

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - PPGBCM

**JULIANA SOUZA RIBEIRO BAESSO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS AZOESTILBENÓIDES COMO  
POTENCIAIS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS**

Porto Alegre

2015

**JULIANA SOUZA RIBEIRO BAESSO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS AZOESTILBENÓIDES COMO  
POTENCIAIS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular  
da Faculdade de Biociências da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. André Arigony Souto**

Porto Alegre

2015

**JULIANA SOUZA RIBEIRO BAESSO**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular  
da Faculdade de Biociências da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone

---

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

---

Profa. Dra. Elvira Maria Saraiva

Porto Alegre

2015

## **Agradecimentos**

*Ao mestre André Arigony Souto, meu sincero agradecimento, com carinho e amizade. Obrigada pela oportunidade e pela confiança. Você, com seu diferente modo de trabalho e vida, foi fonte de inspiração e aprendizado durante todos estes anos.*

*Aos queridos amigos do Laboratório de Produtos Naturais, mestrandos, ICs e Técnicos, agradeço pela amizade e carinho. Foi muito bom dividir este tempo com vocês.*

*Ao querido amigo Bruno Adami, agradeço por ser tão solícito e compartilhar comigo dos momentos mais difíceis. Obrigada pela troca de idéias e pelo companheirismo.*

*Ao meu marido Bruno, agradeço por nunca negar a realização desse sonho. Obrigada pelo incentivo, por me encorajar a seguir em frente sempre, por ser meu ponto de equilíbrio.*

*Meus pais, José Ataíde e Maria do Carmo, meus irmãos, Rodrigo e Adriana, partes da minha vida e base de tudo. Obrigada por serem fonte de tantos exemplos. Vocês contribuíram muito para a minha formação pessoal.*

*À CAPES e PUCRS agradeço pelo financiamento ao longo destes anos.*

## RESUMO

O melanoma é uma lesão maligna que se desenvolve em qualquer lugar da pele, representa de 1 a 3% de todas as neoplasias malignas e atinge igualmente homens e mulheres, principalmente em peles claras. O desenvolvimento do melanoma pode estar associado à exposição excessiva ao sol, queimaduras solares, pele clara, cabelos loiros ou ruivos, grande quantidade de sardas nos ombros e dorsos, histórico familiar e presença de ceratose actínica.

As estratégias quimioterápicas têm sido baseadas no uso de dacarbazina e da temozolomida. Além desses, anticorpos monoclonais também estão sendo utilizados, como o ipilimumabe, aprovado em 2011, para o tratamento paliativo de pacientes com câncer metastático.

Muitos estudos estão em andamento para avaliação da atividade antineoplásica de compostos como o resveratrol. Resveratrol, 3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno (RESV), é um estilbeno fenólico natural que possui, dentre as propriedades mais significativas, a antioxidante, anticarcinogênica - inibindo diversos eventos celulares associados com os 3 maiores estágios da carcinogênese: início, promoção e progressão – anti-inflamatória, antiplaquetária, antifúngica e estrogênica. Análogos do resveratrol foram sintetizados pela modificação de substituintes em ambos os anéis, não alterando a dupla ligação entre eles: um pela fusão de benzeno e outros dois pela fusão de um anel heterocíclico; esses análogos recentemente sintetizados apresentaram atividade antineoplásica, vasodilatadora e anti-tirosinase. Nesse trabalho propomos a síntese de análogos do Resveratrol com o intuito de avaliar a atividade biológica destes. A alteração estrutural de estilbeno modificado do resveratrol (substituição da ligação dupla entre carbonos pela dupla entre nitrogênios) pode ser uma estratégia promissora para melhorar os parâmetros farmacológicos. A substituição de grupos hidroxilas por metilas e acetilas pode aumentar a estabilidade molecular, fazendo com que haja diminuição da suscetibilidade na reação de conjugação de fase II *in vivo*, além de potencializar significativamente a atividade citotóxica.

Ensaio em cultura celular utilizando linhagem de melanoma, B16F10, demonstraram que os compostos sintetizados apresentaram IC50 menor que do resveratrol. Ao avaliarmos o IC50 dos compostos sintetizados em fibroblastos, linhagem 3t3, vimos que apresentaram valores maiores que na linhagem de melanoma, exceto o composto Redresv001, sugerindo uma especificidade dos compostos sintetizados nessas células neoplásicas. Dentre os compostos, o metilado Redresv003 e os acetilados Redresv004 e Redresv005 apresentam melhores resultados, pelo fato de possuírem atividade antiproliferativa em menores

concentrações, serem seletivos para a linhagem cancerígena testada e por manterem sua atividade em longo período de tempo (72 horas), sugerindo que não geraram resistência na linhagem B16F10. Pela análise qualitativa do mecanismo de morte celular, verificamos que os compostos Redresv003, Redresv004 e Redresv005 apresentaram diferença em relação ao controle para ensaio de apoptose e também por autofagia, sugerindo não haver alvo específico para ação com base nesses ensaios.

## ABSTRACT

Melanoma is a malignant tumor that develops anywhere on the skin is 1 to 3% of all malignant neoplasms, and also affects men and women, especially in light skin. The development of melanoma may be associated with excessive sun exposure, sunburn, fair skin, blond or red hair, lots of freckles on their shoulders and backs, family history and presence of actinic keratosis.

The chemotherapeutic strategies have been based on the use of dacarbazine and temozolomide. In addition to these monoclonal antibodies are also being used, such as ipilimumab, approved in 2011 for the palliative treatment of patients with metastatic cancer.

Many studies are underway to evaluate the anticancer activity of compounds like resveratrol. Resveratrol, 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene (RESV) is a natural phenolic stilbene which has, among the most important properties, antioxidant, anticarcinogenic - inhibiting various cellular events associated with three major stages of carcinogenesis: started, promotion and progression - anti-inflammatory, antiplatelet, antifungal and estrogen. Resveratrol analogs were synthesized by modification of substituents on both rings, without altering the double bond between them: one by the fusion of benzene and other two by fusing a heterocyclic ring; these newly synthesized analogues showed anticancer activity, vasodilatory and anti-tyrosinase. In this paper we propose the synthesis of resveratrol analogues in order to evaluate the biological activity of these. The structural change of resveratrol stilbene modified (alternate double bond between the carbons of the double nitrogens) may be a promising strategy to improve the pharmacological parameters. The replacement of hydroxyl groups by methyls and acetyls can increase the molecular stability, so that there is decreasing susceptibility in the reaction phase II conjugation in vivo, significantly potentiate the cytotoxic activity.

Assay in cell culture using melanoma line, B16F10, showed that compounds synthesized had IC<sub>50</sub> less than resveratrol. In evaluating the IC<sub>50</sub> of the compounds synthesized in fibroblasts, 3T3 line, we see that showed higher values than in melanoma strain except Redresv001 compound, suggesting a specificity of the synthesized compounds in these cancer cells. Among the compounds, methylated Redresv003 and acetylated Redresv004 and Redresv005 have greater prominence, because of having antiproliferative activity at lower concentrations, are selective for cancer tested lineage and maintain their activity long period of time (72 hours), suggesting that did not generate resistance in the B16F10 line. For the qualitative analysis of the mechanism of cell death, we find that the Redresv003, Redresv004

and Redresv005 compounds showed differences compared to the control for apoptosis assay and also by autophagy, suggesting no specific target for action based on these assays.