de tumores humanos foram usadas no presente estudo: HepG2 (hepatoma humano), A549 (carcinoma de pulmão humano), MCF 7 (carcinoma de mama humana) e HT144 (Melanoma). As células foram cultivadas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>). O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias e as subculturas foram obtidas por digestão enzimática (tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02%).

### 4.2.2 Viabilidade Celular – Ensaio Colorimétrico (MTS)

As células foram semeadas em placas de 96 poços (inoculo inicial de  $5 \times 10^3$  células ou  $1 \times 10^4$  células, dependendo do tipo celular). Após a aderência (24h), as células foram tratadas com os compostos estudados por 48 horas em diferentes concentrações (12,5 – 100 µM). Ao término do tratamento, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico utilizando-se o Kit “Cell Titer 96TM” (Promega®). O ensaio é baseado na conversão enzimática (desidrogenases) do sal tetrazolium a

sua forma reduzida (formazano), o qual absorve luz a  $\lambda = 490\text{nm}$ . A absorbância das amostras tratadas foi comparada às das amostras não tratadas sendo que a absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os resultados obtidos na 1ª série experimental foram confirmados em duas novas séries subsequentes. Curvas de regressão foram obtidas e os valores de  $IC_{50}$  (*inhibitory concentration*) foram calculados usando o Software Graphpad Prism®.

#### **4.2.3 Análise de Progressão de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo**

As células foram tratadas em concentrações ao redor do  $IC_{50}$  por 24h. Ao término do tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática e transferidas para tubos Falcon. Após centrifugação (5 min a 1000 rpm), o precipitado de células foi homogeneizado em PBSA e as células foram fixadas em etanol gelado (75%) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram tratadas com uma solução contendo: PBSA, RNase (10 mg/mL) e Iodeto de propídio (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 1 h. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, GE) utilizando o software ExpressPro.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão descritos e discutidos inicialmente do ponto de vista químico e posteriormente os resultados biológicos obtidos.

### 5.1 RESULTADOS QUÍMICOS E DISCUSSÃO

Inicialmente deparou-se com algumas dificuldades na obtenção do intermediário hidrazídico (**11a**). Acredita-se que na metodologia inicial empregada, a reação do éster metílico do ácido ferúlico com hidrato de hidrazina em meio etanólico e sob refluxo a 90°C levou a uma reação de adição de Michael (**13**) no carbono  $\beta$  da insaturação  $\alpha$ - $\beta$  carbonílica (figura 19). Após tentativas de nove diferentes métodos (apêndice B, pg 105), este problema foi solucionado com a realização do preparo da hidrazida **11a** diretamente a partir do ácido ferúlico (item 4.1.3, pg 39), evitando a passagem pelo seu éster metílico.

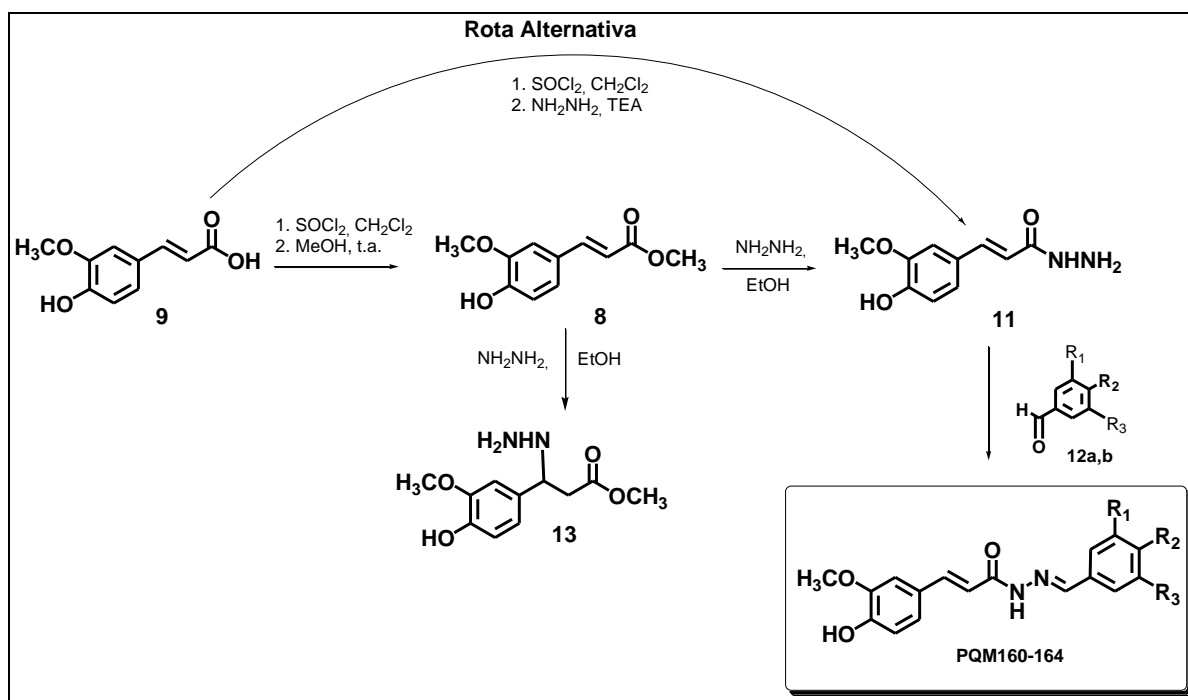


Figura 19 - Formação do produto de Michael (**13**) e estratégia utilizada para garantir a obtenção da substância alvo **PQM160-164**.

Fonte: Do autor.

Um segundo obstáculo surgiu ao realizar-se a preparação da hidrazida **11**, via cloreto de acila, uma vez que o dímero **PQM-165** era formado com maior rendimento, não sendo possível sua remoção por CC. A estratégia utilizada para solucionar este problema foi adicionar o cloreto de acila em uma solução com largo excesso (30 eq.) de hidrato de hidrazina, na presença de trietilamina (1 eq) em baixa temperatura (0°C, banho de gelo), prevenindo a formação do dímero. Desta forma, o composto intermediário hidrazídico **11a** foi obtido, e sua estrutura confirmada por RMN de  $^{13}\text{C}$ , de  $^1\text{H}$  e espectrometria na região do infravermelho (IV) (item 5.1.1, pg 48).

Em uma etapa subsequente o intermediário **11a** foi submetido a uma reação de acoplamento sob aquecimento a 90°C, para a avaliação da possibilidade de realizar esta reação catalisada pela adição de HCl e temperatura ambiente. Contudo, os rendimentos das reações ácido-catalisadas foram muito inferiores aos apresentados pelas reações sob refluxo, e os cinco produtos obtidos (figura 19, pg 44) tiveram suas estruturas caracterizadas por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e espectrometria na região do infravermelho (IV) (itens 5.1.2 ao 5.1.6, pg 50 a pg 75).

Os derivados diméricos da curcumina (**5**) foram obtidos de forma semelhante a hidrazida **11**, como sua formação foi observada na adição de cloreto de acila do ácido ferúlico **10** sobre baixo excesso de hidrato de hidrazina em banho de gelo, optou-se por utilizar 0,5 eq. de hidrato de hidrazina e adiciona-lo sobre uma solução de cloreto de acila **10** a temperatura de 25 °C, obtendo-se os dímeros **PQM-165** e **PQM-166**.

Afim de uma análise da relação estrutura atividade destes compostos as substâncias **PQM-167** e **PQM-166**, regioisômeros de **PQM-162** e **PQM-165**, respectivamente, foram sintetizados a partir do ácido 3-hidroxi-4-metoxi-cinâmico. A rota sintética utilizada foi a mesma para a obtenção dos produtos anteriores, diferindo, apenas, no material de partida.

Foram sintetizadas e testadas oito substâncias, sendo seis (**PQM-160**, **PQM-161**, **PQM-162**, **PQM-163**, **PQM-164** e **PQM-167**. Figura 20 pg 46) delas híbridas curcumina-resveratrol e outras duas (**PQM-165** e **PQM-166**. Figura 20) análogas à curcumina (**5**). No caso dos híbridos, temos duas classes distintas onde **PQM-160** e **PQM-161** não tiveram modificações estruturais nos substituintes dos anéis aromáticos (**B** e **C** figura 13, pg 35), enquanto que em **PQM-162** e **PQM-163** os grupos hidroxila do anel proveniente do resveratrol (anel **B** e anel **C** figura 13, pg 35)

foram substituídas por metoxilas. Esta variação foi importante para avaliar-se a relação estrutura-atividade e a contribuição farmacofórica destes substituintes. Em **PQM-164** o anel proveniente do resveratrol (anel **C** figura 13, pg 35) foi substituído pelo padrão de substituição presente nos anéis da curcumina (subunidade **A** figura 13, pg 35). **PQM-162** e **PQM-167** se diferenciam pela regioquímica dos substituintes da unidade proveniente da curcumina (subunidade **A** figura 13, pg 35), em **PQM-165** e **PQM-166**, assim como a curcumina (**5**), são dímeros, porém apresentam um espaçador hidrazídico e diferem entre si pelo padrão de substituição nos anéis aromáticos.

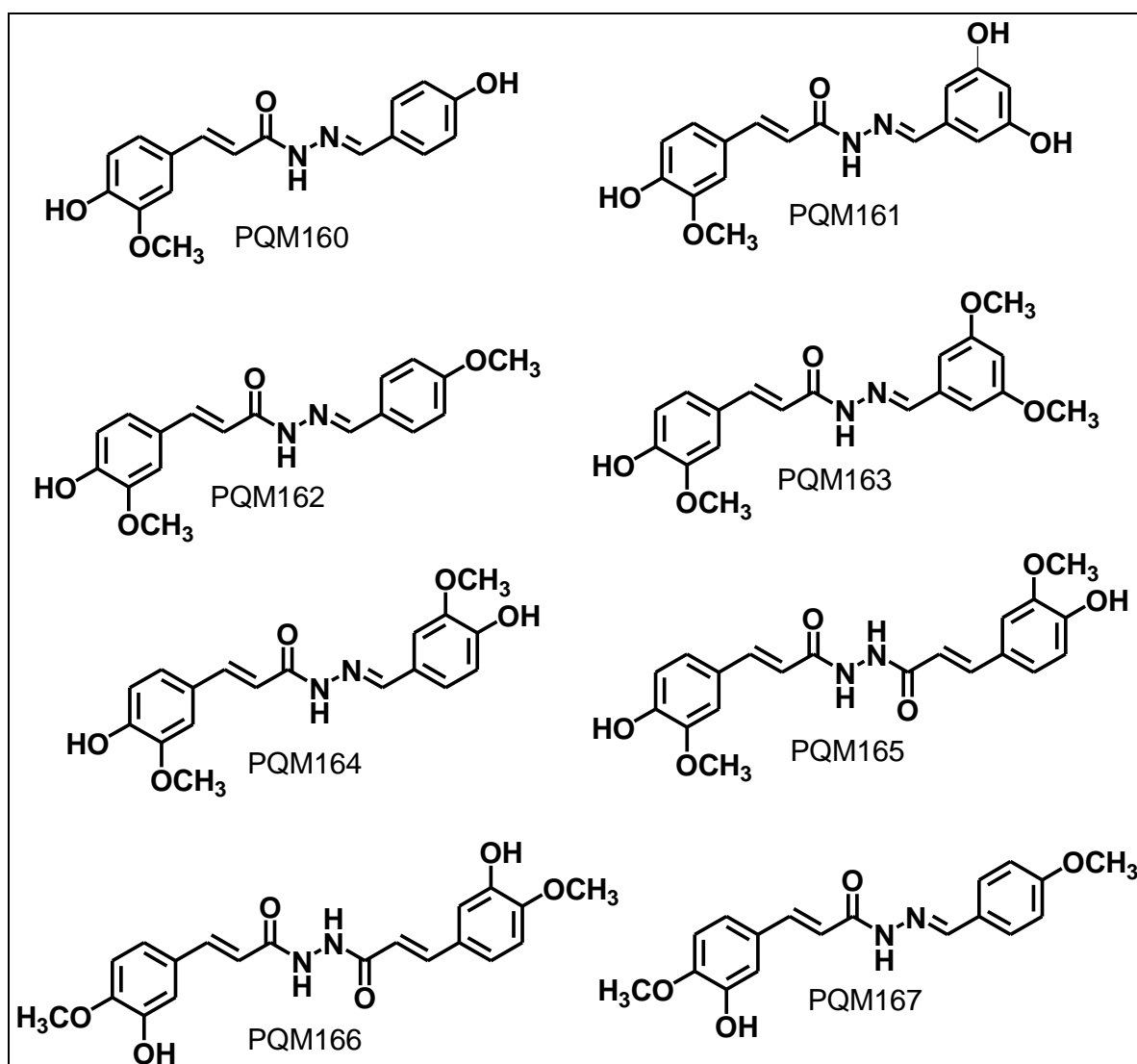
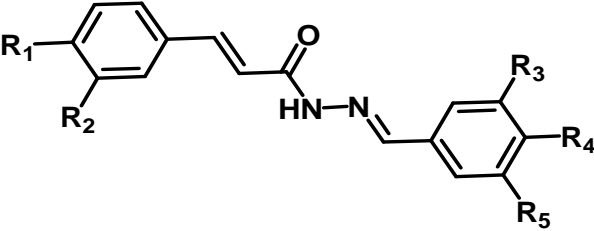


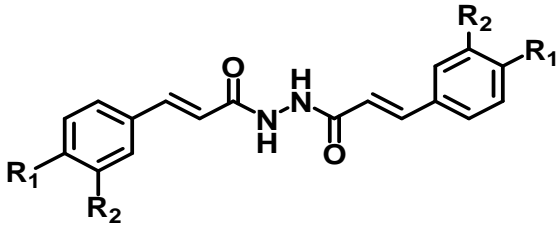
Figura 20 - Estruturas das substâncias-alvo PQM160-167 sintetizadas e avaliadas neste trabalho.  
Fonte: Do autor.



Tabela 1 - Dados experimentais da preparação da série-alvo **PQM160-164**.


Código (aspecto físico)	Substituintes	Eluente da CC	Rendimento Global	Faixa de Fusão (°C)
<b>PQM-160</b> (sólido marrom)	R <sub>1</sub> =R <sub>4</sub> =OH R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =H	Acetato de etila/Hexano 6:4 – 7:3	11,3%	260-265
<b>PQM-161</b> (sólido amarelo claro)	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =OH R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub> R <sub>4</sub> =H	Acetato de etila/Hexano 8:2	16,8%	231-234
<b>PQM-162</b> (sólido amarelo claro)	R <sub>1</sub> =OH R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =H R <sub>2</sub> =R <sub>4</sub> =OCH <sub>3</sub>	Acetato de etila/Hexano 8:2	31,2%	225-227
<b>PQM-163</b> (sólido bege)	R <sub>1</sub> =OH R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =OCH <sub>3</sub> R <sub>4</sub> =H	Acetato de etila/Hexano 7:3	38,3%	212-217
<b>PQM-164</b> (sólido amarelo)	R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =OH R <sub>2</sub> =R <sub>4</sub> =OCH <sub>3</sub> R <sub>5</sub> =H	Acetato de etila /Hexano/Etanol 6:4:0 – 6:4,5:0,5	48,1%	154-161
<b>PQM-167</b> (sólido amarelo claro)	R <sub>2</sub> =OH R <sub>1</sub> =R <sub>4</sub> =OCH <sub>3</sub> R <sub>3</sub> =R <sub>5</sub> =H	Acetato de etila/Hexano 7:3	24,5%	221-224

Fonte: Do autor.

Tabela 2 - Dados experimentais da preparação da série-alvo curcumina-like (**PQM165-166**).


Código (aspecto físico)	Substituintes	Eluente da CC	Rendimento Global	Faixa de Fusão (°C)
<b>PQM-165</b> (sólido branco)	R <sub>1</sub> =OH R <sub>2</sub> =OCH <sub>3</sub>	Acetato de etila /Hexano/Etanol 5:4,5:0,5	10,3%	198-203
<b>PQM-166</b> (sólido branco)	R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> =OH	Acetato de etila/Hexano 7,5:2,5	17,5%	215-217

Fonte: Do autor.

### 5.1.1 Síntese do intermediário (*E*)-3(4-hidróxi-3-metoxifenil)acrilidrazida (**11a**)

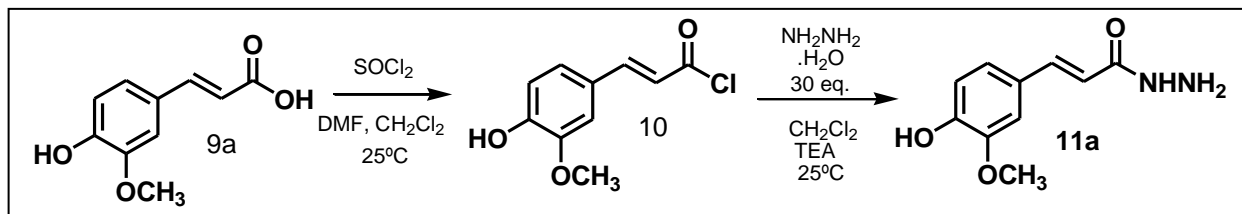


Figura 21 - Síntese do intermediário (*E*)-3(4-hidróxi-3-metoxifenil)acrilidrazida (**11a**)

Fonte: Do autor.

A síntese do intermediário hidrazidíco **11a** foi otimizada pela adição de trietilamina juntamente com hidrato de hidrazina, uma vez que em experimentos iniciais foi observado que o HCl formado na reação entre o hidrato de hidrazina e o cloreto de acila (**10**) estava, possivelmente, agindo na protonação do nitrogênio da função hidrazina, acarretando numa provável hidrólise do produto formado e comprometendo o rendimento da formação de **11a**. Esta hipótese foi confirmada quando a adição de  $\text{Et}_3\text{N}$  levou à obtenção de **11a** com sucesso e em bons rendimentos (observado por RMN). Uma vez obtida, a hidrazida **11a** bruta foi então submetida ao acoplamento com diferentes aldeídos funcionalizados.

O espectro na região do IV (figura 22) da substância **11a** apresenta bandas de estiramento de N-H<sub>2</sub> em 3253 e 3287 cm<sup>-1</sup>, estiramento de O-H em 3147 cm<sup>-1</sup>, deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em 2938 cm<sup>-1</sup>, estiramento de C-H sp<sub>3</sub> em 2838 cm<sup>-1</sup>, estiramento de C=O de amida em 1651 cm<sup>-1</sup>, estiramento de C=N em 1586 cm<sup>-1</sup>, deslocamento angular de N-H em 1510 cm<sup>-1</sup>, deslocamento angular de C-H sp<sub>3</sub> da metila em 1424 cm<sup>-1</sup> e estiramento de C-O em 1027 cm<sup>-1</sup>.

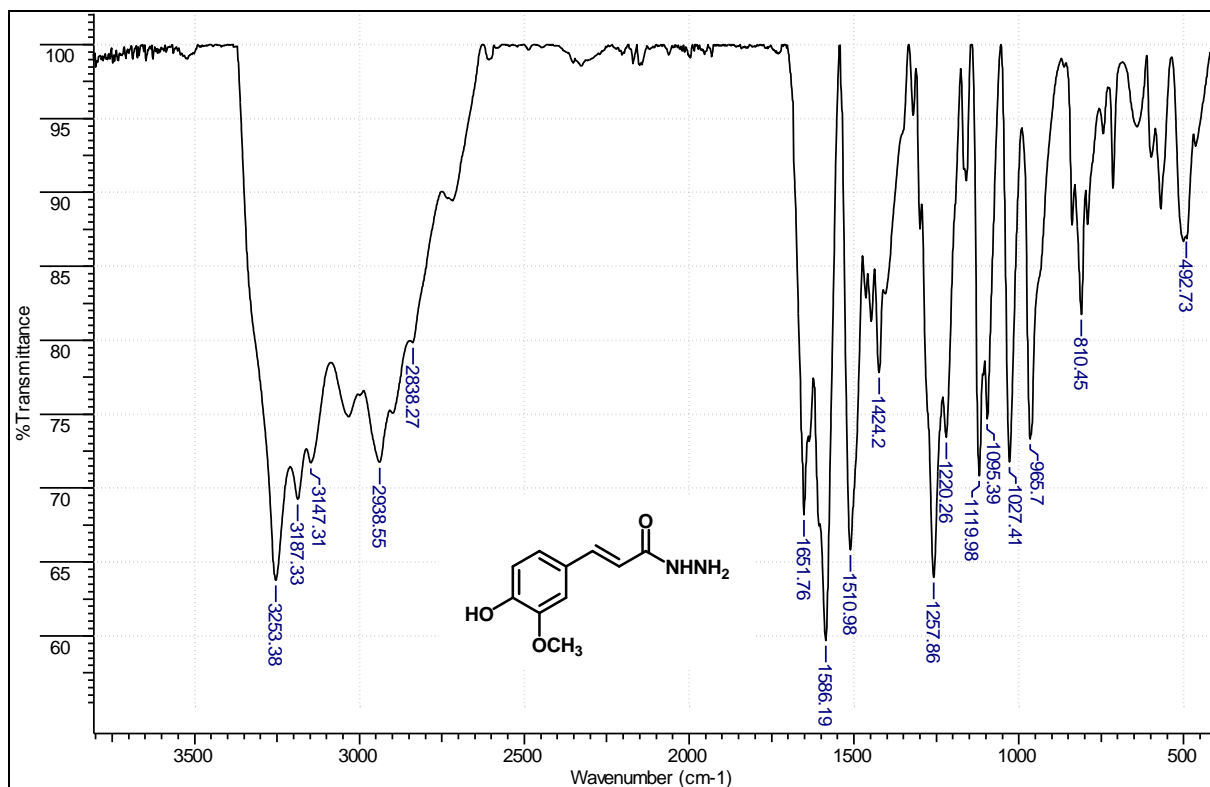


Figura 22 - Espectro na região do infravermelho da (E)-3(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilidrazida 11.  
Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 23) podemos observar o simpleto em  $\delta$  3,89 ppm, referente aos H da metoxila, além dos dupletos em  $\delta$  6,38 e 7,47 ppm ( $J=15,73$  Hz e  $15,72$  Hz, respectivamente) referentes aos H-11 e H-10  $\alpha$  e  $\beta$  carbonílicos, respectivamente. Também foram identificados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,80 referente a H1,  $\delta$  7,03 referente a H6 e  $\delta$  7,12 ppm referente a H4.

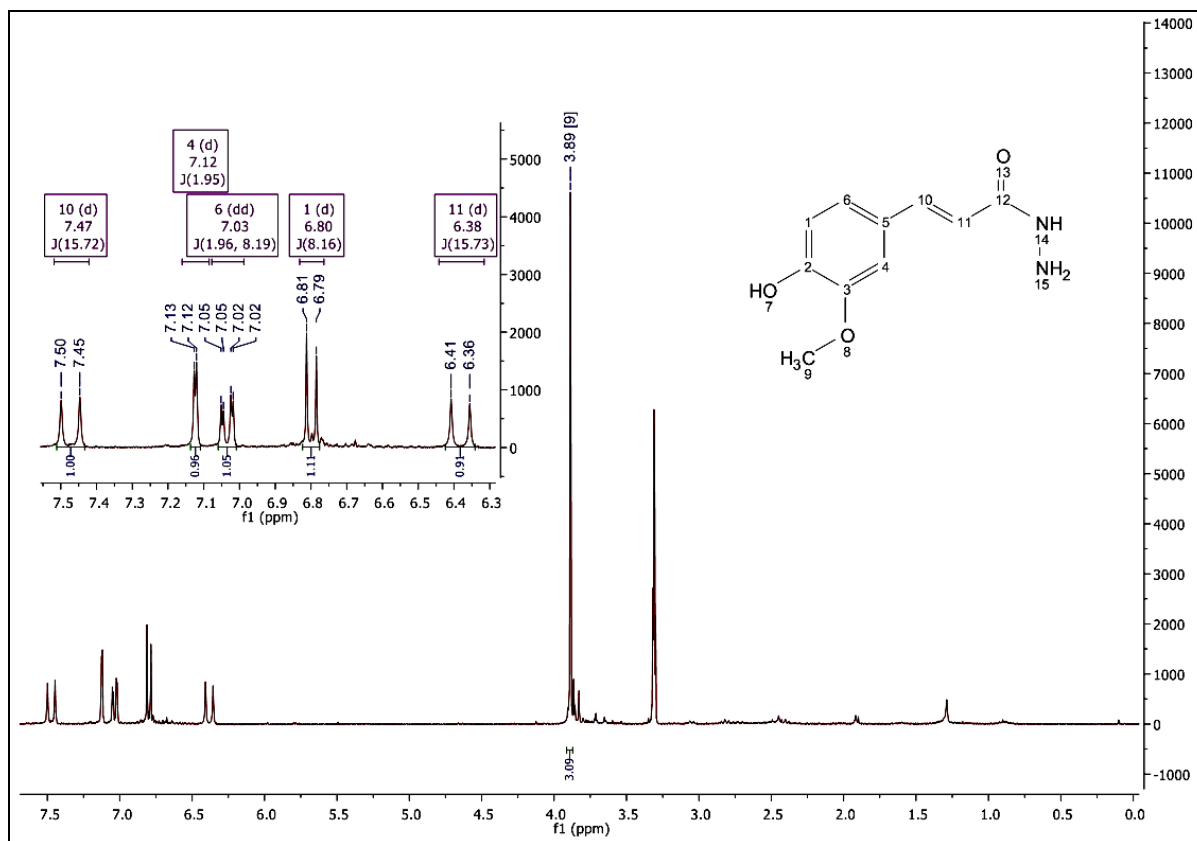


Figura 23 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilidrazida 11.

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24) podemos observar todos os sinais relativos aos 10 carbonos da estrutura de **11a**, com destaque para o carbono do grupo metoxila em  $\delta$  56,4. Em  $\delta$  168,6 foi identificado o sinal referente ao carbono carbonílico de hidrazida, os sinais em  $\delta$  162,5;  $\delta$  149,9;  $\delta$  142,1;  $\delta$  128,2 e  $\delta$  111,5 referentes aos carbonos do anel e os sinais em  $\delta$  149,3 e  $\delta$  123,2, referentes aos carbonos da insaturação  $\alpha$ - $\beta$  carbonílica.

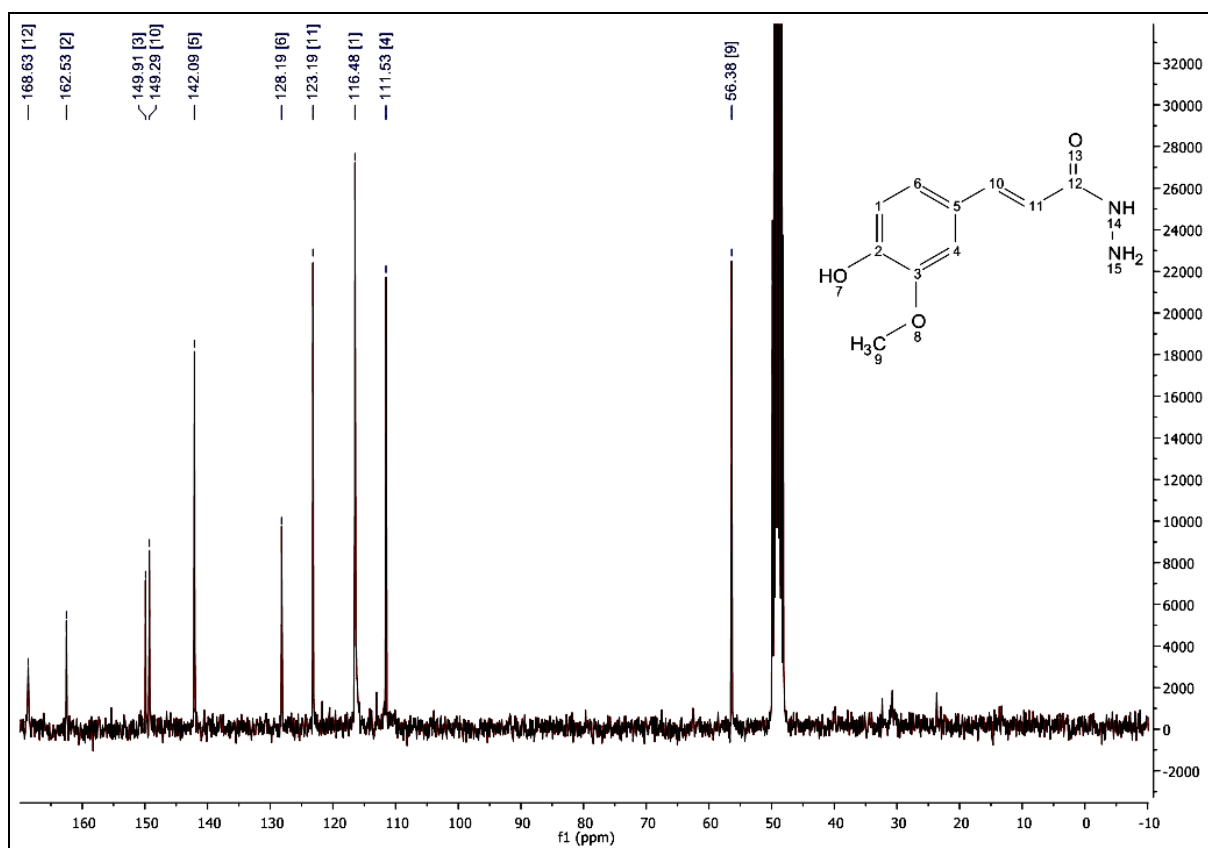


Figura 24 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilidrazida **11**.

Fonte: Do autor.

Tabela 3: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da hidrazida **11**.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	M	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6,80	d	8,16	116,5
2	--	--	--	162,53
3	--	--	--	149,1
4	7,12	d	1,95	111,6
5	--	--	--	142,2
6	7,03	dd	1,96; 8,19	128,2
7	--	--	--	--
8	--	--	--	--
9	3,89	s	--	56,4
10	7,47	d	15,72	149,3
11	6,38	d	15,73	123,19
12	--	--	--	168,6
13	--	--	--	--
14	--	--	--	--
15	--	--	--	--

Fonte: Do autor.

A análise conjunta dos dados dos espectros de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  nos permitiu confirmar a obtenção da substância intermediária **11**.

### 5.1.2 Síntese da 2-*N*-(4-hidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-160)

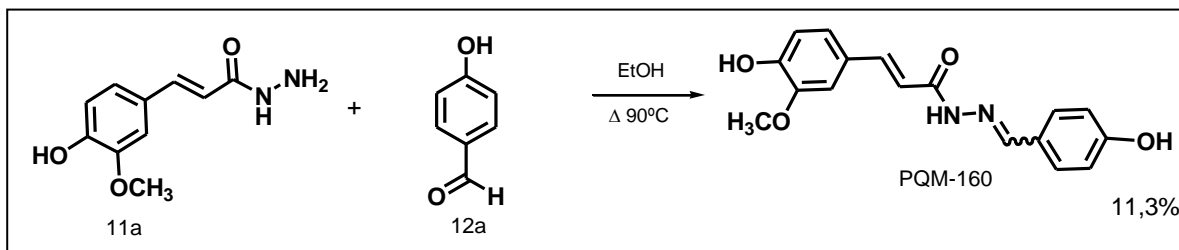


Figura 25 - Síntese da 2-*N*-(4-hidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-160).  
Fonte: Do autor.

Inicialmente foram feitas tentativas de reação de acoplamento com catálise ácida, porém, o rendimento foi muito pequeno. Suspeita-se que o ácido adicionado poderia estar levando novamente à hidrólise da amida precursora da hidrazona-alvo ou do próprio material de partida **11**, levando-nos a optar pelo acoplamento sem catálise, sob refluxo em etanol a  $90^{\circ}\text{C}$ , obtendo-se aumentos significativos nos rendimentos.

O espectro na região do IV (figura 26, pg 54) da substância **PQM-160** apresenta bandas de estiramento de N-H em  $3075\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de O-H em  $3014\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em  $2921\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $sp_3$  em  $2828\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de acilidrazona em  $1678\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=N em  $1606\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em  $1580\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de C-H  $sp_3$  da metila em  $1455$  e  $1371\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1056\text{ cm}^{-1}$ .

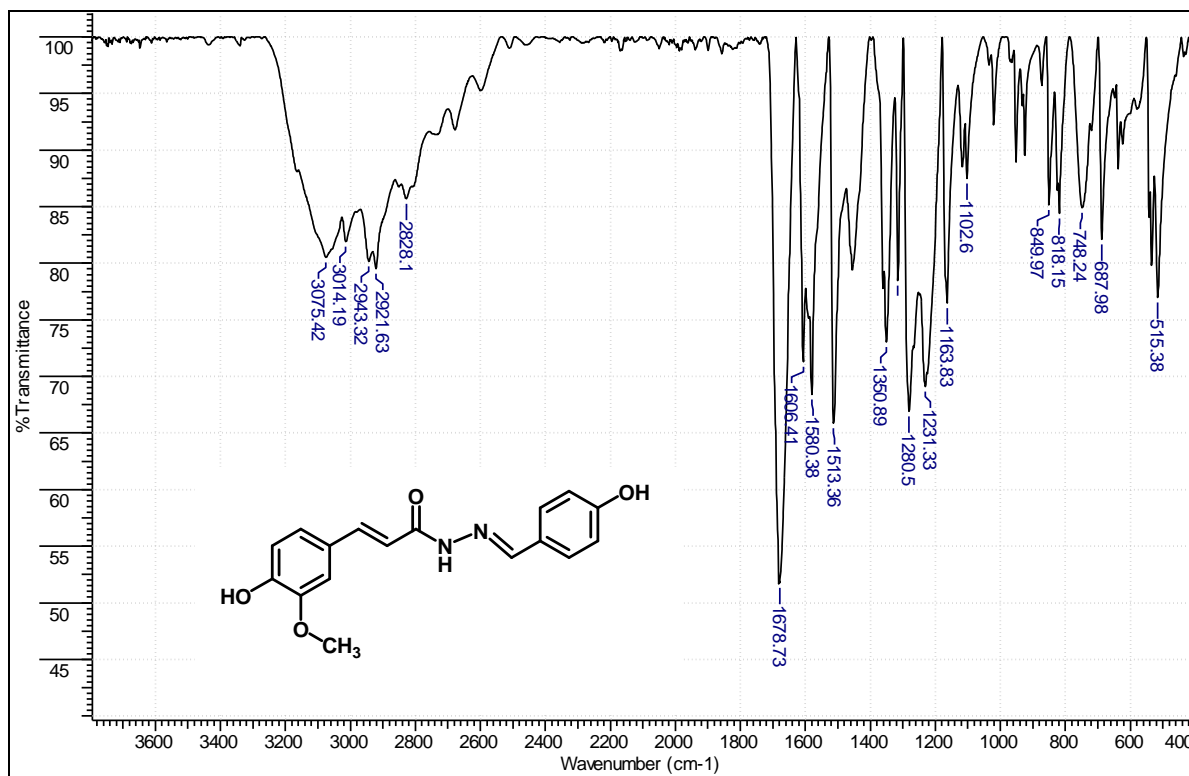


Figura 26 - Espectro na região do infravermelho da (2E)-N-(4-hidroxi-benzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (**PQM-160**).

Fonte: Do autor.



### 5.1.3 Síntese da 2-*N*-(3,5-diidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-161)

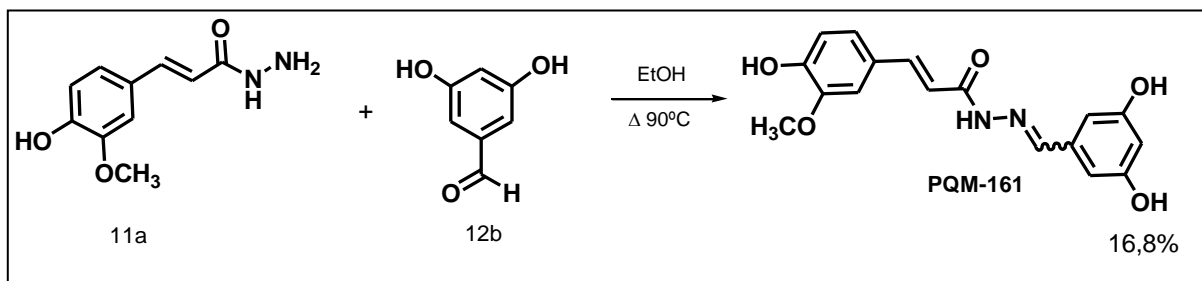


Figura 27 - Síntese da 2-*N*-(4-hidroxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (**PQM-161**).  
Fonte: Do autor.

O espectro na região do IV (figura 28, pg 56) da substância **PQM-161** apresenta bandas de estiramento de N-H em  $3374\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de O-H em  $3230\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em  $3047\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $sp_3$  em  $2962\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de acilidrazona em  $1622\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=N em  $1585\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em  $1467\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de C-H  $sp_3$  da metila em  $1343\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1018\text{ cm}^{-1}$ .

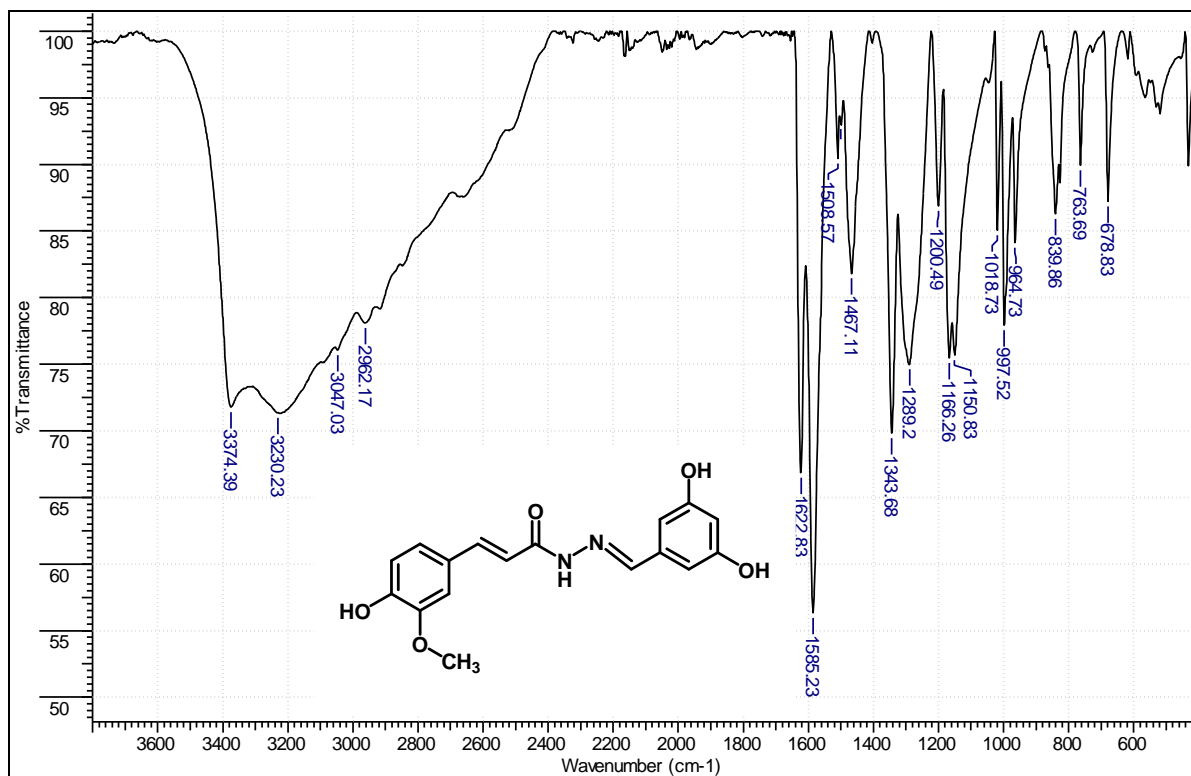


Figura 28 - Espectro na região do infravermelho da 2-*N*-(3,5-diidroxi-benzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-161**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 29, pg 57), podemos observar os simples em  $\delta$  7,96 e em  $\delta$  7,82 ppm referentes ao hidrogênio da ligação  $\text{N}=\text{CH}$  dos isômeros *E* e *Z*, respectivamente, característica da acilidrazona, além dos dupletos em  $\delta$  7,66 ppm ( $J=15,41$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,47 ppm ( $J=15,62$  Hz, 1H), referentes aos H7 e H8 da  $\alpha$ - $\beta$  instauração, respectivamente. Também foi possível observar o simpleto em  $\delta$  3,90 ppm referente aos hidrogênios do grupo metoxila e os demais sinais referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos da estrutura de **PQM-161**.

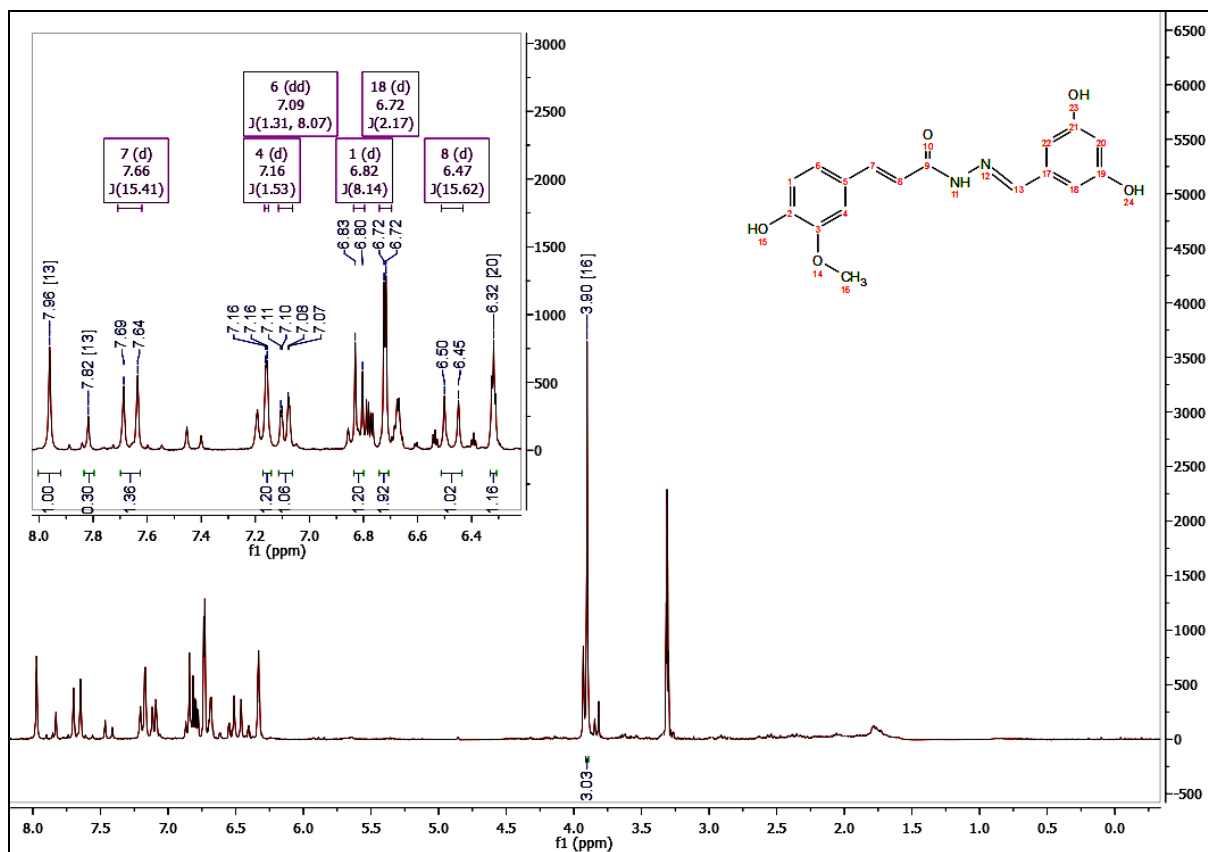


Figura 29 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H. (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da 2-*N*-(3, 5-diidroxibenzaldeído)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-161**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 30, pg 58) podemos observar todos os sinais relativos aos 15 carbonos da estrutura de **PQM-161**. O carbono carbonílico da acilidrazona foi identificado em  $\delta$  165,8 ppm, além dos sinais em  $\delta$  144,3 e  $\delta$  116,3, referentes aos carbonos da C7 e C8 insaturação  $\alpha$ - $\beta$  carbonílica, respectivamente. Em  $\delta$  160,0 foi observado o sinal atribuído aos carbonos C19 e C21, ambos ligados as hidroxilas fenólicas do sistema arilidrazônico. No espectro de carbono, nota-se que o C13 possui dois valores atribuídos, 144,3 e 146,0, o que se justifica pela ocorrência de dois isômeros geométricos *E* e *Z* da ligação da subunidade acilidrazônica, respectivamente.

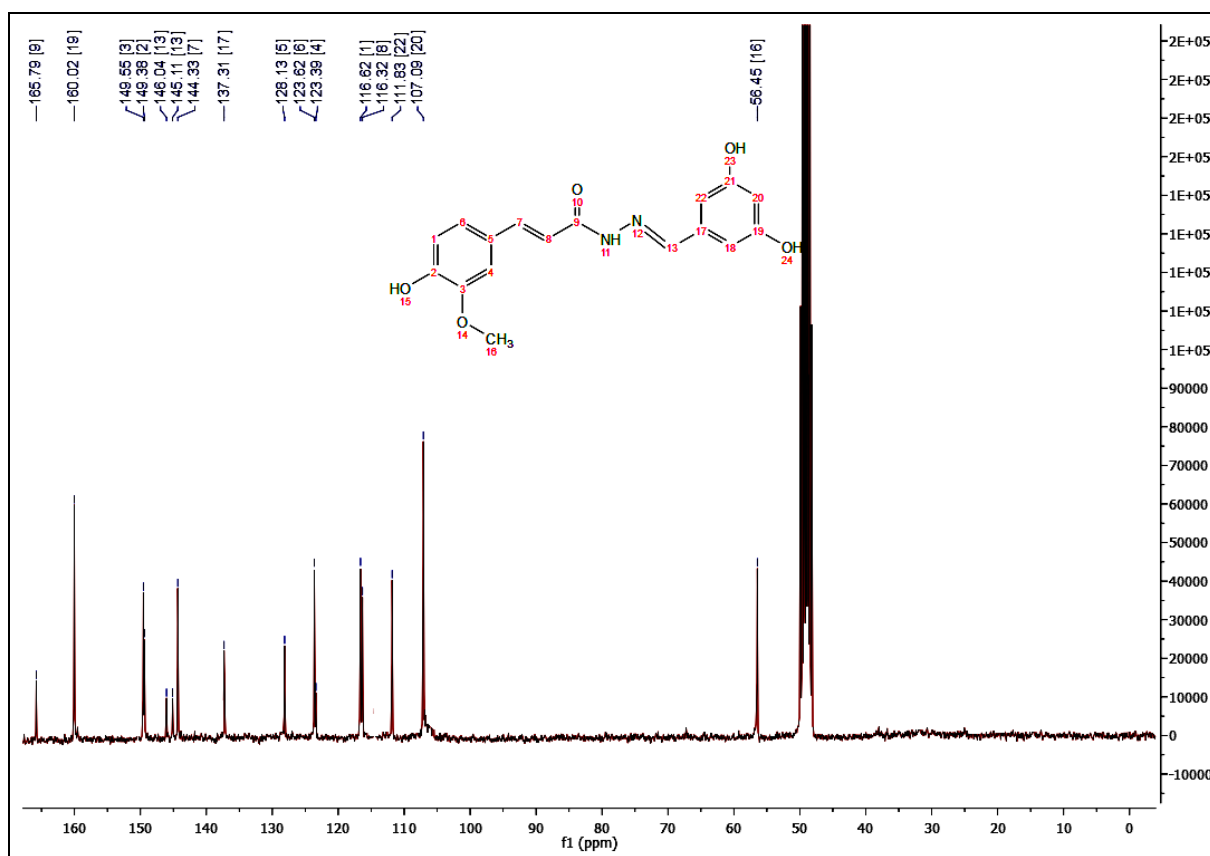


Figura 30 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da 2-N-(3, 5-dihidroxi-benzaldeido)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilidrazida (PQM-161).

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do 2-*N*-(3, 5-diidroxibenzaldeído)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-161**).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	M	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6,82	d	8,14	116,6
2	--	--	--	149,4
3	--	--	--	159,6
4	7,16	d	1,53	123,4
5	--	--	--	128,1
6	7,09	dd	1,31; 8,07	123,6
7	7,66	d	15,41	144,3
8	6,47	d	15,62	116,3
9	--	--	--	165,8
10	--	--	--	--
11	--	--	--	--
12	--	--	--	--
13	7,96( <i>E</i> ); 7,82( <i>Z</i> )	s	--	146,0 ( <i>Z</i> ); 145,1 ( <i>E</i> )
14	--	--	--	--
15	--	--	--	--
16	3,90	s	--	56,5
17	--	--	--	137,3
18	6,72	d	2,17	111,8
19	--	--	--	160,0
20	6,32	s	--	107,1
21	--	--	--	160,0
22	6,72	d	2,17	111,8
23	--	--	--	--
24	--	--	--	--

Fonte: Do autor.

### 5.1.4 Síntese da 2-*N*-(4-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-162)

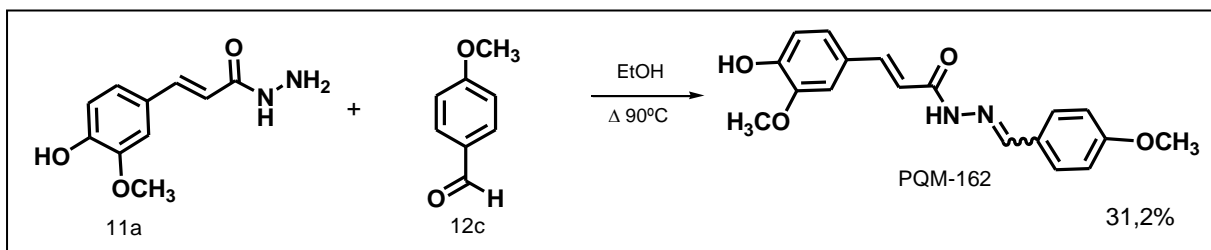


Figura 31 - Síntese da 2-*N*-(4-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-162).

Fonte: Do autor.

O espectro na região do IV (figura 32, pg 61) da substância **PQM-162** apresenta bandas de estiramento de N-H em  $3116\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de O-H em  $3046\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em  $2928\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $sp_3$  em  $2833\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de acilidrazona em  $1651\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=N em  $1605\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em  $1584\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de C-H  $sp_3$  da metila em  $1420$  e  $1398\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1031\text{ cm}^{-1}$ .

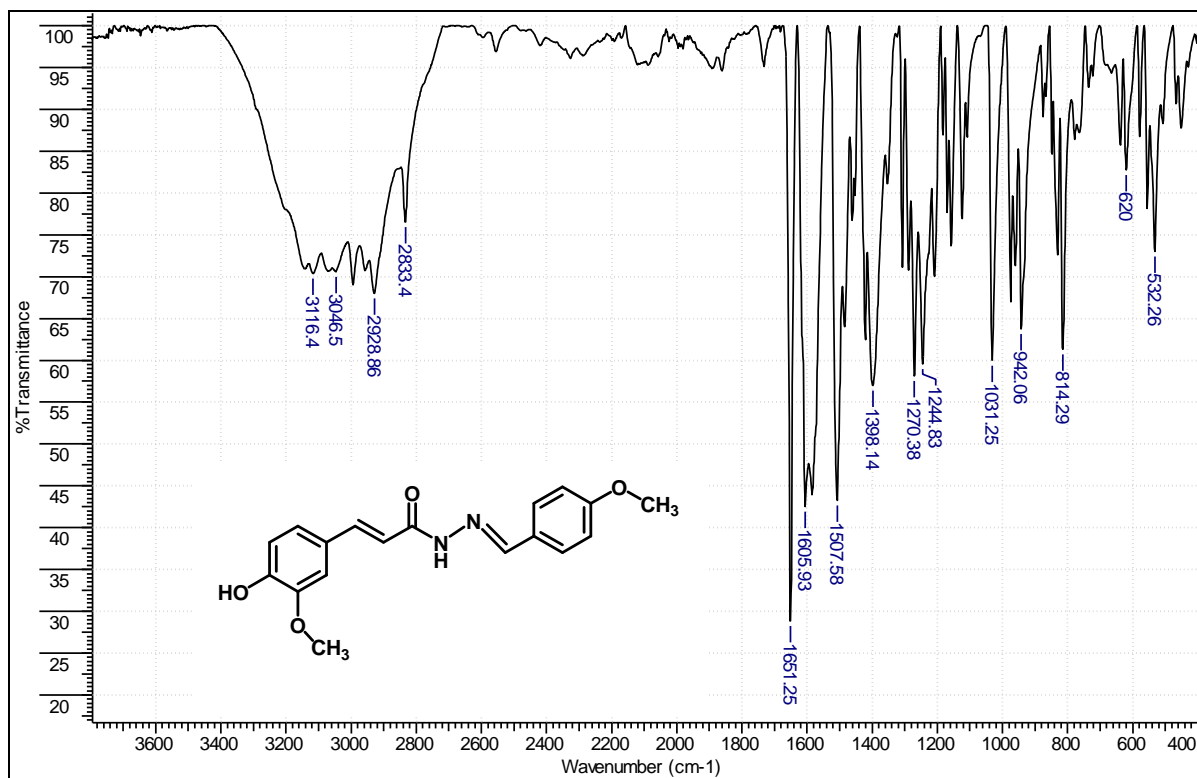


Figura 32 - Espectro na região do infravermelho da 2-N-(4-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (**PQM-162**).

Fonte: Do autor.

### 5.1.5 Síntese da 2-*N*-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-163)

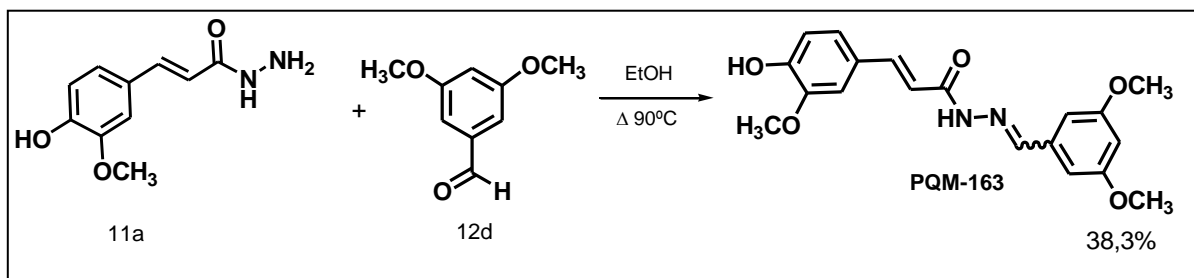


Figura 33 - Síntese da 2-*N*-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-163).  
Fonte: Do autor.

O espectro na região do IV (figura 34, pg 63) da substância **PQM-163** apresenta bandas de estiramento de N-H em  $3153\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de O-H em  $3055\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em  $2934\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $sp_3$  em  $2833\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de acilidrazona em  $1660\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=N em  $1628\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em  $1587\text{ cm}^{-1}$ , defromação angular de C-H  $sp_3$  da metila em  $1423$  e  $1363\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1054\text{ cm}^{-1}$ .



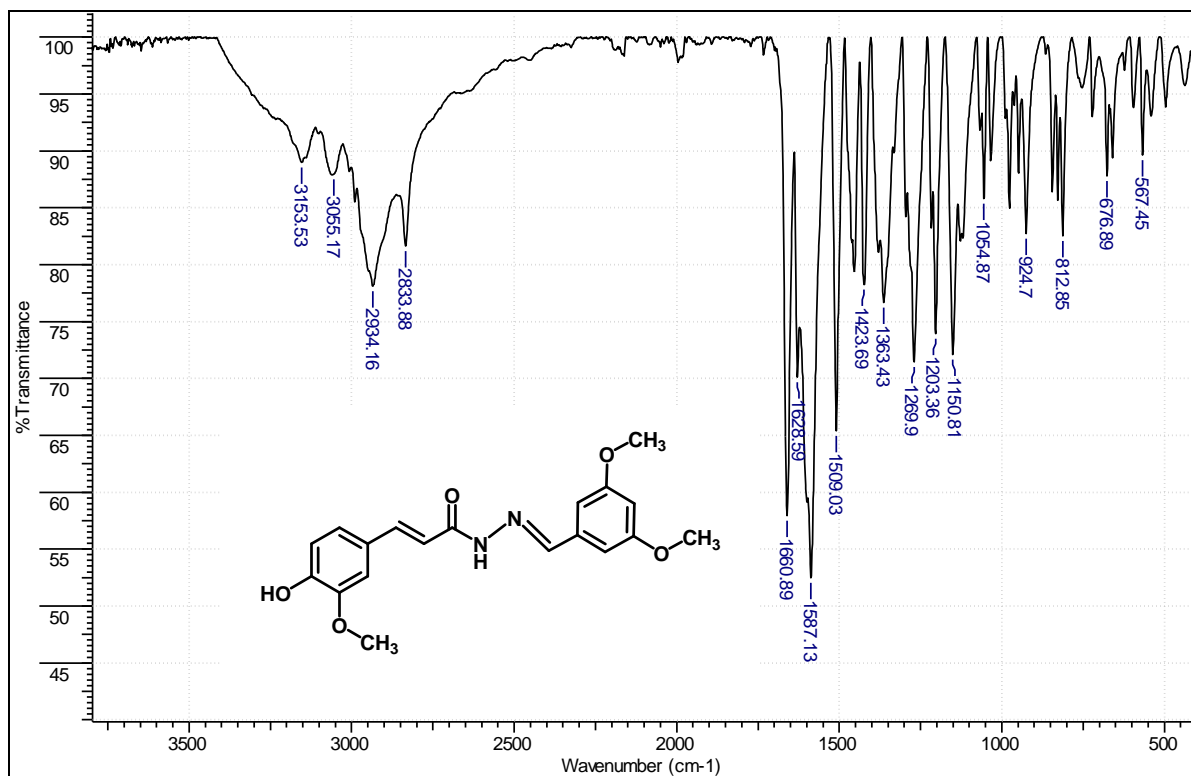


Figura 34 - Espectro na região do infravermelho da 2-*N*-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (**PQM-163**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 35, pg 64), podemos observar o simpleto em  $\delta$  8,10 (*E*) e 7,93 (*Z*) ppm referente aos hidrogênios da ligação  $\text{N}=\text{CH}$  característica da acilidrazona, além dos dupletos em  $\delta$  7,50 ( $J=15,82$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,51 ppm ( $J=15,67$  Hz, 1H) referentes aos H7 e H8 da  $\alpha$ - $\beta$  instauração, respectivamente. Também foi possível observar os simpletos em  $\delta$  3,85 (*Z*); 3,84; 3,83 (*E*) e 3,82 ppm referentes aos hidrogênios dos grupos metoxila e os sinais atribuídos aos hidrogênios dos anéis aromáticos da estrutura.

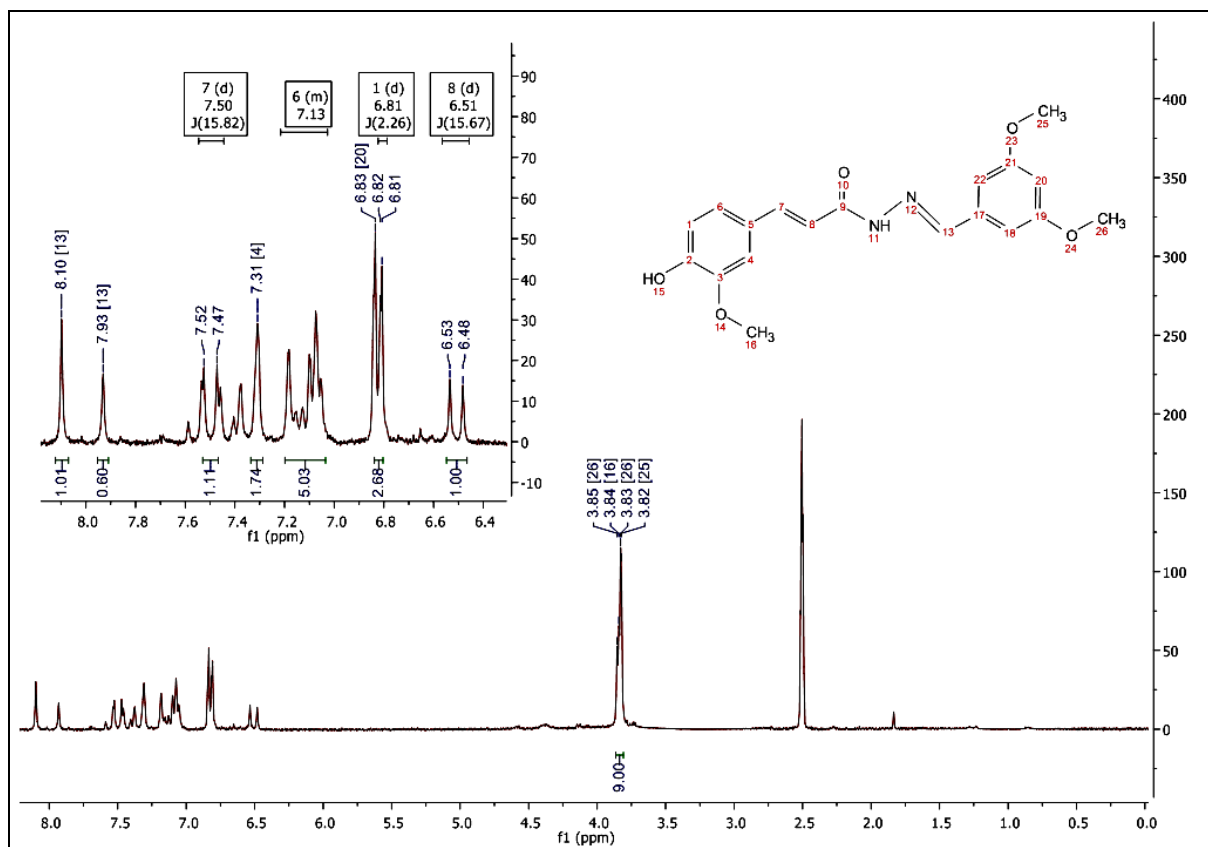


Figura 35 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H. (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) da 2-*N*-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (**PQM-163**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 36, pg 65) podemos observar todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura de **PQM-163**, na forma de seus dois isômeros geométricos. O carbono carbonílico de acilidrazona foi identificado em  $\delta$  162,0, além dos sinais em  $\delta$  146,1 referente ao carbono C7 e,  $\delta$  102,3 (isômero *E*) e  $\delta$  116,7 (isômero *Z*), referentes ao carbono C8 da insaturação  $\alpha$ - $\beta$  carbonílica. Em  $\delta$  160,7 foi observado o sinal atribuído aos carbonos C19 e C21 ambos ligados as metoxilas fenólicas do sistema acilidrazônico, também podemos observar o sinal em  $\delta$  146,1 atribuído a C13 (*E*) e  $\delta$  142,4 atribuído ao C13 (*Z*), carbono envolvido na reação de acoplamento da hidrazida **11a** com o respectivo aldeído.

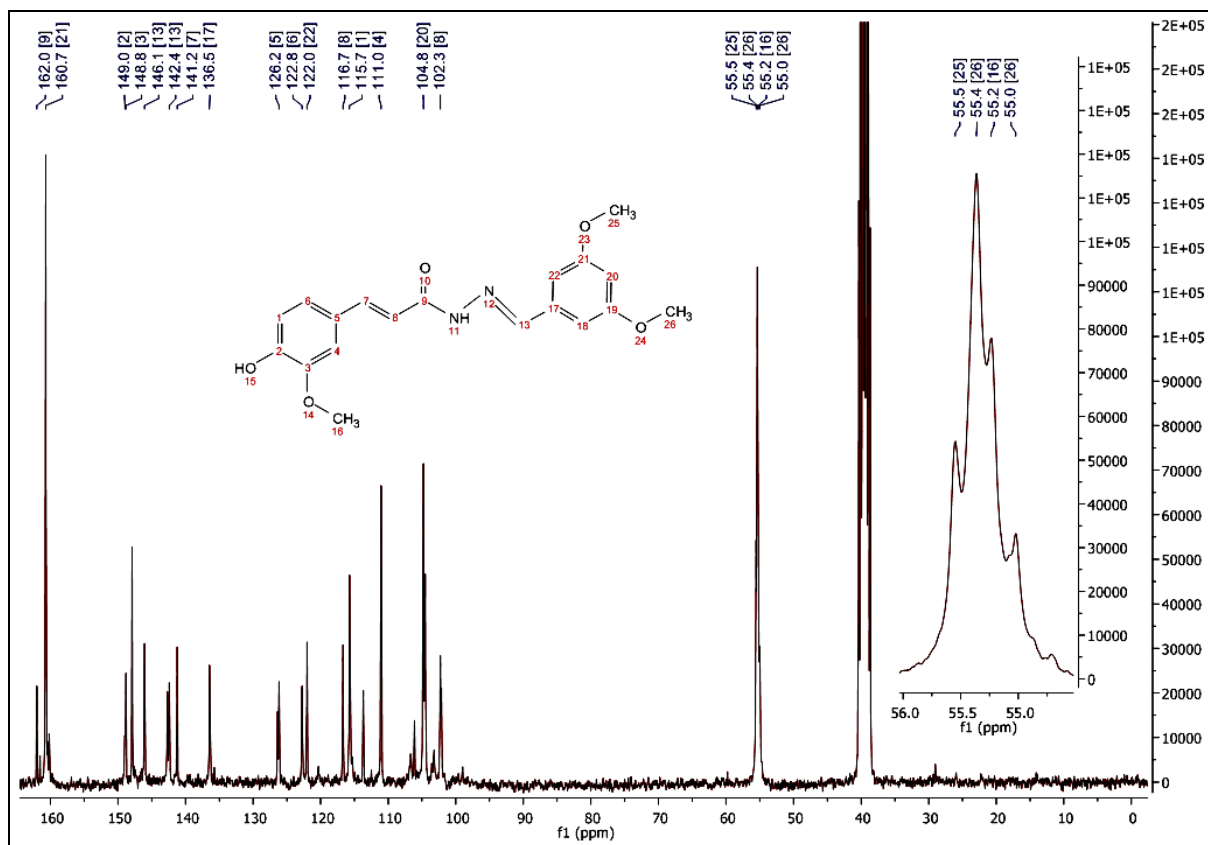


Figura 36 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) da 2-N-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (PQM-163).

Fonte: Do autor.

Após caracterização por espectrometria na região do IV, RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, podemos observar no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (figura 36) que os sinais dos carbonos estão duplicados, e as integrais, bem como a multiplicidade dos sinais do RMN de <sup>1</sup>H (figura 35, pg 64), não estão definidas. Estes fatos podem ser explicados pela ocorrência de dois isômeros geométricos com unidade estereogênica na ligação dupla da função acilidrazônica, formada na etapa de acoplamento de **11a** com 3,5-dimetoxibenzaldeído (**12d**) (figura 33, pg 62). Esse fato também foi identificado no trabalho de Silva et al. (2016) onde a obtenção de acilidrazonas levou a formação de isômeros *E* e *Z*, o autor realizou um estudo com RMN de <sup>1</sup>H com curva de aquecimento e verificou a formação do isômero *E* na temperatura de 120 °C, sendo este o mais estável (SILVA et al., 2016). A fim de atribuir os valores corretos dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram obtidos os mapas de correlação, HSQC (figura 37, pg 66) e HMBC (figura 38, pg 67), estes demonstraram que o deslocamento do carbono C8, que no intermediário **11a** apresenta deslocamento conhecido ( $\delta$  116,53 ppm), passou a ressonar em  $\delta$  102,3 ppm e  $\delta$  116,7 ppm, acoplado com o duplete em  $\delta$  6,51, sabidamente relativo aos hidrogênios da

insaturação  $\alpha$ - $\beta$  carbonílica, que por sua vez, mostrou correlação H-C com os carbonos aromáticos vizinhos C5 e C9, apontada pelo mapa HMBC (figura 38, pg 67). Este fato pode estar relacionado com as interações espaciais decorrentes do posicionamento espacial dos anéis aromáticos ligados ao *N* hidrazônico nos isômeros *E* e *Z*. Quando em configuração *Z* os grupos metoxila posicionam-se muito próximo ao carbono C8, podendo acarretar em um efeito de blindagem sobre o carbono  $\alpha$ -carbonílico do sistema acilidrazônico, esta mesma configuração acarreta os múltiplos sinais atribuídos as metoxilas e ao carbono C13 (figura 39, pg 67).

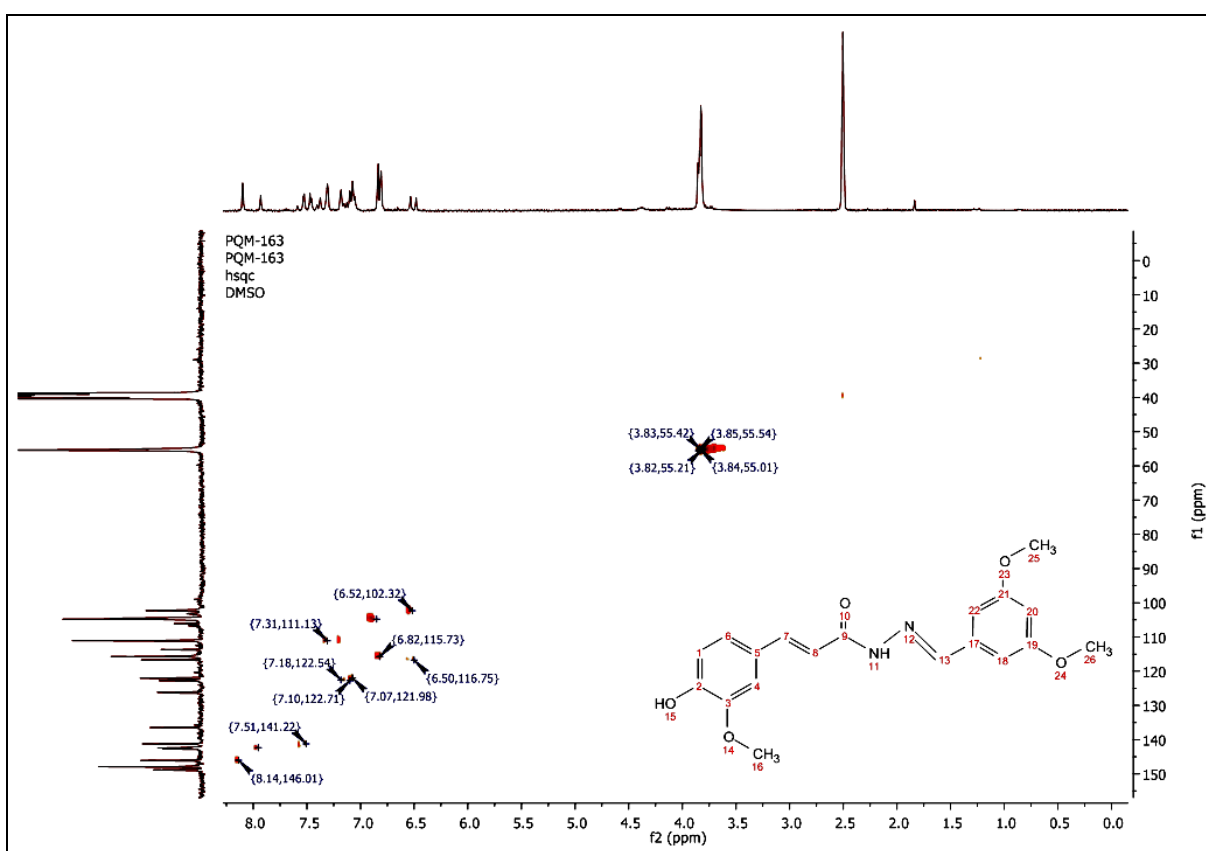


Figura 37 - Mapa de correlação HSQC (300MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-*N*-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-163**).

Fonte: Do autor.

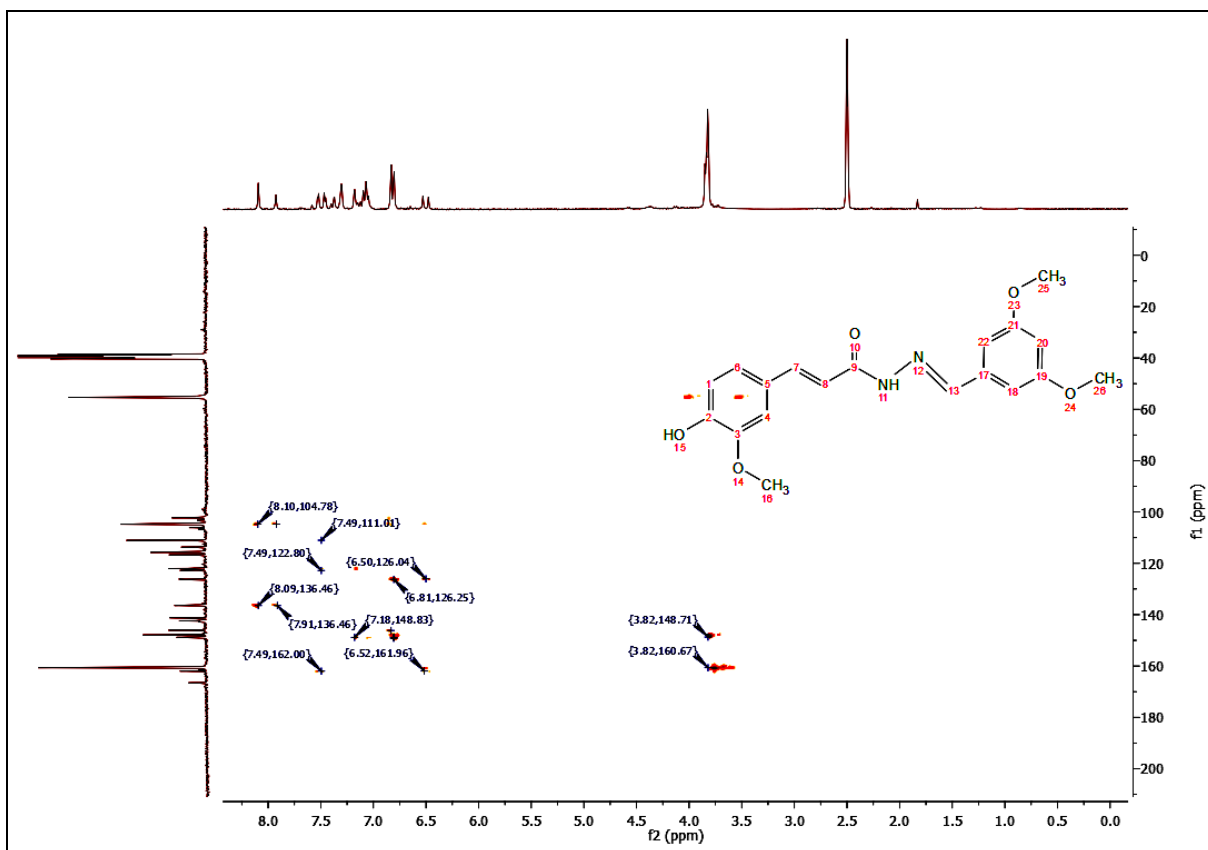


Figura 38 - Mapa de correlação HMBC (300MHz, DMSO- $d_6$ ) de (2E)-N-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-163).

Fonte: Do autor.

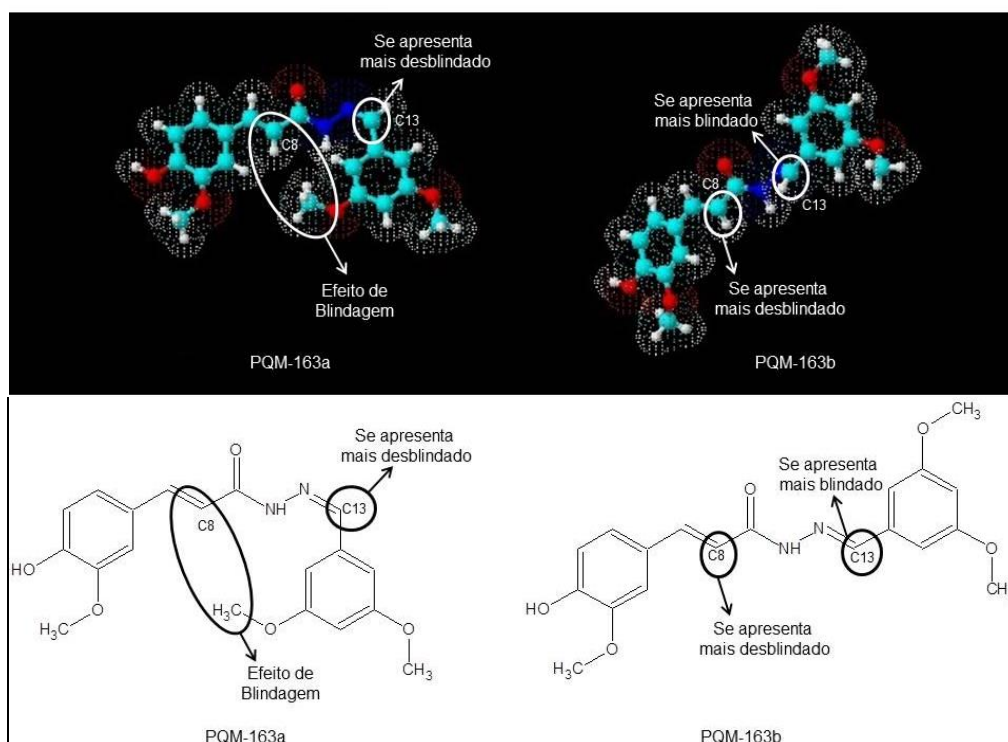


Figura 39 - Comparação dos isômeros geométricos Z (PQM-163a) e E (PQM-163b).

Fonte: Do autor.

Tabela 5: Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e de HMBC do 2-*N*-(3,5-dimetoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-163**).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	M	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC
1	6,81	d	2,26	115,7	C2, C3 e C5
2	--	--	--	149,0	--
3	--	--	--	148,8	--
4	7,31	s	--	111,0	--
5	--	--	--	126,2	--
6	7,13	m	--	122,8	C3
7	7,50	d	15,82	141,2	C4, C6 e C9
8	6,51	d	15,67	102,3( <i>E</i> ); 116,7 ( <i>Z</i> )	C5 e C9
9	--	--	--	162,0	--
10	--	--	--	--	--
11	--	--	--	--	--
12	--	--	--	--	--
13	8,10( <i>E</i> ); 7,93( <i>Z</i> )	s	--	142,4 ( <i>E</i> ); 146,1 ( <i>Z</i> )	C17 e C20
14	--	--	--	--	--
15	--	--	--	--	--
16	3,84	s	--	55,2	C3
17	--	s	--	136,5	--
18	7,13	m	--	122,0	--
19	--	--	--	160,7	--
20	6,83	s	--	104,8	C13
21	--	--	--	160,7	--
22	7,13	m	--	122,0	--
23	--	--	--	--	--
24	--	--	--	--	C18
25	3,82	s	--	55,5	C21
26	3,83( <i>E</i> ); 3,85( <i>Z</i> )	s	--	55,4( <i>E</i> ); 55,0( <i>Z</i> )	C19

Fonte: Do autor.

As análises conjuntas do espectro na região do IV, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  corroboraram para a elucidação da substância **PQM-163**.

### 5.1.6 Síntese da 2-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-164)

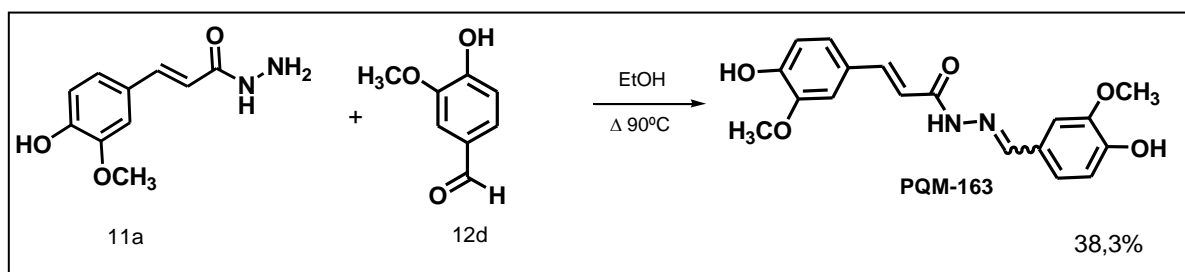


Figura 40 - Síntese da 2-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-164**).

Fonte: Do autor.

O espectro na região do IV (figura 41, pg 70) de **PQM-164** apresenta bandas de estiramento de N-H em  $3183\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de O-H em  $3059\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em  $2965\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $sp_3$  em  $2840\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de acilidrazona em  $1651\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em  $1585\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de C-H  $sp_3$  da metila em  $1427$  e  $1373\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1025\text{ cm}^{-1}$ .

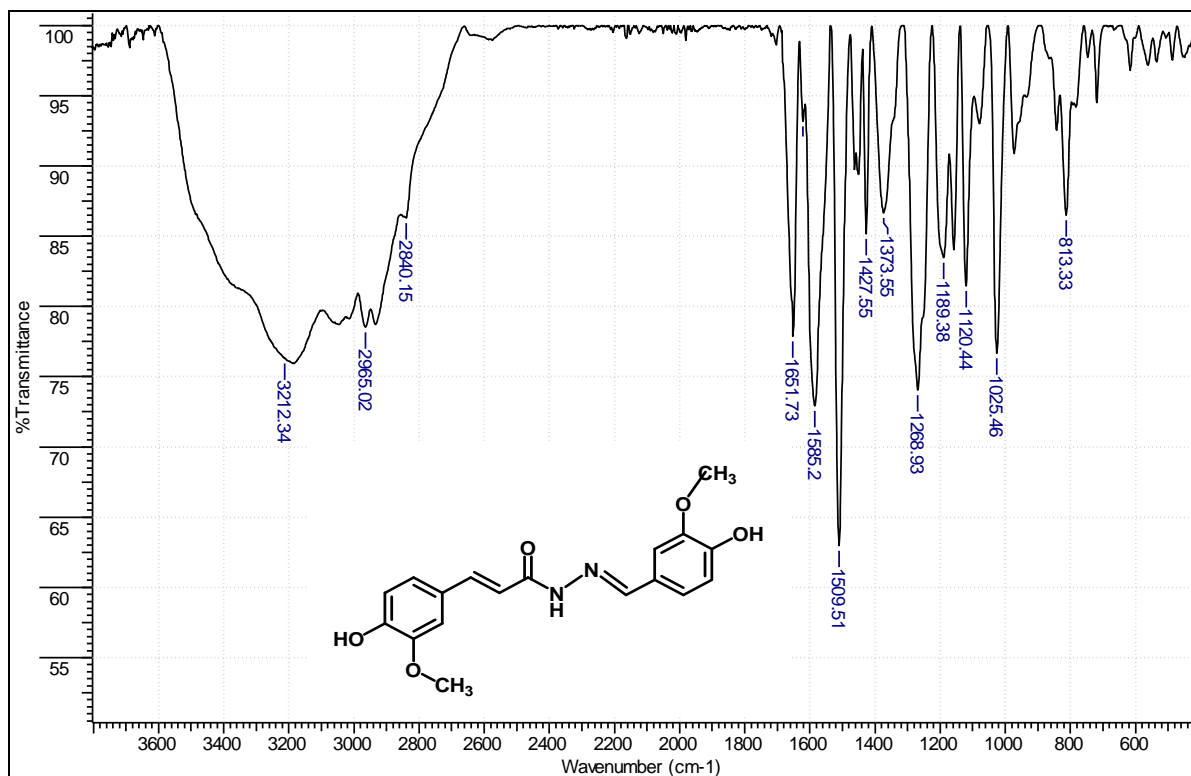


Figura 41 - Espectro na região do infravermelho da 2-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-164**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 42, pg 71), podemos observar os simpletos em  $\delta$  8,13 e  $\delta$  7,95 referente ao hidrogênio da ligação  $\text{N}=\text{CH}$  dos isômeros *E* e *Z*, respectivamente, ligação característica da acilidrazona, além dos dupletos em  $\delta$  7,51 ( $J=15,74$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,56 ( $J=15,65$  Hz, 1H) referentes aos H7 e H8 da  $\alpha$ - $\beta$  instauração, respectivamente. Também foi possível observar o simpleto em  $\delta$  3,82 referente aos hidrogênios do grupo metoxila do isômero *E* e os simpletos em  $\delta$  3,84 referente ao carbono C25 e em  $\delta$  3,85 referente ao carbono C23 das metoxilas do isômero *Z* e os demais sinais relativos aos hidrogênios aromáticos.



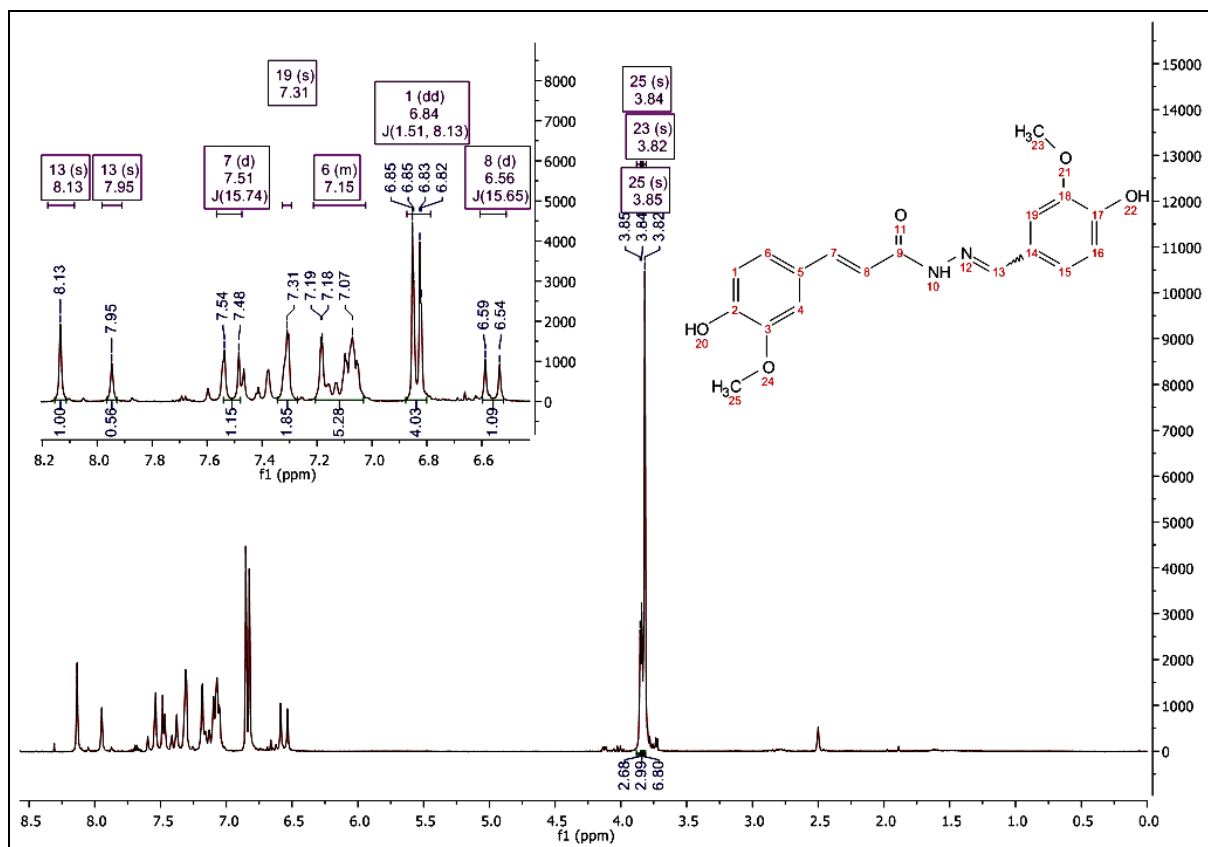


Figura 42 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da 2-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aciloidrazida (**PQM-164**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 43, pg 72) podemos observar todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura de **PQM-164**. O carbono carbonílico de acilidrazona foi identificado em  $\delta$  161,9 (isômero *E*) e  $\delta$  166,3 (isômero *Z*), além dos sinais em  $\delta$  140,7 e  $\delta$  117,1, referentes aos carbonos da C7 e C8 insaturação  $\alpha$ - $\beta$  carbonílica, respectivamente. Em  $\delta$  149,0; 148,8; 147,9 e 148,1 foram observados os sinais atribuídos aos carbonos C2, C3, C17 e C18, respectivamente, carbonos funcionalizados do sistema arilidrazônico. Também podemos observar o sinal em  $\delta$  146,8, relativo a C13 (*E*) e um sinal em  $\delta$  143,1 atribuído ao carbono C13 do isômero *Z*, carbono este que corrobora a obtenção da acilidrazona desejada.

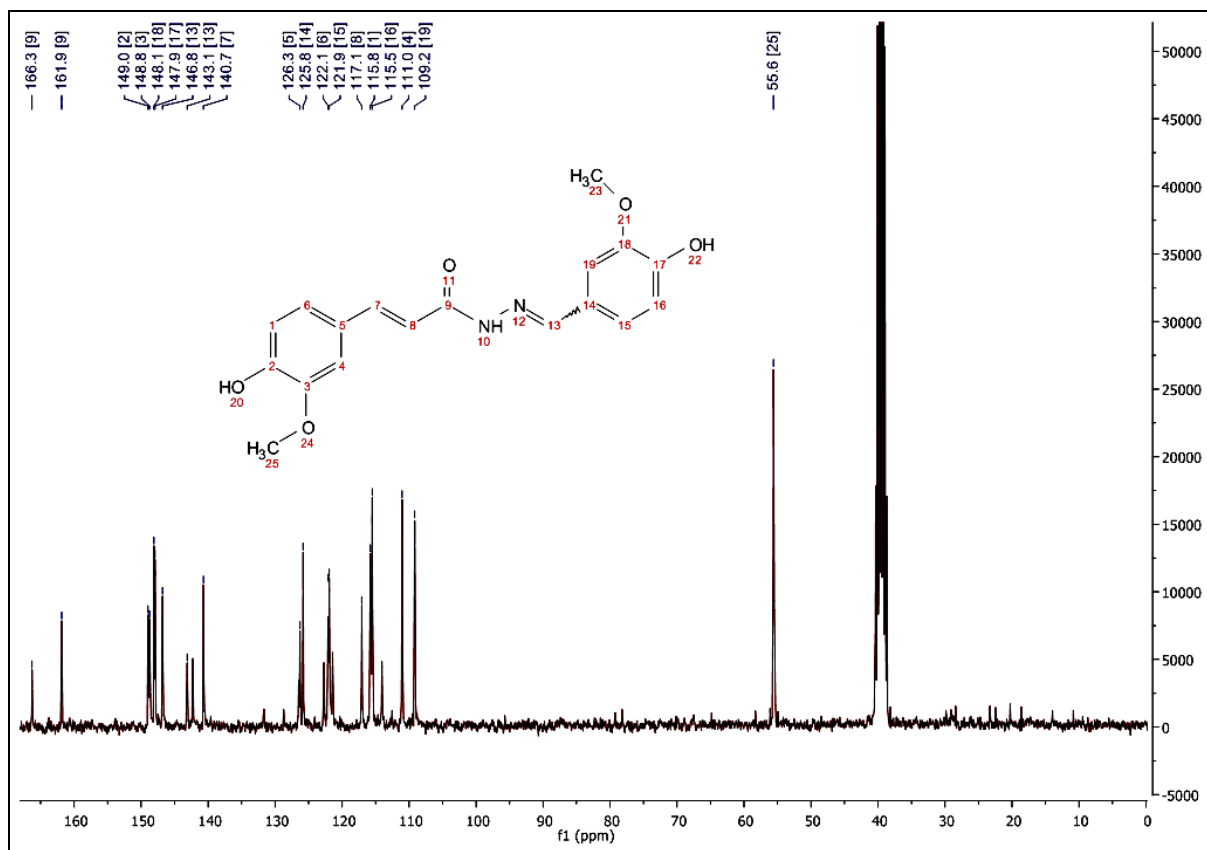


Figura 43 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da 2-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-164**).

Fonte: Do autor.

Mais uma vez os mapas de correlação HSQC (figura 44, pg 73) e HMBC (figura 45, pg 74) foram importantes na elucidação estrutural e a correta atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **PQM-164**. Diferentemente do caso anterior, a substância **PQM-164** não apresentou mudança no deslocamento químico de C8, como observado para **PQM-163**. Este fato pode ser decorrente dos substituintes do anel do sistema arilidrazônico estarem nos carbonos C17 e C18, estando C16 sem substituinte, diferente de **PQM-163** que possui seus substituintes nos carbonos C18 e C16, deste modo, **PQM-164** (*E*) pode posicionar a metoxilas do anel do sistema arilidrazônico distante de C8, não causando efeitos no deslocamento do mesmo.

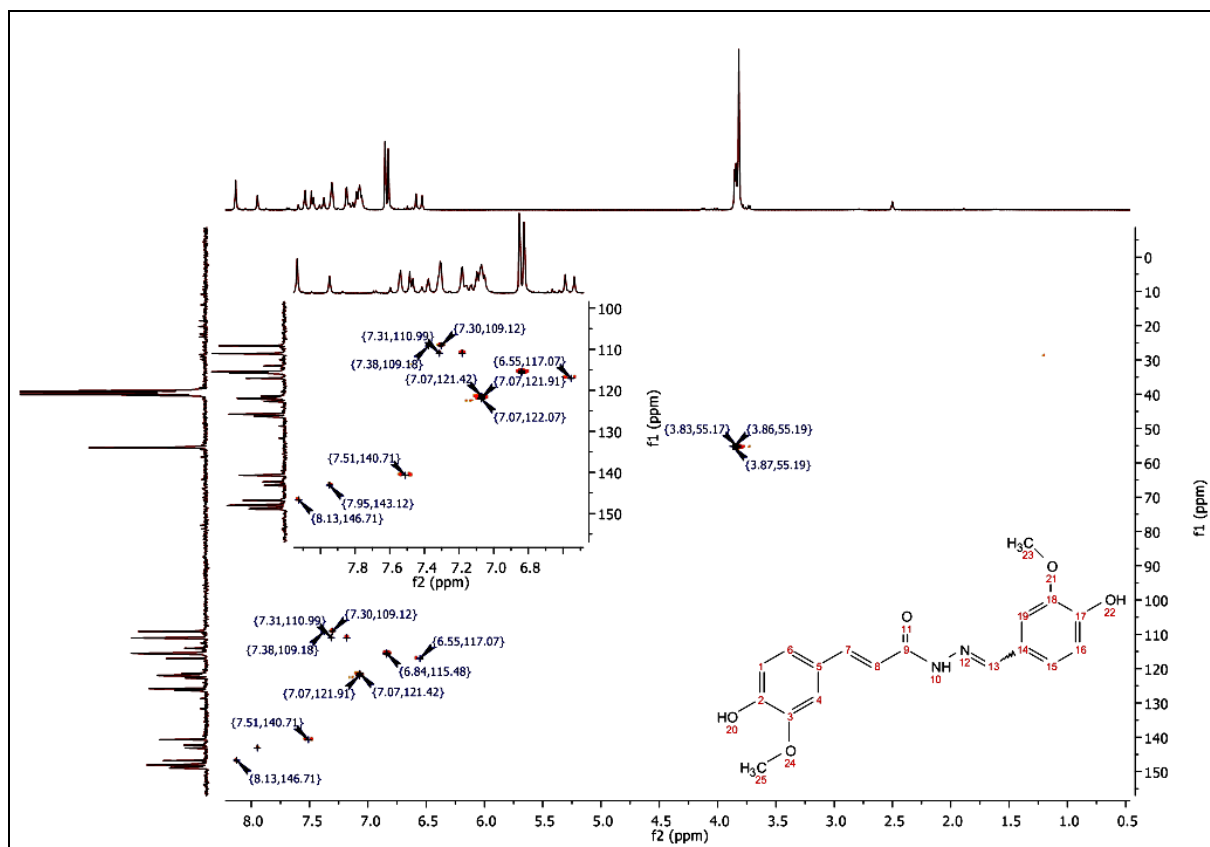


Figura 44 - Mapa de correlação HSQC (300MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidraziae (PQM-164).

Fonte: Do autor.

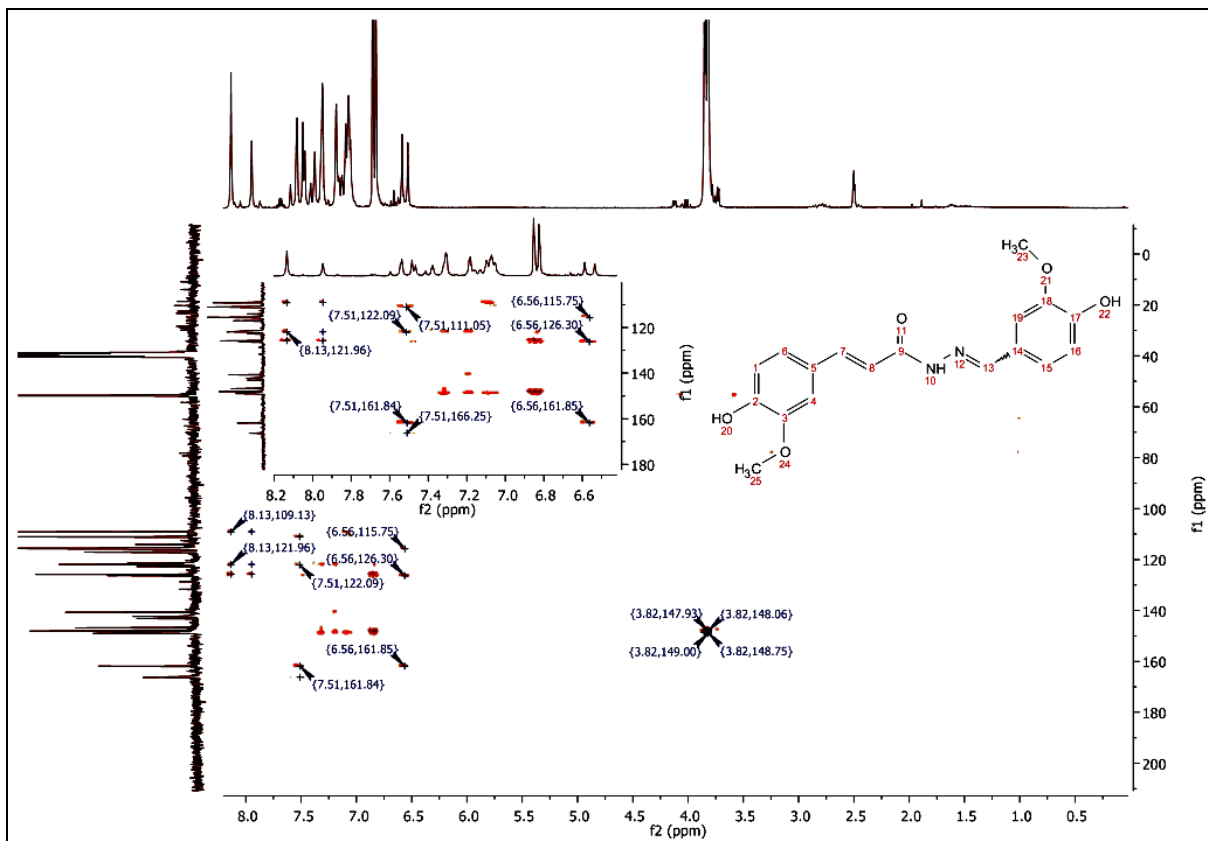


Figura 45 - Mapa de correlação HMBC (300MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de 2-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-164**).

Fonte: Do autor.

Tabela 6 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e de HMBC da 2-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilohidrazida (**PQM-164**).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	M	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC
1	8,84	dd	1,51; 8,13	115,8	--
2	--	--	--	149,0	--
3	--	--	--	148,8	--
4	7,31	s	--	111,0	--
5	--	--	--	126,3	--
6	7,15	m	--	122,1	--
7	7,51	d	15,74	140,7	C4, C6 e C9
8	6,56	d	15,65	117,1	C1, C5 e C9
9	--	--	--	161,9 ( <i>E</i> ); 166,3 ( <i>Z</i> )	--
10	--	--	--	--	--
11	--	--	--	--	--
12	--	--	--	--	--
13	8,13 ( <i>E</i> ); 7,95 ( <i>Z</i> )	s	--	143,1 ( <i>Z</i> ); 146,8( <i>E</i> )	C14, C15 e C19
14	--	--	--	125,8	--
15	7,15	m	--	121,9	--
16	8,84	dd	1,51; 8,13	115,5	--
17	--	--	--	147,9	--
18	--	--	--	148,1	--
19	7,31	s	--	109,2	--
20	--	--	--	--	--
21	--	--	--	--	--
22	--	--	--	--	--
23	3,82 ( <i>E</i> ); 3,84( <i>Z</i> )	s	--	55,6	C17 e C18
24	--	--	--	--	--
25	3,82 ( <i>E</i> ); 3,85( <i>Z</i> )	s	--	55,6	C2 e C3

Fonte: Do autor.

A elucidação da substância **PQM-164** foi confirmada pelos espectros na região do IV, RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e pelos mapas de correlação HMBC e HMQC.

### 5.1.7 Síntese da (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N-((E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida (PQM-165)

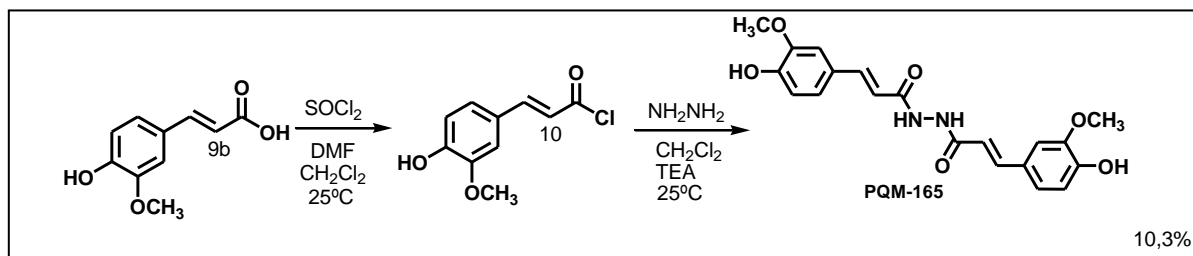


Figura 46 - Síntese da (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N-((E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida (**PQM-165**).

Fonte: Do autor.

Nas etapas de purificação dos compostos finais foi identificada a presença de um dímero, que dificultava a purificação via cromatografia em coluna. Este dímero foi confirmado por RMN, e sua estrutura caracterizada como **PQM-165**.

O espectro na região do IV (figura 47, pg 77) da substância **PQM-165** apresenta bandas de estiramento de N-H em  $3430\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de O-H em  $3016\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $sp^3$  em  $2968\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H de alkenos em  $2840\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de acilidrazona em  $1688\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em  $1590\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de C-H  $sp^3$  da metila em  $1430$  e  $1376\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1033\text{ cm}^{-1}$ .

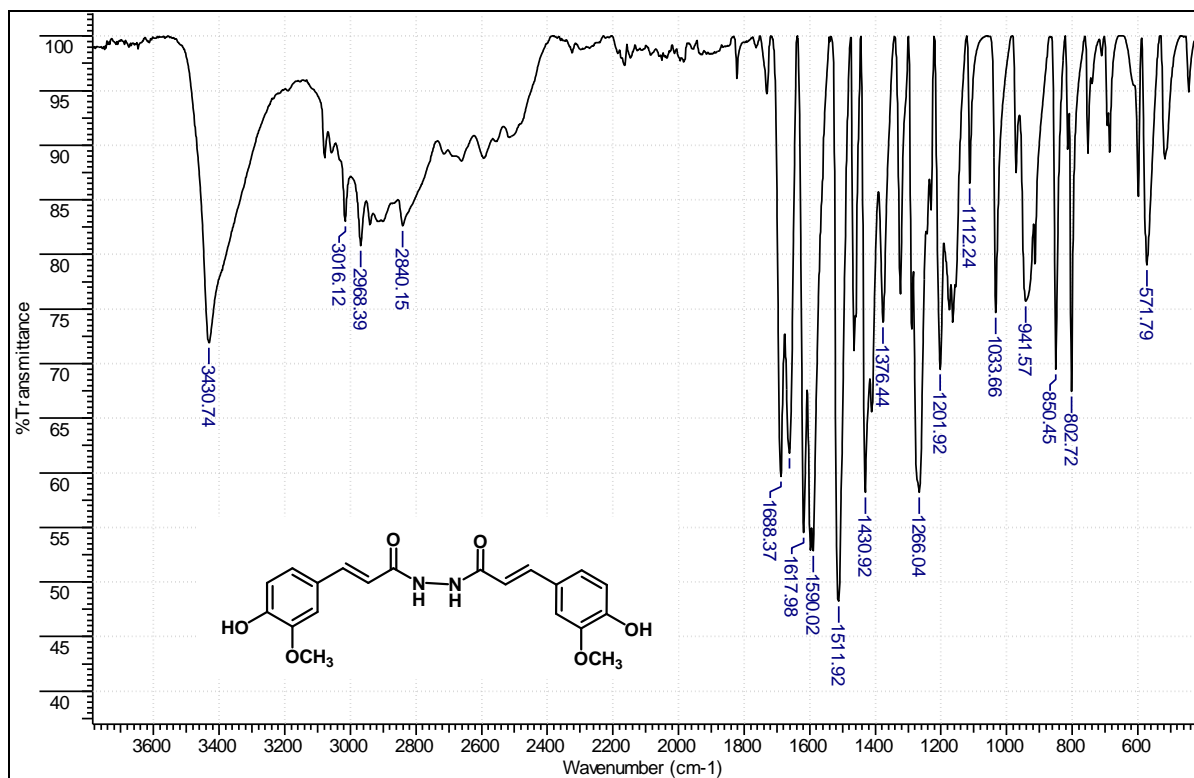


Figura 47 - Espectro no infravermelho da (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N-((E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida (**PQM-165**).

Fonte: Do autor.

### 5.1.8 Síntese de (2*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-*N*-((*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida (PQM-166)

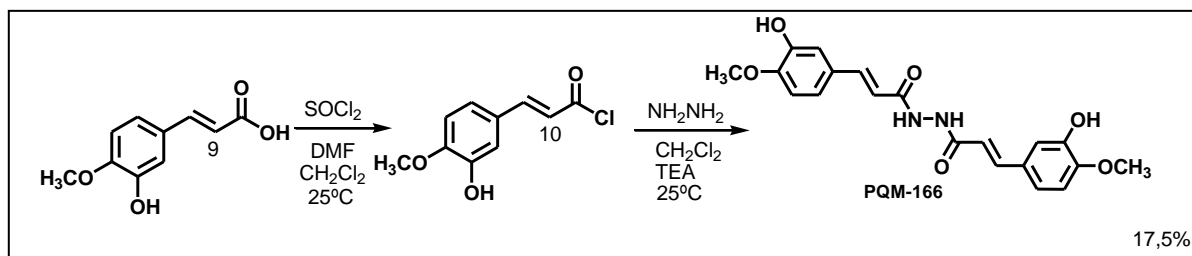


Figura 48 - Síntese da (2*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-*N*-((*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida (PQM-166).

Fonte: Do autor.

O espectro na região do IV (figura 49, pg 79) da substância **PQM-166** apresenta bandas de estiramento de O-H em  $2941\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de N-H em  $3396\text{ cm}^{-1}$ , deslocamento angular de N-H em  $1611\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $\text{sp}^3$  em  $2585\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de amida em  $1668\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-O em  $1023\text{ cm}^{-1}$ , deslocamento angular fora do plano de C-H de alenos em  $2844\text{ cm}^{-1}$  e dentre outras, apresenta as bandas referente ao deslocamento angular de C-H  $\text{sp}^3$  da metila em  $1441$  e  $1357\text{ cm}^{-1}$ .



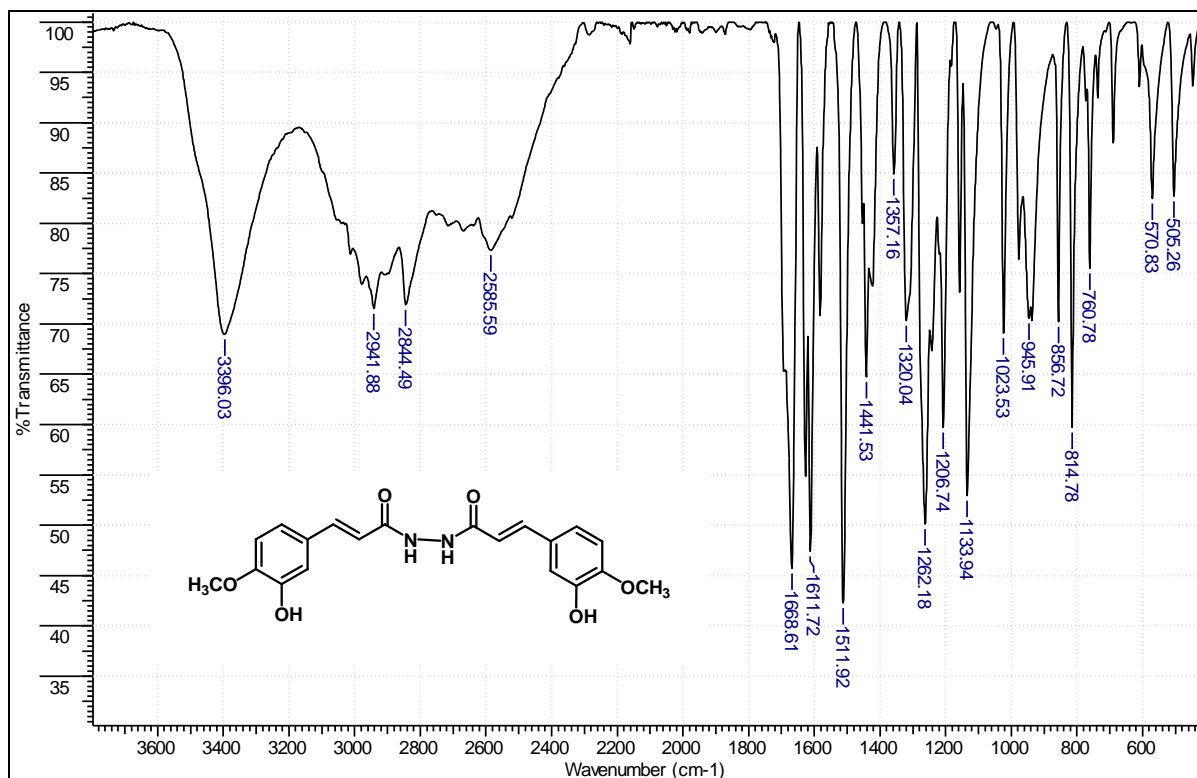


Figura 49 - Espectro na região do infravermelho de (2E)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-N-((E)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilóidrazida (**PQM-166**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 50, pg 80), podemos observar o simpleto em  $\delta$  3,78 referente ao hidrogênio da metila, além dos dupletos em  $\delta$  7,42 ( $J=15,91$  Hz, 2H) e  $\delta$  6,22 ( $J=15,93$  Hz, 2H) referentes aos hidrogênios, H7 e H18, e, H8 e H17, das  $\alpha$ - $\beta$  instaurações, respectivamente. Também foi possível observar o duplete em  $\delta$  6,92 ( $J=8,61$  Hz, 2H) referente aos hidrogênios aromáticos H1 e H24, os sinais em  $\delta$  7,05 referentes aos outros hidrogênios aromáticos.

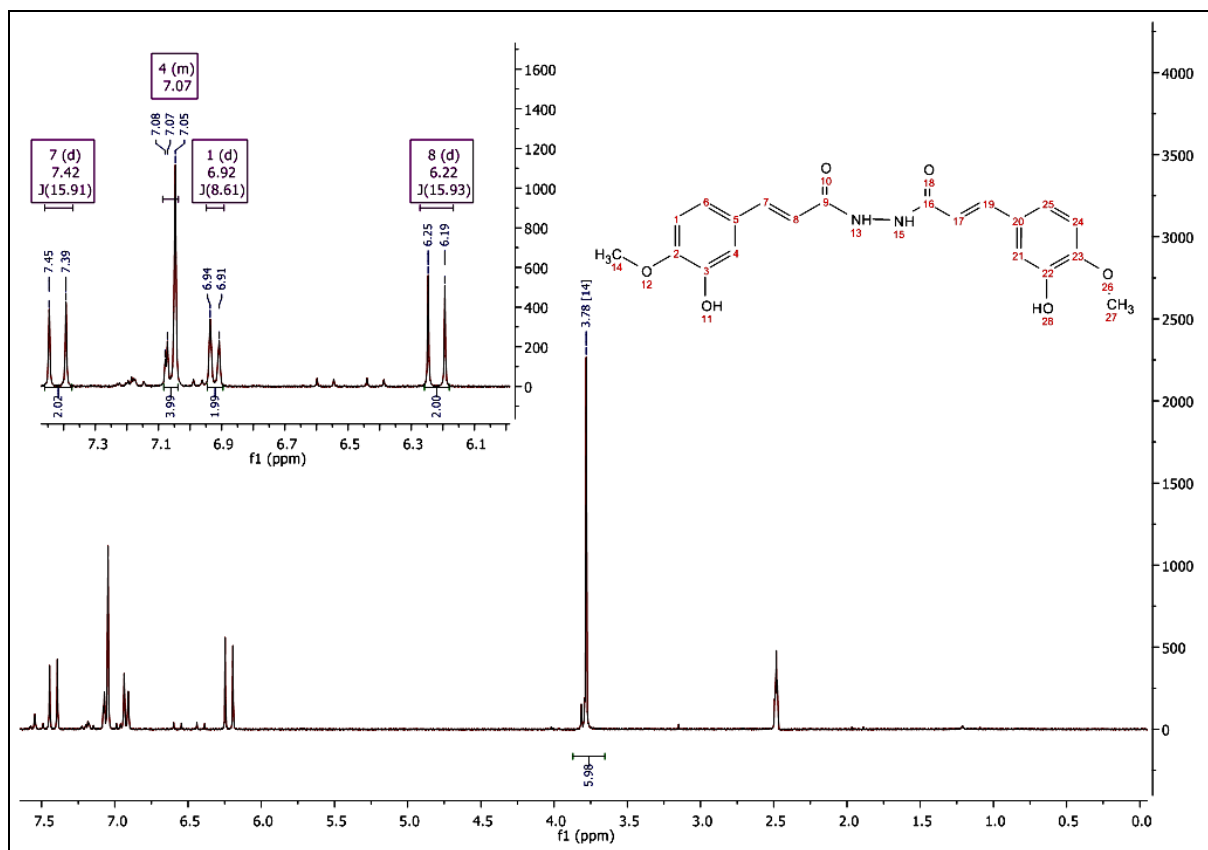


Figura 50 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) de (2*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-*N*-((*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilóidrazida (**PQM-166**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 51, pg 81) podemos observar todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura de **PQM-166**. Os sinais mais característicos são relativos aos carbonos carbonílicos de amida, identificados em  $\delta$  168,3, além dos sinais em  $\delta$  144,6 e  $\delta$  116,8, referentes aos carbonos, C7 e C18, e, C8 e C17, das insaturações  $\alpha$ - $\beta$  carbonílicas, respectivamente. Em  $\delta$  150,3 podemos observar o sinal referente aos carbonos aromáticos metoxilados C2 e C23 em  $\delta$  147,1, o sinal dos carbonos aromáticos hidroxilados C3 e C22 e em  $\delta$  56,1 o sinal dos carbonos metílicos C14 e C27.

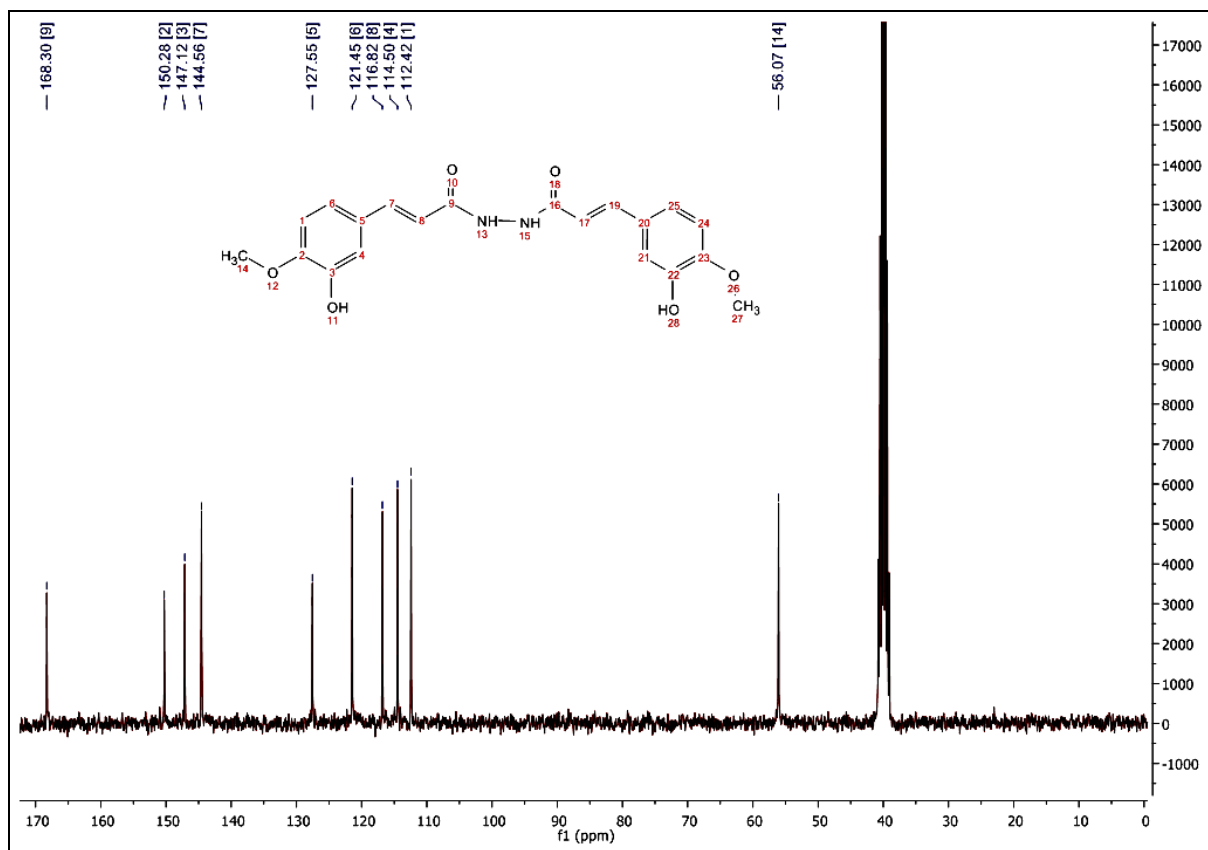


Figura 51 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de (2E)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-N-((E)-3-(3-hidróxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilóidrazida (PQM-166).

Fonte: Do autor.

Tabela 7 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e de HMBC da (2*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-*N*-((*E*)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilóil)acrilohidrazida (PQM-166).

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	M	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	6,92	d	8,61	112,4
2	--	--	--	150,3
3	--	--	--	147,1
4	7,07	m	--	114,5
5	--	--	--	127,6
6	7,07	m	--	121,5
7	7,42	d	15,91	144,6
8	6,22	d	15,93	116,8
9	--	--	--	168,3
10	--	--	--	--
11	--	--	--	--
12	--	--	--	--
13	--	--	--	--
14	3,78	s	--	56,1
15	--	--	--	--
16	--	--	--	168,3
17	6,22	d	15,93	116,8
18	--	--	--	--
19	7,42	d	15,91	144,6
20	--	--	--	127,6
21	7,07	m	--	114,5
22	--	--	--	147,1
23	--	--	--	150,3
24	6,92	d	8,61	112,4
25	7,07	m	--	121,5
26	--	--	--	--
27	3,78	s	--	56,1
28	--	--	--	--

Fonte: Do autor.

### 5.1.9 Síntese de 2-*N*-(4-metoxibenzil)-3-(3-hidróxi-4-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-167)

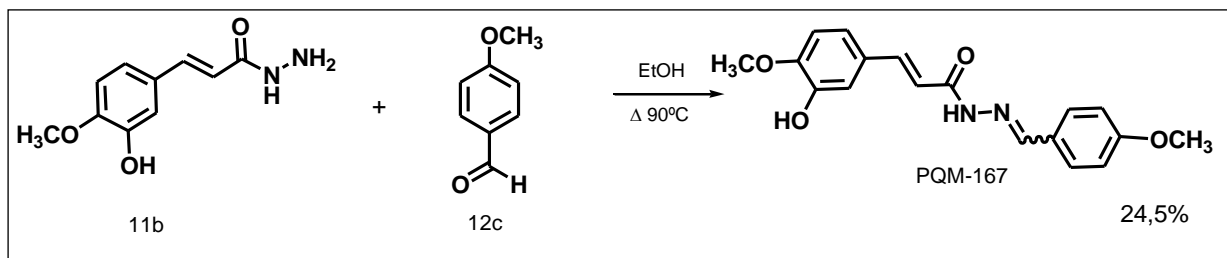


Figura 52 - Síntese 2-*N*-(4-metoxibenzil)-3-(3-hidróxi-4-metoxifenil)acriloidrazida (PQM-167).

Fonte: Do autor.

O espectro na região do IV (figura 53, pg 84) da substância **PQM-167** apresenta bandas de estiramento de N-H em  $3331\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de O-H em  $3196\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em  $2929\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H  $sp^3$  em  $2835\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de acilidrazona em  $1652\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=N em  $1599\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de N-H em  $1574\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de C-H  $sp^3$  da metila em  $1442\text{ cm}^{-1}$  e estiramento de C-O em  $1015\text{ cm}^{-1}$ .

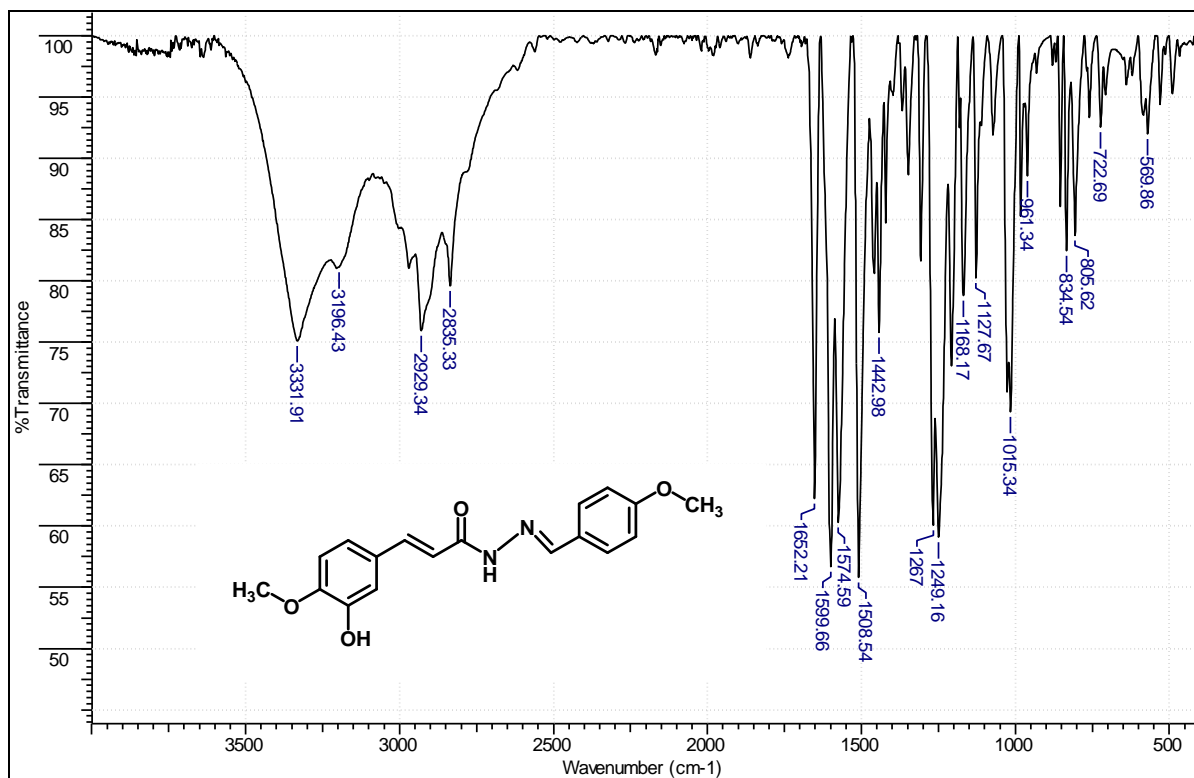


Figura 53 - Espectro na região do infravermelho da 2-N-(4-metoxibenzil)-3-(3-hidróxi-4-metoxifenil)acriloidrazida (**PQM-167**).

Fonte: Do autor.

## 5.2 TESTES BIOLÓGICOS

As oito substâncias sintetizadas (figura 20, pg 46) foram testadas para avaliar seus efeitos sobre a viabilidade celular de três diferentes linhagens derivadas de tumores humanos A549 (carcinoma de pulmão), MCF 7 (carcinoma de mama), e HT144 (melanoma), sendo que cinco deles ainda foram testadas para a linhagem HepG2 (carcinoma hepatocelular). Em uma triagem inicial, os compostos foram utilizados na concentração de 40  $\mu\text{M}$  por 48h. A partir desse ensaio preliminar, foi observado que as substâncias mais efetivas em reduzir a viabilidade das células tumorais foram as **PQM-162**, **PQM-163** e **PQM-164** (Figura 54, pg 86). Observou-se também que os compostos foram mais seletivos para as linhagens MCF 7, HT144 e A 549.

Na sequência, curvas dose-respostas foram feitas para avaliar o  $\text{IC}_{50}$  (*inhibitory concentration*), concentração efetiva em inibir 50% do crescimento, das substâncias **PQM-162** e **PQM-163** sobre as linhagens MCF 7 e HT144 (Figura 55, pg 87). Os resultados mostraram que os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram correspondentes a  $40,49 \pm 1,01$  e  $19,09 \pm 0,67$   $\mu\text{M}$ , respectivamente, para a linhagem MCF 7 (carcinoma de mama) após tratamento de 48h. Enquanto para a linhagem HT144 (melanoma), os valores de  $\text{IC}_{50}$  encontrados foram  $62,17 \pm 1,60$  e  $25,23 \pm 2,93$   $\mu\text{M}$ , respectivamente, após 48h de exposição aos compostos. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  determinados para a curcumina (**5**, figura 6, pg 26), após 48h de tratamento, foram  $47,32 \pm 2,33$  para a linhagem MCF 7 e  $42,76 \pm 3,79$   $\mu\text{M}$  para a linhagem HT144 (tabela 8, pg 87). Assim sendo, os resultados mostraram que a substância **PQM-163** foi mais efetiva que a curcumina em inibir a viabilidade das linhagens MCF 7 e HT144. O mesmo evento foi observado para a substância **PQM-162** frente a linhagem HT144.

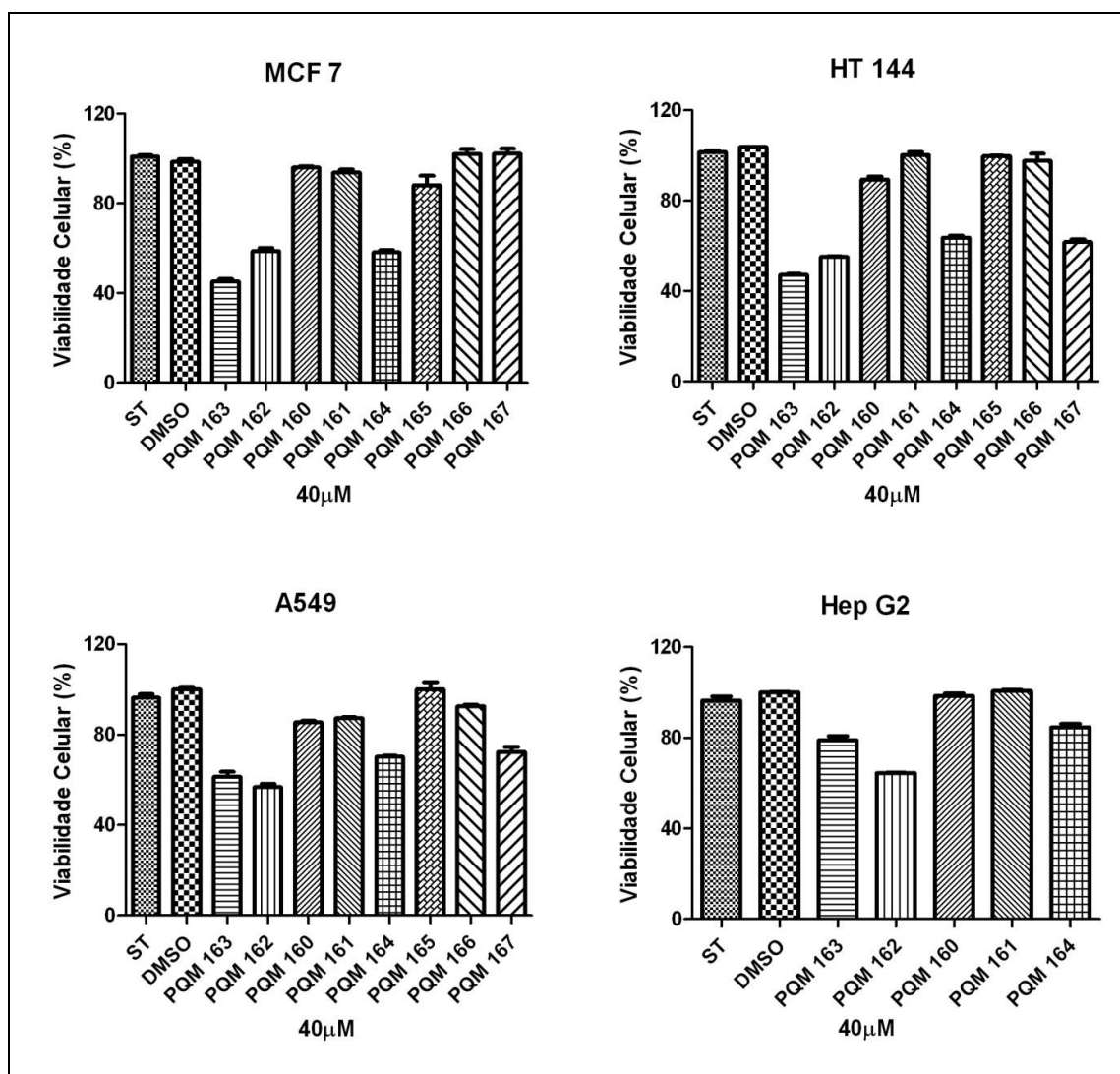


Figura 54 - Viabilidade celular determinada a partir dos ensaios de MTS para a triagem de substâncias potencialmente ativas, após 48h de tratamento com os diferentes compostos.

Fonte: Do Autor.

*Zhou et al.* (2011) demonstrou a efetividade da curcumina (**5**, figura 6, pg 26) em inibir a proliferação e induzir apoptose em células MCF 7 e encontrou um valor de  $IC_{50}$  correspondente a 40  $\mu$ M para a curcumina. *Han et al.* (2015) mostrou que o resveratrol (**7**) foi capaz de induzir apoptose em concentrações efetivas de 60,5  $\mu$ M por agir sobre proteína p53 ou p21 em células da linhagem MCF 7. *Hsieh et al.* (2011) demonstrou que derivados do resveratrol apresentando substituições das hidroxilas por metoxilas obtiveram efeito em inibir ciclo celular e induzir apoptose frente à células LNCaP (adenocarcinoma de próstata), efeito esse não observado no resveratrol. Esses eventos foram observados quando concentrações superiores a 25  $\mu$ M foram utilizadas.



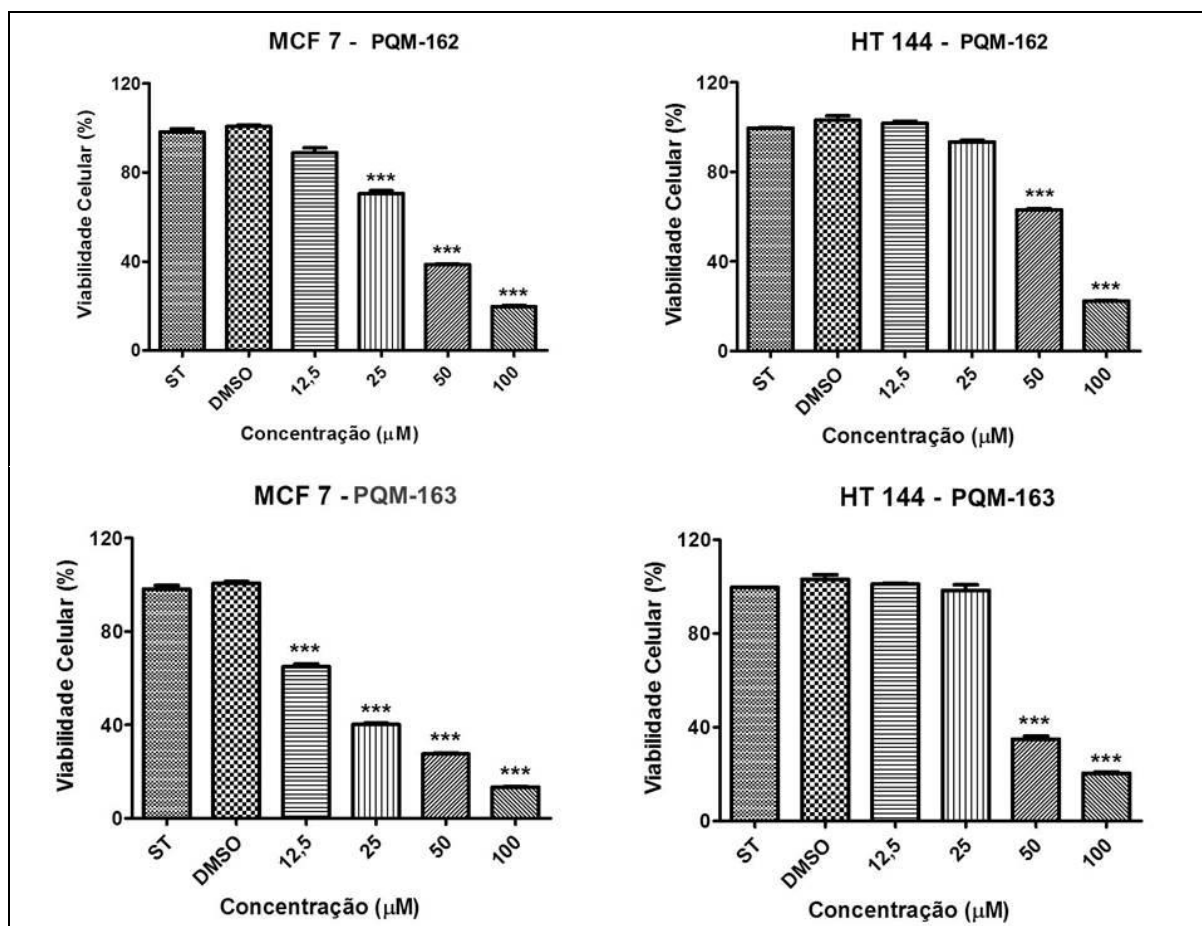


Figura 55 - Viabilidade celular determinada a partir dos ensaios de MTS em culturas de MCF 7 e HT144 tratadas por 48h com os compostos **PQM - 162** e **PQM - 163** em diferentes concentrações.

Fonte: Do Autor.

Tabela 8 - Valores de  $IC_{50}$  determinados a partir dos dados obtidos por MTS.

	$IC_{50}$ (µM)	
	MCF 7	HT 144
PQM-163	<b>19,09 ± 0,67</b>	<b>25,23 ± 2,93</b>
PQM-162	<b>40,49 ± 1,01</b>	62,17 ± 1,60
Curcumina	47,32 ± 2,33	42,76 ± 3,79

Fonte: Do autor.

Os valores de  $IC_{50}$  abaixo daqueles encontrados para o controle positivo estão em negrito

Considerado os dados preliminares relacionados à atividade das substâncias **PQM-162** e **PQM-163** sobre a linhagem MCF 7, ensaios subsequentes foram realizados para se a redução na viabilidade foi decorrente de bloqueio no ciclo celular e/ou atividade citotóxica dos compostos estudados. Os dados mostraram que nas concentrações utilizadas ( $IC_{50}$  e  $IC_{50}/2$ ) o composto **PQM-163** induziu bloqueio

em G2/M, um efeito também observado para o composto **PQM-162**, entretanto este último também foi efetivo em induzir morte celular, pois houve um aumento significativo na população SubG1 (figura 56, pg 89 e tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular determinados por citometria de fluxo em culturas de células MCF 7 tratadas por 24h com as substâncias **PQM-162** e **PQM-163**.

	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>	<b>SubG1</b>
<b>Controle</b>	52,85 ± 0,93	24,36 ± 0,45	20,27 ± 0,70	0,75 ± 0,30
<b>PQM-162</b>				
<b>20 µM</b>	51,00 ± 2,21	14,20 ± 0,82 <sup>***</sup>	30,71 ± 0,96 <sup>***</sup>	4,41 ± 0,19 <sup>***</sup>
<b>40 µM</b>	21,25 ± 0,67 <sup>***</sup>	14,39 ± 0,80 <sup>***</sup>	53,97 ± 1,67 <sup>***</sup>	10,37 ± 0,47 <sup>***</sup>
<b>PQM-163</b>				
<b>10 µM</b>	50,55 ± 0,46	20,31 ± 0,41 <sup>***</sup>	28,36 ± 0,09 <sup>***</sup>	1,61 ± 0,12*
<b>20 µM</b>	50,49 ± 0,94	20,00 ± 0,47 <sup>***</sup>	28,12 ± 1,17 <sup>***</sup>	1,61 ± 0,12*

Fonte: Do autor.

Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA e pós-teste de Dunnet usando GraphPad Prism®. \*p<0,01 e \*\*\*p<0,0001. 5000 células foram analisadas em cada amostra.

As substâncias **PQM-162** e **PQM-163** apresentam padrão molecular semelhante e, portanto, foram selecionadas para avaliação sobre a progressão do ciclo celular. Os dados mostraram que ambas as substâncias interferem na progressão do ciclo celular em um ponto específico (G2/M), após tratamento de 24h. A substância **PQM-163** por 24h nas concentrações de 10 µM e 20 µM apresentaram uma menor frequência de células na fase S com concomitante aumento na população G2/M. As culturas tratadas com a substância **PQM-162** nas concentrações de 20 µM e 40 µM apresentaram o mesmo perfil de inibição, contudo também foi observado aumento significativo na frequência de morte celular nas concentrações analisadas indicando, portanto, não apenas uma atividade antiproliferativa, mas também um perfil citotóxico (figura 56, pg 89).

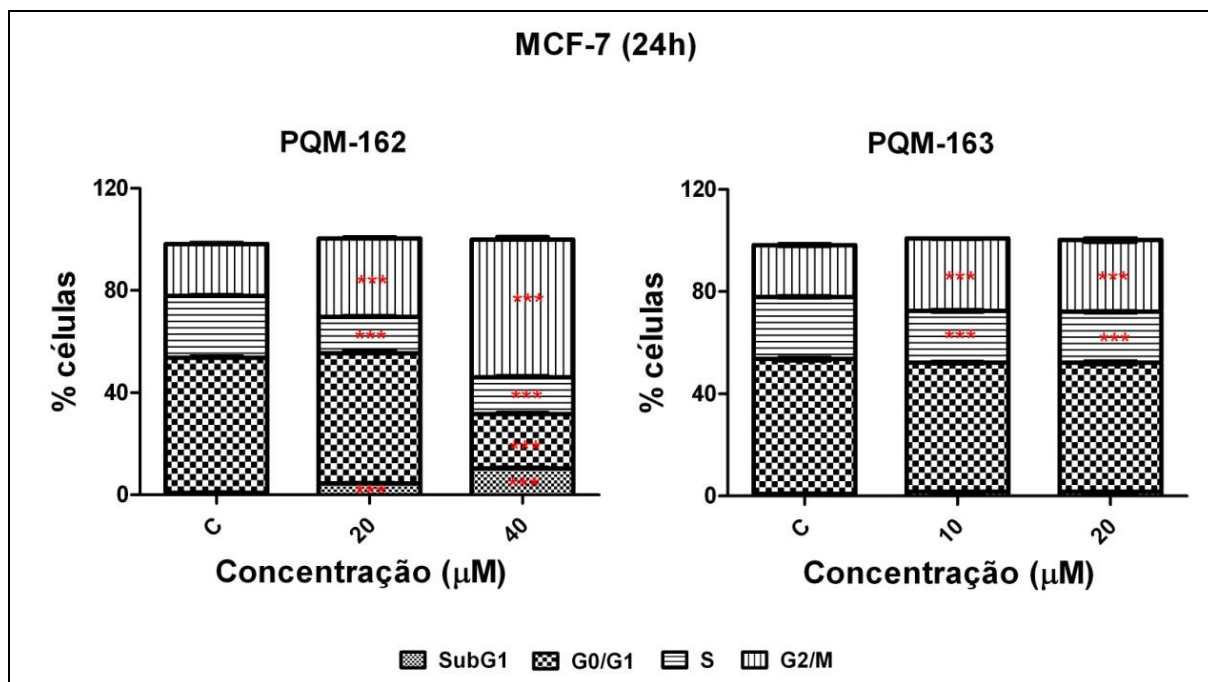


Figura 56 - Análise da Progressão do ciclo celular realizada por Citometria de fluxo em células MCF 7 das substâncias **PQM-162** e **PQM-163**. Diferenças significativas em relação controle foram determinadas por ANOVA e pós-teste de Dunnet. \*\*\* ( $p < 0.0001$ )

Fonte: Do Autor.

Mais estudos estão sendo realizados para esclarecer os mecanismos envolvidos com atividade dos compostos sobre a progressão do ciclo celular, entretanto, compostos que inibem a progressão do ciclo e induzem morte celular são promissores agentes antitumorais (LEITÃO et al., 2005). Além disso, estudos do perfil de citotoxicidade sobre células normais estão sendo realizados.

## 6 CONCLUSÕES

Numa abordagem de construção de análogos da curcumina (**5**, figura 6, pg 26) e derivados híbridos curcumina-resveratrol, foram sintetizadas oito substâncias **PQM-160-167**. A atividade antiproliferativa das substâncias **PQM-160, PQM-161, PQM-162, PQM-163, PQM-164, PQM-165, PQM-166** e **PQM-167** foram avaliadas inicialmente na viabilidade celular por ensaio colorimétrico MTS (40  $\mu\text{M}$ ) frente às linhagens celulares MCF 7, HT144, e A549. As substâncias **PQM-160, PQM-161, PQM-162, PQM-163** e **PQM-164** também foram avaliadas frente à Hep G2. As substâncias **PQM-162, PQM-163** e **PQM-164** demonstraram atividade significativa da contra as linhagens MCF 7 (carcinoma de mama) e HT 144 (melanoma), sendo **PQM-162** ( $\text{IC}_{50} = 40,49 \pm 1,01 \mu\text{M}$ ) mais ativa que a curcumina (**5**, figura 6, pg 26) frente à MCF 7, enquanto que **PQM-163** destacou-se como a mais ativa da série, com  $\text{IC}_{50} = 19,09 \pm 0,67 \mu\text{M}$  para MCF 7 e  $\text{IC}_{50} = 25,23 \pm 2,93 \mu\text{M}$  para HT 144, superando a curcumina (**5**, figura 6, pg 26,  $\text{IC}_{50} = 47,32 \pm 2,33 \mu\text{M}$  para MCF 7 e  $\text{IC}_{50} = 42,76 \pm 3,79 \mu\text{M}$  para HT 144).

Adicionalmente, **PQM-162** e **PQM-163** foram submetidas à análise de progressão de ciclo celular em MCF 7 em concentrações próximas aos respectivos  $\text{IC}_{50}$ , evidenciando que **PQM-163** (40  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de inibir o ciclo celular, enquanto que **PQM-162** (10 e 20  $\mu\text{M}$ ), não apresentou ação sobre o ciclo celular.

Os resultados obtidos evidenciaram também que a alteração da natureza dos substituintes hidroxila presentes no resveratrol (**7**) por grupos metoxila nas estruturas de **PQM-162** e **PQM-163**, levaram a um incremento em potência e seletividade antiproliferativa. Estas duas substâncias inéditas, com padrão molecular híbrido curcumina-resveratrol, podem representar uma inovação-no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais, além de fácil obtenção sintética.

## 7 PERSPECTIVAS

Este trabalho ainda tem como metas:

- a) Conclusão da caracterização das substâncias sintetizadas por RMN e HRMS;
- b) Dar continuidade nos testes biológicos com a substância **PQM-164** que também mostrou promissora atividade no teste inicial de viabilidade celular (figura 55, pg 87).
- c) Investigação dos possíveis mecanismos moleculares relacionados a atividade das substâncias promissoras sobre as linhagens MCF 7 (carcinoma de mama) e HT144 (melanoma).

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B. *et al.* Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor- $\kappa$ B pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 20, p. 7490–7498, 2005.

AGGARWAL, B. B. *et al.* Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*, v. 24, n. 5A, p. 2783–840, 2004.

AMERICAN CANCER SOCIETY STAFF. Chemotherapy Drugs : How They Work. p. 1–16, 2015.

AMES, B. N.; GOLD, L. S. Too Many Rodent Carcinogens: Mitogenesis Increases Mutagenesis. *Science*, v. 249, n. 4, p. 970–971, 1990.

AMIN, A. R. M. R. *et al.* Curcumin Induces Apoptosis of Upper Aerodigestive Tract Cancer Cells by Targeting Multiple Pathways. *Plos One*, v. 10, n. 4, p. e0124218, 2015.

ANAND, P. *et al.* Bioavailability of Curcumin : Problems and Promises. v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.

ARNOTT, C. H. *et al.* Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway. *Oncogene*, v. 21, n. 31, p. 4728–38, 2002.

ASGHAR, U. *et al.* The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 2, p. 130–146, 30 jan. 2015.

ATHAR, M. *et al.* Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 486, n. 2, p. 95–102, jun. 2009.

BARREIRO, E. J. *et al.* A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. *Quimica Nova*, v. 25, n. 1, p. 129–148, 2002.

BATES, S.; PETERS, G. Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Seminars in cancer biology*, v. 6, n. 2, p. 73–82, 1995.

BELKACEMI, A. *et al.* Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, n. November, p. e34, 4 nov. 2011.

BELLINA, F. *et al.* Imidazole analogues of resveratrol: synthesis and cancer cell growth evaluation. *Tetrahedron*, v. 71, n. 15, p. 2298–2305, 2015.

BENITEZ, D. A. *et al.* Mechanisms Involved in Resveratrol-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer – Derived Cell Lines. v. 28, n. 2, p. 2006–2007, 2007.

CAI, Y. J. *et al.* Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1637, n. 1, p. 31–38, 2003.

CAMPOS, H. C. *et al.* The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders I : Parkinson ' s Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 10, p. 239–250, 2011.

CAO, H. *et al.* Density functional theory calculations for resveratrol. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 13, n. 11, p. 1869–1871, 2003.

CASTELLO, A. *et al.* Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell*, v. 149, n. 6, p. 1393–1406, 2012.

CHAO, W. *et al.* Effects of resveratrol on cell growth and prolactin synthesis in GH3 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 7, n. 4, p. 923–928, 2014.

CHATURVEDI, M. *et al.* NF-kappaB addiction and its role in cancer:“one size does not fit all”. *Oncogene*, v. 30, n. 14, p. 1615–1630, 2010.

CHEN, Q.-H. Curcumin-based anti-prostate cancer agents. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, v. 15, n. 2, p. 138–156, 2015.

CHOUDHURI, T. *et al.* Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. v. 512, p. 334–340, 2002.

CLÉMENT, M. V *et al.* Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, v. 92, n. 3, p. 996–1002, 1998.

DEGUCHI, A. Curcumin targets in inflammation and cancer. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, p. 88–96, 2015.

DEY, A.; TERGAONKAR, V.; LANE, D. P. Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 7, n. 12, p. 1031–1040, 2008.

DHANDAPANI, K. M.; MAHESH, V. B.; BRANN, D. W. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkB transcription factors. *Journal of Neurochemistry*, v. 102, n. 2, p. 522–538, 2007.

DU, J.; TANG, X. L. Natural products against cancer: a comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. *Journal of cancer research and therapeutics*, v. 10 Suppl 1, n. 1, p. 27–37, 2014.

DURONIO, R. J.; XIONG, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 5, n. 3, p. 1–12, 2013.

EFERL, R.; WAGNER, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 11, p. 859–868, 2003.

GALLIFORD, C. V.; SCHEIDT, K. A. Pyrrolidinyli-Spirooxindole Natural Products as Inspirations for the Development of Potential Therapeutic Agents. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 46, n. 46, p. 8748–8758, 2007.

GERMANO, D. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 12, p. 3087, 2014.

GHOSH, A. *et al.* Telomerase directly regulates NF-kB-dependent transcription. *Nature cell biology*, v. 14, n. 12, p. 1270–81, 2012.

GOGA, A. *et al.* Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nature medicine*, v. 13, n. 7, p. 820–827, 2007.



HAN, G. *et al.* Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug discoveries & therapeutics*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2015.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HENDERSON, I. C. Improved Outcomes From Adding Sequential Paclitaxel but Not From Escalating Doxorubicin Dose in an Adjuvant Chemotherapy Regimen for Patients With Node-Positive Primary Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, n. 6, p. 976–983, 2003.

HSIEH, T.; HUANG, Y.; WU, J. M. Control of prostate cell growth, DNA damage and repair and gene expression by resveratrol analogues, in vitro. *Carcinogenesis*, discutir resultado das moléculas., v. 32, n. 1, p. 93–101, 2011.

IGURA, K. *et al.* Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Letters*, v. 171, n. 1, p. 11–16, 2001.

IONTA, M. *et al.* 7-Epiclusianone, a Benzophenone Extracted from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae), Induces Cell Cycle Arrest in G1/S Transition in A549 Cells. *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 12804–12816, 2015.

IRESON, C. R. *et al.* Metabolism of the Cancer Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Intestine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 11, n. January, p. 105–111, 2002.

JANG, M. *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, v. 275, n. 5297, p. 218–220, 1997.

JEE, S. H. *et al.* Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells. *The Journal of investigative dermatology*, v. 111, n. 4, p. 656–661, 1998.

KUNDU, J. K. *et al.* Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF- $\kappa$ B in mouse skin by blocking I $\kappa$ B kinase activity. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 7, p. 1465–1474, 2006.

KUNDU, J. K.; SHIN, Y. K.; SURH, Y. J. Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF- $\kappa$ B and AP-1 as prime targets. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, n. 11, p. 1506–1515, 2006.

LEE, G. E. *et al.* DNA methyltransferase 1-associated protein (DMP1) is a co-repressor that stimulates DNA methylation globally and locally at sites of double strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 48, p. 37630–37640, 2010.

LEE, S. C.; TAN, H. T.; CHUNG, M. C. M. Prognostic biomarkers for prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma: current status and future prospects. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 12, p. 3112–24, 2014.

LEITÃO, V. L. DE A. *et al.* CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. *Quimica Nova*, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

LI, J.; LEE, I. W.; *et al.* Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 94, p. 322–332, ago. 2015.

LI, J.; SHIN, G. H.; *et al.* Modified curcumin with hyaluronic acid: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge. *Food Research International*, v. 69, p. 202–208, 2015.

LOPEZ-BERGAMI, P.; LAU, E.; RONAI, Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 1, p. 65–76, jan. 2010.

LOW, K. C.; TERGAONKAR, V. Telomerase: Central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 38, n. 9, p. 426–434, 2013.

LUNDBERG, A. S. *et al.* Genes involved in senescence and immortalization. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 12, n. Figure 1, p. 705–709, 2000.

MATESANZ, R. *et al.* Taxanes with high potency inducing tubulin assembly overcome tumoural cell resistances. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 22, n. 18, p. 5078–90, 2014.

MATSUOKA, A. *et al.* The 4'-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 521, n. 1-2, p. 29–35, 2002.

MCGROGAN, B. T. *et al.* Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1785, n. 2, p. 96–132, 2008.

MUKHOPADHYAY, A. *et al.* Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*, v. 21, n. 57, p. 8852–61, 2002.

NEVES, R. *et al.* Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 11, p. 1663–1681, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, v. 70, n. 3, p. 461–77, 2007.

NISHINO M *et al.* State of the art: Response assessment in lung. *Radiology*, v. 271, n. 1, p. 6–27, 2014.

OHGUCHI, K. *et al.* Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 307, n. 4, p. 861–863, 2003.

PARK, W. *et al.* New perspectives of curcumin in cancer prevention. *Cancer Prevention Research*, v. 6, n. 5, p. 387–400, 2013.

PEREIRA, R. M. *et al.* Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. *Toxicology in Vitro*, v. 31, p. 86–92, 2016.

PERRIM, D. D.; ARMARENGO, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. 3. ed. [S.l.]: Pergamon Press, 1988.

RODRIGUES, D. A. *et al.* Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, p. acs.jmedchem.5b01525, 2015.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases : a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases : a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, v. 68, n. 2, p. 320–344, 2004.

SADIKOVIC, B. *et al.* Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Current genomics*, v. 9, n. 6, p. 394–408, 2008.

SALES, L. *et al.* Anticancer activity of 7-epiclusianone, a benzophenone from *Garcinia brasiliensis*, in glioblastoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, n. 1, p. 393, 2015.

SANDULACHE, V. C. *et al.* Glycolytic Inhibition Alters Anaplastic Thyroid Carcinoma Tumor Metabolism and Improves Response to Conventional Chemotherapy and Radiation. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 11, n. 6, p. 1373–1380, 2012.

SARACCI, R.; WILD, C. P. *THE FIRST 50 YEARS*. 1. ed. Lyon: World Health Organization - WHO, 2015.

SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. *Faseb J*, v. 9, n. 9, p. 726–735, 1995.

SETHI, G.; TERGAONKAR, V. Potential pharmacological control of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 30, n. 6, p. 313–321, 2009.

SHANMUGAM, M. *et al.* *The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment*. [S.l: s.n.], 2015. v. 20.

SHEHZAD, A.; LEE, J.; LEE, Y. S. Curcumin in various cancers. *BioFactors*, v. 39, n. 1, p. 56–68, 2013.

SHEHZAD, A.; REHMAN, G.; LEE, Y. S. Curcumin in inflammatory diseases. *BioFactors*, v. 39, n. 1, p. 69–77, 2013.

SHEN, H.-M.; TERGAONKAR, V. NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, v. 14, n. 4, p. 348–363, 2009.

SHIH, A. *et al.* Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 87, n. 3, p. 1223–1232, 2002.

SHISHODIA, S. *et al.* Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochemical Pharmacology*, v. 70, n. 5, p. 700–713, 2005.

SHISHODIA, S.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Role of Curcumin in Cancer Therapy. *Current Problems in Cancer*, v. 31, n. 4, p. 243–305, 2007.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, primeiro paragrafo, v. 65, n. 1, p. 5–29, 2015.

SILVA, G. S. *et al.* Effects of novel acylhydrazones derived from 4-quinolone on the acetylcholinesterase activity and A  $\beta$  42 peptide fibrils formation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 6366, n. March, p. 1–7, 2016.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 10, n. 3, p. 511–546, 2008.

TROSKO, J. E. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 1, p. 43–48, 2003.

VAN VUUREN, R. J. *et al.* Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 76, n. 6, p. 1101–1112, 2015.

VIEGAS, C. *et al.* New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 5, n. 10, p. 915–926, 2005.

WENDER, P. A; MILLER, B. L. Synthesis at the molecular frontier. *Nature*, v. 460, n. 7252, p. 197–201, 2009.

WHO. *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acesso em: 17 jul. 2015.

WHO. *International Agency for Research on Cancer*. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acesso em: 17 jul. 2015.

WOO, M.-S. *et al.* Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 335, n. 4, p. 1017–25, 2005.

WU, J. *et al.* Anti-Lung Cancer Activity of the Curcumin Analog JZ534 In Vitro. *BioMed Research International*, v. 1, p. 1–10, 2015.

XU, Q. *et al.* Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1348, n. 1, p. 10–19, 2015.

YANG, M. H. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as anti-cancer agents. *Life Sciences*, v. 100, n. 2, p. 75–84, 2014.

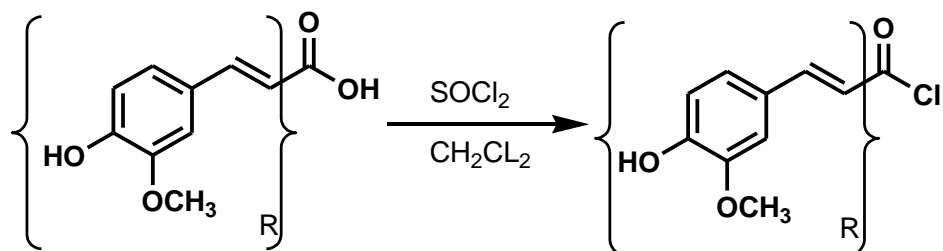
ZANIN, J. L. B. *et al.* Caesalpinioflavone, a new cytotoxic biflavonoid isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 4, p. 804–809, 2015.

ZHOU, Q. *et al.* Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells in vitro and in vivo. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 32, n. 11, p. 1402–1410, 2011.

## APÊNDICES

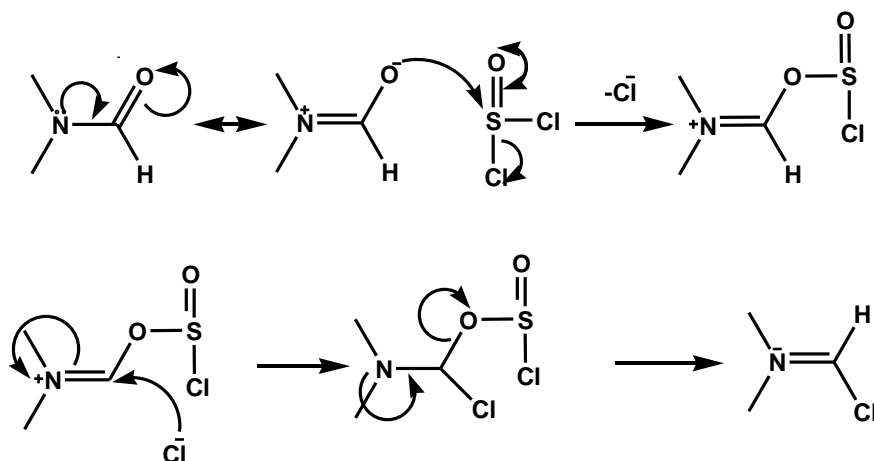
### APÊNDICE A - PROPOSTAS DE MECANISMO DE REAÇÃO

#### 1. Formação do Cloreto de acila (10).



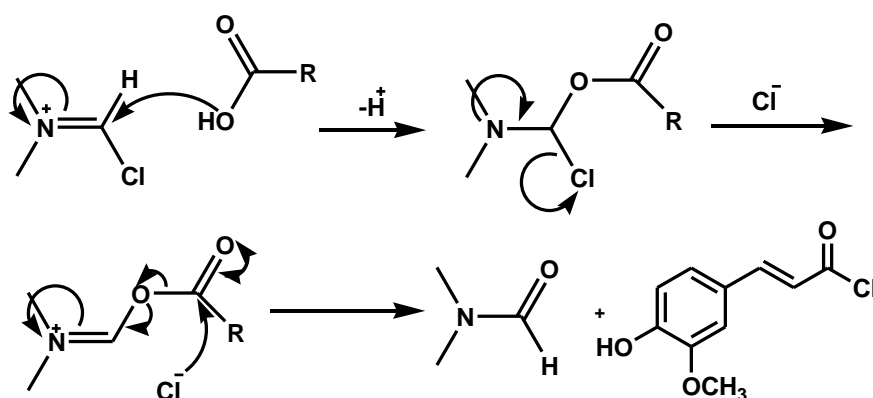
Fonte: Do Autor.

#### Etapa I



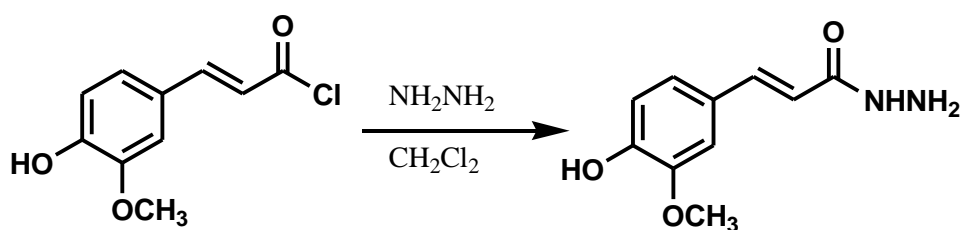
Fonte: Do Autor.

## Etapa II

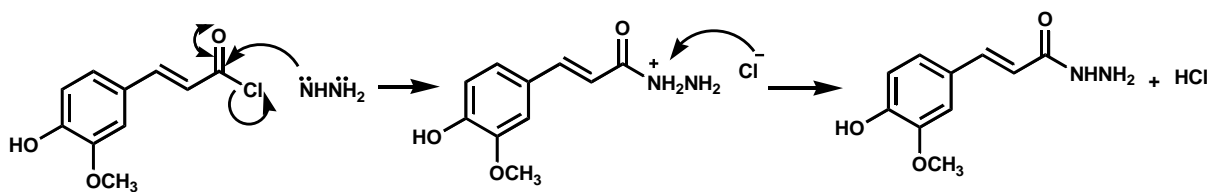


Fonte: Do Autor.

## 2. Formação da hidrazida intermediária (11)



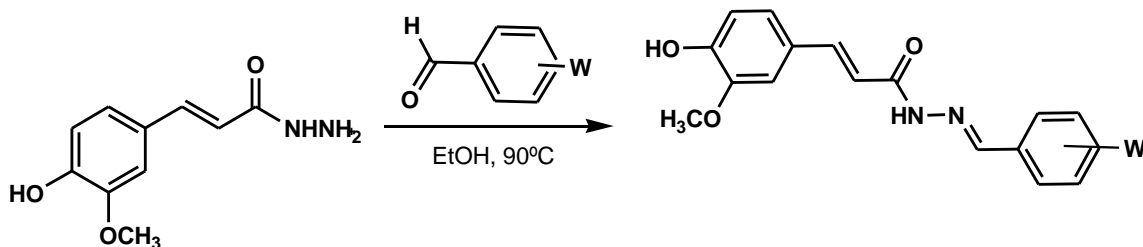
Fonte: Do Autor.



Fonte: Do Autor.

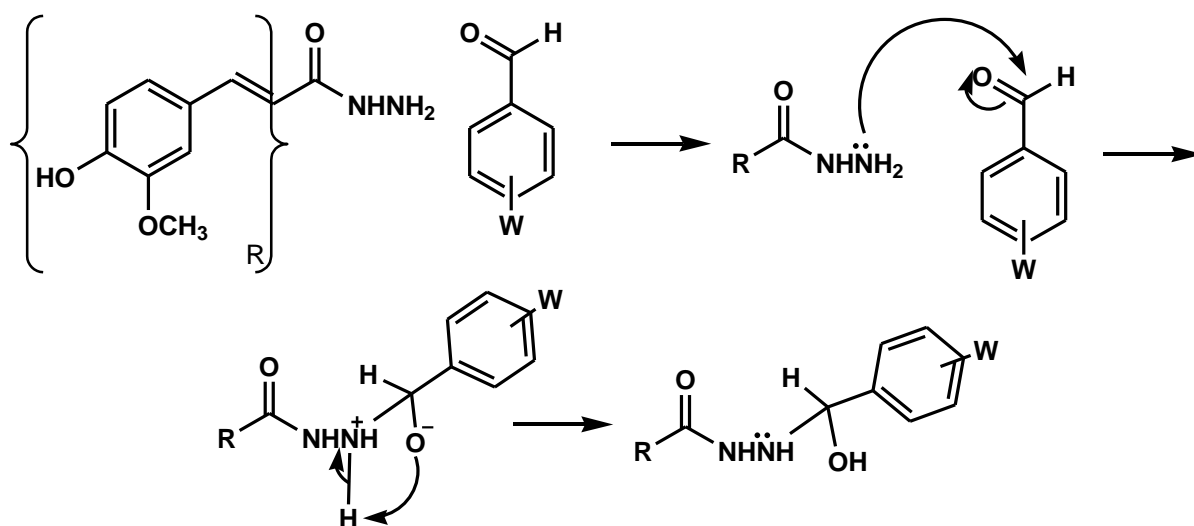


### 3. Acoplamento da Hidrazida 11 com aldeídos funcionalizados para obtenção da série alvo (PQM160-164)



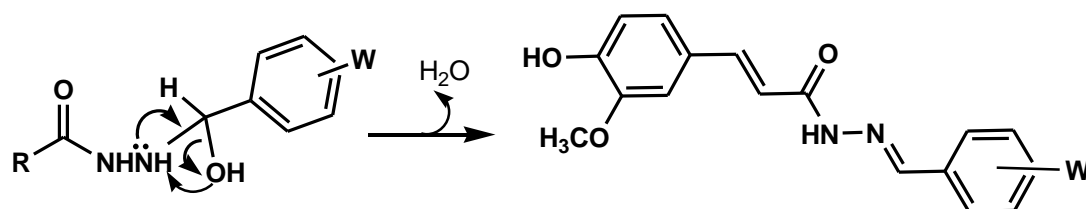
Fonte: Do Autor.

#### Etapa I



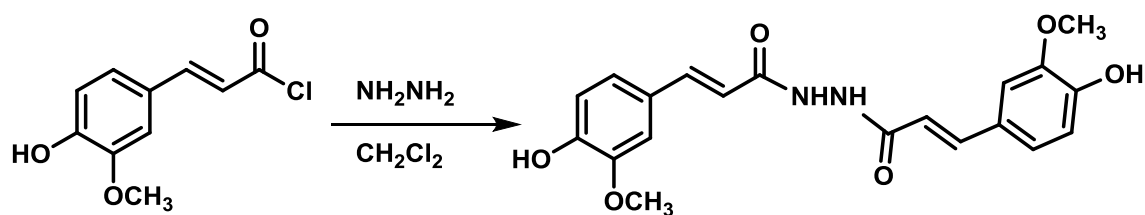
Fonte: Do Autor.

#### Etapa II



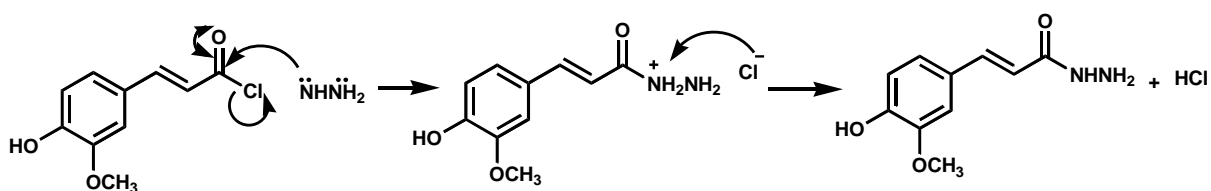
Fonte: Do Autor.

#### 4. Síntese do dímero PQM165



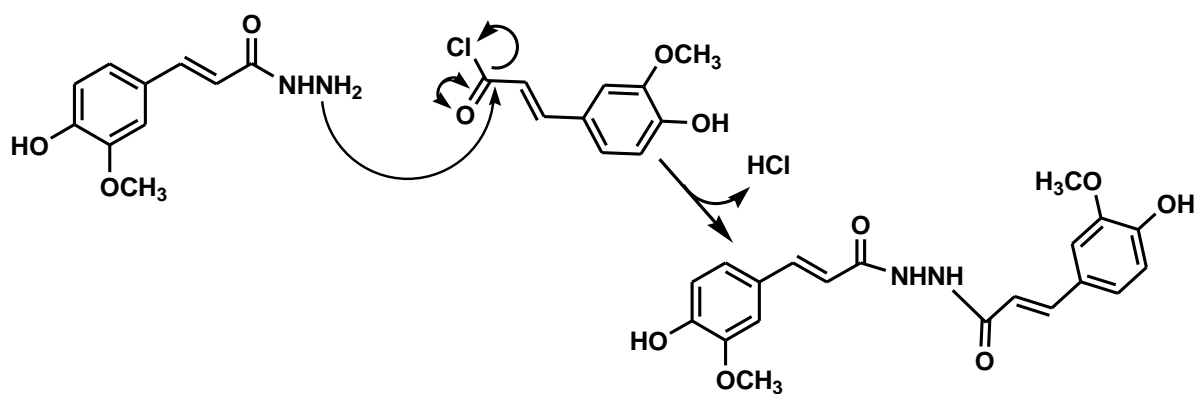
Fonte: Do Autor.

#### Etapa I



Fonte: Do Autor.

#### Etapa II

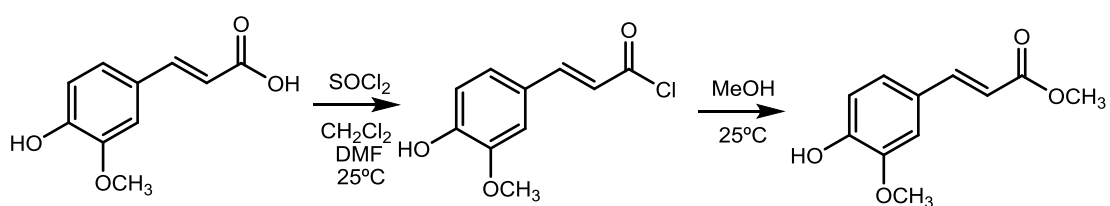


Fonte: Do Autor.

APÊNDICE B - TENTATIVAS PARA OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO  
HIDRAZIDICO 11a.

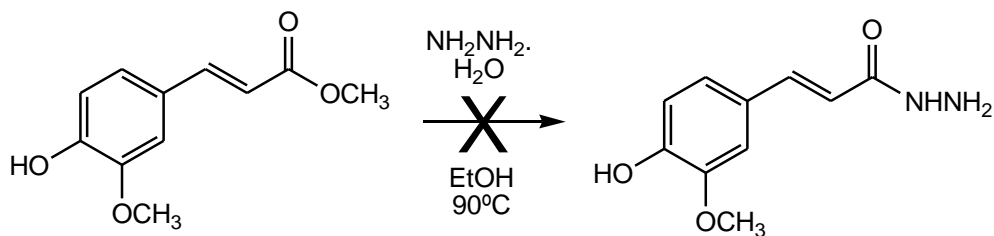
1ª Tentativa

Etapa I



Fonte: Do Autor.

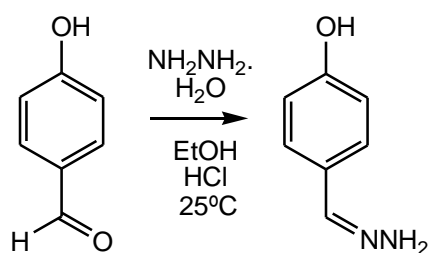
Etapa II



Fonte: Do Autor.

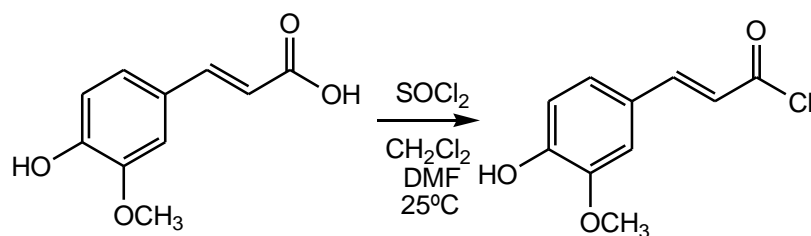
## 2ª Tentativa

### Etapa I



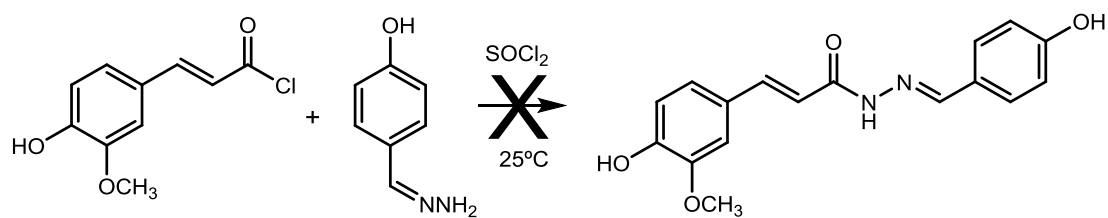
Fonte: Do Autor.

### Etapa II



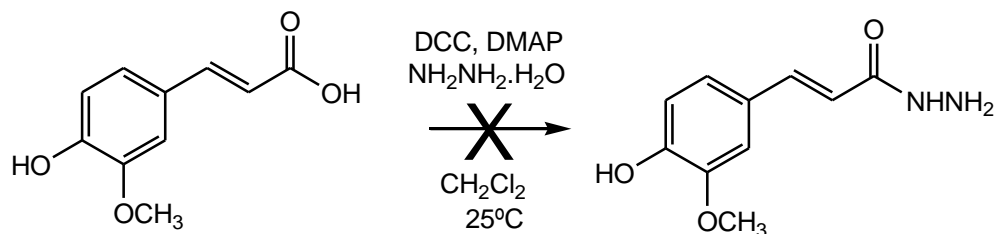
Fonte: Do Autor.

### Etapa III



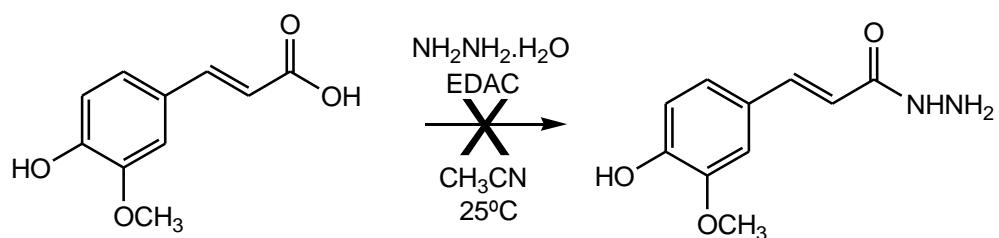
Fonte: Do Autor.

## 3ª Tentativa



Fonte: Do Autor.

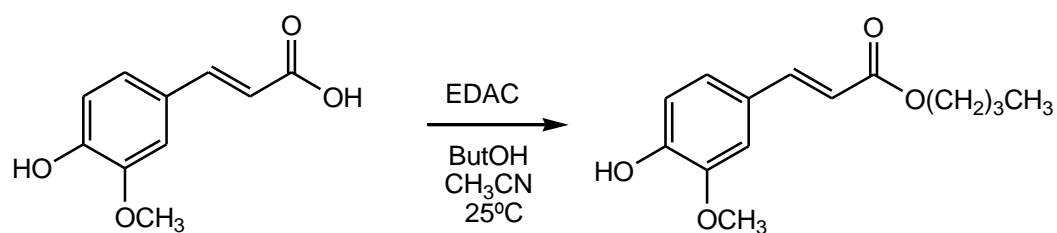
## 4ª Tentativa



Fonte: Do Autor.

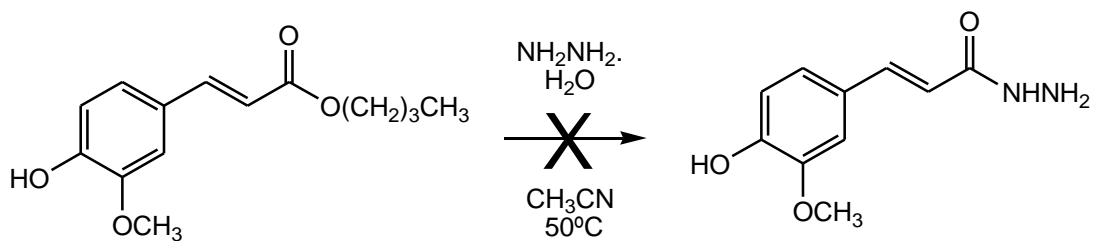
## 5ª Tentativa

## Etapa I



Fonte: Do Autor.

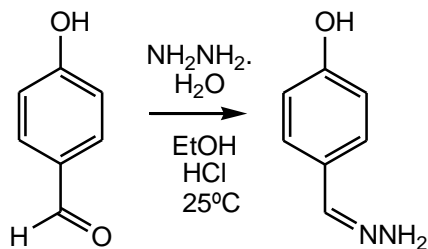
### Etapa II



Fonte: Do Autor.

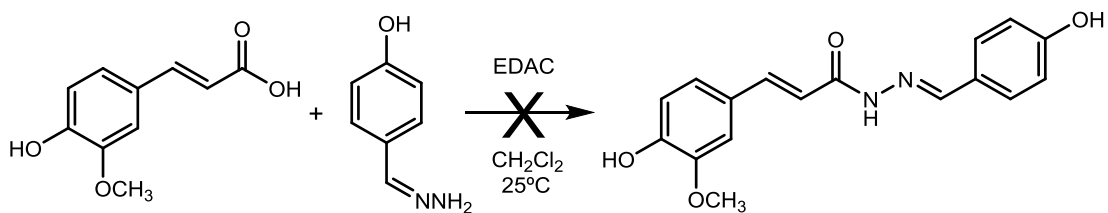
### 6ª Tentativa

#### Etapa I



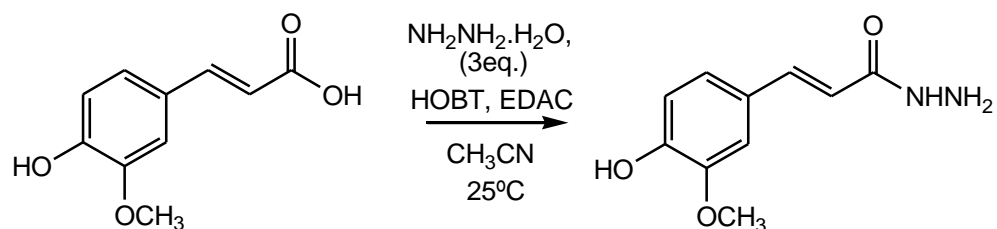
Fonte: Do Autor.

#### Etapa II



Fonte: Do Autor.

## 7ª Tentativa

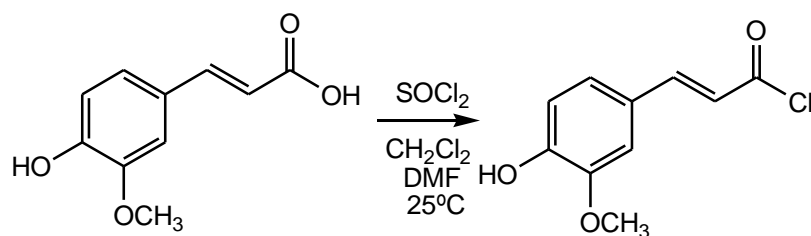


Fonte: Do Autor.

CARVALHO, S. A. et al. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 54, p. 512-521, 2012.

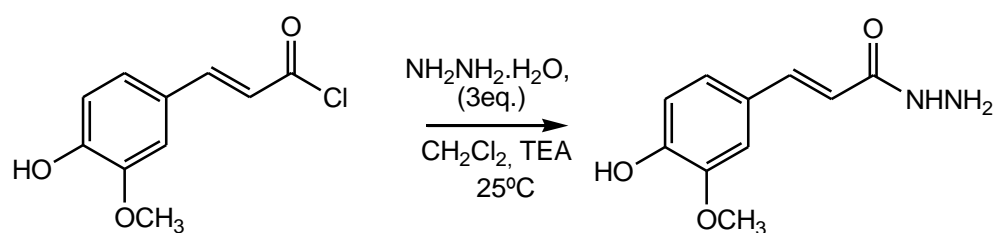
## 8ª Tentativa

## Etapa I

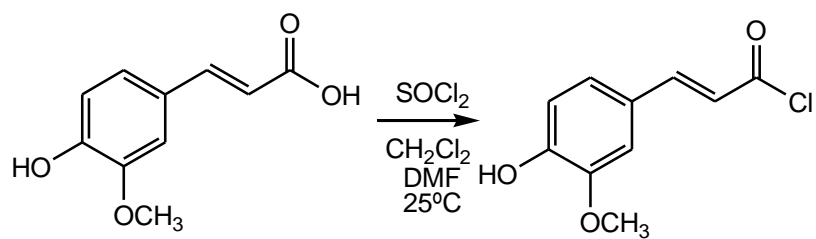


Fonte: Do Autor.

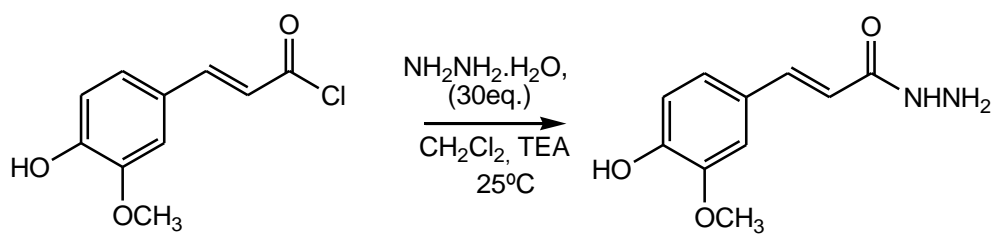
## Etapa II



Fonte: Do Autor.

**9ª Tentativa****Etapa I**

Fonte: Do Autor.

**Etapa II**

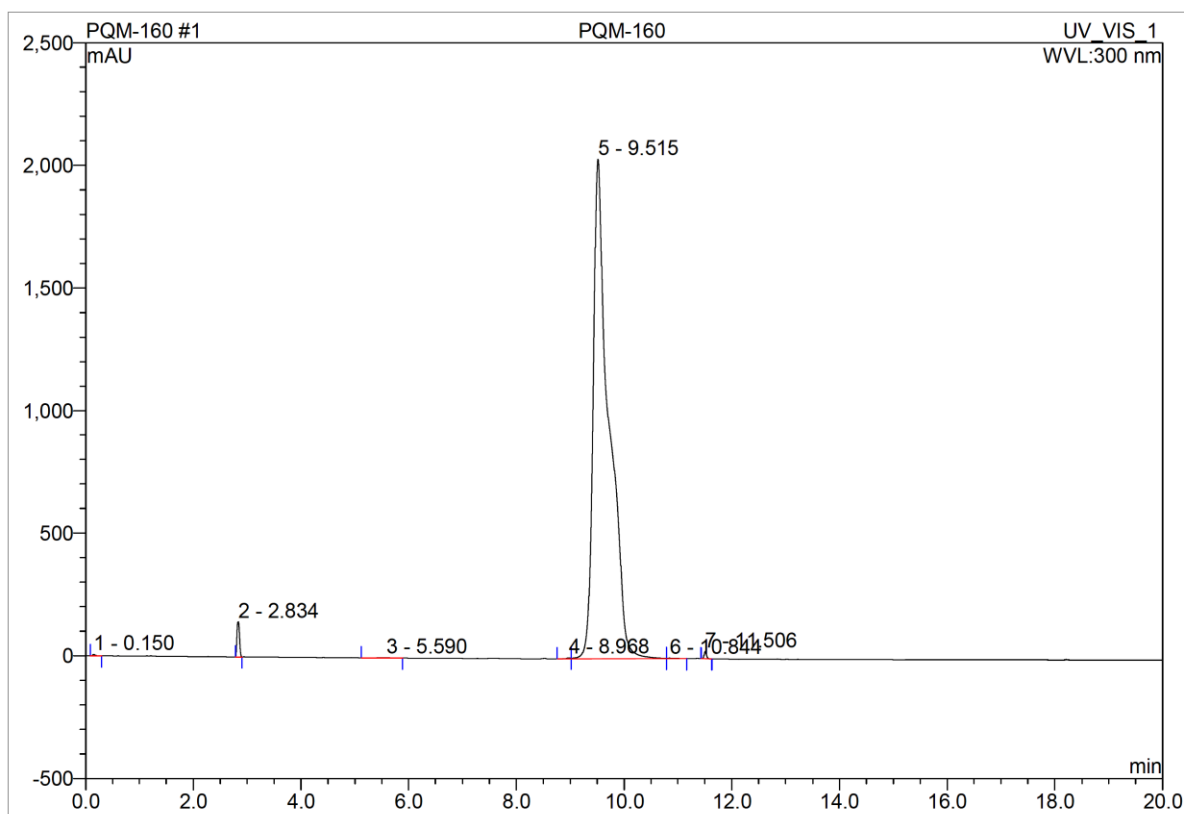
Fonte: Do Autor.



## APÊNDICE C – PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR UHPLC

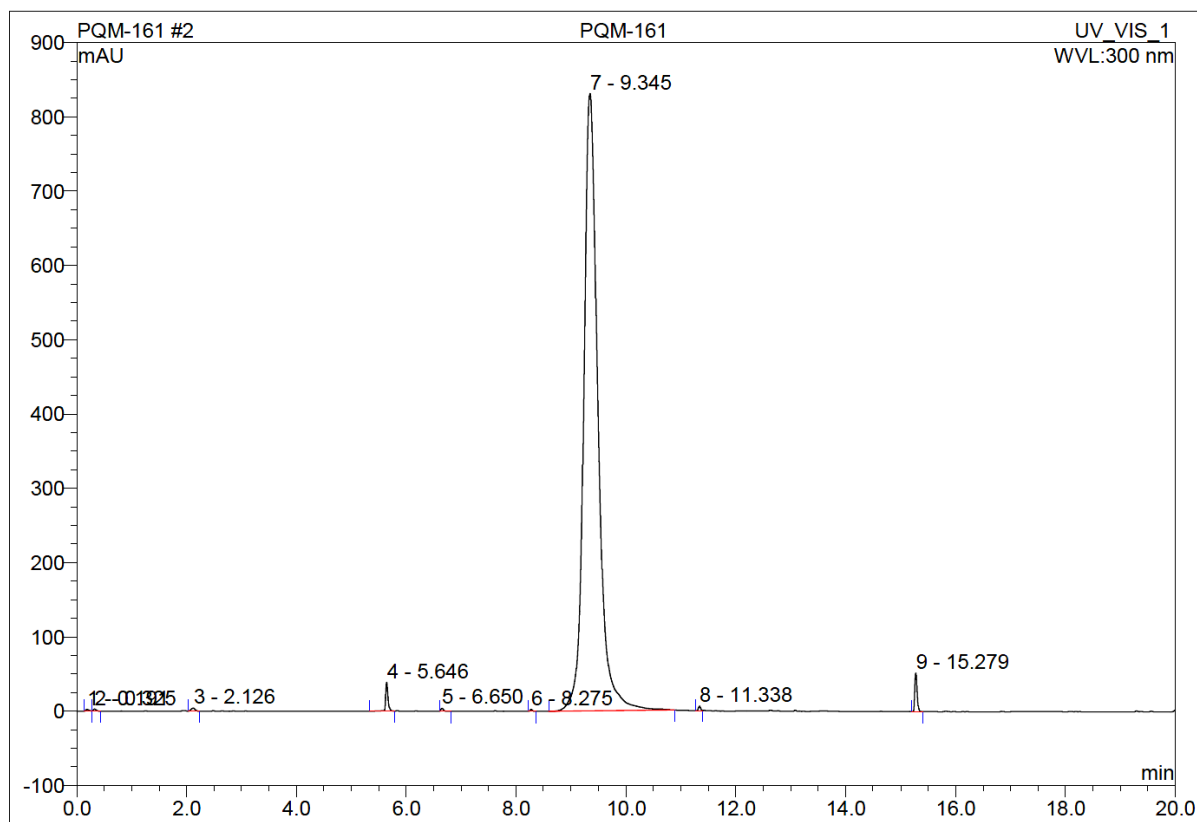
### ABSORVENDO A 300 nm

Todas as análises utilizaram coluna de fase reversa, fluxo de 0,3 ml/min, detecção em 300 nm e fase móvel de metanol/acetoneitrila na proporção de 90%/10%.



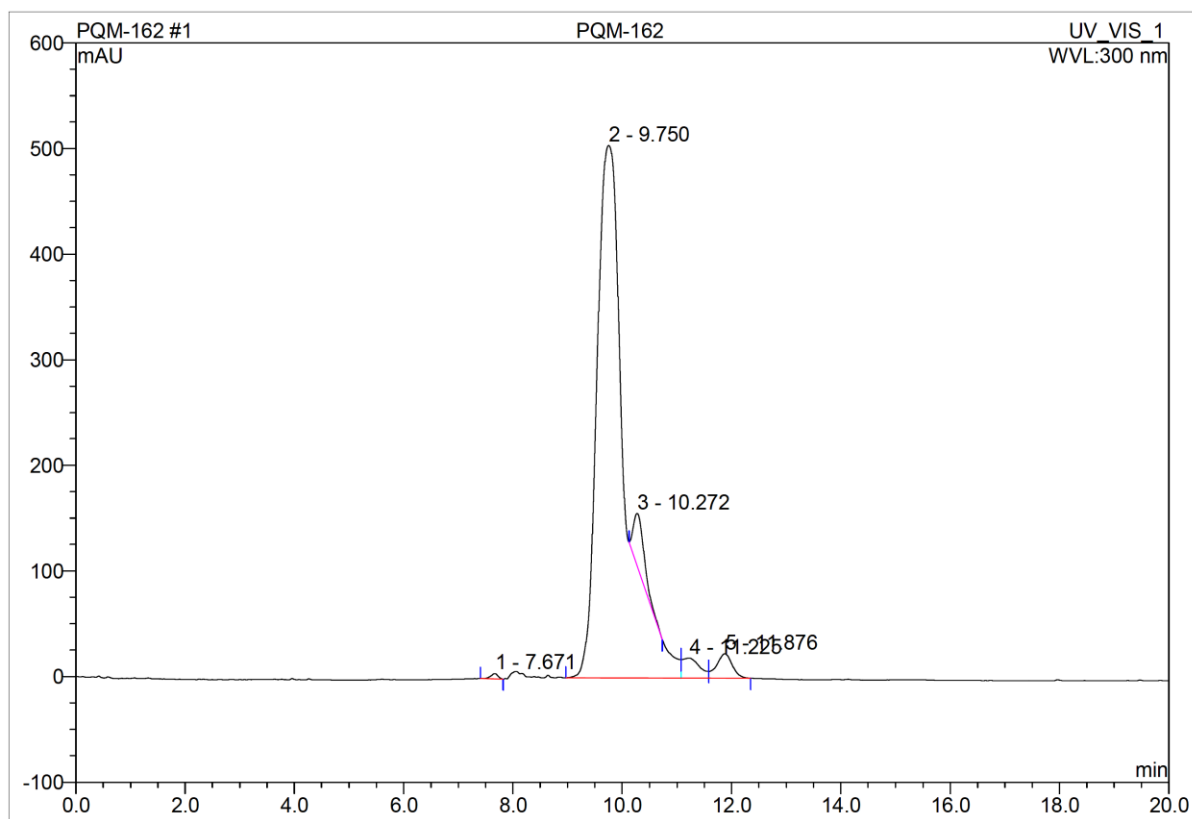
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	0.15	n.a.	5.747	0.308	0.04	n.a.	BMB
2	2.83	n.a.	143.214	7.562	1.08	n.a.	BMB
3	5.59	n.a.	1.329	0.337	0.05	n.a.	BMB
4	8.97	n.a.	4.120	0.333	0.05	n.a.	BM
5	9.51	n.a.	2037.262	688.567	98.49	n.a.	M
6	10.84	n.a.	2.642	0.528	0.08	n.a.	MB
7	11.51	n.a.	30.273	1.487	0.21	n.a.	BMB
<b>Total:</b>			2224.588	699.124	100.00	0.000	

Pureza PQM-160 – 98,49%



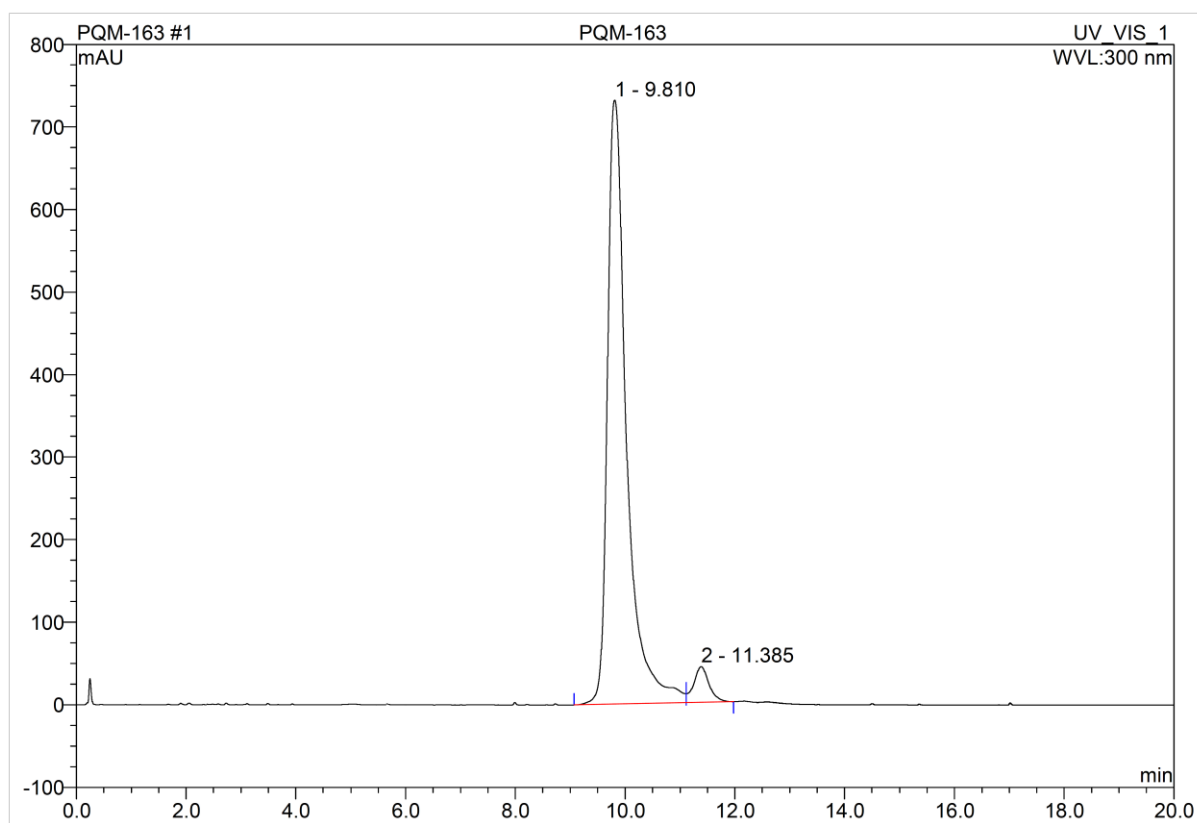
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	0.19	n.a.	2.329	0.158	0.06	n.a.	BM
2	0.33	n.a.	2.841	0.177	0.07	n.a.	MB
3	2.13	n.a.	4.100	0.354	0.14	n.a.	BMB
4	5.65	n.a.	38.801	2.047	0.80	n.a.	BMB
5	6.65	n.a.	4.210	0.236	0.09	n.a.	BMB
6	8.27	n.a.	2.596	0.120	0.05	n.a.	BMB
7	9.35	n.a.	830.902	249.373	97.64	n.a.	BMB
8	11.34	n.a.	5.756	0.247	0.10	n.a.	BMB
9	15.28	n.a.	51.896	2.685	1.05	n.a.	BMB
<b>Total:</b>			943.432	255.398	100.00	0.000	

Pureza PQM-161 – 97,64%



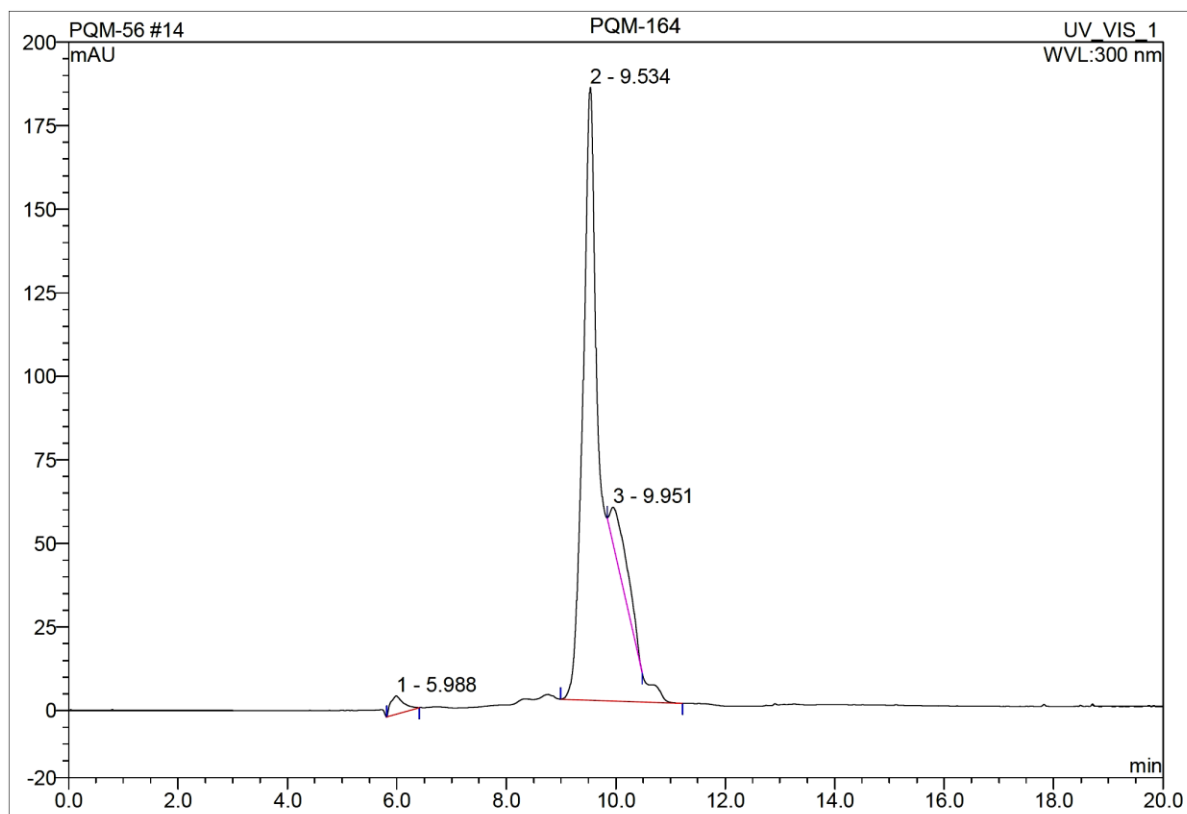
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	7.67	n.a.	4.996	0.762	0.23	n.a.	BMB
2	9.75	n.a.	504.296	301.379	91.79	n.a.	BM
3	10.27	n.a.	49.278	11.446	3.49	n.a.	Rd
4	11.23	n.a.	18.914	7.034	2.14	n.a.	M
5	11.88	n.a.	23.154	7.729	2.35	n.a.	MB
<b>Total:</b>			600.638	328.350	100.00	0.000	

Pureza PQM-162 – 95,28%



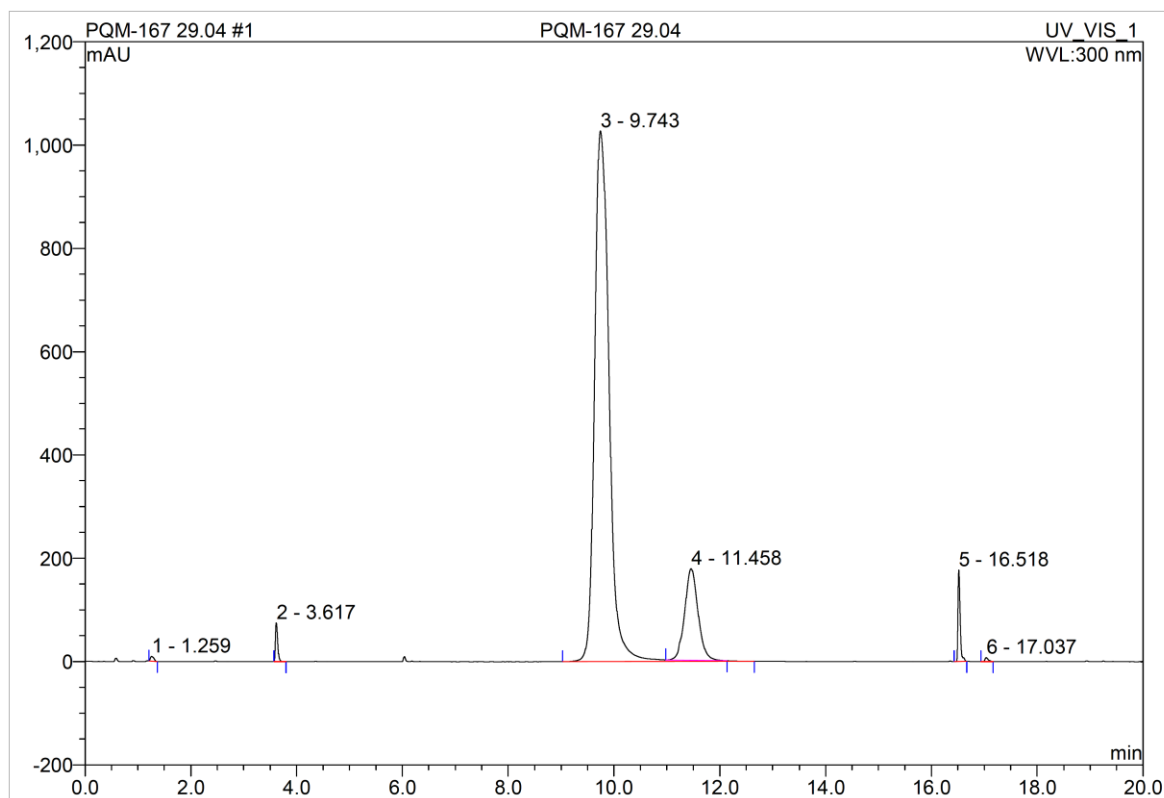
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	9.81	n.a.	731.749	295.410	95.44	n.a.	BM
2	11.38	n.a.	43.428	14.122	4.56	n.a.	MB
<b>Total:</b>			775.177	309.532	100.00	0.000	

Pureza PQM-163 – 95,44%



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	5.99	n.a.	5.491	1.524	1.76	n.a.	BMB
2	9.53	n.a.	183.311	79.407	91.71	n.a.	BMB
3	9.95	n.a.	11.018	5.655	6.53	n.a.	Rd
<b>Total:</b>			199.821	86.587	100.00	0.000	

Pureza PQM-164 – 98,24%



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	1.26	n.a.	9.196	0.692	0.18	n.a.	BMB
2	3.62	n.a.	75.176	3.831	0.97	n.a.	BMB
3	9.74	n.a.	1027.355	328.523	83.26	n.a.	BMB
4	11.46	n.a.	177.264	52.037	13.19	n.a.	Rd
5	16.52	n.a.	177.238	8.955	2.27	n.a.	BMB
6	17.04	n.a.	7.834	0.551	0.14	n.a.	BMB
<b>Total:</b>			1474.063	394.588	100.00	0.000	

Pureza PQM-167 – 96,45%