

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**TECNOLÓGICA E AMBIENTAL**

**Avaliação da Atividade Antitumoral de Amidas Graxas  
Análogas de Canabinóides**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Daiane Souza dos Santos**

**Rio Grande, 2014.**

**Avaliação da Atividade Antitumoral de Amidas Graxas Análogas de  
Canabinóides**

**por**

**DAIANE SOUZA DOS SANTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de **MESTRE EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E AMBIENTAL.**

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Almeida Piovesan  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo G. Montes D'Oca

Rio Grande, 2014.  
Universidade Federal do Rio Grande  
Escola de Química e Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**Avaliação da Atividade Antitumoral de Amidas Graxas Análogas de  
Canabinóides**

Elaborada por

**DAIANE SOUZA DOS SANTOS**

Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Mestre em Química Tecnológica e Ambiental.**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciana Almeida Piovesan (Presidente/Orientadora)

---

Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho (Membro) UFPEL

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula de Souza Votto (Membro) FURG

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marisa e Gilberto meus verdadeiros mestres, modelos reais de perseverança, dedicação, respeito e ética, vocês são o meu alicerce.

Ao meu namorado Filipi, que esteve comigo na reta final do trabalho, muito obrigada por todo carinho, amor, amizade, companheirismo e acima de tudo pela paciência e por me apoiar e me dar forças até o fim.

Quero agradecer muito ao Professor e co-orientador Marcelo D'Oca, por ter disponibilizado espaço e material de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver este trabalho, também pelo carinho e confiança.

Aos alunos de iniciação científica que trabalharam comigo. Principalmente ao Jonathas que mesmo sem tempo por causa da sua enorme carga horária da graduação estava no laboratório sempre que conseguia um tempinho. A Jessica que estava sempre pronta pro que der e vier. Quero agradecer em especial a Taís, Monique, Marcela e Gabriele que trabalharam muito comigo, sempre muito responsáveis, pessoas com uma dedicação inteligência inquestionáveis, tenho muito a agradecer a vocês, acima de tudo pela amizade.

A Luciana pela orientação, pelos incansáveis ensinamentos, por sua dedicação e perseverança dentro do laboratório, e por ter acreditado no meu trabalho.

Aos colaboradores, como a Sergiane Caldas do Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais - LACOM, que sempre se mostrou disposta a fazer análise de CG-EM, também quero agradecer imensamente a Ana Lucia Ruiz e ao João Ernesto Carvalho do CPQBA/Unicamp, pela realização dos testes biológicos, quero agradecer muito ao Professor Alex Flores pela disponibilidade e por fazer as análises de RMN, e quero agradecer imensamente também a Caroline D'Oca pelas análises de RMN.

As Professoras Dra. Darlene Flores e Dra. Ana Paula Votto por todas as suas contribuições no exame de qualificação, vocês ajudaram muito com a finalização do trabalho. Muito obrigada.

Aos meus amigos e colegas do Laboratorio Kolbe de Síntese Orgânica, que de uma forma ou de outra contribuíram com o meu trabalho, muito obrigada pelo carinho, amizade, respeito, pelos ensinamentos e pelas boas risadas. Agradeço muito a Andressa pela amizade e pelos dias de estudo, a Carol Hack por estar sempre disposta a esclarecer uma dúvida, a discutir química. Quero agradecer em especial as pessoas que vou levar pra sempre comigo, a Marieli, Tamara, Renata Ongaratto, Karina, Rafael e Patrick, quero que saibam que pra mim vocês são pessoas iluminadas, sempre que precisei estavam prontos pra me ajudar. Muito obrigada por tudo!

Aos professores do Programa, pela sua dedicação, pelos ensinamentos, pela contribuição no meu crescimento.

*“A verdadeira viagem de  
descobrimiento não consiste em  
procurar novas paisagens, mas em  
ter novos olhos”. (Marcel Proust)*

**Titulo: Avaliação da Atividade Antitumoral de Amidas Graxas Análogas de Canabinóides**

**Autora: Daiane Souza dos Santos**

**Orientadora: Luciana Almeida Piovesan**

**Resumo**

A atividade antiproliferativa *in vitro* de uma série de amidas graxas sintéticas, em sete linhagens de células tumorais foi investigada. Baseado em GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub>, os ensaios preliminares mostraram que a maior parte dos compostos mostrou atividade antiproliferativa moderada a boa contra as linhagem de células tumorais testadas, principalmente em células de glioma humano (U251) e câncer de ovário humano com fenótipo de resistència a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES). A amida (*R,S*)-**3d**, derivada do ácido ricinoleico, mostrou uma elevada seletividade com potência de inibição do crescimento e morte celular para a linhagem de células de glioma. Além disso, as amidas (*S*)-**3c** e (*S*)-**3e**, derivadas dos ácidos oleico e linoleico respectivamente, foram específicas para glioma e ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos com inibição potente do crescimento celular. Estes resultados aliados a um perfil de segurança relativo quando analisado o efeito sobre as linhagens celulares não-tumorais, apontam para que estes compostos sirvam como modelos para o desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento de câncer, incluindo cânceres com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos.

Palavras chaves: atividade antiproliferativa, moléculas sintéticas, células tumorais, fenótipo MDR

**Title: Evaluation of the Antitumor Activity of Fatty Amides Analogous to Cannabinoids**

**Author: Daiane Souza dos Santos**

**Advisor: Luciana Almeida Piovesan**

**Abstract**

The *in vitro* antiproliferative activity of a series of synthetic fatty acid amides in seven cancer cell lines were investigated. Based on GI<sub>50</sub>, TGI and LC<sub>50</sub>, the preliminary assays showed that the most of compounds showed moderate to good antiproliferative activities against tested tumor cell lines, mainly on human glioma cell (U251) and human ovarian cancer with multiple drug-resistant phenotype cell (NCI-ADR/RES). The amide (*R,S*)-**3d**, derived from ricinoleic acid, showed a high selectivity with potent growth inhibition and cell death for glioma cell line. In addition, amide (*S*)-**3c** and (*S*)-**3e**, derived from oleic and linoleic acid respectively, which was specific for glioma and ovarian with phenotype of multiple drug resistance (MDR) cell lines with potent growth inhibition. These results couples with a relative safety profile when analyzing the effect on non-tumor cell line, suggest that the fatty acid amides can serve as templates for the development of candidate to drugs for cancer therapy, including for MDR cancers.

**Keywords:** antiproliferative activity, synthetic molecules, tumor cell, phenotype MDR

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**vs.** - *versus*

**THC** -  $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol

**AEA** - *N*-araquidonil etanolamida (Anandamida)

**2-AG** - 2-araquidonol glicerol

**OEA** - Oleil etanolamida

**PEA** - Palmitoil etanolamida

**INH** - Isoniazida

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

**OPZ** - Pirazol oleico

**SNC** - Sistema nervoso central

**CMI** - Concentração mínima inibitória

**GABA** - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**DCC** - Dicicloexilcarbodiimida

**DMAP** - Dimetilaminopiridina

**DCU** - Dicicloexiluréia

**Et<sub>3</sub>N** - Trietilamina

**RMN <sup>1</sup>H** - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**RMN <sup>13</sup>C** - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

**CDCl<sub>3</sub>** - Clorofórmio deuterado

**GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectroscopy*)

**MDR** – Resistência a múltiplos fármacos (do inglês *Multiple Drug Resistance*)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Compostos canabinóides encontrados na <i>Cannabis sativa</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas de compostos canabinóides endógenos.....	4
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da oleamida, uma amida graxa canabinóide.....	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da <i>N</i> -( $\alpha$ -linoleil) tirosina.....	10
<b>Figura 5.</b> Dopamidas graxas: estrutura química genérica.....	11
<b>Figura 6.</b> Estrutura química genérica das etanolamidas graxas.....	11
<b>Figura 7.</b> Estrutura química genérica das isoniazidas graxas.....	12
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da ( <i>R</i> )-ricinoleilpirrolidilamida.....	13
<b>Figura 9.</b> Compostos submetidos a testes de citotoxicidade em células tumorais de mama.....	14
<b>Figura 10.</b> Estruturas genéricas das amidas graxas: <i>N</i> -acilamidas, <i>N</i> -aciletanolamidas, <i>N</i> -acilaminoácidos, <i>N</i> -acildopamidas e <i>N</i> -acil-GABA.....	16
<b>Figura 11.</b> Estruturas químicas da <i>N</i> -palmitoil-dopamida e <i>N</i> -palmitoil-tirosina.....	17
<b>Figura 12.</b> Estrutura química genérica dos análogos graxos da doxorubicina.....	18
<b>Figura 13.</b> Obtenção da penta-acetilgalactosiltiazolidina através da condensação da <i>L</i> -cisteína com a <i>D</i> -galactose, em 3 etapas, utilizando 4 ácidos graxos com diferentes tamanhos da cadeia carbônica.....	19
<b>Figura 14.</b> Amidas graxas selecionadas para atividade citotóxica frente às linhagens celulares de eritroleucemia.....	19
<b>Figura 15.</b> Estrutura das DHPMs graxas.....	20
<b>Figura 16.</b> Compostos testados nas células de melanona OEA e OPZ.....	21
<b>Figura 17.</b> Estruturas químicas dos compostos sintetizados no trabalho.....	27
<b>Figura 18.</b> Amidas graxas com atividade antiproliferativa.....	28
<b>Figura 19.</b> Amidas obtidas via aminólise.....	32

<b>Figura 20.</b> Amidas obtidas com o uso de DCC e DMAP.....	35
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto (S)- <b>3f</b> .....	37
<b>Figura 22.</b> RMN <sup>13</sup> C do composto (S)- <b>3f</b> .....	38
<b>Figura 23.</b> Análise de CG do composto (S)- <b>3f</b> .....	38
<b>Figura 24.</b> Espectro de massas do composto (S)- <b>3f</b> .....	39
<b>Figura 25.</b> Rearrajo de McLafferty.....	40
<b>Figura 26.</b> Estabilização do carbocátion benzílico com formação do íon tropílio.....	52
<b>Figura 27.</b> Ilustração do papel que cada parte da molécula desempenha na atividade antiproliferativa.....	53
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300M Hz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (R)- <b>1d</b> .....	56
<b>Figura 29</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (R)- <b>1d</b> .....	57
<b>Figura 30.</b> Espectro de CG-EM do composto (R)- <b>1d</b> .....	58
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (R,S)- <b>3d</b> .....	59
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (R,S)- <b>3d</b> .....	60
<b>Figura 33.</b> Espectro CG-EM do composto (R,S)- <b>3d</b> .....	61
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (S)- <b>3b</b> .....	62
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (S)- <b>3b</b> .....	63
<b>Figura 36.</b> Espectro de CG-EM do composto (S)- <b>3b</b> .....	64
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (S)- <b>3e</b> .....	65
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (S)- <b>3e</b> .....	66
<b>Figura 39.</b> Espectro de CG-EM do composto (S)- <b>3e</b> .....	67
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (S)- <b>3c</b> .....	68
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz CDCl <sub>3</sub> ) do composto (S)- <b>3c</b> .....	69
<b>Figura 42.</b> Espectro de CG-EM do composto (S)- <b>3c</b> .....	70

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Compostos utilizados no trabalho.....	26
<b>Tabela 2.</b> Rendimento das amidas via aminólise.....	33
<b>Tabela 3.</b> Rendimento das amidas obtidas com o uso de DCC e DMAP.....	36
<b>Tabela 4.</b> Valores de $GI_{50}$ para as amidas graxas 1-7 avaliadas frente a diversas linhagens celulares.....	43
<b>Tabela 5.</b> Efeitos na inibição do crescimento celular dos derivados benzilamidas graxas (série 1, 2 e 3) frente a diversas linhagens celulares.....	46

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 1.</b> Amidas graxas a serem obtidas.....	6
<b>Esquema 2.</b> Reação de esterificação e transesterificação.....	29
<b>Esquema 3.</b> Mecanismo de formação de ésteres metílicos.....	30
<b>Esquema 4.</b> Obtenção das amidas graxas via aminólise.....	31
<b>Esquema 5.</b> Mecanismo para a reação de aminólise de ésteres metílicos.....	31
<b>Esquema 6.</b> Obtenção das amidas graxas aromáticas na presença de DCC e DMAP.....	35

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto (R,S)- <b>3d</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	50
<b>Gráfico 2.</b> Concentração do composto (R)- <b>2c</b> frente às linhagens celulares de ovário (OVCAR e NCI-ADR/RES).....	51
<b>Gráfico 3.</b> Concentração do composto (S)- <b>3c</b> frente à linhagem celular de ovário NCI-ADR/RES e a linhagem não-tumoral HaCat.....	52
<b>Gráfico 4.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>1a</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	72
<b>Gráfico 5.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>1c</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	72
<b>Gráfico 6.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto (R)- <b>1d</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	73
<b>Gráfico 7.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>2a</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	73
<b>Gráfico 8.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>2c</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	74
<b>Gráfico 9.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto (S)- <b>3b</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	74
<b>Gráfico 10.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto (S)- <b>3c</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	75
<b>Gráfico 11.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto (S)- <b>3e</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	75
<b>Gráfico 12.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto (S)- <b>3f</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	76

<b>Gráfico 13.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>4a</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	76
<b>Gráfico 14.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>4b</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	77
<b>Gráfico 15.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>4c</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	77
<b>Gráfico 16.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto ( <i>R</i> )- <b>4d</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	78
<b>Gráfico 17.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>5a</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	78
<b>Gráfico 18.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>5b</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	79
<b>Gráfico 19.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>5c</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	79
<b>Gráfico 20.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto ( <i>R</i> )- <b>5d</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	80
<b>Gráfico 21.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>5e</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	80
<b>Gráfico 22.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>6c</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	81
<b>Gráfico 23.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto ( <i>R</i> )- <b>6d</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	81
<b>Gráfico 24.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>6e</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	82

<b>Gráfico 25.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>7a</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	82
<b>Gráfico 26.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>7b</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	83
<b>Gráfico 27.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto <b>7c</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	83
<b>Gráfico 28.</b> Análise de dose-resposta para inibição do crescimento celular para o composto ( <i>R</i> )- <b>7d</b> contra às diversas linhagens celulares avaliadas.....	84

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução e justificativa.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>6</b>
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
<b>3 Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>7</b>
3.1 Sistema canabinoide.....	7
3.2 Atividades biológicas dos compostos canabinóides.....	9
3.3 Compostos canabinóides e o câncer.....	14
<b>4 Materiais e métodos.....</b>	<b>22</b>
4.1 Obtenção dos compostos.....	22
4.2 Ensaio antiproliferativo.....	23
<b>5 Resultados e discussões.....</b>	<b>25</b>
5.1 Numeração e nomenclatura dos compostos.....	25
5.2 Síntese dos compostos.....	28
5.3 Atividade antiproliferativa.....	42
<b>6 Conclusão.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>71</b>

## 1 Introdução e justificativa

Câncer é o nome dado a um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e proliferação de células anormais. Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, por dividirem-se rapidamente, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas, podendo ainda espalhar-se para outras regiões do corpo, invadindo tecidos e órgãos, em um processo conhecido por metástase. Se essa propagação não for de alguma forma controlada, pode resultar em morte.<sup>1,2</sup> Estes eventos podem ser causados tanto por fatores externos (*i.e.* tabaco, agentes infecciosos, produtos químicos e radiações) ou fatores internos (*i.e.* mutações herdadas, hormônios, condições imunológicas e mutações que podem ocorrer a partir do metabolismo).<sup>2</sup>

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima e publica anualmente a incidência de câncer no Brasil desde 1995.<sup>1</sup> Para o ano de 2014 foram estimados 576.580 novos casos (302.350 em homens e 274.230 em mulheres). Para a região sul do país são estimados 116.330 casos novos (66.540 em homens e 49.790 em mulheres).<sup>2</sup> Esses dados, de modo geral, revelam números maiores do que as estimativas anteriores.<sup>3</sup>

As opções de tratamento antineoplásico incluem: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e endócrino terapia, e são responsáveis pelo aumento de sobrevida para portadores de diferentes tipos de tumores sólidos. Entretanto, a toxicidade relacionada ao tratamento e o surgimento de resistência aos quimioterápicos em uso

---

<sup>1</sup> American Cancer Society. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/>.

<sup>2</sup> Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer para 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em 25 abril 2014.

<sup>3</sup> Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer para 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/impressao.asp?op=pr&id=1397>.

clínico são responsáveis pela alta incidência de morbidade e mortalidade associadas ao diagnóstico de câncer.<sup>1</sup>

Esta doença é caracterizada pela divisão descontrolada e proliferação de células, o que é causado por mutações no DNA, defeitos no ciclo celular e apoptose desregulada, e compostos que induzem a apoptose podem ser alvos úteis na terapia do câncer.<sup>4,5</sup> Além disso, a resistência a múltiplos fármacos (MDR) é o principal mecanismo pelo qual muitos cânceres, tais como mama, ovário, pulmão e outros, desenvolvem resistência aos fármacos antitumorais,<sup>6,7</sup> e novos fármacos que consigam vencer este obstáculo são alvos importantíssimos nos estudos anticâncer.

Dentro deste contexto, compostos canabinóides estão sendo cada vez mais estudados por apresentarem vasta possibilidade terapêutica. Estes compostos estão dentro de um grupo químico encontrado naturalmente ou que podem ser sintetizados. A *Cannabis sativa*, conhecida popularmente por maconha, é uma das plantas mais antigas utilizada medicinalmente.<sup>8</sup> Dela são extraídos compostos ditos canabinóides, o  $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol (THC) e o canabidiol (**Figura 1**), moléculas lipofílicas, as quais se ligam aos receptores específicos, os receptores canabinóides. Esses receptores foram clonados e a estrutura química dos seus ligantes canabinóides provenientes da *C. sativa* foram elucidadas no início de 1990. Desta forma foi possível elucidar o mecanismo básico dos ligantes nos seus receptores.<sup>9</sup>

---

<sup>4</sup> De Petrocellis, L.; Melck, D.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**, *108*, 191209.

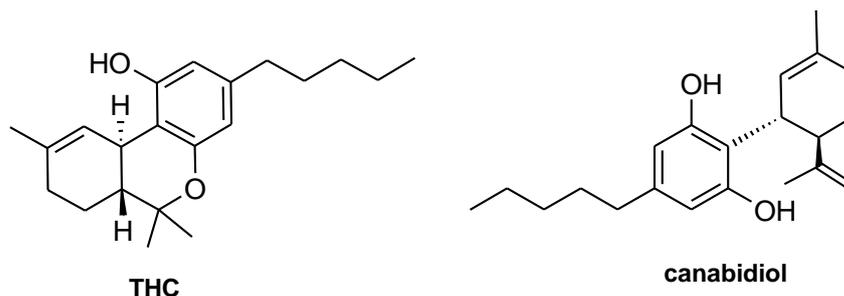
<sup>5</sup> Bifulco, M.; Laezza, C.; Pisanti, S.; Gazerro, P. *British Journal of Pharmacology* **2006**, *148*, 123–135.

<sup>6</sup> Persidis, A. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 94–95.

<sup>7</sup> Gillet, J-P.; Gottesman, M. M. *Methods in Molecular Biology* **2010**, *596*, 47-76.

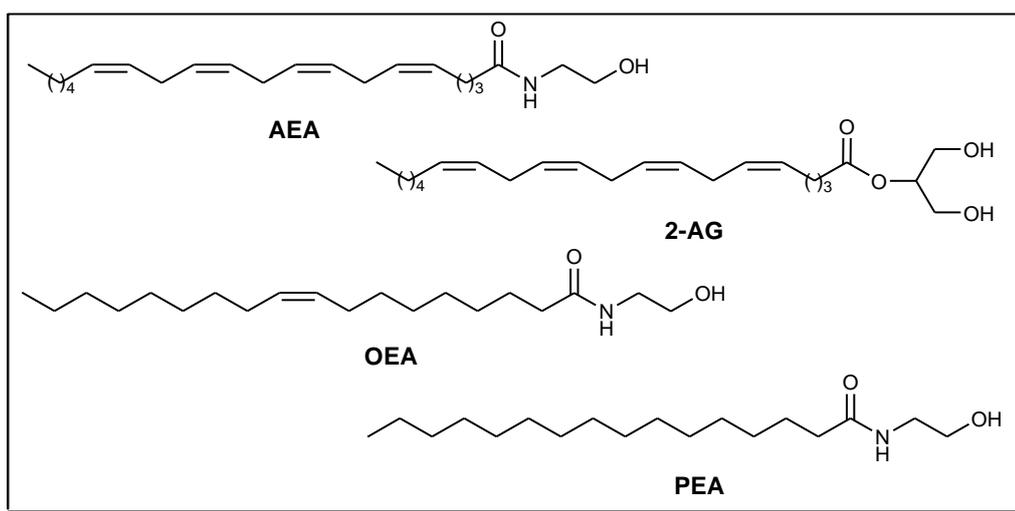
<sup>8</sup> Donohue, S. R.; Dannals, R. F.; Halldin, C.; Pike, V. W.; *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 2961-2970.

<sup>9</sup> Guzman, M.; *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 745-755.



**Figura 1.** Compostos canabinóides encontrados na *Cannabis sativa*.

Existem três tipos de compostos canabinóides, a saber: 1) os derivados de plantas como o THC e canabidiol que ocorrem unicamente em plantas da espécie *Cannabis sativa*; 2) os canabinóides endógenos, também conhecidos como endocanabinóides, os quais são produzidos no organismo de humanos e animais tais como a *N*-araquidonil etanolamida, também conhecida como anandamida (AEA), o 2-araquidonoil glicerol (2-AG), a oleil etanolamida (OEA), e a palmitoil etanolamida (PEA) – todos ilustrados na **Figura 1 e 2**; e 3) os compostos sintéticos, com estruturas análogas aos naturais ou endógenos.<sup>10</sup>



**Figura 2.** Estruturas químicas de compostos canabinóides endógenos.

<sup>10</sup> Safaraz, S.; Adhami, V. M.; Syed, D. N.; Afaq, F.; Mukhtar, H.; *Cancer Research* **2008**, *68*, 339-342.

Compostos canabinóides endógenos e sintéticos oferecem aplicação potencial como fármacos antitumorais, uma vez que vários membros desta classe apresentaram habilidade para reduzir a inflamação, a proliferação celular e a sobrevivência celular.<sup>10,11</sup> A ligação dos canabinóides nos seus receptores celulares canabinóides, CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, podem ativar vários mecanismos de sinalização celular levando a regulação de funções celulares importantes, tais como crescimento celular, proliferação e indução de apoptose, e a modulação de vários estágios no processo metastático (migração, invasão e angiogênese).<sup>12,13</sup>

Vários tipos de tumores, tais como mama, cerebral, pele, tireóide, próstata e coloretal expressam receptores canabinóides,<sup>29,14</sup> então, com afinidade a estes receptores podem oferecer uma estratégia para o tratamento do câncer.

Neste contexto, o Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande (LKSO – FURG) dentro de uma linha de pesquisa que estuda a influência da cadeia graxa na atividade biológica de compostos orgânicos,<sup>15,16,17,18</sup> tem estudado a atividade antitumoral de compostos sintéticos que apresentam estruturas químicas análogas a compostos canabinóides. Desta forma, Lopes relatou o estudo de novas amidas graxas provenientes de ácidos graxos de fontes

---

<sup>11</sup> Long, J. Z.; Nomura, D. K.; Vann, R. E.; Walentiny, D. M.; Booker, L.; Jin, X.; Burston, J. J.; Sim-Selley, L. J.; Lichtman, A. H.; Wiley, J. L.; Cravatt, B. F. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 20270-20275.

<sup>12</sup> Gómez, T.; Pulgar, D.; Velasco, G.; Guzmán, M. *Biochemical Journal* **2000**, *347*, 369-373.

<sup>13</sup> Proto, M. C.; Gazzero, P.; Di Croce, L.; Santoro, A.; Malfitano, A. M.; Pisanti, S.; Laezza, C.; Bifulco, M. *Journal Cellular Physiology* **2012**, *227*, 250-258.

<sup>14</sup> Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Cortés, M. L.; Pulgar, T. G.; Izquierdo, M.; Guzmán, M. *Nature Medicine* **2000**, *6*, 313 – 319.

<sup>15</sup> D'Oca C. R. M.; Marinho, T. G.; Hack, C. R. L.; Duarte, R. C.; D'Oca, M. G. M.; Coelho T.; Silva, P. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 5255-5257.

<sup>16</sup> Rodrigues, M. O. Cantos, J. B.; D'Oca, C. R. M.; Soares, K. L.; Coelho, T. S.; Piovesan, L. A.; Russowsky, D.; Silva, P. A.; D'Oca, M. G. M.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 6910–6914.

<sup>17</sup> Lopes, C. R.; D'Oca, C. R. M.; Duarte, R. C.; Kurz, M. H. S.; Primel, E. G.; Clementin, R. M.; Vilarreyes, J. A.; D'Oca, M. G. M. *Química Nova* **2010**, *3*, 1335-1341

<sup>18</sup> Duarte, R. C.; Ongaratto, R.; Piovesan, L. A.; Lima, V. R.; Soldi, V.; Merlo, A. A.; D'Oca, M. G. M. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 2454-2460.

naturais e da pirrolidilamina, quanto a seus efeitos sobre células eritroleucêmicas K562. Estas amidas graxas demonstraram atividade citotóxica pronunciada, sendo capazes de inibir a proliferação e causar diminuição da viabilidade celular.<sup>16,19</sup>

Marinho, por sua vez, relatou a síntese de 3,4-diidropirimidin-2(1*H*)-onas (DHPMs) com longas cadeias graxas e o estudo da atividade antitumoral frente a células de glioma (C6 rato e UG-138 humana), sendo que alguns dos compostos diminuíram a viabilidade celular.<sup>20</sup>

Recentemente, Santos avaliou o envolvimento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos efeitos da amida endocanabinóide OEA e seu análogo pirazolínico oleico (OPZ) em células de melanoma B16F10. Os resultados para a OEA mostraram uma diminuição da viabilidade celular, indução da apoptose e necrose, e aumento da geração de ROS. No entanto o OPZ causou um aumento da proliferação celular e diminuição de ROS.<sup>21</sup>

Diante das estimativas que crescem a cada ano e da toxicidade e resistência relacionada ao tratamento do câncer, a pesquisa na busca de novos candidatos a fármacos antitumorais mais seguros e eficazes se torna imprescindível, além de ser de extrema importância o entendimento do mecanismo de ação dos mesmos.

---

<sup>19</sup> Lopes, C. R.; *Síntese de Amidas Graxas: Uma nova família de lipídios biologicamente ativos*. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, **2009**.

<sup>20</sup> Marinho, T. G.; *Síntese de Novas 3,4-Diidropirimidin-2(1*H*)-onas Graxas e Estudo da Atividade Antitumoral*. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, **2013**.

<sup>21</sup> Santos, P. A.; *Efeitos do canabinóide oleiletanolamida e seu derivado sintético em células de melanoma*. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada) - Universidade Federal do Rio Grande, **2013**.

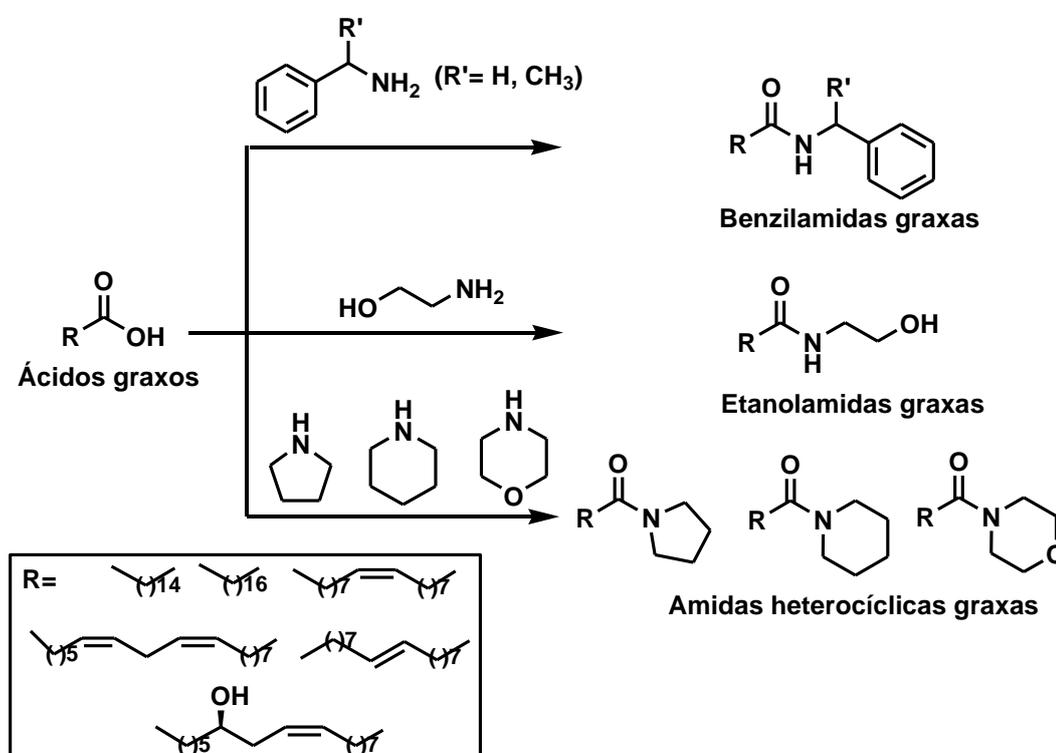
## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Estudo da atividade antiproliferativa de amidas graxas em células tumorais, a fim de se verificar os requisitos estruturais para a atividade e seletividade dos compostos.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Síntese de três séries de amidas graxas a partir de ácidos graxos de fontes renováveis (Esquema 1).
2. Avaliação da atividade antiproliferativa das amidas graxas obtidas frente a 07 (sete) linhagens celulares tumorais e 01 (uma) linhagem celular não-tumoral.
3. Estudo da relação estrutura-atividade das amidas graxas quanto a atividade antiproliferativa.



## 3 Revisão Bibliográfica

### 3.1 Sistema canabinóide

O sistema canabinóide endógeno é formado por dois receptores identificados como CB, o CB<sub>1</sub> e o CB<sub>2</sub>, os quais são acoplados a proteína G, sendo que os efeitos exercidos pelos compostos canabinóides dependem em grande parte desses receptores.<sup>22</sup>

Os receptores canabinóides CB<sub>1</sub> são amplamente encontrados no sistema nervoso central (SNC), incluindo o hipocampo, cortex cerebral, ganglios basais e cerebelo<sup>23</sup> e sua distribuição foi bem caracterizada no encefálo de humanos, sendo também encontrados em tecidos periféricos<sup>24</sup> e em órgãos reprodutores como útero<sup>25</sup> e testículos.<sup>26</sup> Os receptores CB<sub>2</sub> são encontrados abundantemente em tecidos periféricos bem como no sistema imune,<sup>12,27,28</sup> e também foram descritos em cérebros de ratos.<sup>29</sup> Além disso, em um estudo de Guzmán e col.<sup>30</sup> foi realizada uma biópsia em pacientes com tumor cerebral (glioma), a qual foi analisada por técnicas de *Western blot*, imunocoloração e imunofluorescência. Os resultados mostraram que as células tumorais de glioma expressam receptores canabinóides. Em outro

---

<sup>22</sup> Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M.; Young, A.; Bonner, T. I.; *Nature* **1990**, *346*, 561–564.

<sup>23</sup> Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Little, M. D.; Jhonson, M. R.; Melvin, L. S.; De Costa, B. R.; Rice, K. C.; *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 1932–1936.

<sup>24</sup> Parkkari, T.; Savinainen, J. R.; Raitio, K. H.; Saario, S. M.; Matilainen, L.; Sirvio, T.; Laitinen, J. T.; Nevalainen, T.; Niemi, R.; Jarvinen, T.; *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 5252–5228.

<sup>25</sup> Das, S. K.; Paria, B. C.; Chakraborty, I.; Dey, S. K.; *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 4332–4336.

<sup>26</sup> Gérard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G. and Parmentier, M.; *Biochemical Journal* **1991**, *279*, 129–134.

<sup>27</sup> Pertwee, R. G.; *Pharmacology & Therapeutic* **1997**, *74*, 129–180.

<sup>28</sup> Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M.; *Nature* **1993**, *365*, 61–65.

<sup>29</sup> De Jesús, M. L.; Hpstalot, C.; Garibi, J. M.; Sallés, J.; Meana, J. J.; Callado, L. F.; *Neurochemistry International* **2010**, *56*, 829–833.

<sup>30</sup> Guzmán, M.; Duarte, M. J.; Blázquez, C.; Ravina, J.; Rosa, M. C.; Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Velasco, G.; González-Feria, L. *British Journal of Cancer* **2006**, *95*, 197–203.

estudo, Sarfaraz e col.<sup>31</sup> mostraram ainda que receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> são mais pronunciados em células tumorais de próstata do que nas suas células normais.

Os resultados observados demonstram que a obtenção de compostos que possam interagir com esses receptores, tornam o sistema endocanabinóide um excelente alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.<sup>32,33,34</sup>

---

<sup>31</sup> Sarfaraz, S.; Afaq, F.; Adhami, V. M.; Malik, A. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 39480–39491.

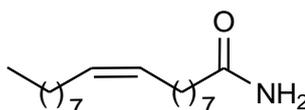
<sup>32</sup> Di Marzo, V.; De Petrocellis, L. *Annual Review of Medicine* **2006**, *57*, 553–574.

<sup>33</sup> Di Marzo, V. *Trends Pharmacological Science* **2006**, *27*, 134–140.

<sup>34</sup> Lambert, D. M.; Fowler, C. J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5059–5087.

### 3.2 Atividades biológicas dos compostos canabinóides

No início da década de 90 foram isoladas e identificadas amidas graxas de origem natural, todas derivadas de ácidos graxos poli-insaturados. Entre estas, a mais conhecida e estudada é a *N*-aracondonoliletanolamida [anandamida, AEA (**Figura 2**)], a qual foi encontrada tanto endogenamente, sendo isolada do cérebro de suínos em 1992,<sup>35</sup> como também foi encontrada no chocolate,<sup>36</sup> demonstrando capacidade de aliviar estados de ansiedade e de induzir estados de tranquilidade e relaxamento.<sup>37</sup> Posteriormente, outras amidas graxas foram isoladas e identificadas, como a palmitoiletanolamida (PEA) (**Figura 2**) e a oleamida (**Figura 3**), esta última foi isolada do fluido cerebro espinhal de mamíferos, mostrou induzir o sono em ratos.<sup>38</sup> Estas amidas desempenham funções importantes no organismo, tais como indução do sono, neuroprotetora e analgésica.<sup>4</sup> Ademais, estão envolvidas no sistema imunológico, balanço de energia, recuperação de estresse, efeitos cardiovasculares, antidepressivos, endócrinos, na fertilidade, entre outras.<sup>39</sup>



**Figura 3.** Estrutura química da oleamida, uma amida graxa canabinóide.

Os endocanabinóides são lipídeos sintetizados endogenamente, que se diferem de outros derivados de plantas conhecidos ou canabinóides sintéticos por serem formados apenas na medida em que o organismo necessita.<sup>40</sup>

<sup>35</sup> Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A. & Mechoulam, R. *Science* **1992**, 258, 946–949.

<sup>36</sup> Di Tomaso, E.; Beltramo, M.; Piomelli, D. *Nature* **1996**, 382, 677-678.

<sup>37</sup> Pacher, P.; Batkai, S.; Kunos, G. *Pharmacological Reviews* **2006**, 58, 389-462.

<sup>38</sup> Cravatt, B. F.; Prospero-Garcia, O.; Siuzdak, G.; Gilula, N. B.; Henriksen, S. J.; Borger, D. L. & Lerner, R. A. *Science* **1995**, 268, 1506-1509.

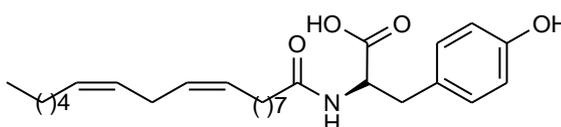
<sup>39</sup> Burstein, S.; Salmonsén, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, 16, 9644-9651.

<sup>40</sup> Brown, I.; Whale, K. W. J.; Cascio, M. G.; Smoum-Jaoni, R.; Mecchoulam, R.; Pertwee, R. G.; Heys, S.D. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **2011**, 85, 305-3010.

As propriedades desses compostos graxos tem despertado cada vez mais o interesse dos grupos de pesquisa em estudar atividades biológicas semelhantes aos citados anteriormente, sendo esses compostos de origem natural ou sintética.

Alguns grupos de pesquisa estão modificando compostos biologicamente ativos, a fim de aumentar a lipofilicidade, inserindo cadeias graxas nos mesmos, para tentar torná-los mais potentes e/ou específicos ou ainda apresentarem uma determinada atividade biológica que o composto ainda não havia apresentado para determinados tipos de patologia.

Yehuda<sup>41</sup> estudou a atividade anti-Parkinson da *N*-( $\alpha$ -linoleil)-tirosina (**Figura 4**), utilizando a *L*-tirosina, um aminoácido que não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, combinado com ácido graxo  $\alpha$ -linoleico (**Figura 4**). Os resultados demonstraram que a combinação de um aminoácido com um ácido graxo produziu a atividade dopaminérgica desejada, sugerindo que a molécula permeou a barreira hematoencefálica, pelo aumento de sua lipofilicidade.



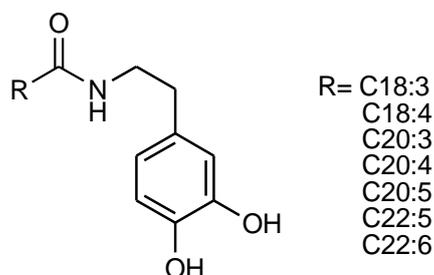
**Figura 4.** Estrutura química da *N*-( $\alpha$ -linoleil)tirosina.

Bezuglov e col.<sup>42</sup> realizaram a inserção de ácidos graxos, todos poli-insaturados (C18:3, C18:4, C20:3, C20:4, C20:5, C22:5, C22:6), na molécula de dopamina— um neurotransmissor do sistema nervoso central, levando a série de compostos (**Figura 5**). A caracterização farmacológica foi feita a partir de ensaios em membranas celulares de ratos, e os testes mostraram que, para estes compostos, a

<sup>41</sup> Yehuda S. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **2002**, 72, 7-11.

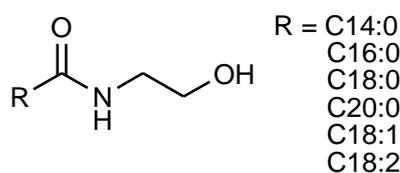
<sup>42</sup> Bezuglov, V.; Bobrov, M.; Gretskeya, N.; Gonchar, A.; Zinchenko, G.; Melck, D.; Bisogno, T.; Di Marzo, V.; Kuklev, D.; Rossi, J.C.; Vidal, J.P.; Durand, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11, 447-449.

atividade foi dependente da cadeia do ácido graxo, sendo as amidas graxas com 4 (quatro) ou mais insaturações as que possuíram propriedades canabinomiméticas mais pronunciadas.



**Figura 5.** Dopamidas graxas: estrutura química genérica.

Berdyshev<sup>43</sup> relatou a síntese de análogos da anandamida utilizando os ácidos graxos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), araquidínico (C20:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) e a etanolamina (**Figura, 6**). Os compostos foram testados frente ao bloqueio de fertilidade, sendo que os derivados dos ácidos insaturados se mostraram bloqueadores de fertilidade muito potentes. Entre os compostos saturados, nenhum bloqueou a fertilização. A atividade biológica destes compostos foi comparada com a anandamida que se mostrou a mais potente de todos os compostos testados.



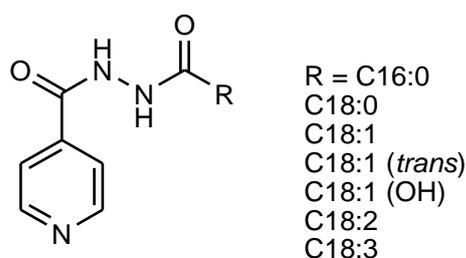
**Figura 6.** Estrutura química genérica das etanolamidas graxas.

Ainda com relação a introdução de cadeias graxas em moléculas biologicamente ativas, Rodrigues e col.<sup>44</sup> realizaram a síntese e a avaliação da

<sup>43</sup> Berdyshev, E.V. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* **1999**, 122, 327-330.

<sup>44</sup> Rodrigues, M. O.; Cantos, J. B.; D'Oca, C. R. M.; Soares, K. L.; Coelho, T. S.; Piovesan, L. A.; Russowsky, D.; Silva, P. A.; D'Oca, M. G. M.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 6910–6914.

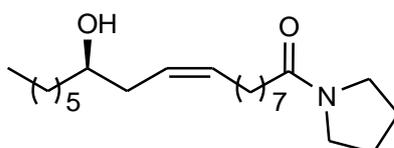
atividade antituberculose de análogos graxos da isoniazida (INH), um dos principais fármacos utilizados no tratamento da doença. Os análogos foram derivados de ácidos graxos saturados, como o palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), monoinsaturados, como o oleico (C18:1) e elaídico (C18:1 *trans*), poliinsaturados como o linoleico (C18:2) e linolenico (C18:3) e insaturado funcionalizado como o ricinoleico (C18:1, OH) (**Figura 7**). Em geral, foi observado que a inserção de cadeias graxas derivadas de ácidos graxos saturados e insaturados na estrutura molecular de INH resultou em propriedades antimicobacterianas significativamente melhores que as da INH. Provavelmente o aumento da lipofilicidade da INH desempenhou um papel importante em sua atividade antimicobacteriana. Entre os derivados testados, o composto derivado do ácido palmítico pode representar um protótipo a candidato a fármaco anti-tuberculose, uma vez que apresentou bons valores de CMI (concentração mínima inibitória) contra todas as cepas estudadas.



**Figura 7.** Estrutura química genérica das isoniazidas graxas.

D'Oca e col.<sup>15</sup> sintetizaram amidas graxas derivadas de ácidos graxos como ácido palmítico (C16:0) esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e ricinoleico (C18:1 OH) e aminas cíclicas e acíclicas. A atividade antimicobacteriana desses compostos foi investigada, sendo os testes realizados *in vitro* contra as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. tuberculosis* resistente a rifampicina (ATCC 35338) e *M. tuberculosis* resistente a isoniazida (ATCC35822). Os resultados foram expressos em concentração mínima inibitória

(CMI). Os valores observados para os compostos sintetizados são comparados com o padrão de CMI para a Isoniazida ( $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e para a Rifampicina ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Ao relacionar a estrutura dos compostos testados com as respostas obtidas nos ensaios biológicos foi possível observar uma maior atividade para amidas derivadas de cadeias insaturadas e de aminas cíclicas. Entre estes, a (*R*)-ricinoleilpirrolidilamida demonstrou a melhor atividade para as três cepas testadas (**Figura 8**).



**Figura 8.** Estrutura química da (*R*)-ricinoleilpirrolidilamida.

### 3.3 Compostos canabinóides e o câncer

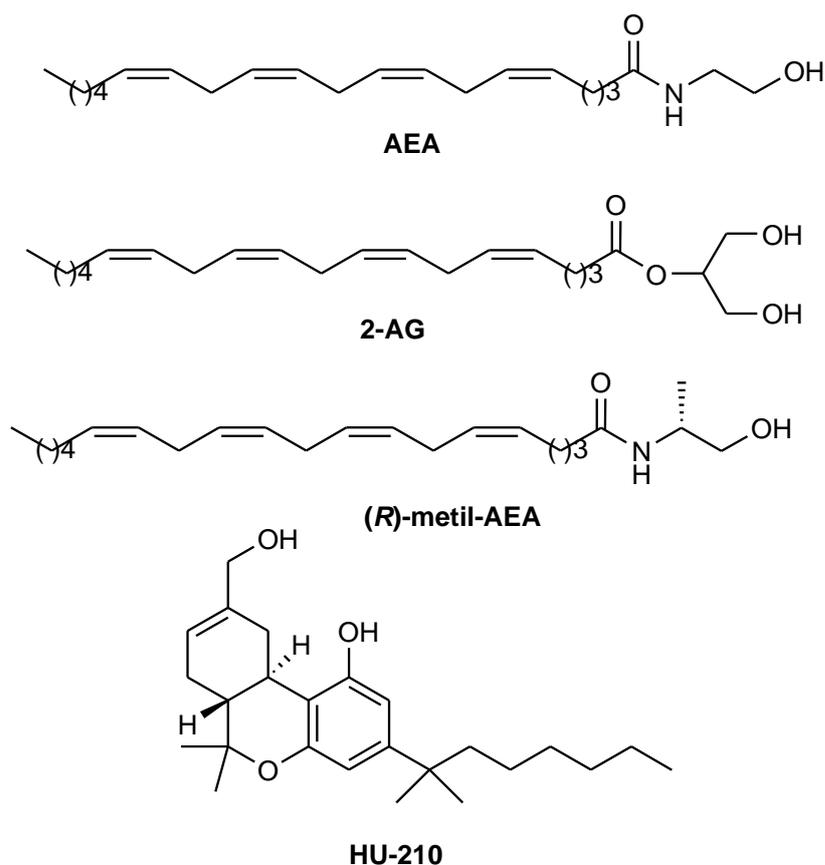
Especificamente quanto à atividade antitumoral, a ligação dos endocanabinóides aos receptores canabinóides celulares, CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, pode ativar várias vias de sinalização molecular e, desta forma, regular funções importantes, tais como crescimento e proliferação celular. Esses efeitos podem apresentar uma importante função nas células cancerígenas, a de regulação da proliferação dessas células, em particular por induzir a apoptose (ou morte celular programada), uma vez que células tumorais possuem apoptose desregulada, esta propriedade se torna imprescindível para o estudo destes compostos.<sup>45</sup>

De Petrocellis e col.<sup>46</sup> avaliaram a AEA, talvez o endocanabinóide mais largamente estudado, quanto a atividade anti-mitogênica em células tumorais de mama das linhagens MCF-7 e EMF-19. Também foram avaliados o ácido araquidônico, um análogo mais estável da AEA, a (*R*)-metilanandamida, bem como um endocanabinóide endógeno, o 2-AG e um canabinóide sintético análogo do THC conhecido como HU-210 (**Figura 9**). A AEA mostrou uma atividade citotóxica dose-dependente para ambas as linhagens celulares. A (*R*)-metil-AEA, o 2-AG e o HU-210, inibiram a proliferação de EMF-19, enquanto que o ácido araquidônico foi muito menos efetivo.

---

<sup>45</sup> Brown, I.; Wahle, K. W. J.; Cascio, M.G.; Smoum-Jaouni, R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R. G.; Heys, S. D. *Prostaglandins Leukotrienes Essential* **2011**, *85*, 305-310.

<sup>46</sup> De Petrocellis, L.; Melck, D.; Palmisano A.; Bisogno, T.; Laezza, C.; Bifulco, V. M.; Di Marzo, *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* **1998**, *95*, 8375-8380.



**Figura 9.** Compostos submetidos a testes de citotoxicidade em células tumorais de mama.

Ruiz e col.<sup>47</sup> estaram o THC em células tumorais de próstata (PC-3). Este estudo demonstrou que houve indução de apoptose, ocasionando uma queda drástica de viabilidade celular dose-dependente.

O glioblastoma multiforme é uma das formas mais agressivas e mais comuns de tumores cerebrais (astrocitoma de grau IV). O tratamento para pacientes diagnosticados com a doença incluem resseção cirúrgica e radioterapia focal, porém é paliativo, já que esses pacientes após diagnosticados com a doença sobrevivem de 6 a 12 meses.<sup>48,49,50</sup> O THC foi submetido a avaliação da atividade antitumoral *in*

<sup>47</sup> Ruiz, L.; Miguel, A.; Diaz-Laviada, I. *FEBS Letters* **1999**, 458, 400-404.

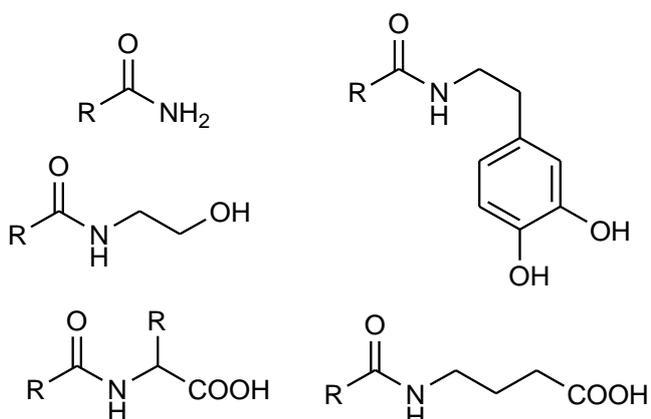
<sup>48</sup> Afra, D.; Baron, B.; Bonadonna, G.; Burderr, S.; Parmar, M.K.B.; Stenning, S.P.; Stewart, L.A.; Curran, Jr. W.J.; Green, S.B.; Hildebrand, J.; Scott, C.B.; Shapiro, W.; Souhami, R.L.; Thomas, D.; Trojanowski, T.; Urtasun, R.C.; Walker, M.D. *The Lancet* **2002**, 359, 1011-1018.

<sup>49</sup> Kleihues, P.; Louis, D.N.; Scheithauer, B.W.; Rorke, L.B.; Reifenberger, G.; Burger, P.C.; Cavenee, W.K. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology* **2002**, 61, 215-225.

<sup>50</sup> Lonardi, S.; Tosoni, A.; Brandes, A.A. *Cancer Treatment Reviews* **2005**, 31, 79-89.

*vivo*. O teste foi realizado em nove pacientes com glioblastoma multiforme, em estado terminal, que já haviam sido submetidos a terapia convencional (cirurgia e radioterapia), mas não obtiveram resultados significativos. Os resultados com o uso de THC intratumoral mostraram que houve uma diminuição da proliferação celular e também um aumento da apoptose das células tumorais quando administrado em dois pacientes.<sup>51,29</sup>

Em um trabalho de Burstein e Salmonsén,<sup>52</sup> foram sintetizados diferentes amidas graxas, utilizando diferentes ácidos graxos, variando desde o ácido palmítico até ácidos graxos maiores poli-insaturados e aminas de diferentes arranjos estruturais, tais como derivados da amônia, da etanolamina, de  $\alpha$ -aminoácidos, da dopamina e do GABA (**Figura 10**).



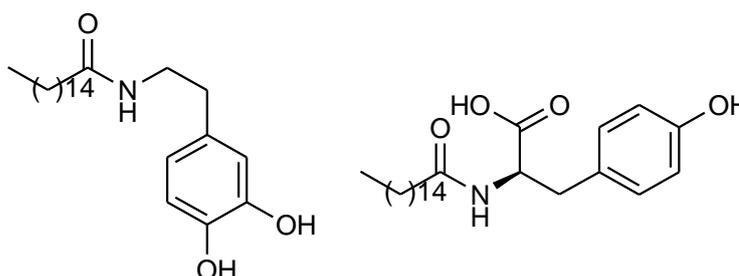
**Figura 10.** Estruturas genéricas das amidas graxas: *N*-acilamidas, *N*-aciletanolamidas, *N*-acilaminoácidos, *N*-acildopaminas e *N*-acil-GABAs.

Após a síntese, os compostos foram submetidos a avaliação dos seus efeitos frente à proliferação de células tumorais, sendo as linhagens testadas: célula normal de mama, célula tumoral de mama, célula cervical tumoral e célula tumoral embrionária do pulmão (todas humanas), macrófagos e células basofílicas leucêmicas, as duas últimas de ratos. Os resultados obtidos demonstraram que

<sup>51</sup> Guzmán, M.; Duarte, M. J.; Blázquez, C.; Ravina, J.; Rosa, M. C.; Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Velasco, G.; González-Feria, L. *British Journal of Cancer* **2006**, *95*, 197–203.

<sup>52</sup> Burstein, S.; Salmonsén, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 9644-9651.

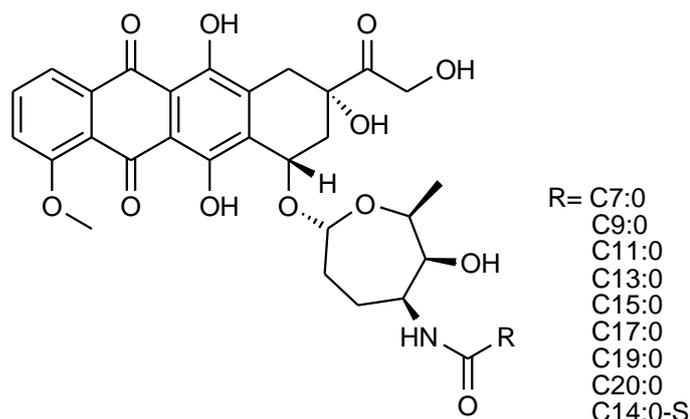
muitos compostos foram eficazes na inibição da proliferação de linhagens celulares diferentes, e apenas dois análogos se mostraram específicos nas células cancerígenas de mama, *N*-palmitoil-dopamina e *N*-palmitoil-tirosina (**Figura 11**). A *N*-palmitoil-dopamina, teve a maior seletividade comparada com a célula normal de mama, não apresentando qualquer efeito sobre esta célula, e para a célula tumoral produziu 80% de inibição do crescimento da mesma.



**Figura 11.** Estruturas químicas da *N*-palmitoil-dopamina e *N*-palmitoil-tirosina.

Chhikara e col.<sup>53</sup> fizeram a modificação da doxorubicina – um dos fármacos amplamente utilizado na terapia antitumoral – pela inserção de cadeias graxas, e os seus derivados graxos foram submetidos a avaliação antitumoral. Foi realizada a inserção de diversos ácidos graxos variando a cadeia de 8 à 20 átomos de carbono (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 e C20:0), bem como de um ácido graxo funcionalizado, o  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$  e um ácido não-graxo, o  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$  (**Figura 12**). Os compostos obtidos foram testados em várias linhagens tumorais como leucemia, ovário, mama e células de colón. Os resultados obtidos mostraram que os novos compostos derivados da doxorubicina apresentaram atividade antitumoral reduzida para as linhagens testadas quando comparados ao fármaco sem os substituintes, sugerindo que, neste caso, é necessário que o grupo amino da doxorubicina esteja livre para a atividade antitumoral.

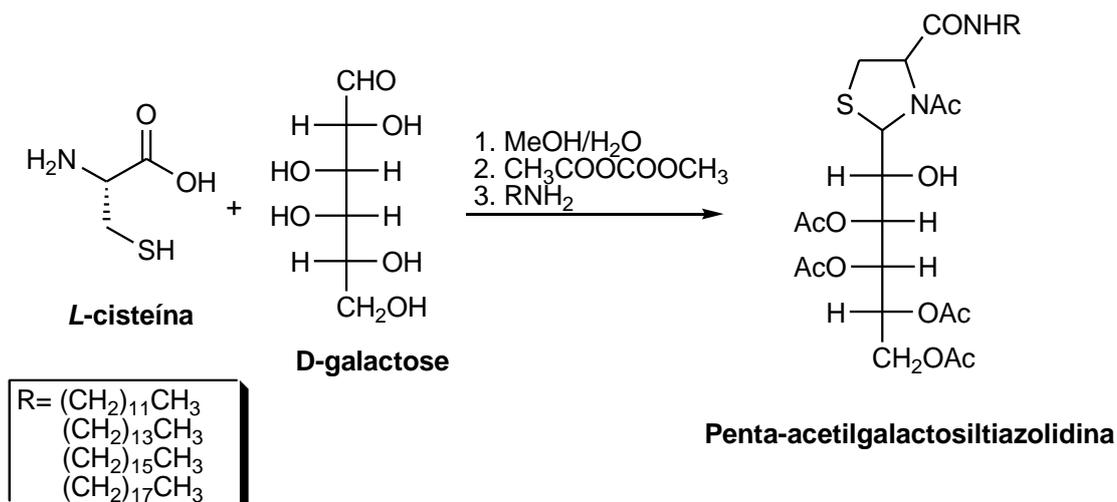
<sup>53</sup> Chhikara, B. S.; Jean, N. S.; Mandal, D.; Kumar, A.; Parang, K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 2037-2042.



**Figura 12.** Estrutura química genérica dos análogos graxos da doxorubicina.

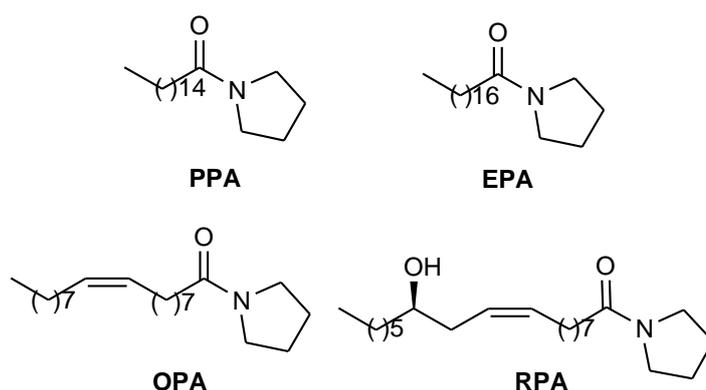
Serra e col.<sup>54</sup> relataram a síntese do penta-acetilgalactosiltiazolidina amida (**Figura 13**), realizando a condensação da *D*-galactose com a *L*-cisteína. A síntese foi feita com ácidos graxos de 4 diferentes tamanhos de cadeias carbônicas, todas saturadas (C12:0, C14:0, C16:0, C18:0). A citotoxicidade dos compostos obtidos foi avaliada frente às linhagens de células tumorais de mama e melanoma, e foram comparadas a uma linhagem de células de fibroblasto (não tumoral). Para os derivados testados, o composto com a cadeia carbônica de 16 carbonos foi o que apresentou maior atividade antiproliferativa, e o composto de cadeia curta, com 12 carbonos apresentou menor atividade. Para a seletividade dos compostos não foi diferente, a maior seletividade foi do composto com 16 carbonos e a menor foi para o composto de 12 carbonos.

<sup>54</sup> Serra, A. C.; Gonalves, A. M. d'A. R.; Laranjo, M.; Abrantes, A. M.; Gonçalves, A. C.; Sarmiento-Ribeiro, A. B.; Botelho, M. F. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 53, 398- 402.



**Figura 13.** Obtenção da penta-acetilgalactosiltiazolidina através da condensação da L-cisteína com a D-galactose, em 3 etapas, utilizando 4 ácidos graxos com diferentes tamanhos da cadeia carbônica.

Tratando-se de amidas graxas, Lopes e col.<sup>19</sup> realizaram a síntese via aminólise de amidas graxas derivadas de ácidos graxos saturados, insaturados e insaturados funcionalizados, e aminas heterocíclicas, aromáticas e alifáticas. Dessas, 4 amidas, todas derivadas da pirrolidina: palmitoilpirrolidilamida (PPA), estearoilpirrolidilamida (EPA), oleoilpirrolidilamida (OPA), ricinoleoilpirrolidilamida (RPA) (**Figura 14**), foram selecionadas para avaliação da atividade citotóxica frente à linhagem celular de eritroleucemia K562.

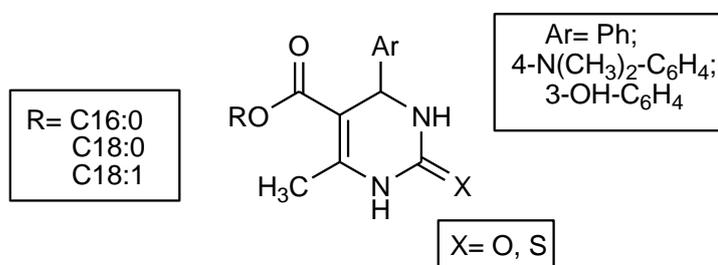


**Figura 14.** Amidas graxas selecionadas para atividade citotóxica frente às linhagens celulares de eritroleucemia

As amidas demonstraram capacidade citotóxica, sendo capazes de inibir a proliferação e diminuir a viabilidade celular. Para a EPA foi observada a maior citotoxicidade imediatamente após o contato com as células na concentração de 1000

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  e na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a citotoxicidade foi observada a partir de 24 horas.

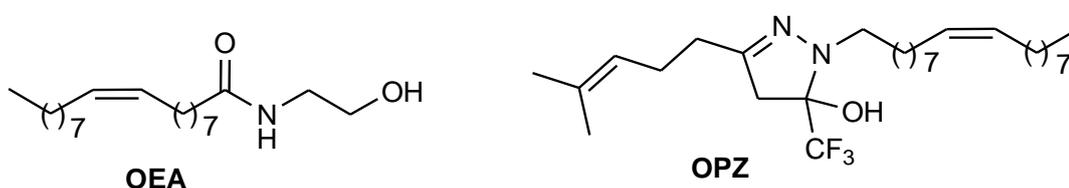
Marinho<sup>20</sup> relatou a síntese de novas 3,4-diidropirimidin-2(1*H*)-onas (DHPMs) derivadas de ácidos graxos de cadeias saturadas e insaturadas, benzaldeído, 3-hidroxibenzaldeído, 4-dimetilaminobenzaldeído, uréia e tiouréia. Alguns dos compostos derivados do benzaldeído e do 3-hidroxibenzaldeído, uréia e tiouréia (**Figura 15**) foram submetidos ao estudo da atividade antitumoral em células de glioma de rato (linhagem C6) humana (linhagem UG-138).



**Figura 15.** Estrutura das DHPMs graxas.

Os resultados mostraram que os compostos derivados da tiourea, do 3-hidroxibenzaldeído e da cadeia graxa palmítica e oleica, causaram uma diminuição pronunciada da viabilidade celular. Quando submetidos ao teste de citotoxicidade, os mesmos compostos graxos da cadeia oleica e palmítica, porém derivada da ureia, causaram uma diminuição da viabilidade celular excelente. De modo geral, os compostos derivados da cadeia graxa oleica e palmítica com o 3-hidroxibenzaldeído, ureia e tiourea, apresentaram uma diminuição na viabilidade celular para ambas as linhagens celulares C6 e UG-138. Os testes realizados com os compostos graxos mostram que o grupo hidroxila parece ser essencial para a diminuição da viabilidade celular, já que houve uma diminuição pronunciada da viabilidade celular quando comparados os compostos derivados do 3-hidroxibenzaldeído com os compostos derivados do benzaldeído.

De acordo com a literatura, os compostos canabinóides podem exercer efeitos anti-proliferativos e induzir a morte celular em um mecanismo dependente do envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS),<sup>55,56</sup> desta forma o nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Laboratório de Cultura Celular- ICB (FURG), avaliou o envolvimento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos efeitos da amida endocanabinóide OEA e seu análogo pirazolínico oleico (OPZ) (**Figura 16**) em células de melanoma de camundongo (linhagem B16F10).



**Figura 16.** Compostos testados nas células de melanoma OEA e OPZ.

Os resultados para a OEA mostraram uma diminuição da viabilidade celular, indução da apoptose e necrose, e aumento da geração de ROS nas células de melanoma B16F10. Entretanto, o análogo OPZ causou um aumento da proliferação celular e diminuição de ROS, demonstrando que esta construção não apresenta aumento no potencial antitumoral.<sup>21</sup>

<sup>55</sup> Massi, P.; Vaccani, A.; Rubino, T.; Parolaro, D. *Journal of Neuroimmunology* **2003**, *145*, 46-54.

<sup>56</sup> Sarker, K.P.; Biswas, K.K.; Yamakuchi, M.; Lee, K.Y.; Hahiguchi, T.; Kracht, M.; Kitajima, I.; Maruyama, I. *Journal of Neurochemistry* **2003**, *85*, 50-61.

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Obtenção dos compostos

Todos os compostos foram sintetizados segundo duas metodologias descritas por D'Oca e col.<sup>15</sup> e Lopes e col.<sup>17</sup> As amidas aromáticas foram sintetizadas por reações do respectivo ácido graxo (0,3 mmol) com uma amina (0,3 mmol), trietilamina (Et<sub>3</sub>N 0,3 mmol), 10% de dimetilaminopiridina (DMAP) e dicitcloexil carbodiimida (DCC 0,3 mmol) foi adicionado gota-a-gota na reação em uma solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e esta mistura foi mantida sob agitação constante à temperatura ambiente por 24 horas. Após, a dicitcloexilureia, um sólido formado no meio reacional foi removida por simples filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o bruto reacional purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e *n*-hexano:acetato de etila (7:3 v/v) como eluentes.

As demais amidas foram sintetizadas a partir dos respectivos esteres metílicos (FAMES) obtidos via esterificação dos respectivos ácidos graxos. A reação de aminólise de FAMES (0,3 mmol) foi realizada na presença de aminas (1,8 mmol) sob aquecimento de 130 °C por 24 horas. A purificação foi realizada através de coluna cromatográfica tendo sílica gel como fase estacionária e gradientes de *n*-hexano:acetato de etila como eluente. Iniciando com 100% de *n*-hexano e seguindo até 60% de hexano e 40% de acetato de etila.

Todos os compostos sintetizados foram submetidos à caracterização por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrofotômetro de massas (GC-MS). Os dados obtidos estão de acordo com os publicados na literatura.<sup>15,17</sup>

## 4.2 Ensaios antiproliferativos

Os testes de atividade antiproliferativa *in vitro* foram realizados em parceria com o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CBPQBA) da Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP, conforme metodologia descrita por Monks e col<sup>57</sup> (1991). Foram testadas sete linhagens de células tumorais humanas [U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, do tipo não pequenas células), PC-3 (próstata) e OVCAR-03 (ovário)], as quais foram cedidas por Frederick MA, do Instituto Nacional do Câncer /USA. Também foi utilizada uma célula não tumoral, VERO (célula epitelial de macaco verde) ou HaCat (queratinócito humano). Estas células foram doadas pelo Dr. Ricardo Della Coletta (FOP, UNICAMP). O armazenamento e cultura experimental foram em meio de RPMI 1640 (GIBCO BRL) suplementado com 5% de soro fetal bovino (GIBCO BRL). A mistura de penicilina:streptomicina ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi adicionada a cultura de células. As células em placas de 96 poços foram colocadas em contato com as amostras diluídas em DMSO em 4 concentrações diferentes (0,25; 2,5; 25 e  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) à 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h. A maior concentração de DMSO no meio era de 0,25%, e o grupo controle recebeu a mesma quantidade de DMSO, e foi observado que esta concentração não afetou a viabilidade celular. Após a exposição, as células foram fixadas com 50% de ácido tricloroacético e a proliferação celular determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular utilizando o ensaio de sulforrodamina B. Foi feita uma curva de concentração-resposta para cada linhagem celular, GI<sub>50</sub> (concentração que inibe o crescimento de 50% das células),

---

<sup>57</sup> Monks, A. D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. *Journal of the National Cancer Institute* **1991**, 83, 757-766.

TGI (concentração que inibe o crescimento celular totalmente – concentração citostática), e LC<sub>50</sub> (concentração que causa morte em 50% das células – concentração citotóxica), foram determinadas por meio de análise de regressão não-linear utilizando software ORIGIN 9.1 (*OriginLab Corporation*).<sup>58</sup>

---

<sup>58</sup> Shoemaker, R. H. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 813–823.

## **5 Resultados e discussões**

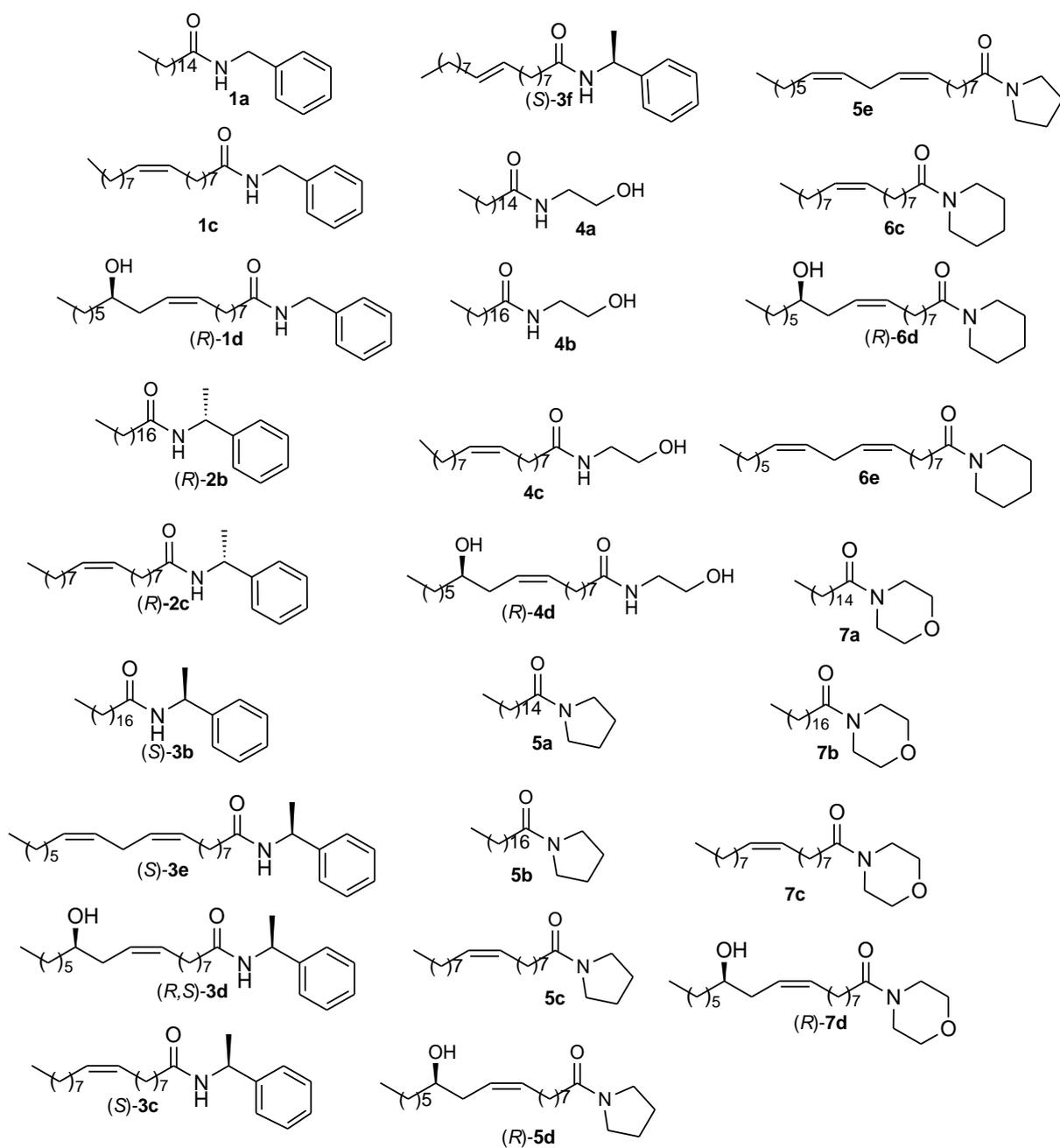
### **5.1 Numeração e nomenclatura dos compostos**

Foram utilizados dois critérios para a numeração dos compostos sintetizados: 1) A sequência de números (1-7), referente às aminas; 2) A sequência de letras (a-f), referente às cadeias graxas.

A numeração dos compostos sintetizados, nomenclatura usual e IUPAC, fórmula molecular e peso molecular estão apresentados na tabela 1. As estruturas químicas das amidas graxas sintetizadas estão representadas na figura 17.

Tabela 1. Compostos utilizados no trabalho.

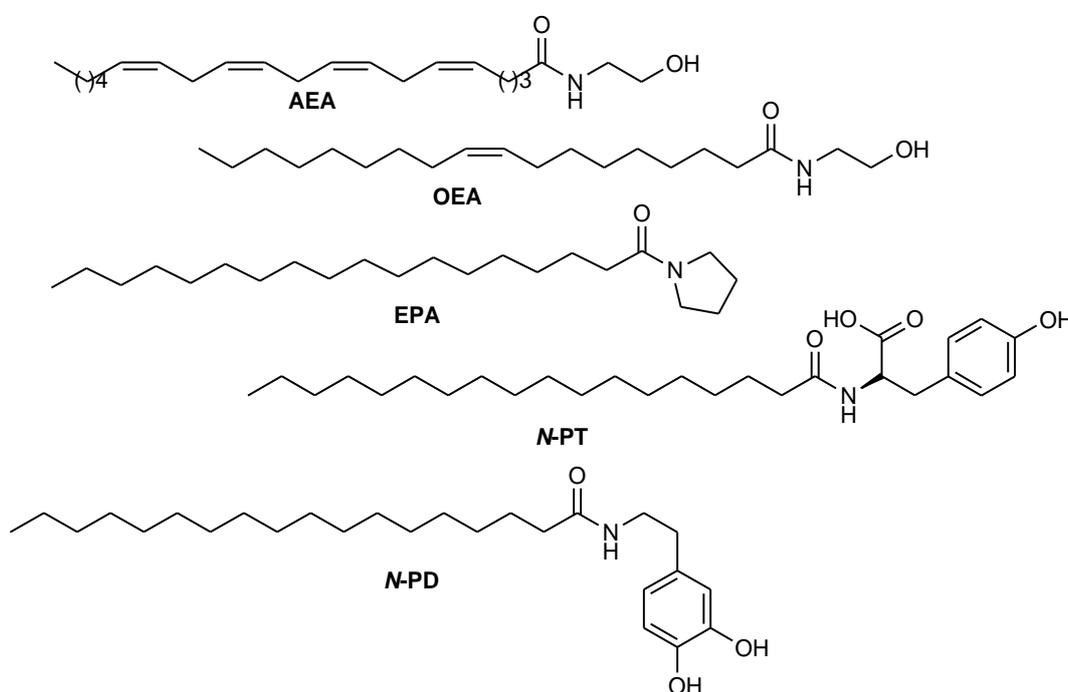
Amida	F.M.	P. M. g/mol	IUPAC	Usual
<b>1a</b>	C <sub>23</sub> H <sub>39</sub> NO	345,3	<i>N</i> -benzilpropionamida	Palmitoilbenzilamida
<b>2c</b>	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO	371,32	( <i>Z</i> )- <i>N</i> -benzilhex-3-enamida	Oleilbenzilamida
( <i>R</i> )- <b>1d</b>	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>	387,31	( <i>R,Z</i> )- <i>N</i> -benzil-6-hidroxi-3-enamida	( <i>R</i> )-ricinoleilbenzilamida
( <i>R</i> )- <b>2a</b>	C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> NO	359,32	( <i>R</i> )- <i>N</i> -(1-feniletil)propionamida	( <i>R</i> )-palmitoilmetilbenzilamida
( <i>R</i> )- <b>2c</b>	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO	385,33	( <i>R,Z</i> )- <i>N</i> -(1-feniletil)hex-3-enamida	( <i>R</i> )-oleilmetilbenzilamida
( <i>S</i> )- <b>3b</b>	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO	387,35	( <i>S</i> )- <i>N</i> -(1-feniletil)propionamida	( <i>S</i> )-estearilmetilbenzilamida
( <i>S</i> )- <b>3c</b>	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO	385,33	( <i>S,Z</i> )- <i>N</i> -(1-feniletil)hex-3-enamida	( <i>S</i> )-oleilmetilbenzilamida
( <i>R,S</i> )- <b>3d</b>	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>2</sub>	401,33	( <i>R,Z</i> )-6-hidroxi- <i>N</i> -( <i>S</i> )-1-feniletil)oct-3-enamida	( <i>R,S</i> )-ricinoleilmetilbenzilamida
( <i>S</i> )- <b>3e</b>	C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> NO	383,32	( <i>S,3Z,6Z</i> )- <i>N</i> -(1-fenil)nona-3,6-dienamida	( <i>S</i> )-linoleilmetilbenzilamida
( <i>S</i> )- <b>3f</b>	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO	385,33	( <i>S,E</i> )- <i>N</i> -(1-feniletil)hex-3-enamida	( <i>S</i> )-elaidilmetilbenzilamida
<b>4a</b>	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	299,28	<i>N</i> -2-hidroxi-1-palmitamida	Palmitoiletanolamida
<b>4b</b>	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>	327,31	<i>N</i> -2-hidroxi-1-estearamida	Estearoiletanolamida
<b>4c</b>	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	325,3	<i>N</i> -2-hidroxi-1-oleamida	Oleoiletanolamida
( <i>R</i> )- <b>4di</b>	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub>	341,29	( <i>R,Z</i> )-12-hidroxi- <i>N</i> -2-hidroxi-1-octadec-9-enamida	( <i>R</i> )-ricinoleiletanolamida
<b>5a</b>	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO	309,53	1-pirrolidin-1-il-hexadecan-1-ona	Palmitoilpirrolidilamida
<b>5b</b>	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO	337,83	1-pirrolidin-1-il-octadecan-1-ona	Estearoilpirrolidilamida
<b>5c</b>	C <sub>22</sub> H <sub>41</sub> NO	355,32	( <i>Z</i> )-1-pirrolidin-1-il-octadec-9-em-1-ona	Oleoilpirrolidilamida
( <i>R</i> )- <b>5d</b>	C <sub>22</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>	351,31	( <i>R,Z</i> )-12-hidroxi-1-pirrolidin-1-il-octadec-9-em-1-ona	( <i>R</i> )-ricinoleilpirrolidilamida
<b>5e</b>	C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> NO	333,3	(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> )-1-pirrolidin-1-il-octadeca-9,12-dien-1-ona	Linoleoilpirrolidilamida
<b>6c</b>	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO	349,59	( <i>Z</i> )-1-piperidin-1-il-octadec-9-em-1-ona	Oleoilpiperidilamida
( <i>R</i> )- <b>6d</b>	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>2</sub>	365,33	( <i>R,Z</i> )-12-hidroxi-1-piperidin-1-il-octadec-9-em-1-ona	( <i>R</i> )-ricinoleilpiperidilamida
<b>6e</b>	C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>2</sub>	351,35	(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> )-1-piperidin-1-il-octadeca-9,12-dien-1-ona	Linoleoilpiperidilamida
<b>7a</b>	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>2</sub>	325,3	1-morfolinaexadecan-1-ona	Palmitoilmorfolilamida
<b>7b</b>	C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>2</sub>	353,33	1-morfolinaoctadecan-1-ona	Estearoilmorfolilamida
<b>7c</b>	C <sub>22</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>	351,31	( <i>Z</i> )-1-morfolinaoctadec-9-em-1-ona	Oleilmorfolilamida
( <i>R</i> )- <b>7d</b>	C <sub>22</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>3</sub>	367,31	( <i>R,Z</i> )-12-hidroxi-1-morfolinaoctadec-9-em-1-ona	( <i>R</i> )-ricinoleilmorfolilamida



**Figura 17.** Estruturas químicas dos compostos sintetizados no trabalho.

## 5.1 Síntese dos compostos

A síntese das amidas graxas com estrutura análoga aos canabinóides foi baseada principalmente na similaridade estrutural de amidas canabinóides naturais e sintéticas da literatura que são responsáveis por atividade biológicas importantes, entre elas a atividade antiproliferativa de linhagens tumorais, como por exemplo, a anandamida<sup>38</sup> (AEA), oleiletanolamida<sup>13</sup> (OEA), estearilpirrolidilamida<sup>12</sup> (EPA), *N*-palmitoiltirosina (*N*-PT) e *N*-palmitoildopamina<sup>41</sup> (*N*-PD) (**Figura 18**).



**Figura 18.** Amidas graxas com atividade antiproliferativa

Para a síntese das amidas graxas, partiu-se de materiais que estavam disponíveis no laboratório como os ácidos graxos comerciais: ácido palmítico, esteárico, oleico e elaídico, além do ácido ricinoleico, proveniente da ricinoleína (*Ricinus communis*), principal constituinte do óleo de mamona.<sup>59,60</sup> A amina

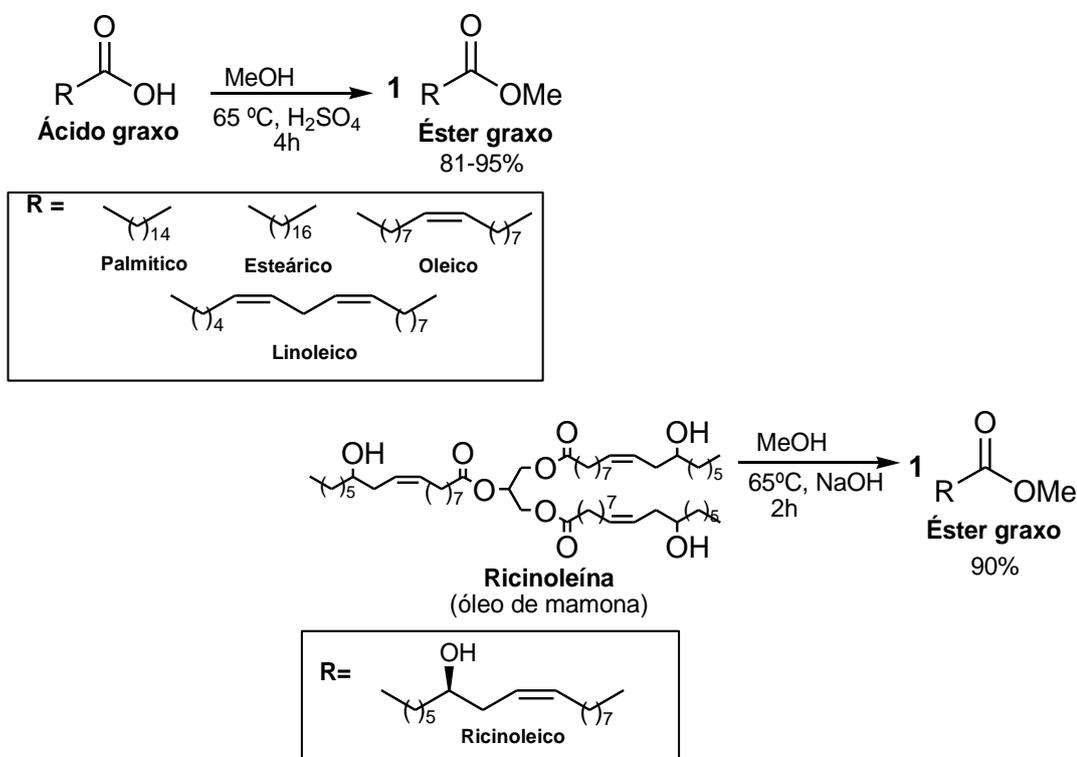
<sup>59</sup> Lakshminarayana, G.; Paulose, M.M.; Kumari, N.B. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1984**, *61*, 1871-1872.

<sup>60</sup> Turner, C.; Whitehand, L.C.; Nguyen, T.; McKeon, T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 26-32.

aromáticas (benzilaminas), acíclica (etanolamina) e heterocíclicas (pirrolidina, piperidina e morfolina).

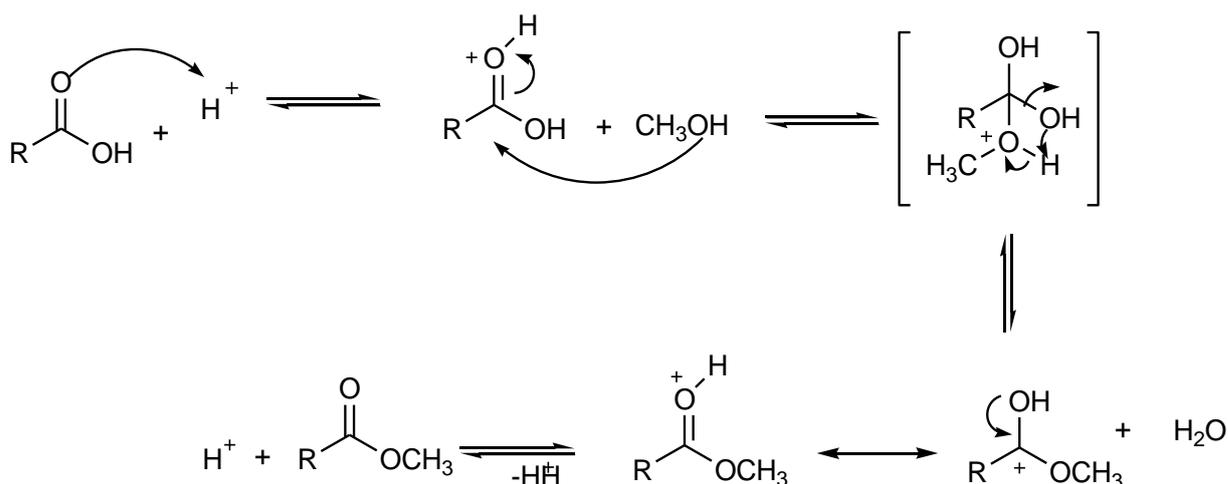
As amidas graxas utilizadas nesse trabalho foram sintetizadas por duas metodologias denominadas método A e método B. As amidas heterocíclicas graxas e alifáticas foram sintetizadas segundo o método **A** descrito por Lopes e col.<sup>17</sup>

Na primeira etapa desta metodologia, os ácidos carboxílicos palmítico, esteárico, oleico e linoleico foram convertidos em ésteres metílicos por esterificação com MeOH e catálise ácida por 4 horas a 65°C. Os rendimentos variaram entre 81-95% (**Esquema 2**). O ricinoleato de metila foi obtido a partir da transesterificação da ricinoleína utilizando NaOH (1%) na proporção molar 1:6, triglicerídeo:álcool sob aquecimento de 65°C por 2 horas. Todos os ésteres foram purificados por coluna cromatográfica, e suas estruturas confirmadas por RMN de <sup>1</sup>H.



**Esquema 2.** Reação de esterificação e transesterificação.

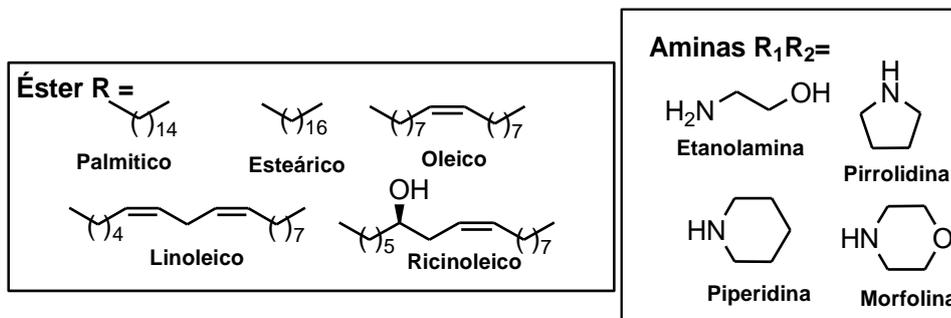
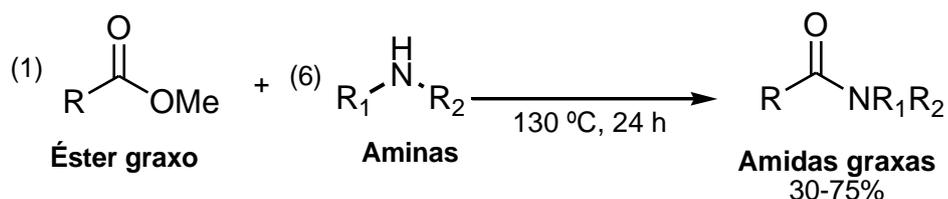
De acordo com o mecanismo sugerido para esterificação<sup>61</sup> (**Esquema 3**), primeiramente ocorre a protonação do oxigênio da carbonila seguido pelo ataque do nucleofílico do metanol à carbonila do ácido carboxílico, ocasionando a formação de um intermediário tetraédrico, com posterior perda de água, e a seguir a formação do respectivo éster.



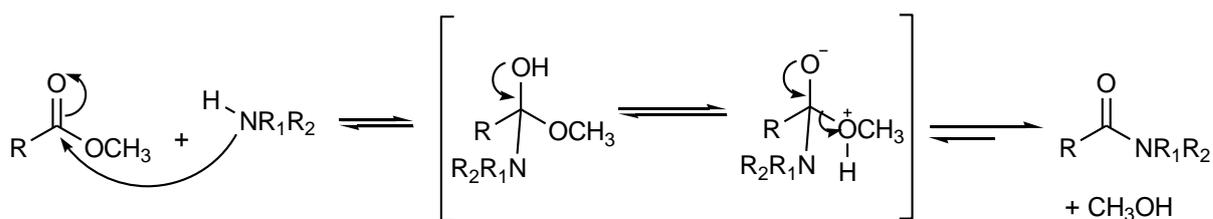
**Esquema 3.** Mecanismo de formação de ésteres metílicos.

Na segunda etapa do método **A**, os ésteres metílicos graxos foram submetidos à aminólise com as aminas de interesse, na proporção molar 1:6, sendo mantidos sob agitação e aquecimento (130 °C) por 24 horas (**Esquema 4**). A conversão do éster metílico em amida graxa foi acompanhada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e os rendimentos variaram entre 30-75% (Tabela 2).

<sup>61</sup> Boocock, D.G.B., Zhou, W., Konar, S.K. *Journal of American Oil Chemists Society* **2003**, *80*, 367-371.

**Método A****Esquema 4.** Obtenção das amidas graxas via aminólise.

No **Esquema 5** é demonstrado o mecanismo proposto para formação das amidas.<sup>16</sup> Onde primeiramente a amina que é nucleófilo da reação ataca a carbonila do éster que é o eletrófilo, causando a formação de um intermediário tetraédrico, que posteriormente perde uma molécula de metanol e ocorre a formação da amida de interesse.

**Esquema 5.** Mecanismo para a reação de aminólise de ésteres metílicos.

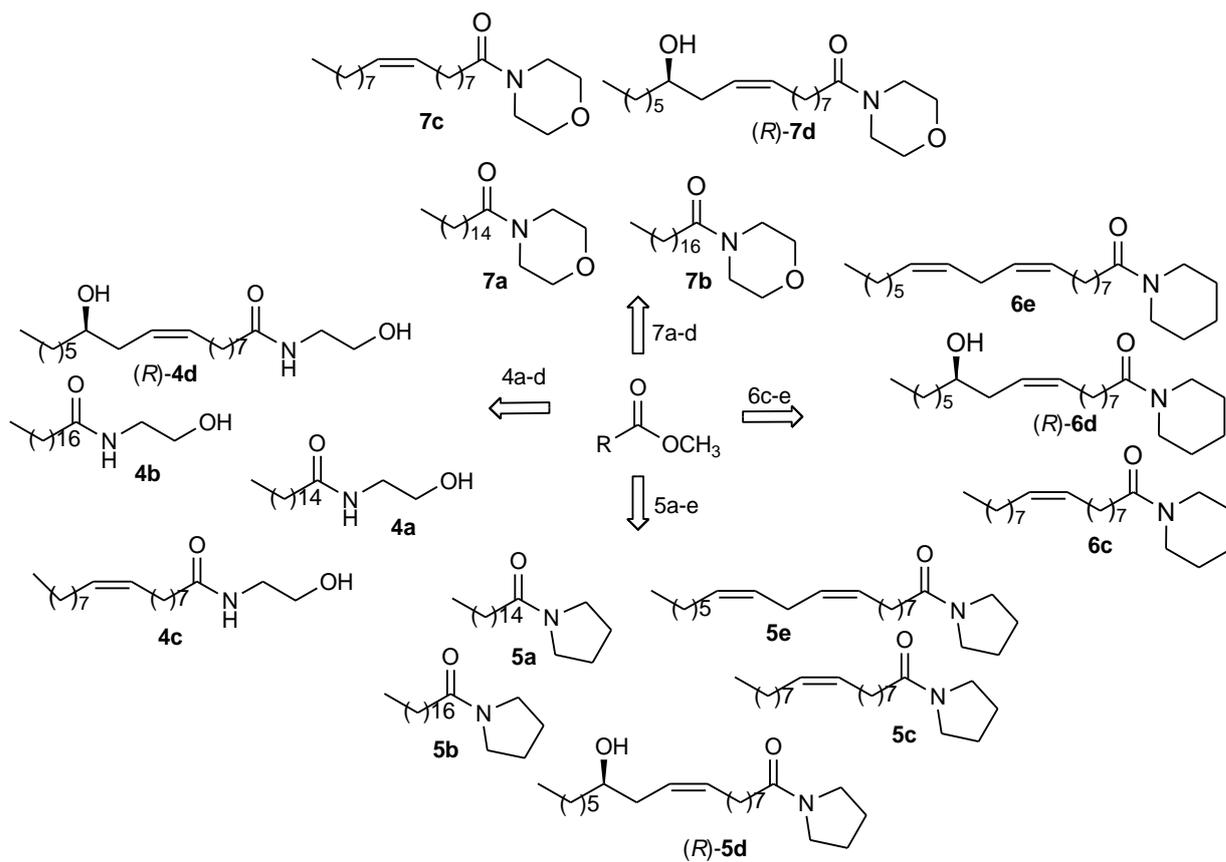


Figura 19. Amidas obtidas via aminólise.

**Tabela 2.** Rendimento das amidas obtidas via aminólise.

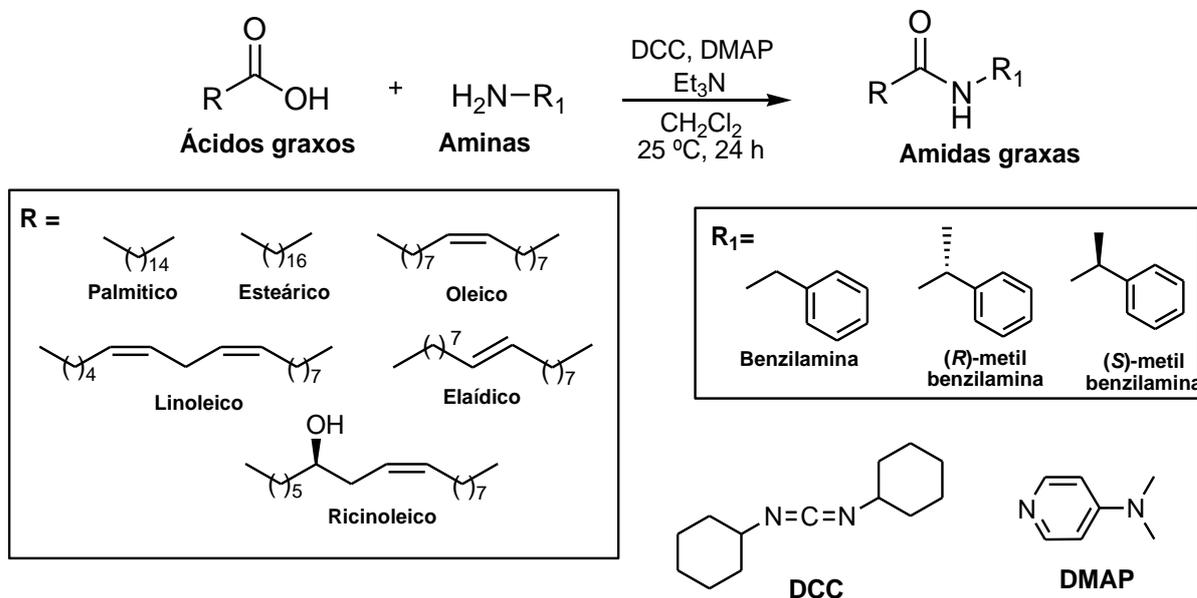
Éster	Amina	Amida	Nº amida	Rend. (%)
Palmítico	Etanolamina	Palmitoiletanolamida	<b>4a</b>	66
Esteárico	Etanolamina	Esteariletanolamida	<b>4b</b>	64
Oleico	Etanolamina	Oleiletanolamida	<b>4c</b>	63
Ricinoleico	Etanolamina	Ricinoleiletanolamida	<i>(R)</i> - <b>4d</b>	51
Palmítico	Pirrolidina	Palmitoilpirrolidilamida	<b>5a</b>	63
Esteárico	(Pirrolidina	Estearilpirrolidilamida	<b>5b</b>	65
Oleico	Pirrolidina	Oleilpirrolidilamida	<b>5c</b>	66
Ricinoleico	Pirrolidina	Ricinoleilpirrolidilamida	<i>(R)</i> - <b>5d</b>	75
Linoleico	Pirrolidina	Linoleilpirrolidilamida	<b>5e</b>	60
Oleico	Pireridina	Oleilpiperidilamida	<b>6c</b>	35
Ricinoleico	Pireridina	Ricinolleilpiperidilamida	<i>(R)</i> - <b>6d</b>	30
Linoleico	Pireridina	Linoleilpiperidilamida	<b>6e</b>	31
Palmítico	Morfolina	Palmitoilmorfolilamida	<b>7a</b>	42
Esteárico	Morfolina	Estearilmorfolilamida	<b>7b</b>	45
Oleico	Morfolina	Oleilmorfolilamida	<b>7c</b>	35
Ricinoleico	Morfolina	Ricinoleilmorfolilamida	<i>(R)</i> - <b>7d</b>	40

Embora a síntese das amidas pelo Método A (**Esquema 4**), tenha fornecido rendimentos de bons a médios, represente uma síntese de custo relativamente baixo e de fácil purificação, foi necessário o uso de um excesso grande do nucleófilo. Com isso, para a obtenção de amidas graxas derivadas da benzilamina, aminas quirais de maior valor comercial, foi utilizada uma metodologia em que este reagente nitrogenado fosse utilizado em menores quantidades e que as condições reacionais fossem mais brandas e que pudesse proporcionar melhores rendimentos.<sup>7</sup>

Utilizando uma metodologia em que a amina foi usada na mesma razão molar que o ácido graxo de partida, os derivados das benzilaminas foram sintetizados empregando o Método **B**.<sup>15</sup> Neste método, os ácidos palmítico , esteárico , oleico , linoleico ,elaídico e ainda ácido ricinoleico , obtido por hidrólise do ricinoleato de

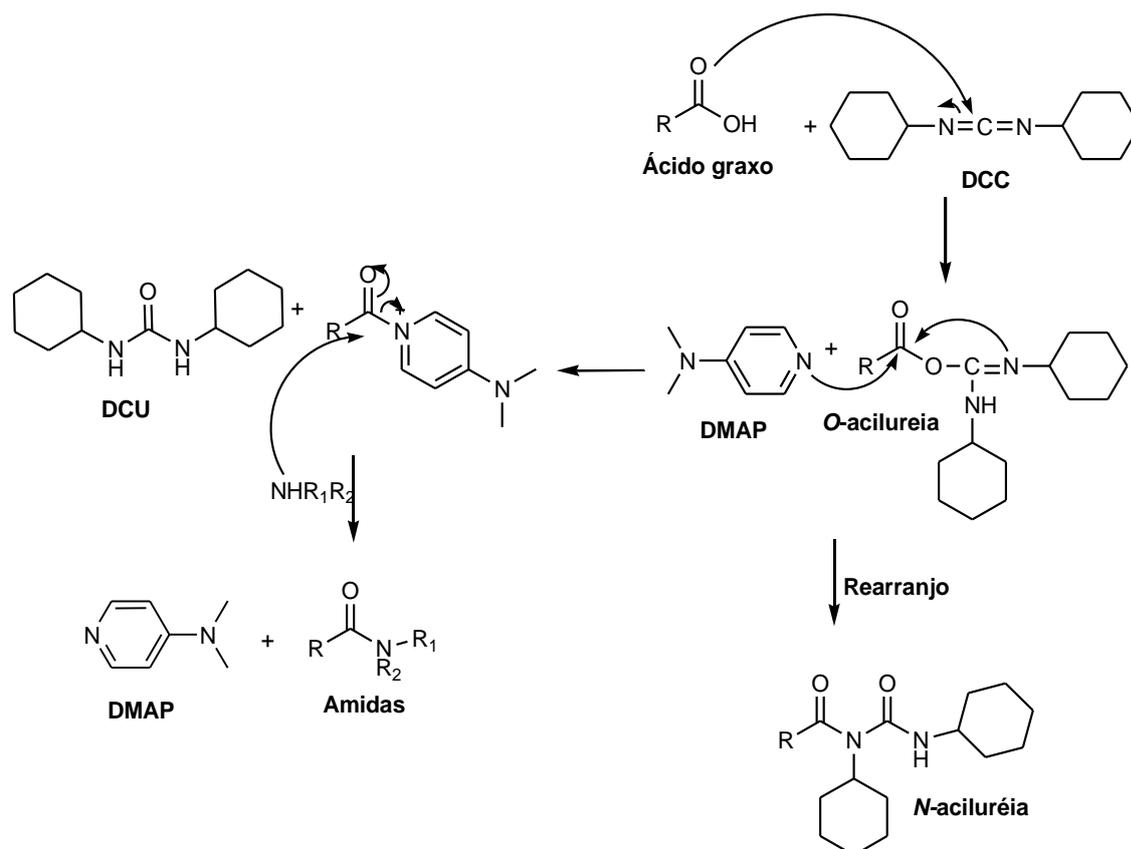
metila, foram levados a presença de DCC, DMAP e Et<sub>3</sub>N juntamente com a amina correspondente ) (**Esquema 6**).

### Método B

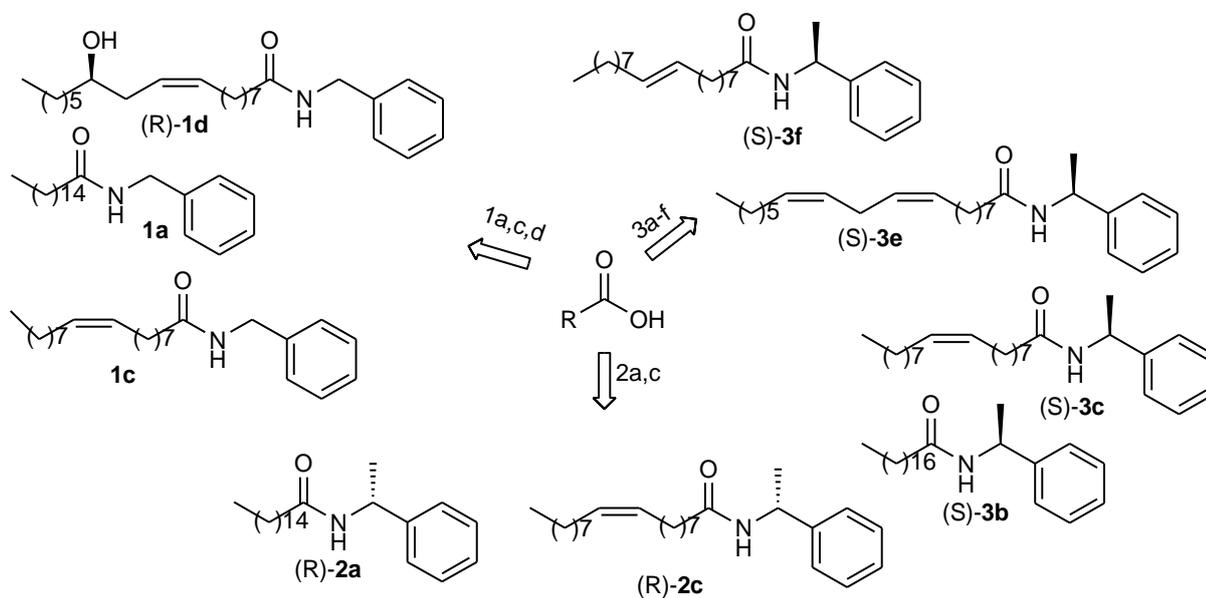


**Esquema 6.** Obtenção das amidas graxas aromáticas na presença de DCC e DMAP.

Na metodologia B foi utilizado DCC como agente de acoplamento e DMAP como catalisador, neste caso o DCC foi adicionado gota-a-gota em solução de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à mistura de ácido graxo e aminas, a temperatura ambiente, acarretando bons rendimentos (**Tabela 3**). O mecanismo indica que, na medida em que a diciclocarbodiimida (DCC) é adicionada gota-a-gota à mistura, ocorre à reação com o ácido graxo levando à formação lenta do intermediário *O*-aciluréria (**Esquema 7**). A alta concentração do nucleófilo (amina) e de DMAP (catalisador) presentes no meio reacional dificultam o rearranjo intramolecular para a formação da *N*-aciluréria, favorecendo a formação das amidas, podendo ser observado a presença de dois subprodutos juntamente com a amida de interesse.



**Esquema 7.** Mecanismo proposto para a formação das amidas utilizando DCC e DMAP.

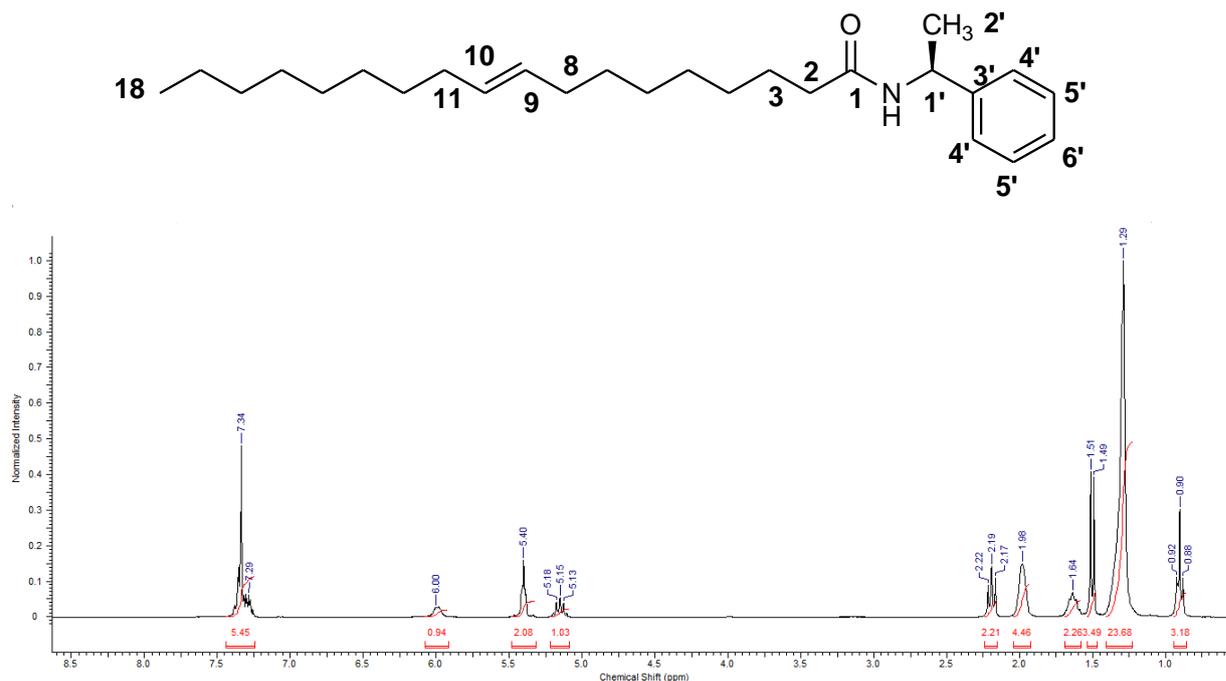


**Figura 20.** Amidas obtidas com o uso de DCC e DMAP

**Tabela 3.** Rendimento das amidas obtidas com uso de DCC e DMAP.

Ácido	Amina	Amida	Nº amida	Rend.(%)
Palmítico	Benzilamina	Palmitoilbenzilamida	<b>1a</b>	75
Oleico	Benzilamina	Oleilbenzilamida	<b>1c</b>	58
Ricinoleico	Benzilamina	Ricinoleilbenzilamida	<b>(R)-1d</b>	50
Palmítico	<i>(R)</i> -metilbenzilamina	<i>(R)</i> -palmitoilmetilbenzilamida	<b>(R)-2a</b>	74
Oleico	<i>(R)</i> -metilbenzilamina	<i>(R)</i> Oleilmetilbenzilamida	<b>(R)-2c</b>	70
Esteárico	<i>(S)</i> -metilbenzilamina	<i>(S)</i> -estearilmetilbenzilamida	<b>(S)-3b</b>	69
Oleico	<i>(S)</i> -metilbenzilamina	<i>(S)</i> -oeilmetilbenzilamida	<b>(S)-3c</b>	60
Ricinoleico	<i>(S)</i> -metilbenzilamina	<i>(S)</i> -ricinoleilmetilbenzilamida	<b>(R,S)-3d</b>	70
Linoleico	<i>(S)</i> -metilbenzilamina	<i>(S)</i> -linoleilmetilbenzilamida	<b>(S)-3e</b>	62
Elaídico	<i>(S)</i> -metilbenzilamina	<i>(S)</i> -elaídilmetilbenzilamida	<b>(S)-3f</b>	69

O composto derivado do ácido elaídico e da *(S)*-metilbenzilamina, o **(S)-3f** foi sintetizado com metodologia B. A caracterização e elucidação da estrutura foi feita por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e CG-EM. Na caracterização do composto **(S)-3f**, o RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 21**) mostrou um multipeto em  $\delta$  7,29–7,34 ppm relativo a 5 hidrogênios no anel aromático (2H4', 2H5' e 1H6') um sinal alargado em 6,0 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio (NH), um multipeto em 5,4 ppm, relativo aos hidrogênios vinílicos H9 e H10, um triplete em 5,13–5,18 ppm referente ao hidrogênio  $\alpha$ -nitrogênio (1H1'), um triplete em 2,17–2,22 ppm referente aos hidrogênios  $\alpha$ -carbonila (2H2), um multipeto referente aos hidrogênios alílicos H8 e H11, observou-se também os um multipeto em 1,64 ppm referente aos hidrogênios  $\beta$  à carbonila H3, também foi observado um dubleto em 1,51 ppm referente aos hidrogênios da metila do centro estereogênico (3H2'), bem como um multipeto em 1,29 ppm referente aos 20 hidrogênios da cadeia graxa. Os três hidrogênios H18 referente a metila da cadeia graxa foram observados em um triplete em 0,88–0,92 ppm.



**Figura 21.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (S)-3f.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 22**) foi observado o sinal referente a carbonila de amida em 172,5 ppm, em 130 ppm referente aos carbonos vinílicos, em 143, 128–127 ppm os sinais referentes aos carbonos presentes no anel aromático, em 48 ppm encontra-se o sinal que caracteriza o carbono C-N (C1') e em 14 ppm o sinal do carbono referente a metila da cadeia graxa.

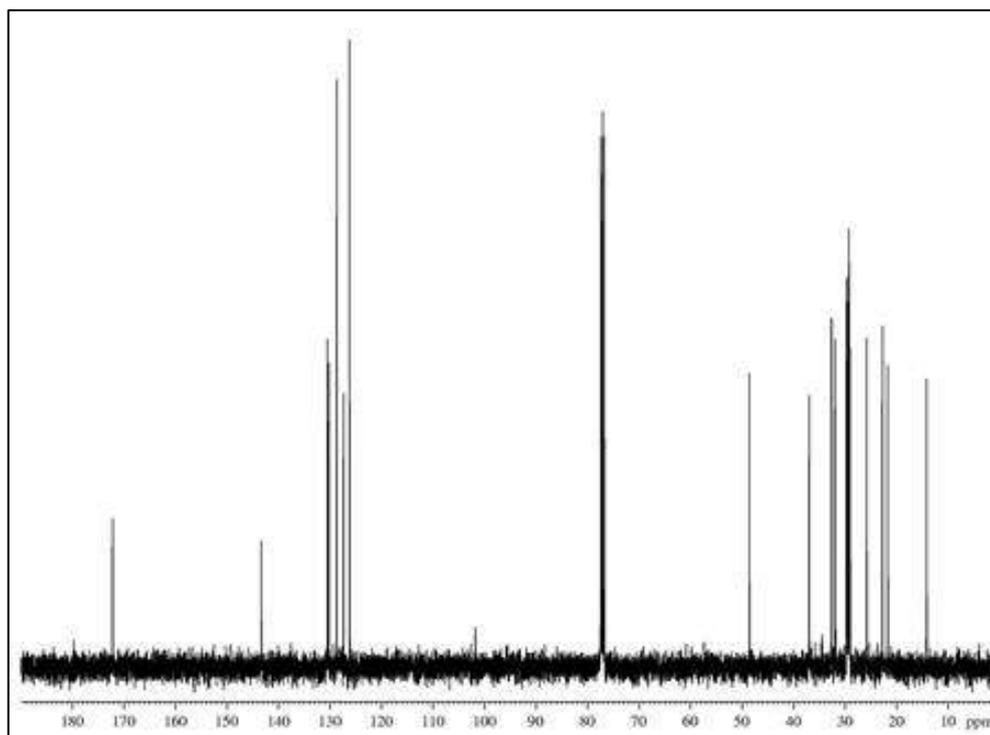


Figura 22. RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (S)-3f.

A análise de Cromatografia Gasosa (CG) atestou a pureza (100%) do composto (**Figura 23**).

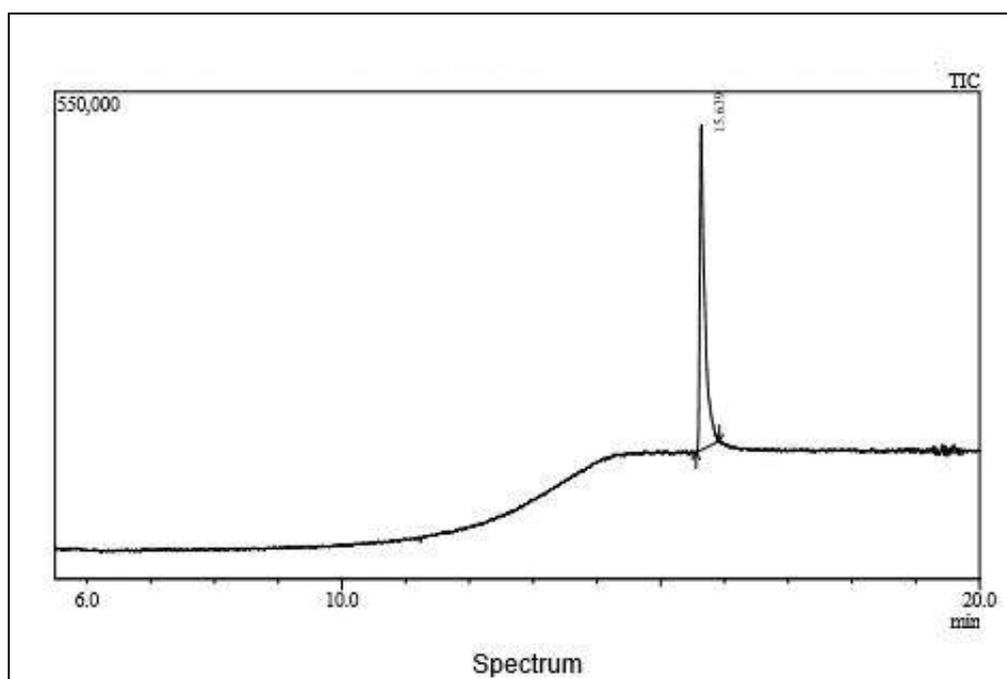
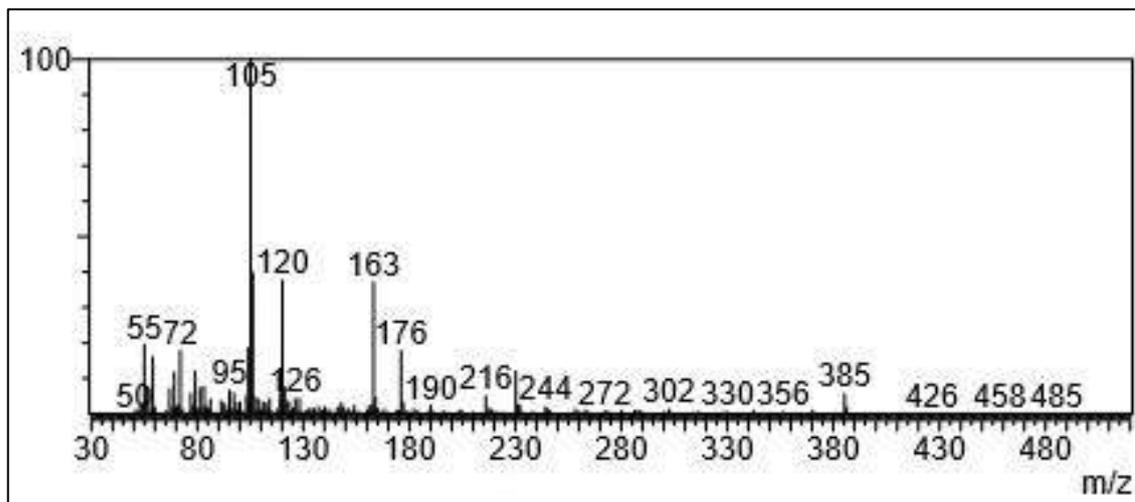


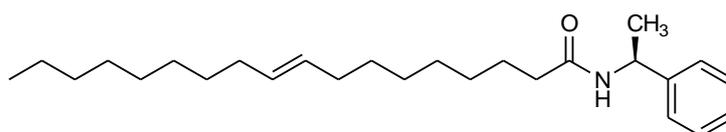
Figura 23. Análise de CG do composto (S)-3f



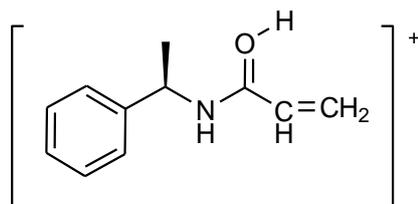
**Figura 24.** Espectro de massas do composto (S)-3f.

No Espectro de Massas (EM) (**Figura 24**), foi possível observar a formação de cinco principais fragmentos de relação massa/carga: 385  $m/z$ , 176  $m/z$ , 163  $m/z$ , 120  $m/z$ , 105  $m/z$ , onde:

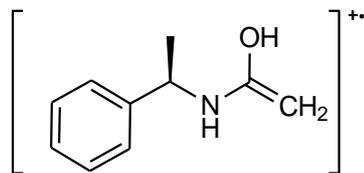
- 1) A fragmentação do íon molecular de massa carga 385  $m/z$  é referente a massa molecular do composto.



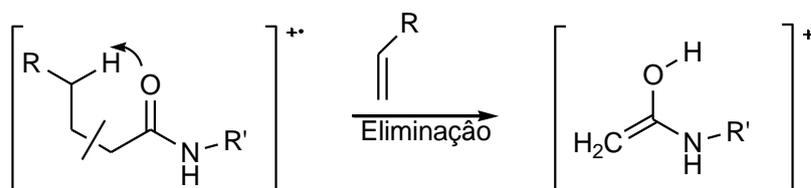
- 2) O fragmento que apresenta o pico em 176  $m/z$  é resultado da quebra da ligação *gamma* ao carbono carbonílico chamado de  $\gamma$ -clivagem (M-209).



3) O pico 163m/z (M-222), resulta do Rearranjo de McLafferty.<sup>62</sup>

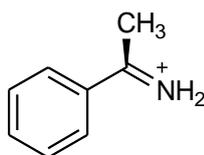


Este rearranjo é comum para ácidos carboxílicos e derivados e consiste na clivagem da ligação *beta* ao carbono carbonílico com abstração do hidrogênio ligado ao carbono *gamma*. A razão *m/z* deste fragmento varia de acordo com o substituinte ligado ao nitrogênio (R') (**Figura 25**).

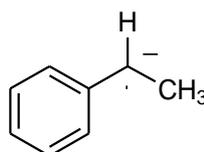


**Figura 25.** Rearranjo de McLafferty.

4) A quebra da ligação carbonila/nitrogênio originou o pico 120 *m/z* (M-265).

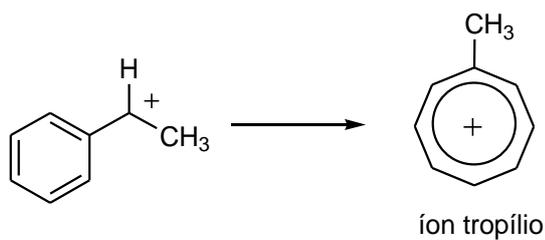


5) A quebra da ligação N-C dá origem ao cátion benzílico de *m/z* 105 (M-280), o qual por ser o fragmento mais estável gerou o pico base.



<sup>62</sup> McLafferty, F.W.; Bockhoff, F.M. *Organic. Mass Spectrometry* **1979**, *14*, 181-184.

Este fragmento é estável devido à estabilização da carga positiva por ressonância podendo se rearranjar para formar seu isômero íon tropílio ( $C_7H_7^+$ ) de maior estabilidade (**Figura 26**). Estudos reportam que a estabilidade termodinâmica do íon tropílio é maior em relação a seu isômero.<sup>63</sup>



**Figura 26.** Estabilização do carbocátion benzílico com formação do íon tropílio.

<sup>63</sup> Silverstein, R.; Webster, F.; Kiemle, D.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7a Ed., 2005.

### 5.3 Atividade antiproliferativa

Após a síntese, as amidas graxas foram submetidas à avaliação da inibição do crescimento celular *in vitro* frente à linhagens celulares humanas. Para esta triagem foram utilizadas sete linhagens tumorais: U251 (glioma), MCF-7 (mama), OVCAR-3 (ovário), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão do tipo não pequenas células), PC-3 (próstata) e uma linhagem celular não tumoral: HaCaT (queratinócito humano) ou VERO (célula epitelial de macaco verde).

Os resultados dos testes de inibição do crescimento celular de cada composto frente a cada linhagem celular foram avaliados a partir de três parâmetros:  $GI_{50}$  (concentração que inibe o crescimento de 50% das células), TGI (concentração que inibe o crescimento celular totalmente – concentração citostática), e  $LC_{50}$  (concentração que causa morte em 50% das células – concentração citotóxica), os quais foram calculados pelo programa *Origin* 9.1. Os gráficos de dose-resposta de todos os compostos frente a todas as linhagens celulares estão no Anexo II.

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados da inibição do crescimento celular das 25 amidas graxas frente à 7 linhagens tumorais e uma não tumoral, em nível de  $GI_{50}$ . Para este parâmetro, compostos com valor de  $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram considerados ativos e compostos com  $GI_{50} \leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram considerados com forte inibição do crescimento, segundo critérios utilizados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI).<sup>64</sup>

---

<sup>64</sup>National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/cancell/HealthProfessional/page4>

**Tabela 4.** Valores de  $GI_{50}$  para as amidas graxas 1–7 avaliadas frente a diversas linhagens celulares.

Amida	Linhagens celulares tumorais							Média $GI_{50}$	Linhagem celular não-tumoral <sup>b</sup>
	U251	MCF-7	OVCAR-3	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3		
	$GI_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )								
<b>1a</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<b>1c</b>	55,4	53,4	103,2	50,3	104,4	94,9	106,9		92,0
<b>1d</b>	8,6	37,8	31,6	8,6	32,3	32,3	122,6	39,1	30,8
<b>(R)-2b</b>	160,6	0,06	--	25,7	--	--	--	--	--
<b>(R)-2c</b>	6,1	6,1	56,9	3,0	26,8	36,6	46,9	26,5	10,3 <sup>c</sup>
<b>(S)-3b</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	69,5
<b>(S)-3c</b>	5,1	7,17	10,5	0,3	10,3	15,2	13,7	8,8	6,7
<b>(R,S)-3d</b>	3,6	5,1	11,1	1,9	6,7	8,3	11,7	6,9	9,7
<b>(S)-3e</b>	0,7	5,3	3,5	3,0	3,2	6,1	6,8	4,0	1,3
<b>(S)-3f</b>	--	110,2	21,7	--	--	--	--	--	24,6
<b>4a</b>	--	--	--	157,7	--	--	--	--	--
<b>4b</b>	116,9	129,5	157,7	157,7	--	--	75,6	--	117,7
<b>4c</b>	27,3	25,9	35,4	9,1	35,4	36,5	16,9	26,6	14,4
<b>(R)-4d</b>	3,6	6,5	4,1	2,8	6,6	4,1	6,3	4,8	3,4 <sup>c</sup>
<b>5a</b>	4,6	4,6	6,3	4,6	5,5	5,9	4,7	5,2	4,8
<b>5b</b>	8,0	7,4	7,3	7,1	14,0	10,8	9,4	9,1	6,3
<b>5c</b>	3,8	5,2	11,5	0,2	5,2	45,6	13,0	12	3,9 <sup>c</sup>
<b>(R)-5d</b>	1,5	4,4	4,3	4,0	4,1	6,9	6,2	4,4	4,0 <sup>c</sup>
<b>5e</b>	4,2	4,2	5,7	4,7	4,7	7,0	4,7	5,0	13,7 <sup>c</sup>
<b>6c</b>	6,7	7,6	9,3	7,7	10,6	23,0	8,7	10,5	7,7
<b>(R)-6d</b>	14,8	6,3	16,6	22,7	24,2	10,7	23,3	16,9	2,6
<b>6e</b>	44,2	22,1	48,9	63,2	58,4	29,1	53,6	45,6	4,2
<b>7a</b>	25	15,4	33,1	6,2	33,1	34,1	22,2	24,1	28,9
<b>7b</b>	39,9	42,8	43,3	33,1	41,1	53,1	41,1	42,0	41,5
<b>7c</b>	2,8	4,9	4,9	3,3	4,5	7,9	5,2	4,7	5,3
<b>(R)-7d</b>	33,1	41,8	31,0	29,4	36,0	49,1	38,5	37	41,3

<sup>a</sup> $GI_{50}$  = concentração que inibe o crescimento de 50% das células.

<sup>b</sup>Linhagem não-tumoral = HaCat.

<sup>c</sup>Linhagem não-tumoral = VERO.

-- = não atingiu a  $GI_{50}$  nas concentrações testadas.

O composto com menor  $GI_{50}$  médio foi o composto (S)-**3e**, com  $GI_{50}$  médio =  $4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Outros oito compostos também apresentaram valores de  $GI_{50}$  médios significativos ( $<10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) – (S)-**3c**, (R,S)-**3d**, (R)-**4d**, **5a**, **5b**, **5d**, **5e** e **7c**. Os compostos contendo uma cadeia graxa saturada, na sua maioria foram inativos, com exceção dos derivados de aminas heterocíclicas, os quais apresentarem inibição do crescimento celular moderada frente às linhagens celulares (séries **5**, **6** e **7**).

Entre os compostos benzilamidas graxas (série **1**, **2**, **3**), os compostos (S)-metilbenzilamidas graxas (Série **3**) foram os que se mostraram mais ativos, com alta potência e seletividade para todas as linhagens celulares, chegando a apresentar  $GI_{50}$  menor que  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O composto (S)-**3f** que contém uma insaturação na configuração *trans* na cadeia graxa, foi uma exceção, já que foi totalmente inativo, o que já foi visto para os compostos saturados. Isto é consistente com o fato das insaturações das cadeias graxas das amidas canabinóides terem necessariamente configuração *cis*, como visto na Figura 2.<sup>65,66</sup>

De maneira geral, os compostos exibiram inibição do crescimento celular mais pronunciada contra as linhagens celulares tumorais de glioma (U251) e ovário com fenótipo MDR (NCI-ADR/RES). Para glioma dois compostos apresentaram inibição do crescimento celular forte, o composto (S)-**3e** com  $GI_{50} = 0,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguido pelo composto (R)-**5d** com  $GI_{50} = 1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Os dois compostos mais ativos foram vistos para a linhagem de ovário com fenótipo MDR (NCI-ADR/RES) – compostos **5c** ( $GI_{50} = 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e (S)-**3c** ( $GI_{50} = 0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) – seguidos pelo composto (R,S)-**3d** ( $GI_{50} = 1,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Estes três compostos apresentaram valores de  $GI_{50}$  menores para a linhagem de ovário com

---

<sup>65</sup> Long, J. Z.; Nomura, D. K.; Vann, R. E.; Walentiny, D. M.; Booker, L.; Jin, X.; Burston, J. J.; Sim-Selley, L. J.; Lichtman, A. H.; Wiley, J. L.; Cravatt, B. F. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* **2009**, *106*, 20270-20275.

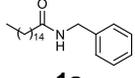
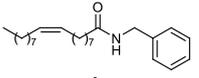
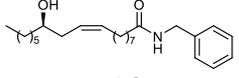
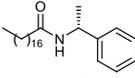
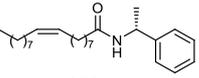
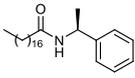
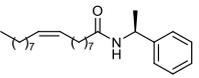
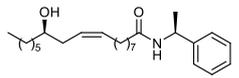
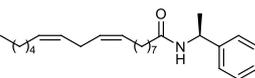
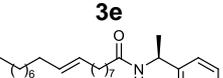
<sup>66</sup> Ezzili, C.; Otrubova, K.; Boger, D. L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 5959-5968.

fenótipo MDR do que para ovário não-resistente, um resultado muito relevante pela importância da pesquisa por novos fármacos para cânceres MDR.

De todas as séries testadas, duas delas se destacaram, os derivados das benzilaminas (séries **1**, **2** e **3**) e os derivados da pirrolidina (série **5**), porém enquanto os compostos derivados da pirrolidina não apresentaram uma relação clara entre a estrutura química e a atividade, os compostos derivados das benzilaminas, apresentaram alta potência e seletividade para algumas linhagens celulares, dependentes da estrutura química, e foram levados a um estudo de relação estrutura-atividade.

Então, a fim de um entendimento da relação entre a estrutura química e a atividade de inibição do crescimento celular de células tumorais, as séries das benzilamidas graxas foram avaliadas em nível de TGI e os resultados estão expressos na Tabela 5. Para este parâmetro, compostos com TGI  $>250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram considerados inativos.

**Tabela 5.** Efeitos na inibição do crescimento celular dos derivados benzilamidas graxas (séries 1, 2 e 3) frente a diversas linhagens celulares.

Amida	Linhagens celulares tumorais							Média TGI	Linhagem celular não-tumoral <sup>b</sup>
	U251	MCF-7	OVCAR-3	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3		
TGI ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )									
 <b>1a</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
 <b>1c</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
 <b>1d</b>	47,5	104,5	86,0	46,6	71,5	178,8	122,6	95,5	66,5
 <b>(R)-2b</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
 <b>(R)-2c</b>	28,3	40,8	>250	35,3	84,8	105,6	161,6	>100,9	43,0 <sup>c</sup>
 <b>(S)-3b</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
 <b>(S)-3c</b>	17,8	43,0	45,5	7,1	45,8	49,3	47,1	44,5	36,8
 <b>(R,S)-3d</b>	13,9	84,5	>250	>250	60,1	132,1	141,9	>133,2	59,1
 <b>3e</b>	5,1	38,6	20,0	16,4	7,7	38,9	30,0	29,2	5,3
 <b>3f</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Doxorubicin	0,92	3,3	7,6	1,6	>25	4,9	11,7	7,9	4,1 <sup>c</sup> 2,3

<sup>a</sup>TGI (*Total Growth Inhibition*) = inibição total do crescimento celular

<sup>b</sup>Linhagem celular não-tumoral = HaCat,

<sup>c</sup>Linhagem celular não-tumoral= VERO.

A partir dos resultados expressos na Tabela 5, uma relação clara entre a estrutura química e atividade de inibição do crescimento celular dos derivados das benzilamidas graxas (série **1**), (*R*)-metilbenzilamidas graxas (série **2**) e (*S*)-metilbenzilamidas graxas (série **3**) foi verificada, uma vez que as várias mudanças nas moléculas influenciam em sua atividade frente as linhagens celulares testadas.

Primeiramente, os resultados foram avaliados a partir do TGI médio. O modelo inicial, composto estruturalmente mais simples, derivado da cadeia graxa saturada C16:0 e da benzilamina (**1a**), foi inativo frente à todas as linhagens celulares (TGI médio  $>250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A presença de uma cadeia graxa monoinsaturada C18:1 (*cis*-**1c**) ou de um grupo metila no carbono benzílico (*R*)-**2b**, e (*S*)-**3b** não causou influência na atividade média (TGI médio  $> 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), independente da orientação espacial do grupo metila.

A presença de um grupo funcional hidroxila na cadeia monoinsaturada (C18:1 OH) no composto **1d** levou a uma inibição do crescimento celular fraca (TGI médio  $95,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Isto demonstrou que funcionalizações na estrutura dos derivados benzilamidas graxas monoinsaturadas podem ser interessantes para a atividade antiproliferativa desta classe de compostos.

Os compostos (*R*)-**2c** e (*S*)-**3c** com um grupo metila no carbono benzílico aliado a uma cadeia graxa monoinsaturada mostraram uma inibição do crescimento celular de fraca a moderada (TGI médio  $>100,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $44,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente). Neste caso foi visto que a orientação espacial do grupo metila tem uma grande influência na atividade, já que o composto (*S*)-**3c** teve uma atividade média duas vezes maior que o composto (*R*)-**2c**.

Os resultados até aqui sugerem que a cadeia monoinsaturada é um fragmento importante para a atividade somente quando aliada a um grupo hidroxila

na cadeia graxa ou um centro estereogênico na posição benzílica, preferencialmente com configuração *S*.

Tendo em mente a importância da funcionalização aliada a uma insaturação na cadeia graxa, bem como da substituição no carbono benzílico, também aliada a uma insaturação na cadeia graxa, o modelo (*R,S*)-**3d** contém estes três requisitos estruturais: uma hidroxila em uma cadeia graxa monoinsaturada e uma metila no carbono benzílico em um centro estereogênico com configuração *S*. Ao comparar este composto (*R,S*)-**3d** com seu análogo sem hidroxila (*S*)-**3c**, foi observado um valor de TGI médio três vezes menor (TGI médio >133,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  vs. 44,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente). O composto **3e** contém uma insaturação a mais na cadeia graxa, no lugar da hidroxila (**3d**), e este composto mostrou o melhor valor de TGI médio (TGI médio = 29,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), sendo quatro vezes mais ativo que o seu análogo hidroxilado **3d** (TGI médio >133,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e quase duas vezes mais ativo que seu análogo monoinsaturado **3c** (TGI médio = 44,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Finalmente, a configuração da dupla ligação foi avaliada. A mudança da configuração *cis* (**3c**) para *trans* (**3f**) causou uma perda total da atividade antiproliferativa, (TGI médio 44,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  vs. >250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente), conforme o esperado, uma vez que as amidas graxas canabinóides apresentam as insaturações sempre em *cis*.<sup>57,58</sup>

Em suma, em relação ao TGI médio, cinco compostos mostraram atividade de fraca a boa – **1d**, (*R*)-**2c**, (*S*)-**3c**, (*R,S*)-**3d**, e (*S*)-**3e**. Entre eles se destacaram os compostos (*S*)-**3c** e (*S*)-**3e** pelos seus menores valores de TGI médio.

Quando se analisa o perfil de ação, o composto (*S*)-**3c** apresentou atividade potente e especificidade de ação para a linhagem tumoral de glioma (U251, TGI = 17,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e ovário com fenótipo MDR (NCI-ADR/RES, TGI = 7,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com

um bom perfil de segurança quando comparado com a linhagem celular não-tumoral (HaCat, TGI = 36,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O composto (*R,S*)-**3d**, apresentou um boa inibição do crescimento celular com morte celular para a linhagem celular de glioma (U251, TGI = 13,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , LC<sub>50</sub> = 63,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com alto grau de seletividade e bom perfil de segurança quando comparado com a linhagem celular não-tumoral (VERO, TGI = 59,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Este modelo constitui um bom protótipo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para glioma. Gliomas constituem o grupo mais frequente de neoplasia cerebral nos seres humanos, representando uma das formas de câncer mais agressivas, levando à morte na maioria dos casos. A terapêutica disponível para o tratamento dos gliomas são geralmente ineficazes ou apenas paliativas, e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas se faz essencial.<sup>67,68</sup> O **Gráfico 1** apresenta a análise de dose-resposta para a inibição do crescimento celular para o composto (*R,S*)-**3d**.

---

<sup>67</sup> Burnet, N.G., Lynch, A.G., Jefferies, S.J., Price, S.J., Jones, P.H., Antoun, N.M., Xuereb, J.H., Pohl, U. *Radiotherapy and Oncology* **2007**, 85, 371–378.

<sup>68</sup> Schor, N.F. *Pharmacology and Therapeutics* **2009**, 121, 253–264.