

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CARLA MIGUEL DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE DERIVADOS
N-BENZIL-PIPERIDÍNICOS ACILIDRAZÔNICOS**

Alfenas/MG

2017

CARLA MIGUEL DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE DERIVADOS N-
BENZIL-PIPERIDÍNICOS ACILIDRAZÔNICOS**

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

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Orientador: Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior. Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Ionta

Alfenas/MG

2017

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

Oliveira, Carla Miguel de.
Investigação da atividade antiproliferativa de derivados N-
benzil-piperidínicos acilidrazônicos / Carla Miguel de Oliveira
-- Alfenas-MG,
2017. 124 f.

Orientador: Cláudio Viegas Júnior.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2017.
Bibliografia.

1. Neoplasias. 2. Ciclo Celular. 3. Hidrazonas. I. Viegas
Júnior, Cláudio. II. Título.

CDD-615.31

CARLA MIGUEL DE OLIVEIRA

**"INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE
DERIVADOS N-BENZIL-PIPERIDÍNICOS-ACILIDRAZÔNICOS"**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 24, 02, 2017

Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini
Instituição: UNESP

Assinatura: Luis Octavio Regasini

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de
Paula
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Dedico esta dissertação a Deus, que é meu suporte durante todos os momentos. A toda minha família e amigos, que estiveram ao meu lado durante esta jornada. Em especial dedico aos meus pais por acreditarem neste sonho

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e por todas as pessoas que tenho em minha vida

Ao meu orientador, Claudio Viegas Jr., por ter me incluído no seu grupo de pesquisa, auxiliado em todo o desenvolvimento dessa dissertação, por todo conhecimento compartilhado e por sua dedicação aos alunos. Obrigada pela confiança e por auxiliar no meu crescimento profissional.

A minha coorientadora, Marisa Ionta, por todo conhecimento compartilhado, pela presença ao longo dessa caminhada e seu empenho nesta dissertação. Sou grata pelas conversas que puderam me tranquilizar nos momentos de ansiedade.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM), Matheus, Vanessa, Kris, Sarah, Amanda, Cindy, Nathália, Rafael, Suellen, Letícia e Ariele, pela amizade e parceria. Obrigada pelos momentos de estudo em grupo, pelos longos diálogos e tenho certeza que sem o apoio de vocês esta jornada teria sido bem mais difícil.

Em especial as amigas, Amanda, Sarah, Nathalia e Cindy que foram companheiras de estudos, compartilhamos momentos alegres e difíceis. Enfim, construímos uma amizade que levarei comigo.

À pós-doutoranda, Vanessa, da qual fui sua primeira aluna de iniciação científica júnior em 2006, sendo este meu primeiro contato com a pesquisa. Foi um prazer reencontrá-la durante meu mestrado e trocar conhecimentos.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições que certamente serão dadas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas.

Por fim e não menos importante, aos meus pais José e Aparecida, e ao meu irmão Ricardo por sempre acreditarem em mim e por toda a confiança depositada em mim. Afinal não seria nada sem vocês.

Ao meu namorado, Bruno por estar junto comigo durante toda essa caminhada, por também acreditar nos meus sonhos e por todas as dificuldades que enfrentamos juntos.

RESUMO

A incidência de câncer tem aumentado devido ao crescimento e envelhecimento populacional, bem como aos fatores de risco tais como: tabagismo, sedentarismo e obesidade. A taxa de mortalidade é alta tanto em países mais ou menos desenvolvidos. Dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), no biênio 2016-2017, revelam estimativas de cerca de 600 mil casos novos de câncer no Brasil, sendo o câncer de mama feminino e o de próstata os mais frequentes. No tratamento do câncer há vários desafios a serem vencidos, tais como melhora eficiência e seletividade do fármaco, bem como diminuição da toxicidade e dos mecanismos de resistência. Além disso, o custo dos medicamentos atualmente utilizados, ainda é elevado à imensa maioria da população de média e baixa renda. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo a avaliação da atividade antiproliferativa de uma série de derivados sintéticos *N*-benzil-piperídínicos acilidrazônicos. Numa triagem inicial, onze substâncias (**32a-k**) foram testadas contra quatro linhagens de células tumorais humanas (MCF7, HT144, A549, HepG2). As substâncias PQM-66 (**32f**), PQM-67 (**32g**), PQM-76 (**32j**) e PQM-88 (**32k**) reduziram a viabilidade de células A549, com IC₅₀ de 139,20 µM; 116,60 µM; 120,50 µM e 53,92 µM, respectivamente. De modo interessante, PQM-75 (**32i**) apresentou um espectro de atividade mais promissor contra as outras três linhagens (HepG2, HT144 e MCF-7), sendo o IC₅₀ de 58,40 µM; 86,40 µM; 44,81 µM, respectivamente. Assim, o composto **32i** foi selecionado para avaliação quanto ao seu potencial antiproliferativo sobre células da linhagem HepG2. Os dados mostraram que **32i** significativamente reduziu a capacidade clonogênica em 60% e 70%, tratadas, respectivamente, com 30 µM e 60 µM. Portanto, a redução da viabilidade, inicialmente observada por MTS, está associada à capacidade de **32i** em inibir a proliferação de células HepG2. Estudos adicionais deverão ser realizados para investigar a influência de **32i** sobre o perfil de expressão de reguladores do ciclo celular.

Palavras chaves: Câncer. Atividade antiproliferativa. *N*-benzil-piperídínicos-acilidrazônicos.

ABSTRACT

The incidence of cancer is increasing because of the growth and aging of the population as well as risks factors such as smoking, sedentary lifestyle and obesity. Mortality rate is elevated in both more-developed and less-developed countries. Data from the INCA, it is estimated in 2016- 2017 around 600 thousand new cases of cancer in Brazil, with female breast cancer and prostate cancer being the most frequent. Several challenges should be overcome to improve the cancer treatment such as improving the drug efficiency and selectivity, reducing toxicity and tumor resistance mechanism. In addition, the cost of medicines is expensive for population. Thus, the present work aims to evaluate the antiproliferative activity of a series of *N*-benzyl piperidinyl acylhydrazone derivatives. In a preliminary screening eleven substances were tested against four human tumor cell lines (MCF7, HT144, A549, HepG2). According to results, **PQM-66 (32f)**, **PQM-67 (32g)**, **PQM- 76 (32j)**, and **PQM-88 (32k)** reduced significantly the viability of A549 cells with IC₅₀ de 139.20 μM; 116.60 μM; 120.50 μM and 53.92 μM, respectively. Interestingly, **PQM-75 (32i)** showed more promising activity against the other 3 lineages (MCF-7, HepG2 e HT144). Thus, compound **32i** was selected for evaluation of its antiproliferative potential on HepG2 cells. Data showed that **32i** reduced 60% and 70% clonogenic capacity of HepG2 with treated 30 μM and 60 μM, respectively and induced cell cycle arrest. Therefore, the reduction in cell viability, initially observed through MTS assay, is associated to ability of **32i** in inhibiting the proliferation of HepG2 cells. Additional studies should be performed to investigate the influence of compound **32i** on expression profile of regulators of cell cycle.

Key words: Cancer. antiproliferative activity. *N*-benzyl piperidinyl acylhydrazone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características usualmente notadas em células tumorais	20
Figura 2 - Mecanismo de regulação do ciclo celular.....	21
Figura 3 - Estrutura de produtos naturais e derivados.....	26
Figura 4 - Estruturas de exemplos de fármacos com potencial antitumoral.	28
Figura 5 - Exemplos de acilidrazonas com atividade antiproliferativa	31
Figura 6 - Desenho estrutural de híbridos moleculares N-benzil-piperidínicos acilidrazônicos (32) com propriedades antiproliferativas	33
Figura 7 - Mecanismo de aminação redutiva entre 4-formilbenzoato de metila (35) e 3-hidroxipiperidina (36) para obtenção do N-benzilpiperidinil éster metílico	35
Figura 8 - Espectro de absorção na região do IV de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) benzoato de metila (ATR).....	37
Figura 9 - Interações conformacionais de sistemas piperidínicos com influência diferenciada no ambiente químico de átomos de hidrogênios em posições axiais e equatoriais.....	38
Figura 10 - Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD,300MHz) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) benzoato de metila (37)	38
Figura 11 - Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD,75 MHz) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) benzoato de metila (37)	39
Figura 12 - Mapa de correlação HSQC (300MHz, CD ₃ OD) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) benzoato de metila (37).....	40
Figura 13 - Mecanismo de obtenção da hidrazida (38), a partir da reação do éster (37)	41
Figura 14 - Espectro de absorção na região do IV de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno).....	42
Figura 15 - Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300MHz) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno).....	43
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD,75MHz) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno).....	44
Figura 17 - Mecanismo de acoplamento da hidrazida (38), com diferentes benzaldeídos	45
Figura 18 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-54 (32a) (ATR).....	47

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) do composto PQM-54 (32a).....	48
Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) do composto PQM-54 (32a).....	49
Figura 21 - Espectro de Massas de PQM-54 (32a) (ESI-MS).	50
Figura 22 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-55 (32b) (ATR).....	51
Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz) do composto PQM-55 (32b).....	52
Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto PQM-55 (32b).....	53
Figura 25 - Espectro de Massas de PQM-55 (32b) (ESI-MS).....	53
Figura 26 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-56 (32c) (ATR).....	54
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300MHz) do composto PQM-56 (32c).....	55
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) do composto PQM-56 (32c).....	56
Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto PQM-56 (32c).....	57
Figura 30 - Espectro de Massas de PQM-56 (32c) (ESI-MS).....	58
Figura 31 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-57 (32d) (ATR).....	59
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz) do composto PQM-57 (32d).....	60
Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto PQM-57 (32d).....	61
Figura 34 - Espectro de Massas de PQM-57 (32d) (ESI-MS).	62
Figura 35 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-65 (32e) (ATR).....	63
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) do composto PQM-65 (32e).....	64
Figura 37 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) do composto PQM-65 (32e).....	65
Figura 38 - Espectro de Massas de PQM-65 (32e) (ESI-MS).	66
Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-66 (32f) (ATR).....	67
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) do composto PQM-66 (32f).....	68

Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto PQM-66 (32f).....	69
Figura 42 - Espectro de Massas de PQM-66 (32f) (ESI-MS).	70
Figura 43 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-67 (32g) (ATR).....	71
Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) do composto PQM-67 (32g).....	72
Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto PQM-67 (32g).....	73
Figura 46 - Espectro de Massas de PQM-67 (32g) (ESI-MS).	74
Figura 47 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-74 (32h) (ATR).....	75
Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300MHz) do composto PQM-74 (32h).....	76
Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75MHz) do composto PQM-74 (32h).....	77
Figura 50 - Espectro de Massas de PQM-74 (32h) (ESI-MS).	78
Figura 51 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-75 (32i) (ATR).....	79
Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300MHz) do composto PQM-75 (32i).....	80
Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$,75 MHz) do composto PQM-75 (32i).....	81
Figura 54 - Espectro de Massas de PQM-75 (32i) (ESI-MS).	82
Figura 55 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-76 (32j) (ATR).....	83
Figura 56 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) do composto PQM-76 (32j).....	84
Figura 57 - Espectro de RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto PQM-76 (32j).....	85
Figura 58 - Espectro de Massas de PQM-76 (32j) (ESI-MS).	85
Figura 59 - Espectro de absorção na região do IV de PQM-88 (32k) (ATR).....	86
Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) do composto PQM-88 (32k).....	87
Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto PQM-88 (32k).....	88
Figura 62 - Espectro de Massas de PQM-88 (32k) (ESI-MS).	89

Figura 63 - Viabilidade celular determinada por MTS. As culturas (HT144, MCF-7, HepG2 e A549) foram tratadas por 48h com os diferentes compostos na concentração de 60 μ M. Cisplatina foi utilizada como um controle positivo da reação. *** ($p < 0,001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey	90
Figura 64 - Viabilidade celular determinada por MTS. Culturas de células A549 Foram tratadas com os compostos PQM-66 (32f) , PQM67 (32g) , PQM-76 (32j) e PQM-88 (32k) em diferentes concentrações por 48h. *** ($p < 0,0001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey	92
Figura 65 - Viabilidade celular determinada por MTS. As diferentes linhagens celulares foram tratadas com o PQM-75 (32i) em diferentes concentrações por 48h. *** ($p < 0,001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey	94
Figura 66 - Viabilidade celular determinada por MTS. A linhagem CCD-1059Sk (fibroblasto normal de pele humana) foi tratada com o PQM-75 (32i) em diferentes concentrações por 48h.*** ($p < 0,001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey	95
Figura 67 - Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem HepG2. As células foram expostas ao composto PQM-75 (32i) por 24h e, na sequência, foram mantidas em cultura por mais 15 dias.....	95
Figura 68 - Histogramas representativos que mostram a distribuição de células em diferentes fases do ciclo celular. As barras castanho, rosa, verde e azul representam respectivamente Sub-G1, G0/G1, S e G2/M.....	96
Figura 69 - Rota sintética utilizada para obtenção da série de derivados N-benzil piperidínicos acilidrazônicos (32).....	100
Figura 70 - Reação de aminação redutiva entre a 3-hidroxi piperidina (36) e o formil-éster (35) para obtenção de N-benzilpiperidinil éster metílico	101
Figura 71 - Obtenção da hidrazida (38), a partir da reação do éster (37).....	102
Figura 72 - Obtenção de N-acilidrazonas (32) a partir da hidrazida (38).....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) benzoato de metila (37)).....	118
Tabela 2 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno) benzoidrazida (38).....	118
Tabela 3 -	Dados experimentais dos derivados <i>N</i> - benzil piperidínicos acilidrazônicos.....	45
Tabela 4 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM- 54 (32a)	119
Tabela 5 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-55.(32b)	119
Tabela 6 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-56 (32c)	120
Tabela 7 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-57 (32d)	120
Tabela 8 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-65 (32e)	121
Tabela 9 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-66 (32f)	121
Tabela 10 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-67 (32g)	122
Tabela 11 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-74 (32h)	122
Tabela 12 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-75 (32i)	123
Tabela 13 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-76 (32j)	123
Tabela 14 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PQM-88 (32k)	124
Tabela 15 -	Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo em culturas HepG2 tratadas por 24 h.....	98
Tabela 16 -	Linhagens celulares.....	106

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

CC	-Cromatografia em coluna
CCD	-Cromatografia em camada delgada
CDK	-Complexo dependente de quinase
HDAC	-Histona desacetilase
HTS	-high-throughput screening
Hz	-Hertz
IC ₅₀	-Concentração inibitória 50%
IV	-Infravermelho
INCA	-Instituto Nacional do Câncer
<i>J</i>	-Constante de acoplamento
<i>m</i>	-multiplete
M.M.	-Massa molar
NAH	- <i>N</i> -acilidrazona
NCI	-National Cancer Institute
NEQs	-Novas entidades químicas
PAC-1	-Composto ativados de pro-caspase
P.F.	-Ponto de fusão
ppm	-Partes por milhão
REA	-Relação estrutura-atividade
<i>s</i>	-Simpleto
<i>t</i>	-Tripleto
t.a.	-Temperatura ambiente
TMS	-Tetrametilsilano
δ	-Deslocamento químico
$\bar{\nu}$	-Número de onda (cm ⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	CÂNCER	19
2.2	ARSENAL TERAPÊUTICO CONTRA O CÂNCER.....	22
2.3	N-ACILIDRAZONAS COMO DESTAQUE NA BUSCA DE FÁRMACOS ANTICÂNCER	28
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	QUÍMICA.....	35
4.1.1	4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)benzoato de metila (37).....	35
4.1.2	4-((3-hidroxi-piperidin-1-il) metileno) benzoidrazida (38).....	40
4.1.3	Obtenção da série de <i>N</i> -benzil-piperidinil-acilidrazonas-alvo	44
4.1.4	<i>N</i> -benzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-54 (32a)	47
4.1.5	<i>N</i> - (4-bromobenzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-55 (32b)	50
4.1.6	<i>N</i> -(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-56 (32c)	54
4.1.7	<i>N</i> - (4-nitrobenzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il) metileno) benzoidrazida: PQM-57 (32d)	58
4.1.8	<i>N</i> - (4-metoxibenzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-65 (32e)	62

4.1.9	<i>N</i> - (4-(pirrolidin-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-66 (32f)	66
4.1.10	<i>N</i> -(4-fluorbenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-67 (32g)	70
4.1.11	<i>N</i> -(4-morfolinobenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-74 (32h)	74
4.1.12	<i>N</i> - ((4-piperidi-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-75 (32i)	78
4.1.13	<i>N</i> -(4-(1h-imidazol-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-76 (32j)	82
4.1.14	<i>N</i> - (4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzohidrazida: PQM-88 (32k)	86
4.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS	89
5	PARTE EXPERIMENTAL	98
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	98
5.1.1	Purificação e secagem de solventes e reagentes	99
5.2	ABORDAGEM SINTÉTICA	100
5.2.1	Reação de aminação redutiva entre o 4-formilbenzoato de metila (35) e 3-hidroxi-piperidina (36)	101
5.2.2	Reação de hidrazinólise entre o 4[(3-hidroxi-piperididín-1-il)metil] benzoato de metila (20) e monodrato de hidrazina	102
5.2.3	Procedimento geral para obtenção das n-benzil-acilidrazonas-alvo (32a-k)	102
5.2.4	Dados de caracterização das e <i>N</i>-benzil-acilidrazonas-alvo (32a-k) ..	103
5.3	TESTES BIOLÓGICOS	109
5.3.1	Linhagens celulares, condições de cultivo e esquema de tratamento	109
5.3.2	Ensaio colorimétrico (MTS)	110
5.3.3	Ensaio de capacidade clonogênica	110

5.3.4	Análise do ciclo celular	111
5.3.5	Análise estatística.....	111
6	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no biênio 2016-2017, estima-se cerca de 600 mil casos novos de câncer no Brasil, sendo o câncer de mama feminino e o de próstata os mais frequentes. Nas mulheres, a maior incidência de câncer é o de mama (28,1%), seguido de intestino (8,6%) e cólon do útero (7,9%). Já nos homens, os principais cânceres são o de próstata (28,6%), pulmão (8,1%) e intestino (7,8%) (INCA, 2016). Parece haver um consenso de que a incidência de câncer tem aumentado devido ao envelhecimento populacional e a fatores de risco tais como: tabagismo, sedentarismo e obesidade. A mortalidade continua elevada tanto em país mais e menos desenvolvidos, tendo ocorrido 14,1 milhões de novos casos de câncer, e 8,2 milhões de mortes durante 2012 (TORRE et al., 2015).

Durante o desenvolvimento do câncer ocorrem mudanças nas células que adquirem características tais como crescimento desordenado, resistência a sinais inibitórios de crescimento, potencial angiogênico e capacidade de formar metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O tumor se desenvolve em várias etapas e a eficácia de tratamento está diretamente relacionada à precocidade do diagnóstico, que deve ser realizado, preferencialmente, antes das células alteradas se tornarem malignas e metastáticas. O tratamento do câncer, em geral, baseia-se na ressecção cirúrgica, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia. No que diz respeito a quimioterapia, muitas vezes, o tratamento é ineficiente ou apenas paliativo devido a resistência do tumor aos fármacos disponíveis no mercado, fato que favorece a progressão da doença, o estabelecimento de metástases (CHENG, Y. T.; YANG; SHYUR, 2016).

Vários fármacos utilizados atualmente no tratamento de neoplasias foram descobertos a partir de metabólitos secundários de plantas e organismos marinhos, pois essas substâncias constituem uma grande variedade química, com diferentes efeitos biológicos. Muitos dos fármacos são de origem sintética ou semissintética e podem atuar por diferentes mecanismos de ação. Apesar do arsenal terapêutico razoavelmente vasto de fármacos antineoplásicos aprovados e em uso clínico, alguns tipos de neoplasias são ainda resistentes à terapêutica disponível, exigindo um esforço contínuo na prospecção, estudos pré-clínicos e clínicos de novas entidades químicas (NEQs) potencialmente eficazes e menos tóxicas (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antiproliferativa de uma série de derivados sintéticos *N*-benzil-piperídínicos

acilidrazônicos, originalmente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa como candidatos a fármacos anti-Alzheimer, mas que, em testes preliminares, indicaram promissora atividade antiproliferativa sobre células derivadas de cânceres humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir serão apresentados alguns dados relacionados ao estado da arte da pesquisa em novos fármacos antineoplásicos, dados da fisiopatologia do câncer, bem como estimativas de sua incidência e tratamento.

2.1 CÂNCER

O câncer continua apresentando alta taxa de mortalidade tanto em países mais desenvolvidos como nos menos desenvolvidos. Com expectativa de aumento principalmente nos países menos desenvolvidos, devido ao envelhecimento populacional e exposição a fatores de risco, tais como má alimentação, tabagismo e sedentarismo. Segundo dados de GLOBOCAN, no mundo ocorreram 14,1 milhões de novos casos de câncer, e 8,2 milhões de mortes durante 2012 (TORRE et al., 2015).

No Estados Unidos, esta enfermidade possui maior taxa de mortalidade infantil. Nas últimas quatro décadas houve aumento no número de pessoas diagnosticadas com câncer, tendo expectativa que aumente para cerca de 2,4 milhões em 2035. Observa-se também que a faixa etária acima de 65 anos representa a maior parcela populacional que é diagnosticada (SWEENEY, 2014).

No Brasil, a estimativa é que ocorram 600 mil novos casos de câncer no biênio 2016-2017. Nos homens há predominância de cânceres de próstata, pulmão e intestino, já nas mulheres são cânceres de mama, intestino e colo de útero. Os mais frequentes são o câncer de próstata (61 mil) nos homens e mama (58 mil) nas mulheres (INCA, 2016).

Esta doença é caracterizada pelo crescimento descontrolado de células que podem invadir tecidos vizinhos e se disseminar para outros locais do organismo. Os tumores malignos são caracterizados por apresentarem células agressivas que se dividem rapidamente, produzem fatores angiogênicos e apresentam grande capacidade invasiva, sendo resistentes aos sinais inibitórios de proliferação e de morte celular por apoptose (**Figura 1**). Ao contrário, em condições normais, os sinais que regulam proliferação e morte celular são altamente regulados, a fim de manter a homeostase tecidual (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

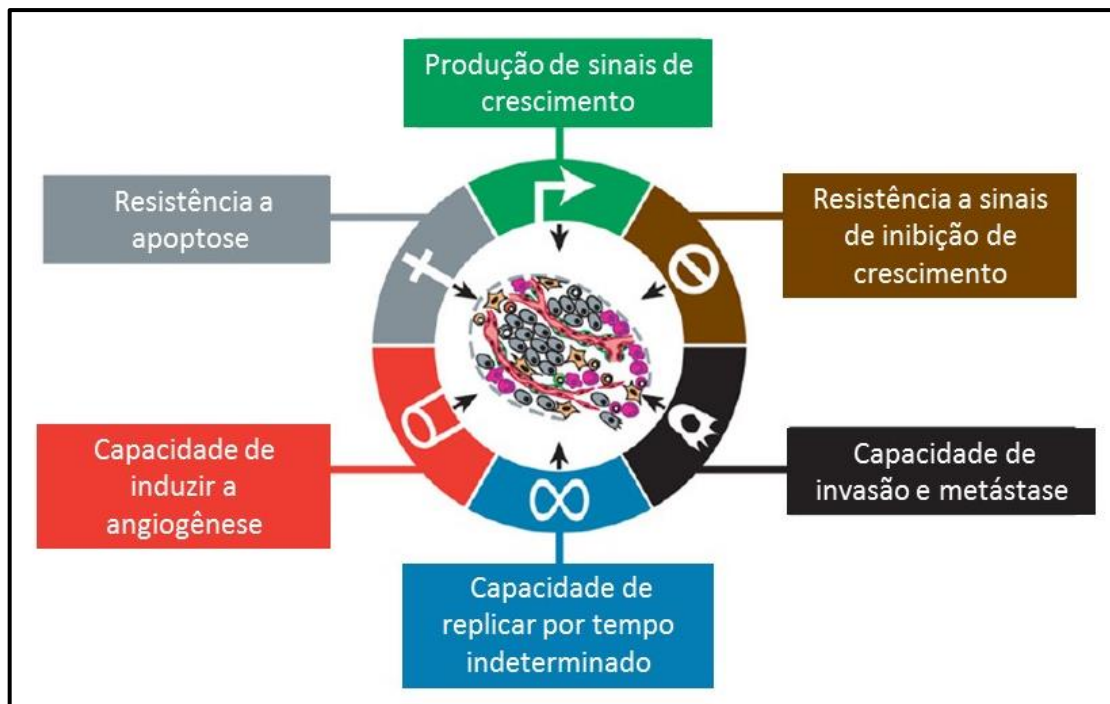


Figura 1- Características usualmente notadas em células tumorais
 Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011

A carcinogênese é um processo complexo que envolve mudanças genéticas e epigenéticas, no qual uma célula normal se torna uma célula cancerígena. Ao longo do processo, as células tornam-se alteradas e proliferam rapidamente e, com a progressão do tumor, as células malignas invadem tecidos adjacentes para estabelecer metástases. As células malignas liberam fatores angiogênicos, processo fundamental para manter o crescimento do tumor (CARBONE; PASS, 2004; YOO; JONES, 2006).

Em tecidos normais, a progressão do ciclo celular é altamente regulada por complexos CDK/ciclina (ASGHAR et al., 2015). No complexo CDK/ciclina, a CDK (quinase dependente de ciclina) representa a subunidade catalítica, enquanto a ciclina representa a subunidade regulatória (SENDEROWICZ, 2004). Para assegurar a apropriada progressão do ciclo existem alguns pontos críticos, chamados pontos de checagem, onde é realizado o monitoramento quanto a integridade do genoma e o acesso dos microtúbulos aos cromossomos. Dessa forma, os mecanismos de checagem impedem que o ciclo progrida em caso de anormalidades (ROSKOSKI, 2016).

O ciclo celular é constituído basicamente por 4 fases: G1, S, G2 e M (**Figura 2**). A fase S é responsável pela duplicação do DNA, seguida da fase G2, em que ocorrem reparos no DNA, caso este esteja danificado, antes que o material genético

seja segregado na fase M; na fase G1, há expressão de proteínas importantes que regulam a passagem pelo ponto de restrição e transição G1/S. A progressão do ciclo é mediada por complexos ciclina-CDK que são formados ao longo do ciclo (LAPENNA; GIORDANO, 2009; MEDEMA; MACÚREK, 2012). A progressão pela fase G1 e transição G1/S são eventos regulados pelos complexos ciclina D-CDK4/6, ciclina E-CDK2, respectivamente; enquanto a progressão pela fase S e a transição G2/M envolvem, respectivamente, a ativação dos complexos ciclina A/CDK2 e ciclina B-CDK1. Complexos ciclina-CDK são, adicionalmente, regulados por eventos de fosforilação de CDKs e interação molecular com as a CKIs (proteínas inibidoras de CDK) (ASGHAR et al., 2015; CÍCENAS; VALIUS, 2011).

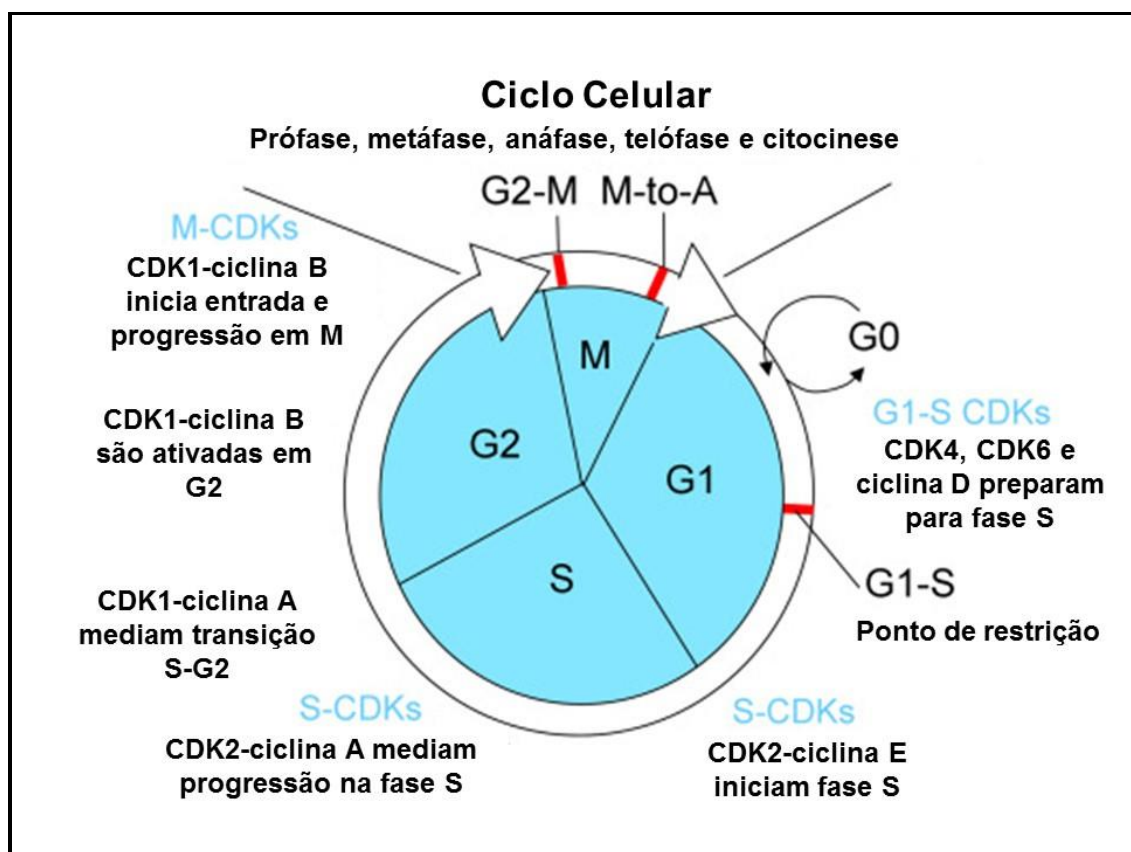


Figura 2 - Mecanismo de regulação do ciclo celular
Adaptado de ROSKOSKI, 2016

Quanto à terapêutica, há vários desafios a serem vencidos no tratamento do câncer, os quais incluem: melhora na eficiência e seletividade do fármaco, bem como diminuição da toxicidade e dos mecanismos de resistência. Além disso, o custo dos medicamentos, atualmente utilizados, ainda é elevado a imensa maioria da população de média e baixa renda. Devido ao fato de células cancerígenas apresentarem alta

taxa de proliferação e alterações nas proteínas que regulam positiva e negativamente o ciclo celular, compostos capazes de inibir a progressão do ciclo celular são potenciais agentes antitumorais e, portanto, devem ser investigados para que novos protótipos de fármacos possam ser identificados (ROSKOSKI, 2016).

2.2 ARSENAL TERAPÊUTICO CONTRA O CÂNCER

De um modo geral, as plantas têm um papel muito importante na descoberta de várias substâncias que foram ou são utilizadas no tratamento de neoplasias. Atualmente, cerca de 60% dos fármacos antineoplásicos tem origem nos produtos naturais (CRAGG; PEZZUTO, 2015). Alguns destes são emblemáticos no desenvolvimento da Química medicinal e da terapêutica contra o câncer, a exemplo dos alcaloides da vinca, vimblastina (**1, Figura 3, p.24**) e vincristina (**2, Figura 3, p.24**), isolados de *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), do taxano, paclitaxel (**3, Figura 3, p.24**), comercializado como Taxol®, que foi isolado das cascas de *Taxus* (*T. baccata* L. e *T. brevifolia* Nutt.) e do alcaloide, camptotecina (**4, Figura 3, p.24**), obtido de *Camptotheca acuminata*. Estas substâncias foram o ponto de partida para grandes avanços obtidos no tratamento de tumores sólidos, sendo identificadas a partir de audaciosos programas de bioprospecção iniciados na década de 1960, por iniciativa do *National Cancer Institute* (NCI - USA) (BRANDÃO et al., 2010).

Os alcaloides de vinca foram os primeiros fármacos antitumorais, de origem vegetal, utilizados na terapêutica a partir da década de 1960 (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Durante um amplo estudo em busca de novas substâncias hipoglicemiantes, foi observada uma significativa atividade citotóxica dessas substâncias sobre células leucêmicas. Posteriormente, verificou-se que os alcaloides da vinca alteram a estabilidade dinâmica dos microtúbulos por se ligarem a sítios específicos da β -tubulina, impedindo a polimerização de novos heterodímeros no microtúbulo. Durante a mitose, a instabilidade dinâmica dos microtúbulos é essencial para a formação do fuso mitótico, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e segregação das cromátides irmãs. Dessa forma, células em divisão, expostas aos alcaloides da vinca, ficam bloqueadas na mitose por ativação do ponto de checagem mitótico e, em geral, morrem por apoptose. (CRAGG; PEZZUTO, 2015; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Apesar da semelhança em termos de propriedades químicas, estas duas substâncias apresentam propriedades

específicas em relação à citotoxicidade e são indicadas para o tratamento de diferentes condições clínicas (BRANDÃO *et al.*, 2010). A vimblastina (**1**) tem indicação no tratamento de linfoma de Hodgkin e câncer de mama, enquanto que a vincristina (**2**) é preferencialmente utilizada contra leucemia linfoblástica grave e linfoma (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

O paclitaxel foi isolado inicialmente das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt., tendo sido identificado em meados de 1962 como um poderoso agente antitumoral, revolucionando a quimioterapia do câncer e estimulando inúmeros trabalhos de pesquisa em todo o mundo (CRAGG; NEWMAN, 2005). Em estudos iniciais, apresentou atividade antitumoral e antileucêmica. Posteriormente em estudos pré-clínicos e clínicos verificou-se sua proeminente eficácia contra tumores sólidos (ZHAO; MU; DU, 2016). Entretanto, após ser aprovado para uso clínico, a produção industrial de **3** a partir de fonte natural sofreu forte pressão de ambientalistas, em virtude da grande quantidade de árvores necessárias para sua produção, pois o seu rendimento era baixo. Como consequência, acentuou-se uma corrida por rotas sintéticas e métodos alternativos de obtenção do Taxol® por semissíntese. Posteriormente, foram descobertos dois de seus precursores biossintéticos, a baccatina III (**5, Figura 3, p.24**) e a 10-desacetil-baccatina III (**6, Figura 3, p.24**), isolados das folhas de várias espécies de *Taxus*. Esta descoberta viabilizou a obtenção semissintética de **3**, trazendo grande vantagem industrial ao método de extração original, sem a necessidade da derrubada de árvores (CRAGG; NEWMAN, 2005). O paclitaxel estabiliza os microtúbulos e altera, portanto, a instabilidade dinâmica dos microtúbulos, fato que retém as células em mitose. Esse composto vem sendo utilizado no tratamento de câncer de ovário, mama e pulmão. (CRAGG; PEZZUTO, 2015). Além do ineditismo e particularidade do complexo padrão estrutural do paclitaxel, a elucidação de seu mecanismo de ação, representou, à época, um achado importante para pesquisas relacionadas ao câncer. Estudos adicionais evidenciaram sua capacidade de induzir morte celular por diferentes mecanismos, contudo os detalhes das vias moleculares ativadas pelo paclitaxel ainda são motivos de estudo (LEE *et al.*, 2016). Apesar da sua atividade promissora como agente antitumoral, trata-se de um composto tóxico, justificando a obtenção de novos análogos. Posteriormente, através de semissíntese, obteve-se seu análogo mais potente o docetaxel (**7, Figura 3, p.24**), mas apesar de aumentar a eficácia ainda há

limitações em seu uso devido à baixa solubilidade, biodisponibilidade e toxicidade induzida pelo excipiente (ZHAO; MU; DU, 2016).

Outros fármacos importantes na história da terapêutica do câncer são a camptotecina (**4, Figura 3, p.24**) e seus derivados. A camptotecina é um alcaloide isolado de *Camptotheca acuminata* que possui atividade antitumoral atuando pela inibição de topoisomerase I (CHEN et al., 2015). Seu mecanismo de ação, também inovador, baseia-se na ligação ao complexo topoisomerase I-DNA, sendo formado um complexo ternário estável, impedindo a religação do DNA, o que leva a danos em sua estrutura, resultando em apoptose. No entanto, não foi utilizada na clínica por conta de suas propriedades farmacocinéticas inadequadas. Porém, foi o modelo de partida para o desenvolvimento do topotecano (**8**) e do irinotecano (**9, Figura 3, p.24**), análogos planejados na tentativa de solucionar problemas relacionados ao metabolismo, toxicidade, resistência e biodisponibilidade (CRAGG; PEZZUTO, 2015). O topotecano (**8**) pode ser utilizado no tratamento de câncer de ovário metastático quando o tratamento de primeira linha não funciona; já o irinotecano (**9**) é indicado ao tratamento de câncer de colorretal metastático em combinação com outros medicamentos. No entanto, ambos tem os efeitos adversos que limitam a dose a ser administrada (NUSSBAUMER et al., 2011).

Outro exemplo, a podofilotoxina (**10, Figura 3, p.24**) foi isolada em 1880 de *Podophyllum peltatum* que é conhecida como “mandrake americana” e se destacou pelo uso na medicina popular no tratamento de canceres de pele e verrugas. No entanto, sua estrutura química foi elucidada em 1950 (CRAGG; PEZZUTO, 2015). A partir do produto natural *epi*-podofilotoxina (**11, Figura 3, p.24**), que é um isômero de (**10**), foram desenvolvidos os derivados semissintéticos etoposídeo (**12**) e teniposídeo (**13, Figura 3, p.24**), sendo estes eficazes no tratamento de neoplasias brônquicas e linfomas (CRAGG; NEWMAN, 2005). Esses fármacos atuam como inibidores da DNA topoisomerase II, uma enzima que induz a quebra momentânea nas duas fitas de DNA para relaxar a tensão torsional gerada durante os processos de replicação e transcrição. Os compostos que atuam como inibidores dessa enzima podem aumentar o período que as duas fitas permanecem quebradas e assim as células ativam a via de apoptose (BRANDÃO et al., 2010). O etoposídeo (**12**) foi desenvolvido por cientistas da Sandoz, na busca por melhorar a atividade da podofilotoxina (**10**). De fato, utilizando como estratégia de conjugação com glicosídeo, foi possível melhorar o perfil

de atividade anticâncer de **10** em relação ao etoposídeo, reduzindo ainda seus efeitos adversos (BASMADJIAN et al., 2014).

A piperina (**14, Figura 3, p.24**) é um alcaloide piperidínico insaturado, presente em várias espécies do gênero *Piper* incluindo *P. nigrum* e *P. longum*. É mais abundante nos frutos de *P. nigrum*, espécie popularmente conhecida como pimenta-do-reino (FERREIRA et al., 2012). A piperina apresenta diversas ações farmacológicas, as quais incluem atividades anti-inflamatória, antimutagênica e antimetastática (LIN et al., 2014). Por estas propriedades, vários estudos apontam a piperina como um adjuvante no tratamento de doenças que envolvem estresse oxidativo incluindo o câncer.

O efeito antitumoral da piperina tem sido investigado em diferentes tipos de tumor como, por exemplo, os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon (CHENG, Y.-T.; YANG; SHYUR, 2016). A piperina mostrou-se efetiva em inibir proliferação e migração de células tumorais derivadas de câncer de mama (DO et al., 2013). Estudo recente mostrou que a piperina inibe a proliferação de células derivadas de câncer de mama triplo negativo, sem afetar o crescimento de células do epitélio mamário normal (GREENSHIELDS et al., 2015). Estudo mostrou também que a piperina tem efeito antiangiogênico sobre tumores sólidos (QU; LV; XU, 2015). Além disso, aumenta o efeito citotóxico da curcumina contra células-tronco derivadas de câncer de mama (KAKARALA et al., 2010). Diante deste conjunto de dados, a piperina pode ser considerada um modelo molecular interessante e inspirador no planejamento de substâncias com padrão estrutural inédito, buscando novas entidades químicas com atividade antitumoral que preservem em parte os atributos estruturais do modelo natural.

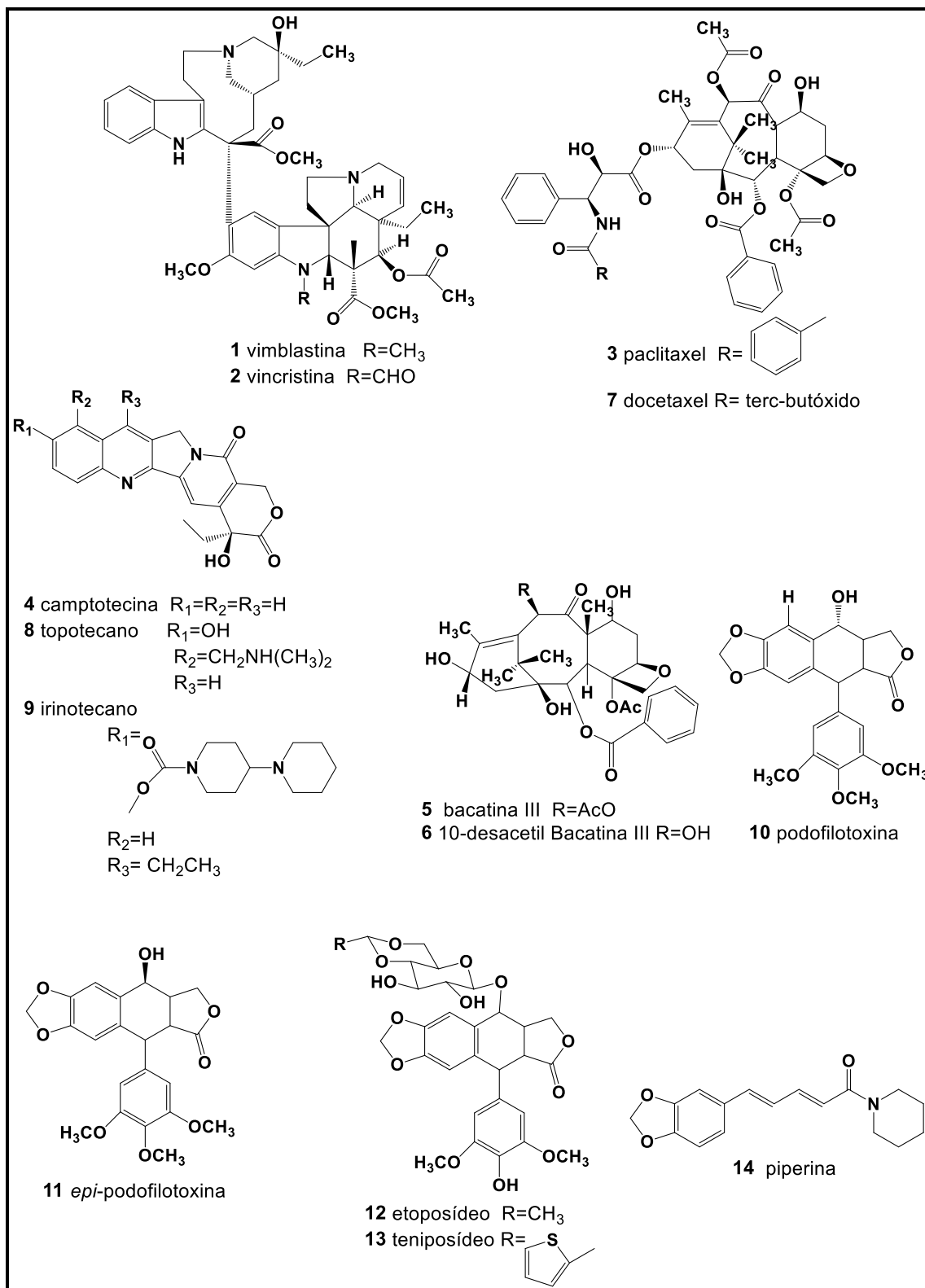


Figura 3 - Estrutura de produtos naturais e derivados
 Fonte: Do autor.

Embora a abordagem terapêutica do câncer varie em decorrência do tipo de tumor e do estágio em que a doença se encontra, em geral, os tratamentos são baseados em ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (CRAGG; PEZZUTO, 2015). Apesar da alta diversidade química e dos diferentes mecanismos de ação, os quimioterápicos atualmente empregados, ainda são pouco eficientes contra alguns tipos de câncer (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Além disso, de modo geral, os quimioterápicos apresentam elevada toxicidade. Assim sendo, a associação medicamentosa tem sido a única alternativa para melhorar as propostas de tratamento para o câncer. Entretanto, muitos deles, mostram-se resistentes aos protocolos quimioterapêuticos baseados na combinação de medicamentos. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novos protótipos que sejam mais eficientes e menos tóxicos e, ainda, que apresentem melhores parâmetros farmacocinéticos (CHENG, Y.-T.; YANG; SHYUR, 2016). Neste contexto, os produtos naturais se destacam como fontes de novos fármacos ou, ainda, como fonte de protótipos moleculares para a obtenção de fármacos estruturalmente inovadores, via síntese ou semissíntese. A exemplo disso, dados demonstram que desde a década de 1940 até o final de 2014, cerca de 175 agentes quimioterapêuticos foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sendo que destes, 75% estão relacionados a produtos naturais, com 49% sendo oriundos de produtos naturais isolados ou de seus derivados. Salientando até hoje a sua importância no desenvolvimento de um fármaco (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Nos últimos anos, o avanço no entendimento da fisiopatologia do câncer e do papel das proteínas-quinases nas vias de sinalização que modulam proliferação, diferenciação, migração e morte celular levaram ao planejamento e à descoberta de pequenas moléculas, como sorafenibe (15), sunitinibe (16), refametinibe (17), tipifarnibe (18), selumetinibe (19, **Figura 4**), as quais têm sido empregadas no tratamento do câncer. Essas moléculas compõem uma nova geração de fármacos e de candidatos a fármacos antineoplásicos, genericamente conhecida por tinibes que, em geral, atuam como inibidores de diferentes proteínas-quinase ou de quinases específicas (CUI, 2014). O sorafenibe, por exemplo, trata-se de inibidor de múltiplas quinases e tem sido empregado no tratamento de alguns tipos de tumores incluindo carcinoma hepatocelular e carcinoma de rim. Embora os ensaios clínicos tenham mostrado aumento na sobrevivência dos pacientes, os efeitos ainda são modestos. Portanto, o desenvolvimento de novas entidades químicas continua a ser de

importância capital, podendo contribuir na melhoria de propostas terapêuticas ao tratamento do câncer (DA SILVA et al., 2014).

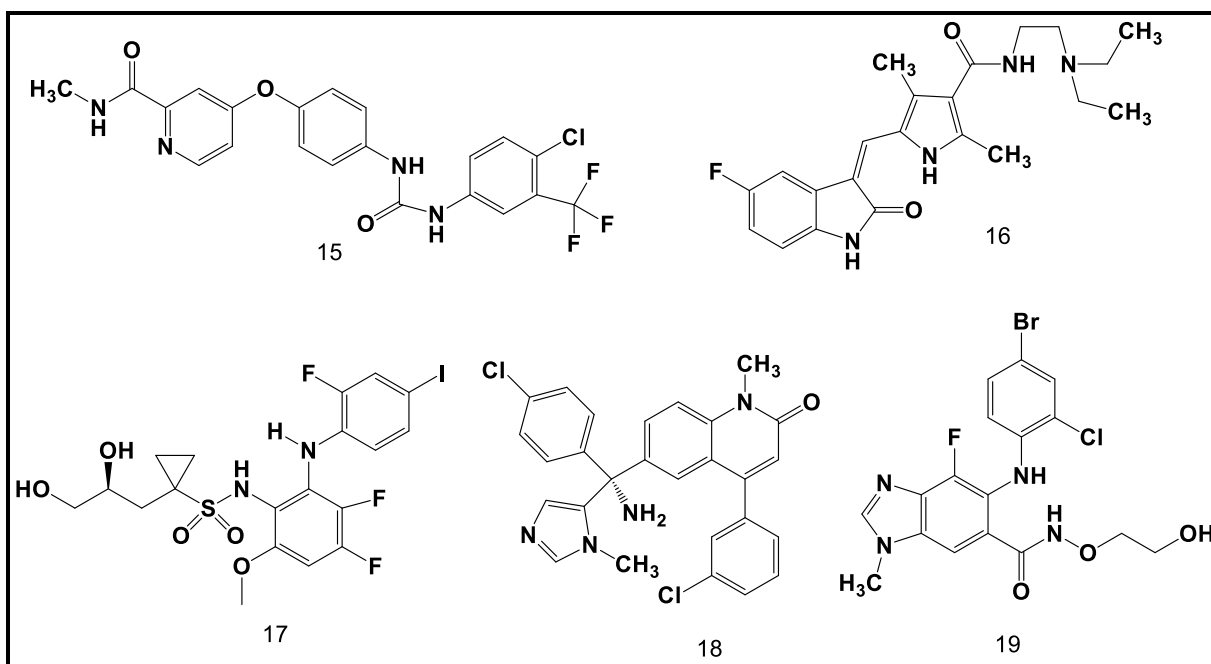


Figura 4 - Estruturas de exemplos de fármacos com potencial antitumoral.

Fonte: Do autor

2.3 N-ACILIDRAZONAS COMO DESTAQUE NA BUSCA DE FÁRMACOS ANTICÂNCER

A subunidade *N*-acilidrazona (NAH) é considerada uma estrutura privilegiada, uma vez que está presente em diversas moléculas bioativas, podendo se ligar a mais de um biorreceptor, e vem sendo utilizada como fragmento molecular em candidatos a protótipos de fármacos desde a década de 1970 (MAIA; TESCH; MANSSOUR FRAGA, 2014). Na literatura, há diversos exemplos de substâncias sintéticas com a subunidade estrutural *N*-acilidrazônica, possuidores de diversas atividades biológicas, dando destaque também para compostos com atividade citotóxica.

O composto ativador de pro-caspase, (PAC-1, **Figura 5, 20**) foi identificado via *high-throughput screening* (HTS) e atua como ativador direto da pro-caspase 3 dependente da quelação de zinco, induzindo a apoptose. No entanto, estudos demonstram a sua capacidade de induzir neurotoxicidade. Outrossim, PAC-1 se mostrou um agente promissor na terapêutica do câncer e vem sendo utilizado como modelo no desenvolvimento de novos candidatos a fármaco (AZIZ et al., 2010; ROTH et al., 2015). Com o objetivo de variar as propriedades farmacológicas e

farmacocinéticas de PAC-1, já foram sintetizados mais de 1000 derivados, tendo sido confirmada importância farmacofórica da subunidade *orto*-hidroxi-*N*-acilidrazona. Foram também descritas diferentes variações estruturais de PAC-1, cujos análogos mantiveram a atividade previamente observada ou então mostraram-se mais ativos que o protótipo original (ROTH; HERGENROTHER, 2016).

Acilidrazonas vem sendo cada vez mais estudadas devido suas propriedades farmacológicas, incluindo a atividade anticâncer. Derivados de ácido *N*-(2-trifluormetilpiridin-4-il)antranílico, mostraram potente atividade citotóxica, sendo observados efeitos em concentrações da ordem de nM, nos compostos **21- 24** com largo espectro de inibição. Além disso, alguns compostos apresentaram baixa toxicidade, o que estimula maiores estudos no sentido de se obter novos fármacos antitumorais (CONGIU; ONNIS, 2013).

A subunidade *N*-acilidrazona foi utilizada como “link-bridge” no planejamento de análogos de combretastatina-A4 (CA-4), levando à obtenção do derivado **25** que possui potente atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens de células, principalmente em carcinoma de pulmão, sendo mais potente que CA-4 e um antimetabólito promissor no tratamento do câncer. Tal composto apresentou atividade antiproliferativa, com menor citotoxicidade quando testado em três linhagens de células normais, tais como de rim embrionário humano (293T), macrófago humano e hepatócito fetal humano (L02). Estudos adicionais demonstraram sua capacidade de inibir a polimerização da tubulina, alteração na formação dos fusos mitóticos e eficácia na inibição de tumor xenoinxertado com células de carcinoma pulmonar (A549). Além disso, a subunidade acilidrazona confere aumento de polaridade, contribuindo para a hidrossolubilidade do composto, um aspecto relevante para uma melhor atividade antitumoral (DUAN et al., 2016). Em outro trabalho, também utilizando a combretastatina-A4 como molécula-protótipo, foi identificado o composto **26** como um candidato a fármaco antitumoral promissor, devido a sua capacidade de inibir polimerização de microtúbulos *in vitro* e ação antiproliferativa *in vivo*. Além disso, foi observada uma maior seletividade de **26** quando comparado aos efeitos de CA-4 (AMARAL et al., 2014).

As estruturas químicas de PAC-1 (**20**) e do sorafenibe (**15, Figura 4**), que possuem as subunidades farmacofóricas *N*-acilidrazona e diarilureia, respectivamente, foram utilizadas como modelo no planejamento de novos candidatos a fármacos híbridos antitumorais. Dentre uma série de compostos avaliados, o

derivado **27** foi identificado com atividade citotóxica superior aos de referência (ZHAI et al., 2013). Derivados furanil-acilidrazônicos também merecem destaque como candidatos a fármacos por seu efeito contra linhagens de células de leucemia promielocítica (HL-60), salientando o composto **28** ($IC_{50}= 16,4 \mu M$), mais potente que a doxorubicina ($IC_{50}=53,3 \mu M$), utilizada como substância controle (CUI, Z. et al., 2010).

Nos últimos anos, a histona desacetilase (HDAC) tem sido relatada como um novo e importante alvo terapêutico para o tratamento do câncer. A inibição desta enzima vem sendo explorada com o intuito de conseguir-se bloquear o crescimento, diferenciação e estimular a apoptose de células transformadas. Atuando por este mecanismo de ação, derivados *N*-acilidrazônicos, tais como os compostos **29** e **30** foram capazes de induzir apoptose pela ativação de caspases 3/7 e pela interrupção do ciclo celular na fase G2/M, respectivamente (RODRIGUES et al., 2016).

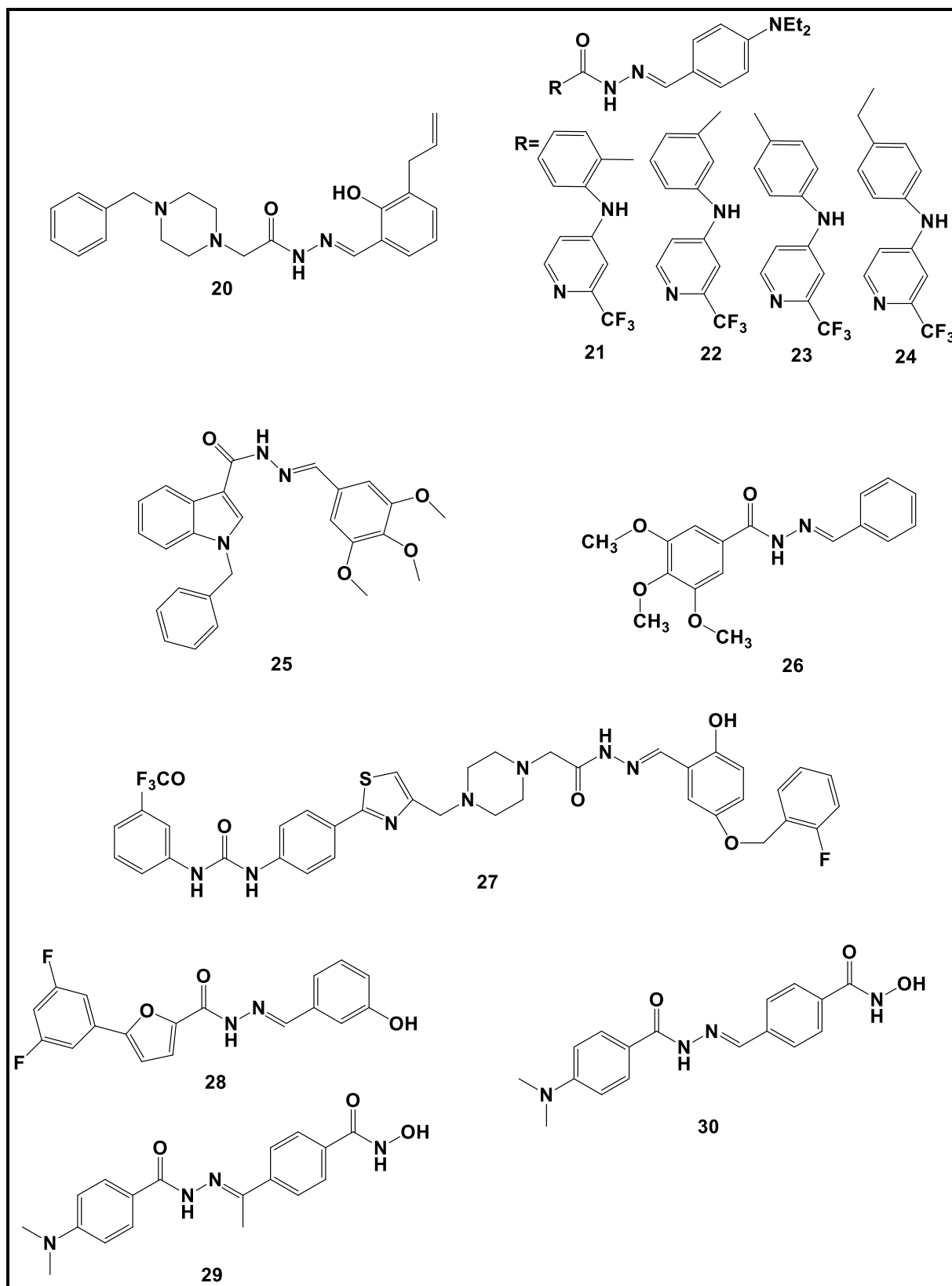


Figura 5 - Exemplos de acilidrazonas com atividade antiproliferativa
 Fonte: Do autor.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diante dos protocolos atualmente disponíveis para o tratamento do câncer, sabe-se que as taxas de mortalidade continuam elevadas. Além disso, alguns tipos de câncer não respondem de forma significativa aos tratamentos disponíveis, o que exige estudos prospectivos contínuos, na academia e na indústria, visando à descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais que sejam eficientes, seletivos, pouco tóxicos e, preferencialmente, mais acessíveis economicamente.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa decidiu estudar o potencial antitumoral de uma série homóloga de derivados *N*-benzil-(5-hidroxi-piperidinil-acilidrazônicos, que foi planejada originalmente como candidatos a protótipos de fármacos contra a doença de Alzheimer, com estrutura baseada no donepezil (**31**, **Figura 5**). Contudo, durante a avaliação do potencial genotóxico, alguns desses compostos revelaram uma possível atividade antiproliferativa sobre células derivadas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (resultados ainda não-publicados).

Até o momento, não há na literatura relatos sobre derivados do tipo *N*-benzilpiperidínicos acilidrazônicos (**32**, **Figura 6**) com atividade antitumoral. No entanto, a piperina (**14**, **Figura 3**), apresenta significativa propriedade antiproliferativa, assim como o derivado da embelina (**33**), a combretastatina (**34**, **Figura 6**) e outros derivados apresentados na revisão bibliográfica, que preservam similaridade estrutural com o padrão molecular da série-alvo (**32**, **Figura 6**) deste projeto, incluindo o sistema *N*-benzilpiperidínico da embelina, as subunidades piperidinila e aril-conjugada da piperina e o sistema *N*-acil-arilidrazônico de derivados da combretastatina-A4. Como um exemplo recente, o derivado benzilpiperidínico (**33**, **Figura 6**) da embelina (SINGH et al., 2014) apresentou o melhor perfil de atividade dentre vários outros análogos estruturais da embelina, atuando na indução de apoptose. Outros estudos, apontam o potencial citotóxico de *N*-acilidrazonas, padrão molecular considerado uma estrutura privilegiada devido à facilidade de funcionalização e a capacidade de modulação de diferentes alvos de ação dependendo do tipo de substituintes, levando à uma variedade de classes químicas e variado perfil de atividade (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007). Um exemplo é o composto acilarilidrazônico **34**, com significativa atividade antiproliferativa *in vivo*, capaz de atuar na inibição da polimerização de microtúbulos e com melhor

citotoxicidade seletiva do que seu produto de origem, a combretastatina-A4 (AMARAL et al., 2014).

Neste contexto, a série-alvo **32** deste projeto representa um novo padrão estrutural para substâncias com potencial antitumoral, conservando a subunidade piperidínica da piperina (**14**, **Figura 6**), agora inserida num fragmento *N*-benzilpiperidínico, estruturalmente relacionado à subunidade retroisostérica presente em **33**, além de uma subunidade acilidrazônica ligada a uma outra subunidade aromática, comum ao derivado **34** (**Figura 6**), com padrão de substituição diversificado.

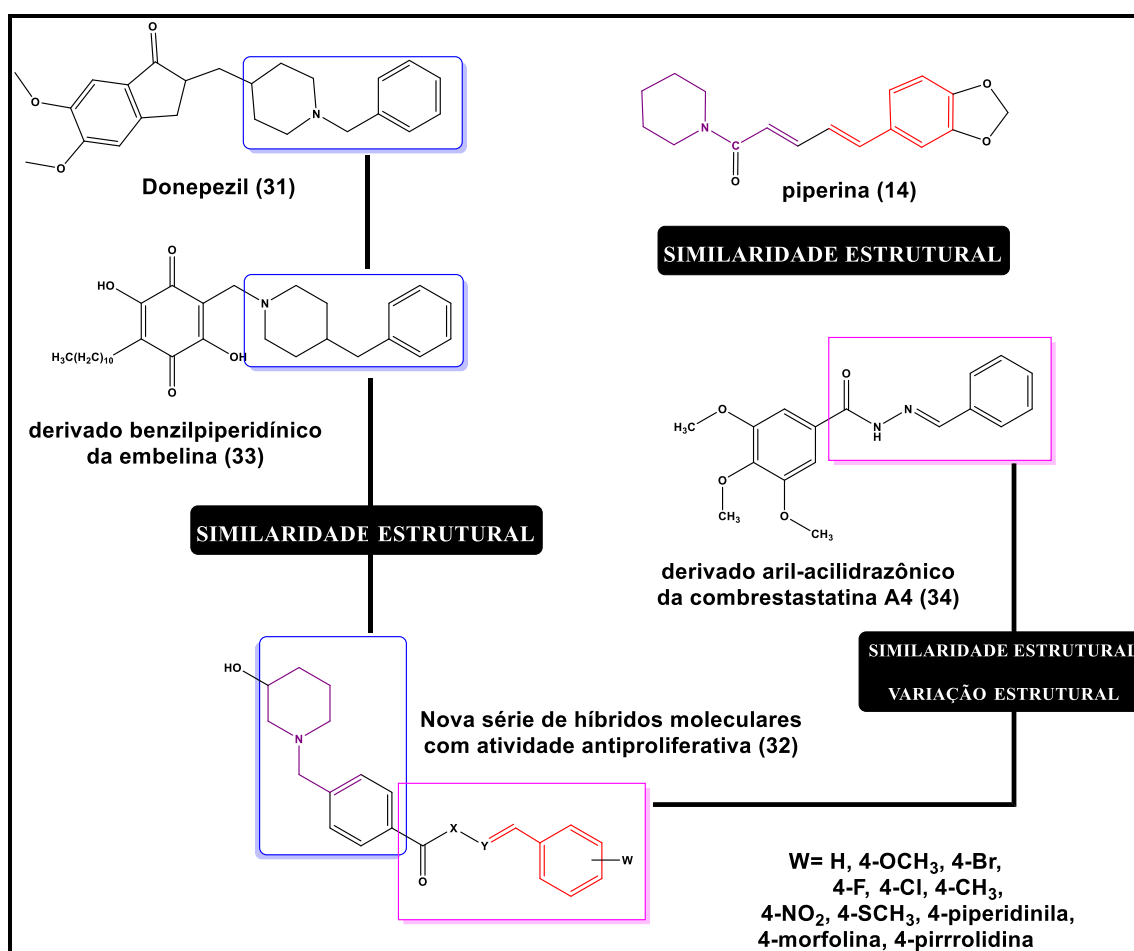


Figura 6- Desenho estrutural de híbridos moleculares *N*-benzil-piperidínicos acilidrazônicos (**32**) com propriedades antiproliferativa

Fonte: Do autor

3.1 OBJETIVO GERAL

Síntese e avaliação do potencial antiproliferativo de uma série de compostos *N*-benzil-piperidinil-acilidrazônicos **32** sobre células derivadas de tumores humanos. Estudar a relação estrutura-atividade e a identificação de possível substância-líder para avaliação do potencial antitumoral desses compostos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Síntese da série de derivados *N*-benzil-piperidínicos acilidrazônicos **32a-k**;
- b) Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* da série-alvo contra quatro diferentes linhagens de cânceres humanos: Carcinoma de pulmão (A549), Carcinoma de mama (MCF-7), melanoma (HT144), carcinoma hepatocelular (HepG2);
- c) Determinação do perfil de seletividade do composto-líder;
- d) Avaliação da capacidade do composto-líder em inibir a capacidade clonogênica e interferir na progressão do ciclo celular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos e discutidos os resultados obtidos neste trabalho.

4.1 QUÍMICA

Em seguida os resultados químicos envolvidos neste trabalho.

4.1.1 4-((3-hidroxipiperidin-1-il)benzoato de metila (37)

A primeira etapa sintética consistiu em uma reação de aminação reductiva e baseou-se no trabalho de Lima e colaboradores (2002). Utilizou-se como material de partida o 4-formilbenzoato de metila comercial (35) e 3-hidroxipiperidina comercial (36) a temperatura ambiente, na presença de $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{ZnCl}_2/\text{MeOH}$ que forneceu o éster *N*-benzilpiperidina (37).

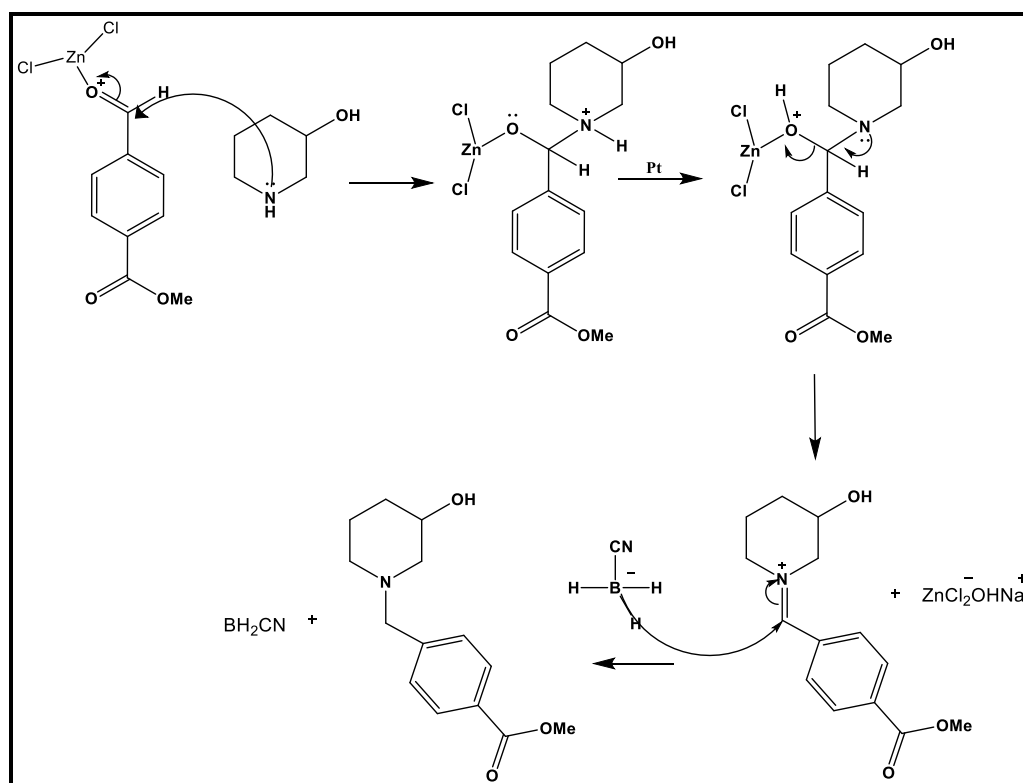


Figura 7 - Mecanismo de aminação reductiva entre 4-formilbenzoato de metila (35) e 3-hidroxipiperidina (36) para obtenção do *N*-benzilpiperidinil éster metílico (37).

Fonte: Do autor.

Acredita-se que o agente redutor seria uma mistura de sais de complexos de zinco tais como: $\text{Na}[\text{ZnCl}(\text{BH}_3\text{CN})_2]$, $\text{Na}_2[\text{ZnCl}_2\text{-(BH}_3\text{CN)}_2]$, $\text{Na}[\text{Zn}(\text{BH}_3\text{CN})_3]$, e $\text{Zn}(\text{BH}_3\text{CN})_2$, onde o zinco atuaria com ácido de Lewis, complexando-se ao oxigênio da aldoxila, tornando-a mais eletrofílica e facilitando a transferência de hidreto (KIM et al., 1985). Na reação de aminação redutiva, 3-hidroxipiperidina (**36**) realiza um ataque nucleofílico a carbonila do formil-éster **35** ativada, devido a complexação com o cloreto de zinco. Em seguida, por prototropismo verifica-se a saída de $\text{ZnCl}_2\text{OHNa}^+$ e com posterior deslocalização do par de elétrons do nitrogênio para formação de um intermediário imínico (KIM et al., 1985). Na sequência, o agente redutor cianoborohidreto de sódio transfere um hidreto para o átomo de carbono do intermediário imínico levando a obtenção do composto **37**.

O agente redutor cianoborohidreto de sódio vem sendo bastante utilizado em aminação redutiva, tendo sido introduzido nessas reações em 1971. Empregado para obter redução seletiva da dupla ligação carbono-nitrogênio na presença de aldeídos ou cetonas, pois o ligante ciano (do cianoborohidreto de sódio) é retirador de elétrons e com isso diminui sua reatividade quando comparado ao borohidreto de sódio (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1971). A manutenção do pH entre 5-6 é importante, pois em pHs mais baixos a amina é protonada e deixa de ser nucleofílica.

O produto bruto obtido foi purificado por cromatografia em coluna e acompanhado por cromatografia em camada delgada, levando ao derivado 4-((3-hidroxipiperidin-1-il)benzoato de metila (**37**) com rendimento de 90%.

A elucidação estrutural do composto **37** foi feita por análise dos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e infravermelho (IV).

Através do espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (**Figura 8**) foram observadas as principais bandas esperadas para a estrutura da substância **37**: em 3335 cm^{-1} banda larga e intensa referente a deformação axial de OH; em 2937 cm^{-1} e 2792 cm^{-1} característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH_2 ; em 2859 cm^{-1} deformação axial de CH_3 ; em 2359 cm^{-1} e 2341 cm^{-1} são característicos da presença de CO_2 no momento da análise; em 1609 cm^{-1} deformação axial do carbono carbonílico ($\text{C}=\text{O}$) e duas bandas de C-O em 1277 cm^{-1} e 1057 cm^{-1} que são características de éster. O alargamento da banda em 1277 cm^{-1} pode corresponder a sobreposição de C-N e C-O.

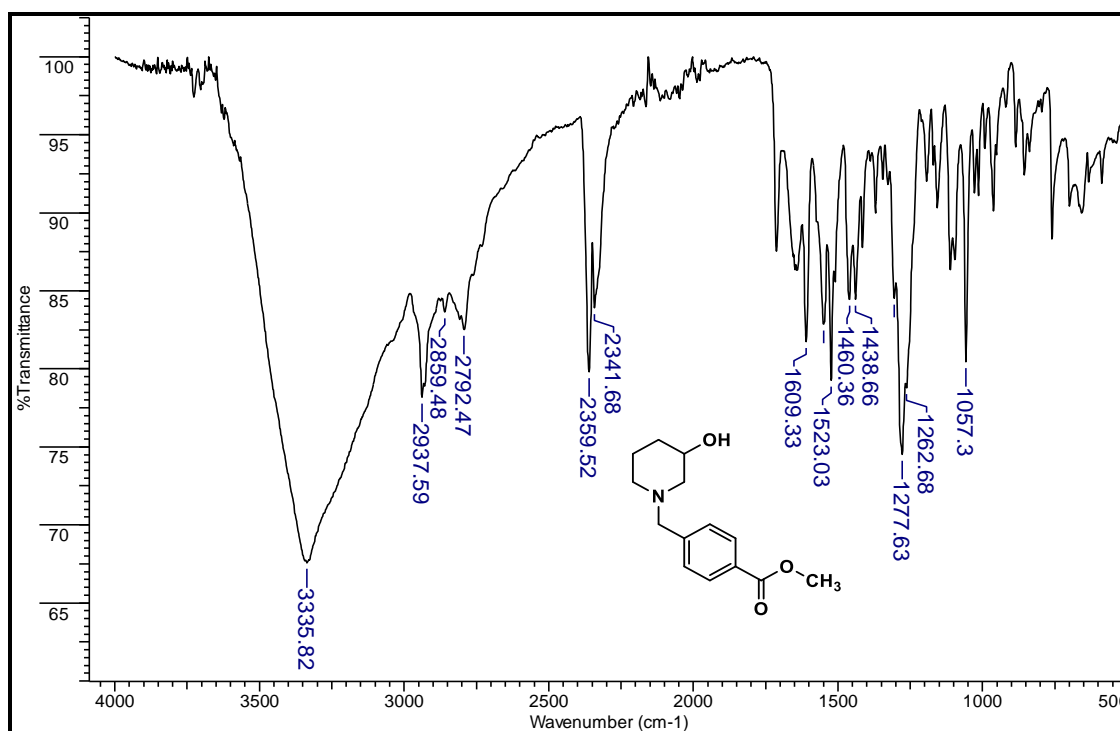


Figura 8 - Espectro de absorção na região do IV de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)benzoato de metila (ATR) (**37**).

Fonte: Do autor.

A análise de **37** por RMN de ¹H revelou um aumento do deslocamento químico de hidrogênios do anel piperídínico. Este fato pode ser explicado por efeitos eletrônicos, influência dos substituintes R1 e R2 e pela conformação cadeira, o que permite que os hidrogênios em posições axiais (Ha) e equatoriais (He) podem ser observados separadamente. Em, geral, os átomos de H equatoriais se apresentam mais desblindados do que os axiais, uma vez que aqueles átomos estão em conformação *syn* com o par de elétrons livre do N. Diante disso, e de acordo com a análise de do mapa de contorno HSQC (**Figura 12**), foi possível realizar a atribuição dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios piperidínicos (RUBIRALTA; GIRALT; DIEZ, 1991).



Figura 9 - Interações conformacionais de sistemas piperídnicos com influência diferenciada no ambiente químico de átomos de hidrogênio em posições axiais e equatoriais.
Fonte: Adaptado de RUBIRALTA; GIRALT; DIEZ, 1991.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 10) do composto **37**, foi observada a presença dos seguintes sinais: dois dupletos em 7,96 e 7,43 ppm referentes, respectivamente, aos H-10, H-12 ($J=8,2$) e H-9 e H-13 ($J=8,1$). Simpleto em 3,9 ppm referente aos três hidrogênios metoxílicos, multipletos entre 3,62- 3,70 ppm referente ao simpleto em 3,57 ppm referente ao H-7. Além destes, foram observados cinco multipletos e dois dupletos na região de 2,86- 1,15 ppm referentes aos hidrogênios pertencentes ao anel piperídínico característicos da subunidade 3-hidroxi-*N*-benzil-piperidínica (Tabela 1, Apêndice A).

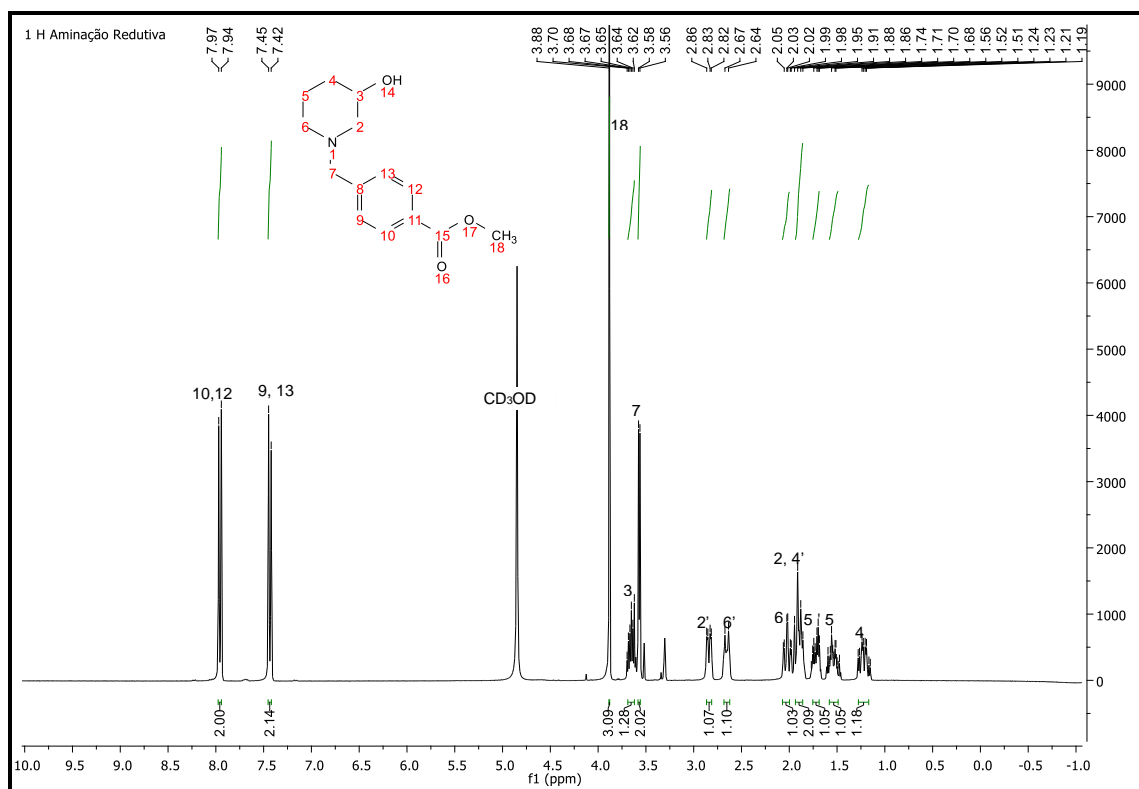


Figura 10 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300MHz) de 4-((3-hidroxi-piperidin-1-ila)benzoato de metila (**37**)

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto (**37**) (**Figura 11**) observou-se a presença dos seguintes sinais: em 167 ppm referente ao carbono carbonílico C-15. Sinais dos carbonos do núcleo aromático em 143,3 ppm referente ao C-8, em 129,1 ppm referente aos C-9, C-10, C-11, C-12 e C-13. Sinal em 62,2 ppm referente ao C-7 que está localizado entre os anéis aromático e piperidínico; em 51,2 ppm referente ao carbono metoxílico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,5 ppm, 60,3 ppm, 53,0 ppm, 32,4 ppm e 22,6 ppm, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (**Tabela 1**, Apêndice A).

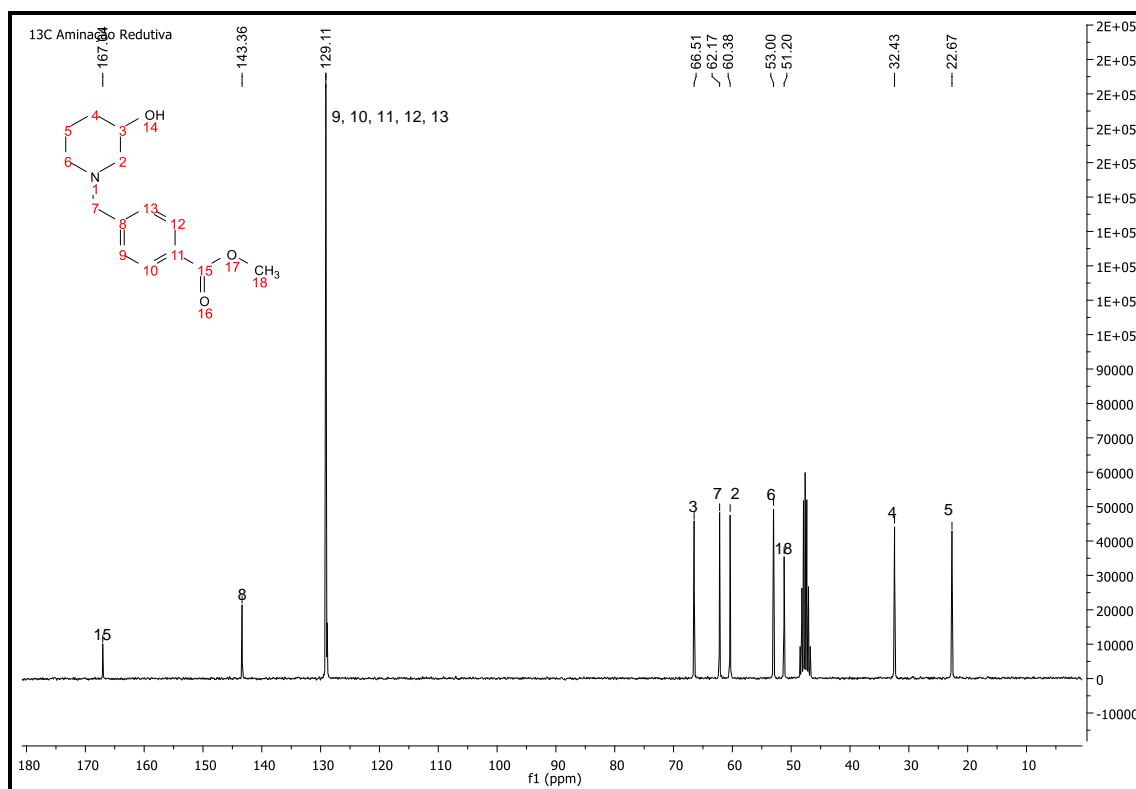


Figura 11 - Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)benzoato de metila (**37**)

Fonte: Do autor

Para que fosse possível uma atribuição inequívoca dos hidrogênios relativos ao núcleo piperidínico, foi obtido mapa de correlação HSQC (**Figura 12**). Numa análise conjunta deste, com os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , os deslocamentos químicos dos H-2, H-4 e H-5 e H-6 (numeração pelo Programa *MestreNova*), pertencentes ao núcleo piperidínico do éster **37**, foram adequadamente identificados, conforme descrito na **Tabela 1**. Segundo dados da literatura (RUBIRALTA; GIRALT; DIEZ, 1991), sabe-se que em anéis piperidínicos em conformação cadeira, os

hidrogênios em posição equatorial sofrem efeito de desblindagem maior que os axiais. Desta forma, foi possível atribuir os sinais dos multipletos centrados em 2,83 e 2,02 a H-2_{eq} e H-2_{ax}, respectivamente; 2,65 e 2,05 a H-6_{eq} e H-6_{ax}, respectivamente; 1,88 e 1,22 a H-4_{eq} e H-4_{ax}, respectivamente e 1,71 e 1,53 a H-5_{eq} e H-5_{ax}, respectivamente.

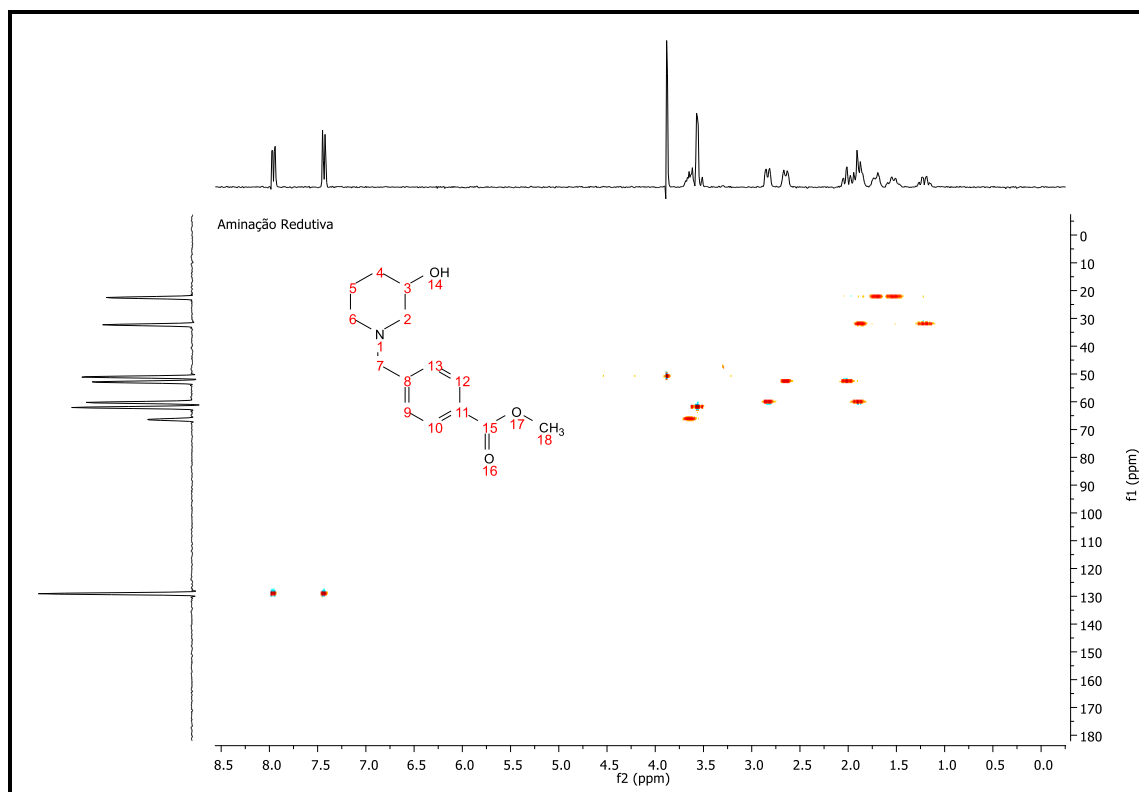


Figura 12 -Mapa de correlação HSQC (300MHz, CD₃OD) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)benzoato de metila

Fonte: Do autor.

4.1.2 4-((3-hidroxipiperidin-1-il) metileno) benzoidrazida (38)

O éster *N*-benzilpiperidínico (**37**) foi submetido à uma reação de hidrazinólise com monohidrato de hidrazina (NH₂NH₂·H₂O) a temperatura ambiente e etanol, dando origem à hidrazida (**38**), intermediário-chave na rota sintética proposta, com um rendimento de 94% após purificação em coluna cromatográfica em sílica-gel.

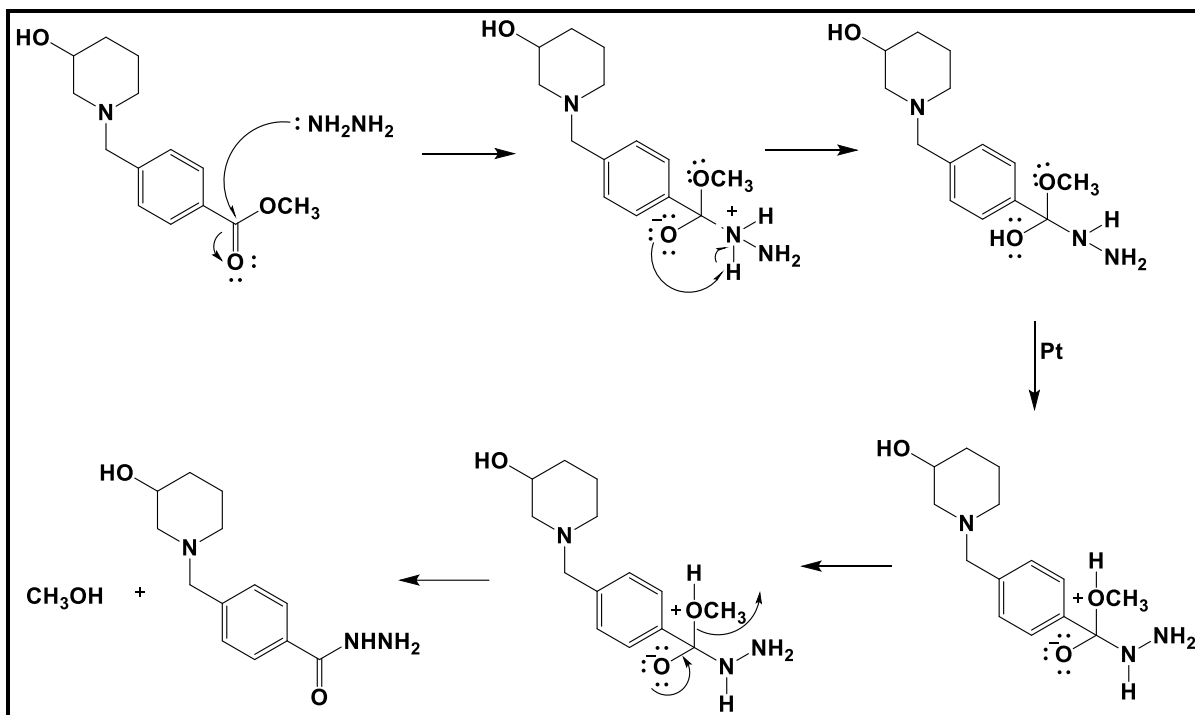


Figura 13 - Mecanismo de obtenção da hidrazida (38), a partir da reação do éster (37)
 Fonte: Do autor.

Na reação de hidrazinólise, ocorre com um ataque nucleofílico pelo monodrato de hidrazina à carbonila do éster (37), posteriormente par de elétrons livre no oxigênio abstrai próton na subunidade NH_2NH_2 , e ocorre prototropismo. Seguido do restabelecimento da carbonila com a saída de uma molécula de metanol, obtendo-se a amida (38), conforme o mecanismo na **Figura 13**. (ROMEIRO et al., 2009).

A elucidação estrutural do composto 38 foi feita por análise dos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e infravermelho (IV).

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 14**) foram observadas as principais bandas características da estrutura do composto 38. Em 3296 cm^{-1} banda correspondente a deformação axial de OH que sobrepõe bandas de deformações axiais de N-H; em 2939 cm^{-1} e 2815 cm^{-1} característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH_2 ; em 2360 cm^{-1} e 2341 cm^{-1} são característicos da presença de CO_2 no momento da análise; em 1611 cm^{-1} banda referente a deformação axial do carbono carbonílico ($\text{C}=\text{O}$) característico de amida; em 1548 cm^{-1} e 1303 cm^{-1} bandas de deformação angular de N-H.

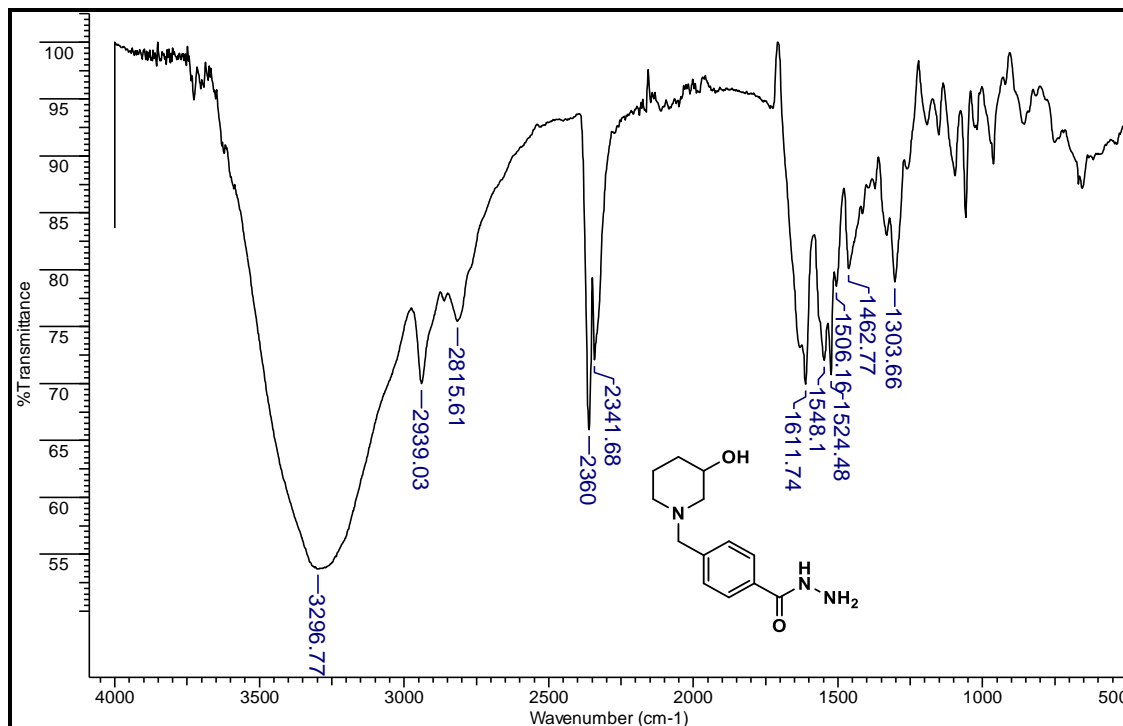


Figura 14 - Espectro de absorção na região do IV de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno) benzoidrazida (**38**).

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 15**) observou-se os seguintes sinais: dos dois dupletos em 7,75 ppm e 7,42 ppm referentes, respectivamente, aos hidrogênios aromáticos H-10, H-12 ($J=7,8$) e H-9, H-13 ($J=7,8$). Multiplete entre 3,67-3,63 ppm referente ao H-3. Em 3,57 ppm foi observado o simpleto relativo a H-7, além dos sinais de hidrogênios referentes ao núcleo piperidínico na região de 2,87-1,21 ppm. Além de ausência do simpleto em 3,9 ppm, referente aos hidrogênios metílicos, característicos do material de partida (**37**) do qual foi obtido a hidrazida (**38**) (**Tabela 2**, Apêndice A).

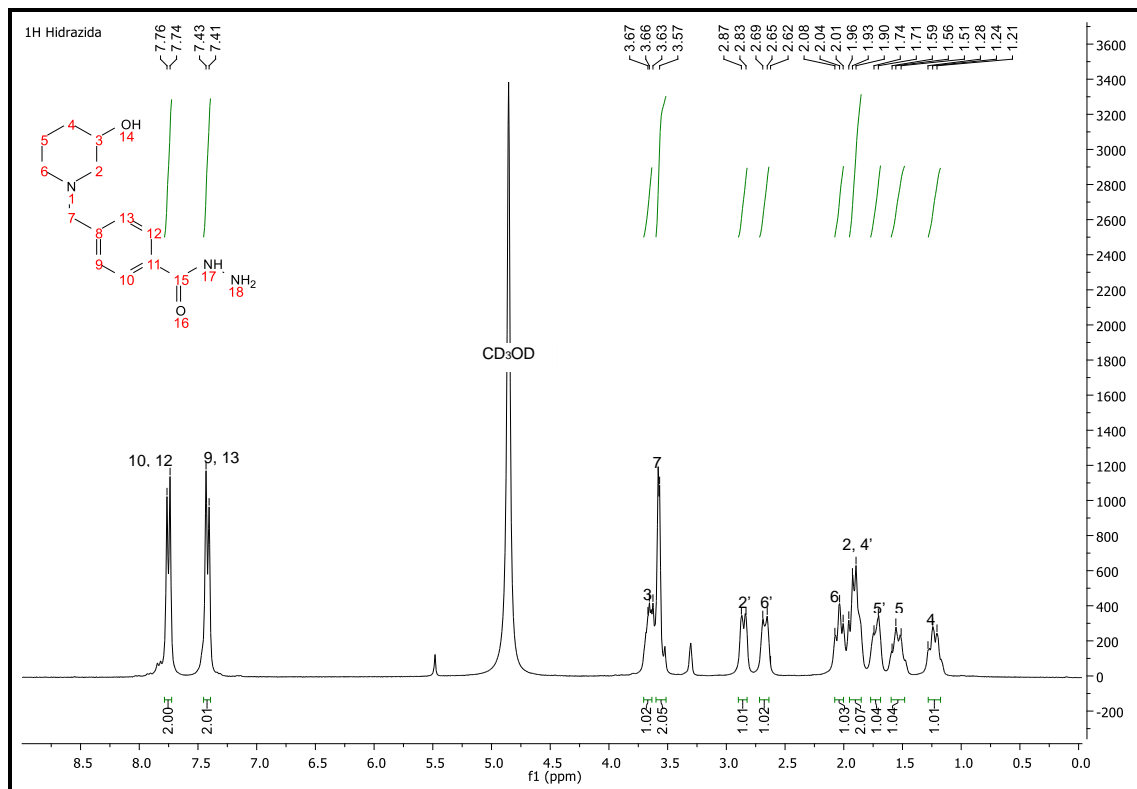


Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno) benzoidrazida (**38**)

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 16**) observou-se a presença dos seguintes sinais: em 168 ppm referente ao carbono carbonílico C-15; sinais referentes aos carbonos do núcleo aromático em 141,3 referente ao C-8, em 131,8 ppm referente ao C-11, em 129,2 ppm referentes aos C-10 e C-12, em 126,8 ppm referente aos C-9 e C-13. Em 62,1 ppm referente ao C-7 que está localizado entre o núcleo aromático e piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,4 ppm, 60,2 ppm, 52,9 ppm 32,4 ppm e 22,5 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5. Além de ausência do sinal em 51,2 ppm referente ao carbono da metoxila presente no material de partida do qual foi obtido a hidrazida, sugerindo que seja a estrutura do composto **38** (**Tabela 2**, Apêndice A).

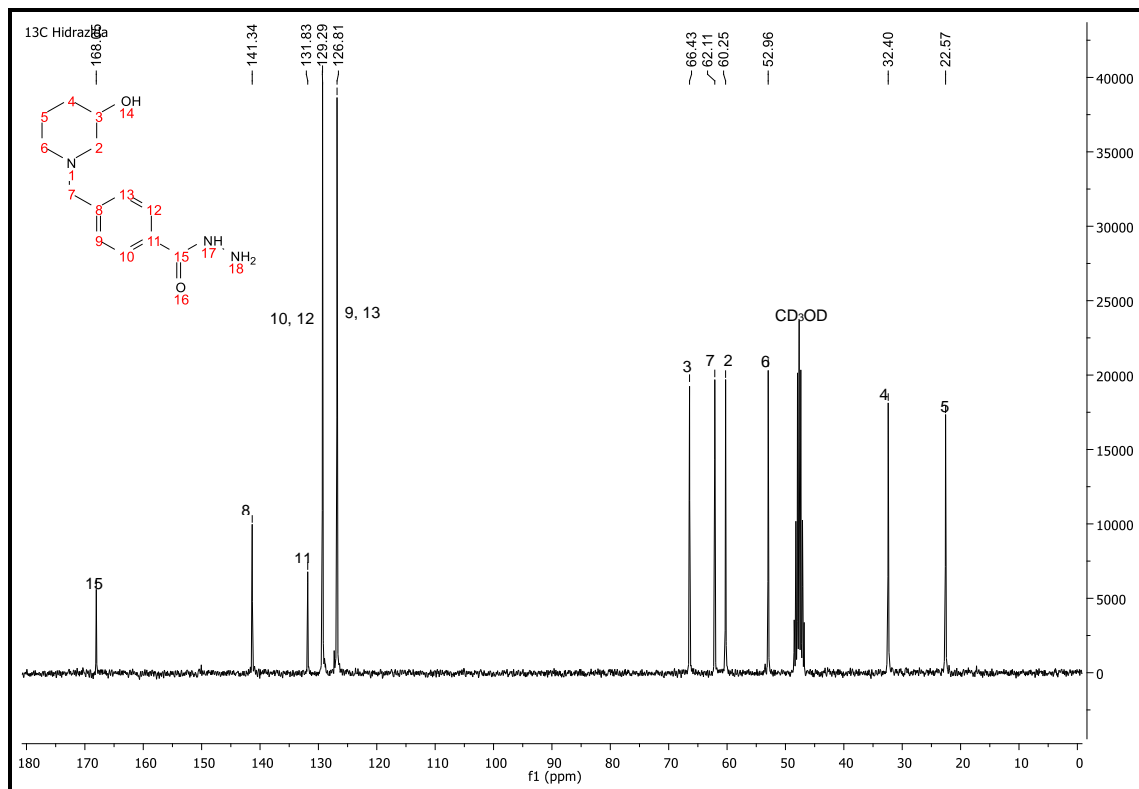


Figura 16 - Espectro de RMN de ¹³C (CD₃OD, 75MHz) de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno) benzoidrazida (**38**)

Fonte: Do autor.

4.1.3 Obtenção da série de *N*-benzil-piperidinil-acilidrazonas-alvo

Para a obtenção da série de derivados *N*-benzil-piperidinil-acilidrazônicos-alvo, foram realizados acoplamentos de diferentes benzaldeídos com a hidrazida **38**, intermediário-chave para a rota sintética. Abaixo, na **Tabela 3**, seguem os rendimentos referente a cada composto obtido e nos tópicos subsequentes a sua identificação.

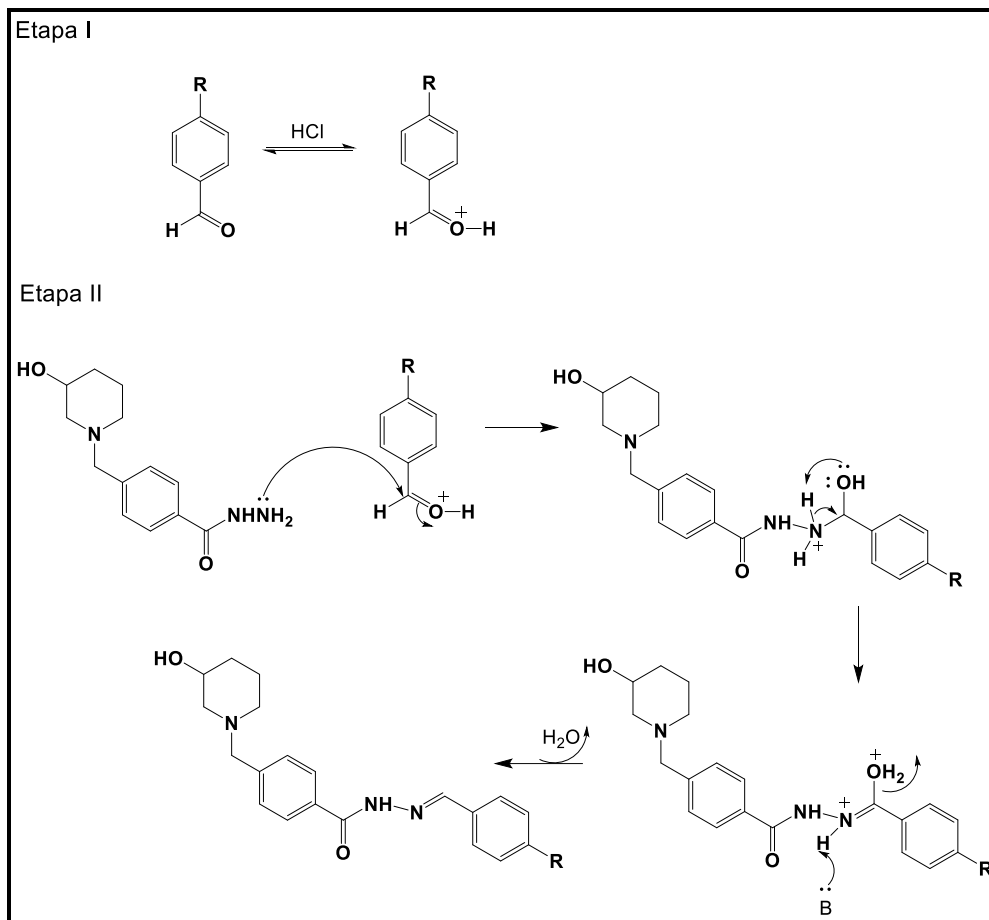
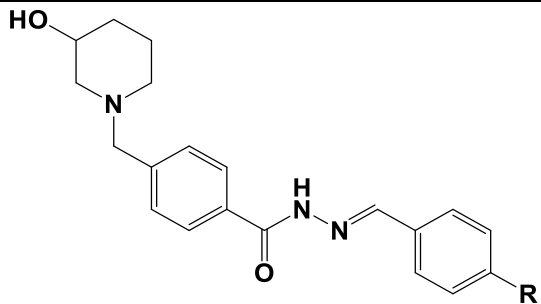


Figura 17 - Mecanismo de acoplamento da hidrazida (**38**), com diferentes benzaldeídos
 Fonte: Do autor.

Nas reações de acoplamento, numa primeira etapa ocorre protonação do O da carbonila, deixando-a mais reativa e suscetível ao ataque nucleofílico. Em seguida, o par de elétrons livre do nitrogênio na hidrazida realiza um ataque nucleofílico à carbonila ativada. Par de elétrons livres do oxigênio da hidroxila abstrai um próton vizinho e a deslocalização do par de elétrons do nitrogênio leva à formação da dupla ligação. Uma base contida no meio que pode ser a água, etanol ou Cl^- realiza a abstração do próton, o que facilita a saída de água, permitindo assim a formação das *N*-acilidrazonas desejadas, conforme **Figura 17**.

Tabela 3 - Dados experimentais dos derivados *N*-benzil piperídínicos acilidrazônicos (32a-k)


Código/ Aspecto físico	Substituinte	Eluente para coluna cromatográfica	Rendimento	Rendimento global	Faixa de fusão (°C)
32a (PQM-54) (sólido cinza)	H	Acetato de etila/ Metanol 7:3	60%	51%	152-153
32b (PQM-55) (sólido branco)	Br	Acetato de etila/ Metanol 8:2	52%	43%	192-194
32c (PQM-56) (sólido bege)	Cl	Acetato de etila/ Metanol 7:3	70%	59%	177-179
32d (PQM-57) (sólido amarelo)	NO ₂	Acetato de etila/ Metanol 7:3	71%	60%	222-225
32e (PQM-65) (sólido cinza)	OCH ₃	Acetato de etila/ Metanol 8:2	85%	60%	217-218
32f (PQM-66) (sólido amarelo)	Pirrol	Acetato de etila/ Metanol 8:2	70%	60%	172-174
32g (PQM-67) (sólido branco)	F	Acetato de etila/ Metanol 8:2	59%	50%	192-195
32h (PQM-74) (sólido amarelo)	Morfolinila	Acetato de etila/ Metanol 7:3	54%	46%	154-157
32i (PQM-75) (sólido amarelo)	Piperidinila	Acetato de etila/ Metanol 8:2	50%	42%	158-162
32j (PQM-76) (sólido bege)	Imidazol	Acetato de etila/ Metanol 6:4	49%	42%	113-114
32k (PQM-88) (sólido cinza)	SCH ₃	Acetato de etila/ Metanol 7:3	78%	66%	215-218

Fonte: Do autor

Pode-se notar que a diferenças de faixas de fusão das substâncias é devida a características de cada grupo substituinte. Sendo assim, o NO₂ com elevada eletronegatividade e ressonância apresenta a maior faixa de fusão. Grupos SCH₃ e OCH₃ possuem faixas de fusão similares por possuírem aproximada eletronegatividade e polarizabilidade. Nos halogênios pode-se observar que flúor apresenta maior faixa de fusão, possuindo um menor raio atômico e permitindo maior aproximação e formação de fortes ligações; bromo com maior raio atômico, no entanto, apresentou faixa de fusão próxima ao flúor; e cloro com raio atômico intermediário entre flúor e cloro apresentou menor faixa de fusão nesta família. Quanto

aos substituintes cíclicos, pirrol apresenta maior faixa de fusão por ser um heterociclo aromático, em sequência piperidinila (amina heterocíclica) e morfolina (6 membros com oxigênio e nitrogênio em posições opostas) e por último o substituinte imidazol (5 membros com dois nitrogênios) com menor faixa de fusão (RUSSEL, 1994).

4.1.4 *N*-benzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-54 (32a)

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 18**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32a**. Em 3331 cm^{-1} banda referente a deformação axial de OH que sobrepõe a deformação axial de N-H; em 2939 cm^{-1} e 2817 cm^{-1} característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH_2 ; em 1644 cm^{-1} banda referente ao carbono carbonílico ($\text{C}=\text{O}$); em 1522 cm^{-1} e 1283 cm^{-1} bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H; em 961 e 831 bandas referentes a deformação angular fora do plano de C-H aromáticos (**Tabela 4**, Apêndice A).

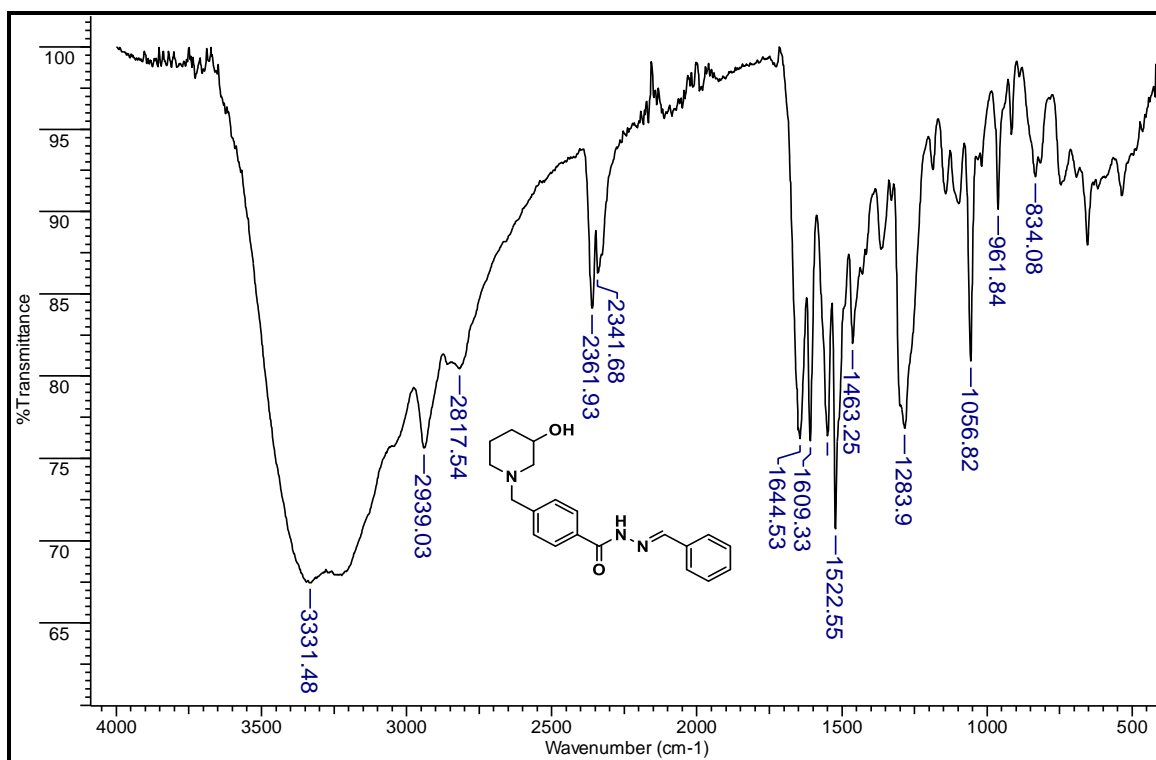


Figura 18 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-54 (32a)** (ATR).

Fonte: Do autor

A análise no espectro de RMN de ^1H de **32a** (Figura 19), observou-se os seguintes sinais: sinais referentes aos núcleos aromáticos, em 8,54 ppm simpleto referente ao H-19; em 8,12 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,1$); em 7,98 ppm duplo duplete referente aos H-21 e H-25 ($J=3,3$ e $6,2$); em 7,72 ppm duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=8,0$); entre 7,59-7,57 ppm multiplete referente aos H-22, H-23 e H-24; em 3,49 ppm simpleto referente ao H-7. Além dos sinais de hidrogênios referentes ao núcleo piperidínico na região de 3,46 - 1,57 ppm (Tabela 4, Apêndice A).

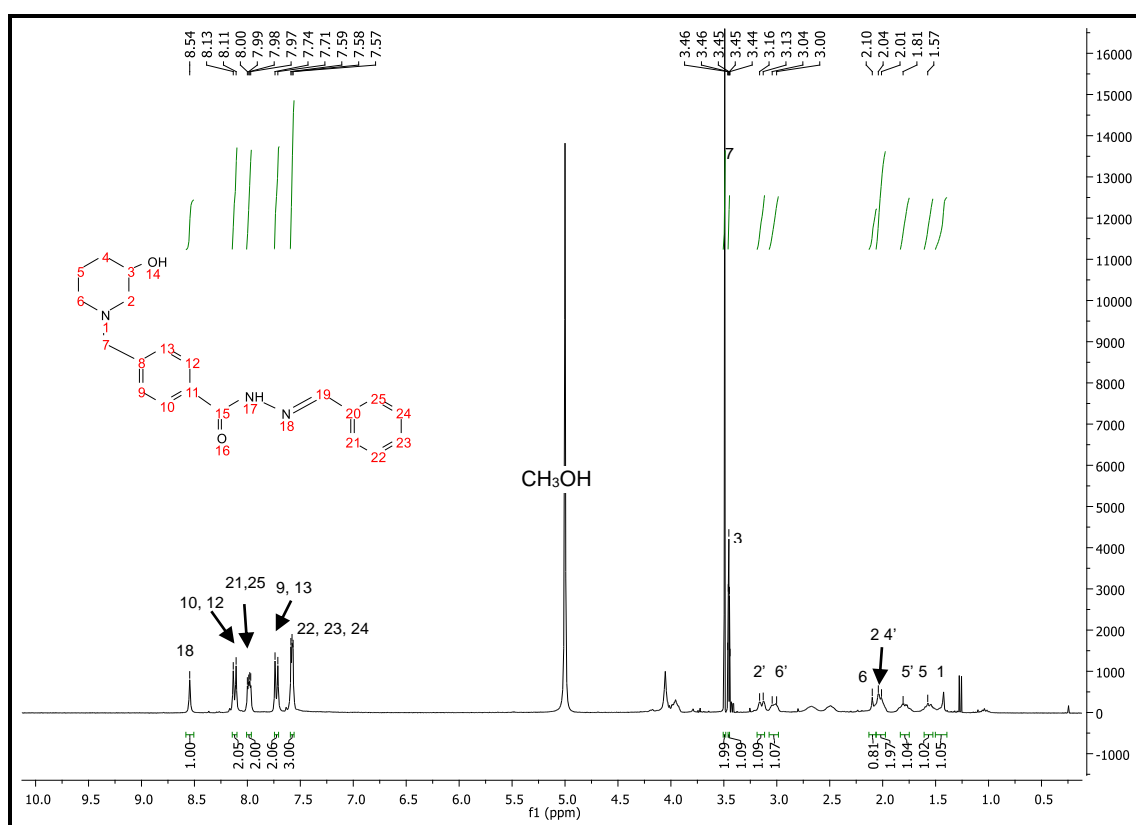


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (CD₃OD, 300MHz) do composto **PQM-54 (32a)**.
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32a** (Figura 20), pode-se observar os sinais em 165,1 ppm referente ao carbono carbonílico C-15; em 149,5 referente ao C-19. Sinais referentes aos núcleos aromáticos em 138,8 ppm referente ao C-8; 134,1 ppm referente ao C-11; 132,5 ppm referente ao C-20, 130,2 ppm referente ao C-22; 128,4 ppm referente ao C-9, C-13, C-21, C-23, C-24 e C-25; 127,7 ppm e 127,4 ppm referentes aos C-10 e C-12. Sinais em 58,8 ppm ao C-7 que está localizado entre o

núcleo aromático e piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 65,0 ppm, 61,7 ppm, 52,9 ppm 31,0 ppm e 21,0 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (**Tabela 4**, Apêndice A).

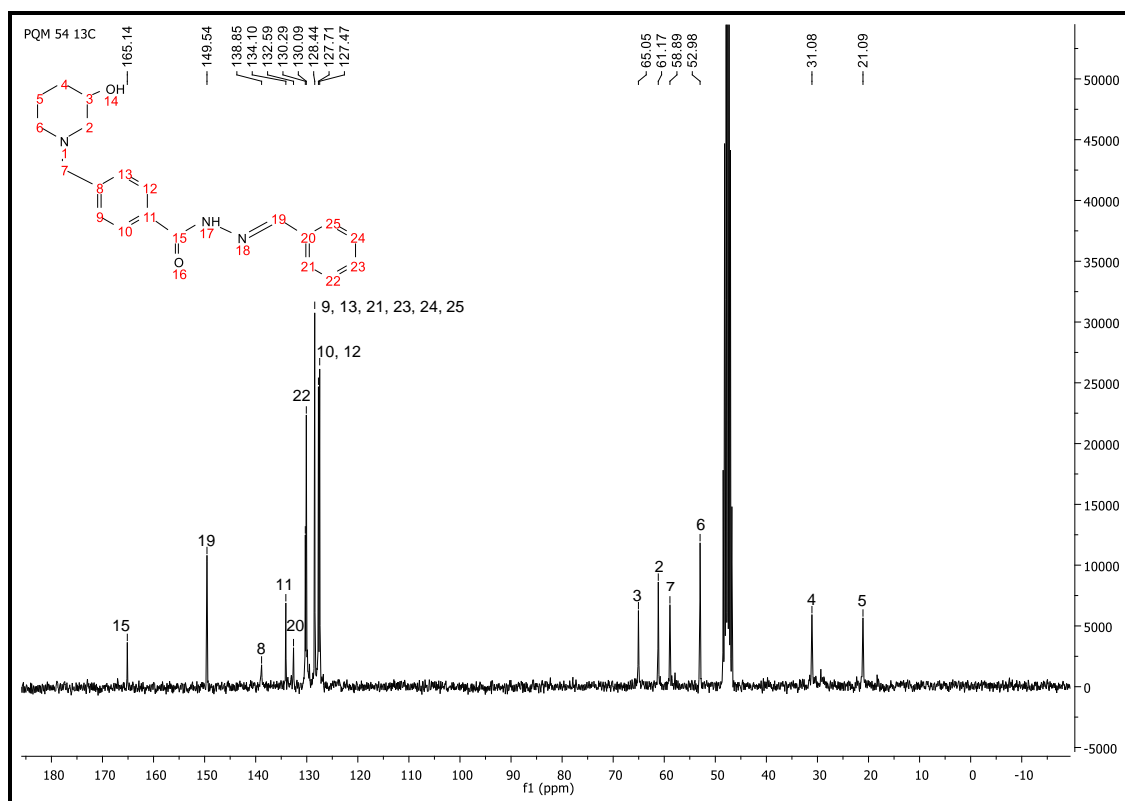


Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) do composto **PQM-54 (32a)**.
Fonte: Do autor

No espectro de massa de alta resolução de **32a** (**Figura 21**) observa-se o pico da molécula protonada em $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z= 338,1868$ e o pico $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com relação de $m/z= 360,1689$.

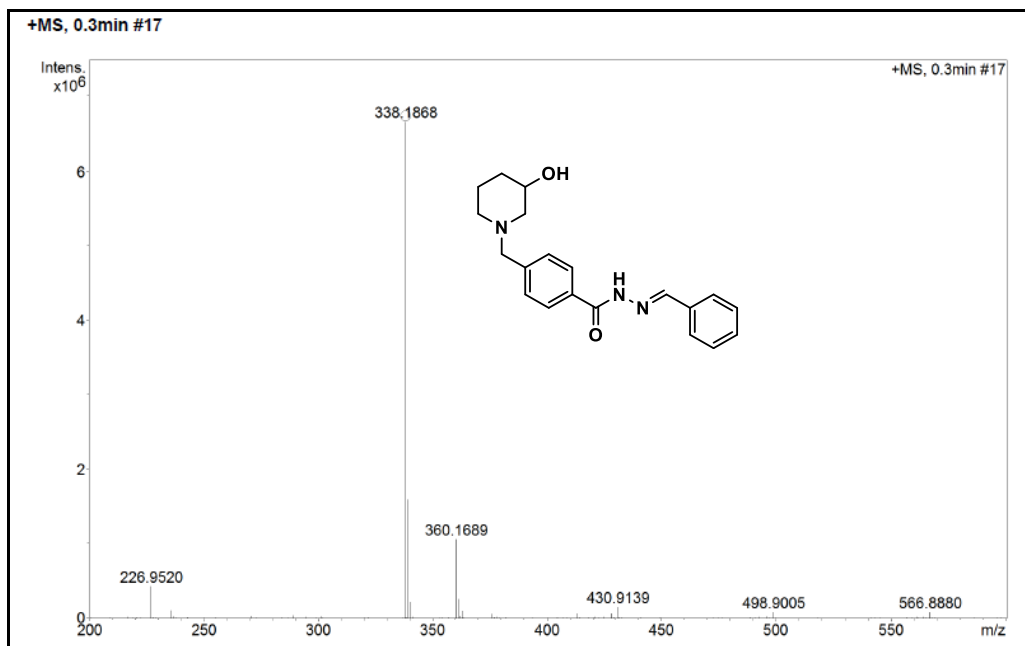


Figura 21 - Espectro de Massas de **PQM-54 (32a)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.5 *N*- (4-bromobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-55 (32b)

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 22**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32b**. Em 3226 cm^{-1} banda referente a deformação axial de N-H; em 3066 cm^{-1} banda referente a deformação axial de C-H aromático; em 2931 cm^{-1} e 2791 cm^{-1} característicos de deformações axiais assimétrica e simétrica das ligações CH_2 ; em 2359 cm^{-1} e 2341 cm^{-1} são característicos da presença de CO_2 no momento da análise; em 1644 cm^{-1} banda referente ao carbono carbonílico (C=O); em 1544 cm^{-1} e 1286 cm^{-1} bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H; em 1066 cm^{-1} banda referente a deformação angular simétrica fora do plano de CH ligado ao Br. em 973 cm^{-1} e 958 cm^{-1} bandas referentes a deformação angular fora do plano de C-H aromáticos; em 815 cm^{-1} e 671 cm^{-1} bandas referentes a deformação angular simétrica fora do plano do grupo N-H.

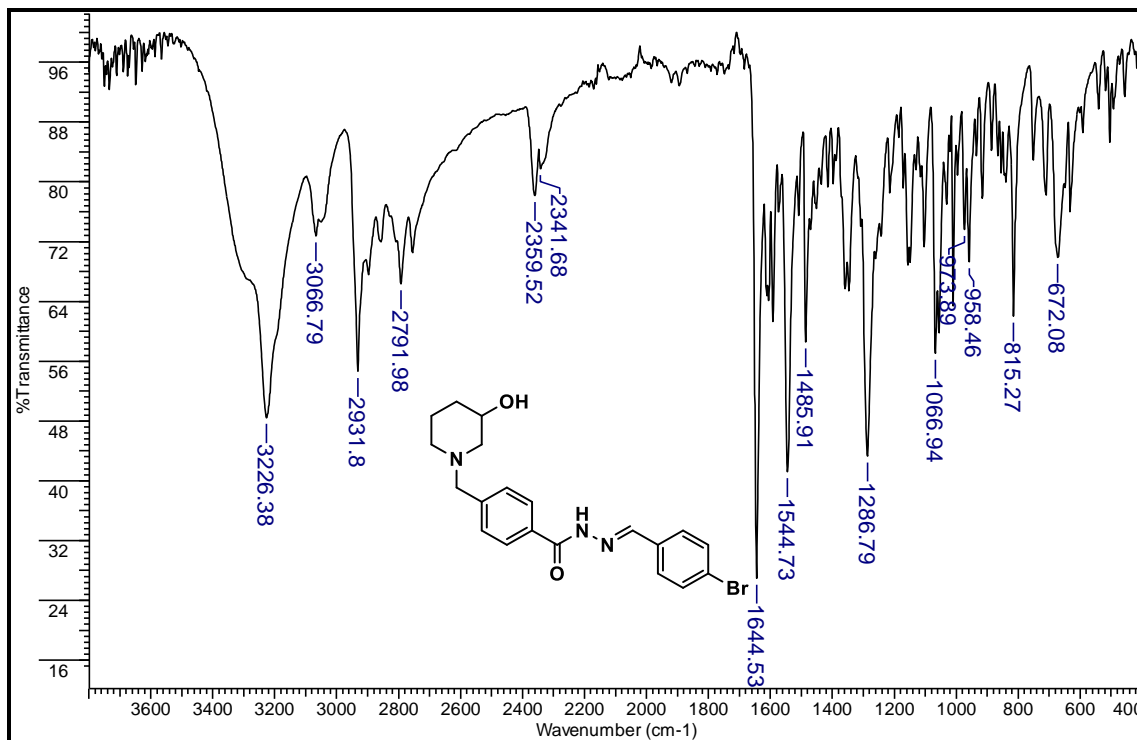


Figura 22 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-55 (32b)** (ATR).

Fonte: Do Autor

No espectro de RMN de ¹H de **32b** (Figura 23), pode observar os seguintes sinais: Sinais dos núcleos aromáticos em 11,88 ppm referente ao H-17; 8,42 ppm simpleto referente ao H-19; em 7,86 duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,0$); em 7,67 simpleto referente aos H-21, H-22, H-24 e H-25, o qual nota-se um deslocamento quando comparado ao **PQM-54** devido a presença do substituinte no carbono 23; 7,43 duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=8,1$). Além destes, sinais referentes ao núcleo piperidínico na região de 3,59-1,03 ppm. O sinal em 3,37 ppm possivelmente está relacionado a presença de água contida no (CD₃)₂SO utilizado para solubilizar a amostra durante análise de RMN (FULMER, et al. 2010) (Tabela 5, Apêndice A).

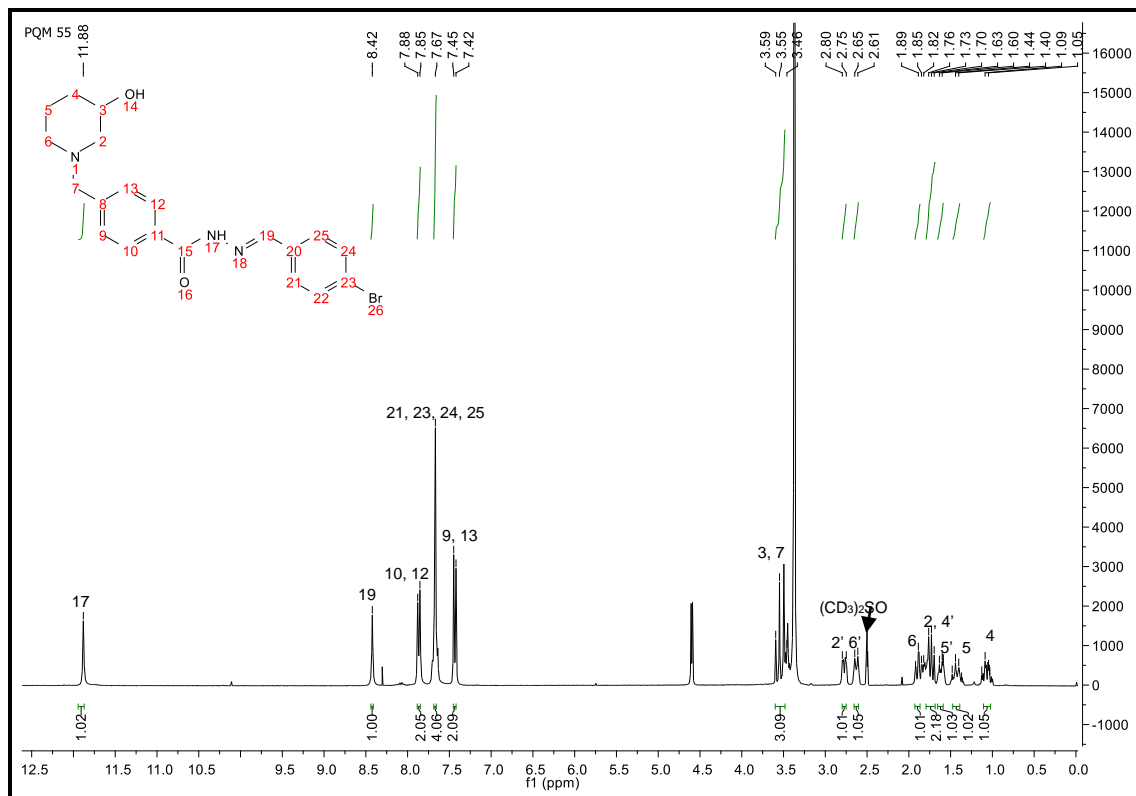


Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz) do composto **PQM-55 (32b)**.
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32b** (Figura 24), pode-se observar os seguintes sinais: em 163,5 ppm referente ao carbono carbonílico; em 146,8 ppm referente ao C-19. Sinais referentes aos núcleos aromáticos em 143,2 ppm referente ao C-8; 134,1 ppm referente ao C-11; 132,3 ppm referente ao C-20, C-22 e C-24, os quais se mostram mais desblindados quando comparado ao PQM-54; 129,3 e 129,2 ppm referentes aos C-10 e C-12; 128,0 ppm referente aos C-9, C-13, C-21 e C-25; e 123,7 ppm referente ao C-23, o qual é o mais característico dessa estrutura. Sinal em 62,1 ppm referente ao C-7 que está localizado entre o núcleo aromático e piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,0 ppm, 61,5 ppm, 53,4 ppm 33,6 ppm e 23,6 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (Tabela 5, Apêndice A).

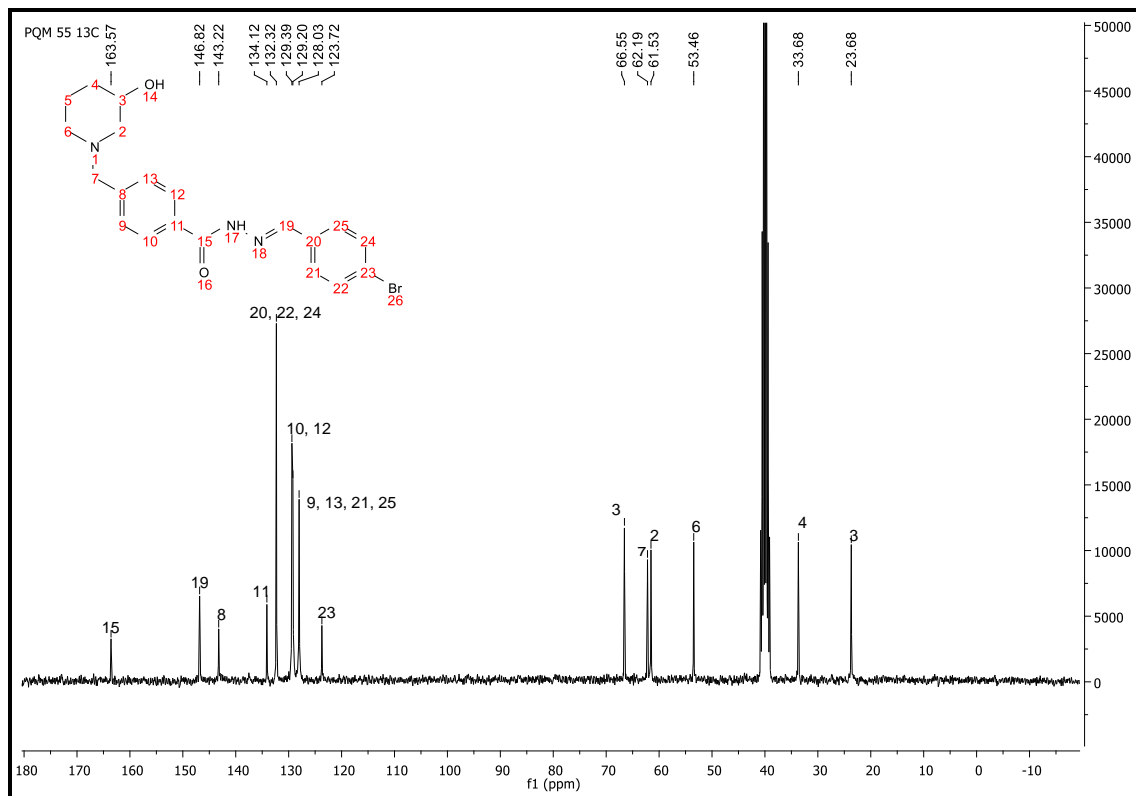


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-55 (32b)**.
Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32b** (Figura 25) observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z= 416,0984$.

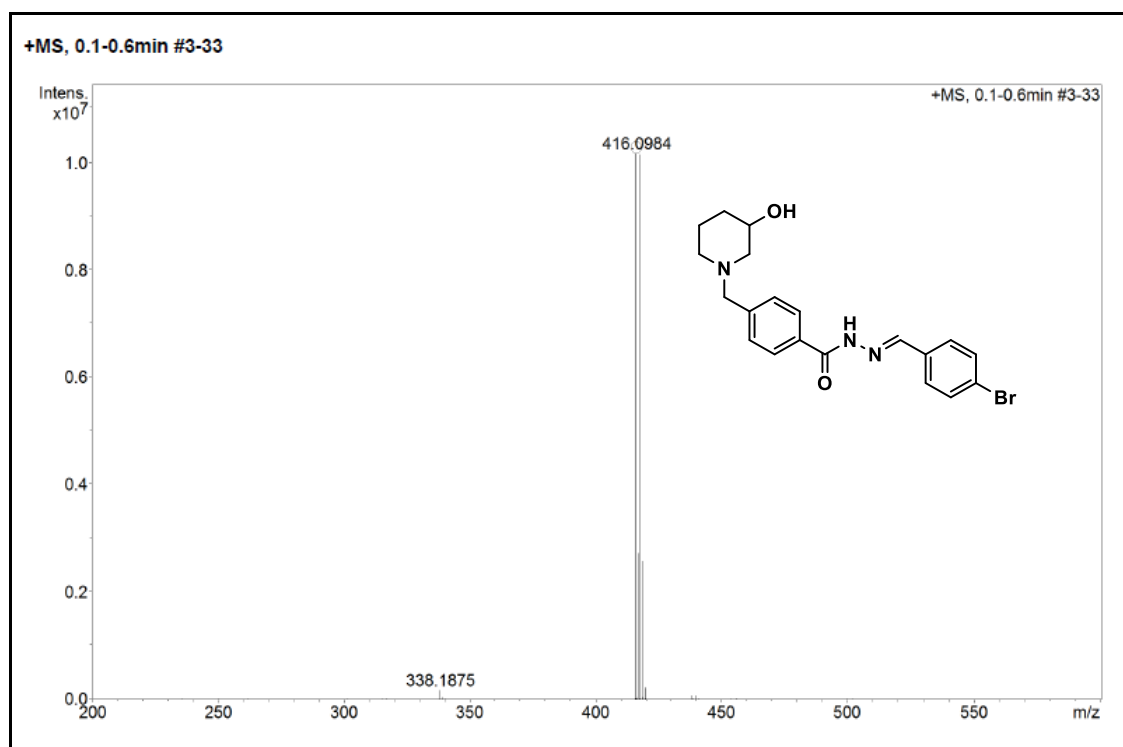


Figura 25 - Espectro de Massas de **PQM-55 (32b)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.6 *N*-(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxi piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-56 (32c)

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 26**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32c**. Em 3196 cm^{-1} banda referente a deformação axial de OH que sobrepõe a deformação axial de N-H; em 2940 cm^{-1} de deformações axial de ligações CH_2 ; em 2361 cm^{-1} e 2341 cm^{-1} são característicos da presença de CO_2 no momento da análise; em 1651 cm^{-1} banda referente ao carbono carbonílico ($\text{C}=\text{O}$); em 1548 cm^{-1} e 1279 cm^{-1} bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H; em 1087 cm^{-1} banda de absorção referente a clorobenzenos.

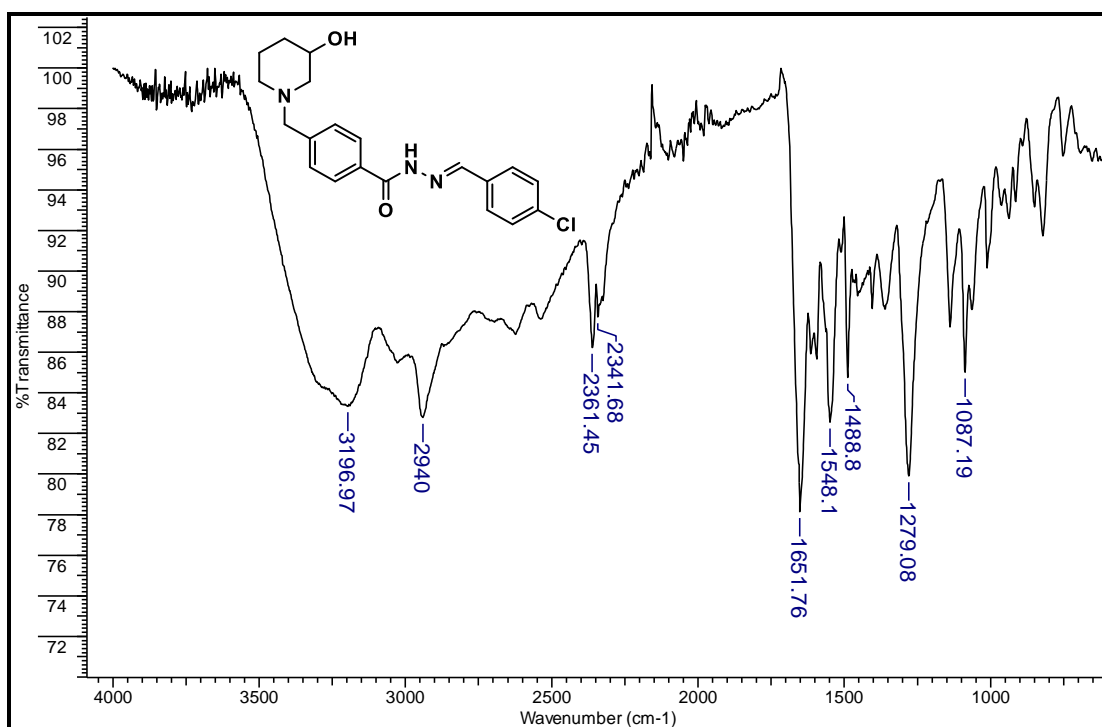


Figura 26 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-56 (32c)** (ATR).
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^1H de **33c** (**Figura 27**), observa-se os sinais referentes aos núcleos piperidínico e aromático. Nota-se a ausência dos sinais referentes aos H-7 e H-3 que pode ser justificado pelo fato do sinal de água contida no DMSO deuterado sair na mesma região que tais hidrogênios, sendo que a supressão realizada na

análise de RMN pode ocultá-los. Por isso, foi necessário repetir RMN de ^1H dos compostos que a análise havia sido realizada em DMSO deuterado.

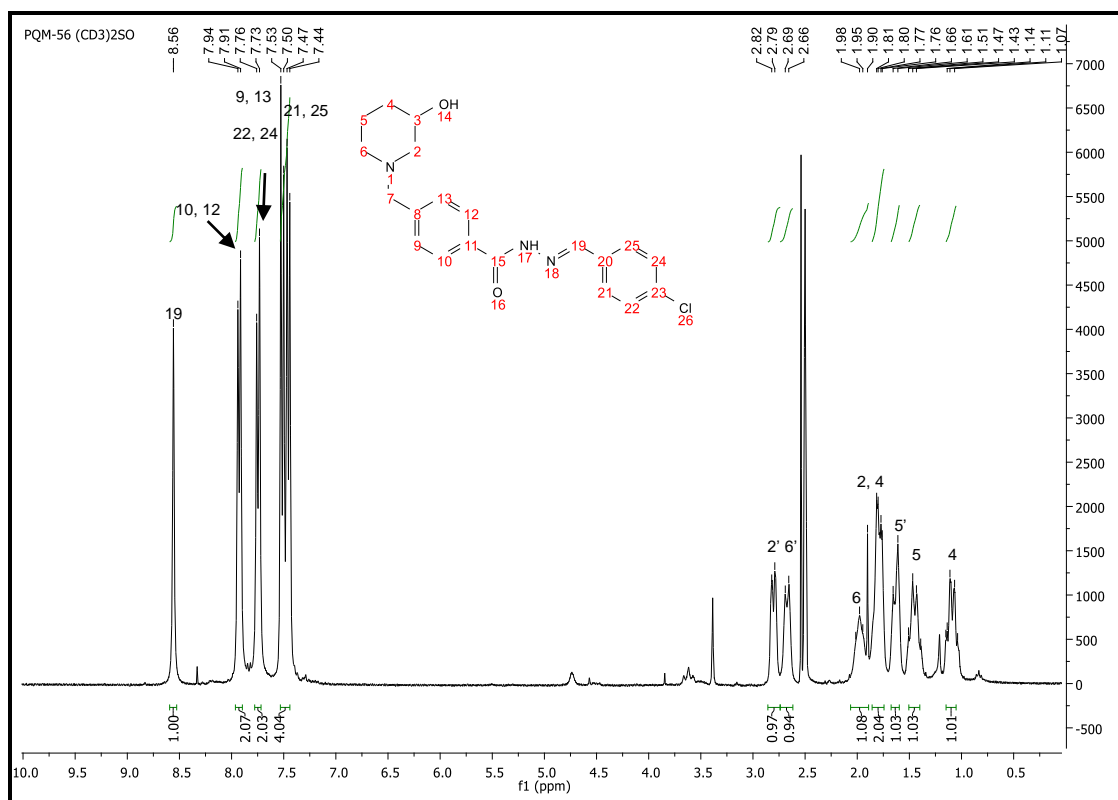


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300MHz) do composto **PQM-56 (32c)**
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^1H de **32c** (Figura 28), observa-se os seguintes sinais: Sinais dos núcleos aromáticos em 8,34 ppm simpleto referente ao H-19; em 7,95 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=7,9$); em 7,83 ppm duplete referente aos H-22 e H-24 ($J=8,4$); em 7,56 ppm duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=8,0$); em 7,44 ppm duplete referente aos H-21 e H-25 ($J=8,4$). Além destes sinais, pode-se observar a presença dos sinais referentes aos núcleos piperidínicos na região de 3,84-1,28, incluindo sinal em 3,84 ppm referente ao H-3 e o simpleto em 3,59 referente ao H-7 (Tabela 6, Apêndice A).

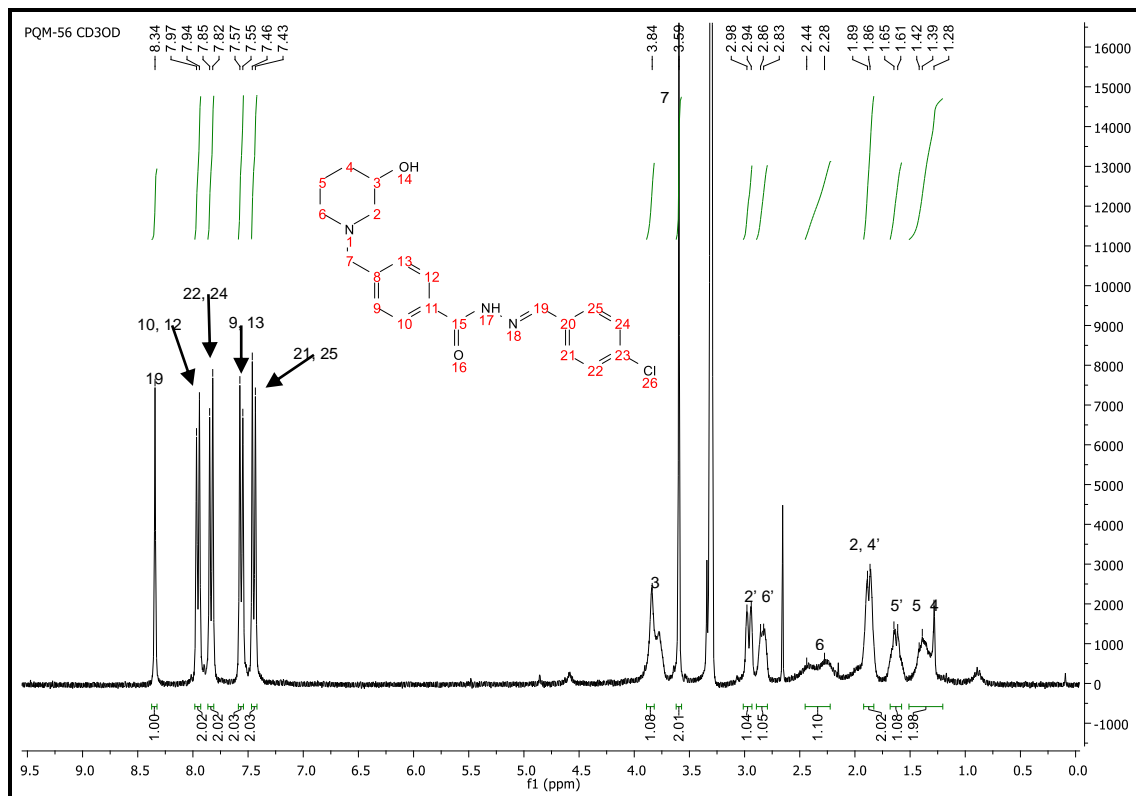


Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) do composto **PQM-56 (32c)**
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32c** (Figura 29), pode-se observar os seguintes sinais: em 163,5 ppm referente ao carbono carbonílico; em 146,9 ppm referente ao C-19. Sinais referentes aos núcleos aromáticos em 134,9 ppm referente ao C-8; 133,8 ppm referente ao C-23, mais desblindado devido ao substituinte cloro; 132,4 ppm referente aos C-11 e C-20; 129,4 referente aos C-9, C-13, C-21, C-22, C-24 e C-25; em 128,1 ppm referente ao C-10 e C-12. Sinal em 63,2 ppm referente ao C-7 que está localizado entre o núcleo aromático e piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,1 ppm, 61,8 ppm, 61,0 ppm 33,3 ppm e 23,2 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (Tabela 6, Apêndice A).

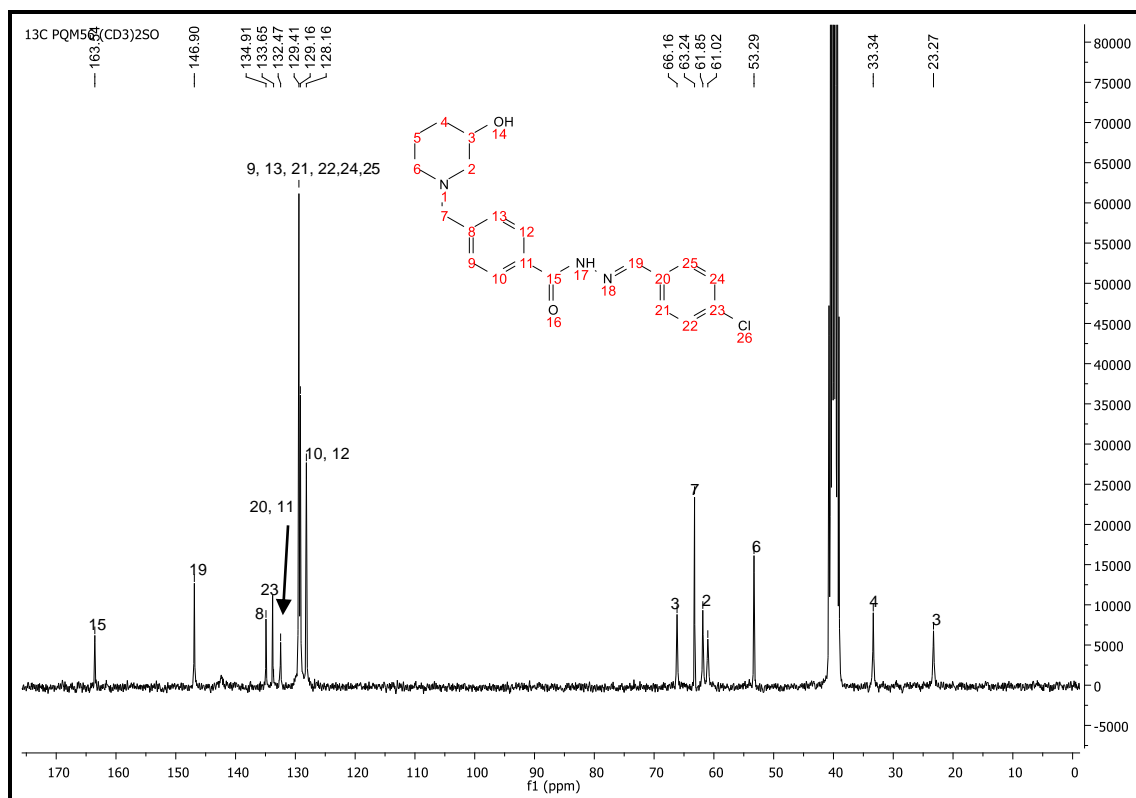


Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-56 (32c)**
 Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32c** (**Figura 30**) observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z= 372,1489$.

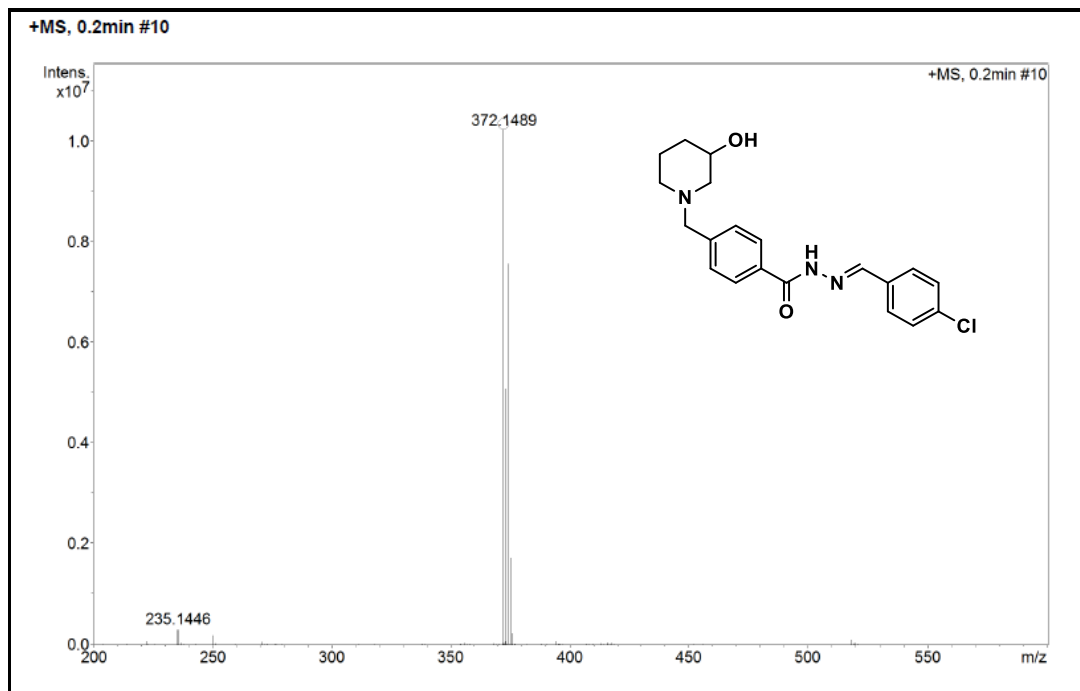


Figura 30 - Espectro de Massas de **PQM-56 (32c)** (ESI-MS).

Fonte: Do autor

4.1.7 *N*- (4-nitrobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-il) metileno) benzoidrazida: PQM-57 (32d)

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 31**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32d**. Em 3323 cm⁻¹ banda referente a deformação axial de OH que sobrepõe a deformação axial de N-H; em 2943 cm⁻¹ e 2849 cm⁻¹ característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH₂; em 1667 cm⁻¹ banda referente ao carbono carbonílico (C=O); em 1545 cm⁻¹ e 1284 cm⁻¹ bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H, nessa região também aparecem bandas referentes a deformação axial assimétrica de N=O₂ (ArNO₂) e deformação axial simétrica de N=O₂ (ArNO₂).

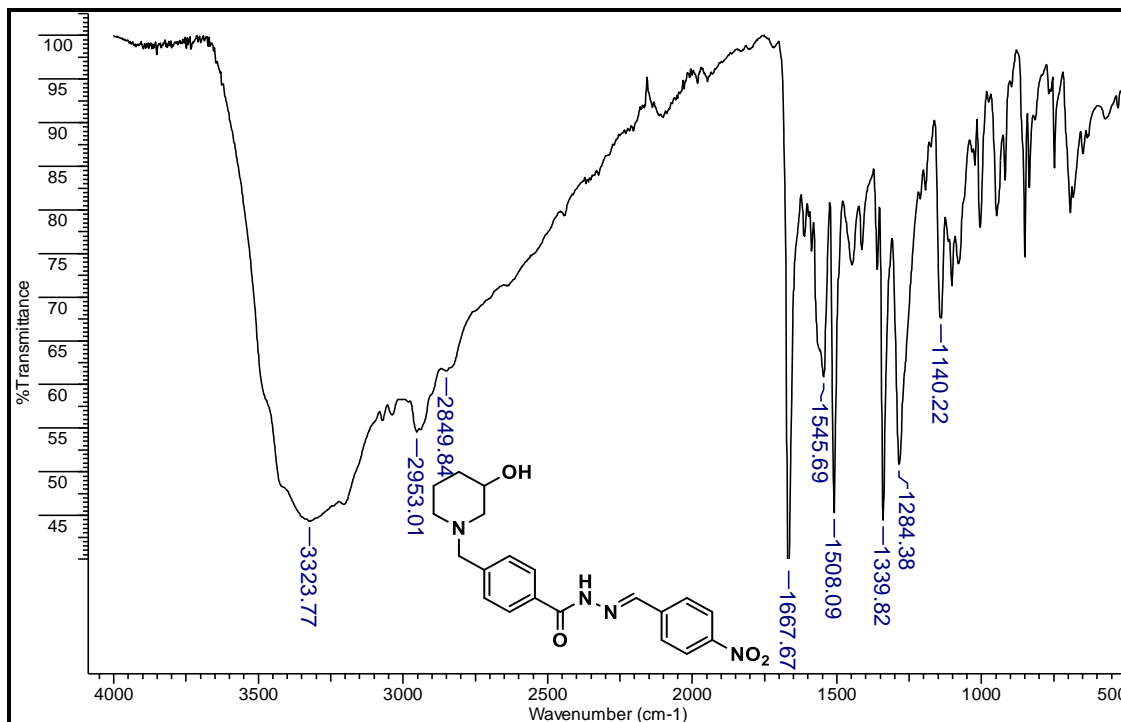


Figura 31 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-57 (32d)** (ATR).
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ¹H de **32d** (Figura 32), observa-se os seguintes sinais: Sinais dos núcleos aromáticos em 8,71 ppm simpleto referente ao H-19; em 8,29 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,6$); em 7,96 triplete referente aos H-21, H-22, H-24 e H-25 ($J=7,9$), o qual nota-se que H-22 e H-24 estão mais desblindados devido ao substituinte NO₂ carbono 23; 7,44 duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=8,0$). Sinais referente ao núcleo piperidínico na região de 2,80-1,01 ppm. Não se observa H-3 e H-7 devido a supressão de água durante a análise de RMN, uma vez que esses hidrogênios aparecem na mesma região da água contida no DMSO deuterado (Tabela 7, Apêndice A).

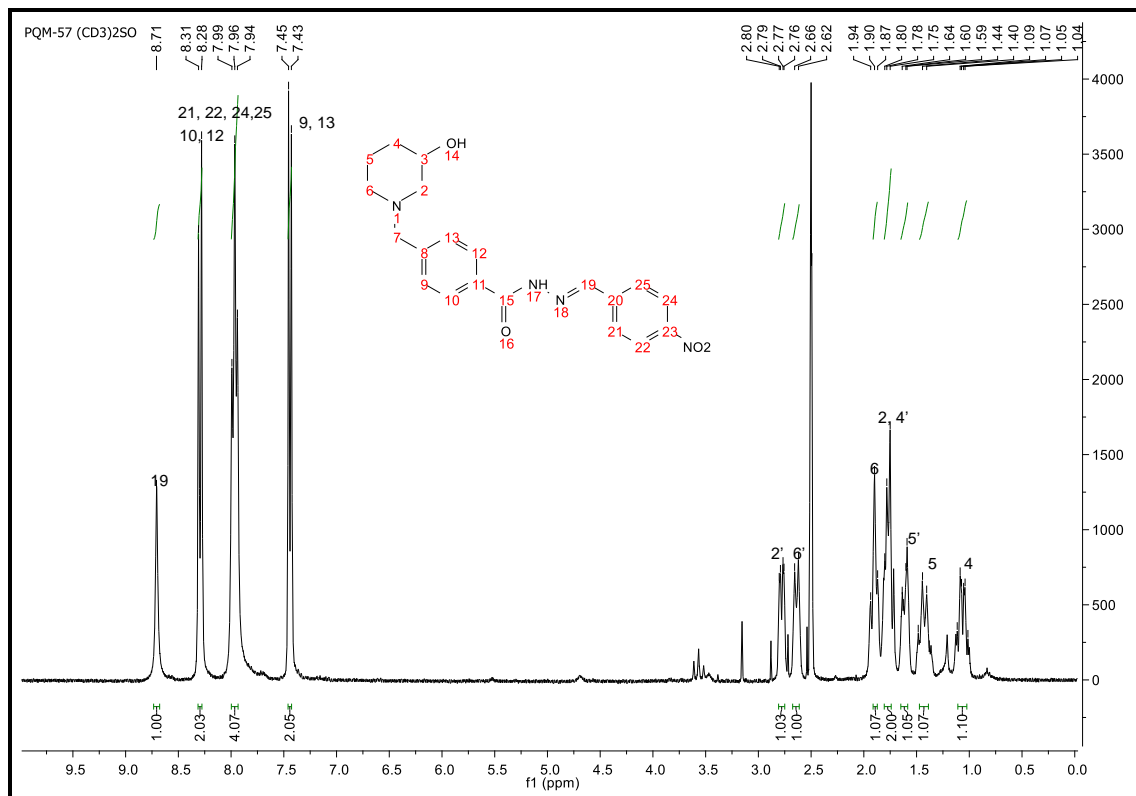


Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz) do composto PQM-57 (32d)
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de 32d (Figura 33) observa-se os seguintes sinais: em 163,7 ppm referente ao carbono carbonílico C-15; em 148,2 ppm referente ao C-19. Sinais referentes aos núcleos aromáticos em 145,5 ppm referente ao C-23, o qual está deslocado para campo mais alto devido ao efeito retirador de densidade eletrônica do substituinte NO_2 ; em 143,1 ppm referente ao C-8; 141,2 ppm referente ao C-20; 132,0 ppm referente ao C-11; 129,2 ppm referente aos C-10 e C-12; e 128,4 ppm referente ao C-9, C-13, C-21 e C-25; em 124,5 ppm referente aos C-22 e C-24. Sinal em 62,0 ppm referente ao C-7 que está localizado entre o núcleo aromático e piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,4 ppm, 61,3 ppm, 53,4 ppm 33,5 ppm e 23,5 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-3 e C-5 (Tabela 7, Apêndice A).

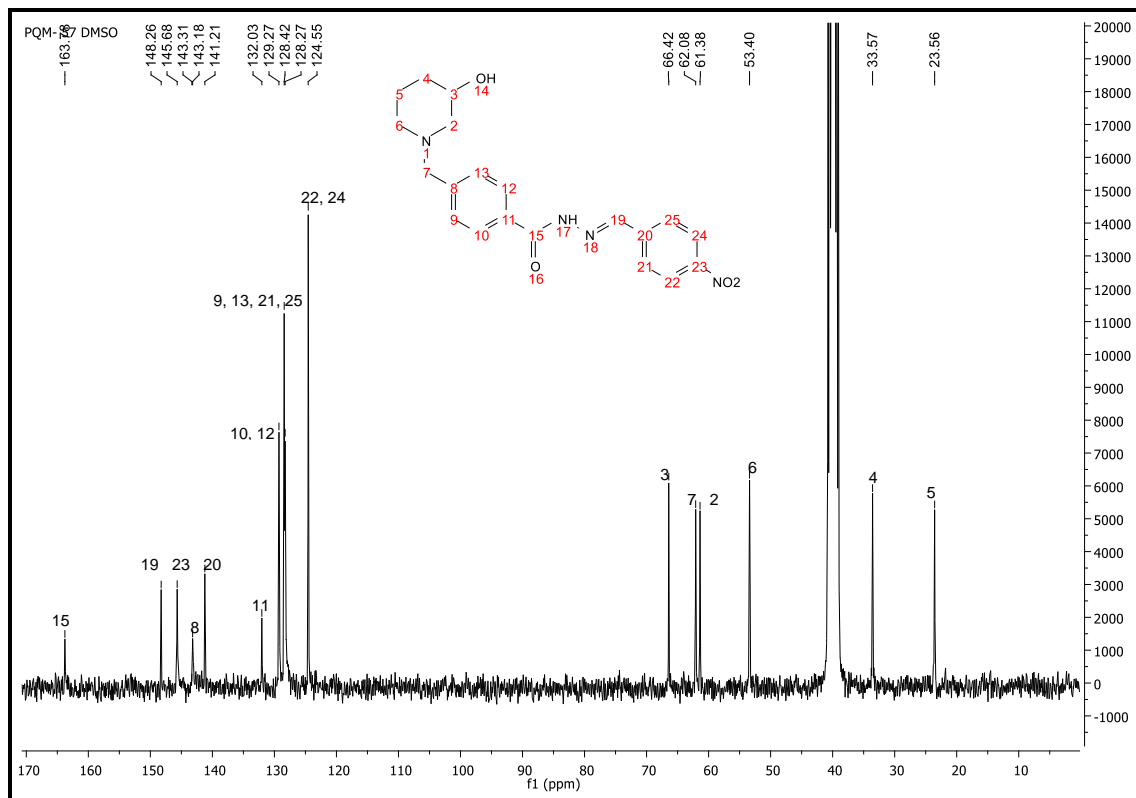


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-57 (32d)**
Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32d** (Figura 34) observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z= 383,1723$.

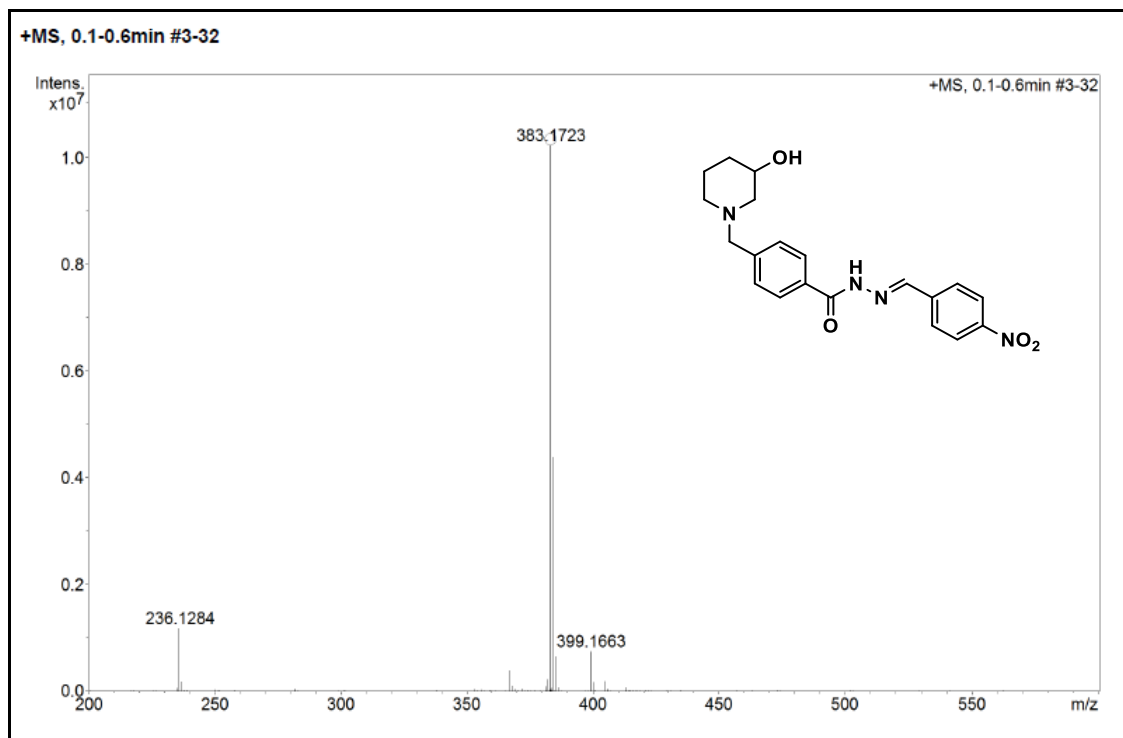


Figura 34 - Espectro de Massas de **PQM-57 (32d)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.8 *N*- (4-metoxibenzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: **PQM-65 (32e)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 35**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32e**. Em 3346 cm⁻¹ banda referente a deformação axial de OH que sobrepõe a deformação axial de N-H; em 3070 cm⁻¹ e 3035 cm⁻¹ bandas referentes a deformação axial de C-H de aromáticos; em 2934 cm⁻¹ e 2835 cm⁻¹ característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH₂; em 1644 cm⁻¹ banda referente ao carbono carbonílico (C=O); em 1602 cm⁻¹ e 1557 cm⁻¹ bandas referentes a deformação axial das ligações C=C do anel; em 1506 cm⁻¹ e 1249 cm⁻¹ bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H; em 1249 cm⁻¹ também há absorção de deformação axial assimétrica de C-O-C; em 1025 cm⁻¹ banda de deformação axial simétrica de C-O-C.

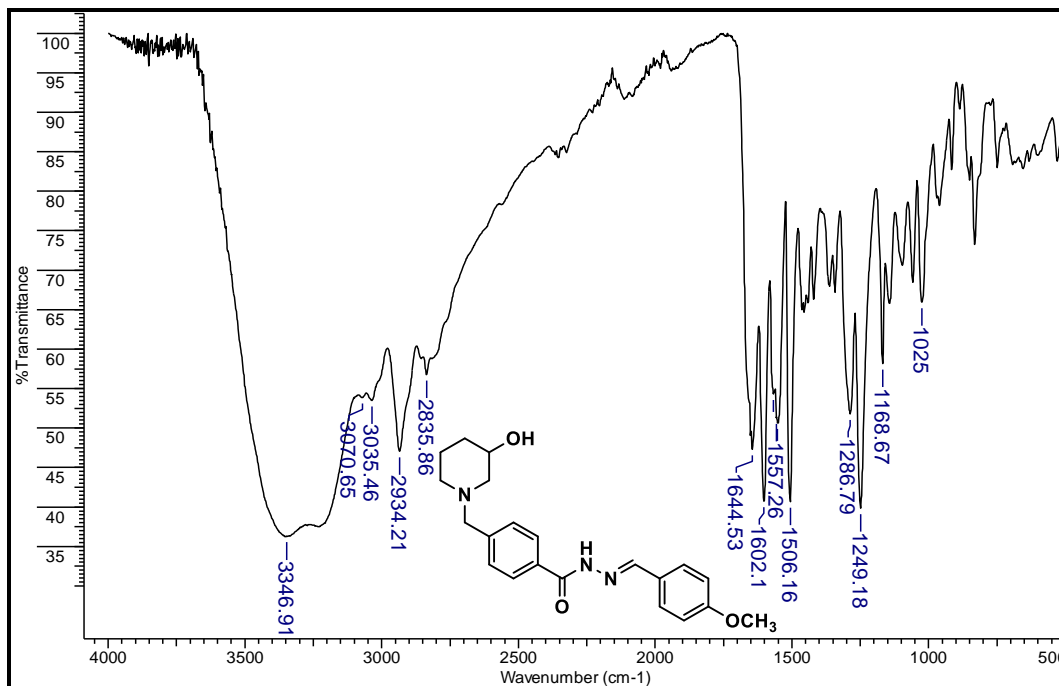


Figura 35 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-65 (32e)** (ATR).
Fonte: Do autor

O espectro de RMN de ^1H de **32e** (**Figura 36**), pode-se observar os seguintes sinais: Sinais dos núcleos aromáticos em 8,30 ppm simpleto referente ao H-19; em 7,91 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,1$); em 7,78 ppm duplete referente aos H-21 e H-25 ($J=8,7$); 7,51 ppm duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=8,1$); 6,99 ppm duplete referente aos H-22 e H-24 ($J=8,7$). Simpleto em 3,84 ppm referente aos H-27 é característico desta estrutura. Multiplete centrado em 3,70 ppm referente aos H-3 e H-7. Sinais referente ao núcleo piperidínico na região de 2,93 - 1,28 ppm. O sinal em 3,33 ppm, possivelmente, é referente à presença de metanol residual na amostra (FULMER, et al. 2010) (**Tabela 8**, Apêndice A).

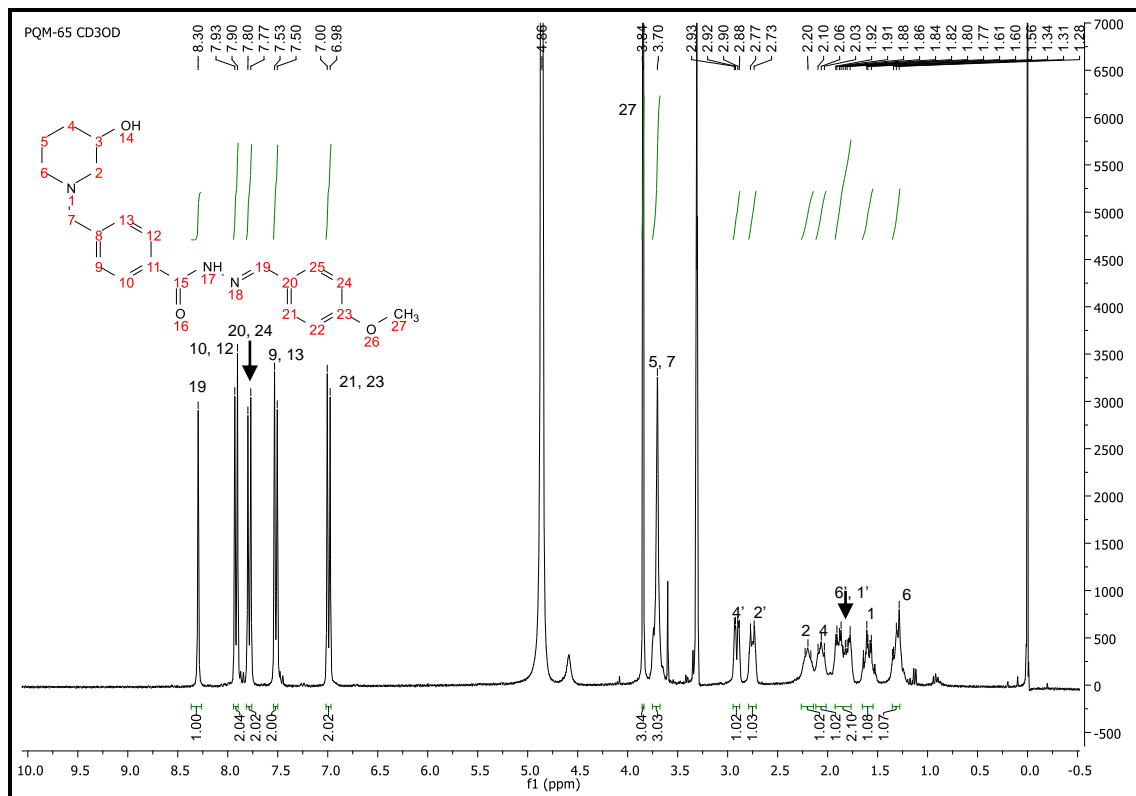


Figura 36 - Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300MHz) do composto **PQM-65 (32e)**
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN ¹³C de **32e** (Figura 37), pode-se observar os seguintes sinais: em 164,5 ppm referente ao carbono carbonílico C-15; em 149,7 ppm referente ao C-19. Sinais referentes aos núcleos aromáticos em 162,2 ppm referente ao C-23, em 134,4 ppm referente ao C-8; em 132,7 ppm referente ao C-11; em 131,3 ppm referente aos C-21 e C-25; em 129,2 ppm referente aos C-9 e C-13; em 128,1 ppm referente aos C-10 e C-12; em 126,5 referente ao C-20; em 113,9 referente aos C-22 e C-24. Em 56,4 ppm referente ao grupo metoxila em C-27 que é o sinal mais característico dessa estrutura. Sinal em 59,5 ppm referente ao C-7. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 59,5 ppm, 54,5 ppm, 51,9 ppm, 27,7 ppm e 17,5 ppm referentes, respectivamente, aos C-2, C-6, C-3, C-4 e C-5. (Tabela 8, Apêndice A).

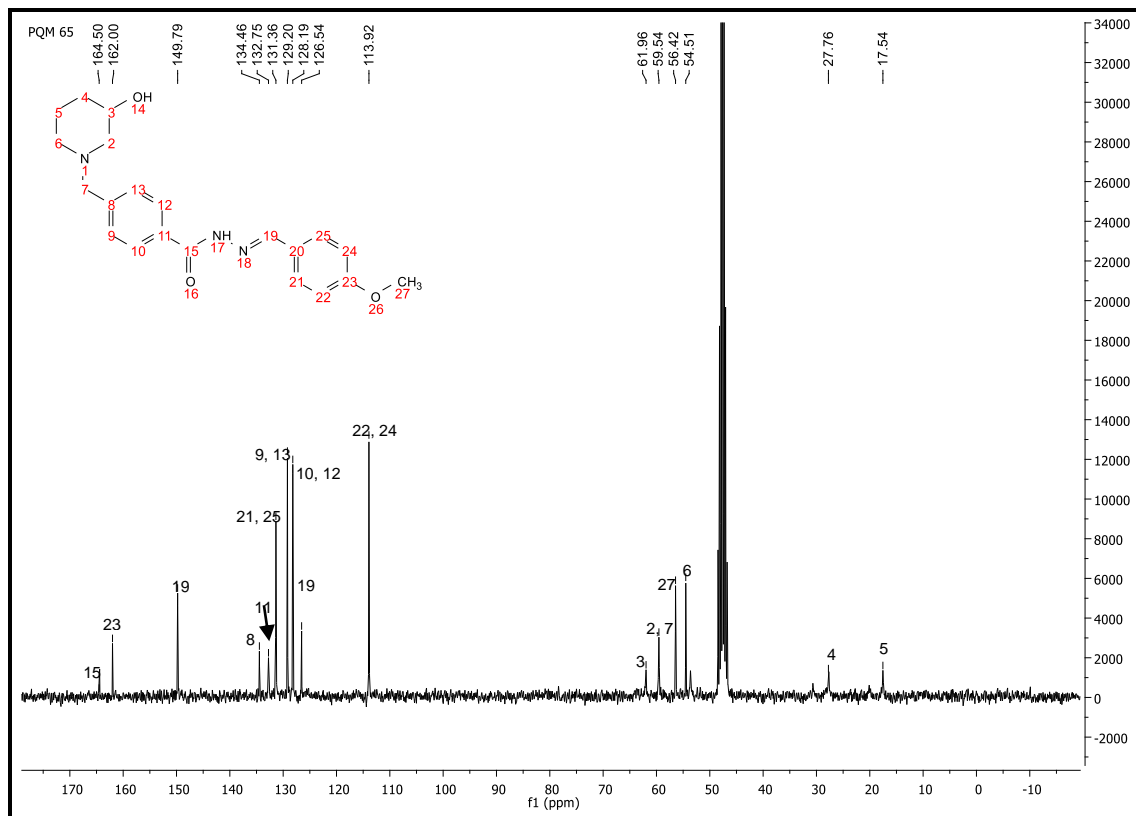


Figura 37 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) do composto **PQM-65 (32e)**

Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32e** (Figura 38) observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z= 368,1982$.

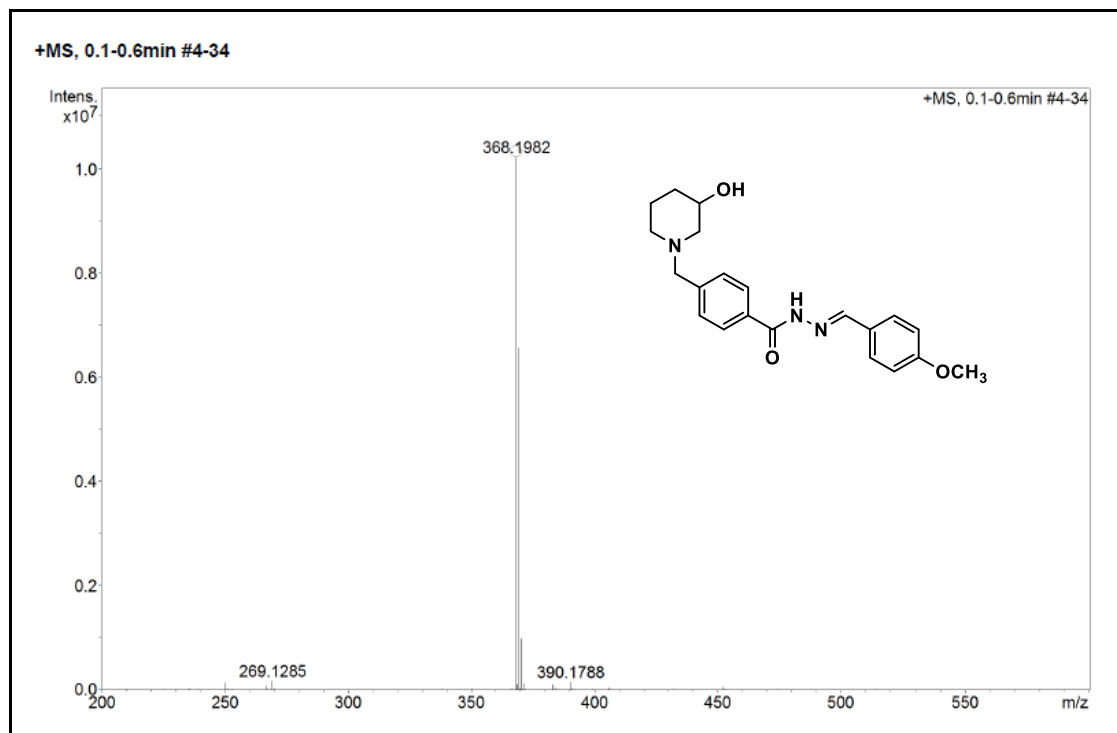


Figura 38 - Espectro de Massas de PQM-65 (32e) (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.9 *N*-(4-(pirrolidin-1-ila)benzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: PQM-66 (32f)

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 39**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32f**. Em 3252 cm⁻¹ banda referente a deformação axial de OH que sobrepõe a deformação axial de N-H; em 3070 cm⁻¹ e 3035 cm⁻¹ bandas referentes a deformação axial de C-H de aromáticos; em 2916 cm⁻¹ e 2842 cm⁻¹ característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH₂; em 2360 cm⁻¹ e 2340 cm⁻¹ são característicos da presença de CO₂ no momento da análise; em 1645 cm⁻¹ banda referente ao carbono carbonílico (C=O); em 1602 cm⁻¹ banda referentes a deformação axial das ligações C=C do anel; em 1523 cm⁻¹ e 1275 cm⁻¹ bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H.

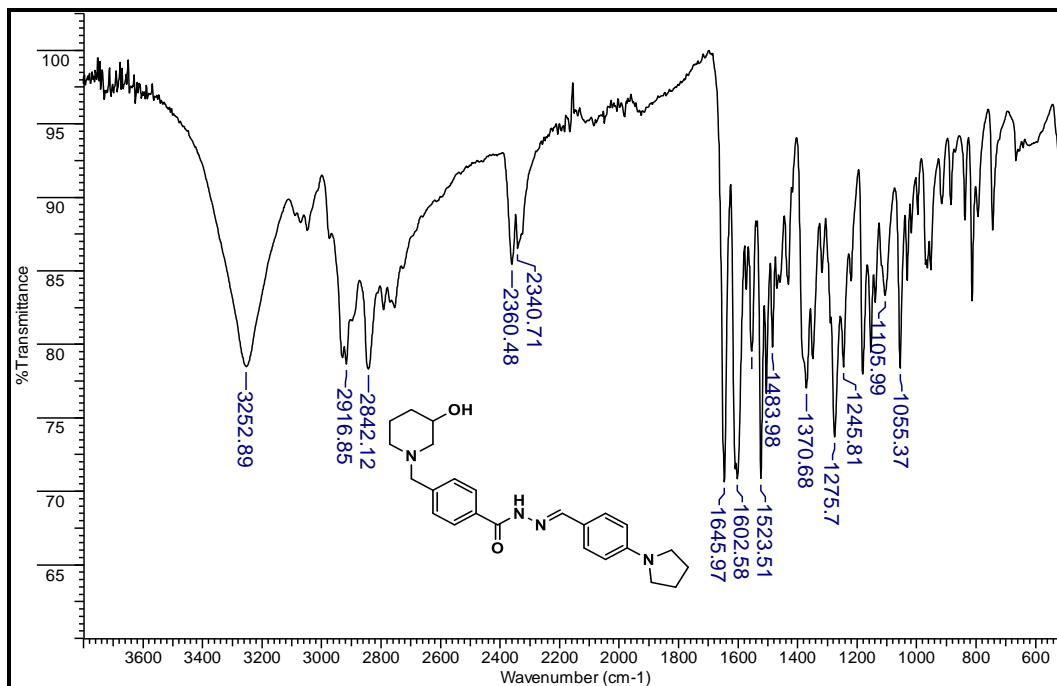


Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-66 (32f)** (ATR).

Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ¹H de **32f** (Figura 40), pode-se observar os seguintes sinais: em 12,27 ppm sinal referente ao H-17, o H-19 está presente na mesma região que a piridina em 8,73 ppm; em 8,27 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=7,3$); em 7,91 ppm duplete referente aos H-21 e H-25 ($J=8,8$); em 7,48 ppm duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=7,5$); em 6,56 ppm referente aos H-22 e H-24 ($J=8,5$). Multiplete compreendido em 3,07- 3,02 ppm referente aos H-27 e H-30 e multiplete compreendido em 1,70-1,65 referente aos H-28 e H-29, sendo estes pertencentes ao anel pirrólico que são os mais característicos dessa estrutura. Sinais referentes ao núcleo piperidínico na região de 4,04- 1,48 ppm. Os sinais em 8,73, 7,58 e 7,22 ppm são referentes a piridina. Foi realizado RMN de ¹H em piridina devido à dificuldade de visualização de H-3 e H-7 quando o espectro foi realizado em DMSO (Tabela 9, Apêndice A).

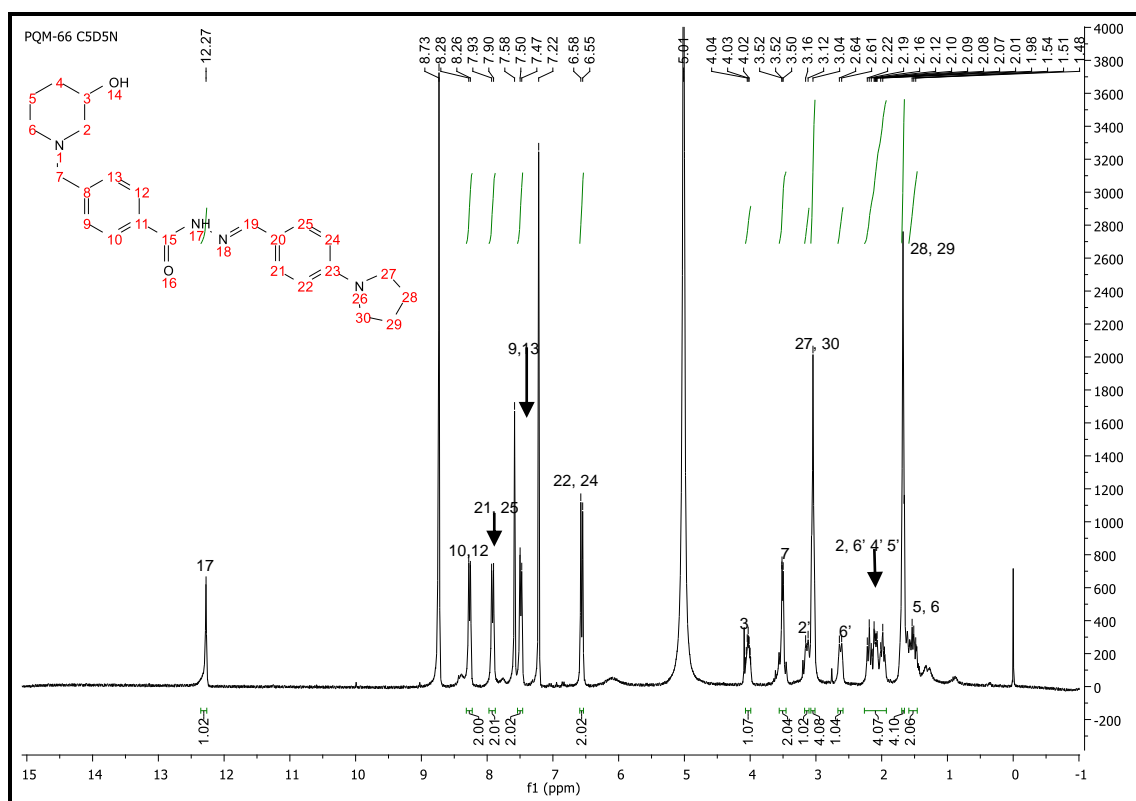


Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) do composto **PQM-66 (32f)**.
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32f** (Figura 41), pode ser observado os seguintes sinais: em 162,9 ppm referente ao carbono carbonílico C-15; em 149,1 ppm referente ao C-23; em 142,7 ppm referente ao C-8 e C-19; em 132,9 ppm referente ao C-11; em 129,0 referente aos C-9, C-13, C-21 e C-25; em 127,8 ppm referente aos C-10 e C-12; em 121,4 referente ao C-20; em 112,0 ppm referente ao C-22 e C-24. A estrutura para o composto **PQM-66** pode ser confirmada pela presença de sinais em 47,7 ppm e 25,4 ppm, referente respectivamente aos C-27, C-30 e C-28, C-29 do anel pirrólico que são os sinais mais característicos desse tipo de estrutura. Sinais em 61,5 ppm referente ao C-7. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,5 ppm, 62,2 ppm, 53,4 ppm 33,7 ppm e 23,7 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (Tabela 9, Apêndice A).

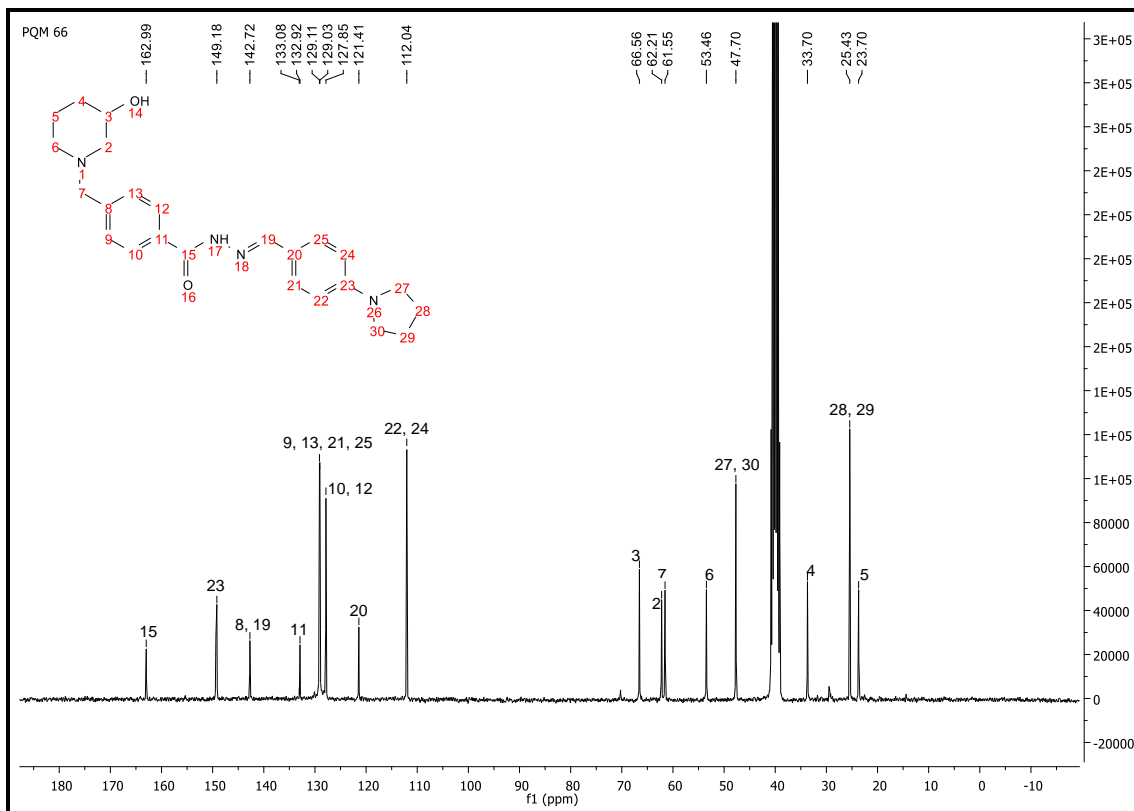


Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-66 (32f)**
 Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32f (Figura 42)** observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação $m/z= 407,2454$.

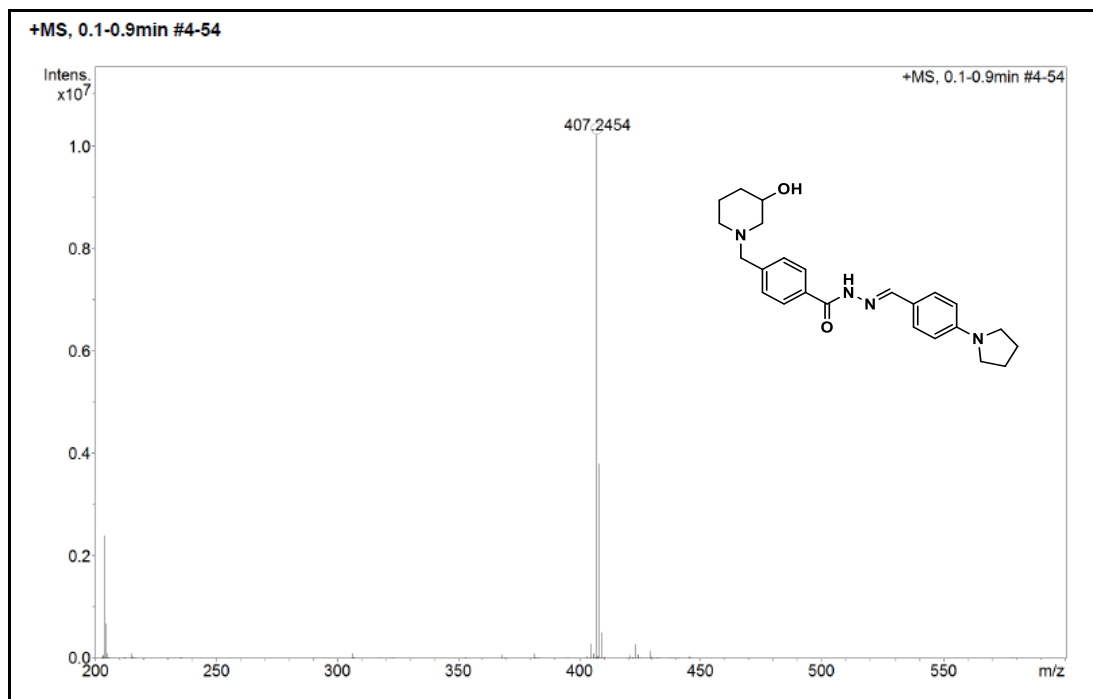


Figura 42 - Espectro de Massas de **PQM-66 (32f)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.10 *N*-(4-fluorbenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: **PQM-67 (32g)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 43**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32g**. Em 3176 cm⁻¹ banda referente a deformação axial de N-H livre; em 3070 cm⁻¹ e 3035 cm⁻¹ bandas referentes a deformação axial de C-H de aromáticos; em 3041 cm⁻¹ banda de deformação axial das ligações CH₂; em 2358 cm⁻¹ e 2332 cm⁻¹ são característicos da presença de CO₂ no momento da análise; em 1639 cm⁻¹ banda referente ao carbono carbonílico (C=O); em 1600 cm⁻¹ e 1556 cm⁻¹ bandas referentes a deformação axial das ligações C=C do anel; em 1507 cm⁻¹ e 1293 cm⁻¹ bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H; em 1148 cm⁻¹ banda referente a deformação axial C-F.

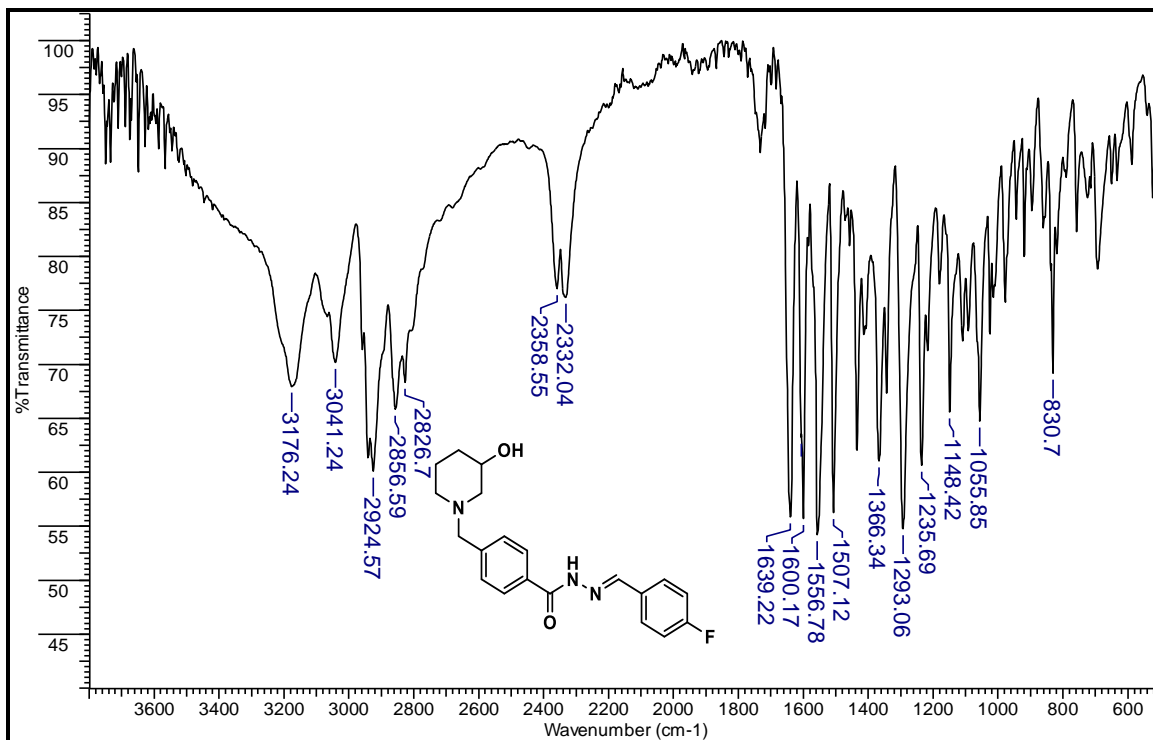


Figura 43 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-67 (32g)** (ATR)

Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ¹H de **32g** (**Figura 44**) observa-se os seguintes sinais característicos de sua estrutura: em 8,29 ppm, um simpleto referente ao H-19; em 8,00 ppm, um duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,0$); em 7,88 ppm um duplo duplete referente aos H-21 e H-25 ($J=5,6$ e $8,3$); em 7,63 ppm, um duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=7,6$); em 7,17 ppm, um triplete referente aos H-22 e H-24 ($J=8,6$) e o simpleto em 4,08 ppm referente a H-7. Além destes, os sinais referentes aos hidrogênios do núcleo piperidínico foram observados na região de 3,9 - 1,54 ppm (**Tabela 10**, Apêndice A).

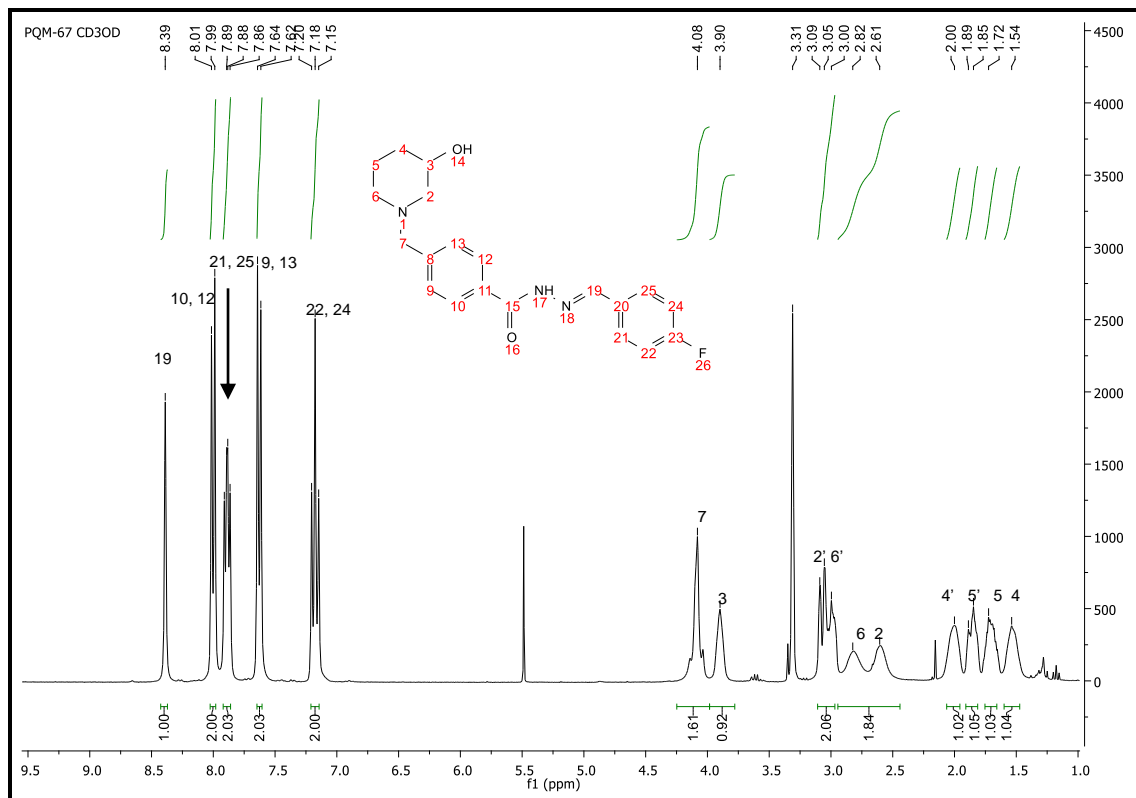


Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) do composto **PQM-67 (32g)**
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32g (Figura 45)** observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-67**: em 163,1 referente ao carbono carbonílico C-15. Sinais pertencentes aos núcleos aromáticos em 164,8 e 161,5 ppm separados em duplete referentes ao C-23 ($J=246$), no qual o substituinte é o flúor; em 146,5 referente ao C-19; em 142,7 ppm referente ao C-8; em 132,0 ppm referente ao C-11; em 131,0 ppm referente ao C-20; em 129,3 e 129,2 referentes aos C-10 e C-12; em 128,7 ppm referente aos C-21 e C-25; em 127,6 ppm referente aos C-9 e C-13; em 116,1 ppm referente ao C-22 e C-24. Sinal em 61,7 ppm referentes aos C-7 que está localizado entre o núcleo aromático e piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,1 ppm, 61,1 ppm, 53,0 ppm, 33,2 ppm e 23,2 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (**Tabela 10**, Apêndice A).

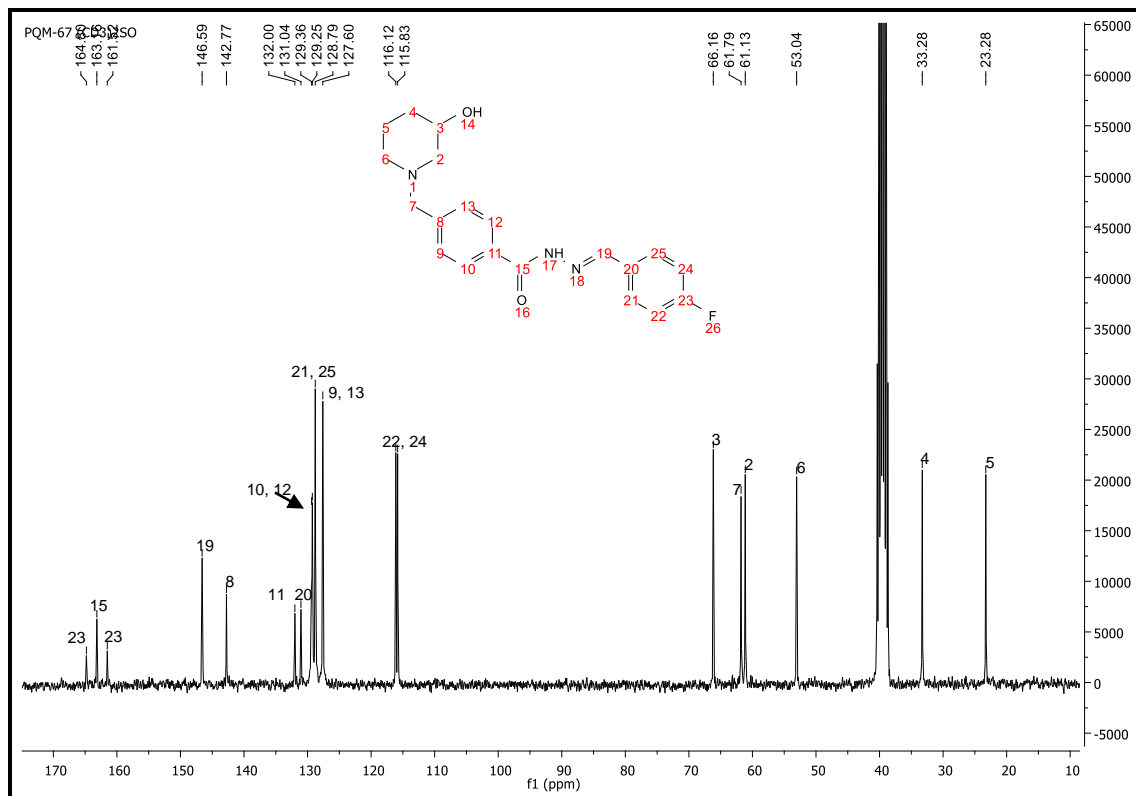


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-67 (32g)**
 Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32g (Figura 46)** observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação $m/z= 356,1786$ e o pico $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com relação $m/z= 378,1585$.

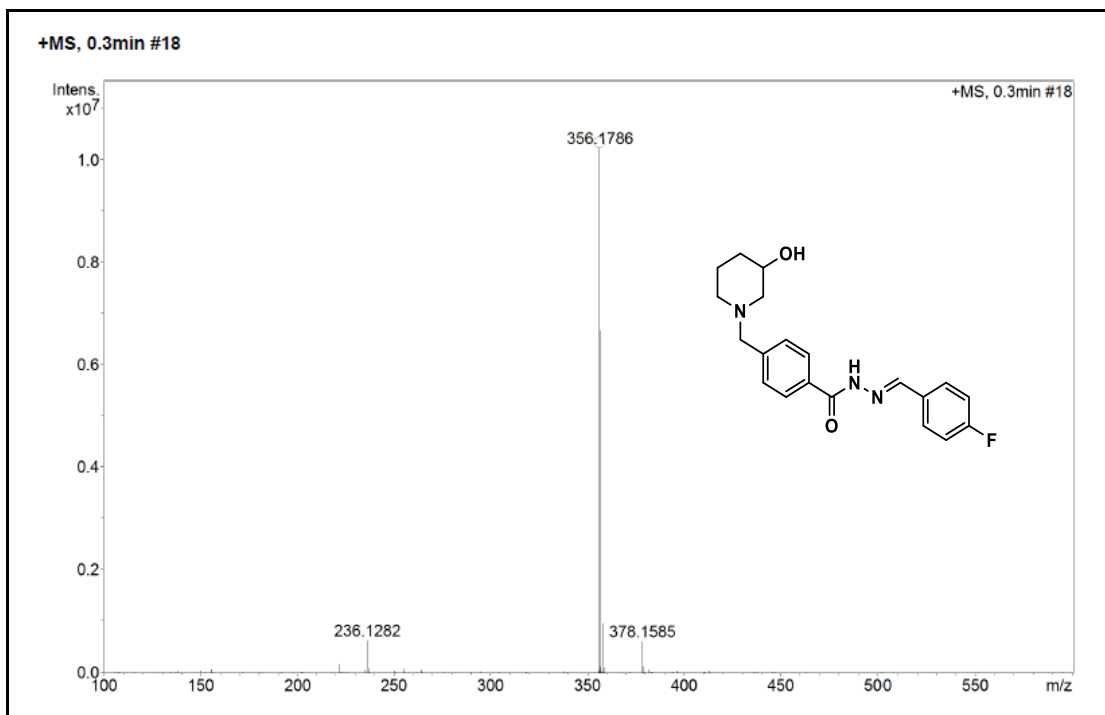


Figura 46 - Espectro de Massas de **PQM-67 (32g)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.11 *N*-(4-morfolinobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: **PQM-74 (32h)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 47**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32h**. Em 3429 cm⁻¹ e 3257 cm⁻¹ banda referente a deformação axial de N-H livre; em 2831 cm⁻¹ banda de deformação axial das ligações CH₂; em 2359 cm⁻¹ e 2341 cm⁻¹ são característicos da presença de CO₂ no momento da análise; em 1609 cm⁻¹ banda referente ao carbono carbonílico (C=O); em 1537 cm⁻¹ e 1228 cm⁻¹ bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H.

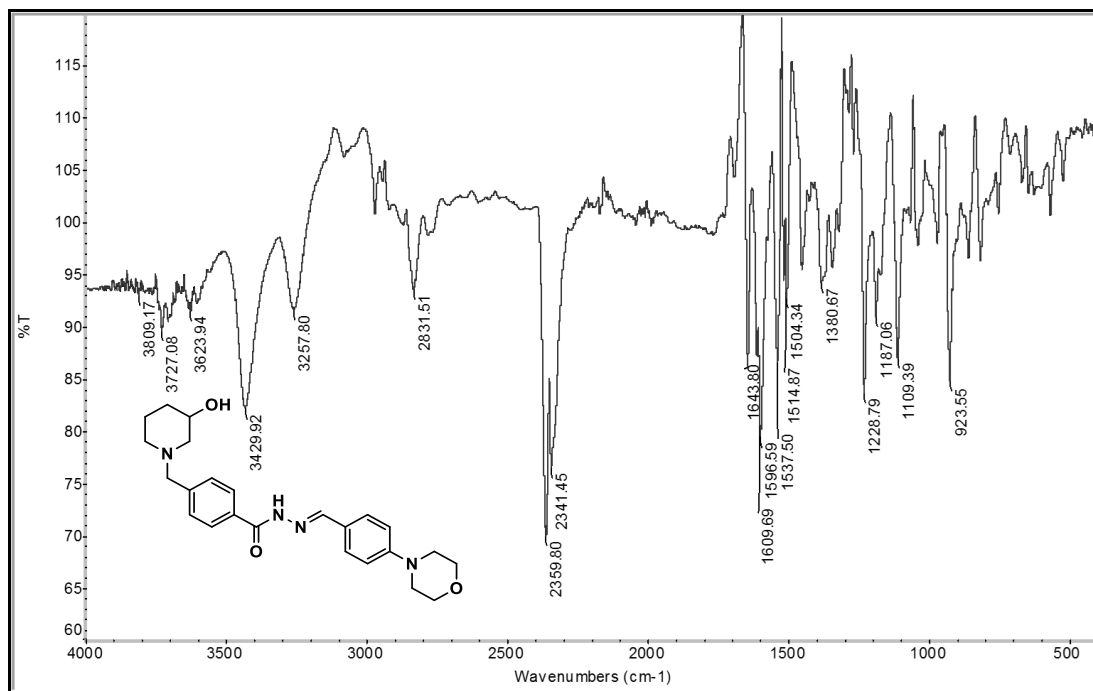


Figura 47 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-74 (32h)** (ATR)

Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ¹H de **32h** (Figura 48) observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-74**: em 12,42 ppm simpleto referente ao H-17, o H-19 está presente na mesma região que a piridina em 8,74 ppm. Sinais pertencentes aos núcleos aromáticos em 8,26 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,8$); em 7,94 ppm duplete referente aos H-21 e H-25 ($J=6,8$); em 7,51 ppm duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=8,1$); em 6,99 ppm referente aos H-22 e H-24 ($J=8,8$). Simpleto em 5,70 ppm referentes aos H-7. Multipletos centrados em 3,76 ppm e 3,12 ppm referentes aos H-28, H-30 e H-27, H-31, respectivamente, sendo que estes sinais estão relacionados ao anel morfolina. Sinais referentes ao núcleo piperidínico na região de 4,08 - 1,48 ppm. Foi realizado RMN de ¹H em piridina devido à dificuldade de visualização de H-3 e H-7 quando o espectro foi realizado em DMSO e também não houve outro solvente que solubilizasse o composto além de DMSO e piridina (Tabela 11, Apêndice A.)

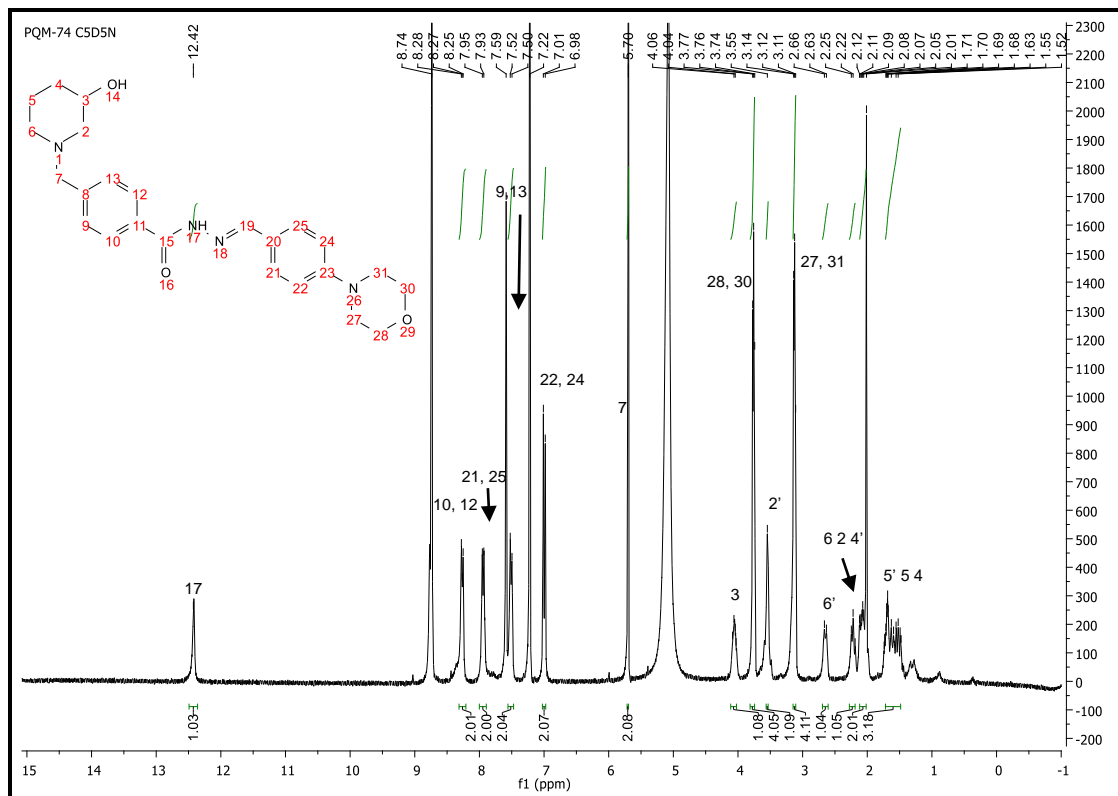


Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300MHz) do composto **PQM-74 (32h)**
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32h** (**Figura 49**) observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-74**: em 163,1 ppm carbono carbonílico C-15; em 148,4 ppm referente ao C-19. Sinais pertencentes aos carbonos dos núcleos aromáticos em 152,6 ppm referente ao C-23; em 142,4 ppm referente ao C-8; em 132,8 ppm referente ao C-11; em 129,2 referente ao C-10 e C-2; 128,7 referente aos C-21 e C-25; em 127,9 referente aos C-9 e C-13; em 125,0 ppm referente ao C-20; em 114,8 referente ao C-22 e C-24. Em 66,4 ppm e 49,9 ppm, sinais referentes aos C-28, C-30 e C-27, C-31, respectivamente, que pertencem ao anel morfolina que são os sinais mais característicos desse tipo de estrutura. Em 61,3 ppm referente ao C-7 que está entre o núcleo aromático e o piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,4 ppm, 62,0 ppm, 53,4 ppm, 33,5 ppm e 23,5 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (**Tabela 11**, Apêndice A).

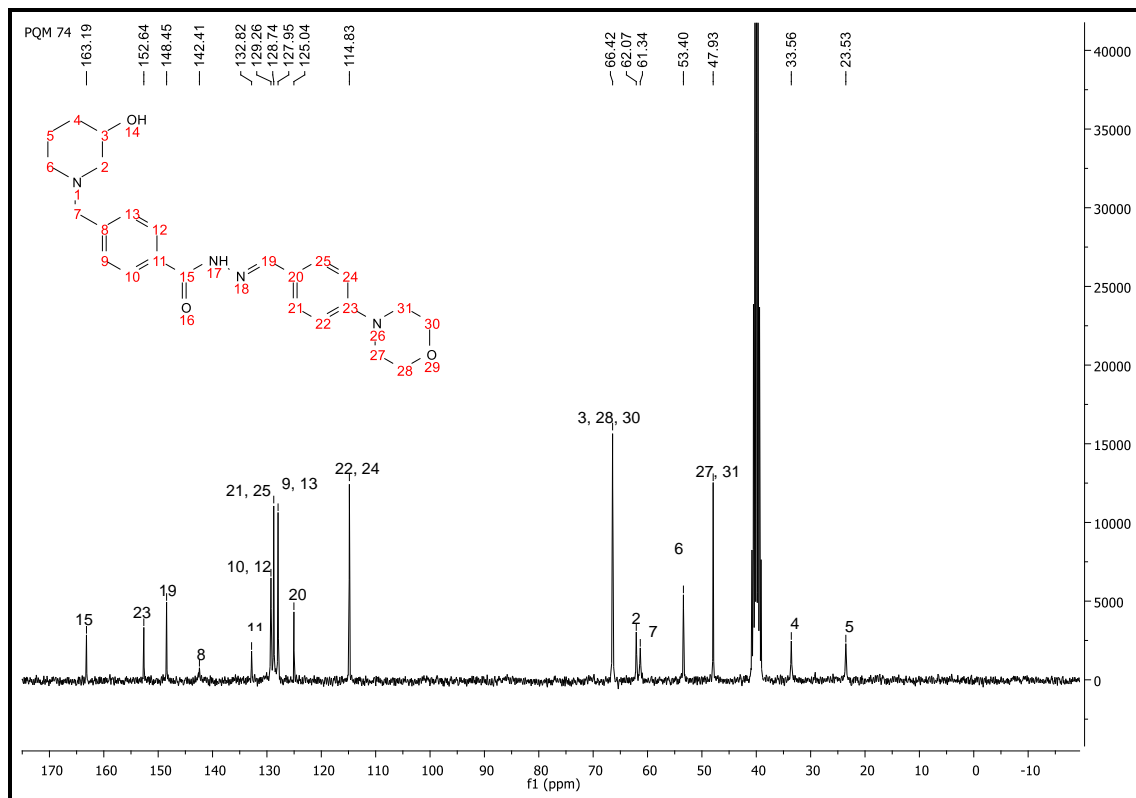


Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75MHz) do composto **PQM-74 (32h)**
 Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32h (Figura 50)** observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação $m/z= 423,2407$ e o pico $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com relação $m/z= 445,2215$.

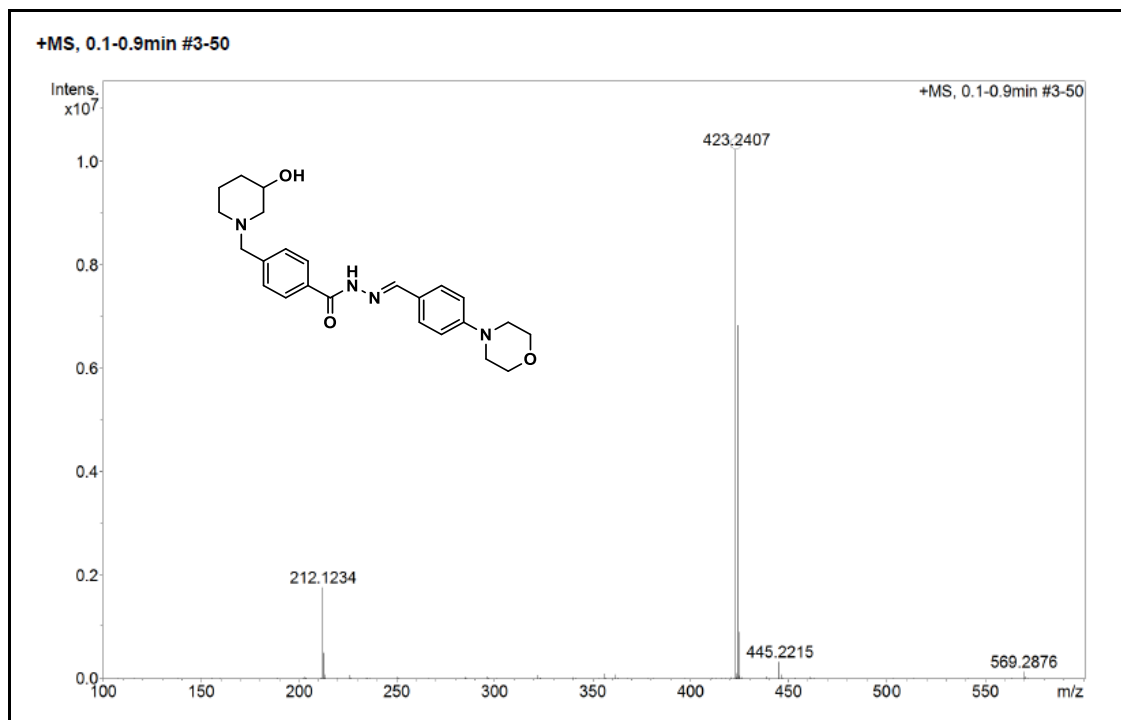


Figura 50 - Espectro de Massas de **PQM-74 (32h)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.12 *N*-((4-piperidi-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: **PQM-75 (32i)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 51**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32i**. Em 3176 cm⁻¹ banda referente a deformação axial de N-H livre; em 3032 cm⁻¹ banda referentes a deformação axial de C-H de aromáticos; em 2932 cm⁻¹ e 2849 cm⁻¹ característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH₂; em 1638 cm⁻¹ banda referente ao carbono carbonílico (C=O); em 1594 cm⁻¹ e 1557 cm⁻¹ bandas referentes a deformação axial das ligações C=C do anel; em 1516 cm⁻¹ e 1294 cm⁻¹ bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H.

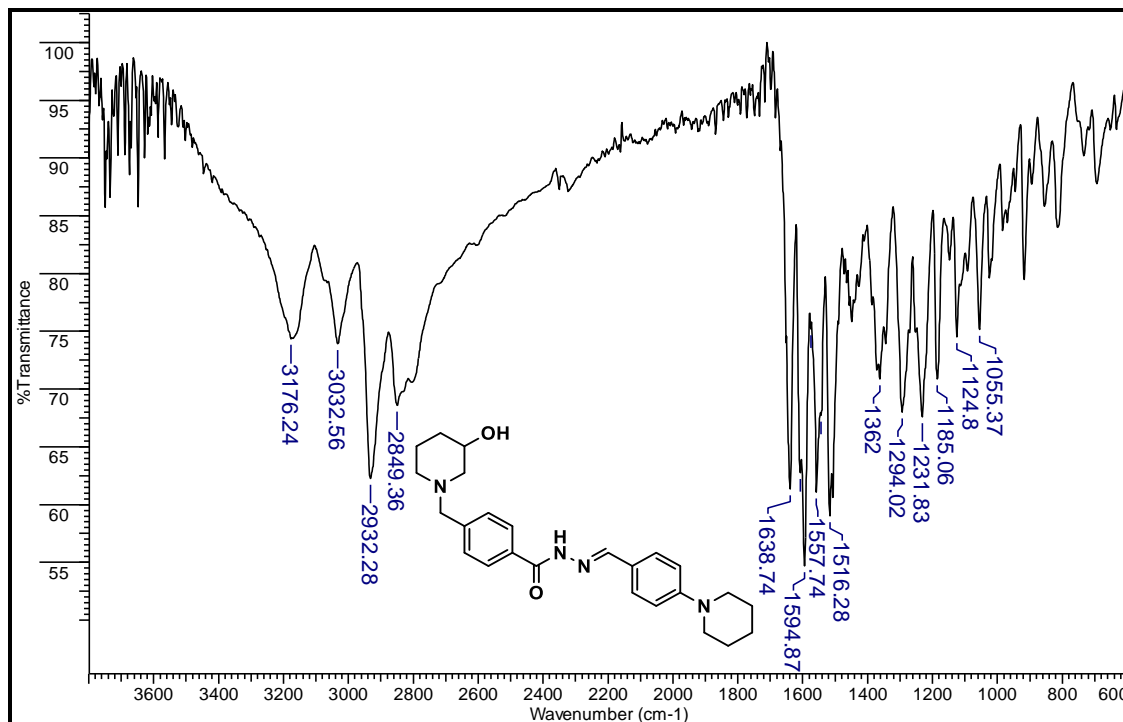


Figura 51 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-75 (32i)** (ATR)
 Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ¹H de **32i (Figura 52)** observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-75**: em 12,38 ppm simpleto referente ao H-17, H-19 está presente na mesma região que a piridina em 8,74 ppm. Sinais pertencentes aos núcleos aromáticos em 8,26 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,7$); em 7,92 ppm duplete referente aos H-21 e H-25 ($J=8,6$); em 7,51 ppm duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=7,8$); em 6,97 ppm duplete referente aos H-22 e H-24 ($J=8,7$). Multiplete centrado em 3,54 ppm referentes aos H-7. Multipletos centrados em 3,12 ppm e 1,46 ppm referentes aos H-27, H-31 e H-27, H-28, H-29 respectivamente, sendo que estes sinais estão relacionados ao anel piperidinila. Sinais referentes ao núcleo piperidínico na região de 4,10 - 1,55 ppm. Foi realizado RMN de ¹H em piridina devido à dificuldade de visualização de H-3 e H-7 quando o espectro foi realizado em DMSO e também não houve outro solvente que solubilizasse o composto além de DMSO e piridina (**Tabela 12** no Apêndice A).

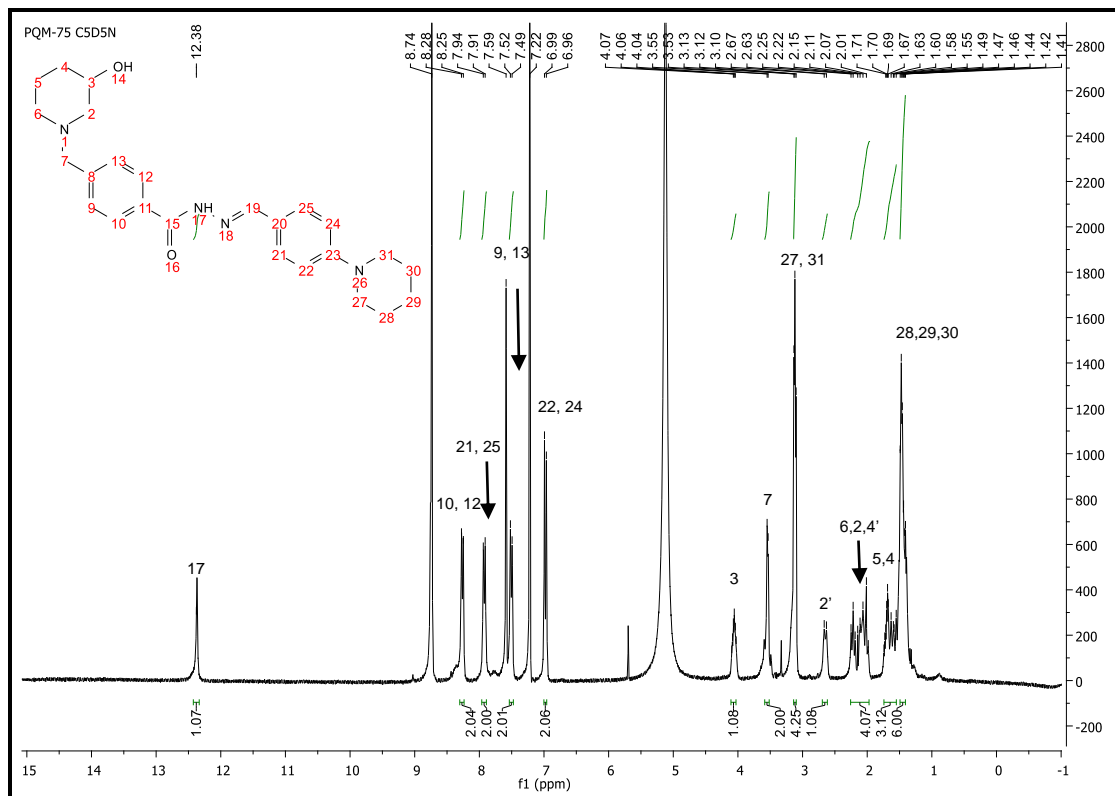


Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300MHz) do composto **PQM-75 (32i)**
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C **32i** (Figura 53) observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-75**: em 163,1 ppm carbono carbonílico C-15; em 148,6 ppm referente ao C-19 Sinais pertencentes aos carbonos dos núcleos aromáticos em 152,8 ppm referente ao C-23; em 142,3 ppm referente ao C-8; em 132,9 ppm referente ao C-11; em 129,2 referente ao C-10 e C-2; 128,8 referente aos C-21 e C-25; em 127,9 referente aos C-9 e C-13; em 123,8 ppm referente ao C-20; em 115,0 ppm referente ao C-22 e C-24. Em 48,8 ppm, 25,4 ppm e 24,3 ppm sinais referentes aos C-27, C-31; C-28, C-30 e C-29, respectivamente, que pertencem ao anel piperidinila que são os sinais mais característicos desse tipo de estrutura. Em 62,0 ppm referente ao C-7 que está entre o núcleo aromático e o piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66, 3 ppm, 61,2 ppm, 51,3 ppm, 33,5 ppm e 23,4 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (Tabela 12, Apêndice A).

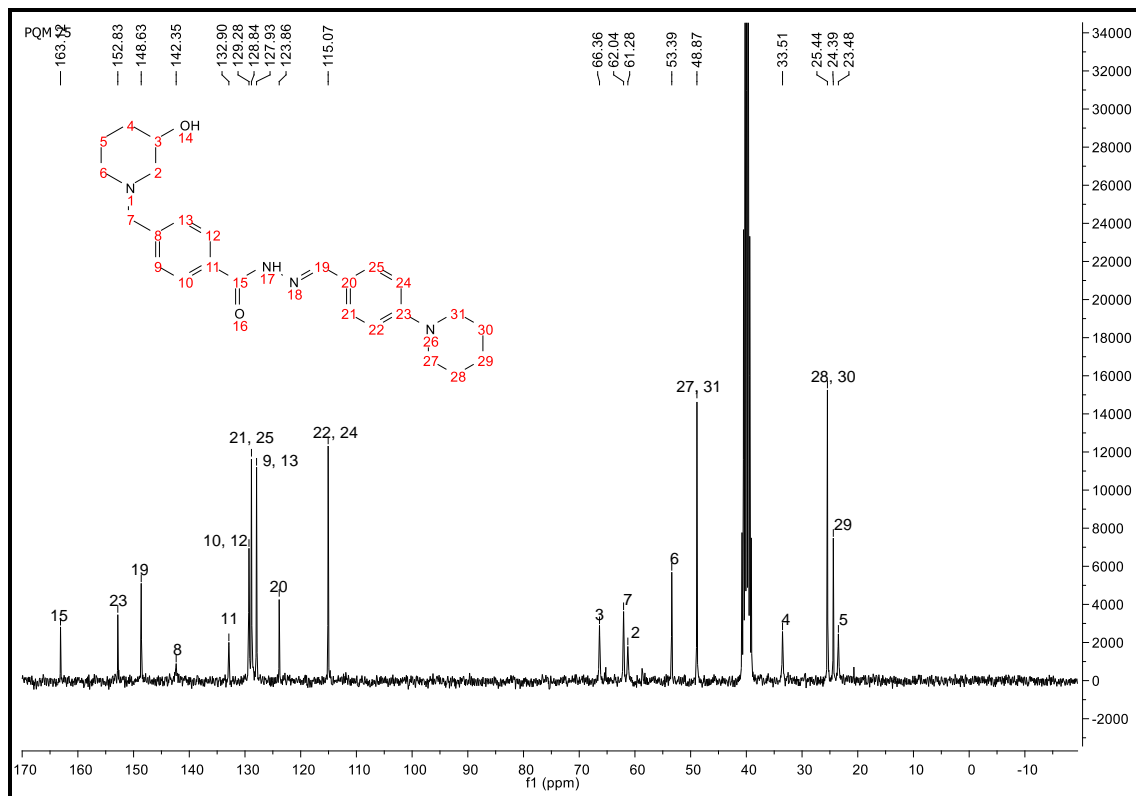


Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-75 (32i)**
 Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32i** (Figura 54) observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z= 421,2616$ e o pico $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com relação de $m/z= 443,2426$.

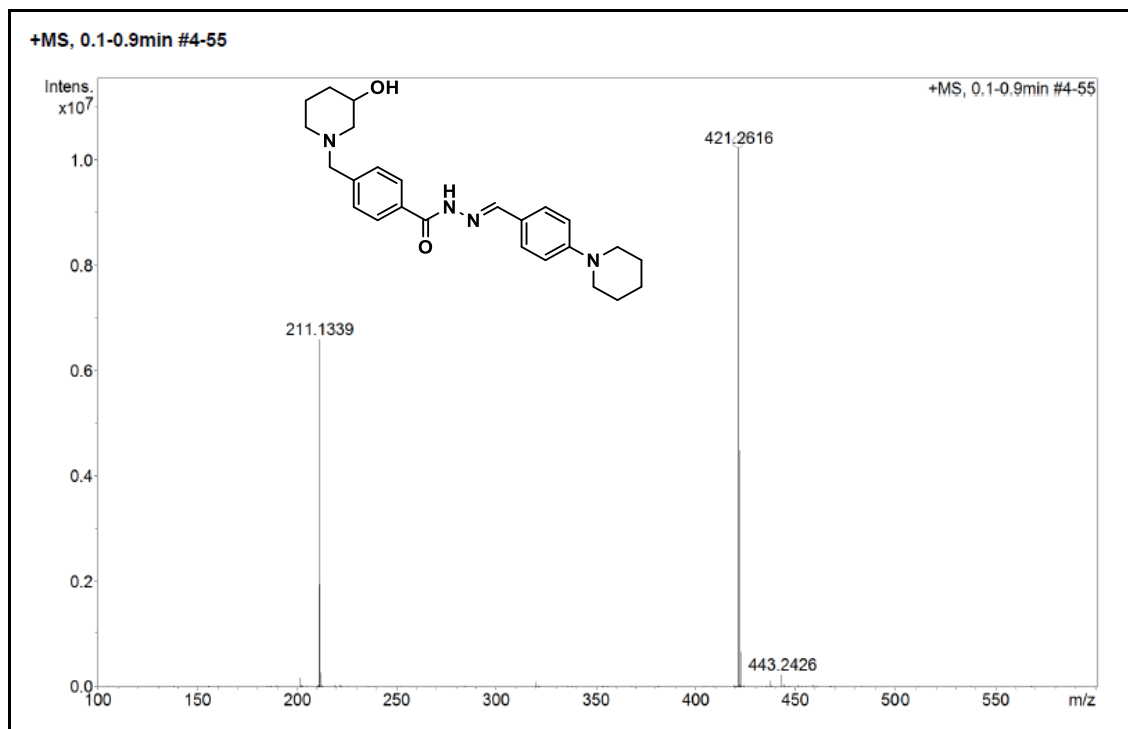


Figura 54 - Espectro de Massas de **PQM-75 (32i)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.1.13 *N*-(4-(1H-imidazol-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida: **PQM-76 (32j)**

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 55**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32j**. Em 3430 cm^{-1} e 3252 cm^{-1} banda referente a deformação axial de N-H livre; em 2925 cm^{-1} e 2832 cm^{-1} característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH_2 ; em 1644 cm^{-1} banda referente ao carbono carbonílico ($\text{C}=\text{O}$); em 1608 cm^{-1} e 1598 cm^{-1} bandas referentes a deformação axial das ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel; em 1515 cm^{-1} e 1229 cm^{-1} bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H.

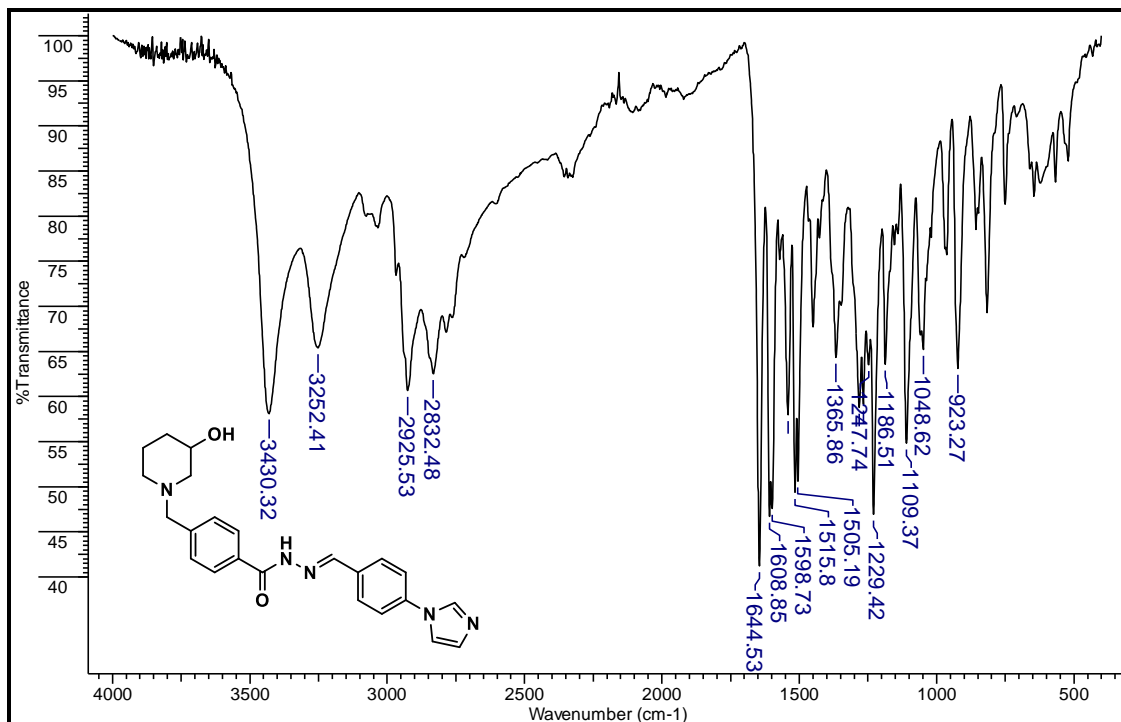


Figura 55 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-76 (32j)** (ATR)
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^1H de **32j** (Figura 56) observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-76**: Em 8,40 ppm simpleto referente ao H-19. Em 8,23 ppm simpleto referente ao H-30; em 7,66 ppm referente ao H-29; em 7,18 ppm simpleto referente ao H-27 que são atribuídos ao anel imidazol. Sinais pertencentes aos núcleos aromáticos em 8,01 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=8,4$); em 7,93 ppm duplete referente aos H-22 e H-24 ($J=8,1$); em 7,66 ppm duplete referente aos H-9 e H-13 ($J=7,6$); em 7,52 ppm referente aos H-21 e H-25 ($J=8,1$). Multiplete entre 3,75-3,67 referente aos H-3 e H-7. Sinais referente ao núcleo piperidínico na região de 3,68 - 1,26 ppm (Tabela 13, Apêndice A).

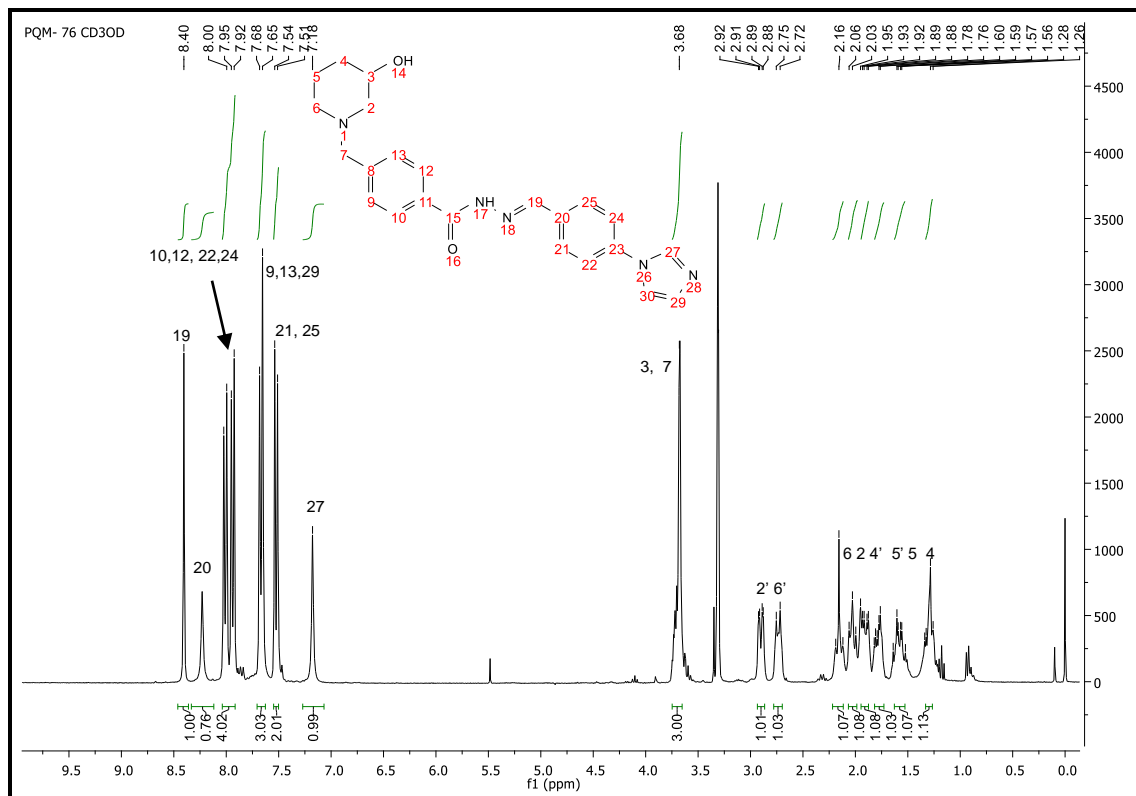


Figura 56 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz) do composto **PQM-76 (32j)**
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32j** (Figura 57) observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-76**: em 163,3 ppm carbono carbonílico C-15; em 147,0 ppm referente ao C-19. Sinais pertencentes aos carbonos dos núcleos aromáticos em 142,8 ppm referente ao C-8; em 138,2 ppm referente ao C-27; em 133,2 referente ao C-23; em 132,3 ppm referente ao C-11; em 130,5 ppm referente ao C-20; em 129,2 referente ao C-10. C-2 e C-29; em 128,0 ppm referente aos C-9, C-13, C-21 e C-25; em 120,8 referente ao C-22 e C-24; em 118,3 ppm referente ao C-30. Em 62,1 ppm referente ao C-7 que está entre o núcleo aromático e o piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,5 ppm, 61,5 ppm, 53,4 ppm, 33,6 ppm e 23,6 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5 (Tabela 13, Apêndice A).

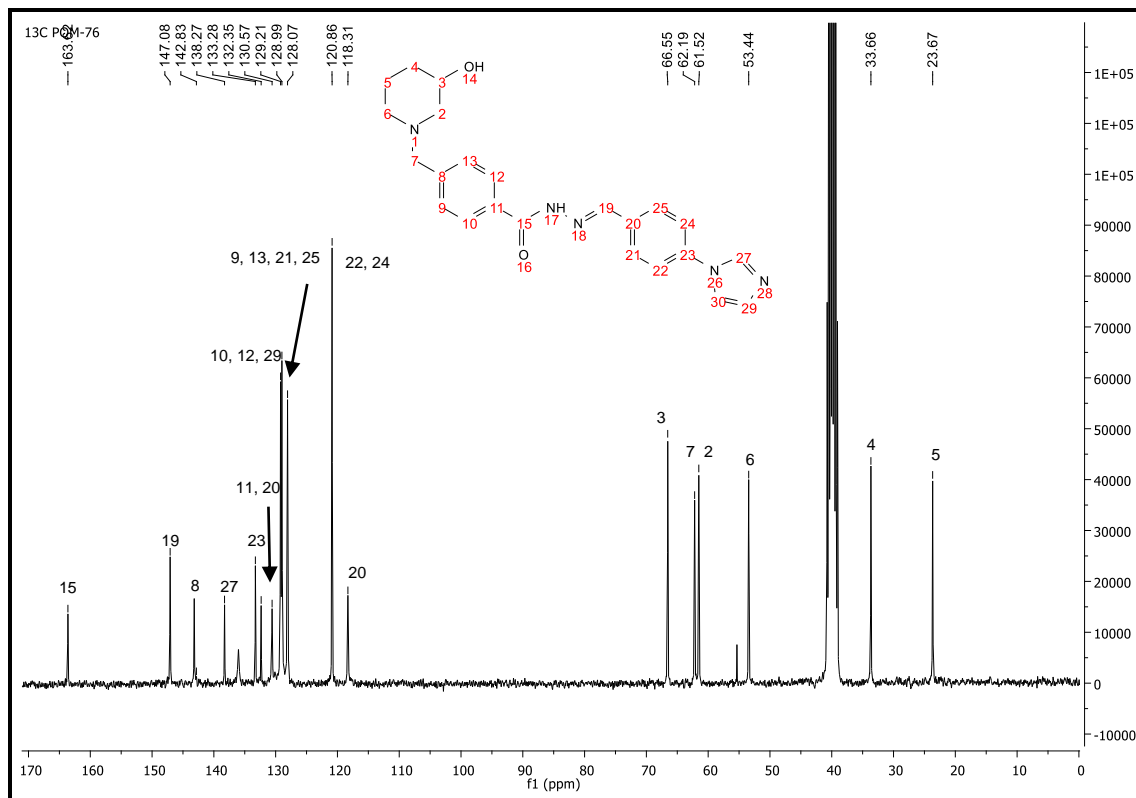


Figura 57 - Espectro de RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-76 (32j)**
 Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32j** (Figura 58) observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z=404,2088$.

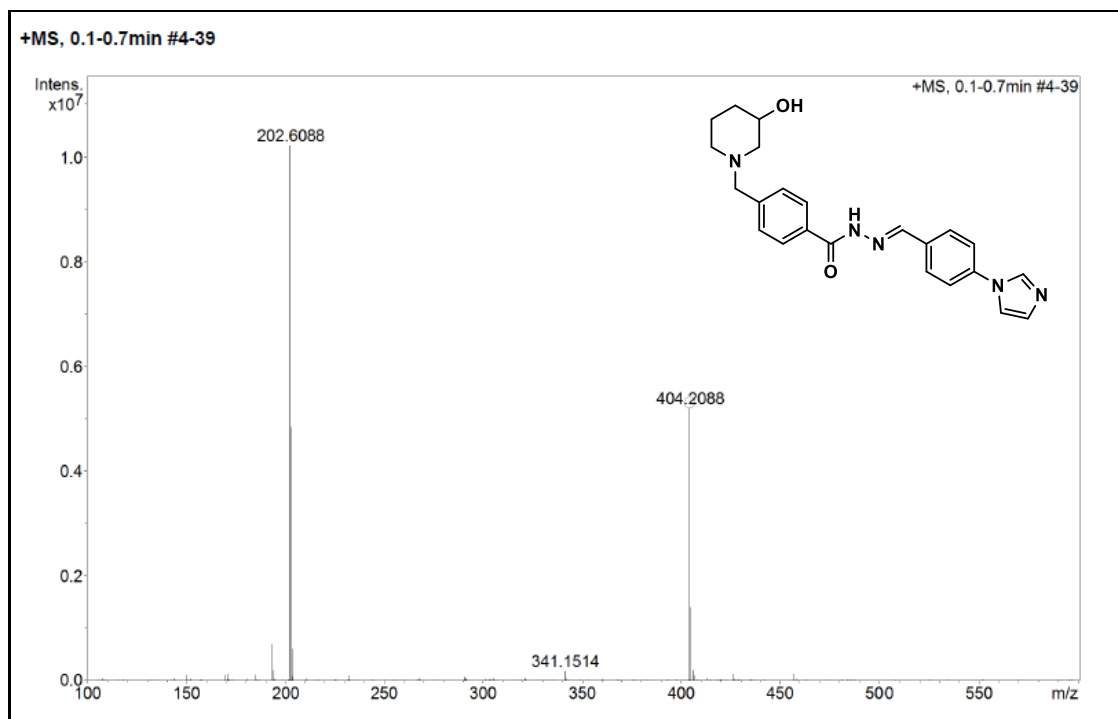


Figura 58 - Espectro de Massas de **PQM-76 (32j)** (ESI-MS).
 Fonte: Do autor

4.1.14 *N*- (4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxi piperidin-1-il)metileno) benzohidrazida: PQM-88 (32k)

No espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 59**) foram observadas as principais bandas características da estrutura de **32k**. Em 3381 cm^{-1} e 3238 cm^{-1} banda referente a deformação axial de N-H livre; em 2919 cm^{-1} e 2781 cm^{-1} característicos de deformações axial assimétrica e simétrica das ligações CH_2 ; em 2359 cm^{-1} e 2323 cm^{-1} são característicos da presença de CO_2 no momento da análise; em 1641 cm^{-1} banda referente ao carbono carbonílico ($\text{C}=\text{O}$); em 1591 cm^{-1} bandas referentes a deformação axial das ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel; em 1534 cm^{-1} e 1277 cm^{-1} bandas de absorção que tem origem na interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N do grupo C-N-H.

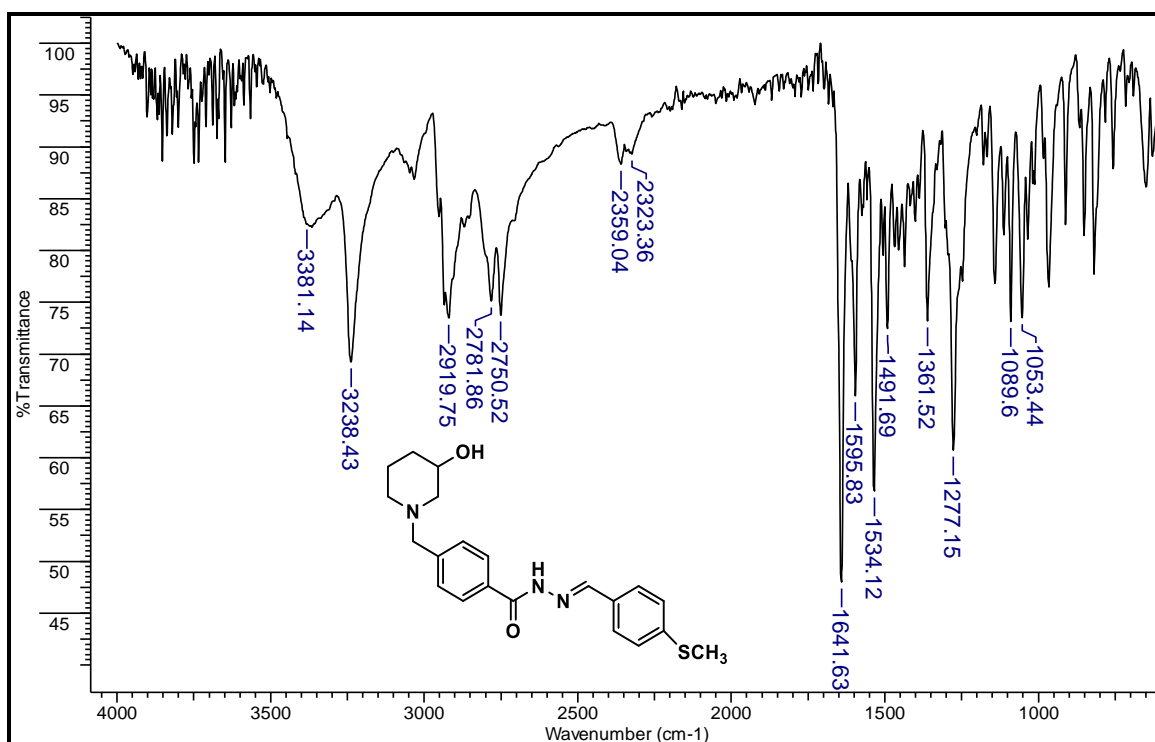


Figura 59 - Espectro de absorção na região do IV de **PQM-88 (32k)** (ATR)
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^1H de **32k** (**Figura 60**) observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-88**: em 12,58 ppm simpleto referente ao H-17, H-19 está presente na mesma região que a piridina em 8,74 ppm. Sinais pertencentes aos núcleos aromáticos em 8,26 ppm duplete referente aos H-10 e H-12 ($J=7,6$); em 7,87 ppm duplete referente aos H-22 e H-24 ($J=8,7$); em 7,50 ppm duplete referente

aos H-21 e H-25 ($J=8,0$); em 7,32 ppm referente aos H-9 e H-13 ($J=8,3$). Simpleto em 3,52 ppm referentes aos H-7. Sinais referente ao núcleo piperidínico na região de 4,04 - 1,52 ppm. (**Tabela 14**, Apêndice A).

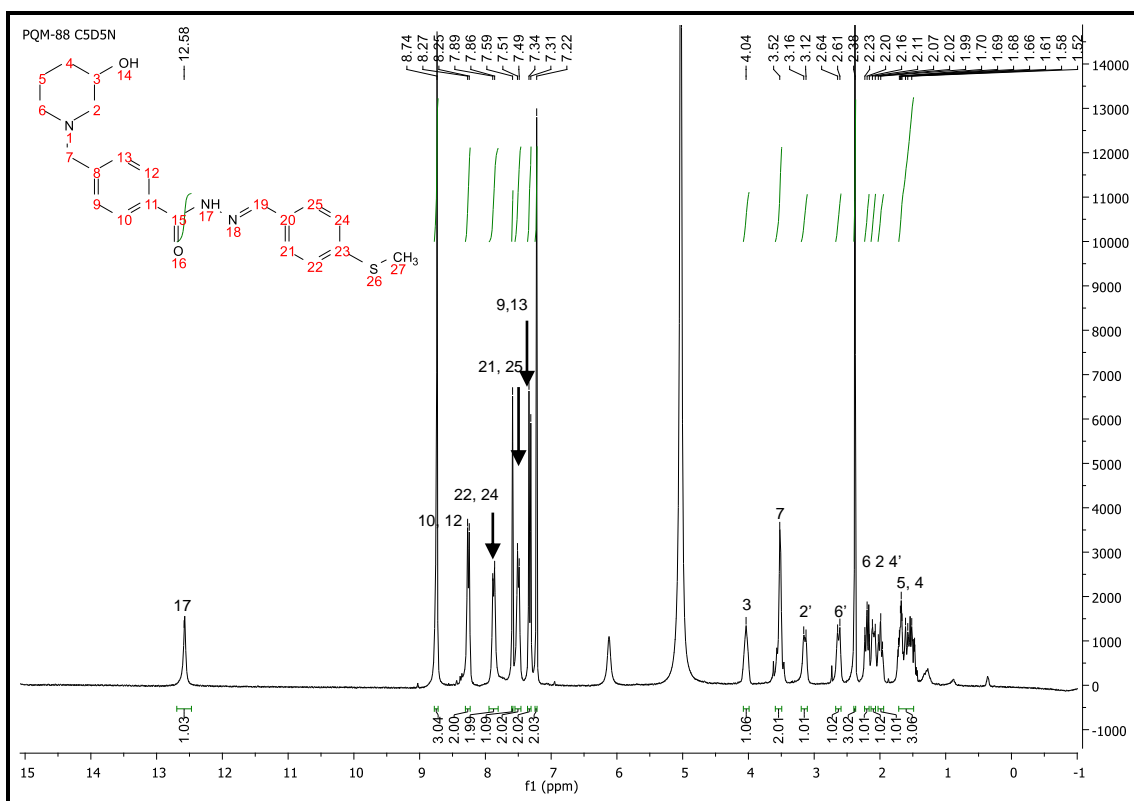


Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) do composto **PQM-88 (32k)**
 Fonte: Do autor

No espectro de RMN de ^{13}C de **32k** (**Figura 61**) observa-se os seguintes sinais correspondentes ao composto **PQM-88**: Em 163,4 ppm carbono carbonílico C-15; em 147,7 ppm referente ao C-19 Sinais pertencentes aos carbonos dos núcleos aromáticos em 143,1 ppm referente ao C-8; em 141,3 ppm referente ao C-23; em 132,4 ppm referente ao C-20; em 131,1 ppm referente ao C-11; em 129,1 referente ao C-10 e C-2; 128,0 referente aos C-9, C-13, C-22 e C-24; em 126,1 referente aos C-21 e C-25. Em 62,2 ppm referente ao C-7 que está entre o núcleo aromático e o piperidínico. Sinais referentes ao núcleo piperidínico em 66,5 ppm, 61,5 ppm, 53,4 ppm, 33,6 ppm e 23,7 ppm referentes, respectivamente, aos C-3, C-2, C-6, C-4 e C-5. Em 14,72 ppm referente ao C-27 que é o mais característico dessa estrutura (**Tabela 14**, Apêndice A).

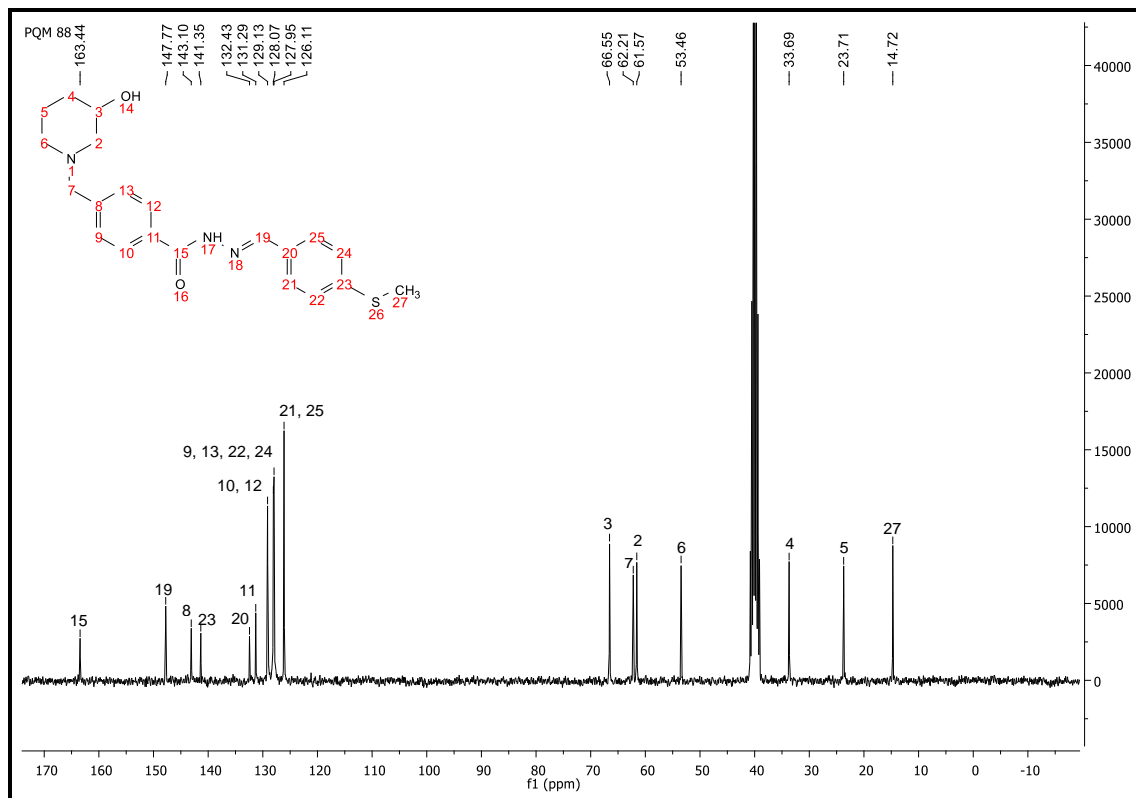


Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) do composto **PQM-88 (32k)**
 Fonte: Do autor

No espectro de massas de alta resolução de **32k (Figura 62)** observa-se o pico da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com relação de $m/z= 384,1755$ e o pico $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com relação de $m/z= 406,1564$.

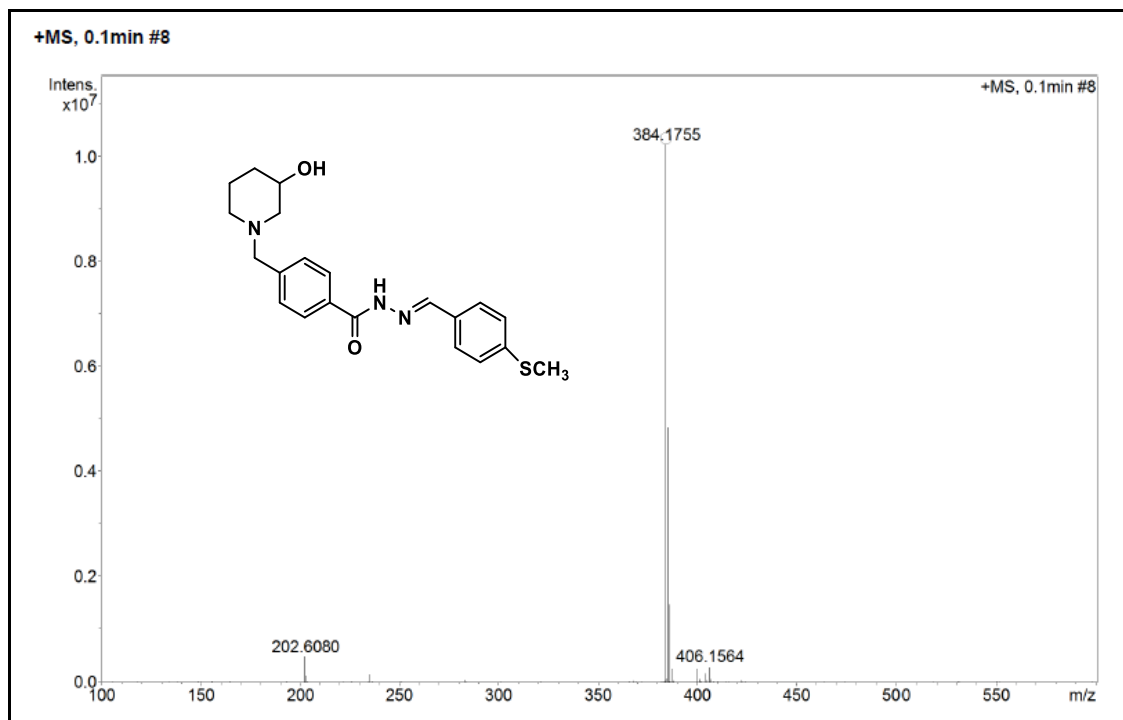


Figura 62 - Espectro de Massas de **PQM-88 (32k)** (ESI-MS).
Fonte: Do autor

4.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

Os diferentes compostos foram testados contra quatro linhagens derivadas de tumores de tumores humanos: A549 (carcinoma de pulmão humano), MCF-7 (carcinoma de mama humana), HT144 (melanoma) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) (**Tabela 16**). Para uma triagem inicial, os compostos foram utilizados na concentração de 60 μM . De acordo com protocolo desenvolvido pelo NCI (*National Cancer Institute*), a triagem é realizada em uma única concentração que pode variar entre 0,1 μM a 1 mM (MONGA; SAUSVILLE; 2002). Os resultados mostraram que houve redução na viabilidade celular em culturas de HT144 tratadas com os compostos **PQM-57 (32d)**, **PQM-66 (32f)**, **PQM-74 (32h)**, **PQM-75 (32i)**, **PQM-76 (32j)** e **PQM-88 (32k)**, sendo que destes **PQM-75 (32i)** foi o mais promissor (**Figura 63**). As células MCF-7 mostram-se resistentes aos compostos estudados, pois foi observado redução na viabilidade (cerca de 20%) somente em culturas tratadas com **PQM-75 (32i)** (**Figura 63**). Na linhagem HepG2, houve redução significativa na viabilidade em culturas tratadas com **PQM-66 (32f)** e **PQM-75 (32i)** (**Figura 63**). Enquanto na linhagem A549, a viabilidade foi reduzida em culturas tratadas com os compostos **PQM-66 (32f)**, **PQM-67 (32g)**, **PQM-76 (32j)** e **PQM-88 (32k)** (**Figura 63**).

De acordo com os dados preliminares, a linhagem A549 (carcinoma de pulmão humano) foi selecionada e curvas concentração-resposta foram realizadas para determinar o IC₅₀ dos compostos **PQM-66 (32f)**, **PQM-67 (32g)**, **PQM-75 (32i)** e **PQM-88 (32k)**. Além disso, o IC₅₀ de **PQM-75 (32i)** também foi determinado para as outras linhagens (MCF-7, HepG2 e HT144), uma vez que este composto se mostrou ativo em todas elas.

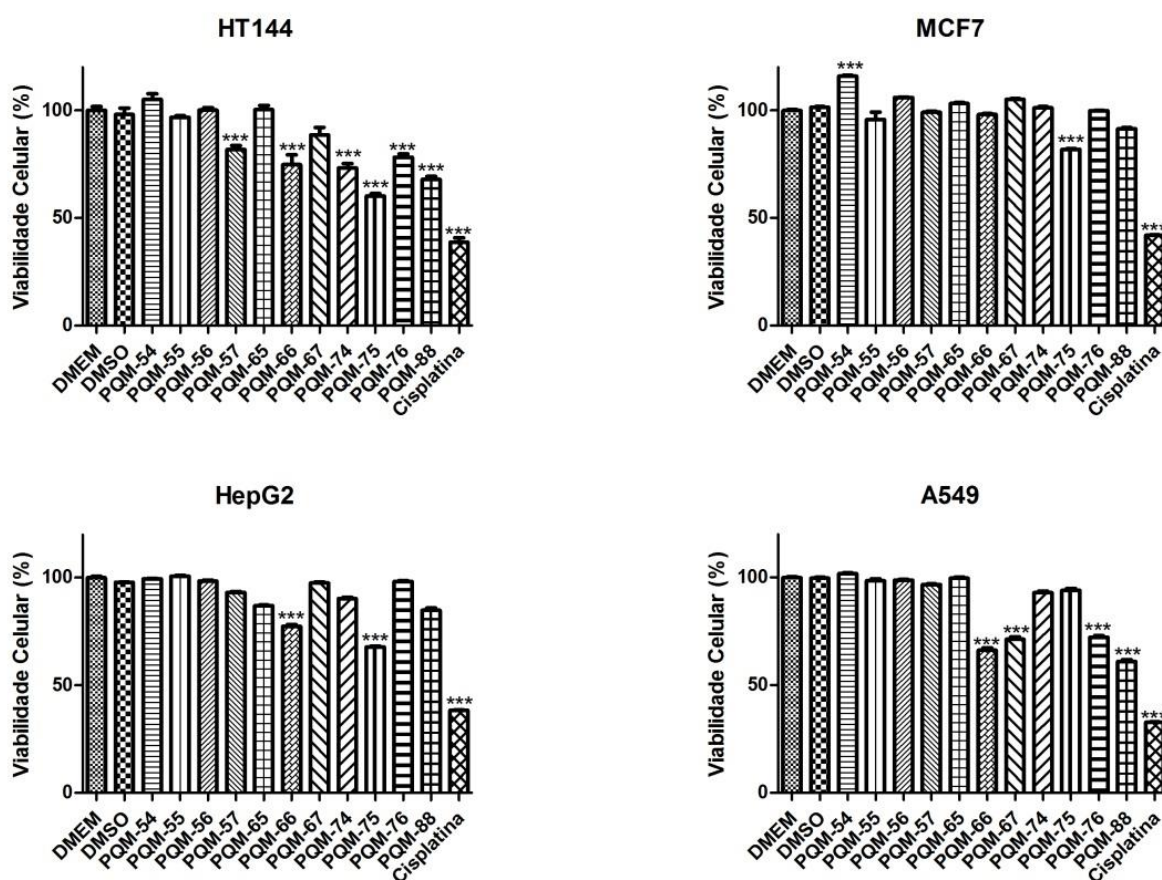


Figura 63 - Viabilidade celular determinada por MTS. As culturas (HT144, MCF-7, HepG2 e A549) foram tratadas por 48 h com os diferentes compostos na concentração de 60 μM . Cisplatina foi utilizada como um controle positivo da reação. *** ($p < 0,001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey.

Fonte: Do autor

Os resultados de curva concentração-resposta realizada com a linhagem A549 mostraram que **PQM-88 (32k)** teve um melhor perfil de atividade (**Figura 64**). Os valores de IC₅₀ encontrados foram $139,20 \pm 4,25 \mu\text{M}$ (**PQM-66, 32f**), $116,60 \pm 3,85 \mu\text{M}$ (**PQM-67, 32g**), $120,50 \pm 3,98 \mu\text{M}$ (**PQM-75, 32i**) e $53,92 \pm 2,56 \mu\text{M}$ (**PQM-88, 32k**). Portanto, dentre os compostos testados, **PQM-88** foi o mais efetivo em reduzir a viabilidade de células de carcinoma de pulmão humano (A549).

Estes resultados sugerem que o átomo de enxofre no substituinte SCH₃ em **32k** é importante para a citotoxicidade na modulação contra linhas de células de câncer do pulmão, uma vez que o análogo com OCH₃ (**32e**) não foi ativo. Neste caso, provavelmente a maior polarizabilidade e menor efeito de retirada de elétrons do átomo de enxofre e sua melhor capacidade de liberação de elétrons e basicidade poderiam explicar essa atividade. Além disso, considerando que os compostos apresentados nesse estudo apresentam um novo padrão estrutural para investigação de atividade antitumoral, não existem relatos na literatura que possam ser comparados aos obtidos no presente estudo. Contudo, Singh e colaboradores (2014) destacam que o derivado benzilpiperidínico (**33**, **Figura 6**) mostrou atividade citotóxica contra diferentes linhagens tumorais em relação ao produto natural de origem, a embelina (**33**, **Figura 6**), demonstrando, portanto, a importância da subunidade benzilpiperidinica. Em outro trabalho, YU; SHI; KE, (2015) demonstraram que derivados acilidrazônicos tem atividade citotóxica sobre células HepG2 (carcinoma hepatocelular), Huh-7 (carcinoma de pulmão) e BCG-823 (câncer gástrico), evidenciando a importância biofórica da subunidade NAH. Na literatura, o fragmento *N*-acilidrazona é uma estrutura considerada privilegiada devido a possibilidade de modular diferentes alvos de ação dependendo do tipo de substituinte, demonstrando ser uma classe química passível de ser explorada para a modulação de diferentes tipos biorreceptores (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007).

Os resultados das curvas concentração-resposta realizadas com as linhagens HT144, MCF-7 e HepG2 frente ao composto **PQM-75 (32i)** mostraram que as linhagens MCF-7 (mama) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) foram as mais responsivas do que a linhagem HT144 (**Figura 65**). Os valores de IC₅₀ encontrados para HepG2 e MCF-7 foram, respectivamente, 58,40 ± 2,30 µM e 44,81 ± 1,85 µM. Ao passo que o IC₅₀ encontrado para a linhagem HT144 foi de 86,40 ± 3,65 µM. O efeito de **PQM-75 (32i)** foi também avaliado sobre células normais. Para isso, foi utilizada a linhagem CCD-1059Sk, a qual se trata de fibroblastos derivados de pele humana. Os dados mostraram que o composto **32i** é menos citotóxico aos fibroblastos do que às linhagens tumorais, com IC₅₀= 193,50 ± 5,00 µM (**Figura 66**).

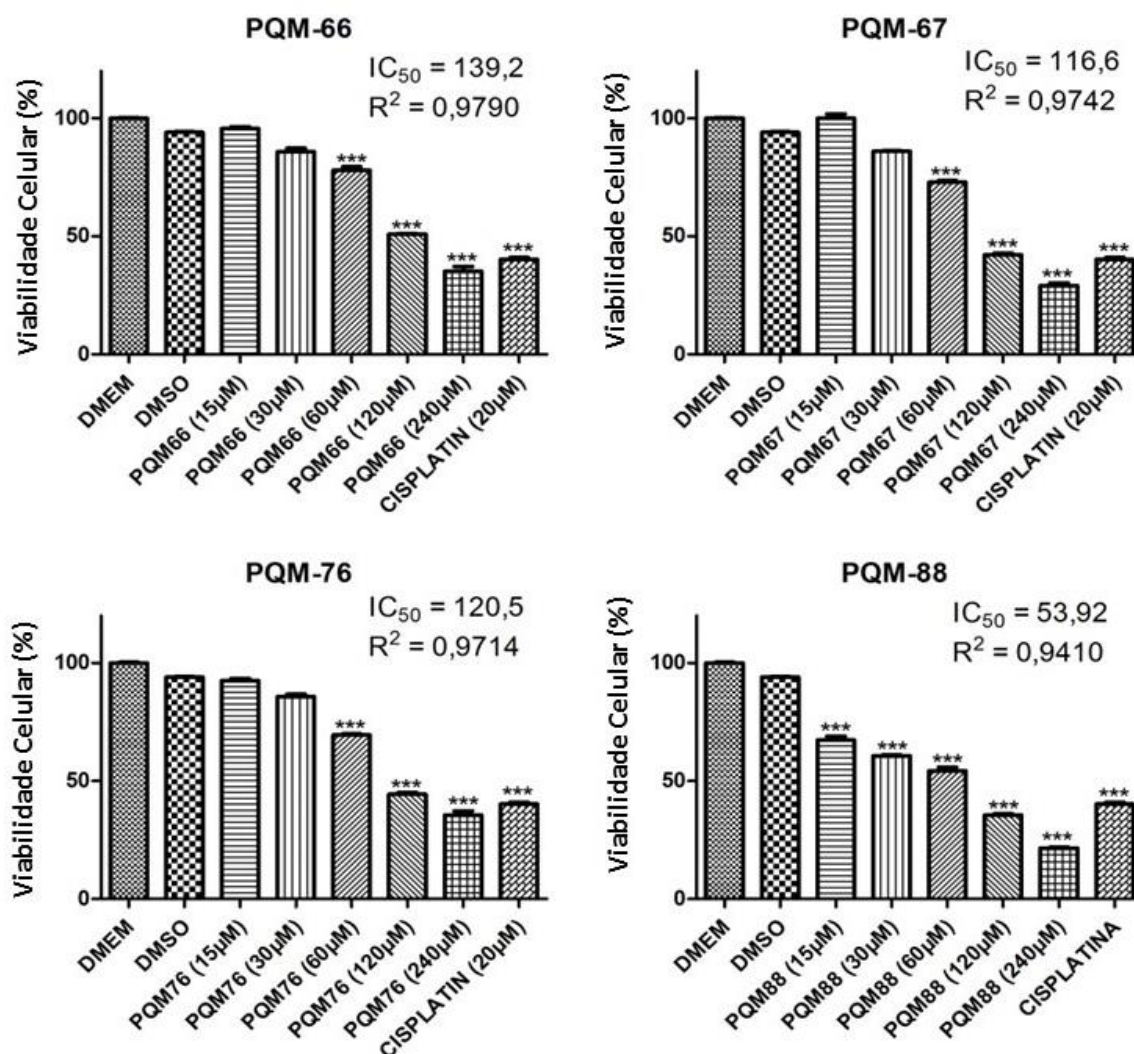


Figura 64 - Viabilidade celular determinada por MTS. Culturas de células A549 foram tratadas com os compostos **PQM-66 (32f)**, **PQM-67 (32g)**, **PQM-76 (32j)** e **PQM-88 (32k)** em diferentes concentrações por 48 h. *** ($p < 0.001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey.

Fonte: Do autor

A redução na viabilidade determinada por ensaio colorimétrico não permite evidenciar se o composto tem atividade antiproliferativa e/ou citotóxica. Novos ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial antiproliferativo de **PQM-75 (32i)** sobre células HepG2. Os resultados mostraram que o composto **32i** reduziu significativamente o número de colônias formadas em culturas de HepG2 (**Figura 67**) após 24 horas de exposição. Em culturas tratadas com 30 µM e 60 µM o número de colônias foi reduzido em aproximadamente 60% e 70%, respectivamente.

O ensaio de capacidade clonogênica trata-se de uma abordagem experimental importante para a identificação de agentes com atividade antitumoral, pois denota a

capacidade do composto em inibir a proliferação por períodos prolongados (FRANKEN et al., 2006). Assim sendo, no presente estudo foi possível demonstrar que a redução da viabilidade induzida por **PQM-75** está associada, pelo menos em parte, à sua capacidade de inibir proliferação de células HepG2. Atividade antiproliferativa de acilidrazonas tem sido descrita na literatura tanto *in vitro* como *in vivo* (AMARAL et al., 2014; DUAN et al., 2016). Além disso, a estrutura polar das acilidrazonas confere maior solubilidade, uma característica importante para a seleção de protótipos a fármacos (DUAN et al., 2016).

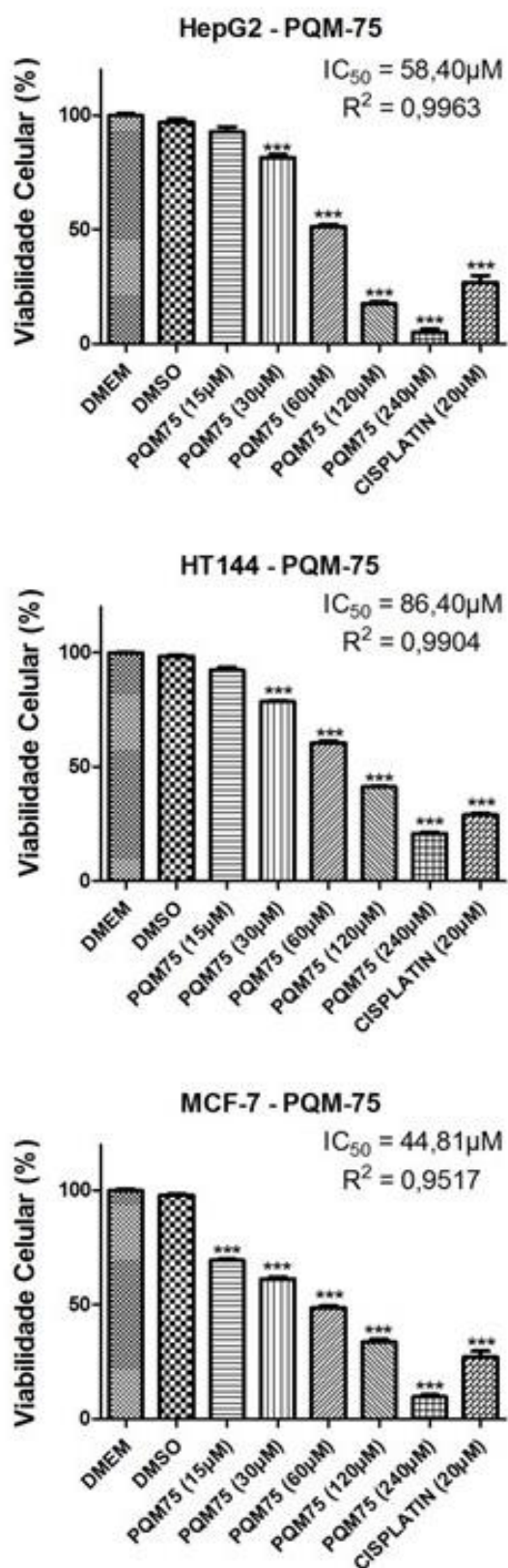


Figura 65 - Viabilidade celular determinada por MTS. As diferentes linhagens celulares foram tratadas com o **PQM-75 (32i)** em diferentes concentrações por 48 h.*** ($p < 0.001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey.

Fonte: Do autor

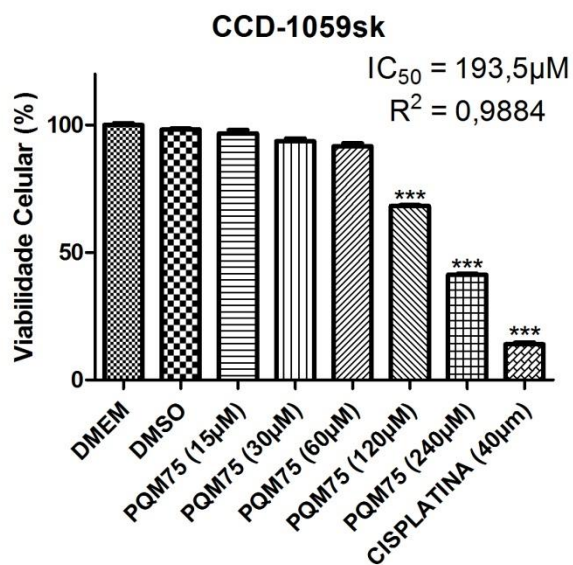


Figura 66 - Viabilidade celular determinada por MTS. A linhagem CCD-1059Sk (fibroblasto normal de pele humana) foi tratada com o **PQM-75 (32i)** em diferentes concentrações por 48 h.*** ($p < 0.001$) de acordo com análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey.
Fonte: Do autor

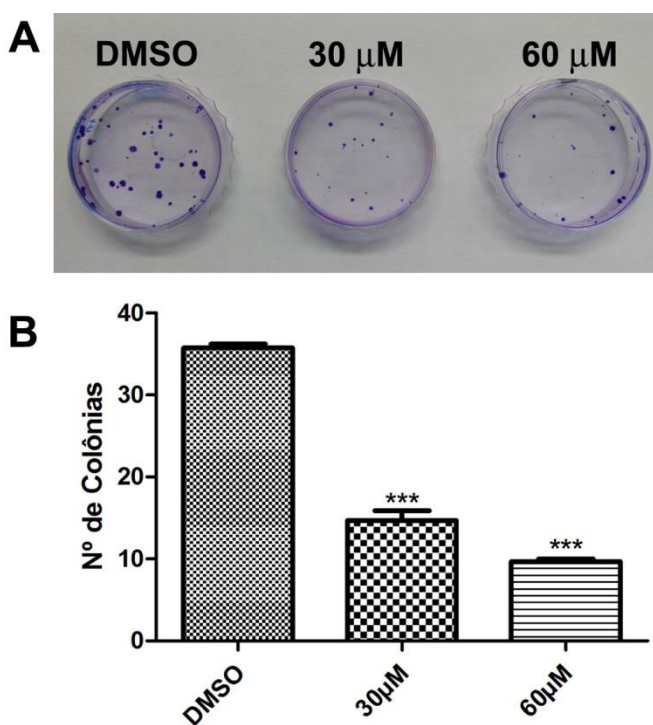


Figura 67 - Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem HepG2. As células foram expostas ao composto **PQM-75 (32i)** por 24 h e, na sequência, foram mantidas em cultura por mais 15 dias.

Fonte: Do autor

Legenda: (A) Imagens ilustrativas para evidenciar a formação de colônias.

(B) Análise do ensaio de capacidade clonogênica. *** ($p < 0.001$) de acordo com análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey.

Com o objetivo de caracterizar melhor a atividade antiproliferativa de **PQM-75 (32i)** sobre células da linhagem HepG2, foi realizada a quantificação de DNA por citometria de fluxo para investigar possível influência de **PQM-75** sobre a progressão do ciclo celular. De acordo com os dados obtidos (**Tabela 15**), o composto **32i** altera a dinâmica normal de progressão do ciclo celular. Contudo foi observado que o efeito é concentração-dependente. Quando as culturas HepG2 foram tratadas com 30 μM , houve aumento significativo na frequência de células em G0/G1 com consequente redução do percentual de células nas fases subsequentes (S e G2/M) indicando bloqueio do ciclo celular na transição G1/S. Por outro lado, nas culturas tratadas com 60 μM de **32i** houve significativo aumento na frequência de células na fase S do ciclo celular. Assim sendo, novas abordagens experimentais deverão ser realizadas para caracterizar os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos de **PQM-75 (32i)** sobre a progressão do ciclo celular. Apesar das novas investigações, a análise do ciclo celular reforça a atividade antiproliferativa de **PQM-75** sobre células HepG2. Além disso, a capacidade de acilidrazonas de bloquear o ciclo celular vem sendo descrito na literatura (ZHANG et al., 2014).

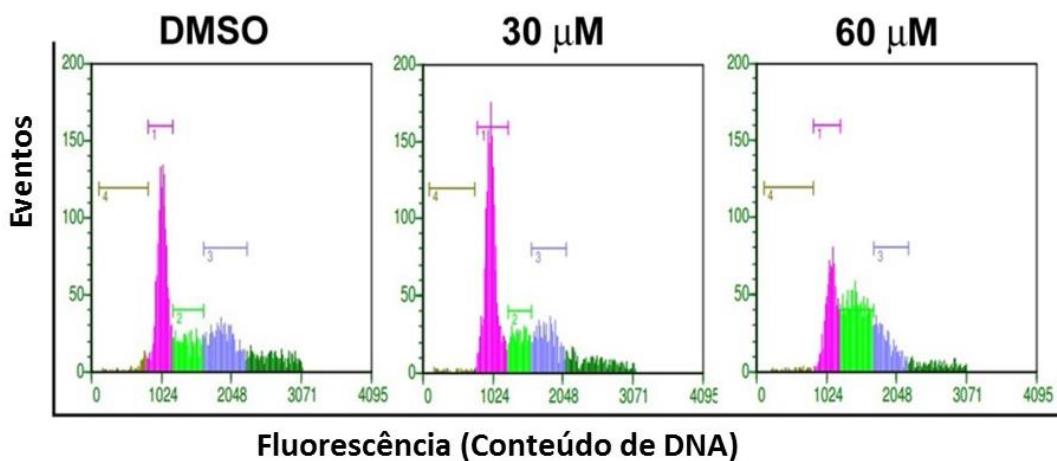


Figura 68 - Histogramas representativos que mostram a distribuição de células em diferentes fases do ciclo celular. As barras castanho, rosa, verde e azul representam, respectivamente, as fases Sub-G1, G0 / G1, S e G2 / M.

Fonte: Do autor

Tabela 15 - Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo em culturas HepG2 tratadas por 24 h.

	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
DMSO	2.21 ± 1.11	49.45 ± 1.83	20.47 ± 1.09	27.86 ± 1.98
30 μM	1.51 ± 0.55	60.18 ± 2.89**	15.62 ± 1.17**	22.68 ± 1.80*
60 μM	1.15 ± 0.38	30.92 ± 0.63***	45.39 ± 0.22***	22.54 ± 0.67*

* (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001) de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: Do autor

Os dados evidenciados neste trabalho são relevantes e suportam a continuidade do estudo para avaliar os mecanismos moleculares relacionados à atividade antiproliferativa de **PQM-75 (32i)** sobre células HepG2 e MCF-7. A análise da relação estrutura-atividade, evidenciou que a presença do grupo piperidinila e tiometila presentes em **PQM-75 (32i)** e **PQM-88 (32k)**, respectivamente, parecem ter uma contribuição auxofórica importante, uma vez que os derivados substituídos por anéis aromáticos de 5 membros (pirrolidina, imidazol), 6 membros alifáticos (morfonila) ou por outros grupos funcionais doadores/aceptores de densidade eletrônica (e.g. OCH₃, NO₂, Cl, Br, F) não foram efetivamente ativos. Apesar da atividade citotóxica ser da ordem de micromolar, estas substâncias merecem atenção especial como candidatos a protótipos de fármacos antitumorais, com fácil acesso sintético e baixa citotoxicidade. Uma vez evidenciado o mecanismo de ação, estudos computacionais poderão ser muito úteis na elucidação de eventuais alvos moleculares envolvidos, podendo ainda confirmar a influência dos substituintes presentes em **PQM-75 (32i)** e **PQM-88 (32k)**, seu modo de interação e orientar derivados adicionais com perfil de ação otimizado.

5 PARTE EXPERIMENTAL

Abordaremos os experimentos realizados do ponto de vista químico e biológico.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

A síntese dos derivados *N*- benzil piperídínicos acilidrazônicos foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM), na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). A avaliação do potencial antiproliferativo foi realizada no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), na UNIFAL-MG, sob orientação Profa. Dra Marisa Ionta e colaboração do doutorando Renato de Oliveira Horvath.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos por espectrômetro de infravermelho Nicolet iS50 FTIR (Thermo Scientific USA) acoplado a Pike Gladi ATR Technologies. Para a atribuição de bandas no infravermelho utilizaram-se como referência os livros de Silverstein e colaboradores, Pavia e colaboradores (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN et al., 2007).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC-300 operando a 300 MHz para RMN de ^1H e de 75 MHz para RMN de ^{13}C do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética da UNIFAL-MG. Como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz). As multiplicidades estão abreviadas da seguinte maneira: s (simpleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto), t (tripleto), m (multipleto), quint (quinteto), q (quarteto). A numeração adotada para os átomos nas estruturas não corresponde à numeração da nomenclatura IUPAC e sim ao sistema adotado pelo programa *MestreNova*, utilizado para manipulação dos espectros de RMN. Todos os reagentes utilizados nas etapas de síntese foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou Acros, sem purificações adicionais.

Para cromatografia em camada delgada (CCD), realizada para acompanhamento das reações, utilizou-se folhas de gel de sílica 60 F254, da marca Merck. Para purificações por cromatografia em coluna (CC), realizada para como método de purificação de misturas, utilizou-se sílica gel 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). As faixas de fusão foram estabelecidas em

equipamento Marte (PFM II) com amostra triturada e empacotada em tubo capilar, sem correção.

Na análise para obtenção de espectros de massas, as amostras foram analisadas utilizando um LC Agilent 1290 e um espectrômetro de massas Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS. As amostras (massa contida no eppendorf) foi diluída em 1 mL de MeOH. 5 microlitros da solução foi diluída novamente em 1 mL de MeOH. 2 microlitros dessa solução foi injetada pelo autoamostrador do LC por infusão direta na fonte de eletrospray do espectrômetro de massas. A fase móvel do LC foi MeOH/0.1% Ac. fórmico na vazão de 0.1 mL/min. A fonte de ionização por eletrospray operou no modo positivo com os parâmetros nas seguintes condições: Temperatura do gás de nebulização 290°C, voltagem do capilar 3500 V, Nozzle Voltage 320 V, vazão do gás de secagem 14 mL/min, pressão do gás de nebulização 45 psig, temperatura do gás auxiliar 350°C e vazão do gás auxiliar 12 mL/min. O analisador quadrupolo operou na faixa de m/z 100 - 1500, o fragmentador 50 V, voltagem do octapolo 750 V, e aquisição de um espectro obtido com alta resolução no TOF até a 5 casa decimal. Os dados espectroscópicos e espectrométricos foram comparados com padrões do banco de dados do PeQuiM.

5.1.1 Purificação e secagem de solventes e reagentes

Os solventes puros e/ou anidros utilizados foram preparados segundo procedimentos descritos por Armarego e Chai, 2003.

O etanol foi secado com sulfato de magnésio anidro por 2 horas, em seguida filtrado. O mesmo foi estocado em balão contendo peneira molecular do tipo A4 ativada. Peneira molecular A4: a peneira molecular A4 foi ativada numa estufa a 200°C por três horas e posteriormente resfriada e mantida em um dessecador.

O metanol foi secado com sulfato de cálcio anidro por 2 horas, em seguida filtrado. O mesmo foi estocado em balão contendo peneira molecular do tipo A4 ativada. Peneira molecular A4: a peneira molecular A4 foi ativada numa estufa a 200°C por três horas e posteriormente resfriada e mantida em um dessecador.

Os demais solventes utilizados foram utilizados sem pré-purificação e/ou destilação.

5.2 ABORDAGEM SINTÉTICA

A rota sintética (**Figura 68**) desenvolvida para a obtenção da série-alvo, tem como material de partida o éster comercial (**35**), que é submetido a uma etapa inicial de aminação redutiva com 3-hidroxipiperidina racêmica (**36**), na presença de $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{ZnCl}_2$ para gerar o éster *N*-benzilpiperidínico (**37**). Numa etapa subsequente, o éster (**37**) reagiu com monohidrato de hidrazina, originando a hidrazida (**38**), sendo este o intermediário-chave na rota sintética. A hidrazida (**38**) foi reagida com uma série de benzaldeídos substituídos (**39**) para gerar a série de *N*-benzilpiperidino-acilidrazonas-alvo (**32**).

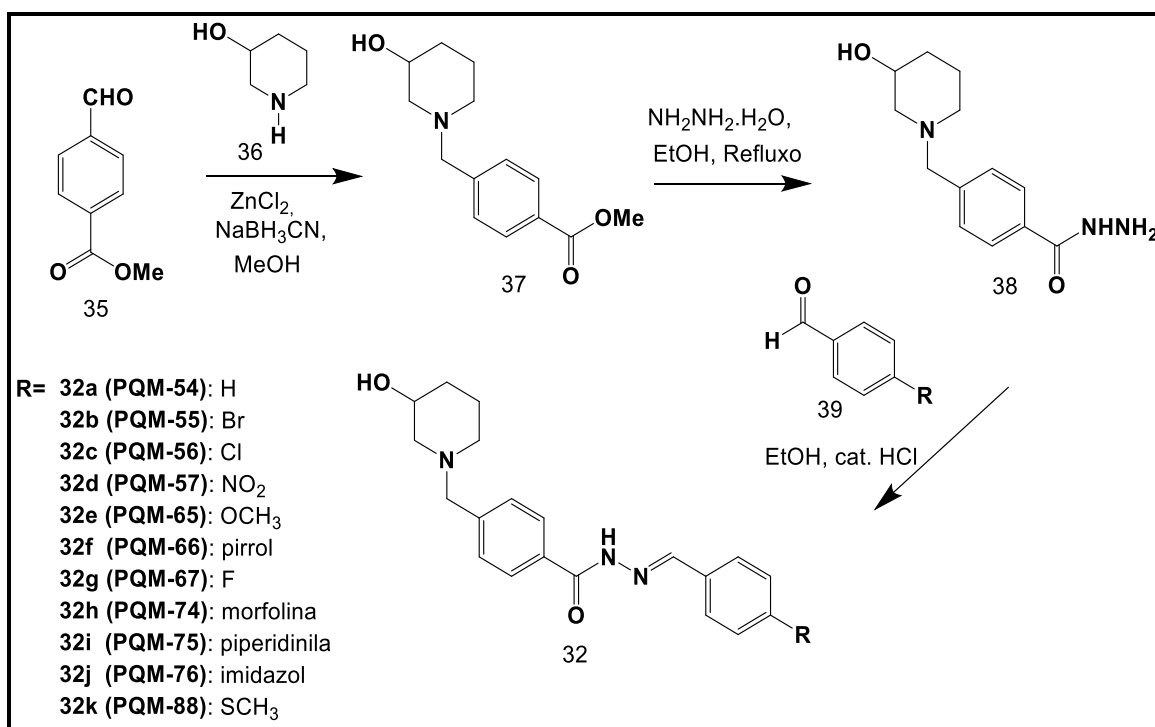


Figura 69 - Rota sintética utilizada para obtenção da série de derivados *N*-benzil piperidínicos acilidrazônicos (**32**)

Fonte: Do autor.

5.2.1 Reação de aminação redutiva entre o 4-formilbenzoato de metila (35) e 3-hidroxipiperidina (36)

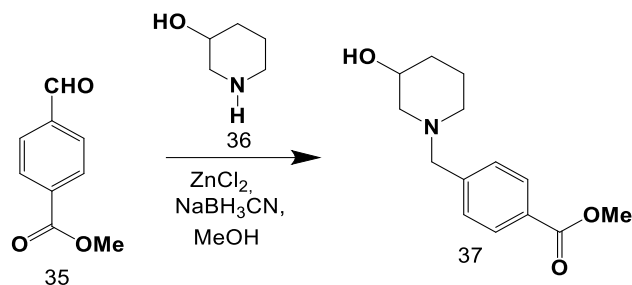


Figura 70 - Reação de aminação redutiva entre a 3-hidroxipiperidina (36) e o formil-éster (35) para obtenção do *N*-benzilpiperidinil éster metílico (37)

Fonte: Do autor.

Em um balão de fundo redondo monotubulado foram adicionados 12,2 mmols do éster (35), 14,6 mmols da 3-hidroxipiperidina (36) e 10 mL de metanol, mantendo a solução resultante sob agitação por 1 h, a temperatura ambiente. Em outro balão, foram misturados 6,1 mmols de ZnCl₂ anidro, 12,2 mmols de NaBH₃CN e 6 mL de metanol anidro, mantendo sob agitação por 1h. Após este tempo, as duas soluções foram misturadas e mantidas sob agitação a temperatura ambiente por mais 24h, com acompanhamento por CCD. Após consumo total do material de partida, o solvente foi removido à vácuo, seguido da adição de solução aquosa de NaOH a 20% até pH ~ 12. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (6 x 10 mL) e a fase orgânica combinada foi subsequentemente lavada com 20 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada sob vácuo (KIM et al., 1985). O produto bruto da reação foi então purificado em coluna cromatográfica sílica gel (eluente: Acetato/MeOH 90:10), resultando em 2,73 g (11 mmol) do produto 37, como um sólido branco.

5.2.2 Reação de hidrazinólise entre o 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil] benzoato de metila (**20**) e monidrato de hidrazina

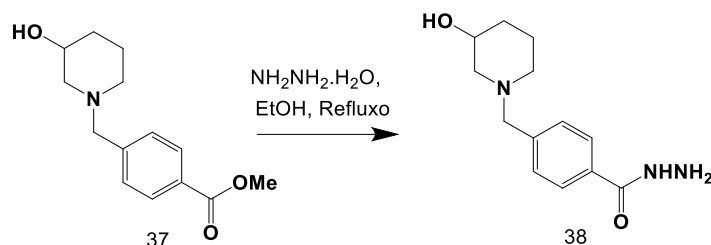


Figura 71 - Obtenção da hidrazida (**38**), a partir da reação do éster (**37**)
Fonte: Do autor.

Em um balão de monotubulado foram adicionados 2,0 mmols do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil] benzoato de metila (**37**), 7 mL de etanol e 11,73 mL (60,2 mol) de monidrato de hidrazina a 98%. A solução resultante foi mantida em refluxo por 3 horas, sob acompanhamento por CCD. Ao final da reação, o solvente foi removido a pressão reduzida (ROMEIRO et al., 2009). Posteriormente foi submetido a coluna cromatográfica (eluente: Acetato 80% e Metanol 20%). Então, foi obtido o produto (**38**) (0,474g, 1,90 mmols), sendo este um sólido branco.

5.2.3 Procedimento geral para obtenção das *N*-benzil-acilidrazonas-alvo (**32a-k**)

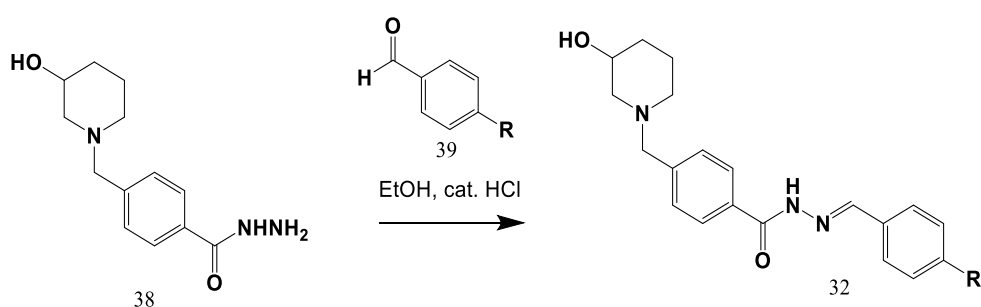


Figura 72 - Obtenção de *N*-acilidrazonas (**32**) a partir da hidrazida (**38**)
Fonte: Do autor.

Em um balão de fundo redondo monotubulado foram adicionados 1 eq. molar da hidrazida (**38**), 1,2 eq. do aldeído de interesse, 5 mL de etanol anidro e 3 gotas de HCl concentrado, permanecendo em agitação a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por CCD e duraram cerca de 3 horas. Após término reacional,

o solvente foi retirado sob pressão reduzida e forneceu as respectivas *N*-acilidrazonas, que foram purificadas em coluna cromatográfica (LIMA et al., 2000).

No decorrer do desenvolvimento desta dissertação utilizou-se a técnica de precipitação para purificação de *N*-acilidrazonas. Após verificação do término reacional, colocou-se o balão no refrigerador, e realizou filtração a vácuo, utilizando primeiro etanol gelado e posteriormente hexano para retirada de alguma impureza. Em seguida realizou-se CCD e pode-se verificar que os compostos **PQM-56**, **PQM-57**, **PQM-65** e **PQM-67** encontravam-se puros, comprovando a maior praticidade e eficiência desta técnica na purificação destes compostos.

5.2.4 Dados de caracterização das e *N*-benzil-acilidrazonas-alvo (32a-k)

Nome do composto: 4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoato de metila (**37**)

Característica: sólido branco

Rendimento: 90%

F.M.: C₁₄H₁₉NO₃

M.M.: 249,1365

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300MHz): 7,95 (d, 1H, *J*= 8,0, H₁₀ e H₁₂); 7,43 (d, 1H, *J*= 7,4, H₉ e H₁₃); 3,88 (s, 3H, H₁₈); 3,70-3,62 (m, 1H, H₃); 3,57 (s, 2H, H₇); 2,86-2,82 (m, 1H, H_{2'}); 2,67-2,64 (m, 1H, H_{6'}); 2,06-2,02 (m, 1H, H₆); 1,91- 1,86 (m, 1H, H₂ e H_{4'}); 1,76-1,68 (m, 1H, H_{5'}); 1,58-1,49 (m, 1H, H₅); 1,24-1,19 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (δ, CD₃OD, 75 MHz): 167,0 (C₁₅); 143,3 (C₈); 129,1 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂ e C₁₃); 66,5 (C₃); 62,1 (C₇); 60,3 (C₂); 53,0 (C₆); 51,20 (C₁₈); 32,4 (C₄); 22,6 (C₅).

Nome do composto: 4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida (**38**)

Característica: sólido branco

Rendimento: 94%

F.M.: C₁₃H₁₉N₃O₂

M.M.: 249,1477

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300MHz): 7,75 (d, 1H, *J*= 7,8, H₁₀ e H₁₂); 7,42 (d, 1H, *J*= 7,4, H₉ e H₁₃); 3,67-3,63 (m, 1H, H₃); 3,57 (s, 2H, H₇); 2,87-2,83 (m, 1 H, H₂); 2,69-2,65 (m, 1H, H_{6'}); 2,08-2,01 (m, 1H, H₆); 1,96-1,90 (m, 1H, H₂ e H_{4'}); 1,74-1,71 (m, 1H, H_{5'}); 1,59-1,51 (m, 1H, H₅); 1,28-1,21 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (δ, CD₃OD, 75 MHz): 168,0 (C₁₅); 141,3 (C₈); 131,8 (C₁₁); 129,2 (C₁₀ e C₁₂); 126,8 (C₉ e C₁₃); 66,4 (C₃); 62,1 (C₇); 60,2 (C₂); 52,9 (C₆); 32,4 (C₄); 22,5 (C₅).

Nome do composto: *N*-benzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-54 (32a)

Característica: sólido cinza

Rendimento: 60%

F.M.: C₂₀H₂₃N₃O₂

M.M.: 337,1790

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 338,1868

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300MHz): 8,54 (s, 1H, H₁₉); 8,12 (d, 1H, *J*= 8,12, H₁₀ e H₁₂); 7,98 (d, 1H, *J*= 7,98, H₂₁ e H₂₅); 7,72 (d, 1H, *J*= 7,73, H₉ e H₁₃); 7,58 (t, 1H, *J*= 7,58, H₂₂, H₂₃ e H₂₄); 3,49 (s, 2H, H₇); 3,46-3,44 (m, 1H, H₃); 3,16-3,13 (m, 1H, H₂); 3,00 (m, 1H, H₆); 2,10 (m, 1H, H₂); 2,04-2,01 (m, 1H, H₂ e H₄); 1,84-1,75 (m, 1H, H₅); 1,60 (m, 1H, H₅); 1,42 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (δ, CD₃OD, 75 MHz): 165,1 (C₁₅); 149,5 (C₁₉); 132,5 (C₂₀); 138,8 (C₈); 134,1 (C₁₁); 132,5 (C₂₀); 165,1 (C₁₄); 132,5 (C₂₀); 130,2 (C₂₂); 128,4 (C₉, C₁₃, C₂₁, C₂₃, C₂₄ e C₂₅); 65,0 (C₃); 58,8 (C₂); 52,9 (C₆); 31,0 (C₄); 21,0 (C₅).

Nome do composto: *N*-(4-bromobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-55 (32b)

Característica: sólido branco

Rendimento: 52%

F.M.: C₂₀H₂₂BrN₃O₂

M.M.: 415,0895

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 416,0984

RMN ¹H (δ, (CD₃)₂SO, 300MHz): 8,42 (s, 1H, H₁₉); 7,86 (d, 1H, *J*=7,9, H₁₀ e H₁₂); 7,67 (s, 1H, H₂₁, H₂₂, H₂₄, H₂₅); 7,43 (d, 1H, *J*=7,4 H₉ e H₁₃); 3,59-3,50 (m, 2H, H₇); 3,59- 3,50 (m, 1H, H₁₃); 2,80- 2,75 (m, 1H, H₂); 2,65- 2,61 (m, 1H, H₆); 1,92-1,85 (m, 1H, H₆); 1,76- 1,70 (m, 1H, H₂ e H₄); 1,63- 1,59 (m, 1H, H₅); 1,48- 1,40 (m, 1H, H₅); 1,09- 1,03 (m, 1H, H₄).

RMN ^{13}C (δ , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 75 MHz): 163,5 (C_{15}); 146,8 (C_{19}); 143,2 (C_8); 134,1 (C_{11}); 132,3 (C_{20} , C_{22} e C_{24}); 129,2 (C_{10} e C_{12}); 128,0 (C_9 , C_{13} , C_{21} , C_{25}); 123,7 (C_{23}); 66,0 (C_3); 62,1 (C_7); 61,5 (C_2); 53,4 (C_6); 33,6 (C_4); 23,6 (C_5).

Nome do composto: *N*-(4-clorobenzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-56 (32c)

Característica: sólido bege

Rendimento: 70%

F.M.: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_2$

M.M.: 371,1401

HRMS (ESI) m/z [M_+^{H}]: 372,1489

RMN ^1H (δ , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 300MHz): 8,34 (s, 1H, H_{19}); 7,95 (d, 1H, $J=7,9$, H_{10} e H_{12}); 7,83 (d, 1H, $J=7,8$, H_{22} e H_{24}); 7,56 (d, 1H, $J=7,6$, H_9 e H_{13}); 7,44 (d, 1H, $J=7,5$, H_{21} e H_{25}); 3,84 (m, 1H, H_3); 3,59 (s, 2H, H_7); 2,84 (m, 1H, H_6'); 2,44- 2,28 (m, 1H, H_6); 1,89- 1,86 (m, 1H, H_2 , H_2' e H_4'); 1,85- 1,61 (m, 1H, H_5); 1,42- 1,28 (m, 1H, H_4 e H_5).

RMN ^{13}C (δ , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 75 MHz): 163,5 (C_{15}); 146,9 (C_{19}); 132,4 (C_{11} e C_{20}); 134,9 (C_8); 133,8 (C_{23}); 132,4 (C_{20}); 128,1 (C_{12}); 129,4 (C_9 , C_3 , C_{21} , C_{22} , C_{24} e C_{25}), 66,1 (C_3); 61,8 (C_2); 61,0 (C_6); 33,3 (C_4); 23,2 (C_5).

Nome do composto: *N*-(4-nitrobenzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-57 (32d)

Característica: sólido amarelo

Rendimento: 71%

F.M.: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$

M.M.: 382,1641

HRMS (ESI) m/z [M_+^{H}]: 383,1723

RMN ^1H (δ , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), 300MHz): 8,71 (s, 1H, H_{19}); 8,29 (d, 1H, $J=8,3$, H_{10} e H_{12}); 7,96 (d, 1H, $J=8,0$, H_{21} , H_{22} , H_{24} e H_{25}); 7,44 (d, 1H, $J=7,4$, H_9 e H_{13}); 2,86- 2,82 (m, 1H, H_6'); 1,94- 1,87 (m, 1H, H_6); 1,80- 1,75 (m, 1H, H_2 , H_2' e H_4'); 1,64- 1,59 (m, 1H, H_5); 1,48- 1,38 (m, 1H, H_5); 1,11- 1,01 (m, 1H, H_4).

RMN ¹³C (δ, (CD₃)₂SO), 75 MHz): 163,7 (C₁₅); 148,2 (C₁₉); 145,5 (C₂₃); 143,1 (C₈); 141,2 (C₂₀); 132,0 (C₁₁); 129,2 (C₁₂); 128,4 (C₉, C₃, C₂₁, C₂₅); 124,5 (C₂₂, C₂₄); 66,4 (C₃); 61,3 (C₂); 53,4 (C₆); 33,5 (C₄); 23,5 (C₅).

Nome do composto: *N*-(4-metoxibenzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-65 (32e)

Característica: sólido cinza

Rendimento: 85%

F.M.: C₂₁H₂₅N₃O₃

M.M.: 367,1896

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 368,1982

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300MHz): 8,30 (s, 1H, H₁₉); 7,91 (d, 1H, *J*=7,9, H₁₀ e H₁₂); 7,78 (d, 1H, *J*=7,8, H₂₁ e H₂₅); 7,51 (d, 1H, *J*=7,5, H₉ e H₁₃); 6,99 (d, 1H, *J*=7,0, H₂₂ e H₂₄); 3,84 (s, 3H, H₂₇); 3,70 (m, 1H, H₃ e H₇); 2,93- 2,88 (m, 1H, H₂); 2,77- 2,73 (m, 1H, H_{6'}); 2,23- 2,17 (m, 1H, H₆); 2,10- 2,03 (m, 1H, H₂); 1,92- 1,77 (m, 1H, H₅); 1,64- 1,56 (m, 1H, H₅); 1,92- 1,77 (m, 1H, H_{4'} e H₅); 1,35-1,28 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (δ, CD₃OD, 75 MHz): 162,0 (C₁₅); 149,7 (C₁₉); 134,4 (C₈); 132,7 (C₁₁); 131,3 (C₂₁ e C₂₅); 129,2 (C₉ e C₁₃); 128,1 (C₁₀ e C₁₂); 126,5 (C₂₀); 113,9 (C₂₂ e C₂₄); 59,5 (C₇); 56,4 (C₂₇); 51,9 (C₃); 54,5 (C₆); 27,7 (C₄); 17,5 (C₅).

Nome do composto: *N*-(4-pirrolidin-1-il)benzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-66 (32f)

Característica: sólido amarelo

Rendimento: 70%

F.M.: C₂₄H₃₀N₄O₂

M.M.: 406,2369

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 407,2454

RMN ¹H (δ, C₅D₅N, 300MHz): 8,73 (s, 1H, H₁₉); 8,27 (d, 1H, *J*=8,3, H₁₀ e H₁₂); 7,91 (d, 1H, *J*=7,9, H₂₁ e H₂₅); 7,48 (d, 1H, *J*=7,5, H₉ e H₁₃); 6,56 (d, 1H, *J*=6,6, H₂₂ e H₂₄); 4,07- 3,99 (m, 1H, H₃); 3,52-3,50 (m, 2H, H₇); 3,16- 3,12 (m, 1H, H₄); 3,07- 3,02 (m, 2H, H₂₇ e H₃₀); 2,64- 2,61 (m, 1H, H_{2'} e H_{6'}); 2,22- 1,96 (m, 1H, H₂, H_{4'}, H_{5'} e H₆); 1,70- 1,65 (m, 2H, H₂₈ e H₂₉); 1,54- 1,48 (m, 1H, H₄ e H₅).

RMN ¹³C (δ, (CD₃)₂SO), 75 MHz): 162,9 (C₁₅); 149,1 (C₂₃); 142,7 (C₈ e C₁₉); 132,9 (C₁₁); 129,1 (C₂₁ e C₂₅); 127,8 (C₁₀ e C₁₂); 121,4 (C₂₀); 112,0 (C₂₂ e C₂₄); 66,5 (C₃); 62,2 (C₂); 61,5 (C₇); 53,4 (C₆); 47,7 (C₃₀); 33,7 (C₄); 25,4 (C₂₉); 23,7 (C₅).

Nome do composto: *N*-(4-fluorbenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-67 (32g)

Característica: sólido branco

Rendimento: 59%

F.M.: C₂₀H₂₂FN₃O₂

M.M.: 355,1696

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 356,1786

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300MHz): 8,39 (s, 1H, H₁₉); 8,00 (d, 1H, *J*=8,0, H₁₀ e H₁₂); 7,88 (d, 1H, *J*=7,9, H₂₁ e H₂₅); 7,63 (d, 1H, *J*=7,6, H₉ e H₁₃); 7,17 (d, 1H, *J*=7,2, H₂₂ e H₂₄); 4,07 (s, 2H, H₇); 3,90 (m, 1H, H₃); 3,09- 3,00 (m, 1H, H_{2'} e H_{6'}); 2,82 (m, 1H, H₆); 2,62 (m, 1H, H₂); 2,00 (m, 1H, H_{4'}); 1,89- 1,82 (m, 1H, H_{5'}); 1,75- 1,72 (m, 1H, H₅); 1,54- 1,51 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (δ, (CD₃)₂SO), 75 MHz): 164,8 (C₂₃); 163,1 (C₁₅); 161,5 (C₂₃); 146,5 (C₁₉); 142,7 (C₈); 131,0 (C₂₀); 129,3 (C₁₀ e C₁₂); 128,7 (C₂₁ e C₂₅); 127,6 (C₉ e C₁₃); 116,1 (C₂₂ e C₂₄); 66,1 (C₃); 61,7 (C₇); 61,1 (C₂); 53,0 (C₆); 33,2 (C₄); 23,2 (C₅).

Nome do composto: *N*-(4-morfolinobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-74 (32h)

Característica: sólido amarelo

Rendimento: 54%

F.M.: C₂₄H₃₀N₄O₃

M.M.: 422,2318

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 423,2407

RMN ¹H (δ, C₅D₅N, 300MHz): 8,74 (s, 1H, H₁₉); 8,26 (d, 1H, *J*=8,3, H₁₀ e H₁₂); 7,94 (d, 1H, *J*=7,9, H₂₁ e H₂₅); 7,51 (d, 1H, *J*=7,5, H₉ e H₁₃); 6,99 (d, 1H, *J*=7,0, H₂₂ e H₂₄); 6,70 (s, 2H, H₇); 4,08- 4,02 (m, 1H, H₃); 3,74 (t, 2H, H₂₈ e H₃₀); 3,55 (m, 1H, H_{2'}); 3,12 (t, 2H, H₂₇ e H₃₁); 2,66- 2,63 (m, 1H, H_{6'}); 2,25- 2,16 (m, 1H, H₆); 2,12- 2,01 (m, 1H, H₂ e H_{4'}); 1,74- 1,48 (m, 1H, H_{5'}, H₅, e H₄).

RMN ¹³C (δ, (CD₃)₂SO), 75 MHz): 163,1 (C₁₅); 152,6 (C₂₃); 148,4 (C₁₉); 142,4 (C₈); 132,8 (C₁₁); 129,2 (C₁₀ e C₁₂); 128,7 (C₂₁ e C₂₅); 127,9 (C₉ e C₁₃); 125,0 (C₂₀); 114,8 (C₂₂ e C₂₄); 66,4 (C₃, C₂₈ e C₃₀); 62,0 (C₂); 53,4 (C₆); 47,9 (C₃₁); 33,5 (C₄); 23,5 (C₅).

Nome do composto: *N*-((4-piperidi-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-75 (32i)

Característica: sólido amarelo

Rendimento: 50%

F.M.: C₂₅H₃₂N₄O₂

M.M.: 420,2525

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 421,2616

RMN ¹H (δ, C₅D₅N, 300MHz): 8,74 (s, 1H, H₁₉); 8,26 (d, 1H, *J*=8,3, H₁₀ e H₁₂); 7,92 (d, 1H, *J*=7,9, H₂₁ e H₂₅); 7,50 (d, 1H, *J*=7,5, H₉ e H₁₃); 6,97 (d, 1H, *J*=7,0, H₂₂ e H₂₄); 4,10-4,03 (m, 1H, H₃); 3,55 (s, 2H, H₇); 3,11 (t, 2H, *J*=3,1, H₂₇ e H₃₁); 2,67- 2,63 (m, 1H, H₂); 2,25- 1,98 (m, 1H, H₂, H₄, H₆ e H₆); 1,74- 1,55 (m, 1H, H₄, H₅ e H₅); 1,49- 1,41 (m, 2H, H₂₈, H₂₉ e H₃₀).

RMN ¹³C (δ, (CD₃)₂SO), 75 MHz): 163,1 (C₁₅); 152,8 (C₂₃); 148,6 (C₁₉); 142,3 (C₈); 132,9 (C₁₁); 129,2 (C₁₀ e C₁₂); 128,8 (C₂₁ e C₂₅); 127,9 (C₉ e C₁₂); 123,8 (C₂₀); 115,0 (C₂₂ e C₂₄); 66,3 (C₃); 61,2 (C₂); 51,3 (C₆); 48,8 (C₂₇ e C₃₁); 33,5 (C₄); 25,4 (C₂₈ e C₃₀); 24,3 (C₂₉); 23,4 (C₅).

Nome do composto: *N*-(4-(1H-imidazol-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-76 (32j)

Característica: sólido bege

Rendimento: 49%

F.M.: C₂₃H₂₅N₅O₂

M.M.: 403,2008

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 404,2088

RMN ¹H (δ, CD₃OD, 300MHz): 8,40 (s, 1H, H₁₉); 8,23 (s, 1H, H₃₀); 8,01 (d, 1H, *J*=8,0, H₁₀ e H₁₂); 7,93 (d, 1H, *J*=7,9, H₂₂ e H₂₄); 7,66 (d, 1H, *J*=7,7, H₁₃ e H₂₉); 7,52 (d, 1H, *J*=7,5, H₂₁ e H₂₅); 7,18 (s, 1H, H₂₇); 3,75- 3,70 (m, 1H, H₃); 3,68 (s, 2H, H₇); 2,92- 2,88 (m, 1H, H₂); 2,75- 2,72 (m, 1H, H₆); 2,19- 2,12 (m, 1H, H₄); 2,06- 2,00 (m, 1H, H₂);

1,95- 1,88 (m, 1H, H₆); 1,82- 1,76 (m, 1H, H_{5'}); 1,64- 1,52 (m, 1H, H₅); 1,34- 1,26 (m, 1H, H₄).

RMN ¹³C (δ, (CD₃)₂SO), 75 MHz): 163,6 (C₁₅); 147,0 (C₁₉); 142,8 (C₈); 138,2 (C₂₇); 133,2 (C₂₃); 132,3 (C₁₁); 130,5 (C₂₀); 129,2 (C₁₀, C₁₂ e C₂₉); 128,0 (C₉, C₁₃, C₂₁ e C₂₅); 120,8 (C₂₂ e C₂₄); 118,3 (C₃₀); 66,5 (C₃); 62,1 (C₇); 61,5 (C₂); 53,4 (C₆); 33,6 (C₄); 23,6 (C₅).

Nome do composto: *N*-(4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxiopiperidin-1-il)metileno) benzoidrazida

Código: PQM-88 (32k)

Característica: sólido cinza

Rendimento: 78%

F.M.: C₂₁H₂₅N₃O₂S

M.M.: 383,1667

HRMS (ESI) m/z [M₊H]: 384,1755

RMN ¹H (δ, C₅D₅N, 300MHz): 8,74 (s, 1H, H₁₉); 8,26 (d, 1H, *J*=8,3, H₁₀ e H₁₂); 7,87 (d, 1H, *J*=7,9, H₂₂ e H₂₄); 7,50 (d, 1H, *J*=7,5, H₂₁ e H₂₅); 7,32 (d, 1H, *J*=7,3, H₉ e H₁₃); 4,04 (m, 1H, H₃); 3,52 (s, 2H, H₇); 3,16- 3,12 (m, 1H, H₂); 2,38 (s, 3H, H₂₇); 2,64- 2,61 (m, 1H, H_{6'}); 2,23- 2,16 (m, 1H, H₂); 2,11- 2,07 (m, 1H, H₆); 2,02- 1,96 (m, 1H, H_{4'}); 1,73- 1,47 (m, 1H, H₄, H₅ e H_{5'}).

RMN ¹³C (δ, (CD₃)₂SO), 75 MHz): 163,4 (C₁₅); 147,7 (C₁₉); 143,1 (C₈); 141,3 (C₂₃); 132,4 (C₂₀); 131,1 (C₁₁); 129,1 (C₂₂ e C₂₄); 128,0 (C₉ e C₁₃); 127,9 (C₂₂ e C₂₄); 126,1 (C₂₁ e C₂₅); 66,5 (C₃), 61,5 (C₂); 53,4 (C₆); 33,6 (C₄); 23,7 (C₅); 14,7 (C₂₇).

5.3 TESTES BIOLÓGICOS

5.3.1 Linhagens celulares, condições de cultivo e esquema de tratamento

No presente estudo foram utilizadas linhagens derivadas de tumores humanos e de pele humana normal (**tabela 16**). As linhagens A549, MCF-7, HepG2 e CCD-1029Sk foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, enquanto a linhagem HT144 foi gentilmente cedida pela profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas em DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma,

CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂) e subculturas foram feitas regularmente a cada 2 ou 3 dias.

Os compostos foram solubilizados em DMSO e pequenas alíquotas foram mantidas a -20° C até o uso. Diluições foram realizadas a partir da solução estoque (40 mM) imediatamente antes dos ensaios experimentais para obtenção das concentrações desejadas.

Tabela 16 - Linhagens celulares

Linhagem	Origem
A549	Carcinoma de pulmão humano
MCF-7	Carcinoma de mama humana
HT144	Melanoma
HepG2	Carcinoma Hepatocelular
CCD-1029Sk	Derme de pele humana normal

5.3.2 Ensaio Colorimétrico (MTS)

A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico, o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) usando o Kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA), descrito por Cori et al. (1991). Este ensaio é baseado na conversão enzimática (desidrogenases) do sal tetrazólio em formazano, o qual absorve luz a 490 nm. A taxa de absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas. Os valores de absorbância obtidos nas amostras tratadas serão comparados com os valores de absorbância das amostras que não forem expostas ao composto estudado. O valor de IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) foi determinado usando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5.3.3 Ensaio de Capacidade Clonogênica

Células foram semeadas em baixa densidade (300 células por placa de 35mm de diâmetro), de forma que 24h após o plaqueamento as culturas exibam células

aderidas, porém isoladas. Após tratamento de 24 horas, as células foram mantidas em meio fresco por mais 15 dias em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação as culturas foram lavadas com PBSA, fixadas por 30 minutos com metanol P.A (Sigma Aldrich LTDA, Brasil). Após secagem, as amostras foram coradas com solução Giemsa 1:4 (Sigma Aldrich LTDA, Brasil), por 5 minutos e lavadas com água destilada. A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (aumento 20x). Foram consideradas na análise as colônias que tinham, pelo menos, 50 células. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes.

5.3.4 Análise do Ciclo Celular

Após tratamento de 24 h, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1000 rpm). As amostras foram fixadas com etanol gelado (75% em PBSA-Salina fosfato tamponada) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 30 minutos em uma solução contendo PBSA, RNase (10 mg/mL) e iodeto de propídio (30 mg/mL) (Guava Technologies-Merck Millipore). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) usando o software GuavaSoft 2.7.

5.3.5 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com a análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Turkey usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

6 CONCLUSÃO

Uma série de 11 derivados N-benzil-piperidinil-acilarilidrazônicos (**32a-k**) foram sintetizados e caracterizados por espectroscopia no IV, RMN e espectrometria de massas de alta resolução, cujos dados foram comparados os dados disponíveis no PeQuiM e na literatura (ROCHA, 2010; VIEGAS, 2013). As substâncias foram avaliadas contra 4 linhagens de células tumorais humanas, sendo realizada uma varredura inicial (*screening*), sendo os compostos **PQM-66 (32f)**, **PQM-67 (32g)**, **PQM-75 (32i)** e **PQM-88 (32k)** selecionados para a obtenção de curvas dose-resposta e determinação do IC₅₀. No entanto, apenas o composto **PQM-75 (32i)** apresentou atividade contra três linhagens estudadas (MCF-7, HepG2 e HT144).

Considerando estes resultados, o composto **PQM-75 (32i)**, exerceu o maior efeito sobre as linhagens MCF-7 e HepG2, que foram mais responsivas do que a linhagem HT144, com valores de IC₅₀ de $58,40 \pm 2,30 \mu\text{M}$ e $44,81 \pm 1,85 \mu\text{M}$ para as linhagens HepG2 e MCF-7, respectivamente. Para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados aos efeitos de **32i** foram realizados estudos adicionais. No ensaio de colônia, foi observado que o composto **32i** reduziu o número de colônias em aproximadamente 60% e 70% nas culturas de HepG2 nas concentrações de 30 μM e 60 μM , respectivamente. Em tratamento por 24 horas, este composto foi capaz de inibir a proliferação celular, evento este que se manteve por um período prolongado, uma característica importante a ser considerada na seleção de candidatos a fármacos antineoplásicos. A análise do ciclo celular demonstrou que o composto **32i** interferiu na progressão do ciclo celular, indicando bloqueio do ciclo celular na transição G1/S ou G2/M, dependendo da concentração utilizada. Os dados obtidos são relevantes e suportam a continuidade do estudo para avaliar os mecanismos moleculares relacionados à atividade antiproliferativa de **PQM-75 (32i)** sobre células HepG2, caracterizando este composto como um potencial candidato a protótipo de fármaco antineoplásico, com estrutura química singular e inovadora.

REFERÊNCIAS

- ASGHAR, U. et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, Londo, v. 14, n. 2, p. 130–146, 2015.
- AZIZ, G. et al. Procaspase-activating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Norway, v. 247, n. 3, p. 238–242, 2010.
- BASMADJIAN, C. et al. Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in chemistry*, Lllkirch, v. 2, n. 20, p. 1–18, 2014.
- BORCH, R. F.; BERNSTEIN, M. D.; DURST, H. D. Cyanohidridoborate anion as a selective reducing agent. *Journal of the American Chemical Society*, Minneapolis, v. 93, n. 12, p. 2897–2904, 1971.
- BRANDÃO, H. N. . et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, Ondina, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.
- CARBONE, M.; PASS, H. I. Multistep and multifactorial carcinogenesis: When does a contributing factor become a carcinogen? *Seminars in Cancer Biology*, Chicago, v. 14, n. 6, p. 399–405, 2004.
- CHEN, J. et al. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia*, Nanjing, v. 103, n. 1, p. 231–241, 2015.
- CHENG, Y.-T.; YANG, C.-C.; SHYUR, L.-F. Phytomedicine-Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacological research*, Taipei, v. 114, n. 1, p. 128–143, 2016.
- CICENAS, J.; VALIUS, M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Fribourg, v. 137, n. 10, p. 1409–1418, 2011.
- CONGIU, C.; ONNIS, V. Synthesis and biological evaluation of 2-indolinone derivatives as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Cagliari, v. 21, n. 21, p. 6592–6599, 2013.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. *Revista Virtual de Química*, Fortaleza, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of*

Ethnopharmacology, Frederick, v. 100, n. 1–2, p. 72–79, 2005.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice*, Brooklyn, v. 25, n. 2, p. 41–59, 2015.

CUI, J. J. A new challenging and promising era of tyrosine kinase inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 5, n. 4, p. 272–274, 2014.

CUI, Z. et al. New class of potent antitumor acylhydrazone derivatives containing furan. *European Journal of Medicinal Chemistry*, California, v. 45, n. 12, p. 5576–5584, 2010.

DA SILVA, R. D. et al. Targeted Therapy for Metastatic Renal Carcinoma: an Update. *Journal of Kidney Cancer and VHL*, Colorado, v. 1, n. 6, p. 63–73, 2014.

DO, M. T. et al. Antitumor efficacy of Piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. *Food Chemistry*, Daejeon, v. 141, n. 3, p. 2591–2599, 2013.

DO AMARAL, D. N. et al. Docking, synthesis and antiproliferative activity of N-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues. *PLoS ONE*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2014.

DUAN, Y. et al. Design, Synthesis and Antitumor Activity of Novel link-bridge and B-Ring Modified Combretastatin A-4 (CA-4) Analogues as Potent Antitubulin Agents. *Nature Scientific Reports*, Nanjing, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. *Mini reviews in medicinal chemistry*, Rio de Janeiro, v. 7, n. 11, p. 1108–1119, 2007.

FERREIRA, W. S. et al. Piperine, its Analogues and Derivatives: Potencial as Antiparasitic Drugs. *Revista Virtual de Química*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 208–224, 2012.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, Amsterdam, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

GREENSHIELDS, A. L. et al. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Letters*, Nova Scotia, v. 357, n. 1, p. 129–140, 2015.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (BRASIL). *Estimativa 2016/ Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: [s.n.], 2016.

KAKARALA, M. et al. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Research and Treatment*, Michigan, v. 122, n. 3, p. 777–785, 2010.

KIM, S. et al. Zinc-Modified Cyanoborohydride as a Selective Reducing Agent. *American Chemical Society*, Korea, v. 50, n. 1, p. 1927–1932, 1985.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, Avelino, v. 8, n. 7, p. 547–566, 2009.

LEE, D. et al. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacology and Therapeutics*, Coreia, v. 162, n. 1, p. 120–133, 2016.

LIMA, P. C. et al. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 187–203, 2000.

LIN, Y. et al. Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Tumor Biology*, Beijin, v. 35, n. 4, p. 3305–3310, 2014.

MAIA, R. DO C.; TESCH, R.; MANSSOUR FRAGA, C. A. Acylhydrazone derivatives: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 11, p. 1161–1170, 2014.

MEDEMA, R. H.; MACÛREK, L. Checkpoint control and cancer. *Oncogene*, Praga, v. 31, n. 21, p. 2601–13, 2012.

MONGA, M.; SAUSVILLE EA; REVIEW Developmental Therapeutics Program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia*, Rockville, v. 16, n. 1, p. 520–526, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, Pensilvânia, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, Geneva, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, 2011.

PAVIA, D. L. . et al. *Introdução à espectroscopia*. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

QU, H.; LV, M.; XU, H. Piperine : Bioactivities and Structural Modifications. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, Northwest, v. 15, n. 86, p. 145–156, 2015.

- ROCHA, M. D. DA. *No Síntese e avaliação farmacológica de novos híbridos moleculares 3-O-piperidinil-Nbenzilacilhidrazônicos, planejados como candidatos a fármacos simbióticos: anticolinesterásicos e anti-inflamatórios.*, Dissertação (Mestrado em Química), 2010, 112f. Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, 2010.
- 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*, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1, p. 655–670, 2016.
- ROMEIRO, N. C. et al. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p. 641–652, 2009.
- ROSKOSKI, R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacological Research*, Horse Shoe, v. 107, n. 1, p. 249–275, 2016.
- ROTH, H. S. et al. Removal of metabolic liabilities enables development of derivatives of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) with improved pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 9, p. 4046–4065, 2015.
- ROTH, H. S.; HERGENROTHER, P. J. Derivatives of Procaspase-Activating Compound 1 (PAC-1) and Their Anticancer Activities. *Current medicinal chemistry*, Illinois, v. 23, n. 1, p. 201–241, 2016.
- RUBIRALTA, M.; GIRALT, E.; DIEZ, A. *Structure, Preparation, Reactivity, and Synthetic Applications of Piperidine and its Derivatives*. 1. ed. New York: Elsevier Ltd, 1991.
- RUSSEL, J. B. *Química Geral*. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1994.
- SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, Tabriz, v. 4, n. 1, p. 421–427, 2014.
- SENDEROWICZ, A. M. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Current Opinion in Cell Biology*, Maryland, v. 16, n. 6, p. 670–678, 2004.
- SILVERSTEIN, ROBERT M.; WEBSTER, FRANCIS X.; KIEMLE, D. J. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- SINGH, B. et al. Synthesis and anti-proliferative activities of new derivatives of embelin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Jammu, v. 24, n. 20, p. 4865–70,

2014.

SWEENEY, S. M. AACR Cancer Progress Report 2014. *American Association for Cancer Research*, Pensilvânia, v. 20, n. 1, p. 126, 2014.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. *CA: a Cancer Journal of Clinicians.*, Atlanta, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

VIEGAS, F. P. D. *Síntese e estudo farmacológico de novos candidatos a protótipos de fármacos de ação dupla úteis ao tratamento da doença de Alzheimer.*, Dissertação (Mestrado em Química), 2013, 153f. Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, 2013.

YOO, C.; JONES, P. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, California, v. 5, n. 1, p. 37–50, 2006.

YU, X.; SHI, L.; KE, S. Acylhydrazone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, bio-evaluation and mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Huangshi, v. 25, n. 24, p. 5772–5776, 2015.

ZHAI, X. et al. Discovery of hybrid dual N-acylhydrazone and diaryl urea derivatives as potent antitumor agents: Design, synthesis and cytotoxicity evaluation. *Molecules*, Liaoning v. 18, n. 3, p. 2904–2923, 2013.

ZHANG, D. et al. Synthesis of sulfonylhydrazone- and acylhydrazone-substituted 8-ethoxy-3-nitro-2h-chromenes as potent antiproliferative and apoptosis inducing agents. *Archiv der Pharmazie*, Hangzhou, v. 347, n. 8, p. 576–588, 2014.

ZHAO, Y.; MU, X.; DU, G. Microtubule-stabilizing agents: New drug discovery and cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, Beijing, v. 162, n. 1, p. 134–143, 2016.

APÊNDICE A - Tabelas com dados de RMN de ^1H e ^{13}C Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) benzoato de metila (**37**))

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	1,91 - 1,86 (H-2 ax);	m	--	60,3
	2,86 - 2,82 (H-2 eq)			
3	3,70 - 3,62	m	--	66,5
4	1,24-1,19 (H-4 ax);	m	--	32,4
	1,91-1,86 (H-4 eq)			
5	1,58 - 1,49 (H-5 ax);	m	--	22,6
	1,76-1,68 (H-5 eq)			
6	2,06 - 2,02 (H-6 ax);	m	--	53,0
	2,67-2,64 (H-6 eq)			
7	3,57	s	--	62,1
8	--	--	--	143,3
9	7,43	d	8,1	129,1
10	7,95	d	8,2	129,1
11	--	--	--	129,1
12	7,95	d	8,2	129,1
13	7,43	d	8,1	129,1
15	--	--	--	167,0
18	3,88	s	--	51,20

Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 4-((3-hidroxipiperidin-1-ila) metileno) benzoidrazida (**38**))

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	1,96 - 1,90 (H-2 ax);	m	--	60,2
	2,87 - 2,83 (H-2 eq)			
3	3,67 - 3,63	m	--	66,4
4	1,28 - 1,21 (H-4 ax);	m	--	32,4
	1,96 - 1,90 (H-4 eq)			
5	1,59 - 1,51 (H-5 ax);	m	--	22,5
	1,74-1,71 (H-5 eq)			
6	2,08 - 2,01 (H-6 ax);	m	--	52,9
	2,69 - 2,65 (H-6 eq)			
7	3,57	s	--	62,1
8	--	--	--	141,3
9	7,42	d	7,8	126,8
10	7,75	d	7,8	129,2
11	--	--	--	131,8
12	7,75	d	7,8	129,2
13	7,42	d	7,8	126,8
15	--	--	--	168,0

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM- 54 (32a)**.

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,04 - 2,01 (H-2 ax); 3,16 - 3,13 (H-2 eq)	m	--	61,7
3	3,46 - 3,44	m	--	65,0
4	1,42 (H-4 ax); 2,04 - 2,01 (H-4 eq)	m	--	31,0
5	1,60 - 1,53 (H-5 ax); 1,84 - 1,75 (H-5 eq)	m	--	21,0
6	2,10 (H-6 ax); 3,04 - 3,00 (H-6 eq)	m	--	52,9
7	3,49	s	--	58,8
8	--	--	--	138,8
9	7,72	d	8,0	128,4
10, 12	8,12	d	8,1	127,7; 127,4
11	--	--	--	134,1
13	7,72	d	8,0	128,4
15	--	--	--	165,1
19	8,54	s	--	149,5
20	--	--	--	132,5
21	7,98	dd	3,3 e 6,2	128,4
22	7,59-7,57	m	--	130,2
23	7,59-7,57	m	--	128,4
24	7,59-7,57	m	--	128,4
25	7,98	dd	3,3 e 6,2	128,4

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-55.(32b)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	1,76 - 1,70 (H-2 ax); 2,80 - 2,75 (H-2 eq)	m	--	61,5
3	3,59 - 3,50	m	--	66,0
4	1,09 - 1,03 (H-4 ax); 1,76 - 1,70 (H-4 eq)	m	--	33,6
5	1,48 - 1,40 (H-5 ax); 1,63 - 1,59 (H-5 eq)	m	--	23,6
6	1,92 - 1,85 (H-6 ax); 2,65 - 2,61 (H-6 eq)	m	--	53,4
7	3,59 - 3,50	m	--	62,1
8	--	--	--	143,2
9	7,43	d	8,1	128,0
10, 12	7,86	d	8,0	129,3; 129,2
11	--	--	--	134,1
13	7,43	d	8,1	128,0
15	--	--	--	163,5
19	8,42	s	--	146,8
20	--	--	--	132,3
21	7,67	s	--	128,0
22	7,67	s	--	132,3
23	--	--	--	123,7
24	7,67	s	--	132,3
25	7,67	s	--	128,0

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-56 (32c)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	1,89 - 1,86	m	--	61,8
3	3,84	m	--	66,1
4	1,42- 1,28 (H-4 ax); 1,89 - 1,86 (H-4 eq)	m	--	33,3
5	1,42 - 1,28 (H-5 ax); 1,85 - 1,61 (H-5 eq)	m	--	23,2
6	2,44 - 2,28 (H-6 ax); 2,84 (H-6 eq)	m	--	61,0
7	3,59	s	--	63,2
8	--	--	--	134,9
9	7,56	d	8,0	129,4
10	7,95	d	7,9	128,1
11	--	--	--	132,4
12	7,95	d	7,9	128,1
13	7,56	d	8,0	129,4
15	--	--	--	163,5
19	8,34	s	--	146,9
20	--	--	--	132,4
21	7,44	d	8,4	129,4
22	7,83	d	8,4	129,4
23	--	--	--	133,8
24	7,83	d	8,4	129,4
25	7,44	d	8,4	129,4

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-57 (32d)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	1,80 - 1,75	m	--	61,3
3	--	--	--	66,4
4	1,11 - 1,01 (H-4 ax); 1,80 - 1,75 (H-4 eq)	m	--	33,5
5	1,48 - 1,38 (H-5 ax); 1,64 - 1,59 (H-5 eq)	m	--	23,5
6	1,94 - 1,87 (H-6 ax); 2,86 - 2,82 (H-6 eq)	m	--	53,4
7	--	--	--	62,0
8	--	--	--	143,1
9	7,44	d	8,0	128,4
10	8,29	d	8,6	129,2
11	--	--	--	132,0
12	8,29	d	8,6	129,2
13	7,44	d	8,0	128,4
15	--	--	--	163,7
19	8,71	s	--	148,2
20	--	--	--	141,2
21	7,96	d	7,9	128,4
22	7,96	d	7,9	124,5
23	--	--	--	145,5
24	7,96	d	7,9	124,5
25	7,96	d	7,9	128,4

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **PQM-65 (32e)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,10 - 2,03 (H-2 ax);	m	--	59,5
	2,93 - 2,88 (H-2 eq)			
3	3,70	m	--	51,9
4	1,35 - 1,28 (H-4 ax);	m	--	27,7
	1,92 - 1,77 (H-4 eq)			
5	1,64 - 1,56 (H-5 ax);	m	--	17,5
	1,92 - 1,77 (H-5 eq)			
6	2,23 - 2,17 (H-6 ax);	m	--	54,5
	2,77 - 2,73 (H-6 eq)			
7	3,70	m	--	59,5
8	--	--	--	134,4
9	7,51	d	8,1	129,2
10	7,91	d	8,1	128,1
11	--	--	--	132,7
12	7,91	d	8,1	128,1
13	7,51	d	8,1	129,2
15	--	--	--	162,0
19	8,30	s	--	149,7
20	--	--	--	126,5
21	7,78	d	8,7	131,3
22	6,99	--	8,7	113,9
23	--	--	--	164,5
24	6,99	--	8,7	113,9
25	7,78	d	8,7	131,3
27	3,84	s	--	56,4

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **PQM-66 (32f)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,22 - 1,96 (H-2 ax);	m	--	62,2
	3,16 - 3,12 (H-2 eq)			
3	4,07 - 3,99	m	--	66,5
4	1,54 - 1,48 (H-4 ax);	m	--	33,7
	2,22 - 1,96 (H-4 eq)			
5	1,54 - 1,48 (H-5 ax);	m	--	23,7
	2,22 - 1,96 (H-5 eq)			
6	2,22 - 1,96 (H-6 ax);	m	--	53,4
	2,64 - 2,61 (H-6 eq)			
7	3,52 - 3,50	s	--	61,5
8	--	--	--	142,7
9	7,48	d	7,5	129,0
10	8,27	d	7,3	127,8
11	--	--	--	132,9
12	8,27	d	7,3	127,8
13	7,48	d	7,5	129,0
15	--	--	--	162,9
19	8,73	s	--	142,7
20	--	--	--	121,4
21	7,91	d	8,8	129,1
22	6,56	d	8,5	112,0
23	--	--	--	149,1
24	6,56	d	8,5	112,0
25	7,91	d	8,8	129,1
27	3,07 - 3,02	m	--	47,7
28	1,70 - 1,65	m	--	25,4
29	1,70 - 1,65	m	--	25,4
30	3,07 - 3,02	m	--	47,7

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-67 (32g)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,62 (H-2 ax); 3,09 - 3,00 (H-2 eq)	m	--	61,1
3	3,90	m	--	66,1
4	1,54 - 1,51 (H-4 ax); 2,00 (H-4 eq)	m	--	33,2
5	1,75 - 1,72 (H-5 ax); 1,89 - 1,82 (H-5 eq)	m	--	23,2
6	2,82 (H-6 ax); 3,09 - 3,00 (H-6 eq)	m	--	53,0
7	4,08	s	--	61,7
8	--	--	--	142,7
9	7,63	d	7,6	127,6
10, 12	8,00	d	8,0	129,3; 129,2
11	--	--	--	132,0
13	7,63	d	7,6	127,6
15	--	--	--	163,1
19	8,39	s	--	146,5
20	--	--	--	131,0
21	7,88	dd	5,6 e 8,3	128,7
22	7,17	t	8,6	116,1
23	--	--	--	164,8; 161,5
24	7,17	t	8,6	116,1
25	7,88	dd	5,6 e 8,3	128,7

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-74 (32h)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,12 - 2,01 (H-2 ax); 3,55 (H-2 eq)	m	--	62,0
3	4,08 - 4,02	m	--	66,4
4	1,74 - 1,48 (H-4 ax); 2,12 - 2,01 (H-4 eq)	m	--	33,5
5	1,74 - 1,48 (H-5 ax); 1,74 - 1,48 (H-5 eq)	m	--	23,5
6	2,25 - 2,16 (H-6 ax); 2,66 - 2,63 (H-6 eq)	m	--	53,4
7	6,70	s	--	61,3
8	--	--	--	142,4
9	7,51	d	8,1	127,9
10	8,26	d	8,8	129,2
11	--	--	--	132,8
12	8,26	d	8,8	129,2
13	7,51	d	8,1	127,9
15	--	--	--	163,1
19	8,74	s	--	148,4
20	--	--	--	125,0
21	7,94	d	6,8	128,7
22	6,99	d	8,8	114,8
23	--	--	--	152,6
24	6,99	d	8,8	114,8
25	7,94	d	6,8	128,7
27	3,12	m	--	47,9
28	3,74	m	--	66,4
30	3,74	m	--	66,4
31	3,12	m	--	47,9

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-75 (32i)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,25 - 1,98 (H-2 ax); 2,67 - 2,63 (H-2 eq)	m	--	61,2
3	4,10 - 4,03	m	--	66,3
4	1,74 - 1,55 (H-4 ax); 2,25 - 1,98 (H-4 eq)	m	--	33,5
5	1,74 - 1,55	m	--	23,4
6	2,25 - 1,98	m	--	51,3
7	3,55 - 3,53	m	--	62,0
8	--	--	--	142,3
9	7,50	d	7,8	127,9
10	8,26	d	8,7	129,2
11	--	--	--	132,9
12	8,26	d	8,7	129,2
13	7,50	d	7,8	127,9
15	--	--	--	163,1
19	8,74	s	--	148,6
20	--	--	--	123,8
21	7,92	d	8,6	128,8
22	6,97	d	8,7	115,0
23	--	--	--	152,8
24	6,97	d	8,7	115,0
25	7,92	d	8,6	128,8
27	3,11	m	--	48,8
28	1,49 - 1,41	m	--	25,4
29	1,49 - 1,41	m	--	24,3
30	1,49 - 1,41	m	--	25,4
31	3,11	m	--	48,8

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-76 (32j)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,06 - 2,00 (H-2 ax); 2,92 - 2,88 (H-2 eq)	m	--	61,5
3	3,75 - 3,67	m	--	66,5
4	1,34 - 1,26 (H-4 ax); 2,19 - 2,12 (H-4 eq)	m	--	33,6
5	1,64 - 1,52 (H-5 ax); 1,82 - 1,76 (H-5 eq)	m	--	23,6
6	1,95 - 1,88 (H-6 ax); 2,75 - 2,72 (H-6 eq)	m	--	53,4
7	3,75 - 3,67	s	--	62,1
8	--	--	--	142,8
9	7,66	d	7,6	128,0
10	8,01	d	8,4	129,2
11	--	--	--	132,3
12	8,01	d	8,4	129,2
13	7,66	d	7,6	128,0
15	--	--	--	163,6
19	8,40	--	--	147,0
20	--	--	--	130,5
21	7,52	d	8,1	128,0
22	7,93	d	8,1	120,8
23	--	--	--	133,2
24	7,93	d	8,1	120,8
25	7,52	d	8,1	128,0
27	7,18	s	--	138,2
29	7,66	d	7,6	129,2
30	8,23	s	--	118,3

Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **PQM-88 (32k)**

Posição	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,23 - 2,16 (H-4 ax);	m	--	61,5
	3,16 - 3,12 (H-4 eq)			
3	4,04	m	--	66,5
4	1,73 - 1,47 (H-6 ax);	m	--	33,6
	2,02 - 1,96 (H-6 eq)			
5	1,73 - 1,47	m	--	23,7
6	2,11 - 2,07 (H-2 ax);	m	--	53,4
	2,64 - 2,61 (H-2 eq)			
7	3,52	s	--	62,2
8	--	--	--	143,1
9	7,32	d	8,3	128,0
10	8,26	d	7,6	129,1
11	--	--	--	131,1
12	8,26	d	7,6	129,1
13	7,32	d	8,3	128,0
15	--	--	--	163,4
19	8,74	s	--	147,7
20	--	--	--	132,4
21	7,50	d	8,0	126,1
22	7,87	d	8,7	127,9
23	--	--	--	141,3
24	7,87	d	8,7	127,9
25	7,50	d	8,0	126,1
27	2,38	s	--	14,7