



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E

SINTÉTICOS BIOATIVOS

TESE DE DOUTORADO

**ANÁLOGOS COM O NÚCLEO 3,4,5-TRIMETOXIBENZOÍLA
INSPIRADOS NA PIPLARTINA: ATIVIDADE TRIPANOCIDA E
CITOTÓXICA CONTRA CARCINOMA BUCAL**

RAYANNE HELLEN DO NASCIMENTO SILVA

João Pessoa

2023

RAYANNE HELLEN DO NASCIMENTO SILVA

**ANÁLOGOS COM O NÚCLEO 3,4,5-TRIMETOXIBENZOÍLA
INSPIRADOS NA PIPLARTINA: ATIVIDADE TRIPANOCIDA E
CITOTÓXICA CONTRA CARCINOMA BUCAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de Concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

João Pessoa

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Rayanne Hellen do Nascimento.

Análogos com o núcleo 3,4,5-trimetoxibenzoila
inspirados na piplartina : atividade tripanocida e
citotóxica contra carcinoma bucal / Rayanne Hellen do
Nascimento Silva. - João Pessoa, 2023.

223 f. : il.

Orientação: Damião Pergentino de Sousa.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Potencial anticâncer. 3.
Piper - Gênero. 4. Doença de Chagas. 5. Trypanosoma
cruzi. I. Sousa, Damião Pergentino de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

RAYANNE HELLEN DO NASCIMENTO SILVA

ANÁLOGOS COM O NÚCLEO 3,4,5-TRIMETOXIBENZOÍLA
INSPIRADOS NA PIPLARTINA: ATIVIDADE TRIPANOCIDA E
CITOTÓXICA CONTRA CARCINOMA BUCAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Tese aprovada em: 29/08/2023

BANCA EXAMINADORA:

 Documento assinado digitalmente
DAMIAO PERGENTINO DE SOUSA
Data: 04/09/2023 17:19:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa
(Universidade Federal da Paraíba)

 Documento assinado digitalmente
TAMIRES CARDOSO LIMA DE CARVALHO
Data: 05/09/2023 15:11:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Tamires Cardoso Lima de Carvalho
(Universidade Federal de Sergipe - UFS)

 Documento assinado digitalmente
SOCRATES CABRAL DE HOLANDA CAVALCANTI
Data: 05/09/2023 11:36:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti
(Universidade Federal de Sergipe - UFS)

 Documento assinado digitalmente
LUCIANA SCOTTI
Data: 05/09/2023 10:09:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Luciana Scotti
(Universidade Federal da Paraíba)

 Documento assinado digitalmente
SILVIO SANTANA DOLABELLA
Data: 07/09/2023 13:09:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella
(Universidade Federal de Sergipe - UFS)

Dedico a toda minha família e amigos por todo o apoio, força e motivação. Em especial para minha mãe, Letícia do Nascimento Santos, que sempre lutou por mim e hoje luta junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a vida e por me tornar quem sou hoje, por todas as vezes que a fraqueza quis se alojar Ele me lembrou que desistir não é uma opção. Foi Ele quem me guiou e caminhou junto comigo até aqui, Gratidão senhor!

À minha mãe, Letícia do Nascimento, mulher forte de garra e cheia de fé em Deus, e assim me tornou igual ou bem parecida, me ensinou que há tempo de chorar e tempo de engolir o choro. Obrigada por todo apoio, conselhos, fé em tudo que eu faço, abraços acolhedores quando mais preciso, a minha garrafa de café feita pra assim conseguir virar dia e noite estudando ou escrevendo, e ainda ouvir “oh minha filha vá dormir”; sem seus cuidados e amor não sei como estaria. Quero um dia poder retribuir ao menos metade de tudo que a senhora fez por mim. Te amo, incondicionalmente!

Aos meus irmãos Rayssa e Leonardo por todo apoio, conselhos e torcida, cuidaram de mim desde pequeninha, e me fizeram Titia. Obrigada aos meus sobrinhos Maria Geovana, Melyssa, Henrique, Guilherme e minha Florzinha vocês chegaram para alegrar nossa família. Assim como também agradeço ao meu cunhado e cunhada, obrigada por toda torcida.

À minha amiga/irmã que Deus me presenteou por meio da UFPB, Ana Júlia, da graduação até hoje. Sempre disposta a me ajudar, a me ouvir, a sorrir e a chorar junto comigo. Obrigada por sua amizade, por seu apoio, seus conselhos, pela companhia dos dias e noites de estudo e de escrita, obrigada por trilhar comigo esses anos todos, a vida fica mais leve quando temos amizades sinceras e levaremos isso até a velhice, duas idosas bebendo vinho e rindo da própria vida. Amo você! À minha amiga, Alana Rodrigues, por vivenciar todos esses anos de mestrado e doutorado comigo, sempre disposta a ajudar, a ensinar e sempre paciente. O mundo precisa de mais pessoas como você, obrigada por tudo!

À minha duplinha, Gabriela Lacet, uma amiga que apareceu do nada, mas foi justo no momento que eu mais precisei; vivenciei comigo momentos de força e vitórias, mas também de fraquezas e me ajudou em todos eles. Gratidão por sua amizade, Deus sempre me envia pessoas maravilhosas para me ajudar a viver minhas lutas. Obrigada por todo apoio, torcida, cuidado, viagens (aguardando as próximas) e por sempre garantir a gargalhada e o vinho hahaha, das amigas que levarei para velhice. Amo você!

Aos meus padrinhos Tia Mônica e Tio Carlos, obrigada por todo apoio, por sempre me acolherem como se eu fosse uma terceira filha, amo demais vocês. Assim como minhas primas Jennifer e Jhullyen por sempre estarem comigo e por torcerem por mim, são como irmãs. A todos meus familiares que sempre torceram por mim, acreditaram no meu propósito. Amo vocês.

Ao meu casal querido e sobrinho, Jacqueline, César e Miguel, obrigada por toda oração, torcida, conselhos e momentos partilhados, vocês são muito especiais para mim e moram no meu coração.

Aos meus amigos e parceiros de surto: Iana, Marina, Leandro, Maria Luiza, Sweltton, Felipe, Karla, Juan, Junior e Jonathas, com vocês aprendo muito a cada dia, e com certeza as piadas e memes tornam os dias mais leves. Que bom que somos todos loucos e que Deus nos apresentou. Obrigada por tudo!

As Girls Power: Evla, Ketlyn, Gabi, Gabriela Parente, Fernanda, Jamilly e Aline, os últimos meses foram complicados e vocês me ajudaram a passar por eles, quando eu já estava esgotada buscava nosso grupo para amenizar a tensão com as conversas que vão de treino e roupas a assuntos bem sérios. Gratidão a cada uma por trazer mais leveza aos meus dias, vocês são muito especiais!

Ao meu orientador, Professor Damião Pergentino de Sousa que, em 2014, me aceitou como aluna de Iniciação Científica e esse sim mudou minha vida. Obrigada por todos ensinamentos e incentivo tudo isso me ajudou a chegar até aqui e contribuiu com minha formação. Gratidão!

A todos os colegas do Laboratório de Química Farmacêutica da UFPB, Marianna, Susianny, Mayara, Allana Brunna, Lázaro, Carlos, Joice, Severino, Anna Emanuella e Jeremias, viveram esse ciclo junto comigo, um ajudando o outro no dia a dia do laboratório, obrigada por toda partilha de conhecimento e apoio, sou grata a cada um de vocês.

Aos meus que não estão mais aqui fisicamente (Painho, Vovô, Vovó Luiza, Tia Léo, Vovó Benedita, mas sei que de lá do céu cuidam de mim. Amo vocês!

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises da UFPB pela realização das análises de RMN de ^{13}C e ^1H ; ao Laboratório Analítico Multiusuário (CCS-UFPB) que realizaram as análises de Infravermelho. Ao Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ) pelas análises de espectrometria de massa.

Ao professor Bruno Robbs e sua equipe (UFF) pela colaboração nos ensaios citotóxicos realizados, parceria no artigo e disponibilidade referente a explicações e apoio na escrita. À professora Alice Maria e sua equipe (UFC), em especial ao Emanuel Paula que, além de realizar os ensaios tripanocidas, sempre esteve atento e muito solícito com todas minhas dúvidas, gratidão por tudo e sucesso, vocês merecem.

A todos meus professores e mestres que com suas aulas e partilhas de vivência me incentivaram a ser cada dia mais determinada em busca dos meus objetivos profissionais. Serei eternamente grata a cada um de vocês que me auxiliariam durante todo esse processo, muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora da tese de doutorado por todas as contribuições. À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pelo apoio institucional e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho, me tornar doutora em “Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos”

RESUMO

A doença de Chagas está entre as treze doenças mais negligenciadas do mundo, mesmo sendo uma patologia bastante relatada e conhecida, continua se tratando de um problema socioeconômico em vários países latino-americanos. Outra doença também considerada um problema de saúde pública é o câncer, a exemplo do câncer de cabeça e pescoço, sendo que os mais comuns estão localizados na região da cavidade oral e apresenta taxa de sobrevida de apenas cinco anos. Portanto, a pesquisa por novos candidatos a fármacos antiparasitários e antitumorais é imprescindível. No presente trabalho uma coleção de vinte e três derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico foram preparados via esterificação de Fischer, substituição nucleofílica utilizando haleto de alquila ou arila, reação de Mitsunobu e amidação com PyBOP. As estruturas dos produtos foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , e espectrometria de massas de alta resolução. Nove compostos são inéditos na literatura, sendo eles os compostos **6**, **9-11**, **13-15**, **22** e **23**. Os derivados foram avaliados quanto a sua ação inibitória contra o *Trypanosoma cruzi* e a atividade citotóxica frente a células de carcinoma de células escamosas da língua (SCC9). Na avaliação da atividade tripanocida os derivados **15-18** e **20** foram bioativos frente as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. O derivado *N*-iso-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**17**) apresentou maior potência tripanocida com $\text{IC}_{50} = 2,21 \mu\text{M}$ e índice de seletividade (IS) = 298,6. O resultado evidencia que as benzamidas tem ação antiparasitária mais promissora e que a presença de um substituinte alquílico volumoso potencializa a ação tripanocida. No estudo de modelagem molecular sugeriu-se um mecanismo de ação em que o alvo mais provável de **17** no *T. cruzi* seria a enzima histona desacetilase (HDAC). Enquanto na avaliação da atividade citotóxica foi realizada pelo teste de MTT, com os compostos **1-8**, **9**, **13-17** e **19-23**. Entre os compostos testados, o 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**) e o composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metil-benzila (**11**) apresentaram IC_{50} de 46,21 e 68,69 μM , e demonstraram alta seletividade, IS > 16 e 53, respectivamente. Estes derivados também causaram apoptose seletiva em células cancerígenas SCC9, sugerindo que a presença de substituintes aromáticos com metila ou metoxila na posição *para* aumentam a potência e seletividade. A modelagem molecular de **10** sugeriu um mecanismo de ação multialvo para a sua atividade antitumoral com CRM1 como o principal receptor alvo. Dessa forma, pode-se concluir que alguns análogos da piplartina apresentam ação tripanocida e antitumoral, contudo, são necessários estudos mais avançados para um melhor entendimento dos seus possíveis mecanismos de ação.

Palavras-chave: anticâncer; Piper; antitumoral; alcaloide; doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease is among the thirteen most neglected diseases in the world, despite being a well-reported and well-known pathology, it continues to be a socioeconomic problem in several Latin American countries. Another disease also considered a public health problem is cancer, such as head and neck cancer, the most common of which are located in the oral cavity and have a survival rate of just five years. Therefore, the search for new candidates for antiparasitic and antitumor drugs is essential. In the present work, a collection of twenty-three 3,4,5-trimethoxybenzoic acid derivatives were prepared via Fischer esterification, nucleophilic substitution using alkyl or aryl halide, Mitsunobu reaction and amidation with PyBOP. The structures of the products were characterized by infrared spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR, and high-resolution mass spectrometry. Nine compounds are new to the literature, namely compounds **6**, **9-11**, **13-15**, **22** and **23**. The derivatives were evaluated for their inhibitory action against *Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activity against tongue squamous cell carcinoma cells (SCC9). In the evaluation of trypanocidal activity, derivatives **15-18** and **20** were bioactive against the epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes forms of *T. cruzi*. The *N*-iso-butyl-3,4,5-trimethoxybenzamide derivative (**17**) showed greater trypanocidal potency with $\text{IC}_{50} = 2.21\ \mu\text{M}$ and selectivity index (SI) = 298.6. The result shows that benzamides have a more promising antiparasitic action and that the presence of a bulky alkyl substituent enhances the trypanocidal action. In the molecular modeling study, a mechanism of action was suggested in which the most likely target of **17** in *T. cruzi* would be the enzyme histone deacetylase (HDAC). While the evaluation of cytotoxic activity was carried out using the MTT test, with compounds **1-8**, **9**, **13-17** and **19-23**. Among the compounds tested, 4-methoxy-benzyl 3,4,5-trimethoxybenzoate (**10**) and the compound 4-methyl-benzyl 3,4,5-trimethoxybenzoate (**11**) presented IC_{50} s of 46.21 and 68.69 μM , and demonstrated high selectivity, $\text{SI} > 16$ and 53, respectively. These derivatives also caused selective apoptosis in SCC9 cancer cells, suggesting that the presence of aromatic substituents with methyl or methoxy at the para position increases potency and selectivity. Molecular modeling of **10** suggested a multitarget mechanism of action for its antitumor activity with CRM1 as the main target receptor. Therefore, it can be concluded that some piplartin analogues have trypanocidal and antitumor action, however, more advanced studies are needed to better understand their possible mechanisms of action.

Keywords: anticancer; *Piper*; antitumor; alkaloid; Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reações para preparação de ésteres: (a) Esterificação de Fischer; (b) Esterificação com haletos de alquila ou arila e (c) Reação de Mitsunobu.	41
Esquema 2. Mecanismo de reação da Esterificação de Fischer.	42
Esquema 3. Mecanismo de reação da esterificação com haletos de alquila e arila.	43
Esquema 4. Mecanismo da reação da Esterificação de Mitsunobu.	44
Esquema 5. Mecanismo proposto da reação de acoplamento para amidação utilizando agente de acoplamento PyBOP.....	46
Esquema 6. Reações para preparação de ésteres derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.....	49
Esquema 7. Esquema geral da esterificação de Fischer utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcool alifático.....	52
Esquema 8. Esquema geral da esterificação utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e haletos de alquila ou arila com acetona sob refluxo.	53
Esquema 9. Esquema geral da reação de Mitsunobu utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcool aromático.....	55
Esquema 10. Esquema da amidação através do método utilizando agente de acoplamento PyBOP, tendo como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.....	56
Esquema 11. Esquema geral da esterificação de Fischer utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcool alifático.....	105
Esquema 12. Esquema da esterificação utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico com haletos de alquila ou arila em acetona sob refluxo.	109
Esquema 13. Reação de Mitsunobu utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcoois aromáticos.	114
Esquema 14. Reação de amidação com PyBOP e o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.....	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da piplartina.....	28
Figura 2. Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	30
Figura 3. Estruturas químicas do Benznidazol (A) e Nifurtimox (B).	31
Figura 4. Principais locais anatômicos do carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço.	34
Figura 5. Estrutura química do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.....	39
Figura 6. Estruturas químicas e nomenclatura dos derivados 1–23.....	50
Figura 7. Gráfico de dispersão de células do estudo de morte celular.	73
Figura 8. Gráfico de histograma apresentando as intensidades de fluorescência do corante Rho123 em epimastigotas tratadas com os compostos 15, 16, 17, 18 e 20.	75
Figura 9. Energias livres de ligação do composto 17 aos seus potenciais alvos moleculares.	80
Figura 10. Modo de ligação previsto para o composto 17 a HDAC.....	81
Figura 11. Atividade hemolítica do composto 10.....	89
Figura 12. Avaliação a exposição à fosfatidilserina (apoptose) do composto 10.	90
Figura 13. Avaliação do ciclo celular e análise SubG1 do composto 10.	91
Figura 14. Avaliação da ativação de caspases do composto 10.	91
Figura 15. Avaliação do ciclo celular e análise SubG1 do composto 10.	92
Figura 16. Energias livres previstas de ligação do composto 10 aos seus alvos de ligação.	98
Figura 17. Modo de ligação previsto e interações ligante-receptor para o complexo composto 9-CRM1.	99
Figura 18. Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de 3,4,5–trimetoxibenzoato de metila (1).	158
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H de 3,4,5–trimetoxibenzoato de metila (1), (CDCl ₃ , 400 MHz).	158
Figura 20. Expansão do espectro de RMN ¹ H de 3,4,5–trimetoxibenzoato de metila (1), (CDCl ₃ , 400 MHz).....	159
Figura 21. Expansão do espectro de RMN ¹ H de 3,4,5–trimetoxibenzoato de metila (1), (CDCl ₃ , 400 MHz).....	159

Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila (1) (CDCl_3 , 100 MHz).	160
Figura 23. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (2).	160
Figura 24. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (2), (CDCl_3 , 400 MHz).	161
Figura 25. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (2), (CDCl_3 , 400 MHz).	161
Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (2), (CDCl_3 , 400 MHz).	162
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (2) (CDCl_3 , 100 MHz).	162
Figura 28. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (2) (CDCl_3 , 100 MHz).	163
Figura 29. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (3).	163
Figura 30. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 400 MHz).	164
Figura 31. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 400 MHz).	164
Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (3), (CDCl_3 , 400 MHz).	165
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (3) (CDCl_3 , 100 MHz).	165
Figura 34. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (4).	166
Figura 35. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (4), (CDCl_3 , 400 MHz).	166
Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (4), (CDCl_3 , 400 MHz).	167
Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (4), (CDCl_3 , 400 MHz).	167

Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (4) (CDCl_3 , 100 MHz).....	168
Figura 39. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (5).	168
Figura 40. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (5), (CDCl_3 , 500 MHz).	169
Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (5), (CDCl_3 , 500 MHz).....	169
Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (5), (CDCl_3 , 500 MHz).....	170
Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (5) (CDCl_3 , 125 MHz).	170
Figura 44. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6).	171
Figura 45. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz).	171
Figura 46. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz).....	172
Figura 47. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz).....	172
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6) (CDCl_3 , 100 MHz).....	173
Figura 49. Espectro de Massas de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6).	173
Figura 50. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7).	174
Figura 51. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz).	174
Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz).....	175
Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7) (CDCl_3 , 100 MHz).	175

Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7) (CDCl_3 , 100 MHz).	176
Figura 55. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (8).	176
Figura 56. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (8), (CDCl_3 , 400 MHz).	177
Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (8), (CDCl_3 , 400 MHz).	177
Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (8), (CDCl_3 , 400 MHz).	178
Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (8) (CDCl_3 , 100 MHz).	178
Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (8) (CDCl_3 , 100 MHz).	179
Figura 61. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9).	179
Figura 62. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 400 MHz).	180
Figura 63. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 400 MHz).	180
Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 100MHz).	189
Figura 65. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9), (CDCl_3 , 100 MHz).	181
Figura 66. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9).	182
Figura 67. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (10).	182
Figura 68. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (10), (CDCl_3 , 400 MHz).	183
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (10), (CDCl_3 , 400 MHz).	183

Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (10), (CDCl_3 , 100 MHz).....	184
Figura 71. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (10).	184
Figura 72. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (11).....	185
Figura 73. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (11), (CDCl_3 , 400 MHz).....	185
Figura 74. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (11), (CDCl_3 , 400 MHz).	186
Figura 75. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (11), (CDCl_3 , 100 MHz).....	186
Figura 76. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (11).	187
Figura 77. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (12).	187
Figura 78. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (12), (CDCl_3 , 400 MHz).	188
Figura 79. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (12), (CDCl_3 , 400 MHz).....	188
Figura 80. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (12) (CDCl_3 , 100 MHz).	189
Figura 81. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (12) (CDCl_3 , 100 MHz).....	189
Figura 82. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13).....	190
Figura 83. Espectro de RMN ^1H , de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13) (CDCl_3 , 500 MHz).....	190
Figura 84. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13), (CDCl_3 , 500 MHz).....	191
Figura 85. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13), (CDCl_3 , 500 MHz).....	191

Figura 86. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13), (CDCl_3 , 125 MHz).	192
Figura 87. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13).	192
Figura 88. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14).	193
Figura 89. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14), (CDCl_3 , 500 MHz).	193
Figura 90. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14), (CDCl_3 , 400 MHz).	194
Figura 91. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14), (CDCl_3 , 125 MHz).	194
Figura 92. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14), (CDCl_3 , 100 MHz).	195
Figura 93. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14).	195
Figura 94. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (15).	196
Figura 95. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (15), (CDCl_3 , 500 MHz).	196
Figura 96. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (15), (CDCl_3 , 500 MHz).	197
Figura 97. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (15) (CDCl_3 , 100 MHz).	197
Figura 98. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (15) (CDCl_3 , 100 MHz).	198
Figura 99. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (15).	198
Figura 100. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de <i>N</i> -butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (16).	199
Figura 101. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (16), (CDCl_3 , 400 MHz).	199

Figura 102. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (16), (CDCl ₃ , 400 MHz).....	200
Figura 103. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (16), (CDCl ₃ , 400 MHz).....	200
Figura 104. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (16), (CDCl ₃ , 100 MHz).....	201
Figura 105. Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>N</i> -Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (17).....	201
Figura 106. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (17), (CDCl ₃ , 500 MHz).	202
Figura 107. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (17), (CDCl ₃ , 500 MHz).....	202
Figura 108. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (17), (CDCl ₃ , 100 MHz).....	203
Figura 109. Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>N</i> -Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (18).....	203
Figura 110. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (18), (CDCl ₃ , 400 MHz).	204
Figura 111. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (18), (CDCl ₃ , 400 MHz).	204
Figura 112. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (18), (CDCl ₃ , 100 MHz).....	205
Figura 113. Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de <i>N</i> -ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19).....	205
Figura 114. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19), (DMSO-d ₆ , 500 MHz).....	206
Figura 115. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19), (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	206
Figura 116. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19), (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	207
Figura 117. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19), (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	207

Figura 118. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19), (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	208
Figura 119. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19), (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	208
Figura 120. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20).	209
Figura 121. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	209
Figura 122. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	210
Figura 123. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	210
Figura 124. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	211
Figura 125. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20), (DMSO- d_6 , 100 MHz).	211
Figura 126. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20), (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	212
Figura 127. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>N</i> -benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (21).	212
Figura 128. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (21), (CDCl_3 , 400 MHz).	213
Figura 129. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (21), (CDCl_3 , 400 MHz).....	213
Figura 130. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (21), (CDCl_3 , 100 MHz).....	214
Figura 131. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (21), (CDCl_3 , 100 MHz).....	214
Figura 132. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22).	215
Figura 133. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22), (CDCl_3 , 400 MHz).....	215

Figura 134. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22), (CDCl_3 , 400 MHz).....	216
Figura 135. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22), (CDCl_3 , 400 MHz).....	216
Figura 136. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22), (CDCl_3 , 100 MHz).....	217
Figura 137. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22), (CDCl_3 , 100 MHz).....	217
Figura 138. Espectro Massa de alta resolução do <i>N</i> -(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22).....	218
Figura 139. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de <i>N</i> -4-clorobenxil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23).....	218
Figura 140. Espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -4-clorobenxil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23), (CDCl_3 , 500 MHz).....	219
Figura 141. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -4-clorobenxil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23), (CDCl_3 , 500 MHz).....	219
Figura 142. Expansão do espectro de RMN ^1H de <i>N</i> -4-clorobenxil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23), (CDCl_3 , 500 MHz).....	220
Figura 143. Espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -4-clorobenxil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23), (CDCl_3 , 125 MHz).....	220
Figura 144. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de <i>N</i> -4-clorobenxil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23), (CDCl_3 , 125 MHz).....	221
Figura 145. Espectro Massa de alta resolução do <i>N</i> -4-clorobenxil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23).....	221
Figura 146. Artigo 1 publicado na revista Molecules.....	222
Figura 147. Artigo 2 aceito na revista Applied Sciences.....	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades farmacológicas da pipartina descritas na literatura.	38
Tabela 2. Informações reacionais dos derivados 1–6.	52
Tabela 3. Informações reacionais dos derivados 7–10 e 13–15.....	54
Tabela 4. Informações reacionais dos derivados 7–10 e 13–15.....	55
Tabela 5. Informações reacionais dos derivados 7–10 e 13–15.....	57
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos 6 e 9.	64
Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos 10, 11 e 13.	65
Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos 14 e 15.	66
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos 22 e 23.	67
Tabela 10. Dados espectroscópicos de massas de alta resolução dos compostos 6, 9-11, 13-15, 22 e 23.	68
Tabela 11. Viabilidade celular e atividade tripanocida de derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
Tabela 12. Potenciais alvos moleculares do composto 17 em <i>T. cruzi</i>	77
Tabela 13. Resultados do acoplamento dos potenciais alvos do composto 17.....	78
Tabela 14. Energias livres previstas de ligação do composto 17 aos seus alvos potenciais e seus componentes de acordo com o método MM-PBSA.	79
Tabela 15. Previsões de ADME para o composto 17 e o medicamento de referência benznidazol.....	82
Tabela 16. Resultados da IC_{50} dos compostos 1-8, 10, 11, 13-17 e 19-23 frente a células SCC9.	85
Tabela 17. Caracterização dos compostos mais seletivos em outras linhagens de OSCC.	87
Tabela 18. Seletividade do composto 10.	88
Tabela 19. Potenciais alvos moleculares do composto 10.	95
Tabela 20. Resultados do Docking do composto 10 aos seus alvos potenciais.	96
Tabela 21. Predição ADMET para o composto 10.	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: acetato de etila

APT: *Attached Proton Test*

CC: Cromatografia em coluna

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CDCl₃: clorofórmio

Cl: cloro

IC₅₀: Concentração Inibitória Média

INCA – Instituto Nacional do Câncer

CN: Controle Negativo

CP: Controle Positivo

DEAD: Azodicarboxilato de dietila

DMSO: dimetilsulfóxido

Et₃N: trietilamina

H₂SO₄: ácido sulfúrico

Hex: hexano

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

J: constante de acoplamento

Me: Metila

mg: miligrama

MHz: Megahertz

mL: mililitro

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

Na₂SO₄: sulfato de sódio

OMe: Metoxila

P.F.: Ponto de fusão

ppm: partes por milhão

QSAR: Relação estrutura-atividade quantitativa

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SAR: Relação estrutura-atividade

t. a.: temperatura ambiente

THF: tetrahidrofurano

TPP: Trifenilfosfina

UV: Ultravioleta

μM: Micromolar

δ: Deslocamento químico em ppm

s: Singleto

sl: Singleto largo

d: Dubleto

dd: Duplo dubleto

t: Tripleto

q: Quarteto

quint: Quinteto

sex: Sexteto

sept: Septeto

m: Multiplete

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ESQUEMAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
SUMÁRIO.....	XXI
1.0 INTRODUÇÃO.....	25
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
2.1. Considerações gerais sobre a doença de Chagas	29
2.2. Considerações Gerais sobre o Câncer	32
2.2.1. Câncer de cabeça e pescoço (CCP)	33
2.2.2. Carcinoma epidermoide (CE)	35
2.3. Considerações gerais sobre a Piplartina	37
2.3.1. Atividades Farmacológicas da Piplartina	37
2.4. Considerações gerais sobre ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.....	39
2.5. Mecanismo de esterificações	40
2.6. Mecanismo de amidação	45
2.7. Estudos de Relação-Estrutura-Atividade biológica.....	47
3.0. OBJETIVOS.....	48
3.1. Objetivo Geral	48
3.2. Objetivos específicos.....	48
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Etapa de preparação dos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.....	49
4.2. Análise espectroscópica dos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico	57
4.2.1. Interpretação dos espectros de infravermelho dos compostos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico 1-23	57
4.2.2. Interpretação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos derivados obtidos.....	59
4.2.3. Análise dos espectros de massas dos compostos 6, 9-11, 13-15, 22 e 23	67

4.3. Estudo de atividade tripanocida dos derivados 1–23	68
4.3.1. Viabilidade celular.....	68
4.3.2. Perfil de morte celular.....	73
4.3.3. Efeito no potencial transmembrânico mitocondrial	74
4.4. Estudo de modelagem molecular tripanocida.....	76
4.4.1. Predições ADMET	82
4.5. Estudo de atividade citotóxica dos derivados 1-8, 10, 11, 13-17 e 19-23	83
4.5.1. Atividade citotóxica	83
4.5.2. Seletividade	87
4.5.3. Atividade hemolítica	88
4.5.4. Investigação da via de morte celular.....	89
4.6. Estudo de modelagem molecular.....	93
4.6.1. Predições ADMET	99
5.0. CONCLUSÕES.....	102
6.0. PARTE EXPERIMENTAL.....	103
6.1. Materiais e métodos utilizados	103
6.1.2. Métodos cromatográficos	103
6.1.3. Análises espectroscópicas.....	103
6.1.3.1. Ressonância Magnética Nuclear.....	103
6.1.3.2. Infravermelho.....	104
6.1.3.3. Espectrometria de Massas de Alta resolução.....	104
6.1.4. Ponto de Fusão	104
6.2. Metodologias de preparação dos compostos 1-23	105
6.2.1. Metodologia de obtenção dos derivados da 3,4,5-trimetoxibenzoatos 1-6	105
6.2.2. Dados espectroscópicos de 1–6	106
6.2.2.1. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de metila (1)	106
6.2.2.2. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de etila (2).....	106

6.2.2.3. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de propila (3).....	107
6.2.2.4. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de isopropila (4).....	107
6.2.2.5. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de butila (5)	108
6.2.2.6. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de isopentila (6)	108
6.2.3. Obtenção dos derivados 7–10 e 13–15	109
6.2.4 Dados espectroscópicos de 7-10 e 13-15.....	110
6.2.4.1. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de pentila (7)	110
6.2.4.2. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de decila (8).....	110
6.2.4.3. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9).....	111
6.2.4.4. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (10)	111
6.2.4.5. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13).....	112
6.2.4.6. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14)	112
6.2.4.7. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de difenila (15).....	113
6.2.5. Obtenção dos derivados 11 e 12:	114
6.2.6. Dados espectroscópicos de 11 e 12	115
6.2.6.1. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (11).....	115
6.2.6.2. 3,4,5–Trimetoxibenzoato de benzila (12)	115
6.2.7. Obtenção das 3,4,5–trimetoxibenzamidas 16-23.....	116
6.2.8 Dados espectroscópicos de 16-23.....	117
6.2.8.1. N-Butil-3,4,5–trimetoxibenzamida (16)	117
6.2.8.2. N-Isobutil-3,4,5–trimetoxibenzamida (17).....	117
6.2.8.3. N-Pirrolidil-3,4,5–trimetoxibenzamida (18)	118
6.2.8.4. N-Ciclohexil-3,4,5–trimetoxibenzamida (19).....	118
6.2.8.5. N-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20).....	119
6.2.8.6. N-benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (21)	120
6.2.8.7. N-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22)	120
6.2.8.8. N-4-clorobenzil-3,4,5–trimetoxibenzamida (23).....	121

6.3. Estudo da atividade tripanocida dos compostos 15-18 e 20	121
6.3.1. Coleta e preparação de células	122
6.3.2. Atividade Tripanocida dos Compostos 15-18 e 20	122
6.3.3. Perfil de Morte Celular	123
6.3.4. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	123
6.4. Estudo de Modelagem Molecular Tripanocida	124
6.4.1. Seleção dos alvos	124
6.4.2. Docking Molecular	124
6.4.3. Simulações de dinâmica molecular e estimativa energias livres de ligação	125
6.4.4. Previsões ADMET.....	126
6.5. Determinação da atividade citotóxica dos derivados 1-8, 10, 11, 13-17 e 19-23	126
6.5.1. Ensaio de Viabilidade Celular (Citotoxicidade)	126
6.5.2. Ensaio de hemolítico	127
6.5.3. Ciclo Celular e Análise SubG1	128
6.5.4. Análise de exposição à fosfatidilserina (apoptose)	128
6.5.4. Análise de Caspases	128
6.5.5. Análise Estatística, Cálculo de IC ₅₀ e Índice de Seletividade (I.S).....	128
6.6. Estudo de Modelagem Molecular do composto 10 frente células SCC9	129
6.6.1. Seleção dos alvos	129
6.6.2. Docking molecular	130
6.6.3. Simulações de Dinâmica Molecular e Energias Livres de Ligação	131
6.6.4. Previsões ADMET.....	132
REFERÊNCIAS	133
7. APÊNDICE – - ESPECTROS DE RMN ¹ H E ¹³ C, IV E EMAR	158
8. ANEXO	222

1.0 INTRODUÇÃO

A pesquisa de novos fármacos é de fundamental importância, pois visa atender às mudanças e necessidades da população. Além disso, a busca por protótipos bioativos e o planejamento de novos fármacos apresenta relevância econômica e social. Atualmente a grande necessidade mundial é por substâncias com maior potência ou que sejam eficazes na terapêutica de patologias que até então não se há cura, que apresentem maior segurança quanto a administração, como também a redução dos efeitos colaterais. Fatores como resistência aos antimicrobianos, alta citotoxicidade dos antineoplásicos, baixo índice de investimentos em fármacos para terapêutica de doenças negligenciadas, assim como o avanço científico e tecnológico, torna este um campo promissor de pesquisa por novos protótipos bioativos (PALMEIRA FILHO; PAN, 2003; VIEIRA; OHAYON, 2006; ZHU et al., 2022).

O câncer é uma doença desencadeada por um crescimento descontrolado de células, denominado de diferenciação celular, que podem se espalhar para diferentes partes do corpo (NIH, 2022). É considerado um problema de saúde pública mundial, onde uma em cada sete mortes no mundo é causada pelo câncer, se tornando assim mais comum do que as mortes causadas pela síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), tuberculose e malária combinadas (ACS, 2017).

Baseados nos dados estatísticos do Global Cancer Observatory (Globocan), realizados em 2020, indica que houve 19,3 milhões novos casos de câncer no mundo. Demonstrando assim que a um em cada cinco indivíduos serão acometidos pelo câncer durante sua vida (FERLAY et al., 2021; SUNG et al., 2021).

No Brasil, estima-se para 2023 a 2025 que ocorrerão 704 mil novos casos de câncer, 483 mil ao excluir casos de câncer de pele não melanoma, este que segundo os estudos apresentará maior incidência, com 220 mil novos casos (31,3%), logo após cânceres de mama, apresentando 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, com 21 mil (3,1%) casos novos (INCA, 2022).

Atualmente, o câncer é o conjunto de doenças que mais causam temor em toda a população, sendo considerado mais comum em homens: de pulmão, de próstata, de estômago, de fígado, colorretal e cavidade oral. Enquanto em mulheres: de mama, de pulmão, de colo do útero, colorretal, glândula tireóide e do estômago são mais comuns (INCA, 2014; WHO, 2017; ZHANG et al., 2016).

Estudos já mostraram que o câncer de cabeça e pescoço (CCP) faz parte de um grupo de neoplasias que apresentam uma origem comum, visto que a maioria se origina da mucosa que recobre o epitélio do trato respiratório e digestivo (FERNÁNDEZ et al., 2015; VILLAGÓMEZ-ORTÍZ et al., 2016). Entre as 10 principais regiões anatômicas afetadas pelo CCP está o complexo bucal, devido a isso o termo câncer oral (CO) pode incluir câncer de lábios, cavidade oral, orofaringe e glândulas salivares (HERMIDA ROJAS, 2007).

Inseridos nos tumores malignos temos o carcinoma epidermoide (CE), que se localiza geralmente na boca, sendo cerca de 90% dos cânceres localizado nessa região, principalmente na língua e assoalho bucal. Esta patologia é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, visto que apresenta alta complexidade e é um câncer muito agressivo, com alta probabilidade de evolução para metástase loco regional e a distância (BRENER et al., 2007; MASSANO et al., 2006; BLATT et al., 2016; FELLER et al., 2017; CASTRO, 2018).

Outras doenças que tem acometido cada vez mais a população são as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) que fazem parte do grupo variado de patologias de origem protozoária, helmíntica, bacteriana, viral, fúngica e parasitária (OMS, 2020; Molyneux et al., 2017).

A Doença de Chagas (DC), também denominada tripanossomíase americana e considerada uma DTN é uma parasitose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, relatada pela primeira vez em 1909 pelo cientista Carlos Chagas, na cidade de Lassance, Minas Gerais (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

As DTNs, por afetarem, em sua maioria, populações mais carentes e de países em desenvolvimento, são doenças que não atraem investimentos e pesquisas por parte das indústrias farmacêuticas. Comprovando isto, dados estatísticos mostram que somente 1,3% dos fármacos introduzidos na terapêutica, entre 1975 e 2004, foram direcionados para o tratamento dessas doenças. Devido a esses fatores, as DTNs são consideradas um sério problema de saúde pública, chegando a representar 11,4% das doenças mundiais (PEREIRA, 2022).

Inseridos neste contexto, muitos produtos naturais estão disponíveis como agentes quimioterápicos contra o câncer, como também já há relatos na literatura sobre a atividade tripanocida desses compostos (REDDY et al., 2003; ARIOKA et al., 2010; PASSALACQUA et al., 2015; GARCIA et al., 2017; ESPINOZA-HICKS et al., 2019; GOMES et al., 2019).

Grandes esforços têm sido dedicados ao estudo fitoquímico de plantas, apresentando grande potencial anticâncer. Desta forma, a caracterização dos componentes químicos ativos

presentes nos produtos naturais, assim como o mecanismo de ação de cada um deles são, na atualidade, um enorme desafio para as pesquisas científicas da área (GEBHARDT, 2000).

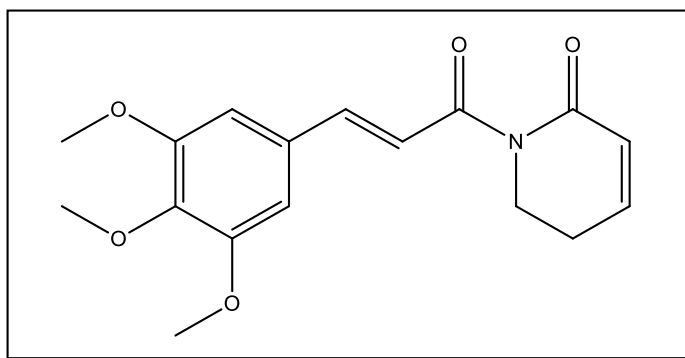
O pesquisador pioneiro da atividade antitumoral das plantas foi HARTWELL e colaboradores durante o período de 1947 – 1953, que iniciou esse estudo racional e organizado, foi nesta pesquisa que constituintes puros originados de plantas foram pela primeira vez caracterizados e assim relatada sua atividade antineoplásica (HARTWELL, 1967).

Nesse contexto, as espécies da família Piperaceae têm sido objeto de estudos químico-farmacológicos devido ao seu elevado potencial como fonte de metabólitos secundários bioativos, especialmente frente a células tumorais (WANG et al., 2014; BEZERRA et al., 2013; REGASINI et al., 2009). De acordo com Costa-Lotufo e colaboradores (2010), a substância piplartina (**Figura 1**), também conhecida como piperlongumina, é um fenilpropanoide trimetoxilado, classificado como alcaloide, encontrado em algumas espécies do gênero *Piper*.

O gênero *Piper* (Piperaceae), contém cerca de 2.000 espécies de plantas distribuídas principalmente em áreas tropicais, sendo considerada uma fonte potencial de medicamentos com base na utilização de algumas espécies de *Piper* na medicina tradicional. Em países como Índia e China, as espécies de *Piper* também são usadas em formulações para tratar o câncer. Outros estudos mostram que estas plantas também são úteis contra a asma, bronquite, febre, aflições hemorroidais, doenças gastrointestinais e reumatismo. As preparações obtidas a partir de plantas do gênero *Piper* apresentam atividade anti-inflamatória, inseticida, e anti-hipertensiva, bem como atividade anticancerígena. Há relatos científicos que este metabólito apresenta atividades ansiolítica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, tripanocida, leishmanicida e anticâncer, mas foi encontrada apenas uma abordagem com atividade citotóxica com séries de análogos sintéticos (PARMAR et al., 1997; BEZERRA et al., 2013; KUMAR et al., 2013; WANG et al., 2014).

Portanto, no presente estudo avaliou-se o potencial citotóxico de uma coleção de análogos da piplartina frente às células tumorais e formas evolutivas do *T. cruzi*. O planejamento de preparação dos compostos considerou parâmetros como lipofilicidade, além de efeitos eletrônicos e estéricos, visando a obtenção de análogos com melhor perfil farmacológico. A relevância do presente trabalho está na busca de protótipos a fármacos que apresentem atividade citotóxica específica para células cancerígenas e atividade tripanocida.

Figura 1. Estrutura química da piplartina.



Fonte: Elaborado pela autora.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações gerais sobre a doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, apresenta como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, descrito pela primeira vez na literatura em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879-1934). Este pesquisador, além de ser o primeiro a citar a doença, também detalhou o ciclo de transmissão (vetores, hospedeiros e um novo organismo infeccioso), assim como as manifestações clínicas agudas do primeiro caso humano (CHAGAS, 1909; DÍAZ-BELLO et al., 2014).

De acordo com a OMS, DC é uma das treze doenças negligenciadas do mundo; mesmo sendo uma patologia conhecida há décadas, continua sendo um problema social e econômico em vários países latino-americanos (HOTEZ et al., 2007; MATHERS; EZZATI; LOPEZ, 2007; MONCAYO; SILVEIRA, 2017).

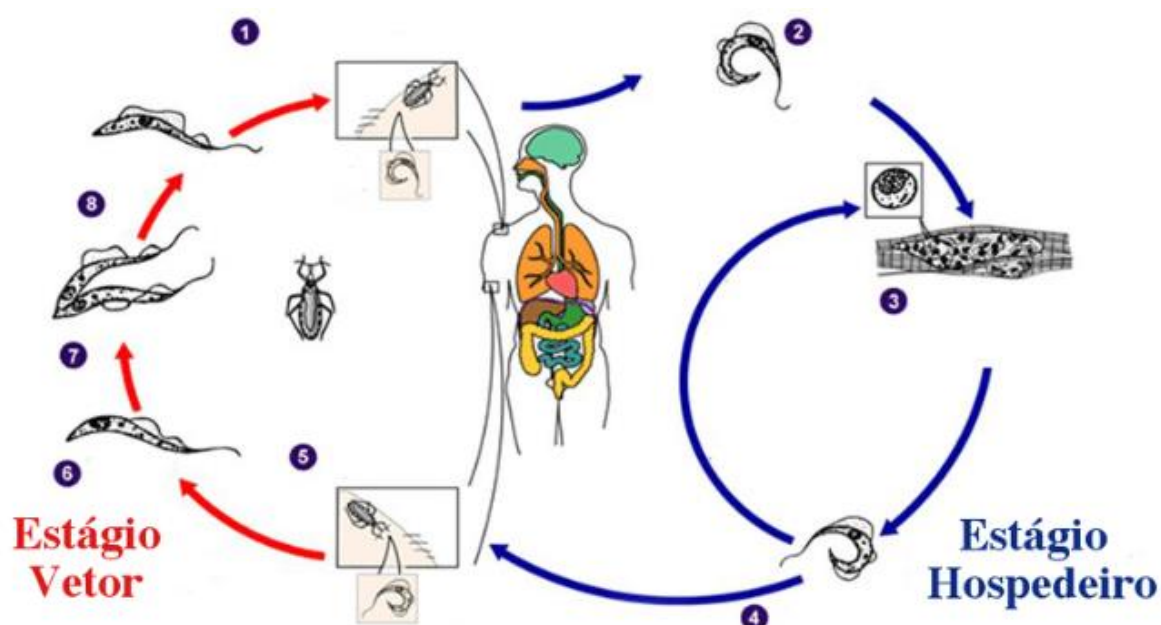
O *T. cruzi* faz parte da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao subgênero *Schizotrypanum*, em sua morfologia pode apresentar um flagelo. Como também, presença do cinetoplasto (área que concentra o DNA mitocondrial). O ciclo de desenvolvimento deste parasito apresenta três formas evolutivas: epimastigota (replicativa e não infectante, presente no intestino superior do inseto), tripomastigota (forma não replicativa, infectante, presente na porção posterior do intestino do inseto) e, por fim, a amastigota (forma replicativa intracelular nos hospedeiros vertebrados) (VOTÝPKA et al., 2015; SOUZA et al., 2018).

Seguindo as estimativas, 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* no mundo, principalmente em países da América Latina, apresentando sua transmissão aos humanos de forma vetorial, ocorrendo pelo contato com os dejetos (urina e fezes) de triatomíneos infectados. A cada ano há aproximadamente 170 mil novos casos e 10 mil óbitos pela DC (WHO, 2020; DNDI, 2021).

No Brasil, os triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros”, estes são insetos invertebrados hematófagos que, ao realizarem o hematofagismo em animais vertebrados, podem se contaminar com formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. No intestino médio do inseto, estas formas evoluem para epimastigotas que se multiplicam por divisão binária, permitindo a manutenção da infecção no inseto. Por fim, realizam diferenciação para forma tripomastigota metacíclica e estas ficam aderidas à região retal do inseto, sendo expelidas em conjunto com os dejetos deste inseto durante o repasto sanguíneo. Para infecção do hospedeiro vertebrado (humano) esse parasito se liga a lipossomas do hospedeiro, que causa

a formação de um vacúolo endocítico, sendo este necessário para a invasão de macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. No meio intracelular, o parasita causa a liberação de enzimas que quebram o vacúolo, e assim diferencia-se em formas amastigotas intracelulares. Estas, por sua vez, multiplicam-se por divisão binária, logo após, são transformadas em tripomastigotas que ficarão disponíveis na corrente sanguínea, para assim infectar novas células e/ou serão absorvidos por um novo inseto no repasto sanguíneo, para ocorrer continuidade do ciclo biológico (**figura 2**) (TEIXEIRA et al., 2011; CDC, 2012).

Figura 2. Ciclo biológico do *T. cruzi*.



*Legenda: 1. Liberação de tripomastigota metacíclico durante o repasto sanguíneo pelo vetor da doença de Chagas; 2. Tripomastigotas conseguem entrar no hospedeiro por meio de feridas ou mucosas, permeando as células próximas ao local da inoculação; 3. No interior das células os tripomastigotas evoluem para amastigotas, multiplicam-se por divisão binária; 4. Diferenciação para tripomastigotas circulantes, eclosão para fora da célula, entrando assim na corrente sanguínea; 5. Durante um repasto sanguíneo o inseto vetor ainda não infectado ao se alimentar do sangue de um hospedeiro infectado pode ser infectado ao ingerir tripomastigotas circulantes; 6. Estes após ingestão do vetor são diferenciados em epimastigotas no intestino médio; 7. Os parasitas se multiplicam no intestino médio; 8. No intestino grosso, eles se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes, que serão excretados nas fezes do inseto.

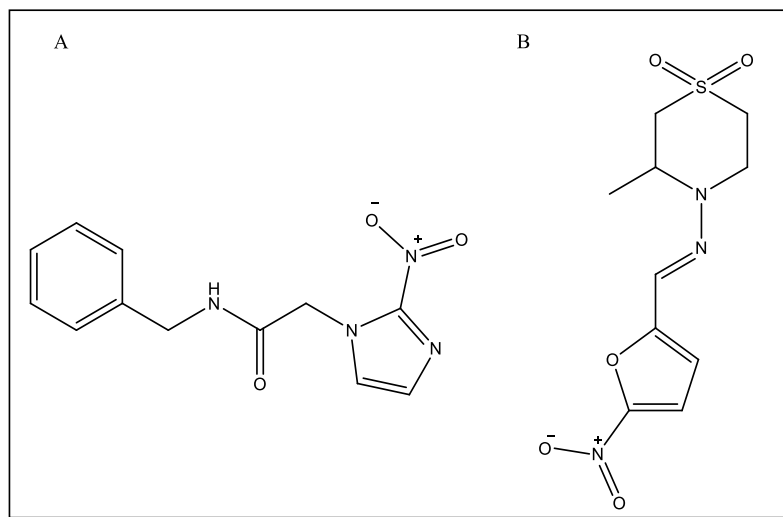
Fonte: Adaptado de CDC, 2012.

A DC apresenta evolução clínica composta por duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia e ocorrendo em 4 a 8 semanas após a infecção,

apresentando redução após 90 dias. Os sintomas mais frequentes são: febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Como também em alguns casos os indivíduos infectados podem apresentar inflamação e formação de edema no local de inoculação dos parasitos (Chagoma de inoculação). Entre os casos agudos, 1-5% dos pacientes evoluem para uma fase aguda severa, podendo ocorrer manifestações como miocardite e meningoencefalite. Enquanto na fase crônica, o paciente pode apresentar sérios danos ao coração e aparelho digestivo (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Em relação ao tratamento e prevenção da DC, ainda não há vacinas disponíveis para esta doença. Porém, já se tem terapia antichagásica disponível para realização do tratamento desta doença. Recomenda-se que o tratamento seja realizado na fase aguda, na forma congênita, infecções reativadas e em DC crônica para menores de 18 anos, como também em pacientes com forma ainda não determinada de DC crônica. Entretanto, os medicamentos disponíveis no mercado ainda são limitados, sendo os fármacos: o Benznidazol e o Nifurtimox (**figura 3**), ambos sendo compostos da classe dos nitroheterocíclicos (RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2015; BERMUDEZ et al., 2016; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Figura 3. Estruturas químicas do Benznidazol (A) e Nifurtimox (B).



Fonte – Elaborados pela autora.

Estes fármacos já estão sendo utilizados há mais de 50 anos, porém, apresentam segurança e eficácia bastante limitadas. Em estudos onde essas substâncias foram avaliadas foi observado que a eficácia do tratamento com a administração desses fármacos apresenta resultados inversamente proporcionais ao período da infecção, dessa forma, sendo maior na

fase aguda da doença (CASTRO; DIAZ DE TORANZO, 1988; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020).

2.2. Considerações Gerais sobre o Câncer

O câncer é uma classe de doenças que pode afetar todo o corpo, sendo caracterizado pelo crescimento descontrolado de células. Estas células invadem tecidos e órgãos normais, sendo assim disseminada. Se tornou uma doença que mais tem afetado a população do mundo todo, sendo este um grande problema de saúde pública onde uma em cada sete mortes no mundo é causada pelo câncer, se tornando assim mais comum do que as mortes por HIV/AIDS, tuberculose e malária combinadas. Atualmente, se encontra como segunda principal causa de morte nos Estados Unidos, seguindo as pesquisas deve ultrapassar as doenças cardíacas como a principal causa de morte nos próximos anos (SIEGEL et al., 2015; OMS, 2016; ACS, 2017).

Devido a pandemia (COVID-19) tanto o diagnóstico como o tratamento do câncer foram afetados inversamente em 2020. Redução ao acesso aos cuidados da saúde, visto que ocorreu o fechamento das unidades de saúde, como também medo da exposição ao vírus, causaram atrasos no diagnóstico e, por consequência, retardo no tratamento, o que podem acarretar em uma redução de curto prazo na incidência de câncer, e em um acréscimo nos números de pacientes com esta doença em estágio avançado e, por fim, aumento da mortalidade (YABROF et al., 2021).

Um dos principais problemas relacionados aos estudos iniciais do câncer é que até mesmo pesquisadores da área apontaram dificuldades para obtenção e avaliação dos dados para todos os tipos de câncer, ao se avaliar as taxas de mortalidade ajustadas por idade não se tem um padrão visto que a doença acomete diferentes faixas etárias e ainda apresentam diferentes tendências (BAILAR, 1987; BAILAR, 1990; BAILAR, 1992).

Com o avanço da tecnologia e da pesquisa clínica, houve um crescimento no conhecimento das estruturas moleculares e características biológicas dos tumores o que permitiu se compreender um pouco mais sobre o tratamento desta doença. Anteriormente, a classificação e terapêutica era especificamente de acordo com o órgão de origem ou com os resultados histomorfológicos do paciente acometido. Com os estudos voltados pra essa área foi observado que o tratamento adequado do câncer deveria seguir dois pilares básicos, sendo eles: aquisição tecnologias avançadas para tumor molecular com criação de perfis, como também estudo de compostos com avaliação da predição de seu alvo (SCHILLER et al., 2002).

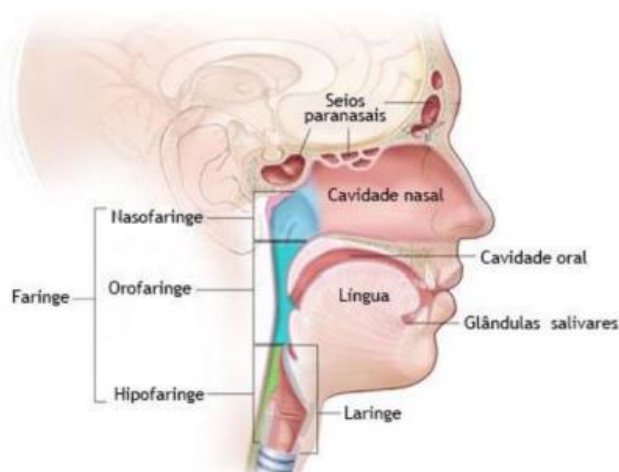
Uma das terapêuticas que podem ser utilizadas para o tratamento do câncer são os agentes antiproliferativos que já são comercializados e bastante conhecidos, alguns dos exemplos são os taxanos e alcaloides da vinca, atuando como antitumorais devido sua ação ter como alvo a tubulina, sendo este o componente proteico do fuso mitótico, essas substâncias apresentam atividade anticancerígena clinicamente eficaz alguns tipos de câncer. Porém, esses compostos apresentam limitações na terapêutica, como resistência inata ou até mesmo adquirida, e a mais comum toxicidade o que permite uma maior limitação em relação a dose, tornando assim necessário pesquisas por novos tratamentos (WOOD et al., 2001; ORR et al., 2003; JORDAN et al., 2004; KAVALLARIS, 2010).

O câncer apresenta uma alta complexidade, além de debilitar bastante o paciente, apresenta formas de constante evolução no organismo do indivíduo acometido, como a metástase, angiogênese, alta produção e liberação de fatores de crescimento, entre outros fatores pró-câncer. Assim como o próprio tratamento com a utilização de quimioterápicos de alta citotoxicidade e na maioria dos medicamentos hoje utilizados se tem baixa seletividade. Dessa forma, estudos que busquem por novas substâncias com propriedades citotóxicas em células cancerígenas são essenciais.

2.2.1. Câncer de cabeça e pescoço (CCP)

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é um termo utilizado para definir neoplasias que acometem o trato aerodigestivo superior, incluindo neoplasias que tem origem nos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe, laringe e tireoide como demonstrado na **figura 4**. Cerca de 40% deste tipo de câncer localiza-se na região de cavidade oral (assoalho bucal, língua, base da língua, palato duro e lábios); 15% na faringe (orofaringe, hipofaringe e nasofaringe); 25% na laringe; e por fim 20% em glândulas salivares e tireoide (DÖBROSSY, 2005; BRAGANTE, NASCIMENTO, MOTTA, 2011).

Figura 4. Principais locais anatômicos do carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço.



Fonte: FERREIRA; TUNISSIOLLI, 2017.

No ano de 2018, o câncer de cabeça e pescoço ficou em sétimo lugar como o câncer mais comum no mundo apresentando 890.000 novos casos e 450.000 mortes. Em estudo realizado por Da Silva e colaboradores (2020) foi analisado um perfil epidemiológico em um centro oncológico no Sul do Brasil, onde foi observado que esta patologia acomete majoritariamente pacientes do sexo masculino, na maioria dos casos a partir dos 50 anos, geralmente com baixa escolaridade e renda familiar, sendo predominantemente tabagistas e etilistas com exposição a mais de 30 anos, apresentando como localização primária do tumor com maior prevalência a região da cavidade oral (BRAY et al., 2018).

Nos Estados Unidos representou 3% de todos os cânceres (51.540 novos casos), cerca de 1,5% da mortalidade por câncer (10.030 mortes). Anteriormente, era diagnosticado em pacientes idosos, tendo como correlação o uso em excesso de tabaco e álcool. Atualmente, ocorreu uma grande redução do uso de tabaco e, nos últimos anos, foi observado um aumento na incidência de câncer na região de cavidade oral, sendo mais comum na região da base da língua e amígdalas, em pacientes na faixa etária inferior a 45 anos, sendo associado a alta prevalência do papilomavírus humano (HPV), já há relatos que este se trata de um fator de risco que vem se tornando de grande relevância para esses tipos de cânceres. Pesquisadores da área correlacionam este aumento com a frequência de sexo oral e do número elevado de parceiros sexuais (MARUR, FORASTIER, 2008; WANG et al., 2013; FITZMAURICE, 2017; MOURAD et al., 2017; SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2018).

Os tratamentos já conhecidos para esta patologia são: técnicas cirúrgicas minimamente invasivas e poupadoras de órgãos, radioterapia, quimioterapia, abordagens multimodais curativas, como também uso de inibidores de checkpoint imunológico. Com a utilização deste último, que podem ser denominados como anti-PD-1 (anticorpos monoclonais) e também como imunoterapia, sendo os medicamentos mais utilizados o pembrolizumabe e nivolumabe, com este tratamento foi observado que se obteve uma melhor preservação da função, diminuição da recorrência e redução da morbidade e mortalidade. Esses medicamentos podem ser utilizados como monoterapia, terapia combinada, como também combinadas com quimioterapia ou até mesmo radioterapias (ARGIRIS et al., 2008; FORSTER, DEVLIN, 2018; COHEN et al., 2019; WANG et al., 2019; CHOW, 2020).

Mesmo com vários anos de pesquisas na área, os tratamentos já conhecidos podem acarretar prejuízos aos pacientes, principalmente na qualidade de vida, causando assim: mucosites (inflamações da mucosa oral), xerostomia (boca seca), fadiga e radiodermites (alterações da pele), que conseqüentemente causa dificuldades na mastigação, deglutição, como também na fala (HUNTER, JOLLY, 2013; LEITE, NOGUEIRA, TERRA, 2015).

Em relação a administração dos inibidores dos *checkpoints* imunológicos para o tratamento deste tipo de câncer também apresenta um espectro de novas toxicidades. Além das reações que podem ocorrer com a infusão do medicamento, ainda pode acarretar ao paciente reações adversas imunológicas podendo afetar diversos órgãos. Causando assim: pneumonites, hepatites, nefrites, colites e endocrinopatias. O que torna o tratamento ainda mais complicado e requer prontamente atendimento pelos profissionais da saúde rapidamente (HAANEN et al., 2017; SCHADENDORF et al., 2017).

2.2.2. Carcinoma epidermoide (CE)

O câncer oral é um dos três tipos de câncer mais comuns nos países da Ásia e do Pacífico, sendo o carcinoma escamoso oral (OSCC) o mais comum, também denominado de carcinoma espinocelular ou até mesmo epidermoide de cabeça e pescoço, evidenciando 90% de todos os casos de câncer oral. Como o avanço dos tumores não causa dor ou sintomas ao paciente, geralmente são identificados já em estágios avançados. Apesar de novas tecnologias e evolução no diagnóstico e tratamento do OSCC, os pacientes com essa doença ainda apresentam baixa sobrevida, geralmente apenas 5 anos (MONTERO et al., 2015; CAPOTE-MORENO et al., 2020; NIH, 2022; WHO, 2022).

Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCCs) localizados na cavidade oral e na laringe continuam sendo associados ao tabagismo, sendo assim denominados de HNSCC HPV-negativo. Até hoje, nenhuma estratégia de triagem apresentou ser eficaz, e o exame físico, cuidados periódicos continuam sendo a abordagem primária para a detecção precoce. Mesmo apresentando lesões orais pré-malignas (OPLs), caracterizadas por causar: leucoplasia (manchas brancas) ou eritroplasia (manchas vermelhas), geralmente se tem a progressão para o câncer, é muito comum casos de pacientes que tem o diagnóstico de HNSCC em estágio avançado sem nem mesmo histórico clínico de pré-malignidade (GILLISON et al., 2019; MEHANNA et al., 2019).

Pesquisas relatam que existem outros fatores de risco para o OSCC, porém, menos comuns, sendo eles: exposição à radiação, infecção crônica, imunossupressão de longo prazo, má higiene oral, má nutrição, mastigação de noz de areca, dentaduras mal ajustadas, anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, síndrome de Li-Fraumeni e disceratose congênita. São esses últimos causas hereditárias raras do carcinoma escamoso oral (CADONI et al., 2012).

O OSCC tem como tratamento padrão inicialmente a ressecção cirúrgica, logo após radiação adjuvante, como até mesmo quimioterapia combinada com radiação (quimiorradiação ou quimiorradioterapia (CRT)), o que vai definir o tipo de tratamento é o estágio da doença. A CRT vem sendo utilizada como tratamento protocolo primário para o os cânceres localizados na faringe ou laringe (NARUSE et al., 2016).

De acordo com pesquisa realizada por Machiels e colaboradores (2020) quando se trata de um carcinoma escamoso oral de forma recorrente e/ou metastática sem a possibilidade de radioterapia curativa ou cirúrgica a terapêutica medicamentosa indicada seria: pembrolizumabe, cetuximabe, metotrexato ou taxano, 5-fluorouracil, cisplatina e docetaxel. Estes podem ser utilizados em monoterapia ou com combinações medicamentosas ou até com outros tipos de tratamentos, o que define o protocolo é o estado do paciente (MACHIELS et al., 2020). Dessa forma, se faz necessário a realização de pesquisas científicas que busquem por novos protótipos que venham a apresentar maior eficácia e segurança para o tratamento deste tipo de câncer, visto que temos cada vez mais episódios de OSCC de forma recidiva e mais agressivos.

2.3. Considerações gerais sobre Piplartina

A piplartina é uma substância encontrada em algumas espécies do gênero *Piper*. Sendo assim extraída da planta medicinal *Piper longum*, caracterizada quimicamente como fenilpropanoide trimetoxilado, também sendo denominada de alcanida. A piplartina também é conhecida como piperlongumina (COSTA-LOTUFO et al., 2010; BEZERRA et al., 2013; WANG et al., 2014).

A piperlongumina é muito utilizada na medicina tradicional chinesa e na medicina popular na América Latina. Na China, essa planta é indicada para o tratamento de tosse, asma, bronquite, infecção do trato respiratório, desconforto estomacal, diarreia, constipação, doença do baço, malária, cólera, hepatite viral e tumores (KUMAR et al., 2011; BEZERRA et al., 2013; WANG et al., 2014; QUIJIA et al., 2021).

Na literatura já consta várias atividades da piplartina sendo elas: antileishmania, anti-Schistosoma, causa inibição de HIF-2 e do crescimento de células cancerígenas, apresenta efeito como agente senolítico ao matar células senescentes, atividade antiinflamatória, assim como propriedades neuroprotetoras pela ativação de Nrf2 (BOCHESCH et al 2011; SEO et al., 2014; PENG et al., 2015; WANG et al., 2016; CHEUKA et al., 2017; SALEHI et al., 2019; TICONA et al., 2020; DALEY et al., 2021; PEIXOTO et al., 2021).

Estudos desta alcanida relatam que por sua estrutura ser composta por um anel aromático trimetoxilado pode beneficiar sua interação com tubulina e, assim atuar como agente desestabilizador de microtúbulos com efeitos antiproliferativos. A piplartina apresenta efeito similar ao da Anexina A1, sendo este alcaloide envolvido nas vias de sinalização de NF-κB e MAPK (SALUM et al., 2013; GINZBURG et al., 2014; LIU et al., 2014; CHEN et al., 2015; MEEGAN et al., 2017).

Em estudo realizado por Cotinguiba e colaboradores foram testados extratos brutos obtidos de sementes e folhas provenientes de espécies brasileiras do gênero *Piper*, e esses demonstraram relevante inibição da proliferação de *T. cruzi*, assim como também foram testadas algumas piperamidas isoladas, destas a piplartina apresentou maior potência frente ao *T. cruzi*.

2.3.1. Atividades Farmacológicas da Piplartina

As atividades farmacológicas da piplartina descritas na literatura estão na **Tabela 1**.

Tabela 1. Atividades farmacológicas da piplartina descritas na literatura.

ATIVIDADE	FONTE
Citotóxica	Duh et al., 1990a, 1990b; Bezerra et al., 2005, 2007, 2008a; Tsai et al., 2005; Kong e outros, 2008; Lin et al., 2007; Jyothi et al., 2009; Raj et al., 2011; Bokesch et al., 2011; Golovine et al., 2013; Adams et al., 2012
Genotóxica	Bezerra et al., 2008b, 2009
Antitumoral	Bezerra et al., 2006, 2008a; Raj et al., 2011
Antiangiogênica	Raj et al., 2011
Antimetastática	Raj et al., 2011
Antiagregante plaquetário	Tsai et al., 2005; Park et al., 2007, 2008; Iwashita et al., 2007; Fontenele et al., 2009; Lee et al., 2010
Antinociceptiva	Rodrigues et al., 2009
Ansiolítica	Felipe et al., 2007
Antidepressiva	Felipe et al., 2007
Antiaterosclerótica	Son et al., 2012
Antidiabética	Rao et al., 2012
Antibacteriana	Naika et al., 2010
Antifúngica	Navickiene et al., 2000; Silva et al., 2002
Leishmanicida	Bodiwala et al., 2007
Tripanocida	Cotinguiba et al., 2009
Esquistossomicida	Moraes et al., 2011, 2012a, 2012b

Fonte: Elaborada pela autora.

Os estudos mais recentes estão mais voltados para o potencial anticancerígeno da piplartina, fornecendo métodos para a terapêutica do câncer usando a piplartina e/ou seus análogos (Lee e Mandinova, 2009). Na literatura já se discute que um dos mecanismos de ação pelo qual a piplartina age como antitumoral se trata da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outro mecanismo já descrito é por meio da redução de receptores HER2, outra denominação dos receptores de fator de crescimento epidérmico) nos casos de câncer de mama (SONG et al., 2016; Jin et al., 2017).

Um achado promissor foi a diminuição da proliferação de células de câncer gástrico (linhagem AGS) por causar a inibição do ciclo celular destas. Relata-se que isso ocorre porque a piplartina reduz a fosforilação de janus quinase 1 e 2 (JAK1 e JAK2), assim como reduz a STATE3, uma molécula que sinaliza a ativação da transcrição. Foi observado também a redução de receptores tirosina quinase em células tumorais dos rins. Sobre glioblastoma já foi constatado que a piplartina apresenta atividade citotóxica nas células cancerígenas, de forma seletiva e potente, causando inibição da migração de gliomas, e bloqueia a enzima glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1). Como também causa o aumento da p38 e Jun N-terminal kinase

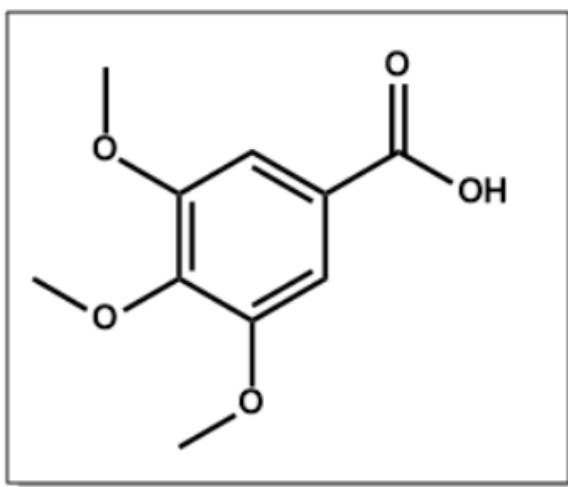
(JNK), ativando assim a apoptose e translocação de NF κ B, sendo esta a proteína responsável pela sobrevivência das células (JIU et al., 2014; GOLOVINE et al., 2015).

Outra atividade da piplartina que vem se mostrando promissora é a atividade antiparasitária. Por exemplo, há relatos de atividade schistomicida e leishmanicida. Ensaios de viabilidade celular demonstraram que a piplartina apresentou maior bioatividade na inibição do crescimento das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 21,0 \mu M$) do que o benzonidazol ($42,7 \mu M$), sendo este último utilizado como controle positivo. Além disso, foi observado que a piplartina causa redução na expressão de enzimas antioxidantes, tendo esta atividade como possível mecanismo de ação, visto que essas enzimas são participantes envolvidas na defesa do parasito como a tripartedoxina redutase e metionina sulfóxido redutase (COTINGUIBA et al., 2009; BEZERRA et al., 2013; MORAES et al., 2012; ARAÚJO-VILGES et al., 2017; NÓBREGA et al., 2019; VIEIRA et al., 2018).

2.4. Considerações gerais sobre ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico

O ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (TA) é um derivado do ácido benzoico, sendo este uma substância importante como fase intermediária na síntese farmacêutica, muito utilizado como aditivo na indústria alimentícia, cigarros e bebidas. O ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_5$, aspecto de sólido cristalino branco, baixa solubilidade em água e solúvel em solventes orgânicos como álcool, éter e clorofórmio, como demonstrado sua estrutura na figura 5 (TAKAHASHI, 2012; TRINAGARAJU et al., 2015).

Figura 5. Estrutura química do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.



Fonte – Elaborados pela autora.

De acordo com estudo realizado por Atewolara-Odule e colaboradores (2020) o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico pode ser encontrado na planta *Tapinanthus bangwensis* e apresenta atividade antioxidante. Este ácido também foi isolado de extrato de *Mitracarpus scaber*, sendo ainda avaliado frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, causando assim inibição de crescimento deste microrganismo (BISIGNANO et al., 1999).

Em estudo realizado por Liu e colaboradores (2018) foi realizada a sua síntese utilizando o ácido gálico para obtenção do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, e com este foram realizadas reações de esterificação e nitração, de acordo com os resultados obtidos foi observado que os derivados apresentaram atividade inibindo a proliferação de células SGC7901, sendo estas células de câncer gástrico.

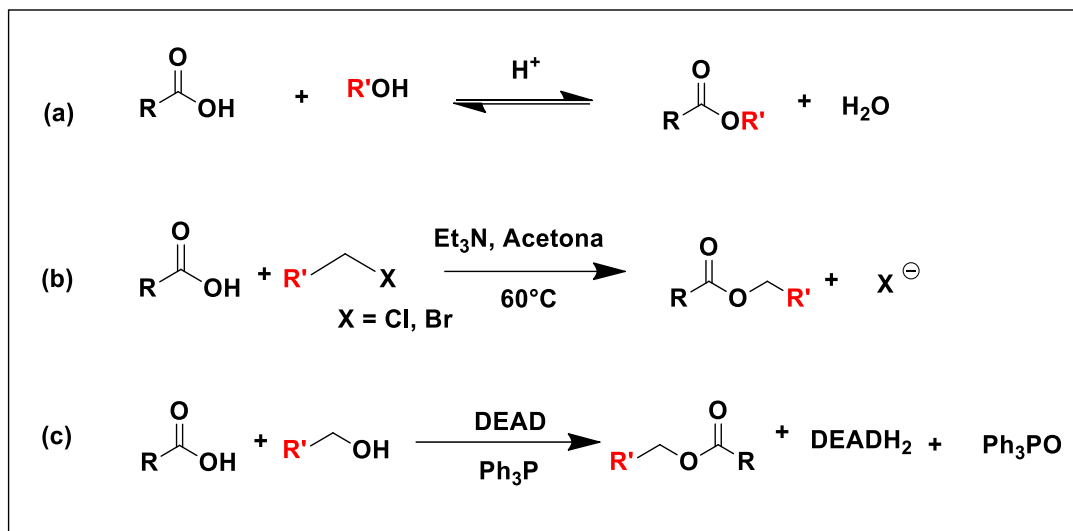
Já há relatos que o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico também faz parte da composição da *Acorus tatarinowii* Schott, sendo esta uma planta medicinal muito utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas e digestivas, logo, este ácido está envolvido com a atividade de transportar a serotonina (SERT), assim atuando nos efeitos antidepressivos apresentados pela referida planta (Commission of Reorganization of Ten TCM Classics, 2018; ZHANG et al., 2019).

Outras atividades também já descritas na literatura do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e seus derivados são: antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antihipertensiva, antiparkinsoniana, antiparasitária, entre outras (VAZAKAS, DOLUISIO, 1964; BISIGNANO et al., 1999; Bisignano et al. 2000; Kasture et al. 2009; NOBREGA et al., 2019; ATEWOLARA-ODULE et al., 2020).

2.5. Mecanismo de esterificações

Os ésteres são de grande importância para a indústria farmacêutica e alimentícia, como também para química medicinal. Dessa forma, metodologias eficazes foram desenvolvidas para sua obtenção. No **Esquema 1** estão representadas as reações utilizadas no presente estudo para obtenção dos ésteres.

Esquema 1. Reações para preparação de ésteres: (a) Esterificação de Fischer; (b) Esterificação com haletos de alquila ou arila e (c) Reação de Mitsunobu.

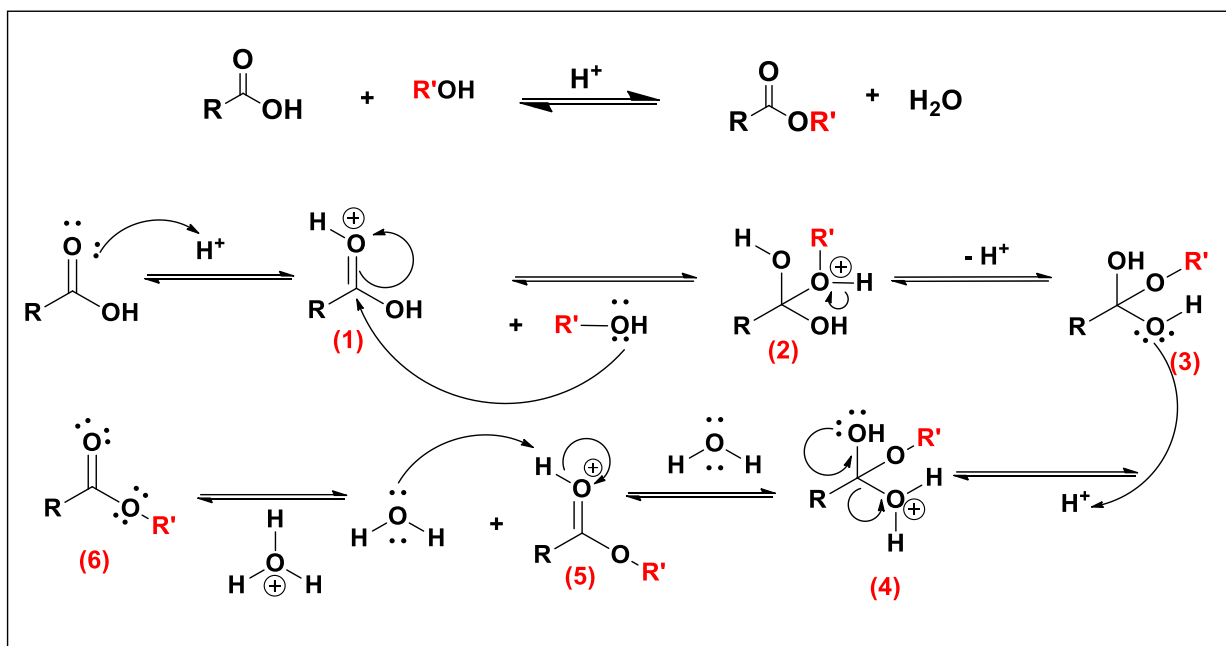


Fonte: Adaptado de SWAMY et al., 2009; CLAYDEN et al., 2012; HERAVI et al., 2018; SOLOMONS, 2018; HERAVI et al., 2018.

A primeira metodologia utilizada foi a Esterificação de Fischer, desenvolvida por Fischer e Spear em 1895. A reação ocorre sob refluxo, utilizando um ácido forte como catalisador, e álcool em excesso, visto que se trata de uma reação reversível (BROWN et al., 2004; REILLY et al., 2014; CALVALCANTE et al., 2015; YEARTY et al., 2017;). No **Esquema 2** está demonstrado o mecanismo dessa reação.

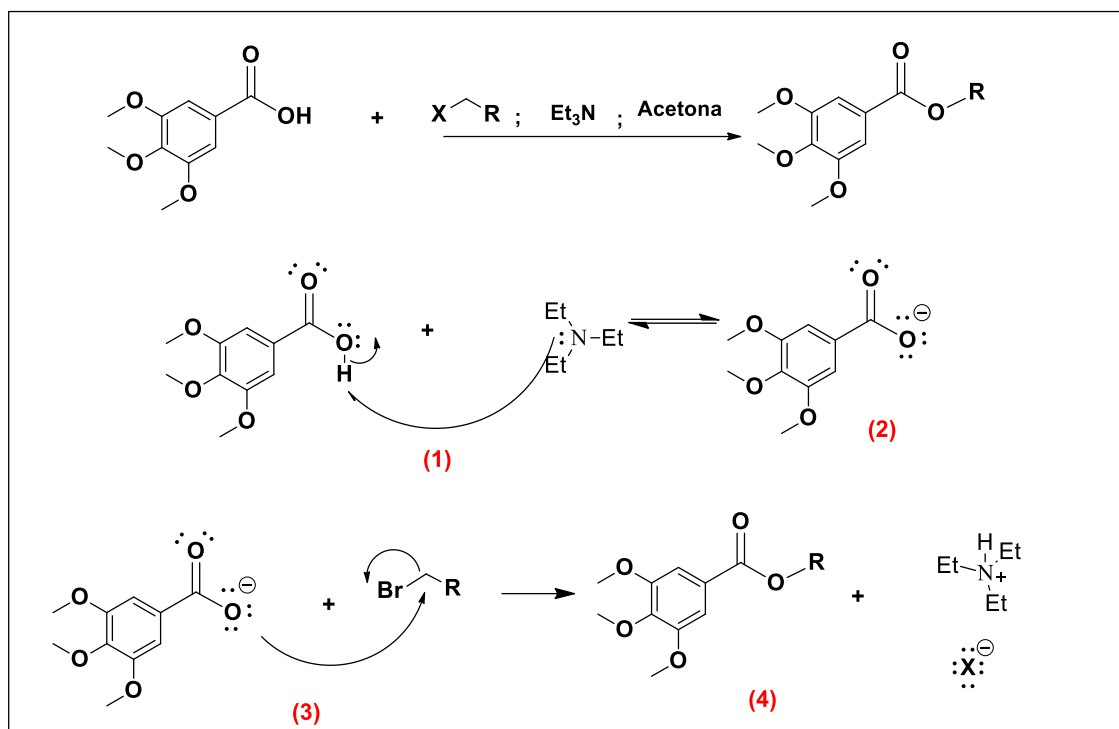
A reação de Esterificação de Fischer é uma substituição nucleofílica acílica (S_NAc), na qual, como demonstrado no **Esquema 2**, ocorre a protonação do oxigênio da carbonila através do catalisador ácido (1), tornando assim essa molécula mais instável. Logo após, o par de elétrons do oxigênio do álcool realiza o ataque à carbonila eletrofílica (2), causando a formação de uma molécula de geometria molecular tetraédrica (3). Na sequência, é realizada a transferência de um próton para hidroxila, prototropismo (4), o que causa a formação de uma molécula de água, restabelecendo a carbonila (5). Por fim, a base conjugada do catalisador utilizado realiza a captação do próton do oxigênio da carbonila, obtendo assim o éster e restaurando o catalisador ácido (6) (CALVALCANTE et al., 2015).

Esquema 2. Mecanismo de reação da Esterificação de Fischer.



Fonte: Adaptado de SOLOMONS, 2018.

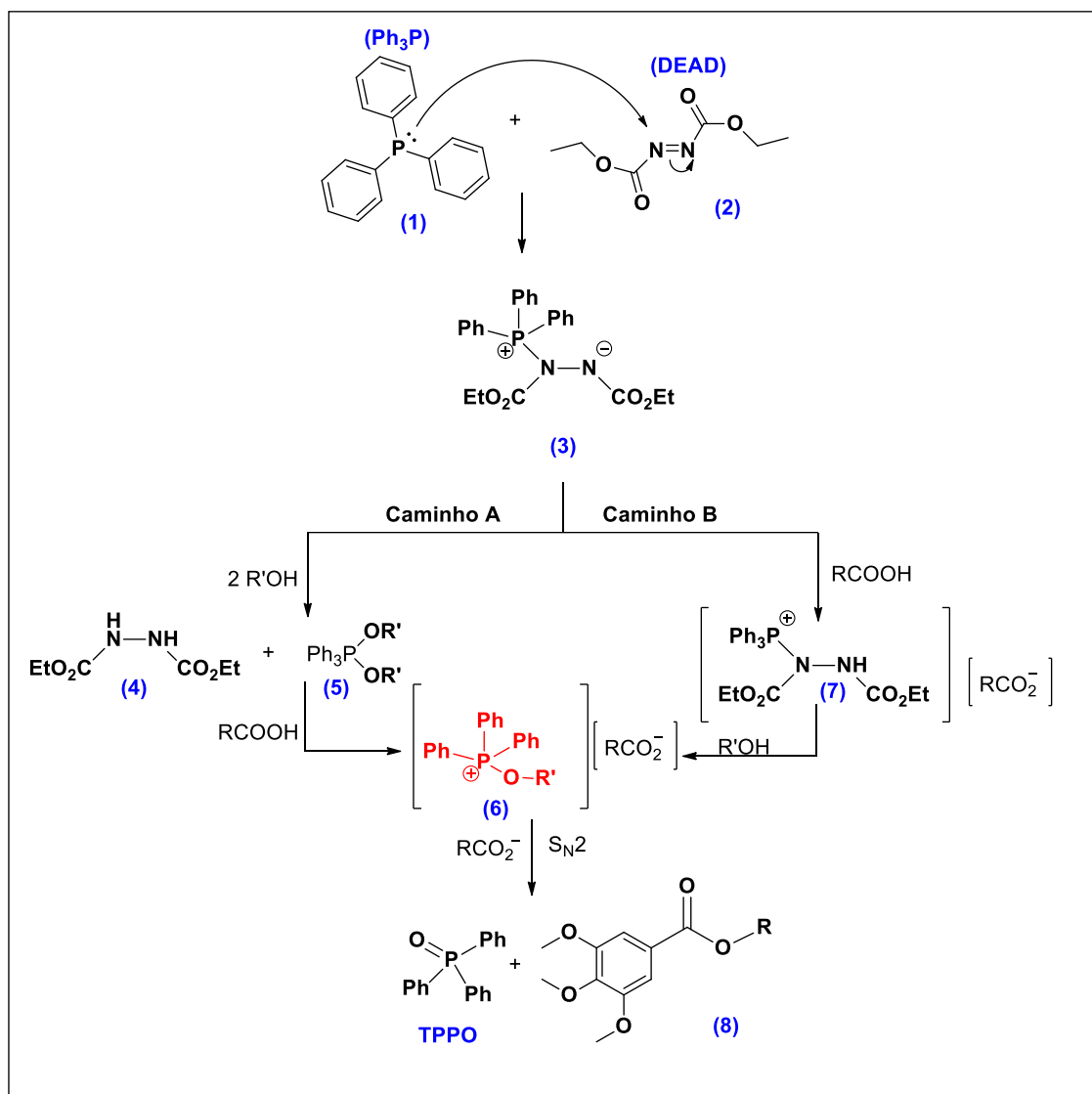
A segunda metodologia empregada foi a Esterificação utilizando haletos de alquila ou arila em uma reação de substituição do tipo S_N2 (substituição nucleofílica bimolecular), que ocorre entre o ácido carboxílico e o haleto de alquila ou arila. A reação é de etapa única, como também de segunda ordem, dessa forma o tempo de reação é dependente das concentrações dos reagentes, nucleófilo e substrato. Este tipo de procedimento ocorre com maior facilidade quando é realizado em carbonos primários, por apresentar menor impedimento estérico, como também com emprego de solvente aprótico (BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014). O mecanismo de reação está demonstrado no **Esquema 3**.

Esquema 3. Mecanismo de reação da esterificação com haletos de alquila e arila.

Fonte: Adaptado de Clayden et al., 2012.

De acordo com o **esquema 3**, inicialmente, o par de elétrons da trietilamina realiza o ataque no hidrogênio do ácido carboxílico (1), gerando assim o sal do ácido, sendo este um nucleófilo mais forte (2). Logo, um par de elétrons do oxigênio ataca o carbono do haleto (3), procedendo com a entrada do nucleófilo e saída do outro grupo, ocorrendo assim a formação do éster (4) (BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014; MATSUBARA; ITO, 2016).

A terceira metodologia utilizada para preparação dos ésteres foi a Reação de Mitsunobu, descrita por Oyo Mitsunobu em 1967. Nesta reação ocorre o acoplamento desidratado com presença de álcool e um ácido, como também utilização do agente oxidante Azodicarboxilato de dietila (DEAD) e o agente redutor, a Trifenilfosfina (TPP). Com esta reação ocorre inversão de configuração estereoquímica (BUT; TOY, 2007). Ao decorrer do procedimento reacional ocorre a formação do éster desejado, mas também ocorre a formação de subprodutos, a hidrazina dietil azodicarboxilato e o óxido de trifenilfosfina, demonstrados no **esquema 4**.

Esquema 4. Mecanismo da reação da Esterificação de Mitsunobu.

Fonte: Adaptado de SWAMY et al., 2009; HERAVI et al., 2018.

Conforme demonstrado no **esquema 4**, a reação de Mitsunobu tem como mecanismo a utilização da trifenilfosfina (1) que inicia o processo realizando o ataque nucleofílico no Azodicarboxilato de dietila (DEAD) (2), ocorrendo assim a formação de um intermediário (3). Este intermediário (3) tem a possibilidade de prosseguir por dois tipos de mecanismos de reação diferentes: a via A e a via B. Pela via A, intermediário (3) realiza desprotonação de duas moléculas de álcool, causando assim a formação de um fosforano pentacoordenado (5), como também o derivado da hidrazina (4). Em sequência, o intermediário (5) em meio ácido ($RCOOH$), libera uma molécula de álcool e gera o sal alcoxifosfônio 6. Enquanto na via B, o intermediário (3) retira um próton do ácido, gerando o intermediário iônico (7). Este, por sua

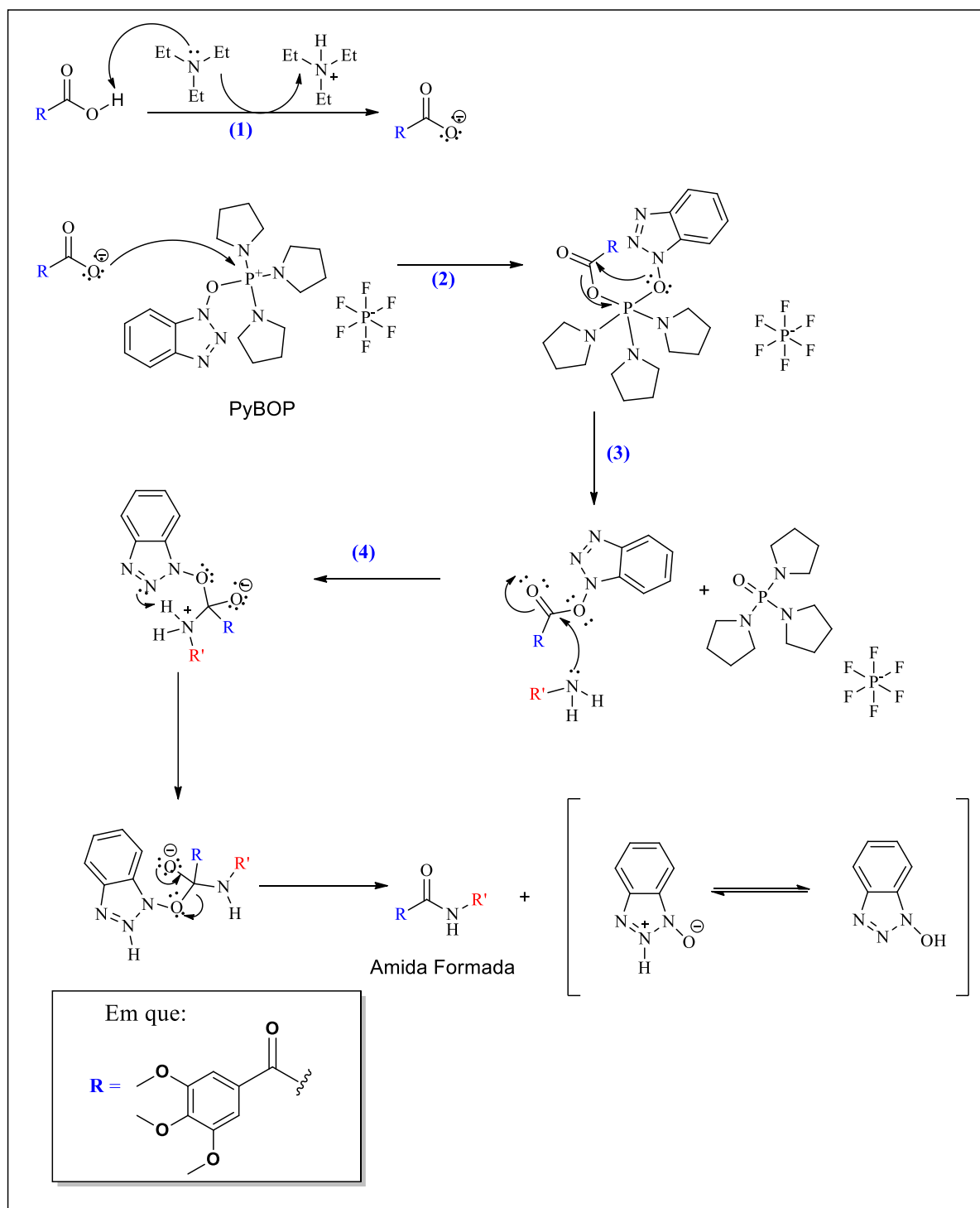
vez realiza interação com o álcool produzindo assim o derivado da hidrazina (4) como subproduto e um sal de alcoxifosfônio (6). Por fim, para as duas vias, o nucleófilo desprotonado (RCO_2^-) realiza ataque ao carbono que é ligado ao oxigênio da porção do álcool, sendo para o 6 uma reação de substituição nucleofílica para geração do produto (8) e o óxido de trifenilfosfina (TPPO) como subproduto (HERAVI et al., 2018; SWAMY et al., 2009).

2.6. Mecanismo de amidação

A preparação de amidas tem apresentado grande importância como intermediários na síntese orgânica e seu emprego na indústria química (SINGH, 2003; ALBERICIO, 2004; BODE, 2006; CUPIDO, 2007). Uma metodologia utilizada para síntese das amidas utiliza o agente de acoplamento PyBOP. A reação está demonstrada no esquema 5. O reagente de acoplamento PyBOP ([2-benzotrazol-1-iloxi)-pirrolidina-1-il]-dipirrolidina-1-il fosfônio-hexafluoro-fosfato) é muito empregado para substituir o BOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfônio hexafluorofosfato), pois dessa forma não se tem a formação de um produto secundário, denominado hexametilfosforamida (HMPA), do qual já há relatos de ação cancerígena. A reação é um procedimento one-pot, em meio básico (RAJAN et al., 2001; VOLLHARDT e SCHORE, 2011).

No mecanismo de reação da amidação via PyBOP, esquema 5, inicialmente a trietilamina (Et_3N) causa a desprotonação do ácido carboxílico (1), este vai interagir com o PyBOP formando uma espécie acil-fosfônio na sua forma ativada (2), ocorrendo assim a reação da porção benzotriazólica com o carbono carbonílico ativado, produzindo assim a espécie triazoléster (3), quando na presença de uma amina ocorre a aminólise (4) o que resulta na obtenção do produto final (RAJAN et al., 2001; VOLLHARDT e SCHORE, 2011).

Esquema 5. Mecanismo proposto da reação de acoplamento para amidação utilizando agente de acoplamento PyBOP.



Fonte: Adaptado de VOLLHARDT e SCHORE, 2011; RAJAN et al., 2001.

2.7. Estudos de Relação-Estrutura-Atividade (SAR)

Os métodos *in silico* baseados em estrutura são utilizados em vários estágios do estudo de novos fármacos. A triagem virtual apresenta uma relação custo-eficácia, já sendo bastante conhecida e realizada devido ao seu potencial para identificar novos quimiotipos e insights mecanísticos sobre as interações ligante-proteína. Atualmente, um dos métodos mais incluídos em pesquisas de novas substâncias com base na estrutura é modelagem molecular (WASZKOWYCZ, 2008; LYU et al., 2019).

A modelagem molecular é o método baseado na estrutura do composto simulando a interação molecular, gerando ainda uma predição do modo de ligação e afinidade entre biorreceptores e ligantes. Para realização desse método é necessário utilizar um banco de dados de compostos. Esta ferramenta otimiza a eficiência e reduz o custo da pesquisa, como também complementa os resultados obtidos nos ensaios farmacológicos. Assim como, o surgimento da tecnologia de ancoragem molecular melhorou a capacidade preditiva do alvo do ligante, e permite compreender o mecanismo molecular relacionado para o design do composto em estudo (CHEN, 2001; ZHI, 2001; MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

Inseridos neste contexto temos os estudos das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR), ou também entre a estrutura química e algum tipo de propriedade físico-química (QSPR), sendo estes essenciais na química e bioquímica modernas e apresentam como principal objetivo a realização de planejamento racional de novas moléculas, para assim buscar por compostos com propriedades desejadas, incluindo no estudo a predição e experiência química de uma forma matematicamente quantificada e computadorizada, através de modelos computacionais. Ao ser gerada relação entre estrutura/propriedade e atividade, podem ser incluídos vários compostos, até mesmo os que ainda não foram sintetizados, para assim ser realizada uma avaliação computacional com objetivo de selecionar compostos otimizados seguindo com as propriedades desejadas (PASHA; SRIVASTAVA; SINGH, 2005; HONÓRIO et al., 2007; WEBER et al., 2007).

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar as atividades tripanocida e citotóxica de uma coleção de derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico estruturalmente relacionados e estabelecer uma relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas.

3.2. Objetivos específicos

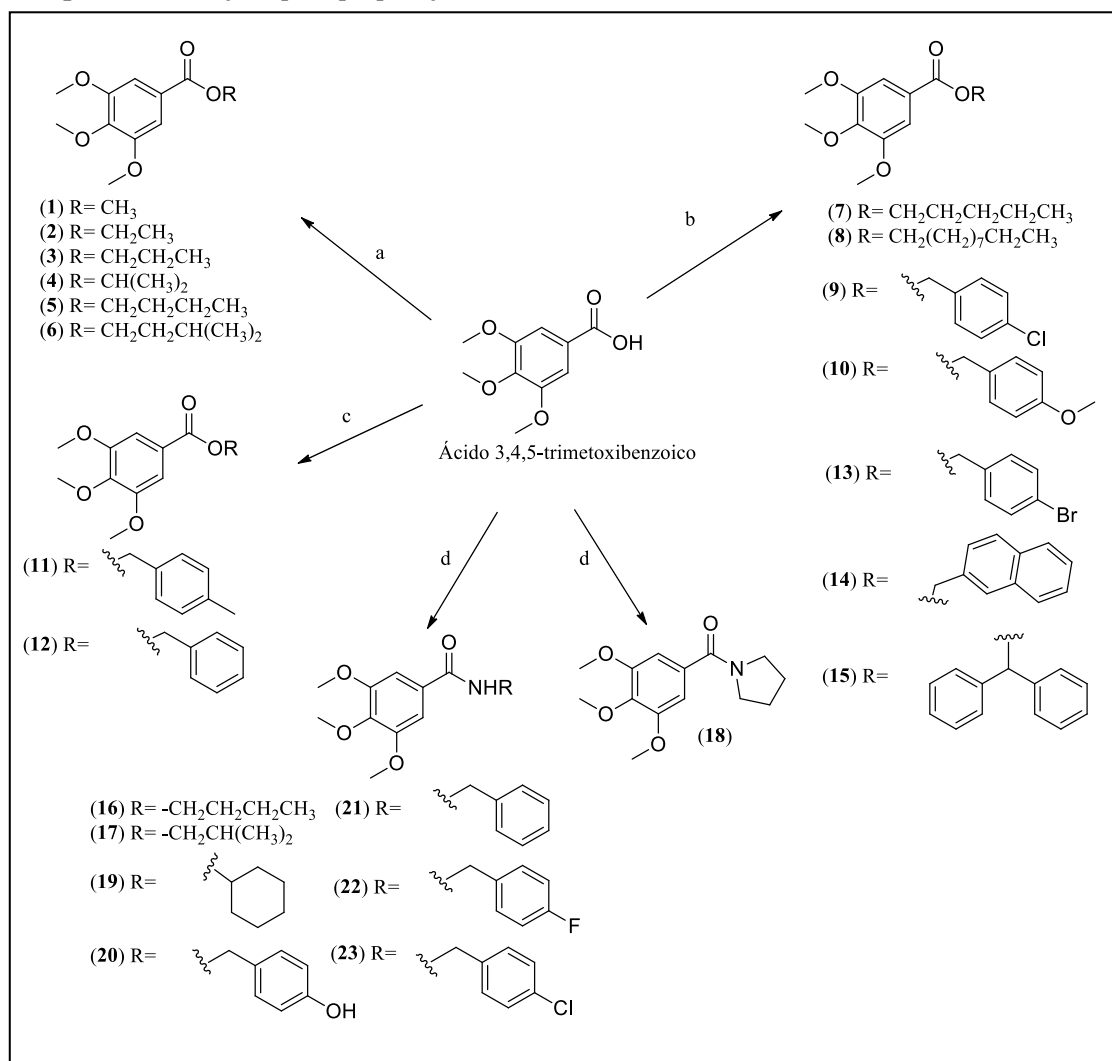
- Preparar os derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico;
- Avaliar a atividade tripanocida dos derivados;
- Avaliar a atividade citotóxica dos derivados;
- Realizar a análise in silico dos compostos mais bioativos;
- Traçar uma relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas;
- Identificar as características químicas importantes para otimização dos efeitos biológicos avaliados.

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Etapa de preparação dos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico

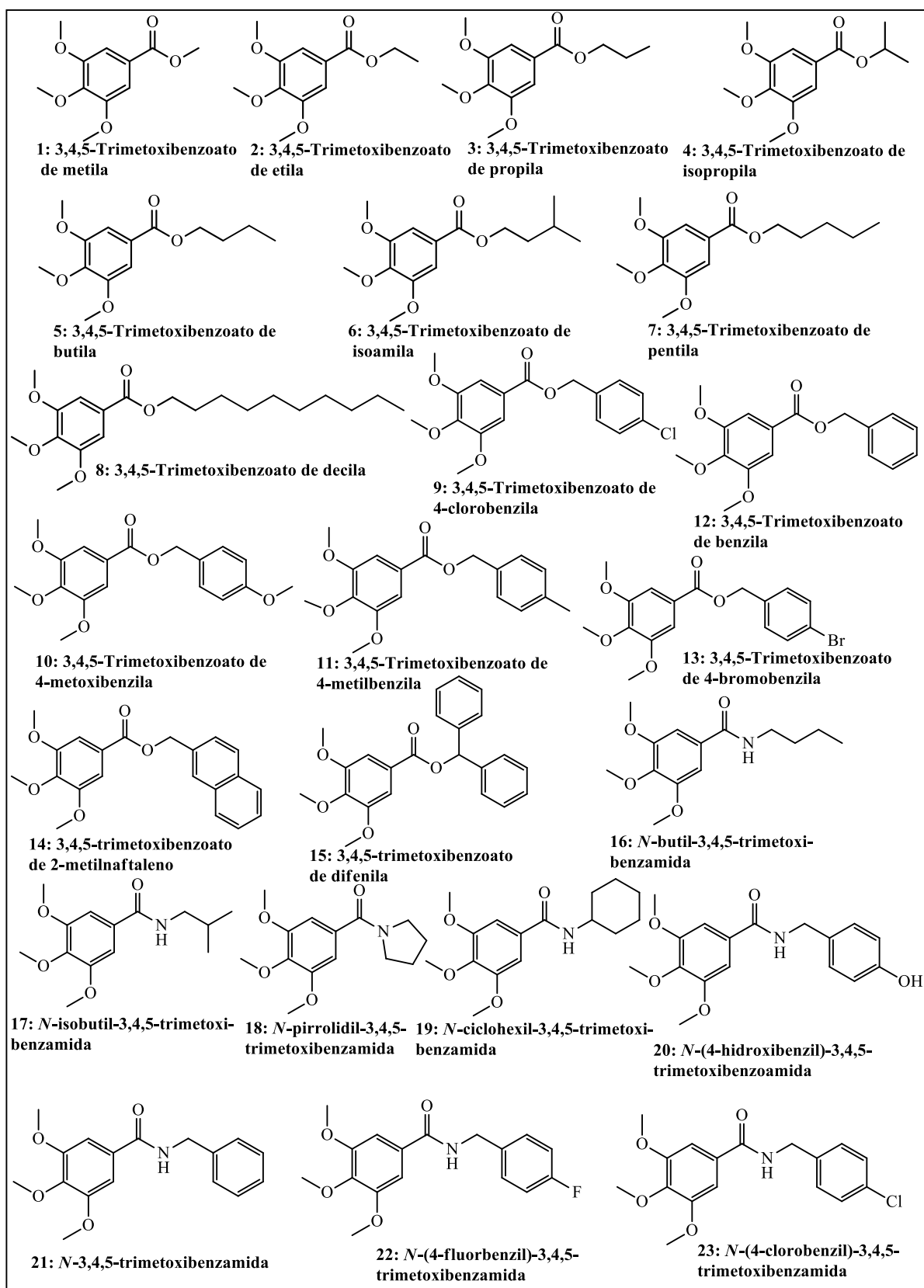
Os derivados 3,4,5-trimetoxibenzoatos e 3,4,5-trimetoxibenzamidas foram preparados pelas metodologias apresentadas no **Esquema 6** e as estruturas químicas estão representadas na **Figura 6**.

Esquema 6. Reações para preparação de ésteres derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.



Legenda: Condições reacionais: a) ROH, H₂SO₄, refluxo; b) Haleto, Et₃N, acetona, refluxo; c) ROH, THF, TPP, DEAD, 0°C a t.a.; d) RNH₂ ou pirrolidina, DMF, PyBOP, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C a t.a.

Fonte: Elaborados pela autora.

Figura 6. Estruturas químicas e nomenclatura dos derivados 1–23.

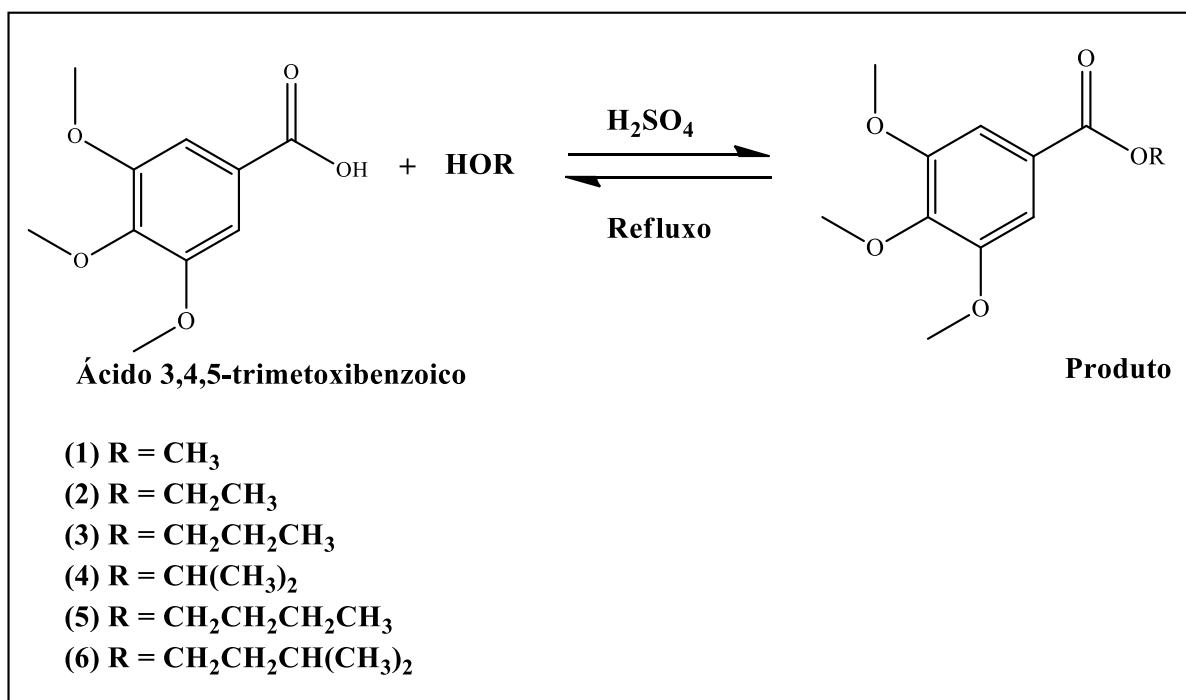
Fonte: Elaborados pela autora.

No presente trabalho, uma coleção de vinte e três derivados estruturalmente relacionados (**figura 6**) foi preparada e em conjunto com seu material de partida, o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (**figura 5**), foram submetidos a atividade citotóxica frente a linhagens de células cancerígenas, assim como atividade antiparasitária frente as formas evolutivas de *T. cruzi*. Os compostos apresentam estrutura química diversificada, porém, todos eles estão relacionados através do seu núcleo base: ésteres (3,4,5-trimetoxibenzoato) dos análogos de **1–15** e amidas (3,4,5-trimetoxibenzamida) de **16–23**. Ao estudar moléculas estruturalmente relacionadas observa-se que modificações estruturais, mesmo que mínimas, podem resultar em uma otimização significativa na atividade farmacológica (EMAMI; GHANBARIMASIR, 2015).

Em seguida estão discutidos alguns aspectos acerca das metodologias de obtenção dos derivados, assim como caracterização estrutural, sobretudo dos produtos inéditos.

A primeira metodologia utilizada foi à reação de Esterificação de Fischer com a obtenção de seis compostos (**1–6**) via a reação entre o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico com o álcool em excesso, utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador. A reação ocorre sob refluxo, e foi monitorada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (CAVALCANTE et al., 2015). O processo ocorreu como mostrado no **Esquema 7**. Os álcoois utilizados nas reações foram: álcool metílico, álcool etílico, álcool n-propílico, álcool isopropílico, álcool butílico e álcool isoamílico. De acordo com a **Tabela 2**, as reações duraram entre 5-24 horas, tendo-se obtido rendimentos entre 45,3–99,6%, sendo o éster **5** com maior rendimento.

Esquema 7. Esquema geral da esterificação de Fischer utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcool alifático.



Fonte – Elaborados pela autora.

Tabela 2. Informações reacionais dos derivados 1–6.

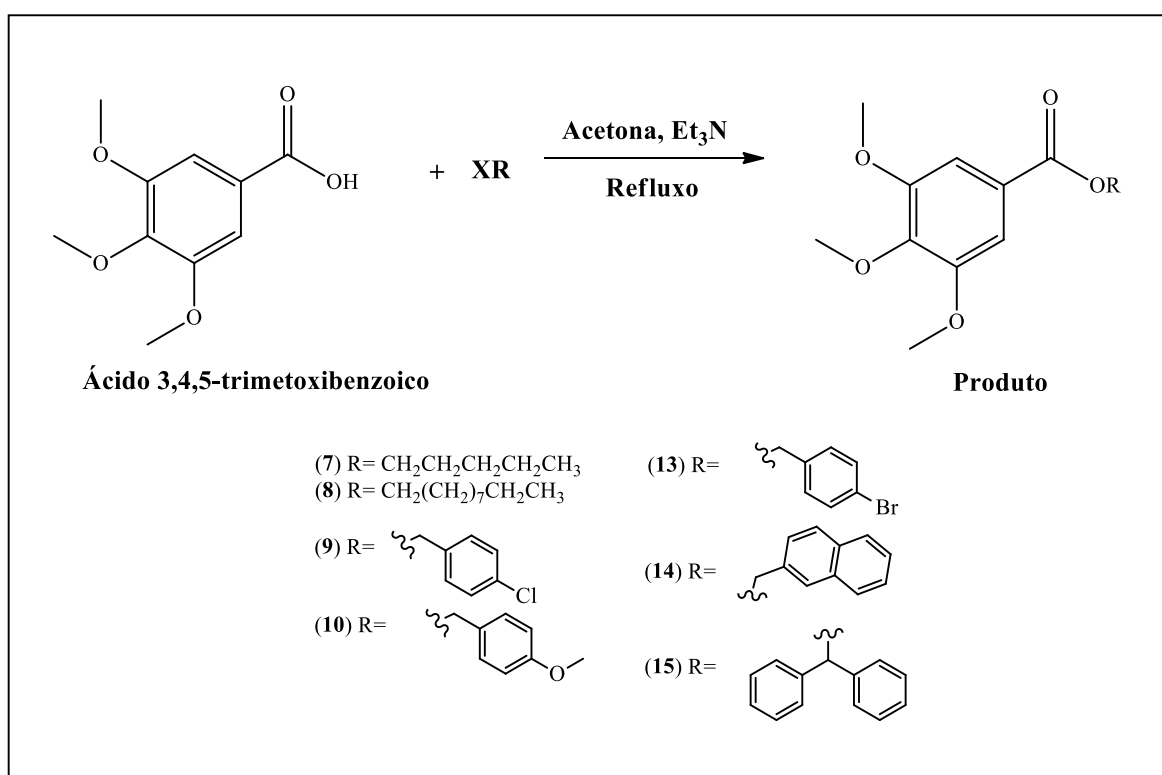
Produto	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Tempo de reação (h)	Quantidade obtida (mmol)	Rend. (%)	Ponto de fusão [lit.] (°C)
1	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	226,22	5	0,447	94,9	81–83
2	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	240,25	6	0,446	94,6	53–54
3	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	254,28	6	0,467	99,1	34–35
4	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	254,28	24	0,269	57,3	-
5	C ₁₄ H ₂₀ O ₅	268,31	24	0,469	99,6	-
6	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	282,33	24	0,213	45,3	-

Fonte – Elaborados pela autora.

Foram obtidos 6 (seis) derivados 3,4,5-trimetoxibenzoatos, e identificados por métodos espectroscópicos de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C , para o éster **6** foi realizada também a análise em espectrometria de massas de alta resolução por tratar-se de produto inédito.

Os análogos 3,4,5-trimetoxibenzoatos **7–10** e **13–15** foram obtidos pela reação utilizando ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e haleto alquílico ou arílico, em acetona anidra sob refluxo na presença da base trietilamina (Et_3N), monitorados por CCDA, segundo a metodologia de BOECK e colaboradores (2005) e LI e colaboradores (2012), **Esquema 8**. Os haletos utilizados nas reações foram: 1-bromopentano, 1-bromodecano, cloreto de 4-clorobenzila, cloreto de 4-metoxibenzila, brometo de 4-bromobenzila, 2-bromometil-naftaleno e o bromodifenilmetano. De acordo com a **Tabela 3**, as reações duraram 24–72 horas, e os produtos foram obtidos apresentando rendimentos intermediários (40,6–75,2%).

Esquema 8. Esquema geral da esterificação utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e haletos de alquila ou arila com acetona sob refluxo.



Fonte – Elaborados pela autora.

Tabela 3. Informações reacionais dos derivados 7–10 e 13–15.

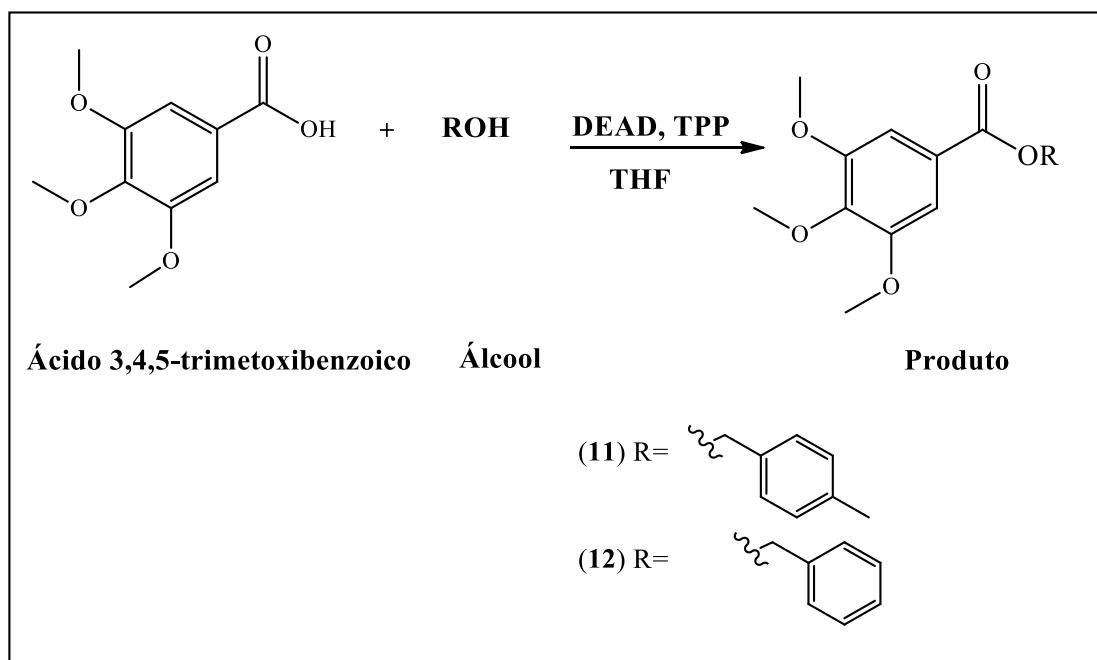
Produto	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Tempo de reação (h)	Quantidade obtida (mmol)	Rend. (%)	Ponto de fusão [lit.] (°C)
7	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	282,33	72	0,354	75,2	-
8	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352,47	48	0,191	40,6	49–50
9	C ₁₇ H ₁₇ O ₅ Cl	336,19	72	0,202	42,9	108–109
10	C ₁₈ H ₂₀ O ₆	332,35	24	0,318	67,5	83–84
13	C ₁₇ H ₁₇ O ₅ Br	381,22	72	0,518	55,0	104–105
14	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	352,38	72	0,456	48,4	84–85
15	C ₂₃ H ₂₂ O ₅	378,42	72	0,392	41,5	57–58

Fonte – Elaborados pela autora.

Foram preparados 7 (sete) 3,4,5-trimetoxibenzoatos, sendo dois com substituintes alifáticos e cinco aromáticos. Entre os sete produtos sintetizados, cinco são inéditos, sendo eles: **9, 10, 13, 14 e 15**.

Os ésteres **11-12** foram preparados via reação de Mitsunobu, em que o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e o álcool aromático foram solubilizados com tetrahydrofurano (THF) a 0° C. Em seguida, trifetilfosfina (TEPP) e o azodicarboxilato de dietila (DEAD) foram adicionados à temperatura ambiente, as reações foram monitoradas por CCDA, segundo a metodologia de Mitsunobu e Yamada (1967), assim como HANDIQUE e colaboradores (2013), como mostrado no **Esquema 9**. Os álcoois utilizados nas reações foram: álcool 4-metilbenzílico e álcool benzílico. De acordo com a **Tabela 4**, o tempo reacional para ambos os produtos foi de 72 horas, com rendimentos de 33,3 e 29,8%, respectivamente.

Esquema 9. Esquema geral da reação de Mitsunobu utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcool aromático.



Fonte – Elaborados pela autora.

Tabela 4. Informações reacionais dos derivados 7–10 e 13–15.

Produto	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Tempo de reação (h)	Quantidade obtida (mmol)	Rend. (%)	Ponto de fusão [lit.] (°C)
11	C ₁₈ H ₂₀ O ₅	316,35	72	0,157	33,3	93–94
12	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	302,32	72	0,281	29,8	91–92

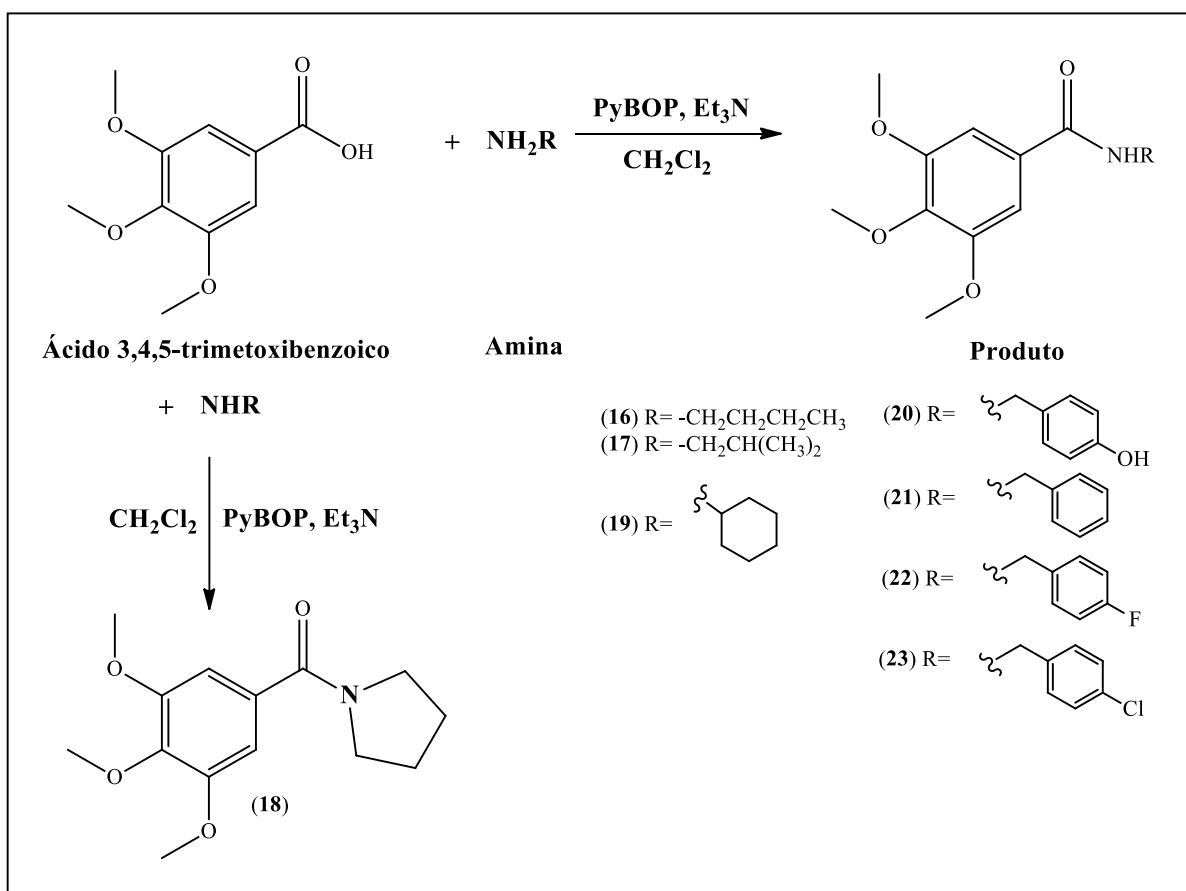
Fonte – Elaborados pela autora.

O produto **11** é inédito na literatura e foi estruturalmente caracterizado por espectrometria de massas de alta resolução, além das técnicas espectroscópicas de Infravermelho, RMN de ¹H e ¹³C.

Para obtenção dos compostos 3,4,5-trimetoxibenzamidas **16-23** utilizou-se a reação com agente de acoplamento PyBOP. A reação ocorre utilizando como solvente a dimetilformamida (DMF), na presença de trietilamina, o procedimento se inicia em a 0° C, após 30 minutos foi adicionada na mistura reacional uma solução do PyBOP em diclorometano, a reação continuou

em temperatura ambiente e foi monitorada por CCDA, segundo a metodologia de Rajan e colaboradores (2001), como mostrado no **Esquema 10**. As aminas utilizadas foram: butilamina, isobutilamina, pirrolidina, ciclohexilamina, 4-hidroxibenzilamina, benzilamina, 4-fluorobenzilamina e 4-clorobenzilamina. De acordo com a **Tabela 5**, o tempo reacional para obtenção das sete amidas foi de 5–8 horas com rendimentos de 44,4–91,3%.

Esquema 10. Esquema da amidação através do método utilizando agente de acoplamento PyBOP, tendo como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.



Fonte – Elaborados pela autora.

Tabela 5. Informações reacionais dos derivados 7–10 e 13–15.

Produto	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Tempo de reação (h)	Quantidade obtida (mmol)	Rend. (%)	Ponto de fusão [lit.] (°C)
16	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	267,32	5	0,419	89,1	115–116
17	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	267,32	6	0,430	91,3	118–119
18	C ₁₄ H ₁₉ NO ₄	265,30	6	0,397	84,2	-
19	C ₁₆ H ₂₃ NO ₄	293,36	8	0,209	44,4	179–180
20	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317,34	8	0,807	57,1	227–229
21	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301,34	8	0,279	59,3	138–139
22	C ₁₇ H ₁₈ FNO ₄	319,33	8	0,282	59,8	131–132
23	C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₄	335,78	8	0,408	86,6	157–158

Fonte – Elaborados pela autora.

Destas oitos 3,4,5-trimetoxibenzamidas obtidas, as **22** e **23** são inéditas na literatura.

4.2. Análise espectroscópica dos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico

A caracterização estrutural dos compostos foi estabelecida através de dados de IV, RMN de ¹H e ¹³C e Espectrometria de Massas de Alta Resolução para os compostos inéditos.

4.2.1. Interpretação dos espectros de infravermelho dos compostos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico 1-23

A análise dos espectros de infravermelho dos ésteres derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico foi baseada nos dados da literatura de Silverstein e Webster (2007); Pavia e colaboradores (2010) e dados da literatura. Nesta forma de espectroscopia observa-se a presença de grupos funcionais, que são de grande importância para identificação da molécula.

Na análise dos espectros de infravermelho dos análogos, foi observado que os ésteres **1–15** apresentam o anel aromático proveniente do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e exibem bandas de absorção semelhantes, acima de 3000 cm⁻¹ referentes ao estiramento de C-H sp², que para aromáticos é de 3150-3050 cm⁻¹, juntamente com bandas de absorção de dobramento do

anel C=C que ocorre aos pares nas regiões de 1600 e 1475 cm^{-1} , e sugerem a presença do anel aromático, vibrações do estiramento C=C muito fraca ou ausente referente a anel tretrassubstituído em 1670 cm^{-1} e absorções também fora do plano acima de 700 cm^{-1} e próxima a 700 cm^{-1} referente a localização dos grupos substituintes.

Também são observadas em todos os espectros bandas de estiramento C=O na faixa de 1750-1730 cm^{-1} características de carbonilas de ésteres, no entanto ocorre a diminuição da frequência de absorção da carbonila devido à conjugação das duplas ligações do anel aromático com o grupo carbonila, resultando um caráter de ligação simples para as ligações duplas, apresentando bandas na faixa de 1740-1715 cm^{-1} ; estiramento C-O atribuída a esta ligação no éster que aparecem com duas bandas na faixa de 1300 a 1000 cm^{-1} , estiramento de éteres arílicos na faixa de 1250 e 1040 cm^{-1} , sugerindo assim a presença das metoxilas no anel aromático, característico de derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.

Em análogos alquílicos devem ser observados bandas de estiramento C-H de alcano por volta de 3000 cm^{-1} . Enquanto em derivados arílicos, temos a banda de dobramento nas regiões de 900-690 cm^{-1} . Em relação aos substituintes do anel aromático para todos os análogos arílicos estão na posição *para*, foi observada uma banda forte de vibração de dobramento na região entre 800-850 cm^{-1} . Em relação à ligação do substituinte com o carbono do anel aromático, para o substituinte brometo ($\text{Br}-\text{C}_{\text{ANEL}}$) a absorção ocorre entre 1075 e 1030.

Em relação as benzamidas também foram analisados os espectros de infravermelho das estruturas moleculares dos compostos **16–23**, que contém o anel proveniente do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico. A absorção mais característica destes oito compostos é uma banda em aproximadamente 3300 cm^{-1} referente a amidas secundárias (-NH), com exceção da amida **18** que é uma amida terciária. Há bandas de absorção acima de 3000 referentes ao estiramento de C-H sp^2 , que para aromáticos é de 3150-3050 cm^{-1} , juntamente com bandas de absorção de dobramento do anel C=C que ocorre aos pares nas regiões de 1600 e 1475 cm^{-1} , e sugerem a presença do anel aromático, vibrações do estiramento C=C muito fraca ou ausente referente a anel tretrassubstituído em 1670 cm^{-1} e absorções também fora do plano acima de 700 cm^{-1} e próxima a 700 cm^{-1} referente à localização dos grupos substituintes. Também são observadas em todos os espectros bandas de estiramento C=O na faixa de 1680 – 1630 cm^{-1} . Estiramento de éteres arílicos na faixa de 1250 e 1040 cm^{-1} , visto que em todas as amidas preparadas no presente trabalho também há a presença das metoxilas no anel aromático, característico de derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.

Em análogos alquílicos foram observadas bandas de estiramento C-H de alcano por volta de 3000 cm^{-1} , grupo metilenos com absorção de dobramento em 1465 cm^{-1} , já grupos metila em 1375 cm^{-1} . Para derivados arílicos, observou-se também a banda de dobramento nas regiões de $900\text{-}690\text{ cm}^{-1}$, estes derivados quando presente substituintes são localizados na posição *para*, foi observada uma banda forte de vibração de dobramento na região entre $800\text{-}850\text{ cm}^{-1}$. A absorção referente a ligação do substituinte com o carbono do anel aromático, para o substituinte cloreto ($\text{Cl-C}_{\text{ANEL}}$) a absorção ocorre entre $1100\text{-}1035\text{ cm}^{-1}$, já quando se trata de um substituinte fluoretos (F-C_{ANEL}) a absorção ocorre entre $1400\text{ e }1000\text{ cm}^{-1}$, quando se trata de uma hidroxila (C-O_{ANEL}) estiramento na faixa de $1260\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$.

4.2.2. Interpretação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos derivados obtidos

Analisando as estruturas dos 3,4,5-trimetoxibenzoatos, mostra a presença de 11 (onze) hidrogênios em comum (**H-2**, **H-6**, **3-MeO**, **4-MeO** e **5-MeO** sendo 2 (dois) hidrogênios aromáticos e 9 (nove) das metoxilas que estão diretamente ligadas ao anel aromático. Apresentam também, 10 (dez) carbonos em comum (**C-1**, **C-2**, **C-3**, **C-4**, **C-5**, **C-6**, **3-MeO**, **4-MeO** e **5-MeO**, **C=O**), sendo 6 (seis) do anel aromático e 3 (três) das metoxilas ligadas ao anel, com a presença da carbonila do éster, confirmando assim as estruturas dos 3,4,5-trimetoxibenzoatos.

Os sinais de próton obtidos no RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) apresentaram em comum os seguintes deslocamentos: dois hidrogênios aromáticos que se observa como um singleto variando de $\delta\ 7,20\text{-}7,36$ (s, 2H) referente aos prótons **H-2** e **H-6**, como também é possível observar em todos os compostos a presença de deslocamentos das metilas provenientes das metoxilas presente nos derivados, estas se apresentam como singleto variando de $\delta\ 3,89\text{-}4,06$ (s, 9H) referente as metilas **3-MeO**, **4-MeO** e **5-MeO**, ou como dois singletos com deslocamentos bem próximos o primeiro em torno de $\delta\ 3,85$ (s, 3H) referente a metila **4-MeO**, enquanto o segundo $\delta\ 3,84$ (s, 6H) referente as metilas **3-MeO** e **5-MeO**, visto que são quimicamente equivalentes. Estas exibem deslocamentos que se coalescem, logo podem ser observados no mesmo sinal. Os demais hidrogênios das cadeias laterais apresentam constantes de acoplamento semelhantes que evidenciam o acoplamento que ocorre entre os hidrogênios vizinhos e os sinais dos hidrogênios metilênicos e metílicos dos substituintes alifáticos, assim como os sinais metínicos dos hidrogênios aromáticos.

Os dados espectrais de RMN ^{13}C os sinais obtidos em (CDCl_3 , 100 MHz, ppm) de todos os ésteres apresentaram em geral sinais em comum, que foram: sinais variando de 165,7 a 166,7 ppm característico de $\text{C}=\text{O}$ de éster, um sinal variando de 152,8 a 153,0 atribuído aos carbonos **C-3** e **C-5**, sinal em aproximadamente 142,0 de **C-4**, sinal variando de 125,2 a 126,9 para **C-1**, um sinal variando de 106,7 a 107,0 para os carbonos **C-2** e **C-6**, sinal de 60,8 a 61,0 atribuído ao carbono **4-MeO** referente a uma das metoxilas, e outro sinal variando de 56,0 a 56,4 concedido a dois carbonos o **3-MeO** e **5-MeO**.

Para os ésteres inéditos **6**, **9-11**, **13-15** foram observados os seguintes deslocamentos comprovando as estruturas de cada molécula. Para o composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (**6**) em relação aos dados obtidos de RMN de ^1H pode ser observado de acordo com sua cadeia lateral um tripleto em δ 4,34 (*t*, $J = 6,8$ Hz, 2H) referente aos hidrogênios **H-1'**, um multipletto em δ 1,81-1,71 (*m*, 1H) referente ao hidrogênio **H-3'**, como também um quarteto em δ 1,66 (*q*, $J = 6,8$ Hz, 2H) atribuído aos hidrogênios de **H-2'**, e por fim um dubleto em δ 0,98 (*d*, $J = 6,6$ Hz, 6H) referente aos hidrogênios **H-4'**. Para o RMN ^{13}C do composto **6** foram observados: sinal em 64,13 de **C-1'**, um sinal em 37,62 para **C-2'**, sinal 25,49 referente ao **C-3'** e por último um sinal em 22,65 atribuído a **C-4'**.

Para o composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (**9**) os deslocamentos obtidos no RMN de ^1H da cadeia lateral observados para a comprovação da molécula foram: para o anel aromático da cadeia lateral um multipletto de δ 7,37-7,36 (*m*, 2H) referente aos hidrogênios **H-3'** e **H-5'**, um segundo multipletto de δ 7,36-7,35 (*m*, 2H) atribuídos aos hidrogênios **H-2'** e **H-6'**. Por fim um singletto em δ 5,31 (*s*, 2H) sendo este sinal do hidrogênio **H-7'**. No RMN ^{13}C foram observados um sinal em 134,60 referente ao **C-1'**, um segundo sinal em 134,20 atribuído ao **C-4'**, um sinal para dois carbonos em 129,54 para **C-2'** e **C-6'**, um outro sinal para dois carbonos em 128,69 referente ao **C-3'** e **C-5'**, e por fim sinal em 66,02 para o **C-7'**, apresentou em sua estrutura o halogênio (C-Cl) como substituinte do anel.

O composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**) apresentou no RMN de ^1H para o substituinte aromático um dubleto em δ 7,38 (*d*, $J = 9,5$ Hz, 2H) atribuído aos hidrogênios do **H-2'** e **H-6'** e um segundo dubleto em δ 6,91 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2H) referente aos prótons **H-3'** e **H-5'**. Também nessa molécula pode ser observado um singletto em δ 5,29 (*s*, 2H) referente aos hidrogênios **H-7'**, e um sinal característico dessa molécula uma quarta metila referente a metoxila da posição *para* do anel aromático da cadeia lateral do composto sendo apresentada como um singletto em δ 3,81 (*s*, 3H) atribuído aos hidrogênios **H-8'**. No RMN de

^{13}C apresentou um sinal em 128,19 de **C-1'**, um sinal para dois carbonos em 130,01 referente a **C-2'** e **C-6'**, um outro sinal para dois carbonos em 113,89 atribuído a **C-3'** e **C-5'**, um sinal em área desprotegida referente a ligação direta ao oxigênio em 159,66 referente ao carbono **C-4'**, um sinal em 66,69 atribuído ao **C-7'**, e por fim em 55,27 referente ao carbono da metoxila da cadeia lateral concedido ao **C-8'**.

O 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (**11**) teve os seguintes sinais de RMN de ^1H referentes ao substituinte: um dubleto em δ 7,34 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 2H) atribuído aos prótons **H-3'** e **H-5'**, um outro dubleto em δ 7,20 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 2H) referente aos hidrogênios **H-2'** e **H-6'**, se observa também um singleto em δ 5,32 (*s*, 2H) atribuído aos hidrogênios **H-7'**, e um sinal em δ 2,36 (*s*, 3H) referente aos hidrogênios da metila **H-8'** na posição *para* do anel aromático. No RMN de ^{13}C foram observados um sinal em 138,10 referente ao carbono **C-4'**, outro sinal em 133,11 para o carbono **C-1'**, um sinal referente a dois carbonos em 129,24 para o **C-3'** e **C-5'**, um segundo sinal para dois carbonos em 128,39 referente ao **C-2'** e **C-6'**, sinal em 66,76 referente ao carbono **C-7'**, e um sinal em 21,30 atribuído ao carbono **C-8'**.

O composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (**13**) apresentou no RMN de ^1H para o substituinte aromático um dubleto em δ 7,51 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 2H) atribuídos aos prótons **H-3'** e **H-5'**, um segundo dubleto em δ 7,32 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 2H) referente aos hidrogênios **H-2'** e **H-6'**, ambos deslocamentos referentes ao anel aromático da cadeia lateral do composto, e um último deslocamento um singleto em δ 5,30 (*s*, 2H) referente aos hidrogênios do **H-7'**. Para RMN de ^{13}C foram observados um sinal em 135,26 (**C1'**), um sinal para dois carbonos em 131,93 referente aos carbonos **C-3'** e **C-5'**, um segundo sinal 130,04 referente a dois carbonos **C-2'** e **C-6'**, um sinal 122,50 referente ao **C-4'**, ligado diretamente ao átomo de bromo, e por fim um sinal em 66,16 referente ao **C-7'**.

Em relação ao composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (**14**), nas análises em RMN de ^1H observou-se sinais aromáticos como um multipeto em δ 7,91-7,85 (*m*, 4H) referente aos hidrogênios **H-1'**, **H-8'**, **H-5'**, **H-4'**, um duplo dubleto em δ 7,55 (*dd*, *J* = 8,4 Hz; 1,6 Hz, 1H) referente ao hidrogênio **H-3'**, um multipeto de δ 7,53-7,45 (*m*, 2H) atribuídos aos hidrogênios **H-6'** e **H-7'**, e um singleto em δ 5,53 (*s*, 2H) dos hidrogênios **H-9'**. No RMN de ^{13}C apresentou sinal em 133,64 referente a **C-8a'**, outro sinal em 133,34 atribuído para **C-2'**, sinal em 133,29 **C-4a'**, um outro sinal em 128,57 referente a **C-3'**; sinal em 128,12 **C-5'**, sinal em 127,85 atribuído a **C-8'**, outro sinal em 127,57 **C-4'**, sinal em 126,47 **C-1'**; outro sinal em

126,44 referente a C-7'; sinal em 126,05 do carbono C-6'; e por fim sinal em 67,14 para o carbono C-9'.

Para o composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (**15**) na RMN de ^1H os deslocamentos apresentados foram: um multipeto em δ 7,59–7,47 (m, 12H) referente aos hidrogênios aromáticos **H-2**, **H-6**, **H-2'**, **H-3'**, **H-4'**, **H-5'**, **H-6'**, **H-2''**, **H-3''**, **H-4''**, **H-5''** e **H-6''**, e por fim o singlete δ 7,44 (s, 1H) referente ao próton **H-7'**. No RMN de ^{13}C deste composto foram observados: sinal em 140,19 referente ao carbono (C-1' e C-1''), um sinal para dois carbonos em 127,99 atribuídos aos carbonos C-2' e C-6', sinal referente a dois carbonos em 128,58 C-3' e C-5', um sinal em 127,15 de C-4', o carbono C-7' foi observado em 77,63. Para os carbonos C-2'' e C-6'' sinal em 127,53, mais um sinal para dois carbonos em 128,47 referente a C-3'' e C-5'' e por fim um sinal em 126,53 atribuído ao carbono C-4''.

Analizando as estruturas das benzamidas obtidas, evidenciou-se a presença de 11 (onze) hidrogênios em comum (**H-2**, **H-6**, **H-7**, **H-8**, **H-9**) sendo 2 (dois) do anel aromático e 9 (nove) das metoxilas que estão diretamente ligadas ao anel aromático, uma importante diferença nos espectros de RMN de ^1H desses compostos para os ésteres é que existe ainda um hidrogênio que está presente em todas as benzamidas secundárias, sendo este sinal referente ao hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio (N-H). Apresentam também, 10 (dez) carbonos em comum (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C=O), sendo 6 (seis) do anel aromático e 3 (três) das metoxilas ligadas ao anel, com a presença da carbonila da amida, o que confirma assim as estruturas das 3,4,5-trimetoxibenzamidas.

Para os espectros de RMN de 1 obtidos em CDCl_3 , 400 ou 500 MHz, ppm, apresentaram em comum os seguintes deslocamentos: singlete variando de δ 6,19 a 7,04 (s, 2H) atribuído aos hidrogênios **H2** e **H6**, há presença do sinal do hidrogênio da ligação (N-H) que pode foram observados variando de δ 6,22 a 7,16 (s, 1H), Pode-se observar também em todos as benzamidas a presença de deslocamentos das metilas provenientes das metoxilas presente nos derivados, estas se apresentam como singlete que variaram de δ 2,786 a 3,88 (s, 6H) referente às metilas **3-MeO** e **5-MeO** e um segundo singlete variando de δ 2,72 a 3,87 (s, 3H) referente a metila **4-MeO**, que podem ser observadas em um único sinal referente a 9 hidrogênios. Os demais hidrogênios das cadeias laterais apresentam constantes de acoplamento semelhantes que evidenciando o acoplamento que ocorre entre os hidrogênios vizinhos, sinais dos hidrogênios metilênicos e metílicos das cadeias laterais saturadas assim como os sinais metínicos dos hidrogênios aromáticos.

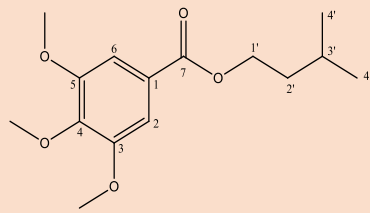
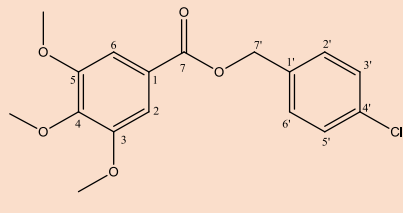
Enquanto que os dados espectrais de RMN ^{13}C os sinais obtidos em CDCl_3 , 100 ou 125 MHz, ppm, os deslocamentos em comum, foram: variando de 164,9 a 167,3 característico de C=O de amida, um sinal em aproximadamente 153,2 atribuído a dois carbonos os carbonos **C-3** e **C-5**, sinal variando de 139,9 a 141,3 para **C-4**, sinal variando de 127,6 – 130,5 (**C-1**), um sinal em 104,3 a 104,6 para dois carbonos, concedidos a **C-2** e **C-6**, sinal variando de 60,2 a 61,0 atribuído ao **4-MeO**, e outro sinal variando de 56,1 a 56,4 atribuído **3-MeO** e **5-MeO**. Os sinais provenientes das cadeias laterais saturadas e aromáticas também estão expostos na descrição de cada molécula e confirmaram assim a estrutura das sete benzamidas preparadas.

As benzamidas **22** e **23** são inéditas na literatura. Para os sinais de ^1H obtidos em (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) do composto *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**22**) os deslocamentos norteadores observados foram: um singlete em δ 6,69 (s, 1H) referente ao hidrogênio da ligação (**N-H**), um multiplete em δ 7,29-7,27 (m, 2H) atribuído aos prótons **H-2'** e **H-6'**, um dubleto em δ 6,98 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) referente aos hidrogênios **H-3'** e **H-5'**, e por fim um dubleto em 4,55 δ (d, $J = 5,8$ Hz, 2H) concedido aos hidrogênios de **H-7'**. Para o RMN de ^{13}C deste composto foram observados: sinal em 134,05 referente ao carbono **C-1'**, sinal em 129,69 atribuído ao carbono **C-2'** enquanto o **C-6'** em 129,58, já o carbono **C-3'** foi observado no sinal 115,74 e o **C-5'** bem próximo deste último em 115,52, um sinal em 161,04 referente ao carbono **C-4'**, um sinal em 163,50 referente a ligação entre o carbono e o halogênio o flúor (**C-F**), e por fim um sinal em 43,48 referente ao carbono **C-7'**.

A *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**23**) apresentou os seguintes dados de RMN de ^1H referente ao substituinte: um singlete em δ 6,74 (s, 1H) atribuído ao hidrogênio da ligação (**N-H**), um dubleto em δ 7,31 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H) referente aos hidrogênios **H-2'** e **H-6'**, um segundo dubleto em 7,28 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H) atribuído aos hidrogênios **H-3'** e **H-5'**, e por fim um dubleto em δ 4,58 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H) atribuído aos prótons de **H-7'**. Em relação ao RMN de ^{13}C desta molécula apresentou um sinal em 136,97 concedido ao carbono **C-1'**, sinal referente a dois carbonos em 129,27 atribuídos aos carbonos **C-3'** e **C-5'**, um pico em 129,60 para o carbono **C-4'**, um segundo sinal referente a dois carbonos em 128,92 atribuídos aos carbonos **C-2'** e **C-6'**, e por fim um sinal em 43,55 concedido ao carbono **C-7'**.

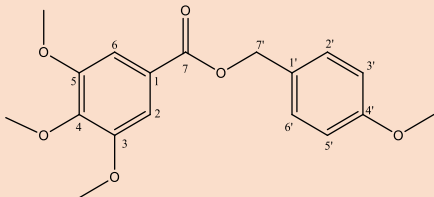
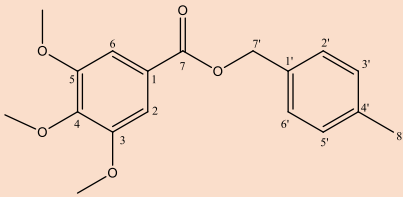
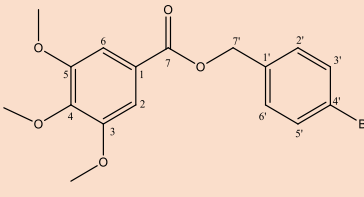
As atribuições referentes as análises espectroscópicas dos compostos **6**, **9-11**, **13-15**, **22** e **23** estão representadas nas Tabelas 6-9.

Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **6** e **9**.

	6		9	
Posição				
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	125,75	-	124,87
2 e 6	7,29 (s, 2H)	107,00	7,31 (s, 2H)	106,98
3 e 5	-	153,03	-	152,98
4	-	142,29	-	142,47
3-MeO	3,90 (s, 3H)	56,41	3,89 (s, 3H)	56,28
4-MeO	3,90 (s, 3H)	61,05	3,89 (s, 3H)	60,93
5-MeO	3,90 (s, 3H)	56,41	3,89 (s, 3H)	56,28
C=O	-	166,57	-	166,00
1'	4,34 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H)	64,13	4,29 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H)	134,60
2'	1,66 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H)	37,62	7,36-7,35 (m, 1H)	129,54
3'	1,81-1,71 (m, 1H)	25,49	7,37-7,36 (m, 1H)	128,69
4'	0,98 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H)	22,65	-	134,20
5'	-		7,37-7,36 (m, 1H)	128,69
6'	-		7,36-7,35 (m, 1H)	129,54
7'	-		5,31 (s, 2H)	66,02

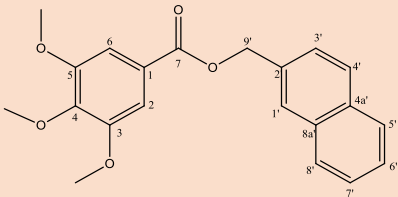
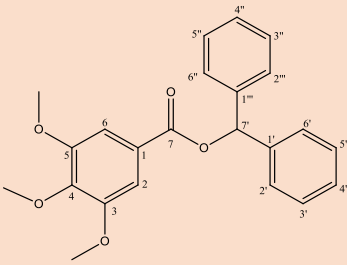
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **10**, **11** e **13**.

	10		11		13	
Posição						
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	125,24	-	125,22	-	125,00
2 e 6	7,31 (s, 2H)	106,90	7,32 (s, 2H)	106,98	7,31 (s, 2H)	107,17
3 e 5	-	152,82	-	152,92	-	153,12
4	-	142,12	-	142,34	-	142,68
3-MeO	3,89 (s, 3H)	56,14	3,89 (s, 3H)	56,16	3,90 (s, 3H)	56,43
4-MeO	3,89 (s, 3H)	60,94	3,89 (s, 3H)	60,85	3,90 (s, 3H)	61,10
5-MeO	3,89 (s, 3H)	56,14	3,89 (s, 3H)	56,16	3,90 (s, 3H)	56,43
C=O	-	166,25	-	166,14	-	166,10
1'	-	128,19	-	133,11	-	135,26
2'	7,38 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H)	130,01	7,20 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	128,39	7,32 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	130,04
3'	6,91 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H)	113,89	7,34 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)	129,24	7,51 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	131,93
4'	-	159,66	-	138,10	-	122,50
5'	6,91 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H)	113,89	7,34 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)	129,24	7,51 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	131,93
6'	7,38 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H)	130,01	7,20 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	128,39	7,32 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	130,04
7'	5,29 (s, 2H)	66,69	5,32 (s, 2H)	66,76	5,30 (s, 2H)	66,16
8'	3,81 (s, 3H)	55,27	2,36 (s, 3H)	21,30	-	-

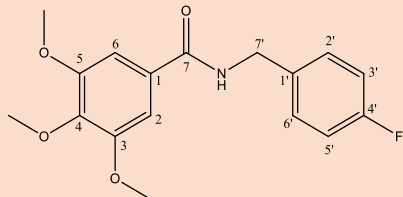
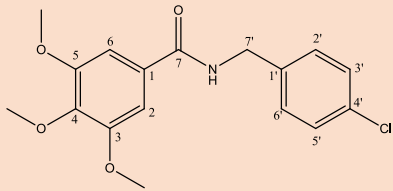
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **14** e **15**.

	14		15	
Posição				
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	125,25	-	125,17
2 e 6	7,36 (s, 2H)	107,18	7,59-7,47 (m, 2H)	107,15
3 e 5	-	153,14	-	152,96
4	-	142,55	-	142,55
3-MeO	3,90 (s, 3H)	56,41	4,06 (s, 3H)	56,31
4-MeO	3,90 (s, 3H)	61,04	4,06 (s, 3H)	60,93
5-MeO	3,90 (s, 3H)	56,41	4,06 (s, 3H)	56,31
C=O	-	166,26	-	165,29
1'	7,91-7,85 (m, 1H)	126,47	-	140,19
2'	-	133,34	7,59-7,47 (m, 1H)	127,99
3'	7,55 (dd, $J = 8,4$ Hz; 1,6 Hz, 1H)	128,57	7,59-7,47 (m, 1H)	128,58
4'	7,91-7,85 (m, 1H)	127,57	7,59-7,47 (m, 1H)	127,15
4a'	-	133,29	-	-
5'	7,91-7,85 (m, 1H)	128,12	7,59-7,47 (m, 1H)	128,58
6'	7,53-7,45 (m, 1H)	126,05	7,59-7,47 (m, 1H)	127,99
7'	7,53-7,45 (m, 1H)	126,44	7,44 (s, 1H)	77,63
8'	7,91-7,85 (m, 1H)	127,85	-	-
8a'	-	133,64	-	-
9'	5,53 (s, 2H)	67,14	-	-
1''	-	-	-	140,19
2''	-	-	7,59-7,47 (m, 1H)	127,53
3''	-	-	7,59-7,47 (m, 1H)	128,47
4''	-	-	7,59-7,47 (m, 1H)	126,53
5''	-	-	7,59-7,47 (m, 1H)	128,47
6''	-	-	7,59-7,47 (m, 1H)	127,53

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **22** e **23**.

	22		23	
Posição				
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	129,69	-	133,37
2 e 6	7,01 (s, 2H)	104,55	7,04 (s, 2H)	104,58
3 e 5	-	153,28	-	153,17
4	-	141,17	-	141,26
3-MeO	3,84 (s, 3H)	56,29	3,87 (s, 3H)	56,43
4-MeO	3,85 (s, 3H)	60,90	3,88 (s, 3H)	61,01
5-MeO	3,84 (s, 3H)	56,29	3,87 (s, 3H)	56,43
C=O	-	167,15	-	167,30
C-F	-	163,50	-	-
N-H	6,69 (s, 1H)	-	6,74 (s, 1H)	-
1'	-	134,05	-	136,97
2'	7,29-7,27 (m, 1H)	129,66	7,31 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H)	128,92
3'	6,98 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	115,74	7,28 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H)	129,27
4'	-	161,04	-	129,60
5'	6,98 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H)	115,52	7,28 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H)	129,27
6'	7,29-7,27 (m, 1H)	129,58	7,31 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H)	128,92
7'	4,55 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H)	43,48	4,58 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H)	43,55

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3. Análise dos espectros de massas dos compostos 6, 9-11, 13-15, 22 e 23.

Os compostos **6**, **9** e **10** possuem valores teóricos m/z de 283,1540, 337,0837 e 333,1332 e foram confirmados através da presença do íon m/z de 283,1538 ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5 + \text{H}$) $^+$, 337,0836 ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClO}_5 + \text{H}$) $^+$ e 333,1331 ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6 + \text{H}$) $^+$, respectivamente. Enquanto as análises realizadas nos compostos **11**, **13-15**, **22** e **23** geraram os íons m/z 317,1382 ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5 + \text{H}$) $^+$; 381,0330 ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{Br} + \text{H}$) $^+$; 353,1381 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5 + \text{H}$) $^+$; 379,1512 ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_5 + \text{H}$) $^+$; 320,1290 ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FNO}_4 + \text{H}$) $^+$ e 336,0995 ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4 + \text{H}$) $^+$. Estes dados estão de acordo com os valores calculados: m/z de 317,1383; 381,0332; 353,1383; 379,1540; 320,1292 e 336,0997, respectivamente. Esses resultados estão demonstrados na **tabela 10**.

Tabela 10. Dados espectroscópicos de massas de alta resolução dos compostos **6**, **9-11**, **13-15**, **22** e **23**.

Compostos	Pico íon molecular	<i>m/z</i> teórico	<i>m/z</i> obtido
6	[M+H] ⁺	283,1540	283,1538
9	[M H] ⁺	337,0837	337,0836
10	[M+H] ⁺	333,1332	333,1331
11	[M+H] ⁺	317,1383	317,1382
13	[M+H] ⁺	381,0332	381,0330
14	[M+H] ⁺	353,1383	353,1381
15	[M H] ⁺	379,1540	379,1512
22	[M+H] ⁺	320,1292	320,1290
23	[M+H] ⁺	336,0997	336,0995

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3. Estudo de atividade tripanocida dos derivados 1–23

4.3.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular dos 23 derivados foi realizada em células LLC-MK2 (ATCC CCL-7), sendo esta linhagem de células epiteliais obtidas dos túbulos renais de macaco, que foram submetidas ao ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Esse ensaio foi realizado com a finalidade de analisar a seletividade das mesmas pelo *T. cruzi* em relação às células hospedeiras. Os valores de viabilidade celular são mostrados na **Tabela 11**. Ensaio antiparasitários também foram realizados com os derivados menos citotóxicos, e os análogos **15-18** e **20** (apresentando baixa citotoxicidade para células saudáveis) foram selecionados para testes adicionais.

A análise dos resultados obtidos nos ensaios antiparasitários (IC₅₀), na determinação da CC₅₀ contra células LLC-MK2, resultou na seleção de cinco análogos (um éster e quatro amidas) para ensaios de IC₅₀. Na avaliação da atividade tripanocida contra a forma tripomastigota, as amidas **16**, **17**, **18** e **20** foram mais potentes que o composto éster **15**.

Analizando os resultados frente a forma tripomastigota, comparando a *N*-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**16**) com a *N*-iso-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**17**) que apresentaram

IC₅₀ de 6,21 µM e 2,21 µM; e IS = 83,10 e 298,64, respectivamente. A isomeria destes compostos revela que o composto **16** apresenta como substituinte uma cadeia carbônica lateral linear, enquanto o composto **17** apresenta uma cadeia carbônica lateral ramificada, logo, pode-se sugerir que o maior volume deste substituinte alquila resultou na potencialização da ação tripanocida contra a forma tripomastigota, além disso, a amida **17** também apresentou alto índice de seletividade para esta cepa. Na comparação de **18** e **20**, o *N*-pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**18**) apresentou um IC₅₀ de 8,14 µM, enquanto o análogo *N*-4-hidroxibenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**) apresentou um IC₅₀ de 8,95 µM. Assim, esses compostos apresentaram atividade semelhante, mesmo com a diferença dos substituintes, alquila e arila, respectivamente.

O composto **15** (3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila) apresentou a maior IC₅₀ (35,30 µM) dos cinco análogos bioativos testados, ou seja, foi o composto menos potente do grupo contra a forma tripomastigota.

Avaliando os resultados obtidos contra a forma epimastigota, o composto **16** apresentou um IC₅₀ de 10,66 µM, enquanto o composto **17** apresentou um IC₅₀ de 8,71 µM, confirmando que os substituintes ramificados apresentam maior atividade tripanocida. Comparando o composto **18** com o composto **20** apresentando respectivamente IC₅₀ de 34,30 µM e 4,06 µM, pode-se observar que o composto **20** foi cerca de 8,4 vezes mais potente. Portanto, contra a forma epimastigota as amidas com substituintes arílicos apresentam maior efeito citotóxico do que aquelas com substituintes alifáticos. Comparando amida **20** com o composto éster **15**; ambos possuem substituintes aromáticos, apresentando respectivamente IC₅₀ de 4,06 µM e 24,47 µM. Demonstrando assim que a amida foi mais potente que o éster, podendo apresentar resultados mais promissores para a forma epimastigota.

Como relatado por Cotinguiba e colaboradores (2009), estes avaliaram piperamidas isoladas de *Piper tuberculatum* e seus derivados quanto à sua atividade tripanocida. Dos quatorze compostos testados, a piplartina foi a mais potente com IC₅₀ = 10,5 µM contra a forma epimastigota do *T. cruzi*. Portanto, pode-se sugerir que a piplartina e seus análogos são moléculas promissoras para atividade tripanocida, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Analizando os dados obtidos contra a forma amastigota, a amida **16** apresentou IC₅₀ 5,72 µM, enquanto a amida **17** se mostrou mais potente com IC₅₀ 1,72 µM, e IS = 115,16 e 383,04, respectivamente, logo, o **17** apresentou o melhor resultado para esta forma evolutiva do *T. cruzi*,

o que pode sugerir que de fato substituintes ramificados resultam em maior potência tripanocida, além de um índice de seletividade três vezes mais alto. Comparando a amida **18** com a amida **20**, apresentaram IC_{50} semelhante, sendo 3,96 e 3,06 μM , respectivamente, mesmo com substituintes diferentes (alquila e arila) não houve diferença na potência. Comparando a amida **20** com o éster **15**, visto que ambos possuem substituintes arila, apresentando IC_{50} 3,06 e 4,30 μM , e $IS = 279,17$ e $290,43$, respectivamente, observando assim bioatividade semelhante, demonstrando assim equipotência em relação a esta forma evolutiva, assim como índice de seletividade semelhante destes compostos, diferindo das formas tripomastigota e epimastigota em que a amida **20** apresentou melhor perfil antiparasitário.

Tabela 11. Viabilidade celular e atividade tripanocida de derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico contra *Trypanosoma cruzi* (formas tripomastigota, epimastigota e amastigota).

COMPOSTO	Cepa (Tripomastigota) (IC ₅₀ µM)	Cepa (Epimastigotas) (IC ₅₀ µM)	Cepa (Amastigotas) (IC ₅₀ µM)	Viabilidade celular (LLC-MK2) (CC ₅₀ µM)	I.S (Tripomastigota)	I.S. (Amastigota)
1	-	-	-	155,56 ± 25,20	-	-
2	-	-	-	294,65 ± 37,79	-	-
3	-	-	-	144,41 ± 14,20	-	-
4	-	-	-	>488,70	-	-
5	-	-	-	380,16 ± 63,17	-	-
6	-	-	-	81,89 ± 11,12	-	-
7	-	-	-	296,63 ± 63,33	-	-
8	-	-	-	291,09 ± 38,92	-	-
9	-	-	-	375,98 ± 141,08	-	-
10	-	-	-	118,73 ± 24,46	-	-
11	-	-	-	37,06 ± 18,97	-	-
12	-	-	-	154,11 ± 20,51	-	-
13	-	-	-	141,47 ± 30,22	-	-
14	-	-	-	225,90 ± 72,40	-	-

15	35,30 ± 6,18	24,47 ± 2,96	4,30 ± 3,69	>528,51	>14,97	290,43
16	6,21 ± 0,86	10,66 ± 3,40	5,72 ± 1,61	659,13 ± 222,57	106,14	115,16
17	2,21 ± 0,37	8,71 ± 2,24	1,72 ± 0,15	659,13 ± 195,27	298,64	383,04
18	8,14 ± 1,70	34,30 ± 12,89	3,96 ± 0,22	676,59 ± 142,10	83,10	170,95
19	-	-	-	513,02 ± 177,32	-	-
20	8,95 ± 1,98	4,06 ± 0,63	3,06 ± 0,53	>630,26	>70,42	279,17
21	-	-	-	305,58 ± 45,63	-	-
22	-	-	-	343,13 ± 121,03	-	-
23	-	-	-	157,78 ± 22,22	-	-
Benznidazol	161,40 ± 31,80	115,10 ± 16,32	-	502,60 ± 57,80	3,11	-

Legenda. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3). Todos os resultados são expressos como média ± média de erro padrão (SEM). Índice de Seletividade (S.I.) = IC₅₀ (formas tripomastigotas ou amastigotas)/CC₅₀ (LLC-MK2).

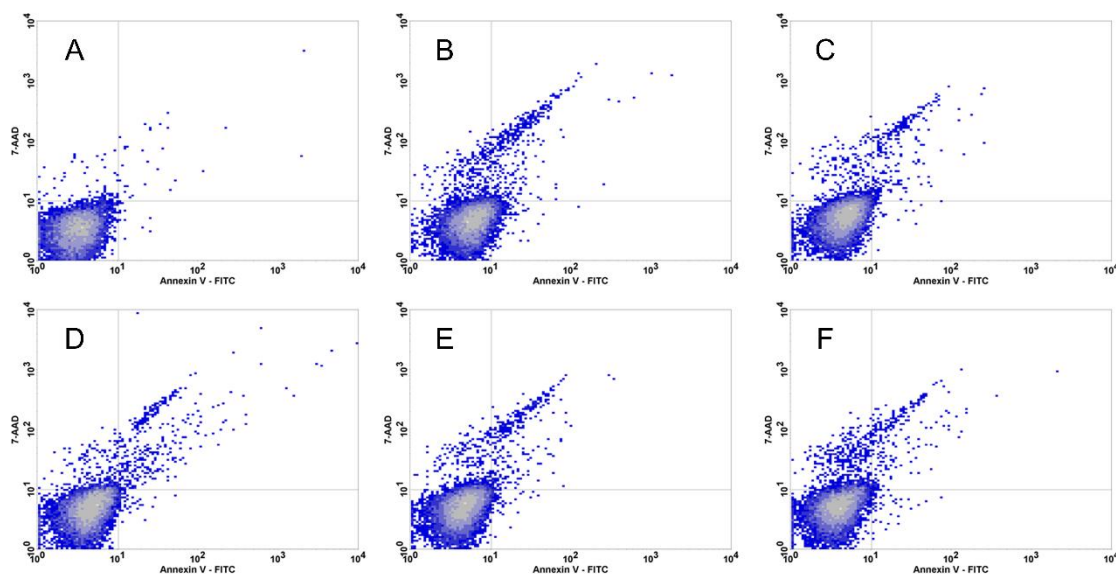
Fonte: Elaborado pela autora

4.3.2. Perfil de morte celular

Para avaliar o perfil de morte celular foram utilizadas formas epimastigotas, usando marcação com AxPE e 7-AAD. Para interpretação dos dados, as células foram divididas em quatro populações celulares: células viáveis, com baixos níveis de marcação para ambos os fluorocromos (não marcadas); células necróticas, marcadas apenas com 7-AAD (7AAD+); células apoptóticas, marcadas apenas com Anexina V-PE (/AxPE+); e células apoptóticas tardias duplamente marcadas (7AAD +/AxPE +) (KUMAR et al., 2015).

As células foram incubadas com os compostos **15-18** e **20** por 24 h em concentrações equivalentes a IC_{50} e $2 \times IC_{50}$. Nesse ensaio, observou-se redução na porcentagem de células viáveis e aumento na porcentagem de células marcadas com 7-AAD, indicando morte celular por necrose (**Figura 7**). A necrose resulta em danos à membrana plasmática e às organelas celulares (KRYSKO et al., 2008). O aumento das células marcadas também é observado no deslocamento das populações de células, conforme mostra a **Figura 7**.

Figura 7. Gráfico de dispersão de células do estudo de morte celular.



*Legenda: (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado com **16**; (C) Grupo tratado com **17**; (D) Grupo tratado com **18**; (E) Grupo tratado com **20**; (F) Grupo tratado com **15**.

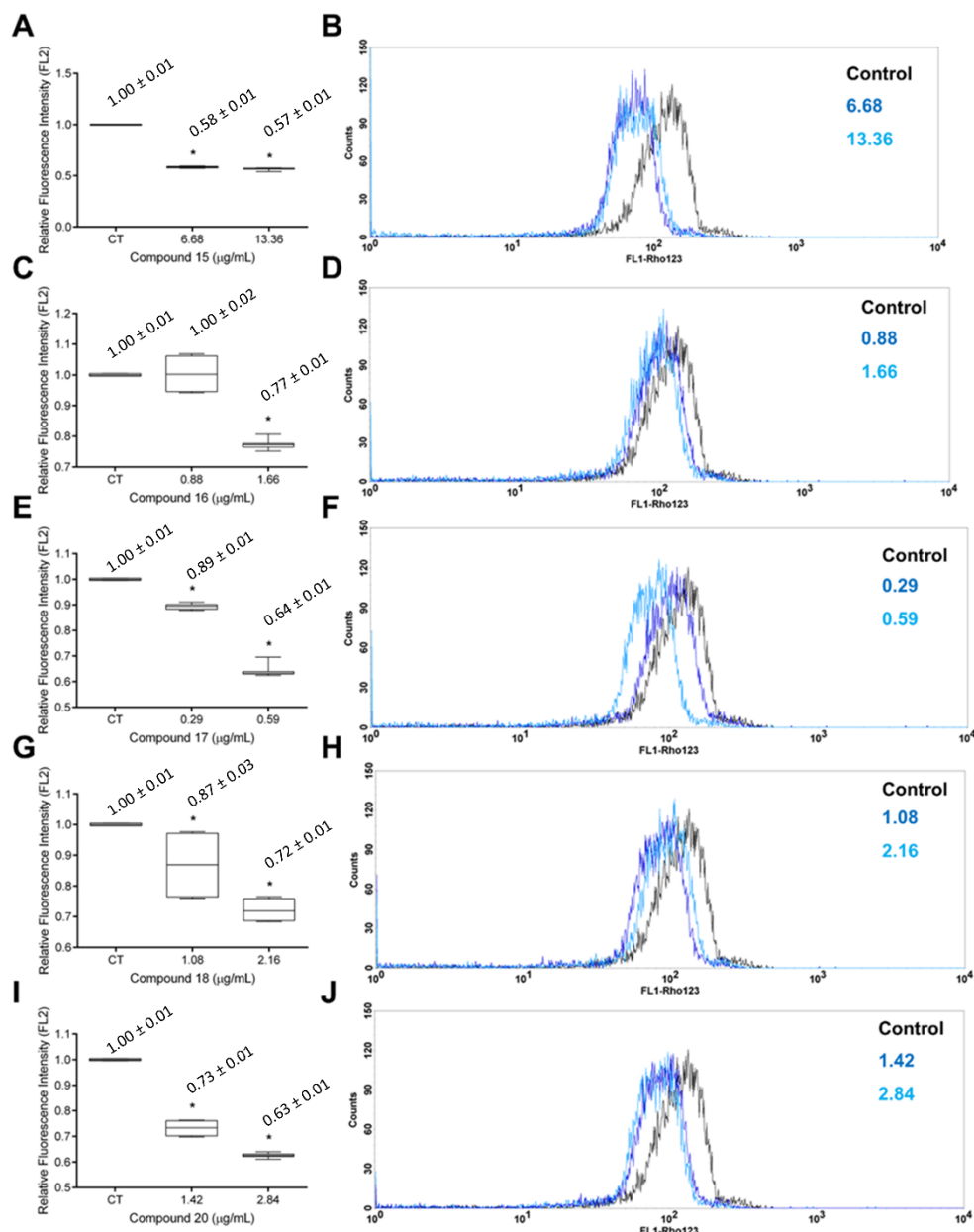
4.3.3. Efeito no potencial transmembrânico mitocondrial

Também foram realizados ensaios de citometria de fluxo com Rho123 (rodamina 123) para avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das formas epimastigotas tratadas do presente estudo.

Quando ocorre alterações do $\Delta\Psi_m$ e na viabilidade da mitocôndria, estes fatores estão envolvidos diretamente com o colapso de produção de energia e morte celular. Ocorrendo redução do acúmulo de Rho123 na mitocôndria, ocasiona um aumento relativo deste corante no citoplasma, assim emitindo fluorescência verde. Quando a célula apresenta modificações no $\Delta\Psi_m$ estes podem ser considerados por meio da redução da fluorescência vermelha, como também aumento da fluorescência verde (O'CONNOR et al., 1988).

O resultado dessa avaliação está demonstrado na **Figura 8**, como pode-se observar o tratamento com os derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico em ambas as concentrações foram capazes de reduzir acentuadamente a capacidade mitocondrial das formas epimastigotas. Os compostos que apresentaram os melhores resultados foram: **15**, **17** e **20**, com reduções de 36%, 37% e 43%, respectivamente. Sugerindo assim que estes compostos estão causando colapso de produção de energia e morte celular desta forma evolutiva.

Figura 8. Gráfico de histograma apresentando as intensidades de fluorescência do corante Rho123 em epimastigotas tratadas com os compostos **15**, **16**, **17**, **18** e **20**.



*Legenda: As linhas preta, azul escuro e azul claro representam, respectivamente, a fluorescência dos grupos de controle, a maior e a menor das concentrações de compostos.

4.4. Estudo de modelagem molecular tripanocida

Os estudos de modelagem molecular foram conduzidos tendo como objetivo a investigação do possível mecanismo de ação tripanocida do composto **17**. Inicialmente os alvos potenciais para o composto foram identificados por meio de uma abordagem de pesca de alvo baseada em homologia. Em seguida, o composto foi acoplado a cada um de seus alvos seguindo a predição, para assim produzir hipóteses de ligação. As energias livres de ligação foram previstas para esses complexos proteína-composto **17** usando uma abordagem baseada em simulações MD. Essas energias de ligação derivadas de MD foram utilizadas como critérios para priorizar o possível mecanismo de ação do composto. Sendo assim, se evita confiar em resultados de encaixe molecular que usam funções de pontuação simplificadas projetadas para processar grandes quantidades de compostos em um tempo razoável e os valores de pontuação não devem ser comparados em diferentes alvos moleculares.

As abordagens computacionais de pesca de alvos dependem do princípio da similaridade: compostos químicos semelhantes devem ter um perfil de bioatividade semelhante. Esses métodos geralmente são treinados com dados de atividade disponíveis em bancos de dados públicos, como o ChEMBL. Infelizmente, esses bancos de dados são tendenciosos para interações de produtos químicos com proteínas humanas. Assim, neste estudo, todos os prováveis alvos do composto **17** foram inicialmente previstos e as proteínas homólogas destes em *T. cruzi* foram identificadas. Dessa forma, foram abordadas as limitações dos dados de bioatividade depositados nos bancos de dados do parasito, estreitando os possíveis alvos moleculares dos compostos do *T. cruzi*. Esta abordagem serve para propor um conjunto inicial de possíveis alvos do composto para futuros cálculos da modelagem molecular e simulações MD.

De acordo com a abordagem de pesca de alvo baseada em homologia, os potenciais alvos moleculares do composto **17** em *T. cruzi* identificados estão listados na **Tabela 12**. As informações na **Tabela 12** incluem o acesso UniProt, o ID usado ao longo do manuscrito, e uma breve descrição funcional para cada proteína. O docking molecular do composto **17** às proteínas listadas (**tabela 12**) foi realizado conforme descrito na Parte experimental. No caso da enzima DHFR-TS, tanto o folato quanto o dUMP foram explorados separadamente. Por outro lado, TUBA e TUBB polimerizam para formar microtúbulos e a inibição desse processo pode influenciar o desenvolvimento normal das células. Assim, a ligação do derivado **17** à interface do dímero TUBA-TUBB foi explorada. A montagem deste dímero foi realizada

conforme proposto em relatório anterior (ESCUDERO-MARTÍNEZ et al., 2017) e sendo referido no presente estudo como TUB. Os resultados do encaixe molecular são fornecidos na **Tabela 13**.

Tabela 12. Potenciais alvos moleculares do composto **17** em *T. cruzi*.

Acesso UniProt	ID	Descrição
Q4DFL5	PPI-1	Peptidilprolil isomerase
Q4D5W5	PPI-2	Peptidilprolil isomerase
Q4DQU7	HDAC	Histona desacetilase
Q4D3A0	MAPK-1	Proteína cinase ativada por mitógeno
A0A2V2VTR7	MAPK-2	Proteína cinase ativada por mitógeno
Q4D2F2	IleRS	Isoleucina-tRNA ligase
Q4DQP2	TUB-B	Cadeia beta tubulina
Q4CLA1	TUB-A	Cadeia alfa tubulina
Q4D397	PDE	Fosfodiesterase
Q4DLS1	DHFR-TS	Bifuncional di-hidrofolato redutase-timidilato sintase

Tabela 13. Resultados do acoplamento dos potenciais alvos do composto **17**.

Alvos	Pose	PLP ^(a)	Z_PLP ^(b)	GS ^(c)	Z_GS ^(d)	CS ^(e)	Z_CS ^(f)	ASP ^(g)	Z_ASP ^(h)	Aggregated Score
PPI-1	1	56.15	2.28	18.93	0.54	26.55	1.85	32.06	1.31	1.49
	2	48.94	0.22	17.9	0.46	26.35	1.78	33.92	1.88	1.08
	3	49.73	0.45	22.1	0.79	22.96	0.51	35.91	2.5	1.06
PPI-2	1	59.08	0.99	25.08	0.72	25.82	0.65	40.92	0.89	0.81
HDAC	1	69.37	2.25	16.18	0.75	23.07	2.13	30.07	0.65	1.44
	2	66.41	1.66	14.14	0.68	22.5	1.92	30.99	0.81	1.27
	3	66.06	1.6	30.16	1.25	20.27	1.11	31.16	0.84	1.2
MAPK-1	1	55.16	3.18	15.68	0.81	18.62	1.44	29.28	3.12	2.14
MAPK-2	1	59.91	2.29	25.5	1.09	23.16	1.58	30.56	1.42	1.6
	2	57.54	1.79	23.44	0.96	22.64	1.41	33.64	2.16	1.58
	3	54.12	1.06	22.41	0.89	21.46	1.04	34.22	2.29	1.32
	4	55.86	1.43	24.66	1.04	21.02	0.9	27.56	0.71	1.02
IleRS	1	44.64	2.02	-1.38	0.43	18.5	3.24	29.06	1.55	1.81
TUB	1	36.01	1.69	-11.12	0.37	12.91	2.03	18.36	1.99	1.52
PDE	1	61.37	2.72	13.71	0.59	21.22	0.45	32.11	0.82	1.15
	2	52.05	0.48	18.63	0.75	24.07	2.3	31.82	0.73	1.06
DHFR-TS (folate site)	1	55.63	1.91	13.93	0.96	20.24	1.79	29.19	2.49	1.79
	2	56.42	2.2	-23.3	-0.98	20.91	2.18	27.15	1.88	1.32
DHFR-TS (dUMP site)	1	35.43	0.69	8.3	0.69	8.18	0.25	22.22	2.99	1.15
	2	37.56	1.24	18.44	1.4	12.49	1.9	11.47	0.01	1.14

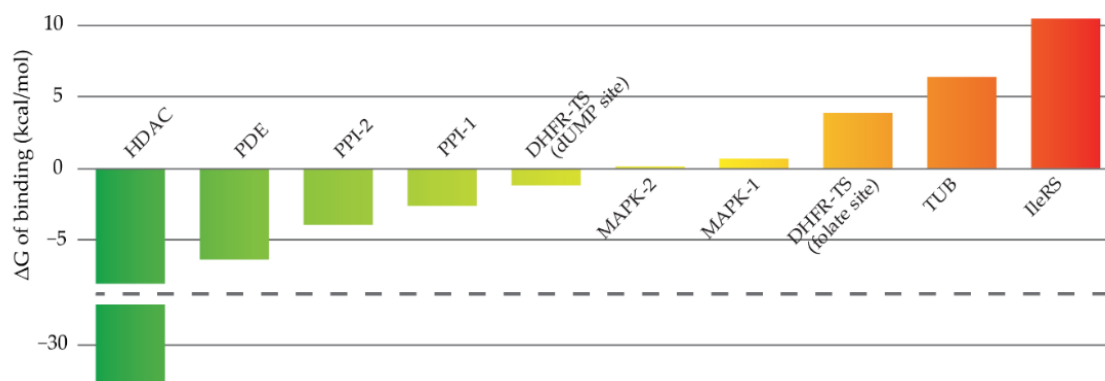
Legenda: ^(a) PLP score, ^(b) Escala PLP score, ^(c) GoldScore score, ^(d) Escala GoldScore score, ^(e) ChemScore score, ^(f) Escala ChemScore score, ^(g) ASP score, ^(h) Escala ASP score

A realização do estudo da modelagem molecular foi em 20 complexos composto-receptor diferentes que foram então submetidos ao cálculo das energias livres de ligação baseadas em MD seguindo o procedimento descrito na Parte experimental. Os resultados desses cálculos são fornecidos na **Tabela 14**, enquanto a menor (melhor) energia livre de ligação calculada para o composto **17** para cada alvo é representada na **Figura 9**.

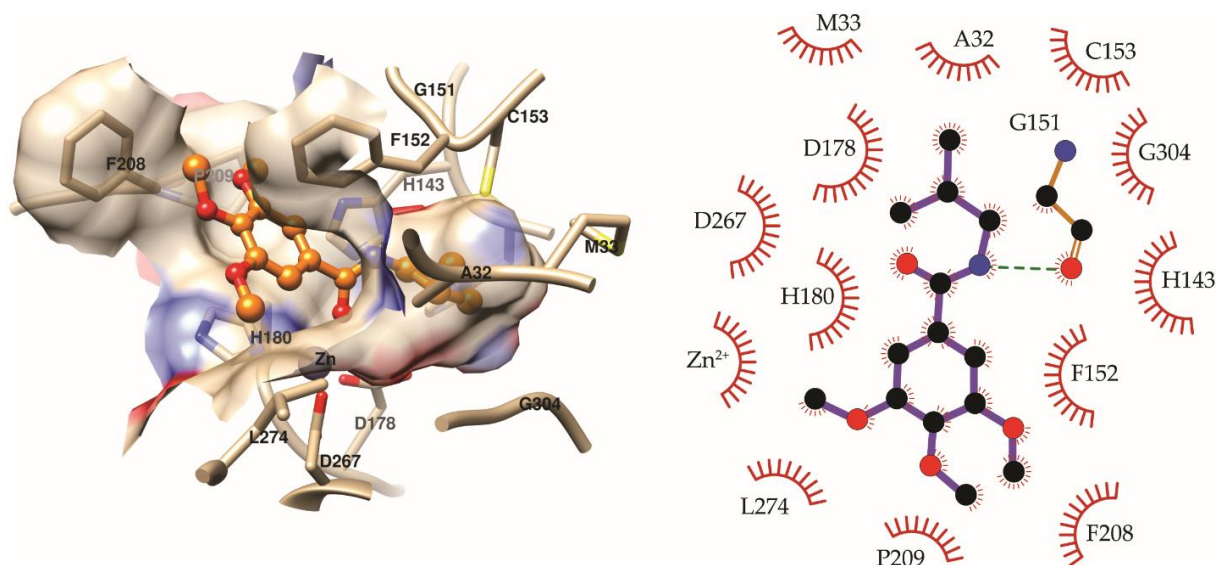
Tabela 14. Energias livres previstas de ligação do composto **17** aos seus alvos potenciais e seus componentes de acordo com o método MM-PBSA.

ALVOS	Confôrmeros	MM-PBSA Componente						ΔG solv.	ΔG TOTAL
		VD WAALS	EEL	EPB	ENPOLAR	EDISPER	ΔG gas		
PPI-1	1	-26.27	-11.09	22.17	-21.32	34.07	-37.37	34.93	-2.44
	2	-24.81	-6.47	17.67	-20.05	32.35	-31.28	29.97	-1.32
	3	-27.55	-9.61	21.26	-22.36	35.68	-37.16	34.58	-2.58
PPI-2	1	-27.81	-6.67	16.97	-20.73	34.32	-34.48	30.56	-3.91
	1	-34.99	-69.76	56.70	-31.23	47.45	-104.75	72.92	-31.83
	2	-29.75	-72.57	55.11	-30.34	44.65	-102.31	69.42	-32.89
HDAC	3	-31.58	-79.12	62.66	-31.32	46.98	-110.70	78.32	-32.37
	1	-42.84	-25.04	49.09	-29.58	49.04	-67.88	68.55	0.67
	1	-33.18	-11.31	31.36	-25.17	43.21	-44.48	49.40	4.92
MAPK-1	2	-35.28	-21.90	40.14	-27.57	44.64	-57.18	57.21	0.03
	3	-33.03	-17.00	37.16	-26.20	43.98	-50.04	54.94	4.90
	4	-34.85	-30.36	48.42	-27.39	44.43	-65.21	65.47	0.26
MAPK-2	1	-42.36	-14.22	45.97	-29.00	50.09	-56.58	67.06	10.49
	1	-41.78	-17.70	45.11	-29.34	50.14	-59.48	65.91	6.42
	1	-35.10	-10.08	25.52	-27.37	43.94	-45.19	42.09	-3.09
IleRS	2	-39.00	-16.30	30.73	-29.48	47.72	-55.30	48.97	-6.32
	1	-34.62	-11.50	33.96	-26.30	43.97	-46.12	51.63	5.51
TUB	2	-33.64	-11.21	31.63	-25.91	42.97	-44.85	48.70	3.85
	1	-28.99	-18.86	36.58	-22.87	39.28	-47.84	52.99	5.14
PDE	2	-26.50	-9.58	22.43	-21.60	34.05	-36.07	34.87	-1.20

*Os valores de energia são expressos em kcal/mol.

Figura 9. Energias livres de ligação do composto **17** aos seus potenciais alvos moleculares.

Ao avaliar os resultados pode-se observar que o alvo mais provável da substância no *T. cruzi*, dentre os avaliados em nossa pesquisa, é a HDAC (histona desacetilase). Portanto, foi realizada uma análise mais detalhada do modo de ligação predito do composto **17** a HDAC, mostrado na **Figura 10**. Para esta enzima, prevê-se que o ligante se oriente com o anel trimetoxifenila na entrada da cavidade de ligação, formando interações de empilhamento π - π com F152 e H180, ao mesmo tempo em que interage com F208 e L274. O oxigênio da carbonila aponta diretamente para o íon Zn^{2+} . Por outro lado, o nitrogênio da amida serve como um doador de ligação de hidrogênio para G151. Essas interações de empilhamento π - π , eletrostáticas e de ligação de hidrogênio são propostas como os principais fatores que estabilizam a ligação do composto **17** ao HDAC. Dessa forma, a cadeia lateral do ligante, que para este composto se trata do radical isobutílico ocupa o fundo da cavidade de ligação, região delimitada por A32, M33, H143, G151, C153 e G304.

Figura 10. Modo de ligação previsto para o composto **17** a HDAC.

* A conformação do ligante representada corresponde ao centróide do cluster mais populoso obtido após agrupar as conformações do ligante nos instantâneos de 100 MD usados para cálculos de MM-PBSA. O composto é representado como bolas e bastões laranja. Apenas os resíduos que interagem com o ligante em pelo menos 50% dos instantâneos MD analisados são rotulados e incluídos no diagrama de interações. A figura foi produzida com UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) e LigPlot+ (LASKOWSKI et al., 2011).

Os alvos potenciais previstos para o composto **17** abrangem diversas funções, como dobramento de proteínas, desacetilação de substratos de acetil lisina, proteínas quinases, ligação de isoleucina ao tRNA, estrutura celular, regulação dos níveis de cAMP e cGMP, bem como a produção de tetraidrofolato. A partir dos resultados da modelagem, observou-se que o alvo mais provável do composto **17** em *T. cruzi* é a enzima HDAC.

De acordo com o mecanismo de ação proposto pode-se explicar a atividade tripanocida do derivado **17**. Como já relatado na literatura os inibidores de HDAC estão atualmente sendo investigados por seu potencial como drogas antitripanossômicas. Nesse sentido, diversos inibidores de HDAC têm sido relatados como eficazes e seletivos contra o *T. cruzi* e propostos como pontos de partida para otimização futura da atividade. Pesquisas adicionais devem ser direcionadas para avaliar a atividade inibitória de HDAC prevista do composto **17** em *T. cruzi*. Finalmente, os resultados da modelagem aqui apresentados podem servir para orientar a futura otimização de amidas derivadas do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico como agentes tripanocidas (ZUMA, 2018; DI BELLO et al., 2022).

4.4.1. Predições ADMET

De acordo com as avaliações das propriedades ADMET do composto **17** e do controle positivo o benznidazol foram realizadas as predições com o servidor web SwissADME (DAINA et al., 2017). Os resultados dessas previsões são fornecidos na **Tabela 15** e mostram que **17** tem propriedades físico-químicas favoráveis para biodisponibilidade oral. Em contraste, o benznidazol contém menos insaturações do que o necessário para a biodisponibilidade oral. Por outro lado, o composto **17** é menos solúvel em água e mais lipofílico que o benznidazol. Ambos os compostos são preditos com alta absorção gastrointestinal e como não substratos da gp-P. Com os dados previstos foi observado que uma propriedade que precisa ser modificada no composto **17** é sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Por fim, as previsões do ADME mostram que o perfil inibitório ao citocromo do composto **17** deve ser melhorado em estudos futuros de bioatividade conjunta e otimização das propriedades do ADME.

Tabela 15. Previsões de ADMET para o composto **17** e o fármaco de referência benznidazol.

Parâmetro	Composto 17	Benznidazol
Propriedades físico-químicas		
Peso molecular (g/mol)	267,32	260,25
Ligações rotativas	7	6
aceitadores de ligação H	4	4
doadores de ligação H	1	1
Fração Csp ³	0,5	0,17
TSPA (A2)	56,79	92,74
Lipofilicidade (Log $P_{o/w}$)		
iLOGP	3,01	1,15
XLOBP3	2,44	0,91
MLOGP	1,5	0,37
Consenso	2,31	0,49
Solubilidade		
Solubilidade em água	Moderadamente solúvel	Solúvel
Farmacocinética		
Absorção gastrointestinal	Alto	Alto
Permeabilidade da pele (Log KP, cm/s)	-6,20	-7,24
Permeabilidade sangue-cérebro	Sim	Não
Substrato gp-P	Não	Não
inibidor CYP1A2	Sim	Não
Inibidor CYP2C19	Não	Não
inibidor CYP2C9	Não	Não
inibidor CYP2D6	Sim	Não
Inibidor CYP3A4	Não	Não

4.5. Estudo de atividade citotóxica dos derivados 1-8, 10, 11, 13-17 e 19-23.

4.5.1. Atividade citotóxica

Para avaliar a citotoxicidade da coleção de derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (**1-8, 10, 11, 13-17 e 19-23**) foram inicialmente testados em células SCC9 (células derivadas da língua humana - OSCC), utilizando o ensaio de viabilidade celular MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). A triagem foi realizada exclusivamente com linhagens de células SCC9 (FONSECA et al., 2021).

O DMSO foi usado como controle negativo, e a carboplatina como controle positivo, sendo este último um quimioterápico amplamente utilizado na clínica para o tratamento deste tipo de câncer. Para calcular a IC_{50} de cada composto, foram criadas curvas de regressão não lineares de viabilidade que foram geradas em relação à concentração de tratamento das moléculas testadas (**Tabela 16**). Apenas compostos com IC_{50} inferior a 500 μM foram testados em fibroblastos normais para assim avaliar a citotoxicidade destes, o que favorece futuros estudos pré-clínicos, assim como para evitar a cristalização em concentrações mais altas. Esses dados se fazem necessários para calcular a IC_{50} e o índice seletividade das moléculas. Para resultados de IC_{50} que não foram abaixo de 1000 μM estes compostos foram considerados como não determinados (N.D.) para o mesmo motivo.

Como já relatado na literatura, as diversas espécies do gênero *Piper* possuem em sua composição a alcaloide piperartina, e esta apresenta várias propriedades farmacológicas, tais como: antitumoral, citotóxica, antinociceptiva, antiplaquetária e antimetastática (NÓBREGA et al., 2019). Embora a piperartina não tenha sido testada neste estudo, os compostos testados são análogos a esta molécula. Os compostos mais ativos que atenderam aos requisitos em células SCC9 foram: **3** ($IC_{50} = 299 \pm 0,06 \mu M$), **4** ($373,1 \pm 0,05 \mu M$), **5** ($204,2 \pm 0,07 \mu M$), **6** ($160,2 \pm 0,07 \mu M$), **7** ($257,6 \pm 0,08 \mu M$), **10** ($46,21 \pm 0,16 \mu M$), **11** ($68,69 \pm 0,02 \mu M$), **14** ($309,9 \pm 0,04 \mu M$) e **16** ($468,8 \pm 0,07 \mu M$). Dessa forma, os fibroblastos normais foram utilizados para ser testado com os compostos selecionados do presente trabalho e com carboplatina para assim determinar a seletividade (**Tabela 16**). Dos derivados selecionados para testes em células não tumorais (fibroblastos orais primários normais), apenas o **7** não foi seletivo (I.S. < 2); outros mostraram seletividade intermediária, como em **5** e **6** (I.S. entre 2 e 3), alguns foram altamente seletivos (I.S. > 4), e os compostos **10** e **11** foram os mais seletivos, com I.S. de 16,02 e 53,12, respectivamente. Resultados de índice de seletividade ≥ 3 são considerados altamente seletivos, visto que apresentam seletividade citotóxica três vezes maior para a linhagem neoplásica em comparação com a célula saudável (MAHAVORASIRIKUL et al., 2010).

A coleção de derivados foi testada frente a células SCC9, foram dezenove compostos testados, dentre eles doze ésteres e sete benzamidas. Dos derivados ésteres, dois compostos não apresentaram atividade citotóxica frente as células SCC9, os compostos **2** e **13**. Os demais apresentaram citotoxicidade variando de baixa a satisfatória.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que, no geral, os ésteres foram mais promissores que as benzamidas. O material de partida, o ácido 3,4,5,-trimetoxibenzoico foi inativo. Os derivados alquílicos com cadeias carbônicas medianas foram mais potentes que os derivados arílicos, exceto em relação ao trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**) e o 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (**11**). O composto **10** apresenta substituinte metoxila na posição *para* do anel aromático e foi o análogo que apresentou maior potência no presente estudo, com $IC_{50} = 46,21 \mu M$ (I.S.= 16,02). De fato, este composto foi 4,5 vezes mais potente e 6,5 vezes mais seletivo que carboplatina, o controle positivo utilizado no experimento, o qual é usado clinicamente frente a vários tipos de cânceres, como por exemplo: câncer de colo uterino, carcinoma pulmonar, cânceres ginecológicos, câncer de mama, entre outros (GARCES et al., 2013; AVELINO et al., 2015; DÍAZ-GUARDAMINO, 2018; MARQUES, 2019).

Comparando o composto **10** com o **11**, observa-se que a substituição da metoxila pela metila na posição *para* do anel resultada em menor potência citotóxica, mas há significativo aumento da seletividade, $IC_{50} = 68,69 \mu M$ (I.S.= 53,12), demonstrando assim seletividade 3 vezes maior que o composto **10**. Pode-se sugerir que radicais arílicos com substituintes metoxila ou metila na posição *para* conferem melhor perfil citotóxico para este tipo de tumor. Avaliando o resultado dos derivados alquílicos, pode-se observar que estes compostos foram inativos ou apresentaram baixa potência e evidencia-se que a redução do tamanho da cadeia carbônica apresentou resultados menos promissores para a atividade citotóxica em **6**, **5**, **4**, **3** e **2**.

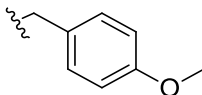
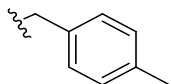
Em estudo realizado por Fan e colaboradores (2019) foram analisadas as propriedades citotóxicas da piplartina ($10 \mu M$) frente a células HepG2 e SMMC-7721 de carcinoma hepatocelular, foi observado que a piplartina apresentou efeitos promissores na busca por novos fármacos para este tipo de câncer.

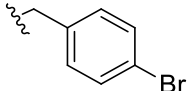
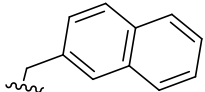
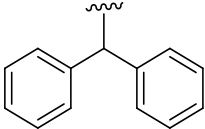
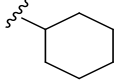
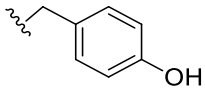
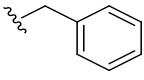
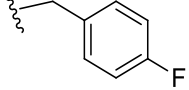
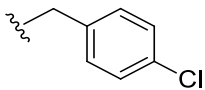
De acordo com Turkez e colaboradores (2019) que realizou os testes de um derivado da piplartina contra células cancerosas de glioblastoma, o composto em estudo apresentou resultados satisfatórios, e este apresenta similaridade estrutural com a amida *N*-(4-fluorobenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**18**) preparada no presente estudo. No entanto,

contra as células SCC9, o composto **18** foi inativo. Logo, pode-se sugerir que este composto deve ser testado frente a outros tipos de câncer.

Os resultados da citotoxicidade dos derivados do presente estudo corroboram os resultados obtidos por CHEN e colaboradores (2018) que analisaram a piplartina frente a células SAS e CGHNC8, classificadas como linhagens de células de câncer bucal, onde foi observado que a piplartina causou supressão da capacidade de formação de esfera tumoral das células cancerígenas orais testadas, supressão da expressão dos genes associados a células-tronco SOX2, Oct-4 e NANOG. Também inibiu a migração e invasão celular e regulou a expressão de moléculas associadas a transição epitelial-mesenquimal (EMT), e ainda aumentou a quimio e radiosensibilidade, como também causou inibição da tumorigênese in vitro e in vivo.

Tabela 16. Resultados da IC₅₀ dos compostos **1-8, 10, 11, 13-17 e 19-23** frente a células SCC9.

COMPOSTO	R	SCC9		FIBROBLASTO GENGIVAL PRIMÁRIO		I.S.
		IC ₅₀	D.P.	IC ₅₀	D.P.	
		μM (μg/mL)	μM (μg/mL)	μM (μg/mL)	μM (μg/mL)	
ÉSTERES						
1	-CH ₃	858,5 (194,21)	0,10 (0,022)	-	-	-
2	-CH ₂ CH ₃	N.D.	-	-	-	-
3	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	299 (76,03)	0,06 (0,015)	1256 (319,37)	0,04 (0,010)	4,20
4	-CH(CH ₃) ₂	373,1 (94,87)	0,05 (0,013)	1795 (456,43)	0,07 (0,018)	4,81
5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	204,2 (54,79)	0,07 (0,019)	510,4 (136,94)	0,04 (0,012)	2,50
6	-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	160,2 (45,23)	0,07 (0,2)	569,8 (160,87)	0,07 (0,2)	3,56
7	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	257,6 (72,73)	0,08 (0,02)	417,6 (117,9)	0,02 (0,0056)	1,62
8	-CH ₂ (CH ₂) ₇ CH ₂ CH ₃	954,9 (336,57)	0,18 (0,063)	-	-	-
10		46,21 (15,36)	0,16 (0,053)	740,6 (246,14)	0,03 (0,009)	16,02
11		68,69 (21,73)	0,02 (0,006)	3649 (1154)	0,04 (0,012)	53,12

13		N.D.	-	-	-	
14		309,9 (109,2)	0,04 (0,014)	3406 (1200,2)	0,06 (0,021)	3,78
15		829,8 (314,01)	0,26 (0,098)	-	-	-
AMIDAS						
16	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	468,8 (125,32)	0,07 (0,019)	2359 (630,61)	0,05 (0,013)	5,03
17	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	N.D.	-	-	-	-
19		N.D.	-	-	-	-
20		N.D.	-	-	-	-
21		N.D.	-	-	-	-
22		N.D.	-	-	-	-
23		N.D.	-	-	-	-
Ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico	H	N.D.	-	-	-	-
Carboplatina	-	208,4 (77,37)	0,05 (0,018)	512,3 (190,19)	0,02 (0,0074)	2,46

* Legenda: Resultados da IC₅₀ e índice de seletividade de coleções de ésteres e amidas derivadas do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico. SCC9 (células OSCC) e fibroblastos gengivais humanos normais foram tratados com os compostos indicados por 48 h. Mostrado da esquerda para a direita: nomenclatura composta, tumor SCC9 ou fibroblasto normal, IC₅₀ (μM), desvio padrão (D.P.) e índice de seletividade (I.S) de pelo menos três experimentos independentes. I.S. = IC₅₀ do composto em células de fibroblastos orais normais/IC₅₀ do mesmo composto para linhagem de câncer oral SCC9. D.P. = desvio padrão. N.D. = não determinado, não tóxico para células SCC.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.2. Seletividade

Para realizar uma caracterização da citotoxicidade dos compostos mais seletivos (S.I. > 4), foi utilizada uma outra linhagem celular de OSCC, a SCC4 (**Tabela 17**). Dos compostos testados, apenas **4** ($IC_{50} = 454,3 \pm 0,04$) e **10** ($IC_{50} = 49,81 \pm 0,3$) apresentaram efeitos citotóxicos em células SCC4. O derivado **10** apresentou atividade citotóxica mais potente que a carboplatina ($IC_{50} = 175,2 \pm 0,2$) nesta célula tumoral, corroborando com os resultados obtidos das células SCC9, e manteve a sua alta seletividade (S.I. = 15,42).

Tabela 17. Caracterização dos compostos mais seletivos em outras linhagens de OSCC.

Células tumorais orais						FIBROBLASTO GENGIVAL PRIMÁRIO		Average S.I.
COMPOSTO	SCC9		SCC4		Average	IC ₅₀	D.P.	
	IC ₅₀	D.P.	IC ₅₀	D.P.				
3	299,0	0,06	N.D.	N.D.	N.D.	1256	0,04	N.D.
4	373,1	0,05	454,3	0,04	375,6	1795	0,07	4,79
10	46,21	0,16	49,81	0,34	48,01	740,6	0,03	15,42
16	468,8	0,07	N.D.	N.D.	N.D.	2359	0,05	N.D.
CARBOPLATINA	208,4	0,05	175,2	0,15	191,8	512,3	0,02	2,67

*Legenda: A IC_{50} (μM) de duas linhagens de células OSCC diferentes (SCC9 e SCC4) e células fibroblásticas normais seguidas pela média do índice de seletividade dos compostos **3**, **4**, **10** e **16** foram calculados da mesma forma que na Tabela 11. Todos os valores são resultados de pelo menos três experimentos independentes.

Fonte: Elaborado pela autora.

O composto **10** ainda passou por outras avaliações de seletividade, foi testado frente células tumorais de linhagens de diferentes origens, sendo elas: B16-F10 (melanoma), HEP-G2 hepatocarcinoma), e HT-29 (adenocarcinoma de cólon) (**Tabela 18**).

De acordo com os resultados foi possível observar que para a linhagem celular B16-F10 o derivado apresentou baixa atividade. Enquanto para as linhagens HEP G2 e HT-29 estas células apresentaram extrema sensibilidade a este composto, com um $IC_{50} < 10 \mu M$ e S.I > 100.

Quando comparado a outras quimioterapias e com os novos compostos testados frente as células OSCC, demonstraram resultados de seletividade para os derivados testados significativamente altos (ZORZANELLI et al., 2018; CHIPOLINE et al., 2020; MACHADO et al., 2021; ZORZANELLI et al., 2022).

Quando se compara com os resultados obtidos no presente estudo com os casos já discutidos na literatura pode-se observar citotoxicidades semelhantes (IC_{50}) para piplartina e outros análogos contra vários tumores desta linhagem de células, mas nenhum apresentou maior seletividade do que os resultados exibidos pelo composto **10** (BEZERRA et al., 2007; JYOTHI et al., 2009; Da Nóbrega et al., 2018).

Tabela 18. Seletividade do composto **10**.

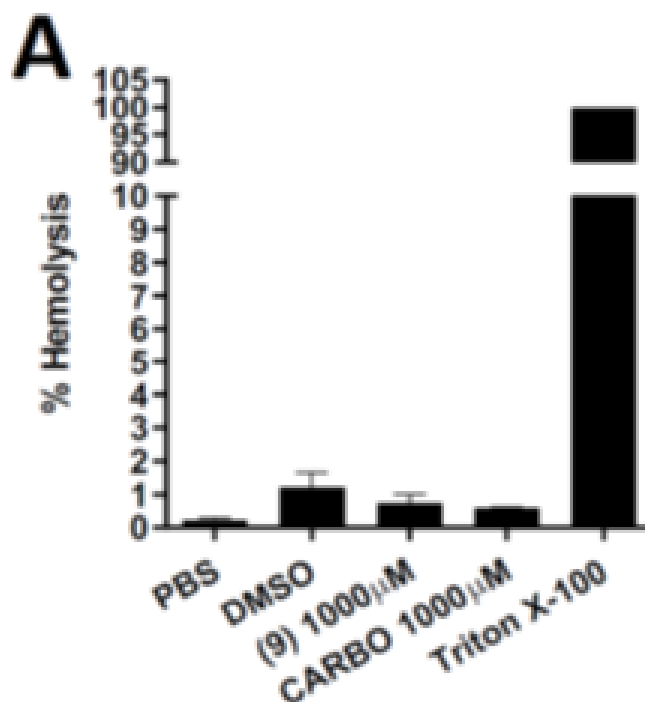
CÉLULAS TUMORAIS	COMPOSTO 10		
	IC_{50}	D.P	I.S.
B16-F10	73,29	0,06	10,10
HEP G2	6,63	0,15	111,7
HT-29	7,31	0,23	101,3

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.3. Atividade hemolítica

Foi avaliada a atividade hemolítica do composto **10**, visto que este apresentou maior efeito citotóxico frente as células cancerígenas e alta seletividade. Também foi avaliada tolerabilidade deste composto para futuros ensaios in vivo, descartando qualquer atividade do composto que poderia levar a citotoxicidade inespecífica por via celular danos à membrana por ensaios hemolíticos.

O composto **10** não exibiu nenhuma alteração significativa frente a atividade hemolítica (**Figura 11A**; inferior a 1%) em eritrócitos humanos, mesmo em uma concentração muito alta (1000 μ M); os níveis de hemólise foram comparáveis aos controles (carboplatina e DMSO) (BEZERRA et al., 2005).

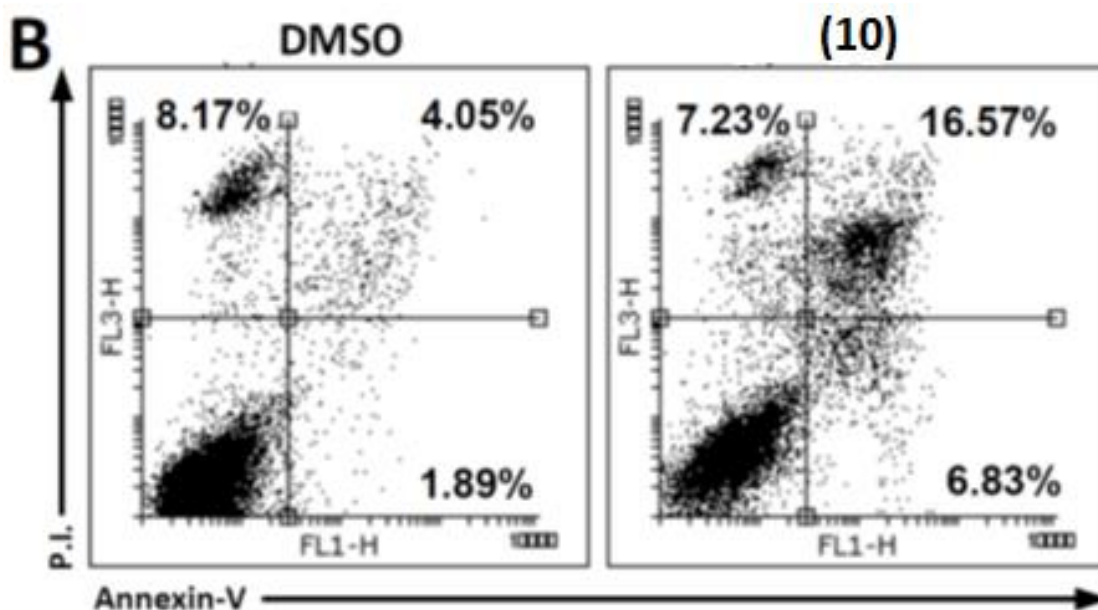
Figura 11. Atividade hemolítica do composto **10**.

* Legenda: **Figura 11.** (A) Atividade hemolítica dos compostos a 500 µM (aproximadamente $10 \times IC_{50}$). ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett foi realizada onde todas as colunas foram significativamente diferentes do controle (Triton X) com $p < 0,0001$. (A) Os resultados são representativos de dados de pelo menos três experimentos independentes.

4.5.4. Investigação da via de morte celular

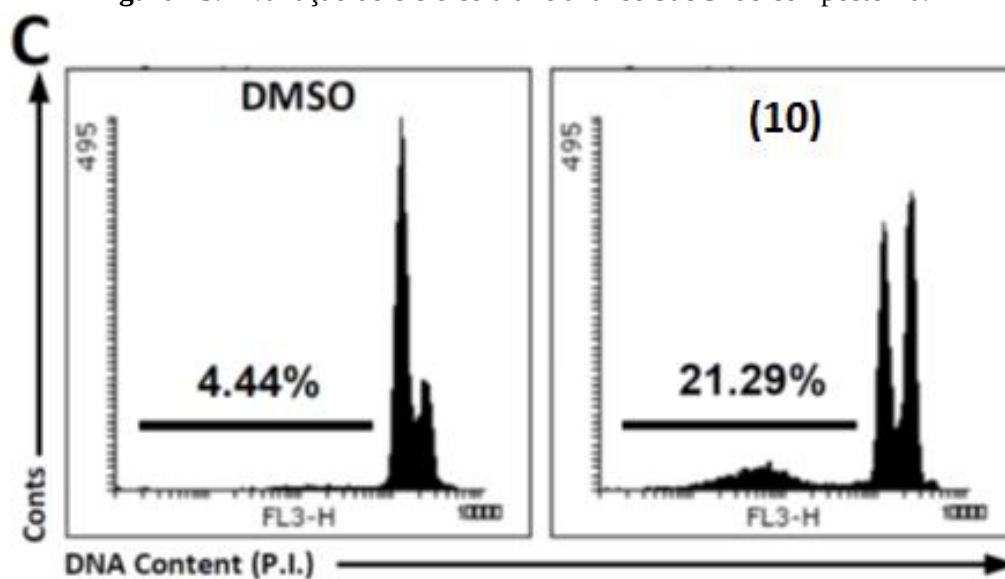
Para esclarecer a via de morte celular causada pelo composto **10**, foram utilizados ensaios de citometria de fluxo, avaliando os fenótipos apoptóticos (exposição à fosfatidilserina, fragmentação do DNA e ativação da caspase 3/7), como também distribuição do ciclo celular (**Figura 12**). Em relação aos resultados obtidos do derivado **10** foi possível observar um aumento de 4 vezes (~17% versus ~4% no controle) na marcação de anexina V simples e/ou duplo positivo (PI+) com o tratamento de 48h (**Figura 12**), indicando assim processo apoptótico quando comparado ao controle.

Figura 12. Avaliação a exposição à fosfatidilserina (apoptose) do composto **10**.

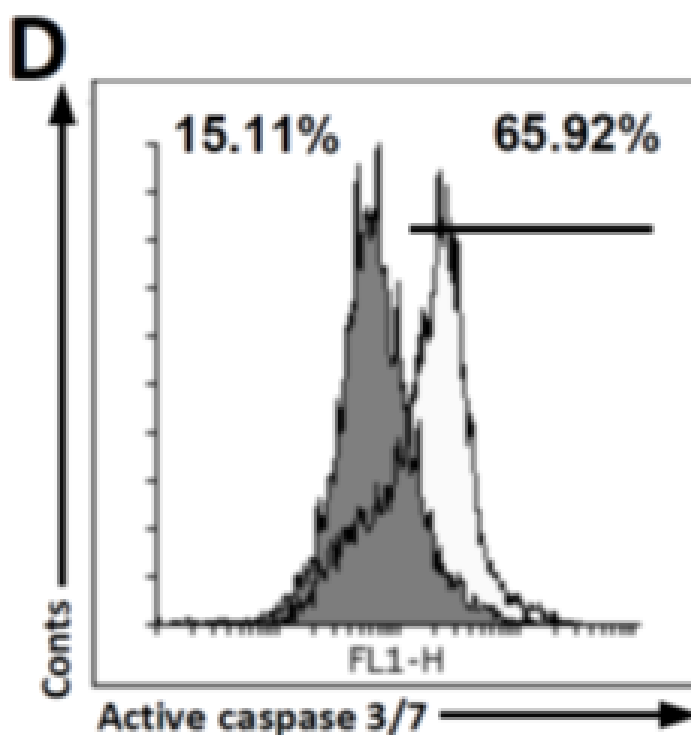


* Legenda: **Figura 12.** (B) Análise da exposição à fosfatidilserina 48 h após o revestimento. As células foram coradas com anexina-V conjugada com FITC e P.I. e foram analisados por citometria de fluxo. (B) Os resultados são representativos de dados de pelo menos três experimentos independentes.

O análogo **10** também foi capaz de induzir a fragmentação do DNA (~21%), conforme mostrado pelo aumento do conteúdo de DNA SubG1 (**Figura 13**) e uma ativação massiva de caspases executoras 3/7 (~66%; **Figura 14**) quando comparado ao controle (~4% SubG1 e ~15% caspases ativas), apresentando suportar um fenótipo apoptótico clássico. Dessa forma, analisando os resultados obtidos pode-se sugerir que o composto **10** causa indução de uma via clássica de morte celular apoptótica.

Figura 13. Avaliação do ciclo celular e análise SubG1 do composto **10**.

* Legenda: **Figura 13.** (C) Análise da morte celular por coloração com iodeto de propídio (PI). Após 48 h de tratamento, as células foram tripsinizadas e coradas com iodeto de propídio na presença de NP-40. A porcentagem de morte celular (conteúdo de DNA SubG0) é indicada. (C) Os resultados são representativos de dados de pelo menos três experimentos independentes.

Figura 14. Avaliação da ativação de caspases do composto **10**.

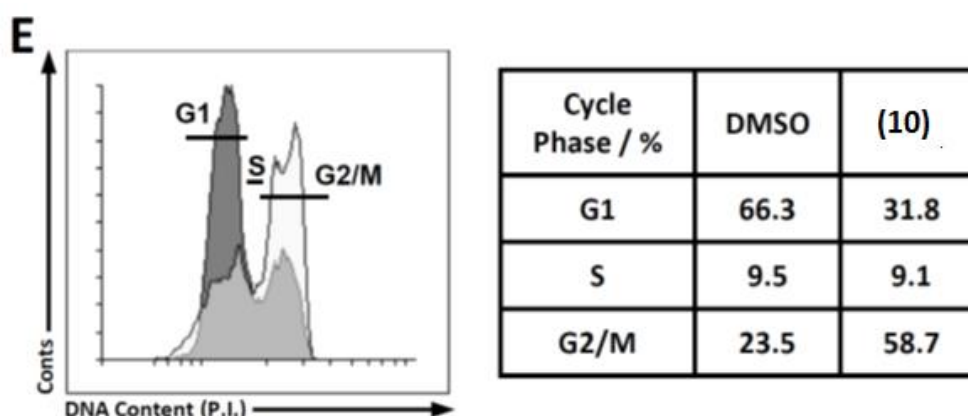
* Legenda: **Figura 14.** (D) Dados de citometria de fluxo representativos da atividade da caspase 3/7. Células SCC9 foram tratadas com o equivalente a $2 \times IC_{50}$ do composto 10, e DMSO foi usado como controle por 48 h de

tratamento. A atividade da caspase 3/7 das células aumentou significativamente no tratamento 10 em comparação com o controle. (D) Os resultados são representativos de dados de pelo menos três experimentos independentes.

Outro fator relevante para o estudo é que após o tratamento com o composto **10** ocorreu um aumento substancial no número de células exibindo uma quantidade de DNA G2/M em comparação com o controle de DMSO (**Figura 15**: ~59% comparado a ~23%, respectivamente).

Avaliando o conjunto de resultados obtidos evidencia-se que **10** apresenta alta citotoxicidade e seletividade contra diferentes tipos de tumores, provavelmente por indução do ciclo celular parando na fase G2/M e intensificação da indução de morte celular por apoptose.

Figura 15. Avaliação do ciclo celular e análise SubG1 do composto **10**.



* Legenda: **Figura 15.** (E) Diferenças na distribuição do ciclo celular. A distribuição do ciclo celular foi analisada após coloração com iodeto de propídio e análises FACS. As células da linhagem SCC9 foram semeadas em uma placa de seis poços (5×10^5 células/poço). As fases G1, S e G2 do ciclo celular foram classificadas com base no conteúdo de DNA após coloração com iodeto de propídio (PI). (E) Os resultados são representativos de dados de pelo menos três experimentos independentes.

Os resultados do derivado **10** corroboram com os resultados obtidos em pesquisas utilizando a piplartina, a qual não revelou atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos, sugerindo que a citotoxicidade dessa classe de compostos não envolve danos à membrana (BEZERRA et al., 2005). Com base nos ensaios da via de morte celular, o composto **10** provavelmente está envolvido em processos apoptóticos.

O análogo **10** foi capaz de induzir a fragmentação do DNA. Um fenótipo apoptótico semelhante foi observado em estudo utilizando a piplartina frente a células PC-3 (célula de

câncer prostático), foi observado um acúmulo de DNA fragmentado (SubG1) e ativação da caspase 3 (KONG et al., 2008). A parada do ciclo celular na fase G2/M causa um atraso na proliferação celular (HUANG et al., 2018;). Essa parada em G2/M foi observada em células PC-3 e V79 (células de mamíferos) tratadas com piplartina (KONG et al., 2008; BEZERRA et al 2008).

4.6. Estudo de modelagem molecular

Estudos de modelagem molecular foram realizados com o objetivo principal de identificar prováveis alvos moleculares do composto **10** que poderiam explicar sua atividade antitumoral. A predição consensual de alvos encontrou 453 alvos potenciais para o composto **10** em *Homo sapiens*. No entanto, o interesse era em alvos relacionados ao câncer. Portanto, foram selecionados para análise posterior 100 candidatos a proteínas (cerca de 22% do total). Destas 100 proteínas, ACHE, AHR, PTPN1, PPARA e THRA são genes condutores de acordo com o banco de dados DriverDBv3 (classificado nas posições 5, 10, 53, 63 e 88, respectivamente). Apenas o gene MCL1 (na posição 57 no ranking) foi classificado como alvo do câncer no banco de dados CTD2. A rede de interação proteína-proteína com interações diretas construídas do 89 CTD2 alvos levaram a 2355 proteínas. Dessas proteínas, MTNR1B, RELA, AHR, NR2F2, MMP2, RIPK2, DUSP3, CASP9, MMP9, PDE4D, RAC1, PTPN7, PTPN1, HDAC6, PDGFRA, MCL1, PPARG, PPARA, PPARG, IMPDH2, PRKCE, CDC42, DNMT1, CYP17A1, NR2E3, THRA, CYP1A2, PTPN2 e HSD17B1 também estiveram presentes na predição do consenso das posições: 6, 7, 10, 18, 22, 23, 27, 31, 38, 41, 42, 51, 52, 54, 55, 57, 63, 66, 68, 71, 74, 76, 78, 79, 81, 88, 89, 96 e 98, respectivamente. Considerando os achados mais relevantes, os possíveis alvos selecionados para outros modelos computacionais foram: AHR, ACHE, THRA, PTPN1, PPARA, MTNR1B, RELA, NR2F2, MMP2, RIPK2, DUSP3, CASP9 e MCL1.

Genes condutores podem ter regulação negativa, positiva ou ambígua em relação à tumorigênese ou proliferação celular, sendo necessárias análises individuais. A inibição de PTPN1 tem sido ambíguo na tumorigênese (atuando como regulador positivo ou negativo) (BOLLU et al., 2017; NUNES-XAVIER et al., 2019; XU et al., 2019).

A situação semelhante foi encontrada para o PPARA. Além disso, THRA (receptor de hormônio tireoidiano alfa) foi estudado em câncer de tireóide, mama e ovário. No entanto, o efeito protetor resultante de sua inibição direta não é tão claro quanto para o receptor tipo beta.

Por outro lado, ACHE e CASP9 têm um efeito protetor contra progressão de tumor. Portanto, essas proteínas não foram selecionadas para posterior modelagem (TAN et., 1995; HAKEN et al., 1998; DAVIDSON et al., 2021; XI et al., 2015; HEUBLEIN et al., 2015; SHINDERMAN-MAMAN et al., 2017).

A **tabela 19** apresenta os alvos potenciais do composto **10** que foram selecionados a partir do análises computacionais de pesca de alvo e da literatura científica que poderia explicar sua atividade antitumoral. A tabela inclui o acesso UniProt de cada destino, os Ids empregados ao longo do manuscrito, uma breve descrição funcional e a origem da estrutura empregada para modelagem. As estruturas dos receptores foram obtidas principalmente de banco de dados Protein Data Bank (PDB), com exceção de STAT3 e AHR. Dentro do estojo de AHR, nenhuma estrutura estava disponível, e um modelo de homologia foi gerado. Por outro lado, havia estruturas de raios-X depositadas no PDB para STAT3, mas estas carecem de um importante segmento na região C-terminal, sendo este importante para a ligação do ligante. Por este motivo, o modelo AlphaFold foi selecionado para modelar STAT3.

Tabela 19. Potenciais alvos moleculares do composto **10**.

Acesso UniProt	ID Alvo ^(a)	Descrição	Fonte ^(b)
P40763 ^(c)	STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3	AlphaFold
P19838 ^(c)	NFKB	Fator Nuclear NF-kappa-B subunidade p105	PDB (1SVC)
O14980 ^(c)	CRM1	Exportina-1	PDB (6TVO)
P42336 ^(c)	PI3K	4,5-Bisfosfatidilinositol-3-cinase (isoforma alfa)	PDB (4JPS)
P42345 ^(c)	MTOR	Serina/treonina-proteína cinase mTOR	PDB (4JSP)
P09211 ^(c)	GSTP1	Glutathione S-transferase P	PDB (5J41)
P35869 ^(d)	AHR	Receptor de hidrocarboneto arílico	SwissModel
P49286 ^(d)	MTNR1B	Receptor de melatonina tipo 1B	PDB (6ME6)
Q04206 ^(d)	RELA	Fator de transcrição p65	PDB (3GUT)
P08253 ^(d)	MMP2	Colagenase tipo IV 72 kDa	PDB (1HOV)
O43353 ^(d)	RIPK2	Serina/treonina cinase 2 de interação com receptores	PDB (5J79)
O43353 ^(d)	DUSP3	Serina/treonina cinase 2 de interação com receptores	PDB (3F81)
Q07820 ^(d)	MCL1	Proteína de diferenciação celular de leucemia mielóide induzida Mcl-1	PDB (6UDV)

*Legenda: (a) ID usado para o alvo ao longo do manuscrito. (b) Fonte da estrutura do receptor empregada para estudos de modelagem. (c) Proteína selecionada a partir do levantamento da literatura científica. (d) Proteína derivada da abordagem computacional de pesca ao alvo.

Os resultados de todos os cálculos de ancoragem estão dispostos na **tabela 20**. Foram investigados no total 13 alvos que levaram a 33 complexos ligante-receptor a serem mais analisados. Em todos os casos, esses 33 complexos mostraram o composto dentro de locais de ligação. Os pontos mais fracos dos algoritmos da modelagem molecular são as grandes aproximações que requer funções de pontuação e exploração limitada da estrutura conformacional do complexo espaço. Uma das alternativas para superar essas limitações é o pós-processamento de docking soluções com métodos mais precisos e computacionalmente intensivos baseados em Molecular Dynamics (MD) simulações.

Tabela 20. Resultados do estudo da modelagem molecular do composto **10** aos seus alvos potenciais.

Alvos	Pose	PLP ^(a)	Z_PLP ^(b)	GS ^(c)	Z_GS ^(d)	CS ^(e)	Z_CS ^(f)	ASP ^(g)	Z_ASP ^(h)	Aggregated Z-score
STAT3	1	57.3	0.81	30.87	1.26	21.98	1.43	28.65	2.02	1.38
	2	57.29	0.81	26.19	0.76	23.89	2.01	27.81	1.76	1.33
	3	58.46	1.23	34.51	1.65	20.2	0.88	24.59	0.76	1.13
NFKB	1	55.94	1.32	17.32	0.84	17.94	1.48	27.24	0.92	1.14
	2	57.85	1.66	14.27	0.66	15.57	0.61	30.48	1.48	1.1
	3	58.24	1.72	-2.85	-0.34	18.22	1.58	29.51	1.31	1.07
CRM1	1	68.92	1.96	22.79	0.36	29.78	2.31	35.11	1.97	1.65
	2	68.39	1.82	25.61	0.54	27.96	1.45	34.06	1.6	1.35
	3	69.87	2.2	11.89	-0.31	27.24	1.1	34.74	1.84	1.21
PI3K	1	68.72	2.12	34.86	1.79	25.67	0.96	40.61	1.8	1.67
	2	67.41	1.79	12.13	-0.78	28.34	2.55	37.87	0.94	1.13
	3	67.45	1.8	19.67	0.07	25.67	0.96	39.27	1.38	1.05
MTOR	4	65.72	1.37	23.83	0.54	26.88	1.68	36.65	0.55	1.03
	1	69.98	1.32	13.42	0.27	29.91	1.64	33.3	0.49	0.93
	1	41.12	2.17	-231.46	0.46	0.09	1.89	11.14	2.87	1.85
GSTP1	2	35.28	1.08	-223.56	1.13	-0.94	1.52	4.74	1.11	1.21
	1	64.38	2.69	-14.28	1.15	18.09	1.69	28.46	1.93	1.87
	2	58.6	1.98	5.49	1.73	9.06	0.46	26.16	1.61	1.45
AHR	3	46.37	0.48	-42.14	0.34	21.61	2.16	28.27	1.91	1.22
	4	53.98	1.41	-43.4	0.3	17.96	1.67	23.13	1.19	1.14
MTNR1B	1	61.17	2.38	26.62	1.06	22.84	1.93	31.37	1.42	1.7
	2	54.57	0.84	29.87	1.15	22.55	1.85	30.38	1.2	1.26
	1	52.18	1.48	21.35	0.63	19.11	2.12	24.24	0.28	1.13
RELA	1	77.9	2.88	6.34	0.68	22.18	2.46	23.78	0.72	1.69
	2	66.64	1.41	-2.93	0.21	18.74	1.48	30.88	2.01	1.28
	3	62.99	0.93	9.88	0.85	20	1.84	22.76	0.53	1.04
RIPK2	1	58.05	1.56	20.9	0.8	24.15	1.06	27.18	1.11	1.13
	2	58.71	1.76	12.6	0.34	25.53	1.52	25.97	0.75	1.09
	3	54.81	0.54	24.24	0.99	23.09	0.71	29.8	1.88	1.03
DUSP3	1	51.3	0.55	11.86	0.77	15.38	0.89	28.74	1.23	0.86
	1	68.86	2.43	23.09	0.65	28.91	2.63	34.06	1.5	1.8
	2	68.05	2.24	19.85	0.53	26.23	1.51	35.59	1.98	1.56
MCL1	3	64.29	1.37	10.84	0.18	28.09	2.29	30.98	0.54	1.09

*Legenda: ^(a) PLP score. ^(b) PLP Z-score. ^(c) GoldScore score. ^(d) GoldScore Z-score. ^(e) ChemScore score. ^(f) ChemScore Z-score. ^(g) ASP score. ^(h) ASP Z-score.

Métodos baseados em MD têm ajudado na identificação de alvos moleculares de compostos bioativos. Enquanto a estimativa de energia livre de ligação de trajetórias MD são eficazes em discriminar entre posições corretas ou não de ligação do ligante. De acordo com

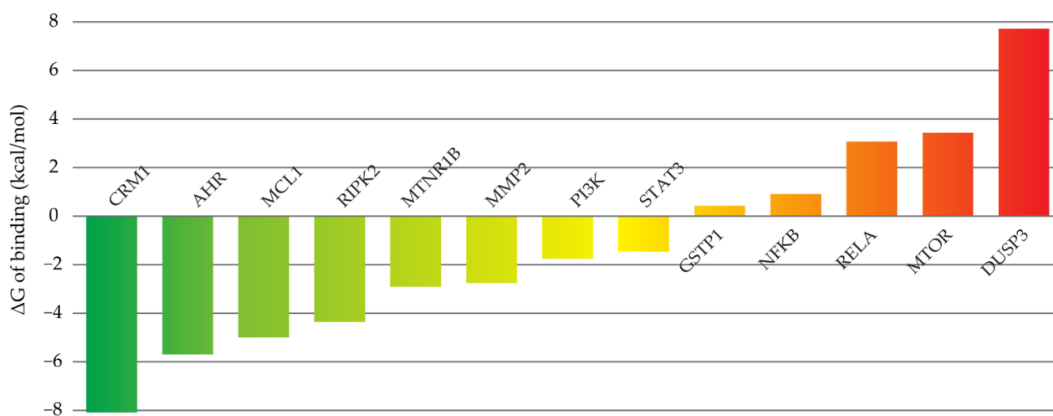
essas evidências, a seleção final dos alvos mais prováveis do composto **10** foi realizado usando o protocolo de simulações MD apresentados na Parte experimental (WANG et al., 2001; KATSILA et al., 2016; GUTERRES et al., 2020).

O comprimento das simulações MD necessárias para prever a energia livre de ligação de um ligante a uma proteína é um tema bastante discutido na literatura científica. Normalmente, a duração das simulações MD está diretamente relacionada aos recursos de hardware disponíveis. Além disso, não há consenso sobre a duração ideal das simulações de MD necessárias para obter um conjunto conformacional de para cálculos MM-PBSA. Diferentes autores concluíram que simulações curtas (menos de 5 ns) seriam suficientes para cálculos MM-PBSA (WANG et al., 2019; POLI et al., 2020).

Outro aspecto considerado na literatura é que em simulações MD curtas são usadas para cálculos MM-PBSA, onde uma abordagem de múltiplas trajetórias é preferível a uma única trajetória. Assim, realizamos cinco simulações MD curtas por complexo, cada uma com duração de 4 ns, e as energias livres de ligação foram estimadas a partir de um conjunto de 100 instantâneos MD extraídos uniformemente de todas as cinco trajetórias. Com essa abordagem, o tempo total de simulação de MD realizado, na pesquisa atual foi realizado o de 660 ns.

A estabilidade conformacional dos complexos durante as simulações de MD foi medida como o RMSD do ligante em relação à pose de encaixe inicial ao longo de cada uma das simulações de MD de 5 ns. No geral, na maioria das simulações, o ligante desviou menos ou cerca de 2 Å da pose de encaixe inicial durante o tempo de simulação MD de 4 ns. Em nenhum caso os valores de RMSD observados aumentaram além de 3 Å. Isso indicando estabilidade conformacional para as trajetórias MD obtidas. Assim como, as diferenças nos gráficos RMSD obtidos para um alvo sugerem que um complexo explora diferentes espaços conformacionais durante cada réplica MD.

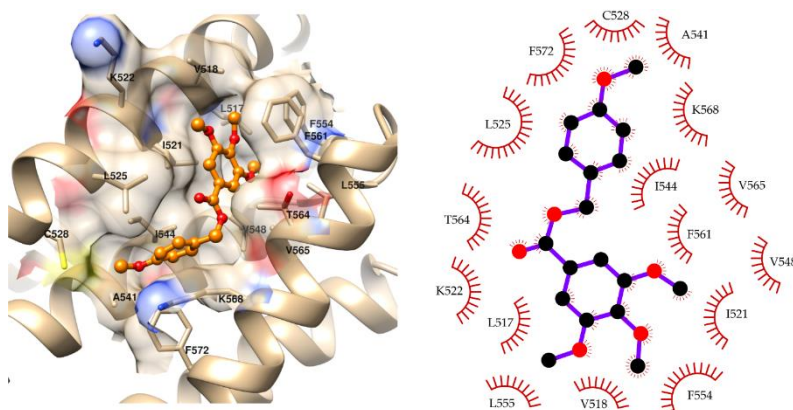
As energias livres de ligação previstas obtidas a partir das simulações de MD são fornecidas como apresentados na **Figura 16**. Somente o confôrmere de ligante com pontuação mais alta por alvo é representado na figura. De acordo com esses resultados, pode-se concluir que o alvo mais provável do composto é CRM1, seguido por AHR, MCL1 e RIPK2. Isto sugere um mecanismo de ação multialvo para a atividade antitumoral do composto, com CRM1 como o principal receptor para o composto **10**. Consequentemente, o modo de ligação previsto do ligante ao CRM1 foi analisado em detalhes.

Figura 16. Energias livres previstas de ligação do composto **10** aos seus alvos de ligação.

*As barras indicam o erro estimado das energias livres de ligação.

A **Figura 17** representa a pose prevista do composto **10** na cavidade de ligação do CRM1, bem como as interações ligante-receptor. A estrutura complexa selecionada para representação foi o centróide do cluster mais populoso obtido do agrupamento dos instantâneos MD usados para cálculos de MM-PBSA. Segundo a predição o ligante realizou ligação no conhecido sulco com característica hidrofóbica de CRM1, sendo este responsável pelo reconhecimento dos sinais de exportação nuclear em proteínas de carga (SHAIKHQASEM et al., 2020). Entre as 21 repetições HEAT que formam o CRM1, a fenda de ligação dos inibidores estava na interface das repetições 11 e 12.

Especificamente, o metoxi do grupo *para*-metoxifenil foi previsto para se orientar em direção a C528. Este é um resíduo chave que está envolvido na ligação covalente de muitos inibidores CRM1 conhecidos. No entanto, inibidores não covalentes desta proteína também foram relatados (ETCHIN ET AL., 2012; LEI et al., 2021; SHAIKHQASEM et al., 2020). De acordo com a predição o restante deste anel realiza interação com L525, A541, I544, K568 e F572. O ligante central do composto interage com L525, T564 e V565. Por outro lado, prevê-se que a fração trimetoxifenil ocupe uma cavidade revestida por L517, V518, I521, V548, F554, L555 e F561, posicionando-se favoravelmente para formar interações de empilhamento π - π com F561.

Figura 17. Modo de ligação previsto e interações ligante-receptor para o complexo composto 9-CRM1.

*Legenda: O ligante é representado como bolas e bastões laranja. O receptor e sua superfície são coloridos como carbono: bege, nitrogênio: azul, oxigênio: vermelho e enxofre: amarelo. A figura foi produzida com UCSF Chimera e LigPlot+ (LASKOWSKI et al., 2011; PETTERSEN et al., 2021).

Os resultados da modelagem obtidos no presente trabalho apresentaram consistência com a atividade antitumoral observada do composto **10**. CRM1 é um alvo molecular validado para compostos anticancerígenos. Essa proteína geralmente é superexpressa no câncer e é classificada como um driver oncogênico. Especificamente, a piplartina demonstrou ser um inibidor de CRM1 com propriedades antitumorais. A interação predita para o derivado **10** com C528 está de acordo com a interação direta observada anteriormente da piplartina com este aminoácido no CRM1 (DICKMANN et al., 2015; NIU et al., 2015; AZIZIAN et al., 2020; FERREIRA et al., 2020). Os modelos descritos neste estudo ajudarão a direcionar pesquisas futuras com foco na melhoria das propriedades antitumorais e inibitórias de CRM1 dos derivados de piplartina.

4.6.1. Predições ADMET

Por fim, as propriedades ADMET do composto **10** foram previstas conforme está descrito na Parte experimental. Os resultados dessas predições são apresentados na **Tabela 21** demonstrando que o composto **10** não contém alerta PAINS. Assim como possui propriedades físico-químicas que são favoráveis para biodisponibilidade oral. Foi previsto também que o análogo **10** seja solúvel em água com alta absorção gastrointestinal, permeável à pele e não seja um substrato da P-gp. Segundo a predição desta molécula, a mesma apresenta baixa distribuição no cérebro e age inibindo três isoformas do citocromo P450. Este último aspecto, juntamente com seu potencial mutagênico previsto, deve ser totalmente esclarecido com experimentos adicionais durante a fase de otimização de hit deste composto.

Tabela 21. Predição ADMET para o composto **10**.

Parâmetros	Composto 10
Propriedades físico-químicas	
Massa molecular (g/mol)	332.35
Ligações rotativas	8
Aceptores de ligação de hidrogênio	6
Doadores de ligação de hidrogênio	0
Fração C - sp ³	0.28
TPSA (A3)	63.22
Lipofilicidade (Log Po/w)	
iLOGP	3.64
XLOGP3	3.15
MLOGP	2.1
Consensus	3.06
Absorção	
Solubilidade em água (log mol/L)	-4.88
Absorção gastrointestinal (%)	97.58
Log Kp (permeabilidade da pele) cm/s	-2.74
Gp-P substrato	No
Distribuição	
Permeabilidade na barreira hematoencefálica (log(BB))	-0.124
Permeabilidade CNS (Log PS)	-3.02
VD (humano) (log L/kg)	-0.425
Metabolismo	
Inibidor CYP1A2	SIM
Inibidor CYP2C9	NÃO
Inibidor CYP2C19	SIM
Inibidor CYP3A4	SIM
Inibidor CYP2D6	NÃO

Excreção	
Clearance Total (log(mL/min/kg))	0.59
Substrato Renal OCT2	NÃO
Toxicidade	
Toxicidade AMES	SIM
Dose máxima tolerada (humano, log(mg/kg/dia))	1.44
Inibidor de hERG I	NÃO
Inibidor de hERG II	NÃO
Toxicidade aguda oral em rato (LD ₅₀ , mol/kg)	2.34
Toxicidade crônica em rato (LOAEL, log(mg/kg/dia))	1.53
Hepatotoxicidade	NÃO
Sensibilidade cutânea	NÃO

5.0. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram preparados vinte e três compostos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico estruturalmente relacionados via várias metodologias sintéticas, sendo nove inéditos. Na análise dos resultados obtidos da atividade citotóxica frente as células SCC9, três dos derivados testados apresentaram potência superior ao controle positivo, a carboplatina, assim como também foram mais seletivos. Os análogos **10** e **11** apresentaram menor IC₅₀ para esta atividade e alto índice de seletividade de 16,0 e 53,1, respectivamente. O estudo de modelagem molecular do composto **10**, sugeriu que o alvo mais provável deste derivado foi o CRM1, seguido por AHR, MCL1 e RIPK2, sugerindo um potencial mecanismo de ação multialvo para sua atividade antitumoral, corroborando os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade.

Em relação a triagem antiparasitária da coleção de análogos preparados, foram selecionados e avaliados os compostos **15-18** e **20** frente as formas tripomastigota, epimastigota e amastigota do *T. cruzi*. Dos compostos testados, todos apresentaram maior potência que o controle positivo, o benznidazol, assim como maior seletividade. De acordo com a modelagem molecular do composto **17**, sugere-se que o principal alvo deste derivado seria o HDAC. Foi proposto que o análogo **17** pode interagir favoravelmente com HDCA por empilhamento π - π , interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, potencialmente explicando o efeito inibitório desta molécula frente as formas evolutivas do *T. cruzi*.

Os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para futuras pesquisas de desenvolvimento de produtos com potencial bioatividade antitumoral e antiparasitária.

6.0. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiais e métodos utilizados

A etapa química foi realizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (DCF/CCS/UFPB). Os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos foram adquiridos das empresas Sigma Aldrich, Neon, Dinâmica, Qhemis, entre outras. Todos apresentavam alto grau de pureza.

6.1.2. Métodos cromatográficos

O monitoramento das reações foi realizado por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando cromatofolhas com sílica gel 60 F₂₅₄ suportada em placa de alumínio MERCK (fase estacionária). A fase móvel foi composta por misturas binárias de hexano e acetato de etila em diferentes proporções. A visualização das placas cromatográficas se deu por exposição das placas à lâmpada de irradiação ultravioleta com dois comprimentos de onda (254 e 356 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58 e utilização de revelador químico a base de ácido sulfúrico a 5% em álcool etílico.

Quando necessária, a purificação dos compostos foi realizada utilizando cromatografia de adsorção em coluna (CC), utilizando como fase estacionária, sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm, em colunas de vidro cilíndricas como suporte. A fase móvel constituiu-se de uma mistura entre hexano e acetato de etila com proporções variáveis.

6.1.3. Análise instrumental

6.1.3.1. Ressonância Magnética Nuclear

Os derivados foram caracterizados e identificados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze (RMN de ¹³C) unidimensional. Os espectros foram obtidos em espectrômetros AscenedTM – Bruker operando a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C) e o Varian-RMN-System operando à 500 MHz (¹H) e 125 MHz (¹³C). Essa análise foi realizada no LMCA/ Laboratório Multiusuário de caracterização e Análise/UFPB).

O solvente usado na dissolução das amostras foi clorofórmio deuterado (CDCl₃) e para os derivados **19** e **20** foi utilizado o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), MERCK. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de

acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades das bandas de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (duplete), *dl* (duplete largo), *dd* (duplo duplete), *dt* (dublete de tripleto), *ddd* (duplo duplo duplete), *t* (tripleto), *tl* (tripleto largo), *td* (tripleto de dublete), *q* (quarteto), *quint* (quinteto), *sext* (sexteto), *sept* (septeto), *m* (multiplete).

Para os espectros de RMN de ^{13}C foi utilizada a técnica de APT em que os carbonos quaternários e metilênicos ficam na face positiva do gráfico (sinais voltados pra cima) e os sinais de carbonos metínicos e metílicos ficam na face negativa do gráfico (sinais voltados para baixo)

6.1.3.2. Espectroscopia de Infravermelho

Para o infravermelho (IV) os dados espectrais na região foram obtidos em aparelho de Cary 630 FTIR Agilent technologies e uma faixa espectral na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, do Laboratório de Analítico de Multiusuário do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde da UFPB, utilizando de 1,0 mg de amostra em 15,00 mg pastilhas de KBr, com frequência medida em cm^{-1} .

6.1.3.3. Espectrometria de Massas de Alta resolução

Os espectros de Massas de Alta Resolução foram obtidos no Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO) do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFRJ). O espectrômetro utilizado foi Solarix XR – configuração FT-ICR (Bruker), com calibração externa com formiato de sódio 100 μM em água/acetonitrila 1:1 e fonte de ionização do tipo electrospray (ESI – pressão do nebulizador: 1 bar, 4.0 L/min, à temperatura de 200°C , fluxo de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$), modo de ionização positivo, janela de detecção de 75 a 1200 m/z . Resolução teórica: 99000 para m/z 400. As amostras foram solubilizadas em 1 mL de metanol e então diluídas 1000x em água:acetonitrila 1:1 e injetadas diretamente no espectrômetro de massas.

6.1.4. Ponto de Fusão

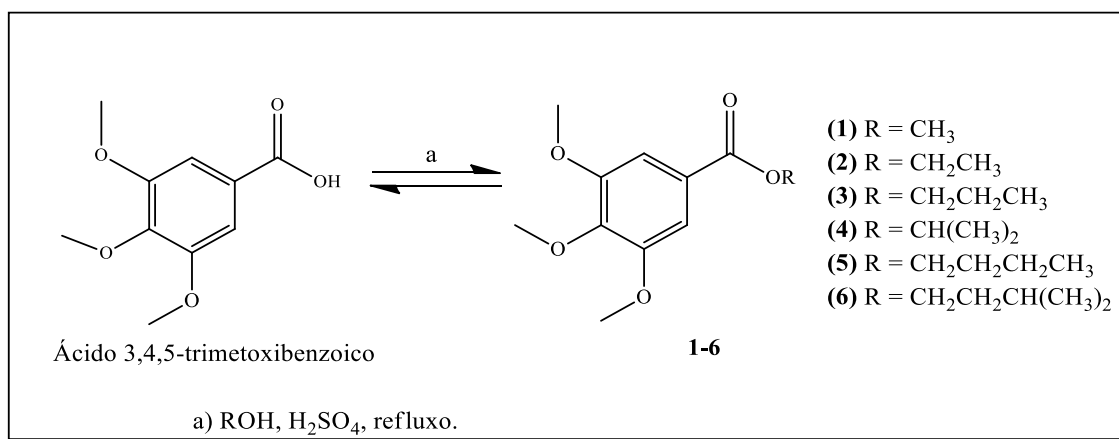
Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho da Microquímica Equipamentos (Modelo MQAPF), nº de série 403/18.

6.2. Preparação dos compostos 1-23

Os derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico foram obtidos por quatro metodologias de síntese: esterificação de Fischer (**1-6**); reação do tipo S_N2 com haleto alquílico (**7-10,13-15**), reação de Mitsunobu (**11 e 12**); e reação de amidação utilizado agente de acoplamento, (**16-23**).

6.2.1. Metodologia de obtenção dos derivados da 3,4,5-trimetoxibenzoatos 1-6.

Esquema 11. Esquema geral da esterificação de Fischer utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcool alifático.

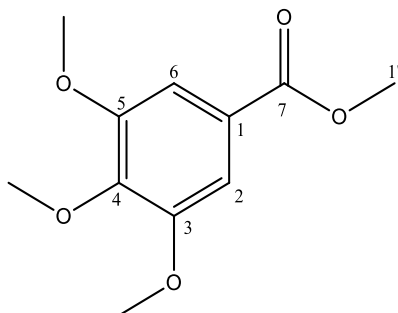


Fonte – Elaborados pela autora.

Em uma solução contendo o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (0,1 g; 0,47 mmol) em 20 mL do álcool alifático, adicionou-se 0,2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. A reação foi conduzida sob refluxo, com agitação magnética, durante 5-24 horas, e monitorada através de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA). Após rotaevaporação do álcool, adicionou-se 15 mL de água e fez-se a extração com diclorometano (3 x 10 mL). A fase orgânica foi neutralizada com 3 x 10 mL de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$ 5%) e com água destilada (10 mL), seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada. Para os ésteres **4** e **6** houve purificação por coluna cromatográfica em sílica gel 60, utilizando hexano e acetato de etila (6:4 e 95:05, Hex:AcOEt) como eluente (CAVALCANTE et al., 2016).

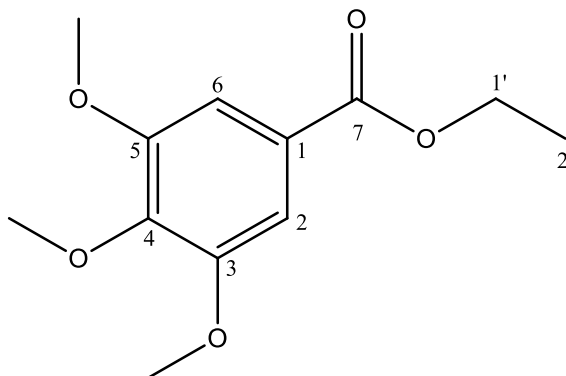
6.2.2. Dados espectroscópicos de 1–6

6.2.2.1. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de metila (1)



Sólido cristalino branco; rendimento 94,9% (101,2 mg; 0,44 mmol); PF.: 81–83 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,46$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3021 (C-H sp^2 aromático), 2953 (C-H sp^3); 1716 (C=O, éster), 1674 (anel tetrassubstituído), 1592 e 1467 (C=C aromático), 1338 e 1132 (C-O, éster), 1229 e 992 (C-O, éter arílico), 863 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29 (*s*, 2H, H-2, H-6); 3,89 (*s*, 12H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,59 (C=O); 152,85 (C-3, C-5); 142,34 (C-4); 125,26 (C-1); 106,86 (C-2, C-6); 60,89 (4-MeO); 56,23 (3-MeO, 5-MeO); 52,19 (C-1') (GREEN et al., 2015).

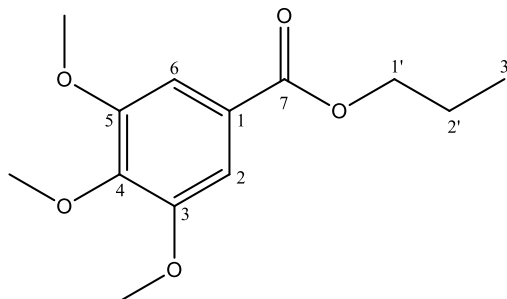
6.2.2.2. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de etila (2)



Sólido branco; rendimento 94,6% (107,1 mg; 0,44 mmol); PF.: 53–54 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,52$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3014 (C-H sp^2 aromático), 2964 (C-H sp^3), 1706 (C=O, éster), 1664 (anel tetrassubstituído), 1591 e 1456 (C=C aromático), 1332 e 1132 (C-O, éster), 1228 e 1042 (C-O, éter arílico), 863 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29 (*s*, 2H, H-2, H-6); 4,39 (*q*, $J = 7,1$ Hz, 2H, H-1'); 3,90 (*s*, 6H, 3-MeO, 5-MeO);

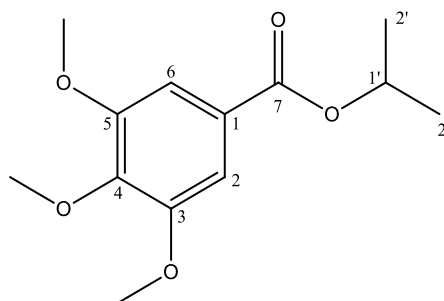
3,89 (*s*, 3H, 4-MeO); 1,39 (*t*, $J = 7,1$ Hz, 3H, H-2'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,25 (C=O); 152,91 (C-3, C-5), 142,09 (C-4); 125,54 (C-1); 106,77 (C-2, C-6); 61,13 (C-1'); 60,91 (4-MeO); 56,24 (3-MeO, 5-MeO), 14,42 (C-2') (NÓBREGA et al., 2018).

6.2.2.3. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de propila (3)



Sólido cristalino branco; rendimento 99,1% (118,8 mg; 0,46 mmol); PF.: 34-35 °C; TLC (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,56$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3114 (C-H sp^2 aromático), 2964 (C-H sp^3), 1706 (C=O, éster), 1664 (anel tetrassubstituído), 1590 e 1459 (C=C aromático), 1333 e 1124 (C-O, éster), 1227 e 1008 C-O, éter arílico), 858 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,30 (*s*, 2H, H-2, H-6); 4,27 (*t*, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-1'); 3,93 (*s*, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); 1,79 (*sext*, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-2'); 1,02 (*t*, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-3'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,14 (C=O); 152,66 (C-3, C-5); 142,06 (C-4), 125,46 (C-1); 106,67 (C-2, C-6); 66,64 (C-1'); 60,95 (4-MeO); 56,18 (3-MeO, 5-MeO); 22,05 (C-2'); 10,44 (C-3') (GREEN et al., 2015).

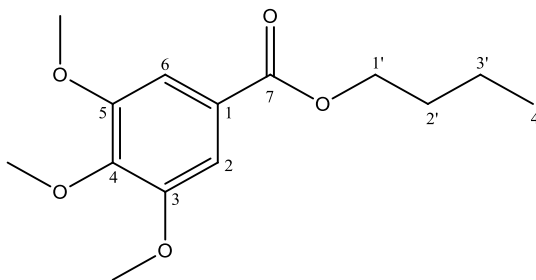
6.2.2.4. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de isopropila (4)



Óleo castanho claro ; rendimento 57,3% (68,6 mg; 0,26 mmol); CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,56$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3024 (C-H sp^2 aromático), 2981 (C-H sp^3), 1711 (C=O, éster), 1679 (anel tetrassubstituído), 1590 e 1461 (C=C aromático), 1327 e 1129 (C-O, éster), 1229 e

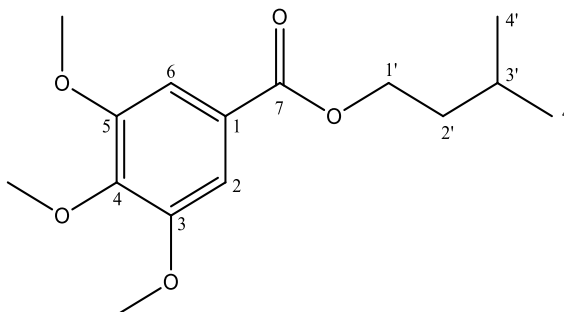
1007 (C-O, éter arílico), 865 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,28 (s, 2H, H-2, H-6); 5,24 (sept, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-1'); 3,90 (s, 6H, 3-MeO, 5-MeO); 3,89 (s, 3H, 4-MeO); 1,36 (d, $J = 6,3$ Hz, 6H, H-2'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 165,74 (C=O); 152,84 (C-3, C-5); 142,03 (C-4); 125,91 (C-1); 106,76 (C-2, C-6); 68,59 (C-1'); 60,91 (4-MeO); 56,23 (3-MeO, 5-MeO); 21,9 (C-2') (GREEN et al., 2015).

6.2.2.5. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de butila (5)



Óleo incolor; rendimento 99,6% (125,9 mg; 0,46 mmol); CCDA (8:2 Hexano/ AcOEt), $R_f = 0,64$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3006 (C-H sp^2 aromático), 2961 (C-H sp^3), 1716 (C=O, éster), 1655 (anel tetrassubstituído), 1590 e 1459 (C=C aromático), 1335 e 1129 (C-O, éster), 1225 e 1006 (C-O, éter arílico), 865 (C-H aromático); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,29 (s, 2H, H-2, H-6); 4,31 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-1'); 3,90 (s, 6H, 3-MeO, 5-MeO); 3,90 (s, 3H, 4-MeO); 1,76 (quint, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-2'); 1,47 (sex, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-3'); 0,98 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, H-4'); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 166,45 (C=O); 153,04 (C-3, C-5); 142,26 (C-4); 125,69 (C-1); 106,96 (C-2, C-6); 65,19 (C-1'); 61,04 (4-MeO); 56,40 (3-MeO, 5-MeO); 30,97 (C-2'); 19,47 (C-3'); 13,91 (C-4') (NÓBREGA et al., 2018).

6.2.2.6. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de isopentila (6)

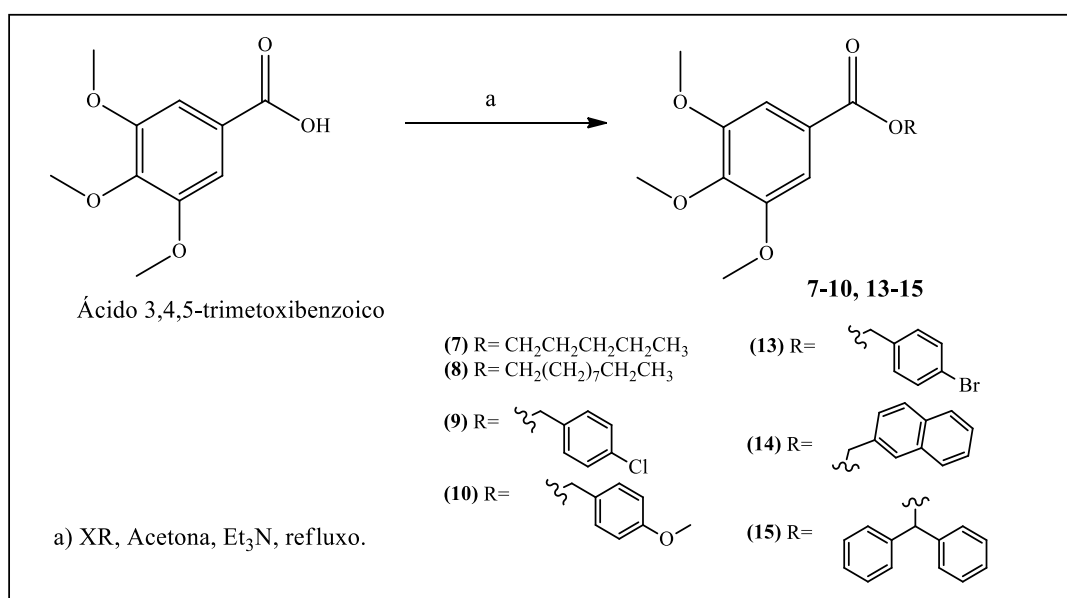


Óleo marrom, rendimento 45,3% (60,3 mg; 0,21 mmol); CCDA (8:2 Hexano/ AcOEt), $R_f = 0,60$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3002 (C-H sp^2 aromático), 2959 (C-H sp^3), 1717 (C=O, éster), 1655

(anel tetrassubstituído), 1590 e 1459 (C=C aromático), 1334 e 1129 (C-O, éster), 1225 e 1006 (C-O, éter arílico), 865 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29 (s, 2H, H-2, H-6); 4,34 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-1'); 3,90 (s, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); 1,81-1,71 (m, 1H, H-3'); 1,66 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-2'); 0,98 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, H-4'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,57 (C=O); 153,03 (C-3, C-5); 142,29 (C-4); 125,75 (C-1); 107,00 (C-2, C-6); 64,13 (C-1'); 61,05 (4-MeO); 56,41 (3-MeO, 5-MeO); 37,62 (C-2'); 25,49 (C-3'); 22,65 (C-4') LC-MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 283,1540, encontrada: 283,1538.

6.2.3. Obtenção dos derivados 7–10 e 13–15

Esquema 12. Esquema da esterificação utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico com haletos de alquila ou arila em acetona sob refluxo.

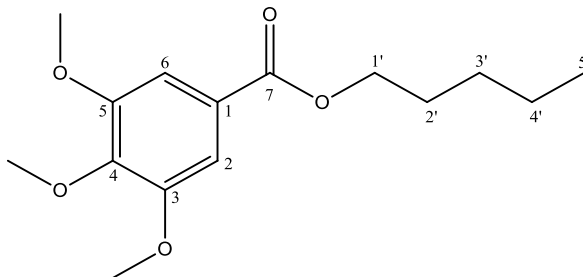


Fonte – Elaborados pela autora.

Em um balão de 100 mL contendo 1 eq. do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (0,1 g; 0,47 mmol) e 15 mL de acetona anidra, foi adicionado 4 eq. de trietilamina (0,26 mL; 1,88 mmol) e 1 eq. do haleto (0,47 mmol). A reação foi conduzida sob refluxo, com agitação magnética, durante 72 horas, e monitorada através de CCDA. Após rotaevaporação da acetona, adicionou-se água destilada (10 mL) e fez-se a extração com diclorometano (3x10mL). A fase orgânica foi tratada com 10 mL de água destilada, e seca com sulfato de sódio anidro. A purificação dos produtos foi realizada utilizando cromatografia em coluna com sílica gel 60 (Hexano/ AcOEt , 10:0 a 9:1) para obtenção dos produtos (BOECK et al., 2005).

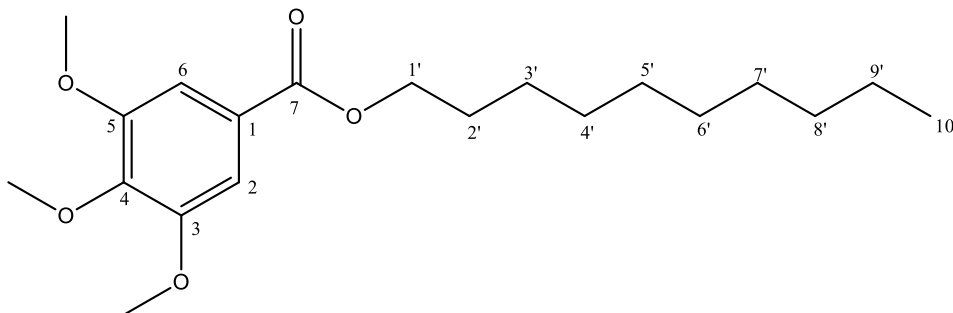
6.2.4 Dados espectroscópicos de 7-10 e 13-15

6.2.4.1. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de pentila (7)



Óleo branco; rendimento 75,2% (100,1 mg; 0,35 mmol); CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,60$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3012 (C-H sp^2 aromático), 2957 (C-H sp^3), 1714 (C=O, éster), 1657 (anel tetrassubstituído), 1590 e 1461 (C=C aromático), 1335 e 1129 (C-O, éster), 1226 e 1006 (C-O, éter arílico), 865 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29 (s, 2H, H-2, H-6); 4,29 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-1'); 3,89 (s, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); 1,75 (quint, $J = 7,2$ Hz, 2H, H-2'); 1,44 – 1,34 (m, 4H, H-3', H-4'); 0,92 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, H-5'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,27 (C=O); 152,93 (C-3, C-5); 142,13 (C-4); 125,57 (C-1); 106,80 (C-2, C-6); 65,30 (C-1'); 60,96 (4-MeO); 56,23 (3-MeO, 5-MeO); 28,42 (C-2'); 28,18 (C-3'); 22,36 (C-4'); 13,99 (C-5') (NÓBREGA et al., 2018).

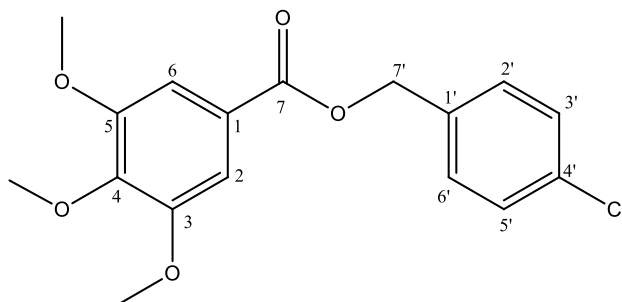
6.2.4.2. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de decila (8)



Sólido amorfo, rendimento 40,6% (67,4 mg; 0,19 mmol); P.F.: 49–50 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,64$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3015 (C-H sp^2 aromático), 2956 (C-H sp^3), 1709 (C=O, éster), 1672 (anel tetrassubstituído), 1590 e 1465 (C=C aromático), 1336 e 1131 (C-O, éster), 1226 e 990 (C-O, éter arílico), 864 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29 (s, 2H, H-2, H-6); 4,30 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-1'); 3,90 (s, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); 1,80 (quint, $J = 6,8$ Hz, 2H, H-2'); 1,42-1,26 (m, 14H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'); 0,87 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, H-10'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,23 (C=O);

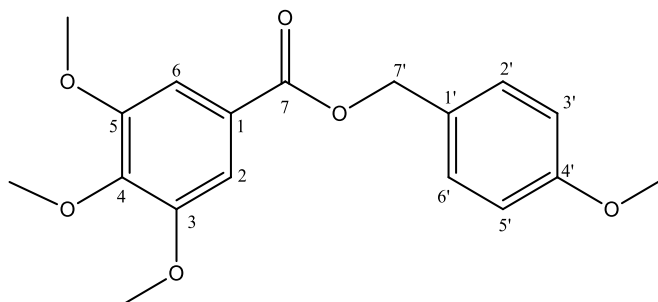
152,59 (C-3, C-5); 142,05 (C-4); 125,43 (C-1); 106,46 (C-2, C-6); 65,33 (C-1'); 60,81 (4-MeO); 56,23 (3-MeO, 5-MeO); 31,89 (C-2'); 29,54 (3'); 29,31 (C-4', C-5'); 29,28 (6'); 28,75 (C-7'); 26,07 (C-8'); 22,71 (C-9'); 14,10 (C-10') (IRANPOOR et al., 2016).

6.2.4.3. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (9)



Sólido cristalino branco, 42,9% (69,7 mg; 0,20 mmol); P.F.: 108-109 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,44$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3008 (C-H sp^2 aromático), 2960 (C-H sp^3), 1713 (C=O, éster), 1664 (anel tetrassubstituído), 1595 e 1472 (C=C aromático), 1335 e 1133 (C-O, éster), 1229 e 1092 (C-O, éter arílico), 1006 (C-Cl); 805 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,37-7,36 (*m*, 2H, H-3', H-5'); 7,36-7,35 (*m*, 2H, H-2', H-6'); 7,31 (*s*, 2H, H-2, H-6); 5,31 (*s*, 2H, H-7'); 3,89 (*s*, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,00 (C-10); 152,98 (C-3, C-5); 142,47 (C-4); 134,60 (C-1'); 134,20 (C-4'); 129,54 (C-2', C-6'); 128,69 (C-3', C-5'); 124,87 (C-1); 106,98 (C-2, C-6); 66,02 (C-7'); 60,93 (4-MeO); 56,28 (3-MeO, 5-MeO). LC-MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 337,0837, encontrada: 337,0836.

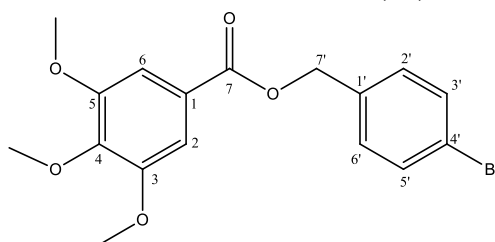
6.2.4.4. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (10)



Sólido cristalino branco, 67,5% (105,7 mg; 0,32 mmol); P.F.: 83-84 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,36$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3008 (C-H sp^2 aromático), 2944 (C-H sp^3), 1711 (C=O, éster), 1670 (anel tetrassubstituído), 1589 e 1465 (C=C aromático), 1332 e 1126

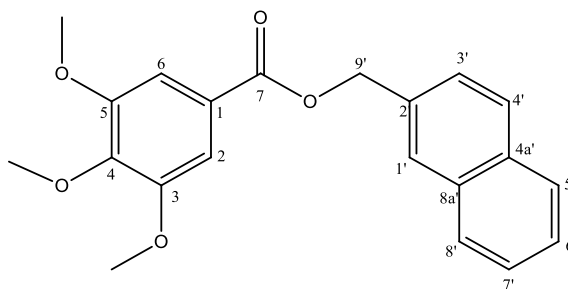
(C-O, éster), 1228 e 1005 (C-O, éter arílico), 864 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,38 (*d*, $J = 9,5$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7,31 (*s*, 2H, H-2, H-6); 6,91 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 5,29 (*s*, 2H, H-7'); 3,89 (*s*, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); 3,81 (*s*, 3H, H-8'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,25 (C=O); 159,66 (C-4'); 152,82 (C-3, C-5); 142,12 (C-4); 130,01 (C-2', C-6'); 128,19 (C-1'); 125,24 (C-1); 113,89 (C-3', C-5'); 106,90 (C-2, C-6); 66,69 (C-7'); 60,94 (4-MeO); 56,14 (3-MeO, 5-MeO); 55,27 (C-8'). LC-MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 333,1332, encontrada: 333,1331.

6.2.4.5. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (13)



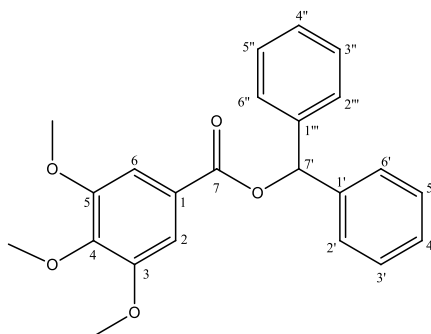
Sólido cristalino branco; rendimento 55,0% (197,0 mg; 0,51 mmol); P.F.: 104-105 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,62$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3034 (C-H sp^2 aromático), 2958 (C-H sp^3), 1712 (C=O, éster), 1664 (anel tetrassubstituído), 1594 e 1454 (C=C aromático), 1334 e 1133 (C-O, éster), 1228 e 1010 (C-O, éter arílico), 1070 (C-Br arílico), 801 (C-H aromático); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,51 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7,32 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7,31 (*s*, 2H, H-2, H-6); 5,30 (*s*, 2H, H-7'); 3,90 (*s*, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 166,10 (C=O); 153,12 (C-3, C-5); 142,68 (C-4); 135,26 (C-1'); 131,93 (C-3', C-5'); 130,04 (C-2', C-6'); 125,00 (C-1); 122,50 (C-4'); 107,17 (C-2, C-6); 66,16 (C-7'); 61,10 (4-MeO); 56,43 (3-MeO, 5-MeO) LC-MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{Br}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 381,0332, encontrada: 381,0330.

6.2.4.6. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (14)



Sólido branco; rendimento 48,4% (160,9 mg; 0,45 mmol); P.F.: 84-85 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,58$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3002 (C-H sp^2 aromático), 2936 (C-H sp^3), 1714 (C=O, éster), 1670 (anel tetrassubstituído), 1590 e 1463 (C=C aromático), 1329 e 1129 (C-O, éster), 1225 e 1008 (C-O, éter arílico), 864 (C-H aromático); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,91-7,85 (m, 4H, H-1', H-8', H-5', H-4'); 7,55 (dd, $J = 8,4$ Hz; 1,6 Hz, 1H, H-3'), 7,53-7,45 (m, 2H, H-6', H-7'); 7,36 (s, 2H, H-2, H-6); 5,53 (s, 2H, H-9'); 3,90 (s, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 166,26 (C=O); 153,14 (C-3, C-5); 142,55 (C-4); 133,64 (C-8a'); 133,34 (C-2'); 133,29 (C-4a'); 128,57 (C-3'); 128,12 (C-5'); 127,85 (C-8'); 127,57 (C-4'); 126,47 (C-1'); 126,44 (C-7'); 126,05 (C-6'); 125,25 (C-1); 107,18 (C-2, C-6); 67,14 (C-9'); 61,04 (4-MeO); 56,41 (3-MeO, 5-MeO). LC-MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 353,1383, encontrada: 353,1381.

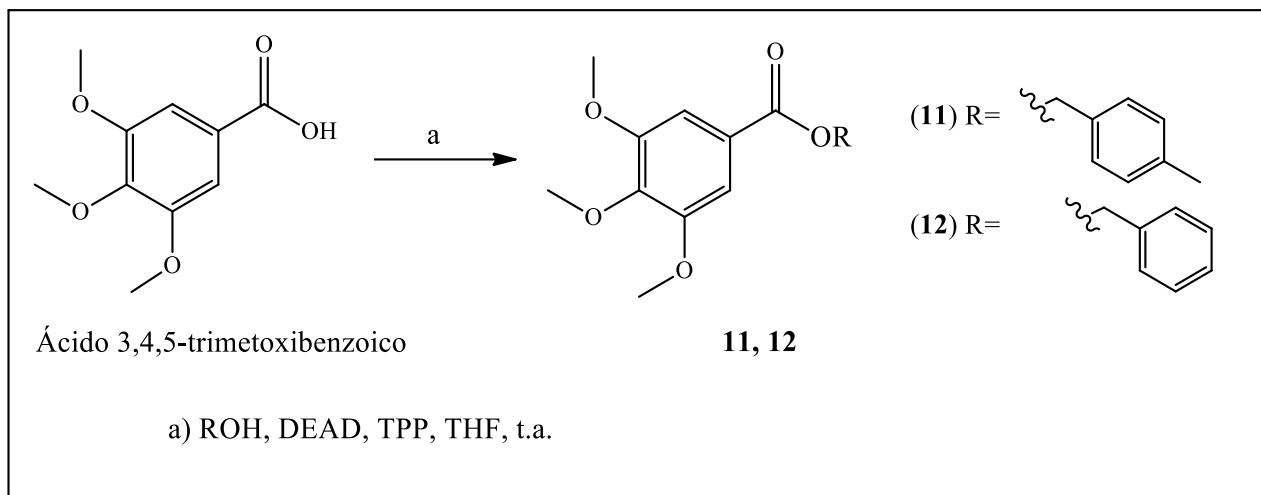
6.2.4.7. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de difenila (15)



Sólido amarelo; rendimento 41,5% (148,2 mg; 0,39 mmol); P.F.: 57-58 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,64$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3026 (C-H sp^2 aromático), 2939 (C-H sp^3), 1727 (C=O, éster), 1655 (anel tetrassubstituído), 1587 e 1456 (C=C aromático), 1338 e 1172 (C-O, éster), 1226 e 1127 (C-O, éter arílico), 855 (C-H aromático); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,59 – 7,47 (m, 12H, H-2, H-6, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''); 7,44 (s, 1H, H-7'); 4,06 (s, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 165,29 (C=O); 152,96 (C-3, C-5); 142,55 (C-4); 140,19 (C-1', C-1''); 128,58 (C-3', C-5')*; 128,47 (C-3'', C-5'')*; 127,99 (C-2', C-6')#; 127,53 (C-2'', C-6'')#; 127,15 (C-4'); 126,53 (C-4''); 125,17 (C-1); 107,15 (C-2, C-6); 77,63 (C-7'); 60,93 (4-MeO); 56,31 (3-MeO, 5-MeO). LC-MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 379,1540; encontrada: 379,1512.

6.2.5. Obtenção dos derivados 11 e 12:

Esquema 13. Reação de Mitsunobu utilizando como material de partida o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico e álcoois aromáticos.

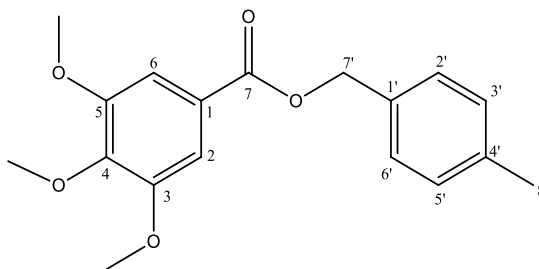


Fonte – Elaborados pela autora.

Preparou-se uma solução contendo o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (1 eq. ;100 mg; 0,47 mmol) e 1 eq. do álcool (0,47 mmol) solubilizado em 4 mL de tetrahydrofurano (THF) à 0 °C. Após 30 minutos, adicionou-se 1 eq. trifenilfosfina (TPP) e 1 eq. do azodicarboxilato de dietila (DEAD). A reação foi conduzida sob constante agitação magnética à temperatura ambiente, durante 72 horas e monitorada através de CCDA. Após rotaevaporação do THF adicionou-se água destilada (10 mL) e fez-se a extração com diclorometano (3x10 mL). A fase orgânica foi neutralizada com bicarbonato de sódio a 5% (3x10 mL), tratada com 10mL de água destilada, e seca com sulfato de sódio anidro. Os produtos foram submetidos a purificação utilizando cromatografia em coluna com sílica gel 60 (Hexano/AcOEt, 10:0 a 95:5) utilizando como eluentes hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (HANDIQUE et al., 2013).

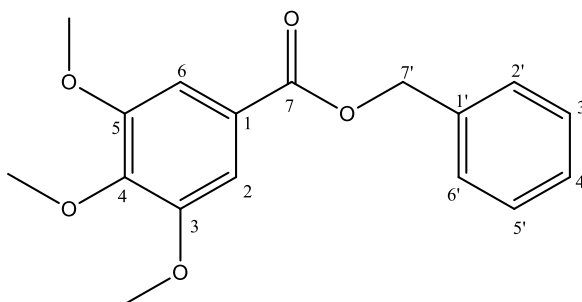
6.2.6. Dados espectroscópicos de 11 e 12

6.2.6.1. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (11)



Sólido cristalino branco, 35% (49,7 mg; 0,15 mmol); P.F.: 93-94 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,5$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3015 (C-H sp^2 aromático), 2971 (C-H sp^3), 1708 (C=O, éster), 1666 (anel tetrassubstituído), 1590 e 1467 (C=C aromático), 1334 e 1127 (C-O, éster), 1229 e 1008 (C-O, éter arílico), 812 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,34 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7,32 (*s*, 2H, H-2, H-6); 7,20 (*d*, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 5,32 (*s*, 2H, H-7'); 3,89 (*s*, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); 2,36 (*s*, 3H, H-8'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,14 (C=O); 152,92 (C-3, C-5); 142,34 (C-4); 138,10 (C-4'); 133,11 (C-1'); 129,24 (C-3', C-5'); 128,39 (C-2', C-6'); 125,22 (C-1); 106,98 (C-2, C-6); 66,76 (C-7'); 60,85 (4-MeO); 56,16 (3-MeO, 5-MeO); 21,30 (C-8'). LC-MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 317,1383, encontrada: 317,1382.

6.2.6.2. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de benzila (12)

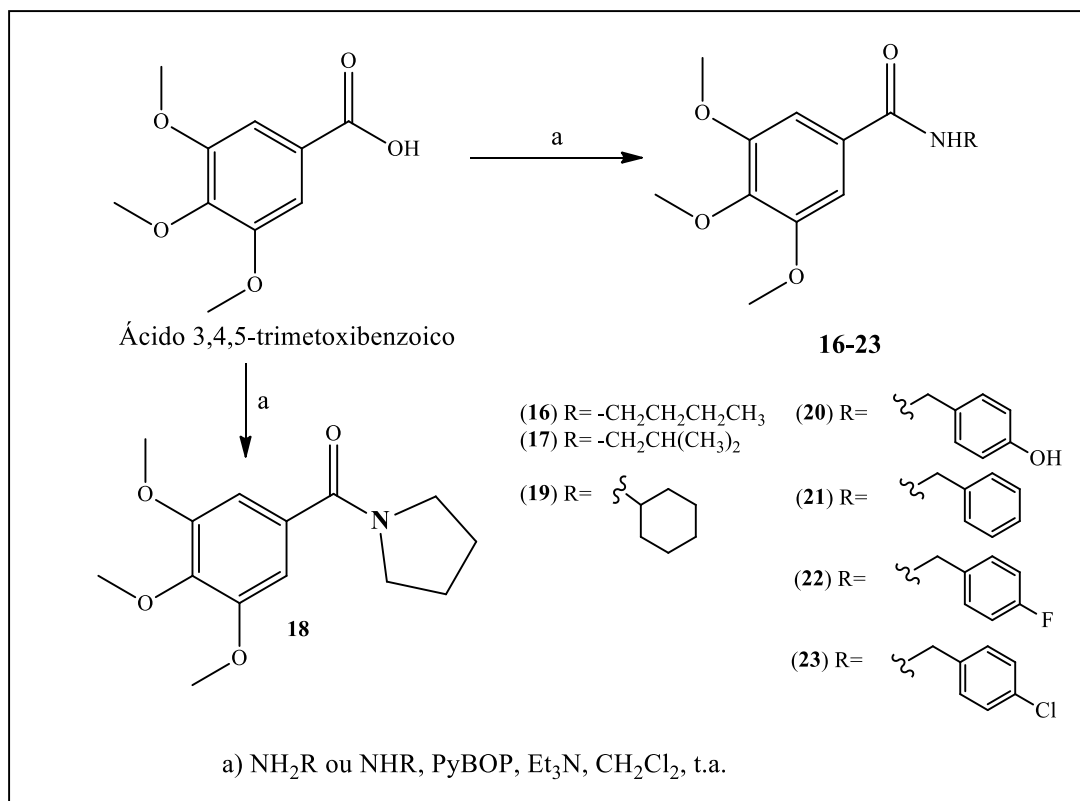


Sólido branco; rendimento 29,8% (84,9 mg; 0,28 mmol); P.F.: 91-92 °C; CCDA (8:2 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,38$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3006 (C-H sp^2 aromático), 2944 (C-H sp^3), 1698 (C=O, éster), 1634 (anel tetrassubstituído), 1583 e 1467 (C=C aromático), 1340 e 1128 (C-O, éster), 1249 e 1040 (C-O, éter arílico), 818 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,46 – 7,42 (*m*, 2H, H-2', H-6'); 7,38 (*m*, 3H, H-3', H-4', H-5'); 7,33 (*s*, 2H, H-2, H-6); 5,36 (*s*, 2H, H-7'); 3,90 (*s*, 9H, 3-MeO, 4-MeO, 5-MeO); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 166,20 (C=O); 153,03 (C-3, C-5); 142,44 (C-4); 136,23 (C-1'); 128,72 (C-3', C-5');

128,36 (C-4'); 128,28 (C-2', C-6'); 125,25 (C-1); 107,08 (C-2, C-6); 66,92 (C-7'); 61,03 (4-MeO); 56,37 (3-MeO, 5-MeO) (NÓBREGA et al., 2018).

6.2.7. Obtenção das amidas 16-23.

Esquema 14. Reação de amidação com PyBOP e o ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.

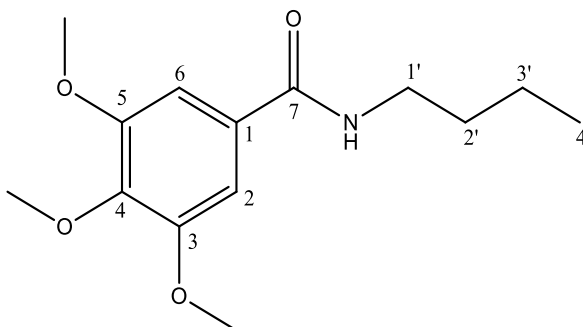


Fonte – Elaborados pela autora.

Em uma solução contendo 1 eq. do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (0,1g; 0,47 mmol) e 1 eq. da amina (0,47 mmol) correspondente, solubilizadas em dimetilformamida (1,0 mL), adicionou-se trietilamina (0,06 mL; 0,47 mmol) à 0 °C. Após 30 minutos, adicionou-se (0,24 g; 0,47 mmol) do agente acoplante PyBOP, previamente dissolvido em diclorometano (1,0 mL), sob agitação magnética. As reações ocorreram durante 6-24 horas e foram monitoradas através de CCDA. Após rotaevaporação dos solventes, adicionou-se água destilada (10 mL) e fez-se a extração com diclorometano (3x10 mL). A fase orgânica foi tratada com ácido clorídrico (10%) (3x10 mL), neutralizada com bicarbonato de sódio a 5% (3x10 mL), tratada com 10 mL de água destilada, e seca com sulfato de sódio anidro. Purificou-se os produtos por cromatografia em coluna com sílica gel 60 (Hexano/AcOEt, 6:4 e 3:7) (RAJAN et al., 2001).

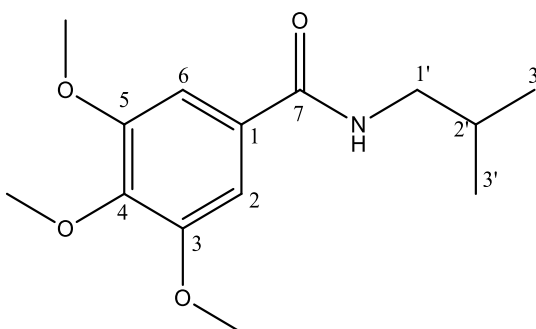
6.2.8 Dados espectroscópicos de 16-23

6.2.8.1. *N*-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (16)



Sólido branco; rendimento 89,1% (112,2 mg; 0,41 mmol); P.F.: 115-116 °C; CCDA (6:4 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,36$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3294 (N-H amida secundária), 3017 (C-H sp^2 aromático), 2932 (C-H sp^3), 1681 (anel tetrassubstituído), 1634 (C=O, amida), 1583 e 1459 (C=C aromático), 1541 e 1506 (N-H dobramento), 1236 e 1131 (C-O, éter arílico), 843 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,98 (s, 2H, H-2, H-6); 6,22 (s, 1H, N-H); 3,87 (s, 6H, 3-MeO, 5-MeO); 3,86 (s, 3H, 4-MeO); 3,43 (q, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-1'); 1,62 (quint, $J = 7,2$ Hz, 2H, H-2'); 1,38 (sex, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-3'); 0,94 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, H-4'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 167,32 (C=O); 153,21 (C-3, C-5); 140,87 (C-4); 130,53 (C-1); 104,46 (C-2, C-6); 60,97 (4-MeO); 56,28 (3-MeO, 5-MeO); 40,03 (C-1'); 31,91 (C-2'); 20,19 (C-3'); 13,91 (C-4') (ZINCHENKO et al., 2017).

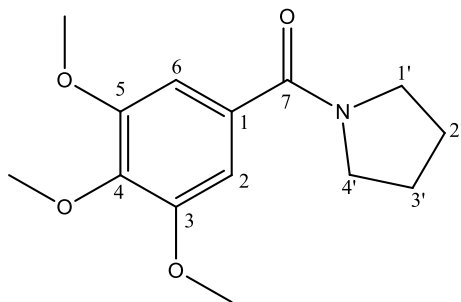
6.2.8.2. *N*-Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (17)



Sólido amarelo; rendimento 91,3% (115,0 mg; 0,43 mmol); P.F.: 118-119 °C; CCDA (6:4 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,36$; IV $\nu_{\max}$ (KBr, cm^{-1}): 3307 (N-H amida secundária), 3015 (C-H sp^2 aromático), 2955 (C-H sp^3), 1687 (anel tetrassubstituído), 1634 (C=O, amida), 1583 e 1469 (C=C aromático), 1543 e 1504 (N-H dobramento), 1237 e 1131 (C-O, éter arílico), 842 (C-H aromático); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 6,98 (s, 2H, H-2, H-6), 6,30 (s, 1H, N-H), 3,86

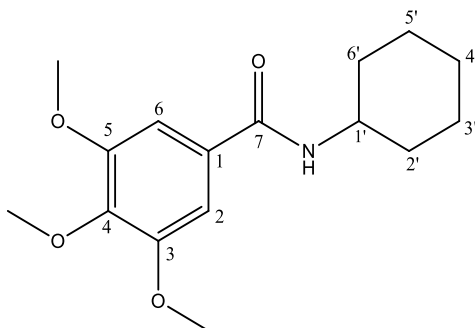
(s, 6H, 3-MeO, 5-MeO), 3,85 (s, 3H, 4-MeO); 3,24 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, H-1'), 1,90–1,84 (m, 1H, H-2'), 0,95 (d, $J = 6,7$ Hz, 6H, H-3'). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 167,49 (C=O); 153,27 (C-3, C-5); 140,75 (C-4); 130,45 (C-1); 104,46 (C-2, C-6); 60,94 (4-MeO); 56,41 (3-MeO, 5-MeO); 47,59 (C-1'); 28,74 (C-2'); 20,25 (C-3') (ZINCHENKO et al., 2017).

6.2.8.3. N-Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (18)



Óleo amarelo; rendimento 84,2% (105,3 mg; 0,39 mmol); CCDA (1:9 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,48$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3038 (C-H sp^2 aromático), 2971 (C-H sp^3), 1657 (anel tetrassubstituído), 1621 (C=O, amida), 1582 e 1463 (C=C aromático), 1510 e 1417 (N-H dobramento), 1239 e 1005 (C-O, éter arílico), 843 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6,71 (s, 2H, H-2, H-6); 3,83 (s, 6H, 3-MeO, 5-MeO); 3,82 (s, 3H, 4-MeO); 3,59 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, H-1'); 3,42 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-4'); 1,92 (m, 2H, H-2'); 1,86 (m, 2H, H-3'); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 169,39 (C=O); 152,94 (C-3, C-5); 139,17 (C-4); 132,09 (C-1); 104,57 (C-2, C-6); 60,83 (4-MeO); 56,17 (3-MeO, 5-MeO); 49,87 (C-1'); 46,26 (C-4'); 26,31 (C-2'); 24,42 (C-3'), (NAREDDY et al., 2016).

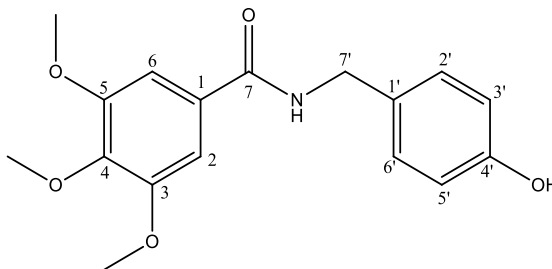
6.2.8.4. N-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (19)



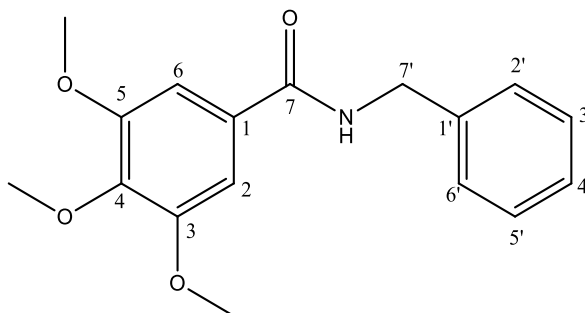
Sólido cristalino branco; rendimento 44,4% (61,4 mg; 0,21 mmol); P.F.: 179-180 °C; CCDA (6:4 Hexano/AcOEt), $R_f = 2,2$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3468 (N-H amida secundária), 3077 (C-

H sp^2 aromático), 2871 (C-H sp^3), 1677 (anel tetrassubstituído), 1621 (C=O, amida), 1582 e 1463 (C=C aromático), 1510 e 1417 (N-H dobramento), 1239 e 1004 (C-O, éter arílico), 844 (C-H aromático); RMN de 1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7,16 (s, 1H, N-H); 6,19 (s, 2H, H-2, H-6); 2,86 (s, 6H, 3-MeO, 5-MeO); 2,72 (s, 3H, 4-MeO); 1,54 (quint, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-1'); 0,88 – 0,76 (m, 4H, H-2', H-6'); 0,67-0,62 (m, 2H, H-4'); 0,36-0,32 (m, 4H, H-3', H-5'); RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): δ 164,91 (C=O); 152,50 (C-3, C-5); 139,87 (C-4); 130,09 (C-1); 104,94 (C-2, C-6); 60,22 (4-MeO); 56,10 (3-MeO, 5-MeO); 48,64 (C-1'); 32,63 (C-2', C-6'); 25,41 (C-4'); 25,15 (C-3', C-5') (OBRECHT et al., 1995).

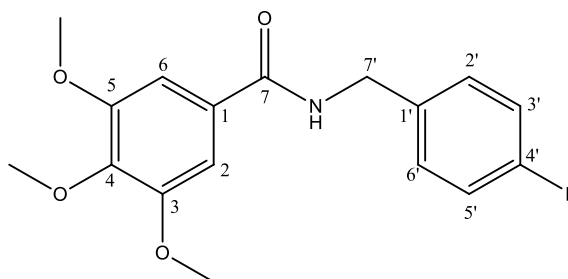
6.2.8.5. N-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (20)



Sólido branco, rendimento 57,15% (256,3 mg; 0,81 mmol); PF.: 227-229°C; CCDA (5:5 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,37$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3379 e 3314 (O-H estiramento), 3346 (N-H amida secundária), 3019 (C-H sp^2 aromático), 2099 (C-H sp^3), 1634 (anel tetrassubstituído), 1611 (C=O, amida), 1574 e 1449 (C=C aromático), 1545 e 1499 (N-H dobramento), 1414 e 1231 (C-O-H arila), 1211 e 1122 (C-O, éter arílico), 823 (C-H aromático); RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,40 (s, 1H, OH); 7,99 (t, $J = 5,8$ Hz 1H, NH); 6,35 (s, 2H, H-2, H-6); 6,24 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 5,82 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 3,48 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H H-7'); 2,93 (s, 6H, 3-MeO, 5-MeO); 2,81 (s, 3H, 4-MeO); RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): δ 165,44 (C=O); 156,32 (C-4'); 152,65 (C-3, C-5); 139,90 (C-4); 129,89 (C-1'); 129,61 (C-1); 128,68 (C-2', C-6'); 115,06 (C-3', C-5'); 104,84 (C-2, C-6); 60,10 (4-MeO); 56,01 (3-MeO, 5-MeO); 42,30 (C-7') (OBRECHT et al., 1995).

6.2.8.6. N-benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (21)

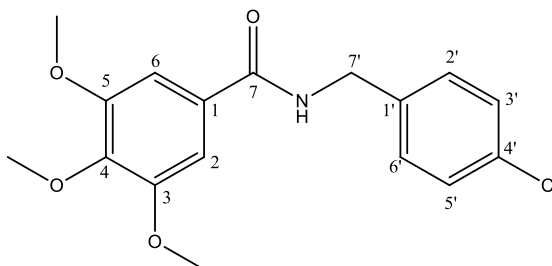
Sólido cristalino branco, 59,6% (84,6 mg; 0,27 mmol); P.F.: 138-139 °C; CCDA (6:4 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,38$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3305 (N-H amida secundária), 3028 (C-H sp^2 aromático), 2942 (C-H sp^3), 1655 (anel tetrassubstituído), 1625 (C=O, amida), 1580 e 1459 (C=C aromático), 1528 e 1499 (N-H dobramento), 1237 e 1127 (C-O, éter arílico), 840 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,35–7,27 (*m*, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'); 7,03 (*s*, 2H, H-2, H-6); 6,60 (*s*, 1H, N-H); 4,61 (*d*, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-7'); 3,86 (*s*, 3H, 4-MeO); 3,85 (*s*, 6H, 3-MeO, 5-MeO); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 167,11 (C=O); 153,34 (C-3, C-5); 141,10 (C-4); 138,22 (C-1'); 129,87 (C-1); 128,86 (C-2', C-6'); 128,01 (C-4'); 127,70 (C-3', C-5'); 104,55 (C-2, C-6); 61,04 (4-MeO); 56,34 (3-MeO, 5-MeO); 44,30 (C-7') (NÓBREGA et al., 2018).

6.2.8.7. N-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22)

Sólido cristalino branco, Rendimento 62,5 % (90 mg; 0,28 mmol); P.F.: 131-132 °C; CCDA (6:4 Hexano/AcOEt), $R_f = 0,34$; IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3288 (N-H amida secundária), 3012 (C-H sp^2 aromático), 2947 (C-H sp^3), 1672 (anel tetrassubstituído), 1634 (C=O, amida), 1585 e 1459 (C=C aromático), 1545 e 1508 (N-H dobramento), 1280 e 1130 (C-F arila), 1219 e 1098 (C-O, éter arílico), 827 (C-H aromático); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,29-7,27 (*m*, 2H, H-2', H-6'); 7,01 (*s*, 2H, H-2, H-6); 6,98 (*d*, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 6,69 (*s*, 1H, N-H); 4,55 (*d*, $J = 5,8$ Hz, 2H, H-7'); 3,85 (*s*, 3H, 4-MeO); 3,84 (*s*, 6H, 3-MeO, 5-MeO); RMN de ^{13}C

(100 MHz, CDCl₃): δ 167,15 (C=O); 163,50 (C-F); 161,04 (C-4'); 153,28 (C-3, C-5); 141,17 (C-4); 134,05 (C-1'); 129,69 (C-1); 129,66 (C-2')*; 129,58 (C-6')*; 115,74 (C-3')#; 115,52 (C-5')#; 104,55 (C-2, C-6); 60,90 (4-MeO); 56,29 (3-MeO, 5-MeO); 43,48 (C-7') LC-MALDI TOF/TOF calculado para C₁₇H₁₈FNO₄ [M+H]⁺: 320,1292 , encontrada:320,1290.

6.2.8.8. N-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23)



Sólido branco; rendimento 86,6% (137,0 mg; 0,41 mmol); P.F.: 157-158 °C; CCDA (6:4 Hexano/AcOEt), R_f = 0,34; IV ν_{max} (KBr, cm⁻¹): 3254 (N-H amida secundária), 3004 (C-H sp² aromático), 2946 (C-H sp³), 1653 (anel tretrassubstituído), 1629 (C=O, amida), 1582 e 1457 (C=C aromático), 1538 e 1498 (N-H dobramento), 1235 e 1128 (C-O, éter arílico), 1070 e 997 (C-Cl), 816 (C-H aromático); RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7,31(*d*, *J* = 6,4 Hz, 2H, H-2', H-6'); 7,28 (*d*, *J* = 6,4 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7,04 (*s*, 2H, H-2, H-6); 6,74 (*s*, 1H, N-H); 4,58 (*d*, *J* = 5,7 Hz, 2H, H-7'); 3,88 (*s*, 3H, 4-MeO); 3,87 (*s*, 6H, 3-MeO, 5-MeO); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 167,30 (C=O); 153,17 (C-3, C-5); 141,26 (C-4); 136,97 (C-1'); 133,37 (C-1); 129,60 (C-4'); 129,27 (C-3', C-5') ; 128,92 (C-2', C-6'); 104,58 (C-2, C-6); 61,01 (4-MeO); 56,43 (3-MeO, 5-MeO); 43,55 (C-7'). LC-MALDI TOF/TOF calculado para C₁₇H₁₈ClNO₄ [M+H]⁺: 336,0997, encontrada: 336,0995.

6.3. Avaliação da atividade tripanocida

Os ensaios para a avaliação tripanocida frente o *Trypanosoma cruzi* foi realizado em colaboração com equipe da professora Dra. Alice Maria Costa Martins, Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC) - Universidade Federal do Ceará (UFC) (Fortaleza, Ceará).

6.3.1. Avaliação de citotoxicidade em células hospedeiras

Antes de realizar o ensaio tripanocida dos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, estes foram submetidos a um ensaio de citotoxicidade em células LLC-MK2 com objetivo de avaliar o perfil de seletividade frente ao *T. cruzi* e as células hospedeiras. As células LLC-MK2 (ATCC CCL-7) são uma linhagem de células epiteliais obtidas dos túbulos renais de macacos (*Macaca mulatta*). Estas células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% FBS (Soro fetal bovino) e antibióticos (penicilina - 200 UI.mL⁻¹ e estreptomicina - 130 mg.mL⁻¹).

Para a realização da avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). Inicialmente as células LLC-MK2 foram expostas aos análogos (**1-23**) solubilizados em DMSO em diferentes concentrações (6,25-200 µg/mL) e incubadas por 24 horas à 37°C. Em seguida foi adicionado o MTT (Amresco, Solon, Ohio, USA; 5 mg/mL), estas células passaram por incubação por 4 horas, após isso foi adicionado 10% de dodecil sulfato de sódio (Vetec, São Paulo, Brasil), com objetivo de solubilizar o formazan. Para a análise das medidas da viabilidade celular foi utilizado um leitor de microplacas (Biochrom® Asys Expert Plus) no comprimento de onda de 570 nm, assim a CC₅₀ foi definida. O cálculo da viabilidade celular relativa foi realizado utilizando como controle negativo células tratadas apenas com solução salina tamponada de fosfato (PBS) estéril no meio. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas (MOSMANN, 1983).

6.3.2. Atividade Tripanocida dos Compostos 15–18 e 20

Inicialmente as formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram obtidas a partir de infecções de células hospedeiras, conforme descrito por LIMA et al. (2016). Para isso, células LLC-MK2 foram cultivadas em frascos estéreis de 25 cm² na concentração de 1 x 10⁵ células. mL⁻¹ em meio DMEM 10% FBS. Após 48 horas de incubação em estufa de CO₂, o meio foi substituído por DMEM 2% FBS sem antibióticos e as células foram infectadas com tripomastigotas na proporção de 20 parasitas por célula.

As formas epimastigotas (cepa Y) do *T. cruzi* foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitas da Universidade de São Paulo (USP), e cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose, com NaCl 4 gL⁻¹; Na₂HPO₄.12H₂O 11,6 gL⁻¹; KCl 0,4 gL⁻¹; glicose 2,2 gL⁻¹; triptose 5 gL⁻¹; infusão hepática 5 gL⁻¹; e hemina bovina 25 mg.L⁻¹; em pH 7,4), suplementado

com 10% FBS e antibióticos (penicilina – 200 UI.mL⁻¹ e estreptomicina – 50 mg.L⁻¹). As culturas foram mantidas a 28 ± 1°C em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand) em frascos estéreis (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000).

Para avaliar o efeito sobre amastigotas intracelulares, células LLC-MK2 (10⁵ células.mL⁻¹) foram cultivadas em placas de 24 poços, em lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro por 24 horas incubadas em estufa de CO₂. As células foram então infectadas com tripomastigotas (2 x 10⁶ células.mL⁻¹) e incubadas por 48 horas.

A atividade tripanocida dos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (**15–18 e 20**) foi avaliada contra formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) em 24 h de incubação e em célula hospedeira LLC-MK2 sat durante 24 h de exposição a diferentes concentrações: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; e 1,56 µg/mL. Enquanto para a forma amastigota do *T. cruzi* (cepa Y) as células foram então tratadas com os derivados testados (**15–18 e 20**) nas concentrações da IC₅₀ e ½ x IC₅₀ de cada composto em relação a forma tripomastigota, foram então mantidos em estufa de CO₂ por 24 horas.

Com o ensaio MTT foi possível calcular o IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células do parasito) das substâncias testadas através da viabilidade celular, que foi calculada em relação ao controle negativo, o benznidazol foi utilizado como controle positivo, cuja absorbância foi considerada 100%.

6.3.3. Perfil de Morte Celular

Para avaliar o perfil de morte celular foram utilizadas formas epimastigotas. O estudo foi realizado em ensaios de citometria de fluxo usando marcação com AxPE e 7-AAD. Para análise dos dados, as células foram divididas em quatro populações celulares: células viáveis, com baixos níveis de marcação para ambos os fluorocromos (não marcadas); células necróticas, marcadas apenas com 7-AAD (7AAD+); células apoptóticas, marcadas apenas com Anexina V-PE (/AxPE+); e células apoptóticas tardias duplamente marcadas (7AAD +/AxPE +), como já descrito por Kumar e colaboradores (2015). As células foram incubadas com os compostos **15–18 e 20** por 24 h em concentrações equivalentes a IC₅₀ e 2 × IC₅₀.

6.3.4. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial (ΔΨm)

O ensaio da avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial (ΔΨm) foi realizado com o corante catiônico Rodamina 123 (Rho123) (MERCK®, Darmstadt, Alemanha). Em pH

fisiológico, Rho123 é fortemente atraído pelo potencial elétrico negativo do espaço intermembranar mitocondrial e, dessa forma, emite fluorescência vermelha (JOHNSON et al., 1980; O'CONNOR et al., 1988).

6.4. Estudo da modelagem molecular tripanocida

O estudo da modelagem molecular da atividade tripanocida foi realizado pela equipe do professor Yunierkis Perez-Castillo na Faculdade de Engenharia e Ciências Aplicadas na Área de Ciências Aplicadas da Universidad de Las Américas (Equador).

6.4.1. Seleção dos alvos moleculares

Os potenciais alvos moleculares para o composto **17** em *T. cruzi* foram preditos seguindo a abordagem de pesca de alvo baseada em homologia descrita em publicações anteriores (LOPES et al., 2020; STEVERDING et al., 2022). Resumindo, os alvos potenciais do composto foram identificados com utilização do método Similarity Ensemble Approach (SEA) (KEISER et al., 2007). Em sequência, os alvos previstos pela SEA para o composto **17** foram utilizados para obter mais informações em pesquisa no Blast, contra as proteínas de *T. cruzi* (taxid: 5693) incluídas no banco de dados de proteínas de referência (refseq_protein) (ALTSCHUL et al., 1997). As Proteínas do *T. cruzi* que se apresentaram como cobertas em pelo menos 75% do seu comprimento pelo alinhamento Blast e idênticas em no mínimo 40% a qualquer uma das proteínas identificadas no SEA, foram assim consideradas alvos potenciais do composto **17** no parasito.

6.4.2. Modelagem Molecular

Com a utilização do Omega da OpenEye foi gerada uma conformação tridimensional inicial do composto **17**. O programa MolCharge foi usado para atribuir cargas atômicas parciais am1bcc a este confôrmero de ligante. As estruturas tridimensionais experimentais das enzimas DHFR-TS e PPD foram recuperadas do banco de dados Protein Data Bank (PDB). Os códigos PDB para essas proteínas são 3HBB (DHFR-TS) e 3V94 (PPD). Qualquer loop não terminal ausente nas estruturas de raios X foi reconstruído com o Modeller usando sua interface implementada no UCSF Chimera. Em relação as outras proteínas investigadas, nenhuma estrutura experimental estava disponível e os modelos de homologia foram produzidos com o servidor web SwissModel. Diferentes estruturas, empregando diferentes templates, foram

previstas para cada sequência e o modelo com o maior valor da métrica QMEAN-DisCo Global (PETTERSEN et al., 2004; HAWKINS et al., 2010; WEBB, 2016; BIENERT et al., 2017; OMEGA, 2022; QUACPAC, 2022).

Os cálculos da modelagem molecular foram realizados com o software Gold de acordo com metodologias já descritas na literatura (JONES et al., 1997; LOPES et al., 2019; PEREZ-CASTILLO et al., 2020). A região de ligação do ligante foi definida a partir dos ligantes presentes nas estruturas radiográficas experimentais e nos moldes utilizados para a obtenção dos modelos de homologia. Qualquer cofator mecanisticamente relevante foi retido nos receptores e os átomos de hidrogênio foram adicionados às proteínas antes dos cálculos de ancoragem. O parâmetro de eficiência de pesquisa do software Gold foi definido como 200% e até 10 cadeias laterais apontando para a cavidade de ligação foram consideradas flexíveis. A pontuação primária foi realizada com a função de pontuação ChemPLP. Foram obtidas 30 soluções do composto **17**, estas foram exploradas para cada receptor que foram posteriormente reavaliadas com as funções de pontuação GoldScore, ChemScore e ASP de Gold. Finalmente, as quatro funções de pontuação foram transformadas em Z-scores e calculadas em um nível de solução de encaixe. Qualquer pose de ligante prevista com pontuação Z maior que 1 foi selecionada para análises adicionais.

6.4.3. Simulações de dinâmica molecular e estimativa energias livres de ligação

A realização da análise de dinâmica molecular (MD) foi realizada com Amber 2022. Em resumo, todos os complexos analisados passaram pelo mesmo protocolo de minimização de energia, aquecimento, equilíbrio e produção. As proteínas foram parametrizadas com o campo de força ff19SB e os parâmetros para o composto **17** foram obtidos com o campo de força gaff2. Parâmetros para o cofator NADP presente na enzima bifuncional DHFR-TS foram recuperados do banco de dados de parâmetros Amber mantido pelo Bryce Group na Universidade de Manchester (<http://amber.manchester.ac.uk/index.html>). Os cátions Zn^{2+} presentes nos alvos HDAC e PPD foram tratados de acordo com o método Cationic Dummy Atom (CADA) (PANG et al., 1999; PANG et al., 2000; PEREZ-CASTILLO et al., 2021; CASE et al., 2022; STEVERDING et al., 2022; FILHO et al., 2023).

Os complexos receptor-composto **17** foram colocados em caixas de octaedros truncados, solvatados com moléculas de água OPC e neutralizados pela adição de contraíons Na^+ e Cl^- em uma concentração de 150 mM. Na primeira etapa de minimização de energia foi então realizada

com tudo, exceto o solvente e os contraíons restritos. Na sequência, a segunda etapa de minimização de energia foi realizada sem restrições aplicadas. Os complexos foram gradualmente aquecidos de 0 a 300 K a volume constante durante 20 ps. Em seguida, os sistemas aquecidos foram equilibrados por 100 ps a temperatura (300 K) e pressão (1 bar) constantes. Os sistemas equilibrados serviram como ponto inicial para as corridas de produção. Foram cinco ciclos de produção curtos (4 ns) realizados por complexo. Dessa forma, cada corrida de produção iniciou com velocidades atômicas iniciais aleatórias, visto que neste formato se tem uma melhor exploração do espaço conformacional de cada complexo.

Para calcular as energias livres de ligação ocorreu a partir das trajetórias de produção de MD utilizando o método MM-PBSA, conforme implementado no script MMPBSA.py fornecido com Amber 2022 (MILLER et al., 2012). Os cálculos ocorreram em 100 instantâneos de MD extraídos de cada execução de produção e cobrindo os 1–4 ns. Sendo assim, 20 instantâneos MD foram extraídos de cada trajetória de produção para cálculos de MM-PBSA. Nas estimativas das energias livres de ligação a força iônica foi ajustada para 150 mM e os parâmetros de solvente implícito padrão foram empregados.

6.4.4. Previsões ADMET

O composto **17** foi avaliado quanto aos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicologia (ADMET). Os resultados foram previstos pelos servidores SwissADME e pkCSM (PIRES et al., 2015; DAINA et al., 2017).

6.5. Determinação da atividade citotóxica dos derivados 1-8, 10, 11, 13-17 e 19-23.

Os ensaios da atividade citotóxica frente as células SCC9 foram realizados pela equipe do professor Dr. Bruno Kaufmann Robbs, no Laboratório Multiusuário de Cultivo de Células e Tecidos (LMCT) na Universidade Federal Fluminense (Niterói, Rio de Janeiro).

6.5.1. Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade)

As Células SCC (SCC9 e SCC4) utilizadas foram derivadas de língua humana OSCC, foram obtidas por (ATCC® CRL-1629 e CRL-1624) e mantidas em meio DMEM/F12 1:1 (Dulbecco's meio Eagle modificado e meio Ham's F12, Gibco (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% (v/v) FBS (soro fetal bovino; Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) e 400 ng/ mL de hidrocortisona (Sigma-AldrichCo., St. Louis, MO,

EUA). Os Fibroblasto gengival humano primário normal (PCS201 018TM) e outras células tumorais, sendo elas: B16-F10 (CRL-6475), Hep G2 (HB-8065) e HT-29 (HTB-38) também foram obtidos no ATCC e mantidos em DMEM suplementado com 10% (v/v) FCS. O cultivo das células foi realizado em ambiente umidificado contendo 5% de CO₂ a 37 °C.

Para todos os experimentos, os compostos foram solubilizados em DMSO (Sigma-Aldrich) para uma concentração final de 100 mM. A partir dessa diluição, outras concentrações foram feitas para realizar o ensaio de viabilidade celular. A carboplatina (Fauldcarbo®; Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) foi usada como controle positivo por ser um fármaco antitumoral.

O ensaio da viabilidade celular das células cancerígenas e fibroblastos primários foi realizado através do ensaio de MTT conforme descrito em MACHADO e colaboradores (2021). As células cancerígenas (5×10^3 células/poço) foram adicionadas em uma placa de 96 poços, teste realizado em triplicata. O DMSO foi diluído em meio de cultura nas mesmas concentrações e foi utilizado como controle negativo, representando 100% de viabilidade celular. Após 48 h de tratamento, as células foram incubadas por 3,5 h com 5 mg/mL de reagente MTT (3,4,5-dimetiazol-2,5-difeniltetrazoliumbromide) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) diluído em meio de cultura. Posteriormente, os cristais de formazan foram dissolvidos em solvente (50% Metanol e 50% DMSO), e a absorbância foi lida a 560 nm usando o espectrofotômetro de microplacas EPOCH (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

6.5.2. Ensaio de hemolítico

Foi utilizado sangue humano conforme previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense – Nova Friburgo, RJ (CAAE: 43134721.4.0000.5626). Os eritrócitos foram coletados por centrifugação a 1500 rpm por 15 min, lavados com PBS (tampão fosfato salino) e glicose 10 mM e contados em contador automático de células (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Os eritrócitos foram então semeados em placas de 96 poços a uma concentração de 4×10^8 /poço em triplicata, e 10 µL dos compostos foram adicionados em uma concentração final de 1000 µM em PBS com glicose (volume final de 100 µL). Dez microlitros de PBS foram usados como controle negativo e 10 µL de PBS com 0,1% Triton × 100 como controle positivo. Para realização da leitura dos dados foi com EPOCH (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 540 nm de absorbância, e os

dados estatísticos foram gerados com o programa GRAPHPAD Prism 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

6.5.3. Ciclo Celular e Análise SubG1

Para avaliar a ação do composto **10** no ciclo celular, células da linhagem SCC9 foram semeadas em uma placa de seis poços (5×10^5 células/poço). Após 48h de tratamento, as células foram tripsinizadas e coradas com iodeto de propídio (75 μ M; Sigma) na presença de NP-40 (Sigma). O conteúdo de DNA foi analisado coletando 10.000 eventos usando um citômetro de fluxo FACScalibur. Os dados foram analisados usando o software CellQuest (BD Biosciences) e FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). (Versão 9.9.4) (LUCENA et al., 2016).

6.5.4. Análise de exposição à fosfatidilserina (apoptose)

As células da linha celular SCC9 foram semeadas em placas de seis poços (5×10^5 células/poço), tripsinizado 48 h após o tratamento, marcadas com o kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC de acordo com o protocolo do fabricante (#BMS500FI/300, Invitrogen) e analisado por citometria de fluxo (FAGET et al., 2012).

6.5.4. Análise de Caspases

Para detecção de caspase ativa, 5×10^4 células SCC9 foram semeadas em uma placa de 24 poços contendo 1 mL de DMEM/F12 com 10% de FBS por poço. O reagente CellEvent™ Caspase-3/7 (#R37111, Invitrogen) foi diluído em meio de cultura de acordo com as instruções do fabricante. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram tratadas com reagente Caspase-3/7 e $2 \times IC_{50}$ de **10** ou DMSO como controle. As células foram analisadas por citometria de fluxo após 48 h de tratamento.

6.5.5. Análise Estatística, Cálculo de IC_{50} e Índice de Seletividade (I.S)

Os dados de IC_{50} para o ensaio MTT foram obtidos por regressão não linear usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) de pelo menos três experimentos independentes. Os dados são apresentados como média, $\pm$ desvio padrão (DP). Uma resposta de dose logarítmica (inibidor) versus curva de resposta usando o método dos mínimos quadrados, sendo esta utilizada para determinar o IC_{50} e D.P dos compostos. O índice de seletividade foi calculado como: $I.S = IC_{50}$ do composto em fibroblastos/ IC_{50} do mesmo composto em células tumorais.

6.6. Estudo de Modelagem Molecular do composto 10 frente células SCC9

O estudo da modelagem molecular da atividade antiproliferativa foi realizado pela equipe do professor Yunierkis Perez-Castillo na Faculdade de Engenharia e Ciências Aplicadas na Área de Ciências Aplicadas da Universidad de Las Américas (Equador).

6.6.1. Seleção dos alvos

A seleção dos alvos foi realizada seguindo dois critérios: levantamento da literatura para o mecanismo de ação da piperlongumina e uma abordagem computacional de pesca de alvos. De acordo com a primeira estratégia foi obtida uma seleção das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição 3 (STAT3), subunidade p105 do fator nuclear NF-kappa-B (NFKB1), exportina-1 (CRM1), fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinase (PIK3), serina/treonina-proteína quinase mTOR (mTOR) e glutathione S-transferase P (GSTP1) para estudos de modelagem (SHRIVASTAVA et al., 2014; NIU et al., 2015; YAO et al., 2016; ZHENG et al., 2016).

A metodologia computacional empregada para predição de alvos consistiu no consenso de diferentes modelos de predições de interação alvo-composto modelo já aplicado em outros estudos anteriores. Todas as possíveis proteínas-alvo do composto **10** no Homo sapiens foram preditas usando os seguintes algoritmos: MolTarPred, Swisstarget Prediction, Targetnet Scbddd, Targetnet Scbddd Ensemble, RF QSAR, e PPB2 (YAO et al., 2016; LEE et al., 2017; PEÓN et al., 2017; DAINA et al., 2019; TEJERA et al., 2021; BELTRÁN-NOBOA et al., 2022).

Foram utilizados algoritmos PPB2 para realização da predição, sendo eles: PPB2-impressão digital de conectividade estendida (ECfp4 NN), PPB2- Impressão digital de forma e farmacóforo (Xfp NN), PPB2- Números Quânticos Moleculares (MQN NN), PPB2- Impressão digital de conectividade estendida (ECfp4 NNNB), PPB2- Forma e impressão digital do farmacóforo (Xfp NNNB), PPB2- Números quânticos moleculares (MQN NNNB), PPB2- Impressão digital de conectividade estendida (ECfp4 NB) e PPB2- Impressão digital de conectividade estendida DNN. Dessa forma, utilizando um total de 13 algoritmos para obter a predição das possíveis proteínas alvo do composto **10**. Para cada alvo, uma pontuação final foi calculada como:

$$FS_i = \sqrt{\bar{F}_i \frac{N_i}{M}}$$

Onde: F_i se trata da pontuação normalizada média do alvo i em todos os métodos que o prevêem, N é o número de métodos que identificam o i -ésimo alvo e M é o número de algoritmos de pesca de alvo empregados (LIU et al., 2019).

Para detectar possíveis proteínas relacionadas ao câncer e assim permitir maior especificidade para o estudo do composto **10**, foram utilizados dois bancos de dados diferentes: DriverDBv3 e Cancer Target Discovery and Development (CTD2) (AKSOY et al., 2017; OUTGHTRED et al., 2020). Em relação ao primeiro banco de dados, ele é um banco multi-ômico integrativo que compreende genes condutores organizados em diferentes tipos de câncer (total de 1457 genes). Já o segundo banco de dados são genes obtidos pelo Instituto Nacional do Câncer e pelo NIH com o objetivo de validar as descobertas da pesquisa em larga escala do genoma do câncer adulto e pediátrico e seu uso na medicina de precisão. A partir deste banco de dados, 89 genes classificados como alvos moleculares com diferentes níveis de evidência foram selecionados.

Devido alto número de alvos, foi construída uma rede de interação proteína-proteína com os 89 principais alvos do CTD2 restrito apenas a interações diretas usando o banco de dados BioGrid e Cytoscape (SHANNON et al., 2003; PEREZ-CASTILLO et al., 2020). Os 100 principais alvos candidatos obtidos a partir da abordagem de pesca de alvo de consenso foram filtrados para manter apenas aqueles também presentes na lista fornecida pela análise dos bancos de dados DriverDBv3 e CTD2.

6.6.2. Modelagem molecular

A modelagem molecular foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Lopes e colaboradores (2022) e Omega (2022). Uma estrutura tridimensional (3D) inicial do composto **10** foi gerada com OpenEye's Omega, e cargas atômicas parciais do tipo am1bcc foram adicionadas a ela com Molcharge. Os cálculos de encaixe foram realizados com Gold [83] (JONES et al., 1997; HAWKINS et al., 2010; QUAPAC, 2022).

Os sítios de ligação explorados para o composto **10** foram definidos a partir dos ligantes e inibidores co-cristalizados com as proteínas alvo quando estas estavam presentes em seus arquivos PDB. Foi o caso de NFkB (PDB 1SVC), CRM1 (PDB 6TVO), PI3K (PDB 4JPS), mTOR (PDB 4JSP), GSTP1 (PDB 5J41), MTNR1B (PDB 6ME6), MMP2 (PDB 1HOV), RIPK2 (PDB 5J79), DUSP3 (PDB 3F81) e MCL1 (PDB 6UDV). Para STAT3, apesar de utilizar o modelo disponível no repositório AlphaFold, a cavidade de ligação do ligante foi

definida após sobrepor este modelo com uma estrutura experimental da proteína em complexo com um inibidor (PDB 6NJS). No caso do AHR, o antagonista presente em um dos moldes do modelo identificado pelo servidor SwissModel (PDB 4ZQD) foi utilizado como referência para a definição da cavidade de ligação após a sobreposição estrutural com o modelo de homologia. Por outro lado, para a relação estrutura atividade biológica a região de ligação do ligante foi definida a partir do segmento de DNA que interage com ela na estrutura de raios-X (PDB 3GUT). Em todos os casos, a opção detectar cavidade do Gold foi ativada e a região de ligação foi definida como qualquer resíduo do receptor a uma distância inferior a 6 Å do ligante de referência.

Em sequência a função de pontuação ChemPLP foi selecionada para encaixe primário, gerando 30 hipóteses de ligação para cada alvo. O parâmetro de eficiência de busca de ouro foi definido como 200%. Os modos de ligação previstos foram reavaliados com as funções de pontuação GoldScore, ChemScore e ASP. Os valores de pontuação foram convertidos em Z-scores e agregados. Todas as conformações de ligantes com um valor de Z-score maior que um foram selecionadas para análises posteriores (LOPES et al., 2019; OMEGA, 2022).

6.6.3. Simulações de Dinâmica Molecular e Energias Livres de Ligação

As simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas com Amber 22. Os campos de força ff19SB, gaff2 e lipídio17 foram utilizados para a parametrização dos aminoácidos, composto **10** e lipídeos, respectivamente. O íon Zn^{2+} e seus resíduos de coordenação em MMP2 foram preparados de acordo com o modelo Cationic Dummy Atom (CaDA) (PANG et al., 2000; ARAÚJO et al., 2020; MACHADO et al., 2020; MAYO CLINIC, 2021; OMEGA, 2022).

Todos esses complexos foram colocados em caixas de octaedros truncados que foram solvatados com moléculas de água OPC, exceto a proteína de membrana MTNR1B. Foi neutralizado o excesso de cargas por realizar a adição de contra-íons Na^+ e Cl^- na concentração de 150 mM (PANG et al., 2000). Após solvatação dos sistemas, esses passaram por minimização da em dois estágios com todos os átomos, exceto os solventes contidos durante o primeiro deles. Todas as restrições foram liberadas para a segunda etapa de minimização de energia. Os sistemas de energia minimizada foram aquecidos de 0 K a 300 K e subsequentemente equilibrados a temperatura e pressão constantes.

Em sequência, os complexos com MTNR1B foram preparados com o servidor CHARM-GUI (KATSILA et al., 2016; GUTERRES et al., 2020). Membranas de camada dupla contendo 50 1-Palmitoil-2-oleoilglicero-3-fosfocolina (POPC), 50 1-Palmitoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (POPE) e 25 moléculas de colesterol (CHL) em cada lado foram construídas para incorporar esses sistemas. Neutralização das cargas em excesso nas proteínas solúveis. Em seguida minimização de energia, aquecimento e equilíbrio.

Os complexos foram configurados usando os arquivos de configuração fornecidos pelo CHARM-GUI. Cinco simulações MD curtas (4 ns) foram realizadas para cada um, incluindo a proteína de membrana. As velocidades atômicas iniciais foram inicializadas aleatoriamente para cada corrida de produção para assim garantir uma exploração diversificada do espaço conformacional dos complexos. Para todos os sistemas foram utilizados os mesmos parâmetros para as corridas de produção.

As energias livres de ligação foram estimadas usando os métodos MM-PBSA, de acordo com o script MMPBSA.py de Amber 22. Os cálculos foram realizados em 100 instantâneos MD selecionados uniformemente no intervalo de tempo de 1–4 ns cada uma das cinco execuções de produção. A força iônica para cálculos de MM-PBSA foi ajustada para 150 mM. Padrão implícito parâmetros de solvente foram empregados para os complexos do composto **10** com proteínas solúveis. Para MTNR1B foi usado um modelo implícito de membrana dielétrica heterogênea (memopt= 3). A espessura e o centro da membrana implícita foram definidos a partir das posições médias dos átomos N31 na bicamada explícita usada para simulações MD.

6.6.4. Previsões ADMET

Em relação aos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicologia (ADMET) do composto **10** foram previstas com os servidores SwissADME e pkCSM (PIRES et al., 2015; DAINA et al., 2017). A previsão das propriedades físico-químicas, bem como a análise PAINS, foram realizadas com SwissADME, enquanto o restante das previsões foram por realizadas com o servidor pkCSM.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. J.; DAI, M.; PELLEGRINO, G.; WAGNER, B. K.; STERN, A. M.; SHAMJI, A. F.; SCHREIBER, S. L. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 38, p. 15115–15120, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212802109>.
- ALBERICIO, F. Developments in peptide and amide synthesis. **Current opinion in chemical biology**, v. 8, n. 3, p. 211-221, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.03.002>.
- AKSOY, B. A.; DANČÍK, V.; SMITH, K.; MAZERIK, J. N.; JI, Z.; GROSS, B.; NIKOLOVA, O.; JABER, N.; CALIFANO, A.; SCHREIBER, S. L.; GERHARD, D. S.; HERMIDA, L. C.; JAGU, S.; SANDER, C.; FLORATOS, A.; CLEMONS, P. A. CTD2 Dashboard: A searchable web interface to connect validated results from the Cancer Target Discovery and Development Network. *Database* **2017**, 2017, 54. <https://doi.org/10.1093/database/bax054>.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Dados e Fatos sobre Câncer de 2017**. ACS [Online] Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-andstatistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>. [Acesso em: 09 de julho de 2018].
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE. Planejamento de experimentos e escolha dos modelos: hospedeiro e parasita. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. Editora Fiocruz, Brazil, p. 175–196, 2000.
- ARAÚJO, M. O.; PÉREZ-CASTILLO, Y.; OLIVEIRA, L. H. G.; NUNES, F. C.; DE SOUSA, D. P. Larvicidal Activity of Cinnamic Acid Derivatives: Investigating Alternative Products for *Aedes aegypti* L. Control. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 61, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules26010061>.
- ARAÚJO-VILGES, K. M. D.; OLIVEIRA, S. V. D.; COUTO, S. C. P.; FOKOUE, H. H.; ROMERO, G. A. S.; KATO, M. J.; KUCKELHAUS, S. A. S. Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p.1601–1607, 2017. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1313870>.
- ARGIRIS A.; KARAMOUZIS, M. V.; RABEN, D.; FERRIS, R.L. Head and neck cancer. **Lancet**, v. 371, n. 9625, p.1695-709, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60728-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60728-X).
- ARIOKA, S.; SAKAGAMI, M.; UEMATSU, R.; YAMAGUCHI, H.; TOGAME, H.; TAKEMOTO, H.; HINO, H.; NISHIMURA, S. I. Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Bioorg. Med. Chem**, v. 18, n. 4, p. 1633–1640, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.12.062>.

ATEWOLARA-ODULE, O. C.; AIYELAAGBE, O. O.; OLUBOMEHIN, O. O.; OGUNMOYE, A. O.; FEYISOLA, R. T.; SANUSI, A. S. Antioxidant activity of some secondary metabolites from *Tapinanthus bangwensis* (Engl., and K. Krause) [Loranthaceae] grown in Nigeria. **Scientific African**, v. 8, p. e00348, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00348>.

AZIZIAN, N. G.; LI, Y. XPO1-dependent nuclear export as a target for cancer therapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 61, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00903-4>.

BAILAR, J. C. Rethinking the war on cancer. **Issues in science and technology**, v. 4, n. 1, p. 16-21, 1987.

BAILAR, J. C. Cancer in Canada: recent trends in mortality. **Chronic Disease**, v. 13, p. Supl:S2-S8, 1992.

BAILAR, J. C. Deaths from all cancer: trends in sixteen countries. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 609, p. 49-56, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb32056.x>.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from *Piper* species. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 7–8, p. 539–543, 2005. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-7-805>.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n. 6, p. 801–807, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000600014>.

BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C.; CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.07.007>.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 28, n. 2, p. 156–163, 2008a. <https://doi.org/10.1002/jat.1261>.

BEZERRA, D. P.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; VASCONCELLOS, M. C.; SILVA, A. C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; HENRIQUES, J. A.; COSTA-LOTUFO,

L. V.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 652, n. 2, p. 164–174, 2008b. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.02.001>.

BEZERRA, D. P.; VASCONCELLOS, M. C.; MACHADO, M. S.; VILLELA, I. V.; ROSA, R. M.; MOURA, D. J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; AQUINO, N. C.; HENRIQUES, J. A.; SAFFI, J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 677, n. 1–2, p. 8–13, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.04.007>.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; SAKER-NETO, N.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453–463, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.003>.

BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; DE BEER, T. A.; TAURIELLO, G.; STUDER, G.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D313-D319, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>.

BISIGNANO, G.; SANOGO, R.; MARINO, A.; AQUINO, R.; ANGELO, V. D.; GERMANÒ, M. P.; PIZZA, C. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. **Letters in applied microbiology**, v. 30, n. 2, p. 105-108, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00692.x>.

BODE, J. W. Emerging methods in amide-and peptide-bond formation. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 9, n. 6, p. 765-775, 2006.

BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K. K.; SINGH, I. P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 4, p. 418–421, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0159-2>.

BOECK, P.; SÁ, M. M.; DE SOUZA, B. S.; CERCENA, R.; ESCALANTE, A. M.; ZACHINO, S. A.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. A simple synthesis of kaurenoic ester and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1360-1366, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800009>.

BOKESCH, H. R.; GARDELLA, R. S.; RABE, D. C.; BOTTARO, D. P.; LINEHAN, W. M.; MCMAHON, J. B.; MCKEE, T. C. A new hypoxia inducible factor-2 inhibitory pyrrolinone alkaloid from roots and stems of *Piper sarmentosum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 9, p. 1178-1179, 2011. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.1178>.

BOLLU, L. R.; MAZUMDAR, A.; SAVAGE, M. I.; BROWN, P. H. Molecular Pathways: Targeting Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer. **Clinical cancer research**, v. 23, n. 9, p. 2136–2142, 2017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0934>.

BOSTRÖM, J.; BROWN, D. G.; YOUNG, R. J.; KESERÜ, G. M. Expanding the medicinal chemistry synthetic toolbox. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 10, p. 922–922, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.116>.

BRAGANTE, K. C.; NASCIMENTO, D. M.; MOTTA, N. W.; Avaliação dos efeitos agudos da radioterapia sobre os movimentos mandibulares de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 16, n. 2, p. 141-147, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-35552012005000021>.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

BROWN, D. P.; DURUTLIC, H.; JUSTE, D. Spectroscopic Properties of Some Simple Esters. A Practical Application of Synthesis and Spectroscopy in the Undergraduate Organic Laboratory. **Journal of chemical education**, v. 81, n. 7, p. 1016, 2004. <https://doi.org/10.1021/ed081p1016>.

BUT, T. Y.; TOY, P. H. The Mitsunobu reaction: origin, mechanism, improvements, and applications. **Chemistry-An Asian Journal**, v. 2, n. 11, p. 1340-1355, 2007. <https://doi.org/10.1002/asia.200700182>.

CADONI, G.; BOCCIA, S.; PETRELLI, L.; DI GIANNANTONIO, P.; ARZANI, D.; GIORGIO, A.; DE FEO, E.; PANDOLFINI, M.; GALLÌ, P.; PALUDETTI, G.; RICCIARDI, G. A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism. **ACTA otorhinolaryngologica italica**, v. 32, n. 1, p. 1, 2012.

CALVALCANTE, P. M. M.; DA SILVA, R. L.; DE FREITAS, J. J. R.; DE FREITAS, J. C. R.; DE FREITAS FILHO, J. R. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, n. 4, p. 319-329, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.07.003>.

CAPOTE-MORENO, A.; BRABYN, P.; MUÑOZ-GUERRA, M. F.; SASTRE-PÉREZ, J.; ESCORIAL-HERNANDEZ, V.; RODRÍGUEZ-CAMPO, F. J.; GARCÍA, T.; NAVAL-GÍAS, L. Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 49, n. 12, p. 1525-1534, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2020.03.009>.

CAMP, D.; VON ITZSTEIN, M.; JENKINS, I. D. The mechanism of the first step of the Mitsunobu reaction. **Tetrahedron**, v. 71, n. 30, p. 4946-4948, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.05.099>.

CAREY, J. S.; LAFFAN, D.; THOMSON, C.; WILLIAMS, M. T. Analysis of the Reactions Used for the Preparation of Drug Candidate Molecules. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 4, n. 12, p. 2337–2347, 2006. <https://doi.org/10.1039/b602413k>.

CASE, D. A.; AKTULGA, H. M.; BELFON, K.; et al., **AMBER 2022**. University of California, San Francisco; 2022.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomedical and environmental sciences**, v. 1, n. 1, p. 19–33, jun. 1988.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2012. **Chagas Disease: What U.S. Clinicians Need to Know**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/cme/chagas/lesson_1/3.html>. Acesso em: 25 jun. 2023.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.

CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et biophysica acta*. **Molecular basis of disease**, v. 1866, n. 5, p. 165689, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165689>.

CHEN, Y. Z.; ZHI, D. G. Ligand–protein inverse docking and its potential use in the computer search of protein targets of a small molecule. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 43, n. 2, p. 217-226, 2001. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010501\)43:2<217::aid-prot1032>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010501)43:2<217::aid-prot1032>3.0.co;2-g).

CHEN, Y. C.; LIAO, C. H.; CHEN, I. S. Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2101, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.05.003>.

CHEN, Y.; LIU J. M.; XIONG, X. X.; QIU, X. Y.; PAN, F.; LIU, D.; LAN, S. J.; JIN, S.; YU, S. B.; CHEN, X. Q. Piperlongumine selectively kills hepatocellular carcinoma cells and preferentially inhibits their invasion via ROS-ER-MAPKs-CHOP. **Oncotarget**, v. 6, n. 8, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3444>.

CHEN, Y. J.; KUO, C. C.; TING, L. L.; LU, L. S.; LU, Y. C.; CHENG, A. J.; LIN, Y. T.; CHEN, C. H.; TSAI, J. T.; CHIOU, J. F. Piperlongumine inhibits cancer stem cell properties and regulates multiple malignant phenotypes in oral cancer. **Oncology letters**, v. 15, n. 2, p. 1789-1798, 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7486>.

CHEUKA, P. M.; MAYOKA, G.; MUTAI, P.; CHIBALE, K. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 58, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules22010058>.

CHIPOLINE, I.C.; DA FONSECA, A.C.C.; DA COSTA, G.R.M.; DE SOUZA, M.P.; RABELO, V.W.-H.; DE QUEIROZ, L.N.; DE SOUZA, T.L.F.; DE ALMEIDA, E.C.P.; ABREU, P.A.; PONTES, B.; FRANCISCO FERREIRA, V.; DE CARVALHO DA SILVA, F.; ROBBS, B. K. Molecular mechanism of action of new 1,4-naphthoquinones tethered to 1,2,3-1H- triazoles with cytotoxic and selective effect against oral squamous cell carcinoma. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, n. 103984, p. 1-55, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103984>.

CHOW, L. Q. M. Head and neck cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 1, p. 60-72, 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1715715>.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. ORGANIC CHEMISTRY, Segunda Edição, Oxford, 2012.

COHEN, E. E. W.; BELL, R. B.; BIFULCO, C. B.; BURTNES, B.; GILLISON, M. L.; HARRINGTON, K. J.; LE, Q. T.; LEE, N. Y.; LEIDNER, R.; LEWIS, R. L.; LICITRA, L.; MEHANNA, H.; MELL, L. K.; RABEN, A.; SIKORA, A. G.; UPPALURI, R.; WHITWORTH, F.; ZANDBERG, D. P.; FERRIS, R. L. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 7, n. 184, p. 1-31, 2019. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0662-5>. 1-31.

COMMISSION OF REORGANIZATION OF TEN TCM Classics, 2018. Shennong's Herbal, vol. 1. China Medical Science Press, Beijing, pp. p007.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P.; MADEIRA, S. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. E.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual de Quím**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100006>.

COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C.; MERÇON, F. Confirmando a Esterificação de Fischer por Meio dos Aromas. **Química Nova na Escola**, v. 19, n.1, p. 36, 2004.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICALLELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703–711, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00044-008-9161-9>.

CUPIDO, T.; TULLA-PUCHE, J.; SPENGLER, J.; ALBERICIO, F. The synthesis of naturally occurring peptides and their analogs. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 10, n. 6, p. 768-783, 2007.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, p. 42717, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

DALEY, S. K.; CORDELL, G. A. Alkaloids in contemporary drug discovery to meet global disease needs. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3800, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26133800>.

DA NÓBREGA, F. R.; OZDEMIR, O.; SOUSA, S. C. S. N.; BARBOZA, J. N.; TURKEZ, H.; DE SOUSA, D. P. Piplartine Analogues and Cytotoxic Evaluation against Glioblastoma. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1382, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23061382>.

DA NÓBREGA, F. R.; SILVA, L. V.; BEZERRA FILHO, C. D. S. M.; LIMA, T. C.; CASTILLO, Y. P.; BEZERRA, D. P.; SOUSA, D. P. D. Design, Antileishmanial Activity, and QSAR Studies of a Series of Piplartine Analogues. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4785756>.

DA SILVA, F. A. ROUSSENQ, S. C.; TAVARES, M. G. S.; DE SOUZA, C. P. F.; MOZZINI, C. B.; BENETTI, M.; DIAS, M. Perfil epidemiológico dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um centro oncológico no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2020. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2020v66n1.455>.

DAVIDSON, C. D.; GILLIS, N. E.; CARR, F. E. Thyroid Hormone Receptor Beta as Tumor Suppressor: Untapped Potential in Treatment and Diagnostics in Solid Tumors. **Cancers**, v. 13, n.17, p. 4254, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13174254>.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; & KAWANO, T. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357–364, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.021>.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; NAKANO, E. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 222–227, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.07.004>.

DE MORAES, J.; KEISER, J.; INGRAM, K.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; BITTENCOURT, C. R.; BEMQUERER, M. P.; LEITE, J. R.; KATO, M. J., NAKANO, E. In vitro synergistic interaction between amide pipartine and antimicrobial peptide dermaseptin against Schistosoma mansoni schistosomula and adult worms. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 2, p. 301-309, 2013.

DÍAZ-BELLO, Z.; THOMAS, M. C.; LÓPEZ, M. C.; ZAVALA-JASPE, R.; NOYA, O.; DE NOYA, B. A.; ABATE, T. A. Genotipagem de *Trypanosoma cruzi* suporta uma fonte comum de infecção em um surto escolar de doença de Chagas aguda na Venezuela. **Epidemiologia Infecção**, v. 142, p. 156–162, 2014.

DICKMANN, A.; MONECKE, T.; FICNER, R. Structural Basis of Targeting the Exportin CRM1 in Cancer. **Cells**, v. 4, n. 3, p. 538–568, 2015. <https://doi.org/10.3390/cells4030538>.

DÖBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer metastasis reviews**, v. 24, n. 1, p. 9-17, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5044-42>.

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDI). 2021. **Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease**. Disponível em: < Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease | DNDi > . Acesso em: 25 jun. 2023.

DUH, C. Y.; WU, Y. C.; WANG, S. K. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aboescens*. **Journal of natural products**, v. 53, n. 6, p. 1575–1577, 1990a.

DUH, C.Y., WU, Y.C., WANG, S.K. Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper aboescens*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2689–2691, 1990b. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85215-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85215-2).

EMAMI, S.; GHANBARIMASIR, Z. Recent advances of chroman-4-one derivatives: Synthetic approaches and bioactivities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 93, p. 539–563, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.048>.

ESCUDERO-MARTÍNEZ, J. M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M.; CASTRO, M. Á.; ROJO, M. V.; SANTIAGO C.; ABAD, A.; GARCÍA, P. A.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; SAN FELICIANO, A.; BALAÑA-FOUCE, R. et al. Antileishmanial activity and tubulin polymerization inhibition of podophyllotoxin derivatives on *Leishmania infantum*. **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v. 7, n. 3, p. 272–285, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.06.003>.

ETCHIN, J.; SUN, Q.; KENTSIS, A.; FARMER, A.; ZHANG, Z.C.; SANDA, T.; MANSOUR, M.; BARCELÓ, C.; MCCAULEY, D.; KAUFFMAN, M.; SHACHAM, S.; CHRISTIE, A. L.; KUNG, A. L.; RODIG, S. J.; CHOOK, Y. M.; LOOK, A. T. Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells. **Leukemia**, v. 27, n. 1, p. 66–74, 2012. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.219>.

FAGET, D. V.; LUCENA, P. I.; ROBBS, B. K.; VIOLA, J. P. B. NFAT1 C-Terminal Domains Are Necessary but Not Sufficient for Inducing Cell Death. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47868, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047868>.

FAN, X.; SONG, J.; ZHAO, Z.; CHEN, M.; TU, J.; LU, C.; WU, F.; ZHANG, D.; WENG, Q.; ZHENG, L.; XU, M.; JI, J. Piplartine suppresses proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma by LINC01391-modulated Wnt/ β -catenin pathway inactivation through ICAT. **Cancer letter**. 2019, 460, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.06.008>.

FELIPE, F. C. B.; SOUSA-FILHO, J. T.; SOUZA, L. E. O.; SILVEIRA, J. A.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; VIANA, G. S. B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, n. 9, p. 605–612, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.12.015>.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International journal of cancer**, 2021. 10. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.

FERREIRA, L.; TUNISSIOLLI, N. Câncer de cabeça e pescoço: Fatores de risco, sinais e sintomas. *Nanocells News*. v. 5, n. 2, p. 1-5, 2017. <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2017.11.18.003>.

FERREIRA, B.I.; CAUTAIN, B.; GRENHO, I.; LINK, W. Small Molecule Inhibitors of CRM1. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00625>.

FILHO, C. S. M. B.; DE MENEZES, R. R. P. P. B.; MAGALHÃES, E. P.; CASTILLO, Y. P.; MARTINS, A. M. C.; DE SOUSA, D. P. Piplartine-Inspired 3,4,5-Trimethoxycinnamates: Trypanocidal, Mechanism of Action, and In Silico Evaluation. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4512, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28114512>.

FITZMAURICE, C. et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>.

FONSECA, A. C. C. D.; DE QUEIROZ, L. N.; SALES FELISBERTO, J.; JESSÉ RAMOS, Y.; MESQUITA MARQUES, A.; WERMELINGER, G. F.; PONTES, B.; DE LIMA MOREIRA, D.; ROBBS, B. K. Cytotoxic effect of pure compounds from Piper rivinoides Kunth against oral squamous cell carcinoma. **Natural Product Research**, v. 35, n. 24, p. 6163-6167, 2021. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1831494>.

FONTENELE, J. B.; LEAL, L. K.; SILVEIRA, E. R.; FELIX, F. H.; FELIPE, F. C. B.; VIANA, G. S. Antiplatelet effects of piplartine, an alkamide isolated from Piper tuberculatum: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 511–515, 2009. <https://doi.org/10.1211/jpp.61.04.0014>.

FORSTER, M. D.; DEVLIN, M. J. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 310, 2018. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00310>.

GARCIA, E.; COA, J. C.; OTERO, E.; CARDA, M.; VELEZ, I. D.; ROBLEDO, S. M.; CARDONA, W. I. Synthesis, and antiprotozoal activity of furanchalcone-quinoline, furanchalcone-chromone and furanchalcone-imidazole hybrids. **Med. Chem. Res**, v. 27, n. 2, p. 497–511, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2076-6>.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 1999. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.

GILLISON, M. L. et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. **Lancet**, v. 393, p. 40–50, 2019. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32779-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32779-X).

GINZBURG, S.; GOLOVINE, K. V.; MAKHOV, P. B.; UZZO, R. G.; KUTIKOV, A.; KOLENKO, V. M. Piperlongumine inhibits NF- κ B activity and attenuates aggressive growth characteristics of prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 74, n. 2, p. 177-186, 2014. <https://doi.org/10.1002/pros.22739>.

GOLOVINE, K. V.; MAKHOV, P. B.; TEPPER, E.; KUTIKOV, A.; CANTER, D.; UZZO, R. G.; KOLENKO, V. M. Piperlongumine induces rapid depletion of the androgen receptor in human prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 73, n. 1, p. 23–30, 2013. <https://doi.org/10.1002/pros.22535>.

GOLOVINE, K.; MAKHOV, P.; NAITO, S.; RAIYANI, H.; TOMASZEWSKI, J.; MEHRAZIN, R.; TULIN, A.; KUTIKOV, A.; UZZO, R. G.; KOLENKO, V. M. Piperlongumine and its analogs down-regulate expression of c-Met in renal cell carcinoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 16, n. 5, p. 743-749, 2015.

GOMES, K. S.; DA COSTA-SILVA, T. A.; OLIVEIRA, I. H.; AGUILAR, A. M.; OLIVEIRA-SILVA, D.; UEMI, M.; SILVA, W. A.; MELO, L.R.; ANDRADE, C. K. Z.; TEMPONE, A. G.; BALDIM, J. L.; LAGO, J. H. G. Structure-activity relationship study of antitrypanosomal chalcone derivatives using multivariate analysis. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 29, n. 12, p. 1459–1462, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.04.020>

GREEN, R. A.; PLETCHER, D.; LEACH, S. G.; BROWN, R. C. D. N-Heterocyclic Carbene-Mediated Oxidative Electrosynthesis of Esters in a Microflow Cell. **Organic letters**, v. 17, n. 13, p. 3290–3293, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01459>.

GUTERRES, H.; IM, W. Improving Protein-Ligand Docking Results with High-Throughput Molecular Dynamics Simulations. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 4, p. 2189–2198, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00057>.

HAANEN, J. B. A. G.; CARBONNE, F.; ROBERT, C.; KERR, K. M.; PETERS, S.; LARKIN, J.; JORDAN, K. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 28, p. 119-42, 2017. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx225>.

HAKEM, R.; HAKEM, A.; DUNCAN, G. S.; HENDERSON, J. T.; WOO, M.; SOENGAS, M. S.; ELIA, A.; DE LA POMPA, J. L.; KAGI, D.; KHOO, W.; POTTER, J.; YOSHIDA, R.; KAUFMAN, S. A.; LOWE, S. W.; PENNINGER, J. M.; MAK, T. W. Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathways In Vivo. **Cell**, 1998, 94, 339–352. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81477-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81477-4).

HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; WARREN, G. L.; ELLINGSON, B. A.; STAHL, M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality

Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 4, p. 572–584, 2010. <https://doi.org/10.1021/ci100031x>.

HERAVI, M. M., GHALAVAND, N.; GHANBARIAN, M.; MOHAMMADKHANI, L. Applications of Mitsunobu reaction in total synthesis of natural products. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 9, p. e4464, 2018. <https://doi.org/10.1002/aoc.4464>.

HEUBLEIN, S.; MAYR, R.; MEINDL, A.; ANGELE, M.; GALLWAS, J.; JESCHKE, U.; DITSCH, N. Thyroid Hormone Receptors Predict Prognosis in BRCA1 Associated Breast Cancer in Opposing Ways. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127072, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127072>.

HONÓRIO, K. M.; GARRATT, R. C.; POLIKARPOV, I.; & ANDRICOPULO, A. D. 3D QSAR comparative molecular field analysis on nonsteroidal farnesoid X receptor activators. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 6, p. 921-927, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.09.003>.

HOTEZ, P. J., MOLYNEUX, D. H., FENWICK, A., KUMARESAN, J., SACHS, S. E., SACHS, J. D., & SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007. <https://doi.org/10.1056/NEJMra064142>.

HUANG, H. W.; TANG, J. Y.; OU-YANG, F.; WANG, H. R.; GUAN, P. Y.; HUANG, C. Y.; CHEN, C. Y.; HOU, M. F.; SHEU, J. H.; CHANG, H. W. Sinularin Selectively Kills Breast Cancer Cells Showing G2/M Arrest, Apoptosis, and Oxidative DNA Damage. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 849, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23040849>.

HUNTER, K. U.; JOLLY, S. Clinical review of physical activity and functional considerations in head and neck cancer patients. **Supportive Care Cancer**, v. 21, n. 5, p. 1475-9, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00520-013-1736-4>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). 2022. A vigilância de câncer fornece os subsídios para que os gestores monitorem e organizem as ações para o controle de câncer. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/introducao> >. Acesso em: 18 Outubro de 2023.

IRANPOOR, N.; FIROUZABADI, H.; RIAZI, A., PEDROOD, K. Regioselective hydrocarbonylation of phenylacetylene to α,β -unsaturated esters and thioesters with $\text{Fe}(\text{CO})_5$ and $\text{Mo}(\text{CO})_6$. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 822, n. C, p. 67-73, 2016.

IWASHITA, M.; OKA, N.; OHKUBO, S.; SAITO, M.; NAKAHATA, N. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A_2 receptor antagonist. **European journal of pharmacology**, v. 570, n. 1–3, p. 38–42, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.05.073>.

JACKSON, Y.; WYSSA, B.; CHAPPUIS, F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 690–696, 2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz473>.

- JIN, H. O.; PARK, J. A.; KIM, H. A.; CHANG, Y. H.; HONG, Y. J.; PARK, I. C.; LEE, J. K. Piperlongumine downregulates the expression of HER family in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 486, n. 4, p. 1083-1089, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.166>.
- JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 2, p. 990-4, 1980. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.2.990>.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.
- JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-265, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>.
- JYOTHI, D.; VANATHI, P.; GOWRI, P. M.; RAO, V. R. S.; RAO, J. M.; SREEDHAR, A. S. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from Piper chaba. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1085-1091, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.023>.
- KASTURE, V. S.; KATTI, S. A.; MAHAJAN, D.; WAGH, R.; MOHAN, M.; KASTURE S. B. Antioxidant and Antiparkinson Activity of Gallic Acid Derivatives. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 385-395, 2009.
- KATSILA, T.; SPYROULIAS, G.A.; PATRINOS, G.P.; MATSOUKAS, M. T. Computational approaches in target identification and drug discovery. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 14, p. 177-184, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.04.004>.
- KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulinbinding agents. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194-204, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrc2803>.
- KHAN, T. A.; AL NASR, I. S.; KOKO, W. S.; MA, J.; ECKERT, S.; BREHM, L.; SAID, R. B.; DAOUD, I.; HANACHI, R.; RAHALI, S.; SANDE, W. W. J. V.; & BIRSACK, B. Evaluation of the Antiparasitic and Antifungal Activities of Synthetic Piperlongumine-Type Cinnamide Derivatives: Booster Effect by Halogen Substituents. **ChemMedChem**, v. 18, n. 12, p. e202300132, 2023.
- KEISER, M. J.; ROTH, B. L.; ARMBRUSTER, B. N.; ERNSBERGER, P.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 197-206, 2007. <https://doi.org/10.1038/nbt1284>.
- KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-221, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>.
- KONG, E. H.; KIM, Y. J.; KIM, Y. J.; CHO, H. J.; YU, S. N.; KIM, K. Y.; CHANG, J. H.; AHN, S.C. Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. **Oncology reports**, v. 20, n. 4, p. 785-792, 2008. https://doi.org/10.3892/or_00000075.

- KUMAR, S.; KAMBOJ, J.; SUMAN; SHARMA, S. Overview for various aspects of the health benefits of piper longum linn. Fruit. **Journal Acupuncture and Meridian Studies**, v.4, n. 2, p. 134–140, 2011. [https://doi.org/10.1016/S2005-2901\(11\)60020-4](https://doi.org/10.1016/S2005-2901(11)60020-4).
- KUMAR, G.; DEGHEIDY, H.; CASEY, B. J.; GOERING, P. L. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and chemical toxicology**, v. 85, p. 45-51, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.012>.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>.
- LEE, S. E.; PARK, B. S.; HUH, T. L.; LEE, E. W.; YUM, J. H. Proteomic evaluation on antiplatelet activity of piperlongumine derived from Piper longum. **Molecular & cellular toxicology**, v. 6, n. 3, p. 295–303, 2010. <https://doi.org/10.1007/s13273-010-0040-3>.
- LEI, Y.; AN, Q.; SHEN, X. F.; SUI, M.; LI, C.; JIA, D.; LUO, Y.; SUN, Q. Structure-Guided Design of the First Noncovalent Small- Molecule Inhibitor of CRM1. **Journal of medicinal chemistry**, v. 64, n. 10, p. 6596–6607, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01675>.
- LEITE, M. A. C.; NOGUEIRA, D. A.; TERRA, F. S. Avaliação da autoestima em pacientes oncológicos submetidos a tratamento quimioterápico. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 6, p.1082-9, 2015. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.0575.26529>.
- LIMA, D. B.; SOUSA, P. L.; TORRES, A. F.; RODRIGUES, K. A.; MELLO, C. P.; MENEZES, R. R.; TESSAROLO, L. D.; QUINET, Y. P.; DE OLIVEIRA, M. R.; MARTINS, A. M. Antiparasitic effect of Dinoponera quadricaps giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128-32, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.008>.
- LIN, Z.; LIAO, Y.; VENKATASAMY, R.; HIDER, R. C.; SOUMYANATH, A. Amides from Piper nigrum L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in vitro. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, n. 4, p 529–536, 2007. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.4.0007>.
- LIU, Q. R.; LIU, J. M.; CHEN, Y.; XIE, X. Q.; XIONG, X. X.; QIU, X. Y.; PAN, F.; LIU, D.; YU, S. B.; CHEN, X. Q. Piperlongumine inhibits migration of glioblastoma cells via activation of ROS-dependent p38 and JNK signaling pathways. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 1-12, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/653732>.
- LIU, F.; HUAI, Z.; XIA, G.; SONG, L.; LI, S.; XU, Y.; HONG, K.; YAO, M.; LIU, G.; HUANG, Y. Synthesis and antitumor activity of novel 6, 7, 8-trimethoxy N-aryl-substituted-4-aminoquinazoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 14, p. 2561-2565, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.05.033>.
- LIU, S. H.; SHEN, P. C.; CHEN, C. Y.; HSU, A. N.; CHO, Y. C.; LAI, Y. L.; CHEN, F. H.; LI, C. Y.; WANG, S. C.; CHEN, M.; CHUNG, I. F.; CHENG, W. C. DriverDBv3: A multi-omics database for cancer driver gene research. **Nucleic acids research**, v. 48, p. D863–D870, 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz964>.

- LOPES, S. P.; CASTILLO, Y. P.; MONTEIRO, M. L.; DE MENEZES, R. R.; ALMEIDA, R. N.; MARTINS, A.; SOUSA, D. P. Trypanocidal Mechanism of Action and in silico Studies of *p*-Coumaric Acid Derivatives. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 5916, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20235916>.
- LOPES, S. P.; YEPES, L. M.; PÉREZ-CASTILLO, Y.; ROBLEDO, S. M.; DE SOUSA, D. P. Alkyl and Aryl Derivatives Based on *p*-Coumaric Acid Modification and Inhibitory Action against *Leishmania braziliensis* and *Plasmodium falciparum*. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3178, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25143178>.
- LUCENA, P. I. FAGET, D. V.; PACHULEC, E.; ROBAINA, M. C.; KLUMB, C. E.; ROBBS, B. K.; VIOLA, J. P. NFAT2 isoforms differentially regulate gene expression, cell death, and transformation through alternative N-terminal domains. **Molecular and cellular biology**, v. 36, n. 1, p. 119-131, 2016. <https://doi.org/10.1128/MCB.00501-15>.
- LYU, J.; WANG, S.; BALIUS, T. E.; SINGH, I.; LEVIT, A.; MOROZ, Y. S.; O'MEARA, M. J.; CHE, T.; ALGAA, E.; TOLMACHOVA, K.; TOLMACHEV, A. A.; SHOICHET, B. K.; ROTH, B. L.; IRWIN, J. J. Ultra-large library docking for discovering new chemotypes. **Nature**, v. 566, n. 7743, p. 224-229, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0917-9>.
- MACHADO, M. R.; PANTANO, S. Split the Charge Difference in Two! A Rule of Thumb for Adding Proper Amounts of Ions in MD Simulations. **Journal of chemical theory and computation**, v. 16, n. 3, p. 1367–1372, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00953>.
- MACHADO, T. Q.; FELISBERTO, J. R. S.; GUIMARÃES, E. F.; DE QUEIROZ, G. A.; DA FONSECA, A. C. C.; RAMOS, Y. J.; MARQUES, A. M.; MOREIRA, D. D. L.; ROBBS, B. K. Apoptotic effect of β -pinene on oral squamous cell carcinoma as one of the major compounds from essential oil of medicinal plant *Piper rivinoides* Kunth. **Natural product research**, v. 36, p. 1636–1640, 2021. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1895148>.
- MACHIELS, J. P., LEEMANS, C. R., GOLUSINSKI, W., GRAU, C., LICITRA, L., & GREGOIRE, V. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 11, p. 1462-1475, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>.
- MAHAVORASIRIKUL, W.; VIYANANT, V.; CHAIJAROENKUL, W.; ITHARAT, A.; NA-BANGCHANG, K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 10, n. 55, p. 1-8, 2010. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-55>.
- MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. D. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000800026>.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo Clinic proceedings**, v. 83, n. 4, p. 489-501, 2008. <https://doi.org/10.4065/83.4.4894>.

MATHERS, COLIN D.; EZZATI, MAJID; LOPEZ, ALAN D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 1, n. 2, p. e114, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000114>.

MATSUBARA, T.; ITO, T. Quantum Mechanical and Molecular Dynamics Studies of the Reaction Mechanism of the Nucleophilic Substitution at the Si Atom. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, n. 17, p. 2636-2646, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02308>.

MÄRZ, M.; CHUDоба, J.; KOHOUT, M.; CIBULKA, R. Photocatalytic esterification under Mitsunobu reaction conditions mediated by flavin and visible light. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1970-1975, 2017. <https://doi.org/10.1039/C6OB02770A>.

MEEGAN, M. J.; NATHWANI, S.; TWAMLEY, B.; ZISTERER, D. M.; O'BOYLE, N. M. Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 453-463, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.048>.

MEHANNA, H. et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomaviruspositive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. **Lancet**, v. 393, p. 51-60, 2019. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32752-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32752-1).

MILLER, B. R.; MCGEE, T. D.; SWAILS, J. M.; HOMEYER, N.; GOHLKE, H.; ROITBERG, A. E.; MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. **Journal of chemical theory and computation**, v. 8, n. 9, p. 3314-21, 2012. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>.

MITSUNOBU, O.; YAMADA, M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 40, n. 10, p. 2380-2382, 1967. <https://doi.org/10.1246/bcsj.40.2380>.

MONCAYO, ÁLVARO; SILVEIRA, ANTONIO CARLOS. Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: Epidemiology, surveillance, and health policies. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 59-88, 2017. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900005>.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Molecular modeling of proteins**, p. 365-382, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19.

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. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MOURAD, M.; JETMORE, T.; JATEGAONKAR, A. A.; MOUBAYED, S.; MOSHIER, E.; URKEN, M.L. Epidemiological trends of head and neck cancer in the United States: a SEER population study. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 75, n. 12, p. 2562-72, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.05.008>.

MUSKAWAR, P. N.; THENMOZHI, K.; GAJBHIYE, J. M.; BHAGAT, P. R.; Facile esterification of carboxylic acid using amide functionalized benzimidazolium dicationic ionic liquids. **Applied Catalysis A: General**, v. 482, p. 214-220, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.06.004>.

NAIKA, R.; PRASANNA, K. P.; GANAPATHY, P. S. S. Antibacterial activity of piperlongumine an alkaloid isolated from methanolic root extract of *Piper Longum* L. **Pharmacophore**, v. 1, n. 2, p. 141-148, 2010.

NAREDDY, P.; JORDAN, F.; BRENNER-MOYER, S. E.; SZOSTAK, M. Ruthenium (II)-catalyzed regioselective C-H arylation of cyclic and N, N-dialkyl benzamides with boronic acids by weak coordination. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 7, p. 4755-4759, 2016.

NARUSE, T.; YANAMOTO, S.; MATSUSHITA, Y.; SAKAMOTO, Y.; MORISHITA, K.; OHBA, S.; SHIRAISHI, T.; YAMADA, S. I.; ASAHINA, UMEDA, M. Cetuximab for the treatment of locally advanced and recurrent/metastatic oral cancer: An investigation of distant metastasis. **Molecular and clinical oncology**, v. 5, n. 2, p. 246-252, 2016. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.928>

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00226-0).

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). 2022. **What Is Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 16 Fevereiro de 2022.

NIU, M.; XU, X.; SHEN, Y.; YAO, Y.; QIAO, J.; ZHU, F.; ZENG, L.; LIU, X.; XU, K. Piperlongumine is a novel nuclear export inhibitor with potent anticancer activity. **Chemico-biological interactions**, v. 237, p. 66-72, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.05.016>.

NUNES-XAVIER, C. E.; AURTENETXE, O.; ZALDUMBIDE, L.; LÓPEZ-ALMARAZ, R.; ERRAMUZPE, A.; CORTÉS, J. M.; LÓPEZ, J. I.; PULIDO, R. Protein tyrosine phosphatase PTPN1 modulates cell growth and associates with poor outcome in human neuroblastoma. **Diagnostic pathology**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0919-9>.

- NOVAK, I.; KOVAČ, B. Electronic structure of antibiotic erythromycin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 550-552, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.11.076>.
- OBRECHT, D.; et al. 1-Phenylalanine cyclohexylamide: a simple and convenient auxiliary for the synthesis of optically pure α , α -disubstituted (R)-and (S)-amino acids. **Helvetica chimica acta**, v. 78, n. 3, p. 563-580, 1995.
- O'CONNOR, J. E.; VARGAS, J. L.; KIMLER, B. F.; HERNANDEZ-YAGO, J.; GRISOLIA, S. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 151, n. 1, p. 568-573, 1988. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(88\)90632-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(88)90632-8).
- OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n.1, p. 152-167, 2014. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140012>.
- OMEGA. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. Disponível em: <http://www.eyesopen.com> (Acessado em 20 de outubro de 2022).
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). 2016. **Câncer. O que é câncer?** [Online]. Genebra. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en>. (Acesso: 09 de julho de 2018).
- ORR, G. A.; VERDIER-PINARD, P.; MCDAID, H.; HORWITZ, S. B. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7280-7295, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206934>.
- OUGHTRED, R.; RUST, J.; CHANG, C.; BREITKREUTZ, B.; STARK, C.; WILLEMS, A.; BOUCHER, L.; LEUNG, G.; KOLAS, N.; ZHANG, F.; DOLMA, S.; COULOMBE-HUNTINGTON, J.; CHATR-ARYAMONTRI, A.; DOLINSKI, K.; TYERS, M. TheBioGRIDdatabase: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. **Protein science**, v. 30, p. 187-200, 2020. <https://doi.org/10.1002/pro.3978>.
- PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 18, p. 3-22, set. 2003.
- PAGLIARI, A. B.; BONACORSO, H. G.; HORNER, M. **Amidas aromáticas como modelos supramoleculares: de polimorfos a cocristais**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- PANG, Y. P; Novel Zinc Protein Molecular Dynamics Simulations: Steps Toward Antiangiogenesis for Cancer Treatment. **Journal of Molecular Modeling**, v. 5, p. 196-202, 1999. <https://doi.org/10.1007/s008940050119>.

- PANG, Y. P.; XU, K.; E. YAZAL, J.; PRENDERGAS, F. G. Successful molecular dynamics simulation of the zinc-bound farnesyltransferase using the cationic dummy atom approach. **Protein science**, v. 9, n. 10, p. 1857–1865, 2000.
- PARK, B. S.; SON, D. J.; PARK, Y. H.; KIM, T. W.; LEE, S. E. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. **Phytomedicine**, v. 14, n. 12, p. 853–855, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.06.011>.
- PARK, B. S.; SON, D. J.; CHOI, W. S.; TAKEOKA, G. R.; HAN, S. O.; KIM, T. W.; LEE, S. E. Antiplatelet activities of newly synthesized derivatives of piperlongumine. **Phytotherapy research**, v. 22, n. 9, p. 1195–1199, 2008. <https://doi.org/10.1002/ptr.2432>.
- PASHA, F. A.; SRIVASTAVA, H. K.; SINGH, P. P. Comparative QSAR study of phenol derivatives with the help of density functional theory. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 24, p. 6823–6829, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.064>.
- PASSALACQUA, T. G.; DUTRA, L. A.; DE ALMEIDA, L.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; TORRES, F. A. E.; YAMASAKI, P. R.; SANTOS, M. B.; REGASINI, L. O.; MICHELS, P. A. M.; BOLZANI, V. S.; GRAMINHA, M. A. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 16, p. 3342–3345, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.072>.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PATTABIRAMAN, V. R.; BODE, J. W. Rethinking amide bond synthesis. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 471–479, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10702>.
- PEIXOTO, J. F.; RAMOS, Y. J.; DE LIMA MOREIRA, D.; ALVES, C. R.; GONÇALVES-OLIVEIRA, L. F. Potential of *Piper* spp. as a source of new compounds for the leishmaniasis treatment. *Parasitol Res*, v. 120, n. 8, p. 2731–2747, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07199-4>.
- PEREZ-CASTILLO, Y.; LIMA, T. C.; FERREIRA, A. R.; SILVA, C. R.; CAMPOS, R. S.; NETO, J. B. A.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; JÚNIOR, H. V. N.; DE SOUSA, D. P. Bioactivity and Molecular Docking Studies of Derivatives from Cinnamic and Benzoic Acids. **BioMed research international**, v. 2020, p. 1–13, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6345429>.
- PEREZ-CASTILLO, Y.; MONTES, R. C.; DA SILVA, C. R.; NETO, J. B. A.; DIAS, C. D. S.; BRUNNA SUCUPIRA DUARTE, A.; JÚNIOR, H. V. N.; DE SOUSA, D. P. Antifungal Activity of *N*-(4-Halobenzyl) amides against *Candida* spp. and Molecular Modeling Studies. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 1, p. 419, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms23010419>.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.

POLI, G.; GRANCHI, C.; RIZZOLIO, F.; TUCCINARDI, T. Application of MM-PBSA Methods in Virtual Screening. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1-19, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25081971>.

QUACPAC. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. (Online) Disponível em: <http://www.eyesopen.com> (Acessado em 20 de Outubro de 2022).

QUIJIA, C. R.; ARAUJO, V. H.; CHORILLI, M. Piperine: Chemical, biological and nanotechnological applications. **Acta Pharm**, 2021, v. 71, n. 2, p. 185–213., 2021. <https://doi.org/10.2478/acph-2021-0015>.

RAJ, L.; IDE, T.; GURKAR, A. U.; FOLEY, M.; SCHENONE, M.; LI, X.; TOLLIDAY, N. J.; GOLUB, T. R.; CARR, S. A.; SHAMJI, A. F.; STERN, A. M.; MANDINOVA, A.; SCHREIBER, S. L.; LEE, S. W. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 231–234, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10167>.

RAJAN, P.; VEDERNIKOVA, I.; COS, P.; BERGHE, D. V.; AUGUSTYNS, K.; HAEMERS, A. Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 2, p. 215–217, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00630-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00630-2).

RAO, V. R.; MUTHENNA, P.; SHANKARAIHAH, G.; AKILESHWARI, C.; BABU, K. H.; SURESH, G.; BABU, K. S.; KUMAR, R. S. C.; PRASAD, K. R.; YADAV, P. A.; PETRASH, J. M.; REDDY, G. B.; RAO, J. M. Synthesis and biological evaluation of new piplartine analogues as potent aldose reductase inhibitors (ARIs). **European journal of medicinal chemistry**, v. 57, p. 344–361, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.014>.

REILLY, M. K.; KING, R. P.; WAGNER, A. J.; KING, S. M. Microwave Assisted Esterification: A Discovery-Based Microscale Laboratory Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 91, n. 10, p. 1706-1709, 2014. <https://doi.org/10.1021/ed400721p>.

RODRÍGUEZ-MORALES, O.; MONTEÓN-PADILLA, V.; CARRILLO-SÁNCHEZ, S. C.;

RIOS-CASTRO, M.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.; CARABARIN-LIMA, A.; ARCE-FONSECA, M. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. **Journal of immunology research**, v. 2015, p. 489758, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/489758>.

RODRIGUES, R. V.; LANZNASTER, D.; BALBINOT, D. T. L.; GADOTTI, V. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 10, p. 1809–1812, 2009. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1809>.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A., RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T. B.; FIDALGO, L. M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N. Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>.

SALUM, L. B.; ALTEI, W. F.; CHIARADIA, L. D.; CORDEIRO, M. N.; CANEVAROLO, R. R.; MELO, C. P.; WINTER, E.; MATTEI, B.; DAGHESTANI, H. N.; SANTOS-SILVA, M. C.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; YUNES, R. A.; YUNES, J. A.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; NUNES, R. J.; VOGT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 501-510, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.037>.

SCHADENDORF, D.; WOLCHOK, J. D.; HODI, F. S.; CHIARION-SILENI, V.; GONZALEZ, R.; RUTKOWSKI, P.; GROB, J. J.; COWEY, C. L.; LAO, C. D.; CHESNEY, J.; ROBERT, C.; GROSSMANN, K.; MCDERMOTT, D.; WALKER, D.; BHOORE, R.; LARKIN, J.; POSTOW, M. A. Efficacy and safety outcomes in patients with advanced melanoma who discontinued treatment with Nivolumab and Ipilimumab because of adverse events: a pooled analysis of randomized Phase II and III Trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 34, p. 3807-14, 2017. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.2289>.

SHAIKHQASEM, A.; DICKMANN, A.; NEUMANN, P.; FICNER, R. Characterization of Inhibition Reveals Distinctive Properties for Human and *Saccharomyces cerevisiae* CRM1. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 14, p. 7545–7558, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00143>.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome research**, v. 13, p. 2498–2504, 2003. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.

SCHILLER, J. H.; HARRINGTON, D.; BELANI, C. P.; LANGER, C.; SANDLER, A.; KROOK, J.; ZHU, J.; JOHNSON, D. H.; EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. **The New England journal of medicine**, v. 346, n. 2, p. 346:92–98, 2002.

SHINDERMAN-MAMAN, E.; COHEN, K.; MOSKOVICH, D.; HERCBERGS, A.; WERNER, H.; DAVIS, P.J.; ELLIS, M.; ASHUR-FABIAN, O. Thyroid hormones derivatives reduce proliferation and induce cell death and DNA damage in ovarian cancer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16593-x>.

SHRIVASTAVA, S.; KULKARNI, P.; THUMMURI, D.; JEENGAR, M. K.; NAIDU, V. G. M.; ALVALA, M.; REDDDY, G. B.; RAMAKRISHNA, S. Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3 K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells. **Apoptosis**, v. 19, n. 7, p. 1148–1164, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0991-2>.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, p. 490-490, 2007.

SINGH, G. S. Recent progress in the synthesis and chemistry of azetidinones. **Tetrahedron**, v. 59, n. 39, p. 7631-7649, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)01099-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)01099-8).

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. Química Orgânica, Grupo Gen, 12 Edição, Volume 2, 2018.

SON, D. J.; KIM, S. Y.; HAN, S. S.; KIM, C. W.; KUMAR, S.; PARK, B. S.; LEE, S. E.; YUN, Y. P.; JO, H.; PARK, Y. H. Piperlongumine inhibits atherosclerotic plaque formation and vascular smooth muscle cell proliferation by suppressing PDGF receptor signaling. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 427, n. 2, p. 349–354, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.061>.

SONG, B., ZHAN, H., BIAN, Q., GU J. Piperlongumine inhibits gastric cancer cells via suppression of the JAK1,2/STAT3 signaling pathway. **Molecular Medicine Report**, v. 13, n. 5, p. 4475-4480, 2016. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5091>.

SOUZA, R. O. S.; SOUSA, P. L.; MENEZES, R. R. P. P. B.; SAMPAIO, T. L.; TESSAROLO, L. D.; SILVA, F. C. O.; PEREIRA, M. G.; MARTINS, A. M. C. Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 311–317, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.042>.

STEVEDING, D.; DO NASCIMENTO, L. G.; PEREZ-CASTILLO, Y.; DE SOUSA, D. P. Gallic Acid Alkyl Esters: Trypanocidal and Leishmanicidal Activity, and Target Identification via Modeling Studies. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5876, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27185876>.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

SWAMY, K. C.; Kumar, N. N. B.; BALARAMAN, E.; KUMAR, K. V. P. P. Mitsunobu and related reactions: advances and applications. **Chemical reviews**, v. 109, n. 6, p. 2551-2651, 2009. <https://doi.org/10.1021/cr800278z>.

TAN, Y.; WANG, M.; YANG, K.; CHI, T.; LIAO, Z.; WEI, P. PPAR- α Modulators as Current and Potential Cancer Treatments. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 9995, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.599995>.

TAKAHASHI, R.; NUNOKAWA, T.; SHIBUYA, T.; TOMITA, R.; TATEWAKI, Y.; OKADA, S.; MATSUDA, H. Synthesis and solid-state polymerization of butadiyne derivatives with trialkoxyphenylurethane groups. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 85, n. 2, p. 236-244, 2012. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20110219>.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W. Atlas Didático: **Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2011.

TICONA, J. C.; BILBAO-RAMOS, P.; FLORES, N.; DEA-AYUELA, M. A.; BOLÁS-FERNÁNDEZ, F.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L. (E)-Piplartine Isolated from Piper pseudoarborescens, a Lead Compound against Leishmaniasis. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1250, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9091250>.

TODOROVIC, M.; PERRIN, D. M. Recent developments in catalytic amide bond formation. **Peptide Science**, v. 112, n. 6, p. e24210, 2020. <https://doi.org/10.1002/pep2.24210>.

TRINAGARAJU, K.; PRASAD, A. V. G. S.; VENKATESWARA, P. R.; PRASAD, P.S.S. SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF 3, 4, 5-TRIMETHOXYBENZOATES OF Mn(II), Co(II), Ni(II) AND Zn(II). **Medicinal Chemistry & Analysis**, v. 15, p. 65-67, 2015.

TSAI, I. L.; LEE, F. P.; WU, C. C.; DUH, C. Y.; ISHIKAWA, T.; CHEN, J. J.; CHEN, Y. C.; SEKI, H.; CHEN, I. S. 2005. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and antiplatelet aggregation constituents from Piper arborescens. *Planta Med.* 71 (6), 535–542, 2005. DOI: 10.1055/s-2005-86415510.1055/s-2005-864155.

TURKEZ, H.; DA NÓBREGA, F. R.; OZDEMIR, O.; FILHO, C. D. S. M. B.; DE ALMEIDA, R. N.; TEJERA, E.; PEREZ-CASTILLO, Y.; DE SOUSA, D. P. NFBTA: A Potent Cytotoxic Agent against Glioblastoma. **Molecules**, 2019, 24, 2411. <https://doi.org/10.3390/molecules24132411>.

VAZAKAS, A. J.; DOLUISIO, J. T. Synthesis and pharmacology of some basic esters of 3, 4, 5-trimethoxybenzoic acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 2, p. 165-169, 1964. <https://doi.org/10.1002/jps.2600530212>.

VIEIRA, G. A. L.; SILVA, M. T. A. D.; REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; LAURE, H. J.; ROSA, J. C.; FURLAN, M.; CICARELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: analysis of two different BEZERRA FILHO, C. S. M./ REFERÊNCIAS |123 strains after pipartine treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 208-218, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.009>.

VIEGAS J. R. C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>.

VOLLHARDT, K.P.C., SCHORE, N. E. **Organic chemistry: structure and function**, W. H. Freeman and Company, 6th ed, New York, 2011.

VOTÝPKA, J.; D'AVILA, C. M. L.; GRELLIER, P.; MASLOV, D. A.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends In Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460-469, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015>.

WAKADE, A. S.; SHAH, A. S.; KULKARNI, M. P.; JUVEKAR, A. R. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, n. 7, p. 528, 2008. <https://doi.org/10.1055/s-2007-987222>

WANG, J.; MORIN, P.; WANG, W.; KOLLMAN, P. A. Use of MM-PBSA in Reproducing the Binding Free Energies to HIV-1 RT of TIBO Derivatives and Predicting the Binding Mode to HIV-1 RT of Efavirenz by Docking and MM-PBSA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 22, p. 5221–5230, 2001. <https://doi.org/10.1021/ja003834q>.

WANG, M.; CHU, H.; ZHANG, Z.; WEI, Q. Molecular epidemiology of DNA repair gene polymorphisms and head and neck cancer. **Journal of biomedical research**, v. 27, n. 3, p. 179-92, 2013. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130034>.

WANG, Y.; MORRIS-NATSCHKE, S.; YANG, NIU, J.; H. M.; LONG, C. L.; LEE, K. H. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 8–16, 2014. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.124811>.

WANG, Y.; CHANG, J.; LIU, X.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; ZHANG, X.; ZHOU, D.; ZHENG, G. Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. **Aging (Albany NY)**, v. 8, n. 11, p. 2915, 2016. <https://doi.org/10.18632/aging.101100>.

WANG, H.; MUSTAFA, A.; LIU, S.; LIU, J.; LV, D.; YANG, H. ZOU, J. Immune checkpoint inhibitor toxicity in head and neck cancer: from identification to management. **Frontiers in pharmacology**, v.10, p.1254, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01254>.

WANG, E.; SUN, H.; WANG, J.; WANG, Z.; LIU, H.; ZHANG, J. Z. H.; HOU, T. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. **Chemical reviews**, v. 119, n. 16, p. 9478–9508, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>.

WASZKOWYCZ, B. Towards improving compound selection in structure-based virtual screening. **Drug discovery today**, v. 13, n. 5-6, p. 219-226, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.002>.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current protocols in bioinformatics**, v. 54, p. 5.6.1-5.6.37, 2016. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.

WEBER, K. C.; HONORIO, K. M.; ANDRICOPULO, A. D.; DA SILVA, A. B. Two-dimensional QSAR studies on arylpiperazines as high-affinity 5-HT_{1A} receptor ligands. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 328-335, 2008. <https://doi.org/10.2174/157340608784872325>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2020. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: Chagas disease (American trypanosomiasis) (who.int). Acesso em: 25 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2022. **Oral health**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>>. Acesso em: 11 Março de 2022.

WOOD, K. W.; CORNWELL, W. D.; JACKSON, J. R. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. **Current opinion in pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 370–377, 2001. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(01\)00064-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(01)00064-9).

XI, H.; WU, R.; LIU, J.; ZHANG, L.; LI, Z. Role of acetylcholinesterase in lung cancer. **Thoracic câncer**, v. 6, n. 4, p. 390–398, 2015. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12249>.

XU, Q.; WU, N.; LI, X.; GUO, C.; LI, C.; JIANG, B.; WANG, H.; SHI, D. Inhibition of PTP1B blocks pancreatic cancer progression by targeting the PKM2/AMPK/mTOC1 pathway. **Cell death & disease**, v. 10, n. 12, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2073-4>.

YABROFF, K. R.; WU, X. C.; NEGOITA, S.; STEVENS, J.; COYLE, L.; ZHAO, J.; MUMPHREY, B. J.; JEMAL, A.; WARD, K.C. Association of the COVID-19 Pandemic With Patterns of Statewide Cancer Services. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 114, n. 6, 907-909, 2022. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab122>.

YAO, Y.; SUN, Y.; SHI, M.; XIA, D.; ZHAO, K.; ZENG, L.; YAO, R.; ZHANG, Y.; LI, Z.; NIU, M.; XU, K. Piperlongumine induces apoptosis and reduces bortezomib resistance by inhibiting STAT3 in multiple myeloma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 45, p. 73497–73508, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11988>.

YEARTY, K. L.; SHARP, J. T.; MEEHAN, E. K.; WALLACE, D. R.; JACKSON, D. M.; MORRISON, R. W. Implementation of picoSpin Benchtop NMR Instruments into Organic Chemistry Teaching Laboratories through Spectral Analysis of Fischer Esterification Products. **Journal of Chemical Education**, v. 94, n. 7, p. 932–935, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00972>.

ZHANG, F. H.; WANG, Z. M.; LIU, Y. T.; HUANG, J. S.; LIANG, S.; WU, H. H.; XU, Y. T. Bioactivities of serotonin transporter mediate antidepressant effects of *Acorus tatarinowii* Schott. **Journal of ethnopharmacology**, v. 241, p. 111967, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111967>.

ZHENG, J.; SON, D. J.; GU, S. M.; WOO, J. R.; HAM, Y. W.; LEE, H. P.; KIM, W. J.; JUNG, J. K.; HONG, J. T. Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway. **Scientific reports**, v. 6, p. 26357, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep26357>.

ZINC PROTEIN SIMULATIONS USING THE CATIONIC DUMMY ATOM (CaDA) Method. In: Mayo Clinic [Online]. Disponível em: <https://www.mayo.edu/research/labs/computer-aided-molecular-design/projects/zinc-protein-simulations-using-cationic-dummy-atom-cada-approach> (Acessado em 21 de janeiro de 2021).

ZINCHENKO, A. N. et al. Synthesis and biological evaluation of novel amino-substituted derivatives of pyrido [2, 3-d] pyrimidine as inhibitors of protein kinase CK2. **Biopolymers and Cell**, v. 33, n. 5, p. 367-378, 2017.

ZORZANELLI, B.C.; DE QUEIROZ, L.N.; SANTOS, R.M.; MENEZES, L.M.; GOMES, F.C.; FERREIRA, V.F.; SILVA, F.D.C.D.; ROBBS, B.K. Potential cytotoxic and selective effect of new benzo[b]xanthenes against oral squamous cell carcinoma. **Future medicinal chemistry**, v. 10, p. 1141–1157, 2018. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0205>.

ZORZANELLI, B. C.; OUVENEY, G.; PAULI, F. P.; DA FONSECA, A. C. C.; DE ALMEIDA, E. C. P.; DE CARVALHO, D. G.; POSSIK, P. A.; RABELO, V. W. H.; ABREU, P. A.; PONTES, B.; FERREIRA, V. F.; FOREZI, L. D. S. M.; DA SILVA, F. C.; ROBBS, B. K. Pro-Apoptotic Antitumoral Effect of Novel Acridine-Core Naphthoquinone Compounds against Oral Squamous Cell Carcinoma. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5148, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27165148>.

ZOU, Y.; WONG, J. J.; HOUK, K. N. Computational exploration of a redox-neutral organocatalytic Mitsunobu reaction. **Journal American Chemical Society**, v. 142, n. 38, p. 16403–16408, 2020. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c07487>.

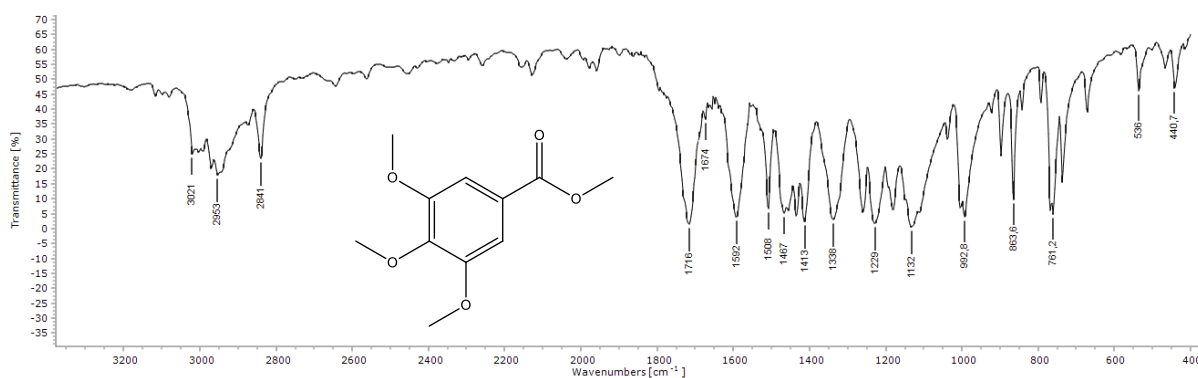
APÊNDICE -- ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C , IV E EMAR**Figura 18.** Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila (**1**).**Figura 19.** Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila (**1**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila (**1**), (CDCl_3 , 400 MHz).

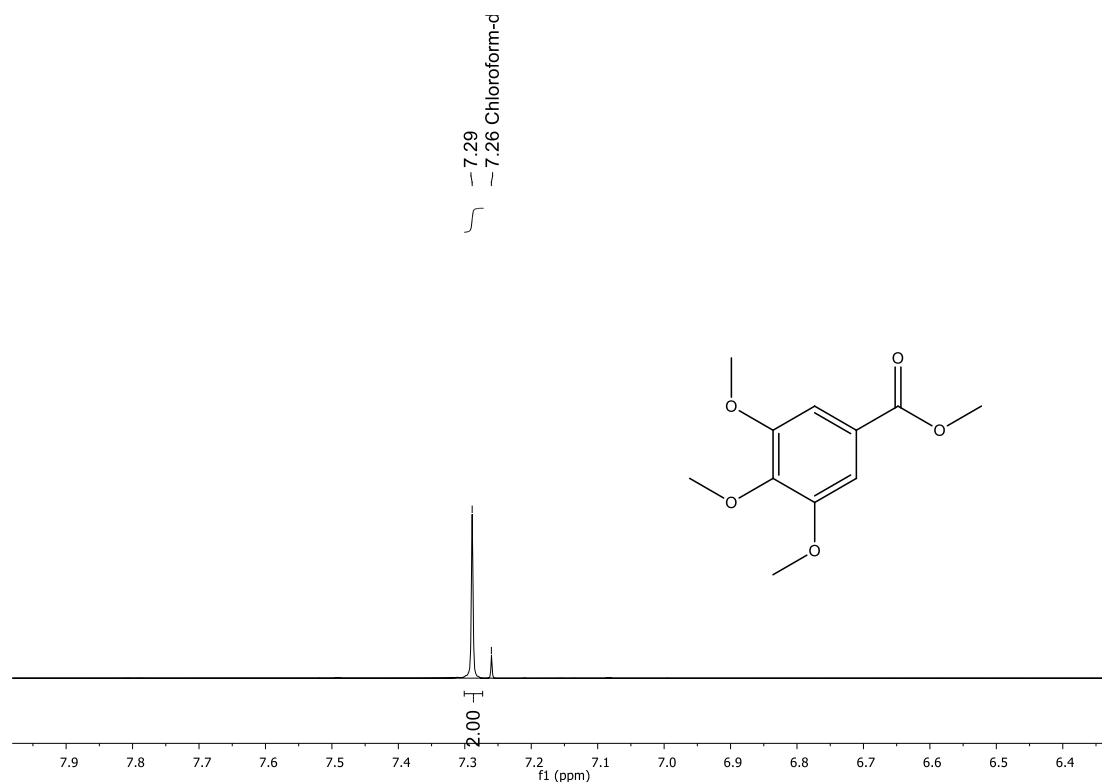


Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila (**1**), (CDCl_3 , 400 MHz).

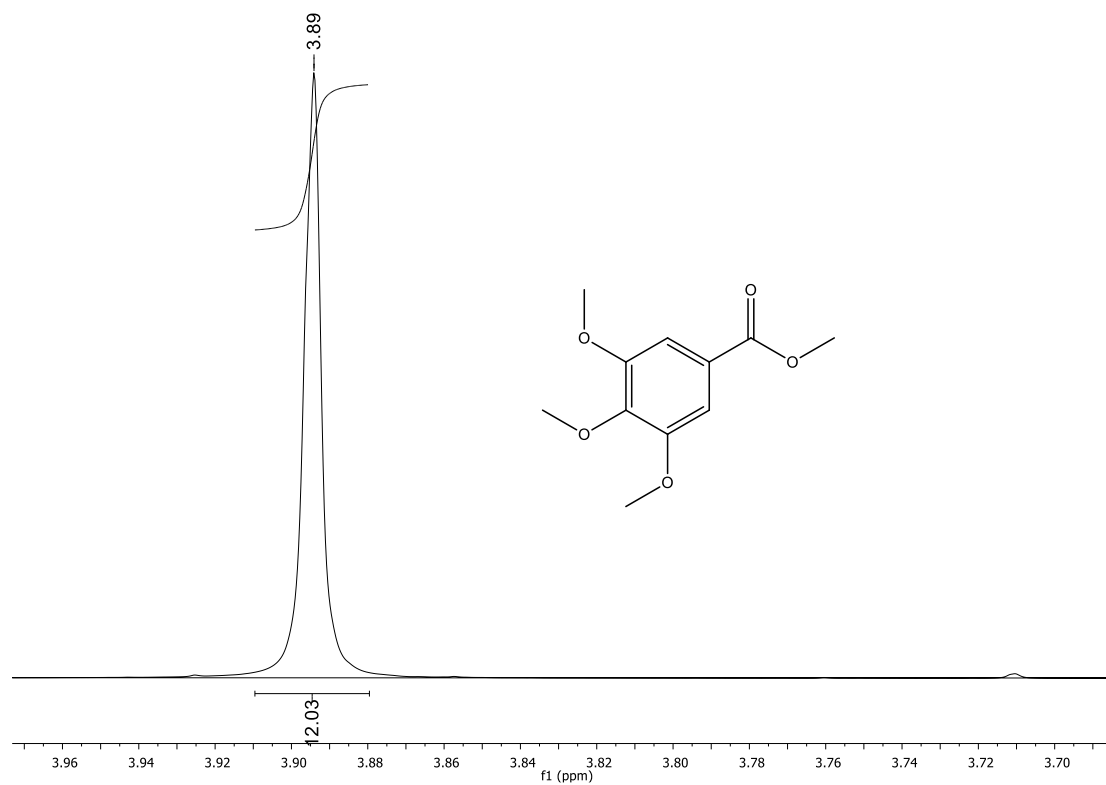


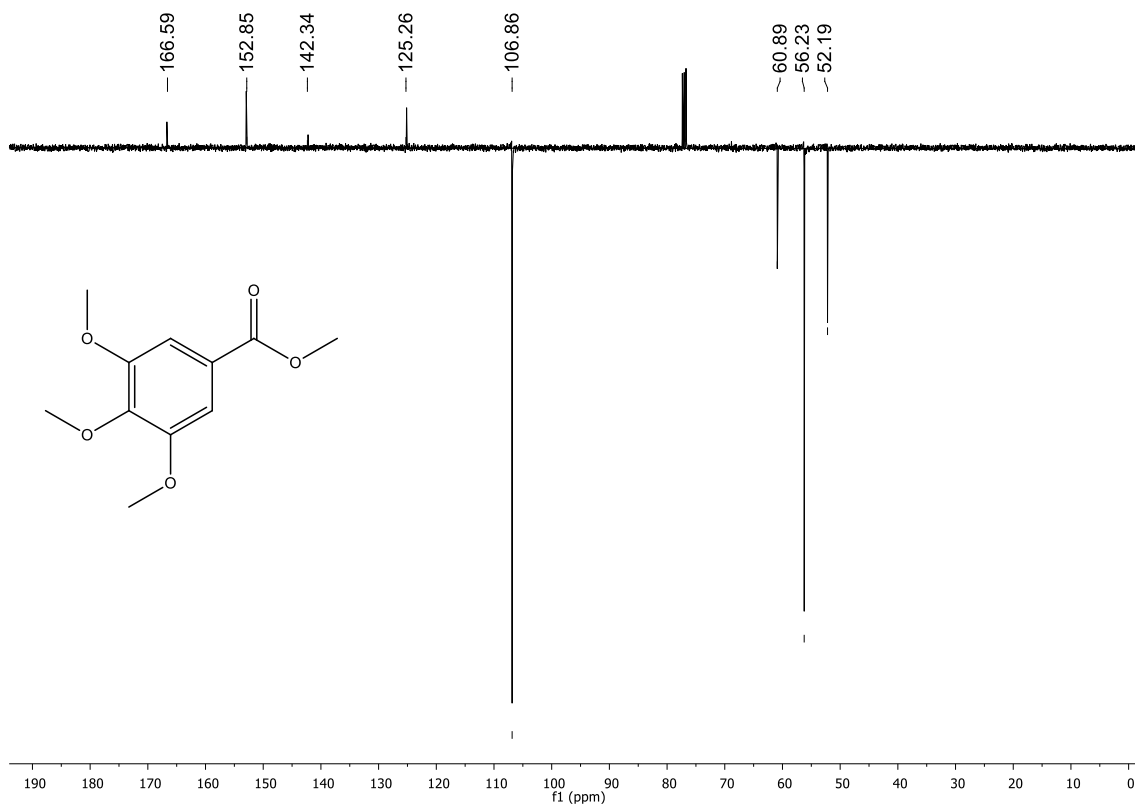
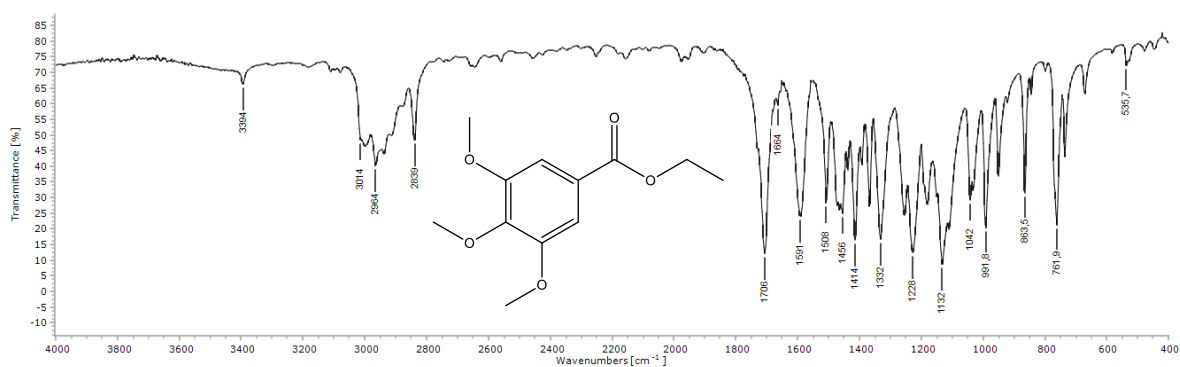
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de metila (**1**) (CDCl_3 , 100 MHz).**Figura 23.** Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (**2**).

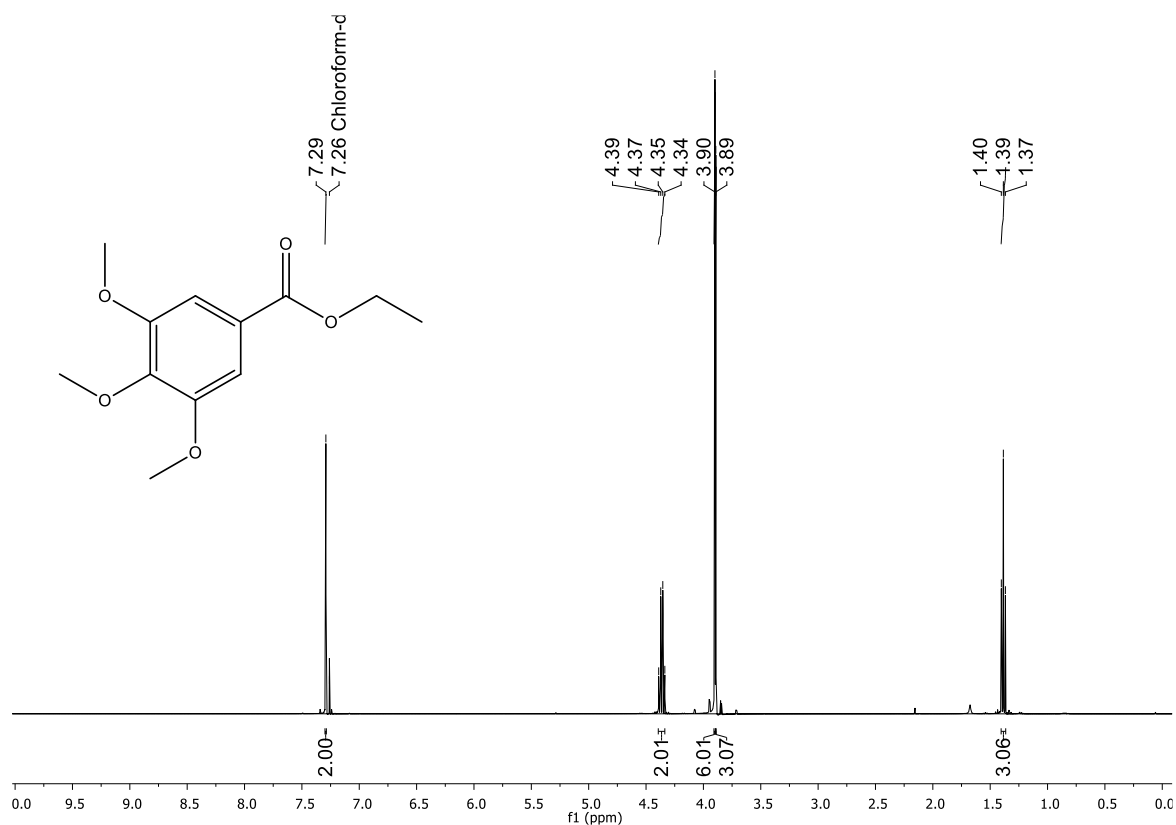
Figura 24. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (**2**), (CDCl_3 , 400 MHz).**Figura 25.** Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (**2**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (**2**), (CDCl_3 , 400 MHz).

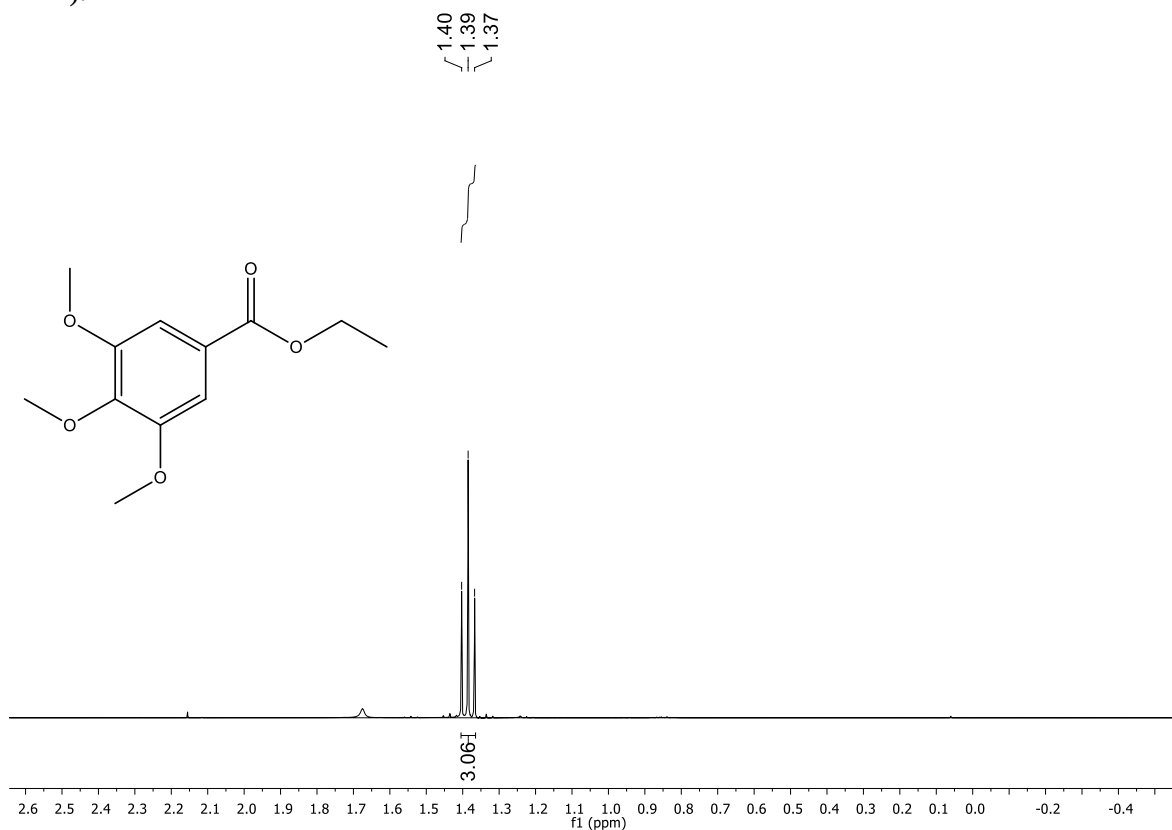


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (**2**) (CDCl_3 , 100 MHz).



Figura 28. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etila (**2**) (CDCl_3 , 100 MHz).



Figura 29. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (**3**).



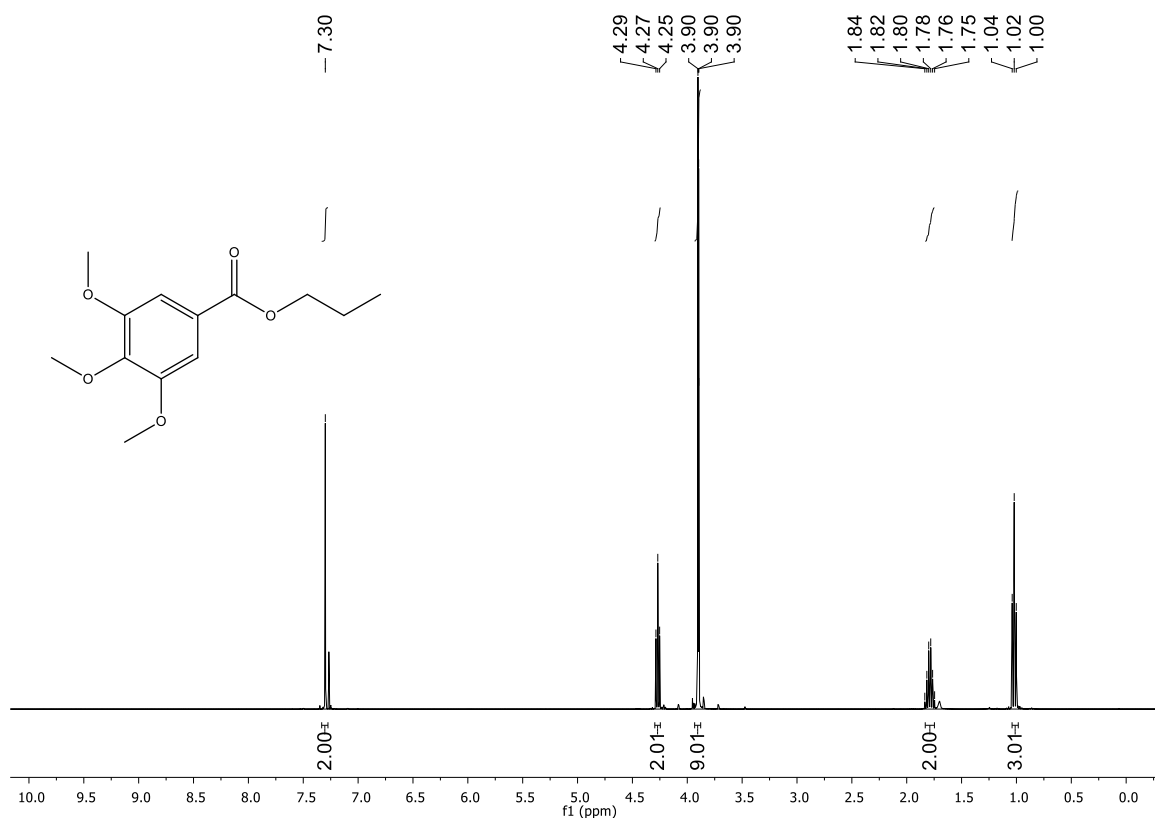
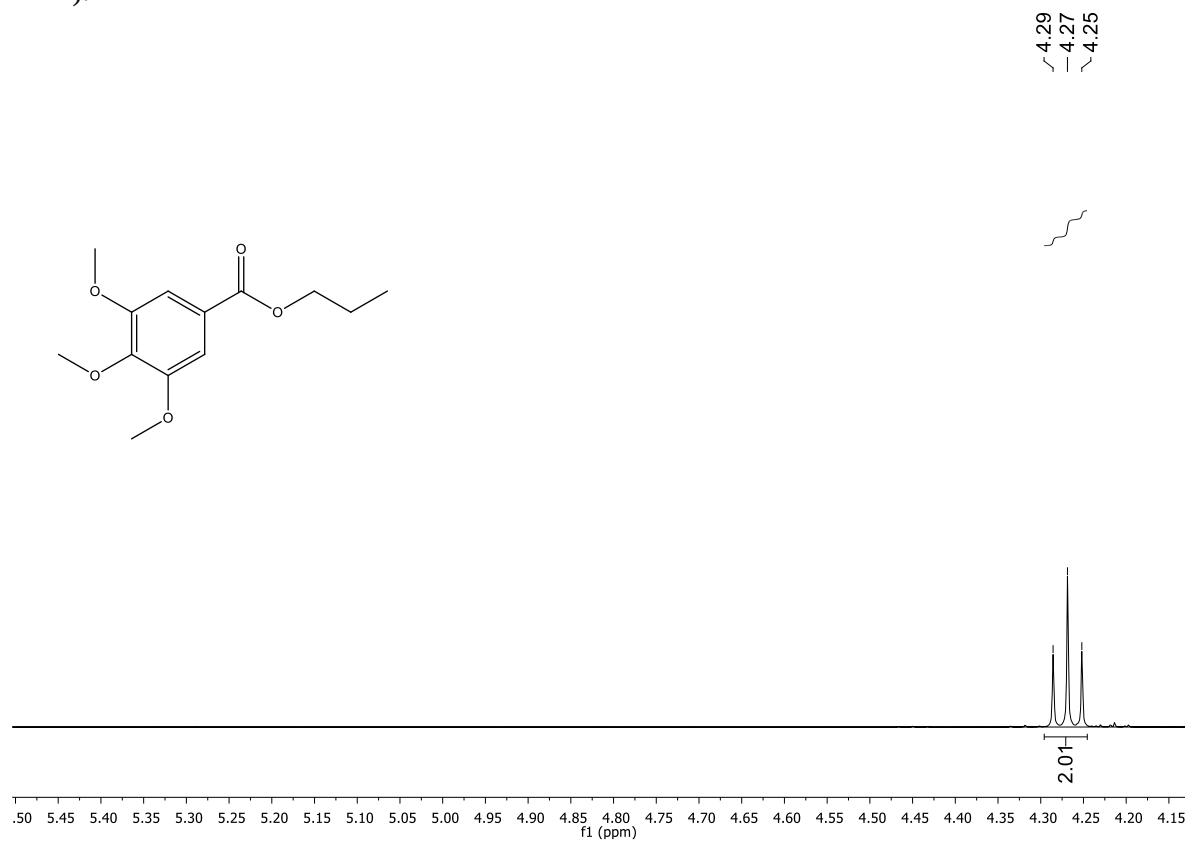
Figura 30. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (**3**), (CDCl_3 , 400 MHz).**Figura 31.** Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (**3**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (**3**), (CDCl_3 , 400 MHz).

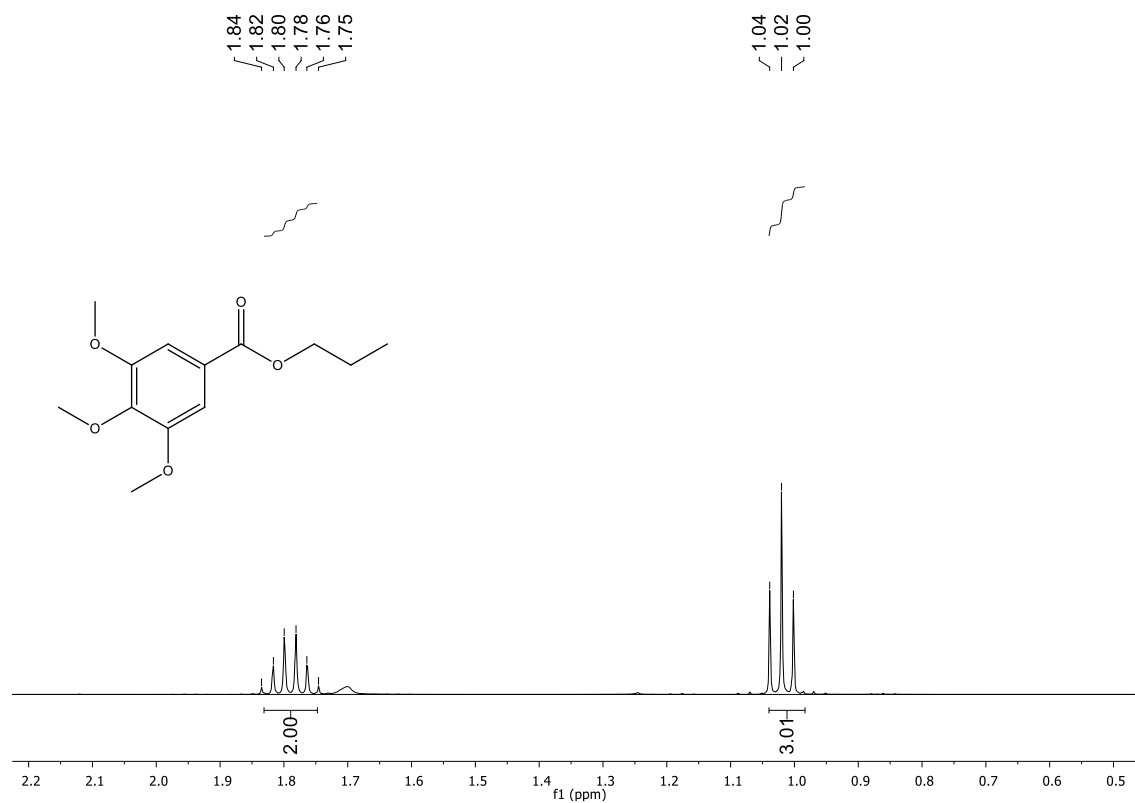


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de propila (**3**) (CDCl_3 , 100 MHz).

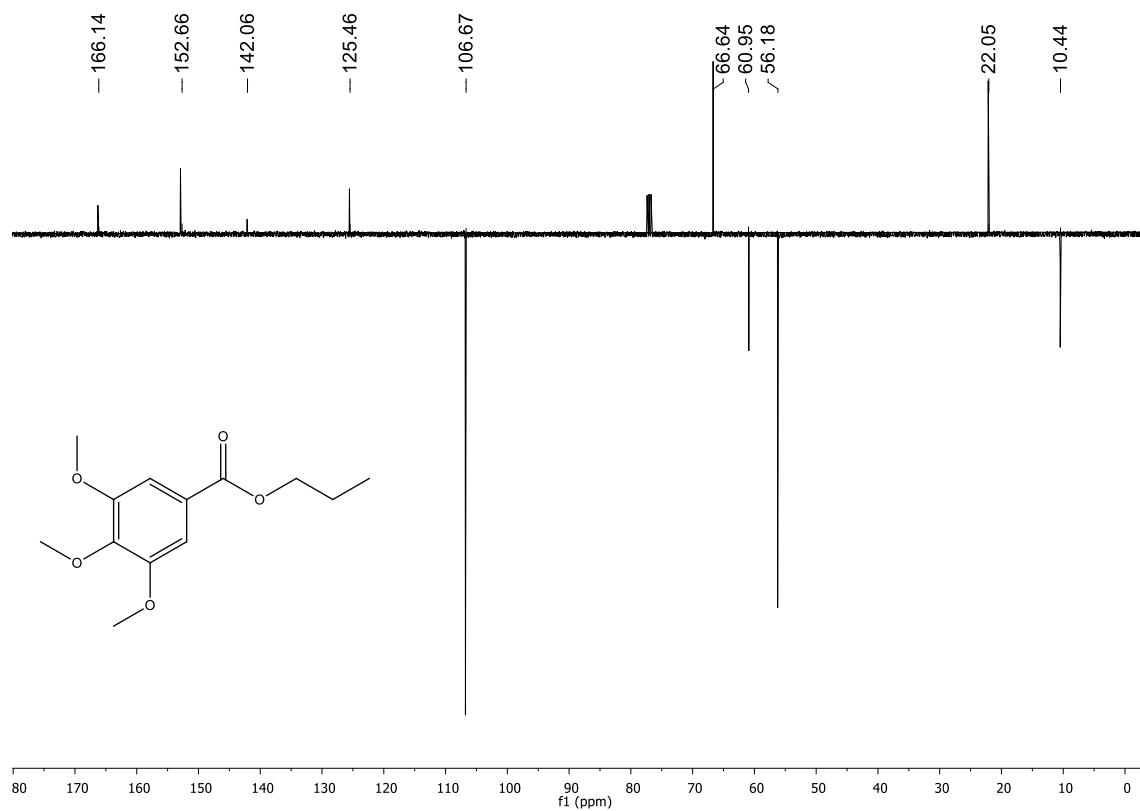


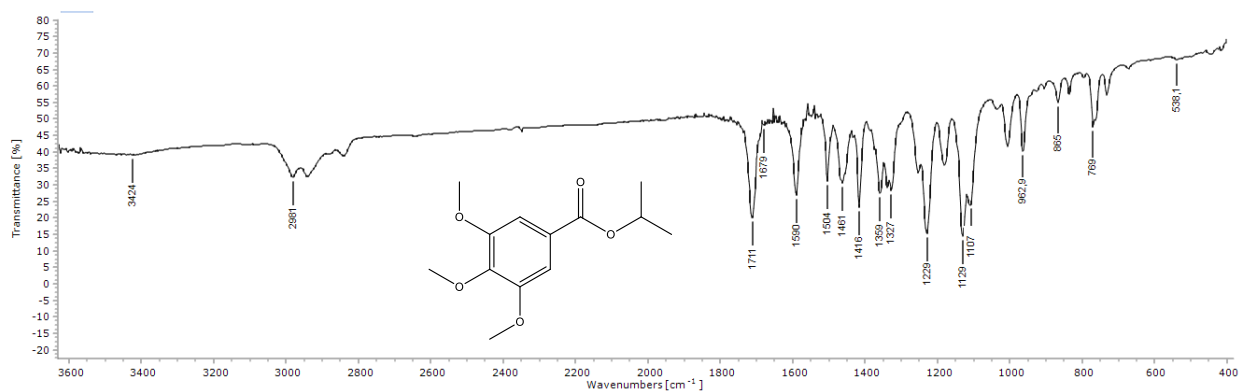
Figura 34. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (**4**).**Figura 35.** Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (**4**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (**4**), (CDCl_3 , 400 MHz).

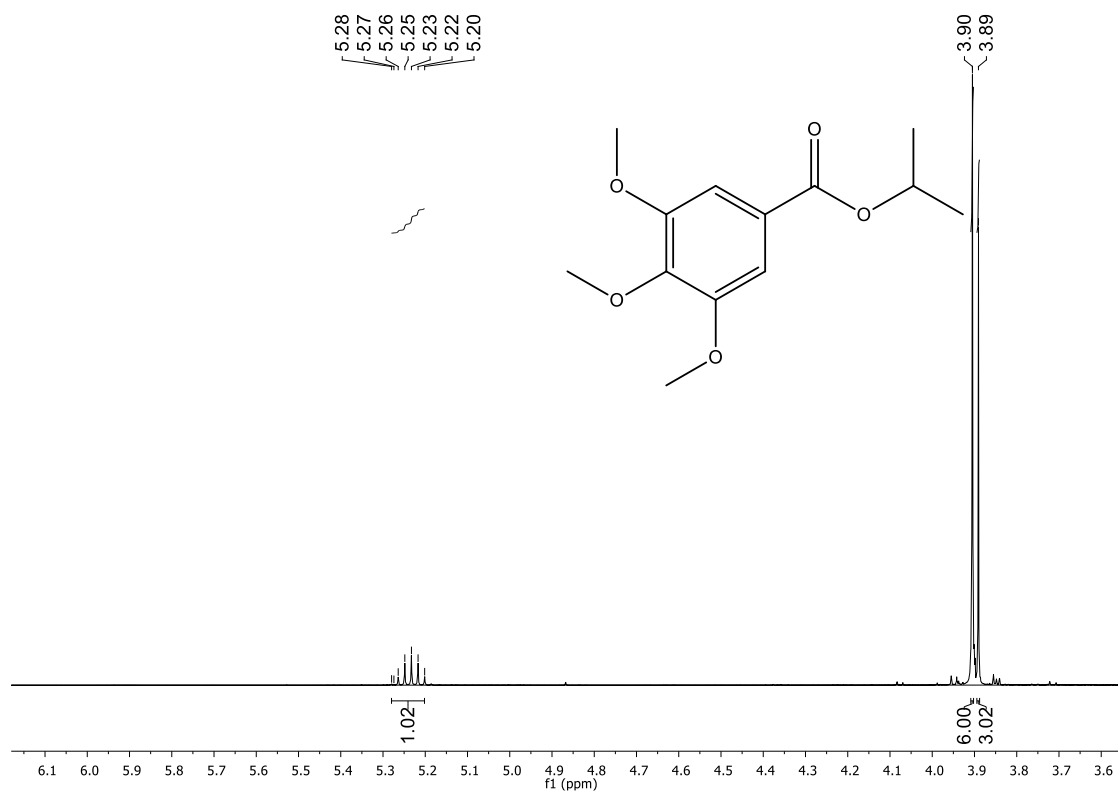


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (**4**), (CDCl_3 , 400 MHz).

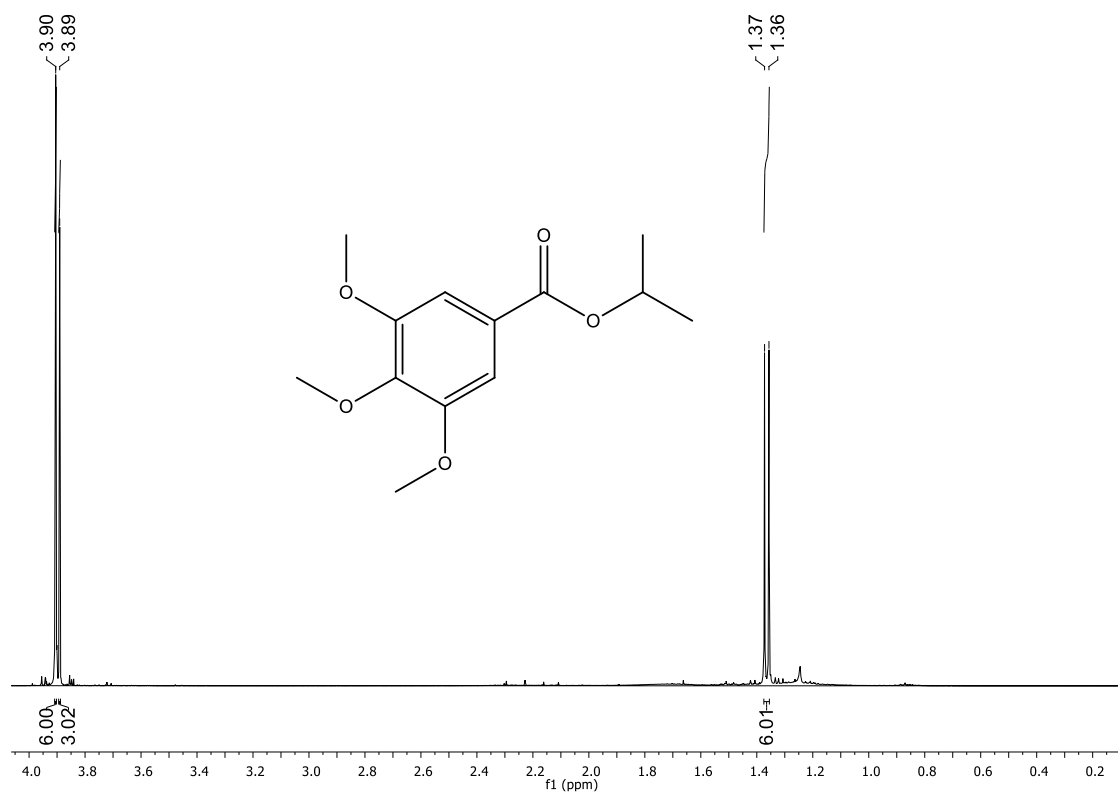


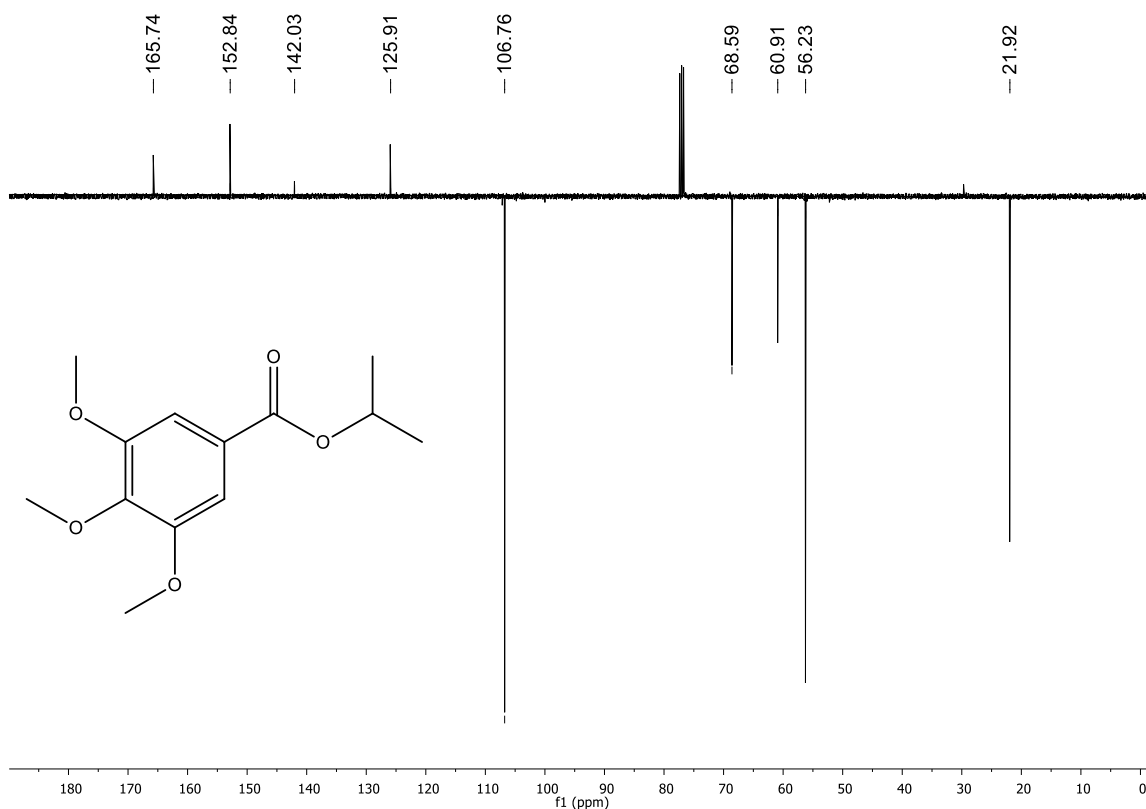
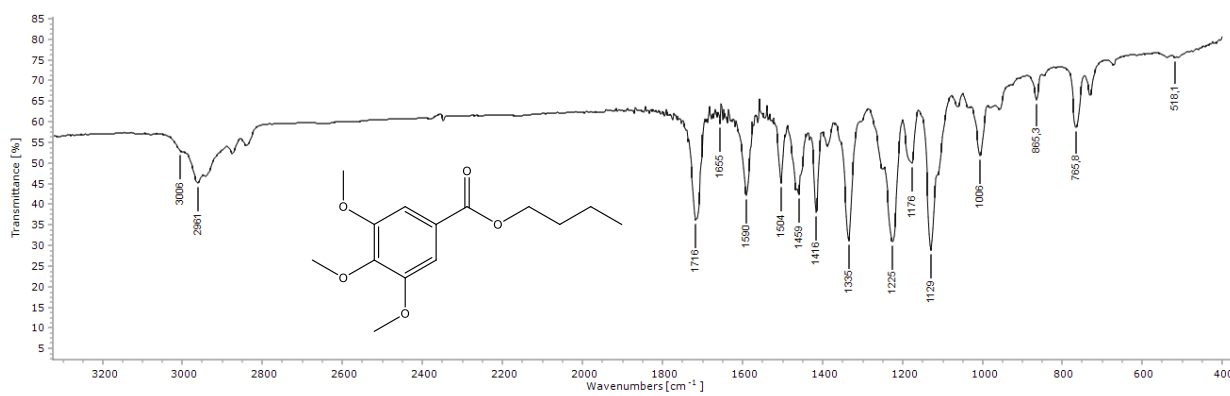
Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopropila (**4**) (CDCl_3 , 100 MHz).**Figura 39.** Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (**5**).

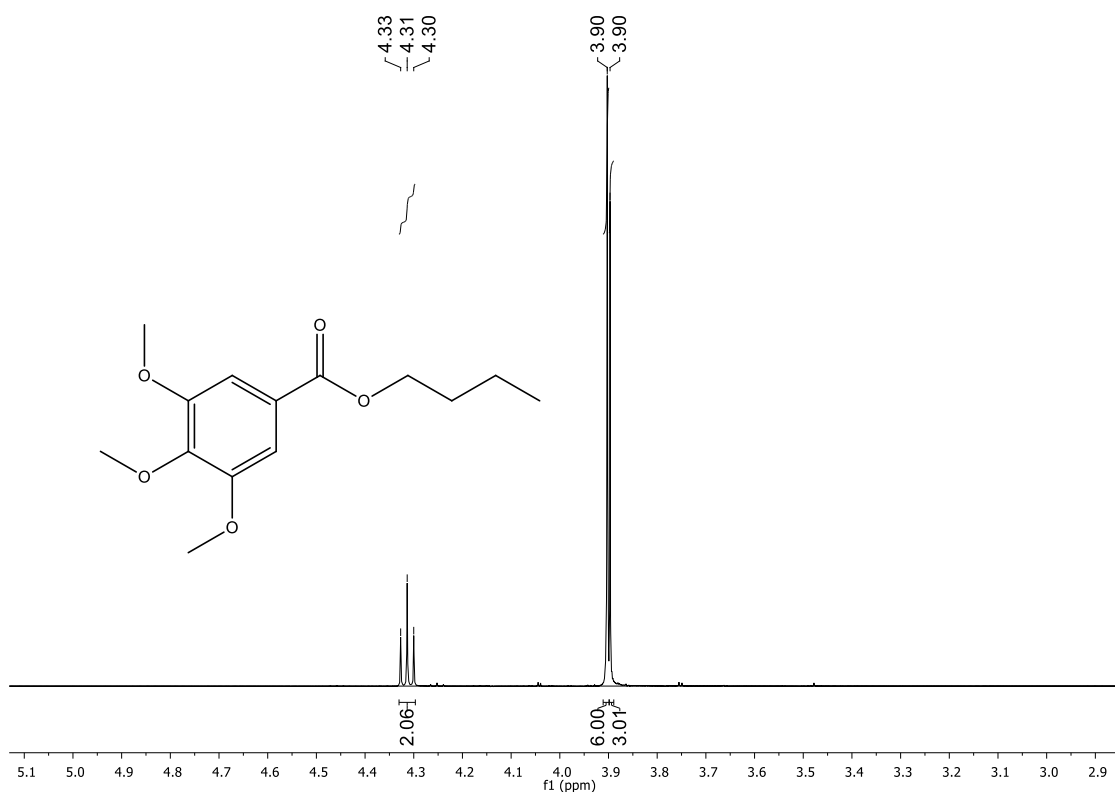
Figura 40. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (**5**), (CDCl_3 , 500 MHz).**Figura 41.** Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (**5**), (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (**5**), (CDCl_3 , 500 MHz).

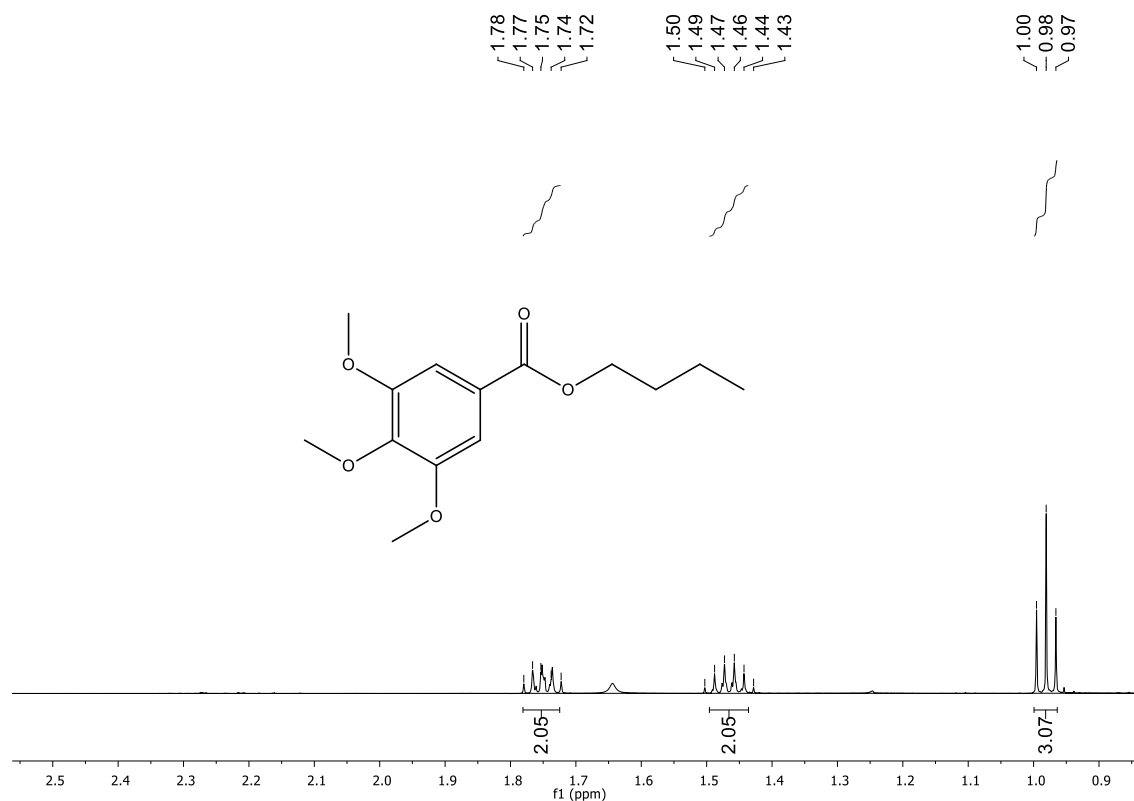


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de butila (**5**) (CDCl_3 , 125 MHz).

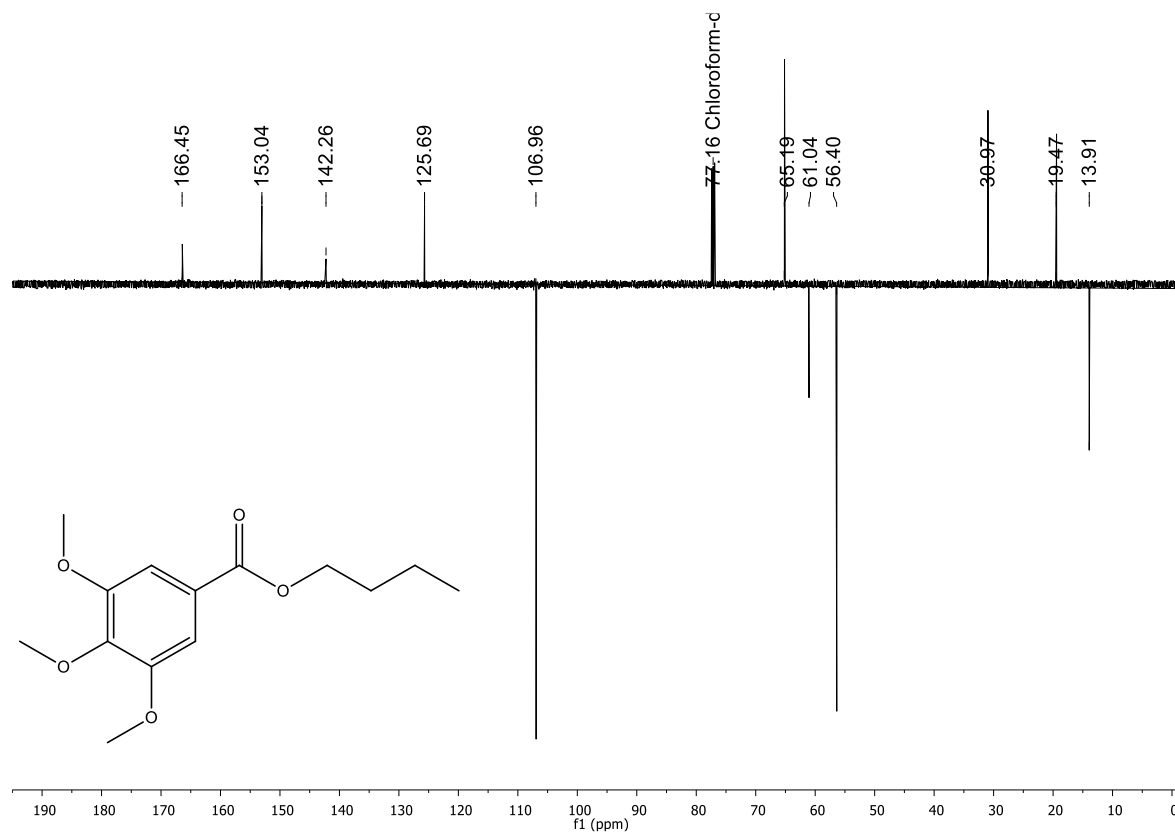


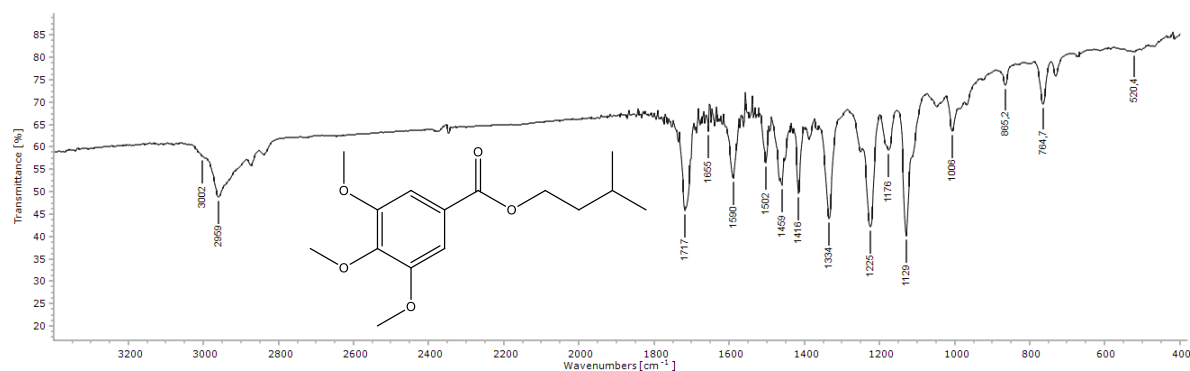
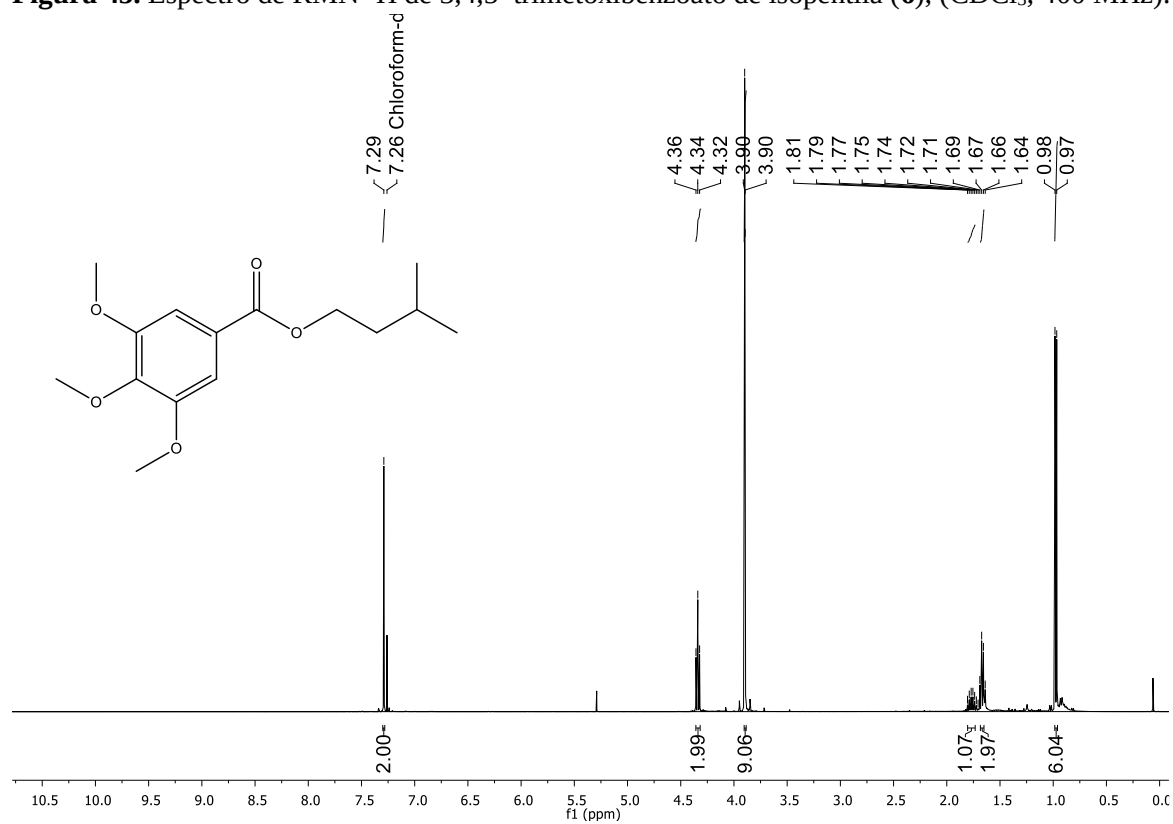
Figura 44. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6).**Figura 45.** Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (6), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 46. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (**6**), (CDCl_3 , 400 MHz).

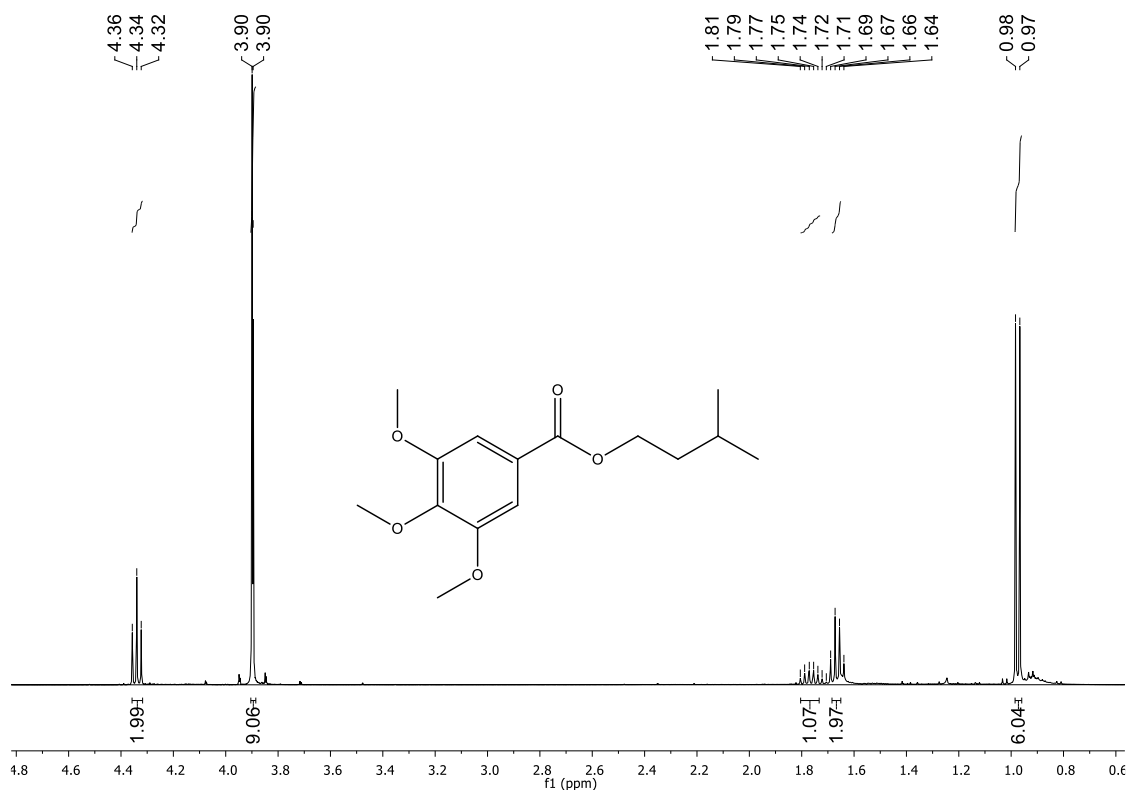


Figura 47. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (**6**), (CDCl_3 , 400 MHz).

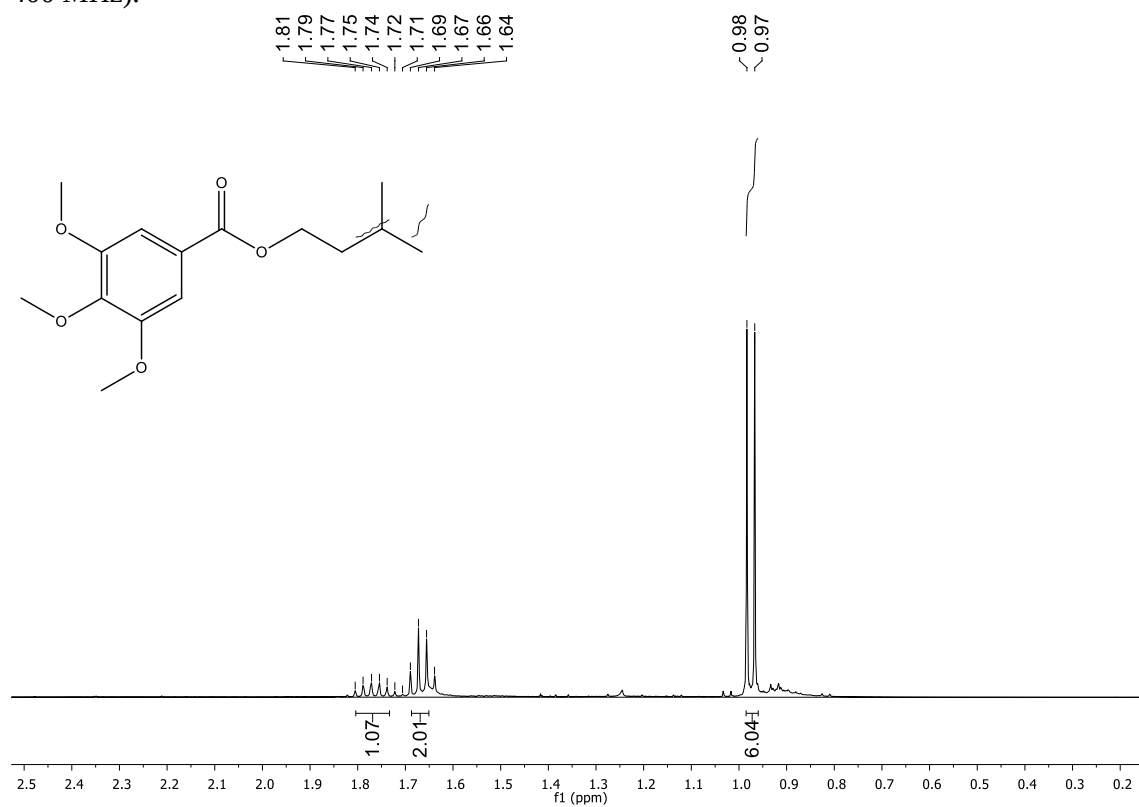


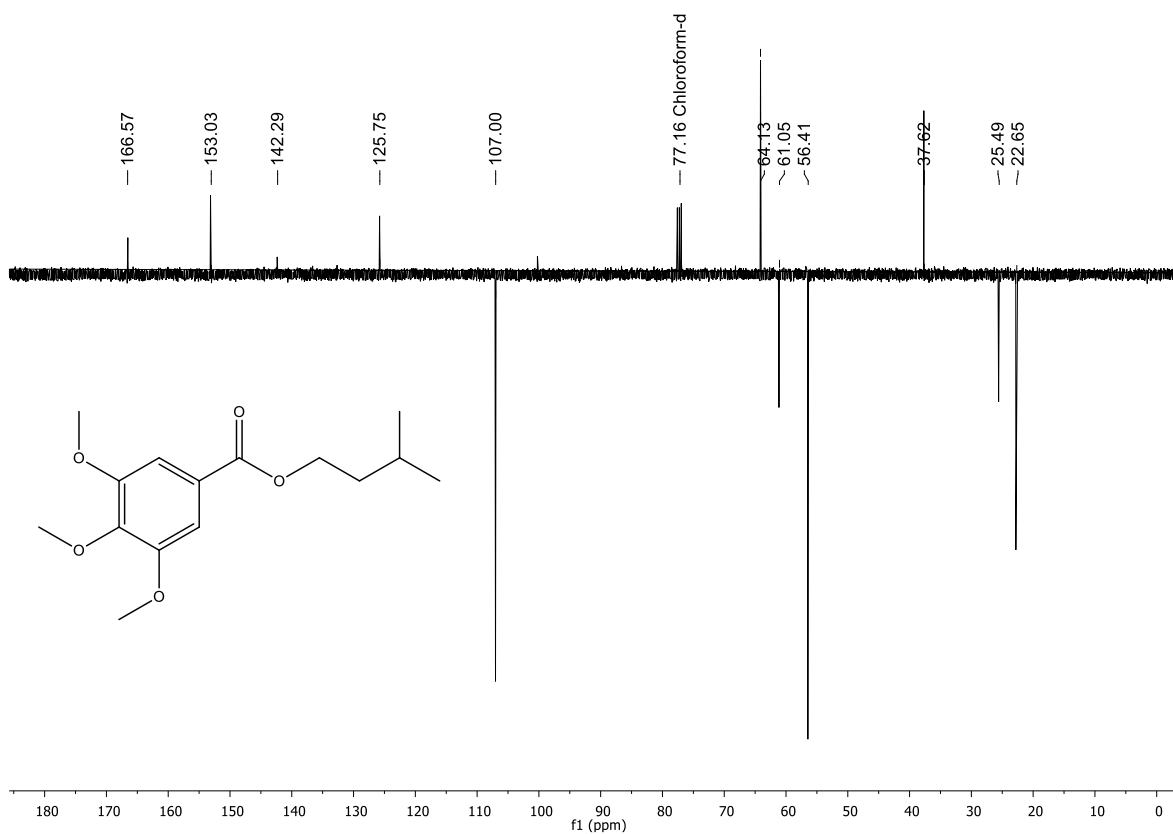
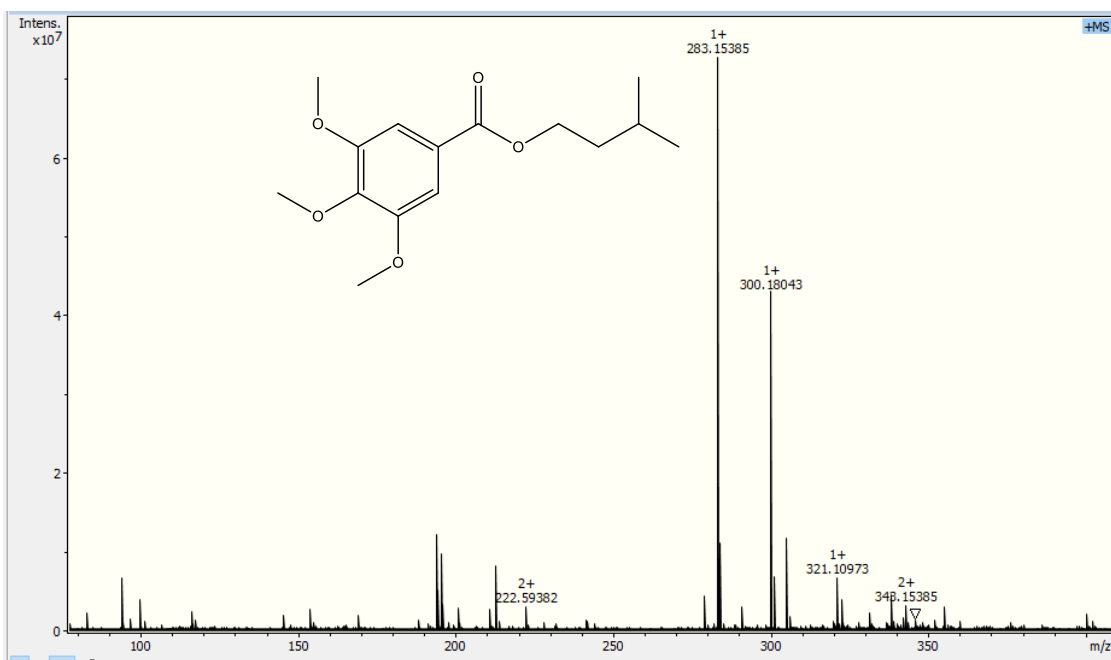
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (**6**) (CDCl_3 , 100 MHz).**Figura 49.** Espectro de Massas de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de isopentila (**6**).

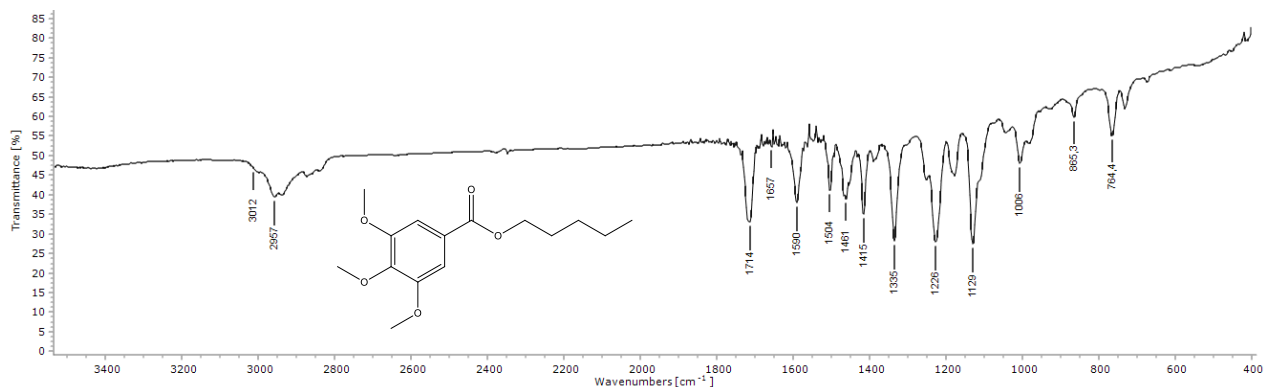
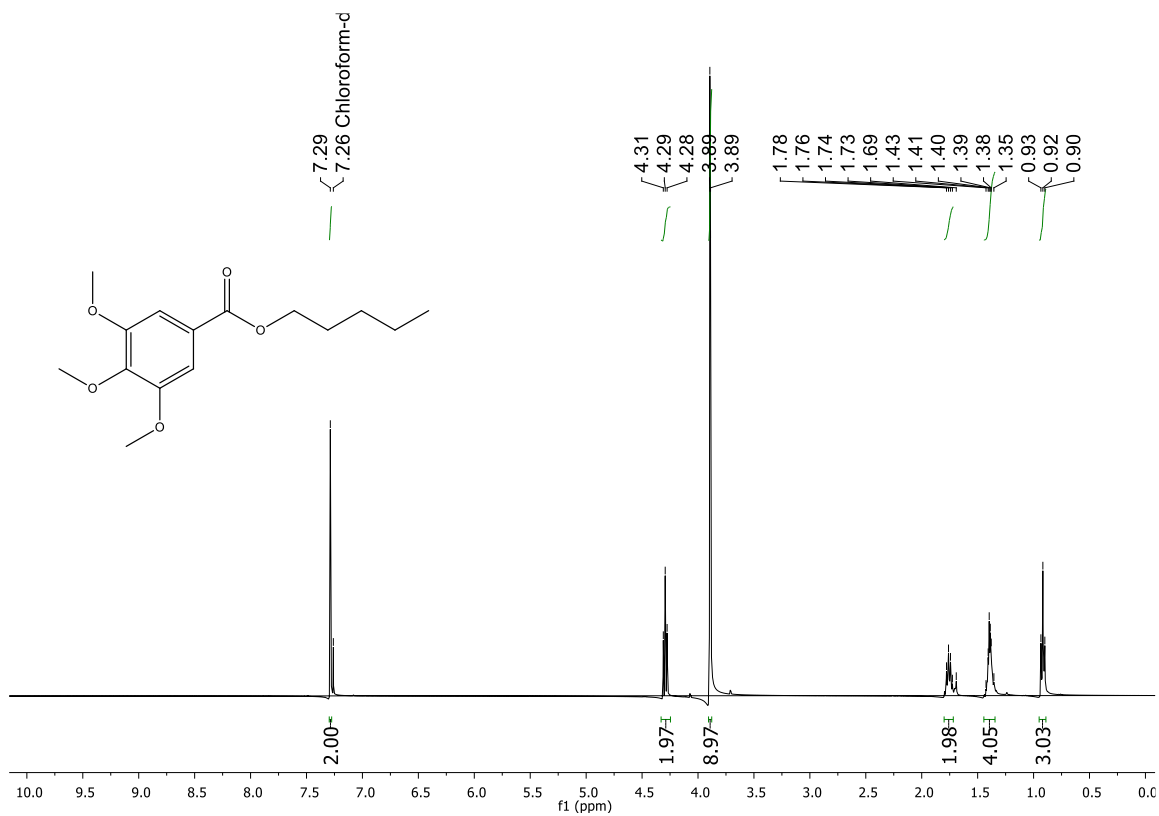
Figura 50. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7).**Figura 51.** Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7), (CDCl_3 , 400 MHz).

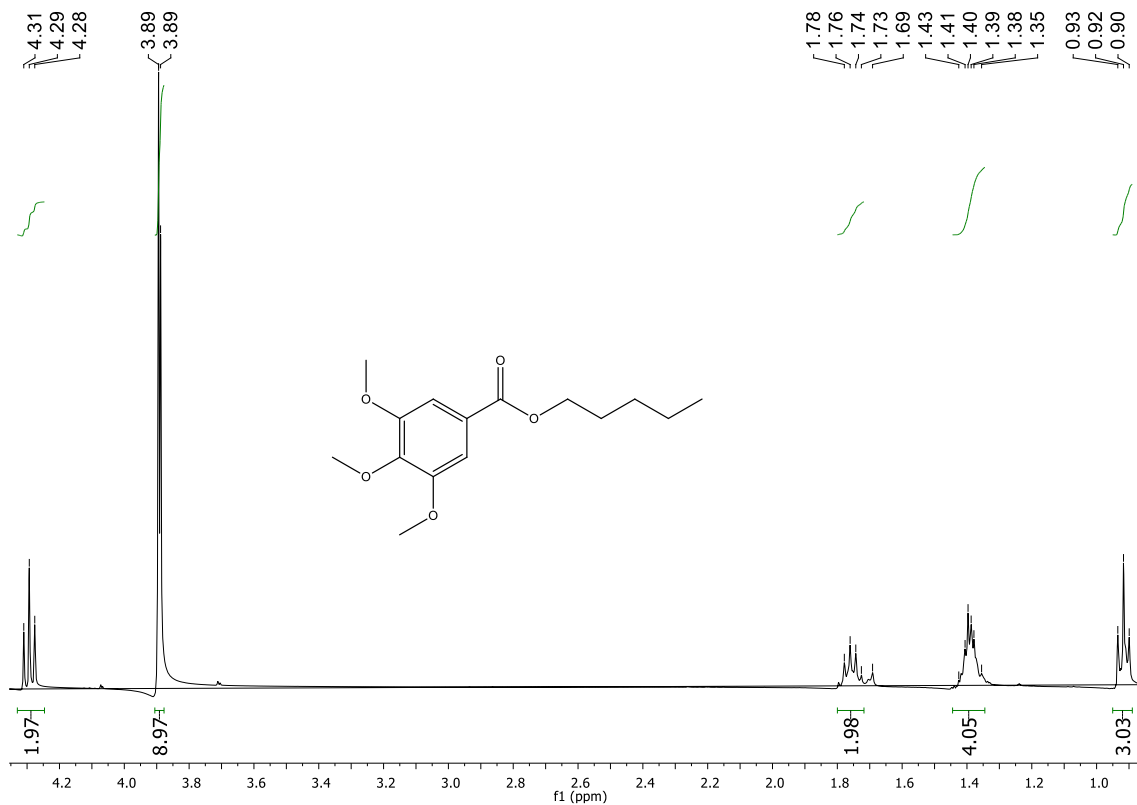


Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7) (CDCl_3 , 100 MHz).

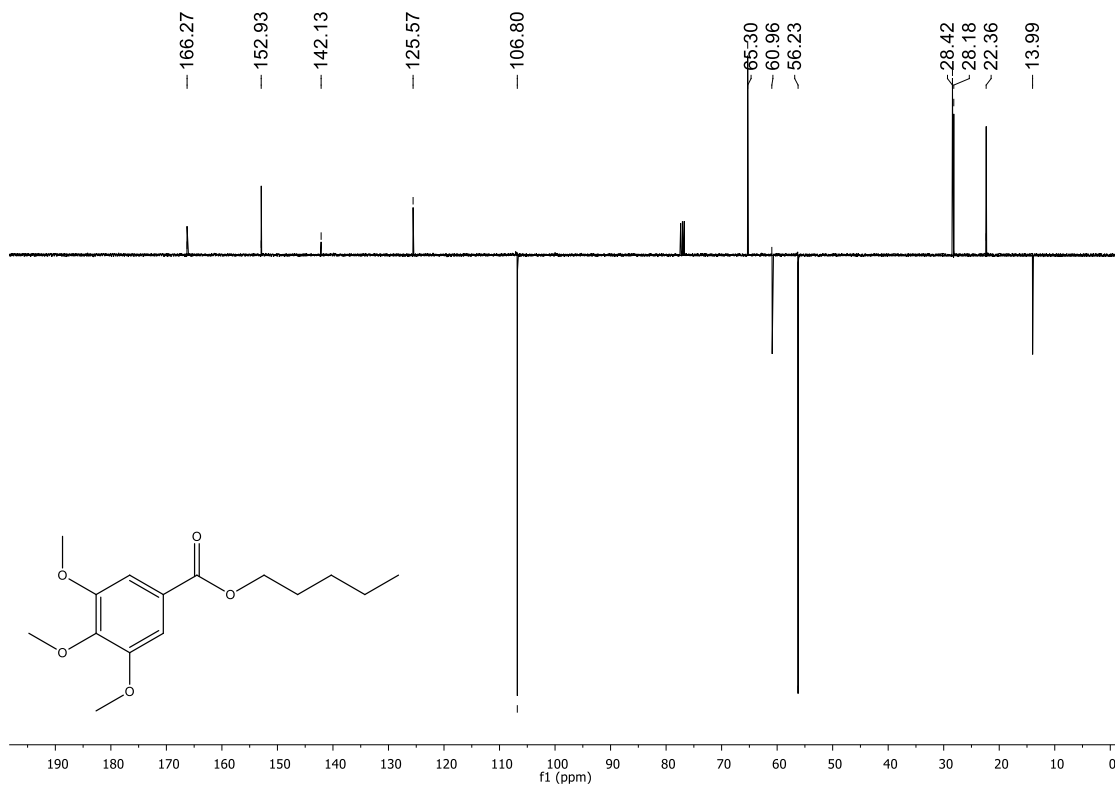


Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de pentila (7) (CDCl_3 , 100 MHz).



Figura 55. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (8).

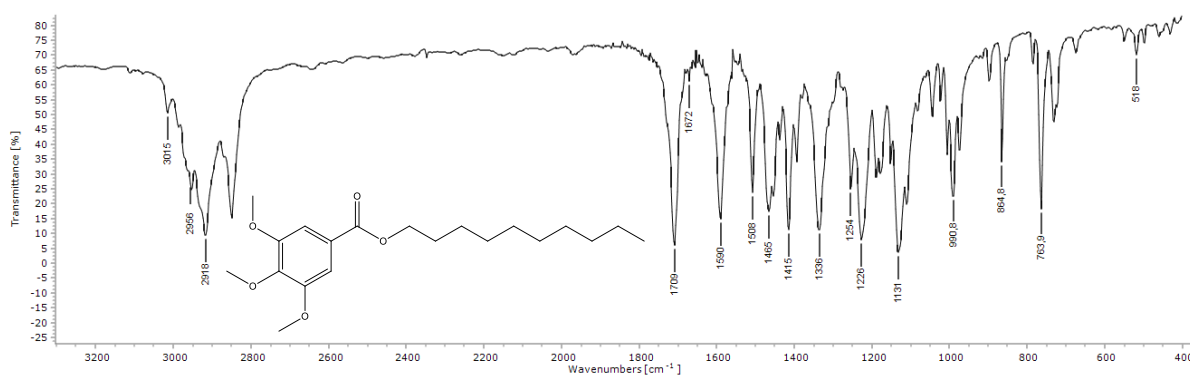


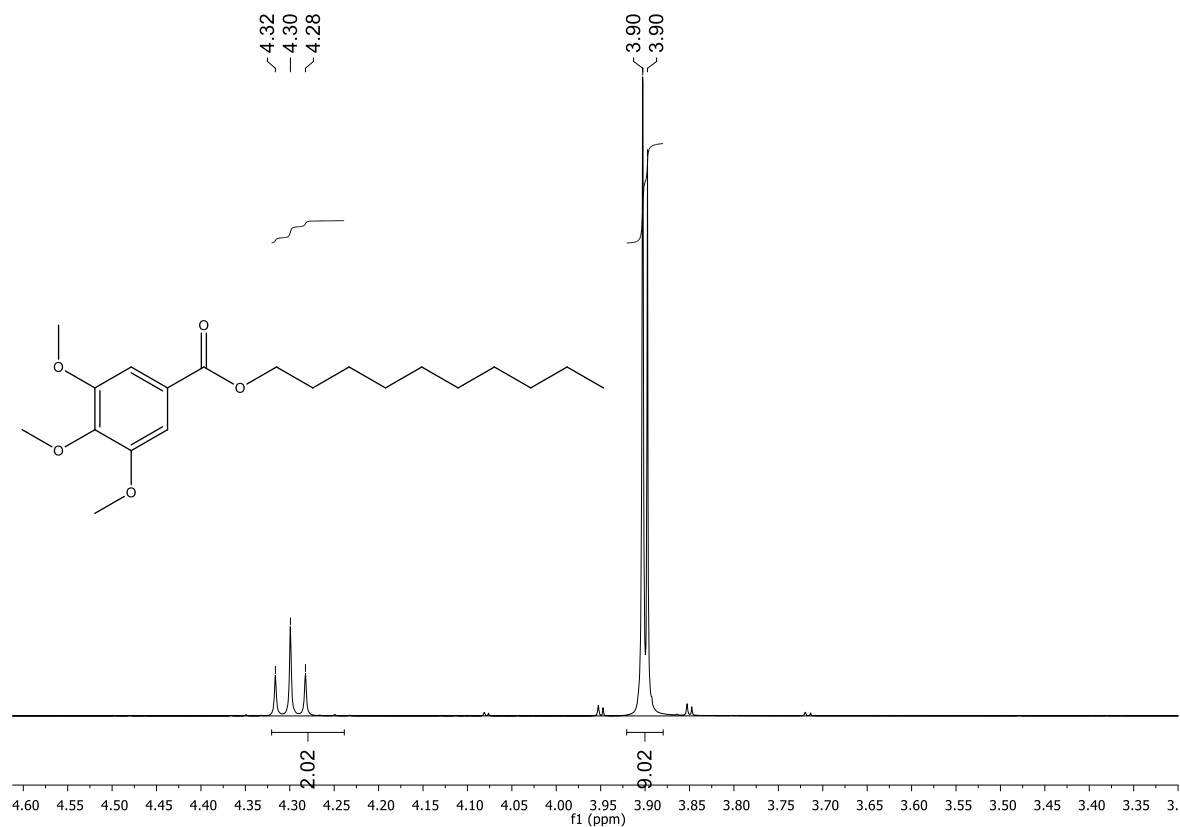
Figura 56. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (**8**), (CDCl_3 , 400 MHz).**Figura 57.** Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (**8**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (**8**), (CDCl_3 , 400 MHz).

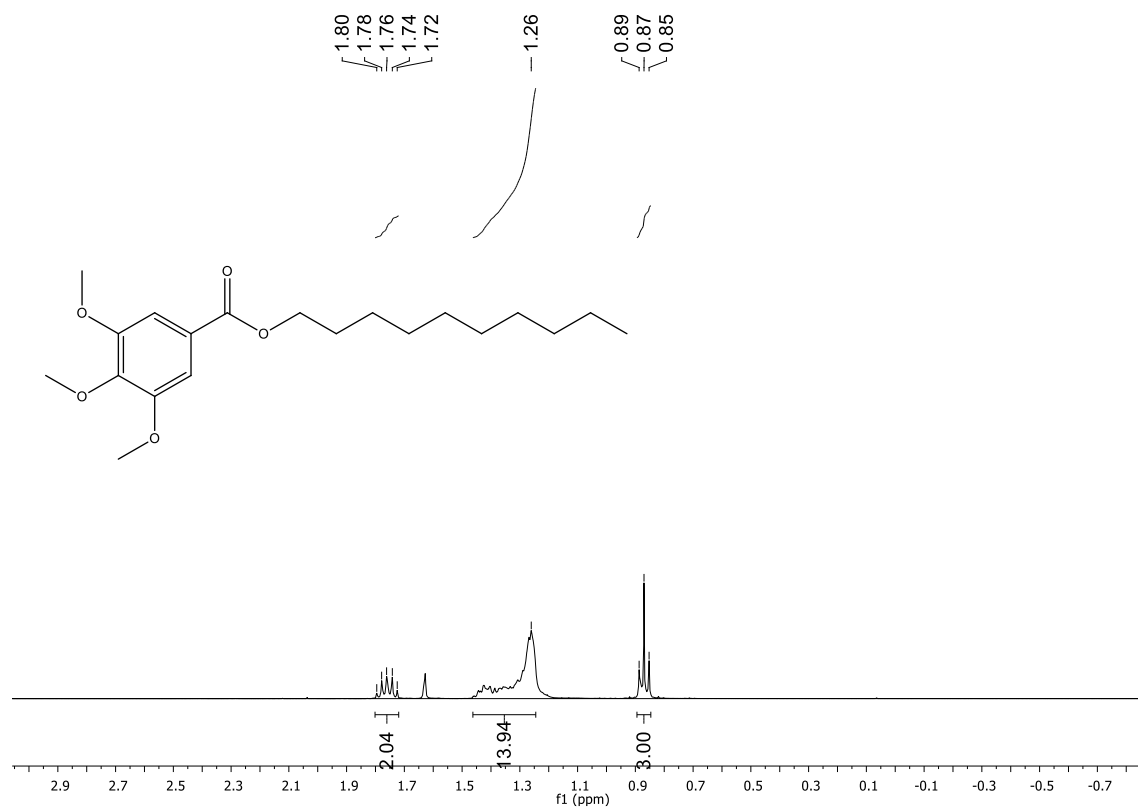


Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (**8**) (CDCl_3 , 100 MHz).

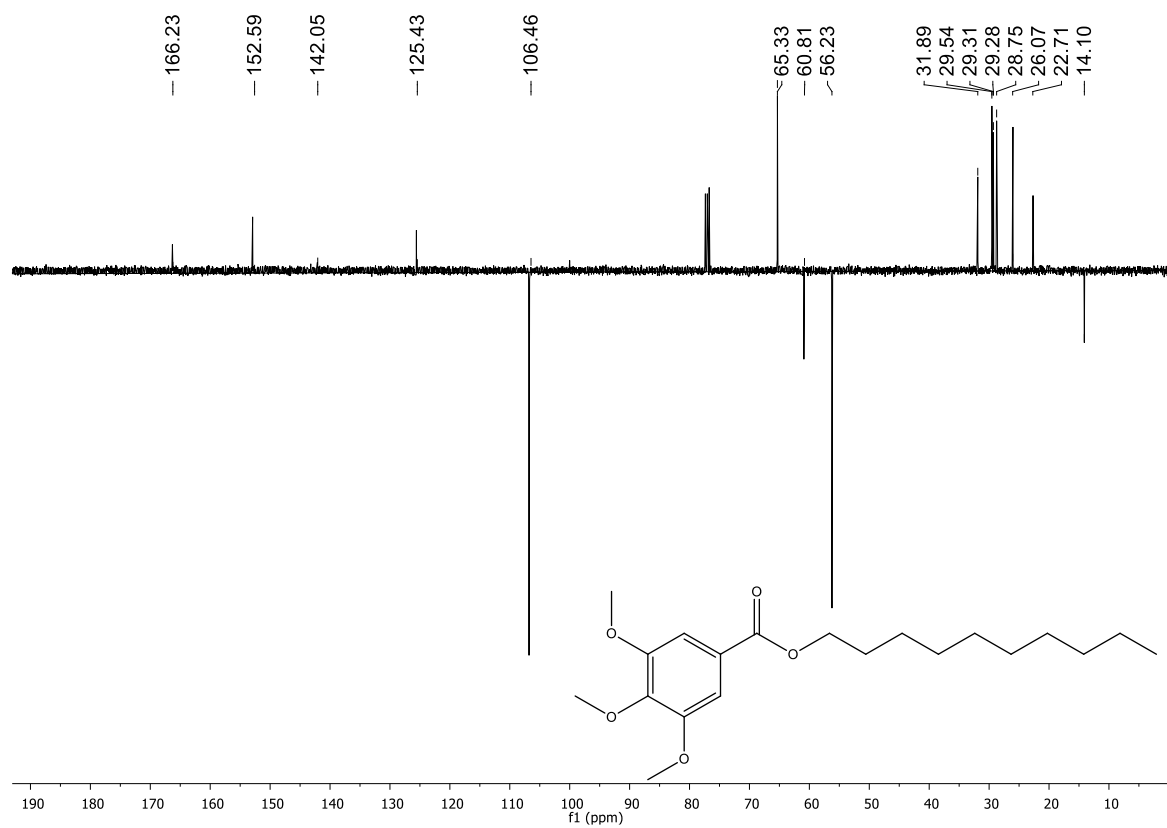


Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de decila (**8**) (CDCl_3 , 100 MHz).

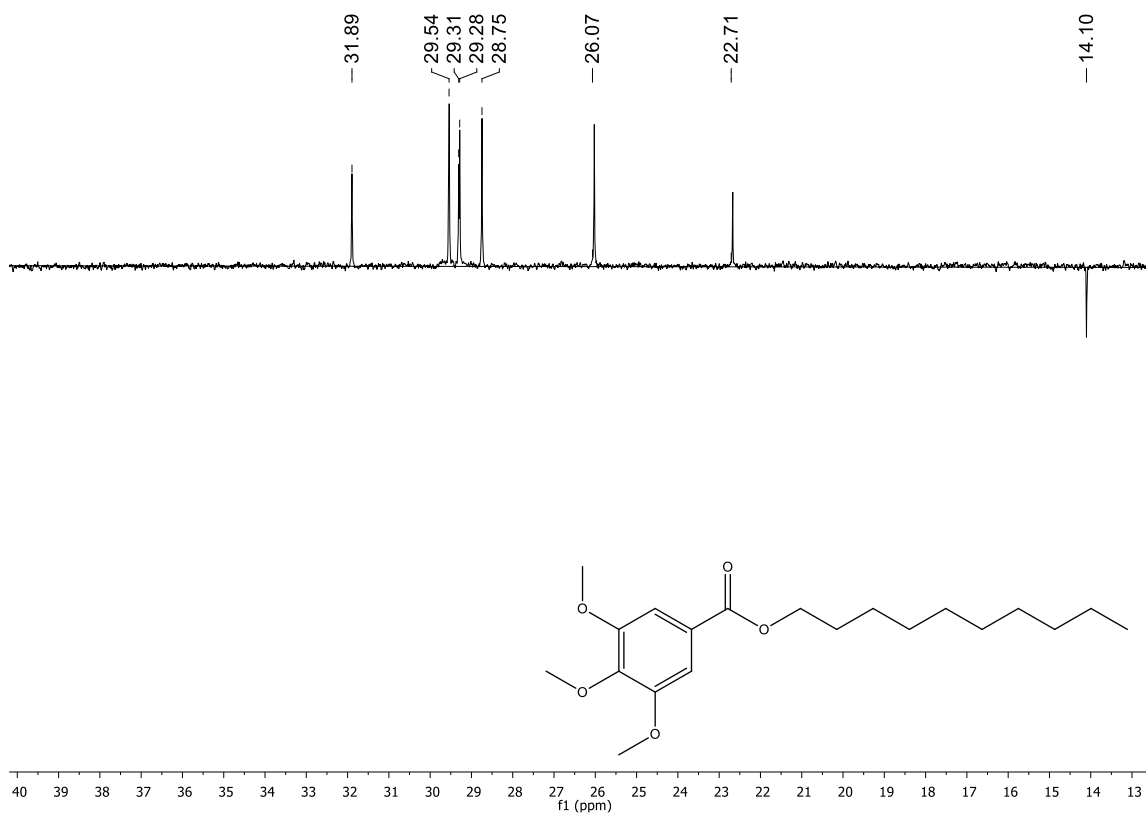


Figura 61. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (**9**).

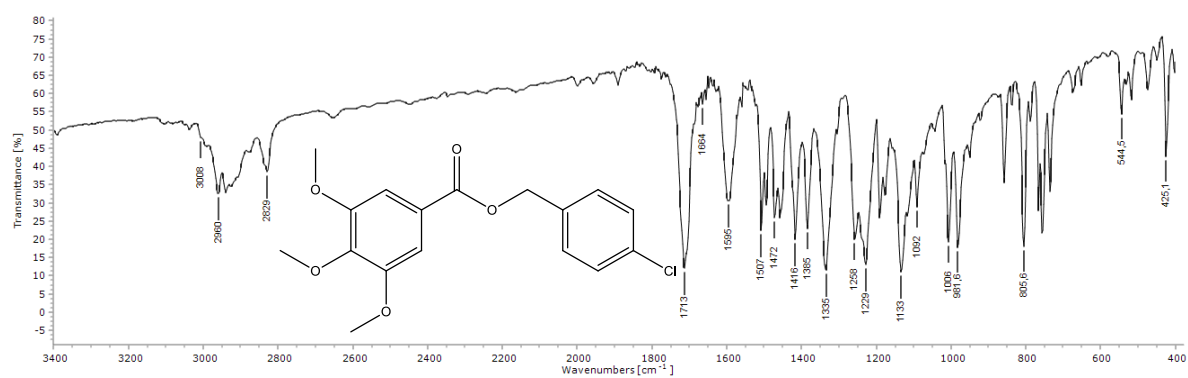


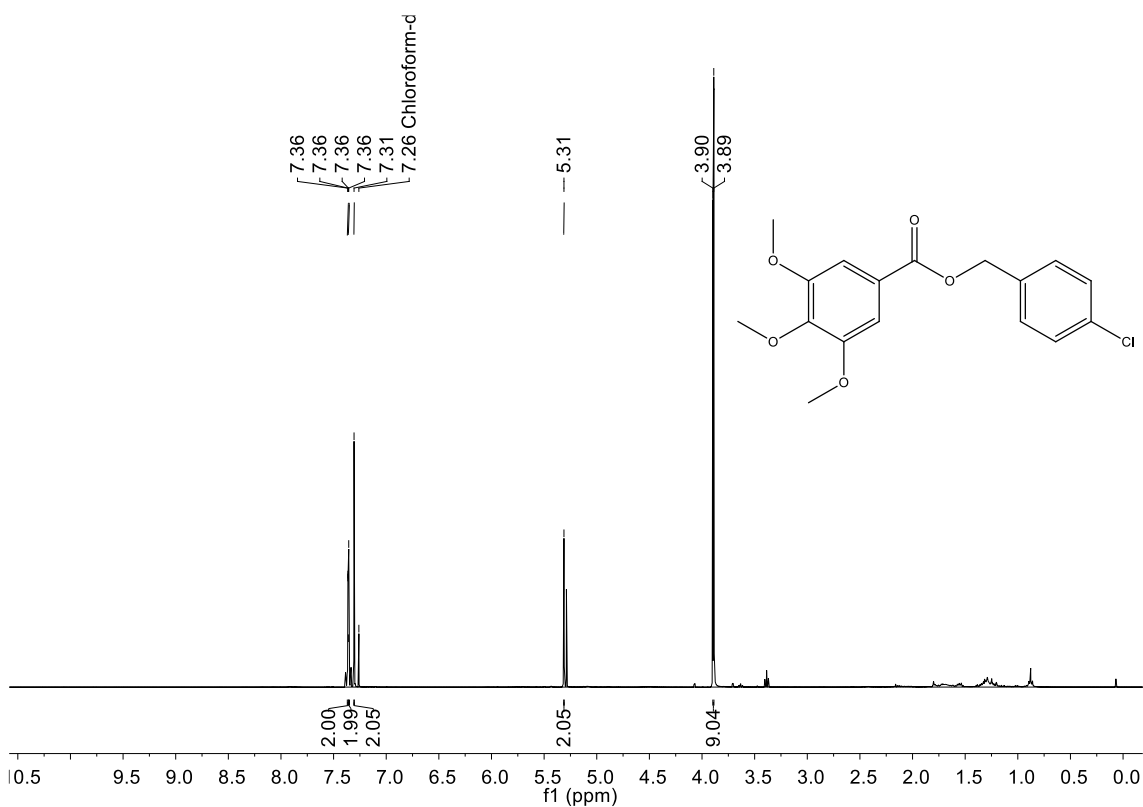
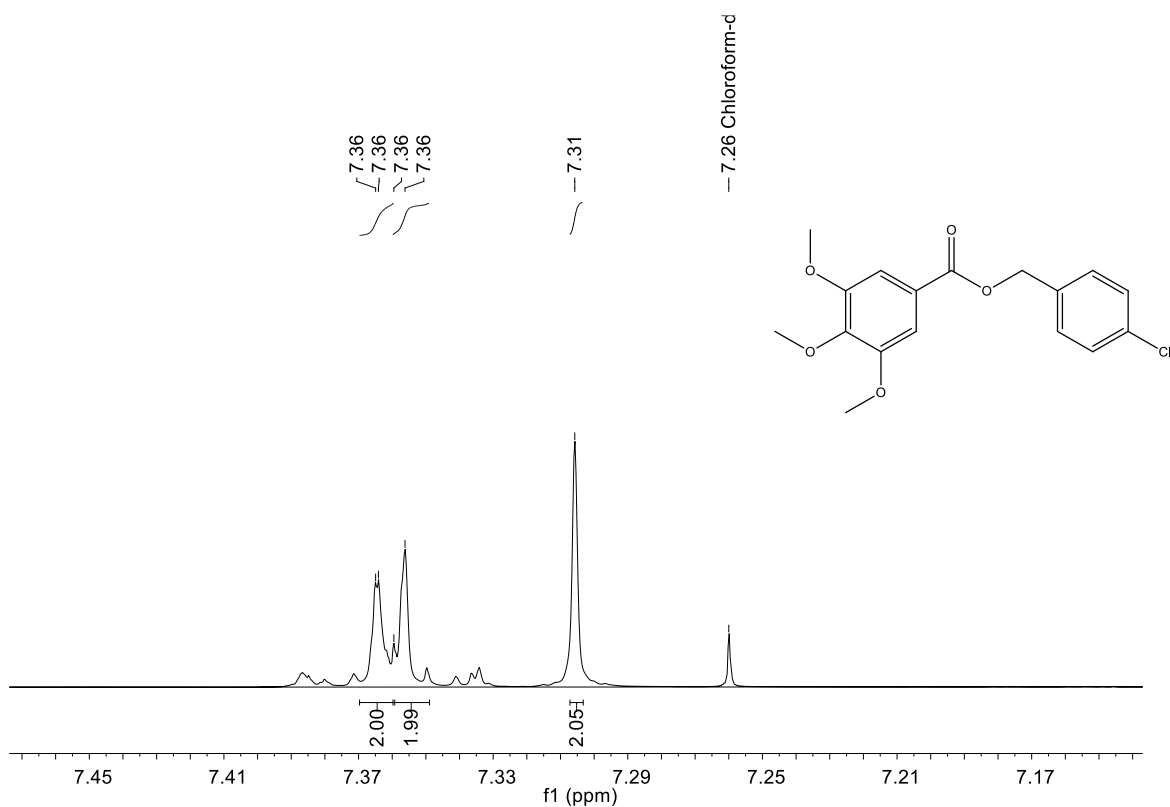
Figura 62. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl_3 , 400 MHz).**Figura 63.** Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl_3 , 100 MHz).

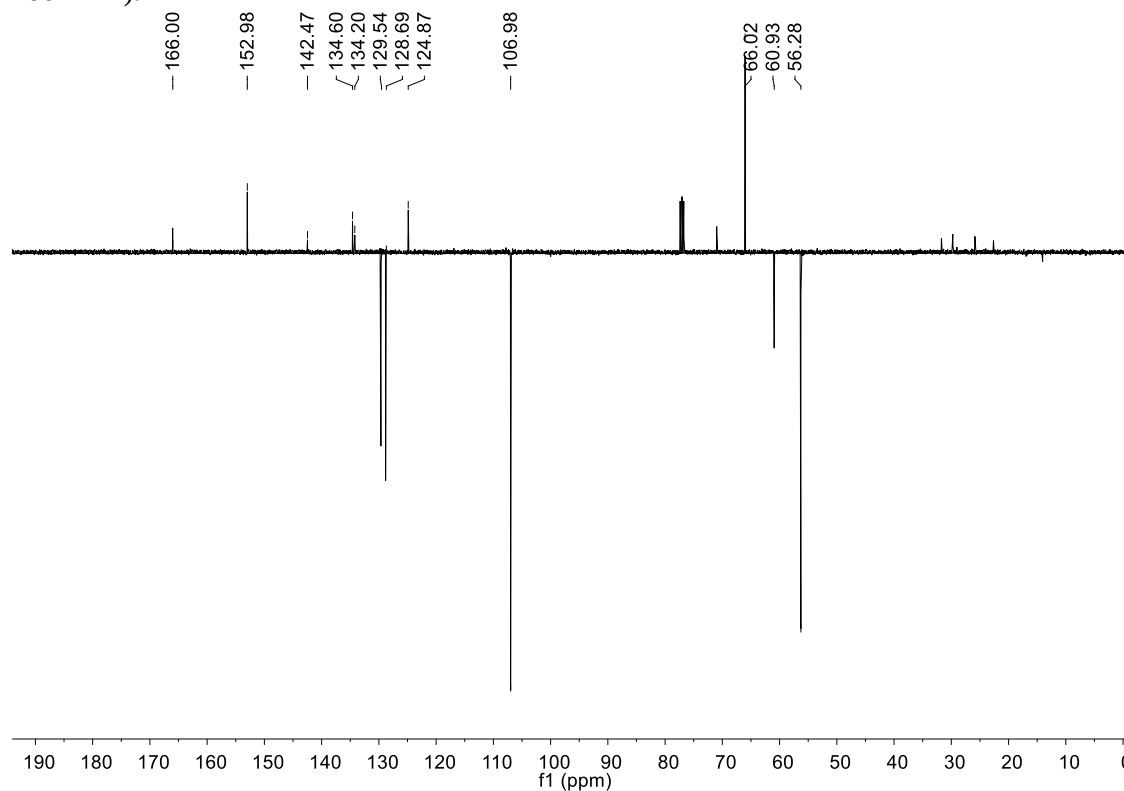


Figura 65. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (**9**), (CDCl_3 , 100 MHz).

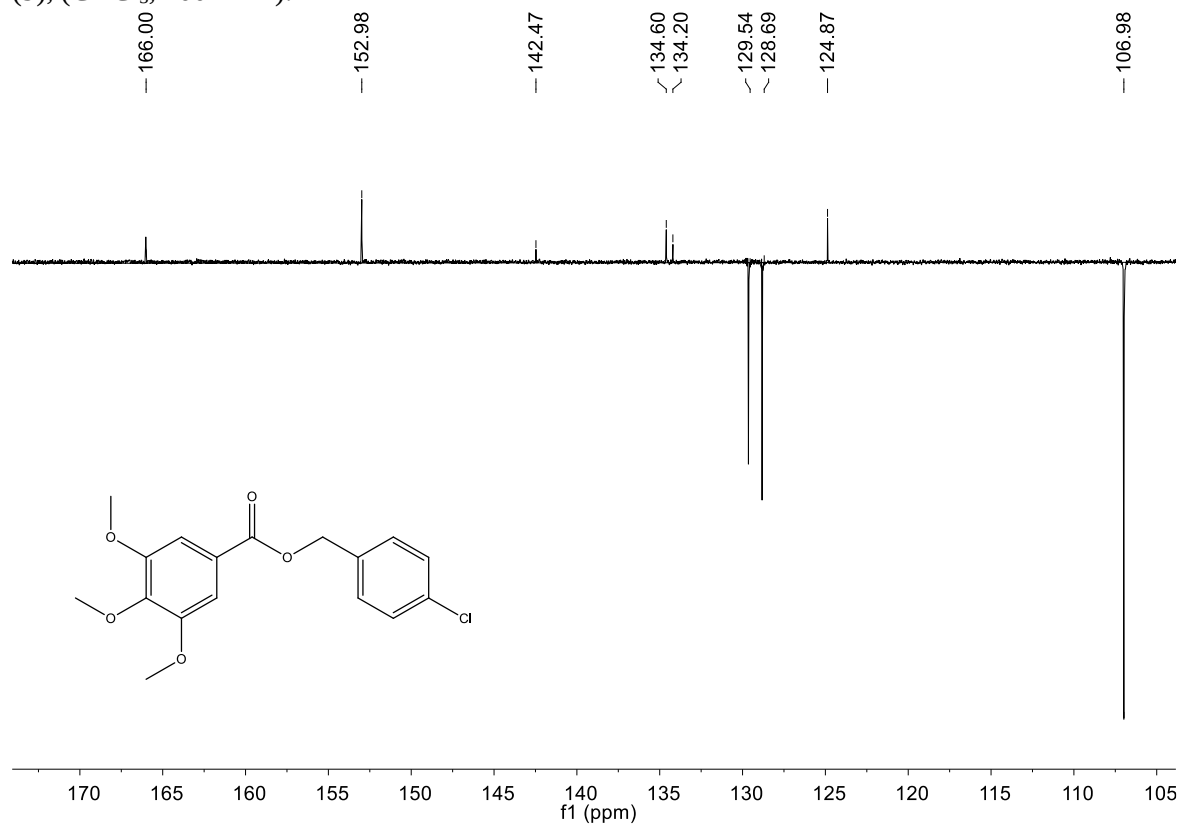


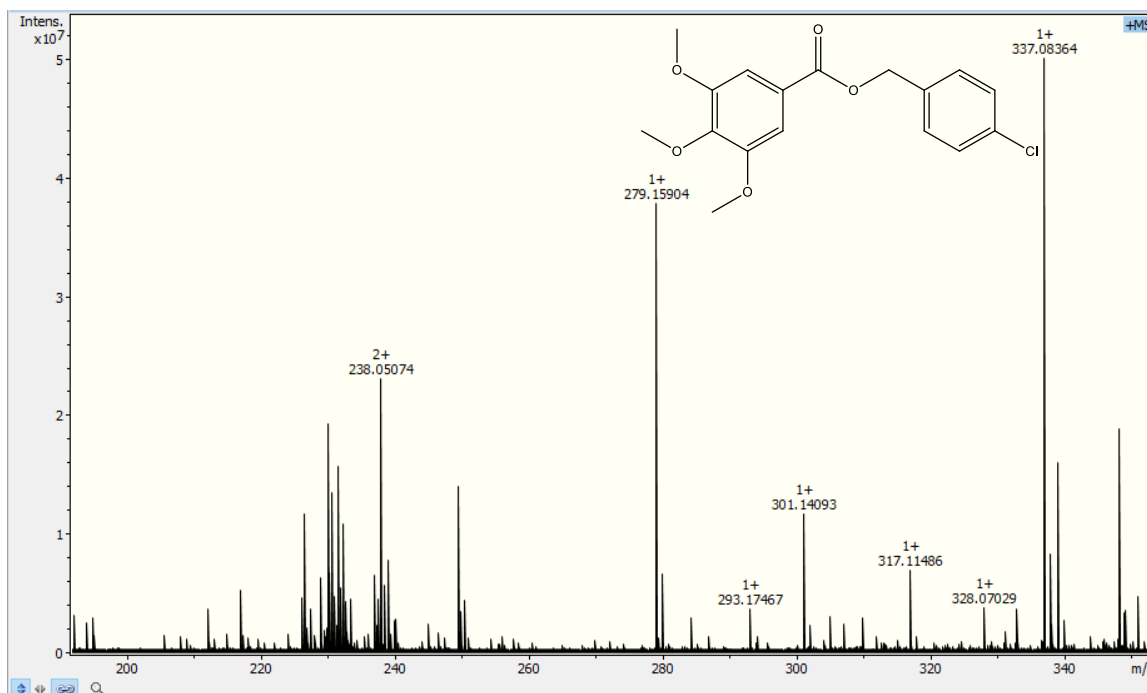
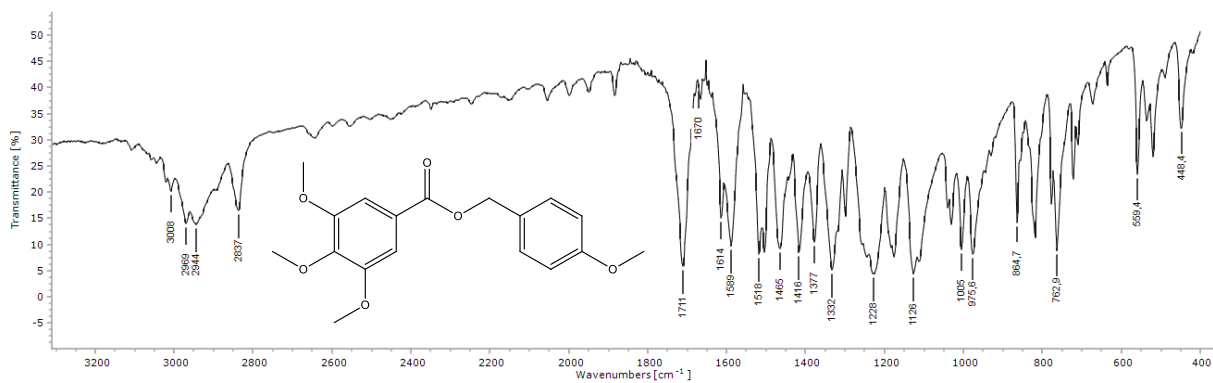
Figura 66. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-cloro-benzila (**9**).**Figura 67.** Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**).

Figura 68. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**), (CDCl_3 , 400 MHz).

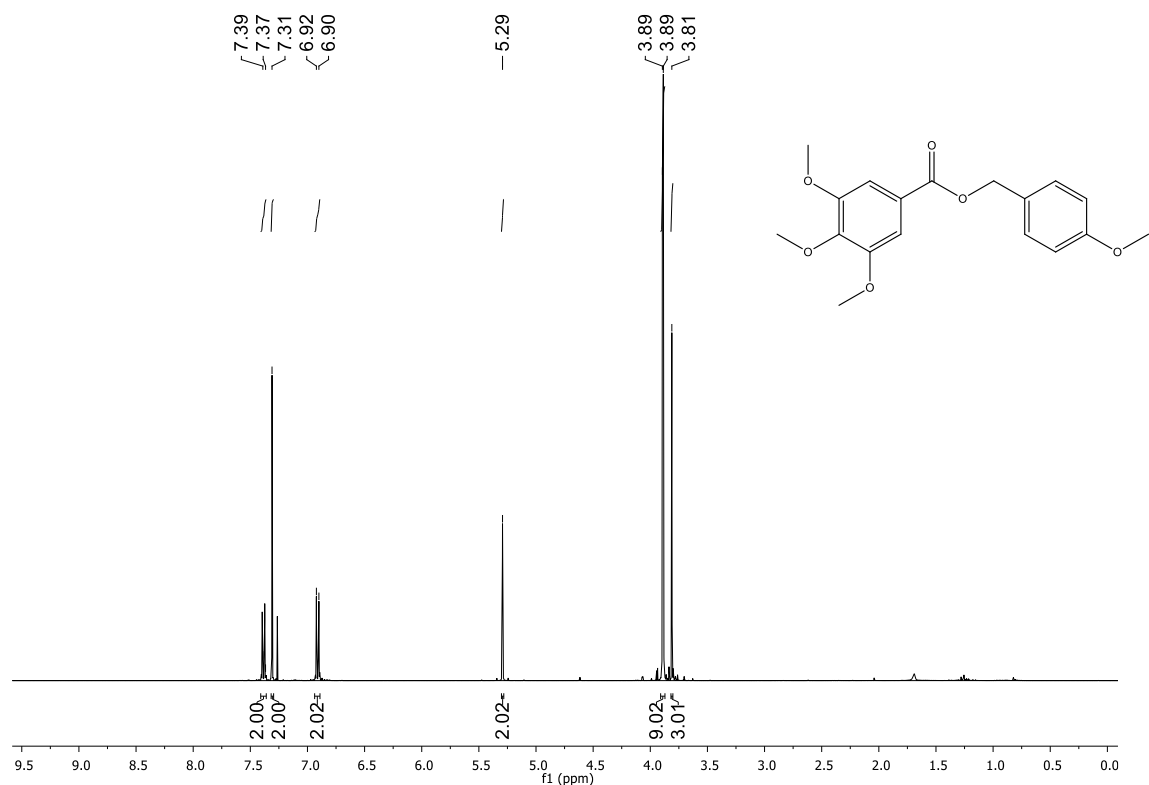


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**), (CDCl_3 , 400 MHz).

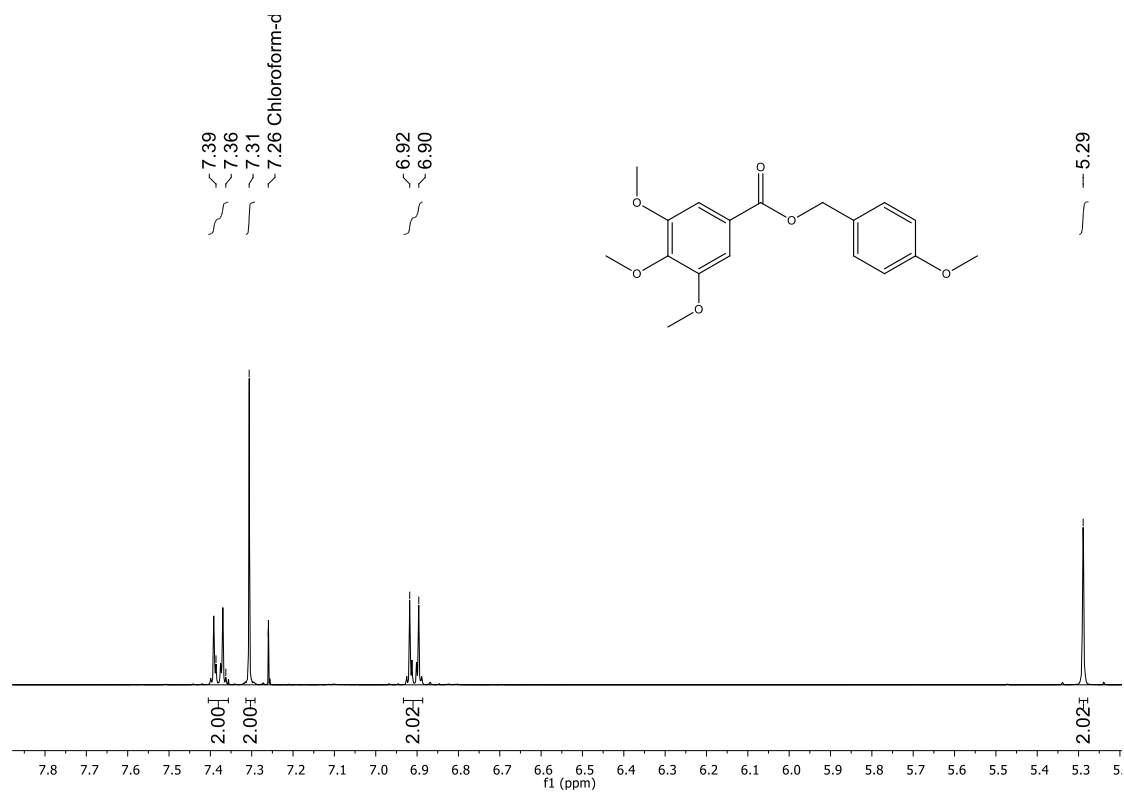


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**), (CDCl_3 , 100 MHz).

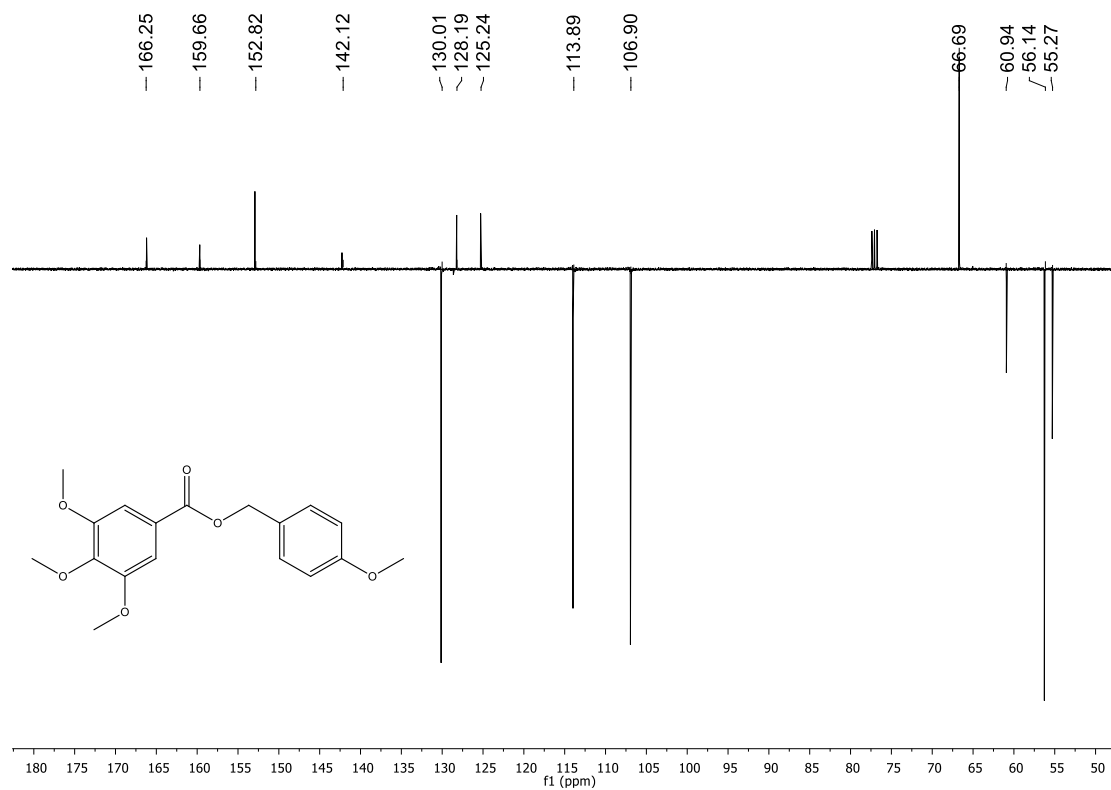


Figura 71. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metoxi-benzila (**10**).

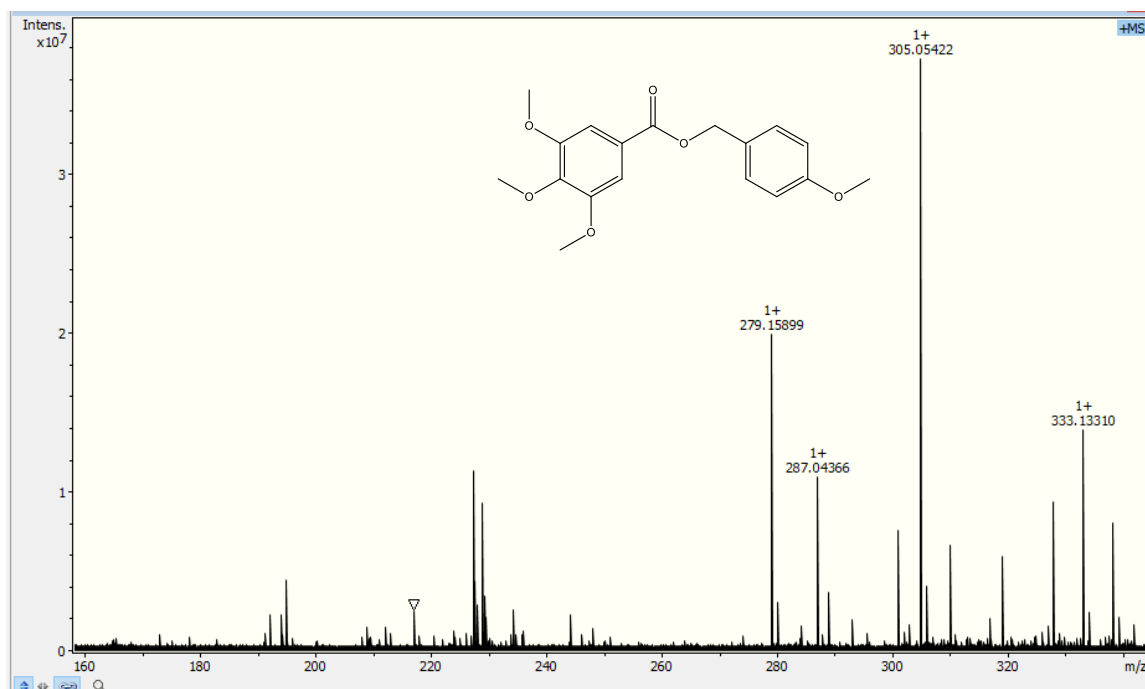


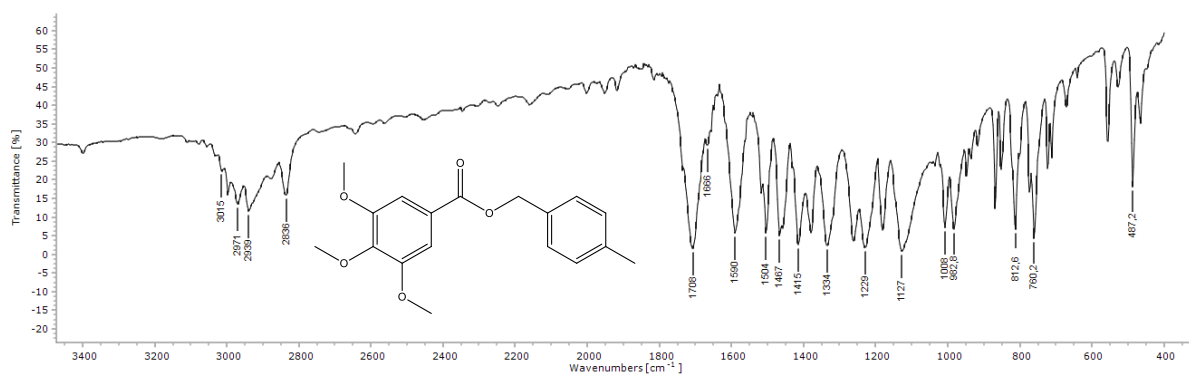
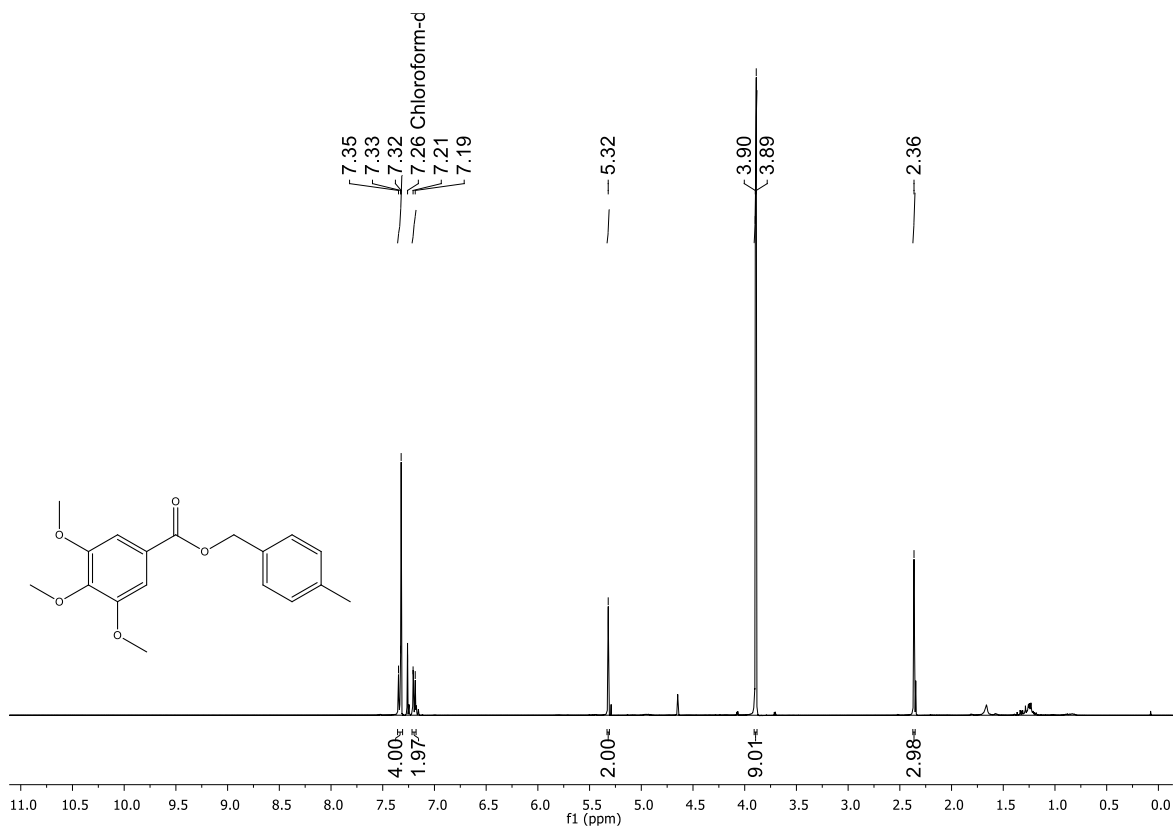
Figura 72. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (**11**).**Figura 73.** Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (**11**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 74. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (**11**), (CDCl_3 , 400 MHz).

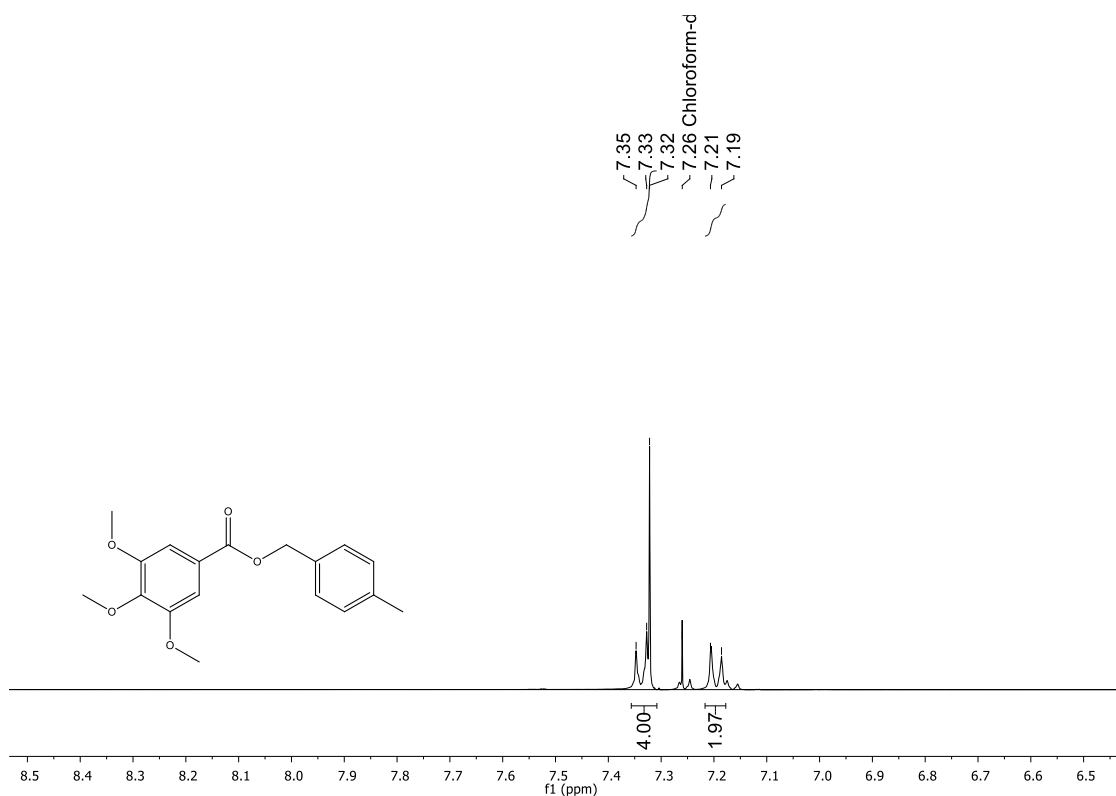


Figura 75. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (**11**), (CDCl_3 , 100 MHz).

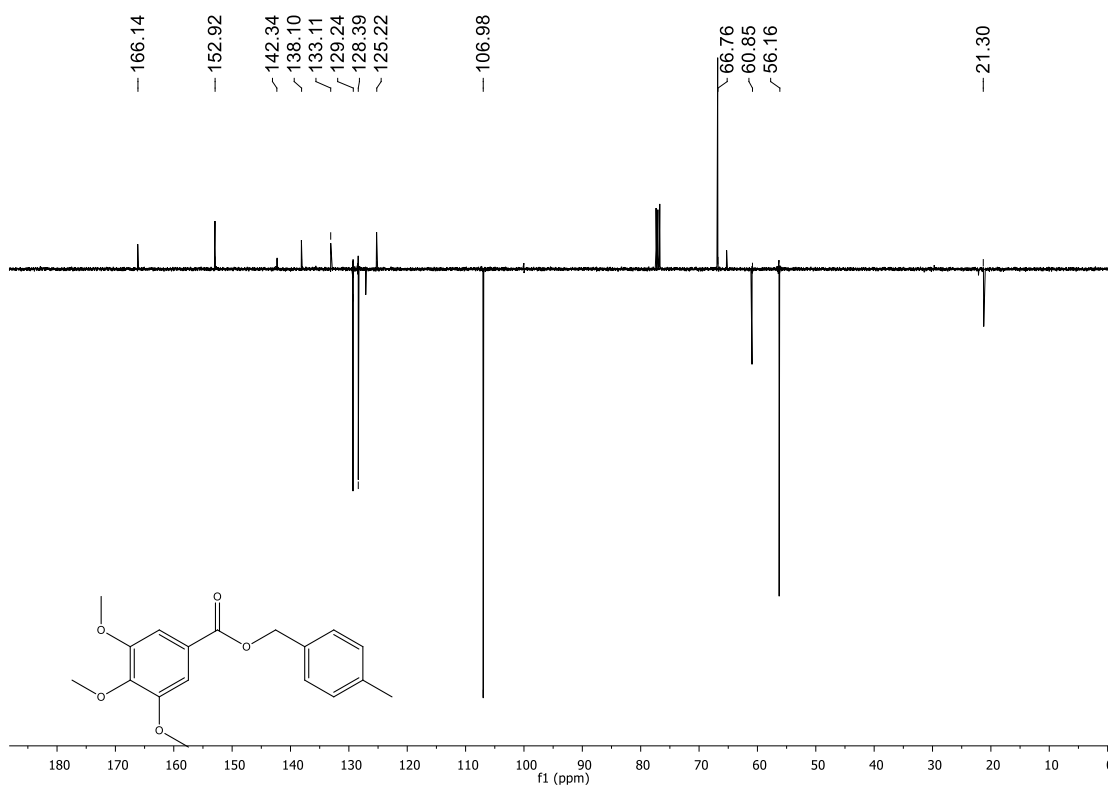


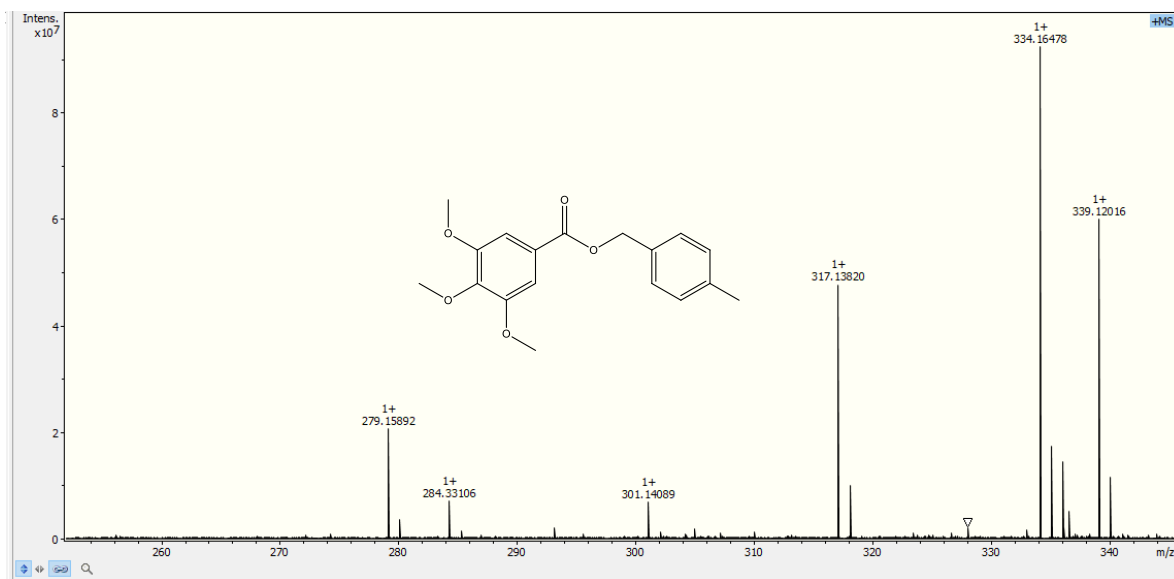
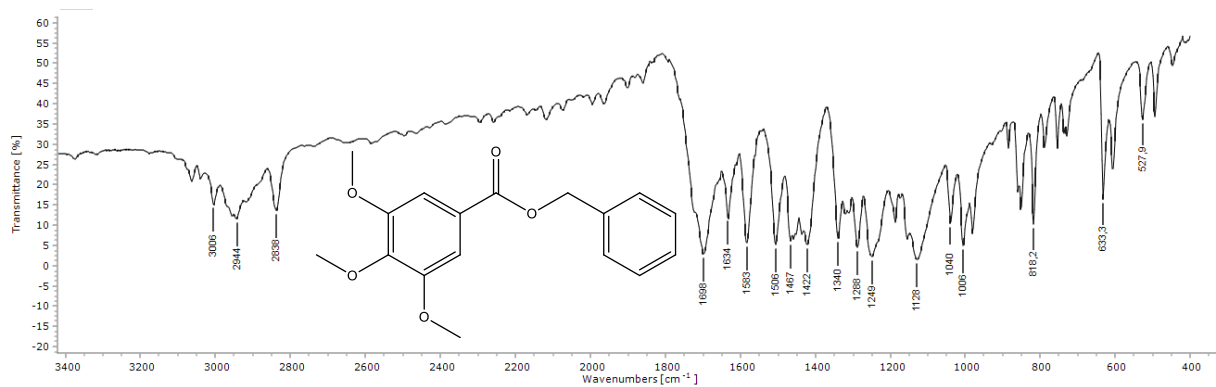
Figura 76. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-metilbenzila (**11**).**Figura 77.** Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (**12**).

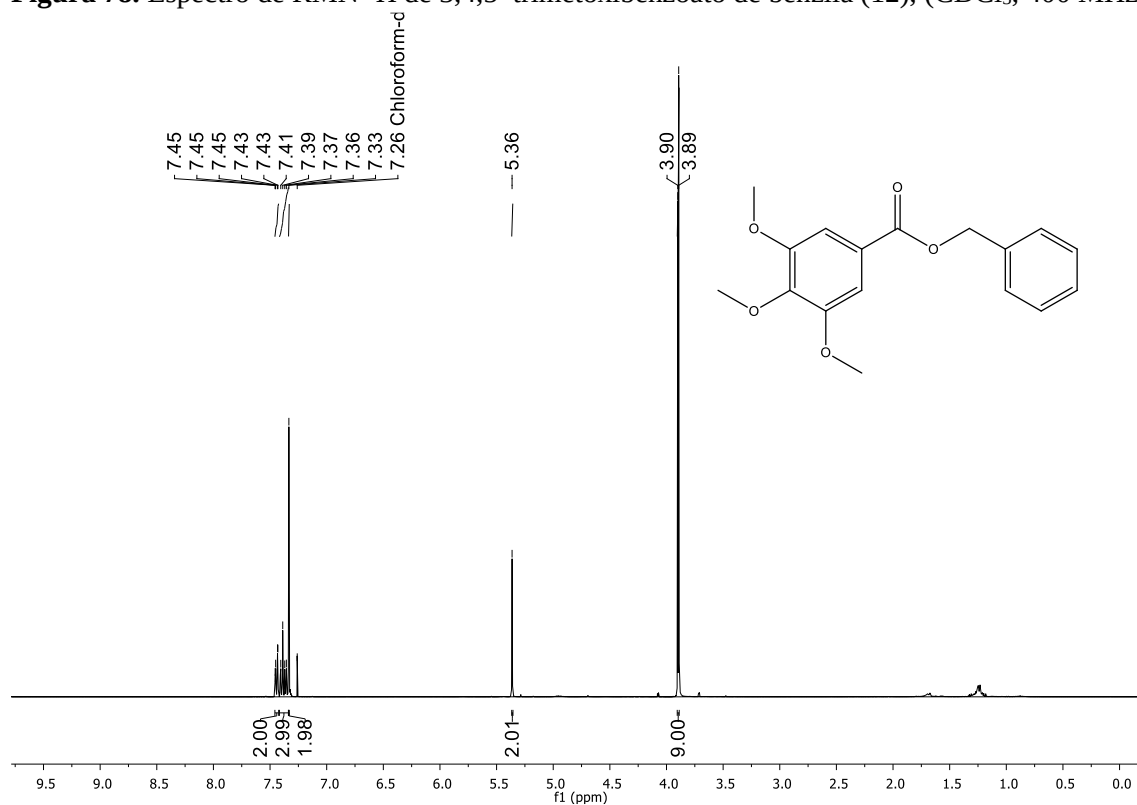
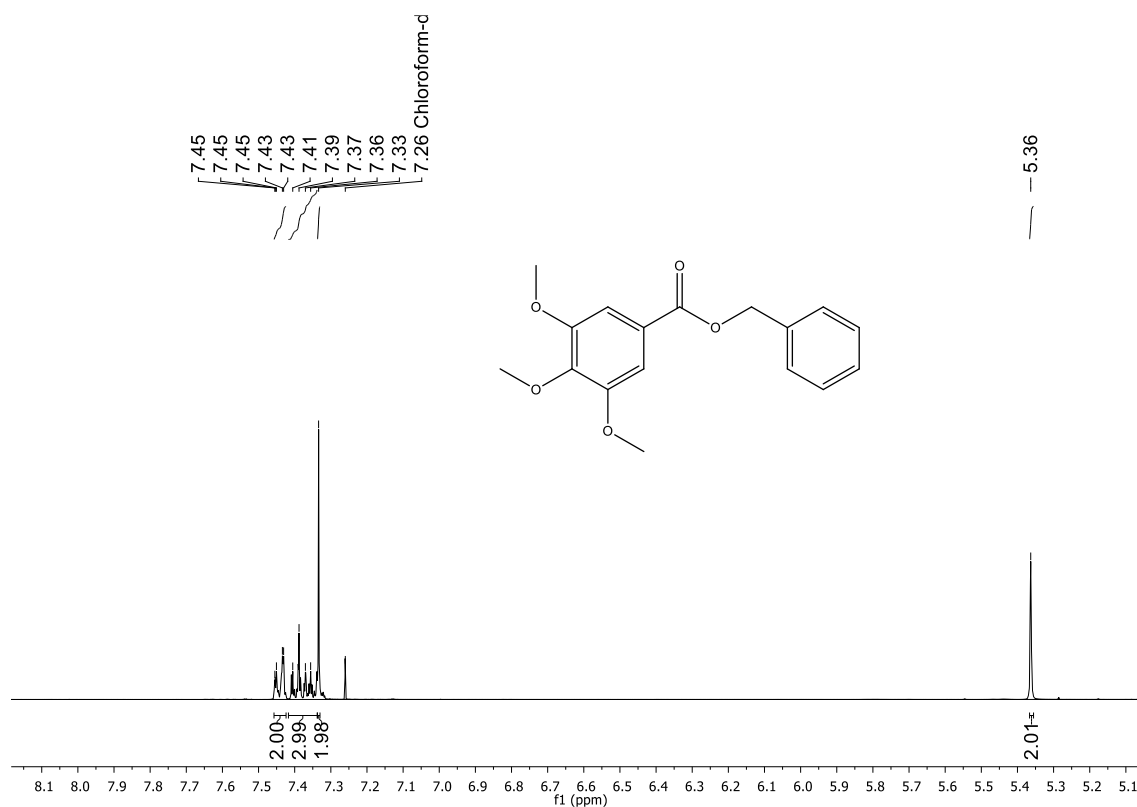
Figura 78. Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (12), (CDCl_3 , 400 MHz).**Figura 79.** Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (12), (CDCl_3 , 400 MHz).

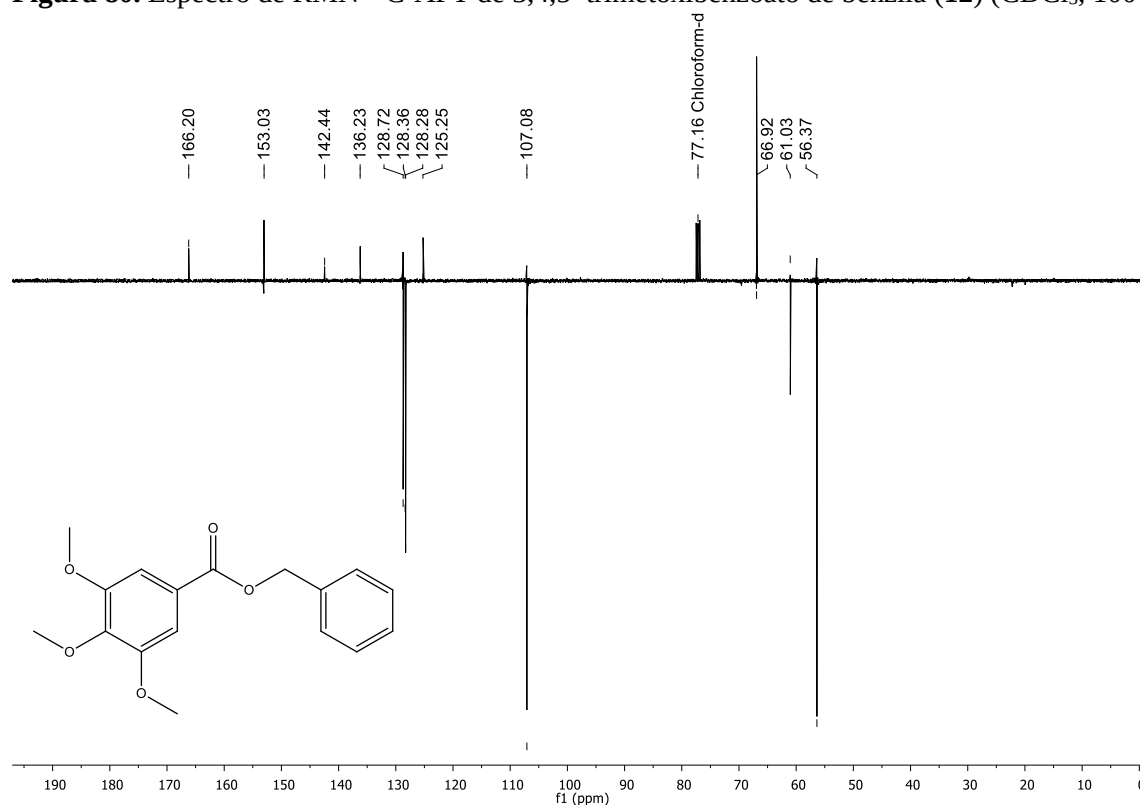
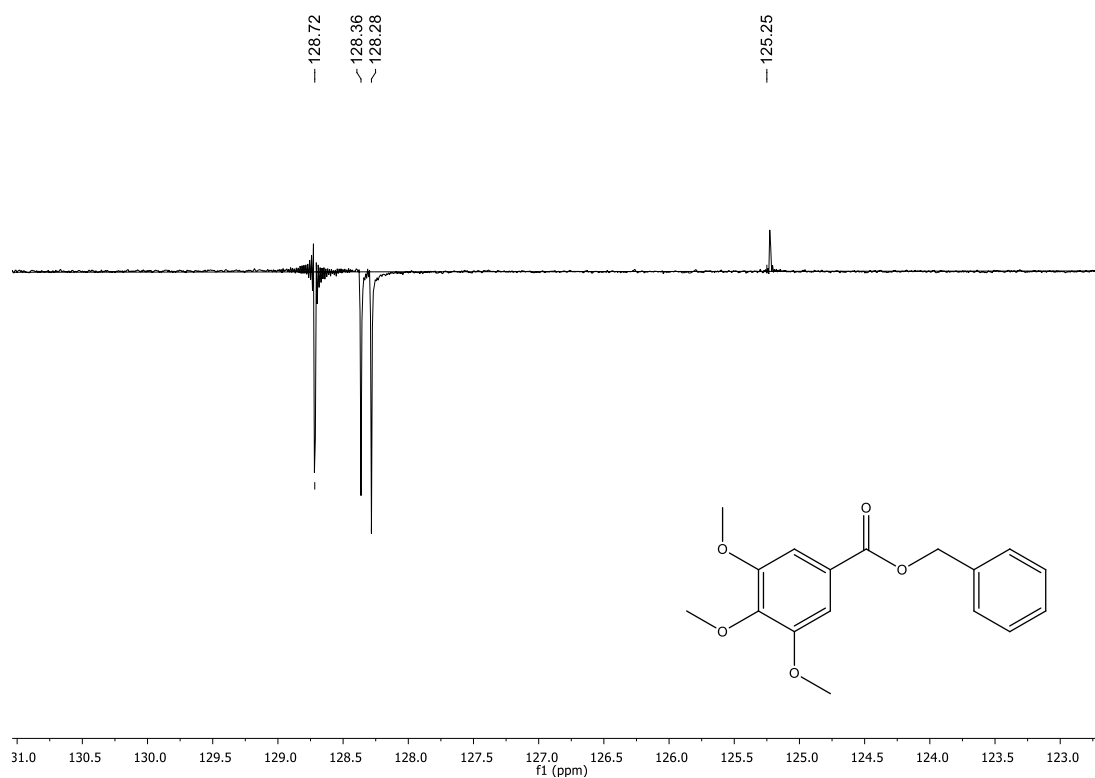
Figura 80. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (**12**) (CDCl_3 , 100 MHz).**Figura 81.** Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de benzila (**12**) (CDCl_3 , 100 MHz).

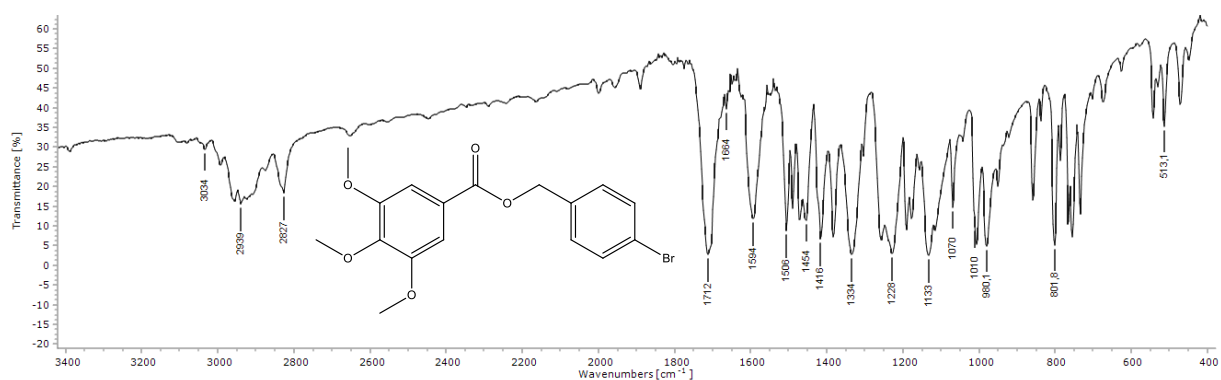
Figura 82. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (**13**).**Figura 83.** Espectro de RMN ^1H , de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (**13**) (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 84. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (**13**), (CDCl_3 , 500 MHz).



Figura 85. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (**13**), (CDCl_3 , 500 MHz).

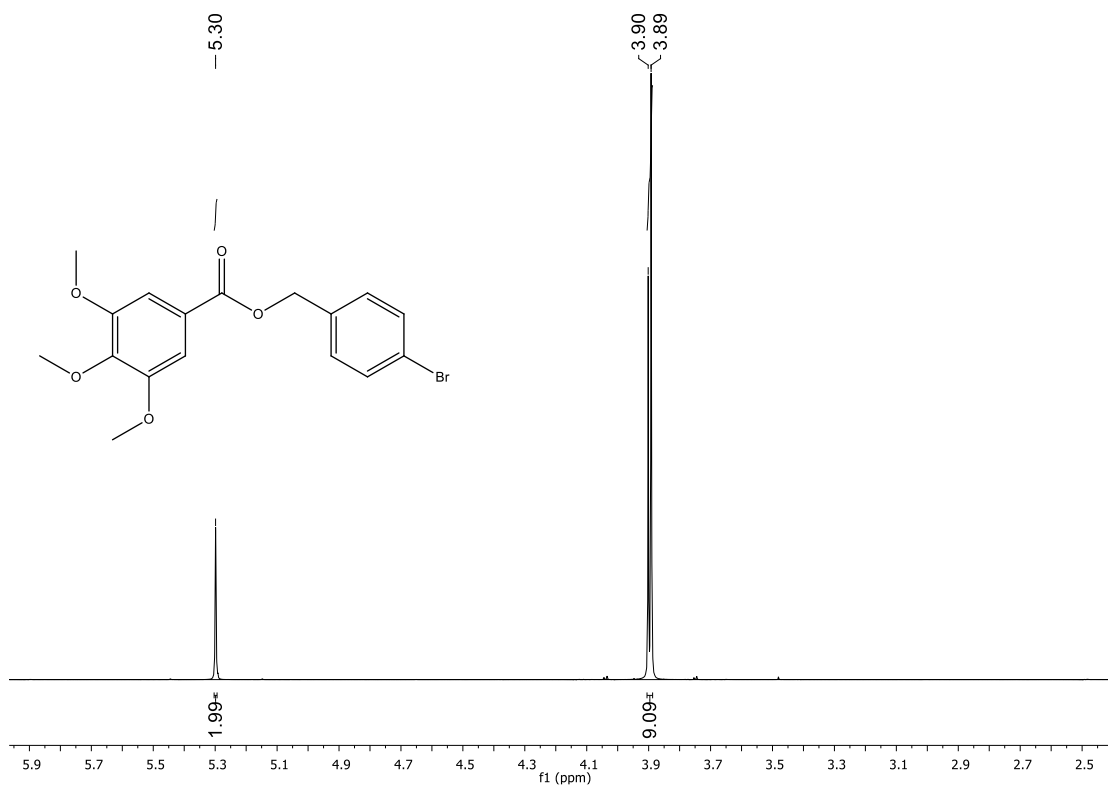


Figura 86. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (**13**), (CDCl_3 , 125 MHz).



Figura 87. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-bromo-benzila (**13**).

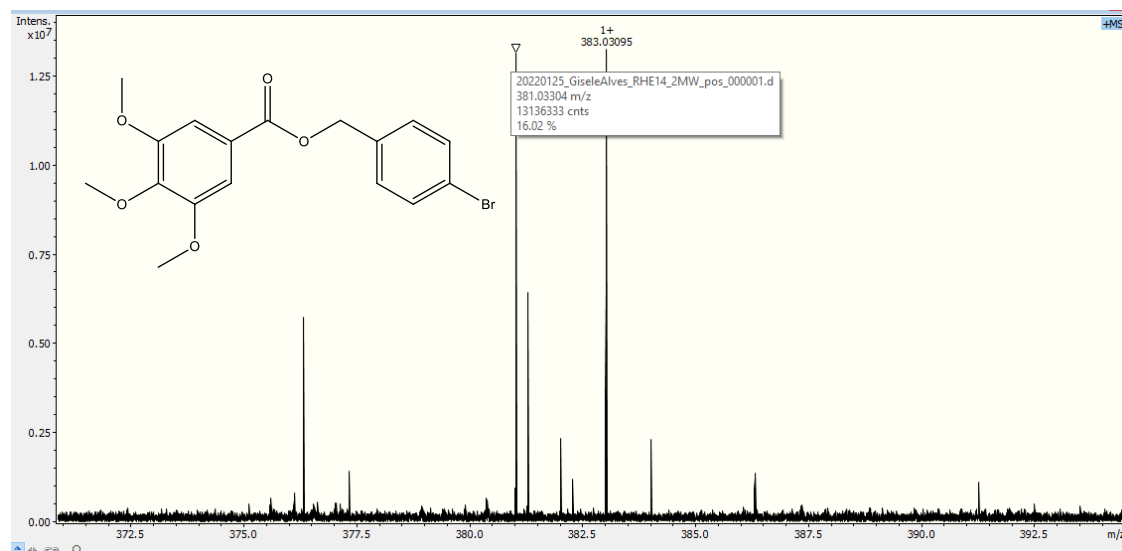


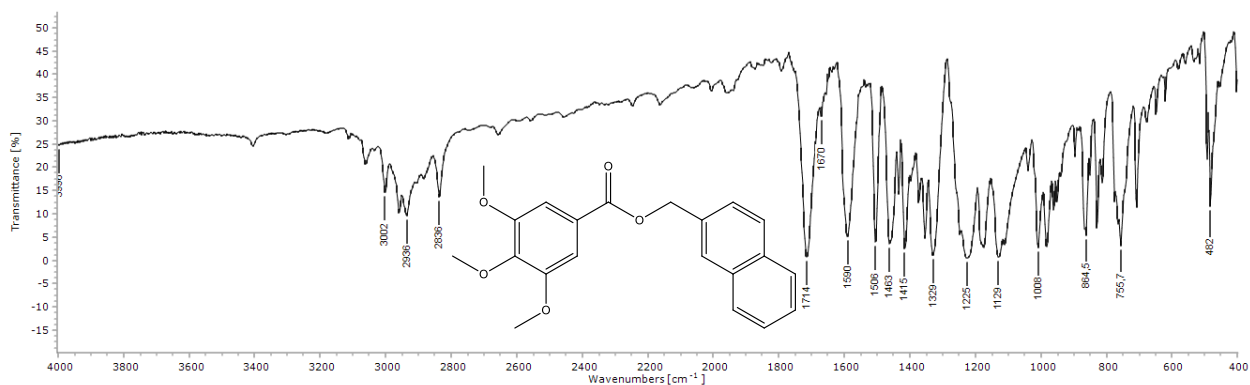
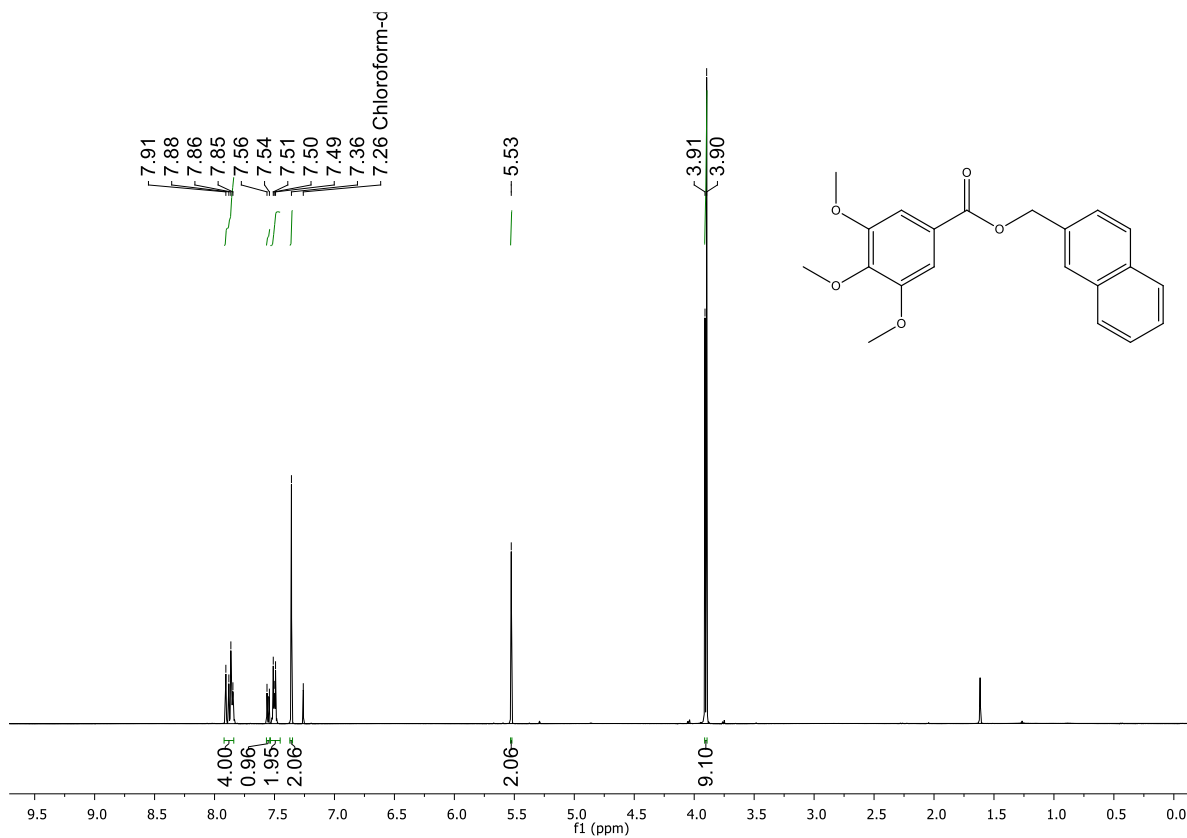
Figura 88. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (**14**).**Figura 89.** Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (**14**), (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 90. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (**14**), (CDCl_3 , 400 MHz).

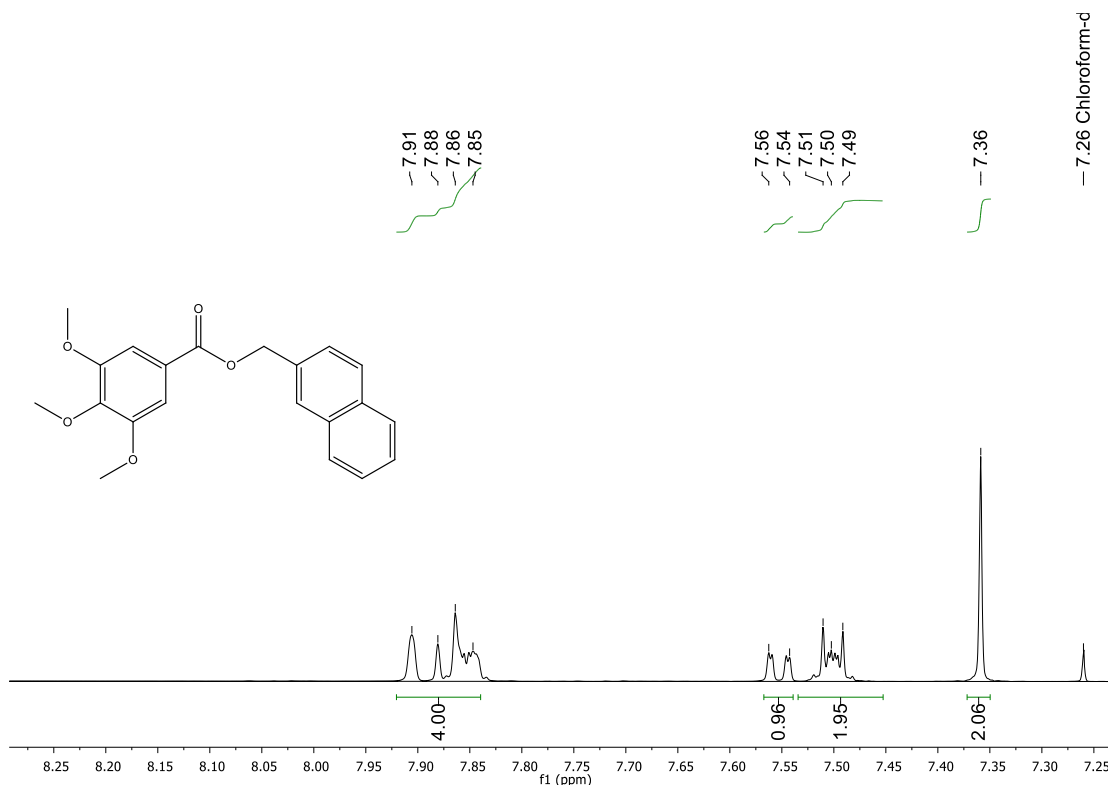


Figura 91. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (**14**), (CDCl_3 , 125 MHz).

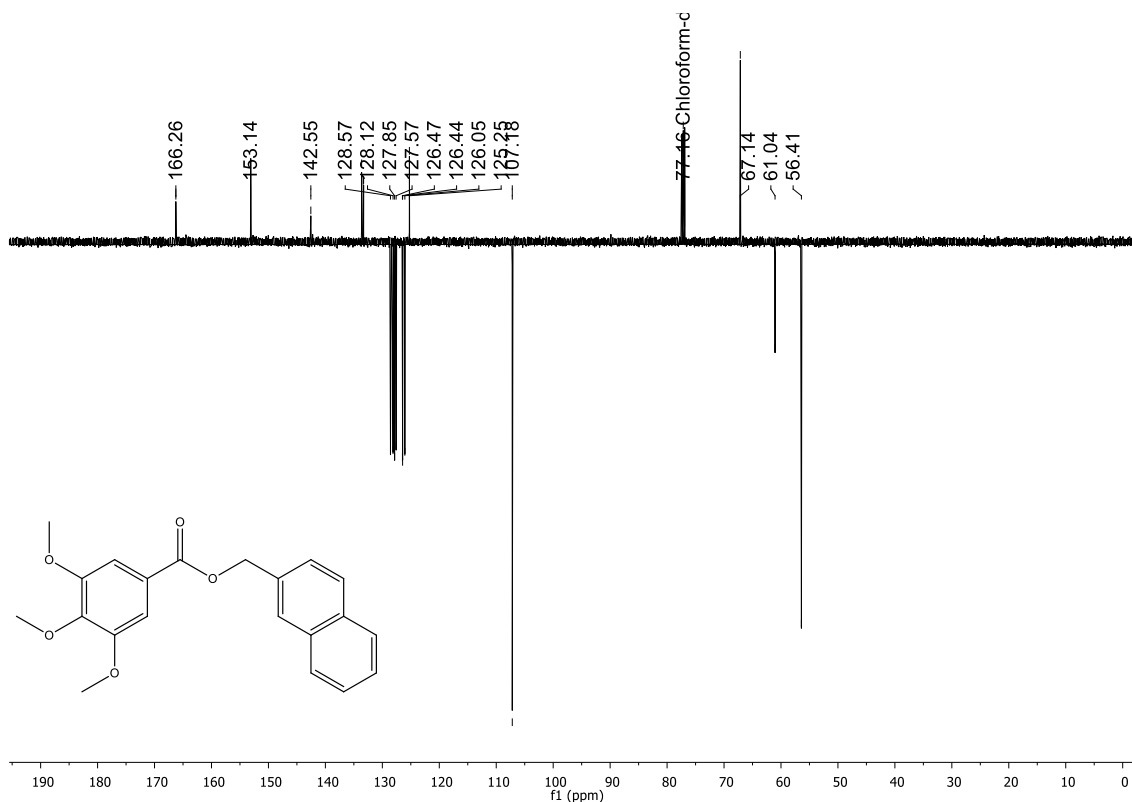


Figura 92. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (**14**), (CDCl_3 , 100 MHz).

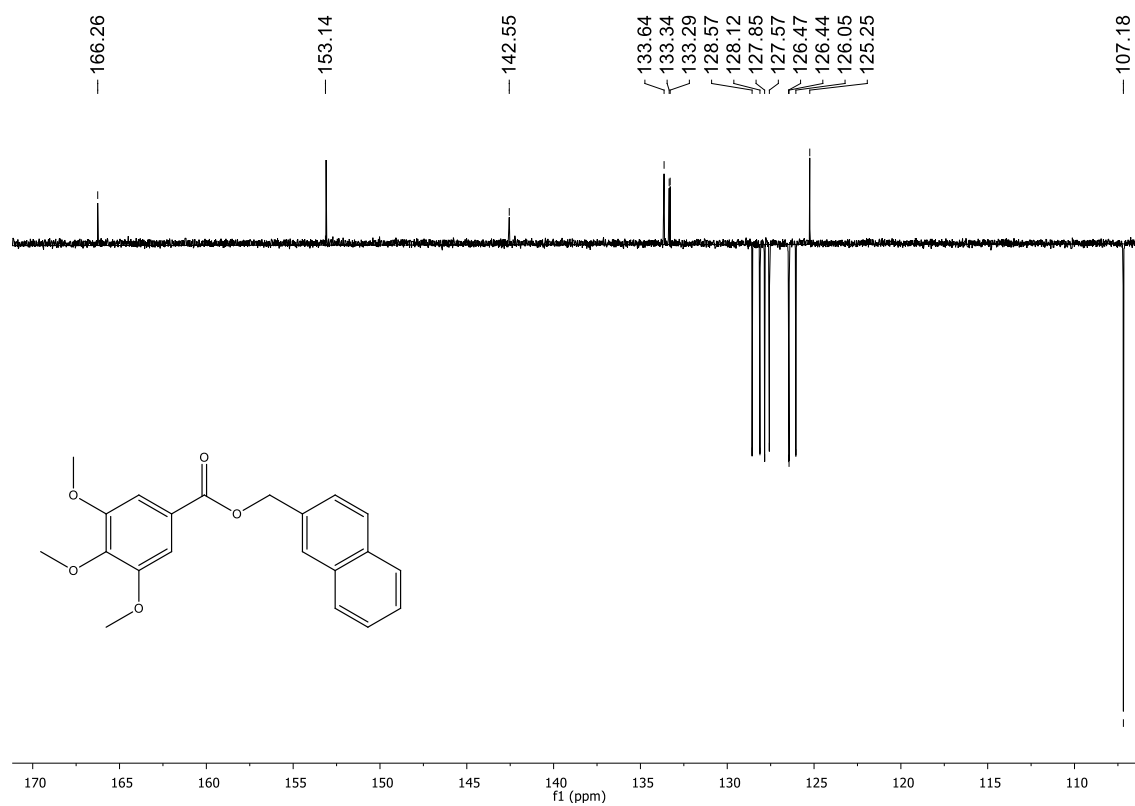


Figura 93. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de 2-metilnaftaleno (**14**).

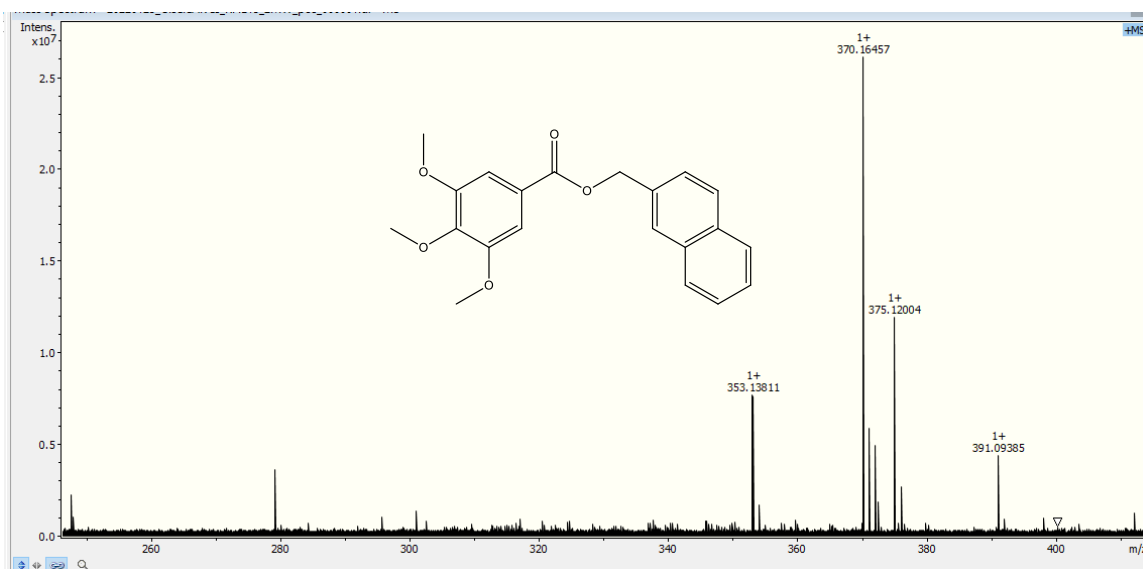


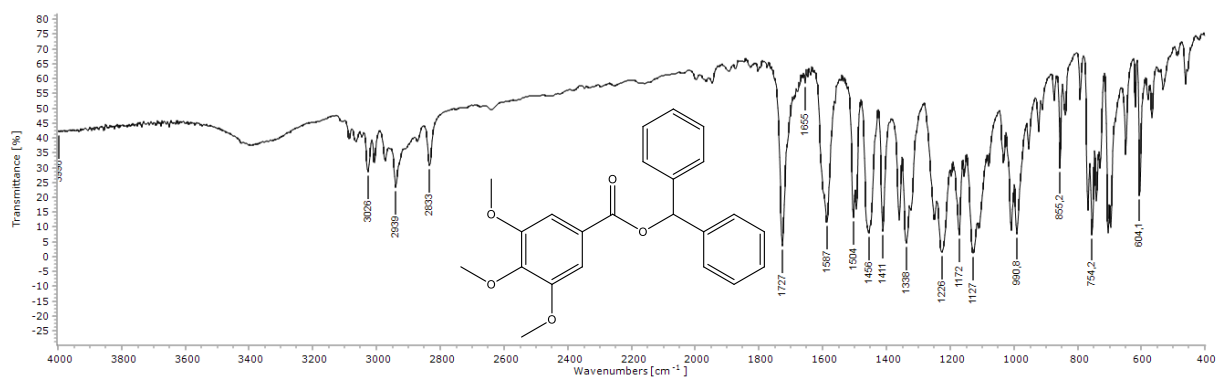
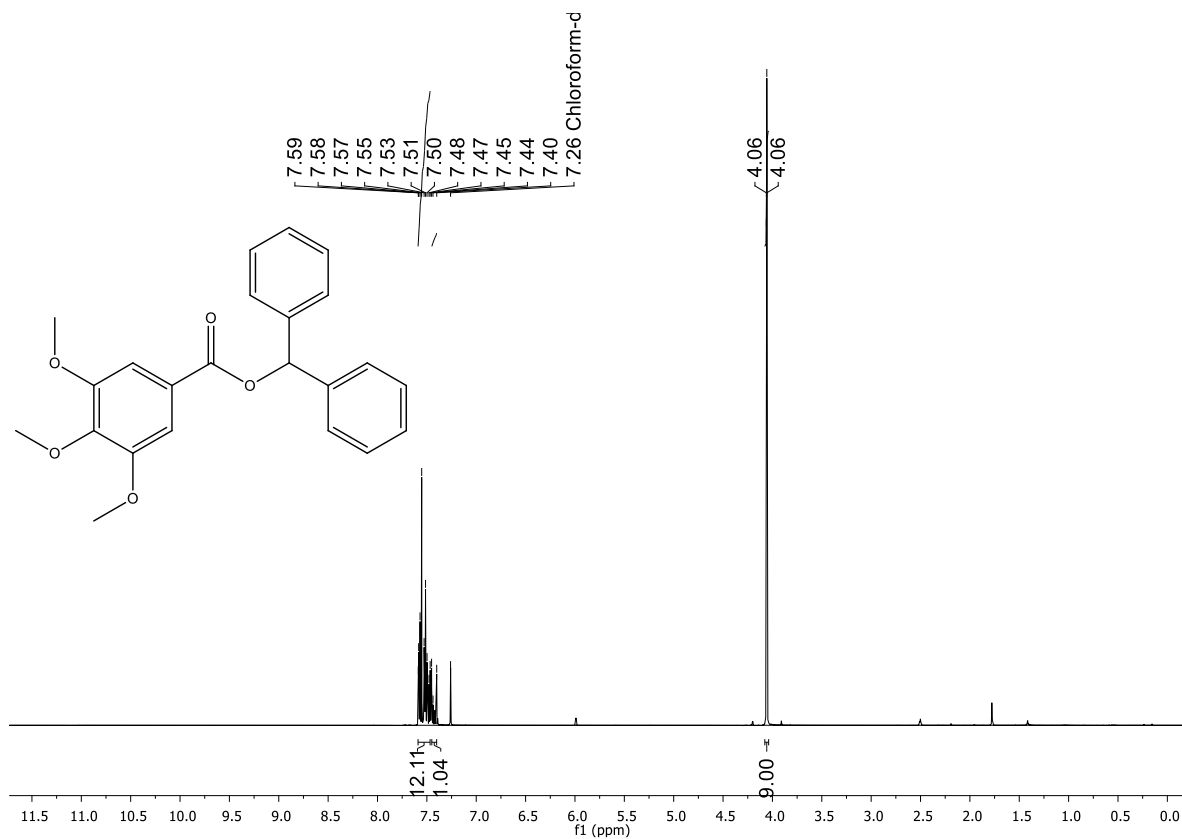
Figura 94. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (**15**).**Figura 95.** Espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (**15**), (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 96. Expansão do espectro de RMN ^1H de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (**15**), (CDCl_3 , 500 MHz).

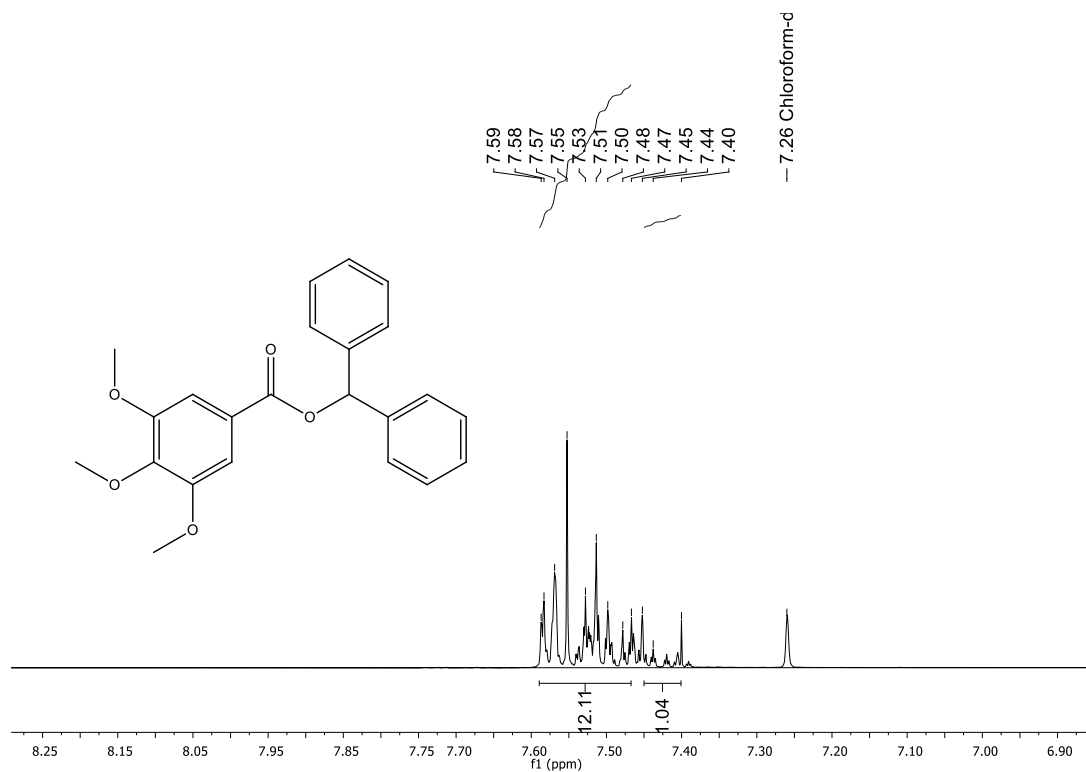


Figura 97. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (**15**) (CDCl_3 , 100 MHz).

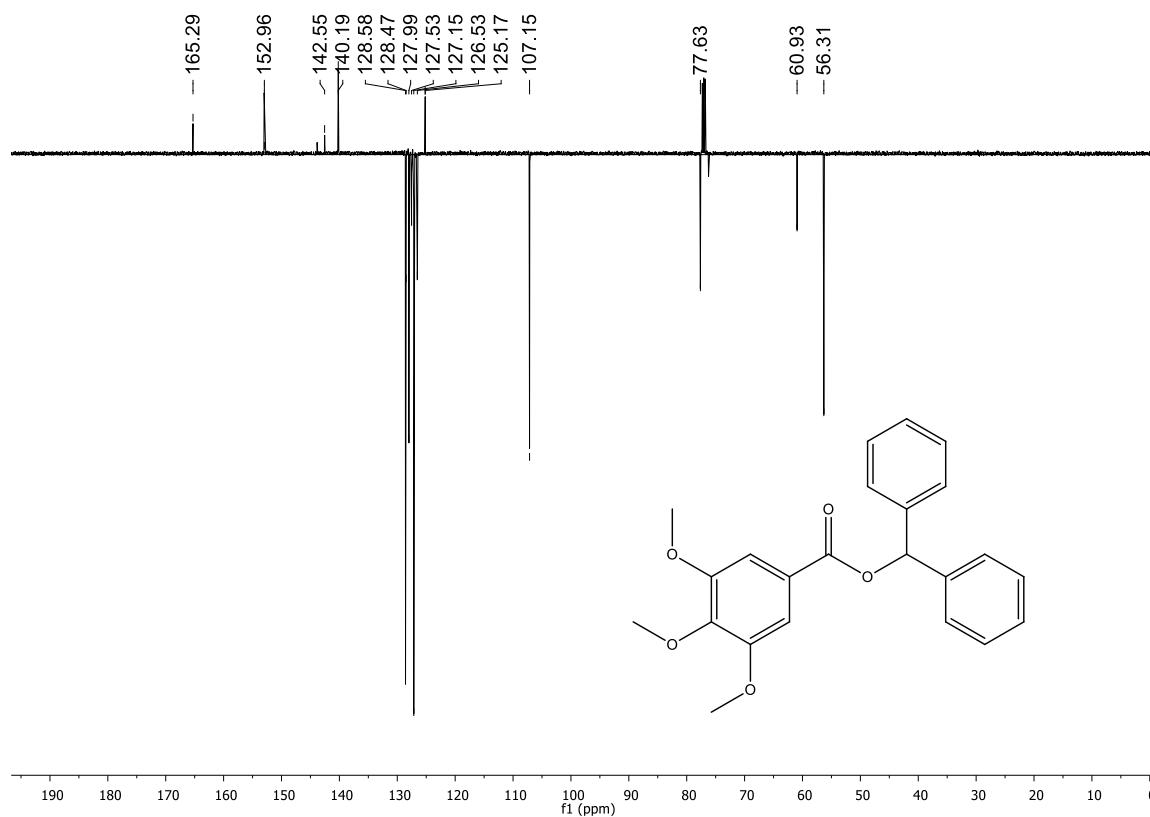


Figura 98. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (**15**) (CDCl_3 , 100 MHz).

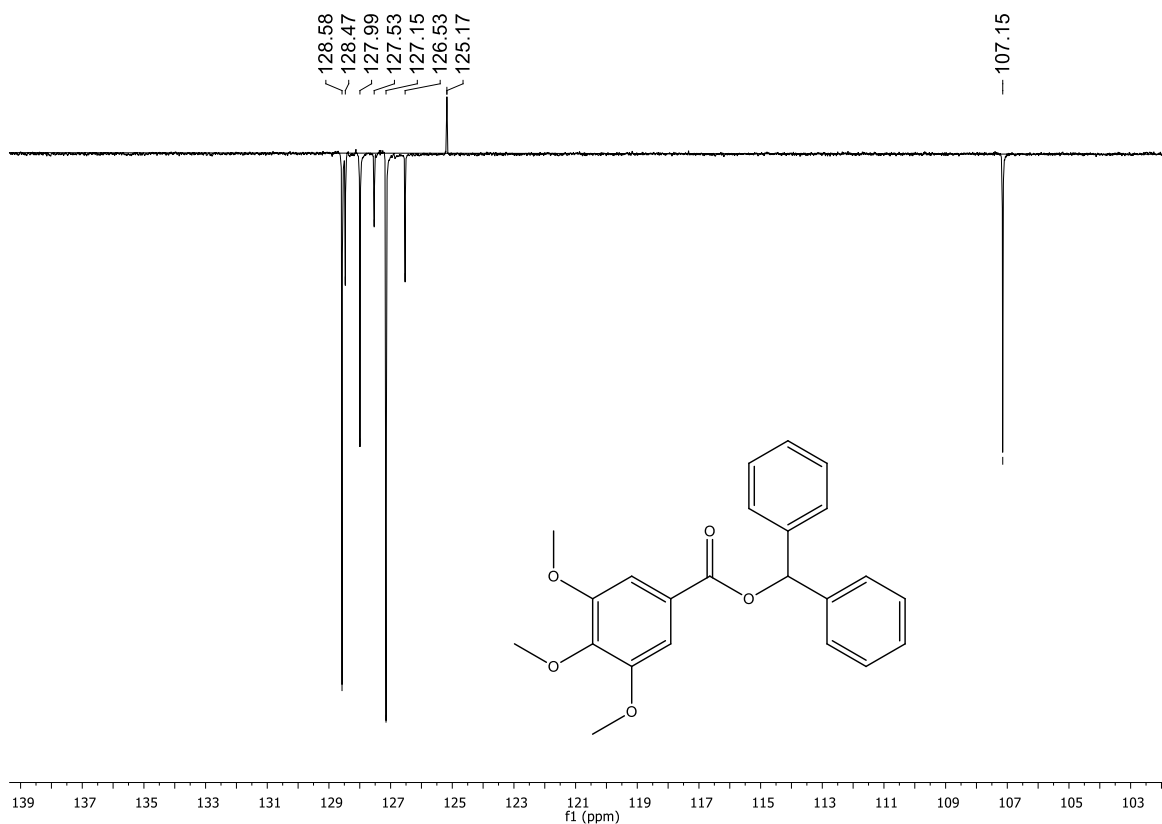


Figura 99. Espectro Massa de alta resolução do 3,4,5-trimetoxibenzoato de difenila (**15**).

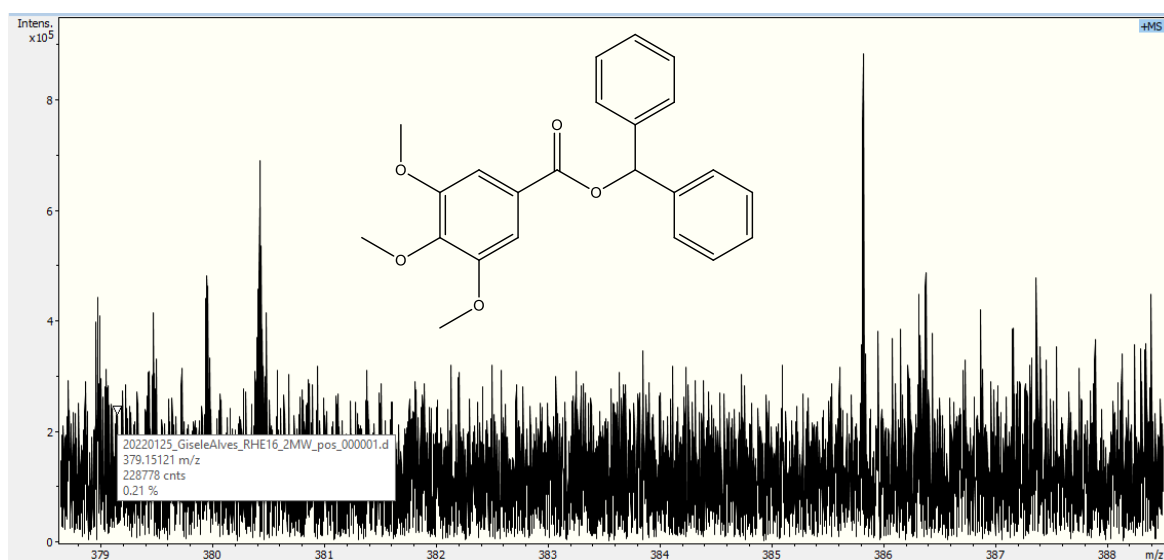


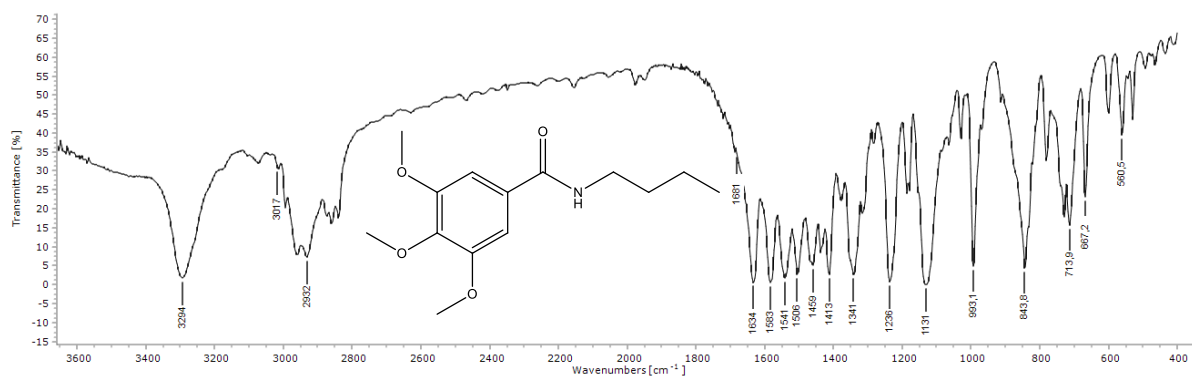
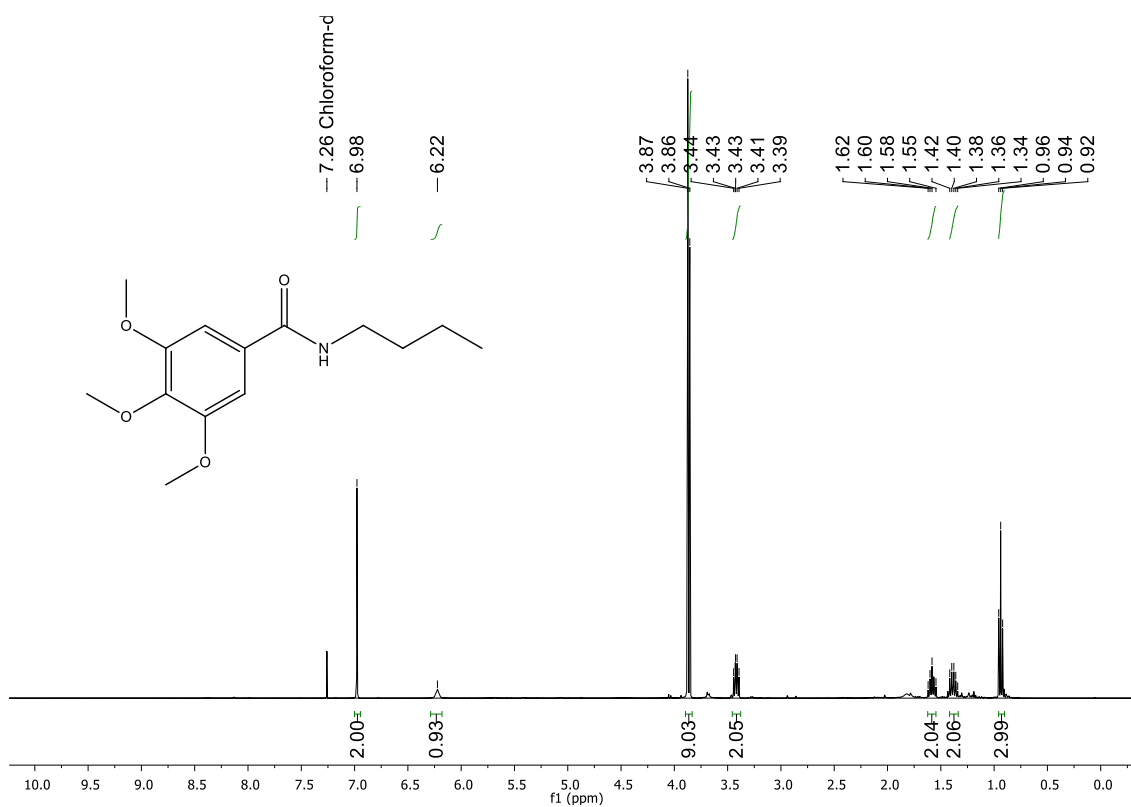
Figura 100. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**16**).**Figura 101.** Espectro de RMN ^1H de *N*-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**16**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 102. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**16**), (CDCl_3 , 400 MHz).

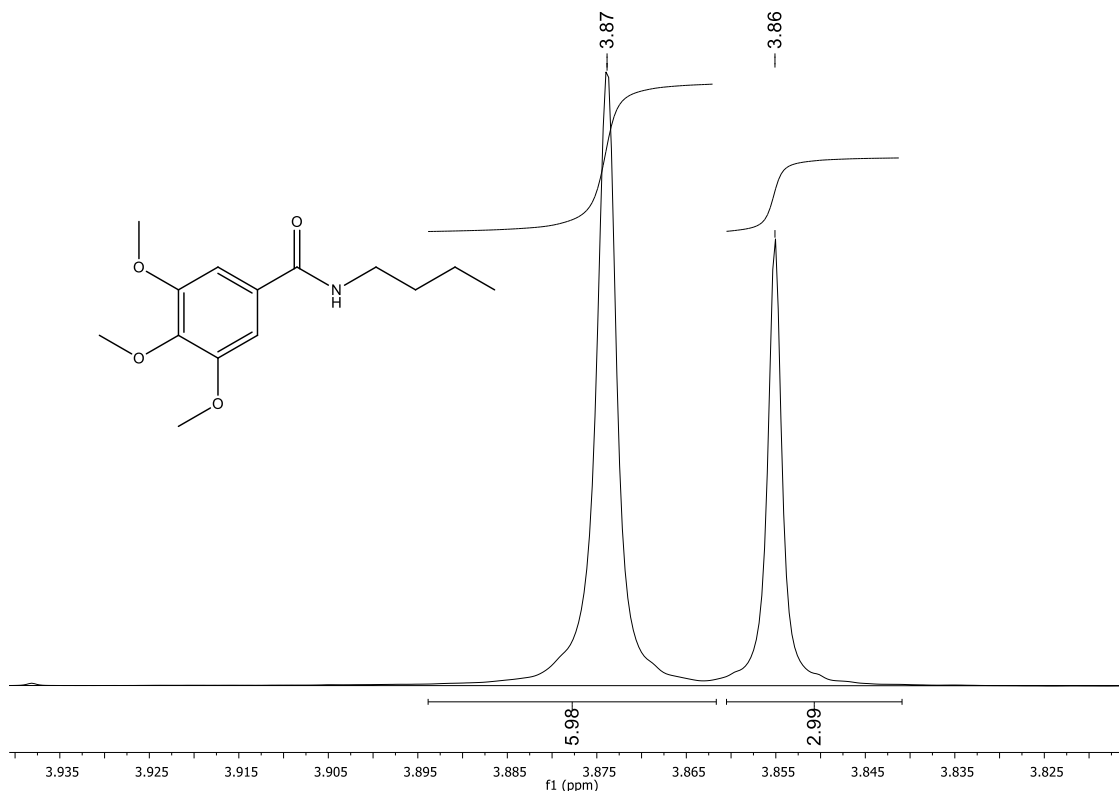


Figura 103. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**16**), (CDCl_3 , 400 MHz).

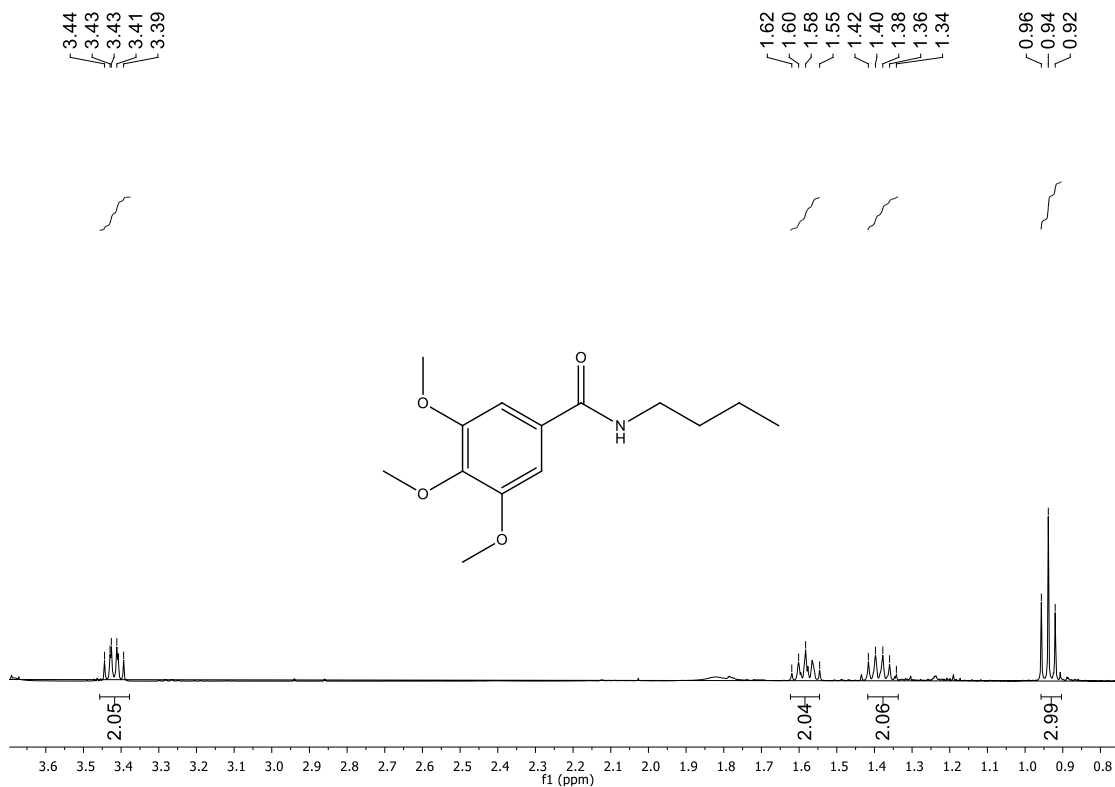


Figura 104. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-butil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**16**), (CDCl_3 , 100 MHz).

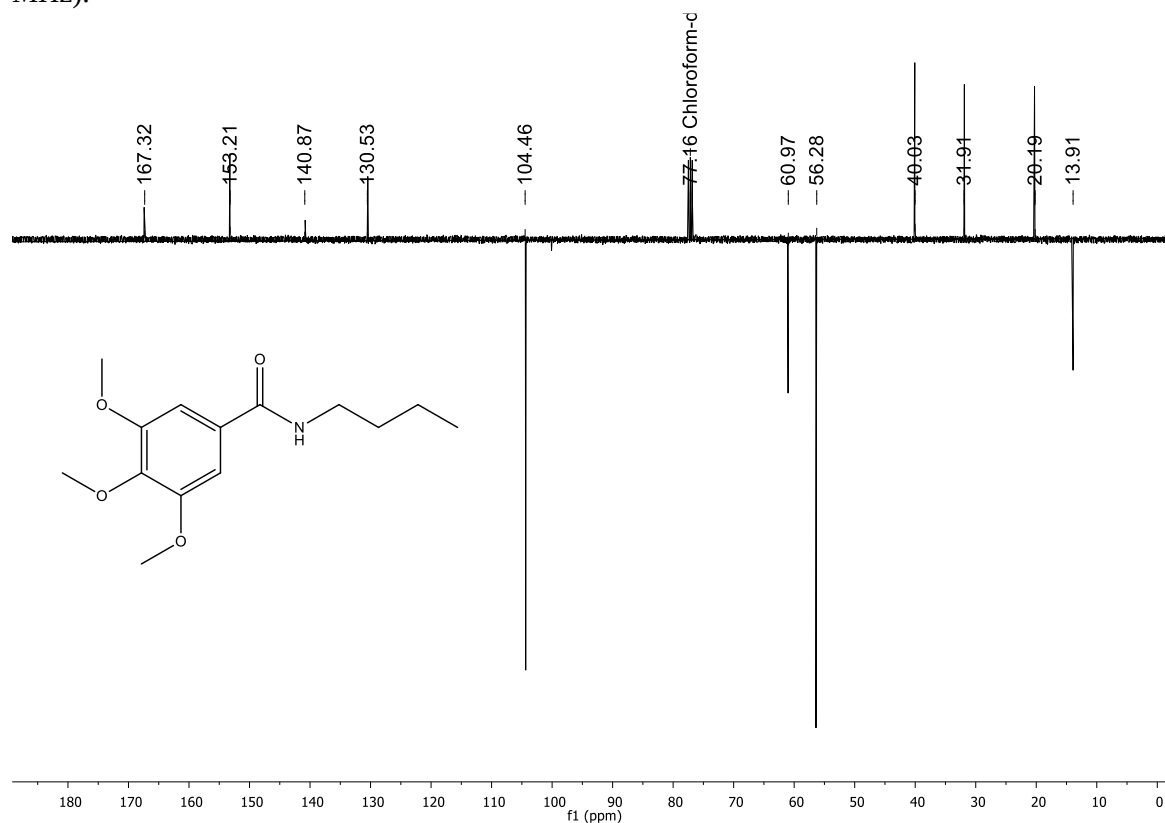


Figura 105. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**17**).

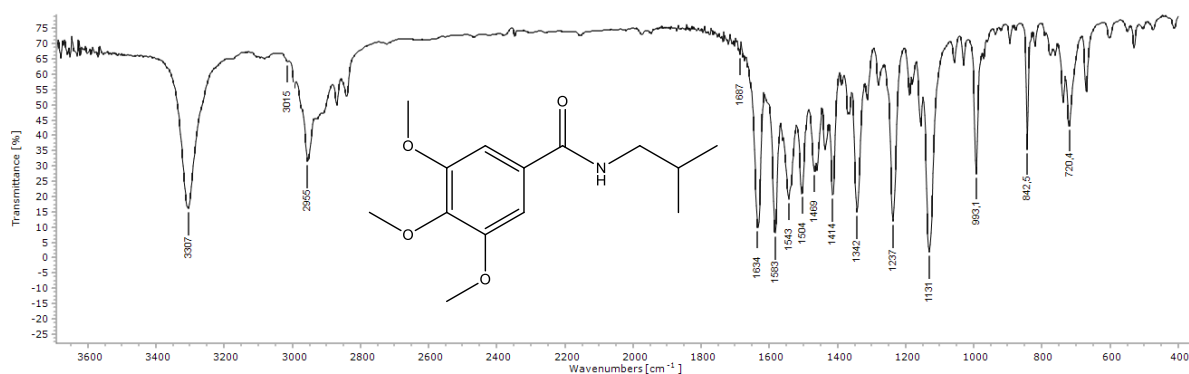


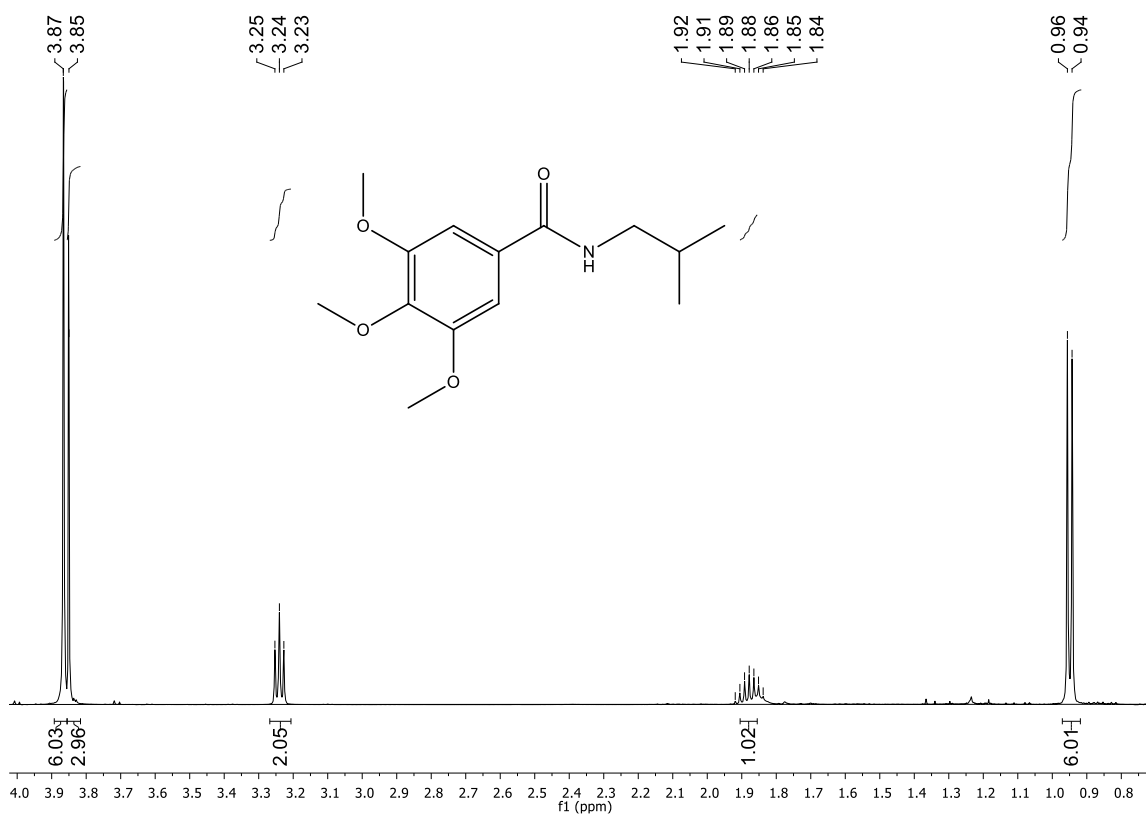
Figura 106. Espectro de RMN ^1H de *N*-Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**17**), (CDCl_3 , 500 MHz).**Figura 107.** Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**17**), (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 108. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-Isobutil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**17**), (CDCl_3 , 100 MHz).



Figura 109. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**18**).

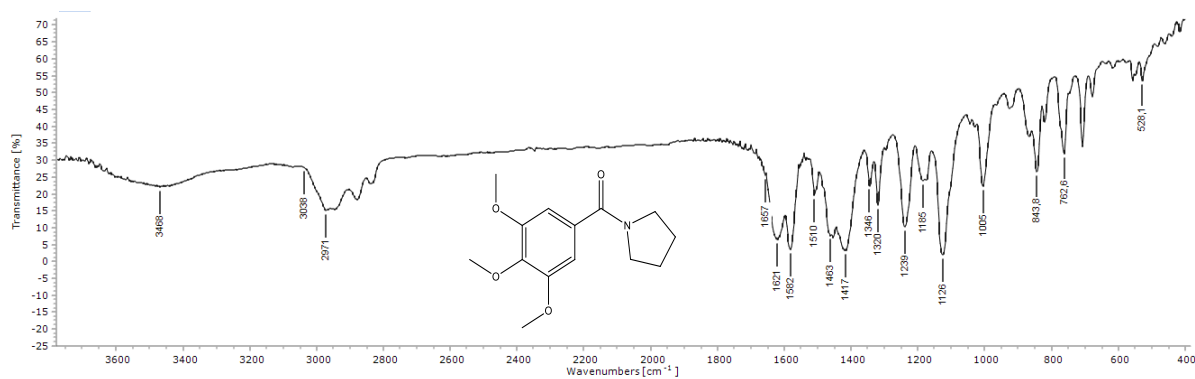


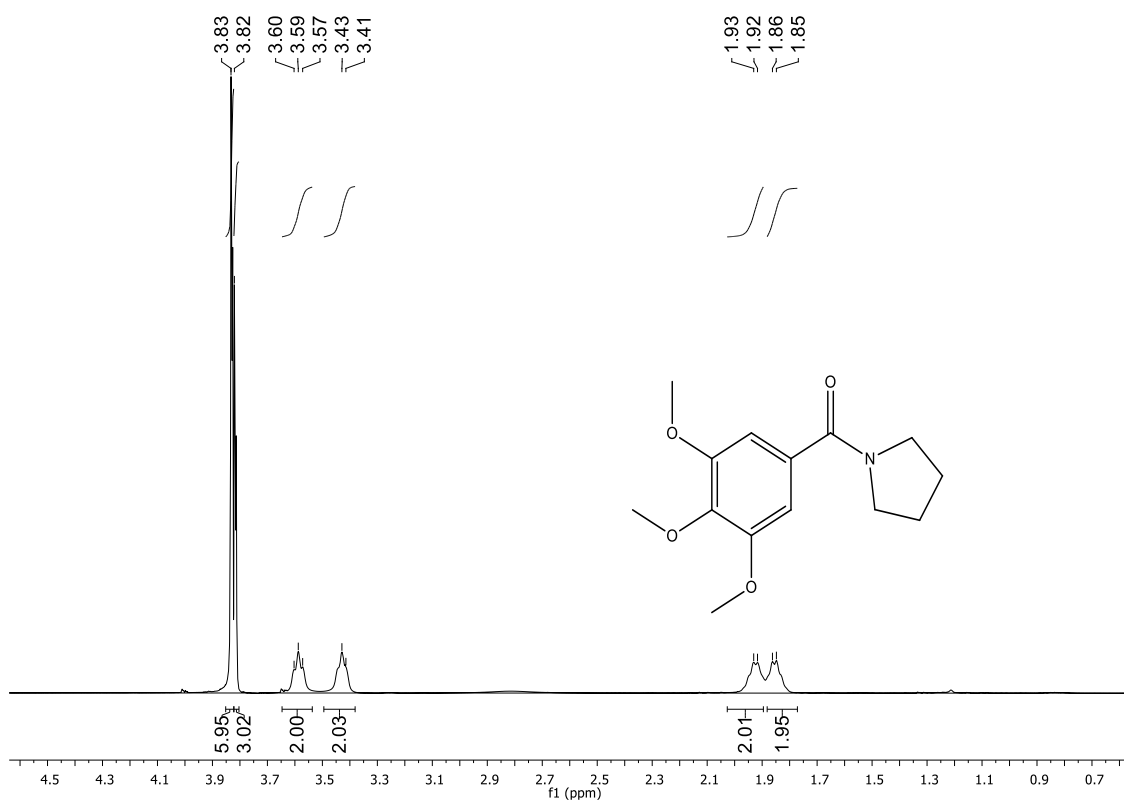
Figura 110. Espectro de RMN ^1H de *N*-Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**18**), (CDCl_3 , 400 MHz).**Figura 111.** Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**18**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 112. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-Pirrolidil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**18**), (CDCl_3 , 100 MHz).

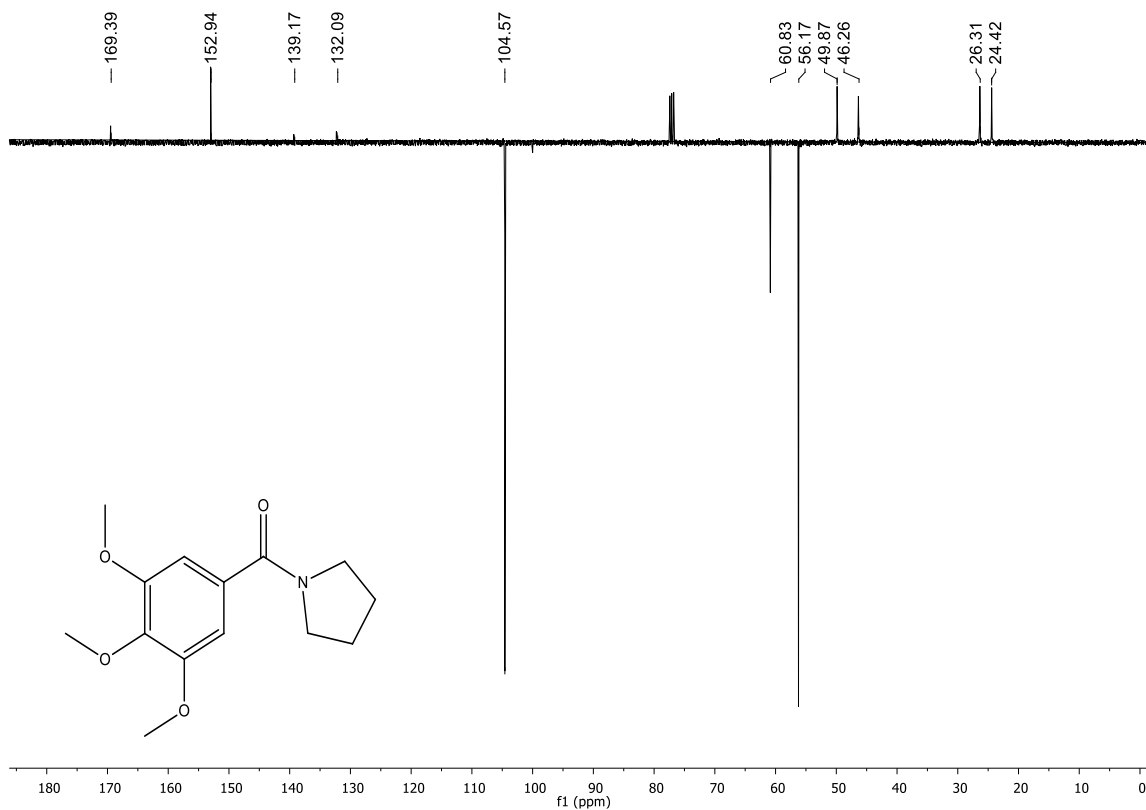


Figura 113. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**19**).

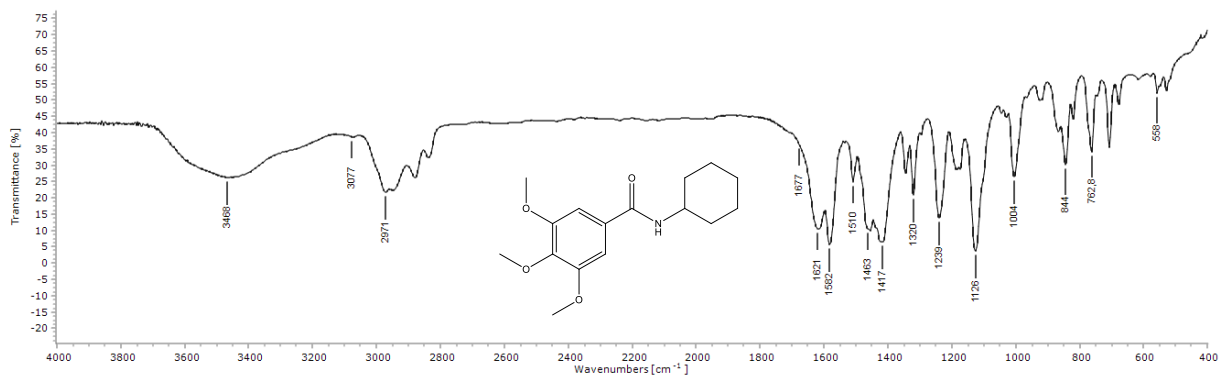


Figura 114. Espectro de RMN ^1H de *N*-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).



Figura 115. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

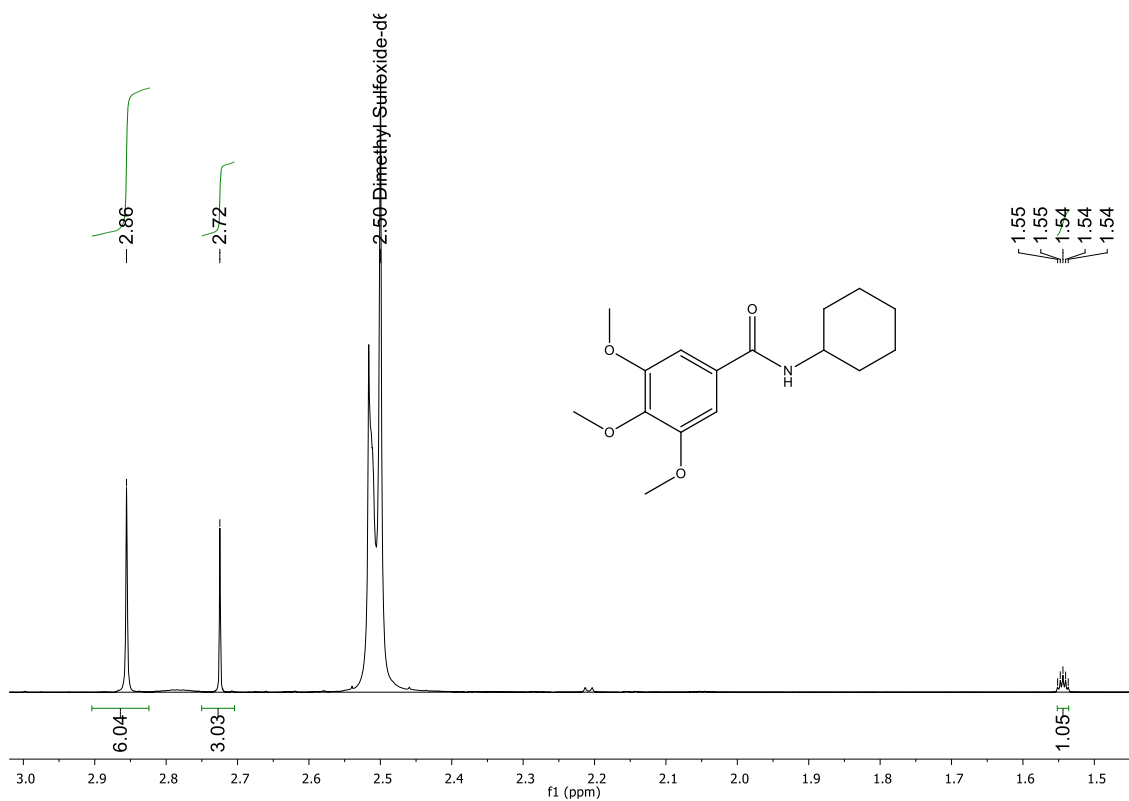


Figura 116. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).



Figura 117. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

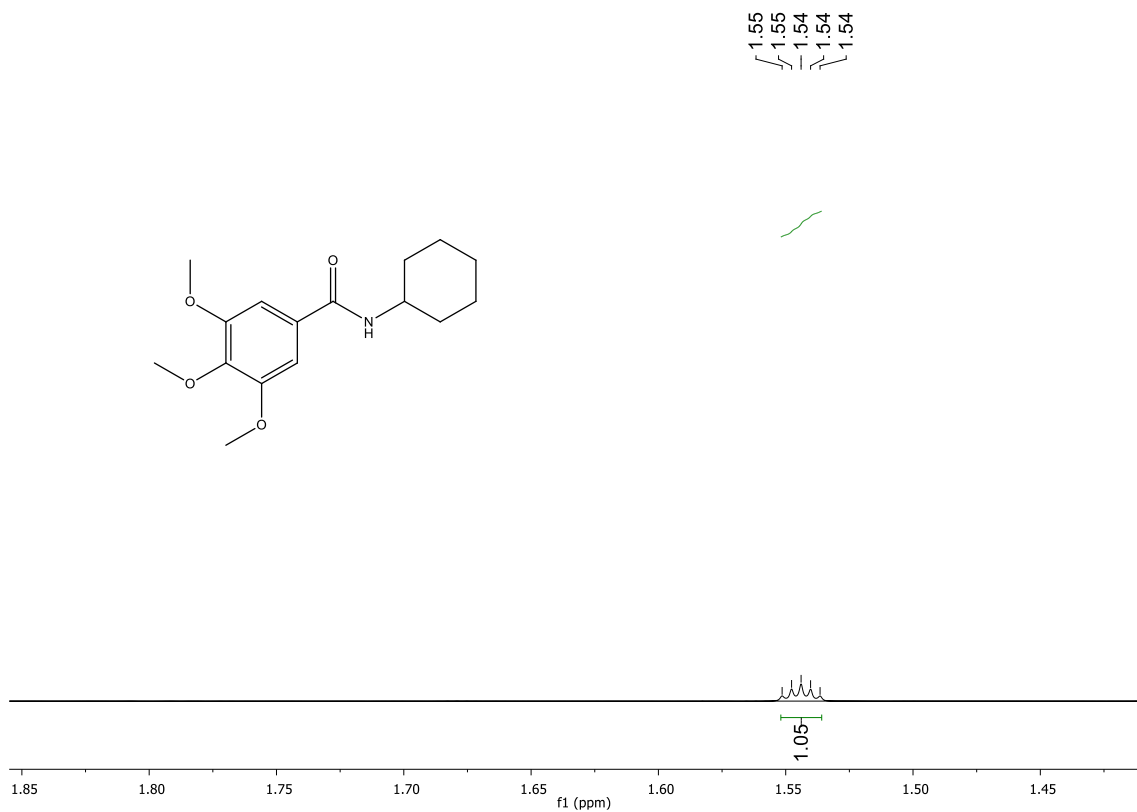


Figura 118. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 125 MHz).

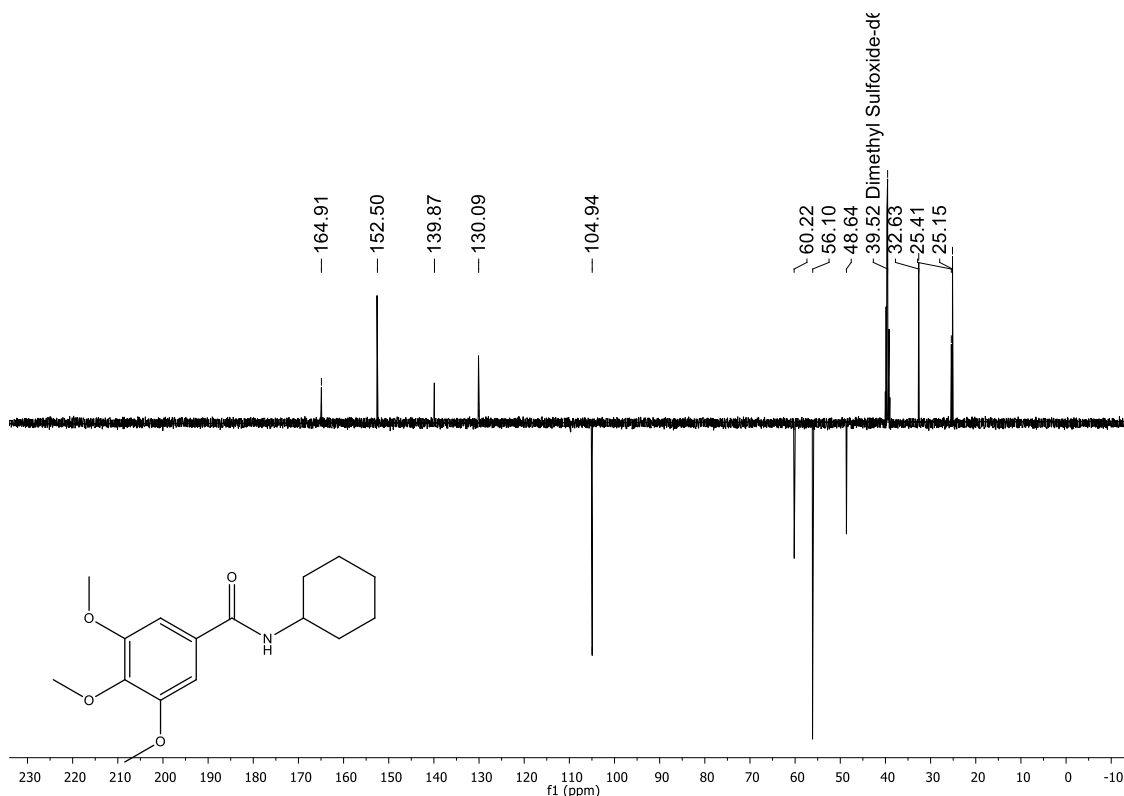


Figura 119. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-ciclohexil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**19**), (DMSO- d_6 , 125 MHz).

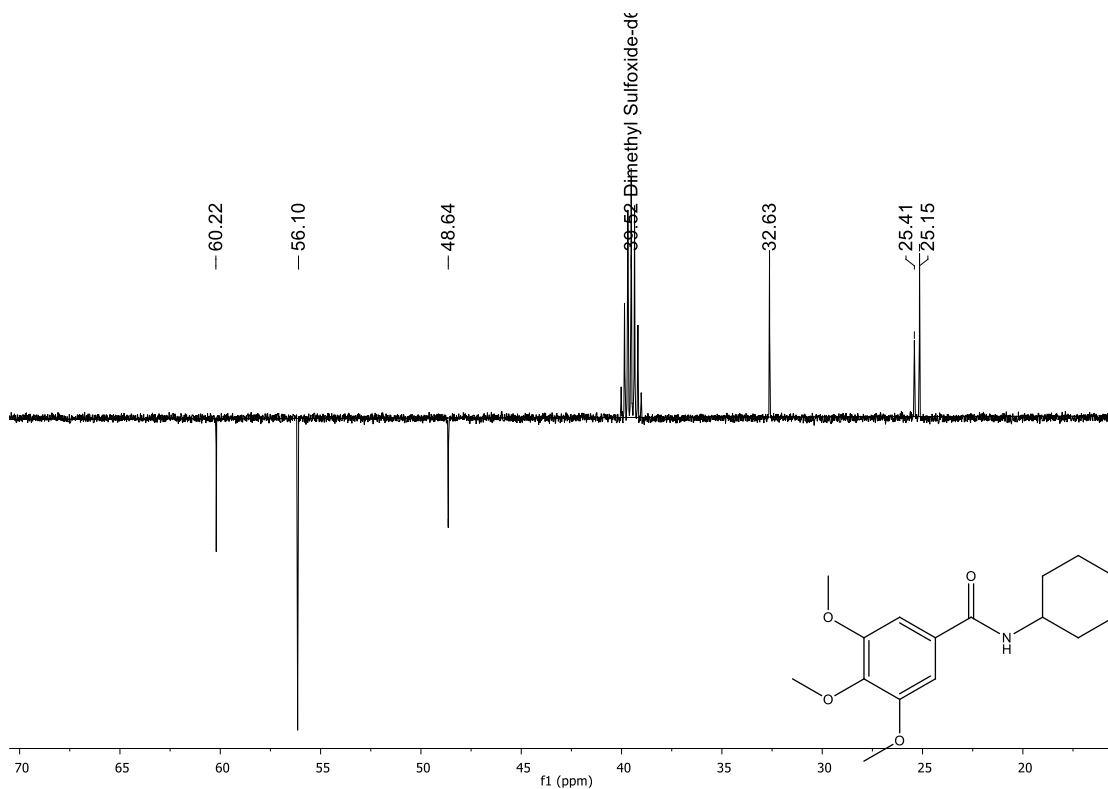


Figura 120. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**).

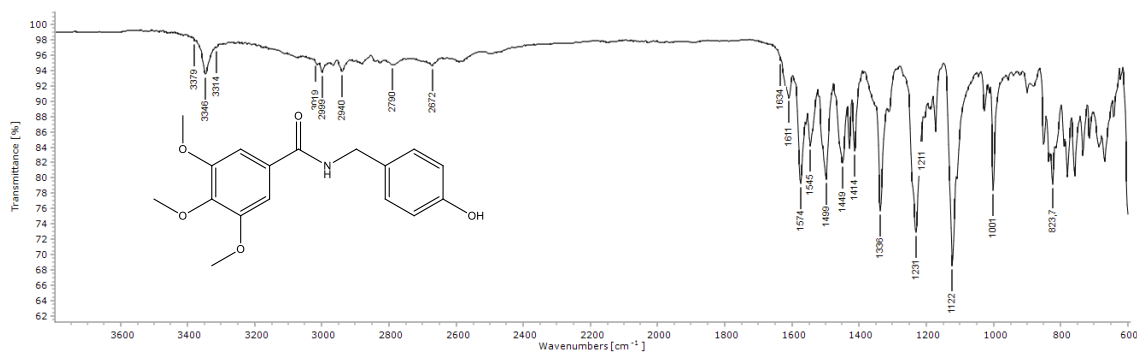


Figura 121. Espectro de RMN ^1H de *N*-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**), (DMSO-d_6 , 400 MHz).

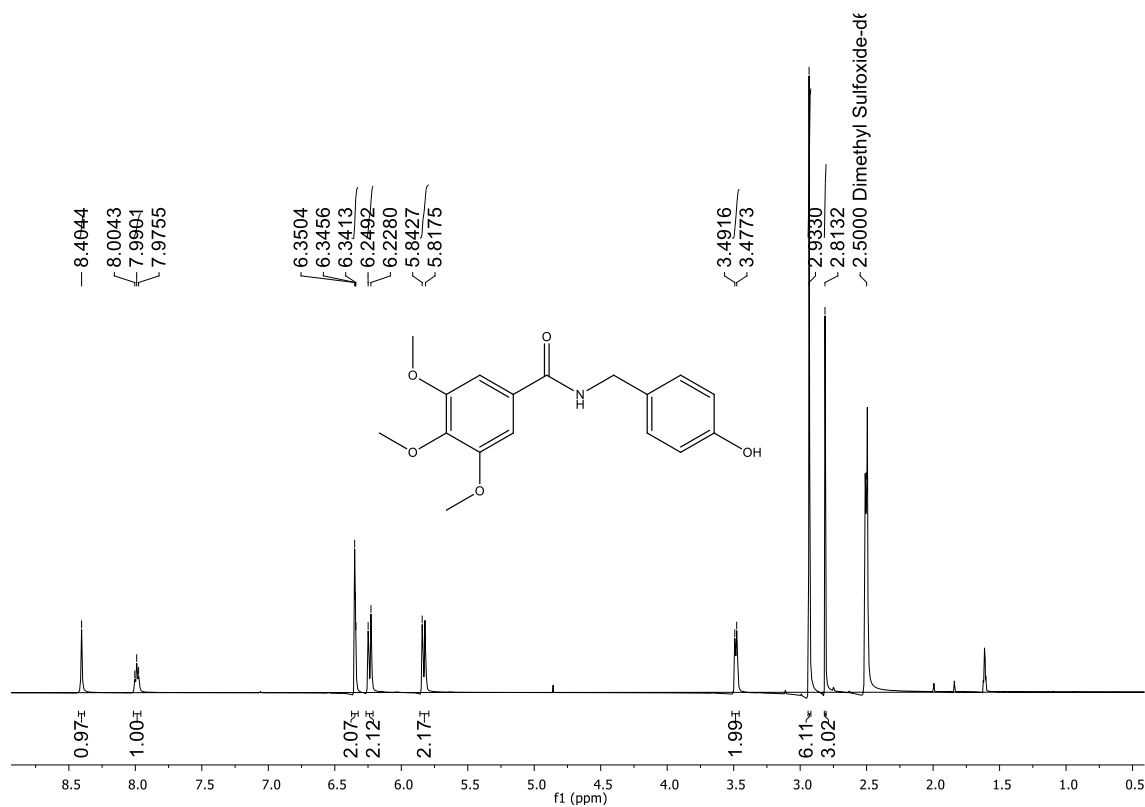


Figura 122. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

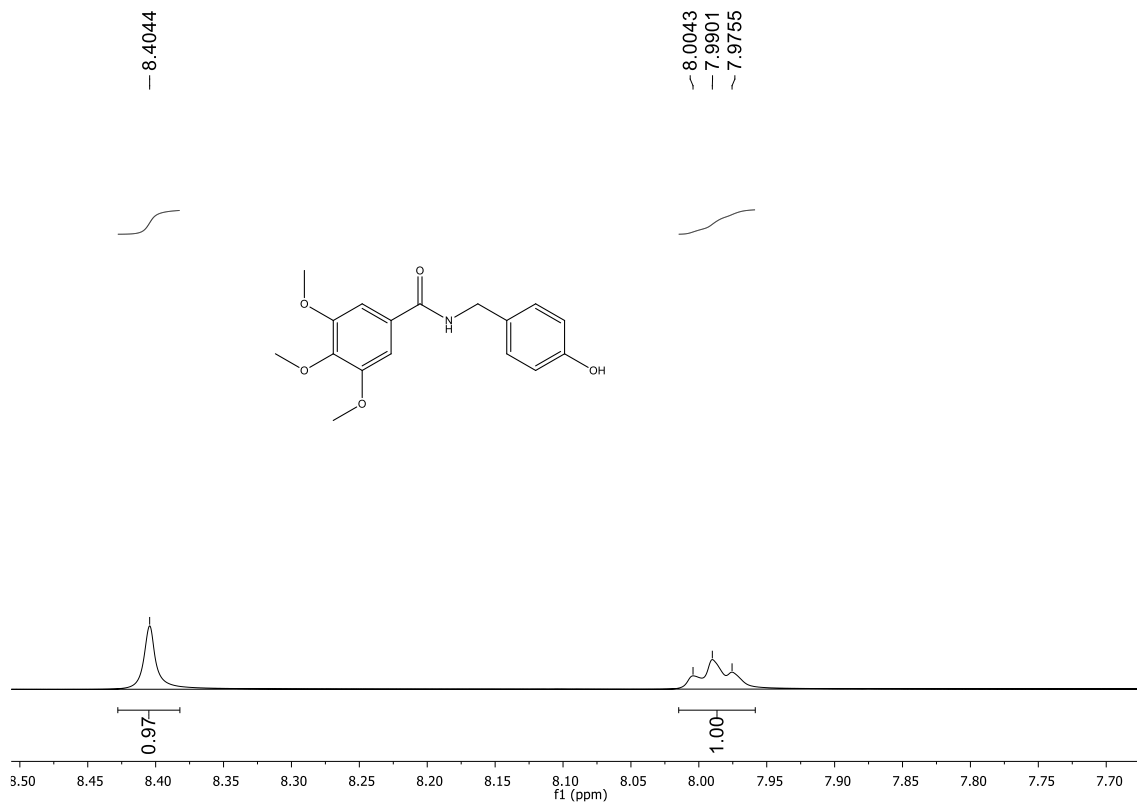


Figura 123. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

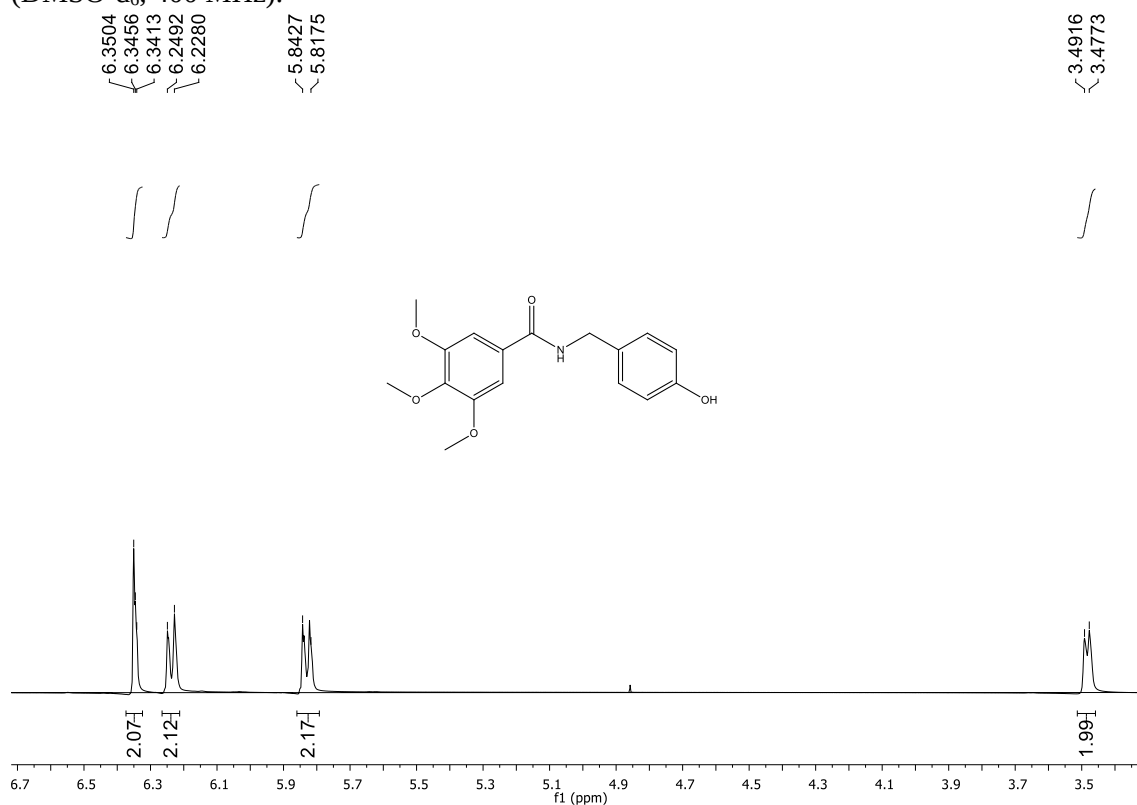


Figura 124. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

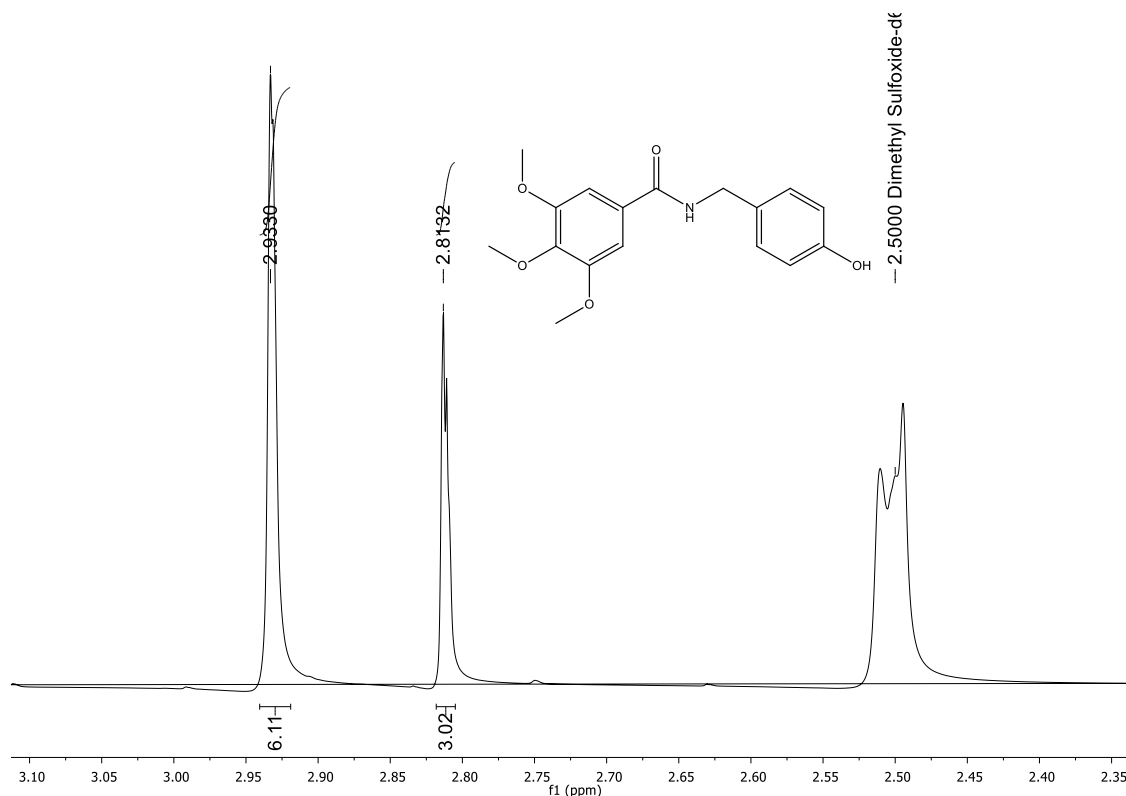


Figura 125. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**), (DMSO- d_6 , 100 MHz).

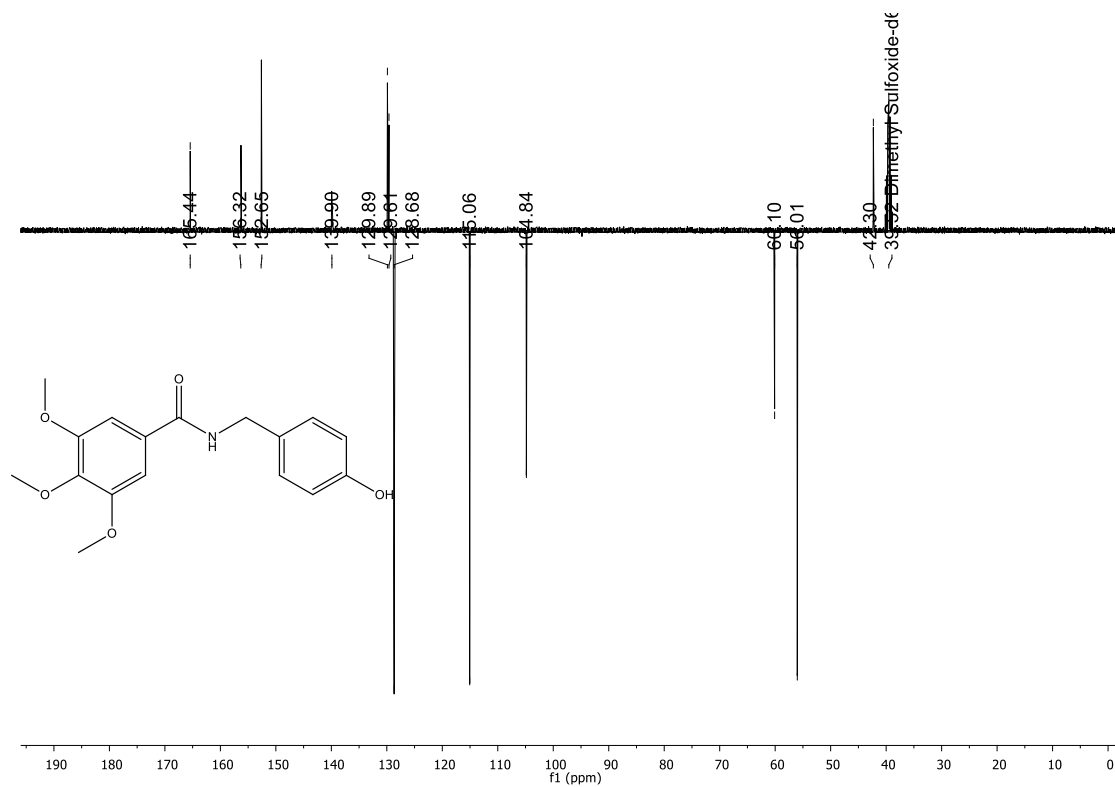


Figura 126. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-(4-hidroxibenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**20**), (DMSO- d_6 , 100 MHz).

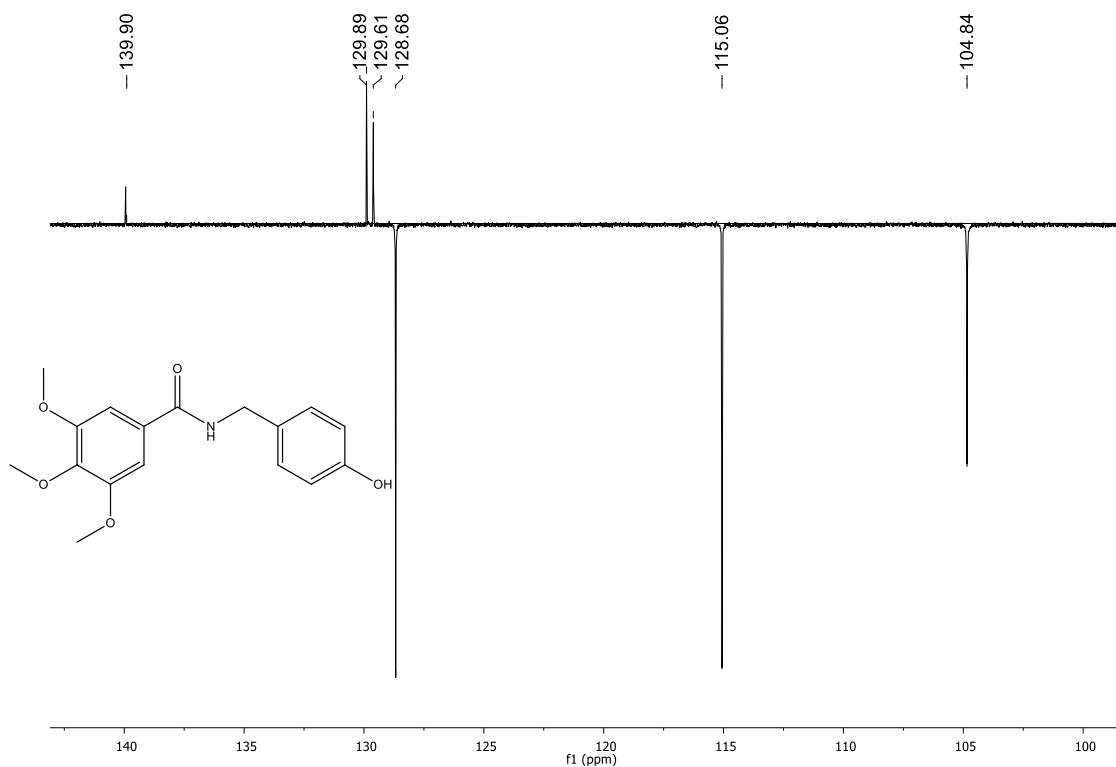


Figura 127. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**21**).

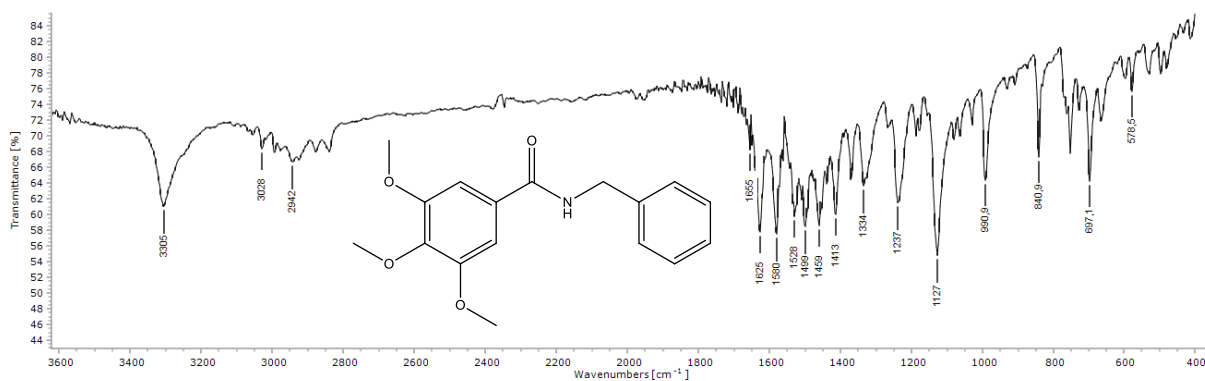


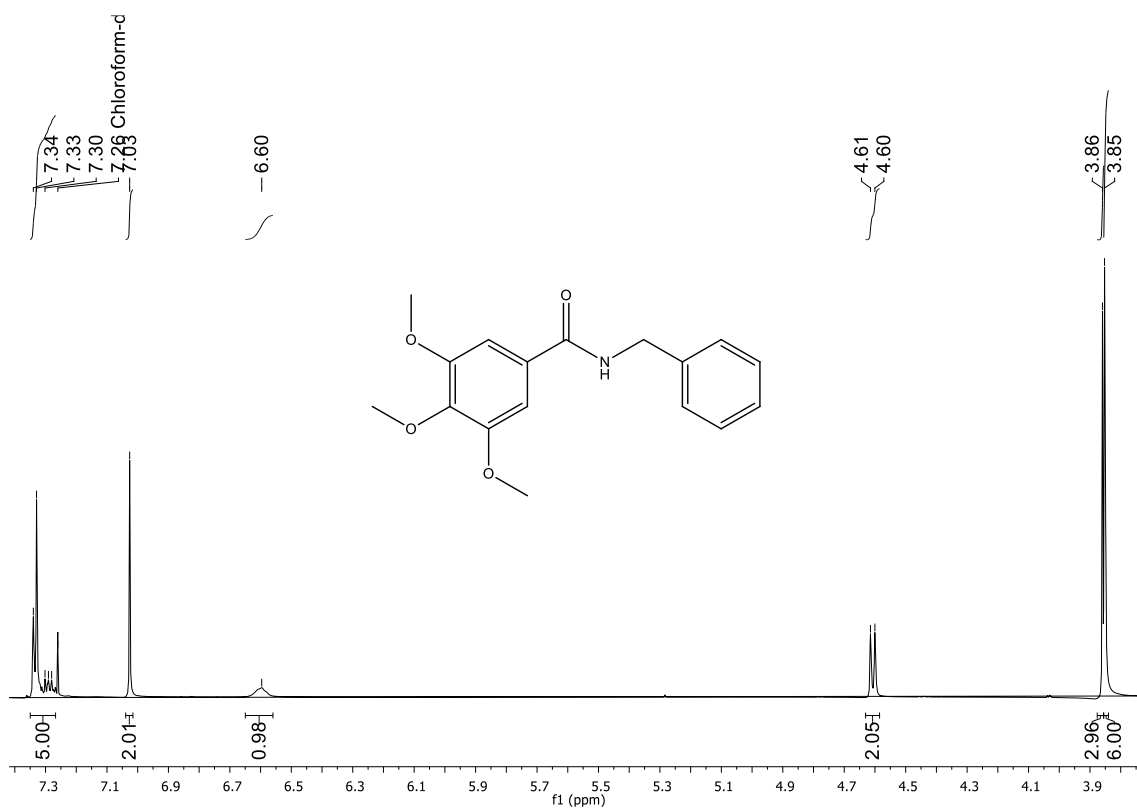
Figura 128. Espectro de RMN ^1H de *N*-benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**21**), (CDCl_3 , 400 MHz).**Figura 129.** Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**21**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 130. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**21**), (CDCl_3 , 100 MHz).

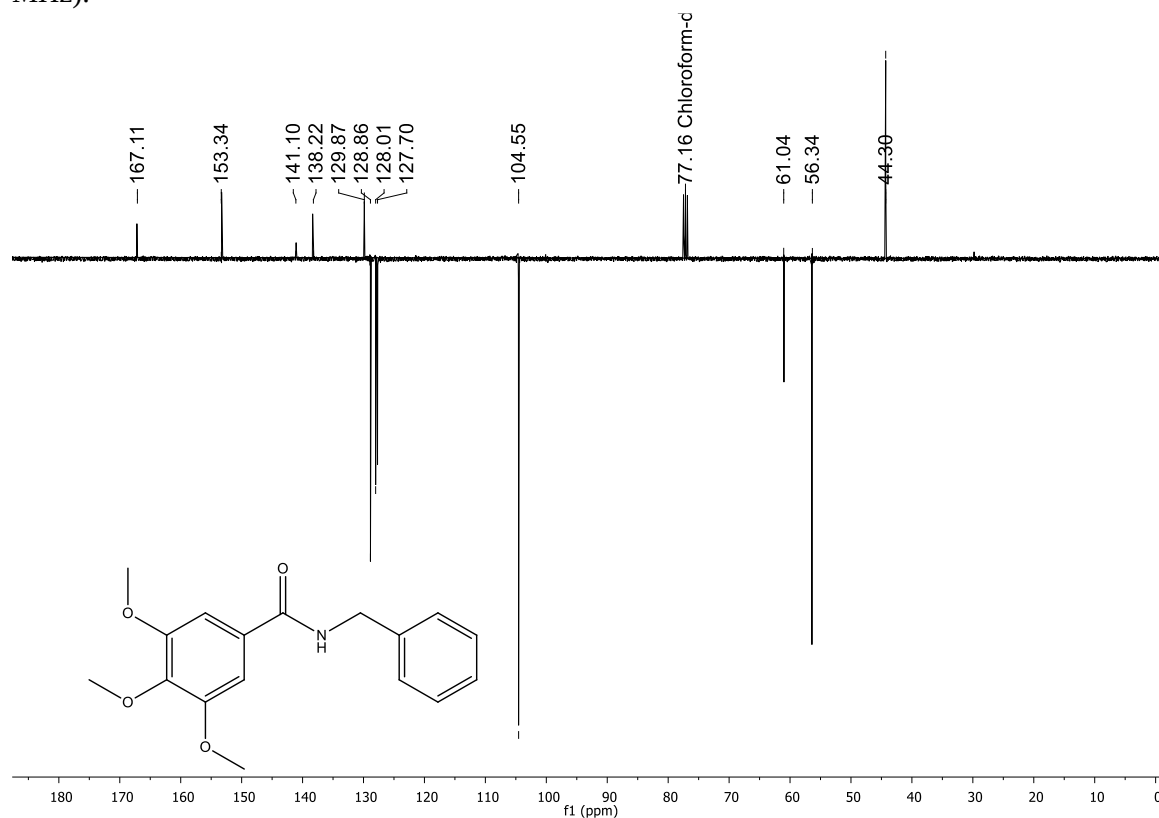


Figura 131. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-benzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**21**), (CDCl_3 , 100 MHz).

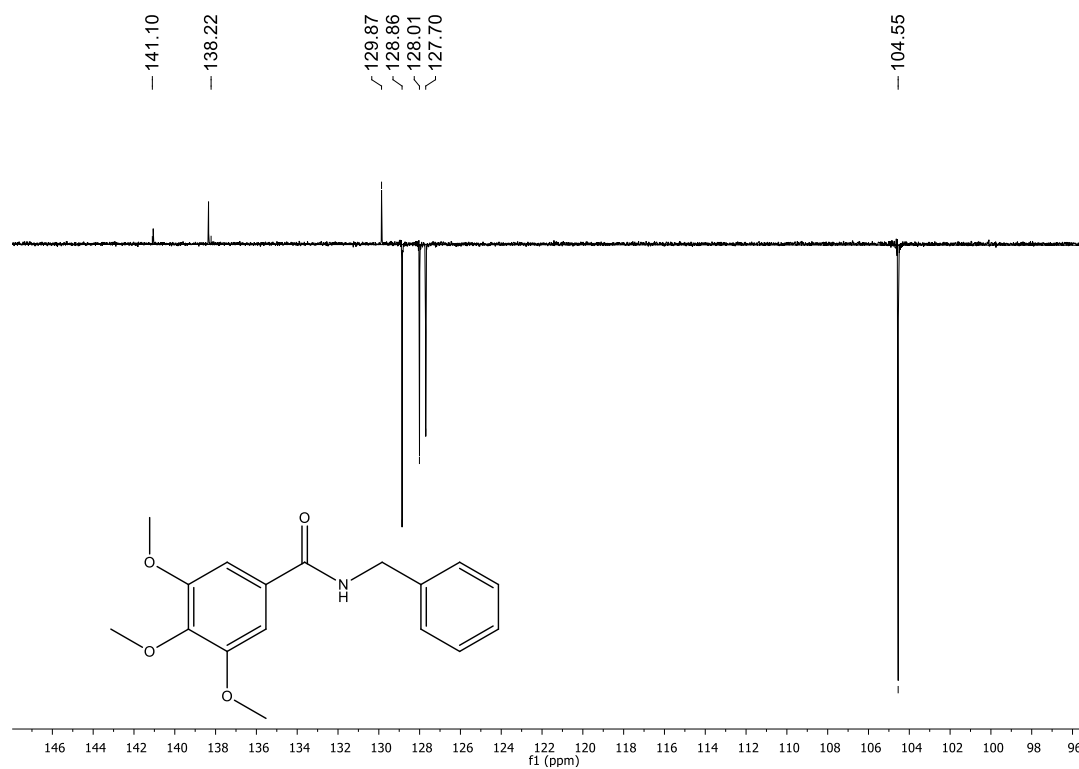


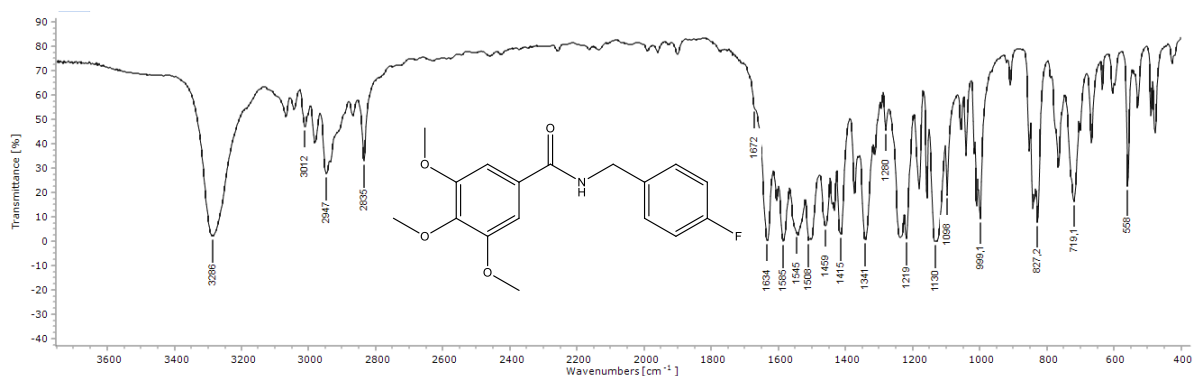
Figura 132. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**22**).**Figura 133.** Espectro de RMN ^1H de *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**22**), (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 134. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**22**), (CDCl_3 , 400 MHz).

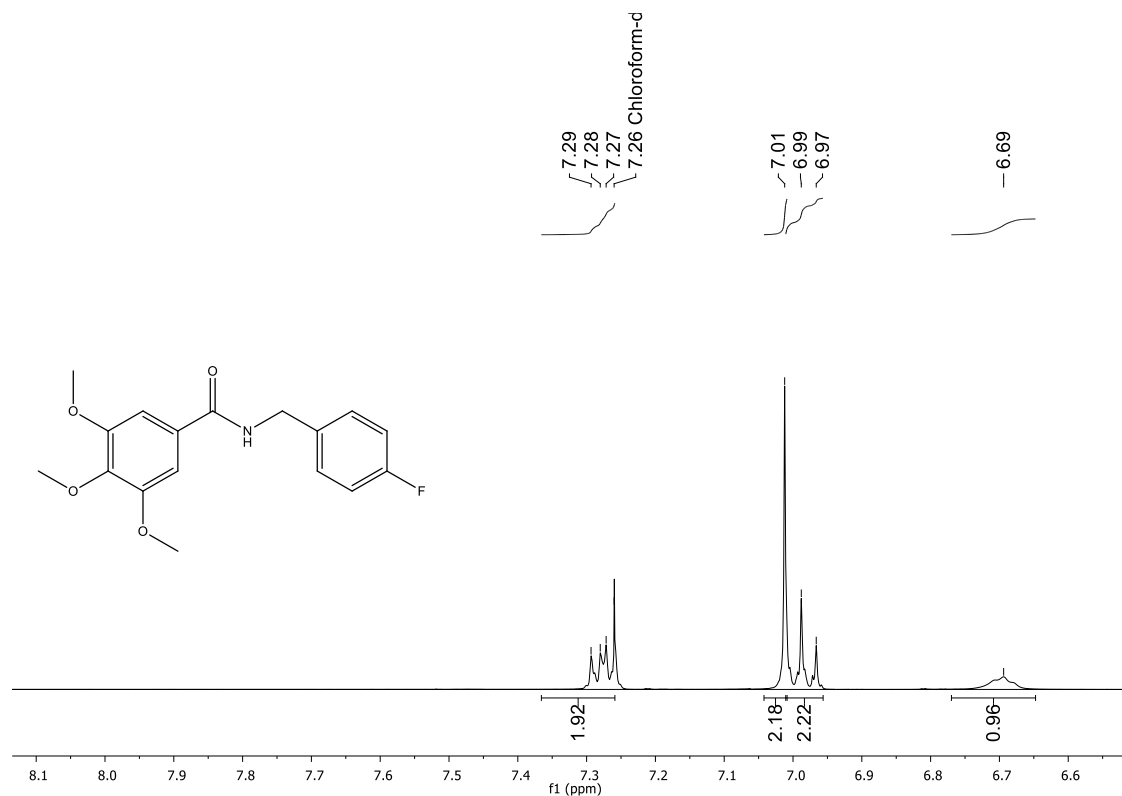


Figura 135. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**22**), (CDCl_3 , 400 MHz).

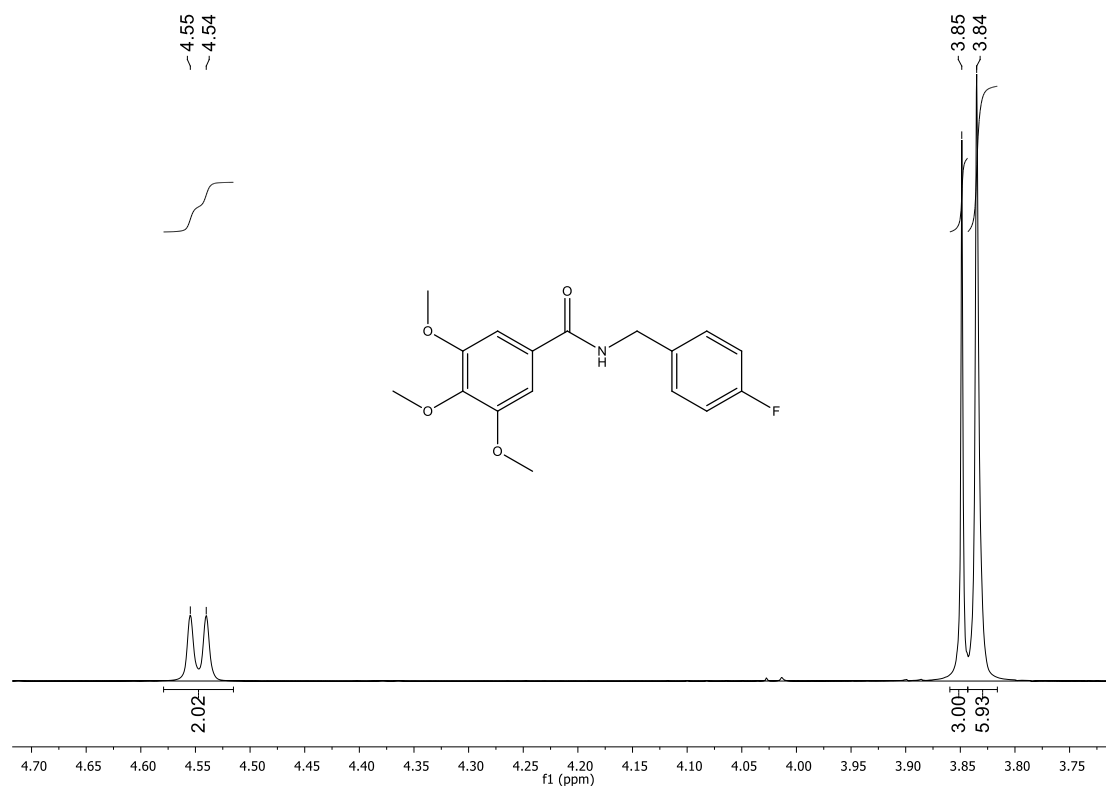


Figura 136. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**22**), (CDCl_3 , 100 MHz).



Figura 137. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (**22**), (CDCl_3 , 100 MHz).

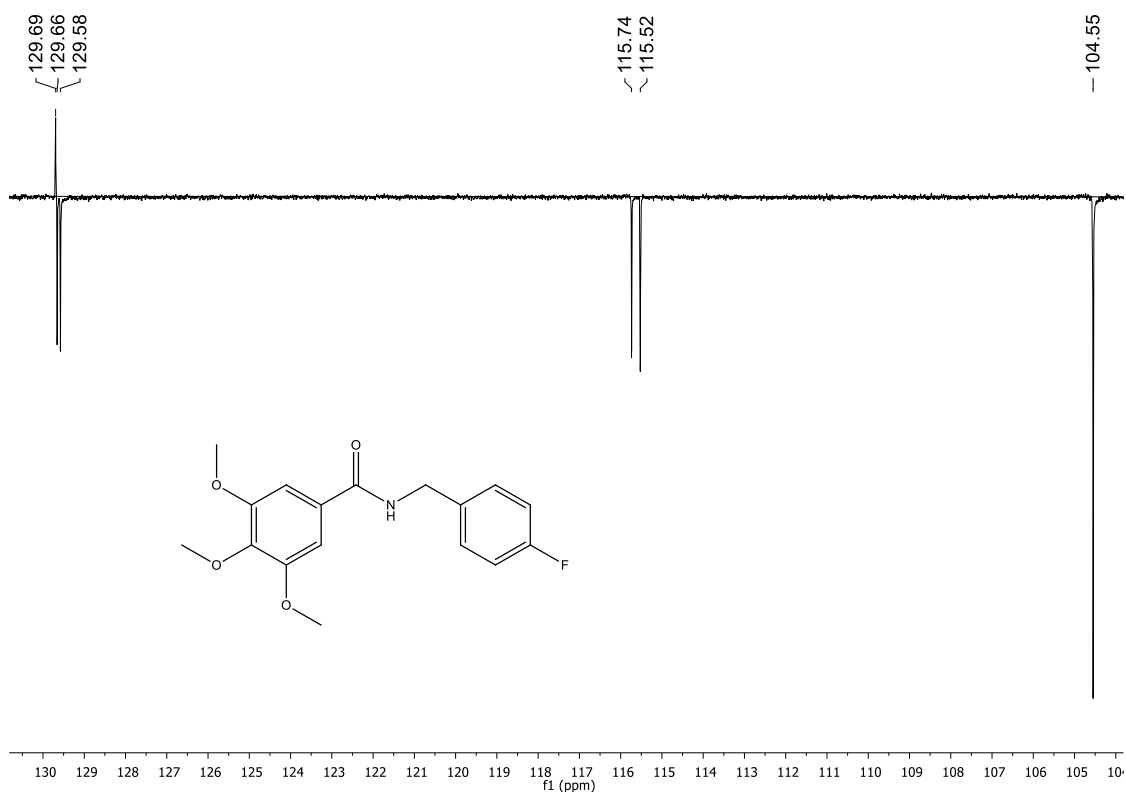


Figura 138. Espectro Massa de alta resolução do *N*-(4-fluorbenzil)-3,4,5-trimetoxibenzamida (22).

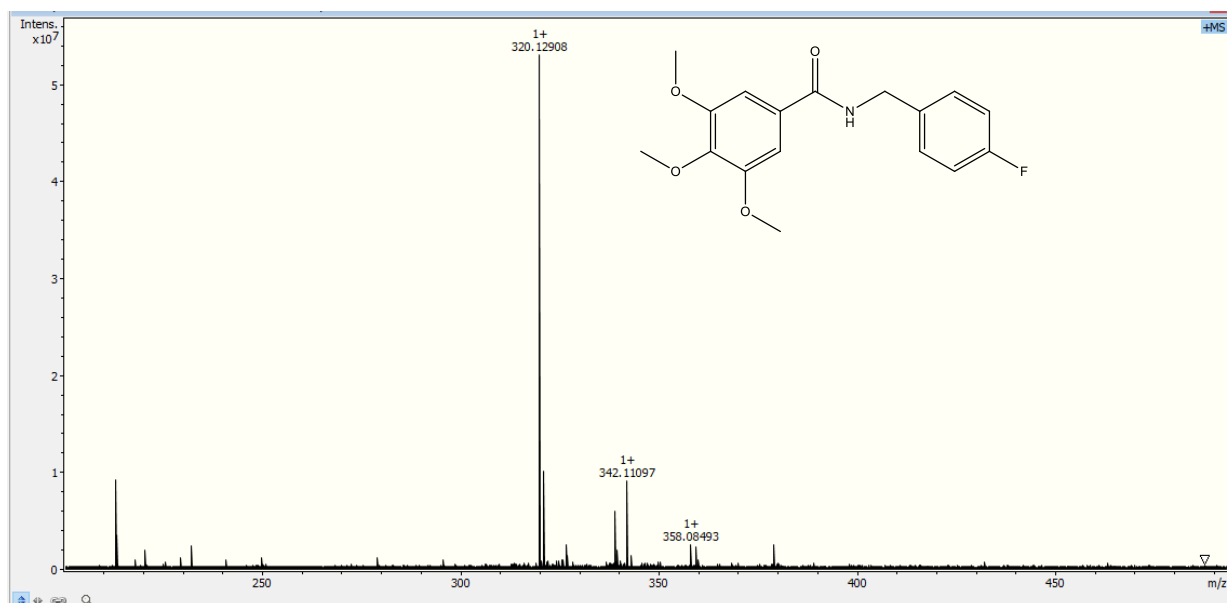


Figura 139. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (23).

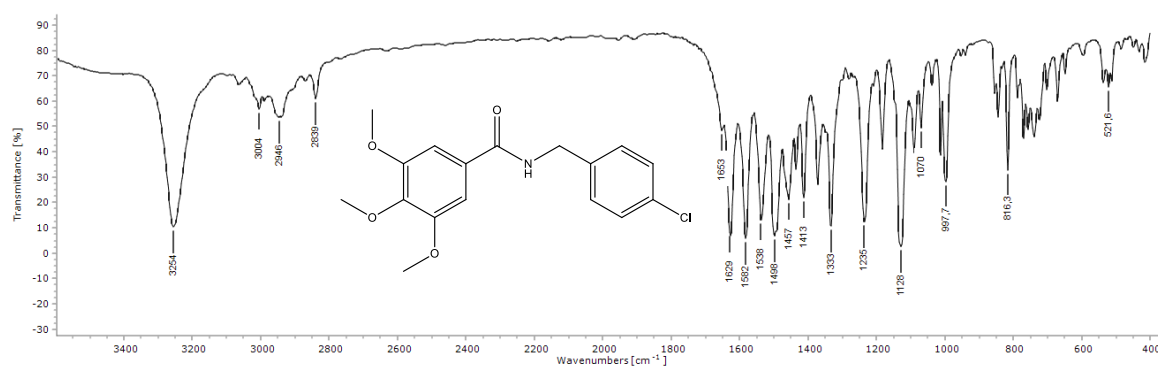


Figura 140. Espectro de RMN ^1H de *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**23**), (CDCl_3 , 500 MHz).



Figura 141. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**23**), (CDCl_3 , 500 MHz).

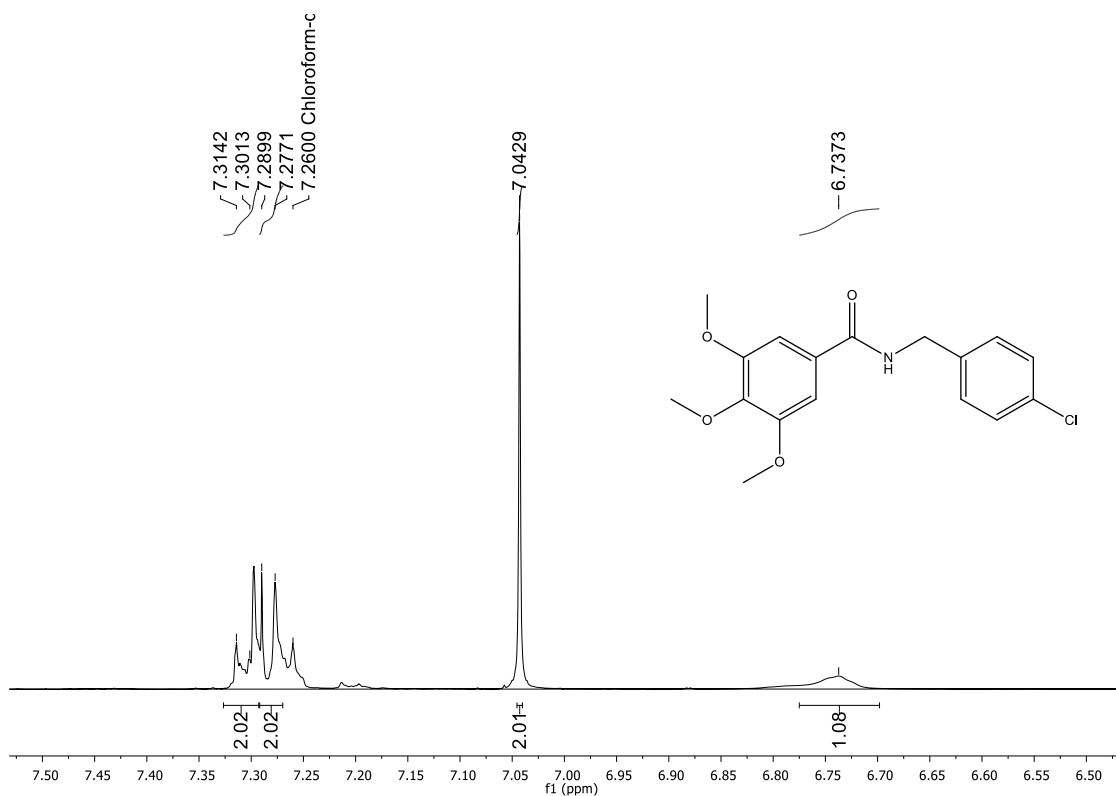


Figura 142. Expansão do espectro de RMN ^1H de *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**23**), (CDCl_3 , 500 MHz).

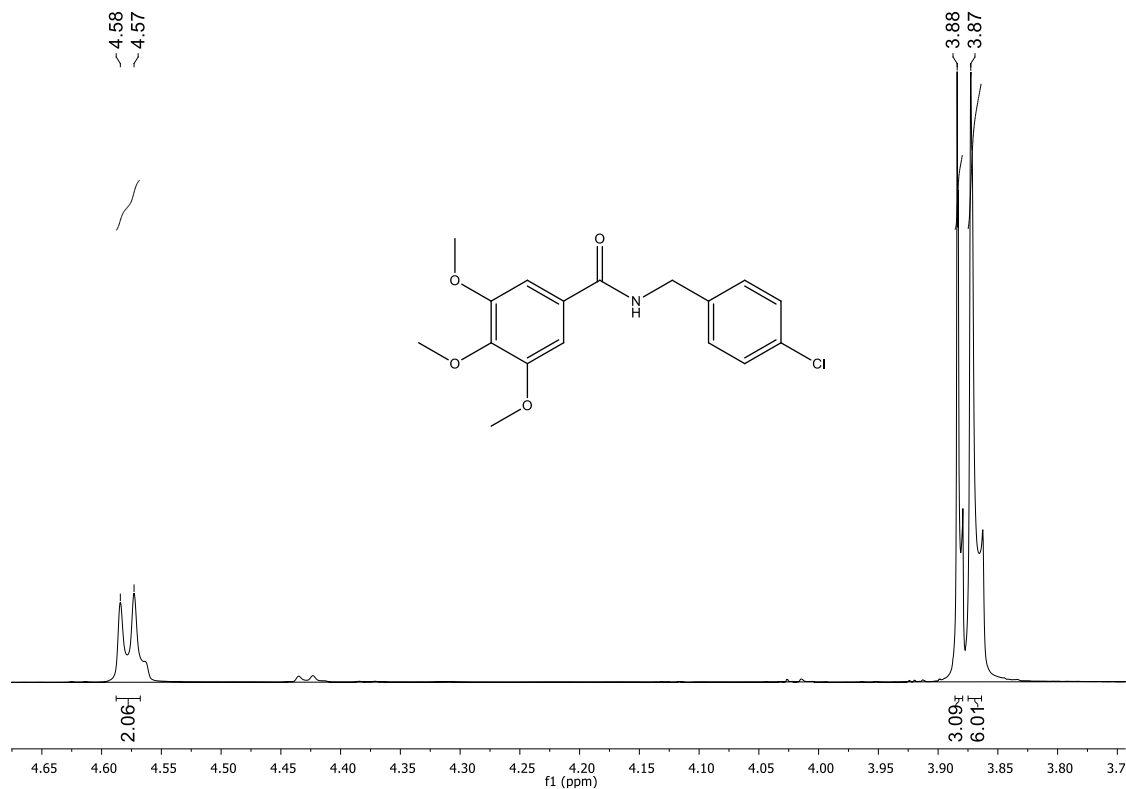


Figura 143. Espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**23**), (CDCl_3 , 125 MHz).



Figura 144. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**23**), (CDCl_3 , 125 MHz).

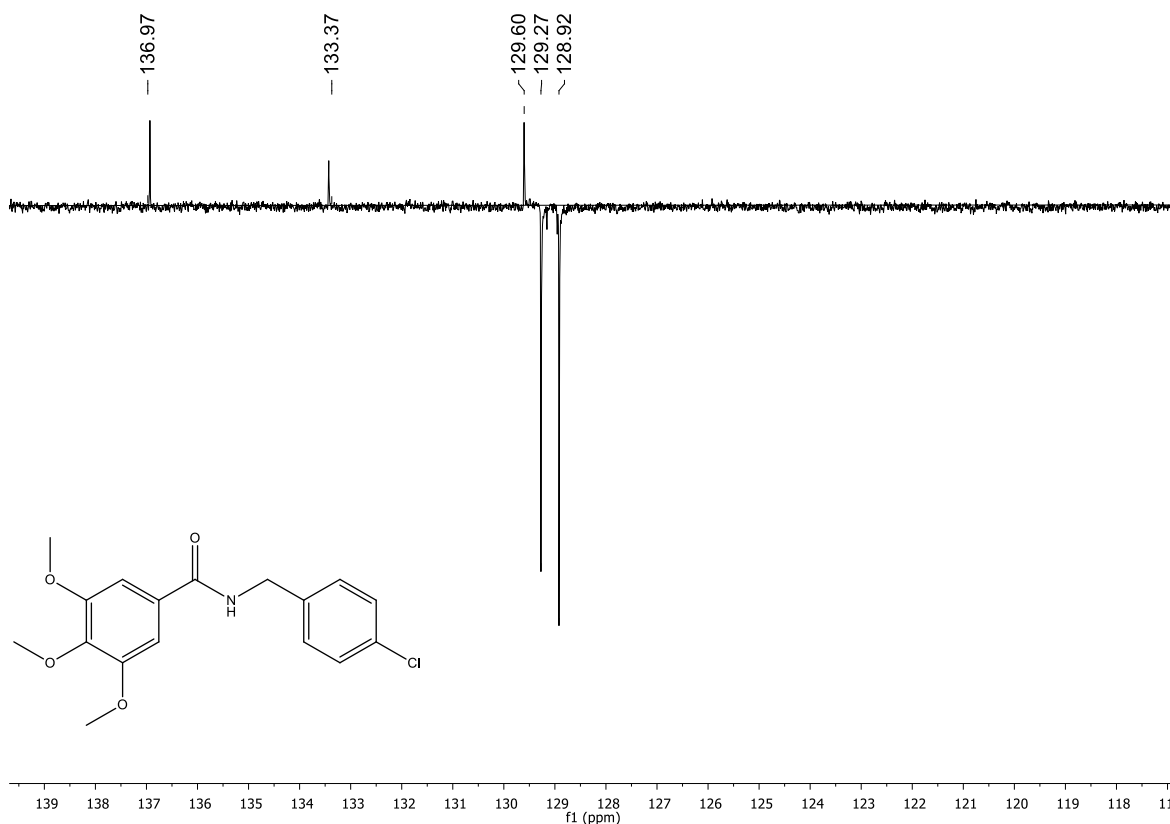
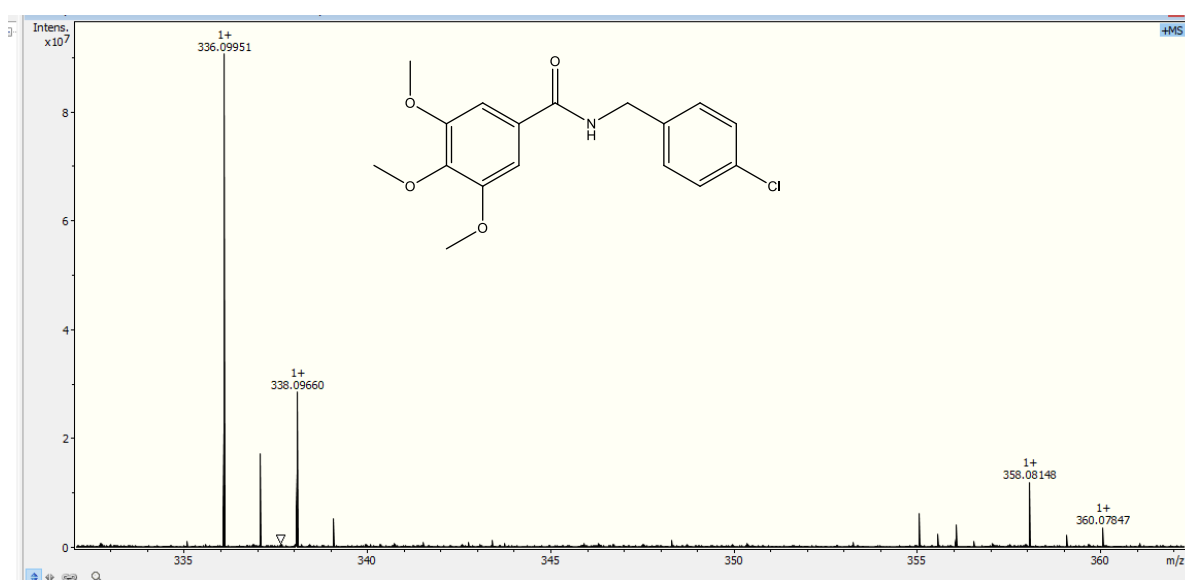


Figura 145. Espectro Massa de alta resolução do *N*-4-clorobenzil-3,4,5-trimetoxibenzamida (**23**).



ANEXO

Figura 146. Artigo 1 publicado na revista Molecules.



Article

Molecular Modeling and In Vitro Evaluation of Piplartine Analogs against Oral Squamous Cell Carcinoma

Rayanne H. N. Silva ¹, Thaissa Q. Machado ², Anna Carolina C. da Fonseca ³, Eduardo Tejera ⁴,
Yunierkis Perez-Castillo ⁵, Bruno K. Robbs ^{6,*} and Damião P. de Sousa ^{1,*}

¹ Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, Brazil

² Postgraduate Program in Applied Science for Health Products, Faculty of Pharmacy, Fluminense Federal University, Niterói 24241-000, Brazil

³ Postgraduate Program in Dentistry, Health Institute of Nova Friburgo, Fluminense Federal University, Nova Friburgo 28625-650, Brazil

⁴ Bio-Cheminformatics Research Group, Universidad de Las Américas, Quito 170516, Ecuador

⁵ Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Área de Ciencias Aplicadas, Universidad de Las Américas, Quito 170516, Ecuador

⁶ Departamento de Ciência Básica, Instituto de Saúde de Nova Friburgo, Universidade Federal Fluminense, Nova Friburgo 28625-650, Brazil

* Correspondence: brunokr@gmail.com (B.K.R.); damiao_desousa@yahoo.com.br (D.P.d.S.)

Abstract: Cancer is a principal cause of death in the world, and providing a better quality of life and reducing mortality through effective pharmacological treatment remains a challenge. Among malignant tumor types, squamous cell carcinoma-esophageal cancer (EC) is usually located in the mouth, with approximately 90% located mainly on the tongue and floor of the mouth. Piplartine is an alkamide found in certain species of the genus *Piper* and presents many pharmacological properties including antitumor activity. In the present study, the cytotoxic potential of a collection of pipartine analogs against human oral SCC9 carcinoma cells was evaluated. The analogs were prepared via Fischer esterification reactions, alkyl and aryl halide esterification, and a coupling reaction with PyBOP using the natural compound 3,4,5-trimethoxybenzoic acid as a starting material. The products were structurally characterized using ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy, and high-resolution mass spectrometry for the unpublished compounds. The compound 4-methoxy-benzyl 3,4,5-trimethoxybenzoate (**9**) presented an IC₅₀ of 46.21 μM, high selectivity (SI > 16), and caused apoptosis in SCC9 cancer cells. The molecular modeling study suggested a multi-target mechanism of action for the antitumor activity of compound **9** with CRM1 as the main target receptor.

Keywords: pipartine; natural products; medicinal plants; anticancer; *Piper*; cytotoxicity; antitumor; alkaloid



Citation: Silva, R.H.N.; Machado, T.Q.; da Fonseca, A.C.C.; Tejera, E.; Perez-Castillo, Y.; Robbs, B.K.; de Sousa, D.P. Molecular Modeling and In Vitro Evaluation of Piplartine Analogs against Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* **2023**, *28*, 1675. <https://doi.org/10.3390/molecules28041675>

Academic Editor: Chia Ming Chang

Received: 26 December 2022

Revised: 29 January 2023

Accepted: 2 February 2023

Published: 9 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is triggered by uncontrolled cell growth through cell differentiation, which can spread to different parts of the body (NIH, 2022). It is considered a global public health problem, and since one in seven deaths in the world is caused by cancer, it is becoming more common than death from HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria combined [1].

According to the National Cancer Institute (INCA), 6 million premature deaths are forecast for 2025, with an estimated 1.5 million annual deaths from cancer that might be prevented with adequate measures [2].

Cancers are a great cause of fear in the general population. Lung, prostate, stomach, liver, colorectal, and oral cavity cancers are considered the most common in men, while in women, breast, lung, cervix, colorectal, thyroid, and stomach cancers are more common [3–5]. Squamous cell carcinoma-esophageal cancer (EC) is a type of malignant tumor

Figura 147. Artigo 2 aceito na revista Applied Sciences.

09/08/2023, 23:14 Email – Rayanne Hellen Nascimento – Outlook

[Applied Sciences] Manuscript ID: applsci-2522843 - Accepted for Publication

Applied Sciences Editorial Office <applsci@mdpi.com>
 Qua, 09/08/2023 21:40

Para: Damiao Pergentino de Sousa <damiao_desousa@yahoo.com.br>
 Cc: Rayanne H. N. Silva <rayanne_nasci@hotmail.com>; Emanuel P. Magalhães <emanuelpmagalhaes@gmail.com>; Rebeca C. Gomes <rebecagomes123456@gmail.com>; Yunierkis Perez-Castillo <yunierkis@gmail.com>; Alice M. C. Martins <martinsalice@gmail.com>; Applied Sciences Editorial Office <applsci@mdpi.com>; Nova Chen <nova.chen@mdpi.com>

Dear Dr. De Sousa,

Congratulations on the acceptance of your manuscript, and thank you for submitting your work to Applied Sciences:

Manuscript ID: applsci-2522843
 Type of manuscript: Article
 Title: Piplartine Synthetic Analogs: In Silico Analysis and Antiparasitic Study against Trypanosoma cruzi
 Authors: Rayanne H. N. Silva, Emanuel P. Magalhães, Rebeca C. Gomes, Yunierkis Perez-Castillo, Alice M. C. Martins, Damião P. De Sousa *
 Received: 8 July 2023
 E-mails: rayanne_nasci@hotmail.com, emanuelpmagalhaes@gmail.com, rebecagomes123456@gmail.com, yunierkis@gmail.com, martinsalice@gmail.com, damiao_desousa@yahoo.com.br

https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fusys.mdp.com%2Fuser%2Fmanuscripts%2Fpreview_info%2F0c57fd7e39e3063b1af1cb85169d37d&data=05%7C01%7C%7Ce7994274267447cf2dfe08db993a5528%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C638272248059520967%7CUnknown%7CTWFPbGZsb3d8eyJWljoMC4wLjAwMDAilCjQljoiv2luMzllCjBTil6lk1haWwLjXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sdata=Kowfc6GIRd2A8akYtBQFH%2FE89GzqAOOn0qxYV2QGcqY%3D&reserved=0

We will now edit and finalize your paper, which will then be returned to you for your approval. Within the next couple of days, an invoice concerning the article processing charge (APC) for publication in this open access journal will be sent by email from the Editorial Office in Basel, Switzerland.

If, however, extensive English edits are required to your manuscript, we will need to return the paper requesting improvements throughout.

We encourage you to set up your profile at SciProfiles.com, MDPI's researcher network platform. Articles you publish with MDPI will be linked to your SciProfiles page, where colleagues and peers will be able to see all of your publications, citations, as well as other academic contributions.

We also invite you to contribute to Encyclopedia (<https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fencyclopedia.pub%2F&data=05%7C01%7C%7Ce7994274267447cf2dfe08db993a5528%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C638272248059520967%7CUnknown%7CTWFPbGZsb3d8eyJWljoMC4wLjAwMDAilCjQljoiv2luMzllCjBTil6lk1haWwLjXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sdata=F98fay95kQPc46X3dZOxxTW06dzLz8kN%2FV7RtCDbWio%3D&reserved=0>).

<https://outlook.live.com/mail/0/fnbox/ld/AQQAADAwATYwMAIY2RkADMtMWRjMy0wMAI8MDAKABAACIDhyts8gk6hu7NcO17cNg%3D%3D> 1/2

09/08/2023, 23:14 Email – Rayanne Hellen Nascimento – Outlook

a scholarly platform providing accurate information about the latest research results. You can adapt parts of your paper to provide valuable reference information, via Encyclopedia, for others both within the field and beyond.

Kind regards,
 Takayoshi Kobayashi
 Editor-in-Chief