

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Desenvolvimento de híbridos de triazenos anti-tumorais

Laura Maria Alves Pereira Ferreira

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Desenvolvimento de híbridos de triazenos anti-tumorais

Laura Maria Alves Pereira Ferreira

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia.

Orientador: Doutora Maria de Jesus de Almeida Rainha Perry da Câmara Saldanha
Rocha, Professora Auxiliar

2019

Resumo

As doenças cancerígenas são apresentadas como principais causas de morte por todo o mundo. Apesar da evolução da terapêutica nos últimos anos, o Glioblastoma Multiforme e o melanoma metastático são tumores agressivos e de rápida progressão, e por isso, a terapêutica com quimioterapia continua a apresentar reduzida taxa de sobrevivência.

O Temozolomide (TMZ), um pró-fármaco com estrutura de triazeno, responsável pela sua atividade anti-cancerígena é utilizado para o tratamento destes tumores. Apesar de apresentar propriedades farmacocinéticas favoráveis, tem sido associado ao aparecimento de resistência. A associação de outros fármacos com o TMZ continua sem demonstrar a eficácia desejada.

A síntese de uma molécula com dois farmacóforos com mecanismos anti-tumorais diferentes tem demonstrado ser uma possível alternativa ao TMZ. Estes fármacos são denominados de fármacos Híbridos. Estes híbridos têm na sua constituição um agente metilante de DNA, Monometiltriazeno (MMT), e um ácido carboxílico de cadeia curta α,β -insaturado com função de inibidor de Histona Deacetilases (HDACi).

O ácido cinâmico e alguns derivados têm sido estudados pelas suas propriedades farmacológicas, incluindo como anti-tumoral. Em estudos anteriores o ácido cinâmico demonstrou atividade como HDACi.

Diversos métodos têm sido usados para a síntese deste tipo de compostos, com o objetivo de melhorar o rendimento e a rapidez da obtenção de produto, nomeadamente com a utilização de agentes de ativação de ácidos carboxílicos.

O *design* de fármacos compreende atualmente um vasto conjunto de estudos que tem por base não só a análise do seu potencial terapêutico, como também dos seus possíveis mecanismos de toxicidade. Os compostos Híbridos derivados de ácidos carboxílicos α,β -insaturados, devido à sua estrutura, apresentam capacidade de funcionarem como aceitadores de Michael e por isso serem potencialmente tóxicos.

No presente trabalho foram sintetizados compostos Híbridos constituídos por monometiltriazeno e ácido trans-cinâmico, recorrendo a um método de síntese que promovesse mais facilmente a formação da ligação amida, bem como a sua caracterização estrutural, e a ação anti-tumoral.

Palavras-Chave: Cancro, TMZ, fármacos Híbridos, ácido cinâmico

Abstract

Nowadays, cancer diseases are one of the main causes of death around the world. In spite of the therapeutics advances on the last few years, Glioblastoma Multiform and metastatic melanoma are still very aggressive tumours and with rapid progression. Due to these characteristics, the current chemotherapy treatments still present a low survival rate.

Temozolomide (TMZ), a pro-drug that has a triazene structure responsible for its anti-cancer activity, is used as treatment for these type of tumours. Although it presents favourable pharmacokinetic properties, it has been associated to the appearance of mechanisms of resistance. The association of TMZ with other drugs still doesn't show to be efficient enough.

The synthesis of a molecule with two pharmacophores with different anti-tumour mechanisms has been shown to be a possible alternative to TMZ. These drugs, called Hybrid drugs have in their structures a DNA methylating agent, Methylthioinosine (MTI), and a small chain α,β -unsaturated carboxylic acid that acts as a Histone Deacetylase inhibitor (HDACi).

Several methods have been used for the synthesis of this kind of compounds, aiming to improve some aspects including: yield and the time spent to obtain the final product, like the use of carboxylic acids activating agents.

Drug design includes a broad set of studies based not only in the analysis of their therapeutic potential but as well as their possible toxicity mechanisms. Hybrid compounds derivate from an α,β -unsaturated carboxylic acids present, due to their structure, the ability to function as Michael acceptors and therefore potentially be responsible for some mechanisms of toxicity.

In this work project there were synthesised Hybrid compounds constituted by monomethyl triazene and trans-cinnamic acid moieties, with the use of a synthesis method that could easily promote the amid bond formation. The compounds synthesised were then studied and analysed concerning their structural characterization and anti-tumor mechanism.

Keywords: Cancer, TMZ, Hybrid drugs, cinnamic acid

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à professora doutora Maria de Jesus Perry pela oportunidade de realizar projectos de investigação e em especial pela orientação, apoio e incentivo na realização do presente trabalho.

Ao laboratório Medicinal Chemistry, iMed.Ulisboa pela oportunidade de realizar este e projectos anteriores e de poder ter contado com a disponibilidade dos espaços, equipamentos, investigadores e professores deste laboratório.

À Cláudia Braga (PhD student), Andreia Figueiredo (MSc student) e Marta Clariano (MSc student) pelo apoio e disponibilidade demonstrado ao longo do tempo passado no laboratório ao longo deste projecto.

À Farmácia Carmo e à Dra. Maria Bela Tavares por me terem aceite como estagiária, pelos momentos de aprendizagem, diversão e amizade. Um obrigado especial à Dra. Inês Evaristo pela orientação do estágio.

Aos Serviços Farmacêuticos do Hospital do Espírito Santo-Évora em especial à Dra. Luísa Pereira, pelo tempo dispensado e conhecimentos adquiridos ao longo do estágio.

À minha família pelo apoio de sempre e em especial durante os últimos cinco anos.

À Joana Capela pela amizade e pela disponibilidade de apoio sempre que precisei.

À Domus Nostra por ter sido a minha casa em Lisboa.

À OAUL por me ter dado a oportunidade de voltar a tocar em orquestra, pelos conhecimentos adquiridos, e pelas amizades criadas.

Ao “Dinner Club” pelos momentos de diversão, conversa e apoio diário e pela amizade que ficou.

Comunicações em encontros científicos

Ferreira, L. M.; Perry, M. J. “ Trans-cinnamic acid derivatives of triazenes as anti-cancer hybrid drugs”, apresentação de poster no “11th iMed.Ulisboa Postgraduate Students Meeting & 4rd i3DU Meeting”, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Julho 2019.

Ferreira, L. M.; Perry, M. J. “Development of anti-cancer Hybrid drugs: Trans-cinnamic derivatives of triazenes”, apresentação de poster no “4ECQUL - 4th Meeting of the College of Chemistry”, Reitoria da Universidade de Lisboa, Julho 2019.

Índice

Resumo	II
Abstract	III
Agradecimentos	IV
Comunicações em encontros científicos	V
Índice	VI
Índice Figuras	VIII
Índice Tabelas	VIII
Índice Anexos	IX
Abreviaturas	X
1- Introdução	1
1.1- Glioblastoma multiforme e melanoma: epidemiologia e etiologia	1
1.2- Terapêutica anti-tumoral	4
1.3- Síntese de fármacos Híbridos	8
1.3.1- Fármacos Híbridos derivados de MMT e de ácidos gordos α,β -insaturados	8
1.3.2 - Métodos para a Síntese de Fármacos Híbridos	10
1.4- Compostos aceitadores de Michael e toxicidade	12
2- Objectivos	14
3- Materiais e métodos	15
3.1- Material	15
3.1.1- Equipamentos.....	15
3.1.2 – Cromatografia.....	16
3.1.3- Lista de reagentes e solventes	16
3.2 – Métodos	16
3.2.1 – Síntese dos compostos Híbridos TRIAZHYB1,2, e 3 pelo método DCC/OHbt	16
3.2.2- Síntese do cloreto de ácido	17
3.2.3- Síntese dos compostos híbridos TRIAZHYB1,2,3,4 e 5 com a utilização de cloretos de ácido trans-cinâmico.	17
3.2.4- Caracterização estrutural dos compostos.....	18
3.2.5- Avaliação da actividade anti-tumoral dos compostos por <i>Screening</i> em linhas celulares cancerígenas de adenocarcinoma do cólon	19
3.2.6- Avaliação da Electrofilicidade e estabilidade em PBS	19
4- Resultados	20
4.1- Propriedades moleculares	20
4.2 – Caracterização estrutural	21
4.3- Avaliação da actividade anti-tumoral dos compostos TRIAZHYB1,2,3,4 e 5	24
4.4- Estudos de carácter electrofílico e Estabilidade em PBS	25
4.4.1- Estudos de carácter electrofílico	25

4.4.2- Estabilidade em PBS.....	26
5- Discussão.....	26
6- Conclusão	31
Bibliografia.....	32
Anexos	38

Índice Figuras

Fig. 1- Diferentes tipos de células do CNS que poderão originar as células tumorais responsáveis pelo GBM. APC: Astrocyte progenitor cell; GRP: Glial-restricted progenitor; OPC: Oligodendrocyte progenitor Cell Adaptado de (5).....	2
Fig. 2 – Alterações morfológicas e histológicas do melanoma. Adaptado de (15,18).....	3
Fig. 3 – Forma estrutural da Carmustina	4
Fig. 4- Mecanismo de ação do DTIC. Adaptado de (24).	5
Fig. 5- Estrutura do pró-fármaco Temozolomide (TMZ).....	5
Fig. 6 – Mecanismo de ação do TMZ comparativamente com o do DTIC. Adaptado de (34).	6
Fig. 7 – Efeitos dos HDACi nas células tumorais. Adaptado de (47).	7
Fig. 8 – Estrutura do 1- aril-3- metiltriazeno (MMT)	8
Fig. 9- Imagem computacional criada para representar a ligação do ácido cinâmico ao centro activo da HDAC8 onde atua como inibidor. Adaptado de (59).....	9
Fig. 10 – Mecanismo da formação do HMT. Adaptado de (60).....	10
Fig. 11 – Mecanismo de Formação do MMT. Adaptado de (60).	10
Fig.12- Mecanismo de formação da ligação amida pelo método CDI/OHbt e formação do produto crotono-betaína. (60)	11
Fig. 13 – Mecanismo de formação de ligação amida pelo método DCC/OHbt. Adaptado de (60).	11
Fig. 14- Esquema da reacção de formação do Cloreto do ácido trans-cinâmico.	12
Fig. 15 – Mecanismo da reacção da formação de ligação covalente entre um aceitador de Michael e o grupo tiol de um resíduo de amino ácido de uma proteína. Adaptado de (70,72).....	13
Fig. 16 – Compostos híbridos sintetizados	14
Fig. 17 - Esquema da reacção de formação do Híbrido	15
Fig. 18- Esquema do procedimento para a análise dos compostos TRIAZHYB por UV.	19
Fig. 19- Esquema do procedimento para a análise do carácter electrofílico	20
Fig. 20- Estrutura dos compostos TRIAZHYB com destaque para os protões ¹ H.....	21
Fig. 21- <i>Overlay</i> dos espectros de absorção no UV do composto TRIAZHYB1 incubado com cisteamina na concentração 8x10 ⁻⁴ M nos tempos: 0, 3,15 e 45 min.	25
Fig. 22- <i>Overlay</i> dos espectros de absorção no UV do composto TRIAZHYB1 incubado com cisteamina na concentração 8x10 ⁻³ M nos tempos: 0,10,20,30,40,50,60 min.....	25
Fig. 23- Espectro de absorção no UV obtido para o composto TRIAZHYB1 em PBS na concentração de 8x10 ⁻³ M nos tempos: 0 (branco) e 10 (vermelho) min.....	26
Fig. 24- Esquema da reacção de síntese dos compostos Híbridos TRIAZHYB 1,2,3,4 e 5.....	27

Índice Tabelas

Tabela 1 – Reagentes utilizados nas sínteses	16
Tabela 2- Caracterização estrutural dos compostos	20
Tabela 3- Ponto de fusão e rendimentos obtidos para os compostos TRIAZHYB 1,2, 3,4 e 5.....	21
Tabela 4- Resultados de IV do composto TRIAZHYB1	22
Tabela 5- Resultados de IV do composto TRIAZHYB2	22
Tabela 6- Resultados de IV do composto TRIAZHYB3	23
Tabela 7- Resultados de IV do composto TRIAZHYB4	23
Tabela 8- Resultados do <i>Screening</i> em células cancerígenas HT29.....	24
Tabela 9- Resumo das características e valores de acordo com a regra de Lipinski.	26
Tabela 10- Resumo dos resultados obtidos de ¹ H-NMR.....	28
Tabela 11- Resumo dos resultados obtidos de ¹³ C-NMR.....	28

Índice Anexos

Anexo 1- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C , COSY; IV e UV do composto TRIAZHYB1.....	38
Anexo 2- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C ; IV e UV do composto TRIAZHYB2	43
Anexo 3- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C ; IV e UV do composto TRIAZHYB3	47
Anexo 4- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C ; IV e UV do composto TRIAZHYB4	49
Anexo 5- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C ; IV e UV do composto TRIAZHYB5	52

Abreviaturas

- ABC - ATP-Binding Cassette Super-family/ Super família de proteínas dependentes de ATP com local de ligação idêntico (cassette)
- ABS - Absorvência
- ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
- AIC - 4-amino-5-imidazole-carboxamida
- BHE - Barreira Hemato-Encefálica
- CDI - Carbonyldiimidazole
- CNS - Central Nervous System/Sistema Nervoso Central
- CSC - Cancer Stem Cells/ Células estaminais cancerígenas
- CYP - Citocromo P450
- DCC - Diciclohexilcarbodi-imida
- DCM - Diclorometano
- DNA - Desoxirribo nucleic acid/Ácido desoxirribonucleico
- DTIC - Dacarbazina
- EGF - Epidermal Growth Factor/ Factor de Crescimento Epidérmico
- EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor/ Receptor do Factor de Crescimento Epidérmico
- FDA - Food and Drug Administration
- GBM - Glioblastoma Multiforme
- GSH - Glutathione (γ -glutamylcisteínilglicina)
- h - hora
- HAT - Histone acetylase/ Histonas acetilase
- HBA - Hydrogen bond acceptor/ Grupo aceitador de Hidrogénios
- HBD - Hydrogen bond donor/ Grupo dador de Hidrogénios
- HCMV - Human Citomegalovirus/ Citomegalovirus Humano
- HDAC - Histone Deacetylase/Histona Deacetilase
- HDACi - Histone Deacetylase Inhibitor/Inibidor de Histona Deacetilase
- HMT - 1-aryl-3-hidroximetil-3-metiltriazeno
- HTS - High-throughput screening
- IV - Infravermelho
- LogP - Logaritmo do coeficiente de partilha sistema 1-octanol-água

- MDR - Multidrug Resistance/ Resistência Multi-fármacos
- MGMT- O⁶-metilguanina DNA metiltransferase
- MTIC - 5-Monometiltriazenoimidazol-4-carboxamide
- MMT - Monometiltriazeno
- MW - Molecular Weight /Peso molecular
- NMR - Nuclear Magnetic Resonance/ Ressonância Magnética Nuclear
- OHbt - Hidroxibenzotriazole
- PAIN - Pan-assay interference compounds
- p.f. - ponto de fusão
- ROS - Reactive Oxygen Species/Espécies Reactivas de Oxigênio
- SVZ - Subventricular Zone/Zona Sub-ventricular
- t_{1/2} - tempo de semi-vida
- tCA - Trans-cinnamic acid/Ácido trans cinâmico
- TEA - Trietilamina
- TLC - Thin layer cromathography/ Cromatografia em camada fina
- TPSA- Total Polar Surface Area/ Área total da superfície dos grupos polares
- tr - tempo de retenção
- TSA - Tricostatina A
- VPA - Valproic acid/Ácido Valpróico
- WHO - World Health Organization/ Organização Mundial de Saúde

1- Introdução

1.1- Glioblastoma multiforme e melanoma: epidemiologia e etiologia

As doenças cancerígenas são a principal causa de morte em todo o mundo. De acordo com a World Health Organization (WHO) estima-se que entre 2008 e 2030 o número de câncros diagnosticados aumente cerca de 80% nos países em desenvolvimento e 40% nos países desenvolvidos.(1) Embora, os tratamentos tenham evoluído e aumentado a esperança de vida dos doentes 5 anos pós-diagnóstico, alguns câncros continuam a apresentar baixas taxas de sobrevivência e elevada mortalidade como é o caso dos tumores do cérebro e sistema nervoso central (CNS) e do melanoma. (2,3) Em 2018 foi estimado que o CNS e o melanoma da pele fossem responsáveis no Mundo, por cerca 600.000 novos casos de cancro, sendo o CNS responsável por 241.000 mortes e o melanoma da pele por 60.000. (4)

O GBM pode ocorrer em qualquer idade ou género, com maior incidência em caucasianos, tendo os tumores primários maior prevalência em idades mais avançadas. (5,6) Algumas das causas apontadas como responsáveis pelo aparecimento deste tumor são: a história familiar, doenças genéticas, como por exemplo Síndrome de Turcot, contusões, vírus, como Human Citomegalovirus (HCMV), e radiação ionizante.(6) Este tumor é considerado pela WHO como grau IV, o mais elevado da classificação, isto é, maligno, mitoticamente activo, que pode apresentar necrose e proliferação vascular. (7)

O GBM foi primeiramente relacionado com as células da Glia no século XIX por Rudolph Virchow.(8) As células da Glia são linhas celulares do CNS que podem ser divididas em 4 classes diferentes: microglia, astrócitos, oligodendrócitos, e as suas células progenitoras NG2-glia. Os aspectos funcionais destas células ainda não são totalmente conhecidos, incluindo as suas funções em condições fisiológicas e patológicas. (9) Contudo, actualmente sabe-se que a neurogénese ocorre mesmo na idade adulta e que todas as células da Glia são originadas a partir destas células estaminais que se encontram na Zona Sub-ventricular (SVZ), por mitose.(10,11) No entanto, o GBM é patologicamente muito heterogéneo, o que dificulta o tratamento, pois embora algumas células cancerígenas sejam originárias das células estaminais SVZ, outras são iniciadas a partir de células progenitoras não-SVZ, ou de células da Glia que sofreram desdiferenciação. (Fig. 1) (10,12) Estas células tumorais podem apresentar vários fenótipos por partilharem algumas características comuns com as células estaminais entre as quais: auto-renovação e diferenciação multipotente. (13) A desregulação do ciclo celular ocorre no *checkpoint* G1/S, principalmente devido a 3 alterações genéticas: na via RB1, responsável por remover os *checkpoints* durante o ciclo celular, via TP53, que evita as respostas apoptóticas e de senescência, e a via RTK de onde resulta um aumento da proliferação celular. (5,7,11,14) A sinalização do receptor EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) também pode estar alterada, tendo esta um papel importante para a manutenção

da pluripotência das células e na estimulação do EGF que pode levar à proliferação descontrolada das células estaminais/ pluripotentes do SVZ. (5)

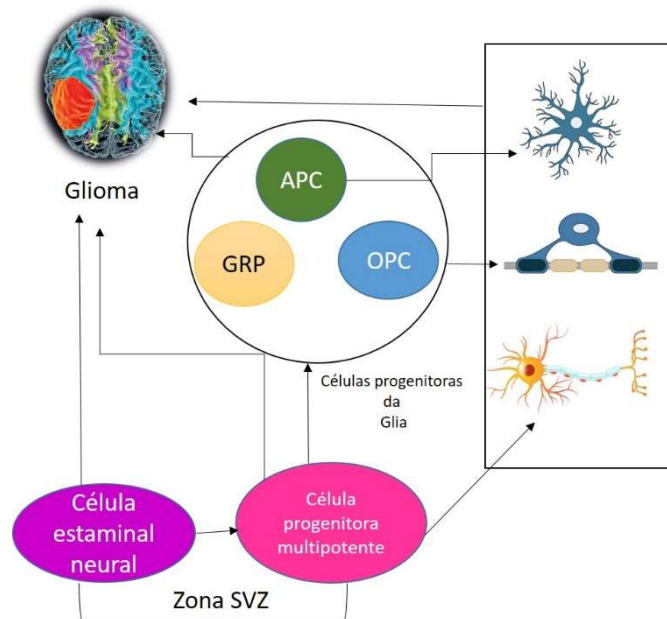


Fig. 1- Diferentes tipos de células do CNS que poderão originar as células tumorais responsáveis pelo GBM. APC: Astrocyte progenitor cell; GRP: Glial-restricted progenitor; OPC: Oligodendrocyte progenitor Cell Adaptado de (5).

O melanoma é uma neoplasia da pele que ocorre pela proliferação anormal dos melanócitos. (15) A susceptibilidade é dependente de factores genéticos e epigenéticos, como pele, olhos e cabelos mais claros e da capacidade intrínseca dos melanócitos de protegerem a pele das radiações UV. A exposição às radiações UV é apresentada como a principal causa das mutações que poderão alterar o crescimento e o funcionamento dos melanócitos. A exposição a estas radiações provoca alterações genéticas na pele que levam ao aumento dos factores de crescimento e à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que danificam o DNA. O último estado do melanoma é quando este metastiza invadindo outros órgãos com células tumorais como: pulmões, fígado ou cérebro, sendo nestes casos classificado pela WHO como grau IV, apresentando por isso enquanto tumor as mesmas características que o GBM. (16,17) A observação da alteração dos sinais da pele permite uma detecção precoce do melanoma e é avaliada pela mnemónica ABCDE, sendo: A, assimetria; B, "border", a definição dos limites; C, cor; D, diâmetro e E, evolução, em relação a um sinal diferente dos restantes da pele que está a evoluir com alterações na forma, cor ou tamanho.(15,18) (Fig. 2)

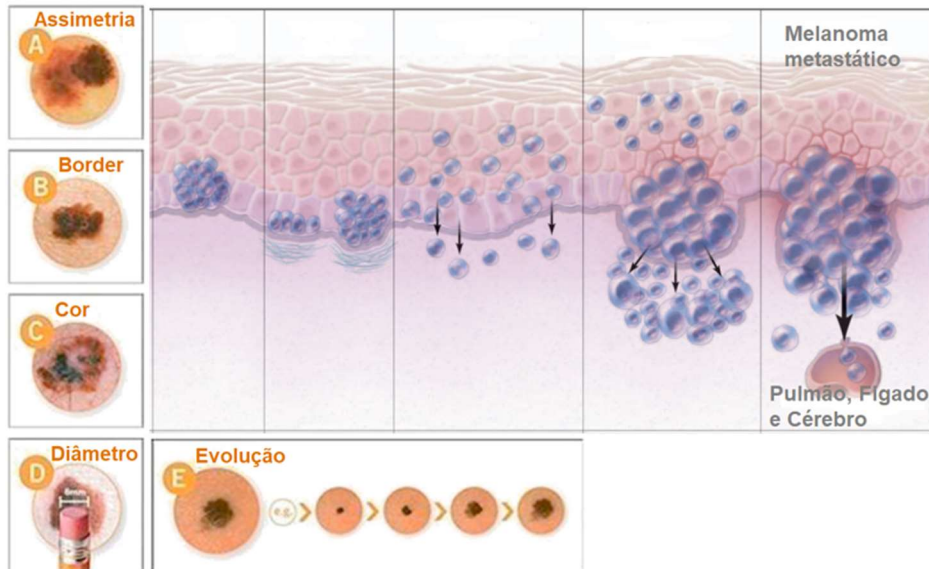


Fig. 2 – Alterações morfológicas e histológicas do melanoma. Adaptado de (15,18).

A nível molecular ocorrem alterações devido a mutações somáticas nos oncogenes: N-RAS, responsável por 15% dos casos de melanoma ou BRAF, mutação identificada em 50% dos casos de melanoma e a mais comum no melanoma metastático. Estas mutações causam activação da serina-treonina cinase da via ERK-MAPK. A mutação mais comum nos casos de melanoma metastático, oncogene BRAF, leva à substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 600, mutação (V600E).(16,19) Como consequência, o oncogene BRAF é ativado e há uma diminuição da transdução de sinal da MAPK.(20) Esta via de sinal apresenta um papel importante na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, ao estar relacionada com o ciclo celular em especial com as fases G1 e S.(21) Assim, a mutação V600E e a inibição do gene supressor de tumores p53 representam um dos mecanismos que torna os melanócitos malignos.(18) A metastização ocorre quando estas alterações a nível molecular que alteram a adesão celular permitem que as células tumorais se desassociem da lesão primária e migrem, invadindo vasos sanguíneos e linfáticos e com facilidade atingir outros órgãos, o que dificulta o prognóstico e o tratamento do melanoma.(18)

A heterogeneidade das células tumorais, o facto de tanto o GBM como o melanoma metastizado serem classificados como grau IV e o difícil acesso aos órgãos envolvidos, impede que todas as células tumorais respondam da mesma forma ao tratamento. Por este motivo os tratamentos aplicados são uma combinação de remoção cirúrgica do tumor, terapêutica múltipla de quimioterapia em conjunto com radioterapia.(22)

1.2- Terapêutica anti-tumoral

O primeiro fármaco utilizado para o tratamento do GBM e tumores no cérebro como o melanoma metastizado foi a Carmustina. Esta molécula é um fármaco anti-neoplásico pertencente ao grupo das nitrosureias. (Fig. 3) O seu mecanismo de ação baseia-se na sua decomposição no ião metildiazónio, um agente alquilante, que se liga ao O⁶ da guanina do DNA. Desta forma impede a separação das cadeias de DNA quando ocorre a replicação celular, promovendo o cross-link das cadeias de DNA entre as bases de guanina e citosina e consequentemente a quebra da cadeia dupla do DNA, bem como, a indução da expressão do p53 e p21 culminando na morte celular por necrose ou apoptose. (23–26) Apresenta como característica elevada lipofília, e como tal consegue atravessar facilmente a Barreira Hemato-Encefálica (BHE).(24) Contudo apresenta desvantagens como: reduzido tempo de semi-vida, resistência, elevada toxicidade e difícil ligação ao local de reconhecimento. (26)

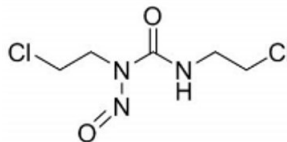


Fig. 3 – Forma estrutural da Carmustina

Com o interesse de melhorar as características farmacodinâmicas e farmacocinéticas de fármacos anti-cancerígenos foram desenvolvidos pró-fármacos. Os pró-fármacos são moléculas que não são administradas na sua forma activa, precisam de activação biológica, maioritariamente enzimática, após administração para exercerem o seu efeito. O principal objectivo do seu desenvolvimento é a optimização da ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade). Para tal, os pró-fármacos são sintetizados de forma a alterarem algumas das propriedades indesejáveis dos fármacos como: baixa solubilidade, metabolização errática e toxicidade (27–29).

O pró-fármaco DTIC, Dacarbazina, foi desenvolvido de forma a ser utilizado concomitante com a Carmustina. O (DTIC) pertence à família dos triazenoimidazóis, tendo presente na sua estrutura o grupo triazeno, que após metabolização hepática pelo CYP450 sofre desmetilação e forma o intermediário (HMMTIC), por sua vez origina o intermediário MTIC, 5-Monometiltriazenoimidazole-4-carboxamida, que se dissocia em 4-amino-5-imidazole-carboxamida (AIC) e ião metildiazónio, este último responsável pela metilação do DNA na posição N⁷ da guanina (Fig.4) (24,30,31).

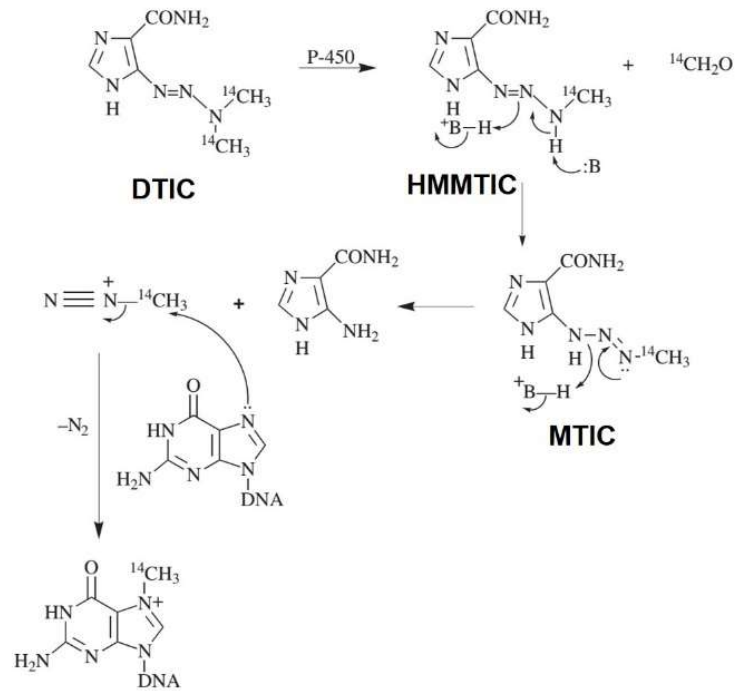


Fig. 4- Mecanismo de ação do DTIC. Adaptado de (24).

Com o objectivo de obter um pró-fármaco sem a necessidade de metabolização hepática para se obter o intermédio MTIC, foi desenvolvido um outro pró-fármaco da mesma família do DTIC, o Temozolomide (TMZ). (Fig. 5) (31)

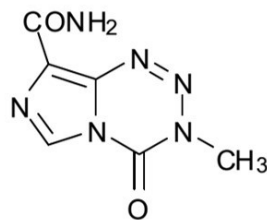


Fig. 5- Estrutura do pró-fármaco Temozolomide (TMZ).

Actualmente o TMZ é o pró-fármaco aprovado pela FDA mais utilizado para o tratamento do GBM e do melanoma metastizado (32). O TMZ é uma imidazotetrazina de segunda geração, sendo por isso um agente alquilante do DNA estruturalmente semelhante com o DTIC, constituído por um anel de imidazol e um grupo trizeno. Este pró-fármaco apresenta como características: baixo peso molecular, 194 g/mol, estabilidade a pH ácido, e por isso resistência à acidez do estômago, lipofílico, o que lhe permite atravessar a BHE, hidrolisando-se espontaneamente a pH fisiológico (7,4) no intermédio MTIC (31,33). A sua instabilidade em condições fisiológicas promove a descarboxilação espontânea do MTIC e hidrólise em 4-amino-5-imidazole-carboxamida (AIC) e ião metildiazónio (Fig.6). A metilação do DNA ocorre nas bases púricas: N⁷-guanina, N³-adenina, O⁶-guanina, sendo esta última, a principal responsável pela eficácia do tratamento. (33–36)

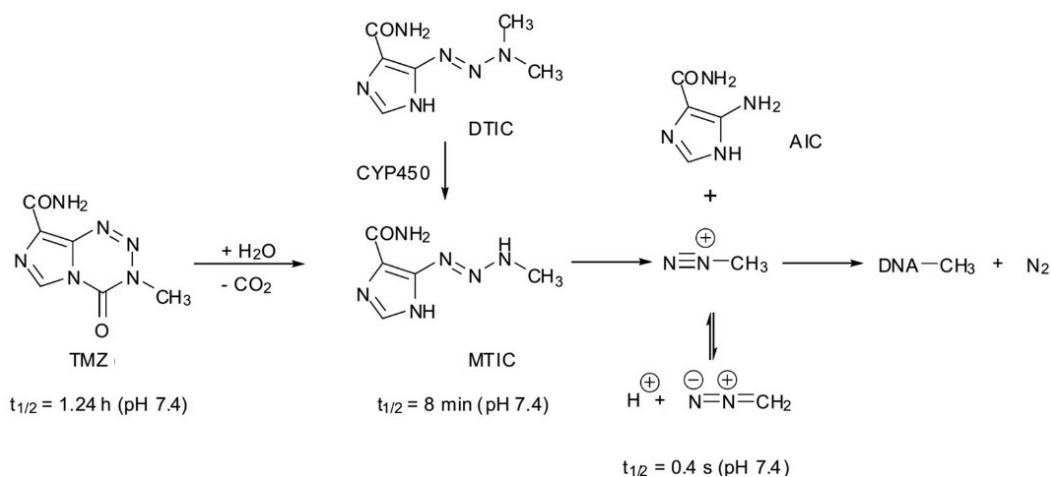


Fig. 6 – Mecanismo de ação do TMZ comparativamente com o do DTIC. Adaptado de (34).

O TMZ apresenta como propriedades farmacocinéticas: $t_{1/2}$ curto, cerca de 2h, absorção aproximadamente de 100%, praticamente sem alteração com a ingestão de alimentos, e boa biodisponibilidade (31,37).

No entanto, a eficácia do tratamento é limitada por mecanismos de resistência como: a expressão da O⁶- metilguanina DNA metiltransferase (MGMT), enzima que funciona como um mecanismo de reparação do DNA ao atuar na remoção da O⁶-guanina metilada formada pela a acção do TMZ (36,38) e a elevada expressão de proteínas MDR, *multidrug resistance*, que por pertencerem à família ABC, *ATP-binding cassette super-family*, são transportadores de efluxo, aumentando assim a quantidade de fármaco exportada para o meio extracelular (39,40).

Com o intuito de melhorar a terapêutica anti-tumoral, têm sido exploradas novas possibilidades de tratamento. Um exemplo actual é o estudo de alterações epigenéticas,

nomeadamente em enzimas importantes para a regulação celular como as Histonas Deacetilases. (HDAC). (41,42)

Os nucleossomas, unidades estruturais da cromatina essenciais no enrolamento do DNA eucariótico, são constituídos por Histonas e DNA. (43) As HDAC, Histonas Deacetilases, são enzimas importantes na regulação da expressão génica, que atuam nesta unidade, estando relacionadas com i) ativação e repressão de genes, ao promoverem condensação da cromatina; ii) reparação e recombinação do DNA, ao removerem o grupo acetil dos resíduos de lisina, previamente adicionados pelas HATs (Histone acetylases). (44,45) Contudo, no caso das células cancerígenas, as HDACs sofrem alterações que levam à sua desregulação e consequente alteração do normal funcionamento da célula.(46)

Os inibidores de HDAC (HDACi) foram desenvolvidos com o objectivo de inibir a função desregulada destas enzimas nas células tumorais, e como tal, induzem a paragem do ciclo e inibem a diferenciação celular, levando à morte das células por apoptose e à redução da angiogénese.(47) (Fig. 7)

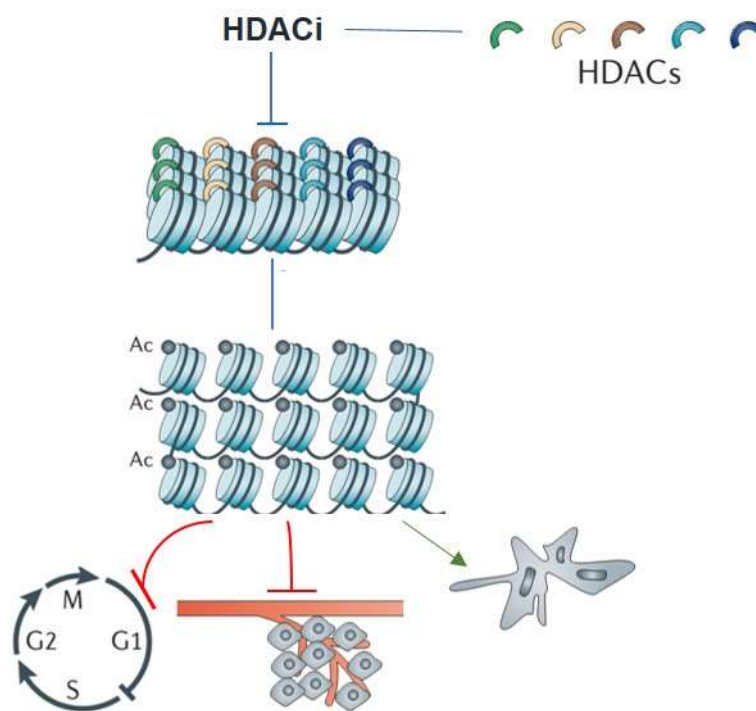


Fig. 7 – Efeitos dos HDACi nas células tumorais. Adaptado de (47).

Os compostos estudados com função de HDACi encontram-se divididos em cinco classes de compostos: ácidos hidroxicinâmicos, ácidos gordos de cadeia curta, benzamidas, tetrapéptidos cíclicos e inibidores das enzimas sirtuínas.(41)

Alguns fármacos de HDACis, como o ácido valpróico, já se encontram aprovados e em terapêutica múltipla concomitantemente com agentes alquilantes do DNA, como o TMZ, e radioterapia. Contudo têm sido identificados alguns casos de resistência.(46)

1.3– Síntese de fármacos Híbridos

1.3.1– Fármacos Híbridos derivados de MMT e de ácidos gordos α,β -insaturados

A terapêutica múltipla para o tratamento de tumores com HDACi, como o ácido valpróico (VPA) e agentes alquilantes do DNA, como o TMZ, tem demonstrado ser mais eficaz, quando comparada com a terapêutica isolada dos fármacos, ao diminuir a resistência ao TMZ, pela diminuição da expressão das MGMT. (48) No entanto, com o intuito de melhorar a eficácia da terapêutica, a investigação de fármacos Híbridos tem surgido nos últimos anos como um campo de investigação emergente.

Os fármacos Híbridos são constituídos por uma molécula composta por dois farmacóforos ligados covalentemente. A estrutura destes fármacos foi desenhada com os objetivos de se obter efeito sinérgico, assim como, de melhorar as propriedades farmacocinéticas (ADMET) e diminuir a resistência. (49,50)

No caso do tratamento do GBM e do melanoma, foram desenvolvidos fármacos compostos por um agente alquilante do DNA, 1-aryl-3-metiltriazeno, e um HDACi, como o VPA, ligados por uma ligação amida.(49,51)

Os monometiltriazenos (MMT) são estruturalmente constituídos por uma cadeia linear de três átomos de azoto ligados consecutivamente na formação (RN=N-NR'R''), sendo que pelo menos um dos grupos substituintes, R, tem de ser um grupo metilo (-CH₃), de forma a ser igual ao intermediário formado pelo TMZ, MTIC, que em condições fisiológicas forma o ião diazónio capaz de alquilar as bases de DNA. Os trizenos que mais demonstraram propriedades anti-tumorais são os 1-fenil-3,3-dimetiltriazenos, normalmente sintetizados a partir de anilinas e aminas secundárias. Na formação destes fármacos Híbridos os MMT mais utilizados são os 1-aryl-metiltriazeno. (49,52) (Fig. 8)

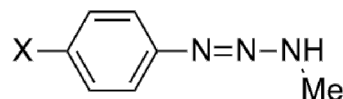


Fig. 8 – Estrutura do 1- aril-3-metiltriazeno (MMT)

A classe dos ácidos gordos carboxílicos de baixo peso molecular, como o VPA, e a classe dos ácidos gordos insaturados como o ácido cafeico e o ácido cinâmico, têm sido utilizadas no desenvolvimento de fármacos híbridos como derivados de HDACi.

O ácido cinâmico é um ácido gordo α,β -insaturado, constituinte da planta *Cinnamomum cassia*, e pertence à classe das hormonas auxinas, pelo que promove o crescimento apical e a diferenciação celular da planta. Este ácido apresenta um largo espectro de atividades biológicas: como antioxidante, anti-inflamatório, e anti-tumoral, exercendo atividade anti-proliferativa das células do melanoma. (53,54)

O ácido trans-cinâmico (tCA) para além de ser detetado em plantas também pode ser detetado no corpo humano, onde é produzido maioritariamente no cólon por microrganismos. Alguns estudos demonstraram que o tCA e derivados são formados pela degradação dos constituintes polifenólicos das frutas e vegetais por microrganismos intestinais inibindo a actividade global das HDAC em células de carcinoma do cólon.(53) O tCA e derivados têm sido alvo de estudos com o objectivo de comprovar a sua actividade como HDACi.

O TSA, Tricostatina A, é um composto orgânico com propriedades anti-fúngicas e um dos primeiros compostos naturais a ser aprovado como HDACi pela FDA. (55) O TSA liga-se ao co-factor essencial Zn^{2+} , presente no centro activo das HDAC. Os estudos realizados com o tCA e derivados demonstraram que se ligam no mesmo local do TSA e que funcionam como HDACi, ao induzir a expressão das mesmas proteínas que o TSA quando atua como HDACi, ao inibir a proliferação de linhas celulares tumorais e ao induzir a apoptose das mesmas. (Fig.9) Os mesmos estudos concluíram também a reduzida toxicidade destes fármacos, pois os resultados obtidos demonstraram que apenas ocorreu supressão de linhas de células tumorais, sem serem registados danos para as restantes células do tecido. (56–59)

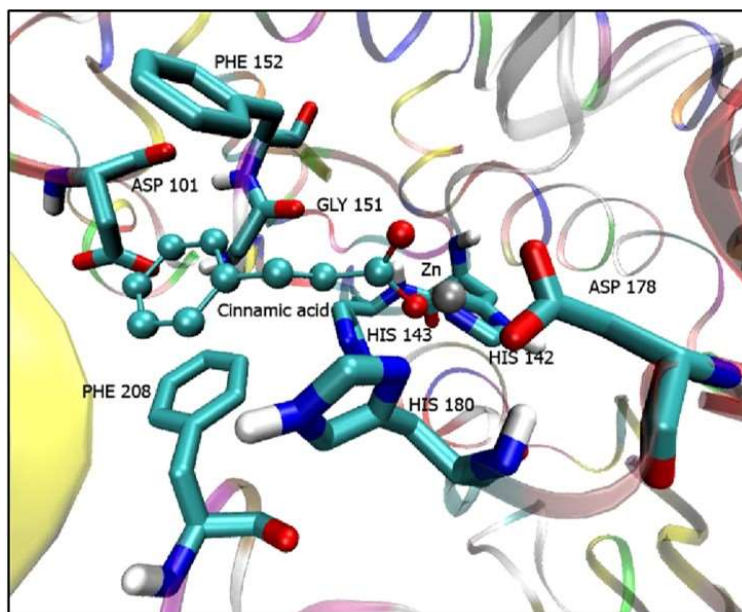


Fig. 9- Imagem computacional criada para representar a ligação do ácido cinâmico ao centro activo da HDAC8 onde atua como inibidor. Adaptado de (59).

1.3.2 - Métodos para a Síntese de Fármacos Híbridos

A síntese dos fármacos Híbridos referidos requer a formação da ligação amida. Para tal, primeiro é necessária a síntese do agente anti-tumoral (MMT) para que depois seja possível a formação da ligação com o HDACi (tCA).

Deste modo a síntese do MMT tem como primeiro passo a síntese do precursor hidroximetiltriazeno (HMT) pela reacção da anilina com ácido nítrico e como tal formação do sal diazónio. O sal reage com o intermediário carbinolamina de onde se obtém o produto final, HMT. (60–63) (Fig.10)

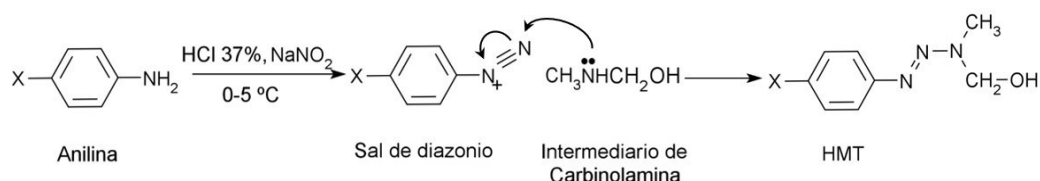


Fig. 10 – Mecanismo da formação do HMT. Adaptado de (60).

Na presença de excesso de uma base com a estrutura específica de um par de eletrões e um grupo HBD (O ou N), como a base metilamina, o HMT decompõe-se em MMT. (60–62) (Fig. 11)

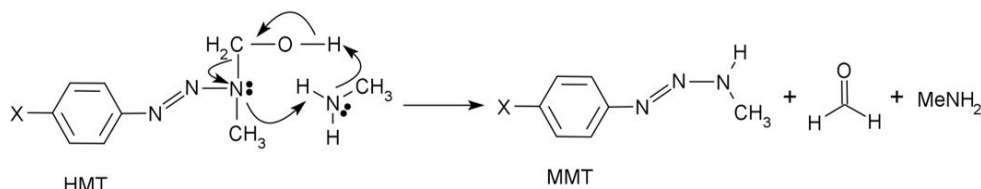


Fig. 11 – Mecanismo de Formação do MMT. Adaptado de (60).

Os métodos já usados para a síntese dos análogos Híbridos baseiam-se no acoplamento do MMT com o ácido carboxílico usando agentes de acoplamento.

No desenvolvimento destes fármacos em trabalhos anteriores foram usados dois métodos: CDI/OHBt e DCC/OHBt.(64)

O método CDI/OHBt utiliza o agente CDI para ativar o ácido carboxílico e promover a formação de um intermediário com o OHBt que reaja com o grupo amina do MMT e assim se forme a ligação amida.

No entanto, para além da formação de produto, formam-se também produtos secundários como CO₂ e imidazole. Este último responsável pelo ataque nucleofílico por adição 1,4 ao Híbrido formado, do qual resulta a formação do carboanião que seguidamente é protonado formando-se o produto crotono-betaína. (60) (Fig.12)

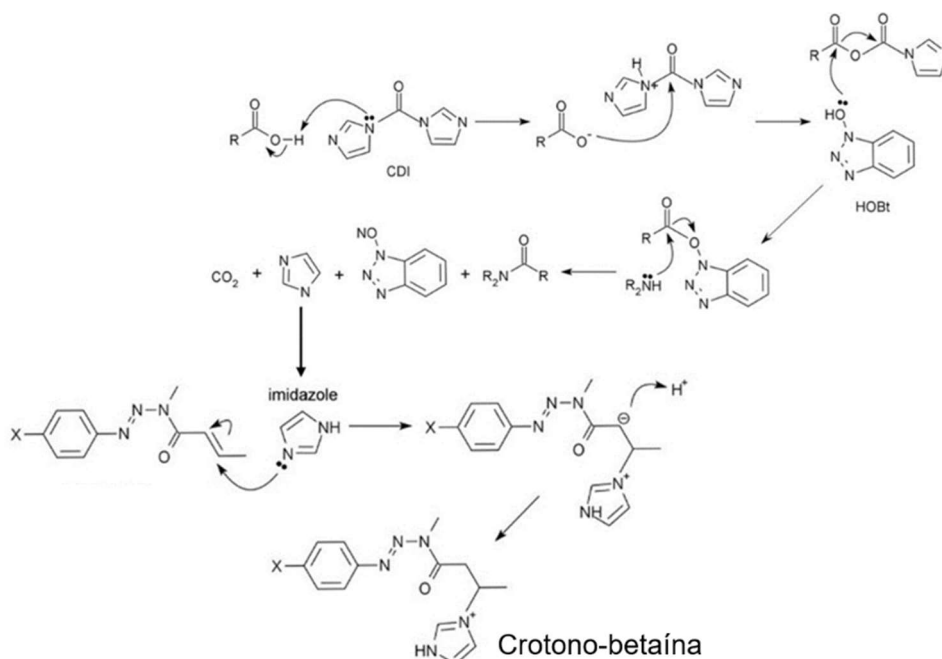


Fig.12- Mecanismo de formação da ligação amida pelo método CDI/OHBT e formação do produto crotono-betaína. (60)

Na reacção com o DCC, a activação ocorre também com o aditivo OHBT e permite a formação de um intermediário que reage diretamente com o grupo amina. (60,64) A utilização de solventes com reduzida constante dielétrica, como o DCM, evita a racemização. Contudo em trabalhos anteriores observou-se baixos rendimentos e elevada quantidade de contaminação de ureído, N,N'-Diciclohexilureia, que é formado como produto secundário. (Fig. 13)

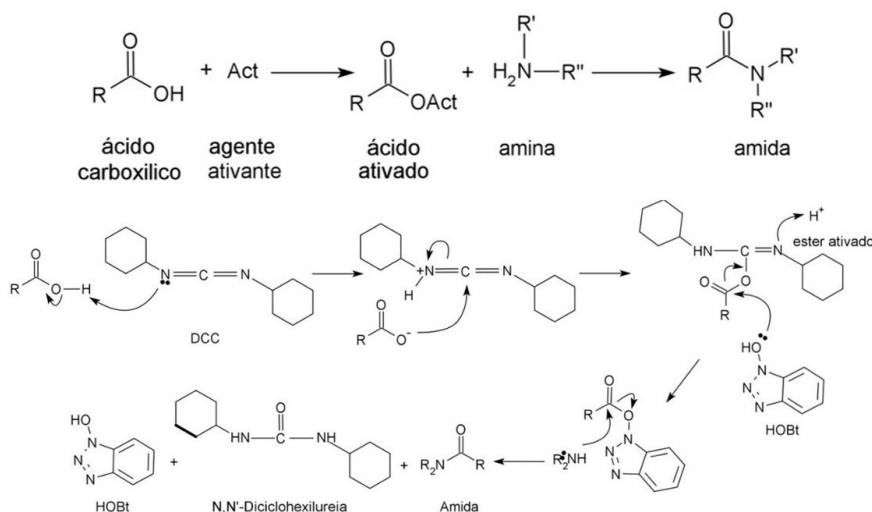


Fig. 13 – Mecanismo de formação de ligação amida pelo método DCC/OHBT. Adaptado de (60).

Em ambos os métodos referidos para activação do ácido carboxílico, CDI e DCC, foram detectados alguns problemas na síntese dos compostos Híbridos, tais como: baixo rendimento, especialmente quando na presença de grupos aromáticos, presença de nucleófilo (imidazol) permite a adição 1,4, muito tempo de reacção e formação em grande quantidade de produtos secundários, como o ureído, que dificultam o processo de separação do produto principal da reacção.

Neste trabalho, a fim de se melhorar e/ou eliminar os problemas dos métodos anteriores, foi utilizado o método em que se parte dos cloretos de ácido cinâmico, que funcionam como formas activadas dos respectivos ácidos carboxílicos e que podem facilitar a formação da ligação amida.

Os cloretos de ácido têm sido utilizados na síntese de moléculas por ligação amida como os peptidomiméticos.(65) A presença do átomo de Cl, torna o grupo carbonilo mais electrofílico, e como tal mais reactivo a espécies nucleofílicas com átomos de azoto. No entanto, a utilização de cloretos de ácido nestas reacções apresenta como desvantagem a formação de HCl. De forma a evitar este problema é adicionado um excesso de base como bicarbonato de sódio ou piridina. (66,67) O método de William e Young foi utilizado para a síntese de peptidomiméticos, pela formação de ligação amida entre um aminoácido e um cloreto de ácido.(66)

Os cloretos de ácido a utilizar nestas reacções por vezes existem já comercializados, mas caso não existam poderão ser sintetizados pelo método esquematizado na Fig.14 pela utilização de cloreto de tionilo (SOCl_2). (68)

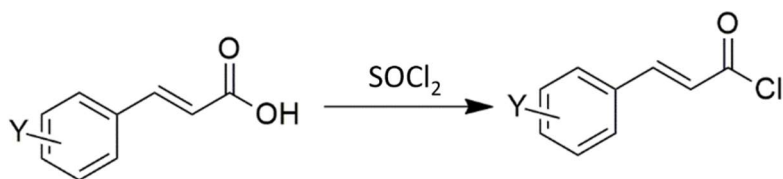


Fig. 14- Esquema da reacção de formação do Cloreto do ácido trans-cinâmico.

1.4- Compostos aceitadores de Michael e toxicidade

Actualmente, o desenvolvimento e *design* de novos fármacos encontra-se dependente de um extenso conjunto de ensaios denominado High-throughput screening (HTS). O HTS é constituído por ensaios de diferentes ramos científicos, e por isso são efectuados ensaios relacionados tanto com a avaliação em linhas celulares, como a capacidade de formação de ligações covalentes com compostos biológicos e até a sua estabilidade em meio fisiológico. Deste modo, os HTS apresentam como principais objectivos: a verificação e pureza do composto, a identificação dos compostos com maior potencial terapêutico, identificação e

estudo do seu mecanismo de acção e a previsão da sua toxicidade *a priori* dos ensaios clínicos.(89,90) Nestes HTS surgem os chamados falsos positivos, geralmente compostos com reactividades características, como o grupo dos aceitadores de Michael.

Os compostos em estudo, TRIAZHYB, embora apresentem uma estrutura com actividade anti-tumoral são também compostos carbonílicos α,β -insaturados, e por isso aceitadores de Michael. Estes compostos, devido a despolarização tornam-se muito electrofílicos e facilmente reagem por adição de Michael com grupos nucleofílicos endógenos presentes nas cadeias terminais dos aminoácidos. Os aceitadores de Michael reagem com mais facilidade com grupos tiol, como por exemplo com grupo terminal da cisteína, e dessa forma ligam-se de forma covalente a proteínas.(69–71) (Fig.15)

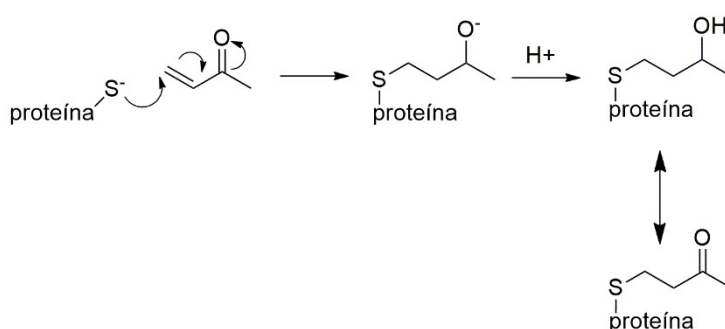


Fig. 15 – Mecanismo da reacção da formação de ligação covalente entre um aceitador de Michael e o grupo tiol de um resíduo de amino ácido de uma proteína. Adaptado de (70,72)

A formação desta ligação covalente poderá ser vista como uma vantagem terapêutica, mas por outro lado poderá apresentar um potencial de toxicidade.(71,73)

Em alguns estudos, os compostos carbonílicos α,β -insaturados, em especial compostos polifenólicos como o ácido cafeico, têm demonstrado actividade biológica benéfica na sinalização da inibição de proteínas pro-inflamatórias e de proteínas relacionadas com o aparecimento de cancro, não só pela sua acção como antioxidantes mas também devido à capacidade de serem aceitadores de Michael.(74) Contudo, estudos realizados em compostos que apresentam grupos aceitadores de Michael demonstraram que a formação de ligações covalentes com nucleótidos endógenos, como os resíduos de aminoácidos, provocam danos celulares e citotoxicidade. (71,74,75)

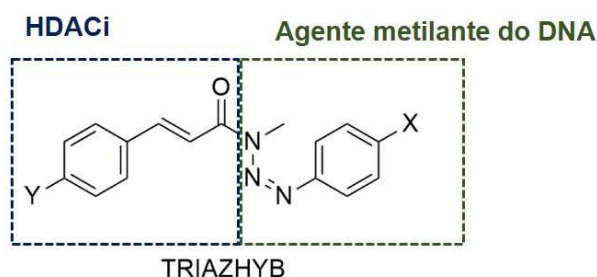
A capacidade electrofílica dos aceitadores de Michael provoca toxicidade devido à formação irreversível de aductos com o grupo tiol da cisteína presente em proteínas com funções críticas. Os compostos mais electrofílicos estão também envolvidos na depleção celular de GSH (γ -glutamilcisteínilglicina) e no stress oxidativo.(76) No entanto, não é possível generalizar estes mecanismos de toxicidade para todos os compostos aceitadores

de Michael, pois os grupos substituintes do composto podem alterar a electrofilia do mesmo. (77)

O conceito de *drug-likeness* permite ajudar a otimizar a farmacocinética e as propriedades farmacêuticas de possíveis fármacos. Como tal, no desenvolvimento de novos fármacos, especialmente se apresentarem uma estrutura já estudada com capacidade de provocar mecanismos de toxicidade, é essencial realizar estudos que despistem uma possível toxicidade. O estudo da electrofilicidade dos TRIAZHYB torna-se particularmente importante no decurso do seu desenvolvimento como fármacos, por apresentarem capacidade de reagir como aceitadores de Michael. (74,78)

2- Objectivos

O presente trabalho de campo teve como primeiro objectivo a síntese de compostos híbridos de ácido trans-cinâmico e MMT, com diferentes substituintes (Fig. 16).



TRIAZHYB1	Y= H	X= CN
TRIAZHYB2	Y= H	X= COMe
TRIAZHYB3	Y= H	X= COOEt
TRIAZHYB4	Y= H	X= Cl
TRIAZHYB5	Y= Me	X= CN

Fig. 16 – Compostos híbridos sintetizados

A figura 17 mostra a avaliação retrosintética das moléculas híbridas desenvolvidas neste trabalho: (i) formação do agente anti-tumoral (MMT) a partir da anilina como descrito anteriormente (Fig. 10 e 11); (ii) posterior ativação do MMT pelo NaH, uma base forte, de forma a tornar-se num nucleófilo forte e promover a substituição nucleofílica devido à carga negativa formada e maior densidade eletrónica; (iii) O cloreto de ácido (já existente ou após a transformação do ácido trans-cinâmico em cloreto de ácido (Fig.14) é adicionado ao MMT ativado em solvente orgânico, a um meio reacional com piridina para que seja promovida a formação da ligação amida (Fig. 17).

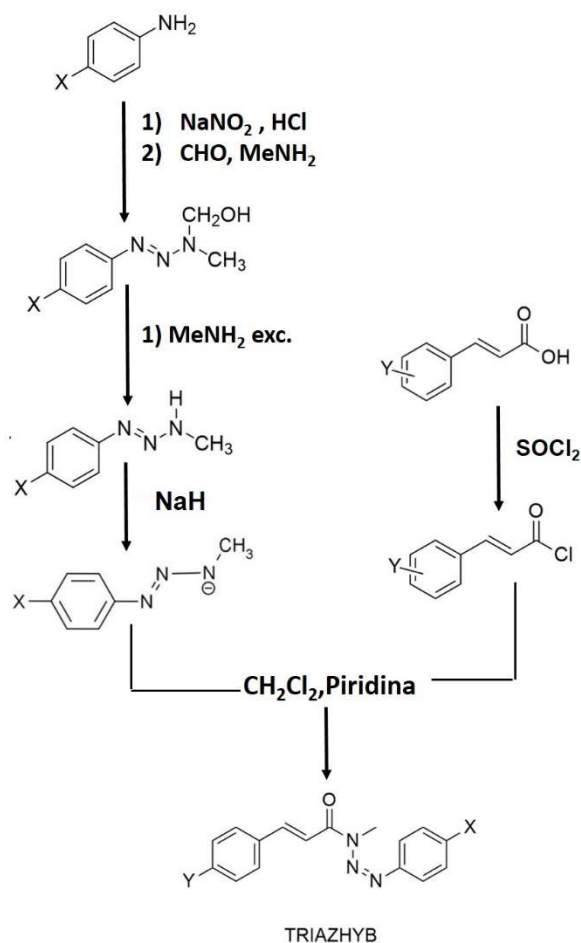


Fig. 17 - Esquema da reacção de formação do Híbrido

Este projecto teve também como objectivos: a caracterização estrutural por $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IV e UV, a sua avaliação como agentes anti-tumorais, em linhas celulares, a avaliação das suas propriedades *drug-likeness* (determinação do LogP), estudos de carácter electrofílico e estabilidade em PBS ou seja em condições fisiológicas.

3- Materiais e métodos

3.1- Material

3.1.1– Equipamentos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Protão ($^1\text{H-RMN}$) e de Carbono ($^{13}\text{C-RMN}$) foram obtidos num espectrofotómetro Bruker Ultra-Schield 300 MHz. Desvios químicos (δ) em partes por milhão (ppm) relativamente ao TMS (clorofórmio deuterado) como padrão interno e constantes de acoplamento (J) expressas em Hertz (Hz). Multiplicidades dadas como: s (singuleto), d (duplete), t (tripleto), q (quarteto) e m (multiplete). A análise dos espectros foi realizada com o programa MestreNova.

Os espectros de infravermelho foram traçados no espectrómetro IRAffinity-1 *Fourier Transform Infrared Spectrophotometer*, Shimadzu. A análise dos espectros foi efetuada pelo programa *Shimadzu IR Solution* Versão 1.5.

Os espectros de UV foram traçados no espectrofotómetro de UV-VIS: UV-1280 Shimadzu e analisados no programa UV-Probe version.

Os estudos de carácter electrofílico e *Screening* em PBS foram efetuados no espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 e analisados no programa UV-1601PC.

3.1.2 – Cromatografia

A cromatografia em coluna para a separação dos compostos na mistura reacional foi efectuada com sílica Merck Kieselgel 60 F254, espessura = 0,25 nm.

As reacções foram monitorizadas por TLC (thin layer chromatography) com filme de sílica-gel depositado em placa e visualização das bandas em luz UV (CAMAG).

3.1.3- Lista de reagentes e solventes

Tabela 1 – Reagentes utilizados nas sínteses

Reagente	Fabricante	Grau de pureza (%)
cloreto de tionilo (SOCl ₂)	Sigma-Aldrich	98
ácido 4-metilcinâmico (C ₁₀ H ₁₀ O ₂)	Alfa Aesar	99
cloreto de ácido trans-cinâmico (C ₉ H ₇ ClO)	Alfa Aesar	97
piridina (C ₅ H ₅ N)	Merk	99.5

Os MMT utilizados na síntese dos compostos foram previamente sintetizados no laboratório iMed FFUL- Medicinal Chemistry, pelo método descrito em 1.3.2.

O solvente utilizado nas sínteses, DCM (CH₂Cl₂), foi seco antes da utilização por destilação com cloreto de cálcio anidro.

As amostras para NMR (¹H e ¹³C) foram preparadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) Sigma-Aldrich.

3.2 – Métodos

3.2.1 – Síntese dos compostos Híbridos TRIAZHYB1,2, e 3 pelo método DCC/OHBT

A uma solução de ácido trans-cinâmico (0.62 mmol, 148.16 g/mol) em 5 mL de CH₂Cl₂ num balão de 50 mL com agitação magnética à temperatura ambiente até dissolução completa, adicionou-se DCC (0.72 mmol, 206.33 g/mol). Após 20 minutos adicionou-se OHBT

(0.62 mmol, 151.19 g/mol). Em seguida, após 30 minutos adicionou-se 200 μ L de TEA (14,4 mmol). A solução foi mantida em agitação contínua durante 1 hora.

Separadamente foram activados os respectivos MMT, (0.62 mmol), pela dissolução em 2 mL de DCM e NaH (95%, 0,6 mmol). Adicionou-se esta solução ao ácido anteriormente activado, efectuando o controlo da reacção por TLC. A reacção foi mantida em agitação à temperatura ambiente durante 48 h.

No controlo por TLC foi utilizado o seguinte eluente: n-hexano: acetato de etilo (2:1). Após 48h o conteúdo do balão foi evaporado sob vácuo.

Na separação do TRIAZHYB1 efectuaram-se duas purificações por cromatografia em coluna, com os eluentes n-hexano:acetato de etilo (1:1) e (2:1) respectivamente.

Para a purificação do TRIAZHYB2 também foi necessário efectuar duas colunas de cromatografia, usando a mesma mistura eluente, n-hexano:acetato de etilo (2:1).

Na separação e purificação do TRIAZHYB3 procedeu-se a uma cromatografia em coluna com eluição n-hexano:acetato de etilo (2:1), seguido de separação por cromatografia preparativa, com extração da sílica com gradiente de polaridade (DCM e acetato de etilo). Observou-se que a maioria do produto desejado não se encontrava ainda puro, pelo que se utilizou novamente o método de cromatografia em coluna com a mistura eluente n-hexano:acetato de etilo (3:1).

Após a separação das soluções respectivas, os compostos foram evaporados a resíduo seco e analisados por $^1\text{H-NMR}$.

3.2.2- Síntese do cloreto de ácido

O cloreto de ácido trans-cinâmico do Híbrido TRIAZHYB5 foi sintetizado de acordo com a técnica descrita na referência (68):

A 0.55 mL (7.5 mmol) de cloreto de tionilo (SOCl_2) num balão de 2 tubuladuras de 50 mL, em refluxo com agitação e à temperatura de 50°C , foi adicionado o ácido acrílico (2E)-3-(4-Metilfenil), (p-Me-tCA) ($M = 163.61$ g/mol, 10 mmol). A reacção foi mantida nas mesmas condições durante 2h, após as quais foi adicionado DCM e novamente 0.55 mL de SOCl_2 . A reacção foi mantida por mais 2h com aumento gradual da temperatura até 80°C e controlo da formação de produto por TLC, utilizando como eluente DCM. A mistura sofreu uma alteração de cor de amarelo claro para vermelho escuro e observou-se a formação de precipitado. Retirou-se o balão do sistema de refluxo e evaporou-se a resíduo seco.

3.2.3- Síntese dos compostos híbridos TRIAZHYB1,2,3,4 e 5 com a utilização de cloretos de ácido trans-cinâmico.

Os compostos Híbridos foram sintetizados de acordo com a técnica:

A 0.31 mmol de MMT-X (TRIAZHYB1 e 5: -CN, TRIAZHYB2: -COCH₂, TRIAZHYB3: COOCH₂CH₃, TRIAZHYB4:Cl) em 6 mL de DCM (CH_2Cl_2) num balão de 50 mL, com agitação

a temperatura ambiente (25°C), até dissolução completa, foi adicionado NaH (0.155 mmol). Em seguida foi adicionada ao meio reacional 0.35 mmol (27 µL) piridina (C₅H₅N). Após 30 min foi adicionado 0.35 mmol do correspondente ácido cinâmico (TRIAZHBY 1,2,3,4: cloreto de tCA; TRIAZHBY5: cloreto de Me-tCA). A solução foi mantida em agitação e à temperatura ambiente (25°C) durante 1 dia.

A mistura reacional foi evaporada a resíduo seco e separada por cromatografia em coluna utilizando como eluente DCM.

Os produtos obtidos foram posteriormente analisados por Espectroscopia de Ressonância Magnética (NMR).

3.2.4- Caracterização estrutural dos compostos

Os espectros de ¹H-NMR e ¹³C-NMR foram obtidos no equipamento referido anteriormente na secção 3.1.1, através da dissolução de uma porção (~11mg) de composto em clorofórmio deuterado (CDCl₃) (800 µL), num tubo de vidro. A análise dos espectros encontra-se na secção 4.1.2 e anexos.

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos no equipamento referido na secção 3.1.1, pela preparação de uma pastilha de 100 mg de KBr e 1 mg do respectivo composto para análise (TRIAZHBY1, 2, 3, 4, e 5). Análise dos espectros encontra-se na secção 4.1.2 e anexos.

Os espectros de UV foram obtidos no equipamento referido em 3.1.1 de acordo com o esquema da Fig.18. A 3mL de ACN numa tina de quartzo adicionou-se 40µL de uma solução mãe (10⁻²M) do TRIAZHBY 1-5 e foi lida a sua absorção nos comprimentos de onda da região do UV (400-200 nm) e obtidos os máximos de absorção para cada composto. A análise dos espectros obtidos encontra-se na secção 4.1.2

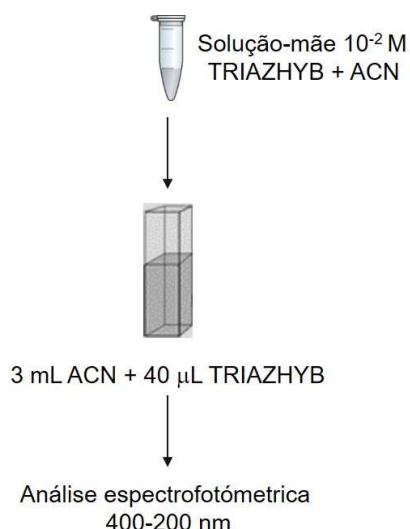


Fig. 18- Esquema do procedimento para a análise dos compostos TRIAZHYB por UV.

3.2.5- Avaliação da actividade anti-tumoral dos compostos por *Screening* em linhas celulares cancerígenas de adenocarcinoma do cólon

A avaliação da atividade anti-tumoral dos compostos por *Screening* em linhas celulares cancerígenas foi efectuada na, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, FFUL, de acordo com o procedimento a seguir descrito. Células humanas de adenocarcinoma do cólon, HT29, foram dispostas em 96 poços em meio indiferenciado em condições de baixa afinidade e tratadas com o agente de deteção de CSC, salinomicina ($1 \mu\text{M}$) como controlo positivo, para testar os compostos ($1 \mu\text{M}$) e com soluções controlo (DMSO). Após 7 dias de incubação, a viabilidade celular foi observada com base na medição de ATP, pelo método CellTiter-Glo™ *Luminescent Cell Viability Assay* (Promega). Para a seleção do limite de células viáveis e não viáveis (Hit) foi aplicado um *cut-off* para valores superiores a 70% de depleção de ATP, isto é viabilidade celular inferior a 30%.

3.2.6- Avaliação da Electrofilicidade e estabilidade em PBS

Os estudos de carácter electrofílico dos compostos foram obtidos com o equipamento referido na secção 3.1.1 e de acordo com a figura 19. A partir de uma solução mãe de cisteamina $9,8 \times 10^{-2} \text{M}$ prepararam-se soluções de concentração 8×10^{-3} e $8 \times 10^{-4} \text{M}$ numa tina de quartzo num volume final de 3 mL em metanol (MeOH). A esta solução foram adicionados 30 μL de amostra do composto TRIAZHYB1 a partir de uma solução mãe em ACN de concentração 10^{-2}M . As soluções foram analisadas a diferentes tempos: para a solução de concentração $8 \times 10^{-4} \text{M}$ – t:3,15 e 45 min e para a concentração de $8 \times 10^{-3} \text{M}$ – t:0,10,20,30,40,50,60 min, registando as alterações no seu espectro de absorção no UV entre 200-400nm.

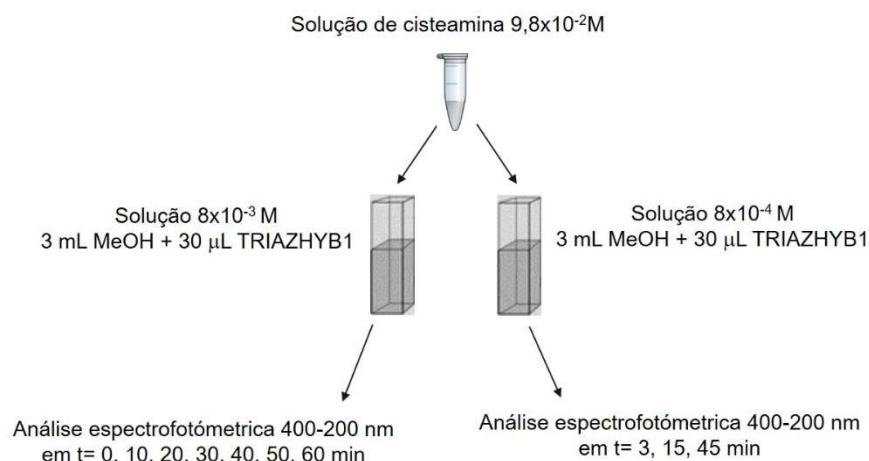


Fig. 19- Esquema do procedimento para a análise do carácter electrofílico

Os estudos de estabilidade do composto TRIAZHYB1 em PBS foi obtido com o mesmo equipamento utilizado nos estudos de carácter electrofílico. Numa tina de quartzo foi colocada uma solução de MeOH e PBS na proporção 20/80% perfazendo um volume de 3 mL. A esta solução adicionou-se 30 μL de TRIAZHYB1 a partir de uma solução de concentração 10^{-2} M . A solução foi analisada a $t:0$ e 10 min.

4- Resultados

4.1- Propriedades moleculares

As características estruturais dos compostos pela regra de Lipinski foram obtidas pelo software molinspiration. (79) (Tabela 2)

Tabela 2- Caracterização estrutural dos compostos

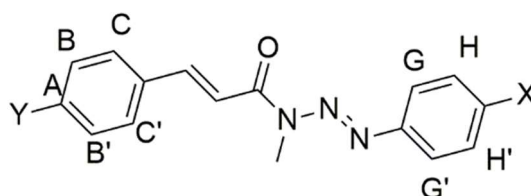
Composto	Peso molecular	LogP	HBA	HBD	TPSA (\AA^2)
TRIAZHYB1	290.33	4.13	5	0	68.82
TRIAZHYB2	307.35	4.27	5	0	62.11
TRIAZHYB3	337.38	4.92	6	0	71.34
TRIAZHYB4	299.76	5.05	4	0	45.04
TRIAZHYB5	304.35	4.58	5	0	68.83

O ponto de fusão e o rendimento foram obtidos experimentalmente. (Tabela 3)

Tabela 3- Ponto de fusão e rendimentos obtidos para os compostos TRIAZHYB 1,2, 3,4 e 5.

Composto	Ponto de fusão (° C)	Rendimento (%)
TRIAZHYB1	168	70
TRIAZHYB2	218-220	73
TRIAZHYB3	138-141	13
TRIAZHYB4	140-141	57
TRIAZHYB5	40-45	38

4.2 – Caracterização estrutural



TRIAZHYB1	Y= H	X= CN
TRIAZHYB2	Y= H	X= COMe
TRIAZHYB3	Y= H	X= COOEt
TRIAZHYB4	Y= H	X= Cl
TRIAZHYB5	Y= Me	X= CN

Fig. 20- Estrutura dos compostos TRIAZHYB com destaque para os prótons ¹H.

TRIAZHYB1

¹H-NMR: δ 3.49 (3H,s, N-CH₃), 7.34-7.36 (3H,A BB', m, Ar), 7.5- 7.55, (2H, CC' m, Ar), 7.52-7.57 (1H, d, J=15Hz, CH=CH), 7.62-7.65 (2H, GG', m, Ar-X), 7.78-7.71 (2H, HH', m, Ar-X), 7.83-7.88 (1H, d, J=15Hz, CH=CH).

¹³C-NMR: δ 28.84 (N-CH₃), 111.92 (ArC-X), 115.92 (X-CN), 118.32 (CH=CH), 122.91 (ArC-X), 128.86 (ArC-Y), 130.61 (ArC-Y), 133.27 (ArC-X), 134.58 (ArC-Y), 145.59 (CH=CH), 151.96 (N-ArC-X), 167.63 (C=O).

IV- Espectro de Infravermelho (IV)

Tabela 4- Resultados de IV do composto TRIAZHYB1

Número de onda (cm ⁻¹)			
-C-N	-CN	Ar-(trans)C=C-C=O	Ar-(trans)C=C-C=O
1460.11	2223.92	1624.06	1681.93

UV

Máximo 1: λ = 320 nm Abs: 1,601

Máximo 2: λ = 260 nm Abs: 1,605

TRIAZHYB2

¹H-NMR: δ 2.57 (3H,s, X-CH₃), 3.5 (3H, s,N-CH₃), 7.34-7.37 (3H, A BB', m, Ar), 7.53-7.65 (2H, CC', m, Ar), 7.58-7.62 (1H,d, J=15Hz, CH=CH), 7.62-7.65 (2H, GG', m, Ar-X), 7.83-7.88 (1H, d, J= 15Hz, CH=CH), 7.99-8.02 (2H, HH', d, J= 15Hz, Ar-X).

¹³C-NMR: δ 26.58 (CH₃-C=O), 28.20 (N-CH₃), 116.32 (CH=CH), 122.28 (ArC-X), 127.98 (ArC-X), 128.67 (ArC-Y), 129.39 (ArC-Y), 134.98 (ArC-Y), 136.95 (ArC-X), 145.03 (CH=CH), 152.00 (N-ArC-X), 167.82 (C=O), 197.00 (X-C=O).

IV- Espectro de Infravermelho (IV)

Tabela 5- Resultados de IV do composto TRIAZHYB2

Número de onda (cm ⁻¹)			
-C-N	Ar-(trans)C=C-C=O	Ar-(trans)C=C-C=O	-C=O
1456.26	1618.28	1672.28	1681.93

UV

Máximo 1: λ = 314 nm Abs: 0,508

Máximo 2: λ = 278 nm Abs: 0,538

TRIAZHYB3

$^1\text{H-NMR}$: δ 1.35 (3H, t, $J=9$ Hz, X- CH_3), 3.51 (3H, s, N- CH_3), 4.31-4.38 (2H, q, $J=6$ Hz, X- CH_2), 7.34-7.38 (3H, A BB', m, Ar), 7.54-7.56 (2H, CC', m, Ar), 7.59-7.60 (1H, d, $J=15$ Hz, CH=CH), 7.63-7.64 (2H, GG', m, Ar), 7.83-7.89 (1H, d, $J=18$ Hz, CH=CH), 8.08-8.11 (2H, HH', d, $J=9$ Hz, Ar-X).

IV- Espectro de Infravermelho (IV)

Tabela 6- Resultados de IV do composto TRIAZHYB3

Número de onda (cm^{-1})			
-C-N	Ar-(trans)C=C-C=O	Ar-(trans)C=C-C=O	-C=O-O
1456.18	1618.28	1676.14	1712.79

UV

Máximo 1: $\lambda = 311$ nm Abs: 0,725

Máximo 2: $\lambda = 278$ nm Abs: 0,734

TRIAZHYB4

$^1\text{H-NMR}$: δ 3.47 (3H, s, N- CH_3), 7.34-7.39 (5H, A BB' CC', m, Ar), 7.50-7.55 (2H, HH', m), 7.56-7.62 (1H, d, $J=18$ Hz, CH=CH), 7.81-7.87 (1H, d, $J=18$ Hz, CH=CH), 7.90-7.96 (2H, GG', m, Ar).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 28.04 (N- CH_3), 116.32 (CH=CH), 123.25 (ArC-X), 129.01 (ArC-Y), 134.69 (ArC-X), 134.97 (ArC-Y), 147.61 (CH=CH), 167.71 (C=O).

IV- Espectro de Infravermelho (IV)

Tabela 7- Resultados de IV do composto TRIAZHYB4

Número de onda (cm^{-1})		
-C-N	Ar-(trans)C=C-C=O	Ar-(trans)C=C-C=O
1456.18	1618.28	1676.07

UV

Máximo 1: $\lambda = 307$ nm Abs: 1,486

Máximo 2: $\lambda = 276$ nm Abs: 1,488

Máximo 3: $\lambda = 224$ nm Abs: 1,031

TRIAZHBY5

$^1\text{H-NMR}$: δ 2.39 (3H,s, Y-CH₃), 3.81 (3H, s, N-CH₃), 6.38-6.44 (1H, d, J=18 Hz, CH=CH), 7.19-7.22 (2H, CC', d, J=9Hz, Ar) 7.66-7.71 (1H, d, J=15 Hz, CH=CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ 21.45 (N-CH₃), 51.62 (-CH₃ (Y)), 111.82 (ArC-X), 116.71 (-CN, CH=CH), 128.07 (ArC-X), 129.62 (ArC-Y), 130.88 (ArC-Y), 131.67 (ArC-X), 133.67 (ArC-Y), 140.72 (CH=CH), 144.89 (ArC-Y), 167.64 (C=O)

4.3- Avaliação da atividade anti-tumoral dos compostos TRIAZHYB1,2,3,4 e 5

Tabela 8- Resultados do *Screening* em células cancerígenas HT29

Composto	Viabilidade celular (%)	Hit
TRIAZHBY1	104.81	Não
TRIAZHBY2	111.71	Não
TRIAZHBY3	96.27	Não
TRIAZHBY4	111.61	Não
TRIAZHBY5	117.74	Não

4.4- Estudos de carácter electrofílico e Estabilidade em PBS

4.4.1- Estudos de carácter electrofílico

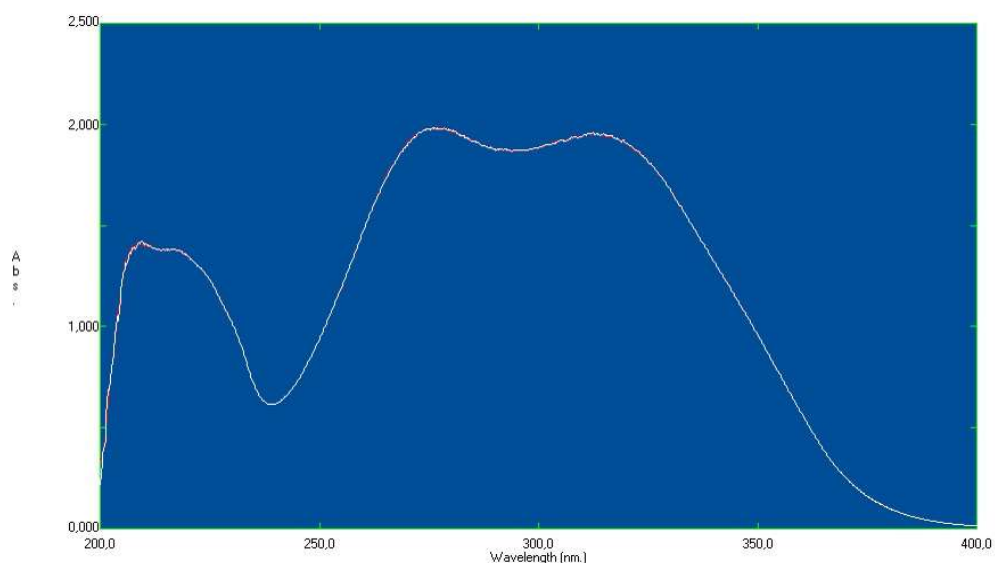


Fig. 21- *Overlay* dos espectros de absorção no UV do composto TRIAZHYB1 incubado com cisteamina na concentração $8 \times 10^{-4} \text{M}$ nos tempos: 0, 3, 15 e 45 min.

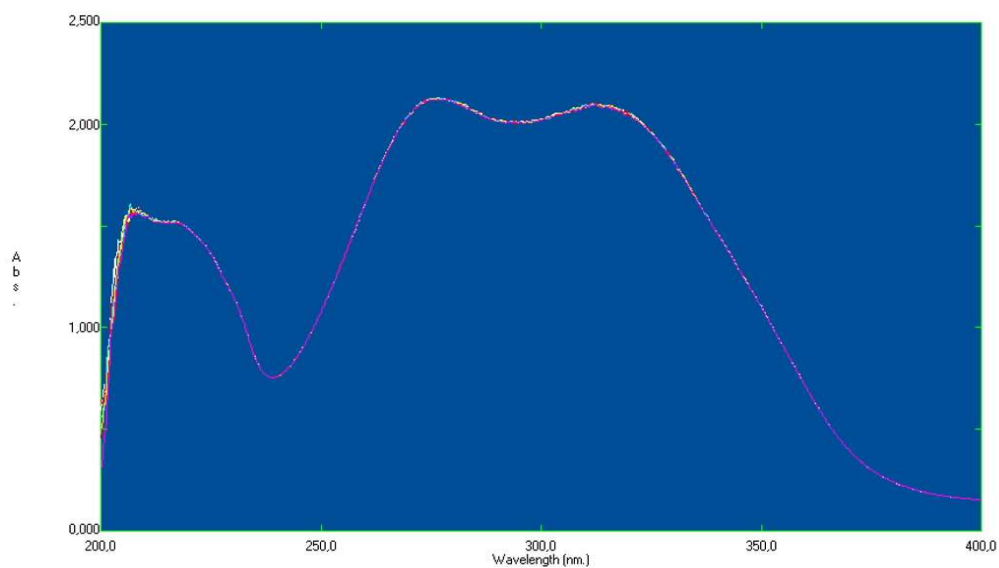


Fig. 22- *Overlay* dos espectros de absorção no UV do composto TRIAZHYB1 incubado com cisteamina na concentração $8 \times 10^{-3} \text{M}$ nos tempos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min.

4.4.2- Estabilidade em PBS

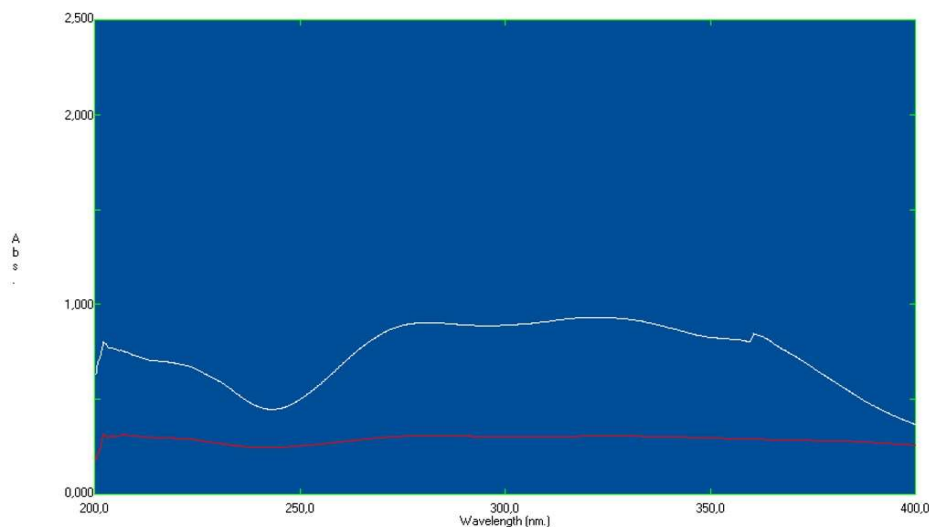


Fig. 23- Espectro de absorção no UV obtido para o composto TRIAZHYB1 em PBS na concentração de $8 \times 10^{-3} \text{M}$ nos tempos: 0 (branco) e 10 (vermelho) min.

5- Discussão

Os compostos sintetizados, TRIAZHYB 1,2,3,4 e 5 foram previamente analisados quanto às suas propriedades moleculares. Através do software molinspiration obtiveram-se 5 características: peso molecular, LogP, HBA, HBD e TPSA. Quatro destas características: peso molecular, LogP, HBA e HBD são as referidas por Lipinski como regras essenciais para que os compostos sejam considerados com boa capacidade de atravessar facilmente as membranas celulares por difusão passiva. Lipinski estabeleceu limites para os valores para cada uma das características (Tabela 4). Entre os compostos sintetizados, todos apresentam valores conforme os tabelados. (79,80)

Tabela 9- Resumo das características e valores de acordo com a regra de Lipinski.

Características	Limite de valores
Peso molecular	<500 Da
LogP	≤ 5
HBA	≤ 10
HBD	≤ 5

Ao longo da última década têm sido analisados outros factores adicionais aos apresentados pela regra de Lipinski. A TPSA é um valor calculado com base nos grupos polares existentes no composto. Este valor permite uma melhor avaliação estrutural dos compostos em relação à sua capacidade de atravessar a BHE. (81) O intervalo de valores de

TPSA entre 40-90 Å² é considerado ótimo para fármacos que atuam no CNS.(82) Todos os compostos analisados apresentam valores dentro deste intervalo.

A reação para a formação dos compostos obtidos ocorreu de acordo com o mecanismo de ação esquematizado na Fig. 24.

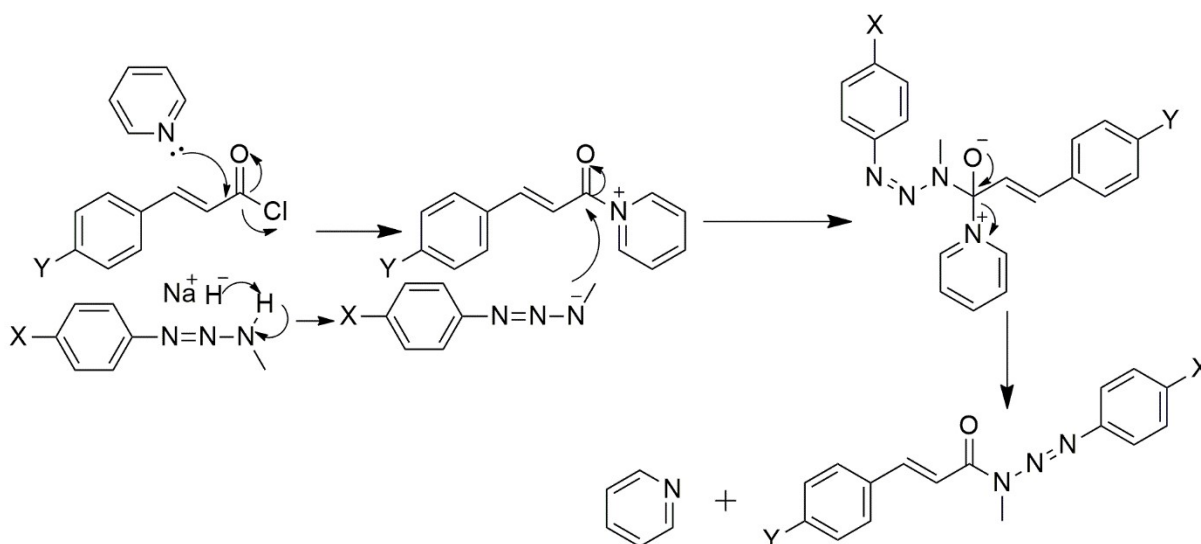


Fig. 24- Esquema da reação de síntese dos compostos Híbridos TRIAZHYB 1,2,3,4 e 5.

Os pontos de fusão obtidos para cada composto apresentam intervalos estreitos, tendo sido o maior intervalo observado para o TRIAZHYB 5 com uma diferença de 5 °C. A diferença de valores pode estar relacionada com o grau de pureza ou com a humidade ainda existente no composto após secagem.

Os resultados de NMR confirmaram a formação dos compostos referidos, tal como pode ser observado nos anexos 1-5 e nas tabelas 10 e 11, onde se discrimina de forma resumida os resultados obtidos. O sinal N-CH₃ apresenta valores e multiplicidade concordantes com o esperado: singuleto (s) e desvio na ordem dos 3 ppm. (83,84)

Os sinais dos H vicinais com geometria trans na dupla ligação que se encontram no ácido trans-cinâmico deverão apresentar constantes de acoplamento entre 11-18 Hz. Os compostos analisados apresentam para CH^a=CH^b J=15-18 Hz, o que está de acordo com o intervalo descrito na literatura. (83–85)

Tabela 10- Resumo dos resultados obtidos de $^1\text{H-NMR}$

Compostos	$^1\text{H-NMR}$ (δ)			
	N-CH ₃ (s, 3H)	trans CH ^a =CH ^b	X	Y
TRIAZHBY1	3.49	a- 7.52-7.57, d, J=15Hz b- 7.83-7.88, d, J=15Hz	----	----
TRIAZHBY2	3.50	a- 7.58-7.63, d, J=15Hz b- 7.83-7.88, d, J=15Hz	2.57,s,CH ₃	----
TRIAZHBY3	3.51	a- 7.59-7.64, d, J=15Hz b- 7.83-7.89, d, J=18Hz	1.35,t,CH ₃ 4.34, q, CH ₂	----
TRIAZHBY4	3.47	a- 7.6-7.63, m, J=18Hz b- 7.81-7.87, d, J=18Hz	----	----
TRIAZHBY5	3.81	a- 6.38-6.44 d, J=18 Hz b- 7.66-7.71, d, J=15 Hz	----	2.39, s, CH ₃

Tabela 11- Resumo dos resultados obtidos de $^{13}\text{C-NMR}$

Composto	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ)			
	N-CH ₃	C=O	X	Y
TRIAZHBY1	28.84	167.63	CN: 115.92	----
TRIAZHBY2	28.20	167.82	C=O: 197.00 CH ₃ : 26.58	----
TRIAZHBY4	28.04	167.71	----	----
TRIAZHBY5	21.45	167.64	CN: 116.71	CH ₃ : 51.62

Os espectros de IV para os compostos TRIAZHYB demonstraram a presença dos grupos esperados para identificação dos compostos sintetizados. Todos os compostos apresentam sinais da ordem de 1456-1460 cm^{-1} que está de acordo com o esperado para a ligação C-N e sinais entre 1672 e 1681 cm^{-1} correspondendo à dupla ligação C=C do grupo Ar-(*trans*)C=C-C=O. (84) Os substituintes do MMT de cada TRIAZHYB também se encontram com sinais concordantes com o descrito na literatura: TRIAZHYB1 (-CN:2223,92); TRIAZHYB2 (-C=O:1691.93); TRIAZHYB3 (-C=O-O:1712.7). (84,86)

O perfil do espectro de UV e os máximos obtidos são característicos de cada composto. Os TRIAZHYB apresentam estruturas semelhantes. Os compostos TRIAZHYB apresentam entre todos perfis semelhantes. (87,88)

Os estudos cinéticos de carácter electrofílico realizados pretendiam demonstrar se o composto TRIAZHYB1, por ser um aceitador de Michael, e na presença de um nucleófilo como a cisteamina seria capaz de formar uma ligação covalente e possivelmente inibir qualquer acção enzimática nas células. A cisteamina pela sua estrutura e por possuir o grupo SH, mimetiza alguns resíduos de aminoácidos com papel importante na actividade enzimática das proteínas. Como tal, é uma boa molécula para estudos que pretendem demonstrar a capacidade de alguns compostos formarem ligações com enzimas. A formação desta ligação observar-se-ia pela alteração da absorvência entre dois comprimentos de onda (ABS) ao longo do tempo, mas com a presença de ponto isosbético, comprovando a ocorrência de uma reacção entre o fármaco híbrido e o nucleófilo de cisteamina. No entanto, no ensaio efetuado, o perfil do espectro manteve-se igual ao longo do tempo, tanto na solução menos concentrada como na mais concentrada. Nos ensaios HTS são referidos alguns casos de interferências e falsos positivos/negativos que poderão influenciar a avaliação dos compostos como potenciais agentes terapêuticos. Uma dessas interferências são os PAIN (Pan-assay interference compounds), ou seja, compostos que demonstrem bioactividade independentemente do alvo biológico. Os compostos que demonstrem esta característica são geralmente considerados desadequados como compostos com propriedades medicinais. Os compostos aceitadores de Michael, como é o caso dos TRIAZHYB, deverão ser estudados na sua electrofilicidade, devido à sua capacidade em formar ligações covalentes com espécies que possuam grupos tiol (SH). Deste modo, caso os ensaios de electrofilicidade demonstrem a formação de ligação covalente, esta poderá corresponder a um risco biológico de bioatividade em vários mecanismos celulares, não só como anti-tumorais, mas também por possivelmente debilitar a ADMET do fármaco em especial a toxicidade. (89)

Nos resultados obtidos nas linhas celulares de adenocarcinoma do cólon HT29 os TRIAZHYB avaliados não demonstraram ser potenciais agentes anti-CSC. Contudo, estes resultados não excluem a hipótese de acção anti-tumoral dos compostos. As células estaminais

CSC, utilizadas neste método, são uma subpopulação de células cancerígenas implicadas na formação de tumor e de metástases resistentes a quimioterapia, logo uma linha celular muito específica, o que de acordo com os estudos de HTS, este estudo de citotoxicidade de compostos com base em marcadores de proliferação não permite excluir o efeito dos compostos TRIAZHYB como anti-tumorais para outras linhas celulares. (90–92)

O estudo da estabilidade do composto TRIAZHYB1 em meio fisiológico, PBS pH=7.4, não foi conclusivo, pois ocorreu precipitação do mesmo no solvente, com 20% de MeOH o que não permitiu efetuar o ensaio até ao final (60 min). Este ensaio revela contudo potenciais problemas de solubilidade por parte destes compostos.

6- Conclusão

A síntese dos cinco compostos propostos para este trabalho, TRIAZHYB 1,2,3,4 e 5, foi alcançada com sucesso conseguindo-se uma separação eficaz dos mesmos da mistura reacional obtendo-se os produtos puros, tal como pode ser observado pelos espectros de NMR e IV.

Os rendimentos variaram entre 38 e 73%.

O método de síntese utilizado provou ser um método simples, rápido e eficaz. Não se observou adição 1,4, o produto começou a ser formado rapidamente e a separação da mistura reacional permitiu a obtenção dos compostos puros.

As propriedades calculadas pelo software *molinspiration* para cada um dos compostos estão de acordo com a regra de 5 Lipinski, bem como valores adequados de TPSA o que os torna bons candidatos a fármacos.

O *Screening* dos compostos em células de adenocarcinoma do cólon não demonstrou capacidade dos compostos em inviabilizarem a proliferação das mesmas. Contudo, será necessário um estudo mais aprofundado noutras linhas celulares, como por exemplo em células da glia, de forma a esclarecer a capacidade anti-tumoral dos TRIAZHYB.

O estudo de carácter electrofílico realizado apenas demonstrou que possivelmente os compostos não apresentam toxicidade relacionada com a possível ligação a enzimas endógenas.

Em projetos futuros será necessário continuar o estudo destes compostos a fim de demonstrar a sua capacidade anti-tumoral com ensaios mais extensos e mais específicos para as patologias para as quais foram desenhados.

Bibliografia

1. Cancer: Key statistics. WHO- World Health Organization. 2019 [citado 23 de Maio de 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/resources/keyfacts/en/>
2. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* . 2015;152:63–82. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>
3. Kitchener S. Epidemiology of melanoma. *Color Atlas Melanocytic Lesions Ski*. 2007;29(4):185–95. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2010.10.005>
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>
5. Hui Z, Verhaak RG, Canoll P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012;12(4):383–94. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1586/erm.12.30>
6. Urbanska K, Sokolowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - An overview. *Wspolczesna Onkol*. 2014;18(5):307–12. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
7. Farina H, Kanza M, Kahkashan P, Saima MM, Shabana US. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2017;18(1):3–9. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
8. Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life*. 2009;2(4):386–93. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3019011>
9. Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci*. 2017;11(February):1–17. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
10. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2003;6(11):1127–34. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn1144>
11. Lim DA, Cha S, Mayo MC, Chen M-H, Keles E, VandenBerg S, et al. Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro Oncol*. 2007;9(4):424–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-023>
12. Llaguno SRA, Parada LF. Cell of origin of glioma: Biological and clinical implications. *Br J Cancer*. 2016;115(12):1445–50. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.354>
13. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 2004;23(58):9392–400. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208311>
14. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human GBM. *Science* (80-). 2008;(September):1807–12. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1164382>
15. Tsao H, Olazagasti JM, Cordero KM, Brewer JD, Taylor SC, Bordeaux JS, et al. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the ABCDEs of Melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(4):717–23. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.01.025>

16. Sousa A, Santos F, Gaspar MM, Calado S, Pereira JD, Mendes E, et al. The selective cytotoxicity of new triazene compounds to human melanoma cells. *Bioorganic Med Chem.* 2017;25(15):3900–10.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.04.049>
17. Merlino G, Herlyn M, Fisher DE, Bastian BC, Keith T, Davies MA, et al. The State of Melanoma : Challenges and Opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017;29(4):404–16. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/pcmr.12475>
18. Craddock N, Jones I. Mechanisms of disease- Melanoma. *N Engl J Med.* 2006;355:51–65. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1112830>
19. Chatzinikolaou G, Karakasilioti I, Garinis GA. DNA damage and innate immunity: links and trade-offs. *Trends Immunol.* 2014;35(9):429–35.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.06.003>
20. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(9):809–19. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1514204>
21. Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E. ERK MAP kinase in G1 cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci.* 2006;97(8):697–702.
Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00244.x>
22. Anjum K, Shagufta BI, Abbas SQ, Patel S, Khan I, Shah SAA, et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother.* 2017;92:681–9.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.125>
23. Arrieta O, Guevara P, Reyes S, Ortiz A, Rembao D, Sotelo J. Protamine inhibits angiogenesis and growth of C6 rat glioma; a synergistic effect when combined with carmustine. *Eur J Cancer.* 1998;34(13):2101–6.
Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(98\)00244-5](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(98)00244-5)
24. Silverman RB, Holladay MW. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.* 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2015. 275–320 p.
25. Erickson LC, Laurent G, Sharkey NA, Kohn KW. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. Vol. 288, *Nature.* 1980. p. 727–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/288727a0>
26. Johannessen TCA, Bjerkvig R, Tysnes BB. DNA repair and cancer stem-like cells - Potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev.* 2008;34(6):558–67. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.03.125>
27. Wilman D V. Prodrugs in cancer chemotherapy. *Biochem Soc Trans.* 1986;14(2):375–82. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1042/bst0140375>
28. Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J. Cytochrome P450-Activated Prodrugs : Targeted Drug Delivery. *Curr Med Chem.* 2008;15(23):2346–65. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986708785909120>
29. Zawilska JB, Wojcieszak J, Olejniczak AB. Prodrugs: A challenge for the drug development. *Pharmacol Reports.* 2013;65(1):1–14.
Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)70959-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(13)70959-9)
30. Taylor G, Horton J. Treatment of grade III and IV Astrocytoma with dimethyl triazeno imidazole carboxamide (DTIC, NSC-45388) alone and in combination with CCNU (NSC-79037) or methyl CCNU (MeCCNU, NSC-95441). *Cancer.* 1975;36(4):1269–76.
Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197510\)36:4%3C1269::AID-CNCR2820360412%3E3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197510)36:4%3C1269::AID-CNCR2820360412%3E3.0.CO;2-%23)
31. Agarwala SS. Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous

- System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma. *Oncologist*. 2000;5(2):144–51. Disponível em: <https://doi.org/doi/10.1634/theoncologist.5-2-144>
32. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis*. 2016;3(3):198–210. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
33. Zhang J, F.G. Stevens M, D. Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(1):102–14. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/1874467211205010102>
34. Moody CL, Wheelhouse RT. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. *Pharmaceuticals*. 2014;7(7):797–838. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ph7070797>
35. Tsang LLH, Quarterman CP, Gescher A, Slack JA. Comparison of the cytotoxicity in vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1991;27(5):342–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00688855>
36. Kulke MH, Hornick JL, Frauenhoffer C, Hooshmand S, Ryan DP, Enzinger PC, et al. O⁶-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in Patients with Neuroendocrine Tumors. *Clin Cancer Res*. 2009;15(1):338–45. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1476>
37. Baker SD, Sartorius SE, Grochow LB, Donehower RC, Rowinsky EK, Wirth M, et al. Absorption, metabolism, and excretion of ¹⁴C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5(2):309–17. Disponível em: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/2/309>
38. Chen X, Zhang M, Gan H, Wang H, Lee JH, Fang D, et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Nat Commun*. 2018;9(1). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05373-4>
39. Munoz JL, Walker ND, Scotto KW, Rameshwar P. Temozolomide competes for P-glycoprotein and contributes to chemoresistance in glioblastoma cells. *Cancer Lett*. 2015;367(1):69–75. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.013>
40. Trog D, Moenkemann H, Haertel N, Schüller H, Golubnitschaja O. Expression of ABC-1 transporter is elevated in human glioma cells under irradiation and temozolomide treatment. *Amino Acids*. 2005;28(2):213–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-005-0171-3>
41. Eckschlager T, Pich J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1–25. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071414>
42. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(9):673–91. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4360>
43. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):38–51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1779>
44. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007;26(37):5541–52. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210620>
45. Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: Lessons from leukaemia. *Br J Cancer*. 2016;114(6):605–11. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.36>
46. Suraweera A, O’Byrne KJ, Richard DJ. Combination Therapy With Histone Deacetylase

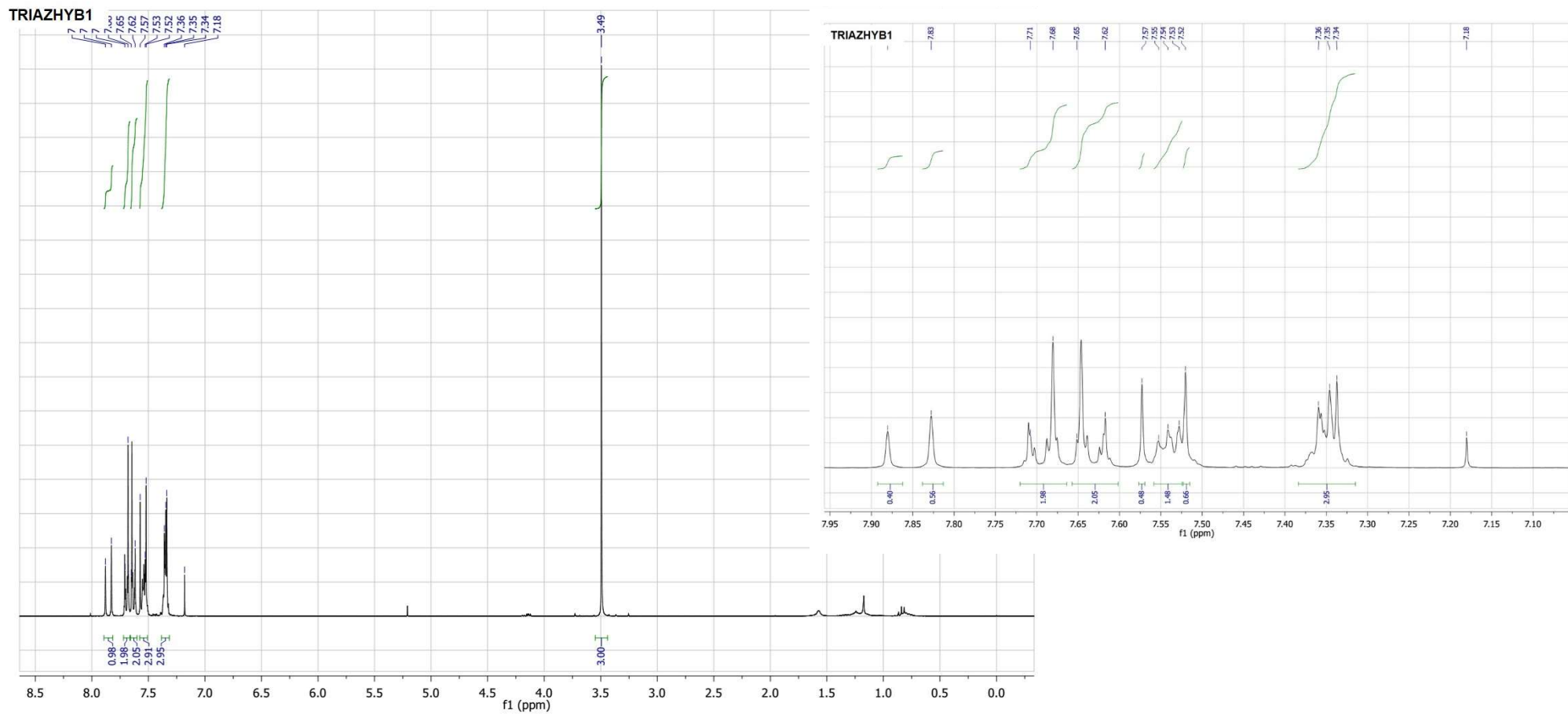
- Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Front Oncol.* 2018;8(March):1–15.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2018.00092>
47. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):769–84. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2133>
48. Ryu CH, Yoon WS, Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, et al. Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/987495>
49. Pinheiro R, Braga C, Santos G, Bronze MR, Perry MJ, Moreira R, et al. Targeting Gliomas: Can a New Alkylating Hybrid Compound Make a Difference? *ACS Chem Neurosci.* 2017;8(1):50–9.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acchemneuro.6b00169>
50. Fortin S, Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2013;8(8):1029–47.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2013.798296>
51. Braga C, Vaz AR, Oliveira MC, Matilde Marques M, Moreira R, Brites D, et al. Targeting gliomas with triazene-based hybrids: Structure-activity relationship, mechanistic study and stability. *Eur J Med Chem.* 2019;172:16–25.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.048>
52. Kimball DB, Haley MM. Triazenes: A versatile tool in organic synthesis. *Angew Chemie - Int Ed.* 2002;41(18):3338–51. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020916\)41:18%3C3338::AID-ANIE3338%3E3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020916)41:18%3C3338::AID-ANIE3338%3E3.0.CO;2-7)
53. Zhu B, Shang B, Li Y, Zhen Y. Inhibition of histone deacetylases by trans-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice. *Mol Med Rep.* 2016;13(5):4159–66. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5041>
54. De P, Baltas M, Bedos-Belval F. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review. *Curr Med Chem.* 2011;18(11):1672–703.
Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986711795471347>
55. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res.* 2011;3(2):166–79. Disponível em: www.ajtr.org/issn:1943-8141/AJTR1012002
56. Peperidou A, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Voulgari E, Avgoustakis K. Multifunctional cinnamic acid derivatives. *Molecules.* 2017;22(8):1–17. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22081247>
57. Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Litinas K, Geromichalos G. Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: Design, synthesis and modeling studies. *Molecules.* 2014;19(7):9655–74. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules19079655>
58. Uesawa Y, Sakagami H, Okudaira N, Toda K, Takao K, Kagaya H, et al. Quantitative Structure–Cytotoxicity Relationship of Cinnamic Acid Phenethyl Esters. *Anticancer Res.* 2018;38(2):817–23. Disponível em: <https://doi.org/10.21873/anticancer.12289>
59. Bora Tatar G, Tokluman TD, Yelekçi K, Yurter H. Power of inhibition activity screening and 3D molecular modeling approaches in HDAC 8 inhibitor design. *Turkish J Chem.* 2011;35(6):861–70. Disponível em: <https://doi.org/10.3906/kim-1107-34>
60. Braga C. Development of alkylating hybrid molecules of triazenes for the treatment of glioma. Tese de Mestrado. Universidade de Lisboa; 2015.
61. Daniels TA, Sidi S, Vaughan K. Open-chain nitrogen compounds. Part III. The formation of triazenes in the reaction of diazonium salts with α -aminoacetonitrile and related α -

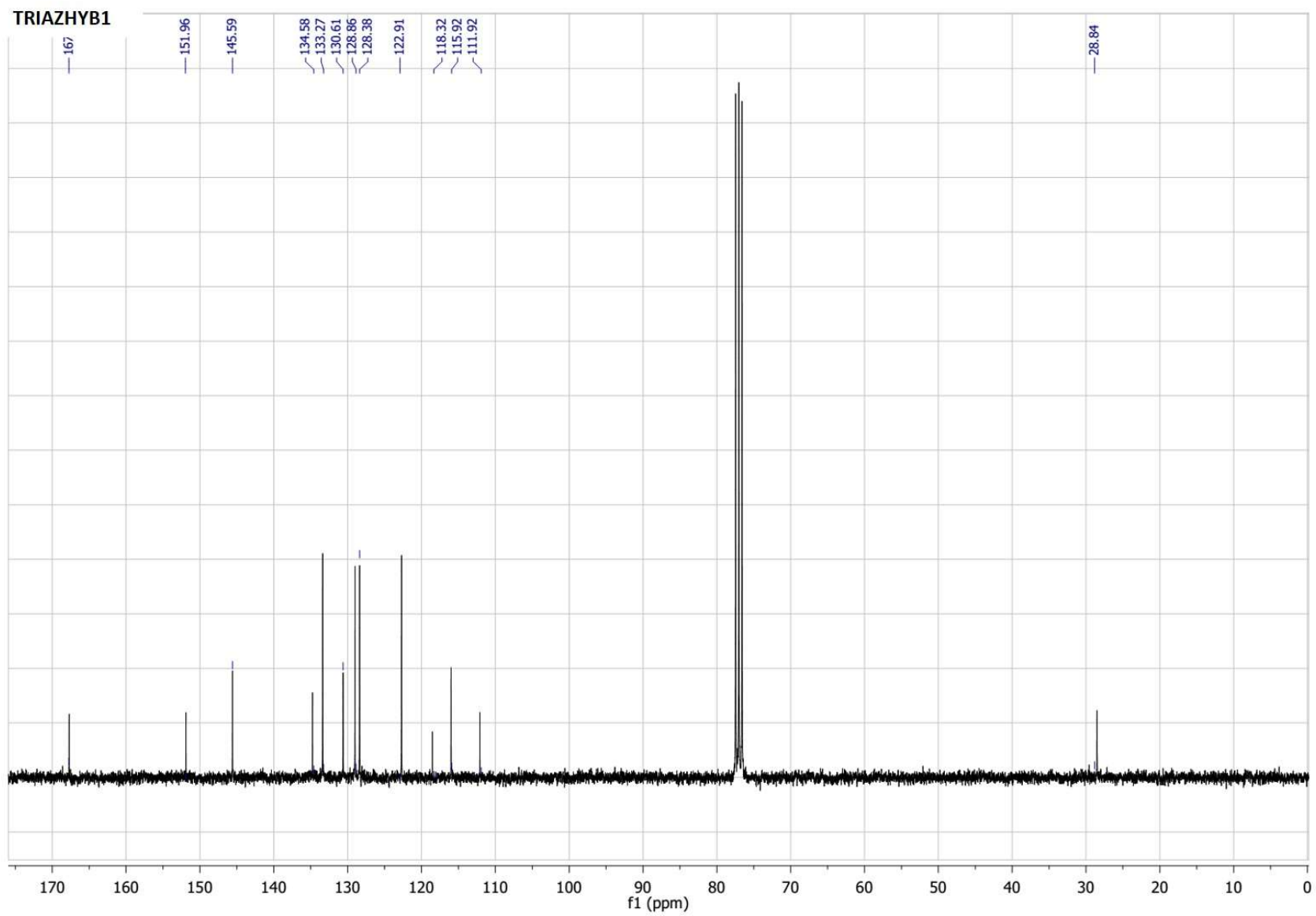
- substituted alky lamines. *Can J Chem.* 1977;55(21):3751–4. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/v77-528>
62. Patrick T, Fong H, Vaughan K. Open-chain nitrogen compounds. Part II.' Preparation, characterization, and degradation of 1(3)-Aryl-3(1)-methyltriazenes; the effect of substituents on the reaction of diazonium salts with methylamine. *Can J Chem.* 1977;55(10):1701–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/v77-240>
63. Pottie IR, Vaughan K, Zaworotko MJ. A molecular recognition event in the reaction of a diazonium salt with N,N-dimethylethylenediamine. *J Chem Crystallogr.* 2001;31(3):143–8. Disponível em: <https://doi.org/10.0.3.255/A:1014363720456>
64. Marder O, Albericio F. Industrial application of coupling reagent in peptides. *Chim Oggi.* 2003;21(6):35 – 40. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/chin.200424286>
65. Prabhu G, Basavaprabhu, Narendra N, Vishwanatha TM, Sureshbabu V V. Amino acid chlorides: A journey from instability and racemization toward broader utility in organic synthesis including peptides and their mimetics. *Tetrahedron.* 2015;71(19):2785–832. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2015.03.026>
66. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* 2005;61(46):10827–52. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>
67. Williams MW, Young GT. Amino-acids and Peptides Part XVI Further Studies of Racemisation during Peptide Synthesis. *J Chem Soc.* 1963;881–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/JR9630000881>
68. Reaction of cinnamic acid with thionyl chloride to cinnamoyl chloride. 2006. Disponível em: <https://www.oc-praktikum.de/nop/pt-experiments>
69. H. Johansson M. Reversible Michael Additions: Covalent Inhibitors and Prodrugs. *Mini-Reviews Med Chem.* 2012;12(13):1330–44. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/13895575112091330>
70. Rodriguez-Sanchez N, Schultz TW, Cronin MTD, Enoch SJ. Experimental verification of structural alerts for the protein binding of cyclic compounds acting as Michael acceptors. *SAR QSAR Environ Res.* 2013;24(11):963–77. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1062936X.2014.898693>
71. Schwöbel JAH, Koleva YK, Enoch SJ, Bajot F, Hewitt M, Madden JC, et al. Measurement and estimation of electrophilic reactivity for predictive toxicology. *Chem Rev.* 2011;111(4):2562–96. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr100098n>
72. Enoch SJ, Cronin MTD. A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent DNA binding. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(8):728–48. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.598141>
73. Dawson DA, Allen JL, Schultz TW, Pösch G. Time-dependence in mixture toxicity with soft-electrophiles: 2. Effects of relative reactivity level on time-dependent toxicity and combined effects for selected Michael acceptors. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng.* 2008;43(1):43–52. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10934520701750371>
74. Amslinger S. The tunable functionality of α,β -unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems. *ChemMedChem.* 2010;5(3):351–6. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900499>
75. Schultz TW, Carlson RE, Cronin MTD, Hermens JLM, Johnson R, O'Brien PJ, et al. A conceptual framework for predicting the toxicity of reactive chemicals: Modeling soft electrophilicity. *SAR QSAR Environ Res.* 2006;17(4):413–28. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10629360600884371>

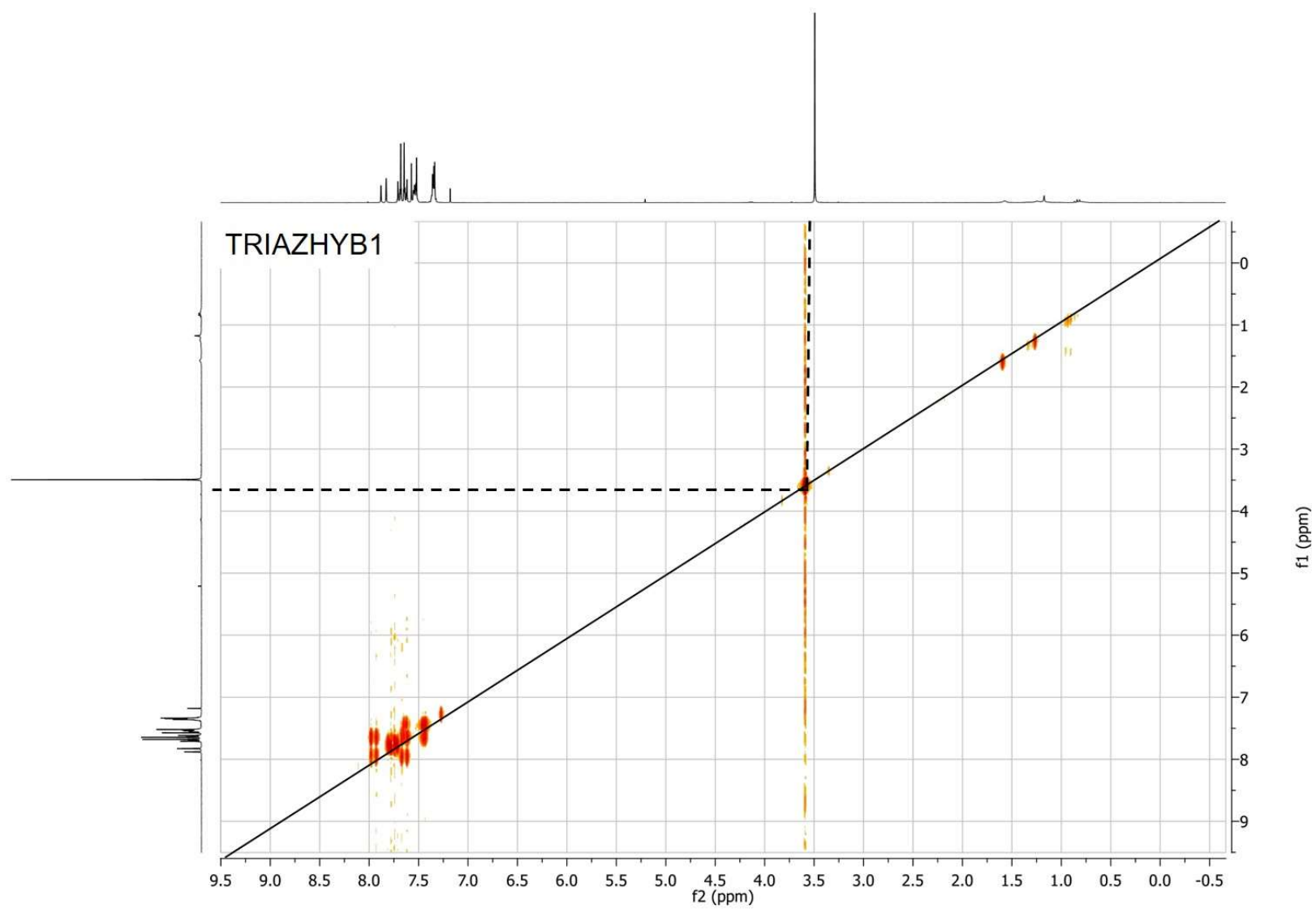
76. LoPachin RM, Gavin T. Reactions of electrophiles with nucleophilic thiolate sites: Relevance to pathophysiological mechanisms and remediation. *Free Radic Res.* 2016;50(2):195–205. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1094184>
77. Arsovska E, Trontelj J, Zidar N, Tomašič T, Mašič LP, Kikelj D, et al. Evaluation of michael-type acceptor reactivity of 5-benzylidenebarbiturates, 5-benzylidenerhodanines, and related heterocycles using NMR. *Acta Chim Slov.* 2014;61(3):637–44. Disponível em: <https://journals.matheo.si/index.php/ACSi/article/view/280/176>
78. Vistoli G, Pedretti A, Testa B. Assessing drug-likeness - what are we missing? *Drug Discov Today.* 2008;13(7–8):285–94. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.11.007>
79. Molinspiration. [citado 20 de Março de 2019]. Disponível em: <http://www.molinspiration.com/>
80. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;23:3–25. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
81. Clark DE. What has virtual screening ever done for drug discovery? *Expert Opin Drug Discov.* 2008;3(8):841–51. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460441.3.8.841>
82. Gomtsyan A. Heterocycles in drugs and drug discovery. *Chem Heterocycl Compd.* 2012;48(1):7–10. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10593-012-0960-z>
83. Vollhardt P, Schore N. *Organic Chemistry*. 6th ed. Rossignol R, Chelton D, editores. W.H.Freeman; 2011. 458–459 p.
84. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7.^a ed. Brennan D, Yee J, Wolfman-Robichaud S, Rigby S, editores. United States of America: John Wiley & sons, Inc; 2005. 550 p.
85. Danylec B, Iskander MN. ¹H NMR measurements of the trans-cis photoisomerization of cinnamic acid derivatives NMR measurements of the trans-cis photoisomerization of cinnamic acid derivatives. *J Chem Educ.* 2002;79(8):1000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ed079p1000>
86. Larkin PJ. *IR and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation*. 2^a ed. Elsevier Inc.; 2017. 286 p.
87. Sommer L. *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet; Volume 8, The Principles*. 1^a ed. Elsevier Science; 1989. 312 p.
88. Perkampus H-H. *UV-VIS Spectroscopy and its applications*. 1^a ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
89. Dahlin JL, Walters MA. The essential roles of chemistry in high-throughput screening triage. *Future Med Chem.* 2014;6(11):1265–90. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc.14.60>
90. Martin HL, Adams M, Higgins J, Bond J, Morrison EE, Bell SM, et al. High-content, high-throughput screening for the identification of cytotoxic compounds based on cell morphology and cell proliferation markers. *PLoS One.* 2014;9(2). Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088338>
91. Nguyen L V., Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *J Pharm Pharmacol.* 2012;12(2):133–43. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1038/nrc3184>
92. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(12):2144–51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>

Anexos

Anexo 1- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C , COSY; IV e UV do composto TRIAZHYB1





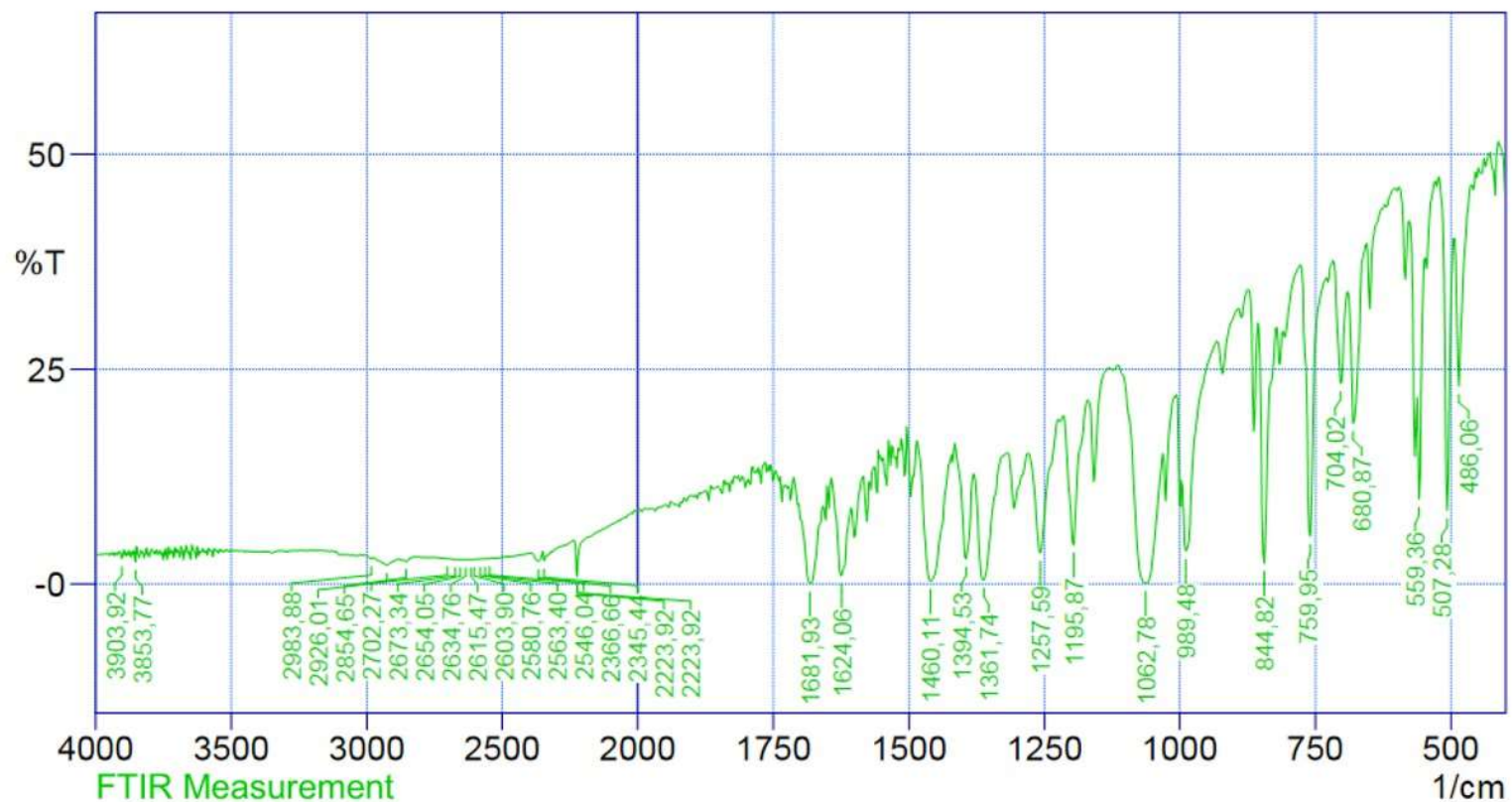


FTIR Measurement

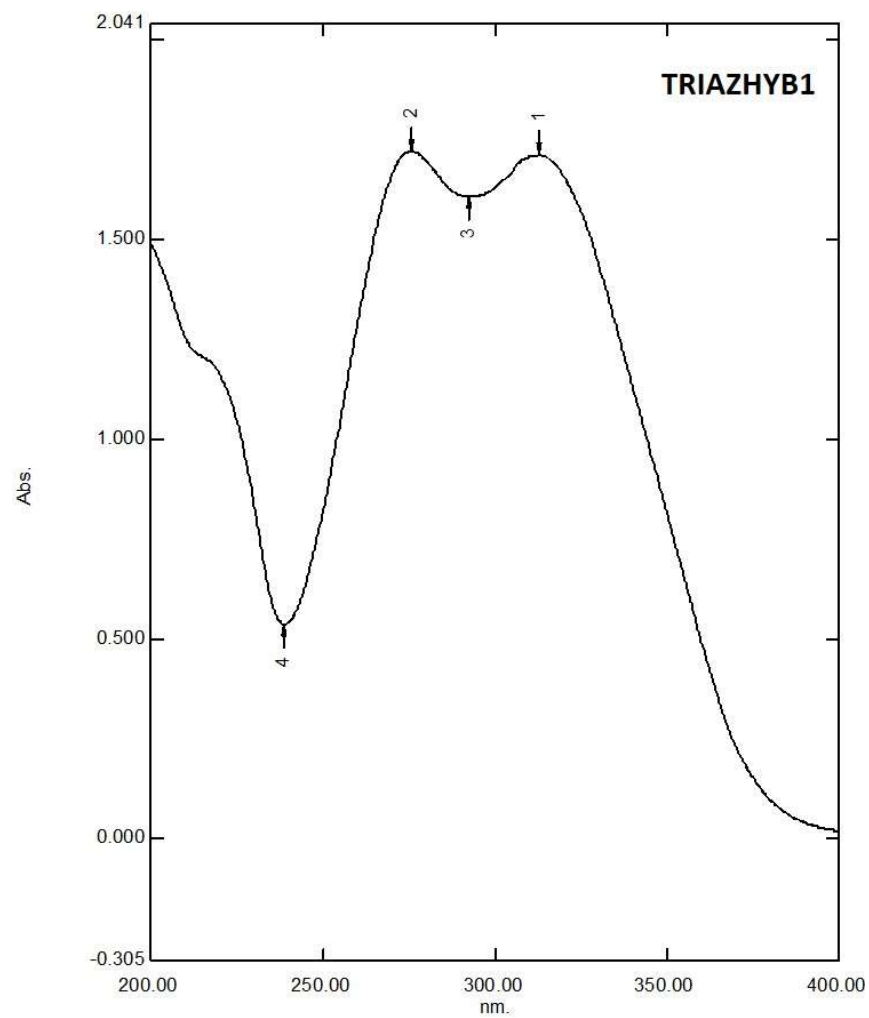
TRIAZHYB1

1/cm

Comment;
FTIR Measurement

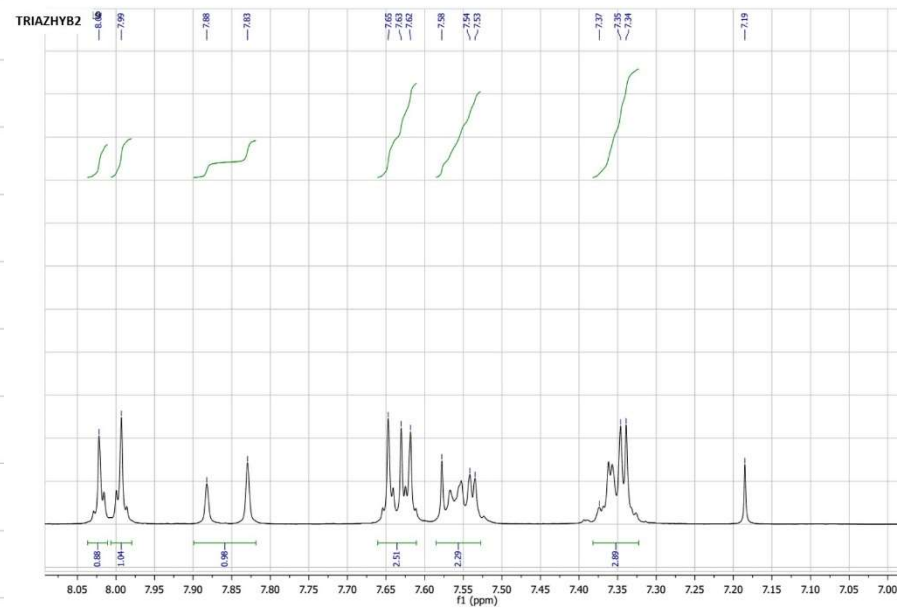
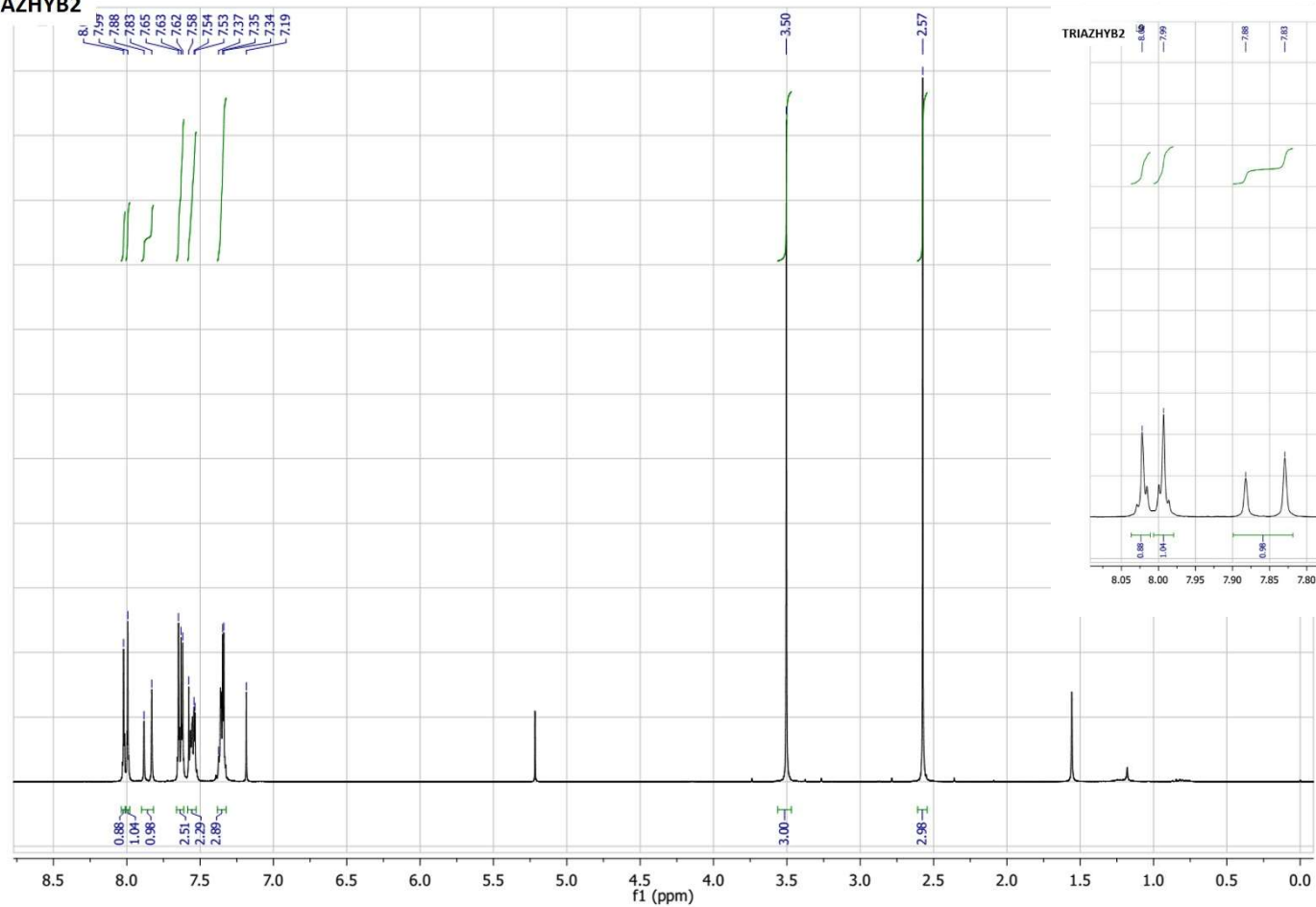


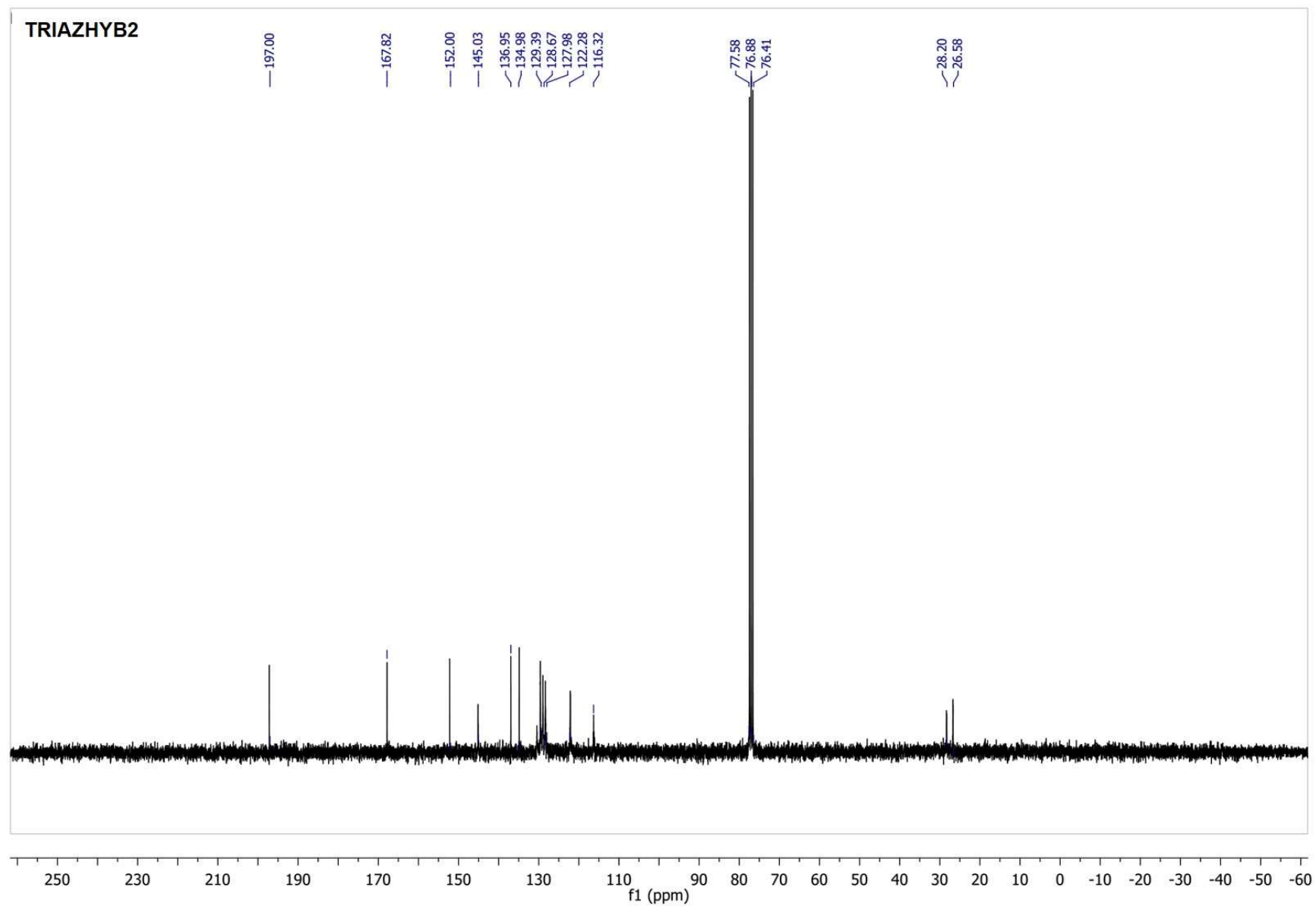
Comment;
FTIR Measurement

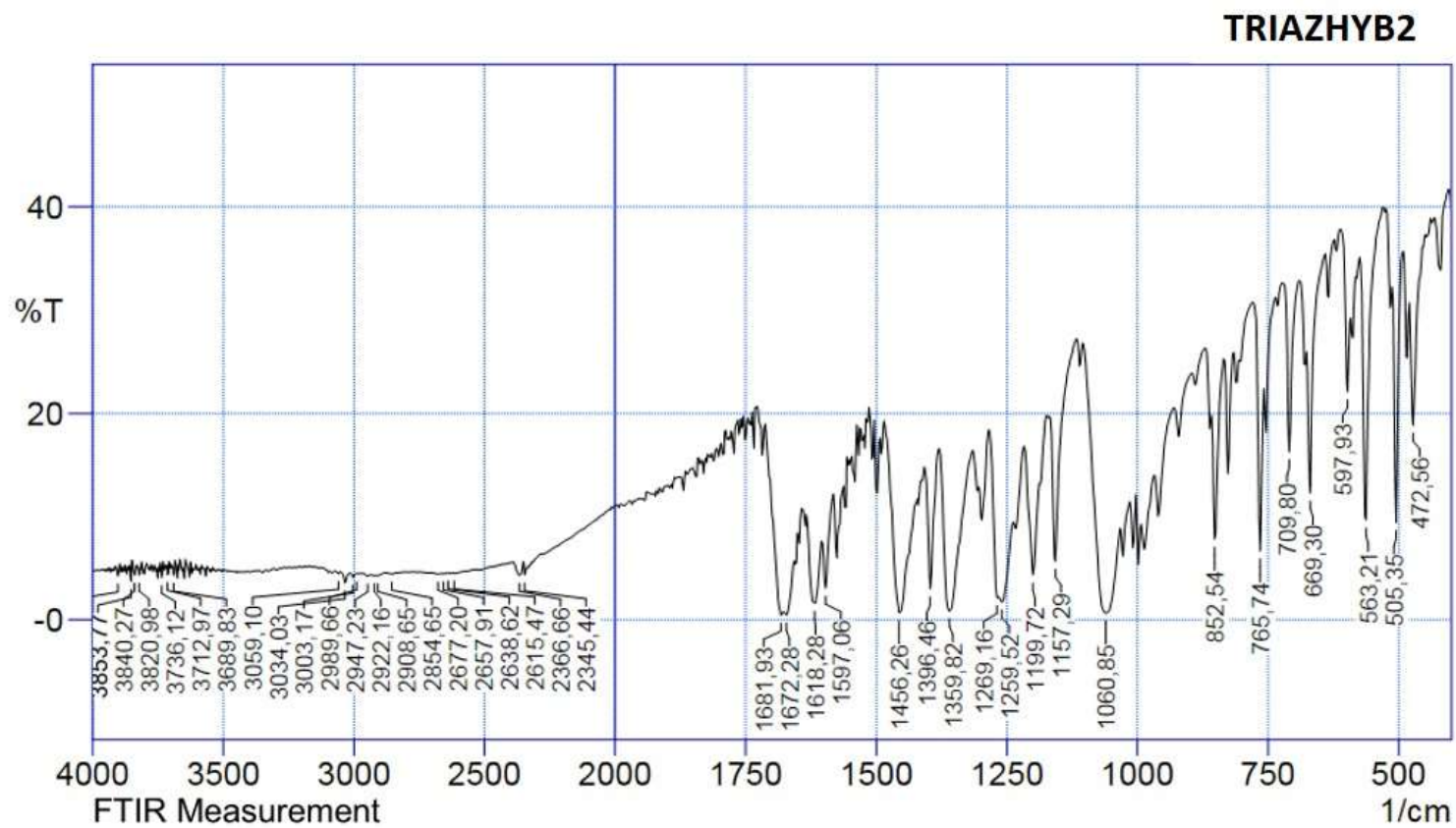


Anexo 2- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C ; IV e UV do composto TRIAZHYB2

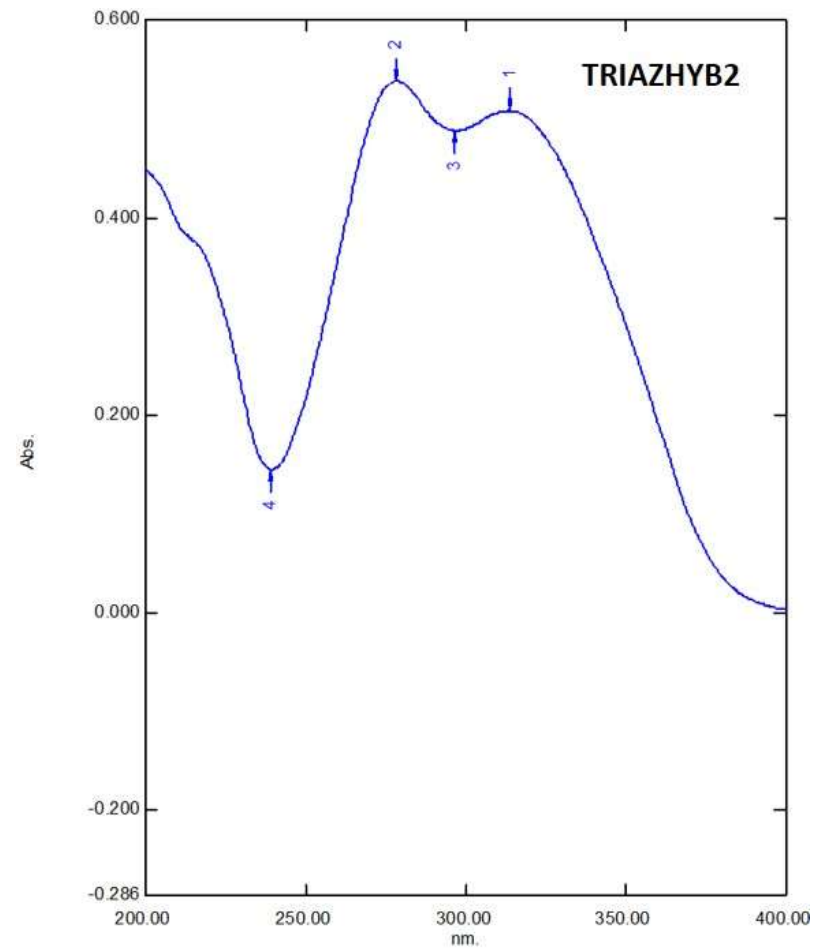
TRIAZHYB2

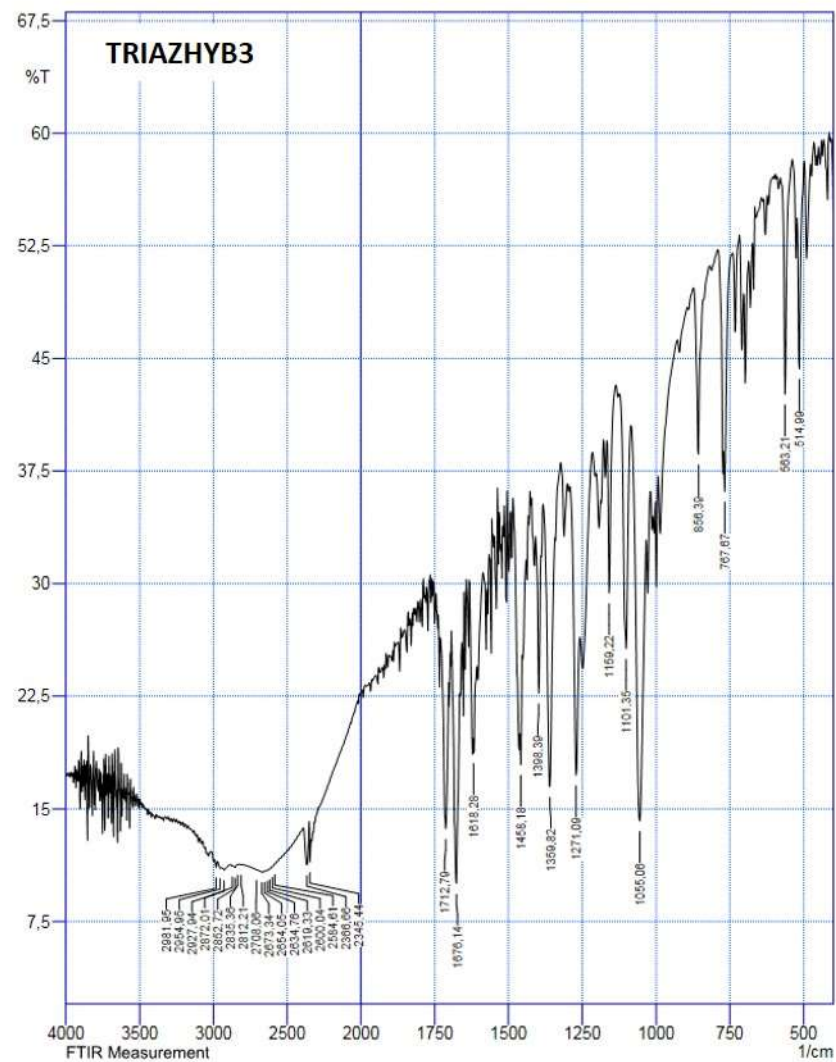






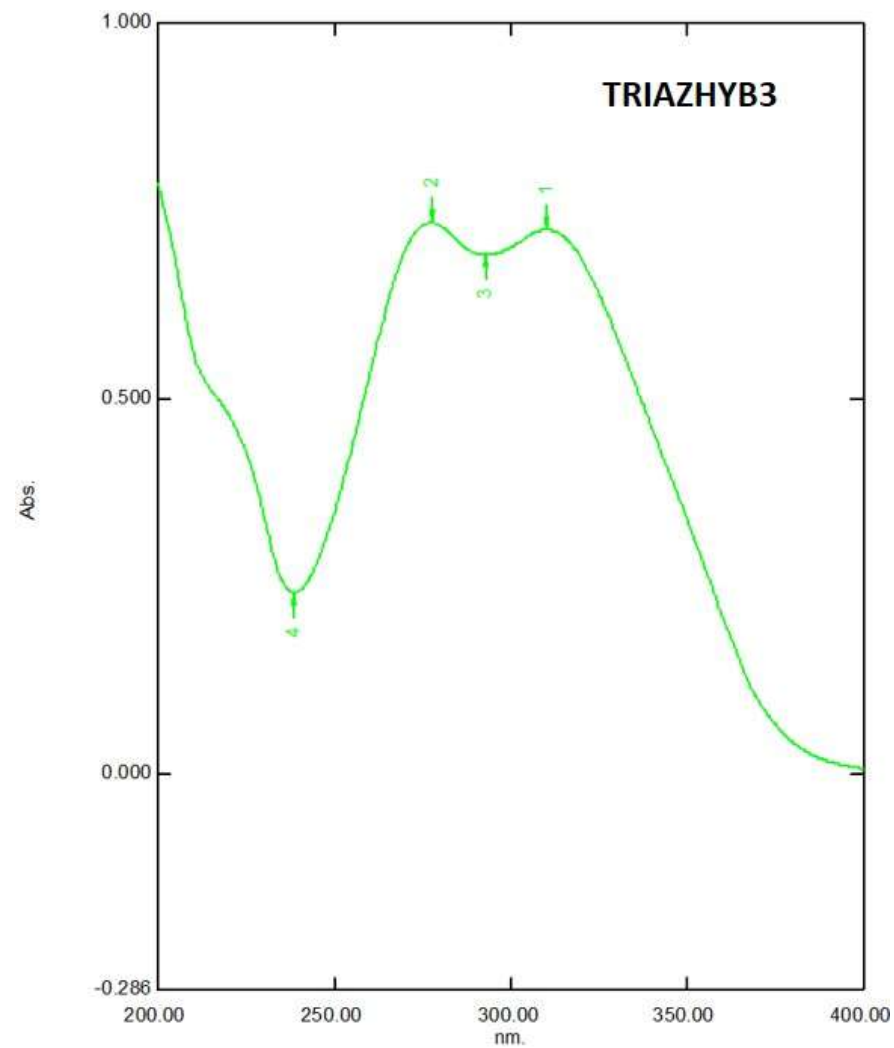
Comment;



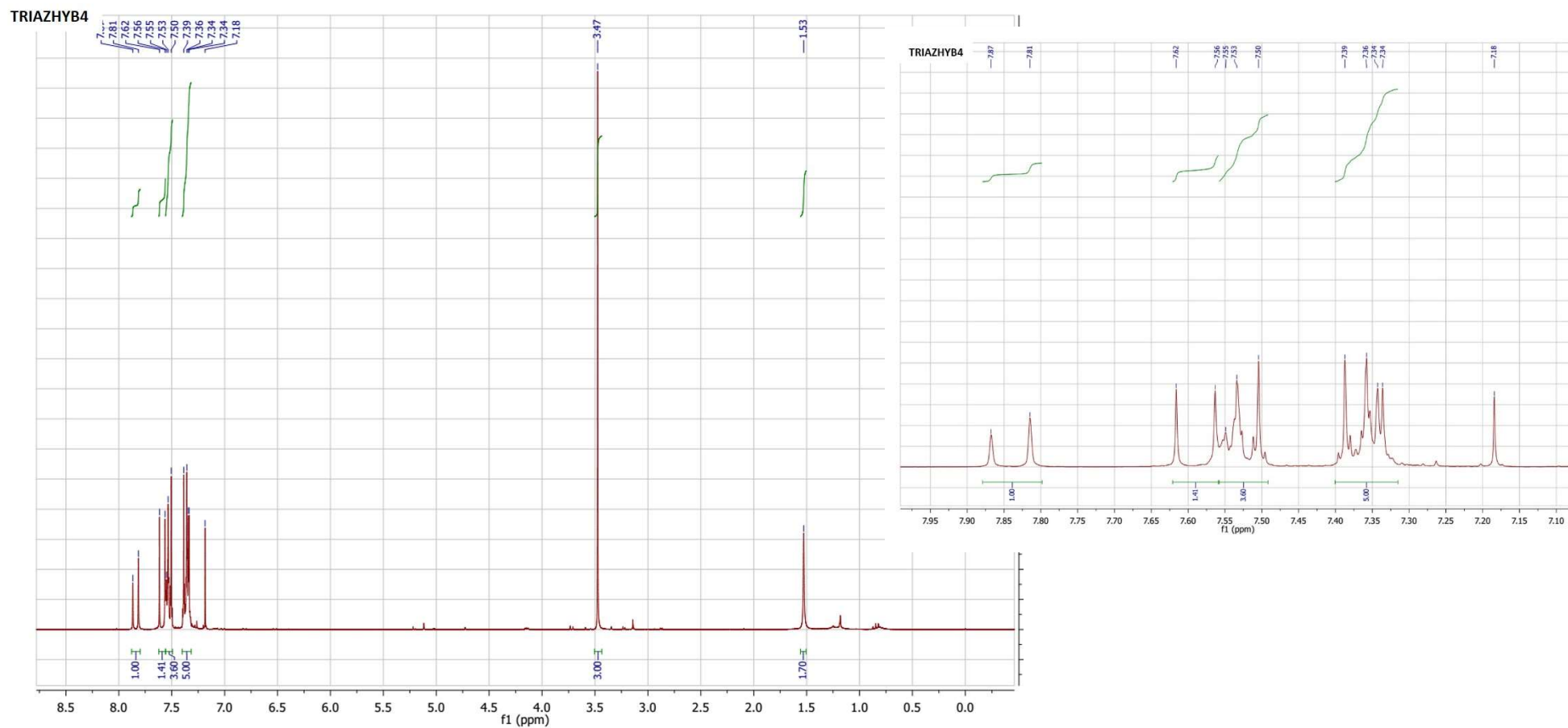


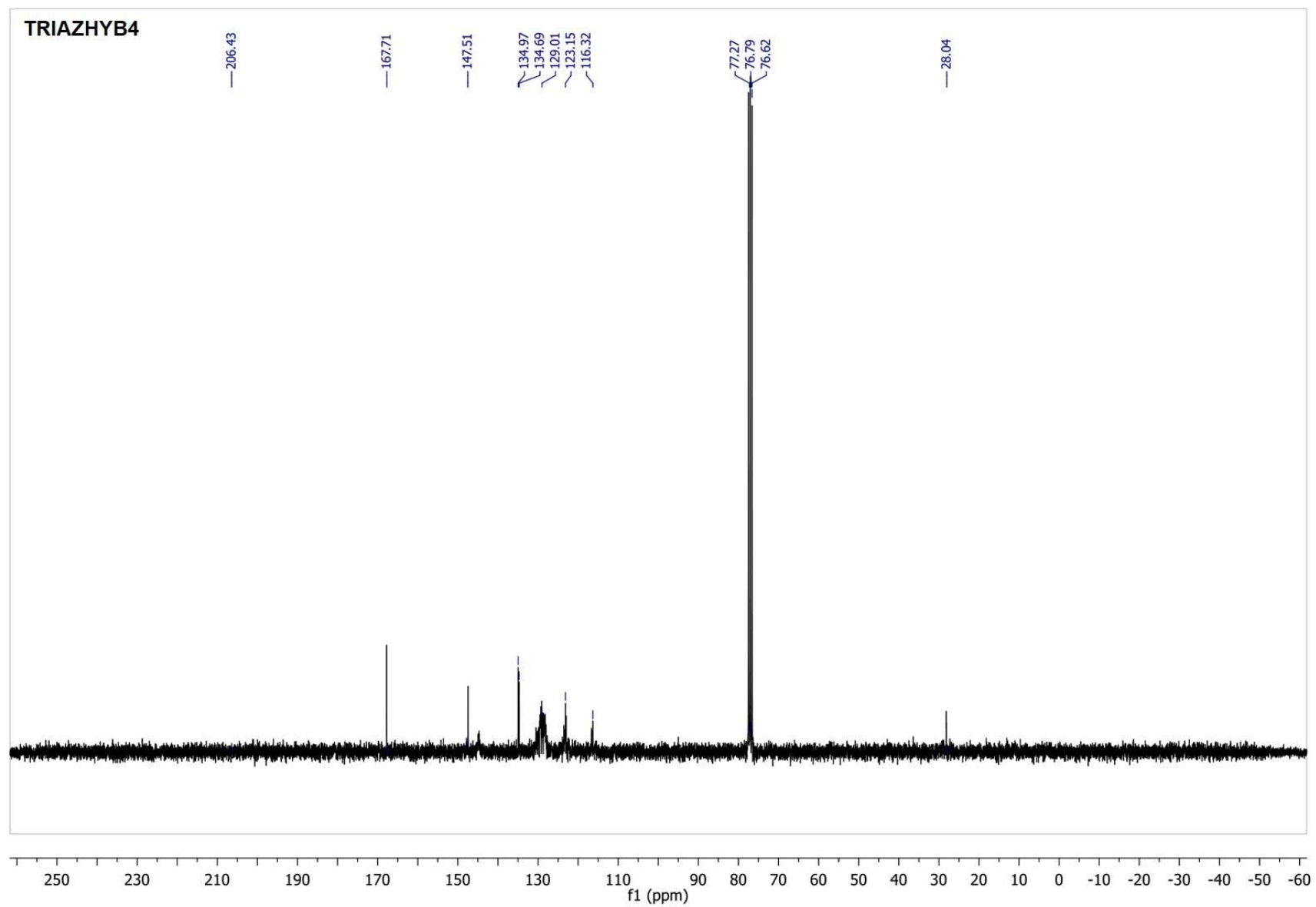
Comment:
FTIR Measurement

Date/Time: 16-05-2009 15:51:53
No. of Scans: 30
Resolution: 4 [1/cm]

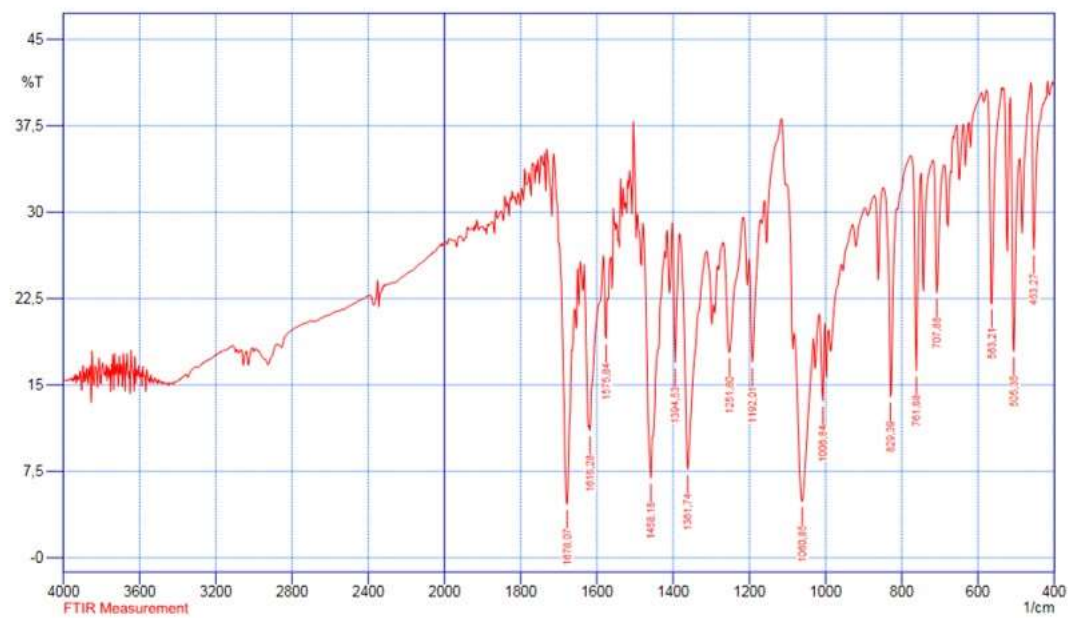


Anexo 4- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C ; IV e UV do composto TRIAZHYB4





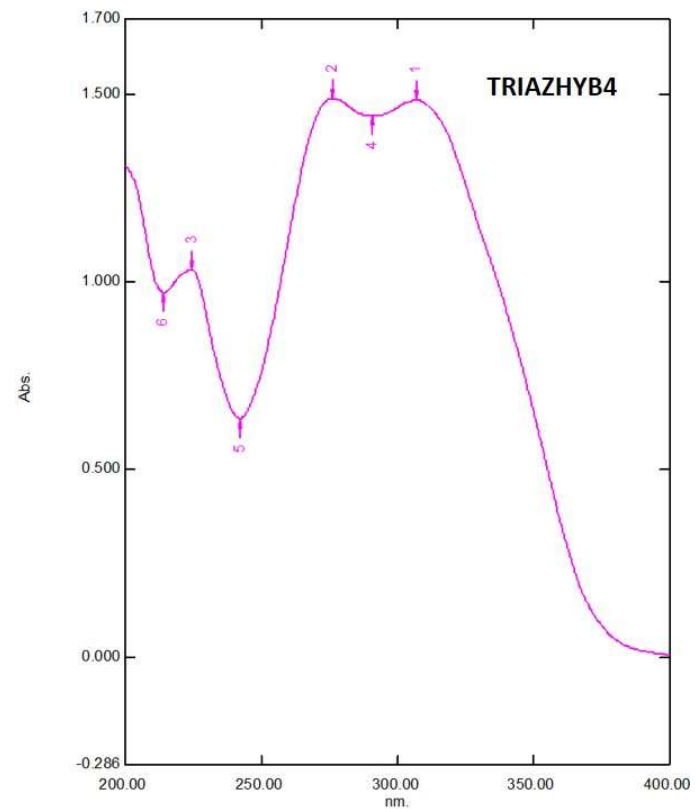
TRIAZHYB4



Comment:
FTIR Measurement

No. of Scans: 30
Resolution: 4 [1/cm]
Apodization: Happ-Genzel

Date/Time: 16-05-2009 15:23:22
User: lab



Anexo 5- Espectros de NMR ^1H , ^{13}C ; IV e UV do composto TRIAZHYB5

