



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Ana Cristina Dias Olival

**Síntese de Compostos Relacionados com o  
Ácido Cinâmico.  
Testes Biológicos em Linhas Celulares Cancerígenas**

Dissertação de Mestrado

**Mestrado em Química Medicinal**

Trabalho efectuado sob a orientação de

**Professora Doutora Maria José Alves**

**Professora Doutora Fátima Baltazar**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO,  
MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Assinatura: \_\_\_\_\_

Ana Cristina Dias Olival

## Agradecimentos

---

Agradeço em primeiro lugar às Doutoradas Maria José Alves e Fátima Baltazar pela oportunidade que me concederam de realizar o projeto de dissertação sob a sua orientação.

À Filipa Santos pela orientação e disponibilidade no desenvolvimento dos testes biológicos

Ao Doutor António Gil Fortes, pela disponibilidade e comentários acertados.

À Dra. Elisa Pinto e Dra. Vânia pelo profissionalismo e boa disposição na realização dos espectros de ressonância magnética nuclear e análise elementar.

Às colegas de laboratório, em especial à Cristina, à Raquel e à Vera, pela partilha de conhecimentos, e pelo bom ambiente de trabalho que senti no laboratório.

À Ana Filipa, pela amizade e o apoio incondicional. Também à Ashly, à Tatiana, à Tarsila e à Nádia pelo convívio e os bons momentos vividos ao longo deste ano no Departamento de Química.

Em geral agradeço a todas as pessoas do Departamento de Química pelo convívio mais estreito durante o último ano letivo.

Ao Hector, por ser o amigo que quem posso ligar nos bons e maus momentos, certa de encontrar acolhimento.

À minha família, que apesar de estar longe, é a minha fonte de inspiração. Sem a minha mãe e o meu pai não teria chegado aqui!

Aos meus irmãos, Luis Miguel, Manuel Adrian e Jesus Alberto, pelas alegrias que me dão na vida.

A Nossa Senhora de Fátima e a Virgem de Coromoto por me proteger com seu manto maternal ao longo da minha vida.



## Resumo

---

O objetivo deste projeto foi a obtenção de análogos estruturalmente relacionados com o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHC) e a avaliação do seu poder inibitório nos transportadores de monocarboxilatos (MCT) em duas linhas celulares de cancro de mama do subtipo basal, MDA-MB-468 e Hs578T, através da quantificação da viabilidade celular e do lactato produzido.

Neste trabalho foram sintetizados 10 compostos relacionados com o CHC, por várias estratégias de síntese. Estes compostos pertencem a três tipos diferentes: (1) diretamente relacionado com o ácido cinâmico, contendo a dupla ligação, (2) contendo uma azidirina em vez da dupla ligação, (3) contendo um anel de triazol em vez da dupla ligação.

Alguns compostos apresentam uma potenciação do efeito na viabilidade celular até 25 vezes em comparação com o CHC. Os resultados observados para a produção do lactato não são comparáveis; o melhor resultado consiste numa duplicação do valor inibitório e ocorre para o ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1*H*-pirazol-1-il)azidirina 2-carboxílico na linha celular Hs578T.

Infelizmente a quantificação do lactato extracelular obtida, na maioria dos casos não é estatisticamente fiável. No caso da linha celular MDA-MB-486 os desvios estatísticos observados podem ser explicados pelo elevado desvio padrão da quantificação do lactato do controlo. No caso da linha celular MDA-MB-486 nenhum dos compostos apresenta uma inibição melhor do que o CHC. O resultado mais importante no estudo desta celular é dado pela pequena diferença de inibição, ainda assim favorável ao CHC, apresentada pelo ácido cinâmico.



## Abstract

---

The objective of this project was to obtain acids structurally related to  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC), and evaluate their inhibitory potential against monocarboxylate transporters (MCT). The biological studies - quantifying cell viability, and lactate production - were obtained in two breast cancer cell lines of subtype basal: MDA -MB- 468 and Hs578T.

Ten compounds of three types were synthesized by different synthetic strategies: (1) cinnamic acid type; (2) aziridine type; (3) triazole type.

All compounds potentiate the effect on cell viability; in one case the effect is 25 times best than CHC. The observed lactate production results are not comparable to the viability results; the best lactate production result was obtained for 3-(2,6-dichlorophenyl)-2-(1H-pyrazol-1-yl) aziridine 2-carboxylic in cell line Hs578T by doubling the effect.

Unfortunately quantification of extracellular lactate obtained in most cases it is not statistically reliable. In MDA-MB-486 cells the statistical deviations observed may be explained by the high standard deviation in the quantification of the lactate control. In MDA-MB-86 cell line cases none of the compounds has a better inhibition than CHC. The most important outcome in this study is given by the inhibition presented by cinnamic acid, still favorable to CHC.





## Abreviaturas

---

%	Porcentagem
$\delta$	Desvio químico (expresso em ppm)
$\delta_H$	Desvio químico do próton
$\delta_C$	Desvio químico do carbono
$\Delta$	Aquecimento
aq.	Aquoso
ATP	Adenosina trifosfato
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHC	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
conc.	Concentração
$CO_2$	Dióxido de carbono
$^{13}C$ RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
DCM	Diclorometano
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMF	N, N, Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfoxido
$D_2O$	Água deuterada
eq.	Equivalente
FBS	Soro fetal bovino
g	Gramas
h	Hora (s)
$H_2O$	Água
HMBC	Correlação de acoplamento heteronuclear a longa distância
$^1H$ RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento expressa em Hertz (Hz)
$K_2CO_3$	Carbonato de potássio
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
K <sub>i</sub>	Constante de inibição
lit.	Literatura
M	mol/dm <sup>3</sup>
MCT	Transportadores de Monocarboxilatos

## Abreviaturas

---

Me	Grupo metilo
MeOH	Metanol
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimole
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adedina reduzido
NaN <sub>3</sub>	Azida de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NOE	Efeito Overhauser
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
t.a.	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacetico
THF	Tetrahidrofurano
TMD	Domínios transmembranares
TMS	Grupo trimetilsililo
TLC	Cromatografia em camada fina

## Capítulo - Introdução

1. Introdução ao metabolismo do cancro.....	- 3 -
1.1. A autossuficiência em sinais de crescimento.....	- 3 -
1.2. Insensibilidade aos supressores de crescimento .....	- 4 -
1.3. Apoptose - Evasão da morte celular programada .....	- 4 -
1.4. Potencial replicativo ilimitado .....	- 4 -
1.5. Aumento da angiogénese (neovascularização) .....	- 5 -
1.6. A invasão de tecidos e metastização .....	- 5 -
1.7. Evasão da imuno-destruição .....	- 5 -
1.8. Reprogramação do metabolismo energético .....	- 6 -
2. Transportadores de Monocarboxilatos .....	- 8 -
2.1. Transportador de Monocarboxilatos 1 – MCT1 .....	- 10 -
3. Cancro de mama .....	- 12 -
4. Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamato – CHC .....	- 13 -
5. Síntese de análogos do $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico - CHC .....	- 14 -
5.1. Síntese de ácidos cinâmicos .....	- 14 -
5.2. Síntese de análogos do ácido cinâmico .....	- 17 -
5.2.1. Síntese de aziridinas .....	- 17 -
5.2.2. Síntese de triazóis.....	- 19 -

## Capítulo 2 - Resultados e Discussão

1. Introdução.....	- 23 -
2. Síntese de reagentes de partida .....	- 24 -
2.1. Síntese de 2-azidoacetato de metilo (1) .....	- 24 -
2.2. Síntese de 2-azido acrilatos de alquilo .....	- 25 -
2.2.1. ( <i>E</i> )-2-azido-3-fenilacrilato de metilo (2).....	- 25 -
2.2.2. ( <i>E</i> )-2-azido-3-(2,6-diclorofenil)acrilato de metilo (3) .....	- 26 -
2.3. 2 <i>H</i> -Azirina-3-carboxilatos de metilo .....	- 26 -
2.3.1. 2-Fenil-2 <i>H</i> -azirina-3-carboxilato de metilo (4).....	- 27 -
2.3.2. 2-(2,6-Diclorofenil)-2 <i>H</i> -azirina-3-carboxilato de metilo (5) .....	- 27 -
Esquema 14. Síntese de 2-(2,6-Diclorofenil)-2 <i>H</i> -azirina-3-carboxilato de metilo .....	- 28 -
1. Síntese de compostos finais .....	- 29 -
1.1. Ácidos 2-azido acrílicos:.....	- 29 -

# Índice

---

1.1.1. Ácido ( <i>E</i> )-2-azido-3-fenilacrílico (7) .....	- 29 -
1.1.2. Ácido ( <i>E</i> )-2-azido-3-(2,6-diclorofenil) acrílico (8) .....	- 30 -
1.2. Ácido 2 <i>H</i> -aziridina 2-carboxílico substituído em $\alpha$ por grupos heteroaromáticos. - 31 -	
1.2.1. Ácido 2-(2-formil-1 <i>H</i> -pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxílico (10).....	- 31 -
1.2.2. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1 <i>H</i> -pirrol-1-il) aziridina-2-carboxílico (12) - 33 -	
1.2.3. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il) aziridina-2-carboxílico (14) .....	- 35 -
1.2.4. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(6-cloro-9 <i>H</i> -purin-9-il) aziridina-2-carboxílico (16a) e ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(6-cloro-7 <i>H</i> -purin-7-il) aziridina-2-carboxílico (16b) .....	- 37 -
1.3. Síntese de ácidos triazólicos .....	- 39 -
1.3.1. Ácidos 1-benzil-4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole-5-carboxílico (18) e 1-benzil-5-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole-4-carboxílico (19) .....	- 39 -
1. Avaliação dos ensaios biológicos dos derivados do CHC .....	- 42 -
1.4. Viabilidade celular .....	- 42 -
1.5. Metabolismo celular.....	- 47 -

## Capítulo 3 - Parte Experimental

1. Procedimentos gerais .....	- 53 -
2. Síntese de reagentes de partida .....	- 55 -
2.1. 2-Azidoacetato de metilo (1) .....	- 55 -
2.2. Síntese de 2-azido cinamatos .....	- 55 -
2.2.1. ( <i>E</i> )-2-Azido-3-fenilacrilato de metilo (2) .....	- 55 -
2.2.2. ( <i>E</i> )-2-azido-3-(2,6-diclorofenil) acrilato de metilo (3) .....	- 56 -
2.3. Síntese de 2 <i>H</i> -azirina-3-carboxilatos de metilo .....	- 57 -
2.3.1. 2-Fenil-2 <i>H</i> -azirina-3-carboxilato de metilo (4).....	- 57 -
2.3.2. 2-(2,6-Diclorofenil)-2 <i>H</i> -azirina-3-carboxilato de metilo (5) .....	- 57 -
2.4. Síntese de benzilazida (6) .....	- 58 -
3. Síntese de produtos finais .....	- 59 -
3.1. Ácidos 2-azido acrílicos:.....	- 59 -
3.1.1. Ácido ( <i>E</i> )-2-azido-3-fenilacrílico (7) .....	- 59 -
3.1.2. Ácido ( <i>E</i> )-2-azido-3-(2,6-diclorofenil) acrílico (8) .....	- 59 -
3.2. Ácido 3- <i>aril</i> -aziridina 2-carboxílico substituído na posição 2 por grupos heteroaromáticos.....	- 60 -
3.2.1. Ácido 2-(2-formil-1 <i>H</i> -pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxílico (10).....	- 60 -
3.2.2. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1 <i>H</i> -pirrol-1-il) aziridina-2-carboxílico (12) - 62 -	

## Índice

---

3.2.3. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1 <i>H</i> -pirazol-1-il) aziridina-2- carboxílico (14) .....	- 64 -
3.2.4. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)- 2-(6-cloro-9 <i>H</i> -purin-9-il) aziridina-2-carboxílico (16) .	- 66 -
3.3. Síntese de ácidos Triazolínicos .....	- 68 -
3.3.1. Ácidos 1-benzil-4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazole-5-carboxílico (18) e 1-benzil-5-fenil-1 <i>H</i> - 1,2,3-triazole-4-carboxílico (19) .....	- 68 -
4. Cultura de Células.....	- 71 -
4.1. Determinação do IC <sub>50</sub> .....	- 71 -
4.2. Quantificação do lactato .....	- 72 -
<b>Bibliografia</b> .....	-75-



# Capítulo 1

## Introdução





### 1. Introdução ao metabolismo do cancro

O cancro é uma doença complexa que envolve inúmeras alterações na fisiologia da célula. As células cancerígenas crescem e dividem-se de forma desregulada, formando tumores malignos.<sup>1</sup>

Hanahan e Weinberg<sup>1</sup> sugeriram que há oito alterações essenciais na fisiologia celular que podem estar subjacentes ao crescimento de células malignas. Estas oito alterações foram descritas como comuns a quase todos cancros, são elas:

- 1) A autossuficiência em sinais de crescimento,
- 2) Insensibilidade aos supressores de crescimento
- 3) Apoptose - Evasão a morte celular programada
- 4) Potencial replicativo ilimitado
- 5) Aumento da angiogénese (neovascularização)
- 6) A invasão de tecidos e metastização
- 7) Evasão da imuno-destruição
- 8) Reprogramação do metabolismo energético

Além destas alterações, são identificadas duas características do cancro com capacidades funcionais adquiridas que permitem as células cancerígenas sobreviver e proliferar. A primeira consiste no desenvolvimento de instabilidade genómica nas células cancerígenas, o que gera mutações aleatórias e conseqüentemente permite a manifestação das alterações fisiológicas que conduzem ao cancro. A segunda característica envolve um estado inflamatório das células cancerígenas, estimulado pelas células do sistema imunitário, o que promove a progressão do tumor através do bloqueio da apoptose pela produção exagerada de substâncias inflamatórias como as citocinas e prostaglandinas.<sup>1</sup>

#### 1.1. A autossuficiência em sinais de crescimento

Os tecidos normais controlam cuidadosamente a produção e a libertação dos sinais de promoção do crescimento das células e da divisão celular. Quando estes sinais estão ausentes

## **Capítulo 1 – Introdução**

---

a proliferação celular é detida. Contudo, as células cancerígenas possuem a capacidade de sustentar a proliferação crônica, na ausência de sinais de crescimento externos.

Alternativamente, as células cancerígenas podem enviar sinais para estimular as células normais do estroma (tecido de sustentação dos órgãos) associado ao tumor, que reciprocamente fornece às células cancerígenas vários fatores de crescimento.<sup>1-3</sup>

### **1.2. Insensibilidade aos supressores de crescimento**

Além da capacidade de induzir e sustentar positivamente os sinais de crescimento, as células cancerígenas são capazes de contornar processos que regulam negativamente a proliferação de células. Muitos destes processos dependem das ações dos genes supressores tumorais. Dois supressores tumorais bastante importantes são o RB (retinoblastoma-associado) e TP53 (proteína tumoral 53). As células tumorais selecionam estes supressores tumorais especificamente por controlarem recursos importantes para a proliferação celular, senescência e apoptose.<sup>1</sup>

### **1.3. Apoptose - Evasão da morte celular programada**

A apoptose é um processo coordenado que inicia a morte celular na sequência de uma variedade de lesões celulares. Em contraste com as células normais, a resistência adquirida à apoptose é uma característica da maior parte dos tipos de células cancerígenas. A evasão à apoptose é uma resposta fisiológica previsível nas células tumorais.<sup>4</sup>

### **1.4. Potencial replicativo ilimitado**

As células não cancerígenas, após um número limitado de divisões entram em senescência, enquanto as células cancerígenas apresentam um potencial replicativo ilimitado que lhes permite crescer e dividir-se indefinidamente. Este limite de proliferação pode ser ultrapassado ao inativar os genes supressores de tumores anteriormente descritos e tem sido

associada a duas barreiras distintas: a senescência, que é a entrada num estado viável não proliferativo tipicamente irreversível, e a apoptose, que é a indução da morte celular.<sup>1,4</sup>

### **1.5. Aumento da angiogénese (neovascularização)**

A angiogénese envolve a neovascularização ou a formação de novos vasos capilares a partir de vasos sanguíneos existentes e está relacionado com os processos de inflamação de tecidos, cicatrização de feridas, e tumorigénese. A angiogénese é necessária para que a maioria dos tumores cresça a fim de proporcionar ao tumor nutrientes essenciais para a obtenção de energia, e para remover produtos residuais tóxicos, tais como ácido láctico e amoníaco.<sup>4</sup>

### **1.6. A invasão de tecidos e metastização**

As células cancerígenas separam-se do tumor primário, entram dentro da corrente sanguínea e no sistema linfático, evadem o ataque do sistema imunológico, invadem e proliferam em tecidos distantes. Esta sequência de passos é chamada de metástase. A metástase é o termo geral usado para descrever a propagação de células cancerosas do tumor primário para os tecidos circundantes e até órgãos distantes, sendo uma das causas primárias de mortalidade por cancro.<sup>4</sup>

### **1.7. Evasão da imuno-destruição**

O sistema imunológico desempenha um papel importante na identificação, resistência e eliminação de neoplasias. As células e os tecidos são constantemente monitorizados por um sistema imunitário sempre alerta. Esta vigilância imune é responsável por reconhecer os antígenos produzidos pelas células cancerígenas e destruir as células anormais utilizando as células T. Este sequência de processos constitui uma barreira efetiva à tumorigénese e à progressão do tumor.

Os tumores sólidos parecem ter conseguido iludir o sistema imunitário desenvolvendo tolerância imunológica contra antígenos tumorais. Desta maneira as células cancerígenas evadem a sua detecção e erradicação por parte do sistema imune.

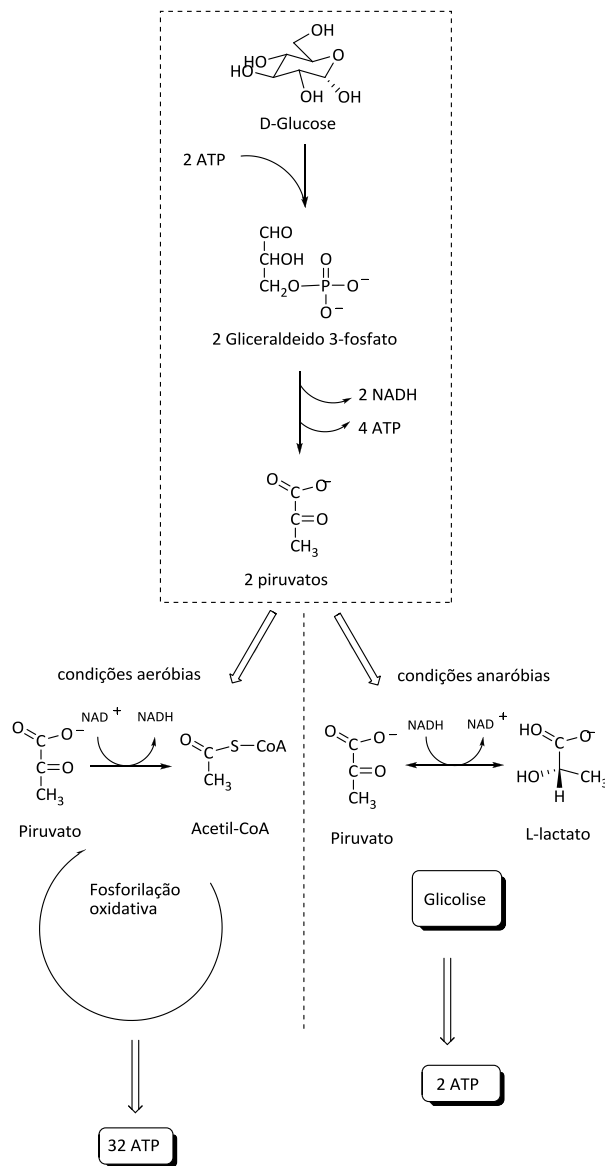
### 1.8. Reprogramação do metabolismo energético

A essência da neoplastia é representada pela proliferação crônica e muitas vezes descontrolada das células, mas também pelos ajustes correspondentes do metabolismo energético, a fim de impulsionar o crescimento e a divisão celular. <sup>1</sup>

O metabolismo energético é constituído por um conjunto de transformações bioquímicas que ocorrem na célula com a finalidade de obter energia. Uma das vias para obter energia é a glicólise.

Nas células normais, a glicólise é uma sequência de reações enzimáticas que ocorrem no citoplasma, através das quais a molécula de glucose, com seis átomos de carbono, é transformada e clivada, originando duas moléculas de piruvato, com três carbonos, e uma quantidade reduzida de ATP. O piruvato produzido pode ser catabolizado aerobicamente pela *piruvato desidrogenase* e ou entrar no ciclo do ácido cítrico gerando moléculas transportadoras de eletrões, como o dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH). Estas moléculas permitem a produção de grandes quantidades de ATP ao nível da cadeia de transporte de eletrões e fosforilação oxidativa. Desta forma, a glucose é completamente oxidada produzindo CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. <sup>5,6</sup> (Esquema 1)

No entanto, a glicólise também pode realizar-se anaerobiamente (na ausência de oxigénio). Nestes casos, o produto final da glicólise deixa de ser o piruvato e passa a ser uma molécula de mais reduzida dimensão, o lactato. <sup>5</sup> A glicólise anaeróbica produz duas moléculas de ácido láctico por cada molécula de glucose. O ácido láctico produzido é transportado para fora da célula pelos transportadores de monocarboxilatos (MCTs). Se o efluxo de ácido láctico a partir da célula não acompanhar o ritmo da sua produção, as concentrações intracelulares aumentam e provocam a diminuição do pH do citosol<sup>7</sup>, o que pode levar à apoptose celular. Este elevado nível de produção de lactato é um fenómeno geralmente observado em células de tumores sólidos, em condições de hipoxia. <sup>8,9</sup>



Esquema 1. Glicólise aeróbia vs glicólise anaeróbia<sup>8</sup>

Ao contrário das células normais, que produzem ATP através da fosforilação oxidativa, as células tumorais mostram uma mudança metabólica, o chamado "efeito Warburg", em que a produção de energia é feita por glicólise anaeróbica.<sup>8</sup> Otto Warburg mostrou que grande parte das células tumorais produz ATP através da conversão de uma quantidade excessiva de glicose em lactato, mesmo na presença de oxigênio.<sup>10-13</sup>

A reprogramação do metabolismo energético das células tumorais é contraditória, porque ao optar pela glicólise anaeróbia, as células estão a escolher uma via menos eficiente

## Capítulo 1 – Introdução

---

de produção de moléculas de ATP. Mas, apesar de ser menos vantajosa em termos energéticos, o aumento da produção de lactato leva a uma diminuição do pH do meio extracelular o que se pensa conferir vantagens proliferativas ao tumor.<sup>14</sup> O aumento da glicólise nas células cancerígenas facilita que intermediários glicolíticos sejam usados para alimentar vias biossintéticas celulares, incluindo aquelas que geram macromoléculas, como nucleósidos e proteínas, necessárias para a constituição de novas células.<sup>1</sup>

Alguns tumores apresentam duas subpopulações de células cancerígenas que diferem nas suas vias de geração de energia. Uma subpopulação é dependente do consumo de glucose sendo o lactato produzido usado para exportação, enquanto as células da segunda subpopulação importam o lactato produzido pelas células vizinhas, que é usado como fonte de energia.<sup>1</sup>

## 2. Transportadores de Monocarboxilatos

Os transportadores de monocarboxilatos (MCTs) são moléculas pertencentes à família de genes SLC16, atualmente composto por 14 membros. Os MCT1, MCT2, MCT3 e MCT4 medeiam o transporte de moléculas com um grupo carboxílico como o piruvato, lactato e os corpos cetônicos, através das membranas<sup>7,15, 16</sup> com o co-transporte de prótons. Contribuem assim para a manutenção do pH intracelular através do efluxo de lactato.<sup>17</sup>

Os MCTs são constituídos por 12 domínios transmembranares (TMDs) com um *loop* grande entre os domínios 6 e 7, ficando os seus terminais N e C no interior celular,<sup>18</sup> com a maioria das regiões pertencentes aos TMDs conservadas, sendo as regiões mais variáveis correspondentes ao *loop* e ao C terminal.<sup>19</sup> (Figura 1)

# Capítulo 1 – Introdução

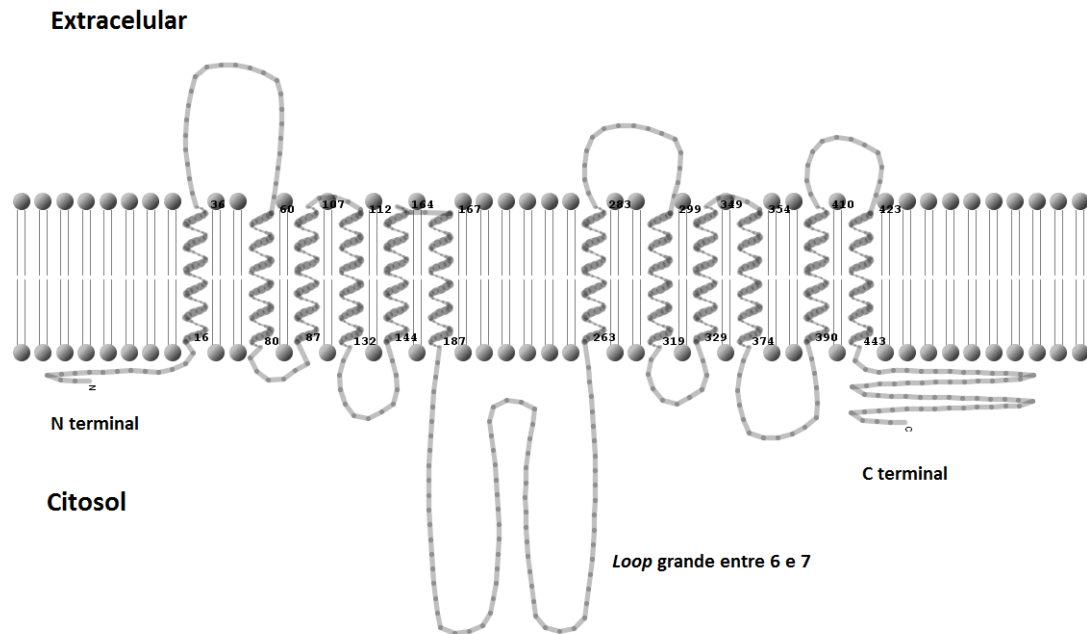


Figura 1. Estrutura proposta dos MCTs<sup>20</sup>

Os MCTs têm a função de transportar o ácido láctico tanto para o meio extracelular como principalmente para o citosol onde o ácido láctico é necessário à gluconeogênese. Todas as células exportam o ácido láctico sob condições de hipóxia e usam qualquer isoforma de MCT que esteja expresso. A maioria dos tecidos que dependam da glicólise aeróbica para o seu metabolismo energético, em condições de normóxia, o efluxo de ácido láctico é realizado pelo MCT4.<sup>21</sup> (Figura 2)

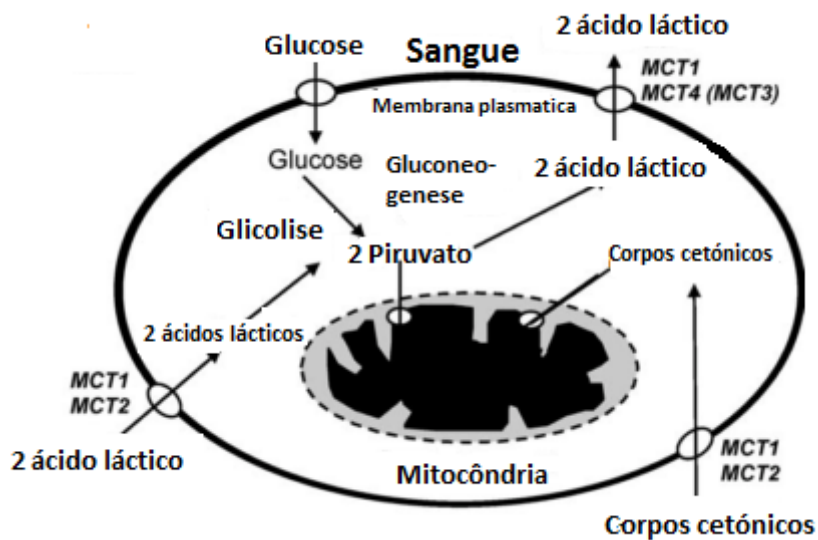


Figura 2. O papel dos MCT no metabolismo.<sup>21</sup>

## Capítulo 1 – Introdução

---

Os MCTs encontram-se em todas as células. O MCT1 pode ser encontrado em todos os tecidos mas por vezes só em certos locais do tecido.<sup>7</sup> O MCT2 está presente em todos os tecidos, com exceção do músculo esquelético, em que está praticamente ausente, com uma distribuição diferente para diferentes espécies<sup>7</sup> e é encontrado juntamente com o MCT1 embora em locais distintos.<sup>22</sup> O MCT3 é expresso no epitélio pigmentar da retina da galinha e rato<sup>23</sup>. O MCT4 embora presente na maioria dos tecidos está fortemente associado com tecidos com uma alta taxa de glicólise, tais como o músculo esquelético e os tecidos tumorais, onde está envolvido na remoção do ácido láctico produzido a partir de glicólise.<sup>24-28</sup>

Em geral, os MCTs pelo facto de estarem presentes em todas as células e contribuírem para a manutenção do pH do citosol têm mostrado estar envolvidos no cancro, facilitando a sobrevivência de tumores glicolíticos.<sup>27</sup>

As diferentes isoformas variam na sua especificidade e afinidade para o substrato, bem como na sua resposta aos inibidores. Os MCT1 e MCT2 têm especificidades muito semelhantes para os seus substratos, mas diferem em relação à afinidade. Por exemplo o MCT2 tem uma afinidade 100 vezes maior para o piruvato do que o MCT1.<sup>24, 29</sup>

Os MCT1 e MCT4, são muito associados a um aumento da agressividade tumoral.<sup>30</sup> Estes dois transportadores requerem uma proteína auxiliar designada Basigina. O MCT2 associa-se a outra proteína diferente, a EMBIGIN. Estas proteínas são essenciais a ação dos MCTs e a sua identidade contribui para explicar a variação de afinidade observada entre os inibidores para os diferentes MCTs.<sup>16</sup>

### 2.1. Transportador de Monocarboxilatos 1 – MCT1

O MCT1, o primeiro membro identificado<sup>16</sup> e caracterizado<sup>31</sup> do gene SLC16, sendo o único que está expresso diferencialmente em todos os tecidos; surge em eritrócitos, no intestino delgado e cólon, no músculo, no coração, etc. Este facto conduz à hipótese de que a expressão de MCT1 poderia estar associada com uma maior malignidade do tumor.<sup>32</sup>

Um estudo recente feito por Sonveaux e os seus colaboradores<sup>6</sup> mostrou-se controverso porque desafia a visão tradicional das células tumorais simplesmente como



## Capítulo 1 – Introdução

---

consumidores vorazes de glicose. Numa série de experiências *in vitro* foi mostrado que algumas células tumorais podem oxidar o lactato cujo transporte é mediado pelo MCT1.

Vários estudos têm vindo a demonstrar a importância do MCT1 em células tumorais. Foi demonstrado que a inibição *in vitro* MCT1 diminui o pH intracelular o que leva à morte celular e, aumenta a sensibilidade à radiação de células do cancro.

Os substratos e os inibidores do MCT1 foram caracterizados por Deuticke<sup>31</sup> e Poole e Halestrap.<sup>19</sup>

Os substratos:

- Monocarboxilatos alifáticos com cadeias curtas (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) não ramificadas.
- Monocarboxilatos substituídos com C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> podem ser preferidos, com exceção dos que contem os grupos amina e amida.
- O grupo monocarboxilato é um substrato com pouca afinidade, enquanto o bicarbonato, dicarboxilatos, tricarboxilatos e sulfonato não tem afinidade.

Tabela 1. Alguns substratos do MCT1

Substrato	Km (mM)
Formiato (C <sub>1</sub> )	>100
Bicarbonato (C <sub>1</sub> )	>100
Acetato (C <sub>2</sub> )	3.5
Glioxilato (C <sub>2</sub> )	70
Oxamato (C <sub>2</sub> )	17
Glicolato (C <sub>2</sub> )	6.6
Propionato (C <sub>3</sub> )	1.5
Piruvato (C <sub>3</sub> )	0.64
L-lactato (C <sub>3</sub> )	2.2
D-lactato (C <sub>3</sub> )	51

Alguns dos inibidores descrito estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Alguns inibidores do MCT1

Inibidor	Km ( $\mu$ M)
$\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamato	27
4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'- disulfonato (DIDS)	50
4,4'-dibenzamidostilbene-2,2'- disulfonato (DBDS)	35
Quercetina	20
Floretina	1.4
Ácido niflúmico	45
<i>p</i> -cloromercuribenzeno sulfonato	<1.0

A identidade molecular do MCT1 foi estabelecida por um processo de purificação de proteínas e a sequenciação de aminoácidos realizada pelos laboratórios do Deuticke<sup>35</sup> e de forma independente no nível de cDNA por Christine Garcia.<sup>37</sup> Foi Garcia que atribuiu o nome ao transportador MCT1.

### 3. Cancro de mama

O cancro da mama é o tipo de cancro mais comum entre as mulheres e corresponde à segunda causa de morte por cancro na mulher. Em Portugal, anualmente são detetados cerca de 4500 novos casos de cancro da mama, e 1500 mulheres morrem com esta doença.

Agora é o cancro mais comum, tanto em regiões desenvolvidas como em desenvolvimento, como cerca de 690 000 novos casos estimados em cada região. As taxas de incidência variam de 19,3 por 100 mil mulheres na África Oriental para 89,7 por 100 mil mulheres na Europa Ocidental, e é elevada (superior a 80 por 100 mil) nas regiões desenvolvidas do mundo (exceto Japão) e baixas (menos de 40 por 100 mil) na maior parte das regiões em desenvolvimento.<sup>35</sup>

O cancro de mama pode ser classificado de acordo com perfis de expressão génica em quatro grupos principais: subtipo basal, subtipo HER2+ (positivo para Human Epidermal

## Capítulo 1 – Introdução

---

Growth Factor Receptor 2), subtipo luminal A e subtipo luminal B. Os tumores do subtipo basal e do subtipo HER2+ têm um comportamento clínico mais agressivo quando comparado com o cancro de mama de subtipos luminais. Os carcinomas mamários do subtipo basal, em contraste com os outros grupos, não têm uma terapia molecular específica, sendo necessária a procura de novos alvos moleculares neste grupo.<sup>36</sup>

Estudos anteriores mostraram um aumento significativo da expressão de MCT1 citoplasma e na membrana plasmática no carcinoma de mama, enquanto comparado com o cancro de mama epitelial. O MCT1, só ou co-expresso com basigina está associado com o subtipo basal, o subtipo de cancro de mama mais agressivo. A agressividade do cancro fica assim associada à expressão do MCT1.<sup>37</sup>

### 4. Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamato – CHC

Uma das descobertas importantes na área dos MCTs foi a do inibidor ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamato, com um  $K_i$  de 64 mM para MCT1.<sup>38</sup> A descoberta do CHC demonstrou que o transporte de monocarboxilatos era feito através de uns transportadores específicos e não por difusão não iónica. No entanto, o CHC parece ter poder inibitório em outros transportadores de monocarboxilatos tais como o transportador de piruvato mitocondrial<sup>39</sup> e o permutador de aniões AE1.<sup>38</sup>

O CHC foi capaz de retardar o crescimento tumoral e potencializar os efeitos da radioterapia em tumores que expressam MCT1 em ratinhos. É demonstrado que a inibição do CHC não é diretamente do MCT1 mas sim da sua proteína auxiliar, Basigina.<sup>14, 40</sup> Sonveaux<sup>6</sup> sugeriu que radiosensibilização induzida por CHC pode refletir uma oxigenação, onde as células tumorais hipóxicas morrerão de “fome” devido ao aumento da glicólise nas células bem oxigenadas.

Foi postulado que o mecanismo de ação do CHC se realize através do aumento da captação de glucose em células bem oxigenadas levando a privação da glicólise em células hipóxicas.<sup>9</sup>

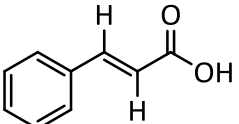
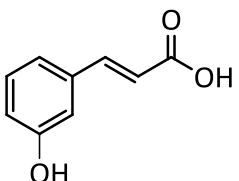
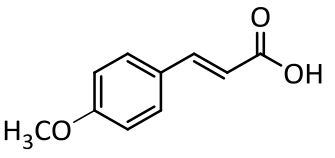
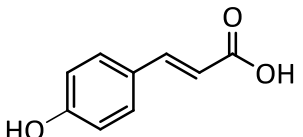
### 5. Síntese de análogos do $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico - CHC

Pelo que ficou descrito nos tópicos anteriores o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHC) é um inibidor do transportador MCT1 que tem vindo a ser estudado pelo seu potencial interesse a nível do controle do cancro da mama. No sentido de se encontrarem inibidores mais fortes do mesmo transportador foi proposto este projeto de síntese de análogos do CHC.

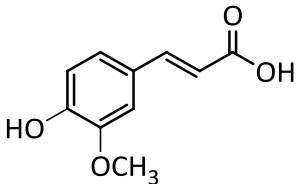
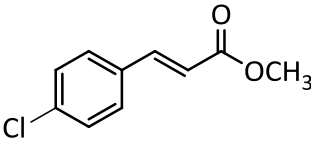
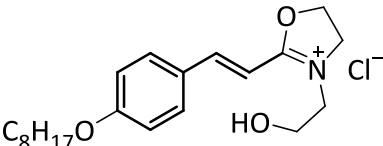
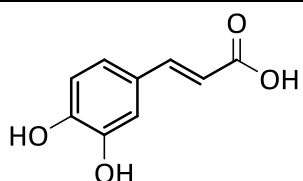
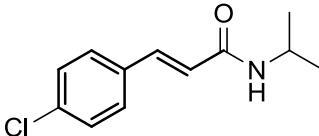
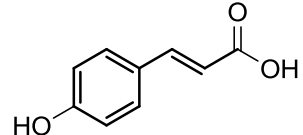
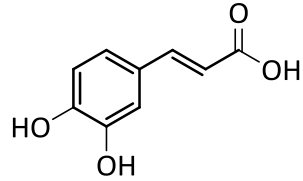
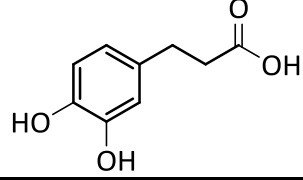
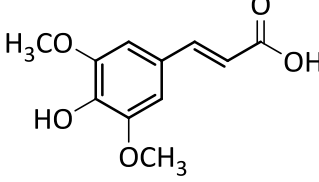
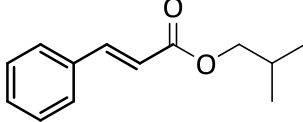
#### 5.1. Síntese de ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos pertencem a uma família relativamente grande de ácidos orgânicos que apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasítica e anticancerígena (ver tabela 3). Estes ácidos são também utilizados na síntese de macromoléculas e na síntese de várias classes de polímeros, sendo especialmente relevantes os que possuem atividade fotoquímica elevada devido à presença de grupos cinamoílo. <sup>45</sup>

Tabela 3 - Alguns derivados do ácido cinâmico com atividade farmacológica<sup>46</sup>

Derivados do ácido cinâmico	Estrutura	Atividade farmacológica
Ácido <i>trans</i> cinâmico		Atividade anti tuberculose e antiviral
Ácido <i>m</i> -hidroxi cinâmico		Atividade antidiabética
Ácido <i>p</i> -metoxi cinâmico		Antidiabético, hepato-protetor,
Ácido 4-hidroxicinâmico		Hepato-protetor

## Capítulo 1 – Introdução

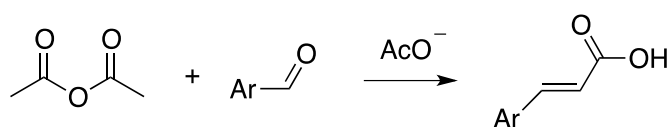
Ácido ferulico		Antioxidante, atividade antidiabética
4-Cloro cinamato de metilo		Atividade antifúngica
Cloreto de ( <i>E</i> )-3-(2-hidroxiethyl)-2-(4-(octiloxi)stiril)-4,5-dihidrooxaz-3-ônio		Atividade citotóxica
Ácido caféico		Antioxidante, hepato-protetor
( <i>E</i> )-3-(4-Clorofenil)- <i>N</i> -isopropil acrilamida		Atividade fungitóxica
Ácido <i>p</i> -cumarínico		Antioxidante
Ácido 3,4-dihidroxi cinâmico		Hepato-protetor
Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico		Atividade anti-colesterolémica
Ácido sinápico		Ansiolítico e antioxidante
Cinamato de isobutilo		Atividade antimicrobiana

## Capítulo 1 – Introdução

---

Os ácidos cinâmicos podem ser obtidos por várias abordagens sendo as mais importantes a reação de Perkin<sup>47</sup>, a condensação de Knoevenagel-Doebner<sup>48</sup> e a reação de Heck<sup>49</sup>. Apesar da variedade de métodos disponíveis o desenvolvimento de novos protocolos sintéticos continua a ser uma área de estudo.

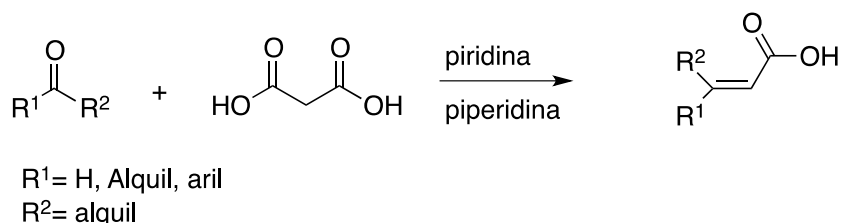
A reação de Perkin foi desenvolvida por Henry Perkin para a obtenção do ácido cinâmico (esquema 2). Consiste numa condensação aldólica entre um aldeído aromático e um anidrido, na presença de um sal alcalino de ácido carboxílico. O sal alcalino atua como catalisador. Além dos sais de ácidos podem ser usadas outras bases como catalisadores.



Esquema 2. Reação de Perkin

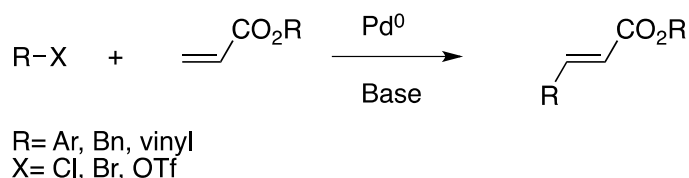
A reação de Perkin conduz a bons resultados quando ao anel aromático do aldeído se ligam grupos retiradores de elétrons. Na presença de grupos dadores de elétrons os rendimentos baixam significativamente. Nesse caso, a utilização de carbonato de potássio anidro como base e condições anidras permitem aumentar substancialmente o rendimento das reações.<sup>52</sup>

A reação de Knoevenagel é uma reação clássica de formação da ligação C-C do tipo condensação aldólica. A reação ocorre entre aldeídos ou cetonas e compostos de metileno ativo, sendo utilizadas aminas como catalisadores (esquema 3). A condensação de Knoevenagel do ácido malónico com compostos carbonílicos é uma via importante de síntese de ácidos insaturados substituídos na posição alfa. O método inclui preferencialmente a modificação Doebner que envolve o aquecimento de aldeídos aromáticos e do ácido malónico na presença de um excesso de piridina e piperidina que facilita a descarboxilação para gerar os compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados respetivos.<sup>53</sup>



Esquema 3. Reação de Knoevenagel-Doebner

A reação de Heck ocorre entre um complexo de paládio formado por reação com um haleto (Br, Cl) ou triflato de arilo, benzilo ou vinilo com um alqueno muitas vezes eletrodeficiente como seja o éster acrílico, e que contenha pelo menos um átomo de hidrogénio. O catalizador de paládio utilizado para gerar o complexo pode ser o cloreto de paládio ou o acetato de paládio (II). A complexação inclui um ligando geralmente a trifenilfosfina ou o BINAP (esquema 4).



Esquema 4. Reação de Heck

## 5.2. Síntese de análogos do ácido cinâmico

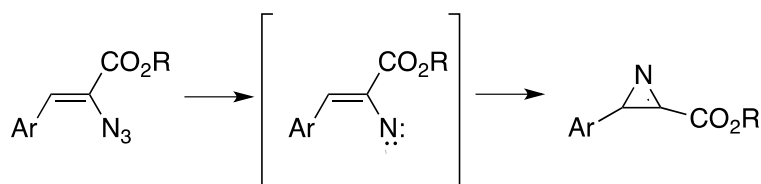
### 5.2.1. Síntese de aziridinas

Um dos métodos de síntese de aziridinas consiste na adição nucleofílica a 2H-azirinas. As 2H-azirinas são mais suscetíveis à adição nucleofílica que as correspondentes iminas, devido à tensão de anel que ocorre nestes pequenos heterociclos. Como no presente caso as aziridinas a obter devem conter um grupo ácido carboxílico, a adição nucleofílica está muito facilitada porque a conjugação entre a ligação C=N e o grupo carboxilato na posição 3 das 2H-azirinas de partida aumenta consideravelmente a eletrofilia do carbono adjacente.

## Capítulo 1 – Introdução

---

As 2*H*-azirinas correspondem ao menor sistema heterocíclico insaturado de azoto, com dois átomos de carbono e uma ligação dupla no anel de três membros. A sua obtenção ocorre por decomposição térmica ou fotolítica de vinilazidas com perda de azoto. O mecanismo de termólise parece originar vinil nitrenos como intermediários, conforme se descreve abaixo, para depois se formar o anel de três membros com bons rendimentos. No caso particular de alfa-azidocinamatos a termólise decorre com grande eficiência e bons rendimentos (esquema 5).

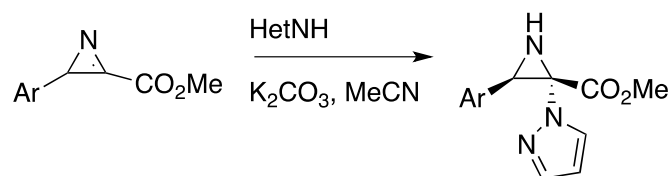


Esquema 5. Mecanismo proposto para a termólise de vinilazidas

A adição nucleofílica de aminas a 2*H*-azirinas resulta habitualmente na abertura do anel de três membros, no entanto quando o nucleófilo é um composto heteroaromático de azoto as aziridinas são mais estáveis devido à deslocalização do par de eletrões do azoto para o interior do anel heteroaromático.<sup>53</sup>

Num trabalho anterior<sup>54</sup>, a 2*H*-azirina carboxilato de metilo reagiu com uma série de nucleófilos *N*-heterocíclicos de cinco membros na presença de carbonato de potássio, à temperatura ambiente sendo os adutos obtidos com bons rendimentos. Um caso representativo destas adições apresenta-se no esquema 6. O mecanismo de adição é seletivo, ocorrendo exclusivamente na face contrária à que contem o grupo arilo na posição 2 da 2*H*-azirina ou seja seletividade *trans*. O produto foi isolado com o rendimento de 76 %. Após a adição nucleofílica a função éster terá que ser hidrolisada para se obter o respetivo ácido carboxílico.

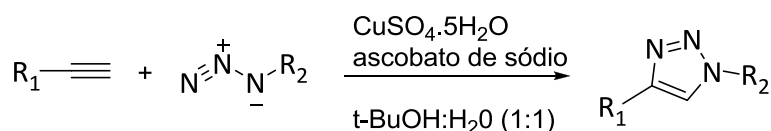




Esquema 6. Adição nucleofílica de um N-heterociclo a uma azirina

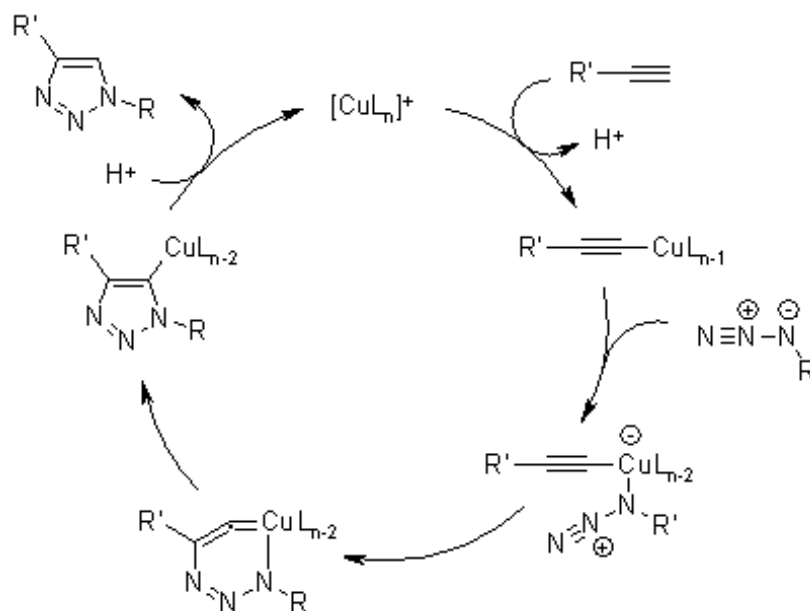
### 5.2.2. Síntese de triazóis

Os 1,2,3-triazóis podem ser obtidos por reação entre uma azida e um alcino terminal, com catálise de cobre (I). Trata-se de uma reação 1,3-dipolar em que se forma exclusivamente o *regio*-isómero 1,4-dissubstituído (Esquema 7). A reação é designada por "*click*", um termo introduzido por Sharpless<sup>55</sup>. Este tipo de reação origina rendimentos elevados, subprodutos facilmente removíveis por métodos não cromatográficos como sejam a cristalização ou a destilação, os processos são estereo-específicos, e a água é habitualmente um dos solventes da reação.<sup>50</sup>



Esquema 7. Reação do tipo *click chemistry*

O esquema 8 explica a proposta mecanística para o ciclo catalítico da reação: inicia-se com a formação de um acetileno de cobre (I) a partir de um alcino terminal e acetato de cobre (II); depois o par de eletrões do átomo de azoto ligado ao carbono ataca o cobre com formação de um anel de seis membros que inclui o cobre; o anel depois contrai para produzir um derivado de cobre triazolínico e finalmente após protonação do heterociclo o cobre é libertado para o meio.



Esquema 8. Proposta mecanística da reação 1,3-dipolar entre um acetileno terminal e uma azida alquílica

A reação com alcinos não terminais não pode ser catalisada por cobre. As reações não sendo catalisadas são mais lentas, mas podem eventualmente acontecer com aquecimento.<sup>51</sup>

## Capítulo 2

# Resultados e Discussão



### 1. Introdução

Devido ao metabolismo glicolítico característico de muitas células cancerígenas o lactato é produzido em grandes quantidades no interior dessas células e libertado para o meio extracelular promovendo a invasão, angiogênese e metástase.<sup>15</sup> O lactato é transportado para o meio extracelular pelas proteínas transmembranares, designados transportadores de monocarboxilatos (MCTs). Por isso a inibição destas proteínas pode ser uma boa estratégia para bloquear o crescimento e proliferação de tumores sólidos. O  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico (CHC) é conhecido por ser um composto ativo como inibidor de MCTs, mas é relatada uma baixa afinidade do composto ao transportador. Além do CHC outros derivados de ácidos cinâmicos têm sido descritos como potenciais anticancerígenos, como descrito anteriormente na tabela 3.<sup>52</sup> Por essa razão teria todo o interesse sintetizar derivados e análogos de ácido cinâmicos para posterior análise do seu potencial biológico.

Este projeto teve como principal objetivo sintetizar compostos análogos ao CHC através de várias estratégias com o intuito de melhorar a inibição dos transportadores de lactato. Após a sua síntese o poder inibitório dos compostos foi avaliado em duas linhas celulares de cancro de mama do subtipo basal, MDA-MB-468 e Hs578T.

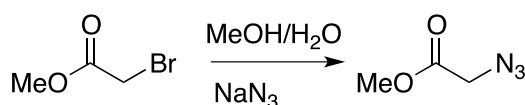
### 2. Síntese de reagentes de partida

Os transportadores de monocarboxilato, como o próprio nome indica transportam compostos contendo um grupo carboxilato. Todos os análogos do CHC sintetizados e testados neste trabalho respeitam esta regra. No entanto a síntese direta de derivados do ácido cinâmico alfa derivatizados não pareceu promissora após pesquisa bibliográfica e optou-se pela obtenção dos ésteres, cuja síntese está referida na literatura por exemplo para alfa azido cinamatos. A transformação do éster em ácido ocorreria por hidrólise no último passo da sequência reacional.

#### 2.1. Síntese de 2-azidoacetato de metilo (1)

O composto **1** é um reagente comercial, no entanto o seu custo justifica fazer a sua síntese no laboratório a partir do bromoacetato de metilo e azida de sódio.

A reação consiste na substituição nucleofílica  $S_N2$  do grupo bromo pelo grupo azido no alfa-bromoacetato de metilo. O processo implica o aquecimento de uma mistura de bromoacetato de metilo e azida de sódio em metanol: água 2:1 durante 4 h. O produto **1** foi obtido por evaporação dos solventes com o rendimento de 36%. O abaixamento de rendimento relativamente à síntese reportada na lit.<sup>53</sup> deverá ser devido a uma evaporação prolongada no evaporador rotativo, levando à evaporação parcial do produto no evaporador rotativo. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN do produto mostra o deslocamento do sinal do grupo metileno para maior desvio químico, devido ao maior poder retirador de densidade eletrónica do grupo azido comparativamente ao bromo. No espectro de infravermelho é particularmente relevante a banda a  $\nu_{\text{max}} = 2108 \text{ cm}^{-1}$  devida à tripla ligação do grupo azido.



**1**

Esquema 9. Síntese de 2-azidoacetato de metilo

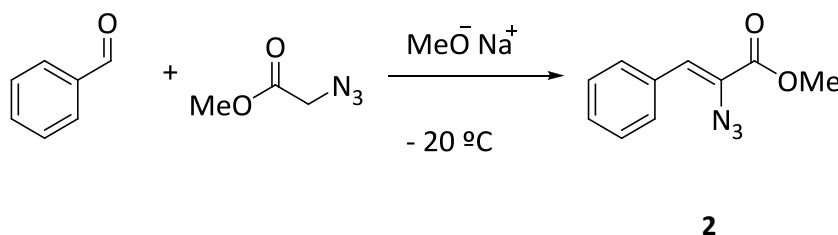
### 2.2. Síntese de 2-azido acrilatos de alquilo

A síntese de alfa-azido cinamatos de alquilo foi extensamente descrita por Hemestsberger.<sup>54</sup> O método consiste na condensação de Knoevenagel entre dois compostos carbonílicos na presença de uma base; trata-se uma variante da condensação aldólica. O grupo carbonilo de um dos compostos carbonílicos (o mais eletrofílico) é atacado pelo carbono alfa do outro composto carbonílico na forma enolística (nucleófilo). Finalmente por eliminação de água forma-se o sistema carbonílico alfa,beta-insaturado como produto. Nas sínteses de alfa-azido cinamatos deste trabalho o composto metilénico ativo (nucleófilo) é o éster alfa-funcionalizado com o grupo azido, e o eletrófilo um aldeído aromático.

A metodologia usada neste trabalho para a síntese dos ácidos acrílicos foi a descrita por Henn em 1984.<sup>55</sup>

#### 2.2.1. (*E*)-2-azido-3-fenilacrilato de metilo (2)

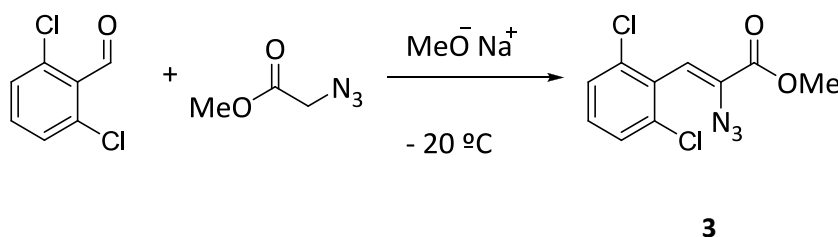
A condensação do benzaldeído com o alfa-azidoacetato de metilo **1** ocorre em metanol na presença de 1 equivalente de metóxido de sódio a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (esquema **10**). O 2-azido-3-fenilacrilato de metilo **2** forma-se com o rendimento de 58 %, abaixo do reportado da lit.<sup>56, 57</sup>. A identificação do produto foi obtida por espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN: H-3 surge como um singleto a desvio químico 6,93 ppm. O sinal dos prótons metilénicos do composto **1** desapareceu no espectro do produto. Os prótons aromáticos surgem como dois mutipletos, com deslocamento químico entre 7,42-7,32 ppm e 7,84-7,81 ppm. A caracterização do espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN encontra-se de acordo com o que está descrito:<sup>57</sup>. No espectro de IV é especialmente relevante uma banda característica do grupo azida a  $\nu_{\text{max}} = 2123\text{ cm}^{-1}$



Esquema 10. Síntese de (*E*)-2-azido-3-fenilacrilato de metilo

### 2.2.2. (*E*)-2-azido-3-(2,6-diclorofenil)acrilato de metilo (3)

Na síntese do composto **3**, o benzaldeído foi substituído pelo 2,6-diclorobenzaldeído, mantendo as condições reacionais indicadas para a síntese de **2**. O (*E*) 2-azido-3-(2,6-diclorofenil)acrilato de metilo foi obtido na forma de um sólido amarelo com o rendimento de 43 %, um rendimento inferior ao reportado na lit<sup>58</sup>. No espectro de <sup>1</sup>H RMN do produto verifica-se a presença do próton olefínico a  $\delta_H = 6,90$  ppm e dos três prótons aromáticos da unidade 2,6-diclorobenzeno. Os prótons aromáticos surgem como um duplete a  $\delta_H = 7,35$  ppm com constante de acoplamento de 8 Hz (prótons H-3' e H-5') e um triplete a  $\delta_H = 7,22$  ppm com uma constante de acoplamento de 8 Hz (H-4').

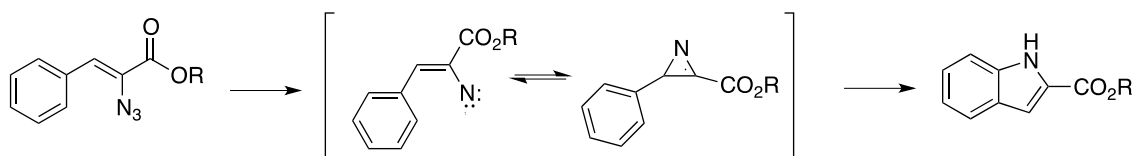


Esquema 11. Síntese de (*E*)-2-azido-3-(2,6-diclorofenil)acrilato de metilo

### 2.3. 2*H*-Azirina-3-carboxilatos de metilo

Os alfa-azido cinamatos de alquilo são compostos suscetíveis a processos de termólise e fotólise originando 2*H*-azirinas com libertação de azoto molecular. O primeiro autor a obter azirinas por termólise a partir de alfa-azido cinamatos foi Hemetsberger.<sup>54</sup> Neste caso as 2*H*-azirinas eram detetadas como intermediários na síntese de indóis. Foi proposto que o mecanismo de síntese dos indóis ocorresse por inserção do nitreno, em equilíbrio com a 2*H*-azirina nas condições reacionais, na posição alfa do anel benzénico espacialmente próximo (esquema **12**).

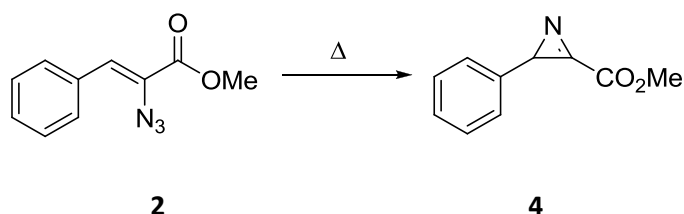




Esquema 12. 2H-azirinas como intermediários da síntese de indóis

### 2.3.1. 2-Fenil-2H-azirina-3-carboxilato de metilo (4)

A 2H-azirina **4** foi preparada por termólise do alfa-azido cinamato **2**, por refluxo em tolueno seco durante 2h. Foi obtido um óleo amarelo, com o rendimento de 92%.<sup>59</sup> A formação do anel de três membros foi verificada pela blindagem do próton do anel de 2H-azirina que surge no espectro de <sup>1</sup>H RMN a  $\delta_H = 3,49$  ppm e no de <sup>13</sup>C RMN a  $\delta_C = 51,9$  ppm, como era esperado pela sua ligação a um átomo de carbono  $sp^3$  (esquema 13).

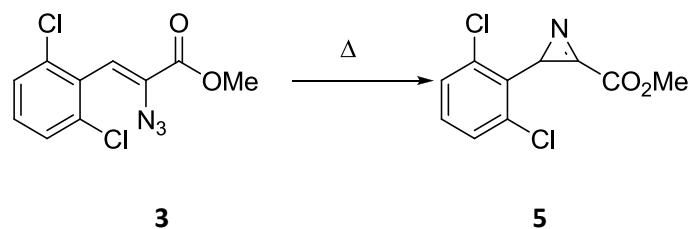


Esquema 13. Síntese de 2-Fenil-2H-azirina-3-carboxilato de metilo

### 2.3.2. 2-(2,6-Diclorofenil)-2H-azirina-3-carboxilato de metilo (5)

A 2H-azirina **5** foi sintetizada por termólise de 3-(2,6-diclorofenil) acrilato de metilo **3**. O óleo resultante da síntese foi recristalizado de *n*-hexano a  $-18$  °C, tendo sido obtido um sólido amarelado com o rendimento de 90 %, comparável com o referido na lit.<sup>58</sup> Tal como no caso anterior a síntese da 2H-azirina foi confirmada pelo espectro de <sup>1</sup>H RMN, ocorrendo um deslocamento do sinal do próton da cadeia carbonada para campo mais alto relativamente à olefina que lhe deu origem ( $\delta_H = 3,66$  ppm).

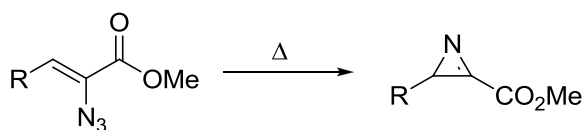
## Capítulo 2 – Resultados e Discussão



Esquema 14. Síntese de 2-(2,6-Diclorofenil)-2*H*-azirina-3-carboxilato de metilo

Na tabela 4 comparam-se os desvios químicos de H-3 e de C-3 dos alfa-azido cinamatos com os correspondentes H-2 e C-2 das 2*H*-azirinas.

Tabela 4.  $\delta_H$  e  $\delta_C$  azido cinamatos 2 e 3 e 2*H*-azirinas 4 e 5. (400 MHz ( $^1H$ ); 100 MHz ( $^{13}C$ ),  $CDCl_3$ , TMS).

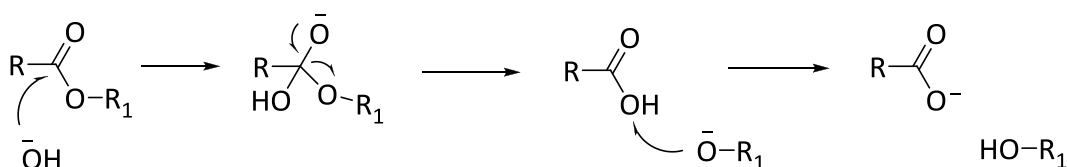


Composto	R	H-3/2 (ppm)	C-3/2 (ppm)
Azido cinamato 2	Fenilo	6,93	125,5
Azirina 4		3,49	51,9
Azido cinamato 3	Diclorofenilo	6,90	131,0
Azirina 5		3,66	35,7

### 1. Síntese de compostos finais

#### 1.1. Ácidos 2-azido acrílicos:

É sabido que os ésteres dos ácidos carboxílicos hidrolisam quando aquecidos em soluções aquosas ácidas ou básicas, com formação dos respectivos ácidos carboxílicos. Em condições alcalinas, obtém-se o ácido carboxílico sob a forma de sal de carboxilato, o qual por adição de um ácido forte gera o ácido carboxílico. O mecanismo da hidrólise dos ésteres ocorre com a adição do íon hidroxilo ao carbonilo do éster seguida de eliminação do íon alcóxido (esquema 15). Os ácidos cinâmicos **7** e **8** foram obtidos sem qualquer problema de seletividade. Se alguma adição 1,4 ocorre, a eliminação conjugada prevalece.



Esquema 15. Mecanismo de hidrólise de ésteres

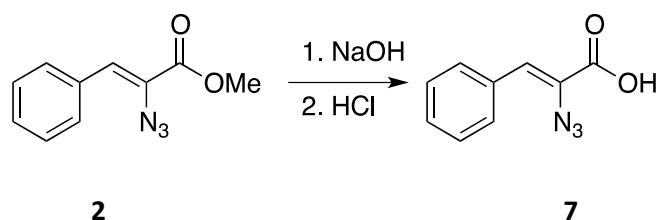
Com este método foram obtidos os derivados dos dois ácidos cinâmicos, substituídos na posição alfa pelo grupo azido.

##### 1.1.1. Ácido (*E*)-2-azido-3-fenilacrílico (**7**)

A hidrólise do alfa-azido cinamato de metilo **2** foi efetuado por dissolução do éster numa solução aquosa de NaOH 1M, à temperatura ambiente. O ácido acrílico **7** foi obtido após neutralização HCl 1M, com o rendimento de 100 %. A identificação do composto foi feita principalmente pela ausência do sinal correspondente ao próton metílico no espectro de  $^1\text{H}$  RMN. O sinal de H-3 surge como um singlete a  $\delta_{\text{H}} = 7,98$  ppm e os prótons aromáticos surgem como dois multipletos com desvios químicos semelhantes ao do seu precursor, composto **2**. No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN é de salientar a ausência do carbono associado ao éster metílico. A

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

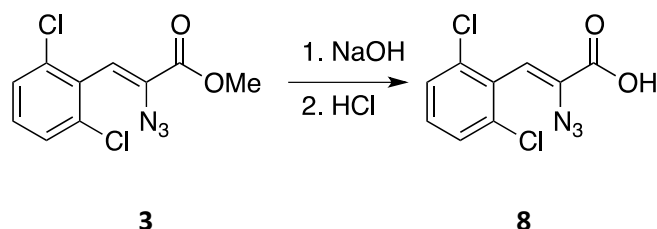
introdução do grupo hidroxilo é também observada no espectro de IV com a presença de uma banda larga entre  $\nu_{\max} = 3500$  e  $\nu_{\max} = 2500 \text{ cm}^{-1}$ .



Esquema 16. Síntese de ácido (*E*)-2-azido-3-fenilacrílico

### 1.1.2. Ácido (*E*)-2-azido-3- (2,6-diclorofenil) acrílico (8)

A reação de hidrólise do acrilato **3** decorreu segundo o método descrito para ácido **7**. Também neste caso o ácido acrílico **8** foi obtido com rendimento quantitativo. Tal como no caso anterior, a identificação do produto foi feita pelo desaparecimento do sinal do grupo metilénico do acrilato **3** no espectro de <sup>1</sup>H RMN. Como resultado da hidrólise do éster metílico os prótons e o carbono associado ao grupo OCH<sub>3</sub> não são visíveis no espectro de <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN, o que indica a presença do grupo ácido carboxílico. A função ácida carboxílica é visível no espectro de IV como uma banda larga entre  $\nu_{\max} = 3500$  e  $\nu_{\max} = 2500 \text{ cm}^{-1}$ .



Esquema 17. Síntese de Ácido (*E*)-2-azido-3- (2,6-diclorofenil) acrílico

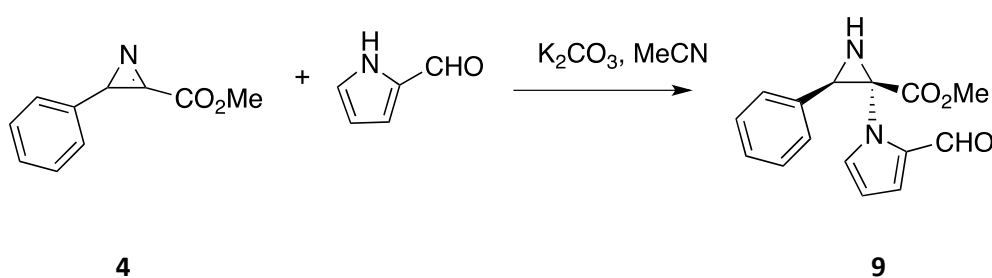
### 1.2. Ácido 2*H*-aziridina 2-carboxílico substituído em $\alpha$ por grupos heteroaromáticos

As aziridinas são heterociclo saturados de três membros que contem um átomo de azoto inserido no anel. A basicidade do átomo de azoto é muito menor do que a de uma amina de cadeia linear devido à contribuição das orbitais p na construção do anel. As aziridinas podem ser obtidas por adição de nucleófilos a 2*H*-azirinas, mas nem sempre este processo preserva o anel de três membros. Sabe-se que nucleófilos de azoto e oxigênio habitualmente conduzem à abertura do anel, mas nucleófilos de enxofre geram aziridinas que podem ser isoladas. O mesmo acontece com nucleófilos heteroaromáticos de azoto como já foi explicado acima.<sup>49</sup>

#### 1.2.1. Ácido 2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxílico (10)

##### i) Obtenção de 2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxilato de metilo (9)

A aziridina **9** foi preparada a partir da 2*H*-azirina **4**, por adição do pirrol-2-carboxaldeído em acetonitrilo em presença de carbonato de potássio (6 eq.). A reação procedeu sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 30 min, sendo o produto recolhido com o rendimento de 39 %, após purificação por cromatografia de “dry-flash” (esquema **18**).



Esquema 18. Síntese de 2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxilato de metilo

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

---

No espectro de  $^1\text{H}$  RMN do produto pode observar-se o sinal relativo a H-3 a  $\delta_{\text{H}} = 3,97$  ppm na forma de singlete e sinais relativos a oito prótons aromáticos: 5H do grupo fenilo e 3H do anel de pirrol. Os prótons H-2'' e H-6'' do grupo fenilo surgem como um duplete a  $\delta_{\text{H}} = 7,51$  ppm com constante de acoplamento de 7,2 Hz; os sinais de H-3'', H-4'' e H-5'' surgem sobrepostos com o sinal correspondente aos prótons H-3' ou H-5' do anel de pirrol, aparecendo como um multiplete a  $\delta_{\text{H}} = 7,41-7,31$  ppm. Os outros sinais correspondentes aos prótons do anel de pirrol surgem como duplos dupletos: um a  $\delta_{\text{H}} = 7,37$  ppm com constantes de acoplamento de 4 e 1,6 Hz, com integração para dois prótons, corresponde a H-3' e H-5'; outro a  $\delta_{\text{H}} = 6,33$  ppm com constante de acoplamento de 4 e 2,4 Hz, que corresponde a H-4'. Este próton encontra-se a campo mais alto relativamente aos outros prótons do pirrol devido à proteção exercida pela unidade enamina do sistema aromático do pirrol. O próton da função aldeído surge como um singlete com um desvio químico de 9,64 ppm.

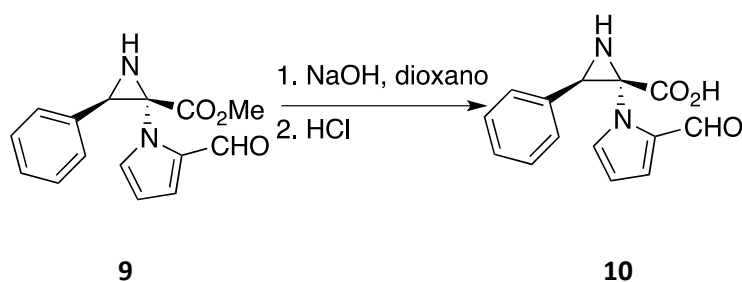
No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN aparecem 10 carbonos aromáticos, dos quais 6 carbonos pertencem ao grupo fenilo, com deslocamento químico entre 132,9 e 127,5 ppm; os carbonos do grupo pirrol surgem a  $\delta_{\text{C}} = 124,7$  (C-3' ou C-5') e  $\delta_{\text{C}} = 110,0$  (C-4'). Como acontece no espectro de  $^1\text{H}$  RMN o sinal do carbono correspondente a C-3' ou C-5' encontra-se sobreposto com os sinais do grupo fenilo ( $\delta_{\text{C}} = 132,9$  a 127,5 ppm)

Os dois carbonos do anel de aziridina surgem na zona alifática um a  $\delta_{\text{C}} = 57,4$  ppm (C-2) e a  $\delta_{\text{C}} = 49,7$  ppm (C-3). O carbono do grupo metoxilo aparece na mesma zona a  $\delta_{\text{C}} = 53,2$  ppm. O carbono carbonílico do grupo aldeído aparece com deslocamento químico de 178,7 ppm e o carbono carbonílico do éster surge a  $\delta_{\text{C}} = 167,0$  ppm.

A função aldeído também é observada no espectro de IV a  $1721\text{ cm}^{-1}$ , assim como a dupla ligação C=O a  $\nu_{\text{max}} = 1748\text{ cm}^{-1}$ .

### ii) Hidrólise do éster 9

O éster da aziridina 9 foi hidrolisado por tratamento com NaOH 1M aquoso em dioxano, sendo obtido o ácido 10 na forma de um óleo laranja, após neutralização com HCl 1M, com o rendimento de 84 % (esquema 19).



Esquema 19. Síntese de Ácido 2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxílico

O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN também apresenta sinais semelhantes ao do éster precursor. Destaca-se ainda que como acontece no espectro de  $^1\text{H}$  RMN, é visível dois sinais correspondentes a função aldeído a  $\delta_{\text{C}} = 181,5$  ppm e a  $\delta_{\text{C}} = 180,7$  ppm.

A introdução do grupo hidroxilo é visível na espectroscopia de IV pelo deslocamento da banda correspondente a dupla ligação C=O para valores inferiores,  $1659\text{ cm}^{-1}$ .

### 1.2.2. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il)aziridina-2-carboxílico (12)

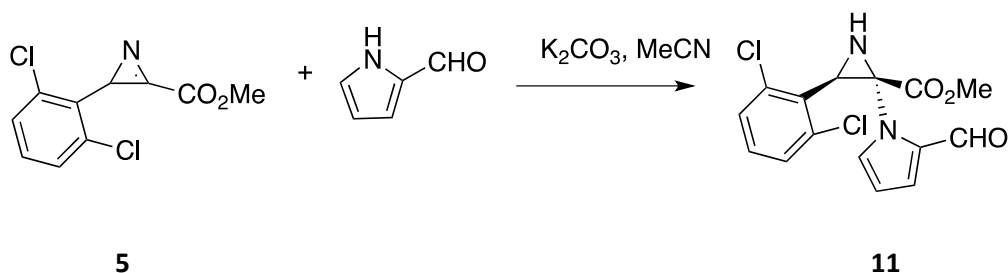
#### i) Obtenção de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il)aziridina-2-carboxilato de metilo (11)

Fez-se reagir a 2*H*-azirina **5** com pirrol-2-carboxaldeído em acetonitrilo na presença de 6 equivalentes de carbonato de potássio, à temperatura ambiente durante 30 minutos. Obteve-se o produto **11** com 59% de rendimento, após purificação por cromatografia de “dry-flash”.<sup>49</sup>

Como esperado o espectro de  $^1\text{H}$  RMN assemelha-se ao espectro do composto **9**. O próton H-3 surge na forma de singleto a  $\delta_{\text{H}} = 3,57$  ppm, e existem mais 6 prótons aromáticos: 3H pertencentes ao grupo fenilo e 3H pertencentes ao pirrol. Os prótons do grupo fenilo H-3'' e H-5'' surgem como um multipeto a  $\delta_{\text{H}} = 7,40 - 7,31$  ppm e H-4'' aparece como um tripla dupleta a  $\delta_{\text{H}} = 7,24$  ppm com  $J = 0,8$  e 4Hz. O sinal correspondente ao anel de pirrol H-5' surge a  $\delta_{\text{H}} = 7,55 - 7,54$  na forma de multipeto, o H-3' surge na forma de duplo tripla a  $\delta_{\text{H}} = 7,24$

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

ppm e o próton H-4' aparece a  $\delta_H = 6,32$  na forma de duplo duplete com constantes de acoplamento de 4 e 2,4 Hz.



Esquema 20. Síntese de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1H-pirrol-1-il) aziridina-2-carboxilato de metilo

### ii) Hidrólise do éster **11**

A hidrólise do composto **11**, tal como já tinha acontecido para o composto **9**, ocorreu por tratamento com NaOH 1M aquoso em dioxano, obtendo-se após neutralização com HCl 1M, o ácido **12** com um rendimento de 86 %.

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto **12** evidencia a hidrólise do grupo éster, que é dada pela ausência do grupo metoxilo. No espectro o próton H-3 surge como um singlete muito próximo do valor de deslocamento químico do éster **11** a  $\delta_H = 4,03$  ppm. Os 6 prótons aromáticos tanto do fenilo como do pirrol surgem com deslocamentos químicos semelhantes aos correspondentes do éster. Os 3H do grupo fenilo aparecem na forma de duplete com constante de acoplamento de 8 Hz a  $\delta_H = 7,47$  ppm (H-3'' e H-5'') e de um triplete de dupletos com  $J = 0,8$  e 8,0 Hz a  $\delta_H = 7,34$  ppm (próton H-4''). Os prótons H-3' e H-4' do anel de pirrol aparecem ambos como duplos dupletos, um a  $\delta_H = 7,28$  ppm, com constante de acoplamento de 1,6 e 4,0 Hz, e outro a  $\delta_H = 6,44$  ppm com constante de acoplamento de 2,8 e 4,0 Hz respetivamente; o próton H-5' surge na forma de multiplete a  $\delta_H = 7,78 - 7,77$  ppm.

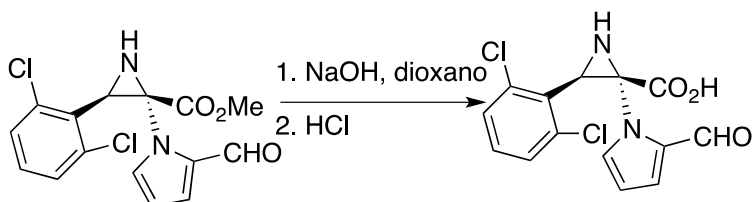
O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN apresenta 10 sinais: 6 correspondentes aos carbonos do grupo fenilo e 4 do pirrol. Os carbonos quaternário do grupo fenilo surgem a  $\delta_C = 134,8$  ppm (ligados aos átomos de cloro) e a  $\delta_C = 130,6$  ppm (C-1''); os carbonos CH aparecem entre  $\delta_C = 129,8 - 128,1$  ppm. Os CH do anel de pirrol surgem a  $\delta_C = 132,2$  (C-5'), 126,9 (C-3') e 110,2 (C-4') ppm. A razão do deslocamento químico para valores mais baixos de C-4' é devido a blindagem a que estes sofrem devido à corrente eletrónica do anel. Na zona alifática surgem os 2 carbonos do



## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

anel de aziridina, um quaternário a  $\delta_c = 59,2$  ppm e um CH a  $\delta_c = 44,5$  ppm. O carbono do carbonílico do aldeído aparece a  $\delta_c = 180,6$  ppm e o carbono carbonílico do ácido carboxílico a  $\delta_c = 171,5$  ppm.

No espectro de IV surgem 3 bandas características: uma a  $\nu_{\max} = 2730$   $\text{cm}^{-1}$  correspondente a ligação do C-H da função aldeído, outra a  $\nu_{\max} = 1709$   $\text{cm}^{-1}$  correspondente a dupla ligação C=O do grupo aldeído e outra a  $\nu_{\max} = 1652$   $\text{cm}^{-1}$  correspondente a dupla ligação C=O do grupo ácido carboxílico.



Esquema 21. Síntese de ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1H-pirrol-1-il) aziridina-2-carboxílico

11

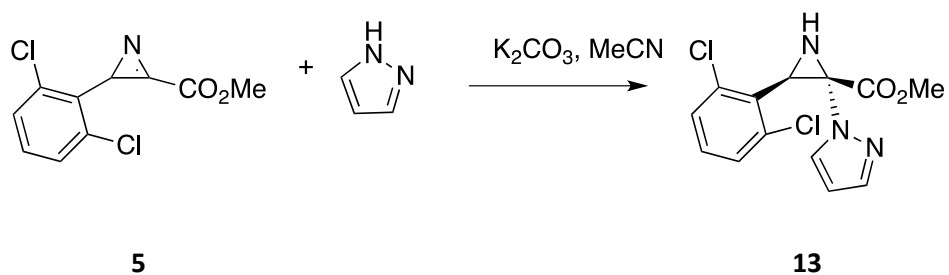
12

### 1.2.3. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1H-pirazol-1-il) aziridina-2-carboxílico (14)

#### i) Obtenção de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1H-pirazol-1-il) aziridina-2-carboxilato de metilo (13)

A aziridina **13** foi obtida a partir da 2H-azirina **5** por adição de pirazol em acetonitrilo na presença de carbonato de potássio, à temperatura ambiente (esquema **23**). O produto foi obtido com o rendimento de 79 % após purificação por cromatografia de “dry-flash”. O composto é conhecido e foi obtido pelo método referido na lit.<sup>49</sup>

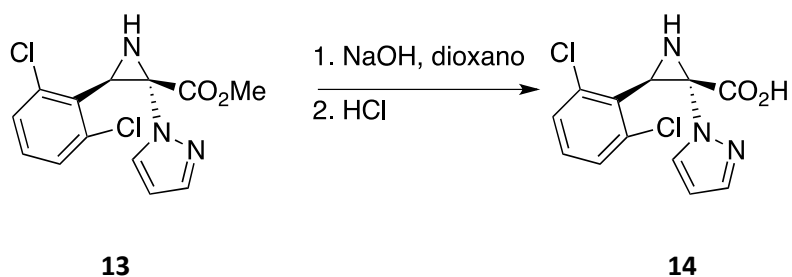
A análise espectroscópica de  $^1\text{H}$  RMN confirma a formação da aziridina **13**, pelo surgimento de três singletos que foram atribuídos ao anel de pirazol: a  $\delta_H = 7,89$  ppm, a  $\delta_H = 7,65$  ppm e a  $\delta_H = 6,35$  ppm. A integração de cada um destes sinais corresponde a 1H, tal como o sinal devido a H-2 e aos três prótons aromáticos, o que garante que os prótons pertencem à mesma molécula.



Esquema 22. Síntese de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1H-pirazol-1-il) aziridina-2-carboxilato de metilo

### ii) Hidrólise do éster **13**

A aziridina **13** foi hidrolisada por tratamento com NaOH 1M aquoso em dioxano obtendo-se o composto **14** com o rendimento 67 %, após neutralização com HCl 1M.



Esquema 23. Síntese de ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1H-pirazol-1-il) aziridina-2- carboxílico

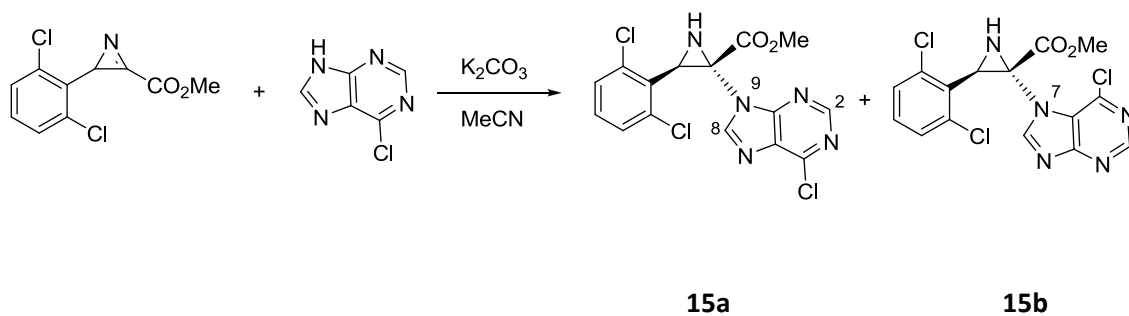
O composto **14** foi identificação especialmente por espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  RMN do grupo carbonilo, que surge com desvio químico superior ( $\delta_c = 170,9$  ppm) e pela ausência do grupo metoxilo no espectro de  $^1\text{H}$  RMN.

### 1.2.4. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)- 2-(6-cloro-9*H*-purin-9-il) aziridina-2-carboxílico (16a) e ácido 3-(2,6-diclorofenil)- 2-(6-cloro-7*H*-purin-7-il) aziridina-2-carboxílico (16b)

#### i) Obtenção de 2-(6-cloro-9*H*-purin-9-il)-3-(2,6-diclorofenil) aziridina-2-carboxilato de metilo (15a) e de 2-(6-cloro-7*H*-purin-7-il)-3-(2,6-diclorofenil) aziridina-2-carboxilato de metilo (15b)

A azirina **3** reagiu com a 6-cloropurina, na presença de carbonato de potássio em suspensão em acetronitrilo, à temperatura ambiente durante 30 min. Esta reação originou, uma mistura de régio-isómeros substituídos em N-9 e em N-7 na proporção 2:1.<sup>60</sup>

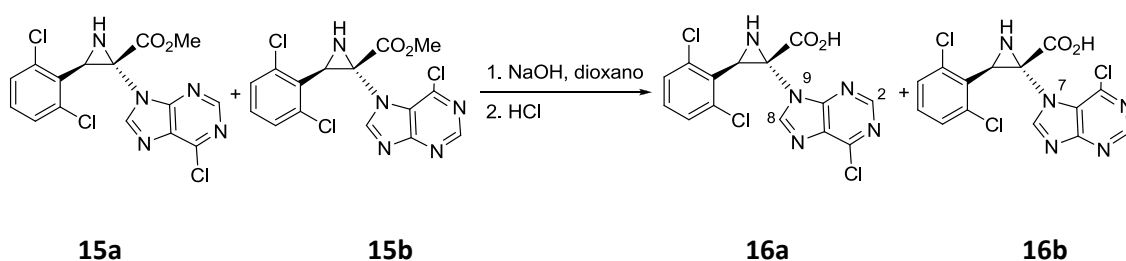
Após recristalização da mistura reacional um dos isómeros foi isolado como um sólido alaranjado com o rendimento 54 %. O restante material (27%) é um sólido mais pálido constituído por uma mistura dos isómeros com proporção 2:1 de acordo com o espectro de <sup>1</sup>H RMN, em que o isómero isolado anteriormente esta em menor quantidade. A identificação dos dois régio-isómeros deveria ser feita com base no espectro de NOE do único isómero isolado. Esse isómero apresenta os sinais dos dois prótons do núcleo da purina um a  $\delta_H = 8,81$  ppm e outro a  $\delta_H = 8,57$  ppm. A irradiação do sinal a  $\delta_H = 8,81$  ppm aumenta a intensidade dos sinais a  $\delta_H = 4,04$  ppm, correspondente a H-3, e a  $\delta_H = 3,63$  ppm, correspondente ao grupo Me. A irradiação do sinal a  $\delta_H = 8,57$  ppm apenas aumenta a intensidade de H-3. O efeito esperado para isómero N-9 seria que a irradiação de H-8 (purina) aumentasse os dois picos na zona alifática do espectro correspondente a H-3 (aziridina) e ao grupo metilo, e a irradiação de H-2 (purina) provocasse o mesmo tipo de efeito. Por outro lado, o efeito esperado para o isómero N-7 seria que a irradiação de H-8 aumentasse os dois pico da zona alifática do espectro, correspondente a H-3 e ao grupo metilo, mas a irradiação de H-2 não deveria afetar o sinal devido ao grupo Me, mas ficam dúvidas relativamente a H-3. Sendo assim parece mais provável que o isómero isolado seja N-7, mas esta identificação não posso ser considerada definitiva.



Esquema 24. Síntese de 2-(6-cloro-9H-purin-9-il)-3-(2,6-diclorofenil) aziridina-2-carboxilato de metilo e de 2-(6-cloro-7H-purin-7-il)-3-(2,6-diclorofenil) aziridina-2-carboxilato de metilo

### ii) Hidrólise dos ésteres 15a e 15b

A mistura dos compostos **15a** e **15b** foi hidrolisada através do tratamento com NaOH 1M. Após neutralização com HCl 1M obteve-se os respectivos ácidos carboxílicos, com um rendimento de 70%.



Esquema 25. Síntese de Ácido 3-(2,6-diclorofenil)- 2-(6-cloro-9H-purin-9-il) aziridina-2-carboxílico e ácido 3-(2,6-diclorofenil)- 2-(6-cloro-7H-purin-7-il) aziridina-2-carboxílico

Verificou-se que a reação de hidrólise ocorreu pelo desaparecimento dos grupos metoxilos de ambos os isómeros nos espectros de  $^1H$  RMN e  $^{13}C$  RMN. Observa-se também pela espectroscopia de infravermelho uma banda característica correspondente a ligação do C=O do grupo ácido carboxílico a  $\nu_{max} = 1662\text{ cm}^{-1}$ .

### 1.3. Síntese de ácidos triazolínicos

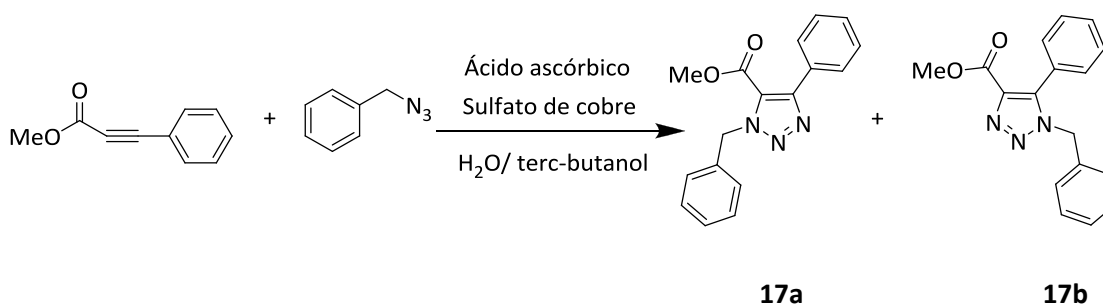
Os 1,2,3-triazóis são heterociclos aromáticos de 5 membros contendo 2 átomos de carbono e 3 átomos de azoto. Os 1,2,3-triazóis substituídos podem ser obtidos através uma reação de click chemistry que consiste na reação 1,3 dipolar entre uma azida com um acetileno, catalisada com cobre a temperatura ambiente. No caso dos acetilenos funcionalizados, a reação acontece por aquecimento, já que não pode ser catalisada por não conterem o protão terminal.

A estratégia usada para a síntese dos ácidos triazolínicos consistiu em sintetizar os ésteres metílicos dos 1,2,3-triazóis para posteriormente serem hidrolisados e obter-se os ácidos correspondentes.

#### 1.3.1. Ácidos 1-benzil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazole-5-carboxílico (18) e 1-benzil-5-fenil-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxílico (19)

##### i) Obtenção de 1-benzil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazole 5-carboxilato de metilo (17a) e de 1-benzil-5-fenil-1*H*-1,2,3-triazole 4-carboxilato de metilo (17b)

A reação entre a benzilazida e o 3-fenilpropiolato de metilo em presença de ácido ascórbico e sulfato de cobre em H<sub>2</sub>O/ terc-butanol 1:1. Após refluxo durante 19 h, originou-se uma mistura de dois 1,2,3 triazole régio-isómeros c.a. 1:1, com um rendimento global de 81 % (41 % correspondente ao isómero 4-fenil e 39 % ao isómero 5-fenil).



Esquema 26. Síntese de 1-benzil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazole 5-carboxilato de metilo e de 1-benzil-5-fenil-1*H*-1,2,3-triazole 4-carboxilato de metilo

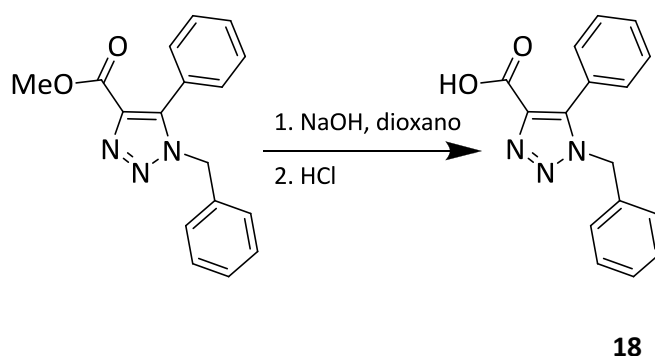
## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

A identificação dos isómeros foi feita pela técnica espectroscópica de HMBC. O espectro em que os prótons do CH<sub>2</sub> a  $\delta_H = 5,45$  ppm apresentam correlação a longa distância com o carbono da dupla ligação ligado diretamente ao grupo fenil a  $\delta_C = 141,4$  ppm, corresponde ao isómero **17b**.

A formação dos compostos **17** pode-se verificar primeiro pela alteração do desvio químico dos prótons do CH<sub>2</sub> do grupo benzil no espectro de <sup>1</sup>H RMN, de  $\delta_H = 4,3$  ppm para  $\delta_H = 5,42$  ppm no caso do isómero **17a** e para  $\delta_H = 5,94$  ppm no caso do **17b**. A mesma alteração do desvio químico para campo mais baixo acontece com os carbonos insaturados no espectro de <sup>13</sup>C RMN, que nos produtos surgem na zona aromática.

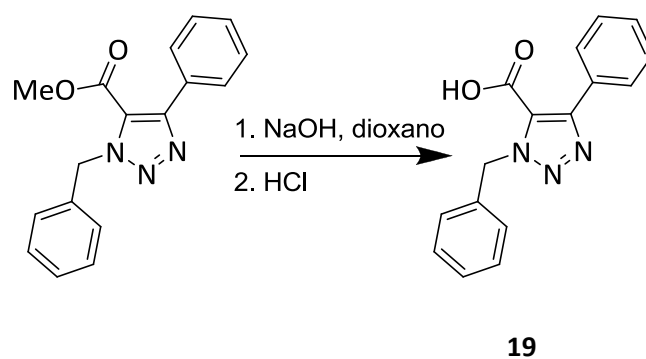
### ii) Hidrólise dos ésteres **17a** e **17b**

O éster do triazol **17a** foi hidrolisado a través do tratamento com NaOH 1M durante 30 min a temperatura ambiente. Foi obtido o respetivo ácido, após neutralização com HCl 1M. Pela análise de espectroscopia de <sup>1</sup>H RMN do produto, verificou-se que o singlete característico do grupo metilo do composto **17a**, tinha desaparecido.



Esquema 27. Síntese de ácidos 1-benzil-4-fenil-1H-1,2,3-triazole-5-carboxílico

A reação de hidrólise do triazol **17b** decorreu segundo o método descrito para ácido **18**. Também neste caso o ácido triazolico **19** foi obtido com rendimento quantitativo. Igual que no caso anterior, a identificação do produto é feita pelo desaparecimento do sinal do grupo metilénico do triazol **17b** no espectro de <sup>1</sup>H RMN



Esquema 28. Síntese de 1-benzil-5-fenil-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxílico

### 1. Avaliação dos ensaios biológicos dos derivados do CHC

As linhas celulares de cancro da mama humano usadas neste trabalho foram a MDA-MB-468 e Hs578T, ambas do subtipo basal ou também chamadas de “triple negative” uma vez que não possuem recetores de estrogénio (ER), progesterona (PR) e “Human Epidermal Growth Factor Receptor 2” (HER2), sendo por isso um subtipo de cancro da mama bastante agressivo e sem terapia dirigida. Por esta razão, e por expressarem MCTs na membrana plasmática, principalmente MCT1, foram escolhidas para avaliar a viabilidade celular e o poder inibitório no metabolismo celular dos compostos sintetizados.

#### 1.4. Viabilidade celular

Os compostos **7**, **8**, **10**, **12**, **14**, **16**, **18** e **19** foram usados para inibir o transporte de lactato nas células cancerígenas. O  $IC_{50}$  foi avaliado pelo ensaio da Sulforodamina B. Este ensaio é bastante utilizado para a monitorização da citotoxicidade *in vitro* (medida da biomassa total), através da coloração de proteínas celulares com Sulforodamina B. Este ensaio foi selecionado por outros métodos não serem tão adequados, já que ao inibir os MCTs estamos a interferir com o metabolismo das células e os ensaios convencionais (MTT, MTS, etc.) tem como base na redução metabólica de compostos.

Decidiu-se testar também o ácido cinâmico **AC** (figura **3**), já que possui a estrutura base do inibidor mais descrito para os MCTs (CHC), para se ter uma ideia da importância do grupo nitrilo em posição  $\alpha$  relativamente ao ácido carboxílico da molécula.

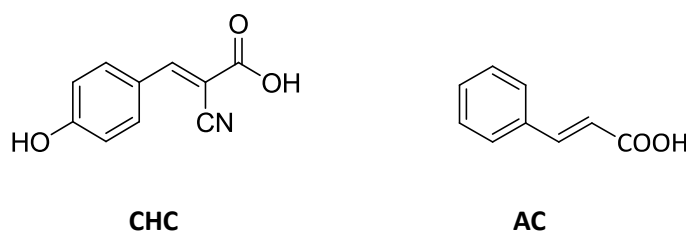


Figura 3. Estrutura do CHC e do ácido cinâmico



## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

Em estudos anteriores do grupo de investigação, o IC<sub>50</sub> do CHC foi determinada em ambas linhas celulares. Na linha celular Hs578T, o CHC apresenta um IC<sub>50</sub> de 11,45 mM e na linha MDA-MB-468 o IC<sub>50</sub> apresentado é de 9,60 mM.<sup>61</sup>

As células de ambas as linhas celulares, foram tratadas com varias concentrações dos compostos: 1 mM, 0,5 mM, 2,5 mM e 0,1 mM, e incubadas durante 24 horas. Os resultados são mostrados nas figuras 4 e 5.

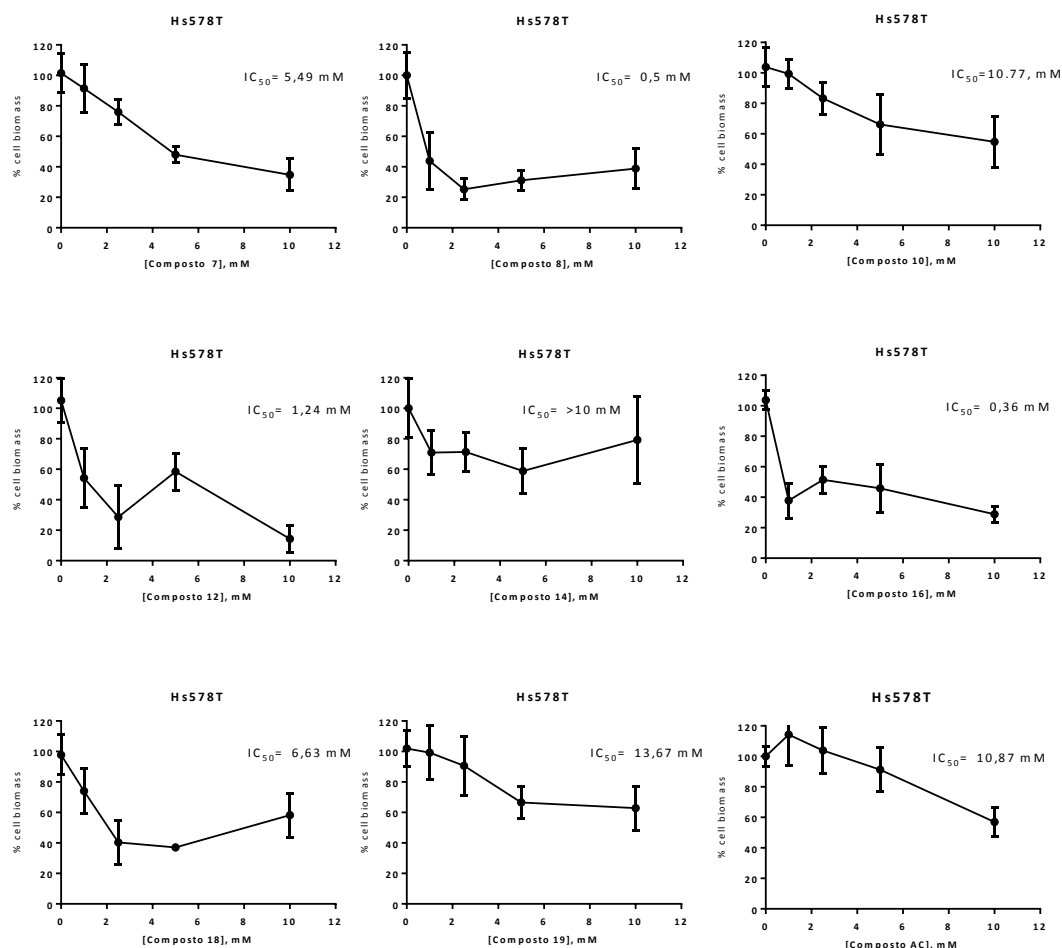


Figura 4. Efeitos dos diferentes compostos na viabilidade celular da linha celular HS578T

Na linha celular Hs578T os compostos **8**, **12**, **14** e **16** são os que mais sensibilizaram as células tumorais. (Figura 4)

As células MDA-MB-468 são mais sensíveis aos compostos **10**, **18** e **19**. (Figura 5)

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

O composto **8** é um dos compostos com o  $IC_{50}$  mais baixo em ambas as linhas celulares e no caso do **AC** não existe uma diferença significativa entre as duas linhas.

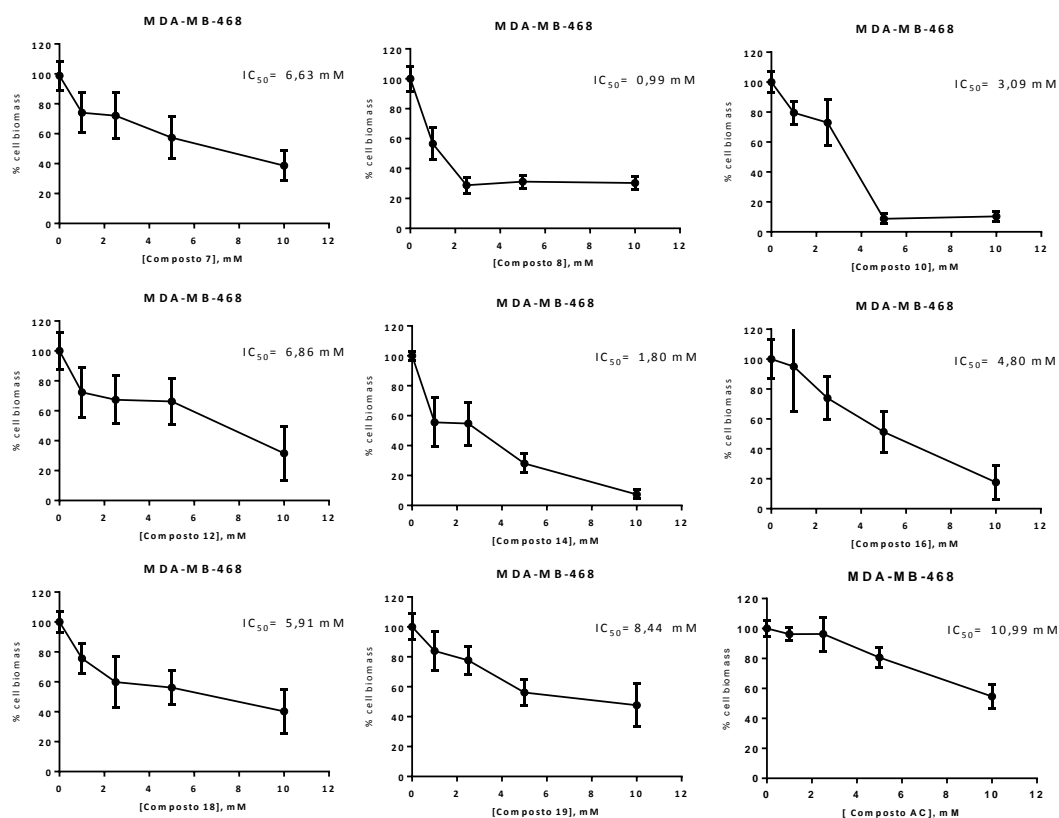
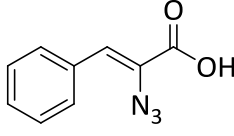
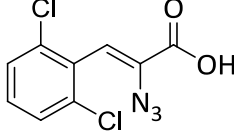
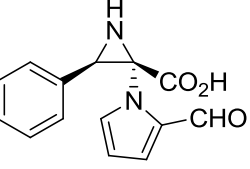
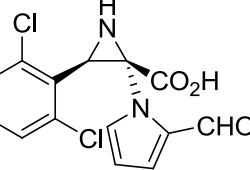
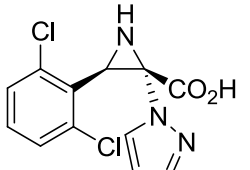
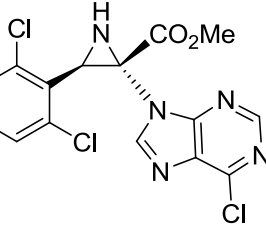


Figura 5. Efeitos dos diferentes compostos na viabilidade celular da linha celular MDA-MB-468

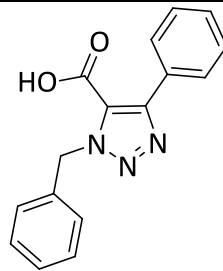
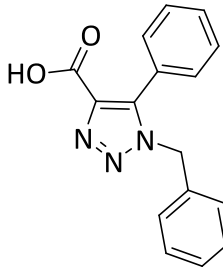
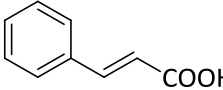
A tabela **5** resume e compara os efeitos de diversos compostos relativamente as duas linhas celulares. As colunas da direita indicam a potenciação dos diferentes compostos relativamente ao CHC. Observa-se que os compostos que potenciam mais a inibição são o **16** no caso da linha Hs578T e o composto **8** na linha MDA-MB-468.

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

Tabela 5. Valores de IC<sub>50</sub> calculados, valores de IC<sub>50</sub> usados para ensaios posteriores e potenciação dos compostos sintetizados em comparação ao CHC.

Composto	HS578T			MDA-MB-468		
	IC <sub>50</sub> calculado (μM)	IC <sub>50</sub> Usado (μM)	Potenciação HS578T em comparação ao CHC	IC <sub>50</sub> calculado (μM)	IC <sub>50</sub> Usado (μM)	Potenciação MDA-MB-468 em comparação ao CHC
 7	5,490	6	1,6	6,630	6,5	1,5
 8	0,02	0,5	20	0,9905	1	10
 10	10,77	10	1	3,092	3	3
 12	1,241	1	10	6,868	7	1,4
 14	>10	10*	1	1,807	2	5
 16	0,3617	0,4	25	4,804	5	2

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

 <b>18</b>	6,631	6,5	1,5	5,915	6	1,6
 <b>19</b>	13,67	10	1	8,444	8	1,25
 <b>AC</b>	10,87	10	1	10,99	10	1

Os inibidores dos MCTs têm influência nas células cancerígenas através da interação dos mesmos com o sítio ativo dos transportadores. Estes inibidores, como os substratos, devem possuir como função principal um ácido carboxílico. Esta função ácido está na forma de sal no interior da célula, pelo que pode interagir ionicamente com um grupo com carga positiva que se encontre no sítio ativo do transportador.

Os compostos **7** e **8** são ácidos acrílicos portadores de um grupo fenilo e 2,6-diclorofenilo, respetivamente. Verificamos que o ácido acrílico **8** que contem o grupo 2,6-diclorofenilo é mais potente que o composto **7**. Isto indica-nos que os grupos cloro podem estabilizar a ligação com o MCT e aumentar assim a sua afinidade. Esta estabilização pode dever-se a uma interação com numa hipotética região hidrofóbica do sítio ativo do transportador, e alterar a sua conformação podendo comprometer o transporte do lactato, e consequentemente a sua inibição. O grupo azido como grupo aceitador de protões, pode estar a interagir com algum grupo doador de protões no sítio ativo.

Os compostos **18** e **19** são compostos triazolínicos. Eles têm um efeito inibitório igual ou menor que o CHC. O mesmo se verifica com o composto **AC**.

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

---

O ensaio da viabilidade celular consiste em avaliar a capacidade da célula na realização das suas funções essenciais, como por exemplo, o metabolismo. Contudo, não permite conhecer o tipo de influência e por isso concluir se essa influência é devida à inibição dos MCTs. Pelo que se procedeu à avaliação do metabolismo celular através da quantificação do lactato.

### 1.5. Metabolismo celular

A produção de lactato durante a inibição foi avaliada para perceber se o efeito inibitório observado no total de biomassa de células após incubação com os compostos, é devido a alterações metabólicas, produzidas pelos compostos. O lactato foi quantificado nas células tratadas em comparação com o controlo, ao qual foi adicionado DMSO de acordo com o meio dos outros ensaios.

Antes de realizar os ensaios para avaliação do metabolismo foi medido o pH do meio contendo os compostos com a concentração do IC<sub>50</sub> já calculado, com o intuito de avaliar se a adição dos compostos alterava o pH do meio, e se influenciaria desta maneira a viabilidade das células. Verificou-se que o pH no meio se mantém dentro do intervalo fisiológico, conforme a tabela 6.

Tabela 6. Valores de pH do meio de cultura sem soro contendo os compostos sintetizados.

	Hs578T	MDA-MB-468
<b>Controlo com DMSO</b>	7,6	
Composto <b>7</b>	7,48	7,43
Composto <b>8</b>	7,71	7,66
Composto <b>10</b>	7,77	7,79
Composto <b>12</b>	7,75	7,75
Composto <b>14</b>	7,53	7,7
Composto <b>16</b>	7,71	7,65
Composto <b>18</b>	7,37	7,55
Composto <b>19</b>	7,26	7,47
<b>AC</b>	7,13	7,13

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

Em geral, as células cancerígenas consomem maior quantidade de glicose do que as células normais e simultaneamente produzem mais lactato. As células Hs578T e MDA-MB-468 têm uma produção de lactato comparável entre si. Quando estas células são inibidas por CHC apresentam uma diminuição de produção de lactato, independentemente da dose utilizada.<sup>61</sup>

Para determinar o efeito dos compostos sintetizados no transporte de lactato, procedeu-se ao tratamento das células de ambas as linhas celulares com a concentração correspondente ao valor do IC<sub>50</sub> e durante 12 h. A concentração de lactato extracelular foi quantificada no sobrenadante após 6 h e 12 h de tratamento. Os resultados da quantificação de lactato nas linhas celulares estão representados na figura 6.

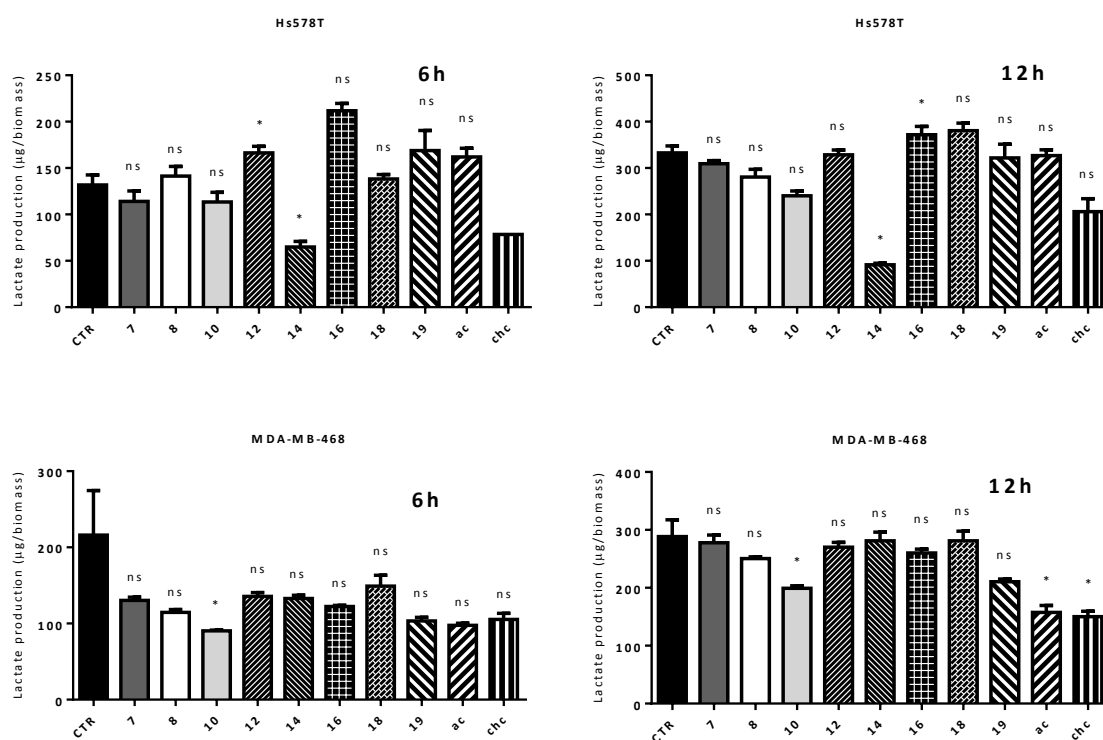


Figura 6. Efeito dos compostos na produção de lactato, após 6 e 12 horas de tratamento. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SD de duas experiências independentes. \*  $p < 0,05$ ; ns, não significativo; Controlo (DMSO) vs compostos.

A quantificação do lactato mostra que em geral a maioria dos compostos não apresenta diferenças estatísticas significativas em relação ao controlo. No entanto, no caso das MDA-MB-468 o desvio padrão da quantificação do controlo está um pouco elevado influenciando os resultados estatísticos. É possível repetir o controle para melhorar os

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

---

resultados estatísticos obtidos para a linha MDA-MB-468. Na linha Hs578T é necessário repetir todos os ensaios para haver confiança nos resultados.

Na linha celular Hs578T verifica-se que, ao fim de 6 h após de incubação, os compostos **7**, **10** e **14** tendem a diminuir a produção de lactato, sendo apenas estatisticamente significativo a diminuição para o composto **14**. Após 12 h os compostos **7** e **10**, continuam a diminuir a quantidade de lactato, embora perdendo um pouco o seu efeito, enquanto os compostos **8**, **19** e **AC** começam a reduzir a produção de lactato. O composto **14**, mantém o efeito de inibição mesmo ao fim da 12 h, havendo até uma maior redução do que ao fim de 6 horas. O composto **12** embora estatisticamente significativo a diminuição da produção de lactato é inferior à que ocorre com a inibição do CHC.

A quantificação do metabolismo do composto **14**, na linha celular Hs578T, foi realizada com a mesma concentração que foi usada para o CHC. Após 6 horas de incubação, observa-se que tem um efeito próximo do CHC, mas passadas 12 h verifica-se uma majoração de duas vezes da produção de lactato.

Na linha celular MDA-MB-486 observa-se que, após 6 h, todos os compostos apresentam diminuição da produção de lactato em comparação com o controlo, embora só seja estatisticamente significativa para o composto **10**. Ao fim de 12 h, o efeito inibitório dos compostos parece atenuar-se. Neste caso são estatisticamente significativos os valores apresentados pelo composto **10** e pelo **AC**. O composto **AC** apresenta valores biologicamente comparáveis ao CHC, o que deixa em aberto a importância do grupo ciano do CHC para esta linha celular.

Podemos ainda observar, em ambas as linhas celulares estudadas, que os compostos que têm uma maior influência na viabilidade celular não são os que possuem um maior poder inibitório da produção de lactato. No caso da linha MDA-MB-468 o composto **10** é aquele que mais inibe a produção de lactato mas é o composto **12** o que mais influencia a viabilidade celular. No caso da linha Hs578T o composto **14** interfere mais com a produção de lactato, enquanto é o composto **16** o que apresenta maior influência na viabilidade das células. Este facto indica, como já referido anteriormente, que os compostos podem estar a influenciar em outro metabolismo essencial para a sobrevivência da célula.

Os grupos funcionais presentes nos compostos testados apresentam diferentes efeitos na produção de lactato das linhas celulares de cancro de mama utilizadas. O que leva a concluir que estes interagem de maneira diferente com os transportadores. Contudo, os

## Capítulo 2 – Resultados e Discussão

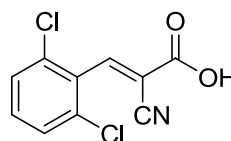
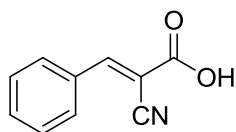
---

resultados obtidos não nos permitem concluir quais os grupos funcionais que favorecem a interação/inibição do MCT.

Para perceber melhor o efeito dos compostos sintetizados sobre o metabolismo dos dois tipos de células seria importante quantificar a glucose consumida pelas células cancerígenas após incubação.

Num futuro próximo, será necessário a realização de novas experiências para complementar o trabalho apresentado aqui, tais como:

- Fazer mais ensaios de quantificação de lactato para melhorar o desvio padrão, principalmente dos controlos e obter resultados estatisticamente significativos.
- Analisar o consumo de glucose das linhas de células de cancro de mama, com o intuito de avaliar se o aumento de produção de lactato é acompanhado de uma diminuição do consumo de glucose como está descrito na lit.
- Realizar ensaios de viabilidade celular em células normais para avaliar a citotoxicidade dos compostos.
- Síntese de novos análogos do CHC, para tentar descobrir que grupos funcionais favorecem a afinidade com o transportador na posição  $\alpha$  relativamente ao grupo carboxílico e no anel aromático da posição 3. Por exemplo:





# Capítulo 3

# Parte Experimental



### 1. Procedimentos gerais

Os espectros de RMN foram realizados no aparelho Varian Unity Plus ( $^1\text{H}$ : 300MHz,  $^{13}\text{C}$ : 75MHz) ou no aparelho Bruker Avance III ( $^1\text{H}$ :400MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100MHz) incluindo o espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC), usando o pico do solvente como referência interna. Os dados de cada espectro de RMN são indicados na seguinte ordem: desvio químico ( $\delta$ /ppm), multiplicidade do sinal, constantes de acoplamento ( $J$ /Hz), número de prótons (nH) e atribuição do sinal. As multiplicidades de sinais são: singlete (s), duplete (d), duplete de dupletos (dd), tripleto (t), tripleto de dupletos (td), multiplete (m). Os desvios químicos foram obtidos em partes por milhão usando  $\delta_{\text{H}}$  Me<sub>4</sub>Si como referência zero.

Os espectros de IV foram realizados num espectrofotômetro Bomem MB 104 FT-IR, usando Nujol em células de cloreto de sódio.

Na purificação dos compostos através de cromatografia em coluna utilizou-se sílica gel MN Kieselgel 60 como fase estacionária, sendo o eluente indicado no procedimento experimental.

Na cromatografia em camada fina (TLC) foram utilizadas placas de alumínio com gel de sílica 60 com 0,25 mm de espessura (Merck). A revelação foi realizada, dependendo do composto, por exposição a radiação UV de 254 nm ou por exposição a atmosfera de iodo.

Todos os reagentes e solventes foram utilizados na sua forma comercial com exceção dos mencionados. O metanol utilizado foi seco sobre magnésio e iodo, o tetrahydrofurano sobre sódio metálico e benzofenona. A dimetilformamida (DMF) foi seca por destilação fracionada, e o tolueno por exclusão da fração de cabeça da destilação simples. O metanol e o tetrahydrofurano foram destilados imediatamente antes de cada utilização. O éter de petróleo 40-60 °C utilizado nas cromatografias foi previamente destilado.

Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respectivos meios foram efetuadas em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar. As células foram cultivadas numa incubadora (Termo Cientific Heracell 150i CO<sub>2</sub> Incubator) humidificada a 37 °C e em atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>.

Os respectivos controlos e os *stocks* dos compostos a ser testados foram preparados em água contendo 1 % de dimetil sulfóxido (DMSO). As medições de absorvância foram realizadas

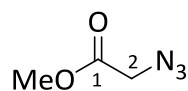
### **Capítulo 3 – Parte Experimental**

---

num aparelho Tecan InfiniteM200. A solução de trabalho para a quantificação do lactato foi preparada por dissolução de um kit comercial contendo enzimas *lactato oxidase*, *peroxidase* e o corante 4-aminofenazona numa solução tampão constituída por 4-clorofenol e PIPES a pH 7,5. A solução de trabalho para a quantificação da glucose foi preparada com as enzimas *glucose oxidase*, *peroxidase* e o corante 4-aminofenazona no tampão constituído por fenol e K-fosfato a pH 7,5.

### 2. Síntese de reagentes de partida

#### 2.1. 2-Azidoacetato de metilo (1)

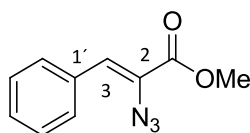


1

A uma solução de bromoacetato de metilo (30g, 0,196mmol) em metanol (30mL), foi adicionada uma suspensão de azida de sódio (15,5g, 0,238mmol, 1,2 eq.) em água (15mL). A mistura foi refluxada durante 4 horas. Após este tempo os solventes foram evaporados no evaporador rotativo. O líquido residual foi redissolvido em água e extraído com éter etílico. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada. Obteve-se um líquido incolor com o rendimento de 36% (8,30 g, 0,072mmol).  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 2108 \text{ N}\equiv\text{N}$ ,  $1749 \text{ C}=\text{O}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,88 (s, 2H, H-2) e 3,79 (s, 3H-  $\text{OCH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168,6 (C-1), 52,5 ( $\text{OCH}_3$ ) e 50,1 (C-2) ppm. Os dados analíticos estão conforme a lit<sup>54</sup>.

#### 2.2. Síntese de 2-azido cinamatos

##### 2.2.1. (*E*)-2-Azido-3-fenilacrilato de metilo (2)



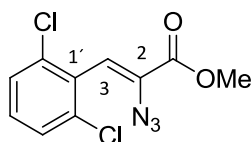
2

Uma solução de metóxido de sódio (2,7g, 50mmol) em metanol seco (26mL), arrefecida entre  $-20^\circ\text{C}$  e  $-30^\circ\text{C}$ , num banho de xilenos e azoto líquido, e mantida sob agitação magnética, foi adicionada durante 45min uma mistura de benzaldeído (1,33g; 12,5mmol) e 2-azidoacetato de metilo **1** (5,75g; 50mmol) em THF seco (5mL). O banho refrigerante foi mantido controlado durante o período de adição dos reagentes, sendo o balão de reação depois transferido para banho de água e sal ( $-10^\circ\text{C}$ ), permanecendo sob agitação magnética durante 2:30h.

## Capítulo 3 – Parte Experimental

Findo o tempo de reação a mistura reacional foi vertida para um copo de água e gelo (100mL) e depois transferida para um funil de separação. A mistura foi extraída com éter etílico (3 x 100mL), a fase orgânica lavada com água e seca com sulfato de magnésio. Após filtração, o éter foi evaporado no evaporador rotativo tendo sido obtido um óleo amarelo, com o rendimento de 58 % (1,49g, 7,31mmol) que mostrou estar virtualmente puro por análise espectroscópica de RMN.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 2123$  (N≡N), 1723 (C=O), 1618 (C=C).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,84 – 7,81 (m, 2H, H-2' e H-6'), 7,42 – 7,32 (m, 3H, H-3', H- 4' e H-5'), 6,93 (s, 1H, H-3) e 3,92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,9 (C-1), 133,1 (C-1'), 130,5 (C-2' e C-6'), 129,4 (C3', C-4' e C-5'), 128,4 (C3', C-4' e C-5'), 125,5 (C-3), 125,3 (C-2) e 52,8 ( $\text{OCH}_3$ ) ppm. Os dados analíticos estão conforme a lit.<sup>57</sup>

### 2.2.2. (*E*)-2-azido-3-(2,6-diclorofenil) acrilato de metilo (3)



3

Uma solução de metóxido de sódio (3,2g, 60,84mmol) em metanol seco (26mL) arrefecida entre -20°C e -30°C, num banho de xilenos e azoto líquido, e mantida sob agitação magnética, foi adicionada uma mistura de 2,6-diclorobenzaldeído (2,64g; 15,17mmol) e de 2-azidoacetato de metilo **1** (7g; 60,84mmol) em THF seco (5mL), durante 45min. A temperatura do banho foi controlada durante o período de adição dos reagentes, sendo o balão de reação depois transferido para banho de gelo e sal (-10°C). A mistura permaneceu sob agitação magnética durante 2:30h.

Findo o tempo de reação a mistura reacional foi vertida para um copo de água e gelo (100mL) e depois transferida para um funil de separação. A mistura foi extraída com éter etílico (3 x 100mL), a fase orgânica lavada com água e seca com sulfato de magnésio. Após filtração o éter foi evaporado no evaporador rotativo obtendo-se um óleo amarelo, com o rendimento de 43% (1,76g, 6,50mmol), que mostrou ser o produto esperado virtualmente puro por análise espectroscópica.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 2128$  (N≡N); 1731 (C=O), 1631 (C=C).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,35 (d,  $J = 8,4\text{Hz}$ , 2H, H-3' e H-5'), 7,22 (t,  $J = 8\text{ Hz}$ , 1H, H-4'), 6,90 (s, 1H, H-3) e

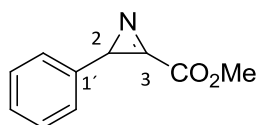
## Capítulo 3 – Parte Experimental

---

3,95 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,7 (C-1), 134,5 (C-2' e C-6'), 131,4 (C-2' e C-6'), 131,0 (C-2), 129,8 (C-4'), 129,6 (C-1'), 127,9 (C-3' e C-5'), 120,6 (C-3) e 53,1 (OCH<sub>3</sub>) ppm. Os dados analíticos estão conforme a lit.<sup>58</sup>

### 2.3. Síntese de 2*H*-azirina-3-carboxilatos de metilo

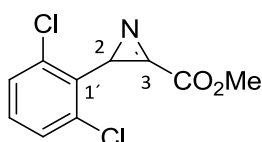
#### 2.3.1. 2-Fenil-2*H*-azirina-3-carboxilato de metilo (4)



4

Uma solução de (*E*)-2-azida-2-fenilacrilato de metilo **2** (0,3g, 1,47mmol) em tolueno seco (20mL) foi colocada em refluxo a 120°C durante 2 h. Evaporou-se o solvente à securo. Obteve-se um óleo amarelo, com o rendimento de 92% (0,237g, 1,35mmol) que mostrou ser a azirina **4** por análise dos seus espectros de ressonância magnética e comparação com os dados da lit.<sup>59</sup>  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1735$  C=O. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,34 – 7,32 (m, 3H, H-3', H-4' e H-5'), 7,15 – 7,13 (m, 2H, H-2' e H-6'), 4,03 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) e 3,49 (s, 1H, H-3) ppm. <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,0 (C=O), 159,0 (C-2), 138,1 (C-1'), 128,1 (C-3', C-4' e C-5'), 126,4 (C-2' e C-6'), 53,6 (OCH<sub>3</sub>) e 51,9 (C-3) ppm.

#### 2.3.2. 2-(2,6-Diclorofenil)-2*H*-azirina-3-carboxilato de metilo (5)



5

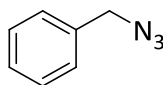
Uma solução de (*E*)-2-azido-3-(2,6-diclorofenil) acrilato de metilo **3** (0,72g, 2,65mmol) em tolueno seco (20ml) foi colocada em refluxo a 120°C durante 2 h. Evaporou-se o solvente à

## Capítulo 3 – Parte Experimental

---

secura. O óleo resultante foi redissolvido em *n*-hexano e colocado no frigorífico durante 19h. Foi obtido um precipitado sob a forma de um sólido amarelo que foi filtrado. O sólido foi identificado como sendo a azirina pretendida após análise espectroscópica. O produto foi obtido com um rendimento de 90% (0,56 g; 2,30 mmol).  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1726$  C=O.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,30 (d,  $J = 8,4\text{Hz}$ , 2H, H-3' e H-5'), 7,18 (t,  $J = 8\text{ Hz}$ , 1H, H-4'), 4,07 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) e 3,66 (s, 1H, H-3) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165,6 (C-1), 158,6 (C-2), 136,4 (C-2' e C-3'), 132,3 (C-1'), 129,7 (C-4'), 128,7 (C-3' e C-5'), 53,7 ( $\text{OCH}_3$ ) e 35,7 (C-3) ppm. Os dados analíticos estão conforme a lit<sup>59</sup>.

### 2.4. Síntese de benzilazida (6)



6

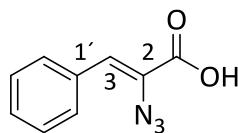
A uma solução de azida de sódio (0,24g, 3,69mmol) em DMF seco (1mL), adicionou-se brometo de benzilo (0,43g; 300 $\mu$ l; 2,50mmol) sob agitação magnética, à temperatura ambiente e sob atmosfera de azoto. A mistura reacional permaneceu à temperatura ambiente durante 120 h. À mistura reacional adicionou-se DCM (25 mL) e a solução foi transferida para um funil de extração. A solução foi lavada com  $\text{H}_2\text{O}$  (10 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e o solvente evaporado até seca. Obteve-se um líquido amarelado com um rendimento 92% (0,307g, 2,30mmol) que mostrou ser após análise de ressonância magnética de próton a benzilazida.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,41-7,31 (m, 5H, H-aromáticos), 4,35 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.



### 3. Síntese de produtos finais

#### 3.1. Ácidos 2-azido acrílicos:

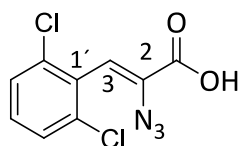
##### 3.1.1. Ácido (*E*)-2-azido-3-fenilacrílico (7)



7

A uma solução de (*E*)-2-azido-3-fenilacrilato de metilo **2** (44mg, 0,216mmol) em dioxano (2mL) adicionou-se hidróxido de sódio aquoso 1M (3mL). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 30 min à temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado até *secura*. O sólido resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado à *secura*. Foi obtido um sólido branco com um rendimento 99% (39mg, 0,210mmol) cuja análise de ressonância magnética levou a concluir que se tratava do produto esperado.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1611$  (C=C), 1673 (C=O), 2127 (N≡N), 3500 – 2500 banda larga (OH).  $^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,86-7,84 (m, 2H, H-2' e H-6'), 7,44-7,35 (m, 3H, H-3', H-4' e H-5'), 7,08 (s, 1H, H-3) ppm.  $^{13}\text{C RMN}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,8 (C-1), 132,8 (C-1'), 130,8 (C-2' e C-6'), 129, 8 (C-3', C-4' e C-5'), 128,5 (C-3', C-4' e C-5'), 127,7 (C-3) e 124,6 (C-2) ppm.

##### 3.1.2. Ácido (*E*)-2-azido-3-(2,6-diclorofenil) acrílico (8)



8

A uma solução de (*E*) 2-azido-3-(2,6-diclorofenil) acrilato de metilo **3** (52mg, 0,191mmol) em dioxano (2mL) adicionou-se hidróxido de sódio aquoso 1M (3mL). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 30 min à temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado à *secura*. O sólido

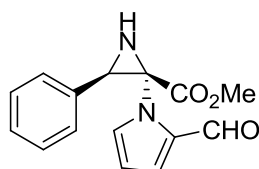
## Capítulo 3 – Parte Experimental

resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado à secura. Foi obtido um sólido branco com o rendimento 100 % (47mg, 0,191mmol) cuja análise de ressonância magnética levou a concluir que se tratava do produto esperado.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1695$  (C=O), 2125 (N≡N), banda larga entre 3500 e 2500 (OH),  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,37 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 2H, H-3' e H-5'), 7,23 (t,  $J=8\text{ Hz}$ , 1H, H-4') e 7,08 (s, 1H, H-3) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166,0 (C-1), 134,5 (C-2' e C-6'), 131,0 (C-2' e C-6'), 130,1 (C-3' e C-5'), 129,8 (C-1'), 127,9 (C-4') e 122,9 (C-3) ppm.

### 3.2. Ácido 3-aryl-aziridina 2-carboxílico substituído na posição 2 por grupos heteroaromáticos

#### 3.2.1. Ácido 2-(2-formil-1H-pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxílico (10)

##### i) Obtenção de 2-(2-formil-1H-pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxilato de metilo (9)



9

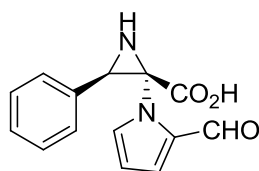
A uma suspensão de 2-fenil-2H-azirina-3-carboxilato de metilo **4** (0,23g, 1,30mmol) em acetonitrilo (10mL), adicionou-se carbonato de potássio (6 eq.) e pirrol-2-carboxaldeído (0,124g; 1,30 mmol). Colocou-se a suspensão em agitação magnética à temperatura ambiente. A reação foi seguida por TLC. Após 1 hora filtrou-se a mistura reacional e evaporou-se o solvente à secura. O óleo obtido foi purificado por cromatografia “dry-flash”, usando como eluente uma mistura de éter petróleo: éter etílico 1:1. Obteve-se um óleo laranja com o rendimento de 39% (0,138g; 0,510mmol) cuja análise de ressonância magnética levou a concluir que se tratava do produto esperado.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1748$  (C=O) e 1721 (C-H do aldeído).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,64 (s, 1H, COH), 7,51 (d,  $J=7,2\text{ Hz}$ , 2H, H-2' e H-6'), 7,41-7,31 (m, 4H, H-3'', H-4'', H-5'' e H-3' ou H-5'), 7,37 (dd,  $J=4$ ; 1,6 Hz, 1H, H-3' ou H-5'), 6,33 (dd,  $J=4$ , 2,4 Hz, 1H, H-4'), 3,97 (s, 1H, H-3) e 3,47 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178,7 (COH), 167,0 (C-1), 132,9 (C-1''), 132,8 (C-2'), 130,1 (C-3'', C-4'', C-5'' e C-3' ou C-5'), 128,3 (C-

## Capítulo 3 – Parte Experimental

---

3'', C-4'', C-5'' e C-3' ou C-5'), 128,2 (C-3'', C-4'', C-5'' e C-3' ou C-5'), 127,5 (C-2'' e C-6''), 124,7 (C-3' ou C-5'), 110,0 (C-4'), 57,4 (C-2), 53,2 (OCH<sub>3</sub>) e 49,6 (C-3) ppm.

### ii) Hidrólise do éster 9

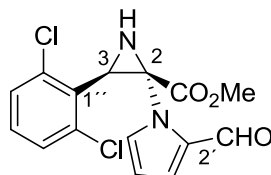


10

A uma solução de 2-(2-formil-1H-pirrol-1-il)-3-fenilaziridina-2-carboxilato de metilo **9** (0,056g, 0,207mmol) em dioxano (2mL) adicionou-se hidróxido de sódio aquoso 1M (3mL). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 5 min à temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado à secura. O sólido resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado à secura. Foi obtido um óleo castanho com o rendimento 84% (0,045g, 0,175mmol) cuja análise espectroscópica provou ser o ácido esperado.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  = 2725 (C-H do aldeído), 1714 (C=O do aldeído) e 1659 (C=O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  9,50 (s, 3/5 H, COH), 9,35 (s, 2/5 H, COH), 7,59 (d,  $J$  = 7,2, 2H, H-2'' e H-6''), 7,51-7,39 (m, 4H, H-3'', H-4'' e H-5'' e H-3' ou H-5'), 7,24 (dd,  $J$  = 4; 1,6 Hz, 1H, H-3' e H-5'), 6,45 (dd,  $J$  = 1,2, 6,8 Hz, 1H, H-4'), 4,07 (s, 1H, H-3) ppm. <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  181,5 (COH), 180,7 (COH), 171,2 (C-1), 134,1 (C-1''), 132,8 (C-2'' e C-6''), 132,1 (C-2'), 128,4 (C-3'', C-4'', C-5'' e C-3' ou C-5'), 127,3 (C-3'', C-4'', C-5'' e C-3' ou C-5'), 126,4 (C-3' ou C-5'), 126,2 (C-3'', C-4'', C-5'' e C-3' ou C-5'), 110,4 (C-4'), 59,4 (C-2) e 46,6 (C-3) ppm.

### 3.2.2. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il) aziridina-2-carboxílico (12)

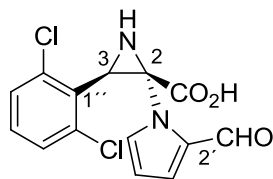
#### i) Obtenção de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il) aziridina-2-carboxilato de metilo (11)



11

A uma suspensão de 2-(2,6-diclorofenil)-2*H*-azirina-3-carboxilato de metilo **5** (0,2g; 0,82mmol) em acetonitrilo (10mL) adicionou-se carbonato de potássio (6eq.) e pirrol-2-carboxialdeído (77mg; 0,082mmol). Colocou-se a suspensão em agitação magnética à temperatura ambiente. A reação foi seguida por TLC. Após 1 hora filtrou-se a mistura reacional e evaporou-se o solvente até *secura*. O sólido foi purificado por cromatografia “dry-flash”, usando como eluente uma mistura de éter petróleo: éter etílico 1:1. Obteve-se um sólido laranja, com o rendimento de 59 % (0,165g;0,488mmol) que provou ser o composto pretendido por comparação com os dados físicos e espectroscópicos publicados<sup>49</sup>.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  = 2726 (C-H do aldeído); 1738 (C=O); 1726 (C=O do aldeído). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9,60 (s, 1H, COH), 7,55-7,54 (m, 1H, H-5'), 7,40-7,31 (m largo, 2H, H-3'' e H-5''), 7,24 (td, 1H,  $J=0,8, 4\text{Hz}$ , H-4'), 7,0 (dd, 1H,  $J=1,6, 4\text{Hz}$ , H-3'), 6,32 (dd, 1H,  $J=2,4, 4\text{Hz}$ , H-4'), 3,93 (s, 1H, H-3) e 3,57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  178,9 (COH), 167,8 (C-1), 135,9 (C-2'' ou C-6''), 134,9 (C-2'' ou C-6''), 133,0 (C-2'), 130,3 (C-1'), 129,9 (C-4''), 129,7 (C-5'), 129,3 (C-3'' ou C-5''), 127,9 (C-3'' ou C-5''), 124,5 (C-3'), 109,9 (C-4''), 57,6 (C-2), 53,5 (OCH<sub>3</sub>) 3 46,7 (C-3) ppm.

### ii) Hidrólise do éster **11**

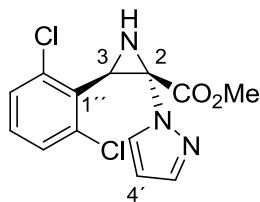


#### **12**

A uma solução de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(2-formil-1*H*-pirrol-1-il)-aziridina-2-carboxilato de metilo **11** (0,077g;0,227mmol) em dioxano (2mL) adicionou-se hidróxido de sódio aquoso 1M (3mL). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 30 min à temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado à secura. O sólido resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado à secura. Foi obtido um sólido branco com o rendimento 86% (0,064g; 0,197mmol) cuja análise de ressonância magnética levou a concluir que se tratava do produto esperado.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ =2730 (C-H do aldeído), 1652 (C=O), 1709 (C=O do aldeído).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  9,47 (s, 1H, COH), 7,78 – 7,77 (m, 1H, H-5'), 7,47 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 2H, H-3'' e H-5''), 7,34 (td,  $J= 8; 0,8$  Hz, 1H, H-4''), 7,28 (dd,  $J=4; 1,6$  Hz, 1H, H-3'), 6,44 (dd,  $J= 4; 2,8$  Hz, 1H, H-4') e 4,03 (s, 1H, H-3) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  180,6 (CHO), 171,5 (C-1), 134,8 (C-2'' e C-6''), 132,2 (C-2'), 132,21 (C-5'), 130,6 (C-1'), 129,8 (C-4''), 128,9 (C-3'' ou C-5''), 128,1 (C-3'' e C-5''), 126,9 (C-3'), 110,2 (C-4'), 59, 2 (C-2) e 44,5 (C-3) ppm.

### 3.2.3. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1*H*-pirazol-1-il) aziridina-2-carboxílico (14)

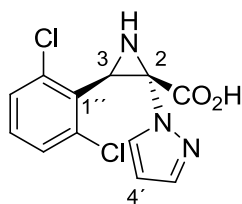
#### i) Obtenção de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1*H*-pirazol-1-il) aziridina-2-carboxilato de metilo (13)



**13**

A uma suspensão de 2-(2,6-diclorofenil)-2*H*-azirina-3-carboxilato de metilo **5** (0,2g; 0,819mmol) e carbonato de potássio (6 eq.) em acetonitrilo (10mL), adicionou-se pirazol (0,055mg; 0,082mmol). Colocou-se a suspensão em agitação magnética à temperatura ambiente. A reação foi seguida por TLC. Após 1 h filtrou-se a mistura reacional e evaporou-se o solvente até à *secura*. O sólido resultante foi purificado por cromatografia “dry-flash”, usando como eluente uma mistura de éter petróleo: éter etílico 1:1. Obteve-se um sólido amarelo, com o rendimento de 79 % (0,203g; 0,65mmol) que provou ser o composto pretendido por comparação com os dados físicos e espectroscópicos publicados<sup>49</sup>.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1734$  C=O. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,89 (s, 1H, H-5'), 7,65 (s, 1H, H-3'), 7,36 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 2H, H-3'' ou H-5''), 7,25 (t,  $J=8\text{Hz}$ , 1H, H-4''), 6,35 (s, 1H, H-4'), 3,91 (s, 1H, H-3), 3,62 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  168,0 (C=O), 140,7 (C-3'), 135,6 (C-1''), 130,3 (C-5'), 129,97 (C-4''), 128,61 (C-3'' ou C-5''), 106,1 (C-4'), 58,6 (C-2), 53,8 (OCH<sub>3</sub>), 46,1 (C-3) ppm.

### ii) Hidrólise do éster **13**

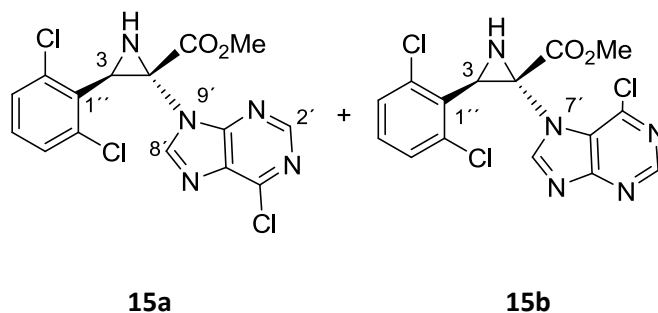


**14**

A uma solução de 3-(2,6-diclorofenil)-2-(1*H*-pirazol-1-il)aziridina-2-carboxilato de metilo **13** (0,060g; 0,192mmol) em dioxano (2mL) adicionou-se hidróxido de sódio aquoso 1M (3mL). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 30 min à temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado à secura. O sólido resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado até secura. Foi obtido um sólido branco com o rendimento 67% (0,039g; 0,130mmol) que provou ser o composto pretendido por comparação com os dados físicos e espectroscópicos publicados<sup>49</sup>.  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1641 \text{ C=O}$ .  $^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,11 (s, 1H, H-3' ou H-5'), 7,70 (s, 1H, H-3' ou H-5'), 7,47 (d,  $J = 8\text{Hz}$ , 2H, H-3'' e H-5''), 7,34 (t,  $J = 8\text{Hz}$ , 1H, H-4''), 6,46 (s, 1H, H-4'), 3,98 (s, 1H, H-3) ppm.  $^{13}\text{C RMN}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  170,9 (C-1), 134,9 (C-2'' e C-6''), 131,5 (C-5'), 130,1 (C-1''), 129,9 (C-4''), 128,6 (C-3'' e C-5''), 105,9 (C-4'), 60,3 (C-2) e 43,2 (C-3) ppm.

### 3.2.4. Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-2-(6-cloro-9*H*-purin-9-il) aziridina-2-carboxílico (16)

- i) **Obtenção de 2-(6-cloro-9*H*-purin-9-il)-3-(2,6-diclorofenil) aziridina-2-carboxilato de metilo (15a) e de 2-(6-cloro-7*H*-purin-7-il)-3-(2,6-diclorofenil) aziridina-2-carboxilato de metilo (15b)**



A uma suspensão de 2-metil-(2,6-diclorofenil)-2*H*-azirina-3-carboxilato **5** (0,2g; 0,819mmol) e carbonato de potássio (6eq) em acetonitrilo (10ml), adicionou-se 6-cloropurina (0,126mg;0,0819mmol). Colocou-se a suspensão em agitação magnética à temperatura ambiente. A reação foi seguida por TLC. Após 1 h filtrou-se a mistura reacional e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Obteve-se uma mistura de régio-isómeros na razão 2:1. Após recristalização da mistura reacional foi isolado um dos isómeros como um sólido alaranjado com o rendimento 54 % (0,177g;0,446mmol) e o restante material (27%) é um sólido mais pálido constituído por uma mistura de isómeros N-7 e N-9 na proporção 2:1 de acordo com o espetro de <sup>1</sup>H RMN.

**Caracterização do isómero isolado:**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1721$  C=O. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,80 (s, 1H, H-purina), 8,56 (s, 1H, H-purina), 7,42 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 2H, H-3'' e H-5''), 7,30 (t,  $J=8\text{Hz}$ , 1H, H-4''), 4,02 (s, 1H, H-3) e 3,61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  166,5 (C-1), 152,6 (CH-purina), 151,5 (Cq-purina), 144,3 (CH-purina) 135,5 (Cq-purina), 131,6 (C-2'' e C-6''), 130,5 (C-4''), 129,3 (Cq-purina), 128,8 (C-1'), 65,8 (C-2), 54,2 (OCH<sub>3</sub>) e 45,0 (C-3) ppm.

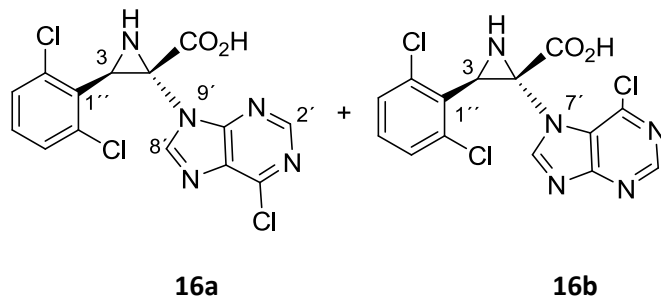


## Capítulo 3 – Parte Experimental

---

**Caracterização do material restante:**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}= 1726$  C=O.  $^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,65 (s, 1H, H-purina), 8,10 (s, 1H, H-purina), 7,16 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 2H, H-3'' e H-5''), 7,03 (t,  $J=8\text{Hz}$ , 2H, H-4''), 4,00 (s, 1H, H-3) e 3,82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) ppm.

### ii) Hidrólise dos ésteres 15a e 15b



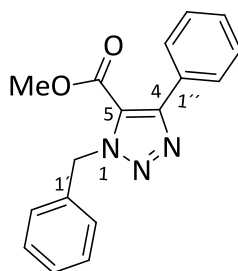
A uma solução da mistura dos compostos **17** (0,150g; 0,377mmol) em dioxano (2mL) adicionou-se hidróxido de sódio aquoso 1M (3ml). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 30 min à temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado à secura. O sólido resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado até secura. Foi obtido um sólido branco com um rendimento 70 % (0,101g; 0,264mmol).  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}= 1662$  C=O .  $^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,70 (s, 1H, H-purina), 8,57 (s, 1H, H-purina), 8,53 (s, 1H, H-purina), 8,41 (s, 1H, H-purina), 7,48 – 7,45 (m, 6H, H-Ar), 4,22 (s, 1H, H-3) e 4,13 (s, 1H, H-3)ppm.

### 3.3. Síntese de ácidos Triazolínicos

#### 3.3.1. Ácidos 1-benzil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazole-5-carboxílico (18) e 1-benzil-5-fenil-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxílico (19)

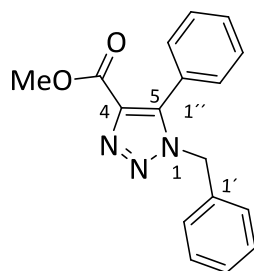
##### i) Obtenção de 1-benzil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazole 5-carboxilato de metilo (17a) e de 1-benzil-5-fenil-1*H*-1,2,3-triazole 4-carboxilato de metilo (17b)

A uma solução de benzilazida **6** (0,248g; 1,87mmol) numa mistura de H<sub>2</sub>O/ terc-butanol 1:1 (2 mL), adicionou-se ácido ascórbico (0,027g), sulfato de cobre (0,002g) e 3-fenilpropiolato de metilo (0,300g; 1,87mmol). A mistura reacional foi colocada em refluxo durante 12 h. Findo este tempo, tratou-se a mistura reacional com H<sub>2</sub>O e extraiu-se com acetato de etilo. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada sob vácuo e evaporada no evaporador rotativo. Obteve-se uma mistura de régio-isómeros, os quais foram separados por cromatografia “dry-flash”, usando como eluente uma mistura de éter petróleo: éter etílico. O regioisómero **17a** foi isolado na forma de um óleo transparente (0,230g;0,785mmol; 42 %) e do regioisómero **17b** (0,213g;0,729mmol; 39 %).



**17a**

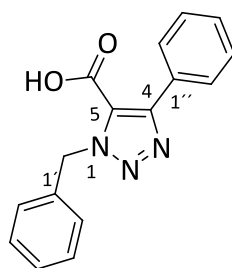
**Caracterização do isómero 17a:**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1721$  (C=O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,73-7,71 (m, 2H, H-Ar), 7,46-7,41 (m, 3H, H-Ar), 7,38-7,30 (m, 5H, H-Ar), 5,94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C RMN (107 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159,5 (C-1), 150,5 (C-4), 135,0 (C-1'), 130,1 (C-1''), 129,2 (C-Ar), 128,9 (C-Ar), 128,7 (C-Ar), 128,0 (C-Ar), 127,8 (C-Ar), 123,7 (C-5) 54,2 (CH<sub>2</sub>) e 52,2 (CH<sub>3</sub>) ppm.



**17b**

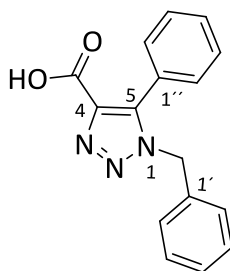
**Caracterização do isômero 17b:**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1756$  (C=O).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,54-7,50 (m, 1H, H-Ar), 7,49-7,42 (m, 2H, H-Ar), 7,29-7,25 (m, 3H, H-Ar), 7,24-7,20 (m, 2H-H-Ar), 7,02-7,00 (m, 2H, H-Ar), 5,45 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) e 3,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (107 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161,3 (C-1), 141,4 (C-5), 136,8 (C-4), 134,5 (C-1'), 130,1 (C-Ar), 129,7 (C-Ar), 128,7 (C-Ar), 128,5 (C-Ar), 127,4 (C-Ar), 125,7 (C-1Ar), 52,1 ( $\text{CH}_2$ ) e 51,9 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

### ii) Hidrólise dos ésteres 17a e 17b



**18**

A uma solução 1-benzil-5-fenil-1H-1,2,3-triazole-4-carboxilato de metilo **17a** (0,052g, 0,177mmol) em dioxano (2ml) adicionou-se hidróxido de sódio 1M (3ml). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 30 min à temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado até securo. O sólido resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado no evaporador rotativo. Foi obtido um sólido branco com um rendimento 97 % (0,048g, 0,171mmol).  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1} = 1701$  (C=O).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,73-7,71 (m, 2H, H-Ar), 7,42-7,40 (m, 3H, H-Ar), 7,33 (s, 5H, H-Ar), 5,95 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (107 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161,4 (C-1), 151,3 (C-1''), 134,8 (C-1'), 133,1 (C-4), 129,5 (C-Ar), 129,2 (C-Ar), 128,8 (C-Ar), 128,1 (C-Ar), 123,4 (C-5) e 54,4 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.



### 19

A uma solução de 1-benzil-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazole-5-carboxilato de metilo **17b** (0,092g, 0,313mmol) em dioxano (2ml) adicionou-se hidróxido de sódio 1M (3ml). A solução foi colocada sob agitação magnética durante 30 min a temperatura ambiente. A mistura reacional foi neutralizada a pH 7 com HCl 1M. O solvente foi evaporado até *secura*. O sólido resultante foi lavado com acetonitrilo, filtrado sob vácuo e o solvente evaporado no evaporador rotativo. Foi obtido um sólido branco (0,087, 0,313mmol, 100 %).  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}=1696$  (C=O).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,54-7,48 (m, 1H, H-Ar), 7,47-7,40 (m, 2H, H-Ar), 7,28-7,26 (m, 3H, H-Ar), 7,25-7,20 (m, 2H-H-Ar), 7,02-6,99 (m, 2H, H-Ar), 5,44 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (107 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,6 (C-1), 142,0 (C-5), 134,2 (C-1') 130,0 (C-Ar), 129,7 (C-Ar), 129,1 (C-4), 128,7 (C-Ar), 128,6 (C-Ar) 127,5 (C-Ar), 125,2 (C-1'') e 52,3 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

### 4. Cultura de Células

As linhas celulares humanas de cancro de mama utilizadas foram MDA-MB-468 (subtipo basal) e HS578T (subtipo basal). Foram obtidas de ATCC (American Type Culture Collection). As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco, 4,5g/l de glucose (DMEM, Invitrogen) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen) inativado por calor e com 1 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina, Invitrogen).

Para realizar qualquer ensaio, as células sub-confluentes foram lavadas com uma solução salina de fosfato tampão (PBS) e tripsinizadas com tripsina a 37°C. A tripsina foi inativada pela adição de DMEM com 10 % de FBS, sendo as células submetidas a centrifugação durante 5 min a 900 rpm. As células foram re-suspensas em meio fresco e as células retiradas foram retiradas 10 µL de suspensão de células, e adicionado 20 µL de azul de tripano. O azul de tripano é um corante de exclusão que apenas entra em células permeabilizadas (inviáveis). As células foram contadas numa câmara de Neubauer para posterior cálculo da densidade celular.

#### 4.1. Determinação do IC<sub>50</sub>

Para a determinação do IC<sub>50</sub>, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, a diferentes densidades para cada linha celular: 10000 células/100µl (Hs578T) e 20000 células/100µl (MDA-MB-468) por poço. As células foram deixadas a aderir durante a noite e foram tratadas com várias concentrações dos compostos **7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19** e **AC**: 1 mM, 0,5 mM, 2,5 mM e 0,1 mM, e incubadas durante 24 horas.

O efeito da inibição foi avaliado pelo ensaio da sulforodamina B (SRB, TOX-6, Sigma-Aldrich). Após a incubação das células com os compostos, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com 50µl de ácido tricloroacético frio a 10% (TCA) durante 1 h a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com água para remover o TCA e secas ao ar durante 1-2 h. As células foram coradas com 50µl de uma solução de 0,4 % Sulforodamina B durante 30 min e, no fim do período de marcação, as placas foram lavadas com ácido acético a 1% até que o corante não incorporado fosse removido. A Sulforodamina B incorporada foi solubilizada com 100µl duma solução de Tris base 10 mM durante 10 min à temperatura ambiente.

## Capítulo 3 – Parte Experimental

---

Foi realizada a medição espectrofotométrica da absorvância a 490nm, utilizando-se como absorvância de referência 655nm. Os valores de IC<sub>50</sub> foram estimados a partir de pelo menos três experiências independentes, cada uma em triplicado, utilizando o *software* GraphPad Prism 6, aplicando-se uma relação dose-resposta (declive variável) de regressão não-linear sigmoidal, depois da transformação logarítmica.

### 4.2. Quantificação do lactato

Para a quantificação do lactato, as células foram plaqueadas em placas de 48 poços, a diferentes densidades para cada linha celular: 30000 células/300µl (Hs578T) e 68000 células/300µl (MDA-MB-468) por poço. As células foram deixadas a aderir durante a noite, sendo posteriormente incubadas com a quantidade relativa aos valores de IC<sub>50</sub> dos respectivos compostos, durante 6 h e 12 h. Aos ensaios de controlo foi adicionado 1 % de DMSO. Ao fim de 6 h e 12 h, foi recolhido 50 µl do sobrenadante para uma placa de 96 poços e armazenado a -20°C, para realizar as quantificações.

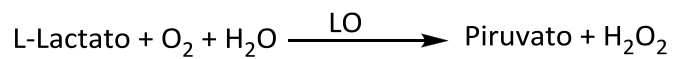
Foi utilizado um kit colorimétrico enzimático (Lactate, LO-POD, Enzymatic colorimetric, Spinreact, S.A.U., St. Esteve de Bas, Spain). O ensaio foi realizado numa placa de 96 poços, onde foi adicionado 2µl de sobrenadante de cada ensaio e 200 µl da solução de trabalho, previamente preparada. Foi também preparado um branco, contendo 200 µl da solução de trabalho e 2 µl de PBS, sendo também efetuada uma curva padrão contendo 2 µl de solução padrão de lactato de concentrações crescentes e 200 µl de solução de trabalho. Incubou-se durante 5 min, leu-se a absorvância e calculou-se a quantidade de lactato (mg) através da fórmula:

$$\frac{abs amostra}{abs padrão} \times 10 \text{ (concentração da solução padrão)}$$

O método de quantificação é baseado na oxidação do lactato pela *lactato oxidase* (LO) à piruvato e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage com o 4-aminofenazona e 4-clorofenol em presença da *peroxidase* (POD) para produzir quinona vermelha. A intensidade da cor formada é proporcional a concentração de lactato na amostra.

### Capítulo 3 – Parte Experimental

---



Foram recolhidos dados de duas experiências independentes, cada uma em triplicado, para cada linha celular. Os dados foram tratados no GraphPad Prism 5 *software*, normalizados com a quantificação da biomassa total e todas as condições foram analisadas para significado estatístico utilizando o teste t de Student de duas caudas para a comparação de médias, sendo os valores limite de significância de  $p < 0,05$ .





# Bibliografia



## Bibliografia

---

1. Hanahan, Douglas e Weinberg, Robert A. *Cell*. (2011). 144. 646-679
2. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., e Moses, H.L. (2008). *Mol. Cancer Res.* 6. 1521–1533.
3. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., e Moses, H.L. (2004). *Nature*. 432. 332–337.
4. Seyfried, T. N. and Shelton, L. M. (2010). *Nutrition & metabolism*. 7. 7.
5. Quintas, A., Freire, A., Halpern, M. *Bioquímica, Organização Molecular da Vida*. Lidel. Lisboa. 2008
6. Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., Saedeleer, C. J. De, et al. (2008). *The Journal of Clinical Investigation*.
7. Halestrap, A. P. e Price, N. T. *Biochem. J.* (1999). 299. 281–299.
8. Meredith, D. e Christian, H. C. (2008). *Xenobiotica*. 38. 7. 1072-1106.
9. Granchi, C., Roy, S., De Simone, A., Salvetti, I., Tuccinardi, T., Martinelli, A., Macchia, M., et al. (2011). *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46. 11. 5398–407.
10. Warburg O. (1956). *Science*. 123. 309-14.
11. Busk, M., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Steiniche, T., Jakobsen, S., Horsman, M. R., e Overgaard, J. (2011). *Radiother Oncol*. 99. 3. 404–11.
12. Wang, T., Marquardt, C., Foker, J. (1976). *Nature*. 261. 702–5
13. Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., Saavedra, E. (2007). *FEBS J.* 274. 1393–418
14. Postovit, Lynne-Marie, Adams, Michael A., Lash, Gendie E., Heaton, Jeremy P., e Graham, Charles H. (2002). *The Journal of Biological Chemistry*. 277. 38 (20). 35730–35737.
15. Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Azevedo-Silva, J., Casal, M., Schmitt, F. C., e Baltazar, F. (2012). *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 44. 1. 127–39.
16. Halestrap, A. P. e Meredith, D. (2004). *European journal of physiology*. 447. 5. 619–28.
17. Poole, R. C. e Halestrap, A. P. (1993). *American Journal of Physiology*. 264. 761-782.
18. Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W., e Bröer, S. (2000). *The Biochemical journal*. 350. 1. 219–27.
19. Poole, R. C., Sansom, C. E. e Halestrap, A. P. (1996). *Biochemical Journal*. 320. 817–824.
20. Pinheiro, C. e Baltazar, F. (2010). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
21. Halestrap, A. P. (2011). *IUBMB Life*
22. Jackson, V.N., Price, N.T., Carpenter, L. e Halestrap, A.P. (1997). *Biochem J.* 324. 2. 447–53

## Bibliografia

---

23. Yoon, H., Fanelli, A., Grollman, E.F. e Philp, N.J. (1997). Biochemical and Biophysiological Research Communications. 234. 1. 90-94
24. Lin, R. Y., Vera, J. C., Chaganti, R.S. e Golde, D. W. (1998). J Biol Chem. 273. 28959–28965.
25. Juel, C., e Halestrap, A. P. (1999). Journal of Physiology. 517. 3. 633-642
26. Pilegaard, H., Domino, K., Noland, T., Juel, C., Hellsten, Y., Halestrap, A. P. e Bangsbo, J. (1999) Am. J. Physiol. 276. 255-261
27. (a) Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Scapulatempo, C., Ferreira, L., Martins, S., Pellerin, L., Rodrigues, M., Alves, V.A., Schmitt, F. e Baltazar, F. (2008). Virchows Arch. 452. 139– 46. (b) Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Ferreira, L., Pereira, S.M., Etlinger, D., Moreira, M.A., Jube, L.F., Queiroz, G.S., Schmitt, F. e Baltazar, F. (2008). Int J Gynecol Pathol. 27. 568–74.
28. Manning Fox, J. E., Meredith, D., e Halestrap, A. P. (2000). The Journal of physiology, 529. 2. 285–93.
29. Lam, W. K., Felmlee, M. A., e Morris, M. E. (2010). The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. 38. 3. 441–447.
30. Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C., Brown, M.H, Barclay, A.N and Halestrap A.P. (2000). Embo J. 19. 3896–3904.
31. Deuticke, B. (1982). J. Membrane Biol. 70. 89–103.
32. Fang, J., Quinones, Q. J., Holman, T. L., Morowitz, M. J., Wang, Q., Zhao, H., Sivo, F., et al. (2006). Molecular pharmacology. 70. 6. 2108–15.
33. Garcia, C. K. Goldstein, J. L. Pathak, R. K., Anderson, R.G., Brown, M.S. (1994). Cell. 76. 5. 865-873. (b) Garcia, C. K. Li, X., Luna, J e Francke, U. (1994). Genomics. 23. 2. 500-503.
34. Liga Portuguesa Contra o Cancro. Diponivel em: <http://www.ligacontracancro.pt/>. Acesso em: 15/10/2013.
35. Thomas,Albert. World Health Organization: GLOBOCAN Project. Disponivel em: <http://globocan.iarc.fr/>. Acesso em: 15/10/2013.
36. Pinheiro, C., Albergaria, A., Paredes, J., Sousa, B., Dufloth, R., Vieira, D., Schmitt, F. e Baltazar, F. (2010). Histopathology. 56. 7. 860-7.
37. Halestrap, A. P. (1976). The Biochemical journal. 156. 181–183.
38. Halestrap, A. P., and Denton, R. M. (1974). The Biochemical journal. 138. 313–316.
39. Wilson, M.C., Meredith, D., Fox, J.E., Manoharan, C., Davies, A.J. e Halestrap, A.P. (2005). J Biol Chem 280:27213–21

## Bibliografia

---

40. Chiriac, C. I., Tanasa, F., e Onciu, M. (2005). *Molecules*, 10. 2. 481–7.
41. Sharma, R. I., Welch, E., Schweiger, L., Craib, S., e Smith, T. (2011). *International journal of molecular imaging*. 2011. 874585.
42. (a) Perkin, W. H. (1868) *J. Chem. Soc.* 21. 53. 18; (b) Johnson, J. R. (1942). *Organic Reactions*. 210; (c) Fieser, L. F.; Fieser, M. (1961) *Advanced Organic Chemistry*. Wiley-Interscience: New York. 464, 732.
43. (a) Knoevenagel, E. (1898). *Ber.* 31. 2596; (b) Fieser, L. F.; Fieser, M. (1956). *Organic Chemistry*. 3rd ed. Wiley – Interscience: New York. 692; (c) House, H. O. (1965); *Modern Synthetic Reactions*, W.A. Benjamin, Inc.: New York. 225.
44. (a) Heck, R. F.; Nolley Jr., J. P. *J. Org. Chem.* 1972, 37, 2320; (b) Heck, R. F. (1982). *Org. React.* 27. 345; (c) Overman, L. E.; Dounay. (2003). *A. Chem. Rev.* 103. 2945.
45. Simonyan, A. V. (1993). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 27. 2. 92-100.
46. Gupta, M., e Wakhloo, B. P. (2007). *I.* 94–98.
47. Alves, M, e Costa, F. *Heterocyclic Targets in Advanced Organic Synthesis. 2H-Azirines as electrophiles*. Kerala, India. *Research Signpost*. 2011. 145-172 ISBN: 978-81-308-0431-6
48. Alves, M., Ferreira, P., Maia, H., Monteiro, L. e Gilchrist, T. (2000). *Tetrahedron Letters*. 41. 4991-4995.
49. Sharpless, William D. (2005). *J. Chem. Edu.* 82. 12. 1833-1836.
50. Kolb, Hartmuth C., Finn, M. G. and Sharpless, K. Barry. (2001). *Angew. Chem. Int. Ed.* 40. 2004-2021
51. De, P., Baltas, M., e Bedos-Belval, F. (2011). *Current medicinal chemistry*. 18. 11. 1672–703.
52. Roy, P. J., Boisvert, M. e Leblanc, Y. (2007). *Org. Syn.* 84. 262.
53. (a) Hemestberger, H., Knittel, D. e Weidmann. (1969). *Monatshefte für Chemie*. 100. 1599- 1603. (b) Knittel, D., Hemestberger, H., e Weidmann. (1970). *Monatshefte für Chemie*. 101. 157- 160. (c) Hemestberger, H., Knittel, D. e Weidmann. (1970). *Monatshefte für Chemie*. 101. 161- 165. (d) Hemestberger, H. e Knittel, D. (1972). *Monatshefte für Chemie*. 103. 194- 204. (e) Hemestberger, H. e Knittel, D. (1972). *Monatshefte für Chemie*. 103. 205- 209.
54. Henn, L., Hickey, D., Moody, C. e Rees, C. (1984). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 2189-2196.
55. Stokes, B. J., Dong, H. B., E. Leslie, Pumphrey, A. L. e Driver, T. G. (2007). *J. Am. Chem. Soc.* 129. 7500.

## **Bibliografia**

---

56. O'Brien, Alexander, Lévesque, G. François and Seeberger, Peter H. (2011), *Chem. Commun.* 47, 2688–2690.
57. Alves, M. e Gilchrist, T. (1998). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.* 299-303
58. Knittel D. *Synthesis.* (1985). 186.
59. Alves, M., Fortes, A. G. e Gonçalves, L. (2003). *Tetrahedron Letters.* 44. 6277-6279.
60. Pinheiro, C., Pinheiro, S., Gonçalves, V., Vieira, A., Paredes, J., Schmitt, F. e Baltazar, F. (2010). XIX Porto Cancer Meeting.