

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

**Potenciais candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e
avaliação da atividade antitumoral de análogos ureídicos e tioureídicos
da capsaicina**

Gustavo José Vasco Pereira

Dissertação para obtenção do Título
de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo
2018

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

**Potenciais candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e
avaliação da atividade antitumoral de análogos ureídicos e tioureídicos
da capsaicina**

Gustavo José Vasco Pereira

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título
de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P436p Pereira, Gustavo José Vasco
 Potenciais candidatos a novos agentes
 antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade
 antitumoral de análogos ureídicos e tioureídicos da
 capsaicina / Gustavo José Vasco Pereira. - São
 Paulo, 2018.
 139 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Parise Filho, Roberto

1. Química farmacêutica medicinal. 2. Capsaicina.
3. Modificação molecular. 4. Câncer. 5.
Bioisosterismo. I. T. II. Parise Filho, Roberto,
orientador.

Gustavo José Vasco Pereira

Potenciais candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos ureídicos e tioureídicos da capsaicina

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Ricardo Augusto Massarico Serafim

João Paulo dos Santos Fernandes

Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo, 05 de dezembro de 2018

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, o responsável por ofertar abrigo e conhecimento.

Ao meu afilhado, meu filho, Vinicius Andrade Alves. Seu sorriso me inspira, sua alegria me contagia e seu amor me mantém de pé.

Ao meu avô Geraldo, que Deus o tenha. Nos deixou em decorrência de um câncer de pulmão. Aqui está meu vô, uma contribuição para chegar na cura das doenças que vem assombrando nossa família.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelo caminho iluminado, o amparo concedido e pelas mãos estendidas me guiando sempre no caminho da conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho, agradeço pela perseverança, orientação, ajudas e broncas que adicionaram o meu crescimento. Obrigado por apontar um norte nos momentos em que me encontrei perdido e obrigado por me inspirar com sua didática e dedicação.

Ao amigo Maurício Temotheo Tavares, responsável por me influenciar a iniciar a trajetória de mestre. Desde o início abrindo meus olhos mostrando que o caminho não seria fácil, porém sempre incentivando com seu ombro amigo e muita dedicação e orientação nas horas mais difíceis. Com certeza você tem mérito nesta conquista, meu irmão.

Aos meus pais, Zoraya Batista Vasco Pereira e Geraldo Pereira Filho, sou eternamente grato pelo amor depositado sobre minha vida. Pelo suor de cada dia para me dar educação e estudo. Por acreditarem, e simplesmente por serem os melhores pais do mundo.

À minha noiva Aline Oliveira, não sei nem por onde agradecer a força e dedicação neste período. Não somente nos estudos, mas também na saúde e na doença estive ao meu lado me confortando e provendo segurança para continuar. Obrigado por acreditar em mim nos momentos em que nem eu acreditava mais.

À Rosania Yang e Thais Batista, agradeço pela ajuda inicial da prática laboratorial. Obrigado pela paciência em todos os momentos e parabéns pelas excelentes profissionais que se tornaram.

Ao amigo Nuno Tavares, pelas dicas, risadas, brigas por pipetas e agitadores, e ajuda no HPLC e espectros de RMN. Obrigado por fazer da pós-graduação momentos de alegria, e aprendizado concomitantes. Com certeza a sua amizade eu levarei pra minha vida.

Ao amigo Alfredo Souza, agradeço pelos conselhos, pela preocupação, pelas risadas, pelas “terapias” gratuitas e por me ensinar que o mundo não é um conto de fadas. Obrigado por me ajudar a encontrar um norte na minha vida, obrigado por me dar seu ombro pra chorar quando precisei, e sou grato acima de tudo por me dar a satisfação de te chamar de amigo.

Aos amigos Fernando Moura Gatti, Elys Cardoso, Marina Primi, Micael Rodrigues, Thalita Cândido, Debora Savino e Rafaela Landucci pela contribuição nesta

jornada, obrigado pela amizade, carinho e bons momentos. Cada um de vocês tem uma marca em tudo que aprendi e aproveitei na pós-graduação. Vocês são demais!

Ao Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes, por participar do exame de qualificação contribuindo com seu conhecimento para melhoria deste trabalho, e pela honra de participar da defesa desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, faço meu agradecimento das mesmas palavras mencionadas ao Prof. João Paulo, e sou grato além disso pela preocupação em um momento em que tive de me ausentar, e agradeço pelas descontrações e amizade nesses anos.

Ao amigo e membro da banca examinadora, Ricardo Serafim, obrigado pelas dicas e visitas repentinas ao laboratório. Agradeço imensamente pela satisfação de ter você fazendo parte desta etapa.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo, pela colaboração, paciência e orientação para execução do trabalho.

À Profa Dra Yara Cury, Profa Dra Vanessa Olzon Zambelli e Barbara Behr Martins, do Instituto Butantan, pela colaboração nos testes de hiperalgesia que contribuíram com a discussão deste trabalho.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e espaço concedido para desenvolvimento deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fomentar a execução deste trabalho.

Aos amigos e familiares que mesmo sem saber o tamanho da dificuldade, prestaram apoio, incentivos e crenças.

***Muito obrigado a cada um de vocês que de alguma forma
contribuíram comigo!***

***“Basta ser sincero e desejar profundo.
Você será capaz de sacudir o mundo (...)”***
- Raul Seixas -

Atividades acadêmicas desenvolvidas

✓ **Organização de eventos**

IV Symposium on Drug Design and Development for Neglected Diseases – FCF/USP (2015)

XIII National Meeting of Medicinal Chemistry Professors – FCF/USP (2015)

✓ **Apresentação de trabalho**

XIII National Meeting of Medicinal Chemistry Professors - Potential candidates for new anticancer agents: synthesis and evaluation of antitumor activity of tioureidicos and ureidicos analogs of capsaicin – FCF/USP (2015)

✓ **Disciplinas cursadas**

Tópicos Gerais De Fármaco e Medicamentos I – (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

Mecanismo de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico – (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

Análise Espectrométrica de Fármacos – (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

Tópicos de Epistemologia e Didática (Faculdade de Educação – Universidade de São Paulo)

Delineamento de Experimento e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas – (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

✓ **Produção científica**

CUNHA, M. R. C.; TAVARES, M. T.; CARVALHO, C. F.; SILVA, N. A. T.; SOUZA, A. D. F.; PEREIRA, G. J. V.; FERREIRA, F. F.; PARISE-FILHO, R.
Environmentally Safe Condition for the Synthesis of Aryl and Alkyl Sulfonyl Hydrazones via One-Pot Reaction. Sustainable Chemistry&Engineering, v. 4 (4), p. 1899 – 1905, 2016.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

-Charlie Chaplin-

Resumo

Potenciais candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos ureídicos e tioureídicos da capsaicina

As neoplasias malignas, doenças mundialmente conhecidas como câncer, possuem um dos tratamentos mais onerosos, tóxicos e de baixa seletividade na terapêutica atual. Adicionalmente, o contínuo crescimento da incidência da doença também representa em uma grande problemática. Os produtos de origem natural se apresentam como alternativas para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. A capsaicina, produto natural proveniente das pimentas do gênero *Capsicum*, apresenta propriedades antineoplásicas, portanto, pode ser utilizada como protótipo para obtenção de análogos. Quatro séries foram planejadas e sintetizadas, obtendo-se compostos ureídicos e tioureídicos. A estratégia sintética se baseou na reação da piperonilamina ou vanililamina com isocianatos ou isotiocianatos, ligados a substituintes aromáticos ou alquílicos. Vinte e sete análogos foram sintetizados com rendimentos variando entre 22 a 90 %. Todos os compostos apresentaram aspecto sólido variando a cor de branco a levemente amarelados. Para a caracterização das substâncias obtidas foram utilizados dados de RMN ^1H e ^{13}C , ponto de fusão e a determinação de pureza foi realizada mediante HPLC. Todos os compostos foram submetidos a ensaios de avaliação da atividade citotóxica por redução do MTT contra linhagens de células cancerígenas e células saudáveis. Os compostos RPF652, RPF 512 – 514) apresentaram atividade comparável ou superior ao protótipo com valores de IC_{50} na faixa de micromolar. Os resultados apontados pela modelagem molecular indicam que descritores eletrônicos como E_{homo} e E_{lumo} podem estar associados à atividade do composto, ClogP (3,92) pode favorecer melhor permeabilidade na membrana celular, e o maior número de sítios de aceitação de ligação de hidrogênio podem corroborar com a citotoxicidade em linhagem A2058. Particularmente, o análogo RPF652 apresentou atividade pronunciada com valores de IC_{50} de 55, 67, e 87 μM contra as células A2058, SK-MEL 25, e U87, respectivamente, o que representa atividade de superior à capsaicina. Como uma tendência o composto RPF652 causou parada no ciclo de linhagem B-RAF B16F10 não levando a célula à morte. Porém esta linhagem não apresenta mutação no códon V600E. Em contraponto, o análogo RPF652 apresentou maior potência contra linhagem $^{\text{V600E}}$ B-RAF A2058 mutada, indicando possível seletividade em linhagens que apresentam a mutação no códon V600E da proteína B-RAF. Ademais, novos esforços devem ser concentrados no análogo RPF652 para melhor elucidação mecanística de sua atividade.

Palavras-chave: Química medicinal. Câncer. Bioisosterismo. Citotoxicidade. Modelagem molecular.

Abstract

New potential antineoplastic candidates: synthesis and antitumoral evaluation of urea and thiourea capsaicin analogues

Malignant neoplasms have one of the most expensive, non-selective and toxic treatment of present times. This situation, combined with the rising incidence rate, represents a major problem for humanity. The use of natural products can be an alternative for treatment of several diseases, including cancer. Capsaicin is a natural product derived from *Capsicum* peppers, with reported anticancer activity and can be used as prototype for the design of new molecules with remarkable activity.

Capsaicin analogues were designed and synthesized in four series of derivatives, replacing the prototype amide bond with urea and thiourea functions. The synthetic approach builds the urea/ thiourea scaffold using the reaction of piperonyl/ vanilyl amine with alkyl and aryl isocyanides/ isothiocyanides. Twenty-seven new compounds were obtained with yields from 22 to 90 %, and were fully characterized using ^1H and ^{13}C NMR, the purity was determined by melting point and HPLC. All of the obtained compounds were evaluated in MTT cytotoxic assays against different cancer cell-lines (B16F10, A2058, SK-MEL 25 and U-87), and compared with healthy human cells (T75). Additionally, the most active compound was submitted to a cell cycle arrest assay.

The thiourea derivative RPF652 was the most active compound, and the urea derivatives RPF512, RPF513 and RPF514 showed good micromolar IC_{50} values. This results, when correlated with several *in silico*-calculated properties for the obtained molecules, suggests that ClogP, E_{homo} , E_{lumo} and the number of hydrogen-bond acceptance sites may be correlated to the anticancer activity reported. RPF652 especially, showed IC_{50} values with superior activity and better selectivity index when compared with capsaicin. The cell-cycle assay of RPF652 showed significant arrest in V600E-codon B-RAF non-mutated cell lines (B16F10) without killing it. V600E-codon B-RAF mutated cells A2058, were significantly more sensitive to the compound. These findings may suggest some insights about the mechanism of action and targets of this compounds.

Key words: Medicinal chemistry. Cancer. Bioisosterism. Cytotoxicity. Molecular modeling.

Lista de abreviaturas

- Apaf-1: Fator de ativação de protease associado à apoptose 1
- Bcl-2: *B-cell lymphoma 2* (Linfoma de células B)
- Bcl-X_L: *B-cell lymphoma extra large* (Linfoma de células B extra grande)
- CDCl₃: Clorofórmio deuterado
- DCM: Diclorometano
- DIABLO: *Direct IAP – Binding Protein with Low pI* (Proteína de ligação-IAP direta com baixo pI)
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido deuterado
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- FADD: *Fas Associated Death Domain* (Domínio de morte celular associado ao Fas)
- FasL: Ligante Fas
- FasR: Receptor Fas
- IAP: *Inhibitors of apoptosis proteins* (Proteínas inibidoras da apoptose)
- IC₅₀: *Half maximal inhibitory concentration* (Concentração inibitória 50%)
- LBDD: *Ligand based drug design* (Planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante)
- MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- RMN ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono
- RMN ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- SBDD: *Structure based drug design* (Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor)
- Smac: *Second mitochondrial – derived activator of caspases* (Segundo ativador mitocondrial de caspase)
- TNF: *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
- TRADD: *Tumor necrosis factor Receptor type 1 – Associated Death Domain* (Domínio de morte associado ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1)
- DISC: *Death-Inducing Signaling Complex*

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

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

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigênio)

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases* (Proteína-quinases ativadas por mitógenos)

PI3K: *Phosphoinositide- 3- kinase* (Fosfatidilinositol-3-cinase)

FDA: *Food and Drug Administration*

HMBA: *hexamethylene bisacetamide* (bis-acetamida hexametilênica)

SAHA: *suberoylanilide hydroxamic acid* (ácido hidroxâmico suberoilânilida)

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

CC: Cromatografia em coluna

THF: Tetraidrofurano

MeOH: Metanol

δ: Deslocamentos químicos em ressonância magnética nuclear

Casp: Caspase

Casp 3 cleaved: caspase 3 clivada

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

Lista de figuras

Figura 1. Principais tipos de câncer que afetam a população mundial.	20
Figura 2 - Vias apoptóticas intrínseca e extrínseca	23
Figura 3 – Ação de fármacos antineoplásicos	25
Figura 4 – <i>Capsicum sp.</i> e seu composto majoritário (capsaicina).	27
Figura 5 - Relação de modificação clássica e não-clássica de bioisosterismo.	30
Figura 6 – Aplicação de bioisosterismo em fármacos presentes na terapêutica.	32
Figura 7 - Representação esquemática da melhoria de interação entre os ligantes e os sítios de ligação por homologia.	33
Figura 9 - Planejamento dos análogos a partir da capsaicina.	37
Figura 10 - Diagrama de Craig.	38
Figura 11 - Análogos piperonílicos e vanilínicos e suas subséries ureídicas e tioureídicas planejadas.	38
Figura 12 – Mecanismo simplificado de reação para formação de ureia a partir de isocianatos.	53
Figura 13 – Espectro de RMN ^1H do composto RPF505.	55
Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF505	56
Figura 15 – Espectro de RMN ^1H do composto RPF515.	59
Figura 16 – Espectro de RMN ^{13}C do análogo ureídico RPF515.	60
Figura 17. Fotomicrografias das linhagem A2058 e B16F10 tratadas com o RPF652.	64
Figura 18. Gráficos representativos do ciclo celular das linhagens B16F10 e A2058 tratadas com o RPF652	65

Figura 19 - Western Blotting da linhagem A2058 tratada com o composto RPF652.	66
Figura 10 - Avaliação do efeito da capsaicina e análogos (5,2 nmol/pata) no comportamento nociceptivo dos animais. Todos os animais receberam os compostos via intraplantar. n= 8 animais	67
Figura 21 - Mapa HOMO e LUMO, mapa de potencial eletrostático (MPE), calculado da capsaicina e do composto RPF652	70
Figura 23 – Vetor de momento dipolo calculado para a capsaicina e para o composto RPF652	71
Figura 24 – Mapa HOMO, valores calculados para orbital molecular HOMO (eV), LUMO (eV), ClogP, Momento dipolo e HBA dos compostos RPF652, RPF662 e RPF552	72

Lista de tabelas

Tabela 1 - Fármacos de origem natural.	26
Tabela 2 - Análogos funcionais da capsaicina: RPF101 e RPF151 (de-Sá-Júnior et al., 2013; Ferreira et al., 2015).	28
Tabela 3 – Resultados obtidos na síntese da série piperonílica (séries <i>Ia</i> e <i>Ib</i>).	51
Tabela 4 – Resultados dos compostos vanilínicos sintetizados (série <i>Ia</i> e <i>IIa</i>).	57
Tabela 5 - Resultados de IC ₅₀ dos análogos testados por redução do MTT frente a linhagens tumorigênicas e sadias.	63
Tabela 6 - Valores calculados das propriedades moleculares da capsaicina e do derivado RPF652.	69

Sumário

<i>Introdução</i>	19
1 Introdução	20
1.1 Câncer	20
1.2 Fisiopatologia e bioquímica do câncer	21
1.2.1 - Apoptose	22
1.3 Tratamento	24
1.4 Os capsaicinóides	27
1.5 Planejamento de fármacos	29
1.5.1 – Bioisosterimo	30
1.5.2 - Homologia.....	32
<i>Objetivos</i>	34
2 Objetivos.....	35
<i>Planejamento</i>	36
3 Planejamento de compostos	37
Figura 11 . Análogos piperonílicos e vanilínicos e suas subséries ureídicas e tioureídicas planejadas.	38
<i>Material e Métodos</i>	39
4 Material e Métodos	40
4.1 – Material, reagentes e solventes	40
4.2 Métodos Sintéticos.....	43
4.2.1 – Síntese das séries piperonílicas ureídicas e tioureídicas – Séries Ia e Ib	43
4.2.2 – Síntese das séries vanilínicas ureídicas e tioureídicas – IIa e IIb.....	44
4.3 Métodos Analíticos	45
4.3.1 – Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	45
4.3.2 –Cromatografia em coluna	45
4.3.3 – Ponto de fusão	45
4.3.4 – Ressonância magnética nuclear.....	45
4.3.5 – Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatography -HPLC).....	46
4.4 – Ensaio biológicos	46
4.4.1 – Preparação da solução de MTT	46

4.4.2 – Ensaio de viabilidade celular por MTT	46
4.4.3 – Análise do ciclo celular	47
4.4.4 - Análise da sinalização celular induzida pelo análogo RPF652	47
4.5 – Métodos computacionais	48
4.6 – Avaliação da capacidade de hiperalgesia do composto RPF652	49
<i>Resultados e Discussão</i>	50
5 Resultados e discussão	51
5.1 Parte sintética	51
Vinte e sete análogos foram sintetizados e caracterizados das séries propostas. Dentre eles 14 piperonílicos e 13 vanilínicos. Entretanto, para melhor entendimento, serão apresentados e discutidos primeiramente os resultados da série piperonílica e posteriormente da série vanilínica.	
5.1.1 – Série piperonílica Ia e Ib	51
Os valores de rendimento, faixa de fusão, aspecto físico e pureza cromatográfica da série piperonílica podem ser verificados na tabela 3. Os respectivos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C constam no item “ANEXOS I” e os cromatogramas no item “ANEXOS II”..	
5.1.2 – Análise espectroscópica de RMN ¹ H e ¹³ C da série piperonílica.....	55
5.1.3 - – Série vanílica IIa e IIb.....	57
5.1.4 Análise espectroscópica de RMN ¹ H e ¹³ C da série vanilínica.	59
5.2 Parte biológica	62
5.2.1 – Avaliação de viabilidade celular por MTT	62
5.2.2 – Avaliação morfológica das linhagens A2058 e B16F10 tratadas com o composto RPF652.	63
5.2.3 - Avaliação do Ciclo celular e Elucidação do tipo de Morte Celular.....	64
5.2.4– Investigação de nocicepção e hiperalgesia modulada pelo RPF652.....	67
5.3 – Modelagem molecular	68
<i>Conclusões</i>	72
6 Conclusões.....	73
7. Perspectivas	76
7 Referências	78
8. <i>Anexos I</i>	85
Anexos II	115

Introdução

1 Introdução

1.1 Câncer

O termo “câncer” é utilizado para descrever um conjunto de alterações que compartilham uma característica comum: o crescimento celular descontrolado. A massa celular gerada nesse processo recebe o nome neoplasia, ou tumor, considerada maligna quando tem a capacidade de invadir outros tecidos ou benigna quando se restringe a área de sua formação (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LABI; ERLACHER, 2015). Existe mais de 100 doenças como o câncer de pulmão, próstata, mama, cólon, estômago, esôfago, bexiga, dentre outros que se caracterizam por este crescimento desordenado que invade os tecidos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2018; TORRE et al., 2015)

No ano de 2018 foi estimado um número 18,1 milhões de casos de câncer ao redor do mundo, onde a expectativa no ano de 2035 pode chegar a 24 milhões de casos (WCRF, 2018). Segundo a organização mundial da saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, aonde neste mesmo ano cerca de 9,5 milhões de pessoas vieram a óbito devido às neoplasias malignas (WHO, 2018).

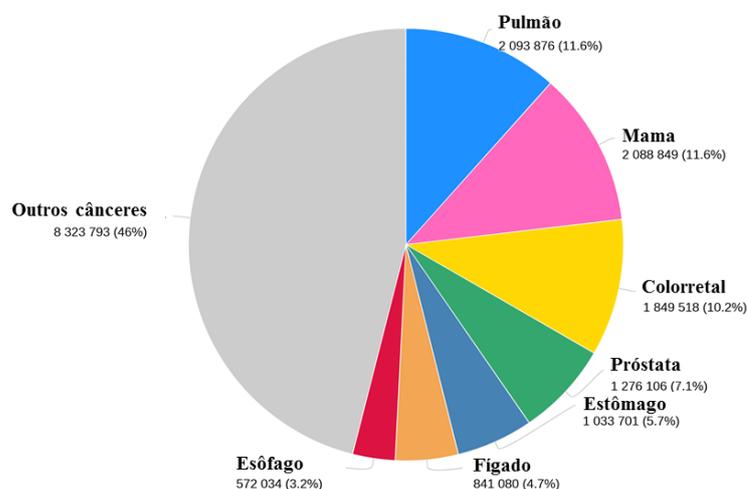


Figura 1. Principais tipos de câncer que afetam a população mundial.

No Brasil, para o biênio 2018 – 2019, estima-se ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Essa estimativa reflete o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, mama feminina, pulmão, cólon e reto entre os mais incidentes, porém

cânceres do colo do útero, estômago e esôfago também demonstram taxas elevadas (INCA, 2018).

Outra problemática são os altos números de internações que trazem um enorme gasto aos cofres públicos, onde foi relatado que somente entre 2008 e 2009, foram gastos cerca de 1,3 bilhões de reais em cirurgias, sessões de quimioterapia e radioterapia (INCA, 2018).

O câncer pode ser causado por fatores internos e externos, os quais se podem entender como fatores internos, as incidências genéticas que ocorrem em cerca de 10 a 30% dos casos, são bem menos comuns se comparados com os fatores externos, como tabagismo, alcoolismo, exposição a agentes químicos, radiação solar, entre outros (XIE et al., 2016). O conhecimento dos fatores externos causadores do câncer corrobora na profilaxia da doença. A diminuição do consumo de tabaco e álcool, a aplicação de protetor solar, evasão à poluição, obesidade e infecções, e utilização de equipamento de proteção individual em ambientes de alta concentração de produtos químicos, são estratégias adotadas que podem prevenir a patologia (DELA CRUZ; TANOUE; MATTHAY, 2011)

1.2 Fisiopatologia e bioquímica do câncer

Dois conceitos são amplamente aceitos na área da tumorigênese. Primeiramente, o câncer é resultado de mudanças genéticas sequenciais que, eventualmente, transformam células normais em malignas, este mecanismo é referido como carcinogênese multietapas. Segundo, a sustentação de tumores permite sua evolução a partir de processos biológicos específicos que apresentam desregulação (LABI; ERLACHER, 2015).

Hanahan e Weinberg (2011) sugerem seis alterações essenciais na fisiologia da célula normal, que em conjunto ditam o crescimento maligno: sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, ativação da invasão tecidual e metástase, ativação da imortalidade replicativa, indução da angiogênese, reprogramação do metabolismo energético e evasão à resposta imune e à apoptose. Cada uma dessas alterações representa violação do mecanismo de defesa do ciclo celular contra a formação de células neoplásicas.

A célula para se tornar maligna, necessita superar uma série de barreiras fisiológicas, tendo em vista que o nosso organismo apresenta inúmeros mecanismos de

reparo celular. Estes mecanismos podem ser inicializados a partir do próprio ciclo celular (DE ALMEIDA et al., 2005).

O ciclo celular é separado pelos estágios $G_1 - S - G_2 - M$, sendo na fase M que ocorre o processo de duplicação – dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase. A replicação do DNA acontece especificamente na fase S (síntese), precedente ao intervalo G_1 , onde ocorre aumento do tamanho celular e preparo para duplicação, seguida pela fase G_2 , fase em que ocorre o preparo para mitose (fase M) (VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R., BERNEMAN et al., 2003). Esta sequência possibilita a duplicação da célula sem dar origem a células anormais.

Características genéticas ou exposição a carcinógenos, levam a célula a sofrer processo de mutação espontânea, devido ao dano no DNA, que podem alterar o desenvolvimento normal da população celular evadindo o processo apoptótico (FESIK, 2005; OKADA; MAK, 2004).

1.2.1 - Apoptose

Atualmente, sabe-se que a apoptose é um processo de eliminação celular geneticamente determinado, que visa manter o controle e a homeostase tecidual com finalidade de eliminar as células envelhecidas, ou não desejadas. Pode ser considerada um mecanismo de proteção do organismo frente a processos infecciosos, imunológicos ou contra agentes nocivos (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno altamente rápido. Ocorre retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas presentes nas células mantêm a morfologia, com exceção das mitocôndrias que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana do núcleo. Então, a membrana celular forma prolongamentos conhecidos como *bleps* e o núcleo se desintegra em fragmentos envolvidos pela membrana nuclear. Esses prolongamentos da membrana aumentam de número e tamanho levando ao rompimento, originando assim o que são conhecidos como corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem inicializar um processo inflamatório (ZIEGLER, 2004).

A apoptose ocorre durante o desenvolvimento, envelhecimento ou como um mecanismo homeostático de prevenção dos tecidos. Duas são as vias bioquímicas existentes para indução à apoptose, via extrínseca, ou por receptor de morte celular; e via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial. A alteração de qualquer dessas vias pode resultar em evasão à apoptose, conseguinte proliferação desordenada da célula (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007)

A via extrínseca (Figura 2) é desencadeada por membros da família de receptores de morte celular denominados TNF/Fas, onde sinalizam agregação e formação de um complexo indutor de morte, o qual recruta pró-caspases através de proteínas de domínio de morte FADD (*Fas Associated Death Domain*), ou TRADD (*Tumor necrosis fator Receptor type 1 – Associated Death Domain*). As proteínas do domínio de morte associam-se à pró-caspase 8 levando a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC – *Death-Inducing Signaing Complex*), por conseguinte ativa a caspase 8, que procede a clivar a caspase 3 e esse processo proteolítico leva ao mecanismo apoptótico (OUYANG et al., 2012)

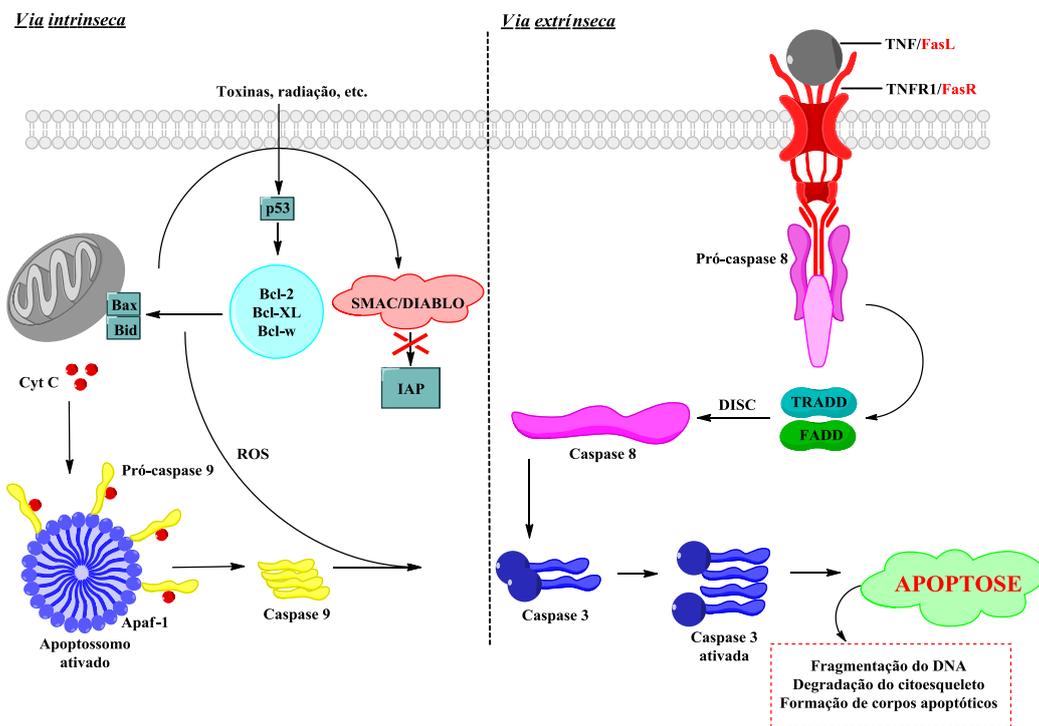


Figura 2 - Vias apoptóticas intrínseca e extrínseca – A via intrínseca, também chamada de via mitocondrial é desencadeada por diversos tipos de estímulos que causam alterações na mitocôndria, dentre eles o potencial transmembrânico, possibilitando maior liberação de citocromo *c* e ativando caspases efetoras próapoptóticas. A via extrínseca é ativada por ligantes que interagem com o receptor de morte celular (TNFR₁) levando a ativação de caspases que numa cascata proteolítica levam a célula à apoptose.

Já a via intrínseca (Figura 2) envolve diversos estímulos não mediados por receptores, envolvendo por exemplo a ativação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bid (promove colapso na membrana mitocondrial interna). Concomitante, membros da família de proteínas da Bcl-2 regulam a liberação de citocromo *c* a partir da membrana mitocondrial interna, este associasse com a pró-caspase 9 formando o apoptossomo, subseqüentemente ativam as caspases 9 e 3, culminando na clivagem de substratos específicos e gerando morte celular (KUNDU; THOMPSON, 2008). A Smac/DIABLO, proteína mitocondrial promotora da inativação da atividade das Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAP), e as espécies reativas de oxigênio (ROS) também concebem a ativação das caspases 9 e 3, intensificando o efeito apoptótico (DU et al., 2000; WU et al., 2000).

Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências mostraram que a resistência aos processos apoptóticos é uma característica marcante na maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004). Entretanto, a análise do processo de tumorigênese demonstra que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por mecanismos distintos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumorigênico. Entre estes, inclui a evasão à morte por apoptose levando as células a escaparem do controle de crescimento, dentre outros mecanismos como a lesão do DNA (ZÖRNIG et al., 2001).

Ademais, o conhecimento fisiopatológico acerca do câncer torna possível a identificação de alvos potenciais para abordagens terapêuticas, fármacos que exploram a ativação de processos apoptóticos, ou inibição de vias promotoras de neoplasias, tendem a possuir potencial de tratar com eficácia esta patologia (FESIK, 2005; HANAHAN; WEINBERG, 2011)

1.3 Tratamento

Diversas estratégias são aplicadas para o tratamento do câncer, dentre elas pode-se citar a intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e endócrinoterapia. As estratégias são isoladas, porém, complementares entre si. O tratamento depende sempre do tipo de câncer, onde o mesmo é elucidado via biopsia do tumor e análise celular (GREENPEPTIDE, 2015; INCA, 2018)

A quimioterapia tem como objetivo primário atacar as células neoplásicas, preservando as normais. Mesmo não agindo de forma específica contra tumores,

lesionado demais tecidos, exerce um papel importante adjunto às demais técnicas de tratamento, o que leva a uma redução na taxa de mortalidade por neoplasias. A figura 3, apresenta uma visão geral de fármacos aprovados para a terapêutica do câncer, aduzindo os alvos de ação (DE ALMEIDA et al., 2005; URRUTICOECHEA et al., 2010)

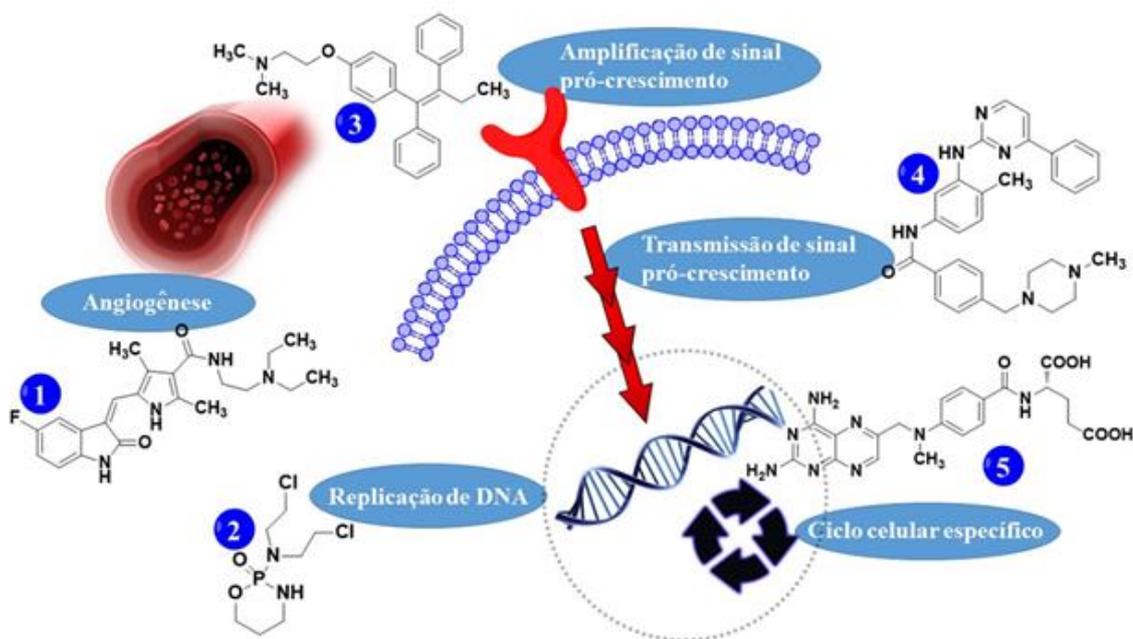


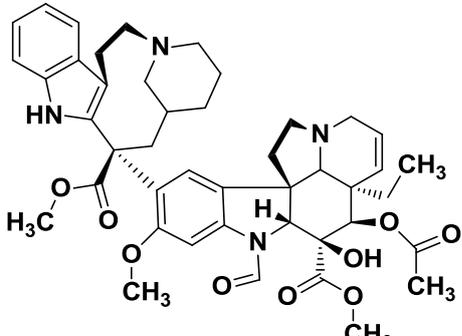
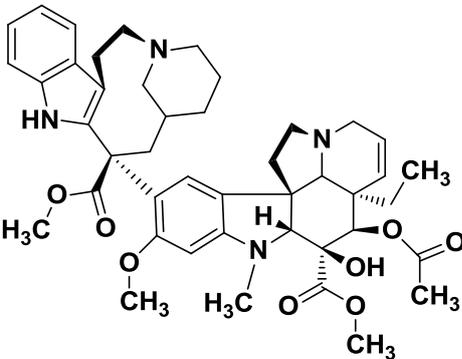
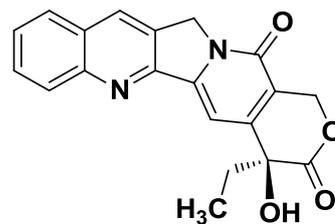
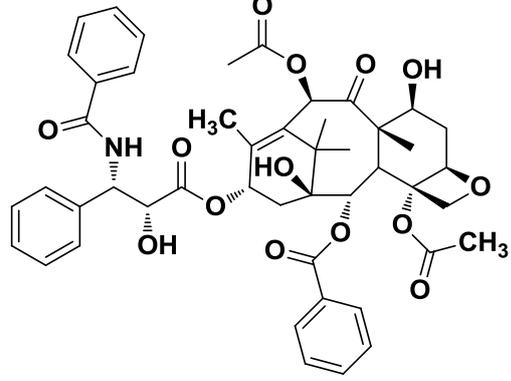
Figura 3 – Ação de fármacos antineoplásicos – 1-sunitinibe: inibe proteínas e enzimas efetoras na angiogênese; 2-ciclofosfamida: agente alquilante do DNA; 3-tamoxifeno: antagonista hormonal; 4-imatinibe: inibição da tirosina-quinase Abl; 5-metotrexato: inibição da síntese de DNA.

Porém, devido a inúmeros problemas causados pela quimioterapia, a comunidade científica estimulam-se a pesquisar antineoplásicos mais seletivos e efetivos, pois os avanços no estudo da biologia do câncer propiciam o desenvolvimento de pesquisas, amplificando o escopo de substâncias bioativas no tratamento do câncer (COSTA-LOTUFO et al., 2010). No intuito de diminuir os altos efeitos adversos agregado ao tratamento do câncer, algumas alternativas são estudadas com frequência, como a utilização de produtos naturais para o seu tratamento (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

Meados dos anos 50 um extenso programa de pesquisa para investigar as propriedades antitumorais oriundos de plantas medicinais foi iniciado nos EUA, de onde foi dado um passo significativo na terapêutica do câncer com a descoberta mais adiante do paclitaxel e camptotecina, abrindo portas para chegada de diversas classes de

moléculas com atividade antitumoral (OBERLIES; KROLL, 2004). A tabela 1 apresenta fármacos presentes na terapêutica provenientes de produtos naturais.

Tabela 1 - Fármacos de origem natural.

Nome	Estrutura	Ação	Origem	Referência
Vincristina		Interação com β -tubulina impedindo a formação de microtubulos	<i>Catharanthus roseus</i>	(SERTEL et al., 2011)
Vinblastina				
Camptotecina		Inibição da enzima topoisomerase I	<i>Camptotheca acuminata</i>	(OBERLIES; KROLL, 2004)
Paclitaxel		Polimerização de tubulinas e estabilização de microtúbulos formados	<i>Taxus brevifolia</i>	(CRAGG; NEWMAN, 2004)

Devido a grande biodiversidade da flora brasileira, a qual ainda oferece diversas alternativas para pesquisa, muitos protótipos bioativos podem ser oriundos de pesquisas neste ramo (FUNARI et al., 2013).

A pimenta vermelha (*Capsicum sp.*) apresenta na sua composição compostos capsaicinóides, majoritariamente a capsaicina. Estas substâncias apresentam atividades como o controle do crescimento de células adiposas, no caso da piperina, e atividades antineoplásicas, no caso dos capsaicinóides. As ações desses exemplos de produtos naturais chamam atenção dos pesquisadores, os quais se apresentam como protótipos inspiradores para a síntese de novos análogos (HAYMAN; KAM, 2008; THIELE; MUELLER-SEITZ; PETZ, 2008)

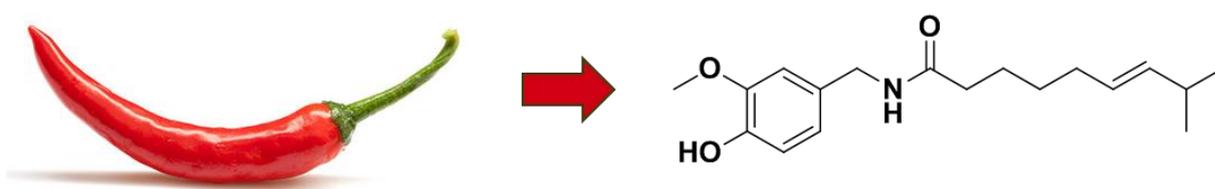


Figura 4 – *Capsicum sp.* e seu composto majoritário (capsaicina).

1.4 Os capsaicinóides

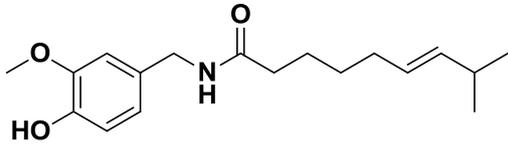
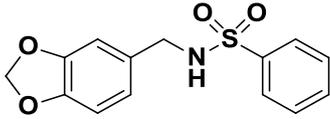
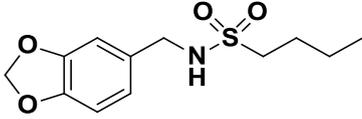
A capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), foi isolada pela primeira vez em 1816 e totalmente cristalizada 60 anos depois, em 1876 (BODE; DONG, 2011). Vem sendo estudada com frequência apresentando diversas atividades biológicas, dentre elas, respostas termogênicas (JOO et al., 2010), anti-inflamatória, ações contra nevralgia, artrose, artrite reumatoide, neuropatia diabética (LUO; PENG; LI, 2011), imunossupressão (JUN et al., 2007) e propriedade antineoplásica (WAHYUNI et al., 2013).

A ação antineoplásica da capsaicina e seus efeitos nos estágios de carcinogênese e mutagênese ganharam espaço nas pesquisas (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Observa-se atividade em células malignas de próstata (MALAGARIE-CAZENAVE et al., 2011; SÁNCHEZ et al., 2007); de cólon (LIN et al., 2013); da glía (KANG et al., 2007); de esôfago (HUANG et al., 2009); de mama (THOENNISSSEN et al., 2010); gástricas (KANG et al., 2007); hepáticas (HUANG et al., 2009) e pancreáticas (XIE et al., 2016).

O mecanismo de ação antineoplásico pela capsaicina incluem a inibição da NF κ B, enzima a qual está ligada aos mecanismos de resistência celular, despolarização mitocondrial (LEE et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2007; WANG et al., 2011), estresse oxidativo promovido por espécie reativa de oxigênio (OIKAWA et al., 2006) , super expressão da Bax, proteína proapoptótica da família da Bcl-2 e depleção de proteínas anti-apoptóticas da mesma família, e liberação de citocromo *c* (JUN et al., 2007; JUNG; KANG; MOON, 2001), estímulos apoptóticos por via extrínseca mediado pela ativação do receptor TRPV₁ (GHOSH; BASU, 2010), e corroborando com esses estudos foi também relatado a ativação da calpaína, enzima conhecida por clivar reguladores significativos do processo apoptótico (KIM; YOUNG; YONG, 2005).

Estes estudos demonstram que a capsaicina apresenta potencial a ser protótipo para síntese de novos análogos funcionais (DAMIÃO et al., 2014; DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013; FERREIRA et al., 2015). O grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roberto Parise Filho desenvolveu, por exemplo, 2 análogos que mostraram melhora na atividade antitumoral em relação ao protótipo capsaicinóide: RPF101 e RPF151 (Tabela 2). O RPF101 que apresentou atividade antitumoral na linhagem celular MCF-7 de adenocarcinoma mamário por causar distúrbios na rede de microtúbulos, assim realizando a parada do ciclo celular na fase G₂ e M (DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013). O RPF151 apresentou atividade em linhagem MDA-MB-231 também modelos de câncer de mama e sua atividade antineoplásica é devido a indução da depleção de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, e condução da clivagem da caspase-3, corroborando no processo apoptótico (FERREIRA et al., 2015).

Tabela 2 - Análogos funcionais da capsaicina: RPF101 e RPF151 (de-Sá-Júnior et al., 2013; Ferreira et al., 2015).

Composto	Estrutura	IC ₅₀ MCF-7	IC ₅₀ MDA-MB-231
Capsaicina		53 µM	120 µM
RPF 101		32 µM	-
RPF 151		-	87 µM

Além do mais, análogos sulfonil-hidrazônicos, amídicos e ésteres foram sintetizados e apresentaram citotoxicidade seletiva em diferentes linhagens tumorigênicas (BATISTA FERNANDES et al., 2018; DAMIÃO et al., 2014; DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013; FERREIRA et al., 2015).

Tal fato indica que a capsaicina pode ser utilizada como modelo de planejamento de análogos com potencial atividade, representando alternativas de interesse na terapêutica do câncer (LEE et al., 2004).

1.5 Planejamento de fármacos

A química medicinal possui métodos eficientes para otimizar a potência e o perfil farmacológico de moléculas, levando ao planejamento e síntese de substâncias cada vez mais ativas, com biodisponibilidade satisfatória, diminuição da ação tóxica, e metabolismo adequado ao seu perfil terapêutico (KOROLKOVAS, 1988; WERMUTH, 2008).

Abordagens racionais no planejamento de fármacos podem ser desenvolvidas a partir de estudos de complementariedade entre o ligante e a estrutura alvo. O planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (*Structure-based Drug Design, SBDD*) é uma técnica que utiliza princípios físico-químicos da estrutura de

interesse em relação ao receptor alvo. A determinação estrutural do receptor é realizada por técnicas experimentais de cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) com auxílio de métodos computacionais (APAROY; KUMAR REDDY; REDDANNA, 2012).

O planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (*Ligand-Based Drug Design, LBDD*) é utilizado quando não se conhece a estrutura 3D do alvo e é norteado por ligantes bioativos já existentes que servem como modelos para modificações moleculares. Este método visa obtenção de análogos com otimização da ação biológica, diminuição do efeito tóxico, e/ou o aumento da seletividade perante o alvo dos derivados obtidos. (ACHARYA et al., 2011; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

1.5.1 – Bioisosterismo

O bioisosterismo é definido como são modificações moleculares utilizando átomos ou conjunto de átomos, que apresentam características eletrônicas e físico-químicas semelhantes, assim, podendo apresentar propriedade similar ou equivalente. Quando modificados alguns grupos substituintes ou átomos de uma estrutura molecular conhecida, por bioisósteros, é possível que ocorra alterações benéficas em relação a farmacocinética e farmacodinâmica no análogo em questão (BARREIRO et al., 1997; NJUGUNA; MASIMIREMBWA; CHIBALE, 2012).

Burger (1970), define bioisósteros em clássicos e não clássicos, os quais bioisósteros clássicos são átomos ou subunidades moleculares que disponham a mesma valência ou anéis equivalentes. Os bioisósteros não clássicos abrangem subunidades que não obedecem a regra descrita anteriormente, porém possuam alguma característica semelhante como: acidez, basicidade, tamanho ou número de ruo de doadores/aceptores de ligação de hidrogênio (WERMUTH, 2008).

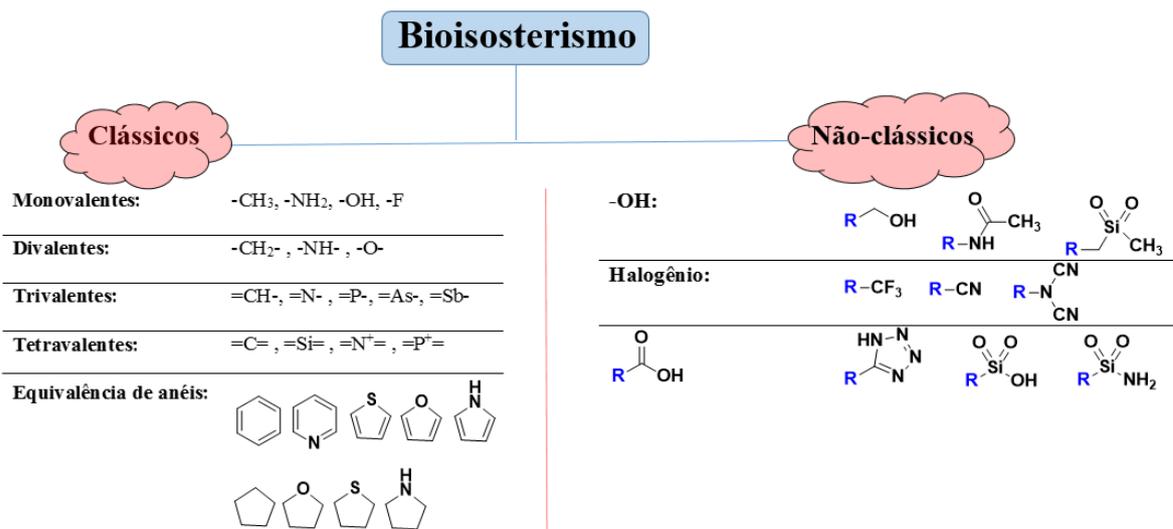


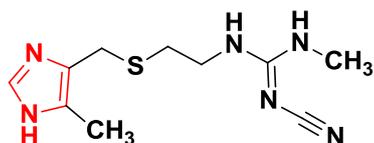
Figura 5 - Relação de modificação clássica e não-clássica de bioisosterismo.

O sucesso desta estratégia no desenvolvimento de novas entidades moleculares permite à indústria farmacêutica e à pesquisa descoberta de novos análogos bioativos, acrescentando ganho significativo no *pool* de moléculas presentes na terapêutica (LIMA; BARREIRO, 2005).

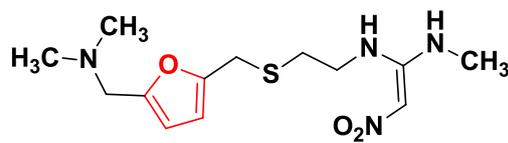
Esta ferramenta é bastante empregada na obtenção de análogos, a partir de um determinado protótipo que apresenta atividade biológica. “Análogos” que deriva do grego *analogia*, é empregado para apontar semelhanças estruturais e funcionais. Esta definição implica em três categorias: compostos que apresentem similaridades químicas e terapêuticas; compostos que apresentam similaridades químicas; e compostos que apresentam apenas o mesmo efeito farmacológico, porém com estruturas completamente distintas. Por sua vez, o bioisosterismo é o termo que pode ser aplicado a análogos que se enquadram na primeira categoria (LIMA; BARREIRO, 2005; MEANWELL, 2011)

A figura 7 a seguir ilustra alguns fármacos que apresentam a utilização de bioisosterismo como ferramenta de modificação molecular de fármacos.

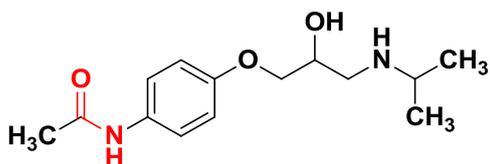
Cimetidina



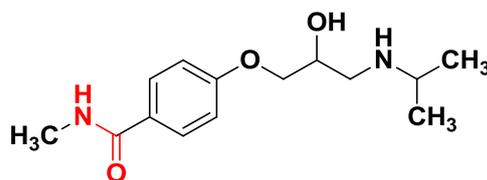
Ranitidina



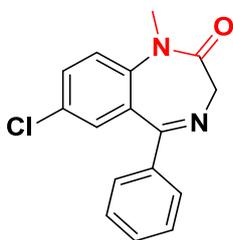
Pactolol



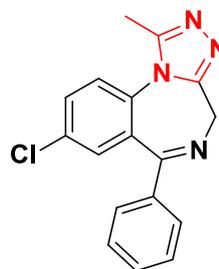
Atenolol



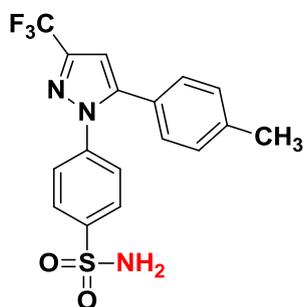
Diazepam



Alprazolam



Celecoxibe



Etoricoxibe

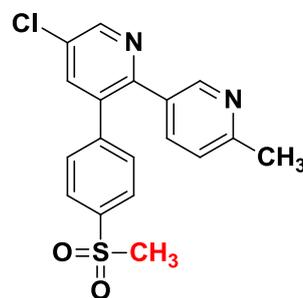


Figura 6 – Aplicação de bioisosterismo em fármacos presentes na terapêutica.

1.5.2 - Homologia

Modificações planejadas por homologia consistem em alteração de uma ou mais unidades metilênicas (-CH₂-) na estrutura do análogo em relação ao seu protótipo. Realizando essas alterações, a característica de lipofilicidade apresenta-se alterada em relação ao protótipo, sendo maior caso ocorra acréscimo de unidades (homologia superior), ou menor caso sejam retiradas unidades metilênicas (homologia inferior). O tamanho da estrutura obviamente também é alterado em relação ao protótipo, e com isso, observa-se modificação de padrões estéricos entre ambas, resultando em possíveis modificações como já foram citadas (HUGGINS; SHERMAN; TIDOR, 2012).

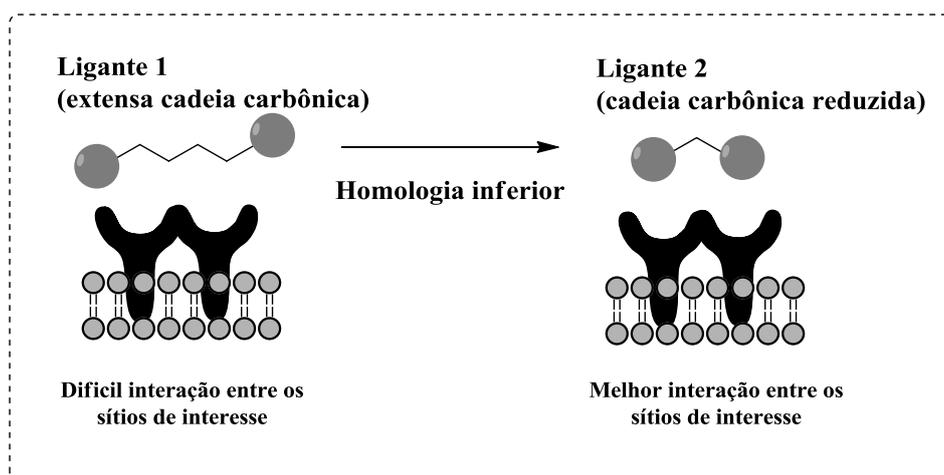


Figura 7 - Representação esquemática da melhoria de interação entre os ligantes e os sítios de ligação por homologia.

Marks e Breslow (2007), atentaram-se à atividade citotóxica do dimetilsulfóxido (DMSO) e utilizando ferramentas como modificação molecular e estudos extensivos de relação estrutura-atividade (REA), determinaram relação bioisostérica entre o composto e amidas simples. Devido às amidas demonstrarem maior citotoxicidade proveu-se a ideia de unir duas unidades amídicas, como demonstra a figura 7, com intuito de explorar outras regiões de interação do bolsão catalítico. Por conseguinte, a adição de unidades metilênicas (homologia superior) deram origem a compostos inibidores das histonas desacetilase (Figura 8), como a *bis*-acetamamina hexametilênica (HMBA) entretanto o mais promissor foi o ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA – *suberoylanilide hydroxamic acid*), atualmente na terapêutica como vorinostate. O composto causa parada de uma série de linhagens celulares tumorais, onde a aplicação farmacológica do vorinostate para o tratamento de linfoma cutâneo de células-T foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) no ano de 2006 (BUTLER et al., 2002; LEE et al., 2012; MARKS; BRESLOW, 2007).

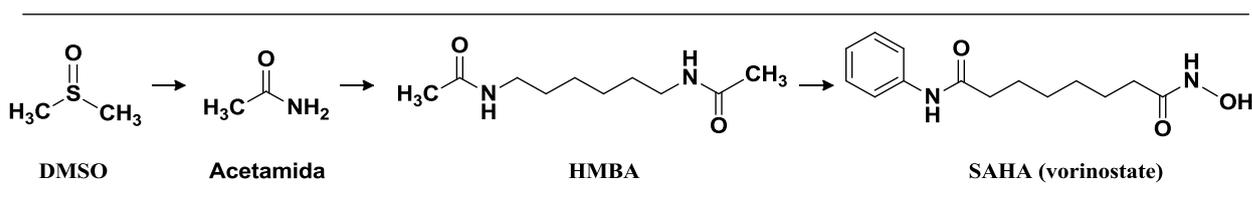


Figura 8 – Estruturas dos inibidores de histona desacetilase.

Objetivos

2 Objetivos

Devido ao número crescente de casos de câncer no mundo, a busca por novos antineoplásicos é fundamental. Estudos sobre a capsaicina mostram atividade antineoplásica relevante, portanto esta apresenta-se como um interessante protótipo para planejamento e síntese de moléculas análogas na tentativa de obter compostos bioativos com características terapeuticamente satisfatória e de baixa toxicidade em relação ao protótipo. Para tanto, este projeto visa a obtenção de análogos com os seguintes objetivos específicos:

I – Utilizando a capsaicina como protótipo inspirador, sintetizar análogos ureídicos e tioureídicos, planejados por bioisosterismo e homologia;

II – Avaliar a atividade antitumoral dos análogos sintetizados em relação ao protótipo, frente a linhagens celulares tumorais e linhagens e não tumorigênicas;

III – Determinar propriedades eletrônicas, lipofílicas e estéricas dos análogos mediante a modelagem molecular, que apontam dados para a elucidação mecanística e para o planejamento de novas moléculas.

Planejamento

3 Planejamento de compostos

Para o planejamento dos análogos deste projeto foi utilizado o modelo de divisão da capsaicina em três partes, A, B e C (DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013; FERREIRA et al., 2015). A região A apresenta um anel metilcatecol, a região B apresenta a função amida e a região C traz uma longa cadeia alquílica insaturada e ramificada. A figura 9 apresenta estas características bem como o planejamento das séries e subséries e as modificações moleculares propostas.

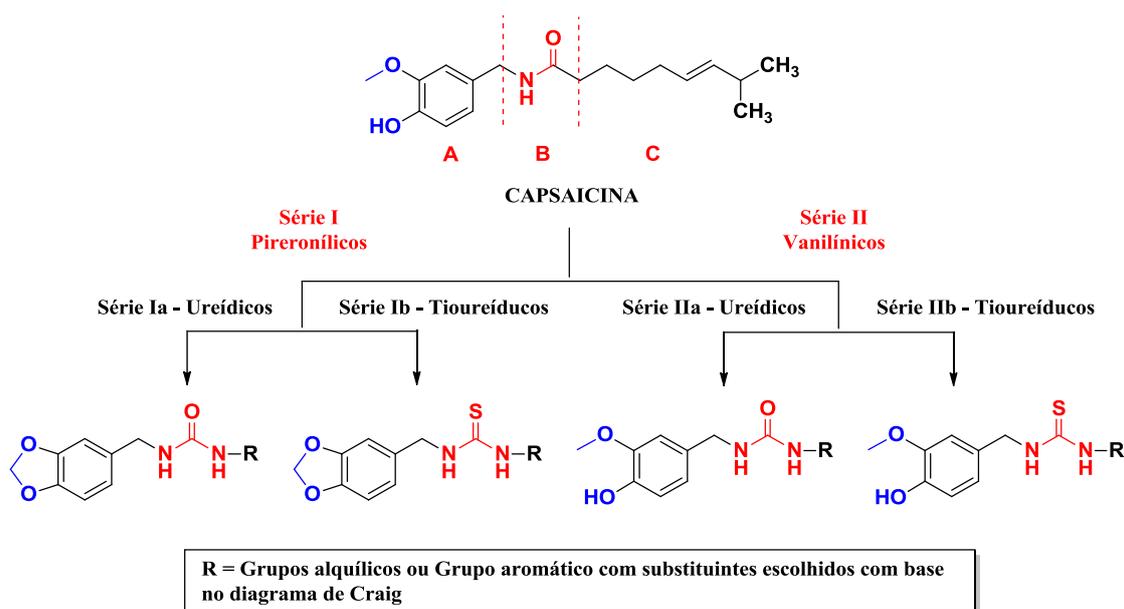


Figura 9 - Planejamento dos análogos a partir da capsaicina.

Para o planejamento da série I, foi proposto fechamento do anel metil-catecol presente na região A do protótipo, formando o sistema benzodioxólico e dando origem às séries piperonílicas. A proposta para a série II foi manter o anel metil-catecol obtendo assim as séries vanilínicas. As séries I e II foram subdivididas em ureídicas (a) e tioureídicas (b), de acordo com as modificações bioisostéricas de função amida da região B. Por fim, para as modificações na região C, foram propostas duas alterações, a saber: homologia superior/inferior ou adição de grupos arílicos *p*-substituídos. Em relação ao delineamento da série de compostos aromáticos, os substituintes do grupo arílico foram selecionados de acordo com o diagrama de Craig (1971) (Figura 11). Entre os critérios para seleção de substituintes e também para estabelecer relação entre caráter eletrônico/lipofílico e a atividade biológica do ligante é importante a escolha daqueles

que possam propriedades bem dispersas entre si, ou seja, aqueles grupos substituintes oriundos dos quatro quadrantes do diagrama (CRAIG, 1971; TAVARES, 2004).

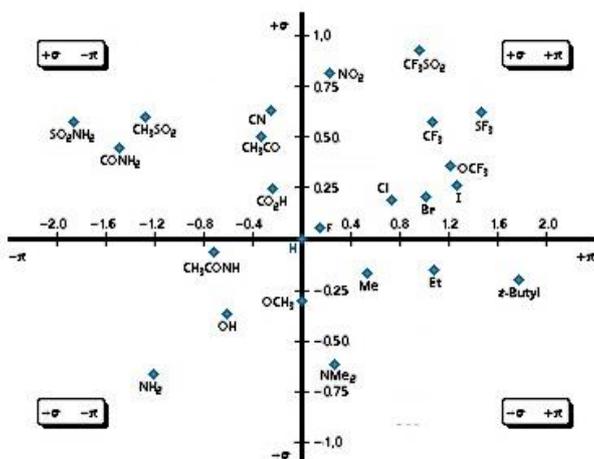


Figura 10 - Diagrama de Craig.

A figura 11 abaixo, apresenta todos os análogos planejados a partir da capsaicina. Demonstrando as séries piperonílica, vanilínica e suas subdivisões ureídicas e tioureídicas com os respectivos códigos atribuídos.

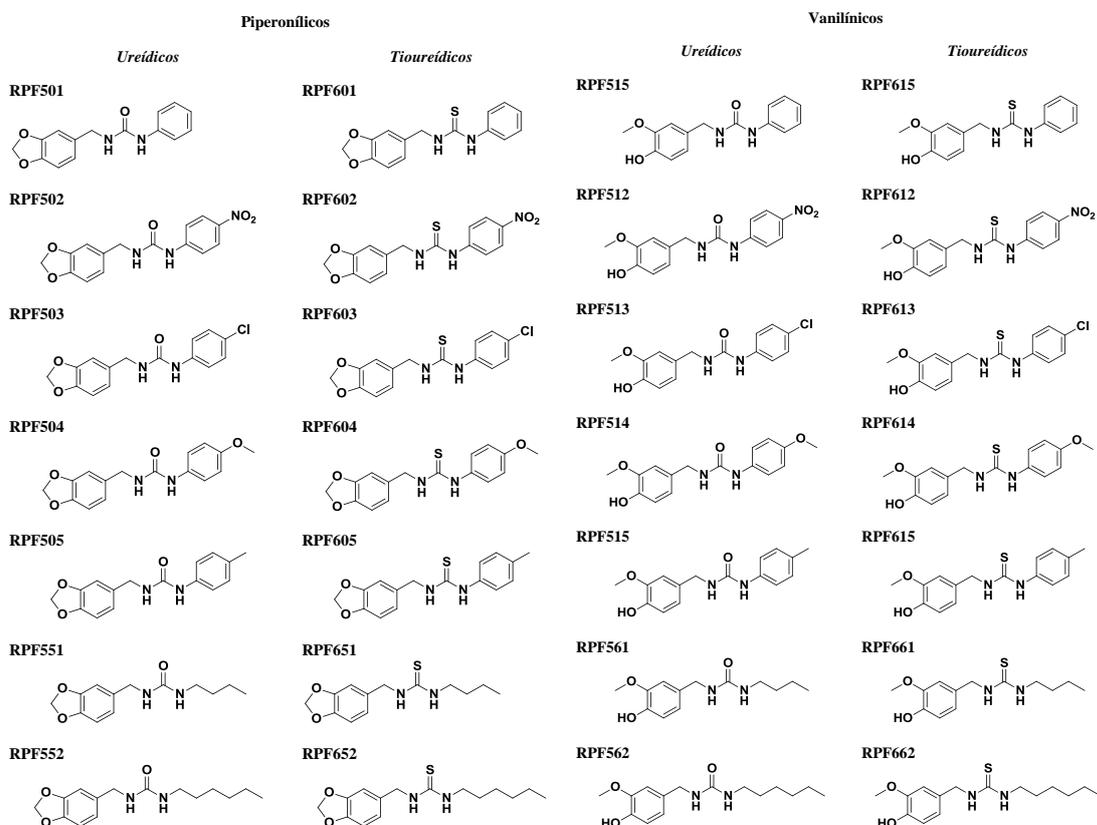


Figura 11 . Análogos piperonílicos e vanilínicos e suas subséries ureídicas e tioureídicas planejadas.

Material e Métodos

4 Material e Métodos

4.1 – Material, reagentes e solventes

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados os materiais listados a seguir:

REAGENTES

- Piperonilamina (Sigma-Aldrich);
- Cloridrato de vanililamina (Oakwood)
- Trietilamina (Vetec)
- Fenil isocianato (Sigma-Aldrich);
- Fenil isotiocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Nitrofenil isocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Nitrofenil isotiocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Clorofenil isocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Clorofenil isotiocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Metoxifenil isocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Metoxilfenil isotiocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Tolil isocianato (Sigma-Aldrich);
- *p* – Tolil isotiocianato (Sigma-Aldrich);
- Butil isocianato (Sigma-Aldrich);
- Butil isotiocianato (Sigma-Aldrich);
- Hexil – isocianato (Sigma-Aldrich);
- Hexil – isotiocianato (Sigma-Aldrich);

SOLVENTES

- Diclorometano (Synth);
- Acetona (Synth);
- Acetato de etila (Synth);
- Clorofórmio (Synth);
- Hexano (Synth);
- Etanol (Synth);

- Metanol (Synth);
- Água deionizada;
- Clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.);
- Dimetilsulfóxido deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Inc);
- Acetona deuterada (Cambridge Isotope Laboratories, Inc);

VIDRARIAS E UTENSÍLIOS

- Balão de fundo redondo 25 mL;
- Balão de fundo redondo 50 mL;
- Balão de 2 bocas 50 mL;
- Funil de adição;
- Kitassato 125 mL;
- Funil analítico;
- Funil sinterizado;
- Becker 25 mL;
- Proveta 10 mL;
- Proveta 50 mL;
- Funil de separação 60 mL;
- Barra magnética;
- Espátula;
- Septo de borracha;
- Tubo secante;
- Dessecador;
- Garra;
- Argola;

EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (Hanna HI 190M);
- Balança Analítica (Shimadzu AY220);

- Evaporador rotativo (Büchi®), acoplado à bomba de vácuo Büchi® (V-700) e banho-maria Büchi® (B-480);
- Câmara ultravioleta 254 nm;
- Termômetro;
- Linha de vácuo;
- Ponto de fusão M565 (Büchi);
- Bomba de vácuo Vacuubrand, modelo ME-IC;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker®, modelo Advanced DPX-300. Frequências: 300 MHz e 75 MHz;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu® - PROMINENCE) acoplado a uma coluna de fase reversa (Shimadzu® - Shim-pack CLC-ODS 150x4,6 mm).

DIVERSOS

- Banho de silicone;
- Sulfato de sódio anidro (Grupo Química);
- Filtro de papel;
- Sílica gel 70-230 Mesh (Sigma-Aldrich);
- Cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica GF 254 (Merck);
- Gelo seco.

HARDWARES E SOFTWARES PARA MODELAGEM MOLECULAR

- ChemBioDraw Ultra™ 12.0 (CambridgeSoft®. 2012);
- Sistema operacional *Windows 7 Home Premium* de configuração Intel(R) Core(TM) i5 – 2400, 3,10 GHz, RAM 6,0 GB, sistema operacional de 64 bits.

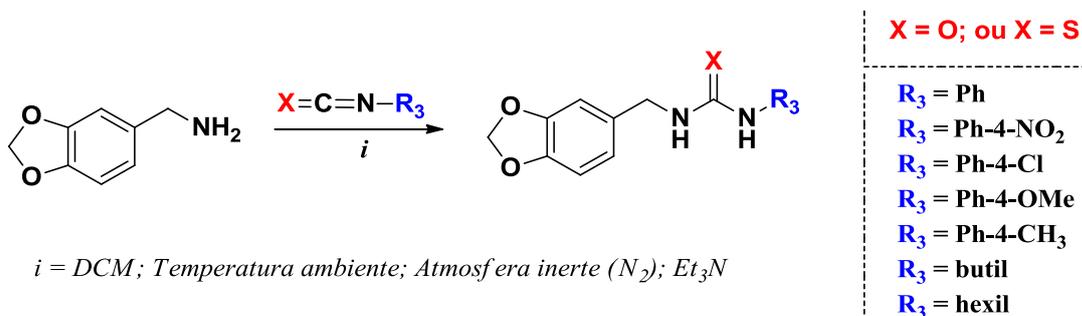
4.2 Métodos Sintéticos

As sínteses realizadas neste projeto tiveram como principal objetivo a formação de análogos piperonílicos (Série I) e vanilínicos (Série II) com as subséries ureídicas (a) e tioureídicas (b) da capsaicina. As reações foram de adição nucleofílica entre amina primária e isocianatos ou isotiocianatos, visando à formação de funções orgânicas ureia ou tioureia.

4.2.1 – Síntese das séries piperonílicas ureídicas e tioureídicas – Séries Ia e Ib

As primeiras sínteses tinham como objetivo a obtenção da série piperonílica (esquema 1). Portanto, o reagente precursor desta primeira etapa foi a piperonilamina. Esta utilizada como amina primária reagindo com isocianato ou isotiocianatos, obtendo as subséries Ia e Ib. A metodologia foi adaptada do trabalho de Delebecq (2013) de acordo com o procedimento geral I (DELEBECQ et al., 2013).

Série piperonílica



Esquema 1. Representação esquemática das sínteses dos análogos da série piperonílica e suas subséries ureídicas e tioureídicas, com os reagentes e condições reacionais.

Procedimento geral I: Como fonte de amina primária foi utilizado a piperonilamina submetida a reação com isocianatos ou isotiocianatos. Em um balão de duas bocas provido de agitação magnética e um funil de adição acoplado, foram adicionados 20 mL de diclorometano (DCM), junto com 136 μL de piperonilamina (1,1 mmol; 1,1 eq.). Em seguida 1 mmol (1 eq.) do isocianato/isotiocianatos dissolvido em 5 mL de DCM foi gotejado pelo funil de adição. A reação foi mantida sob temperatura ambiente e com

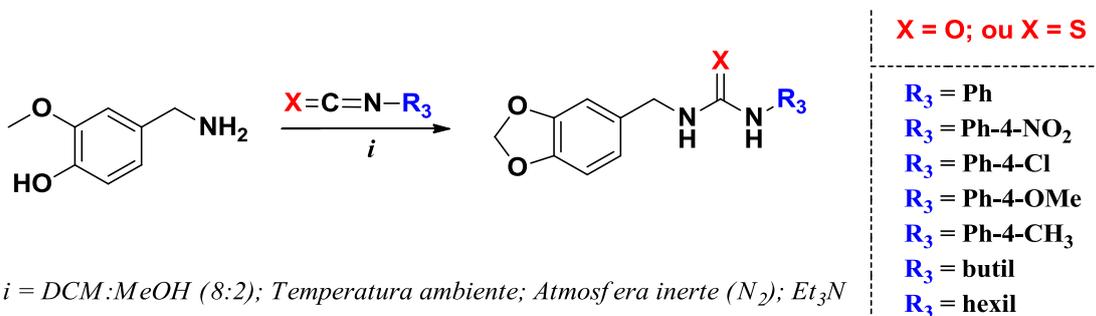
atmosfera inerte (N₂). O sistema foi mantido sob as mesmas condições até o consumo total do reagente limitante sendo acompanhado por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).

Para purificação, foram realizadas extrações ácidas com solução de HCl 5% (3 vezes) e a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi removido por rotaevaporação e os produtos sólidos foram purificados por recristalização ou separação por coluna cromatográfica. Os produtos finais foram armazenados em ambientes de baixa temperatura.

4.2.2 – Síntese das séries vanilínicas ureídicas e tioureídicas – *Ila e Iib*.

As etapas subsequentes deste trabalho foi a obtenção da série vanilínica (Esquema 2) Portanto, o reagente precursor desta segunda etapa foi o cloridrato de vanililamina. Foi utilizada como amina primária reagindo também com isocianatos ou isotiocianatos, obtendo as subséries *Ila* e *Iib*. A metodologia foi adaptada do trabalho de Delebeq (2013), assim como a série anterior e desenvolveu-se conforme *procedimento geral II*.

Série vanilínica



Esquema 2. Representação esquemática das sínteses dos análogos da série vanilínica e suas subséries ureídicas e tioureídicas, com os reagentes e condições reacionais.

Procedimento geral II: Em um balão de duas bocas provido de agitação magnética e um funil de adição acoplado, foram adicionados 32 mL de DCM e 8 mL de metanol (MeOH) (DCM:MeOH – 8:2) no balão, junto com 208 mg de cloridrato de vanililamina (1,1 mmol; 1,1 eq.) e 153 µL de trietilamina (Et₃N) (1,1 mmol; 1,1 eq.). No funil de adição foi adicionado 10 mL de DCM e 1 mmol de isocianato (1 eq.) ou 1 mmol de isotiocianato (1 eq.), a solução presente no funil de adição foi adicionada em 5 frações de 2 mL a cada 30

minutos. O sistema foi mantido sob as mesmas condições até o consumo total do reagente limitante sendo acompanhado por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).

Para purificação, foram realizadas extrações ácidas com solução de HCl 5% (3 vezes) e a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e posteriormente filtrada. Logo após foi gotejado hexano e mantido sobre repouso por 24 horas. O produto precipitado foi submetido à filtração simples e lavado com hexano a frio. Os produtos finais foram armazenados em ambientes de baixa temperatura.

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 – Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

A cromatografia em camada delgada (CCDC), é um método para verificação e acompanhamento da reação. Foram utilizadas cromatofolhas com sílica e as mesmas foram reveladas por lâmpada ultravioleta (UV), vanilina, ninidrina e/ou molibdato.

4.3.2 –Cromatografia em coluna

As purificações de alguns compostos foram realizadas por cromatografia em coluna (CC), valendo-se de sílica gel 60 (Merck) como fase estacionária.

4.3.3 – Ponto de fusão

O ponto de fusão de compostos sólidos será obtido pelo uso de aparelho de ponto de fusão capilar (Büchi – M565), disponível no laboratório de planejamento e síntese de quimioterápicos potencialmente ativos para doenças negligenciadas (LAPEN)

4.3.4 – Ressonância magnética nuclear

As análises de RMN ¹H e ¹³C foram realizadas em espectrômetro de frequência 300 MHz (Bruker Advanced DPX-300) do laboratório de RMN da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

4.3.5 – Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatography -HPLC)

A pureza cromatográfica dos compostos foi determinada utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu® - PROMINENCE) acoplado a uma coluna de fase reversa C-18 (Shimadzu® - Shim-pack CLC-ODS 150x4,6 mm).

4.4 – Ensaios biológicos

4.4.1 – Preparação da solução de MTT

A solução de Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi obtida pela diluição de 50 mg do pó em 10 mL de PBS (5 mg/mL). A solução foi armazenada ao abrigo da luz e em geladeira.

4.4.2 – Ensaio de viabilidade celular por MTT

Todos os compostos foram submetidos a ensaios de atividade citotóxica em culturas celulares tumorigênicas e não-tumorigênicas. O teste foi realizado via avaliação de viabilidade celular por biorredução do sal brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As linhagens de células neoplásicas utilizadas neste teste foram de melanoma murinho (B16F10), melanoma humano (SK-MEL 25 e A2058), glioblastoma (U-87), adenocarcinoma mamário (MCF-7), adenocarcinoma cervical (HeLa), e linhagem não-tumorigênica foi utilizada de fibroblasto humano (T75). As diversas linhagens tumorais e normais foram plaqueadas em triplicata na concentração de 10^4 /poço em placas de 96 poços e cultivadas por 24 horas em estufa contendo 5 % de CO₂ a 37 °C. Após o período de incubação as células foram tratadas com concentrações de 3 a 100 µM de todas as séries e foram incubadas por 24 horas. Após incubação foram adicionados 5 µL de MTT (5 mg/mL) às células e incubadas por 3 horas. Após este período foram adicionados 100 µL de SDS 30% e as placas foram armazenadas por mais 24 horas. A quantificação foi mensurada em comprimento de onda de 570 nm por espectrofotometria (Spectramax-M2, Software Molecular Pro 5.4, Sunnyvale, CA, EUA) (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi expressa com valores de percentagem em comparação com as células não tratadas, conforme equação a seguir:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{(Aa - Ab) \times 100}{Ac - Ab}$$

Onde: Aa – absorvância das amostras; Ab = absorvância do branco; Ac = absorvância do controle positivo.

Os dados foram plotados no software Prism 5 versão 5.03 (GraphPad Software, Inc, 2009), onde foi calculado a IC₅₀ segundo tutorial fornecido pelo Prism.

4.4.3 – Análise do ciclo celular

Para o estudo das fases do ciclo celular, as células de melanoma murinho B16F10 e melanoma humano A2058 foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 10⁵ células/poço. Para sincronização, as células foram plaqueadas com meio RPMI sem adição de soro fetal bovino. Após 12 h de incubação, o meio sem SFB foi removido e as células foram tratadas com o análogo de maior atividade nas concentrações relativas ao valor de IC₅₀, diluídos em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24 h de incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas por 10 min a 1200 RPM. O *pellet* foi ressuspenso em 300 uL de HSF (0,1% DE Triton X-100, 0,1 % de citrato de sódio de 50 µg/mL de Iodeto de propídeo), 10 µg /mL de RNase (Sigma) e incubado a 37 °C por 1 h na ausência de luz. Os dados foram adquiridos por citometria de fluxo (FACSCalibur). Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o algoritmo Dean Jett-Fox, do software FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR, EUA)

4.4.4 - Análise da sinalização celular induzida pelo análogo RPF652

Para análise dos mediadores do ciclo e migração celular, foi padronizado o ensaio de Western blotting a partir dos lisados celulares obtidos da cultura das células de melanoma A2058 tratadas com o derivado RPF652. As proteínas de cada amostra foram separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% e em tampão contendo 2,5 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 19 mM de glicina e 0,3 mM de SDS. A seguir as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher e Schuell, EUA) em tampão contendo 1,2 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 9,6 mM de glicina e 20% de metanol. A eficácia das transferências foi verificada através da coloração das membranas com o corante Ponceau S (Sigma), seguida por bloqueio em solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) diluído em PBS. Após o bloqueio foram realizadas 03 (três) lavagens de 10 minutos com TTBS (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM de NaCl e 0,1%

de Tween 20 (pH 7,6) por 2 horas. Após as lavagens as membranas foram incubadas por 24 horas, a 4°C sob agitação constante e com os seguintes anticorpos primários: anti-ciclina D1 mouse, anti-ciclina D3 mouse, anti-ciclina A mouse, anti-NFκ-B rabbit, anti-fosfo Akt (Thr308) rabbit, anti-β-Caderina rabbit, anti-c-Raf, anti-fosfo c-Ras, anti-fosfo p38 (Thr 180/Tyr182) rabbit, anti-fosfo MAPK rabbit, anti-fosfo GSK3β (Ser 9) rabbit; anti-N-Caderina rabbit, anti-Src rabbit, anti-fosfo Src (Tyr 416) rabbit, anti-FAK rabbit, anti-fosfo FAK (Tyr 925) rabbit e anti-fosfo FAK (Tyr 397) rabbit. Todos os anticorpos primários foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TTBS por 30 minutos e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação com o anticorpo secundário conjugado com IgG horseradish peroxidase, adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas com TTBS e adicionado o substrato quimioluminescente Luminata™ e as membranas foram reveladas e analisadas em sistema Fotodocumentador ImageQuant LAS4000 (GE). Todas as bandas foram normalizadas pela da banda da beta-actina.

4.5 – Métodos computacionais

Os estudos de modelagem molecular foram realizados no Departamento de Farmácia da FCF-USP. Foram utilizados os programas Spartan'14 versão 1.1.4 (Wavefunction Inc, 2014) e ChemBio Draw® Ultra 12.0, em computador PC *Windows 7 Home Premium* de configuração Intel(R) Core(TM) i5 – 2400, 3,10 GHz, RAM 6,0 GB, sistema operacional de 64 bits.

As propriedades eletrônicas, estéricas, topológicas e de lipofilicidade das séries planejadas e da capsaicina foram construídas considerando sua forma neutra. A minimização de energia foi realizada pelo método semi-empírico PM6 e na sequência pelo método Hartree-Fock-3-G21G-água, obtendo assim os descritores: mapa de potencial eletrostático (MPE), energia dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, coeficiente de partição (ClopP), sítio acceptor de ligação de hidrogênio (*hydrogen bond acceptor – HBA*), sítio doador de ligação de hidrogênio (*hydrogen bond donor - HBD*), área de superfície polar (*polar surface area - PSA*), momento dipolo (MD). As massas exatas dos compostos foram calculadas pelo programa ChemBio Draw® Ultra 12.0.

4.6 – Avaliação da capacidade de hiperalgesia do composto RPF652

O teste foi realizado com a colaboração da Profa. Dra. Yara Cury e da pesquisadora Dra. Vanessa Zambelli no laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan. O animal foi posicionado em uma caixa totalmente transparente com uma abertura superior para a entrada de ar. O camundongo permaneceu por 20 minutos para sua adaptação previamente ao experimento. A capsaicina, o análogo (5,2 nmol/pata; 20 µl) e o veículo correspondente (etanol + salina), nas mesmas condições experimentais, foram administrados por via intraplantar. Imediatamente após a injeção, o animal retornou à caixa transparente posicionada a frente de um espelho, de maneira a facilitar a visualização e mensurar o tempo (em segundos) de “flinches” ou lambidas da pata tratada, durante 5 minutos (FREITAS et al., 2015).

Os ensaios em animais contaram com aprovação do Comitê de Ética para o uso de animais do Instituto Butantan – CEUA, sobre registro protocolar número 1904030518.

Resultados e Discussão

5 Resultados e discussão

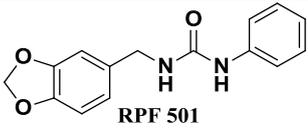
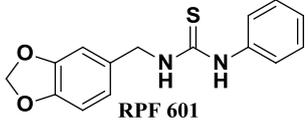
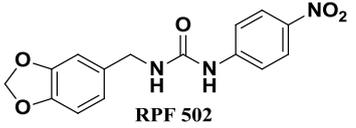
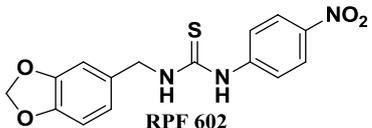
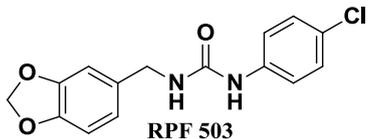
5.1 Parte sintética

Vinte e sete análogos foram sintetizados e caracterizados das séries propostas. Dentre eles 14 piperonílicos e 13 vanilínicos. Entretanto, para melhor entendimento, serão apresentados e discutidos primeiramente os resultados da série piperonílica e posteriormente da série vanilínica.

5.1.1 – Série piperonílica *Ia e Ib*

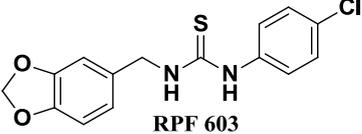
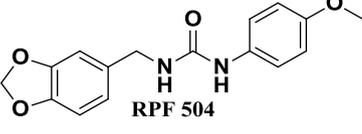
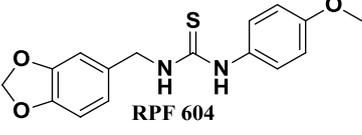
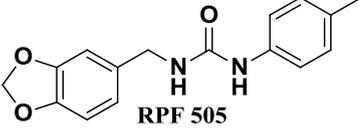
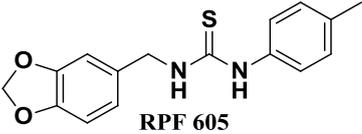
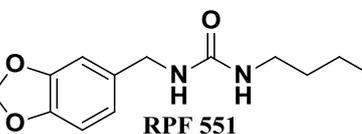
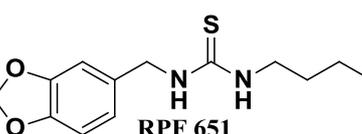
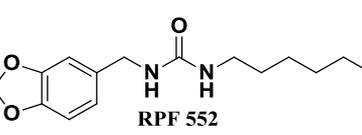
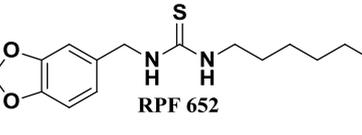
Os valores de rendimento, faixa de fusão, aspecto físico e pureza cromatográfica da série piperonílica podem ser verificados na tabela 3. Os respectivos espectros de RMN ^1H e ^{13}C constam no item “ANEXOS I” e os cromatogramas no item “ANEXOS II”.

Tabela 3 – Resultados obtidos na síntese da série piperonílica (séries *Ia e Ib*).

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)	Pureza ^a (%)
 RPF 501	50	162,0 – 163,5	97,0
 RPF 601	40	160,3 – 162,1	99,5
 RPF 502	80	224,5 – 226,0	95,4
 RPF 602	50	142,1 – 147,9	99,5
 RPF 503	63	187,3 – 189,0	98,8

^aDeterminada por HPLC: Utilização de coluna de fase reversa (Shimadzu® - Shim-pack CLC-ODS 150x4,6 mm), preparo de solução de 0,2mg/mL, volume de injeção de 20 μL , leitura em detector UV 254 nm. Eluente: gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$. Tempo total de corrida: 20 minutos.

Tabela 3 (continuação) - Resultados obtidos na síntese da série piperonílica (séries Ia e Ib).

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)	Pureza ^a (%)
 <p>RPF 603</p>	65	151,0 – 152,5	99,8
 <p>RPF 504</p>	90	197,4 – 199,5	97,8
 <p>RPF 604</p>	75	161,1 – 162,5	99,0
 <p>RPF 505</p>	90	195,0 – 195,5	99,4
 <p>RPF 605</p>	48	135,0 – 137,0	96,4
 <p>RPF 551</p>	85	197,0 – 198,5	97,6
 <p>RPF 651</p>	75	71,2 – 73,0	99,1
 <p>RPF 552</p>	42	130,0 – 131,0	96,7
 <p>RPF 652</p>	52	116,0 – 117,0	99,8

^aDeterminada por HPLC: Utilização de coluna de fase reversa (Shimadzu® - Shim-pack CLC-ODS 150x4,6 mm), preparo de solução de 0,2mg/mL, volume de injeção de 20 µL, leitura em detector UV 254 nm. Eluente: gradiente H₂O:MeOH. Tempo total de corrida: 20 minutos.

De acordo com o planejamento, a série piperonílica foi subdividida em série ureídica e tioureídica, portanto o método para a formação dessas subséries, foi baseado de acordo com DELEBECQ *et al.*, 2013. A síntese ocorre por adição nucleofílica à carbonila de isocianatos e tiocarbonila de isotiocianatos, a partir da piperonilamina como amina primária.

O mecanismo de reação a seguir (Figura 12) demonstra a formação de ureia a partir dos precursores isocianato e amina primária. Entretanto, o mesmo mecanismo pode ser adaptado para a formação de tioureias a partir do isotiocianato e de aminas primárias (TENÓRIO *et al.*, 2005).

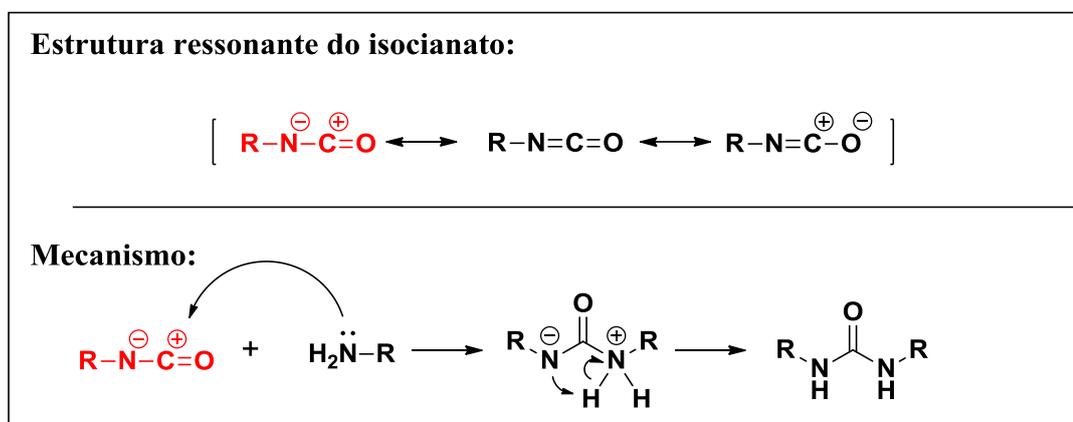


Figura 12 – Mecanismo simplificado de reação para formação de ureia a partir de isocianatos.

A reatividade do grupo isocianato é baseada na polarização induzida pela alta eletronegatividade dos átomos de nitrogênio e oxigênio, que deslocalizam a densidade eletrônica do carbono em direção a estes átomos adjacentes, tornando assim o ataque nucleofílico mais favorável (DELEBECQ *et al.*, 2013; SHARMIN; ZAFAR, 2012) possibilitando assim a formação das funções ureias ou tioureia.

As sínteses com isocianatos formam o produto de interesse no tempo médio de 2 horas e com isotiocianato em média 4 horas. Segundo DELEBECQ (2013), a deslocalização eletrônica do carbono causada no pelo oxigênio do isocianato permite maior velocidade reacional quando comparado aos isotiocianatos. Isso ocorre devido maior eletronegatividade do oxigênio quando comparado ao enxofre (TENÓRIO, *et al.*, 2005).

Como pode ser observado na tabela 3, os compostos foram purificados de forma satisfatória, entretanto, além das extrações ácido-base realizadas como protocolo padrão

para esta série, alguns compostos foram submetidos à recristalização ou cromatografia em coluna para remoção de traços de produtos indesejados.

Os compostos apresentaram rendimentos de moderados a ótimo, variando o percentual entre 40 e 90 %. Os derivados **RPF502** e **RPF504** apresentaram os maiores rendimentos pois precipitaram instantaneamente no meio reacional, este fato dá-se provavelmente pela alta reatividade do isocianato em formar uma função hidrofílica culminando para precipitação do composto (AVALOS et al., 2000). Ademais, os ureídicos de um modo geral apresentaram os maiores rendimentos, certamente por serem submetidos a protocolos de purificação por recristalização, tendo em vista que a maioria dos compostos tioureídicos foram purificados mediante coluna cromatográfica.

A verificação de pureza dos derivados foi avaliada pela faixa de fusão e todos os compostos apresentaram variação em até 2 °C. A estreita faixa de fusão pode indicar elevado grau de pureza dos análogos, entretanto esses dados foram corroborados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) onde os derivados apresentaram pureza superior a 95 %, como pode ser observado na tabela 3.

Finalmente, após a obtenção dos análogos de interesse, os compostos foram caracterizados mediante análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C , como exemplificados a seguir.

5.1.2 – Análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C da série piperonílica

A caracterização dos derivados foi realizada mediante análise de RMN ^1H (figura 13) e RMN ^{13}C . O produto **RPF505** foi utilizado como padrão ilustrativo e representa os compostos da série piperonílica.

RPF505

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ = ppm) δ : 8,25 (1H, s, NH-13), 7,82 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-16, H-18), 7,49 (2H, d, J = 8,3 Hz, H-15, H-19), 7,35 (1H, s, H-6), 7,28 (1H, d, J = 7,9 Hz, H-4), 7,23 (1H, d, J = 7,3 Hz, H-3), 6,51 (1H, t, J = 5,8 Hz NH-11) 6,41 (2H, s, H-8), 4,77 (2H, d, J = 5,8 Hz, H-10), 2,70 (3H, s, H-21).

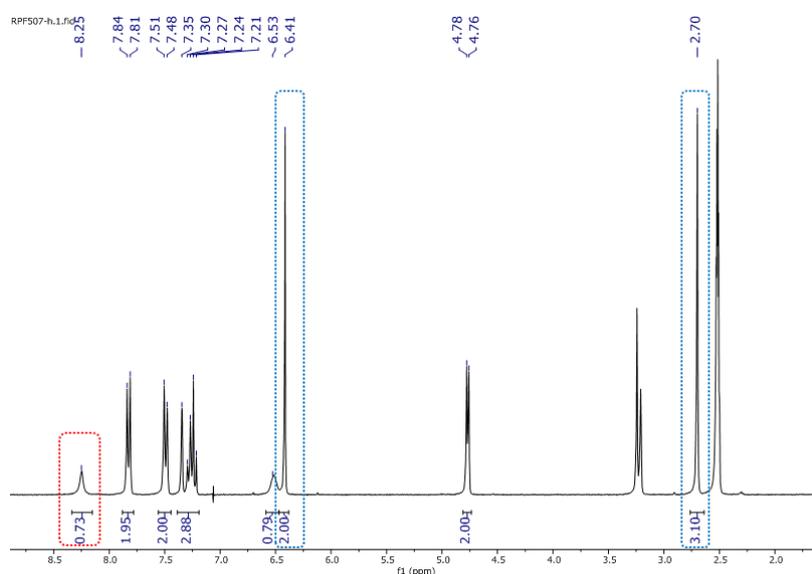
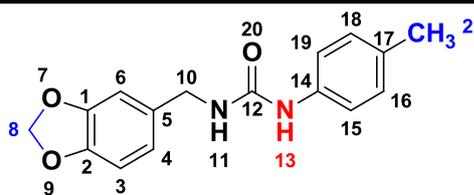


Figura 13 – Espectro de RMN ^1H do composto **RPF505**.

O análogo RPF505 pode ser caracterizado pela presença de sinais como o singlete em 8,25 ppm (destacado em vermelho – figura 13) identificando o nitrogênio mais ácido da função ureia (NH-13). A região aromática apresenta dupletos em 7,82 e 7,49 ppm característicos de H-15, H-16, H-18 e H-19. Ainda na região aromática, o singlete em 7,35 ppm, junto aos dupletos consecutivos (7,28 e 7,23 ppm) representam os hidrogênios do sistema benzodioxólico H-6, H-4 e H-3 correspondentemente. Em 6,41 ppm apresenta-se um singlete (destacado em azul – figura 13) característico dos hidrogênios metilênicos do anel dioxólico (H-8). O duplete em 4,77 ppm representa dois hidrogênios que acoplam com o nitrogênio (NH-11). O deslocamento em 2,70 ppm apresenta um singlete

(destacado em azul – figura 13) representativo dos três hidrogênios da metila pertencente à metila (H-21).

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 14) é possível observar um sinal característico da formação do produto ureídico em 155,3 ppm correspondente ao carbono C12. A menor blindagem eletrônica de C12, em relação ao carbono correspondente do isocianato de partida (125 ppm), ocorre devido ligação adicional com um novo átomo de nitrogênio, levando a campo mais baixo (SHARMIN; ZAFAR, 2012; SPECTRABASE, 2018).

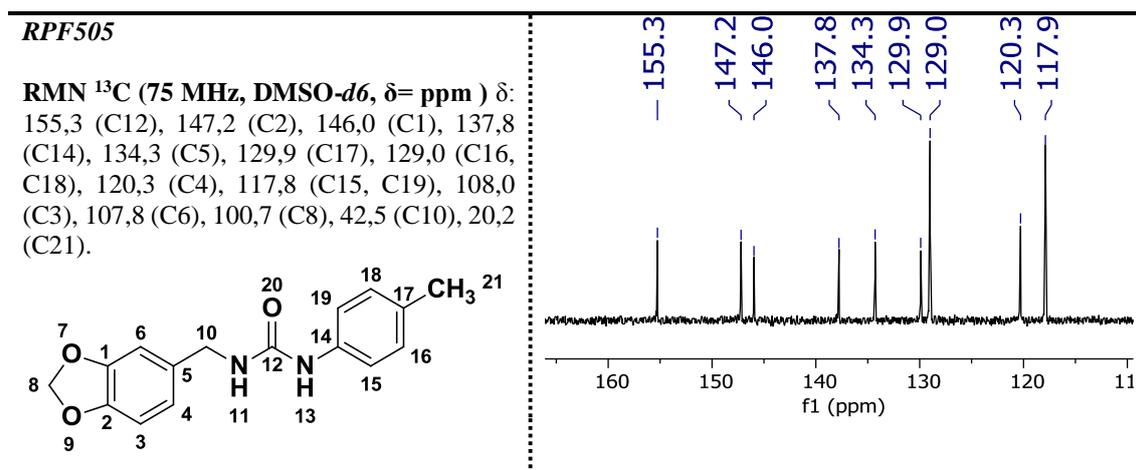
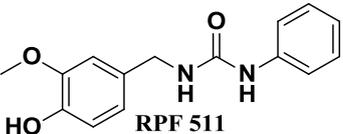
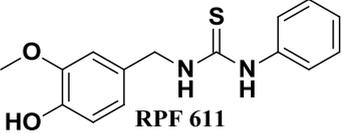
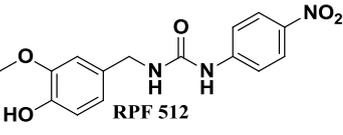
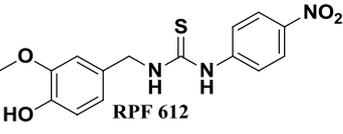
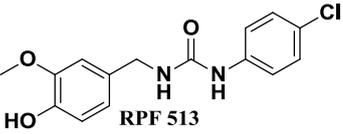
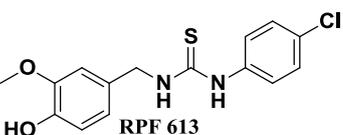
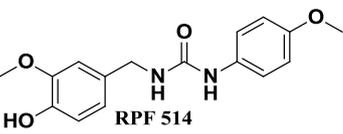


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C do composto RPF 505.

5.1.3 - – Série vanílica IIa e IIb

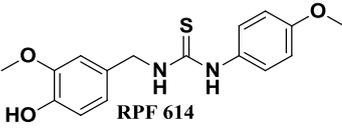
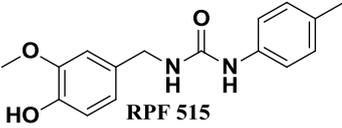
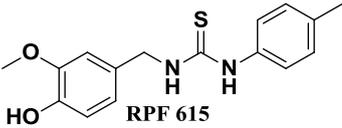
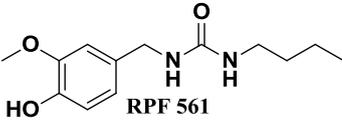
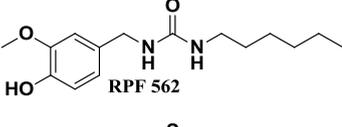
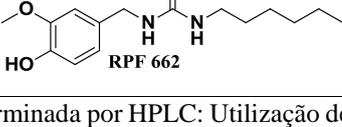
A etapa subsequente deste projeto foi a síntese da série vanílica. Os valores de rendimento, faixa de fusão, aspecto físico e pureza cromatográfica podem ser verificados na tabela 4. Os respectivos espectros de RMN ^1H e ^{13}C constam, assim como da série piperonílica, no item “ANEXOS I” e os cromatogramas no item “ANEXOS II”.

Tabela 4 – Resultados dos compostos vanílicos sintetizados (série Ia e IIa).

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)	Pureza ^a (%)
 RPF 511	42	181,7 – 183,6	99,6
 RPF 611	37	131,4 – 133,3	99,6
 RPF 512	68	186,0 – 187,1	95,0
 RPF 612	39	163,7 – 164,9	99,1
 RPF 513	59	198,4 – 199,9	99,8
 RPF 613	51	154,0 – 154,7	98,5
 RPF 514	72	154,9 – 156,8	99,4

^aDeterminada por HPLC: Utilização de coluna de fase reversa (Shimadzu® - Shim-pack CLC-ODS 150x4,6 mm), preparo de solução de 0,2mg/mL, volume de injeção de 20 μL , leitura em detector DAD 254 nm. Eluente: gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$. Tempo total de corrida: 20 minutos.

Tabela 4 (continuação) - Resultados dos compostos vanilínicos sintetizados (série Ia e IIa).

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)	Pureza ^a (%)
 RPF 614	56	140,0 – 141,3	98,8
 RPF 515	63	198,4 – 199,5	98,6
 RPF 615	48	131,4 – 133,3	99,3
 RPF 561	20	96,7 – 98,6	98,6
 RPF 562	42	83,4 – 84,6	99,6
 RPF 662	22	81,1 – 82,0	95,1

^aDeterminada por HPLC: Utilização de coluna de fase reversa (Shimadzu® - Shim-pack CLC-ODS 150x4,6 mm), preparo de solução de 0,2mg/mL, volume de injeção de 20 µL, leitura em detector DAD 254 nm. Eluente: gradiente H₂O:MeOH. Tempo total de corrida: 20 minutos.

Nesta série, as reações apresentam o mesmo mecanismo reacional de adição nucleofílica à carbonila ou tiocarbonila a partir de amina primária. Logo, o método para esta etapa também foi adaptado do trabalho de DELEBECQ (2013). Para esta série, os compostos apresentaram rendimentos de 22 a 72 % e como pode ser observado na Tabela 4, os compostos ureídicos também apresentam maior rendimento em relação aos tioureídicos. Como esperado, compostos ureídicos apresentam seu caráter mais hidrofílico, e por consequência, maior rendimento devido melhor precipitação em solvente de caráter apolar.

As sínteses desta série sofreram modificações no meio reacional devido à baixa solubilidade do reagente precursor cloridrato de vanililamina. Em relação às reações da série anteriormente descrita, o meio reacional foi alterado afim de obter polaridade superior para melhor solubilização do reagente. Logo, foi adicionado metanol (MeOH)

no sistema reacional, obtendo assim uma proporção 8:2 de diclorometano:metanol (DCM:MeOH).

Ademais, a alta reatividade dos isocianatos e isotiocianatos provocam ataque na hidroxila aromática pertencente ao metilcatecol da vanililamina, formando subprodutos indesejados. Para contornar o problema, o volume de solvente foi dobrado para priorizar o ataque da amina e obtenção majoritária de compostos ureídicos ou tioureídicos. Corroborando com o aumento de volume do solvente, a adição dos reagentes isocianatos e isotiocianatos foram fracionados. Nesse caso, a maior diluição e menor concentração dos reagentes eletrofílicos, tendem a favorecer o ataque do par eletrônico mais disponível, que por ventura, pertence ao nitrogênio da vanililamina em relação ao par eletrônico do oxigênio pertencente a hidroxila fenólica (BAYER; FARBENINDUSTRIE, 1988).

Inicialmente, as sínteses dos derivados desta série seguiriam o protocolo padrão de purificação assim como descrito para série piperonílica. Entretanto, durante a evaporação do solvente, os produtos de interesse concomitante sofriam evaporação e eram coletados no balão de condensação do rotaevaporador.

Como solução para esta problemática, foi adicionado hexano na fase orgânica após extração ácida para forçar a precipitação do produto de interesse, ao invés de adquirir o mesmo mediante evaporação do solvente. Após 24 horas o precipitado foi submetido a filtração simples e lavagem com hexano a frio. Foi realizado então cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) para verificação de traços de impureza, e as análises indicavam a presença somente do produto de interesse. Em seguida os derivados foram submetidos a confirmação de pureza mediante faixa de fusão e HPLC. Sua caracterização foi confirmada por análise espectroscópica de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Como pode ser explicado a seguir.

5.1.4 Análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C da série vanilínica.

A caracterização dos derivados desta série também foi realizada mediante análise de RMN ^1H e RMN ^{13}C . O produto **RPF515** foi utilizado como padrão ilustrativo e representa os compostos da série piperonílica.

RPF515

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , $\delta = \text{ppm}$) δ :
8,81 (1H, s, OH-9), 8,32 (1H, s, NH-13), 7,27 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, H-15, H-19), 7,02 (2H, d, $J = 8,0$, H-16, H-18), 6,87 (1H, s, H-6), 6,73 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-4), 6,69 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3), 6,38 (1H, t, $J = 5,1$ Hz, NH-11), 4,17 (2H, d, $J = 5,2$ Hz, H-10), 3,17 (3H, s, H-8), 2,21 (3H, s, H-20)

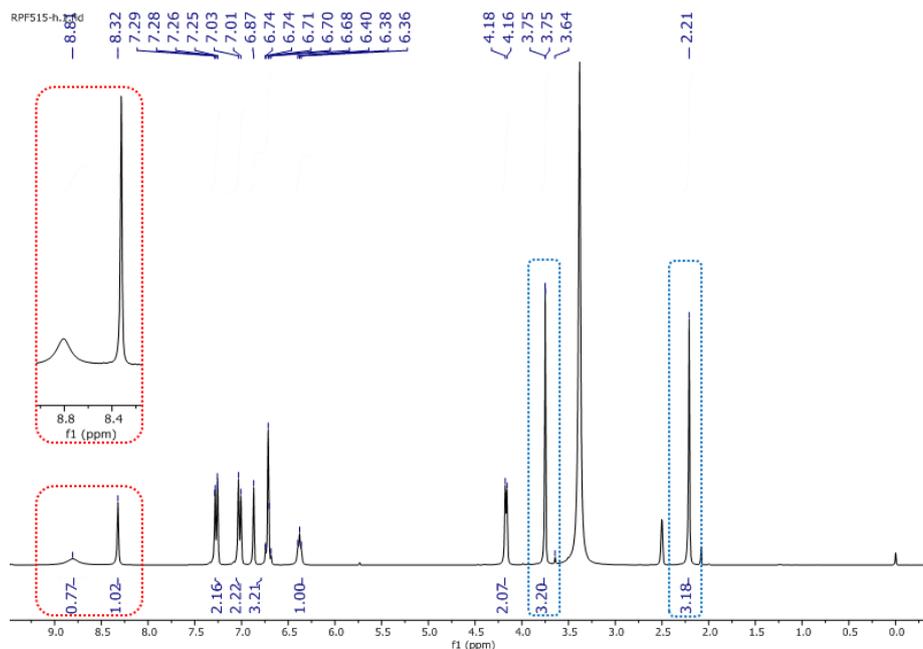
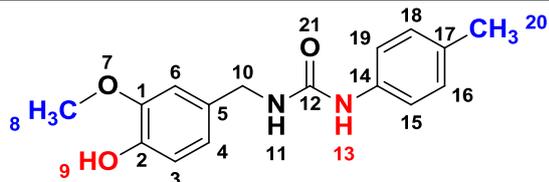


Figura 15 – Espectro de RMN ^1H do composto RPF515.

Os compostos pertencentes à série vanilínica foram identificados através de sinais característicos que se diferenciam estruturalmente dos compostos da séria piperonílica. A verificação da formação dos compostos vanilínicos pode ser representada por um singlete largo característico em 8,81 ppm (destacado em vermelho – figura 15) representado pela hidroxila fenólica (OH-9) presente no sistema metilcatecol do composto. Em 8,32 ppm um singlete representativo do NH-13 presente da tioureia. Na região aromática do espectro, dois dupletos característicos em 7,27 e 7,02 ppm, representam os hidrogênios H-15, H-16, H-18 e H-19. Em 6,89 ppm um singlete representa o hidrogênio H-6 do sistema metilcatecol. Por conseguinte, dois dupletos em 6,73 e 6,69 ppm são característicos dos hidrogênios H-4 e H-3. Um triplete em 6,38 ppm representa o nitrogênio da ureia NH-11, acoplado com 2 hidrogênios H-10 que aparecem em 4,17 ppm no espectro. Em 3,17 ppm (destacado em azul – figura 14), um singlete representa

três hidrogênios da metila H-8 característico do sistema metilcatecol. Ademais, em 3,21 ppm um singlete representa três hidrogênios da metila H-20.

A análise espectroscópica de RMN ^{13}C (Figura 16) permite a conformação do composto ureídico nesta série. O deslocamento do carbono carbonílico (C12) dos compostos ureídicos apresentam-se próximo de 155 ppm. Comparativamente, os espectros de carbono dos derivados tioureídicos, o deslocamento do carbono tiocarbonílico apresenta-se em torno de 180 ppm. É sabido que a verificação dos distintos deslocamentos permite a identificação de compostos ureídicos ou tioureídicos (TENÓRIO, et al., 2012). Ademais, os dados espectroscópicos de todos os análogos sintetizados podem ser verificados no item “ANEXOS I”.

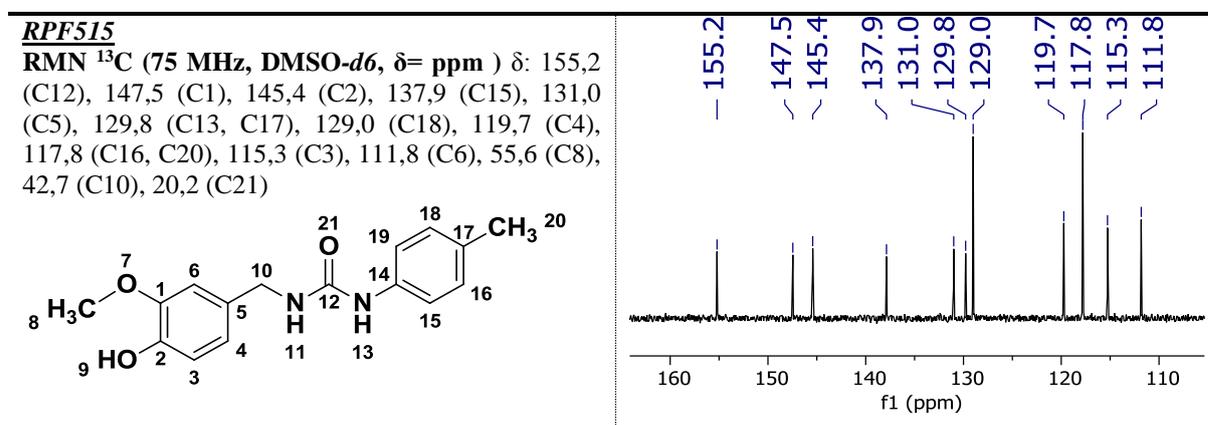


Figura 16 – Espectro de RMN ^{13}C do análogo ureídico RPF515.

5.2 Parte biológica

5.2.1 – Avaliação de viabilidade celular por MTT

Os compostos foram submetidos a ensaios de atividade citotóxica em culturas celulares tumorigênicas e não-tumorigênicas. O teste foi realizado avaliando a viabilidade celular por biorredução do MTT, em parceria com o Dr. Ricardo Alexandre de Azevedo, no Laboratório de Imunologia de Tumores da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

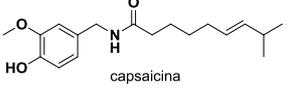
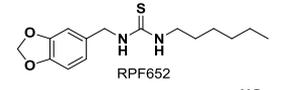
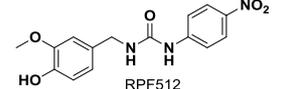
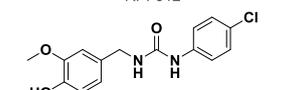
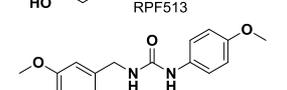
As linhagens de células neoplásicas utilizadas neste teste foram glioblastoma (U-87), adenocarcinoma mamário (MCF-7), adenocarcinoma cervical (HeLa), melanoma murino (B16F10) e melanoma humano (SK-MEL 25 e A2058), além da linhagem não tumorigênica, fibroblasto humano (T75).

Os compostos **RPF502**, **RPF602** e **RPF504**, não foram testados devido a problemas com solubilidade no teste biológico. O composto **RPF661** não foi testado por conta de sua rápida sublimação e difícil isolamento.. Ademais a maioria dos compostos apresentou IC₅₀ superior a 100 µM em todas as linhagens testadas, não conferindo citotoxicidade significativa.

Como demonstrado na tabela 5, quatro compostos (**RPF652**, **RPF512**, **RPF513** e **RPF514**) apresentaram atividade citotóxica comparável ou superior ao protótipo frente a três linhagens tumorais (SK-MEL 25, A2058 e U87) com valores de IC₅₀ na faixa de micromolar. Adicionalmente, os análogos mais ativos mostraram seletividade para as células tumorais em comparação com as células não-tumorigênicas (T75).

Particularmente, o análogo **RPF652** apresentou atividade pronunciada com valores de IC₅₀ de 55, 67, e 87 µM contra as células A2058, SK-MEL25, e U87, respectivamente, o que representou maior potência em relação ao protótipo. Como uma tendência, os compostos apresentaram maior potência contra a linhagem de melanoma humano A2058 em comparação com as demais linhagens sugerindo certo grau de seletividade para células que apresentam a mutação ^{V600E}B-RAF (TATSUNO et al., 2016). Cabe ressaltar que o análogo **RPF652** demonstrou o maior índice de seletividade para A2058, com valor de 1.8 (Tabela 5)

Tabela 5 - Resultados de IC₅₀ dos análogos testados por redução do MTT frente a linhagens tumorigênicas e não-tumorigênicas.

Compostos	Linhagens - IC ₅₀ (μM) ± SD ^ε				IS ^ψ
	SK-MEL 25	A2058	U87	T75	
 capsaicina	> 100	> 100	> 100	> 100	-
 RPF652	67,19 ± 8,7	55,17 ± 9,35	86,95 ± 7,44	>100	1,80
 RPF512	98,7 ± 7,35	98,20 ± 8,34	98,54 ± 8,55	>100	1,01
 RPF513	90,5 ± 6,97	84,45 ± 7,67	92,48 ± 7,98	>100	1,18
 RPF514	91,8 ± 7,45	92,54 ± 7,89	> 100	>100	1,08

^ψIS: índice de seletividade, determinado pela razão entre IC₅₀ A2058 e T74
^εSD: desvio padrão

O composto **RPF652** com grupo benzodioxol e cadeia n-alquílica junto à porção tioureídica obviamente exibiu atividade melhorada contra linhagem A2058 em relação aos compostos ureídicos **RPF512** a **514**, portadores do grupo metilcatecol adicionalmente a grupos aromáticos volumosos junto à função ureia.

Em relação aos análogos ureídicos, aqueles que apresentam grupo elétron-doador, como os compostos **RPF513** e **RPF514**, parecem resultar em compostos mais ativos, o que pode ser devido ao aumento na densidade eletrônica do anel aromático. Corroborando este dado, o análogo **RPF512**, com grupo nitro, retirador de elétrons, provou ser o menos ativo de todos (TAVARES, 2004).

5.2.2 – Avaliação morfológica das linhagens A2058 e B16F10 tratadas com o composto RPF652.

A morfologia das células de melanoma A2058 tratadas com o composto **RPF652**, o mais ativo das séries avaliadas, pode ser visualizada na figura 17. Conforme observado, em comparação com o controle, as alterações induzidas pelo composto são características de morte celular por apoptose, visto que há perda de adesão celular, retraimento significativo do citoplasma, perda da refringência e formação acentuada de corpos apoptóticos (GALLUZZI et al., 2015). Em comparação aos efeitos ocasionados pelo

composto **RPF652** em linhagem de melanoma murino B16F10, é possível verificar que as células não estão mortas, mas há, obviamente menor número de células por poço.

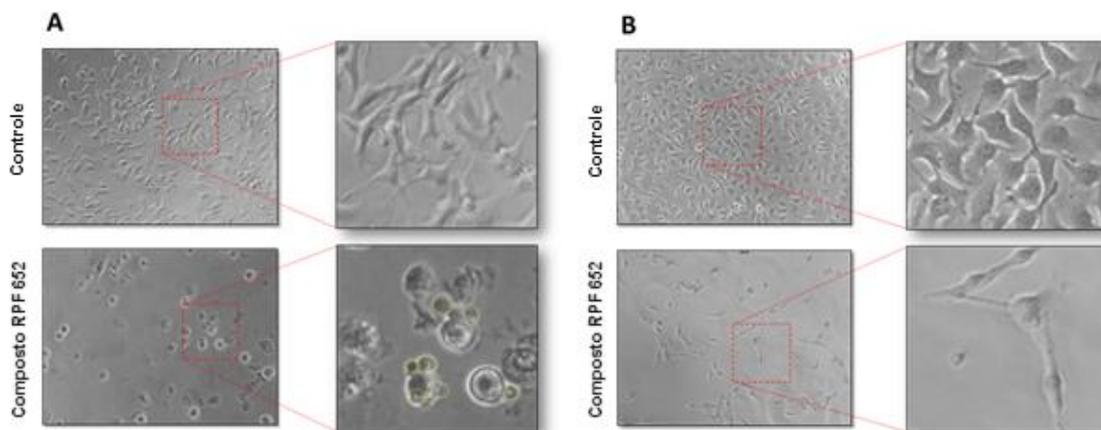


Figura 17. Fotomicrografias das linhagens A2058 e B16F10 tratadas com o RPF652. As fotomicrografias mostram, em destaque, os aspectos morfológicos das culturas controle de melanoma A2058 (A) e B16F10 (B), e tratadas com o composto RPF652, acompanhada por 24 horas e mantidas a 37 °C. Círculos tracejados em amarelo indicam o aparecimento de corpos apoptóticos. Quadriculados em vermelho indicam a ampliação da figura.

5.2.3 - Avaliação do Ciclo celular e Elucidação do tipo de Morte Celular

Após a obtenção dos dados de análise morfológica, os resultados de morte celular indicam que o composto **RPF652** provoca possível parada do ciclo celular (GUICHARD et al., 2015). Assim, com o objetivo de avaliar as fases do ciclo celular afetadas, ensaios subsequentes foram padronizados e realizados com iodeto de propídio, utilizando o composto **RPF652** em concentrações variáveis (12,5, 25 e 50 μ M).

A figura 18A ilustra que, para linhagem de melanoma murino B16F10, a utilização do composto **RPF652** na concentração de 50 μ M promove possível parada do ciclo celular nas fases G_0/G_1 , representada pela maior porcentagem/população de células. Ademais, o aspecto é dose-dependente. Não há variação na população $subG_0/G_1$ em comparação com o controle (veículo), indicando que não há morte celular (NASELLI et al., 2014).

Em contraponto, para a linhagem de melanoma A2058, apresentada na figura 18B, observa-se aumento pronunciado da população de células que param na fase $subG_0/G_1$

corroborando, assim, os dados obtidos pela morfologia. Ademais, testes demonstraram que o composto induziu significativamente, por resposta dose-dependente, parada do ciclo celular na fase G₀/G₁ em linhagem A2058 (FERREIRA et al., 2016).

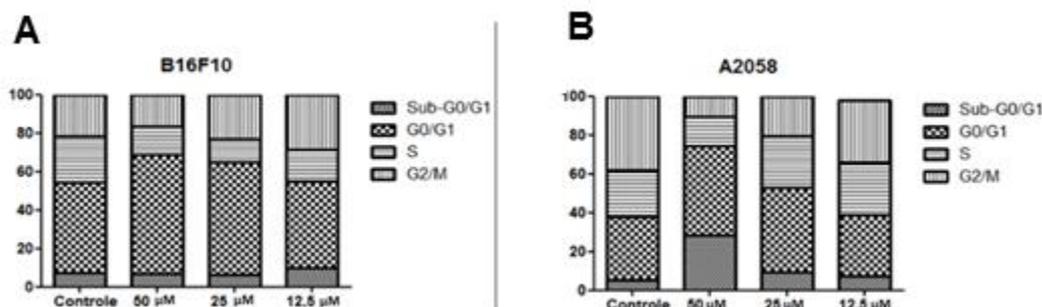


Figura 18. Gráficos representativos do ciclo celular das linhagens B16F10 e A2058 tratadas com o RPF652 - (A) Distribuição da porcentagem das fases do ciclo celular da linhagem B16F10 tratada com o composto RPF652. (B) Distribuição das fases do ciclo celular da linhagem A2058 tratada com o composto RPF652. (C).

Para elucidar os potenciais mecanismos que contribuiriam para a morte celular das linhagens A2058 induzidas pelo composto **RPF652**, algumas proteínas relacionadas à apoptose foram determinadas por Western blotting. Tendo em vista que esta linhagem apresenta mutação no códon 600 da proteína B-RAF (^{V600E}B-RAF), onde a valina é substituída pelo ácido glutâmico, a atividade do composto nessa linhagem pode indicar uma possível atuação na via RAF/MEK/ERK, assim como o fármaco vemurafenibe (BOLLAG et al., 2012; BOX; VUKMER; TERZIAN, 2014; FERREIRA et al., 2016; POLLOCK; MELTZER, 2002). É sabido que esta mutação tem um efeito catastrófico por tornar a via RAF/MEK/ERK constitutivamente ativa. Assim, moléculas que podem interferir nesse processo tem grande apelo anticâncer (BOX; VUKMER; TERZIAN, 2014).

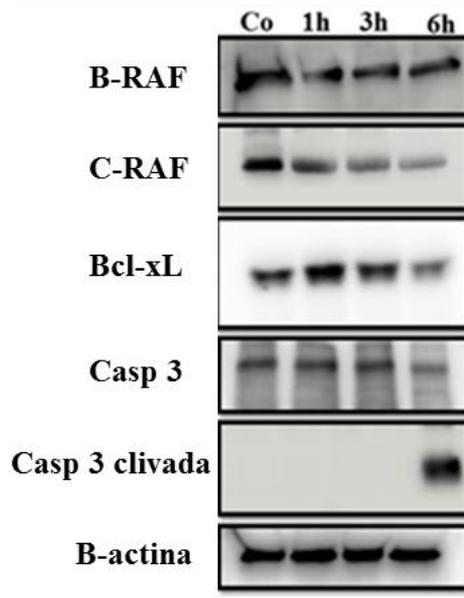


Figura 19 - Western Blotting da linhagem A2058 tratada com o composto RPF652.

Como apresentado na Figura 19, observa-se claramente o efeito *up-regulation* de proteínas pró-apoptóticas e a regulação negativa de proteínas antiapoptóticas. A partir de 1 h, há uma redução considerável de B-RAF, indicando que a via está sendo modulada pelo composto **RPF652**. Estes dados são corroborados pela abrupta redução de C-RAF a partir de 3 horas de tratamento (FERREIRA et al., 2016)

Ainda na figura 19, a análise em 6 horas revela redução da concentração de proteínas antiapoptóticas Bcl-xl, bem como redução de caspase 3 total e, conseqüentemente, aumento da forma ativa caspase 3 clivada. Corroborando os dados de morfologia celular, o envolvimento e o aumento de caspase 3 clivada determinam que a morte é por apoptose, numa possível ativação da via apoptótica em linhagem A2058 (DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013; EUM; LEE, 2011).

Vale ressaltar, no entanto, que a elucidação mecanística do **RPF652** sobre a via RAF/MEK/ERK ainda deve ser continuada. Os dados obtidos para o composto **RPF652** podem ser considerados satisfatórios e o fato de o composto promover apoptose em linhagem A2058 ^{V600E}B-RAF e não na linhagem de melanoma B16F10, nos leva a acreditar em uma possível atuação sobre a proteína mutada. Evidentemente, novos testes devem ser realizados para melhor elucidação do mecanismo de ação do derivado em questão (FERREIRA et al., 2016).

5.2.4– Investigação de nociceção e hiperalgesia modulada pelo RPF652

Tendo em vista que o receptor TRPV é o responsável pela resposta pungente observada na exposição de mucosas à capsaicina (CATERINA; JULIUS, 2001), foi proposto uma investigação adicional com objetivo de comparar a ação nociceptiva do análogo RPF652 frente ativação desse receptor.

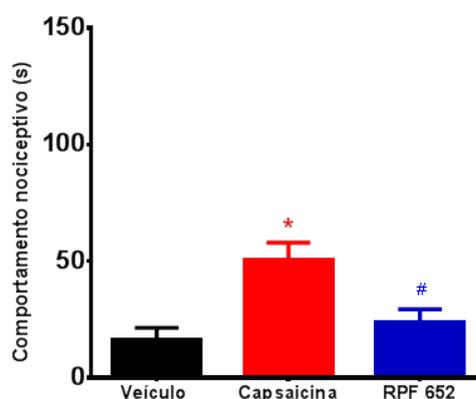


Figura 20 - Avaliação do efeito da capsaicina e análogos (5,2 nmol/pata) no comportamento nociceptivo dos animais. Os compostos foram administrados via intraplantar (n = 8 animais).

Como pode ser observado (Figura 20), a capsaicina gerou uma resposta estatisticamente significativa em relação ao controle (veículo). Em comparação ao análogo **RPF652**, diferente do seu protótipo, gerou estímulo significativamente inferior nos animais tratados, sendo que estes foram mais tolerantes à sensibilidade da dor quando comparados com aqueles tratados com capsaicina. Entretanto, além da resposta do análogo **RPF652** demonstrar-se menor, a hipótese de atuação semelhante à capsaicina de atuar em TRPV não deve ser descartada. Após esta triagem, novos testes devem ser realizados afim de coletar dados que apontem a elucidação mecânica mais detalhada do derivado (FANG et al., 2018; FREITAS et al., 2015).

5.3 – Modelagem molecular

O propósito de uma abordagem teórica foi encontrar conformações energeticamente mais favoráveis e assim calcular propriedades moleculares com propósito de fornecer ideias sobre relações estrutura-atividade (CARVALHO et al., 2003).

Ao empregar modificações moleculares em estruturas de interesse, pode-se alterar propriedades físico-químicas, e por consequência, a sua atividade biológica. Neste cenário, os estudos de modelagem molecular têm grande proveito na discussão sobre relação estrutura-atividade, uma vez que por meio de cálculo de propriedades pode-se correlacionar as atividades biológicas com as características físico-químicas dessas moléculas, e dessa forma, determinar os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos (ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010).

Os estudos iniciaram pela construção dos modelos tridimensionais da capsaicina e do composto **RPF652**. A geometria molecular foi otimizada e o cálculo das propriedades foi realizado no programa Spartan'14[®] obtendo-se: mapa de potencial eletrostático (MPE), energia dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, coeficiente de partição (ClogP), sítio acceptor de ligação de hidrogênio (HBA), sítio doador de ligação de hidrogênio (HBD), área de superfície polar (PSA – *Polar surface area*), momento dipolar (μ).

A tabela 6 apresenta os valores calculados das propriedades físico-químicas da capsaicina e do composto **RPF652**.

Tabela 6 - Valores calculados das propriedades físico-químicas da capsaicina e do derivado RPF652.

	ClogP	E _{homo} (eV)	E _{lumo} (eV)	μ Debye (D)	PSA (Å ²)	HBA	HBD	Massa molar (g/mol)
Capsaicina	3,66	-8,27	3,98	3,96 D	48,21	4	2	305,19
RPF652	3,92	-8,51	3,70	7,57 D	36,60	5	2	294,14

As moléculas apresentam ClogP próximos, sendo 3,66 para capsaicina e 3,92 para o **RPF652**, indicando que ambas são lipofílicas, mas ainda apresentam, segundo LIPINSKI et al. (1997), capacidade de terem boa “passagem por membranas”. O dado pode ser corroborado pelo parâmetro PSA, que indica que quanto menor a área polar na superfície molecular, melhor a permeabilidade em membrana biológica. Acredita-se que

estes dados podem ser considerados relevantes para a maior atividade de **RPF652** frente ao protótipo (CLARK, 1999; FERREIRA et al., 2015).

Em relação aos orbitais de fronteira, os valores calculados para os orbitais HOMO estão semelhantes entre a capsaicina e o **RPF652** (Tabela 6). Entretanto, na distribuição dos mapas (Figura 21), observa-se a existência de maior intensidade do orbital HOMO, especialmente na região da função tioureia, ponto onde foi idealizada a modificação bioisostérica. Embora a distribuição dos mapas do orbital LUMO, para ambos compostos, apresenta-se similar, a menor energia calculada para o derivado **RPF652** ($E_{\text{lumo}} = 3,70$ eV) pode indicar maior reatividade quando comparado com o seu protótipo ($E_{\text{lumo}} = 3,94$ eV) (DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013).

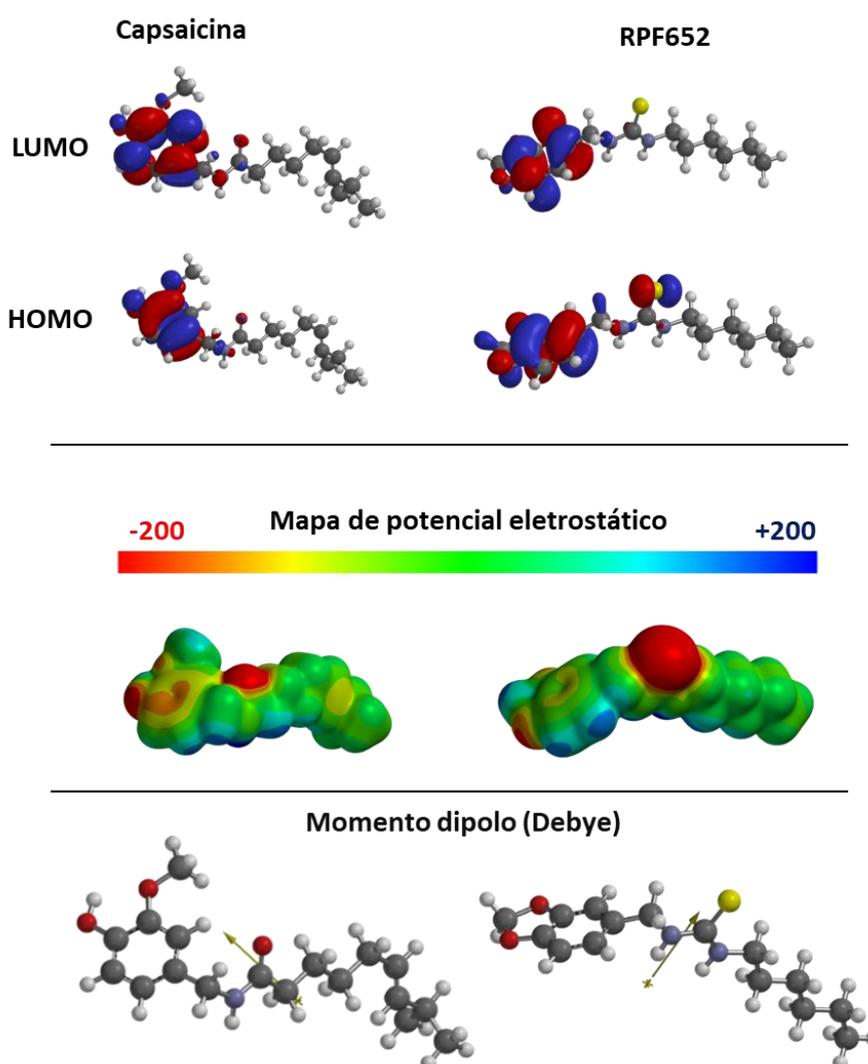


Figura 21 - Mapas HOMO e LUMO, mapa de potencial eletrostático (MPE) e vetor de momento dipolo calculados para capsaicina e RPF652. As estruturas moleculares estão representadas no modelo bastão e bolas. Os hidrogênios estão em branco, em cinza os carbonos, esferas vermelhas representam oxigênio, as azuis representam nitrogênio e amarela o enxofre.

Em relação ao mapa de potencial eletrostático (MPE) (Figura 21), a coloração apresentada indica que as regiões em vermelho, de maior intensidade (-200 kJ/mol), representam uma região da molécula com maior densidade eletrônica, enquanto que as regiões de coloração azul escuro (+200 kJ/mol) possuem menor distribuição de densidade eletrônica (FERREIRA et al., 2015). Para o composto **RPF652**, verifica-se maior densidade eletrônica na região da função tiouréia, o qual pode ser um dado adicional para entender as razões pela qual o análogo é mais ativo que o protótipo (VARENTSOV; KOSHEV; SUKHOV, 2018).

O momento dipolar calculado mostra valores de 3,96 D e 7,57 D para a capsaicina e **RPF652**, respectivamente. Os valores indicam polaridade superior do análogo em relação ao protótipo. Por definição, o momento dipolar é o produto total da quantidade de carga positiva ou negativa e a distância entre seus centroides, logo, a diferença calculada entre as moléculas dá-se pela alta densidade eletrônica na região tioureídica (DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013). Ademais, como observado na figura 21, os vetores de momento dipolar estão em lados opostos. Assim, estes dados em conjunto podem justificar a maior atividade do análogo frente ao seu protótipo.

Tendo em vista que o composto **RPF652** é mais ativo que capsaicina e isso se deve, provavelmente, a um conjunto de fatores como a melhor permeabilidade de membrana (ClogP), maior número de HBA, menor energia do orbital LUMO e maior polaridade (maior momento dipolar), novas comparações foram estabelecidas frente aos análogos **RPF662** e **RPF552**, que são estruturalmente semelhantes ao RPF652, mas não apresentaram atividade (Figura 24).

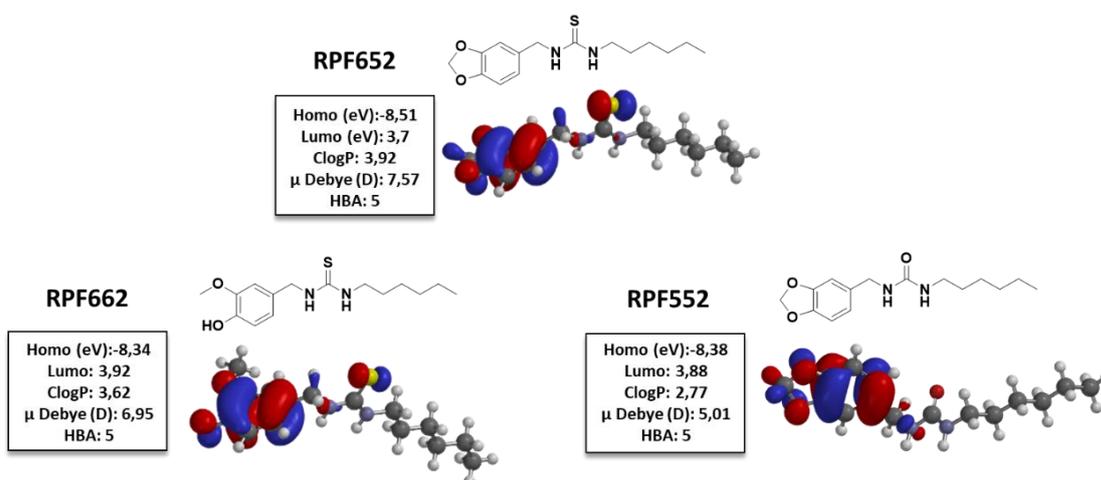


Figura 24 – Mapa HOMO, valores calculados para orbital molecular HOMO (eV), LUMO (eV), ClogP, Momento dipolo e HBA dos compostos RPF652, RPF662 e RPF552. As estruturas moleculares estão representadas pela estrutura química e no modelo bastão e bolas. Os hidrogênios estão em branco, em cinza os carbonos, esferas vermelhas representam oxigênio, as azuis representam nitrogênio e amarela o enxofre.

Como pode ser observado, os derivados da figura 24 apresentam semelhanças estruturais e de propriedades. A principal diferença estrutural observada entre o composto ativo **RPF652** e o inativo **RPF662** é o fechamento de anel do sistema metilcatecol para o benzodioxol. No caso de **RPF552**, embora apresente o núcleo benzodioxol, a ausência da função tioureia pode ter impactado em sua atividade.

Ademais, quando comparados entre si, **RPF652** apresenta maior momento de dipolo e a menor energia do orbital molecular LUMO, fatos que podem estar associados a maior reatividade e, por conseguinte, maior atividade (ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010; DE-SÁ-JÚNIOR et al., 2013).

Entende-se, assim, que o estudo de modelagem molecular colaborou para um melhor entendimento das bases moleculares para a ação dos compostos propostos. Ademais, as informações aqui obtidas podem revelar indícios sobre a proposição de novos análogos capsaicinoides com potencial ação antitumoral. proposições moleculares podem ser subsequentemente propostas..

Conclusões

6 Conclusões

O presente trabalho consistiu na síntese de 27 compostos baseados no arcabouço estrutural da capsaicina, dentre os quais, quatorze pertencentes à série piperonílica (série *I*) e treze pertinentes à série vanilínica (série *II*).

Todos os compostos sintetizados foram obtidos dentro de valores rendimento variando de moderados a ótimos. O método sintético proposto para ambas as séries foi de adição nucleofílica à carbonila ou tiocarbonila de isocianato ou isotiocianatos, obtendo com sucesso os derivados planejados, com exceção do composto **RPF661** que apresenta rápida sublimação, portanto não foi possível completar suas caracterizações. Todos os análogos obtiveram grau de pureza aceitável, tendo em vista que os valores em percentagem foram superiores a 95,1 %.

Foram realizados os ensaios de atividade biológica dos vinte e sete análogos que foram sintetizados e caracterizados. Os testes realizados foram de viabilidade celular por redução do MTT, frente à linhagem de glioblastoma (U-87), adenocarcinoma mamário (MCF-7), adenocarcinoma cervical (HeLa), melanoma murino (B16F10) e melanoma humano (SK-MEL 25 e A2058), além da linhagem não tumorigênica, fibroblasto humano (T75).

Quatro compostos apresentaram citotoxicidade contra linhagens tumorigênicas A2058, SK-MEL-25 e U87. Adicionalmente, não apresentaram atividade citotóxica em linhagem não-tumorigênica T75.

O estudo revelou atividade interessante do composto **RPF652** nas linhagens sobre citadas, apresentando $IC_{50} = 55, 67$ e $87 \mu M$, correspondentemente, superando assim a potência do protótipo. Os resultados apresentados na linhagem ^{V600E}B-RAF A2058, indicaram formação de corpos apoptóticos, perda de refringência, aumento dos níveis de caspase 3 clivada e retraimento do citoplasma. Sendo assim, os dados levam a conclusão que morte desta linhagem é via apoptose. Ademais, o composto provocou depleção nos níveis de ^{V600E}B-RAF, sugerindo ação citotóxica por inibição desta proteína.

A investigação adicional em linhagem B16F10 mostrou que o composto **RPF652** causou parada no ciclo celular na fase G₀/G₁, entretanto não levou a linhagem ao processo

de morte. Esta linhagem não possui mutação no códon V600E da B-RAF, sendo assim, os dados corroboram com a conclusão mecanística citada anteriormente.

Estudos adicionais de avaliação de nocicepção e hiperalgesia foram realizados no intuito de verificar uma possível ação em receptores do tipo TRPV. Os testes demonstraram que o composto **RPF652** possui sua atividade estatisticamente menos significativa que o protótipo capsaicinóide, porém a hipótese de uma possível ação via TRPV não deve ser descartada.

Os cálculos de energia dos orbitais de fronteira (E_{homo} e E_{lumo}) podem estar associados à atividade do composto em relação a reatividade do derivado. O PSA pode favorecer melhor permeabilidade na membrana celular e o maior número de sítios de acepção de ligação de hidrogênio e o fechamento de anel tornando o sistema metilcatecol em benzodioxol podem estar envolvidos no aumento da citotoxicidade em linhagem tumorigênica $V600E$ B-RAF A2058.

Por fim, o mapa de potencial eletrostático indica aumento da densidade eletrônica numa região a qual foi realizada modificação bioisostérica pela função tiouréia, e o momento dipolo do composto indicou alta polaridade do derivado, o que pode estar associado com a melhoria da potência do **RPF652** em relação à capsaicina.

Perspectivas

7. Perspectivas

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, novos estudos podem ser propostos frente aos derivados.

Realizar estudos mecanísticos adicionais para o composto **RPF652**, o qual apresentou atividade em linhagem celular ^{V600E}B-RAF A2058, com o intuito de verificar uma possível atuação na via RAF/MEK/ERK.

Adicionalmente realizar avaliação do estímulo do receptor capsaicinóide (TRPV) do análogo **RPF652** e dos demais derivados, para estudos de relação estrutura-atividade complementares.

Propor novos derivados piperonílicos junto à função tiouréia com inserção de cadeias alquílicas laterais que disponham variações nas unidades metilênicas, presença de insaturações, e presença de ramificações podem ampliar o escopo para os estudos de relação estrutura-atividade.

Referências

7 Referências

ACHARYA, C. et al. Recent Advances in Ligand-Based Drug Design: Relevance and Utility of the Conformationally Sampled Pharmacophore Approach. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 1, p. 10–22, 2011.

APAROY, P.; KUMAR REDDY, K.; REDDANNA, P. Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5- LOX Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3763–3778, 2012.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.

AVALOS, M. et al. Reactions of 2-amino-2-thiazolines with isocyanates and isothiocyanates. Chemical and computational studies on the regioselectivity, adduct rearrangement, and mechanistic pathways. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 26, p. 8882–8892, 2000.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.

BATISTA FERNANDES, T. et al. Arylsulfonylhydrazone induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 15, n. Iii, p. 1–11, 2018.

BAYER, O.; FARBENINDUSTRIE, G. Polyurethanes 16.1. n. 1950, 1988.

BODE, A. M.; DONG, Z. The two faces of capsaicin. **Cancer Research**, v. 71, n. 8, p. 2809–2814, 2011.

BOLLAG, G. et al. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 11, p. 873–886, 2012.

BOX, N. F.; VUKMER, T. O.; TERZIAN, T. Targeting p53 in melanoma. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 1, p. 8–10, 2014.

BUTLER, L. M. et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11700–11705, 2002.

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

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 487–517, 2001.

CLARK, D. E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. **Journal**

of Pharmaceutical Sciences, v. 88, n. 8, p. 807–814, 1999.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents †. **Chemal Review**, v. 109, p. 3012–3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Contributed Reviews Wani Contribution to Cancer Chemotherapy. **Chart**, n. 12, p. 232–244, 2004.

CRAIG, P. N. Interdependence between Physical Parametess and Selection of Substituent Groups for Correlation Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 680–684, 1971.

DAMIÃO, M. C. F. C. B. et al. Novel Capsaicin Analogues as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and *In Silico* Approach. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 12, p. 885–895, 2014.

DE-SÁ-JÚNIOR, P. L. et al. RPF101, A new capsaicin-like analogue, Disrupts the microtubule network accompanied by arrest in the G2/M phase, Inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, n. 3, p. 385–398, 2013.

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

DELA CRUZ, C. S.; TANOUE, L. T.; MATTHAY, R. A. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 4, p. 605–644, 2011.

DELEBECQ, E. et al. On the Versatility of Urethane / Urea Bonds : Reversibility , Blocked. **Chem. Rev**, v. 113, p. 80–118, 2013.

DU, C. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 33–42, 2000.

EUM, K. H.; LEE, M. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 348, n. 1–2, p. 61–68, 2011.

FANG, J. Q. et al. Parameter-specific analgesic effects of electroacupuncture mediated by degree of regulation TRPV1 and P2X3 in inflammatory pain in rats. **Life Sciences**, v. 200, n. September 2017, p. 69–80, 2018.

FERREIRA, A. K. et al. RPF151, a novel capsaicin-like analogue: in vitro studies and in vivo preclinical antitumor evaluation in a breast cancer model. **Tumor Biology**, v. 36, n. 9, p. 7251–7267, 2015.

JOO, J. I. et al. Proteomic Analysis for Antiobesity Potential of Capsaicin on White Adipose Tissue in Rats Fed with a High Fat Diet. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 6, p. 2977–2987, 2010.

JUN, H. S. et al. Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of Bcl-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 708–715, 2007.

JUNG, M. Y.; KANG, H. J.; MOON, A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. **Cancer letters**, v. 165, n. 2, p. 139–45, 26 Apr. 2001.

KANG, J. H. et al. Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. **FEBS Letters**, v. 581, n. 23, p. 4389–4396, 2007.

KIM, J. A.; YOUNG, S. K.; YONG, S. L. A phospholipase C-dependent intracellular Ca²⁺ release pathway mediates the capsaicin-induced apoptosis in HepG2 human hepatoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 1, p. 73–80, 2005.

KUNDU, M.; THOMPSON, C. B. Autophagy: Basic Principles and Relevance to Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 427–455, Feb. 2008.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 3, p. e1675-11, 2015.

LEE, J. S. et al. Capsaicin-induced apoptosis and reduced release of reactive oxygen species in MBT-2 murine bladder tumor cells. **Archives of pharmacal research**, v. 27, n. 11, p. 1147–1153, 2004.

LEE, Y. J. et al. Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 10, p. 881–893, 2012.

LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.

LIN, C.-H. et al. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 46, 2013.

LUO, X. J.; PENG, J.; LI, Y. J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 1–7, 2011.

MALAGARIE-CAZENAVE, S. et al. The vanilloid capsaicin induces IL-6 secretion in prostate PC-3 cancer cells. **Cytokine**, v. 54, n. 3, p. 330–337, 2011.

MARKS, P. A.; BRESLOW, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: Development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 84–90, 2007.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NASELLI, F. et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 652–658, 2014.

NJUGUNA, N. M.; MASIMIREMBWA, C.; CHIBALE, K. Identification and characterization of reactive metabolites in natural products-driven drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 507–513, 2012.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and Taxol: Achievements in Natural Products Research. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 129–135, 2004.

OIKAWA, S. et al. Mechanism of oxidative DNA damage induced by capsaicin, a principal ingredient of hot chili pepper. **Free Radical Research**, v. 40, n. 9, p. 966–973, 7 Jan. 2006.

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

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

POLLOCK, P. M.; MELTZER, P. S. A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. **Cancer Cell**, v. 2, n. 1, p. 5–7, 2002.

RÔMULO P. TENÓRIO, ALEXANDRE J. S. GÓES, JOSÉ G. LIMA, ANTONIO R. DE FARIA, ANTÔNIO J. ALVES, T. M. DE A. TIOSSEMICARBAZONAS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, APLICAÇÕES SINTÉTICAS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA. **Quimica Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.

SÁNCHEZ, A. M. et al. Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. **Apoptosis**, v. 12, n. 11, p. 2013–2024, 2007.

SERTEL, S. et al. Molecular docking and pharmacogenomics of Vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 723–735, 2011.

SHARMIN, E.; ZAFAR, F. Polyurethane : An Introduction. p. 3–16, 2012.

spectrabase. Disponível em: <<https://spectrabase.com/spectrum/5DQgtyc2Yc3>>.

TATSUNO, M. et al. BRAF V600 mutations in Langerhans cell histiocytosis with

a simple and unique assay. **Diagnostic Pathology**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2016.

TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.

THIELE, R.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Chili pepper fruits: Presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 4219–4224, 2008.

THOENNISSEN, N. H. et al. Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and-negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. **Oncogene**, v. 29, n. 2, p. 285–296, 2010.

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

URRUTICOECHEA, A. et al. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 3–10, 2010.

VARENTSOV, V. K.; KOSHEV, A. N.; SUKHOV, I. F. Mathematical Modeling and Experimental Studies of the Joint Electrodeposition of Gold and Silver from Sulfuric Acid Thiourea Solutions on Flow-Through 3D Electrode Taking into Account Its Nonstationary State. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, v. 52, n. 4, p. 495–505, 8 Jul. 2018.

VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R., BERNEMAN, Z. N. et al. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–149, 2003.

WAHYUNI, Y. et al. Secondary metabolites of Capsicum species and their importance in the human diet. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 783–793, 2013.

WANG, H. M. et al. Down-Regulation of Tumor-Associated NADH Oxidase, tNOX (ENOX2), Enhances Capsaicin-Induced Inhibition of Gastric Cancer Cell Growth. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 61, n. 2, p. 355–366, 2011.

WCRF. Disponível em: <<https://www.wcrf.org/>>.

WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/>>.

WU, G. et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. **Nature**, v. 408, n. 6815, p. 1008–1012, 2000.

XIE, L. et al. Capsaicin and dihydrocapsaicin induce apoptosis in human glioma cells via ROS and Ca²⁺-mediated mitochondrial pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4198–4208, 2016.

ZIEGLER, U. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 124–128, 2004.

ZÖRNIG, M. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis.

Anexos I
Análises espectroscópicas

Anexos I

1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-fenilureia

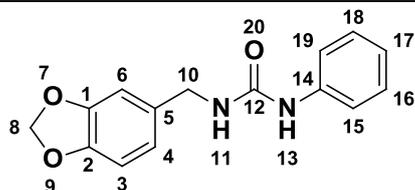
Código: RPF 501

Série: Ia

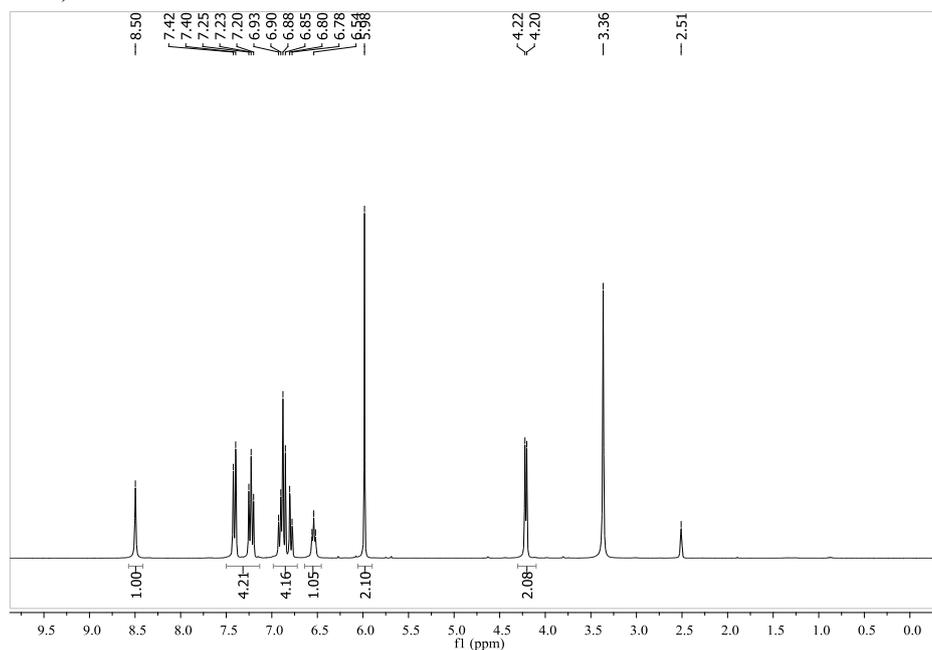
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 97 %

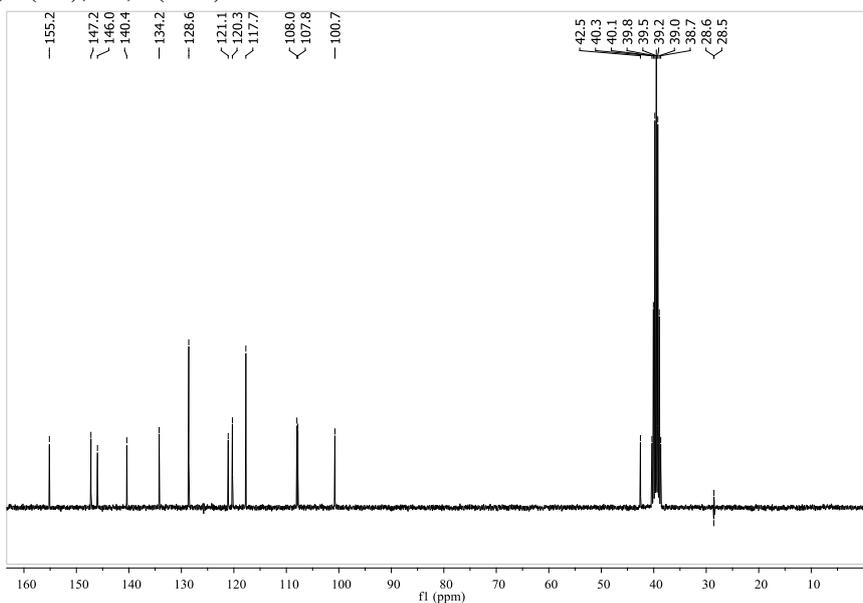
Faixa de fusão: 162,0 – 163,5°C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,50 (1H, s, NH-11), 7,41 (2H, d, *J* = 7,7 Hz, H-15, H-19), 7,23 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, H-4), 6,91 (1H, d, *J* = 7,3 Hz, H-4), 6,87 (1H, s, H-6), 6,85 (1H, s, NH-13), 6,79 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-3), 6,54 (1H, t, *J* = 5,8 Hz, H-17), 5,98 (2H, s, H-8), 4,21 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, H-10)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,2 (C12), 147,2 (C2), 146,0 (C1), 140,4 (C14), 134,2 (C5), 128,6 (C16c C18), 121,1 (C17), 120,3 (C4), 117,7 (C15, C19), 108,0 (C3), 107,8 (C6), 100,7 (C8), 42,5 (C10).



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(4-nitrofenil)ureia

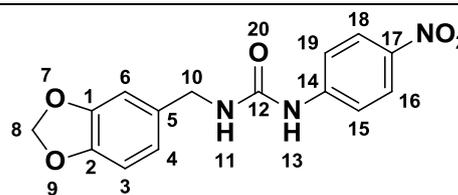
Código: RPF 502

Série: Ia

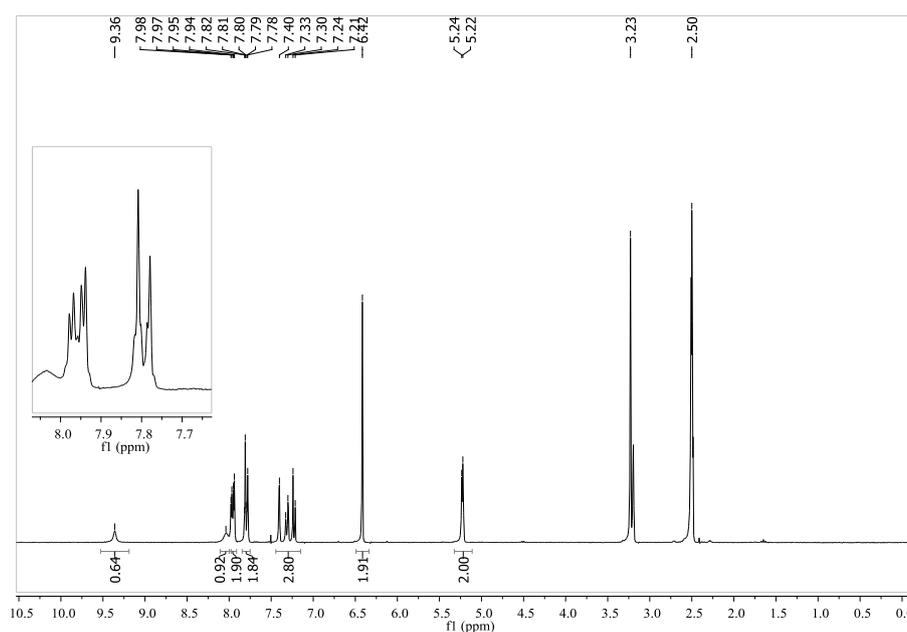
Aspecto: Sólido amarelo

Pureza (HPLC): 95,4 %

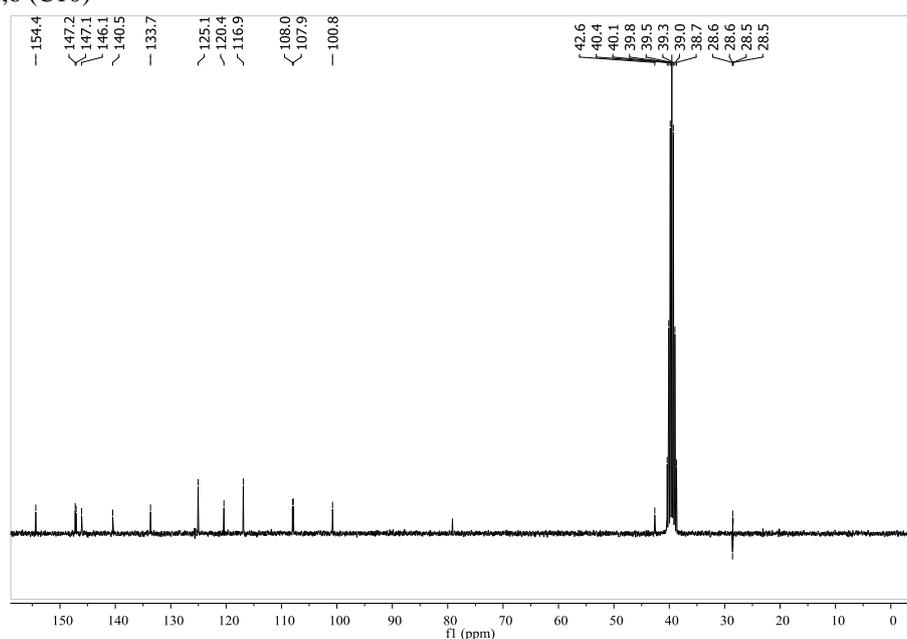
Faixa de fusão: 160,3 – 162,1°C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 9,36 (1H, s, NH-11), 8,04 (1H, sl, NH-13), 7,96 (2H, dd, $J_1 = 3,1$ Hz, $J_2 = 3,1$ Hz, H-16, H-18), 7,80 (2H, m, H-15, H-19), 7,40 (1H, s, H-6), 7,31 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-4), 7,23 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-3), 6,42 (2H, s, H-8), 5,23 (2H, d, $J = 4,0$ Hz, H-10)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 154,4 (C12), 147,2 (C2), 147,1 (C1), 146,1 (C17), 140,5 (C14), 133,7 (C5), 125,1 (C16, C18), 120,4 (C4), 116,9 (C15, C19), 108,0 (C3), 107,9 (C6), 100,8 (C8), 42,6 (C10)



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-fenilureia

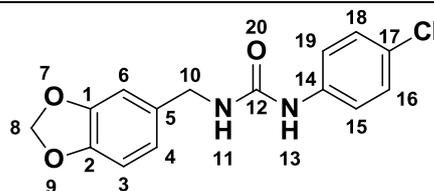
Código: RPF 503

Série: Ia

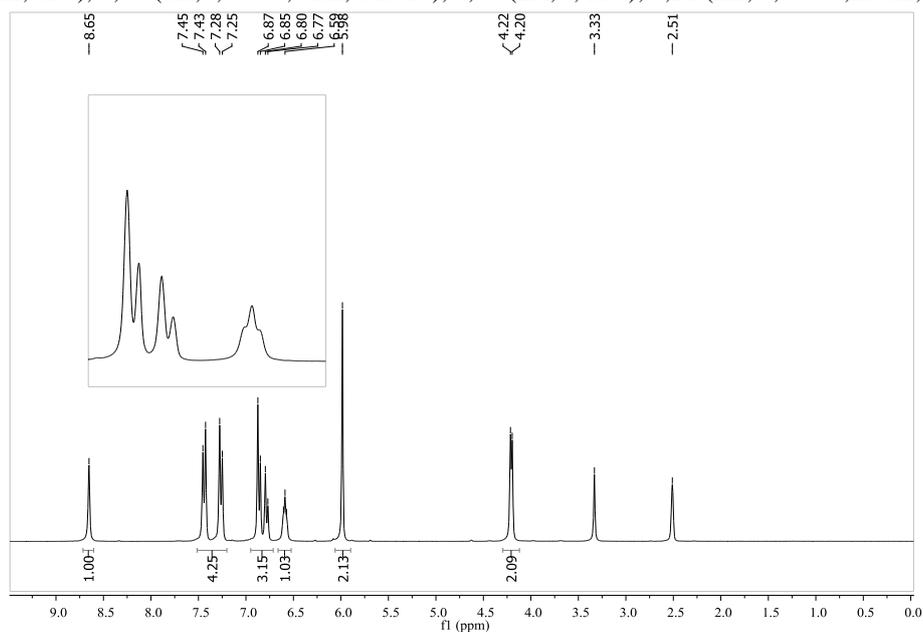
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 98,8 %

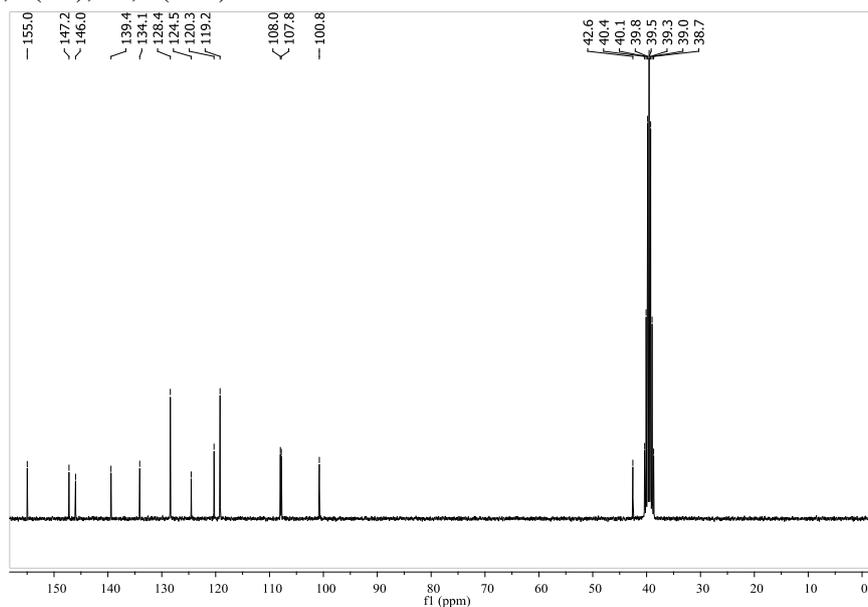
Faixa de fusão: 187,3 – 189,0°C



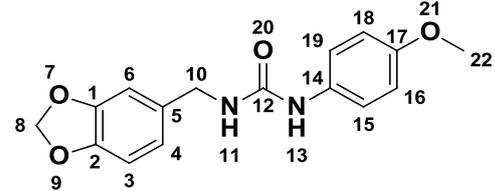
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,65 (1H, s, NH-11), 7,44 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, H-16, H-18), 7,26 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, H-15, H-19), 6,87 (1H, s, H-6), 6,86 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-4), 6,78 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H-3), 6,59 (1H, t, *J* = 7,9 Hz, NH-13), 5,48 (2H, s, H-8), 4,21 (2H, d, *J* = 4,21 Hz, H-10)



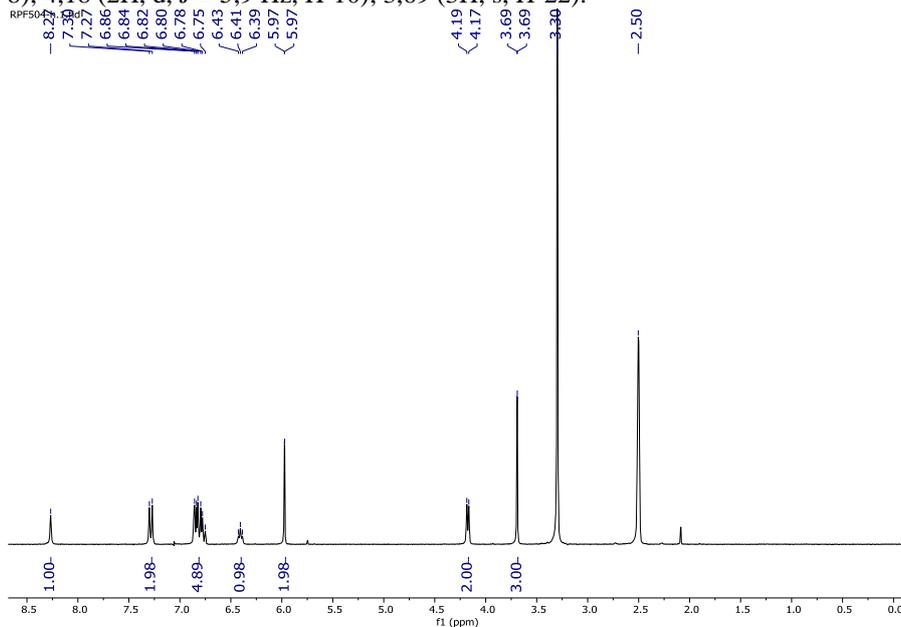
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,0 (C12), 147,2 (C2), 146,0 (C1), 139,4 (C14), 134,1 (C5), 128,4 (C16, C18), 124,5 (C17), 120,3 (C4), 119,2 (C15, C19), 108,0 (C3), 107,8 (C6), 100,8 (C8), 42,6 (C10).



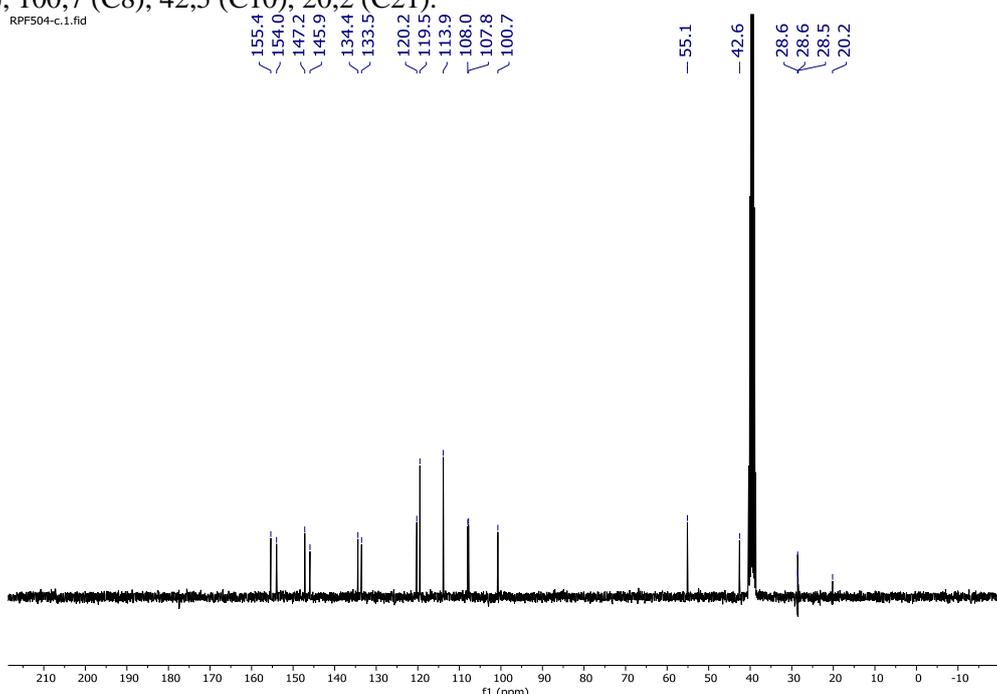
1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-3-(4-methoxyphenyl)urea

<p>Código: RPF 504 Série: Ia Aspecto: Sólido branco Pureza (HPLC): 97,6 % Faixa de fusão: 197,4 – 199,5°C</p>	
--	--

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,27 (1H, s, NH-13); 7,28 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-16, H-20); 6,86 (1H, s, H-6); 6,84 – 6,75 (4H, m, H-3, H-4, H-17, H-19), 6,41 (1H, t, *J* = 5,9 Hz, NH-11); 5,97 (2H, s, H-8); 4,18 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, H-10); 3,69 (3H, s, H-22).



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,4 (C12), 154,2 (C2), 146,0 (C1), 137,8 (C14), 134,3 (C5), 129,9 (C17), 129,0 (C16, C18), 120,3 (C4), 117,8 (C15, C19), 108,0 (C3), 107,8 (C6), 100,7 (C8), 42,5 (C10), 20,2 (C21).



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(p-tolil)ureia

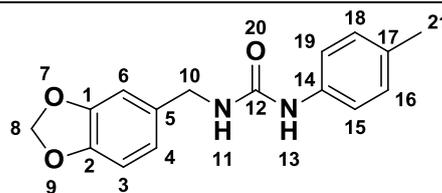
Código: RPF 505

Série: Ia

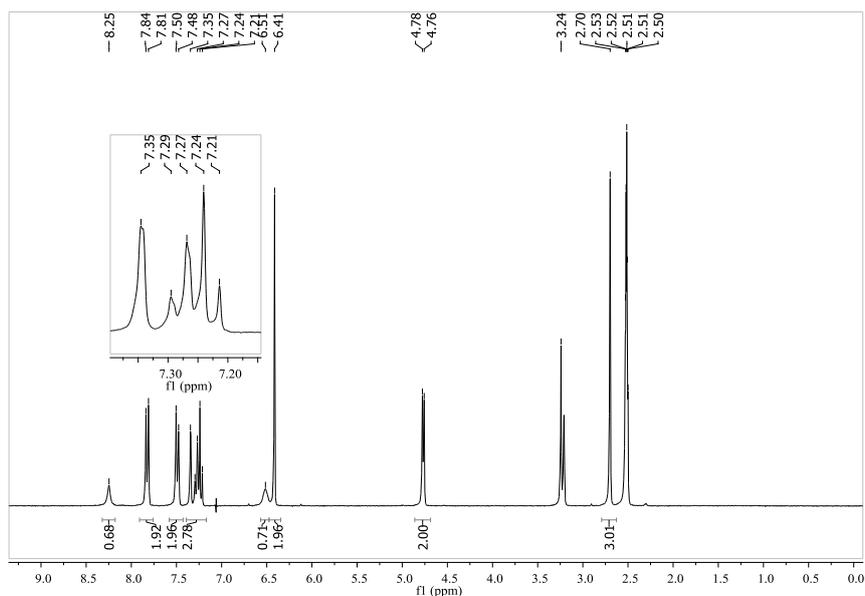
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 99,4 %

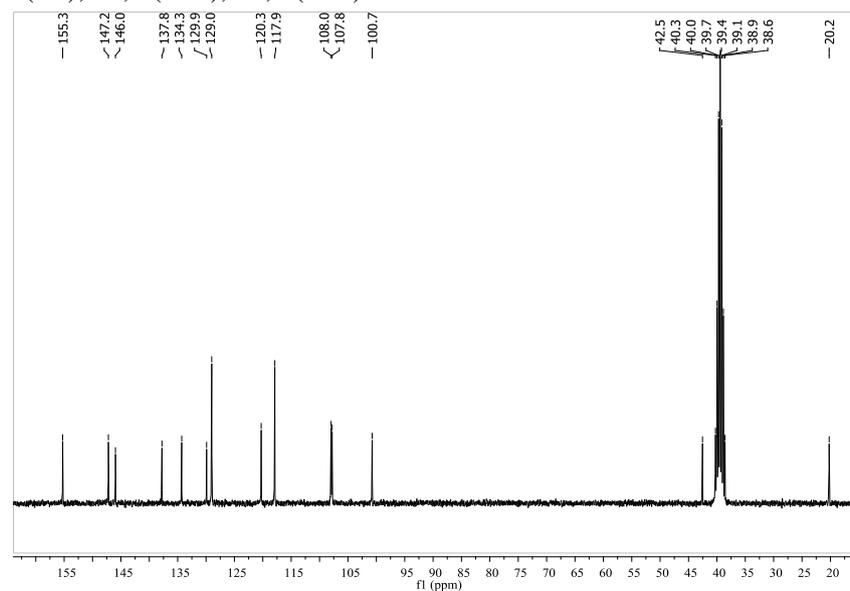
Faixa de fusão: 151,0 – 152,5 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,25 (1H, s, NH-13), 7,82 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-16, H-18), 7,49 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, H-15, H-19), 7,35 (1H, s, H-6), 7,28 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H-4), 7,23 (1H, d, *J* = 7,3 Hz, H-3), 6,51 (1H, sl, NH-11) 6,41 (2H, s, H-8), 4,77 (2H, d, *J* = 5,8 Hz, H-10), 2,70 (3H, s, H-21).



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,3 (C12), 147,2 (C2), 146,0 (C1), 137,8 (C14), 134,3 (C5), 129,9 (C17), 129,0 (C16, C18), 120,3 (C4), 117,8 (C15, C19), 108,0 (C3), 107,8 (C6), 100,7 (C8), 42,5 (C10), 20,2 (C21).



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-butilureia

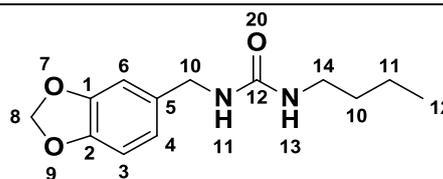
Código: RPF 551

Série: Ia

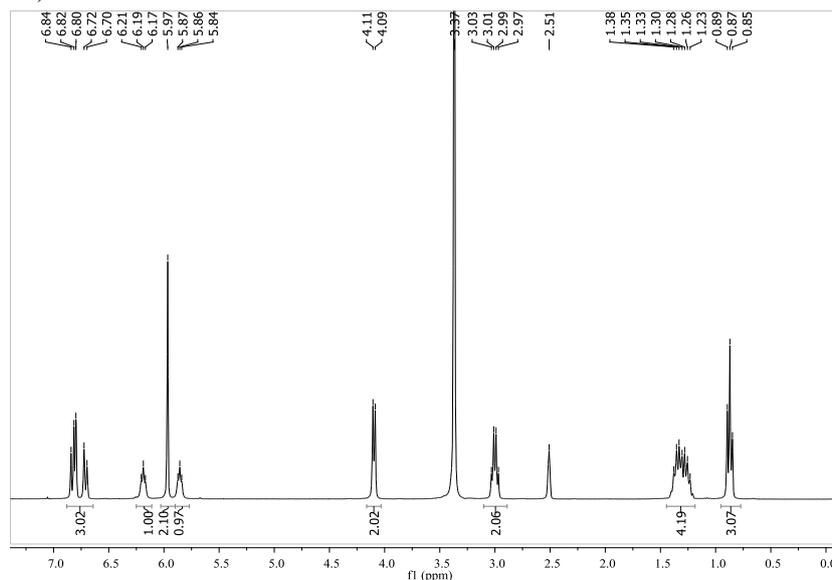
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 97,6 %

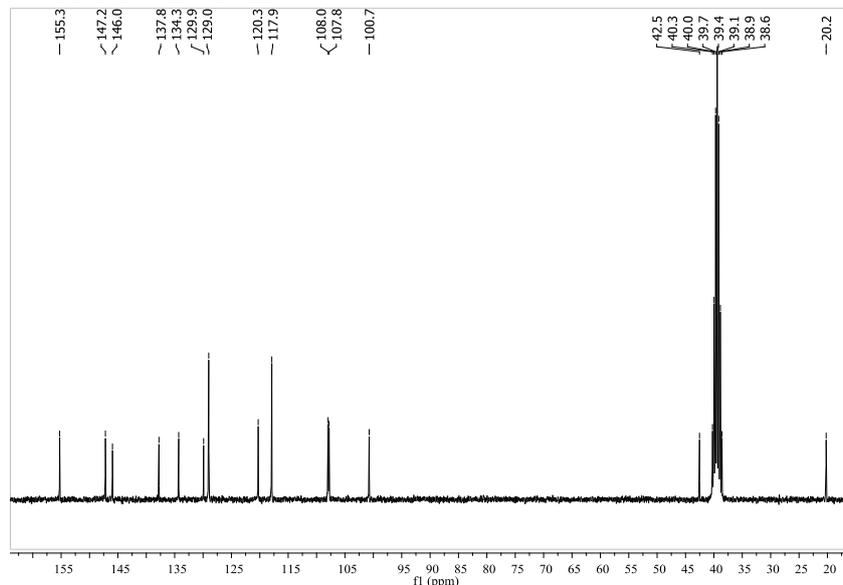
Faixa de fusão: 197,0 – 198,5 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 6,83 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H-4), 6,80 (1H, s, H-6), 6,71 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H-3), 6,19 (1H, t, *J* = 5,7 Hz, NH-11), 5,97 (2H, s, H-8), 5,83 (1H, t, *J* = 5,3 Hz, NH-13), 4,10 (2H, d, *J* = 6,0 Hz, H-10), 3,00 (2H, q, *J* = 6,4 Hz, H-15), 1,31 (4H, m, H-14, H-16), 0,87 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, H-17)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,3 (C12), 147,2 (C2), 146,0 (C1), 137,8 (C14), 134,3 (C5), 129,9 (C17), 129,0 (C16, C18), 120,3 (C4), 117,8 (C15, C19), 108,0 (C3), 107,8 (C6), 100,7 (C8), 42,5 (C10), 20,2 (C21).



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-hexilureia

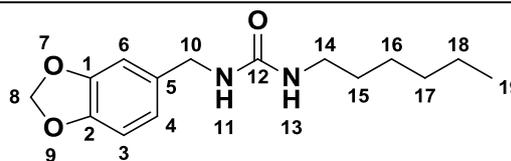
Código: RPF 552

Série: Ia

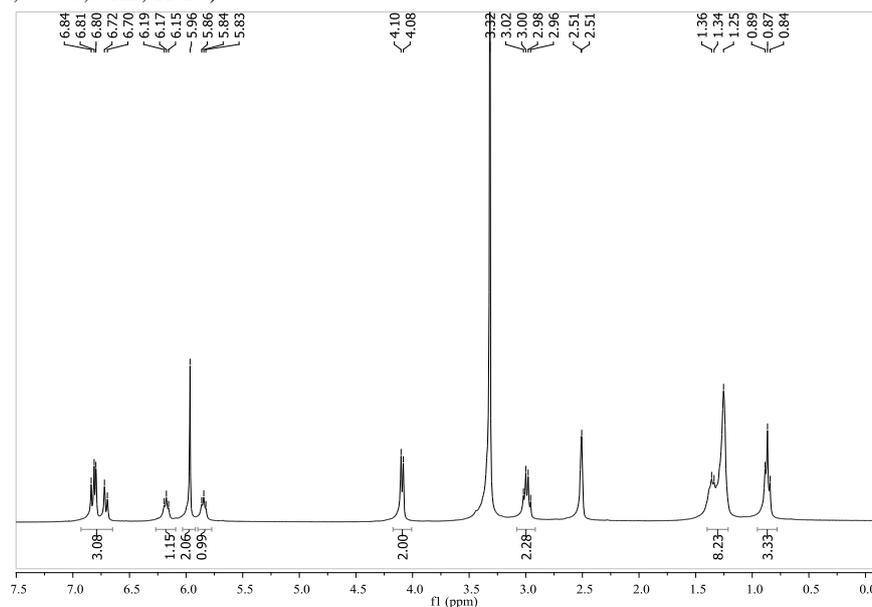
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 96,7 %

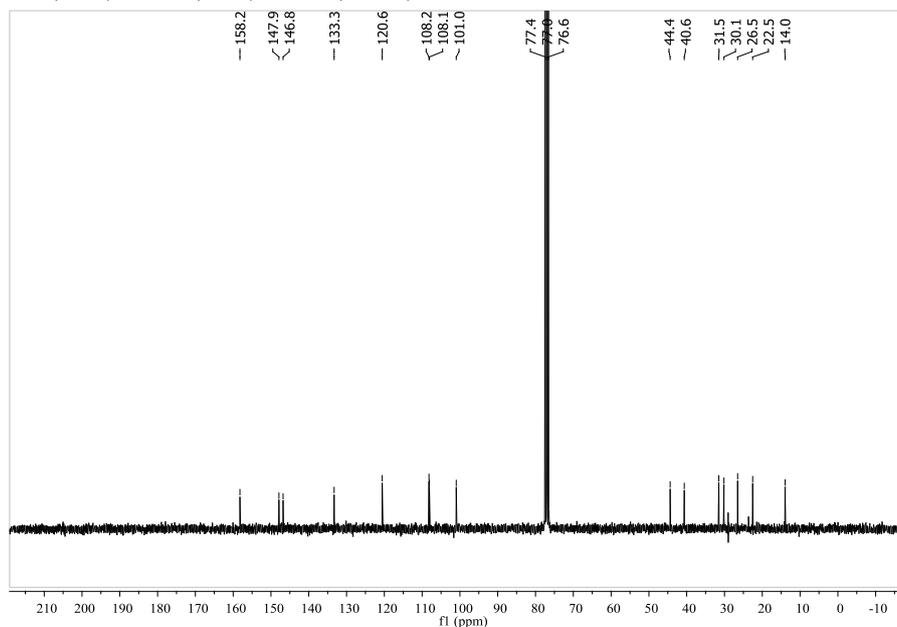
Faixa de fusão: 130,0 – 131,0 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 6,83 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H-4), 6,80 (1H, s, H-6), 6,71 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H-3), 6,17 (1H, t, *J* = 5,8 Hz, NH-11), 5,96 (2H, s, H-8), 5,84 (1H, t, *J* = 5,5 Hz, NH-13), 4,09 (2H, d, *J* = 6,0 Hz, H-10), 2,99 (2H, q, *J* = 6,7 Hz, H-15), 1,32 (8H, m, H-14, H-16, H-17, H-18), 0,86 (3H, t, *J* = 6,5 Hz, H-19)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 158,2 (C12), 147,9 (C2), 146,8 (C1), 133,3 (C5), 120,6 (C4), 108,2 (C3), 108,1 (C6), 101,0 (C8), 44,4 (C10), 40,6 (C14), 31,5 (C17), 30,1 (C15), 26,5 (C16), 22,5 (C18), 14,0 (C19)



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-feniltiourea

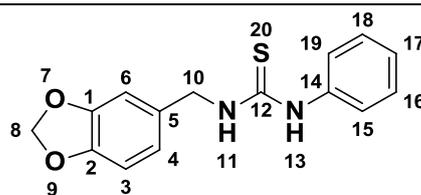
Código: RPF 601

Série: Ib

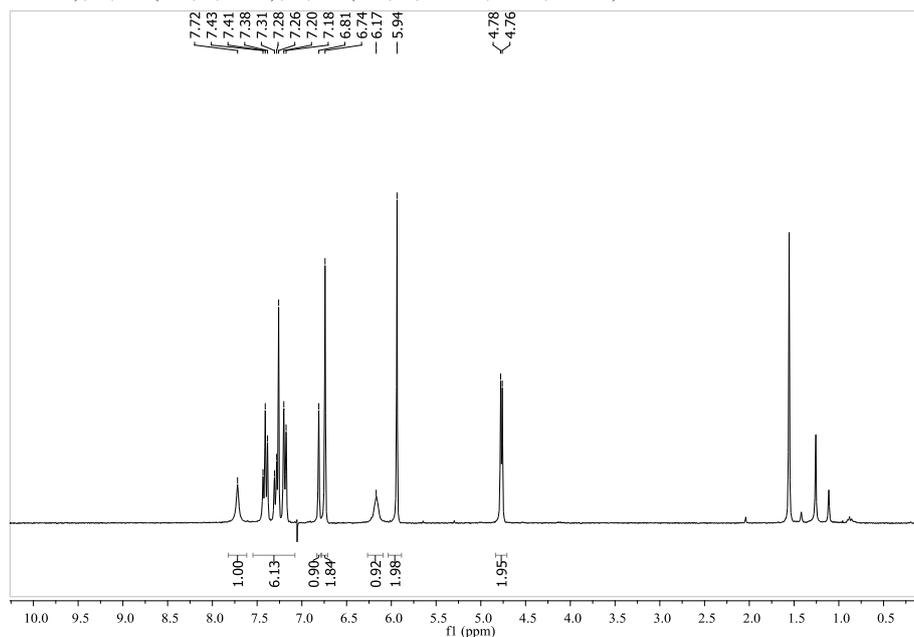
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 99,5 %

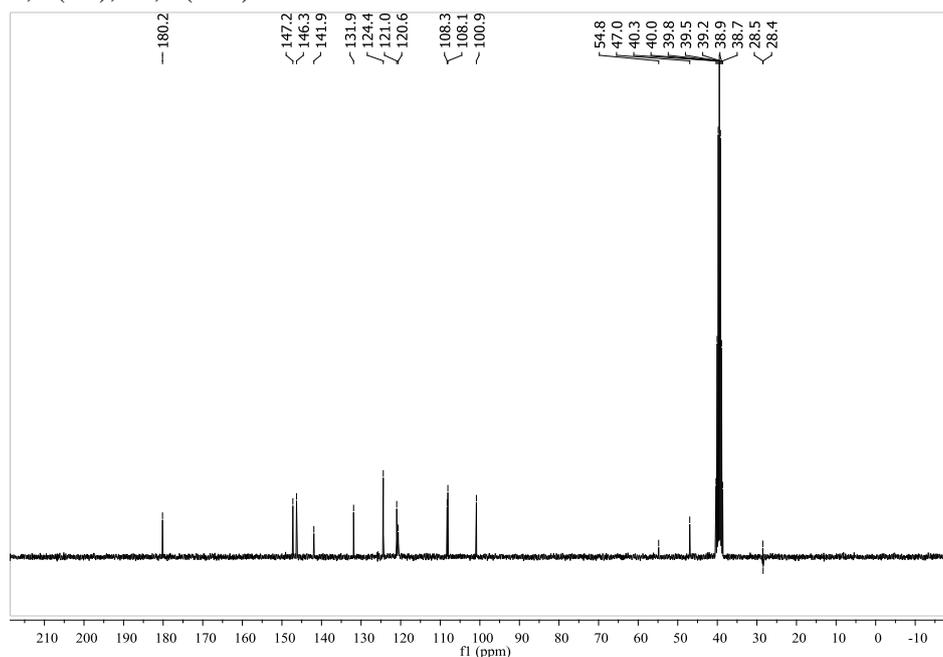
Faixa de fusão: 142,1 – 143,9 °C



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 7,72 (1H, s, NH-11), 7,41 (2H, t, *J* = 7,7 Hz, H-19, H-18), 7,28 (1H, m, H-17), 7,19 (2H, d, *J* = 7,6 Hz, H-15, H-19), 6,81 (1H, s, H-6), 6,74 (2H, s, H-4, H-3), 6,17 (1H, sl, NH-13), 5,94 (2H, s, H-8), 4,77 (2H, d, *J* = 5,4 Hz, H-10)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,2 (C12), 147,2 (C2), 146,3 (C1), 141,9 (C14), 131,9 (C5), 124,4 (C16, C18), 121,0 (C17), 120,6 (C4), 108,3 (C19, C19), 108,1 (C3), 100,9 (C6), 54,8 (C8), 47,0 (C10)



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(4-nitrophenil)tiourea

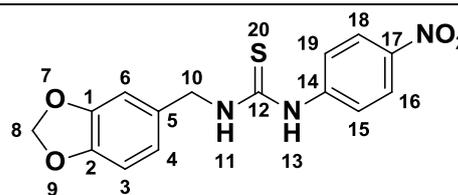
Código: RPF 602

Série: Ib

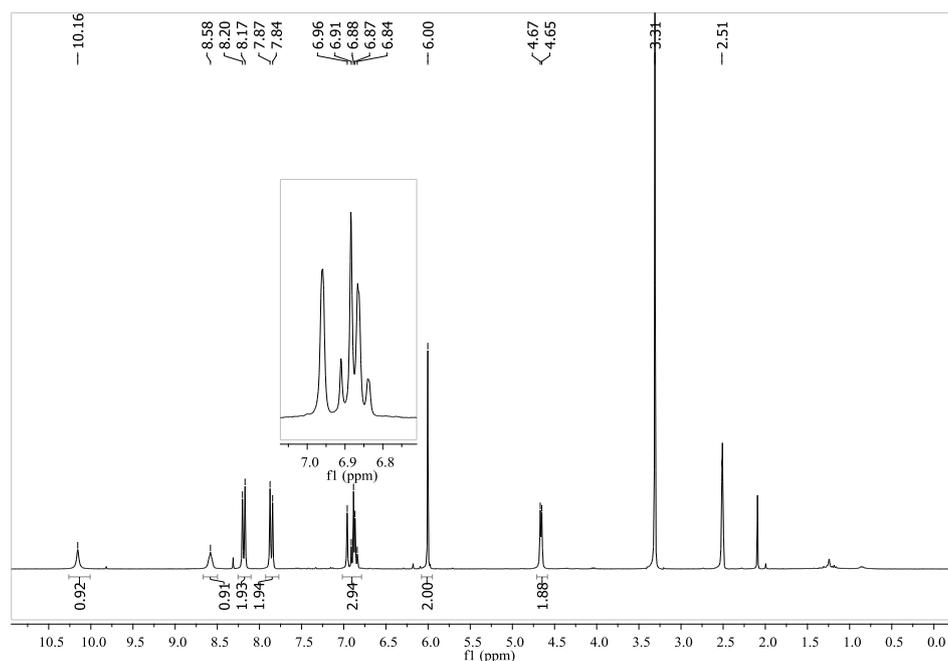
Aspecto: Sólido amarelo

Pureza (HPLC): 99,5 %

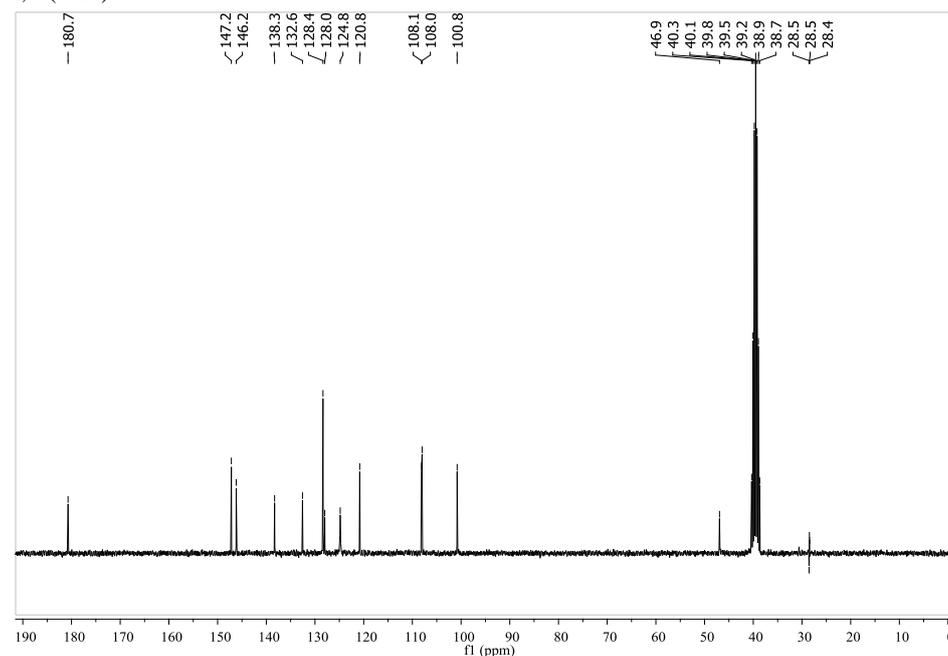
Faixa de fusão: 142,1 – 143,9 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 9,36 (1H, s, NH-11), 8,04 (1H, sl, NH-13), 7,96 (2H, dd, $J_1 = 3,1$ Hz, $J_2 = 3,1$ Hz, H-16, H-18), 7,80 (2H, m, H-15, H-19), 7,40 (1H, s, H-6), 7,31 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-4), 7,23 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-3), 6,42 (2H, s, H-8), 5,23 (2H, d, $J = 4,0$ Hz, H-10)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,7 (C12), 147,2 (C2), 146,2 (C1), 138,3 (C17), 132,6 (C14), 128,4 (C5) 128,0 (C16, C18), 124,8 (C4), 120,8 (C15, C19), 108,1 (C3), 108,0 (C6), 100,8 (C8), 46,9 (C10)



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(4-clorofenil)tiourea

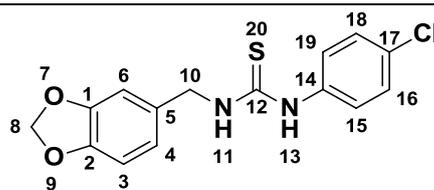
Código: RPF 603

Série: Ib

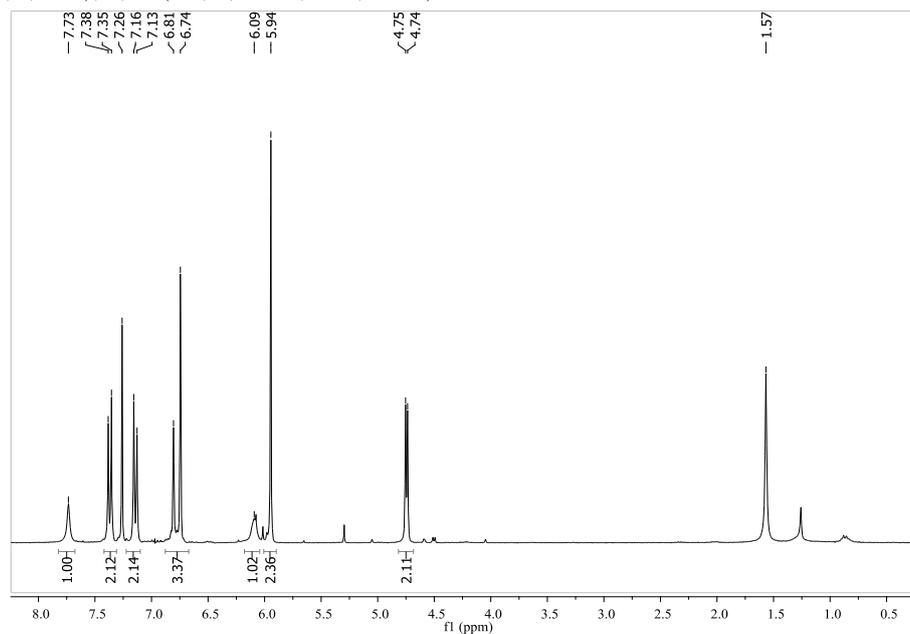
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 99,8 %

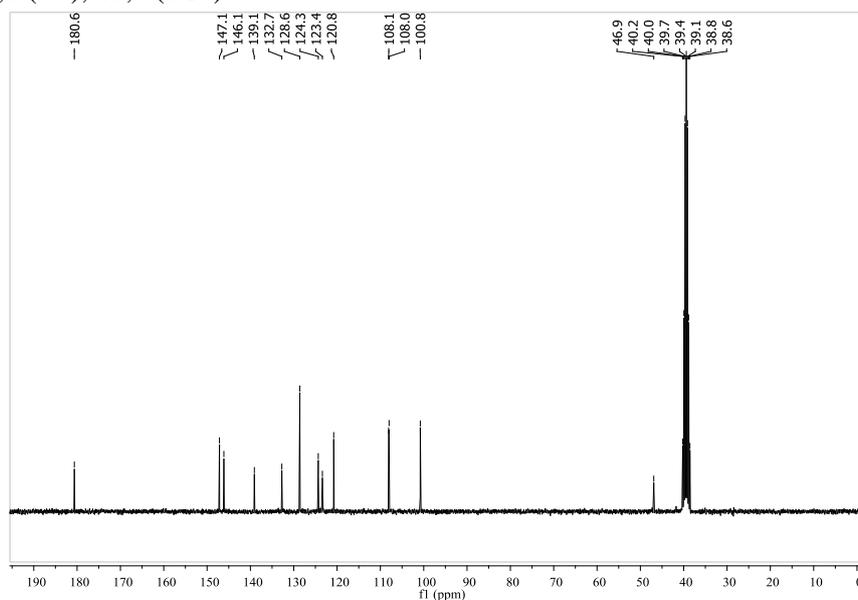
Faixa de fusão: 151,0 – 152,5 °C



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 7,73 (1H, s, NH-11), 7,37 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-16, H-18), 7,14 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-15, H-19), 6,81 (1H, s, H-6), 6,74 (2H, s, H-4, H-3), 6,09 (1H, sl, NH-13), 5,94 (2H, s, H-8), 4,74 (2H, d, *J* = 5,4 Hz, H-10)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,6 (C12), 147,1 (C2), 146,1 (C1), 139,1 (C14), 132,7 (C5), 128,6 (C16, C18), 124,4 (C17), 123,4 (C4), 120,8 (C15, C19), 108,1 (C3), 108,0 (C6), 100,8 (C8), 46,9 (C10).



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(4-metoxifenil)tioureia

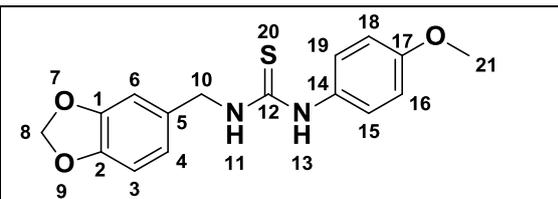
Código: RPF 604

Série: Ib

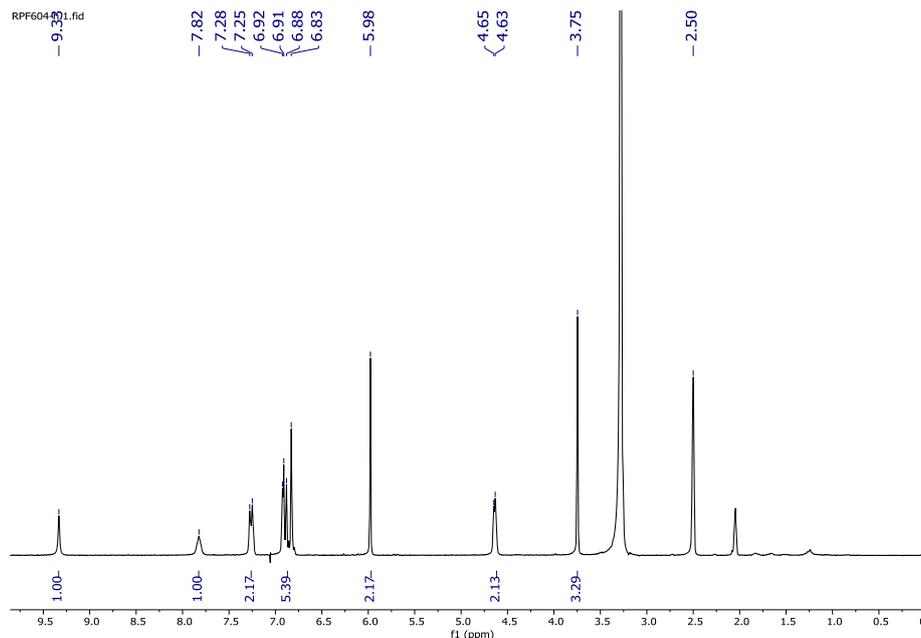
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 99,0 %

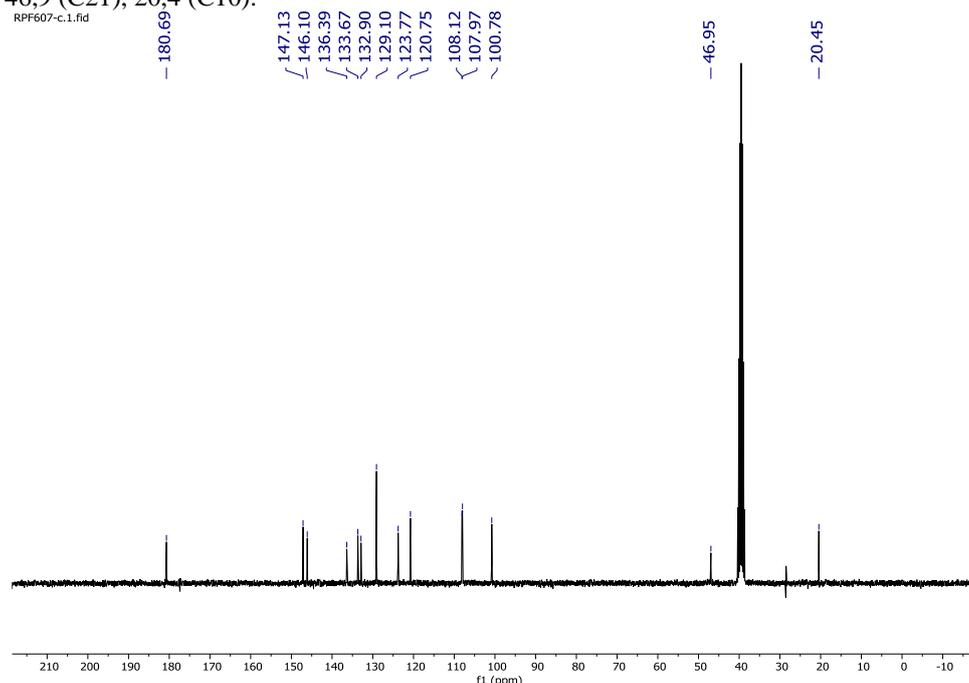
Faixa de fusão: 161,0 – 162,5 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 9,33 (1H, s, NH-11); 7,82 (1H, s, NH-13); 7,27 (2H, d, *J* = 8,4Hz, H-11, H-15); 6,92 (2H, d *J* = 4,2 Hz, H-12, H-14); 6,88 (1H, d, *J* = 7,3 Hz, H-3); 6,85 (1H, d, *J* = 5,9 Hz, H-4); 6,79 (1H, s, H-6); 5,97 (2H, s, H-8); 4,64 (2H, d, *J* = 4,5 Hz, H-10); 3,74 (3H, s, H-21)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,7 (C12), 147,1 (C2), 146,1(C1), 136,4 (C5), 133,7 (C17), 132,9 (C14), 129,1 (C15, C19), 123,0 (C4), 120,7 (C16, C18), 108,1 (C6), 107,9 (C3), 100,8 (C8), 46,9 (C21), 20,4 (C10).



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(p-tolil)tiourea

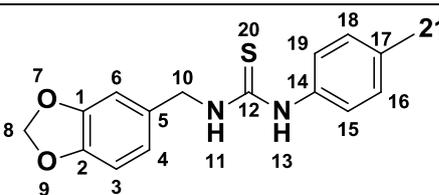
Código: RPF 605

Série: Ib

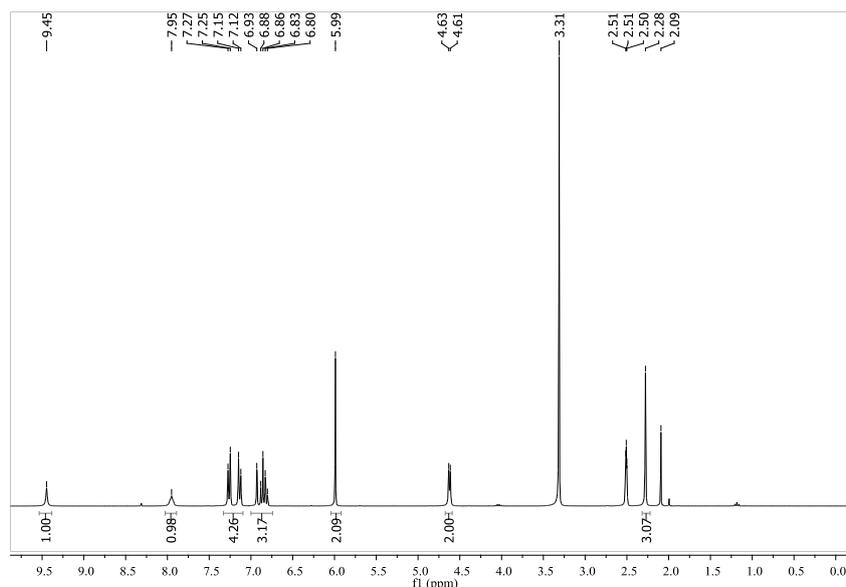
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 96,4 %

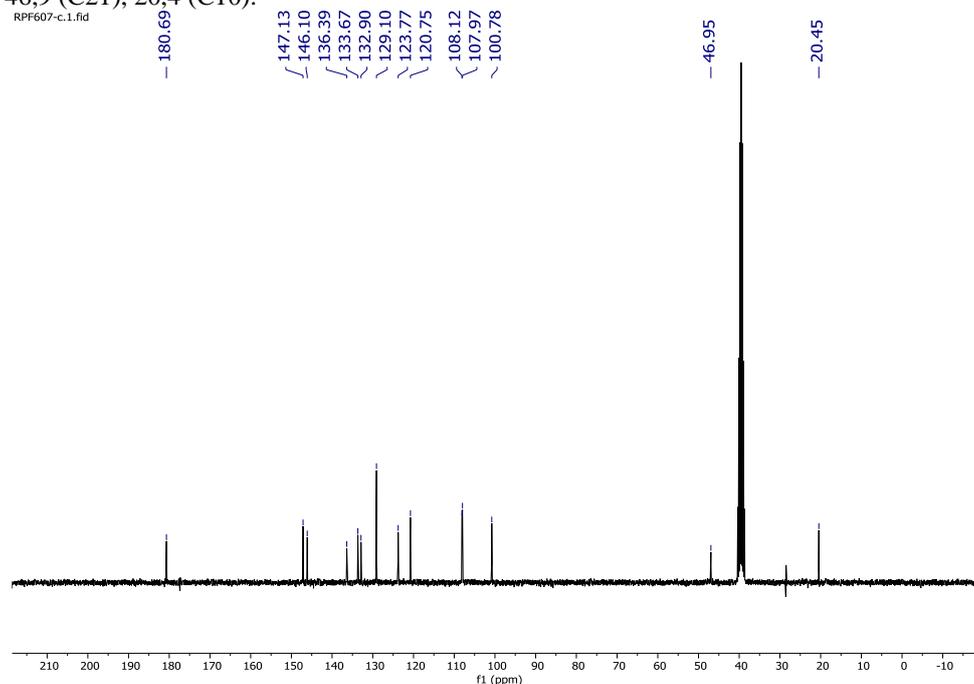
Faixa de fusão: 135,0 – 137,0 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 9,45 (1H, s, NH-11), 7,95 (1H, sl, NH-13), 7,23 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, H-16, H-18), 7,13 (2H, d, *J* = 8,3 Hz, H-15, H-19), 6,93 (1H, s, H-6), 6,87 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H-4), 6,82 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-3), 5,99 (2H, s, H-8), 4,62 (2H, d, *J* = 5,7 Hz, H-10), 2,28 (3H, s, H-21)



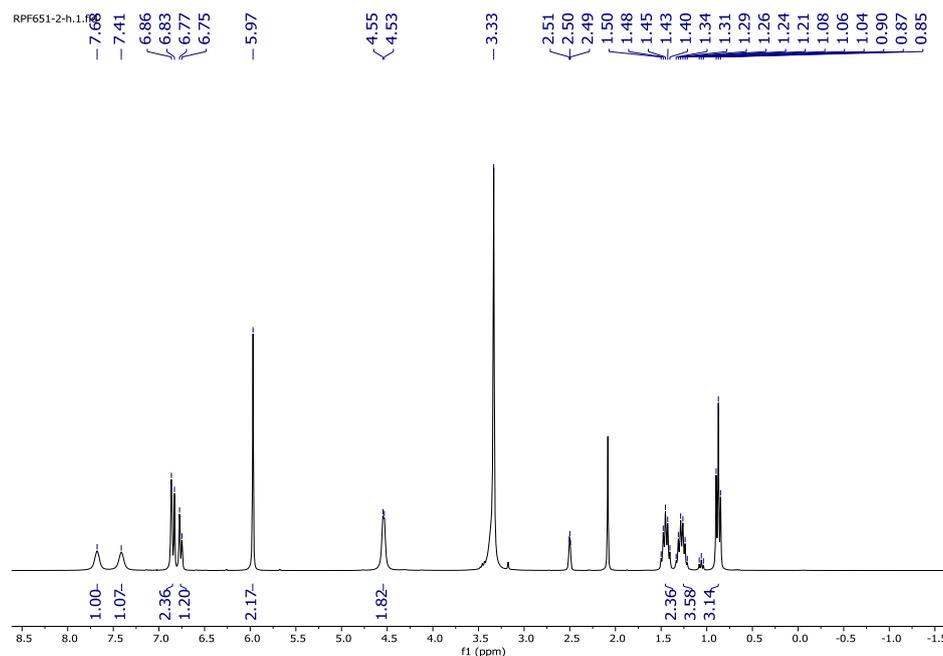
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,7 (C12), 147,1 (C2), 146,1 (C1), 136,4 (C5), 133,7 (C17), 132,9 (C14), 129,1 (C15, C19), 123,0 (C4), 120,7 (C16, C18), 108,1 (C6), 107,9 (C3), 100,8 (C8), 46,9 (C21), 20,4 (C10).



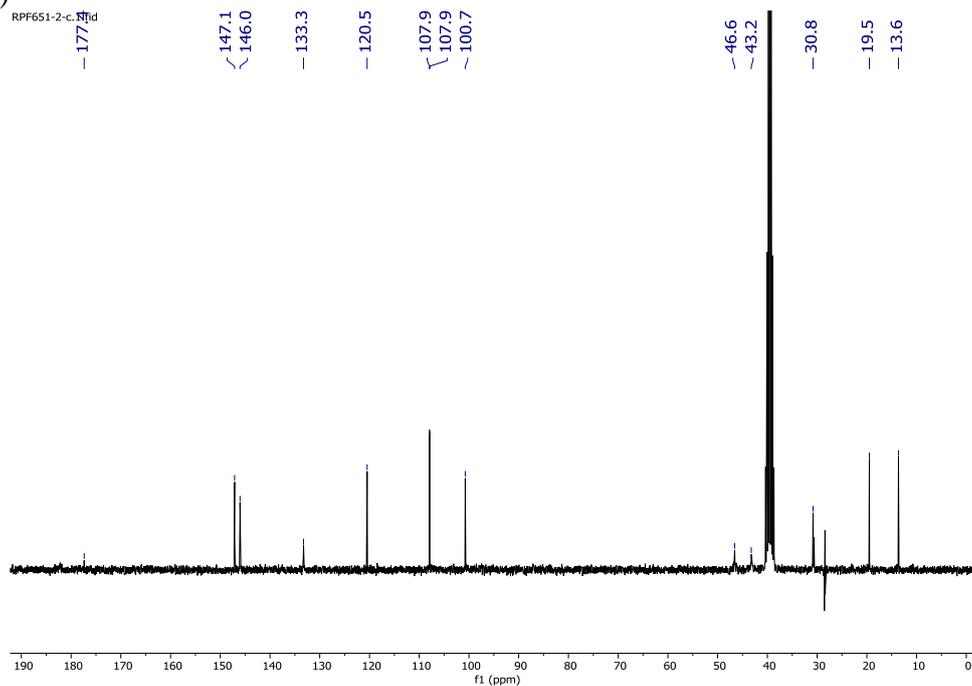
1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-3-butylthiourea

<p>Código: RPF 651 Série: Ib Aspecto: Sólido amarelo Pureza (HPLC): 99,1 % Faixa de fusão: 71,2 – 73,0 °C</p>	
--	--

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 7,68 (1H, s, NH-11); 7,41 (1H, sl, NH-13); 6,85 (2H, d, *J* = 10,1 Hz, H-6, H-3); 6,76 (H, d, *J* = 7,9 Hz, H-4); 5,97 (2H, s, H-8); 4,54 (2H, d, *J* = 6,0 Hz, H-10); 1,50-1,40 (2H, m, H-15); 1,34-1,21 (4H, m, H-16, H-17); 0,87 (3H, t, *J* = 7,3 Hz, H-18).



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 177,4 (C12), 147,1 (C1), 146,0 (C2), 133,2 (C5), 120,5 (C4), 107,9 (C6), 100,7 (C3), 46,6 (C8), 43,2 (C10, C15), 30,8 (C11), 19,5 (C17), 13,6 (C18)



1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-hexiltiureia

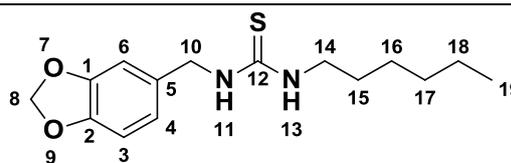
Código: RPF652

Série: Ib

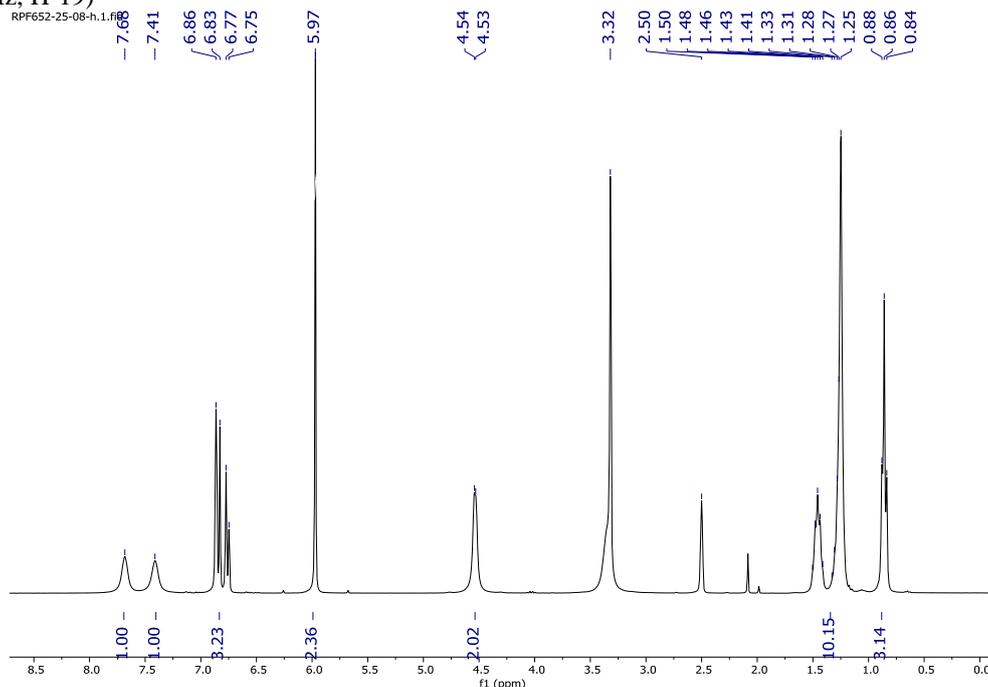
Aspecto: Sólido amarelo

Pureza (HPLC): 99,8 %

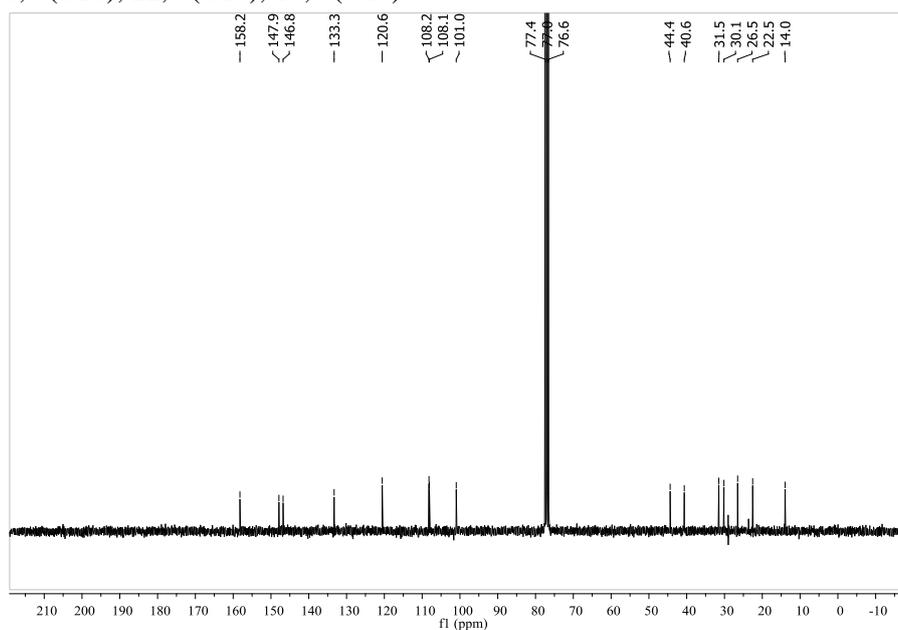
Faixa de fusão: 116,0 – 117,0 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 7,69 (1H, sl, NH-11), 7,42 (1H, sl, NH-13), 6,87 (1H, s, H-6), 6,85 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-4), 6,76 (1H, d, *J* = 9,3 Hz, H-3), 5,98 (2H, s, H-8), 4,54 (2H, d, *J* = 4,2 Hz, H-10), 1,45 (2H, q, *J* = 6,6 Hz, H-15), 1,26 (8H, sl, H-14, H-16, H-17, H-18), 0,87 (3H, t, *J* = 6,7 Hz, H-19)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 158,2 (C12), 147,9 (C2), 146,8 (C1), 133,3 (C5), 120,6 (C4), 108,2 (C3), 108,1 (C6), 101,0 (C8), 44,4 (C10), 40,6 (C14), 31,5 (C17), 30,1 (C15), 26,5 (C16), 22,5 (C18), 14,0 (C19)



1-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-fenilureia

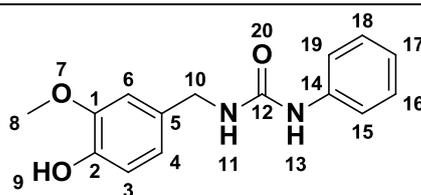
Código: RPF 511

Série: IIa

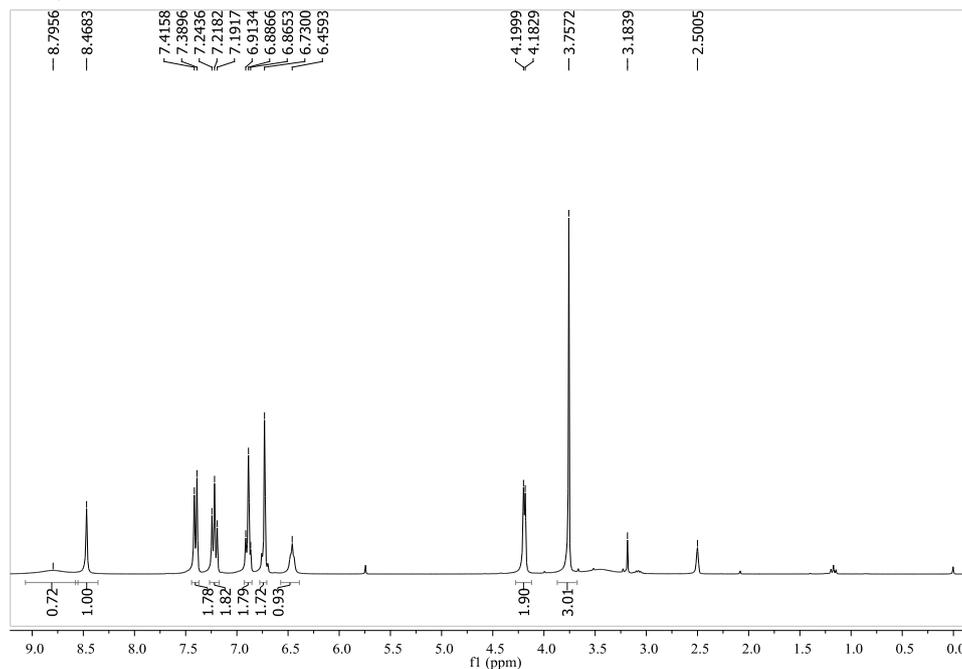
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 99,6 %

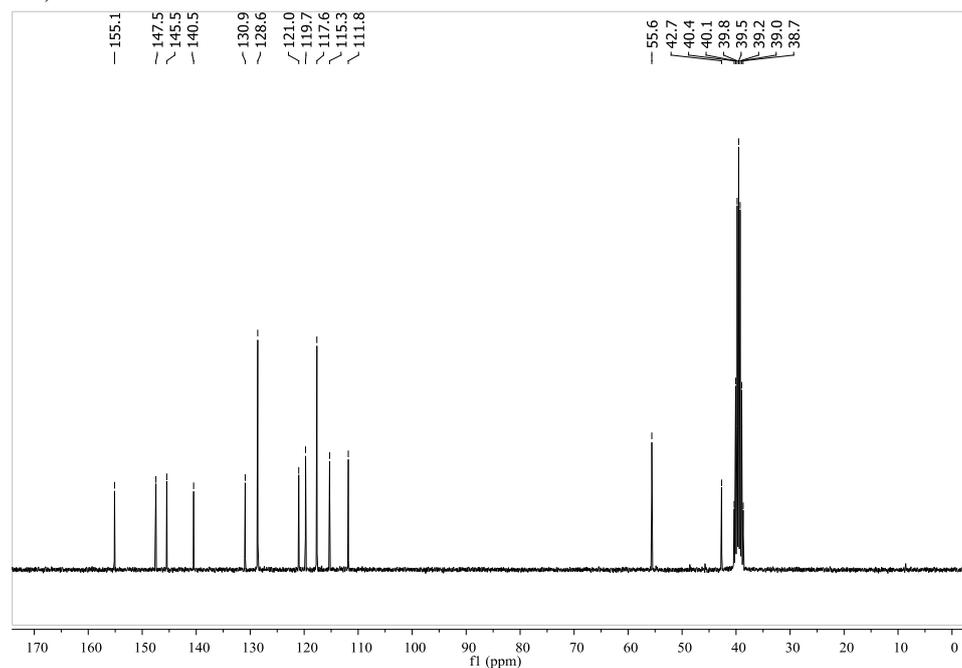
Faixa de fusão: 181,7 – 183,6 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,79 (1H, s, OH-9), 8,47 (1H, s, NH-11), 7,40 (2H, d, *J* = 7,9 Hz, H-3, H-4), 7,21 (2H, t, *J* = 7,8 Hz, H-16, H-18), 6,90 (2H, t, *J* = 8,1 Hz, H-15, H-19), 6,75 (1H, s, NH-13), 6,72 (1H, s, H-6), 6,46 (1H, t, *J* = 4,8 Hz, H-17) 4,19 (2H, d, *J* = 5,1 Hz, H-10), 3,75 (3H, s, H-8).



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,1 (C12), 147,5 (C1), 145,5 (C2), 140,5 (C14), 130,9 (C5), 128,6 (C16, C18), 121,0 (C17), 119,7 (C4), 117,6 (C15, C19) 115,3 (C3), 111,8 (C6), 55,6 (C8), 42,7 (C10)



1-(4-hydroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-nitrofenil)ureia

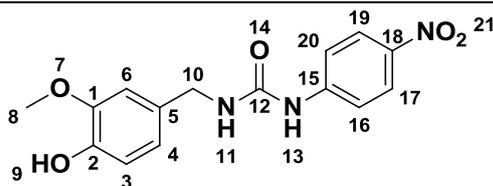
Código: RPF 512

Série: IIa

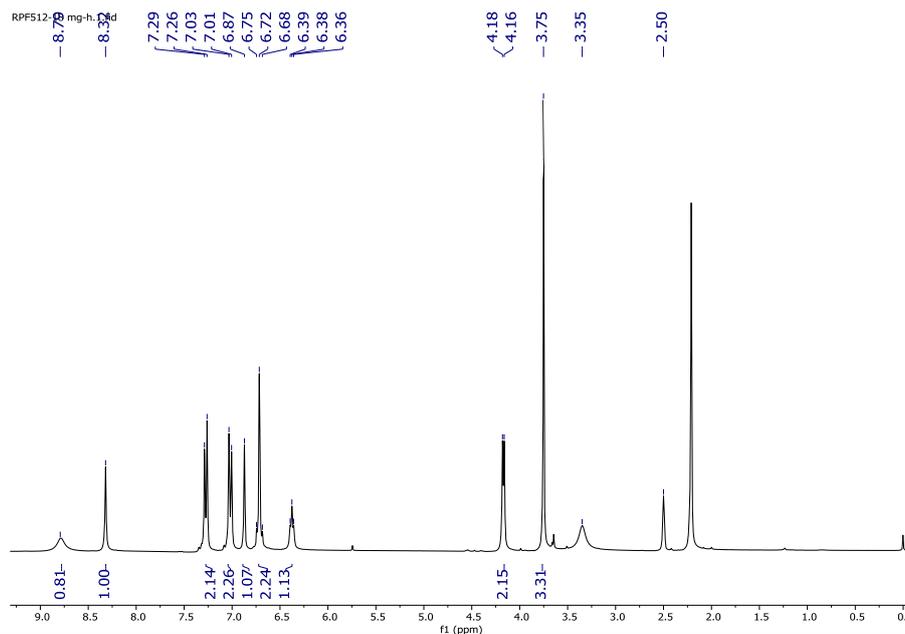
Aspecto: Sólido amarelado

Pureza (HPLC): 95,0 %

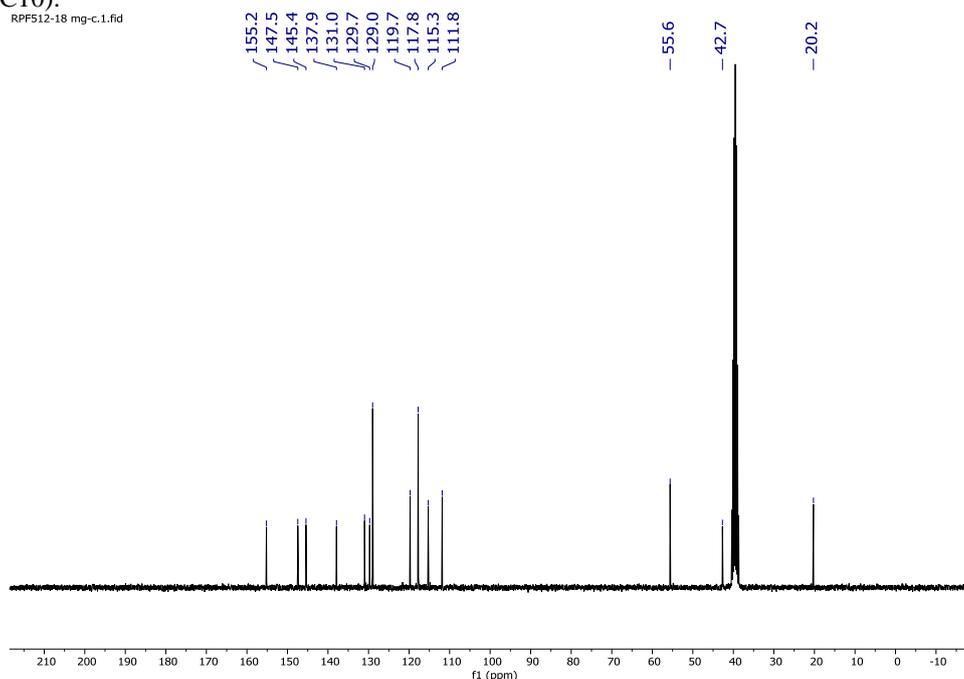
Faixa de fusão: 182,0 – 183,1 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,79 (1H, sl, OH-9); 8,32 (1H, s, NH-13); 7,27 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, H-17, H-19); 7,02 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, H-16, H-20); 6,87 (1H, s, H-6); 6,75 – 6,68 (2H, m, H-3, H-4); 6,38 (1H, t, *J* = 5,4 Hz, NH-11); 4,17 (2H, d, *J* = 5,4 Hz, H-10); 3,75 (3H, s, H-8).



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,2 (C12), 147,5 (C1), 145,4 (C2), 137,9 (C15), 131,0 (C5), 129,7 (C13, C17), 129,0 (C18), 119,7 (C4), 117,8 (C16, C20), 115,3 (C3), 111,8 (C6), 55,6 (C8), 42,7 (C10).



1-(4-clorofenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)ureia

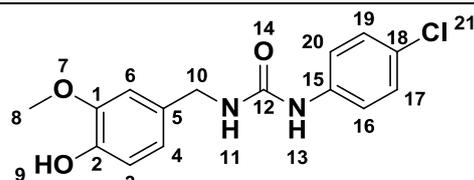
Código: RPF 513

Série: IIa

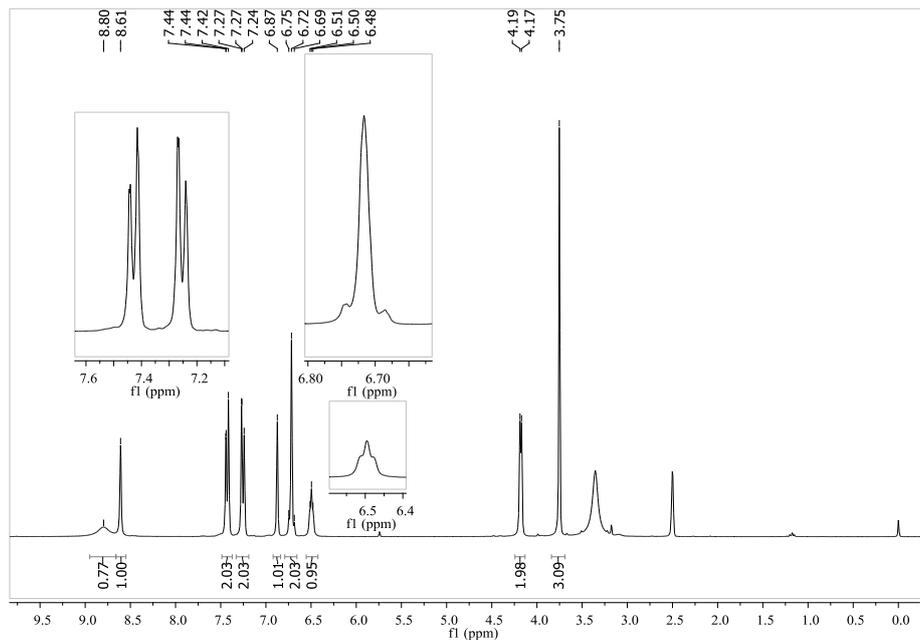
Aspecto: Pó cristalino branco

Pureza (HPLC): 99,8 %

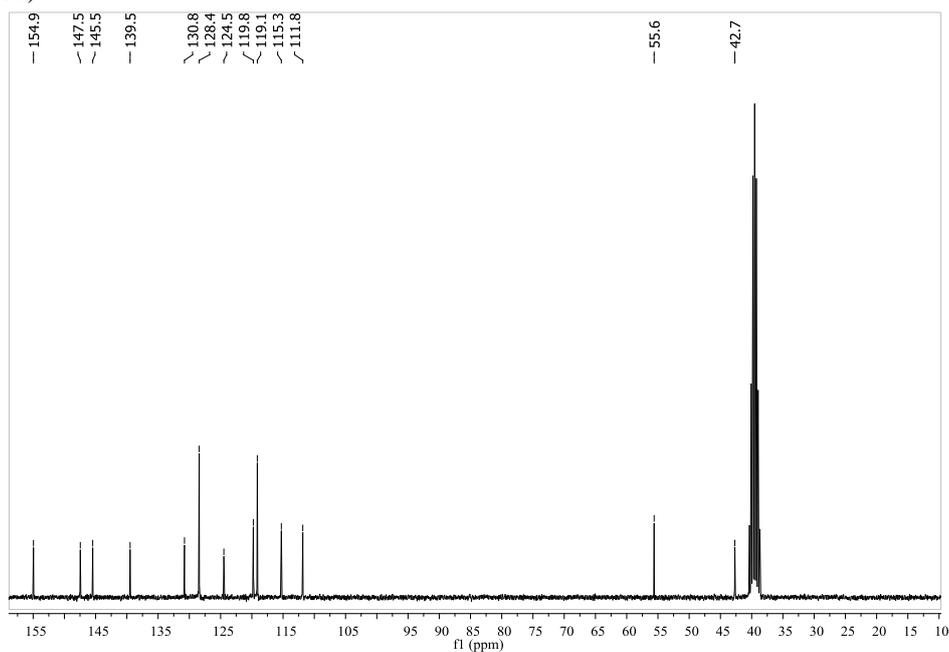
Faixa de fusão: 198,4 – 199,9 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,80 (1H, sl, OH-9), 8,61 (1H, s, NH-13), , 7,44 (2H, d, *J* = 7,40 Hz, H-16, H-19), 7,25 (2H, d, *J* = 7,40 Hz, H-17, H-19), 6,87 (1H, s, H-6), 6,73 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-4), 6,70 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-3), 6,50 (1H, t, *J* = 5,0 Hz, NH-11), 4,18 (2H, d, *J* = 4,8 Hz, H-10), 3,75 (3H, s, H-8)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 154,9 (C12), 147,5 (C1), 145,5 (C2), 139,5 (C15), 130,8 (C5), 128,4 (C13, C17), 124,5 (C18), 119,8 (C4), 119,1 (C16, C20), 115,3 (C3), 113,6 (C6), 55,7 (C8), 42,7 (C10)



1-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-metoxifenil)ureia

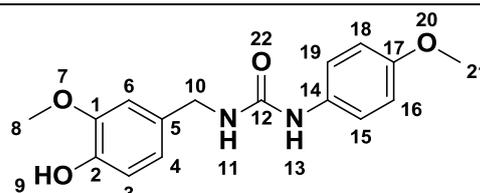
Código: RPF 514

Série: IIa

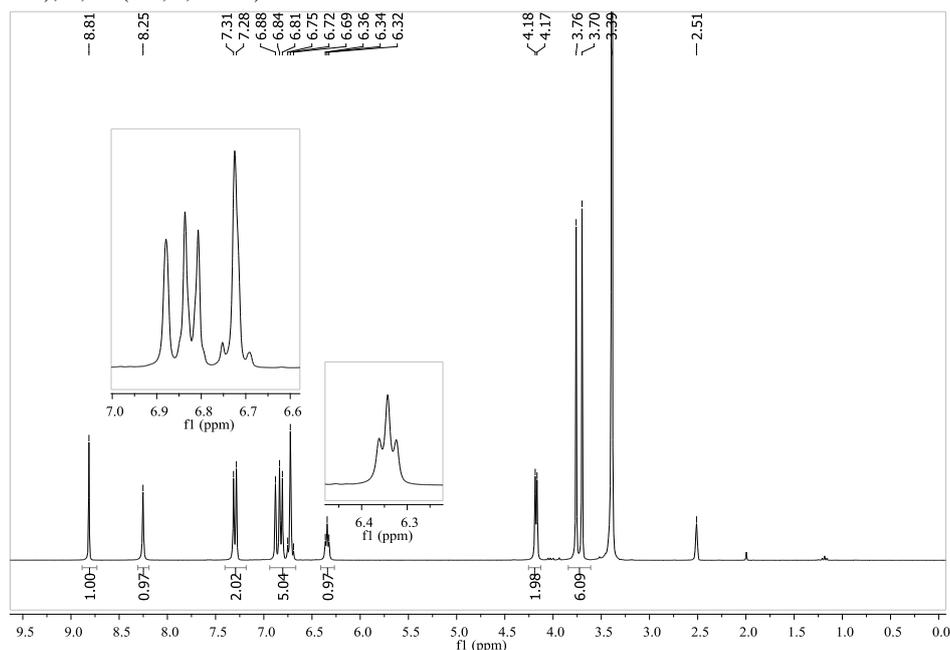
Aspecto: Pó cristalino branco

Pureza (HPLC): 99,4 %

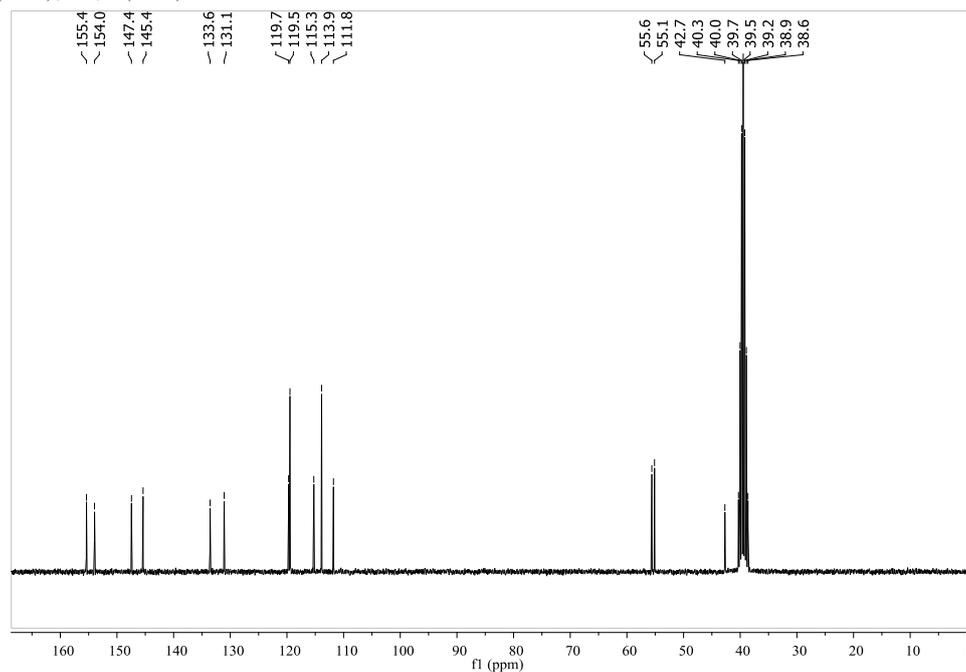
Faixa de fusão: 154,9 – 156,8 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,81 (1H, s, OH-9), 8,25 (1H, s, NH-13), , 7,31 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-15, H-19), 6,88 (1H, s, H-6), 6,82 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, H-16, H-18), 6,74 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-4), 6,71 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-3), 6,34 (1H, t, *J* = 5,6 Hz, NH-11), 4,18 (2H, d, *J* = 5,7 Hz, H-10), 3,76 (3H, s, H-8), 3,70 (3H, s, H-21)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,4 (C12), 154,0 (C17), 147,4 (C1), 145,4 (C2), 133,6 (C14), 131,1 (C5), 119,7 (C4), 119,5 (C19, C15), 115,3 (C3), 113,9 (C19, C16), 111,8 (C6), 55,6 (C8), 55,1 (C21), 42,7 (C10)



1-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(p-tolil)ureia

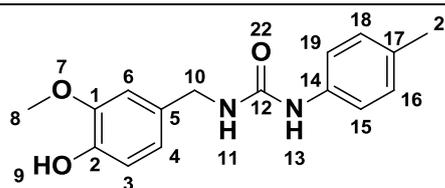
Código: RPF 515

Série: IIa

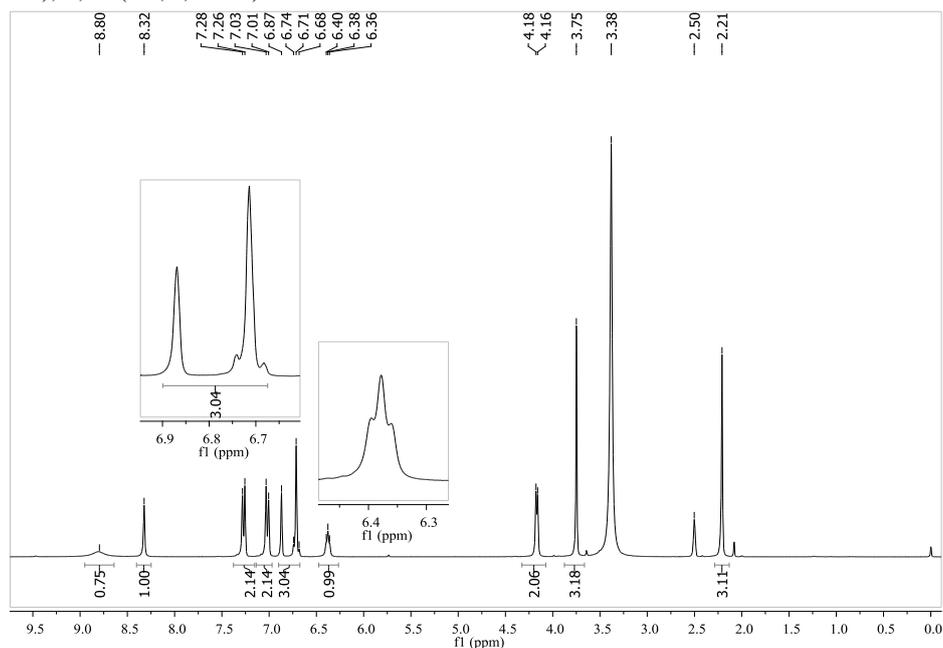
Aspecto: Pó cristalino branco

Pureza (HPLC): 98,6 %

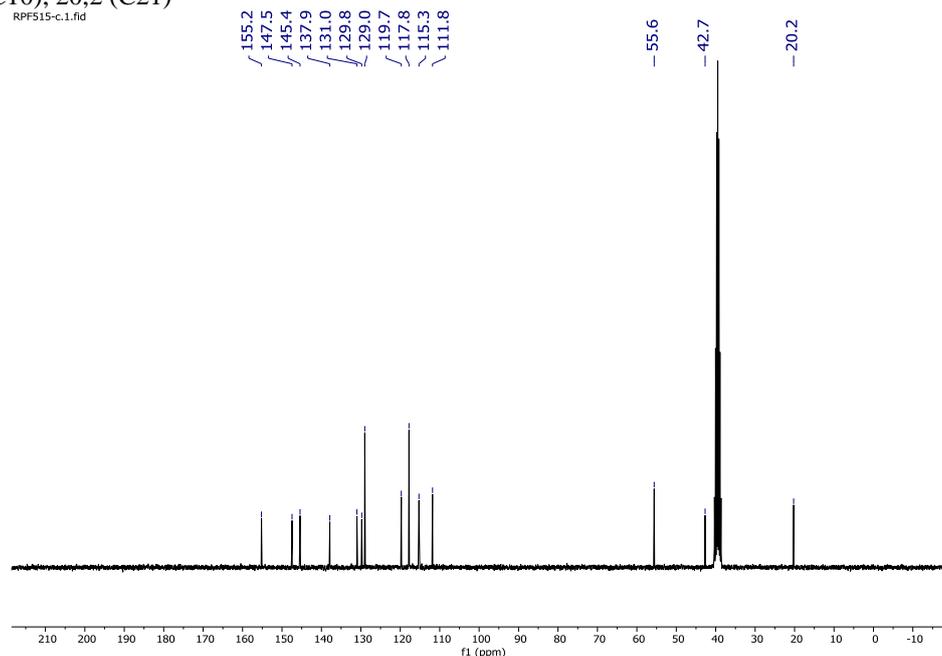
Faixa de fusão: 198,4 – 199,9 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 8,80 (1H, sl, OH-9), 8,32 (1H, s, NH-13), 7,27 (2H, d, *J* = 7,6 Hz, H-15, H-19), 7,02 (2H, d, *J* = 8,0, H-16, H-18), 6,87 (1H, s, H-6), 6,73 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-4), 6,69 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-3), 6,38 (1H, t, *J* = 5,1 Hz, NH-11), 4,17 (2H, d, *J* = 5,2 Hz, H-10), 3,17 (3H, s, H-8), 2,21 (3H, s, H-20)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 155,2 (C12), 147,5 (C1), 145,4 (C2), 137,9 (C15), 131,0 (C5), 129,8 (C13, C17), 129,0 (C18), 119,7 (C4), 117,8 (C16, C20), 115,3 (C3), 111,8 (C6), 55,6 (C8), 42,7 (C10), 20,2 (C21)



1-butil-3-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)ureia

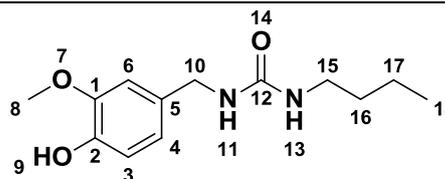
Código: RPF 561

Série: IIa

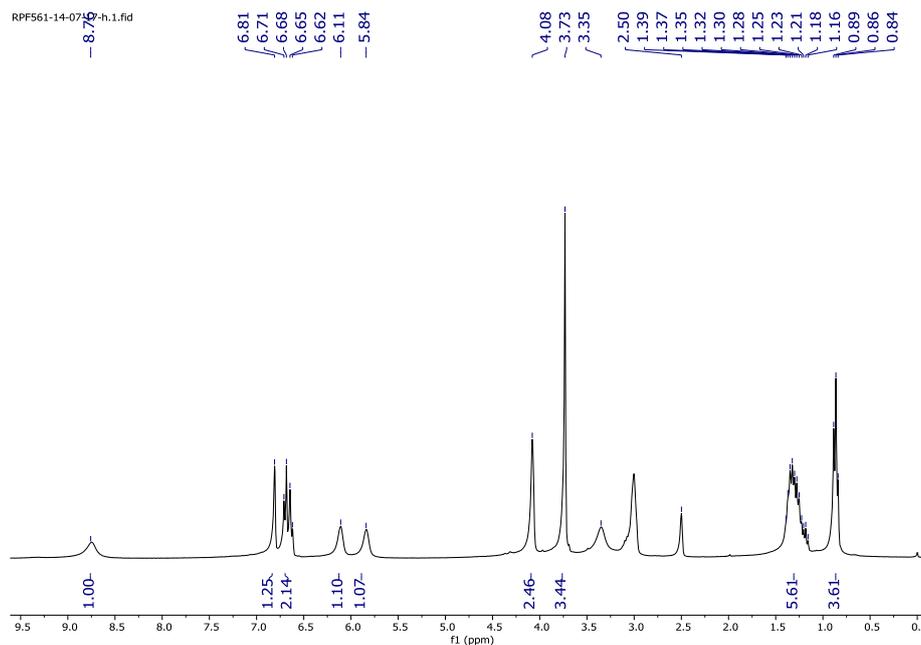
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 98,6 %

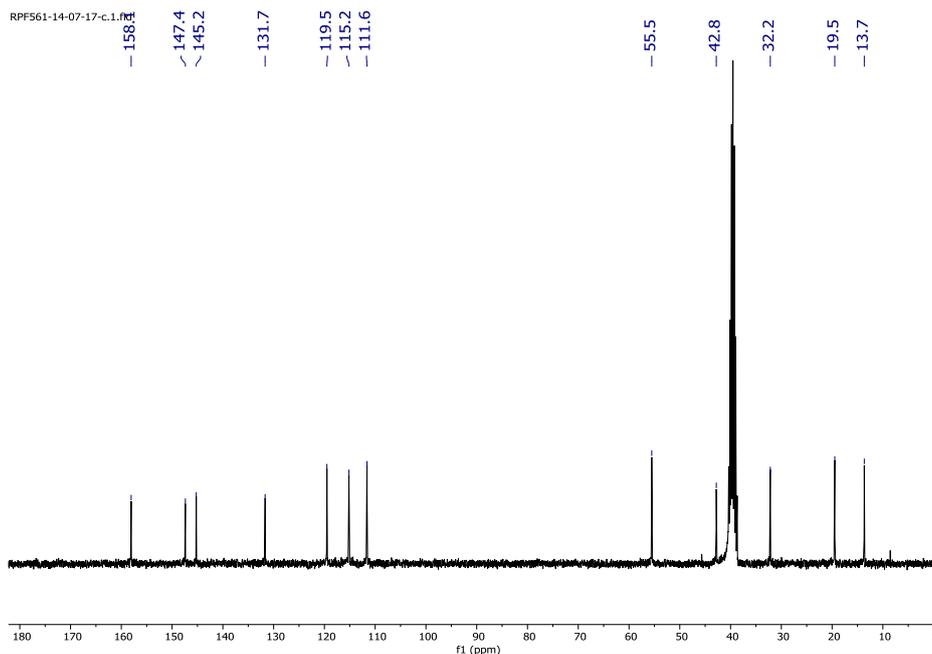
Faixa de fusão: 96,7 – 98,5 °C



RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ = ppm) δ : 8,76 (1H, sl, OH-9); 6,81 (1H, s, H-6); 7,60 (1H, d, J = 7,9 Hz, H-3); 6,63 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-4); 6,11 (1H, sl, NH-11); 5,84 (1H, sl, NH-13); 4,08 (2H, s, H-10); 3,73 (3H, s, H-8); 1,39 – 1,16 (6H, m, H-15, H-16, H-17); 0,86 (3H, t, J = 7,1 Hz, H-18).



RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ = ppm) δ : 158,1 (C12), 147,4 (C1), 145,2 (C2), 131,7 (C5), 119,5 (C4), 115,2 (C3), 111,6 (C6), 55,8 (C8), 55,5 (C10), 42,8 (C15), 32,2 (C18), 19,5 (C16), 13,7 (C17).



1-hexil-3-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)ureia

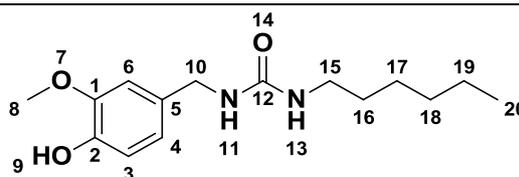
Código: RPF 562

Série: IIa

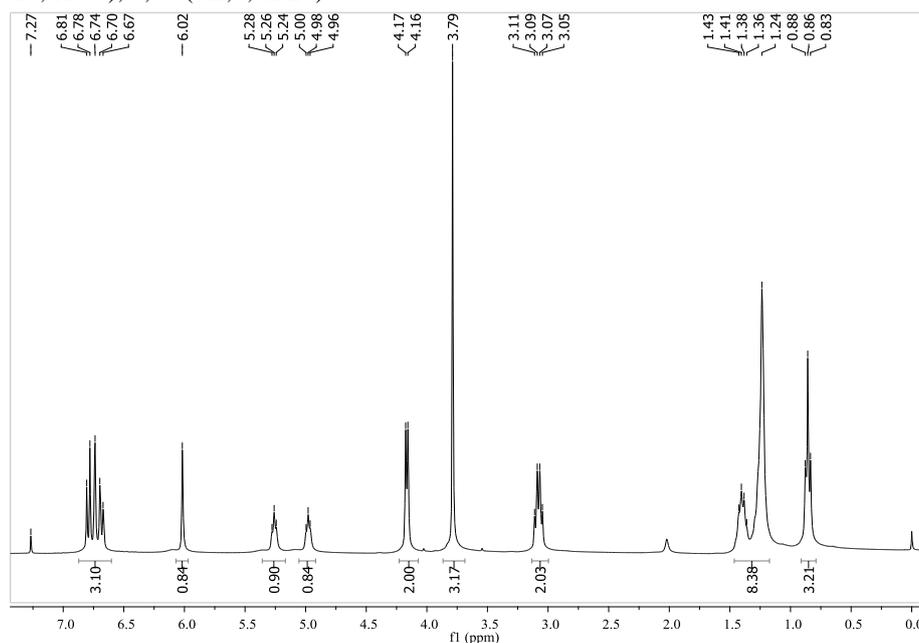
Aspecto: Pó amarelado

Pureza (HPLC): 98,8 %

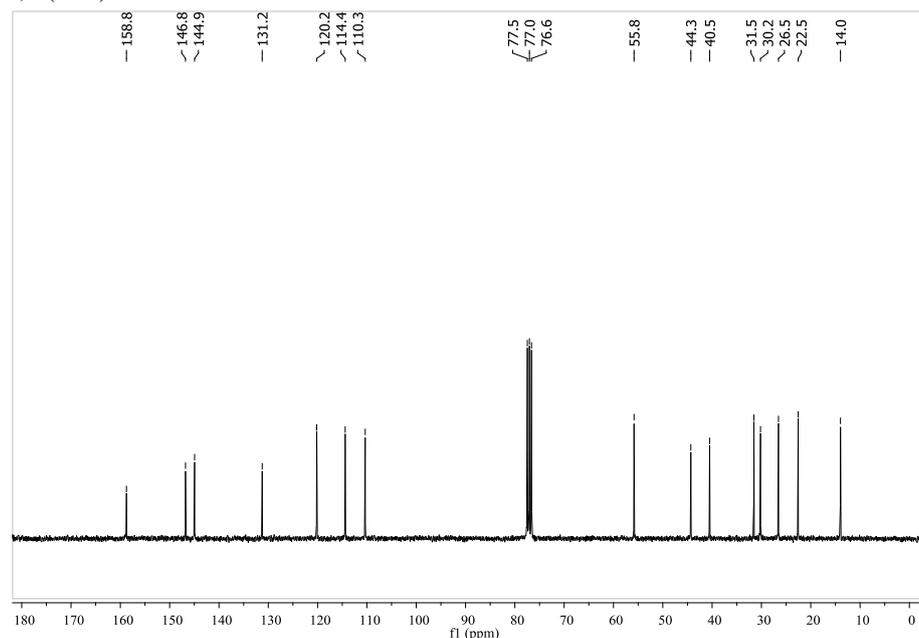
Faixa de fusão: 83,4 – 84,6 °C



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 6,79 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-4), 6,79 (1H, s, H-6), 6,68 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-3), 6,02 (1H, s, OH-9), 5,26 (1H, t, *J* = 5,3 Hz, NH-13), 4,98 (1H, t, *J* = 5,0 Hz, NH-11), 4,17 (2H, d, *J* = 5,5 Hz, H-10), 3,79 (3H, s, H-8), 3,08 (q, *J* = 6,7 Hz, H-15), 1,43-1,36 (8H, m, H-16, H-17, H-18, H-19), 0,89 (3H, t, H-20)



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 158,8 (C12), 146,8 (C1), 144,9 (C2), 131,2 (C5), 120,2 (C4), 114,4 (C3), 110,3 (C6), 55,8 (C8), 44,3 (C10), 40,5 (C15), 31,5 (C18), 30,2 (C16), 26,5 (C17), 22,5 (C19), 14,0 (C20)



1-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-feniltiourea

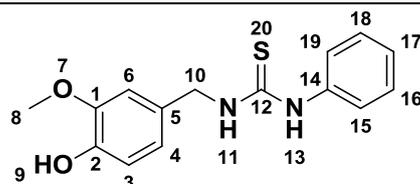
Código: RPF 611

Série: Ib

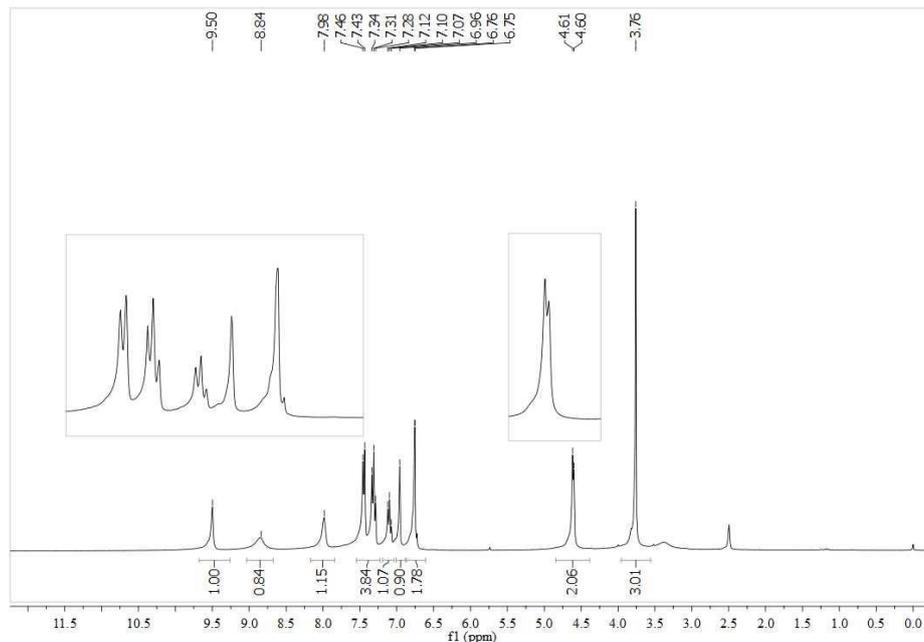
Aspecto: Pó cristalino branco

Pureza (HPLC): 99,6 %

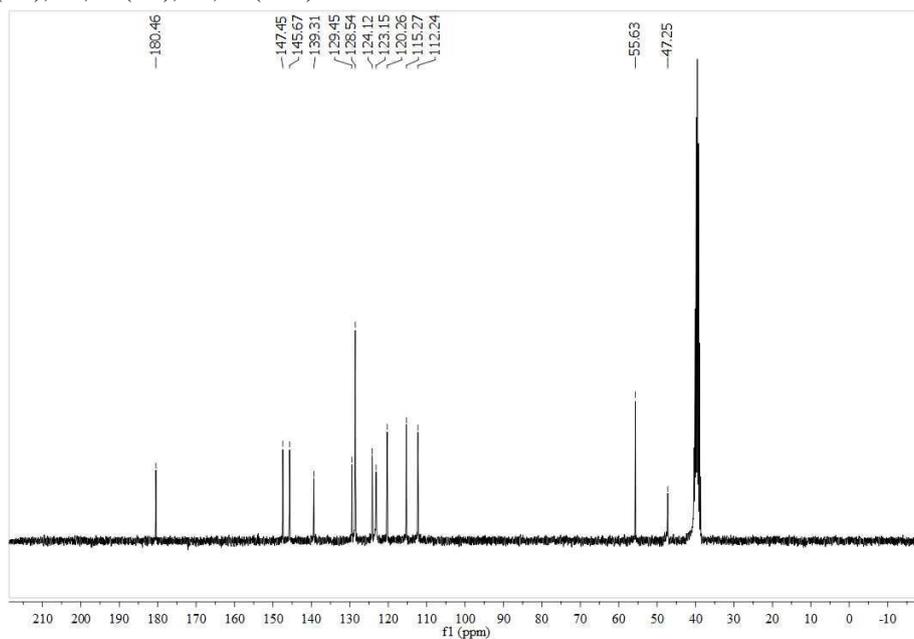
Faixa de fusão: 181,7 – 183,2 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 9,50 (1H, s, OH-9), 8,84 (1H, s, NH-13), 7,98 (1H, s, OH-11) 7,46 (2H, d, *J* = 7,44 Hz, H-15, H-19), 7,34 (2H, d, *J* = 7,32 Hz, H-16, H-18), 7,12 (1H, t, *J* = 7,11 Hz, H-17), 6,96 (1H, s, H-6), 6,76 (2H, d, *J* = 6,75 Hz, H-3, H-4), 4,61 (2H, d, *J* = 4,61 Hz, H-10), 3,76 (3H, s, H-8).



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,46 (C12), 147,46 (C1), 145,67 (C2), 139,31 (C14), 129,45 (C17), 128,54 (C16, C17, C18), 124,12 (C5), 123,15 (C4), 120,26 (C15, C19), 115,27 (C3), 112,24 (C6), 55,63 (C8), 47,25 (C10)



1-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(4-nitrofenil)tiourea

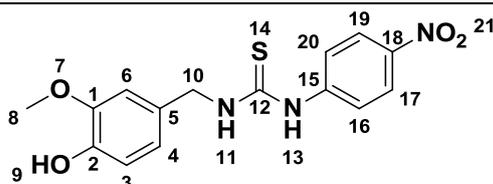
Código: RPF 612

Série: Ib

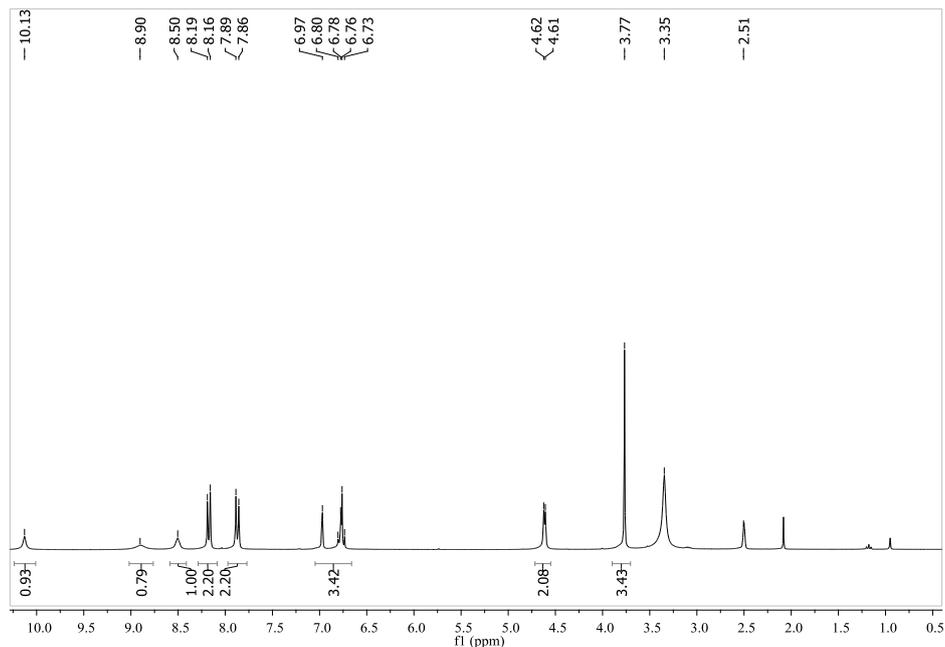
Aspecto: Pó amarelado

Pureza (HPLC): 99,1 %

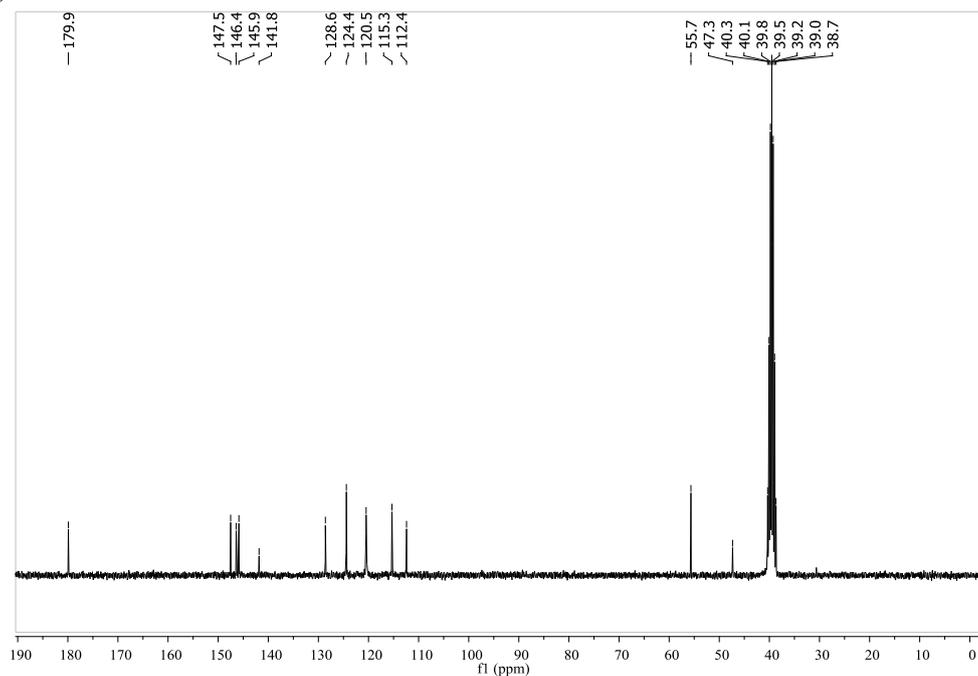
Faixa de fusão: 163,7 – 164,9 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 10,13 (1H, s, OH-9), 8,90 (1H, sl, NH-13), 8,50 (1H, s, NH-11), 8,17 (2H, d, *J* = 9,2 Hz, H-16, H-20), 7,87 (2H, d, *J* = 9,2 Hz, H-17, H-19), 6,97 (1H, s, H-6), 6,79 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-4), 6,75 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-3), 4,61 (2H, d, *J* = 5,1 Hz, H-10), 3,77 (3H, s, H-8)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 179,9 (C12), 147,5 (C1), 146,4 (C2), 145,9 (C18, C15), 141,8 (C5), 128,6 (C17, C19), 124,4 (C4), 120,5 (C20, C16), 115,3 (C3), 112,4 (C6), 55,7 (C8), 47,3 (C10)



1-(4-clorofenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)ureia

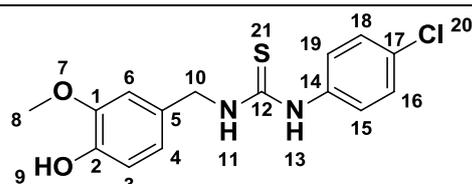
Código: RPF 613

Série: Ib

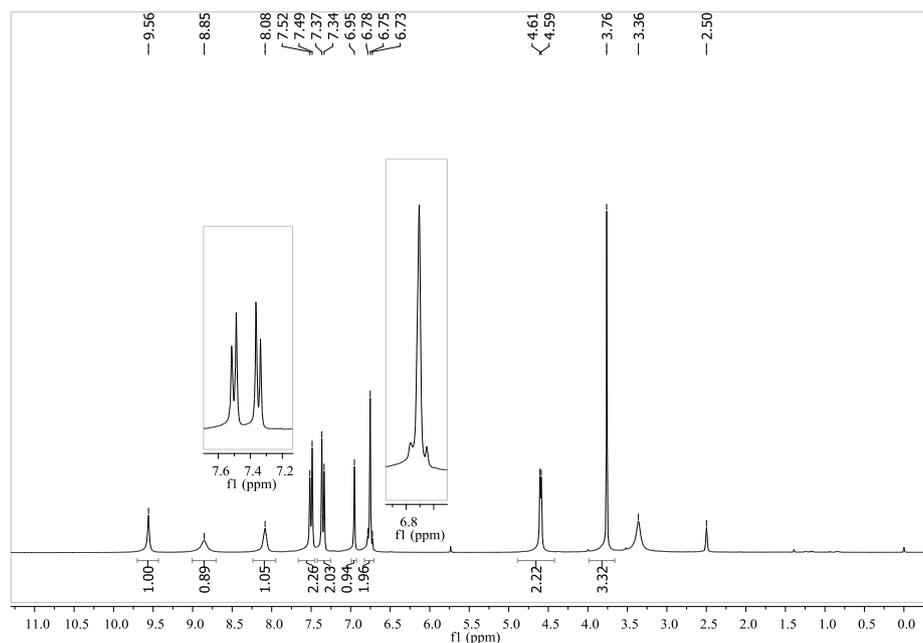
Aspecto: Pó cristalino branco

Pureza (HPLC): 98,5 %

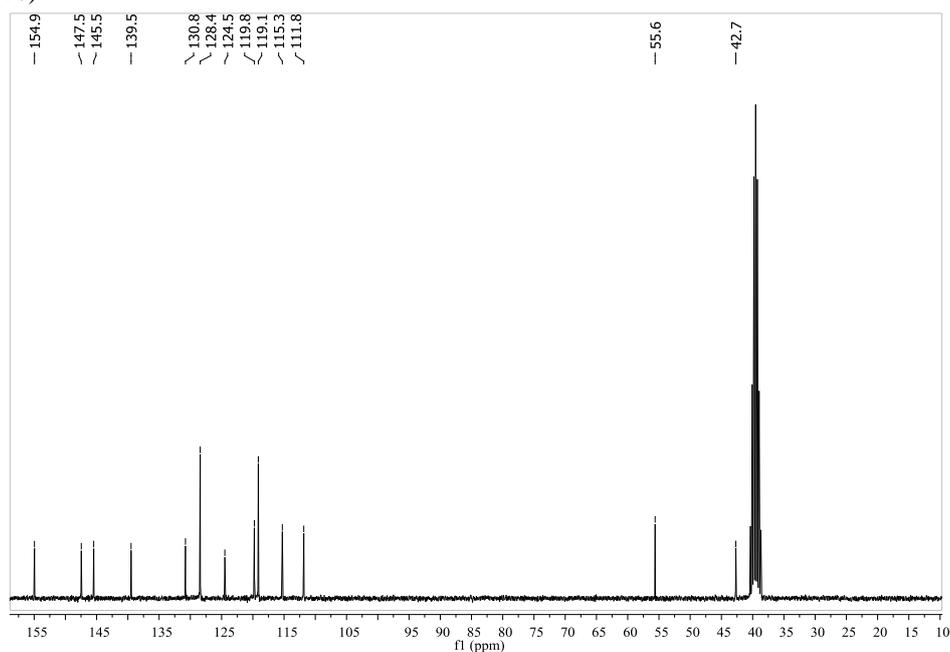
Faixa de fusão: 145,0 – 154,7 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ 9,56 (1H, s, NH-13), 8,85 (1H, sl, OH-9), 8,08 (1H, s, NH-11), 7,50 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-16, H-18), 7,35 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-15, H-19), 6,95 (1H, s, H-6), 6,77 (1H, d, *J* = 9,3 Hz, H-3), 6,74 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-4), 4,60 (2H, d, *J* = 5,1 Hz, H-10), 3,76 (3H, s, H-8)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,5 (C12), 147,5 (C1), 145,7 (C2), 138,4 (C14), 129,3 (C5), 128,3 (C16, C18), 127,8 (C17), 124,6 (C4), 120,3 (C15, C19), 115,3 (C3), 112,3 (C6), 55,6 (C8), 47,3 (C10)



1-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(p-tolil)tiourea

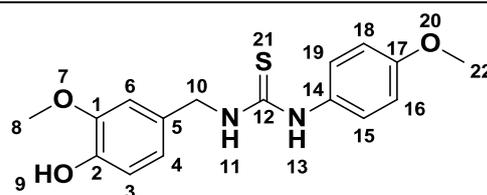
Código: RPF 614

Série: IIb

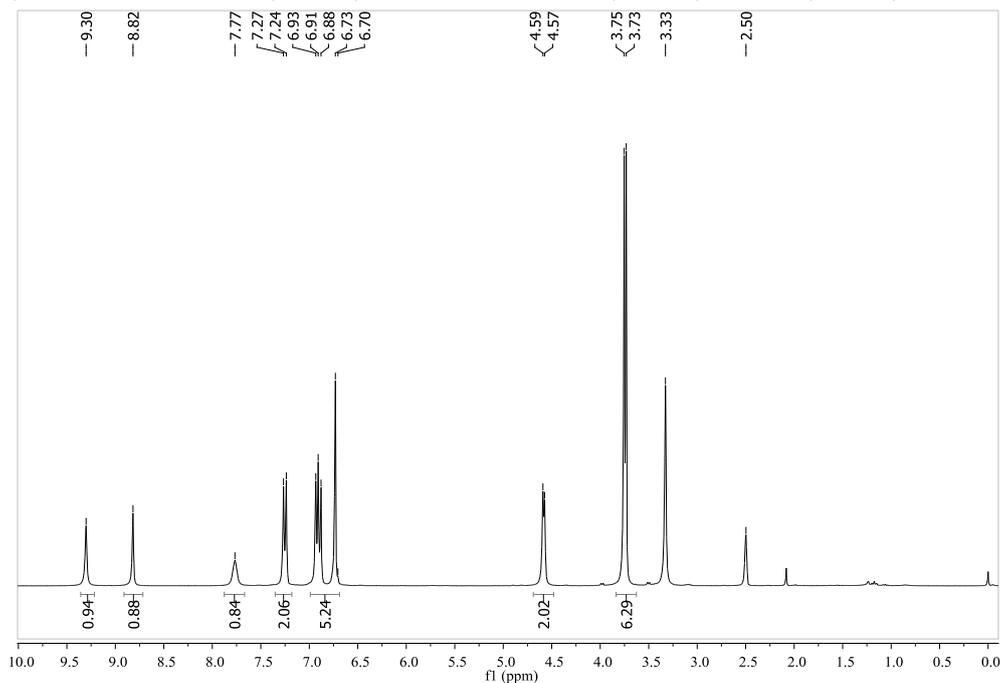
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 98,8 %

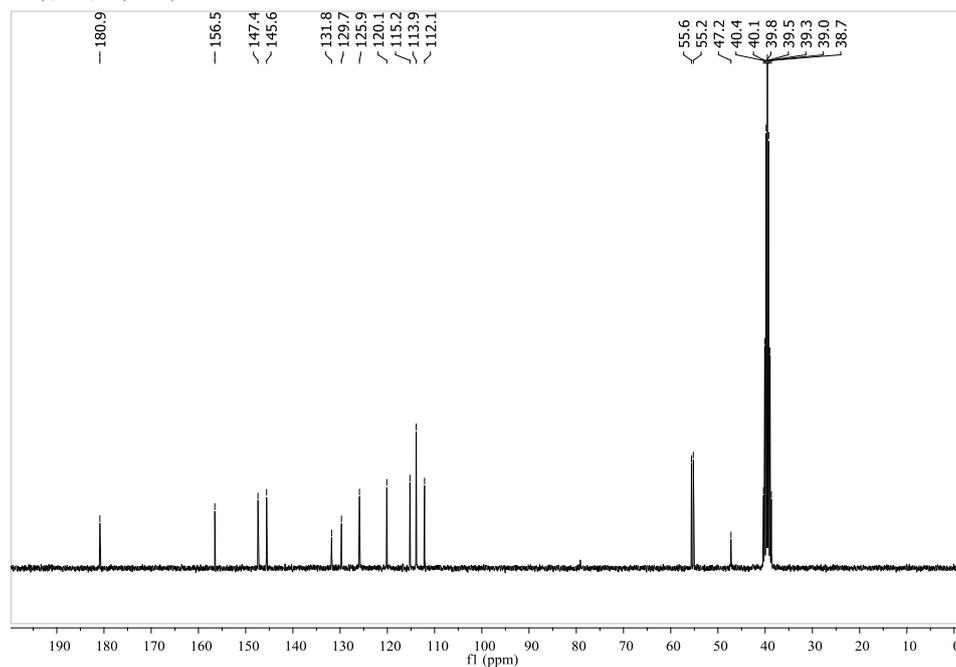
Faixa de fusão: 140,0 – 141,3 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 9,30 (1H, s, OH-9), 8,82 (1H, s, NH-11), 7,77 (1H, sl, NH-13), 7,25 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-16, H-20), 6,93 (1H, s, H-6), 6,89 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-17, H-19), 6,72 (2H, d, *J* = 7,9 Hz, H-10), 4,58 (2H, d, *J* = 5,1 Hz, H-10), 3,75 (3H, s, H-8), 3,73 (3H, s, H-22)



RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ= ppm) δ: 180,9 (C12), 156,5 (C18), 147,4 (C1), 145,6 (C2), 131,8 (C15), 129,7 (C5), 125,9 (C16, C20), 120,1 (C4), 115,2 (C3), 113,9 (C17, C19), 112,1 (C6), 55,6 (C8), 55,2 (C22), 47,2 (C10)



1-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3-(p-tolil)tiourea

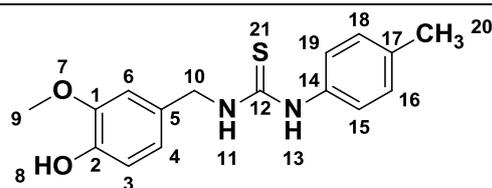
Código: RPF 615

Série: IIb

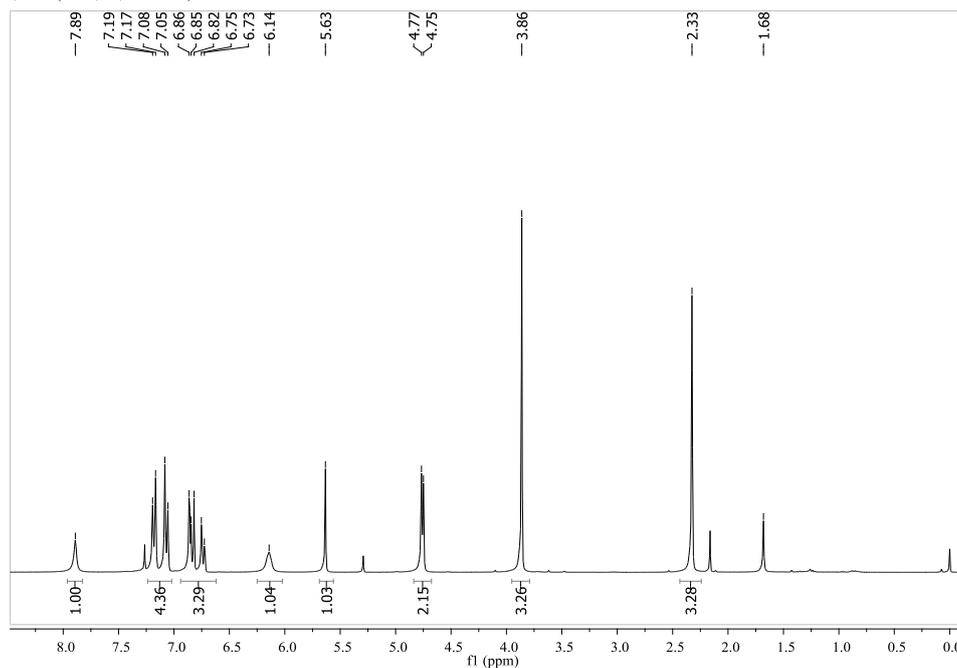
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 99,3 %

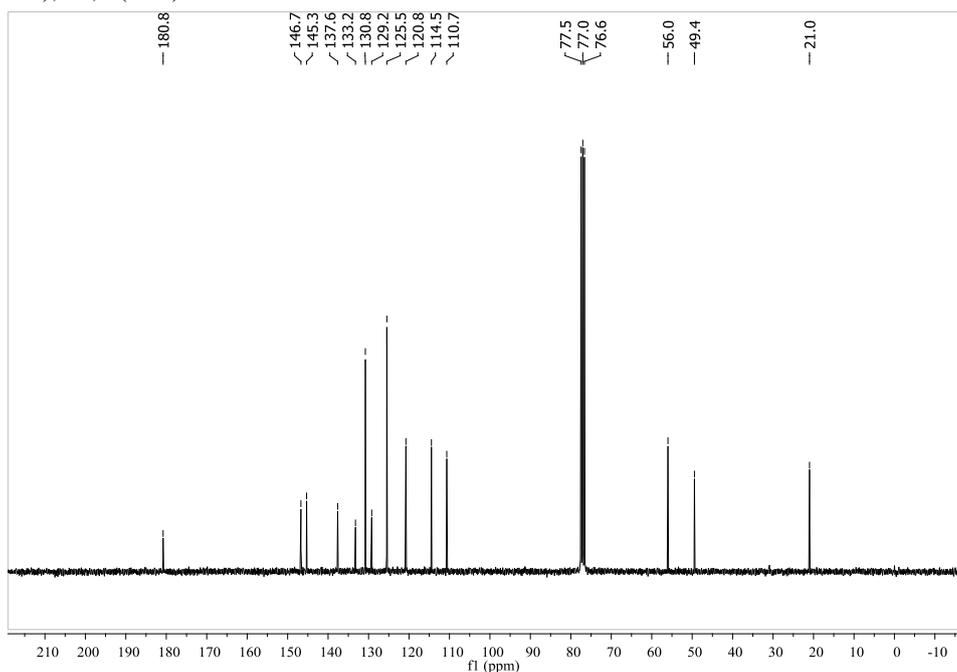
Faixa de fusão: 131,4 – 133,3 °C



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 7,89 (1H, s, OH-8), 7,18 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, H-16, H-18), 7,07 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, H-15, H-19), 6,87 (1H, s, H-6), 6,83 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-4), 6,74 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-3), 6,14 (1H, sl, NH-13), 5,63 (1H, s, NH-11), 4,76 (2H, d, *J* = 5,3 Hz, H-10), 3,86 (3H, s, H-9), 2,33 (3H, s, H-20)



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 180,8 (C12), 146,7 (C1), 145,3 (C2), 137,6 (C14), 133,2 (C17), 130,8 (C5), 129,2 (C16, C18), 125,5 (C4), 120,8 (C15, C19), 114,5 (C3), 110,7 (C6), 56,0 (C9), 49,4 (C10), 21,0 (C20)



1-hexil-3-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)tiourea

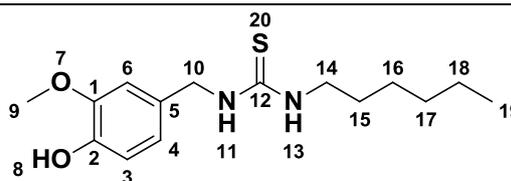
Código: RPF 662

Série: IIb

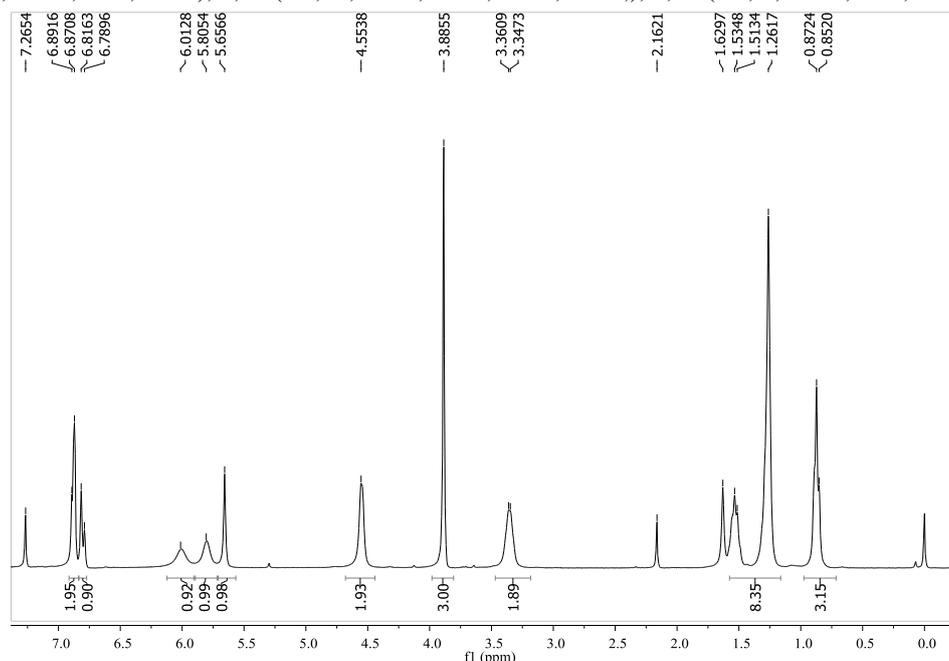
Aspecto: Sólido branco

Pureza (HPLC): 97,3 %

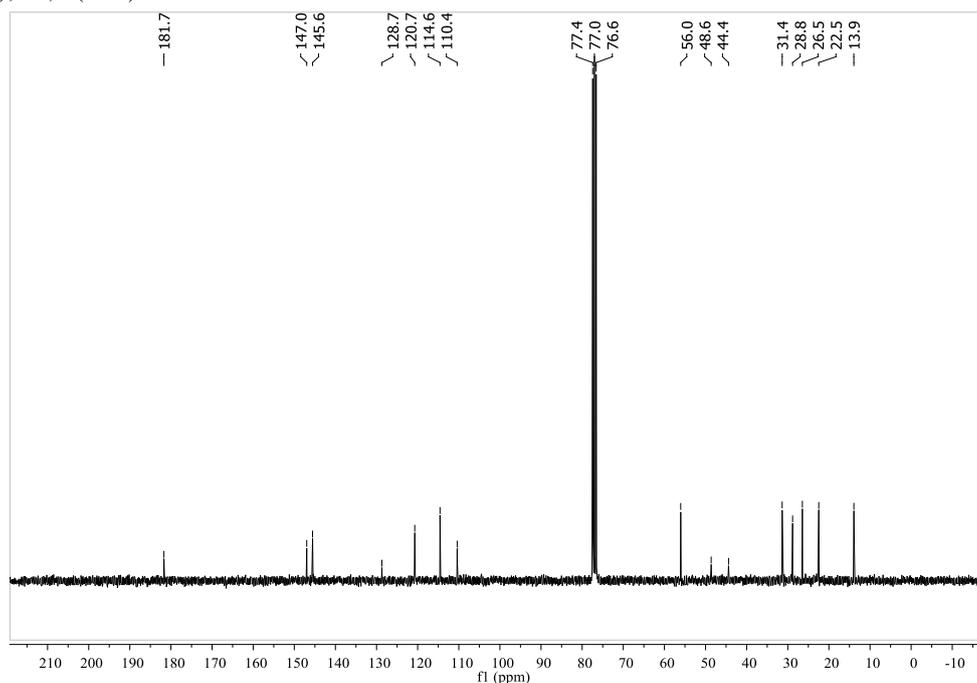
Faixa de fusão: 81,1 – 82,0 °C



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 6,88 (2H, m, H-6, H-4), 6,80 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-3), 6,01 (1H, sl, OH-8), 5,80 (1H, sl, NH-13), 5,65 (1H, s, NH-11), 4,55 (2H, s, H-10), 3,88 (3H, s, H-9), 3,35 (2H, d, *J* = 4,1 Hz, H-14), 1,49 (8H, m, H-15, H-16, H-17, H-18,), 0,86 (3H, d, *J* = 6,1 Hz, H-19)



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ= ppm) δ: 181,7 (C12), 147,0 (C1), 145,6 (C2), 128,7 (C5), 120,7 (C4), 114,6 (C3), 110,4 (C6), 56,0 (C9), 48,6 (C10), 44,4 (C14), 31,4 (C17), 28,8 (C15), 26,5 (C16), 22,5 (C18), 13,9 (C19)



Anexos II
Cromatogramas
(Análise mediante HPLC)

Anexos II

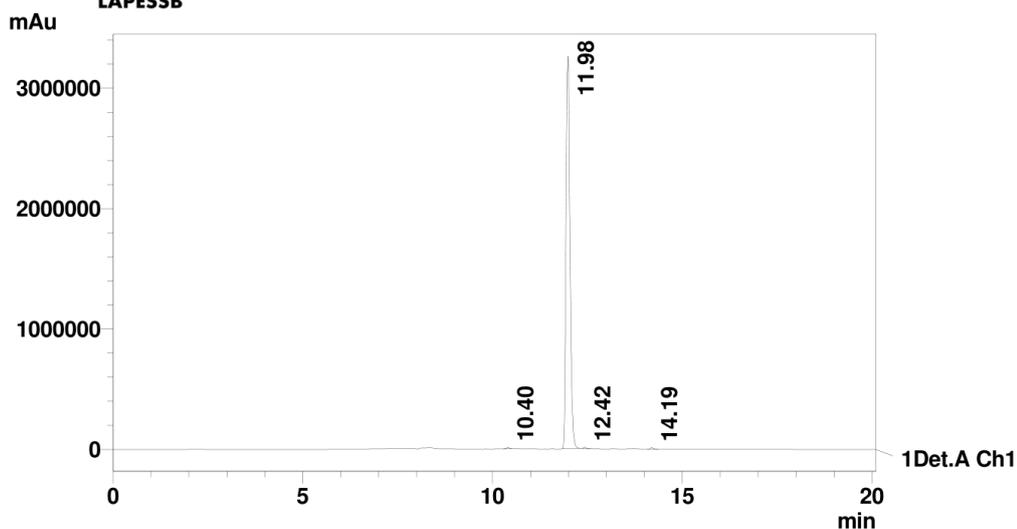
RPF 501

LAPESSB FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 15/1/2018
Sample: RPF 501_15_01_18
Vial: 50
Injection Volume: 20
Batch:



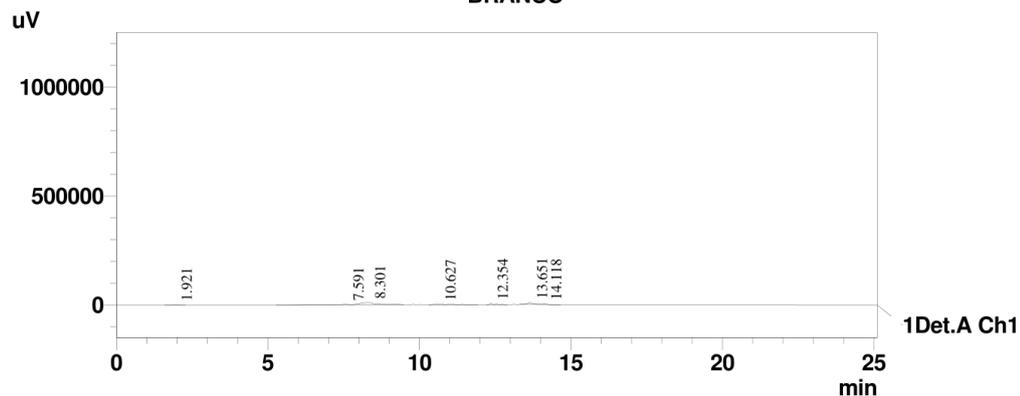
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	10.397	50258	10337	0.075	1.222	0.209	0.000
2	11.983	23856737	3259772	0.113	1.256	99.328	0.000
3	12.421	51004	11587	0.074	1.215	0.212	0.000
4	14.187	60252	11933	0.073	1.543	0.251	0.000
Total		24018251	3293629			100.000	

BRANCO



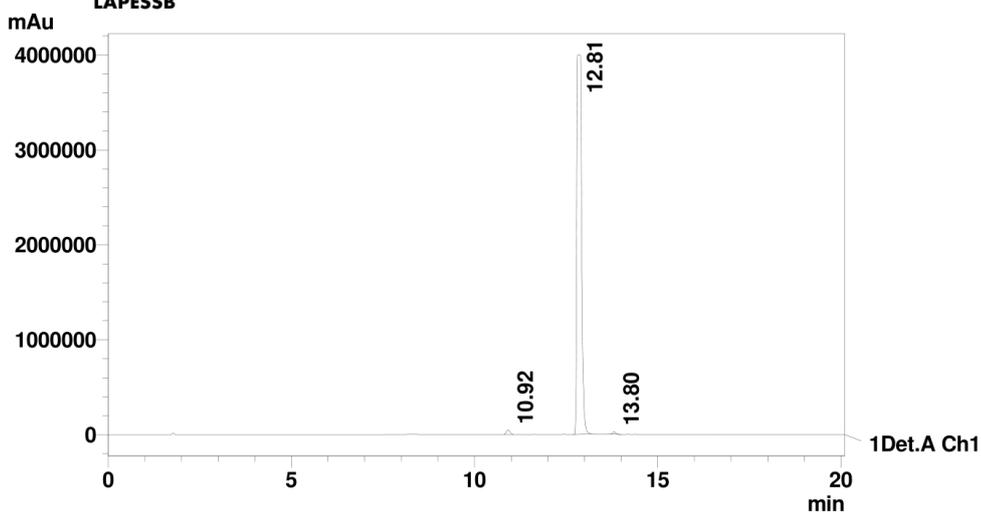
RPF 503

LAPESSB
 FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 15/1/2018
 Sample: RPF 503_15_01_18
 Vial: 60
 Injection Volume: 20
 Batch:



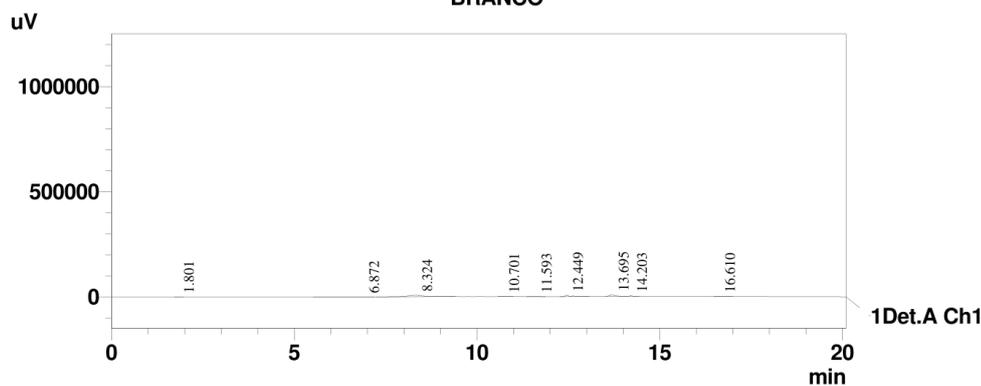
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Failing Factor	Area %	Conc. %
1	10.917	319111	46731	0.109	1.047	0.887	0.000
2	12.808	35564977	3994579	0.136	2.331	98.824	0.000
3	13.801	103959	24877	0.068	1.448	0.289	0.000
Total		35988046	4066187			100.000	

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm

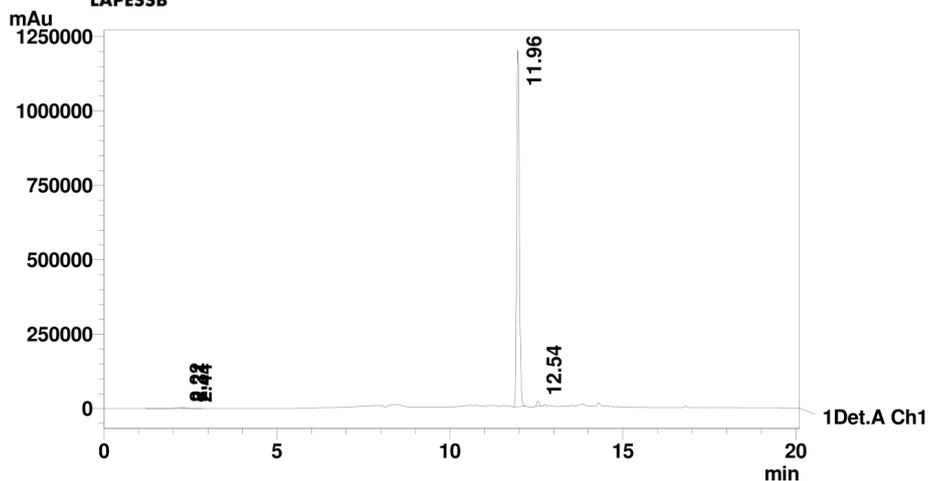
LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 18/1/2018
 Sample: RPF504_18_01
 Vial: 0
 Injection Volume: 20
 Batch: 08-Jan-18.lcb

LAPESSB

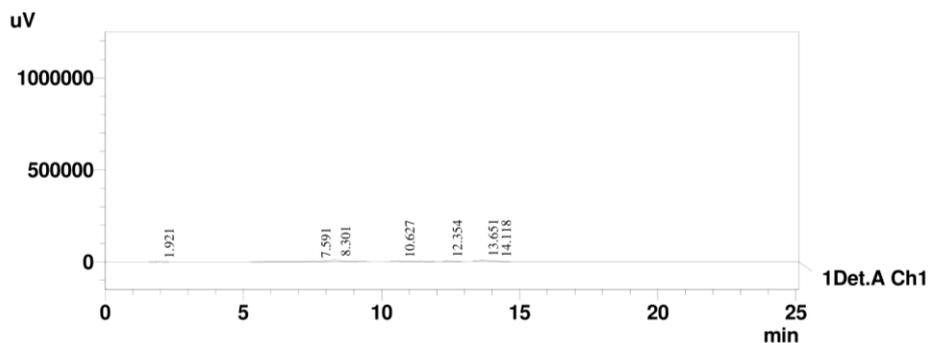


1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	2.223	41973	3111	0.000	0.000	0.643	0.000
2	2.305	18385	3584	0.000	0.000	0.282	0.000
3	2.436	5377	1026	0.000	0.000	0.082	0.000
4	11.958	6374678	1198462	0.082	1.303	97.658	0.000
5	12.539	87130	17982	0.079	1.274	1.335	0.000
Total		6527542	1224165			100.000	



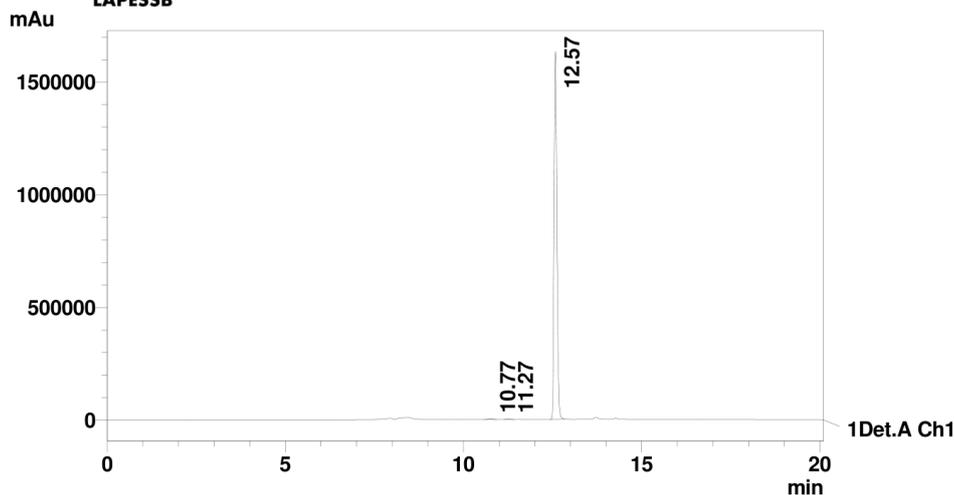
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
 FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 18/1/2018
 Sample: RPF505_18_01
 Vial: 2
 Injection Volume: 20
 Batch: 08-Jan-18.lcb

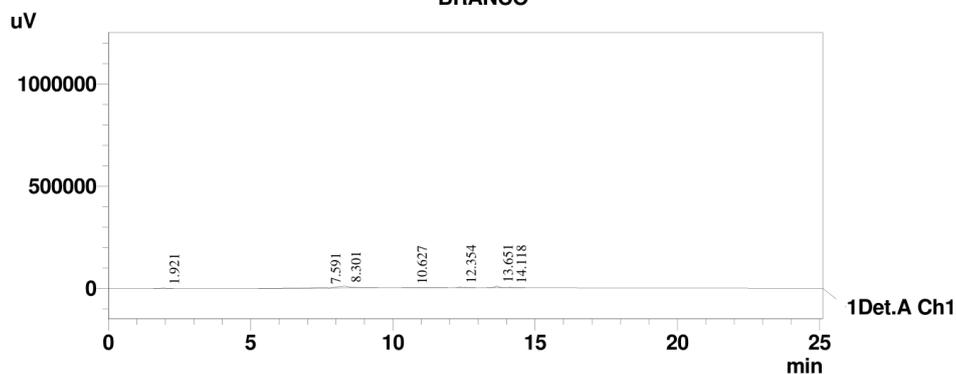


1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	10.767	33989	3421	0.158	0.902	0.371	0.000
2	11.273	18407	2461	0.109	0.905	0.201	0.000
3	12.572	9098884	1632613	0.087	1.276	99.427	0.000
Total		9151281	1638496			100.000	

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm

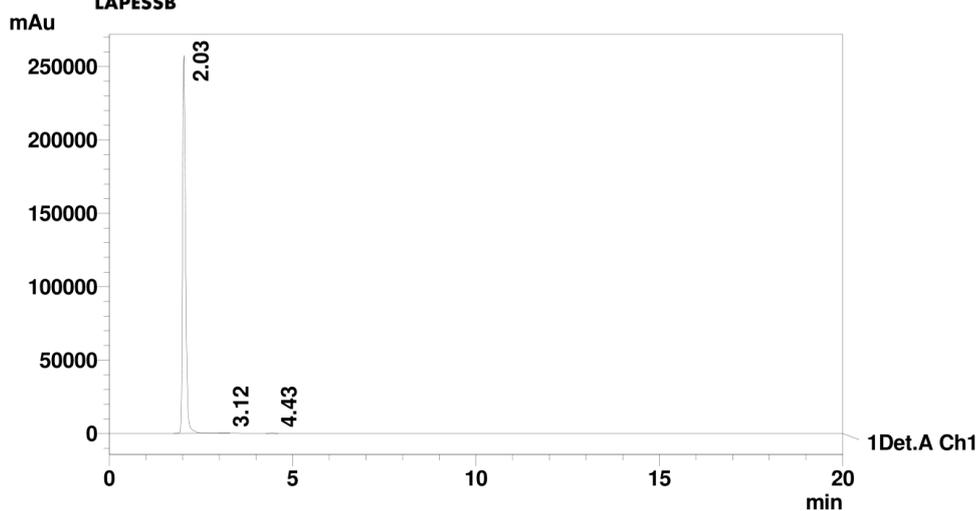
RPF 551

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 6/2/2017
 Sample: 551
 Vial: 2
 Injection Volume: 25
 Batch: gustavo-06-02-2017.lcb



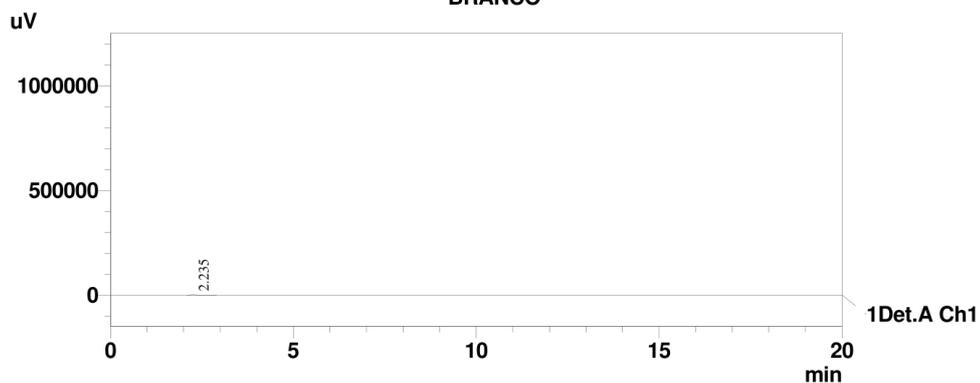
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	2.027	1496144	257460	0.086	1.446	99.811	99.811
2	3.117	1305	181	0.111	1.114	0.087	0.087
3	4.429	1523	169	0.136	0.000	0.102	0.102
Total		1498972	257811			100.000	

BRANCO



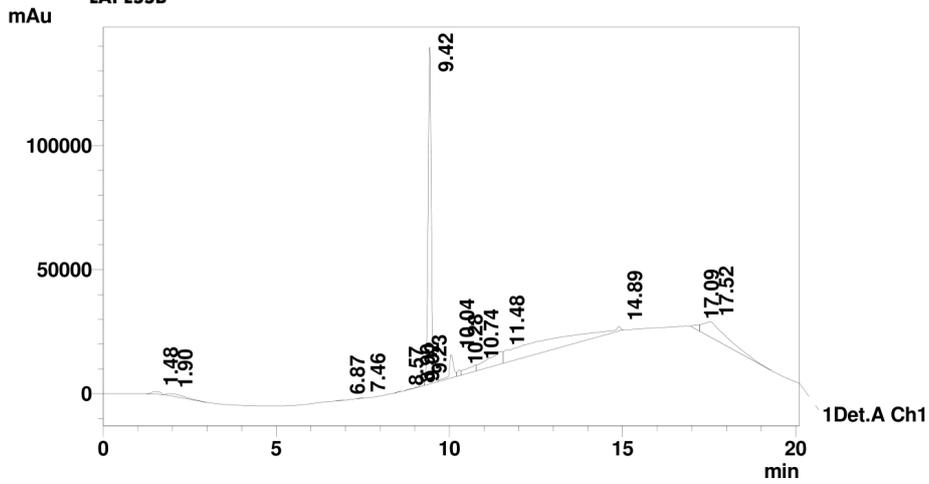
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 24/1/2018
 Sample: RPF552_ACN 24_01
 Vial: 21
 Injection Volume: 20
 Batch:



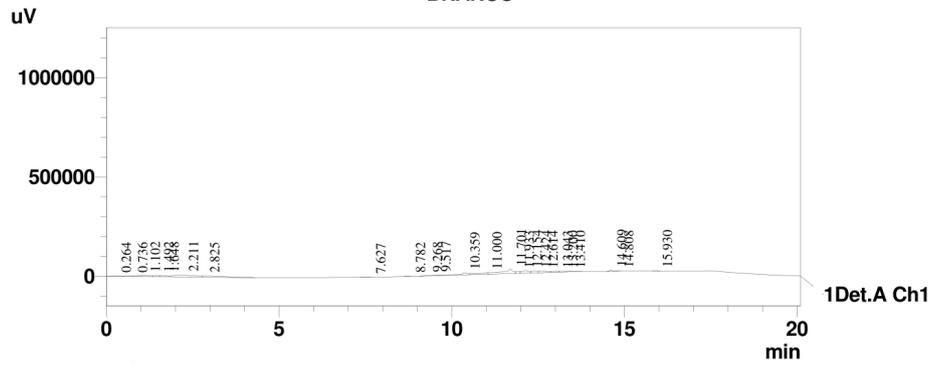
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Height Factor	Area %	Conc. %
1	8.872	10998	2365	0.073	0.963	3.231	0.000
2	9.682	329356	72002	0.072	1.433	96.769	0.000
Total		340355	74367			100.000	

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm

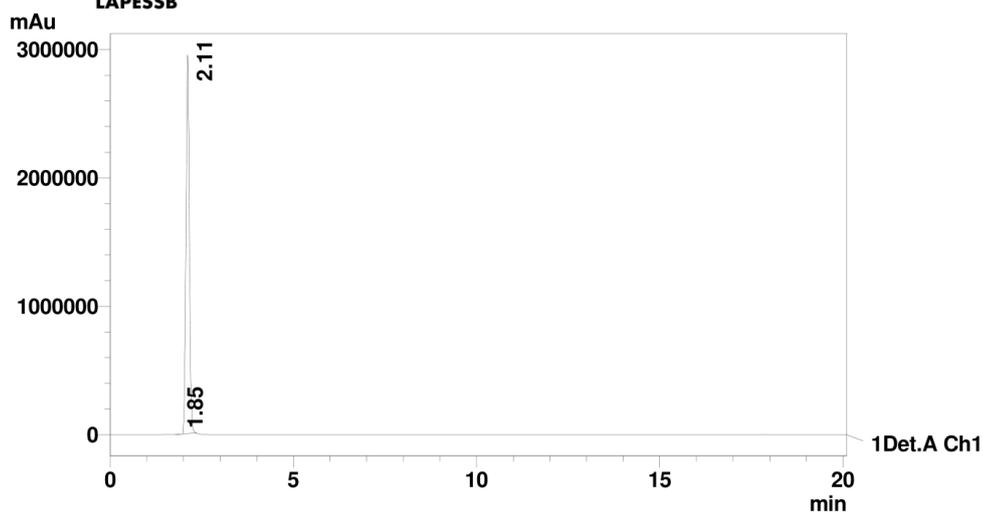
RPF 601

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 23/2/2018
Sample: RPF 601
Vial: 0
Injection Volume: 20
Batch:



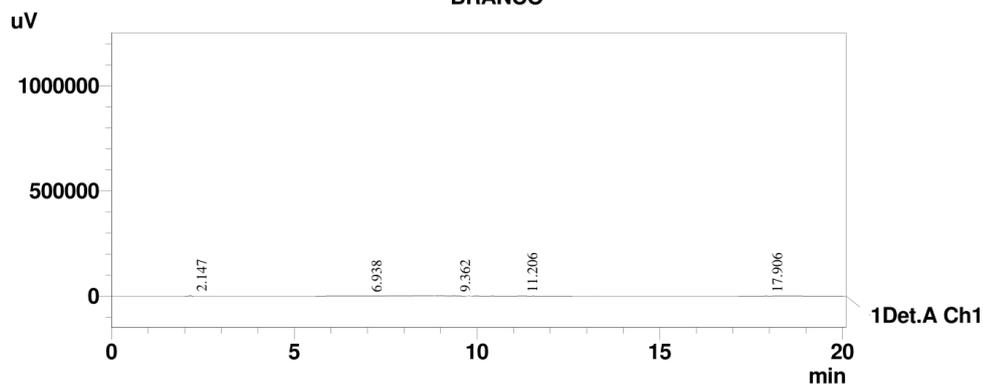
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Height	Area %	Conc. %
1	1.847	11701	2686	0.073	0.974	0.062	0.000
2	2.107	18835430	2947825	0.098	1.097	99.938	0.000
Total		18847131	2950511			100.000	

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm

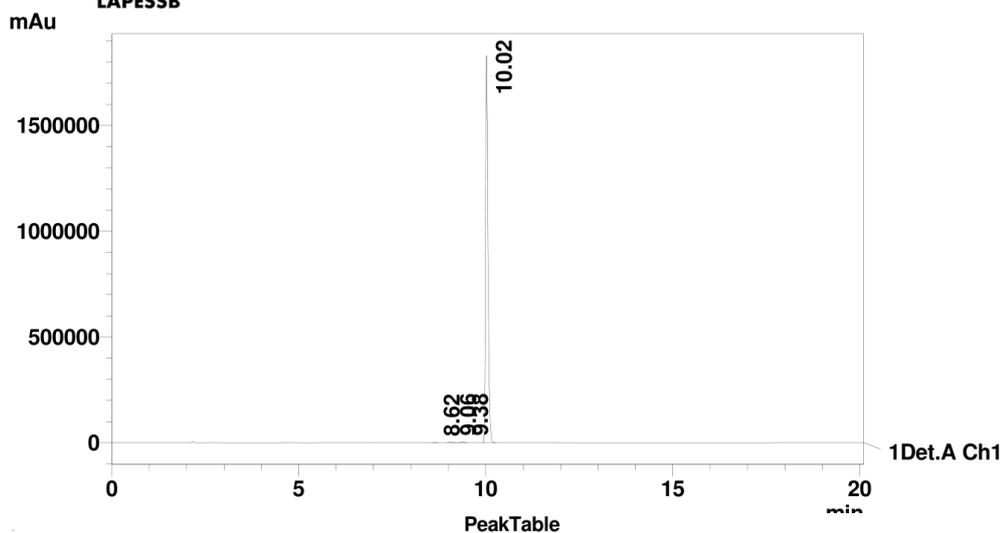
RPF 602

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



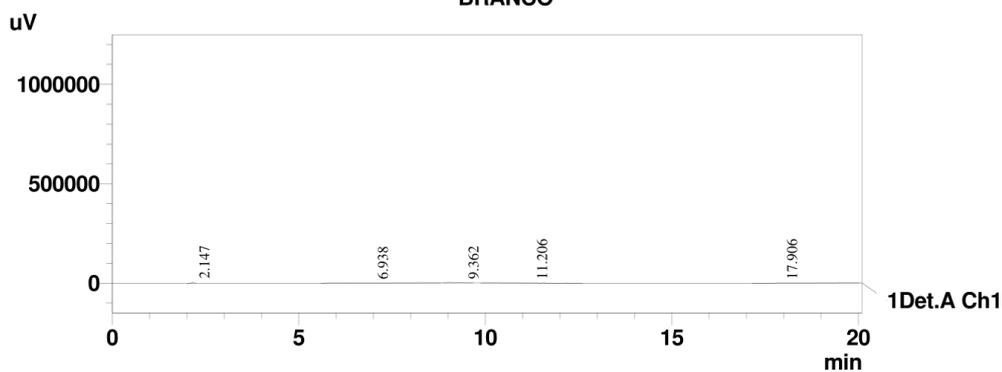
Date: 23/2/2018
Sample: RPF 602
Vial: 1
Injection Volume: 20
Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	8.622	3567	877	0.066	1.428	0.043	0.000
2	9.058	13585	2559	0.083	1.144	0.165	0.000
3	9.381	19493	2820	0.082	0.837	0.236	0.000
4	10.016	8208875	1831102	0.068	1.484	99.556	0.000
Total		8245520	1837360			100.000	

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm

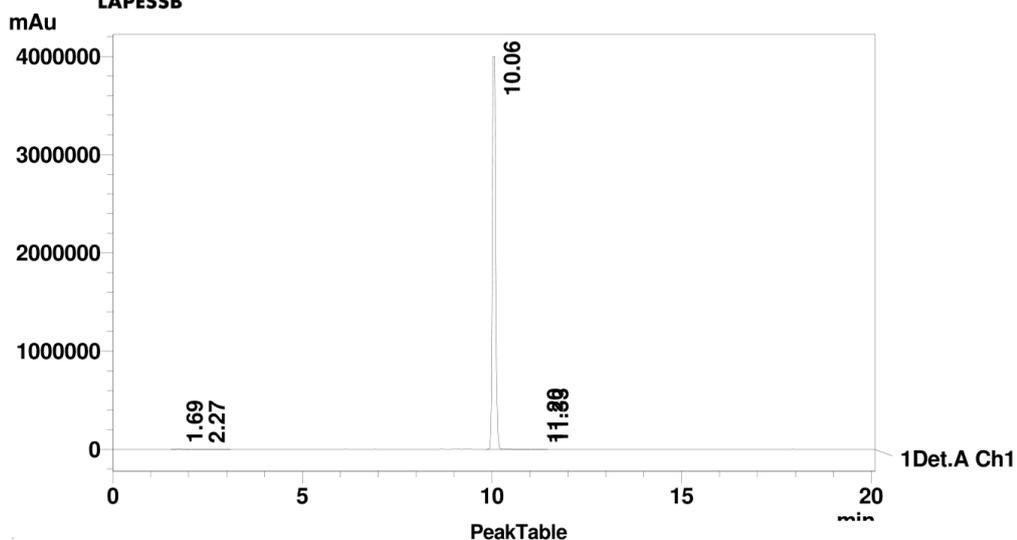
RPF 603

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



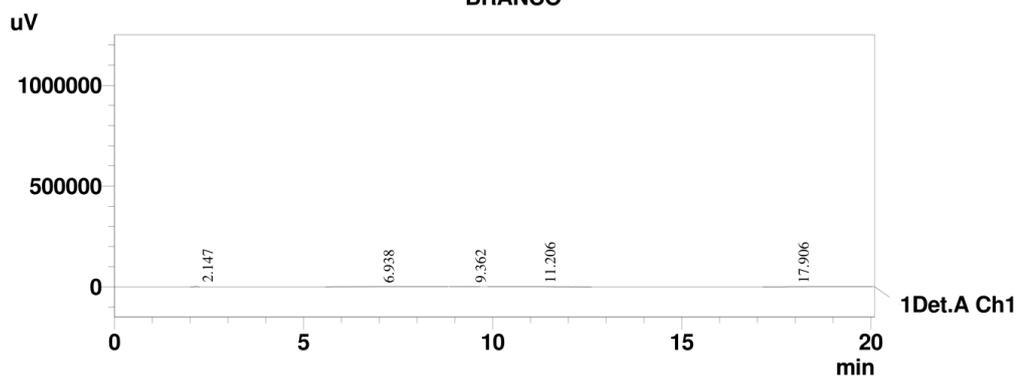
Date: 23/2/2018
 Sample: RPF 603
 Vial: 2
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Failing Factor	Area %	Conc. %
1	1.687	18689	1188		0.292	1.922	0.079
2	2.272	4812	161		0.493	2.581	0.020
3	10.058	23691859	3999700		0.086	1.004	99.880
4	11.196	3225	359		0.166	0.000	0.014
5	11.329	1772	327		0.000	0.000	0.007
Total		23720357	4001736				100.000

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm

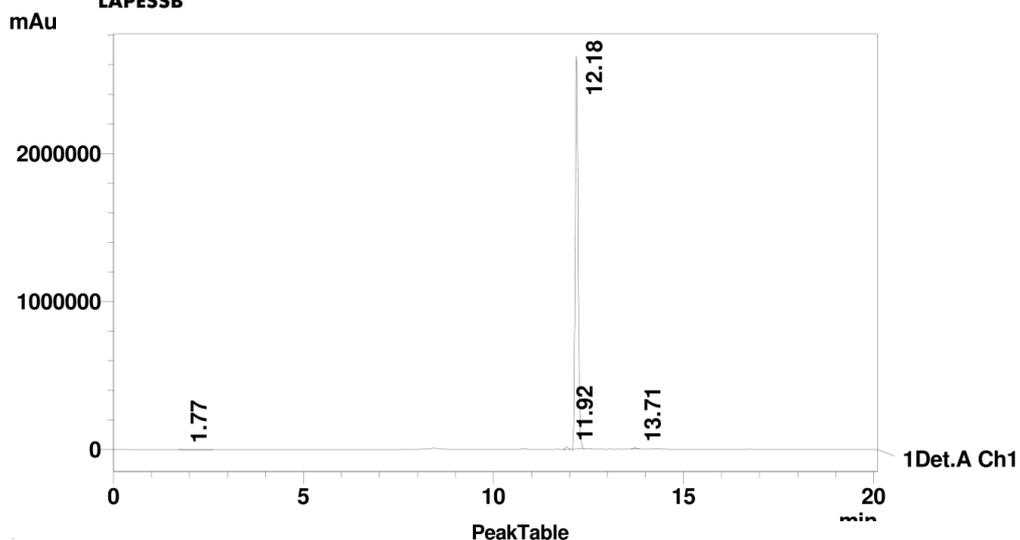
RPF 604

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



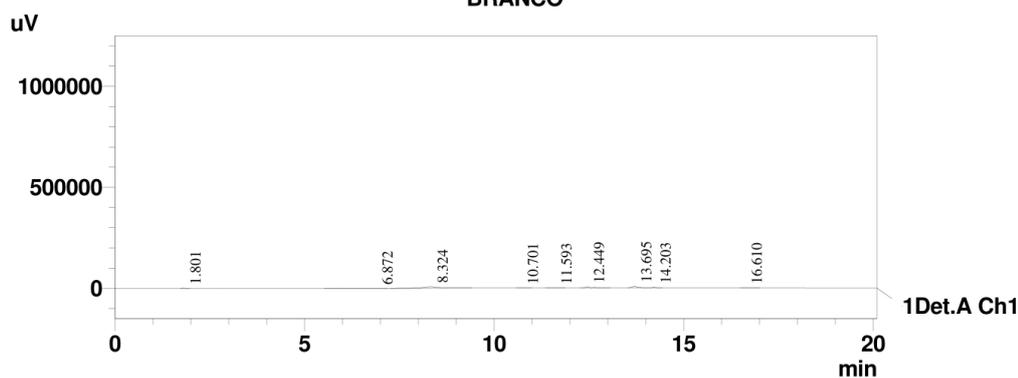
Date: 18/1/2018
 Sample: RPF 604_18_01_18
 Vial: 1
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	/idth at 50% Heig	Failing Facto	Area %	Conc. %
1	1.773	16684	2725	0.077	2.745	0.119	0.000
2	11.922	81520	15053	0.086	1.079	0.580	0.000
3	12.178	13932174	2655958	0.080	1.249	99.042	0.000
4	13.713	36560	5614	0.107	1.277	0.260	0.000
Total		14066938	2679350			100.000	

BRANCO



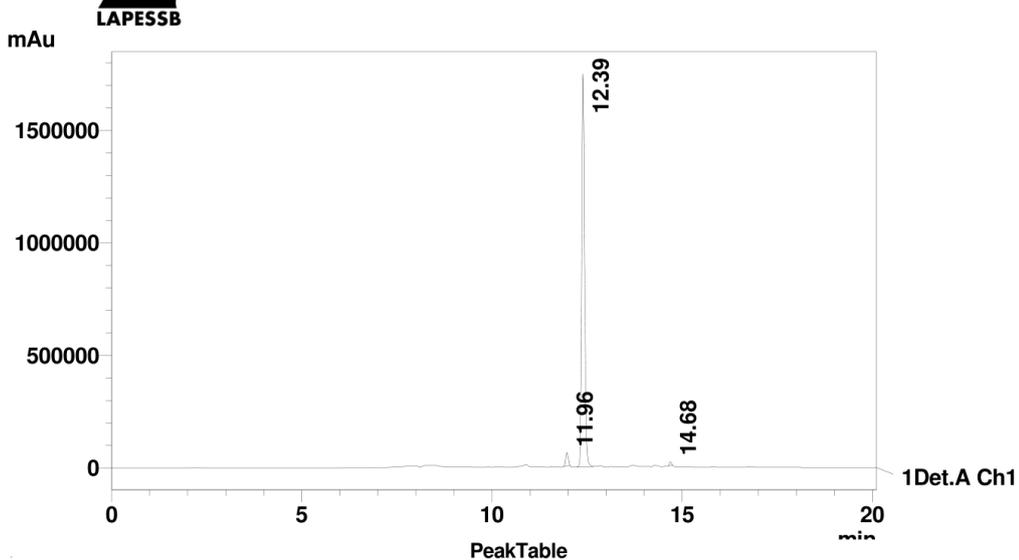
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
 FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

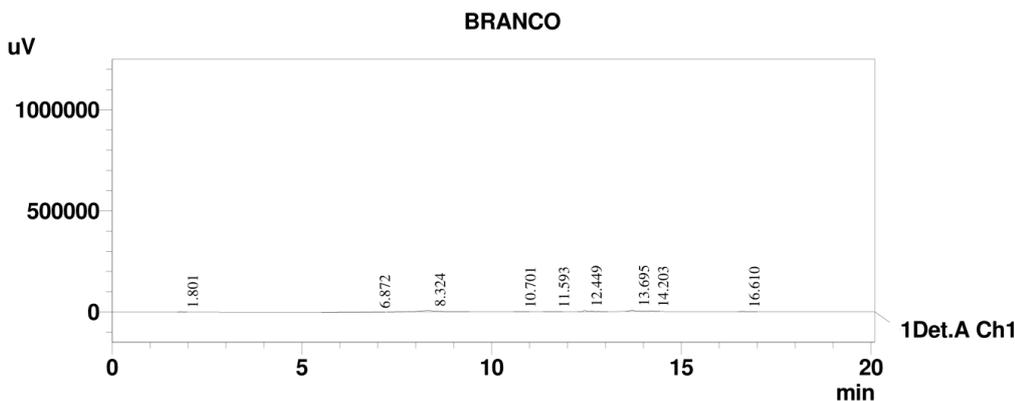


Date: 18/1/2018
 Sample: RPF605_18_01
 Vial: 3
 Injection Volume: 20
 Batch: 08-Jan-18.lcb



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	/idth at 50% Heig	ailing Facto	Area %	Conc. %
1	11.962	279321	60852	0.074	1.166	2.875	0.000
2	12.386	9375422	1747300	0.083	1.299	96.493	0.000
3	14.684	61376	16438	0.062	1.075	0.632	0.000
Total		9716119	1824590			100.000	



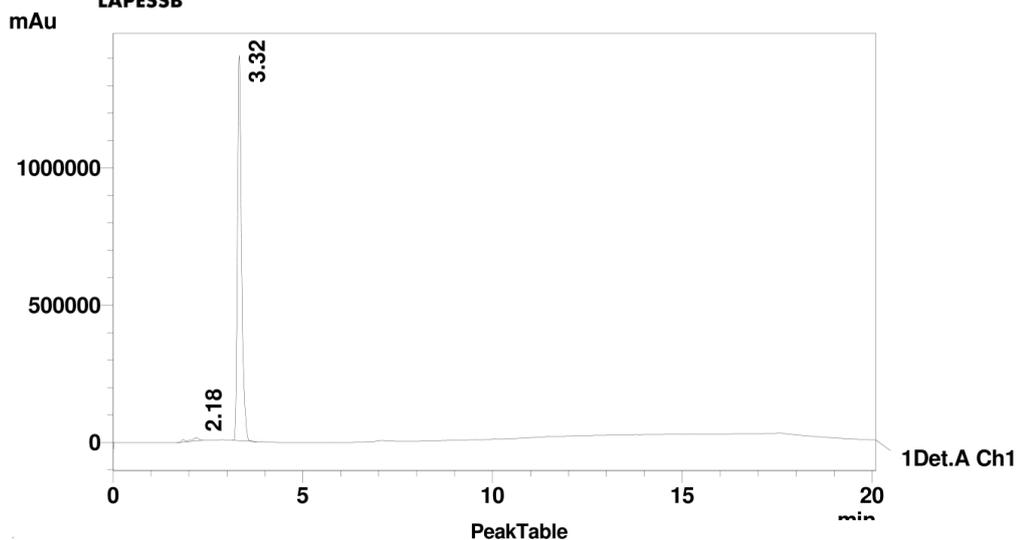
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

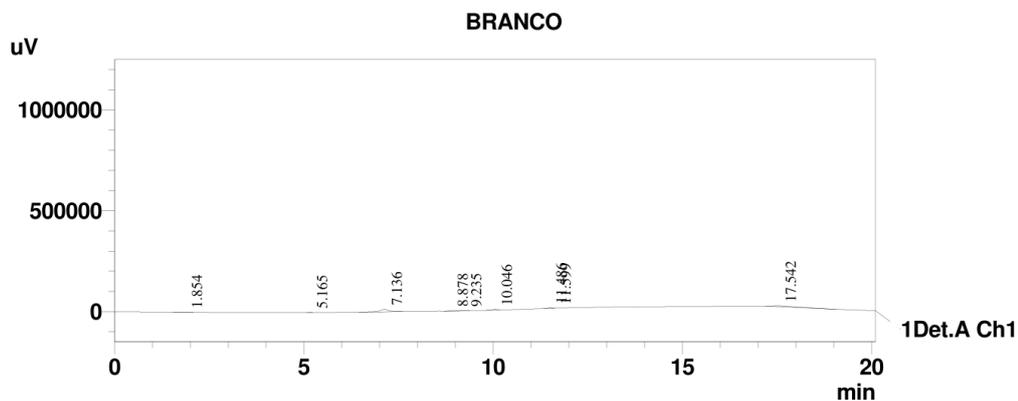


Date: 18/1/2018
 Sample: RPF651 ACN_18_01_18
 Vial: 12
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	2.181	197580	11244	0.182	0.696	1.831	0.000
2	3.319	10591820	1404168	0.110	1.437	98.169	0.000
Total		10789401	1415412			100.000	



1 Det.A Ch1 / 254nm

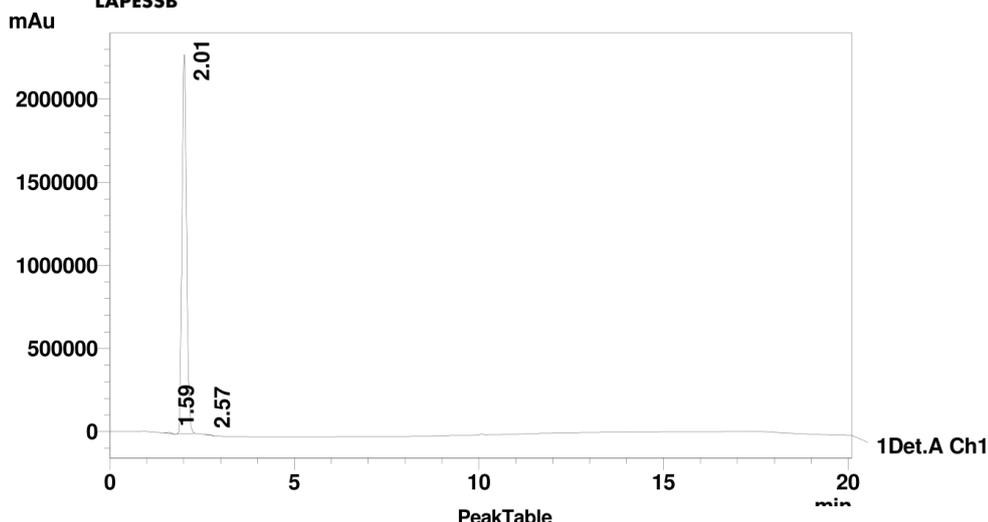
RPF652

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

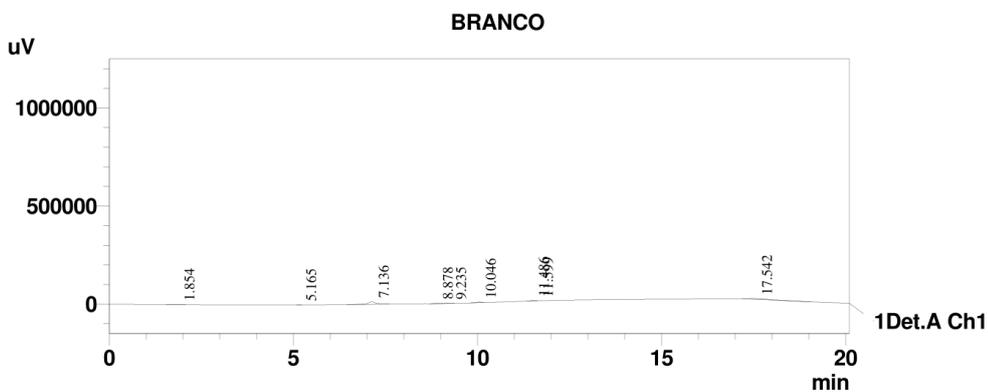


Date: 24/1/2018
 Sample: RPF652_ACN 24_01
 Vial: 22
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Height Factor	Area %	Conc. %
1	1.591	39205	4797		0.139	1.104	0.000
2	2.010	19695702	2281796		0.133	1.160	99.845
3	2.567	-8539	0		0.000	0.000	-0.043
Total		19726368	2286592			100.000	



1 Det.A Ch1 / 254nm

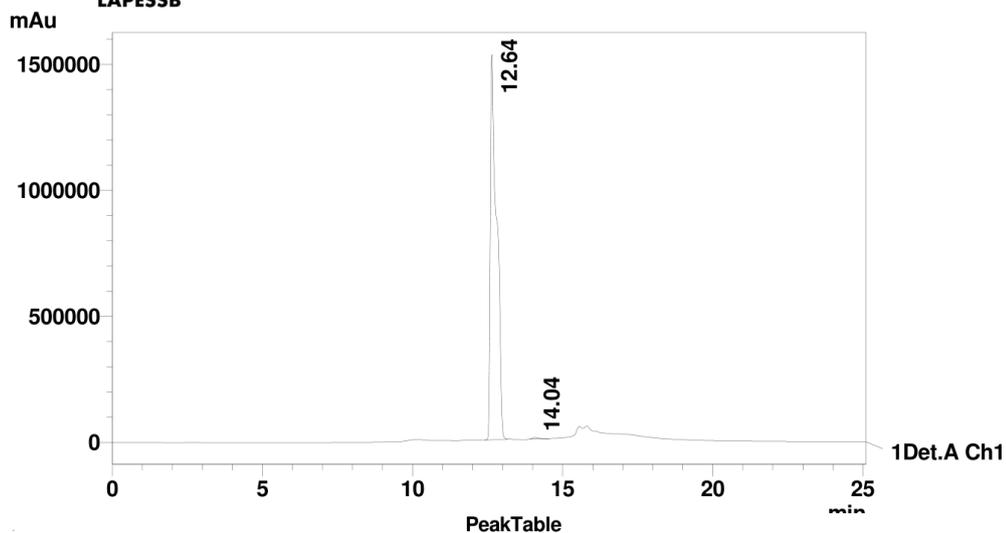
RPF 511

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

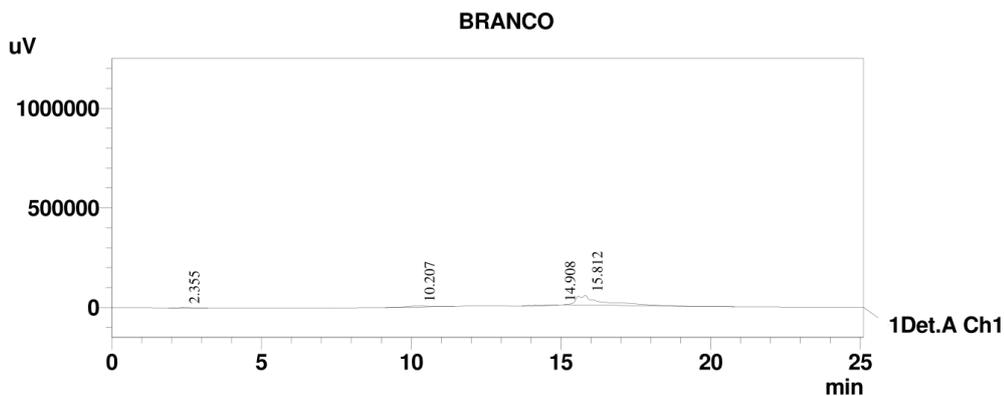


Date: 8/11/2017
Sample: RPF511_2 08_11
Vial: 1
Injection Volume: 20
Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	12.636	22537576	1529832	0.285	2.218	99.683	0.000
2	14.045	71559	5654	0.187	3.307	0.317	0.000
Total		22609135	1535487			100.000	



1 Det.A Ch1 / 254nm

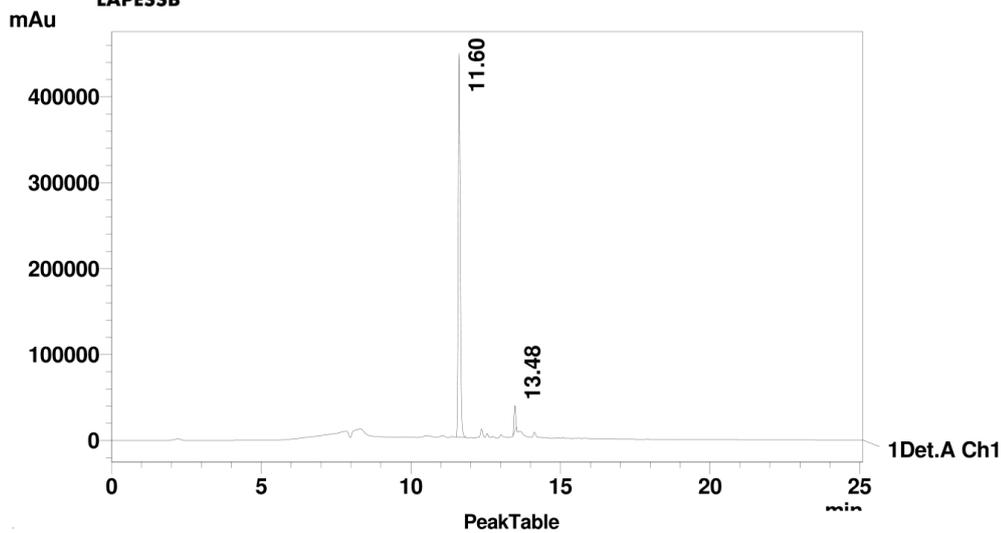
RPF 512

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

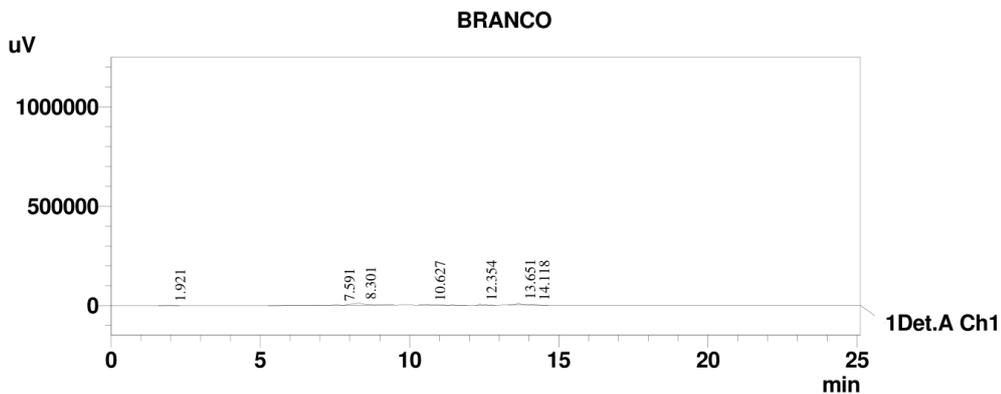


Date: 11/1/2018
Sample: RPF 512_11_01_18
Vial: 10
Injection Volume: 20
Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	11.605	2115096	446346	0.073	1.293	95.065	0.000
2	13.476	109798	29768	0.060	1.044	4.935	0.000
Total		2224894	476114			100.000	



1 Det.A Ch1 / 254nm

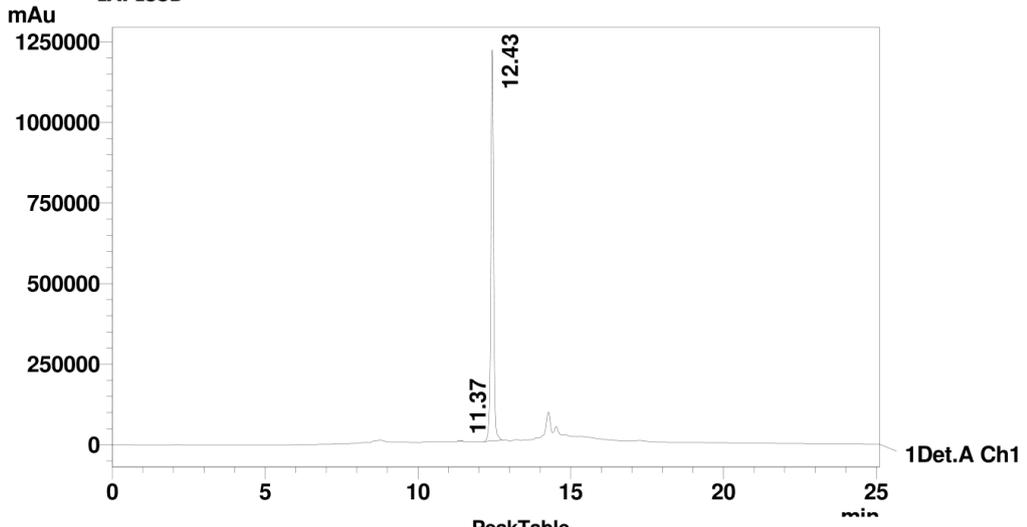
RPF 513

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

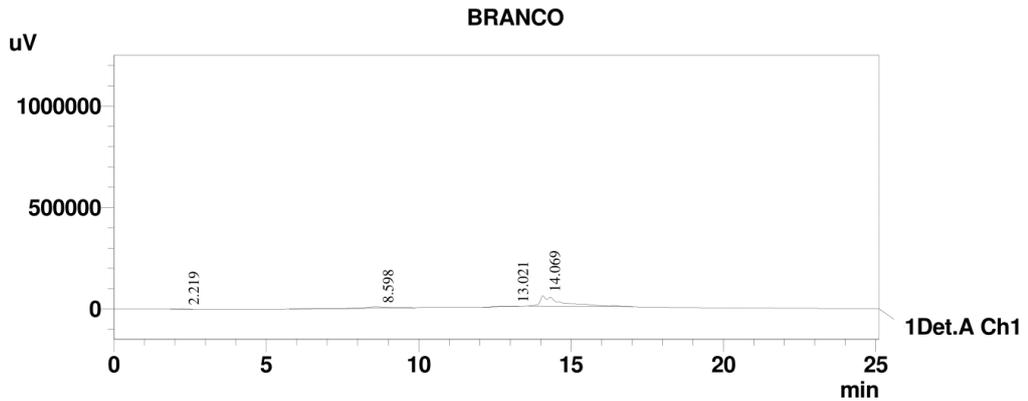


Date: 17/11/2017
Sample: RPF 513_2 17_11
Vial: 13
Injection Volume: 20
Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	/idth at 50% Heig	ailing Facto	Area %	Conc. %
1	11.374	14649	2662		0.089	1.229	0.190
2	12.426	7681461	1215014		0.093	1.035	99.810
Total		7696110	1217675				100.000



1 Det.A Ch1 / 254nm

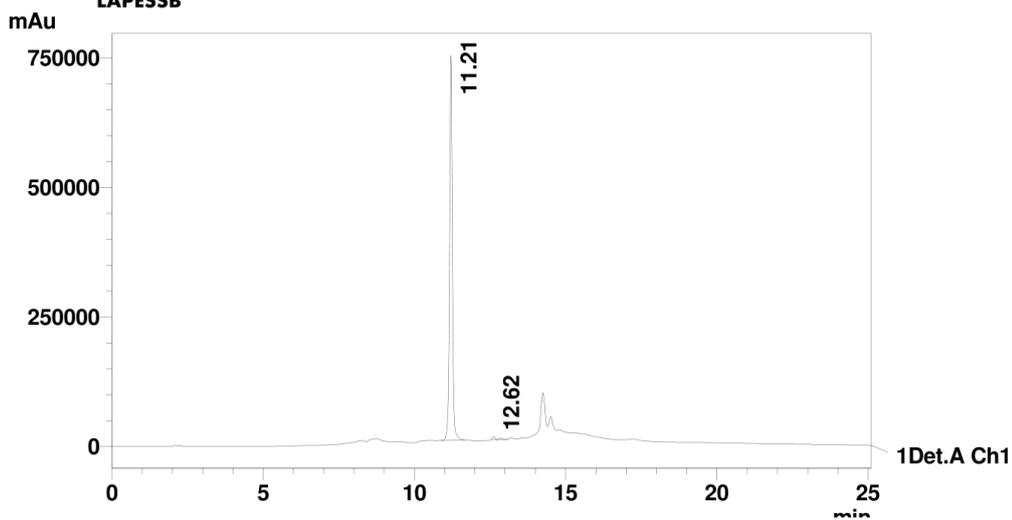
RPF 514

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

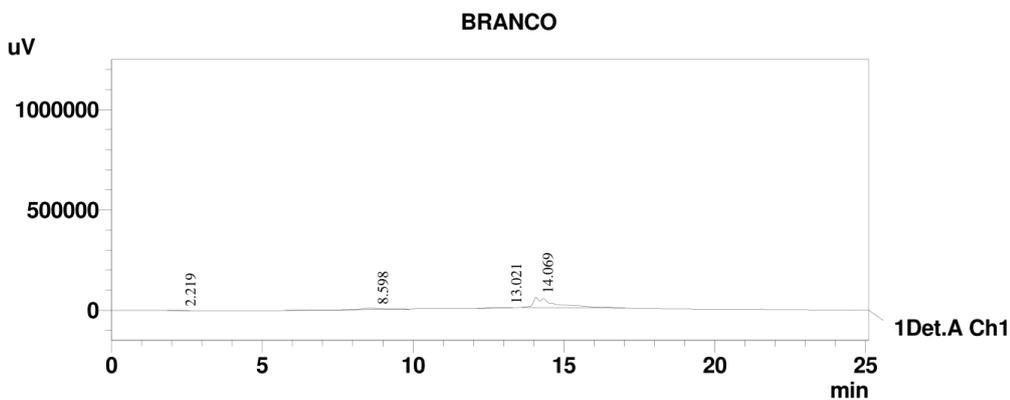


Date: 17/11/2017
Sample: RPF 514_2 17_11
Vial: 22
Injection Volume: 20
Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	/idth at 50% Heig	failng Facto	Area %	Conc. %
1	11.207	4818780	743465		0.094	1.036	99.410
2	12.618	28576	6045		0.082	1.095	0.590
Total		4847357	749510				100.000



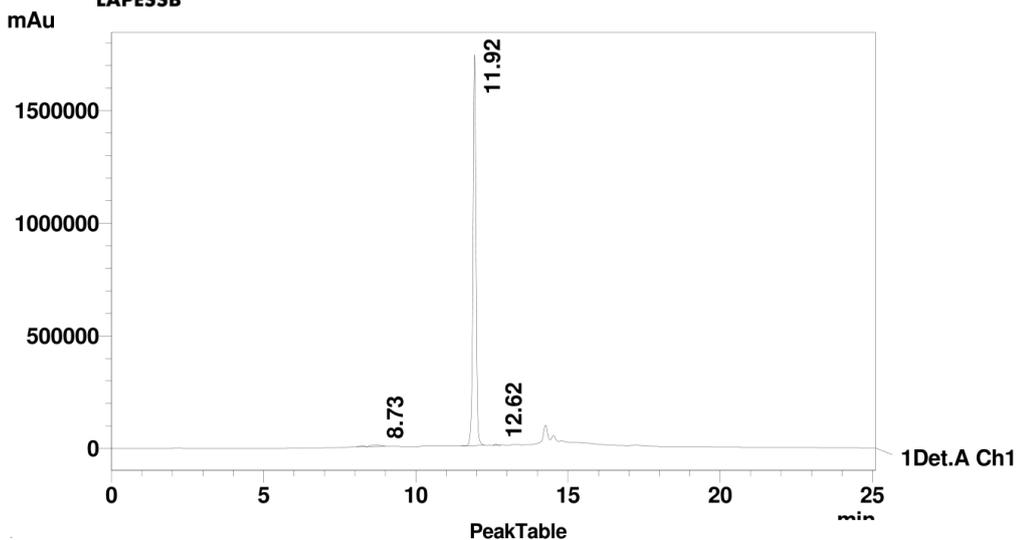
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



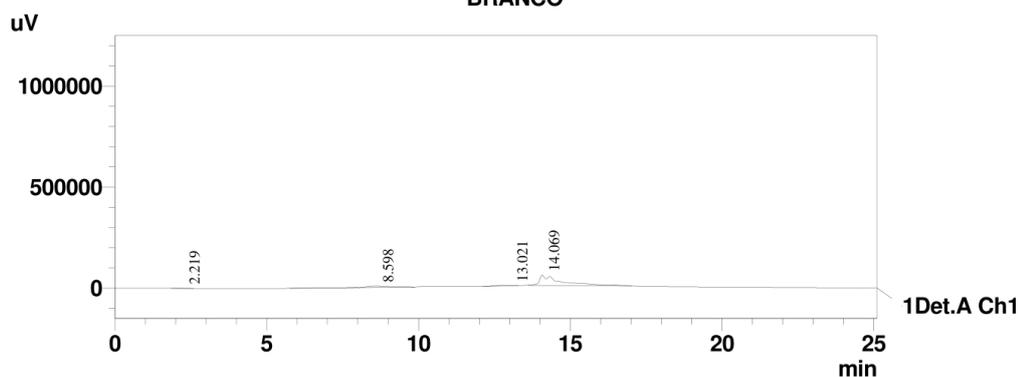
Date: 17/11/2017
 Sample: RPF 515_2 17_11
 Vial: 0
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	8.730	131921	5197	0.389	0.891	1.081	0.000
2	11.922	12036720	1735912	0.103	0.995	98.668	0.000
3	12.624	30623	6392	0.086	0.993	0.251	0.000
Total		12199264	1747501			100.000	

BRANCO



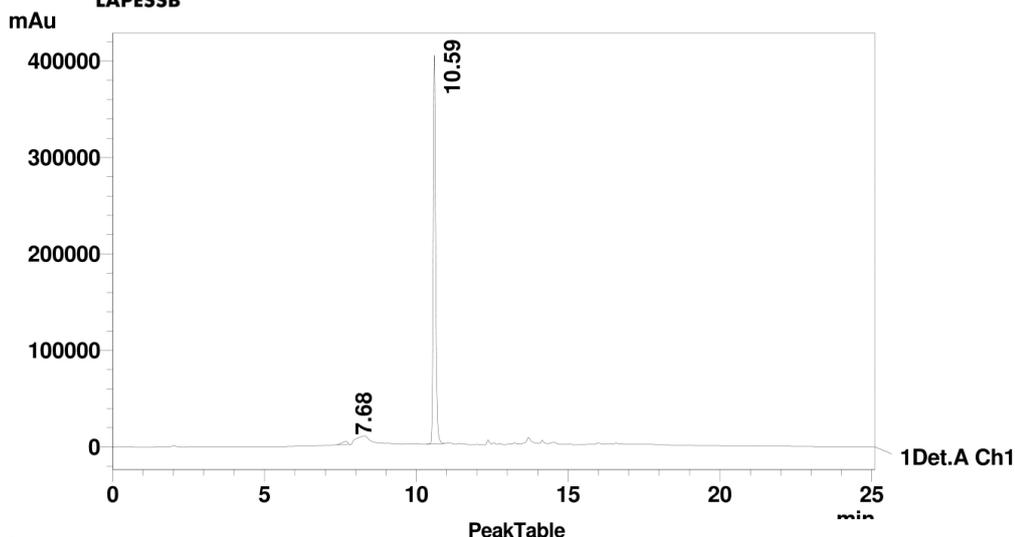
RPF 561

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

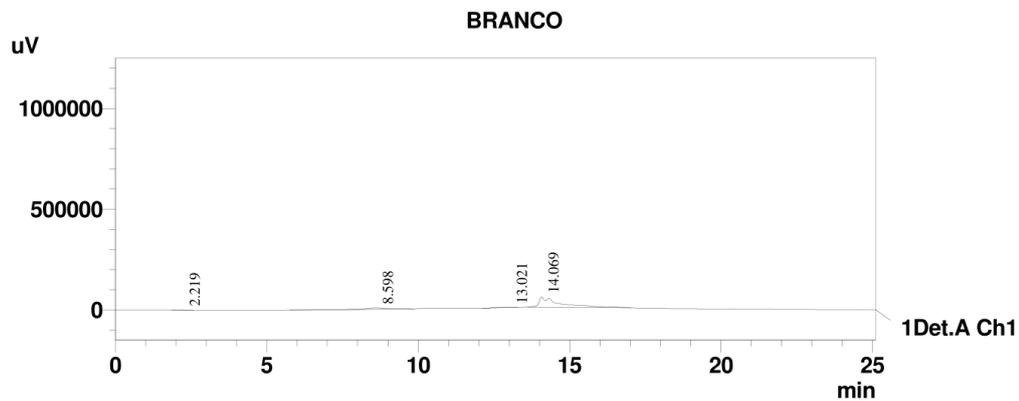


Date: 15/1/2018
 Sample: RPF 561 (2)_15_01_18
 Vial: 21
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Failing Factor	Area %	Conc. %
1	7.680	38376	3148		0.202	0.686	1.679
2	10.591	2246799	403179		0.083	1.248	0.000
Total		2285175	406327			100.000	



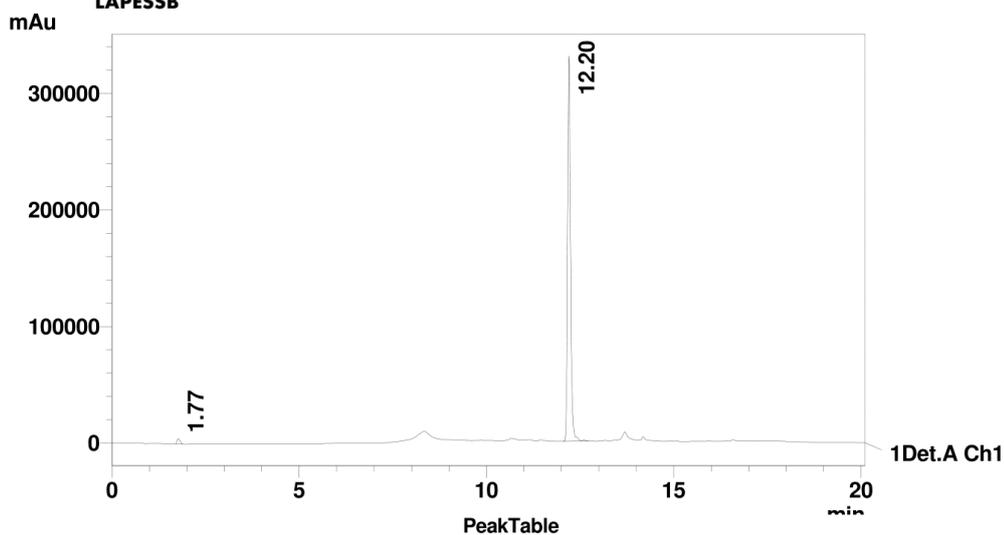
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

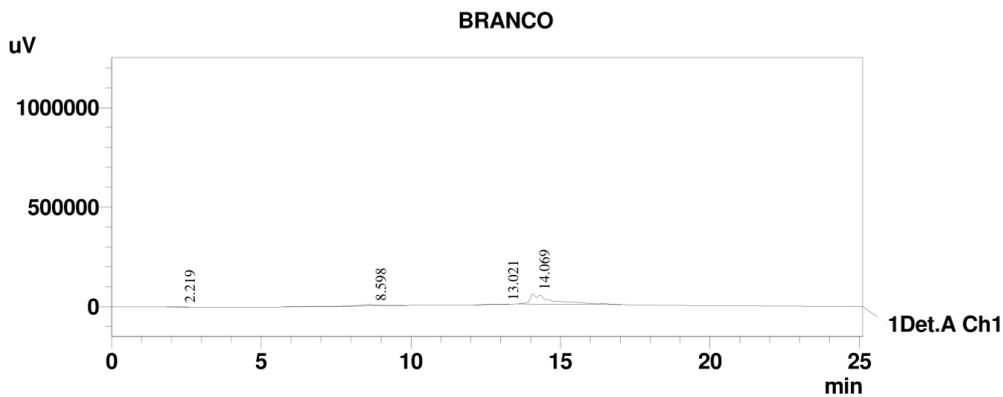


Date: 15/1/2018
 Sample: RPF 562_15_01_18
 Vial: 31
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	1.767	22532	4305	0.086	1.496	1.238	0.000
2	12.196	1798027	330643	0.080	1.274	98.762	0.000
Total		1820559	334948			100.000	



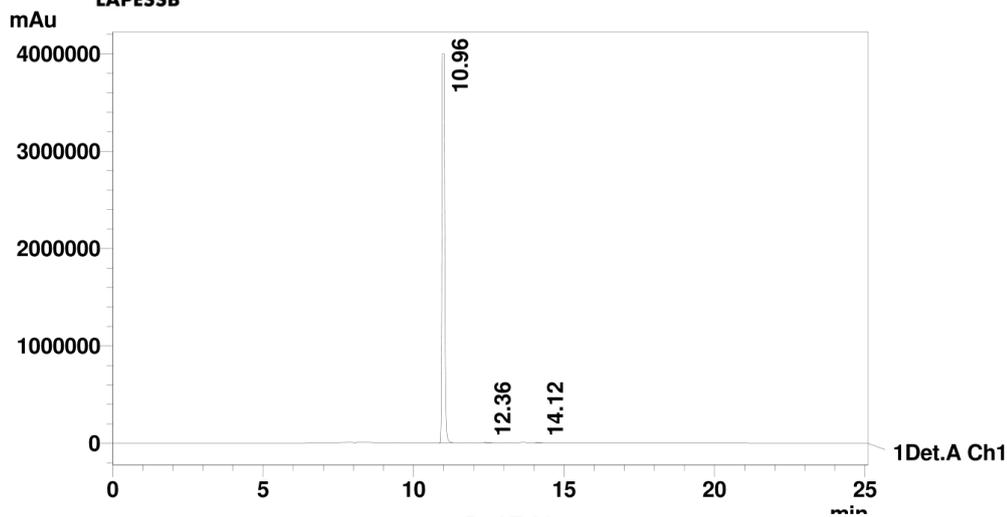
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

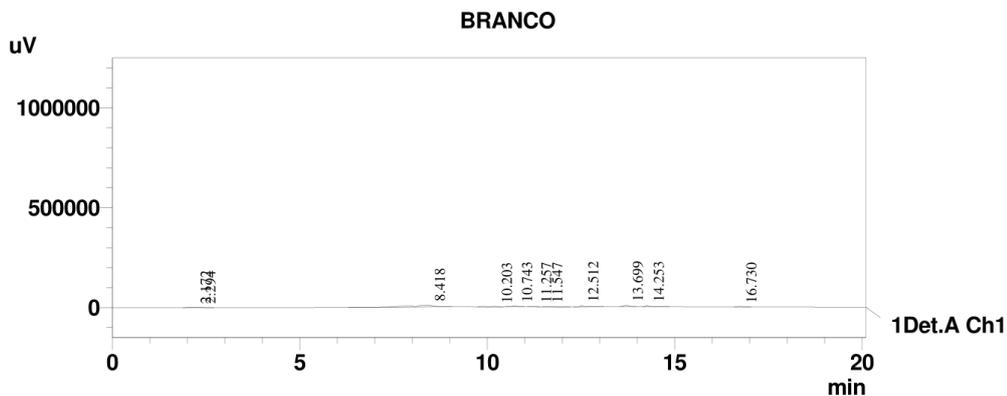


Date: 11/1/2018
 Sample: RPF 611_11_01_18
 Vial: 1
 Injection Volume: 20
 Batch:



Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Height Factor	Area %	Conc. %
1	10.958	26353360	3995211	0.101	1.886	99.869	0.000
2	12.364	9579	3966	0.052	1.344	0.036	0.000
3	14.117	25097	5319	0.071	1.251	0.095	0.000
Total		26388035	4004495			100.000	



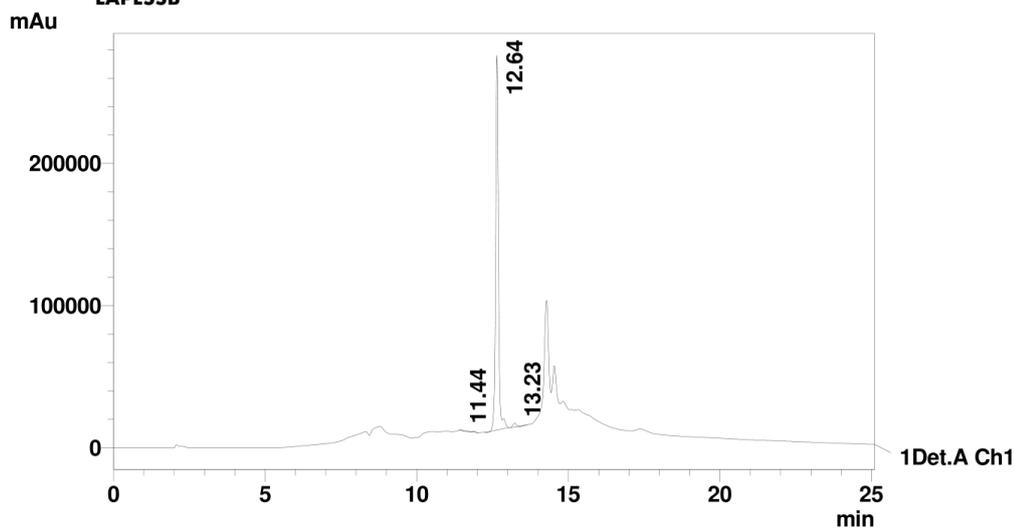
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 17/11/2017
 Sample: RPF 612_2 17_11
 Vial: 12
 Injection Volume: 20
 Batch:



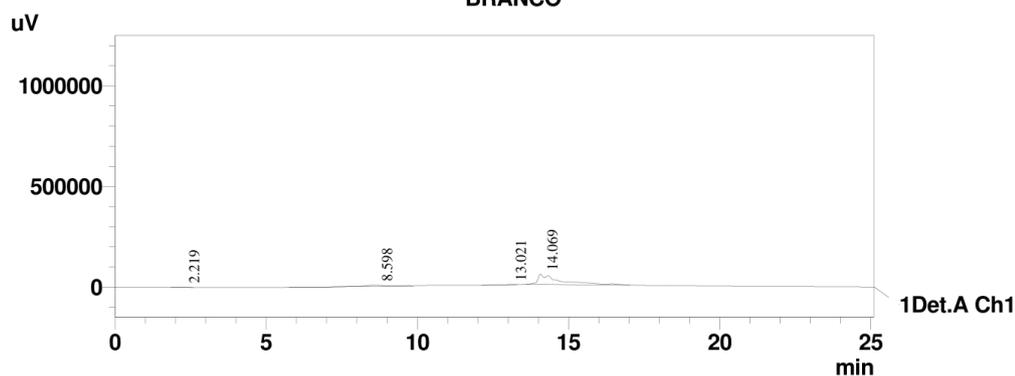
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	11.437	-1337	406	0.074	1.485	-0.078	0.000
2	12.644	1691175	263362	0.092	1.060	99.130	0.000
3	13.234	16181	2720	0.121	0.937	0.948	0.000
Total		1706019	266488			100.000	

BRANCO



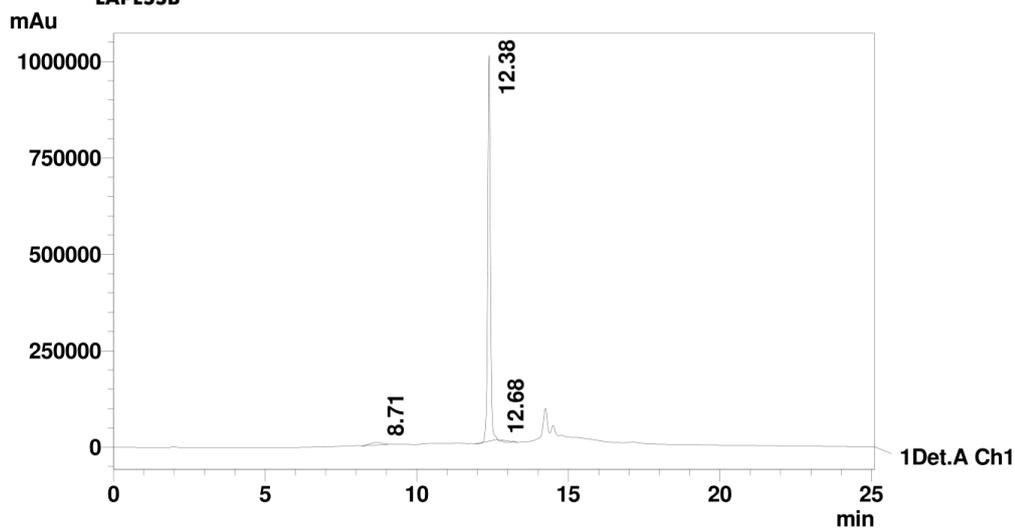
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 17/11/2017
 Sample: RPF 613_2 17_11
 Vial: 60
 Injection Volume: 20
 Batch:

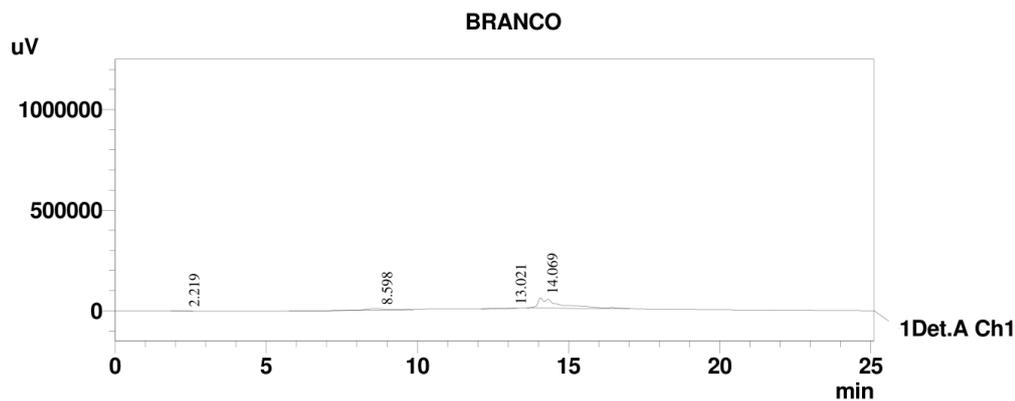


1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	8.710	178659	6476	0.453	0.831	2.873	0.000
2	12.382	6123853	1000565	0.090	1.051	98.490	0.000
3	12.675	-84753	-833	0.000	0.000	-1.363	0.000
Total		6217759	1006208			100.000	



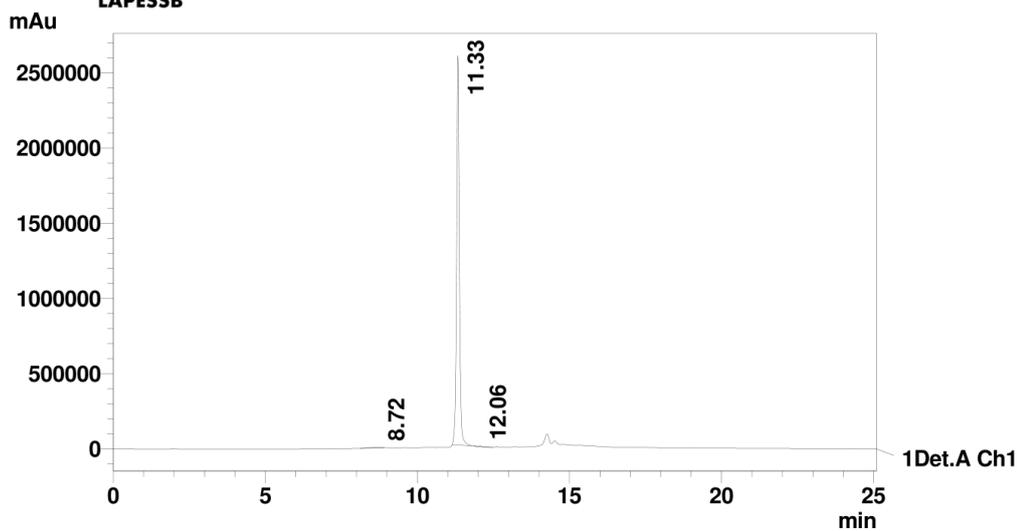
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 17/11/2017
 Sample: RPF 614_2 17_11
 Vial: 2
 Injection Volume: 20
 Batch:

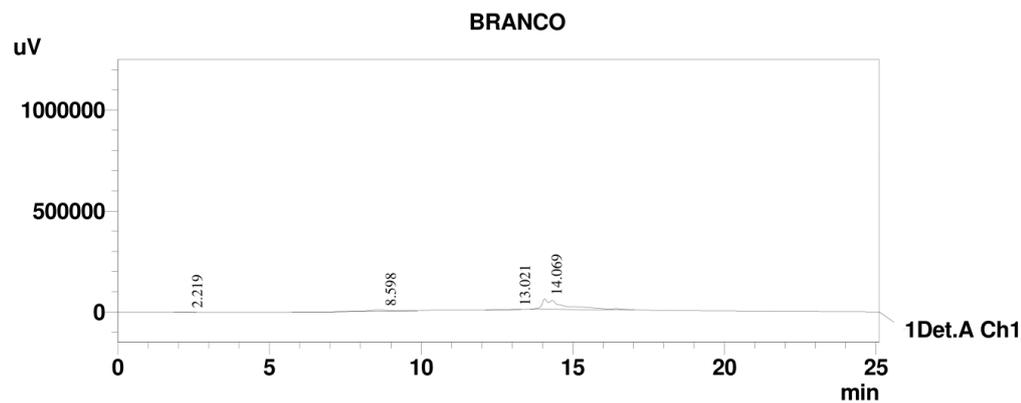


1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	8.723	96415	4709	0.365	0.726	0.591	0.000
2	11.332	16283603	2589882	0.091	1.046	99.766	0.000
3	12.058	-58206	2973	0.058	0.617	-0.357	0.000
Total		16321813	2597565			100.000	



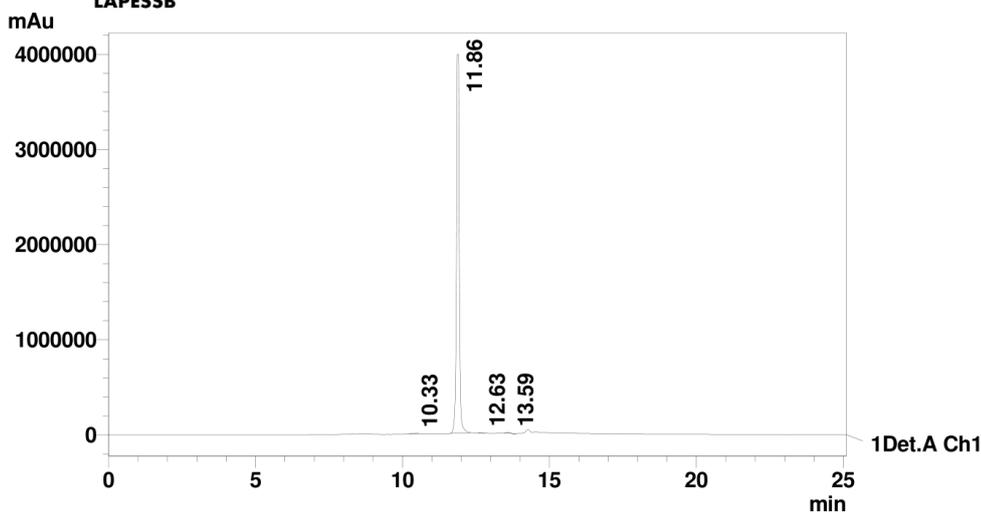
1 Det.A Ch1 / 254nm

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 17/11/2017
 Sample: RPF 615_2 17_11
 Vial: 11
 Injection Volume: 20
 Batch:

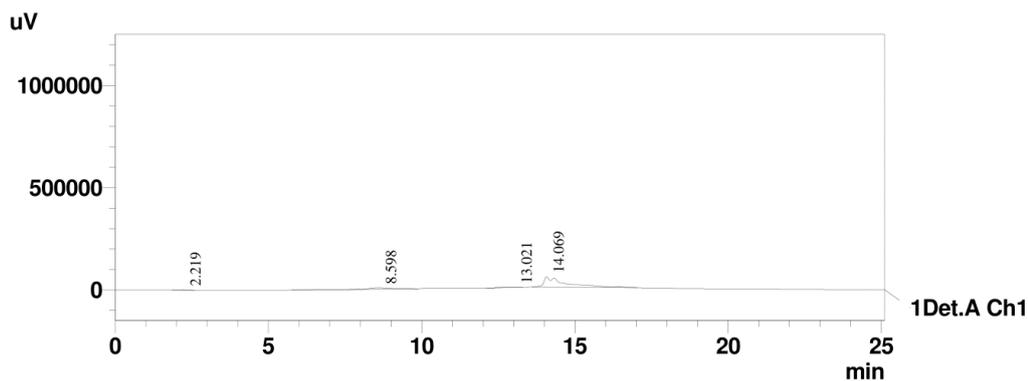


1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	/idth at 50% Heig	Tailing Facto	Area %	Conc. %
1	10.335	17322	2074	0.100	1.441	0.063	0.000
2	11.858	27229409	3981580	0.095	1.245	99.681	0.000
3	12.633	20189	6050	0.076	1.050	0.074	0.000
4	13.592	49565	8709	0.117	0.890	0.181	0.000
Total		27316485	3998413			100.000	

BRANCO

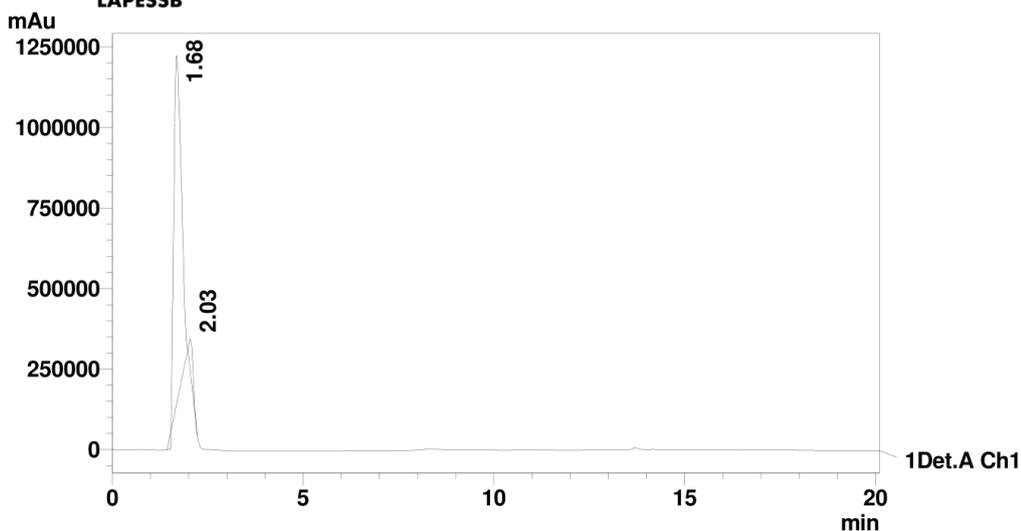


LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 15/1/2018
 Sample: RPF 662_15_01_18
 Vial: 30
 Injection Volume: 20
 Batch:



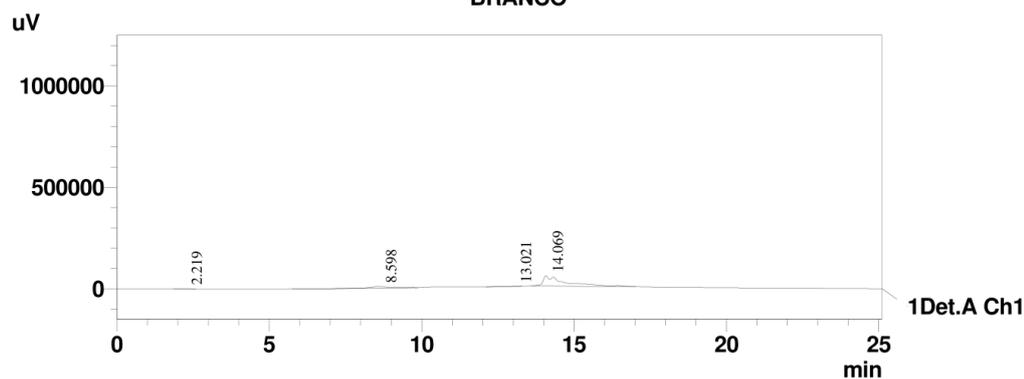
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	1.681	14439963	1081899	0.227	1.430	95.108	0.000
2	2.033	742764	93928	0.130	1.798	4.892	0.000
Total		15182728	1175827			100.000	

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm