



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Sistemas Conjugados: Importância na
ação e potenciação de fármacos.**

Nuno Alexandre Guerreiro Alves

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof.º Dr.º Amadeu Fernandes Brigas

2012

Sistemas Conjugados: Importância na ação e potenciação de fármacos.

Declaração de autoria de trabalho.

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.

(Nuno Alexandre Guerreiro Alves)

Copyright © 2012 por Nuno Alexandre Guerreiro Alves

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao seu autor e editor.

*Ao avô Acácio e à avó Margarida, sempre
Aos meus pais
Ao resto da família*

*“On bended knees is no way to be free...”
Eddie Vedder*

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que este trabalho fosse projetado e realizado. A todos os meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, ao Prof. Dr. Amadeu Brigas, meu orientador, pela total disponibilidade que apresentou para me orientar e ajudar, não só ao longo da realização deste trabalho, mas também ao longo da minha formação académica. Foi, efetivamente, um prazer trabalhar sob a sua orientação.

Ao Prof. Américo Lemos, por ter tido a sorte que comigo partilhasse diversos conhecimentos práticos e teóricos a nível laboratorial.

A todos os restantes professores das áreas de Química, Química Orgânica e, principalmente, Química Orgânica Farmacêutica por me terem ajudado a encontrar o lugar onde melhor me encaixo no seio das Ciências Farmacêuticas.

A todos os meus colegas e amigos, principalmente o Marcos Torrado e o Cesar Costa, por terem marcado e por me terem acompanhado ao longo de todo este percurso.

A toda a minha família, não só pelo apoio que me deram mas também por todos os sacrifícios que fizeram, sendo eles a razão de aqui ter chegado.

Por fim, a toda a Universidade do Algarve tal como a toda a sua estrutura, pelas condições de trabalho e pelo peso e significado que têm tanto na minha formação académica como cívica.

Resumo

Os sistemas conjugados apresentam uma reatividade própria devido à deslocalização das suas ligações. Esta reatividade torna-os importantes não só ao nível da indústria química mas também em questões farmacológicas e toxicológicas. Existem bastantes fármacos que exercem a sua função farmacológica devido à capacidade alquilante inerente aos seus sistemas conjugados, podendo a alquilação dar-se por uma reação tipo-Michael ou por uma substituição nucleofílica assistida por um sistema conjugado, como ocorre com compostos com sistemas alílicos. Muitos fármacos citotóxicos ou antibióticos atuam por um mecanismo de alquilação, seja pela alquilação do DNA ou pela modificação covalente de enzimas e outras proteínas. Estas alquilações interferem com os processos celulares levando à apoptose da célula.

Por outro lado, existem muitos fenómenos de toxicidade que têm vindo a ser associados ao desenvolvimento de diversas doenças, que ocorrem também devido à alquilação de proteínas e do DNA por moléculas com um sistema conjugado na sua estrutura. Estas alquilações podem levar a respostas imunológicas e à diminuição de função de algumas proteínas endógenas, por alterarem a estrutura destas. No caso da alquilação do DNA, podem provocar mutações que podem causar um descontrolo do ciclo celular dando origem ao desenvolvimento de uma neoplasia.

O conhecimento dos mecanismos pelo qual os fármacos e outras moléculas com atividade biológica contendo sistemas conjugados na sua estrutura atuam, a nível endógeno, é bastante relevante tanto na compreensão de determinadas patologias, como na criação de novas moléculas com uma atividade farmacológica melhorada.

Palavras-chave: Sistemas conjugados, Agentes alquilantes, Citotóxicos, Antibióticos, Moléculas tóxicas, Potenciação de fármacos.

Abstract

Conjugated systems show a particular reactivity due to their bond delocalization. This reactivity makes them important not only in chemical industry but also in pharmacological and toxicological issues. There are plenty of drugs that exert their pharmacological activity due to their alkylating ability inherent to their conjugated systems, which can give the alkylation by a Michael-type reaction or a nucleophilic substitution assisted by a conjugated system, as occurs with compounds with an allylic systems. Many cytotoxic drugs or antibiotics act by an alkylation mechanism, being this mechanism the alkylation of DNA or covalent modification of enzymes and other proteins. These alkylations interfere with cellular processes leading to apoptosis of the cell.

Moreover, there are many mechanisms of toxicity that have been associated with the development of various diseases, which occur also due to alkylation of DNA and protein molecules by molecules having a conjugated system in their structure. These alkylations lead to immunologic responses and decrease of the function of some endogenous proteins, by altering their structure. In the case of alkylation of DNA, mutations may occur which may cause an uncontrolled cell cycle, leading to the development of a tumor.

The knowledge of the mechanisms by which drugs, and other biologically active molecules with a conjugated system in its structure, acts at an endogenous level, may become quite important both in understanding certain pathologies, and at the creation of new molecules with an improved pharmacological activity.

Keywords: Conjugated systems, Alkylating agents, Cytotoxics drugs, Antibiotics, Toxic molecules, Drugs potentiation.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
I. Introdução aos Sistemas Conjugados	1
II. Adições a sistemas alílicos.....	7
II.1. Alilmetanosulfonato e Feniletilmetanosulfonato	8
II.2. Isopreno	10
II.3. Mitomicina C	13
II.4. Tamoxifeno.....	18
III. Adição tipo-Michael	21
III.1. Acroleína	25
III.2. Derivados da peroxidação de ácidos gordos insaturados.....	33
III.2.1. 4-hidroxi-2-nonenal.....	35
III.2.2. 4-oxo-2-enal	39
III.3. <i>cis</i> -2-butene-1,4-dial	41
III.4. Terpenóides.....	44
III.4.1. Lactonas diterpénicas.....	45
III.4.1.1. Jolkinolido D	46
III.4.2. Lactonas Sesquiterpénicas	48
III.4.2.1. Iludina S e Irofulveno.....	49
III.4.2.2. Santamarina	51
III.4.2.3. Helenalina.....	52
III.4.2.4. Partenolido	53
III.4.2.5. Cnicina e Cinaropicrina.....	54
III.5. Hipotemicina	55
III.6. 6-hidroximetil-1H,3H-pirrol[1,2-c]tiazol	56
IV. Outros fármacos com sistemas conjugados.....	57
IV.1. Anfotericina B.....	57
IV.2. Enediínas	59
IV.3. Ácidos gordos triénicos conjugados.....	60

V. Discussão/Potenciação e desenvolvimento de fármacos	62
V.1. Mitomicina C	65
V.2. Bases azotadas	66
V.3. Lactonas sesquiterpénicas	70
V.3.1. Helenalina.....	73
V.4. Pró-fármaco de enediínas	74
V.5. Esteroides.....	76
V.6. Espaçadores multiconjugados.....	78
VI. Conclusão	82
VII. Bibliografia	83

Índice de Estruturas

Estrutura I-1 - Estruturas de ressonância do butadieno.	1
Estrutura I-2 - Estrutura molecular da cisplatina 2 e da ciclofosfamida 3.	4
Estrutura II-1 - Ativação metabólica do Isopreno a IP-1,2-O e IP-3,4-O.....	11
Estrutura II-2 - Estrutura molécula da mitomicina C.	15
Estrutura II-3 - Estrutura molecular do toremifeno.	20
Estrutura III-1 - Estrutura molecular da acroleína.	25
Estrutura III-2 – Estrutura molecular do 2-propen-1-ol.	26
Estrutura III-3 – Aductos formados in vitro entre a acroleína e desoxiadenosina.	26
Estrutura III-4 – Estrutura dos aductos maioritários da reacção da acroleína com a desoxitimidina.	28
Estrutura III-5 – Cross-link formado entre a acroleína e duas desoxiguanosinas.	30
Estrutura III-6 – Estrutura molecular do 4-hidroxi-2-nonenal.	35
Estrutura III-7 – Cross-link formado pelo 4-hidroxi-2-nonenal e duas desoxiguanosinas.	37
Estrutura III-8 – Histidina 33, cisteína 30 e lisina 34.....	38
Estrutura III-9 –Estrutura do cross-link formado entre o 4-hidroxi-2-nonenal, uma lisina e uma histidina.....	38
Estrutura III-10 – Estrutura molecular do 4-oxo-2-enal.....	40
Estrutura III-11 – Estrutura dos aductos exocíclicos formados pelo 4-oxo-2-enal e a desoxiguanosina.	40
Estrutura III-12 – 1,N2-biciclo 2'-deoxiguanosina.	42
Estrutura III-13 – Cisteína 30 e Lisina 34.	44
Estrutura III-14 – Estrutura molecular do isopreno.....	45
Estrutura III-15 – Estrutura do aducto duplo formado por duas moléculas de jolkinolido D e uma alanina.	47
Estrutura III-16 – Estruturas moleculares de α -metileno- γ -lactona 41, butenolido 42, ciclopentenona 43.....	48
Estrutura III-17 – Éster conjugado, ou alílico.	49
Estrutura III-18 – Estrutura molecular do irofulveno.....	51
Estrutura III-19 – Estrutura molecular da santamarina.	52
Estrutura III-20 – Estrutura molecular da helenalina.	53
Estrutura III-21 – Estrutura molecular do partenolido.	53

Estrutura III-22 – Cnicina 49 e Cinaropicrina 50.....	55
Estrutura IV-1 – Estrutura molecular da anfotericina B.....	58
Estrutura IV-2 – Estrutura molecular do ergosterol 54 e do colesterol 55.....	58
Estrutura IV-3 – Estrutura molecular do ácido jacárico.....	61
Estrutura IV-4 – Estrutura geral de um hidroperóxido de um ácido triénico conjugado.	61
Estrutura V-1 – Estrutura molecular do 5-fluoruracilo.....	67
Estrutura V-2 – Análogo da alquilante da timina com nucleofugo em posição alílica. .	68
Estrutura V-3 - Análogo alquilante da guanina com nucleofugo em posição alílica.	68
Estrutura V-4 - Análogo alquilante da guanina com um grupo aceitador de Michael exocíclico.....	69
Estrutura V-5 – Estrutura molecular da timina.....	69
Estrutura V-6 – Molécula análoga da timina com função alquilante.	70
Estrutura V-7 – Alteração do farmacóforo da santamarina 46, uma lactona sesquiterpénica, por aumento das dimensões do sistema conjugado.....	71
Estrutura V-8 – Derivado da helenalina.	74
Estrutura V-9 – Estrutura molecular de um pró-fármaco de uma enediina.....	75
Estrutura V-10 – Estrutura do ciclo-pentano-peridro-fenantreno.....	76
Estrutura V-11 – Estrutura de um derivado de um esteroide, o colesterol, com capacidade alquilante.....	77
Estrutura V-12 – Estrutura de um potencial fármaco híbrido de dois alquilantes de DNA unidos por um espaçador multiconjugado.....	78
Estrutura V-13 - Estrutura de um hidroperóxido de um potencial fármaco híbrido de dois alquilantes de DNA unidos por um espaçador multiconjugado.	80
Estrutura V-14 – Produtos da peroxidação de Estrutura V-13.....	81

Índice de Mecanismos

Mecanismo II-1 – Reacção (a) SN1 e (b) SN2 de um sistema alílico.	7
Mecanismo II-2 – Reacção tipo SN1' em sistemas alílicos	7
Mecanismo II-3 - Reacção tipo SN2' em sistemas alílicos.	8
Mecanismo II-4 - Alquilação pelo alilmetanosulfato por mecanismo Sn2'	9
Mecanismo II-5 – Alquilação pelo alilmetanosulfato por mecanismo S _N 2.	9
Mecanismo II-6 – Alquilação pelo feniletilmetanosulfonato.	10
Mecanismo II-7 – Hidrólise do IP-1,2-O.	12
Mecanismo II-8 – Formação da desoxiinosina.	13
Mecanismo II-9- Mecanismo de alquilação de DNA por parte da mitomicina C.	16
Mecanismo II-10 - Mecanismo de formação de aductos do tamoxifeno com o DNA. ...	19
Mecanismo II-11 – Conversão do α-hidroxitamoxifeno.	19
Mecanismo III-1 – Adição de Michael.	21
Mecanismo III-2 – Reacção tipo-Michael.	23
Mecanismo III-3 – Formação de uma base de Schiff.	24
Mecanismo III-4 – Mecanismo de formação do aducto 18 da Estrutura (Adaptado de Pawłowicz & Munter, 2006)	27
Mecanismo III-5 - Mecanismo de formação dos aductos maioritários entre a acroleína e a desoxitimidina (Adaptado de Pawłowicz & Kronberg, 2008).....	29
Mecanismo III-6 – Formação do aducto exocíclico entre a acroleína e a desoxiguanosina.	29
Mecanismo III-7 – Aductos formados entre a acroleína e a desoxicitidina.	31
Mecanismo III-8 – Formação de aducto entre acroleína e desoxicitidina contendo dois exocíclis.	31
Mecanismo III-9 – Formação de aducto entre a acroleína e cisteína.	32
Mecanismo III-10 – Activação metabólica da ciclofosfamida a fosforamida e acroleína.	32
Mecanismo III-11 – Passo de iniciação da peroxidação lípica.	33
Mecanismo III-12 – Primeiro passo de propagação da peroxidação lípida.	34
Mecanismo III-13 – Segundo passo de propagação da peroxidação lípida.	34
Mecanismo III-14 – Formação de um α,β – aldeído insaturado a partir de um hidroperóxido lípido.	34

Mecanismo III-15 – Formação de aducto entre o 4-hidroxi-2-nonenal e a desoxiguanosina.	36
Mecanismo III-16 - Oxidação do furano a cis-2-Butene-1,4-dial.	41
Mecanismo III-17 – Mecanismo de formação do 1,N2-biciclo 2'-deoxiguanosine (Adaptado de Vu & Peterson, 2005)	42
Mecanismo III-18 – Mecanismo de alquilação do jolkinolido D (Adaptado de Sakakura, Takayanagi, & Kigoshi, 2002)	47
Mecanismo III-19 – Mecanismo de acção da iludina S (Adaptado de McMorris & Chimmani, 2007).....	50
Mecanismo III-20 – Mecanismo de inibição das cinases pela hipotemicina. (Adaptado de Barluenga & Jogireddy, 2010).....	55
Mecanismo III-21 – Mecanismo de adição do 6-hidroximetil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol ao DNA (Adaptado de Soares, Brito, & Laranjo, 2010)	56
Mecanismo IV-1 - Mecanismo de acção da C1027, uma enediina (Adaptado San Pedro, Beerman, & Greenberg, 2012)	60
Mecanismo V-1 - Mecanismo de acção de uma molécula derivada da mitomicina C... 66	
Mecanismo V-2 – Mecanismo de acção potencial de uma lactona sesquiterpénica, baseada na estrutura da santamarina 46, dependente da redução de um anel de hidroquinona.....	72
Mecanismo V-3 – Remoção dos diois protectores dos grupos carbonilo do anel de hidroquinona.....	72
Mecanismo V-4 – Mecanismo de acção do pró-fármaco de enediina.....	75
Mecanismo V-5 – Mecanismo de activação de um análogo esteroide a um composto com capacidade alquilante por um mecanismo tipo-Michael.	77
Mecanismo V-6 – Alquilação do DNA por um espaçador multiconjugado, através de um mecanismo S_N1	79

Índice de Figuras

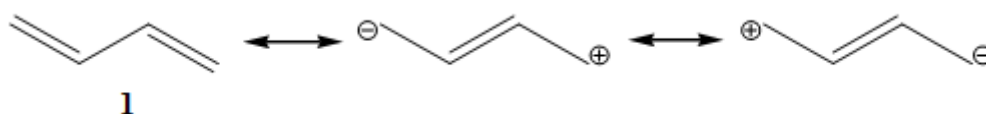
Figura I-1 - Orbital de menor energia do benzeno.	2
Figura I-2 – Representação das orbitais de um catião alílico.	3
Figura II-1 - Orientação da mitomicina C no seio da dupla hélice de DNA. A seta aponta a desoxiguanosina onde se dá a primeira alquilação. (Adaptado de referência Tomasz, 1995)	17
Figura III-1 - Densidade electrónica da 3-butenona.	22

I. Introdução aos Sistemas Conjugados

Em grande parte das moléculas uma simples estrutura de Lewis permite descrever as ligações existentes na sua estrutura. No entanto existe um grupo restrito de moléculas em que isto não é suficiente. Este grupo é constituído pelas moléculas que apresentam ligações deslocalizadas, ou seja, em que uma ou mais orbitais ligantes não estão confinadas a apenas dois átomos, mas antes deslocalizadas ao longo de três ou mais átomos. Este facto encontra-se associado a moléculas que apresentam uma ou mais ligações π intercaladas com ligações σ , tanto quanto possível planares, podendo as moléculas ser cíclicas ou acíclicas e apresentar heteroátomos na sua constituição.

No caso destes compostos, pode entender-se a sua estrutura molecular como uma estrutura híbrida das suas formas canónicas, possíveis estruturas de Lewis da molécula, nunca sendo igual a qualquer uma destas estruturas. Esta representação estrutural da estrutura real como uma média, ponderada em função da estabilidade, das suas formas canónicas é chamada de ressonância. No entanto, é de referir que para escrever as estruturas de ressonância, ou canónicas, há que ter atenção a determinadas regras. (March & Smith, 2007)

O butadieno **1** é um composto com duas ligações π , cujos eletrões π se encontram deslocalizados sobre os quatro átomos de carbono da cadeia, podendo esta molécula ser utilizada para exemplificar a ressonância deste tipo de compostos (Estrutura I-1).



Estrutura I-1 - Estruturas de ressonância do butadieno.

Num cálculo da equação de onda, todas as estruturas de ressonância são contabilizadas conferindo assim uma energia molecular mais baixa, sendo que a diferença entre o resultado desta equação e o valor da estrutura de Lewis de mais baixa energia constitui a energia de ressonância. Este diferencial de energia quantifica a estabilidade extra conferida à molécula pela deslocalização das ligações. (Vollhardt & Schore, 2002)

No entanto, esta aproximação torna-se mais correta se for feita com base na teoria das orbitais moleculares. De facto, esta última teoria torna mais fácil a explicação da deslocalização das ligações. Olhando por esta prisma para o benzeno, molécula aromática logo com as ligações deslocalizadas, vemos que todos os átomos de carbono da molécula apresentam uma configuração sp^2 , usando estas orbitais para estabelecer ligações σ , fazendo com que todos os átomos da molécula se encontrem no mesmo plano. Cada carbono possui ainda uma orbital p , contendo um eletrão. Cada uma destas orbitais estabelece coalescência com as duas orbitais p dos átomos de carbono adjacentes. Esta coalescência forma seis novas orbitais, das quais três são ligantes e ocupam aproximadamente o mesmo espaço. A orbital de menor energia, apresentando apenas um nó no plano da molécula, é representada na Figura I-1. (March & Smith, 2007)

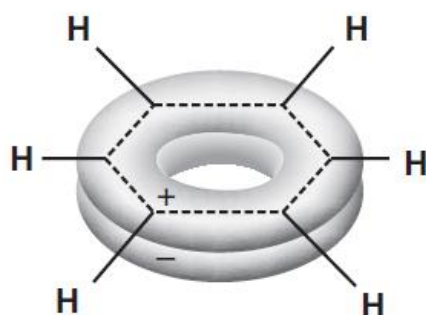


Figura I-1 - Orbital de menor energia do benzeno.

A existência desta deslocalização das ligações leva a que, para além de a molécula apresentar uma energia fundamental menor, as ligações apresentem um menor comprimento e que seja necessária mais energia para as romper. (Vollhardt & Schore, 2002)

Existem outros fatores que influenciam a deslocalização de carga, como a conformação da molécula. A deslocalização é tanto mais eficiente quanto mais planar for a molécula, pois esta conformação maximiza a coalescência entre as orbitais p , diminuindo assim a energia fundamental da molécula. Esta maior estabilidade faz com que estas moléculas com capacidade de deslocalização de carga, procurem apresentar uma estrutura planar ou o mais próximo possível disso. Muitas moléculas, por sua vez, vêm a sua deslocalização eletrónicas ser reduzida, ou mesmo impedida de se concretizar por apresentarem átomos que, devido a efeitos conformacionais ou estéreos. (Carey & Sundberg, 2007) (March & Smith, 2007)

Os sistemas conjugados, sistemas com ligações duplas ou triplas alternadas com ligações simples, encontram-se estritamente ligados a estes fenómenos de deslocalização das ligações, sendo esta extensamente verificada nestes sistemas. Tendo em conta que a deslocalização de ligações é verificada devido ao *overlap* entre as orbitais *p* dos átomos, esta é verificada em sistemas conjugados como o butadieno. Este tipo de deslocalização é verificado ainda em outros sistemas conjugados lineares como carbonilos α,β -insaturados, sistemas conjugados de três ou mais ligações duplas ou triplas, iminas α,β -insaturadas e compostos em que exista uma ligação dupla ou tripla conjugada com um anel aromático. Em termos de reatividades, sabe-se que compostos com extensas conjugações apresentam uma grande reatividade, polimerizando de forma relativamente fácil, especialmente na presença de eletrófilos. Esta reatividade é explicada pela facilidade que estes compostos têm em estabilizar cargas iónicas ou radicais, devido ao seu extenso sistema conjugado, que permite deslocalizar a carga por uma extensa estrutura. (Vollhardt & Schore, 2002)

A deslocalização de ligação ocorre também em sistemas alílicos, em que uma ponte dupla ou tripla se encontra conjugada com a orbital *p* de um átomo adjacente. Olhando novamente para as orbitais, é fácil perceber que esta conjugação com um átomo adjacente se pode estender por um sistema conjugado maior, caso as ligações múltiplas se encontrem conjugadas entre si. (March & Smith, 2007)

No caso específico dos sistemas alílicos, o que mais interessa para este trabalho, é a reatividade destes compostos e o facto de estes poderem apresentar um radical, um anião ou um catião alílico, dependendo se a orbital *p* do átomo adjacente possui um, dois ou nenhum eletrão, bastante estáveis (Figura I-2).

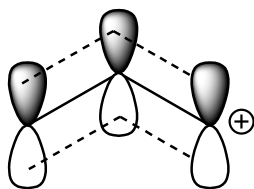


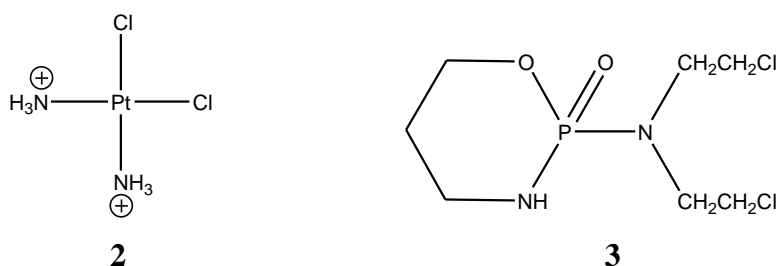
Figura I-2 – Representação das orbitais de um catião alílico.

Existem ainda outros casos específicos de sistemas conjugados em que há uma deslocalização das ligações que por não apresentarem relevância considerável para este trabalho não serão abordados.

Os sistemas alílicos, devido à deslocalização eletrônica, para além de apresentarem uma energia mais baixa, apresentam ainda características reacionais bastante diferentes dos seus hidrocarbonetos homólogos, nomeadamente ao nível de substituições nucleofílicas. (Vollhardt & Schore, 2002) (March & Smith, 2007)

Os sistemas conjugados são grupos funcionais de grande importância a nível terapêutico, podendo ser olhados por dois prismas diferentes. Se por um lado existem vários fármacos que têm num grupo conjugado o seu farmacóforo que lhe permite bloquear processos celulares através da alquilação do DNA ou enzimas, sendo neste trabalho abordados antibióticos e antineoplásicos, por outro existem vários xenobióticos que exercem a sua toxicidade a nível fisiológico por mecanismos associados também a grupos conjugados. É mostrado neste trabalho que, no caso dos agentes alquilantes do material genético ou de enzimas, devido a este seu mecanismo de ação, tanto podem atuar contra microorganismos infecciosos como contra células tumorais.

Estes compostos conjugados apresentam uma grande capacidade alquilante o que é muito importante em termos de citotoxicidade. De facto e apesar de o seu principal mecanismo de alquilação direta ser diferente, outras moléculas alquilantes como a cisplatina e a ciclofosfamida, uma mostarda nitrogenada (Estrutura I-2), são dos citotóxicos utilizados há mais tempo, devido à sua toxicidade para as células. (Lawley & Phillips, 1996)



Estrutura I-2 - Estrutura molecular da cisplatina **2** e da ciclofosfamida **3**.

Em boa verdade, os citotóxicos e os xenobióticos tóxicos encontram-se estritamente ligados, não só por atuarem pelos mesmos mecanismos, mas por, muitas vezes, a diferença entre um antineoplásico e um agente mutagénico, se basear na sua concentração. Isto verifica-se no caso de alguns citotóxicos que apresentam atividade mutagénica, e em alguns xenobióticos mutagénicos que desencadeiam processos de apoptose celular, quando se encontram em grandes concentrações. (Hemminki, 1983)

(Esterbauer, 1993) Tanto num caso como outro, relaciona-se com um balanço entre as mutações exercidas e a capacidade da célula manter a sua viabilidade. (Hartl & Jones, 2006)

O estudo da ação de compostos tóxicos alquilantes representa um plano importante no estudo da Química Orgânica Farmacêutica. Se o conhecimento dos seus mecanismos permite uma melhor percepção de diversos processos patológicos, indispensável ao avanço da Farmacologia, este mesmo conhecimento também se pode apresentar como uma importante mais-valia no *design* ou potenciação de novos fármacos que atuem por alquilação de centros ativos de enzimas, proteínas ou material genético.

Sendo o objetivo deste trabalho explorar os mecanismos de reação entre fármacos e outros xenobióticos com grupos conjugados, levando em conta o paralelismo de ação entre estes e visando a potenciação e *design* de fármacos, no trabalho as moléculas serão apresentadas de acordo com o seu mecanismo de alquilação.

Não descurando a importância do desenvolvimento de novos e mais potentes antibióticos dado o crescente aparecimento de estirpes de microorganismos resistentes às terapias atualmente disponíveis, é o cancro que constitui uma das maiores, se não a maior, preocupação a nível de investigação científica. Dada a expressão desta patologia, da sua progressão e considerando também a relativa resistência destes casos a terapia medicamentosa, assim como a elevada taxa de mortalidade associada a determinados tipos de neoplasia, torna-se imperativo aumentar a eficiência terapêutica contra esta patologia.

Apesar da reconhecida importância e potencialidade ao nível da alquilação por compostos conjugados, existem também outros fármacos e moléculas conjugadas que, apesar de não atuarem por meio de uma alquilação mediada por este sistema, devem direta ou indiretamente a sua ação à existência de um sistema conjugado na sua estrutura molecular, e como tal merecem também referência.

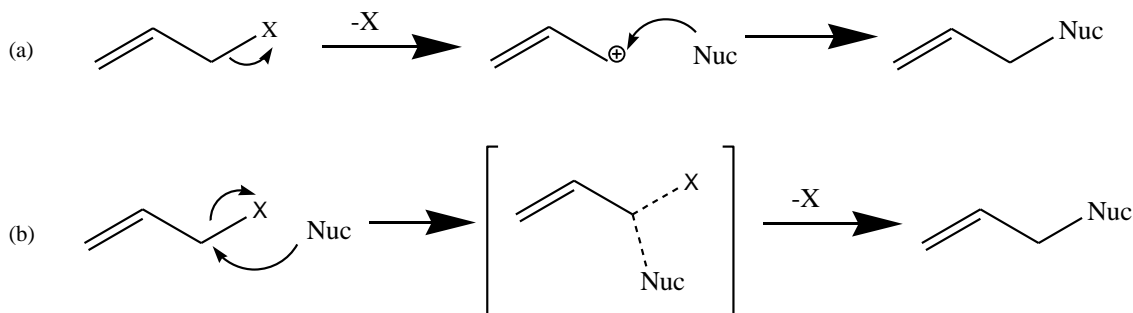
É na perspectiva de alcançar um futuro com um maior e melhor leque de opções no combate ao cancro, que os sistemas conjugados, assim como a Química Orgânica Farmacêutica, podem assumir um papel de relevância. A adição ou modificação de compostos conjugados em moléculas com atividade farmacológica contra o cancro associado ao conhecimento das características das células tumorais, podem assim

conferir não só uma maior citotoxicidade e uma maior versatilidade da ação dos fármacos, que permita superar a capacidade que as células tumorais têm em desenvolver resistência aos agentes quimioterapêuticos, mas também conferir uma maior seletividade aos citotóxicos que permita diminuir as suas reações adversas, através do aproveitamento de algumas características específicas que diferenciam as células tumorais das saudáveis.

II. Adições a sistemas alílicos

Os sistemas alílicos são sistemas que apresentam uma conjugação entre uma ligação π e a orbital p do átomo adjacente. (March & Smith, 2007) (Vollhardt & Schore, 2002)

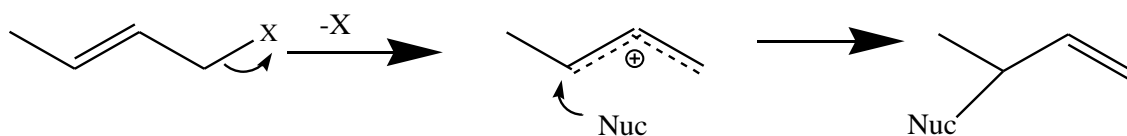
Os sistemas alílicos podem ser alvos de reações nucleofílicas, podendo reagir, tal como as outras moléculas, por um mecanismo S_N1 e S_N2 (Mecanismo II-1).



Mecanismo II-1 – Reação (a) S_N1 e (b) S_N2 de um sistema alílico.

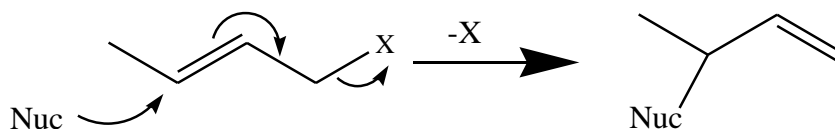
No entanto, devido à sua estrutura conjugada que permite uma deslocalização das ligações π , estes grupos funcionais podem reagir por outros mecanismos chamados de S_N1' e S_N2' , que são mecanismos variantes dos já mencionados S_N1 e S_N2 . (March & Smith, 2007)

O mecanismo S_N1' é um mecanismo em que, tal como no S_N1 , se forma um carbocátion após a quebra da ligação com o nucleofugo. Esta carga positiva é deslocalizada ao longo do sistema alílico, dando-se o ataque nucleofílico no carbono 3 do sistema alílico posicionado na margem oposta do sistema, em relação ao carbono 1 anteriormente ligado ao nucleofugo, ao contrário do que ocorre nos mecanismos S_N1 (Mecanismo II-2). Olhando para a estrutura de um sistema alílico é fácil de perceber que o produto deste tipo de reação nucleofílica apenas se distingue do produto de uma reação S_N1 , se o sistema alílico não for simétrico.



Mecanismo II-2 – Reação tipo S_N1' em sistemas alílicos

Quanto ao mecanismo S_N2' , este ocorre por um ataque nucleofílico ao carbono 3 do sistema alílico. No mesmo passo da reação deste ataque dá-se uma deslocalização concertada da ligação dupla e o abandono do nucleofugo (Mecanismo II-3). Tal como na reação S_N1' , o produto desta reação S_N2' também não apresenta qualquer diferença do produto de uma reação S_N2 em sistemas alílicos simétricos.



Mecanismo II-3 - Reação tipo S_N2' em sistemas alílicos.

Em termos de reatividade os compostos alílicos apresentam também uma velocidade de reação relativa superior aos seus alcanos correspondentes. Esta maior reatividade ocorre em todos os tipos de substituição nucleofílica. No caso das reações tipo S_N1 , este facto prende-se com a capacidade que o sistema alílico tem em estabilizar o catião formado, por ressonância. Em relação a reações do tipo S_N2 , a maior velocidade de reação está relacionada com a estabilização, também por ressonância, do estado de transição da reação. (March & Smith, 2007)

Esta velocidade de reação dos sistemas alílicos é tanto maior quanto o número de possíveis estruturas de ressonância estáveis. A adição de grupos alquílicos ao sistema também aumenta a sua reatividade desde que não interfira com a reação por motivos de impedimento estérico. Isto ocorre devido a um fenómeno chamado hiperconjugação, que se baseia numa sobreposição entre a orbital p vazia do carbocatião e uma orbital ligante vizinha. Resumidamente, o grupo alquílico aumenta a estabilidade do carbonato ou do estado estacionário da reação pela doação de carga eletrónica. (Ochran & Uggerud, 2007) (Streitwieser, Jayasree, Leung, & Choy, 2005)

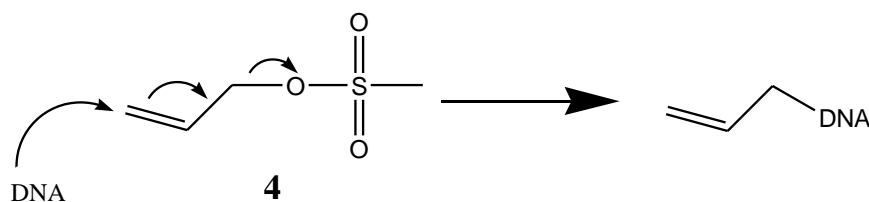
II.1. Alilmetanosulfonato e Feniletilmetanosulfonato

Os ésteres alilmetanosulfonato **4** e feniletilmetanosulfonato **5** são compostos que apresentam um potencial mutagénico e carcinogénico na medida em que tem a capacidade de estabelecer aducto com desoxiguanosinas existentes no DNA. Tanto o feniletilmetanosulfonato como o alilmetanosulfonato funcionam como agentes alquilantes do átomo de oxigénio existente na posição 6 do nucleótido de guanina das desoxiguanosinas. Esta alquilação pode levar a mutações pontuais por uma transversão

de bases, nomeadamente uma transversão G→A, já que uma desoxiguanosina alquilada no Oxigénio na posição 6, vai emparelhar com uma timidina em vez de uma citidina. (Eder, Dornbusch, & Fischer, 1987) (Eder, Kutt, 2001)

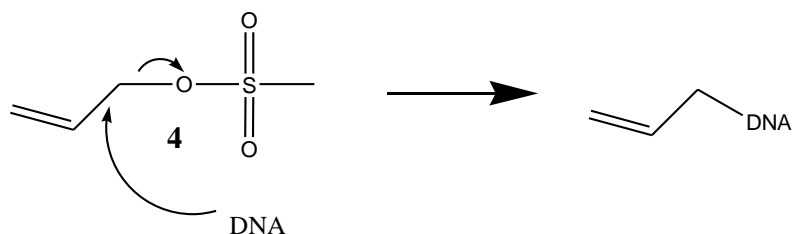
Apesar de ambos os compostos serem alquilantes e terem um átomo-alvo em comum, cada um estabelece a ligação covalente por um mecanismo diferente.

A estrutura do metanosulfonato constitui uma das estruturas mais básicas de um composto alílico exercendo genotoxicidade de forma direta. (Eder, Dornbusch, & Fischer, 1987) Devido ao impedimento estérico, dadas as dimensões do grupo metanosulfonato, a reação de alquilação do alilmetanosulfonato dá-se preferencialmente por via de uma adição conjugada. O ataque nucleofílico do oxigénio dá-se no átomo de carbono na extremidade oposta ao grupo abandonante, por um mecanismo do tipo S_N2' , já que este carbono apresenta um menor impedimento estérico do que o carbono diretamente ligado ao grupo metanosulfonato (Mecanismo II-4).



Mecanismo II-4 - Alquilação pelo alilmetanosulfato por mecanismo S_N2' .

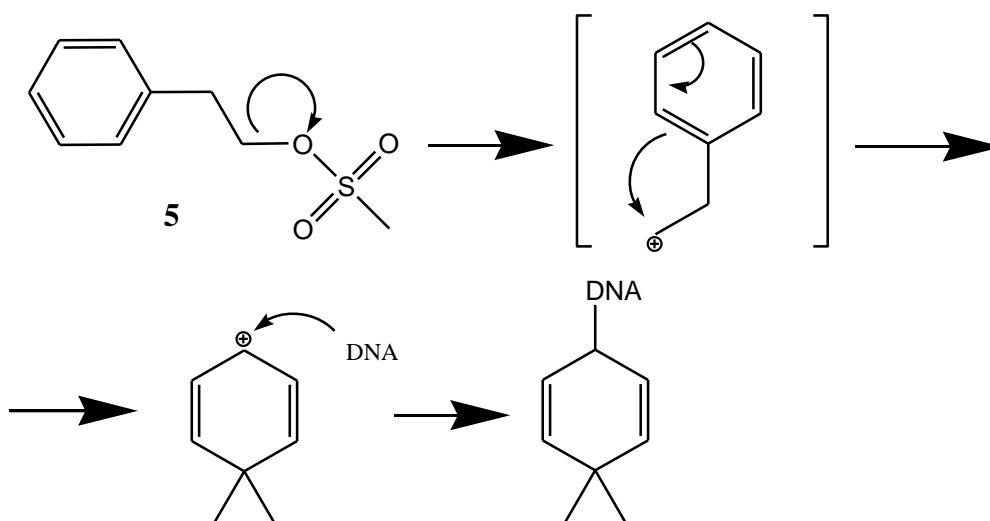
No entanto apesar da reação apresentada atrás se dar com maior facilidade ocorrendo assim de forma preferencial, o alilmetanosulfonato também pode reagir com a base azotada por via de uma reação do tipo S_N2 simples, em que a substituição nucleofílica é assistida por uma ponte dupla, e facilitada por o nucleofugo se encontrar ligado a um carbono alílico (Mecanismo II-5).



Mecanismo II-5 – Alquilação pelo alilmetanosulfato por mecanismo S_N2 .

Ambas as reações de alquilação do alilmetanosulfonato com o DNA celular dão o mesmo aducto, como produto. (Eder, Kutt, & Deininger, 2001)

Por sua vez, o feniletilmetanosulfonato reage por um mecanismo S_N1 , em que após a dissociação do grupo abandonante metanosulfonato, se dá um rearranjo da molécula que dá origem a um ião fenônio, em que o carbonato é altamente estabilizado por ressonância, já que se encontra em posição alílica em relação a duas ligações duplas. Após a formação deste ião, dá-se o ataque nucleofílico por parte do Oxigénio, estabelecendo-se assim o aducto (Mecanismo II-6).



Mecanismo II-6 – Alquilação pelo feniletilmetanosulfonato.

II.2. Isopreno

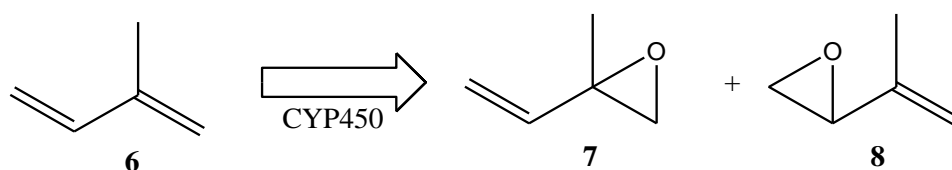
O isopreno **6** foi classificado como um possível carcinogénico para as células humanas pela Internacional Agency for Research on Cancer. Este análogo, metilado na posição 2, do 1,3-butadieno é bastante abundante no ambiente, sendo proveniente tanto de fontes antropológicas, como combustões, como de fontes naturais, já que o isopreno é um produto de vários processos biológicos, principalmente, em plantas. (Begeman, Boysen, & Georgieva, 2011) (de las Heras & Rodriguez, 2003)

Apesar de as emissões de isopreno para a atmosfera através de fontes naturais excederem a emissão por fontes antropológicas em cerca de 300 vezes, é pelo do fumo do tabaco que há uma maior exposição do organismo humano ao isopreno.

Este composto orgânico conjugado demonstrou ser carcinogénico em roedores, causando neoplasias nos pulmões e na glândula de Harder, uma glândula lacrimal profunda (Delgado, 2005). Estes tumores encontram-se associados a mutações pontuais, mais concretamente transversões A→T, no proto-oncogene K-ras, no codão 61. O

isopreno também demonstrou induzir quebras de cadeia de DNA e outras transversões, predominantemente A→G, em alguns estudos *in vitro* com outras linhas de células que não as de roedores. (Begeman, Boysen, & Georgieva, 2011)

No entanto, o isopreno por si é inofensivo, sendo que a sua atividade carcinogénica é atribuída aos seus metabolitos. A molécula de isopreno é metabolizada pelo CYP2E1, uma enzima do citocromo P450. A oxidação pela ação do CYP2E1 vai produzir dois tipos de epóxidos: o IP-1,2-O **7**, ou 2-metil-2-viniloxirano, e o IP-3,4-O **8**, ou propen-2-ilo-xirano (Estrutura II-1).



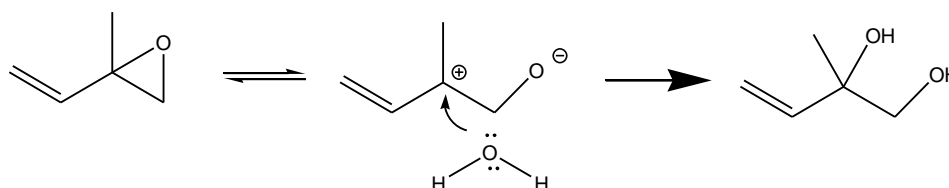
Estrutura II-1 - Ativação metabólica do Isopreno a IP-1,2-O e IP-3,4-O.

Os monoepóxidos podem sofrer uma epoxidação subsequente formando-se um diepóxido que, tal como os monoepóxidos, será alvo de hidrólise ou conjugação com glutathiona, de modo a ser excretado do organismo. No entanto este fenómeno não se dá de forma imediata, permitindo assim aos metabolitos do isopreno exercerem uma atividade nociva no organismo.

Estes epóxidos têm uma elevada capacidade alquilante, não só pela tensão do anel oxirano e eletronegatividade do carbono interno deste, o que é inerente a esta classe de compostos, mas também devido ao facto de um dos carbonos do anel ser um carbono em posição alílica, o que aumenta a reatividade deste, facilitando uma reação de adição nucleofílica. Esta particularidade dos metabolitos do isopreno permite que estes atuem como agente alquilantes de diversas macromoléculas biológicas. A alquilação de nucleósidos pelos epóxidos derivados da oxidação do isopreno é tida como a causa que desencadeia a mutagénese e carcinogénese associada a este composto.

Apesar do carácter alquilante e ambos pode dizer-se que existe uma diferença de toxicidade entre os dois epóxidos já que o IP-3,4-O forma uma maior quantidade de aducto com o DNA, que o IP-1,2-O. Isto é explicado com base na estrutura deste último, já que, para além da eletrofilicidade do carbono interno do anel oxirano, este carbono é também um carbono terciário em posição alílica. Assim este carbono apresenta uma grande facilidade em reagir por um mecanismo S_N1 , já que, o anel reage

de forma espontânea dando-se uma rutura do anel. Esta rutura leva ao alívio da tensão do anel, que é energeticamente favorável, como também forma um carbocatião alílico terciário que é estabilizado por ressonância, constituindo um catião bastante estável em ambiente intracelular. Este carbocatião vai ser atacado por moléculas de água (Mecanismo II-7). Assim o IP-1,2-O constitui uma molécula bastante instável, cuja rápida hidrólise não lhe permite formar aducto com os nucleosídeos de forma considerável, em relação ao IP-3,4-O.



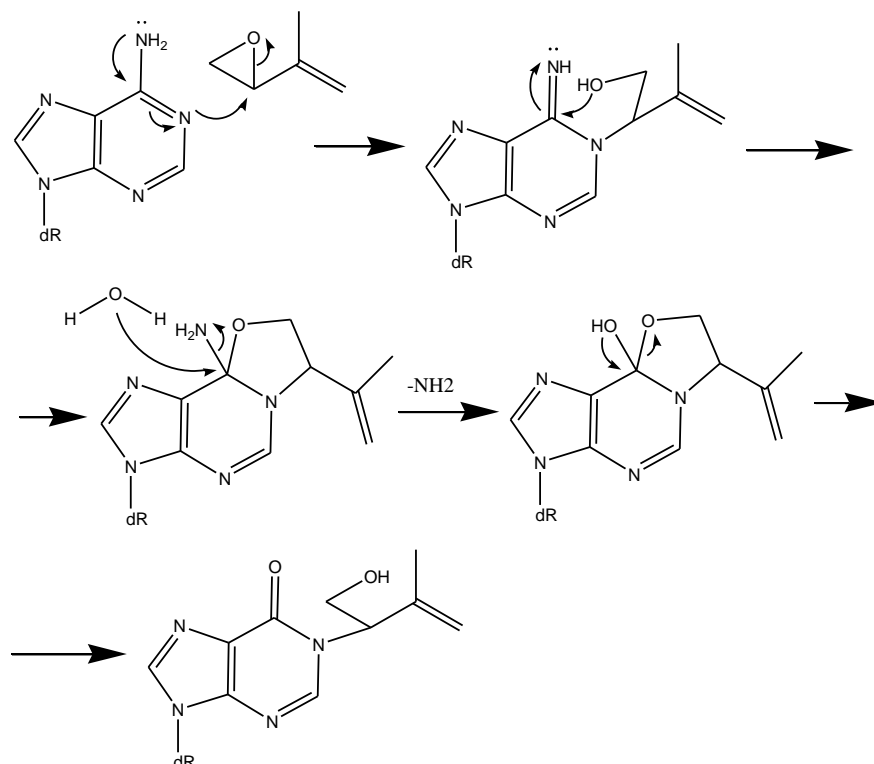
Mecanismo II-7 – Hidrólise do IP-1,2-O.

Apesar de a alquilação do nucleósido se poder dar pelo estabelecimento de uma ligação covalente entre um átomo de azoto existente na sua base azotada, e um qualquer dos carbonos integrantes do anel oxirano do IP-3,4-O, a reação vai dar-se preferencialmente com o carbono interno do anel, já que se encontra numa posição alílica, reagindo assim mais facilmente.

Não obstante estabelecer aducto também com a desoxiguanosina, são os aducto estabelecidos com a desoxiadenosina que se apresentam como os mais importantes na genotoxicidade dos metabolitos do isopreno, já que as principais mutações são as transversões de uma base de adenina para outra base azotada sendo que as alquilações dão-se, de forma quase exclusiva, nos átomos de azoto existentes nas posições 1 e 3 do anel de purina por um mecanismo S_N2 . (Begeman, Boysen, & Georgieva, 2011)

Os aducto considerados mais importantes na genotoxicidade do isopreno são os estabelecidos pelo IP-3,4-O com o átomo de azoto na posição 1 da purina. Estes aducto reagem de forma intramolecular formando-se uma desoxiinosina, que se origina por uma desaminação na posição 6 da adenina da desoxiadenosina. O mecanismo de formação deste composto é apresentado no Mecanismo II-8. Esta desoxiinosina apresenta assim uma hipoxantina como base azotada, molécula esta que apresenta uma grande similaridade com a guanina e estabelece assim par com uma citosina. Este facto pode levar a incorporações de bases azotadas incorretas aquando da replicação do DNA

o que justificaria algumas mutações pontuais, nomeadamente transversões A→G. (Begeman, Boysen, & Georgieva, 2011)



Mecanismo II-8 – Formação da desoxiinosina.

A compreensão total dos mecanismos de interação dos metabolitos do isopreno com o DNA, pode assim ser um passo em frente na avaliação da genotoxicidade deste composto conjugado.

II.3. Mitomicina C

A mitomicina C **9** é um potente fármaco, com propriedades anticancerígenas e antibióticas, descoberto em 1950, e obtido em culturas de *Streptomyces caespitosus*. Desde aí têm sido desenvolvidos e descobertos diversos análogos da mitomicina C, sendo incorporados no grupo das mitomicinas. (Tomasz, 1995)

Apesar de apresentar também propriedades antibacterianas, a mitomicina C tem vindo a ser utilizada desde 1960 em quimioterapia devido à sua atividade contra tumores sólidos, mantendo-se atualmente como um importante citotóxico usado em quimioterapia combinada em casos de cancro da mama, do pulmão, da próstata, estômago, pâncreas e cancro coloretal. Mais recentemente têm vindo a ser

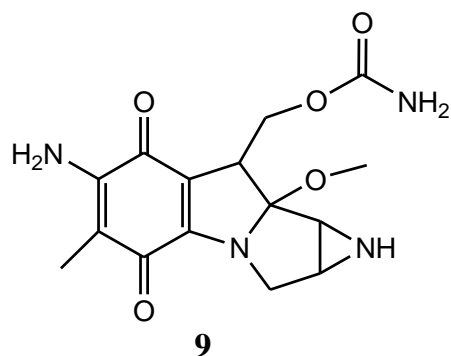
demonstrados alguns efeitos da mitomicina C a nível da expressão de alguns genes, no organismo humano. (Tomasz & Palom, 1997) (Lown, 1983)

Nos microorganismos bacterianos, a mitomicina C tem como efeitos a inibição da síntese e recombinação do DNA, e causa também a quebra dos cromossomas e troca de segmentos de DNA entre cromatídeos irmãos, apresentando atividade tanto contra bactérias Gram -, como contra Gram +. (Lown, 1983) (Tomasz & Palom, 1997)

Os efeitos da mitomicina C podem ser entendidos, de forma relativamente fácil, à luz do seu mecanismo de ação intermolecular. A mitomicina C funciona como um agente alquilante bifuncional do DNA, estabelecendo *cross-links* entre as duas cadeias complementares da dupla hélice. Esta ação é de tal modo tóxica, que apenas um *cross-link* pode causar a morte de uma célula bacteriana. Em certos casos, esta pode apenas estabelecer monoadductos com o material genético da célula ou, em casos ainda mais raros, estabelecer um aducto com duas ligações à mesma cadeia de DNA. Ambos estes tipos de alquilação são menos tóxicos para a célula que os *cross-links*. A forma de atuar da mitomicina C foi descoberta em 1963, e em 1995 ainda não era conhecido nenhum outro antibiótico obtido de forma natural, que apresentasse um mecanismo de ação semelhante a este. Apesar de a mitomicina C reagir com as moléculas do DNA, a síntese de RNA e proteínas não sofre uma alteração que possa ser considerada relevante. (Tomasz, 1995)

A mitomicina C, sendo citotóxica, apresenta muitos efeitos adversos como leucopenia, trombocitopenia, vômitos, náuseas e febre. Estes efeitos de toxicidade devem-se à ação da molécula sobre os tecidos proliferativos da matriz óssea e epitélio do sistema gastrointestinal. (Lown, 1983)

No entanto a capacidade desta mitomicina em estabelecer aducto com o DNA, sejam eles monoadductos ou *cross-links*, é dependente da redução do anel de quinona presente na sua estrutura (Estrutura II-2). Esta redução, que pode ser enzimática, pela ação da redutases endógenas, ou química, vai desencadear uma serie de reações espontâneas na molécula, ficando esta com a capacidade de reagir com nucleófilos do DNA. (Denny, 2001)

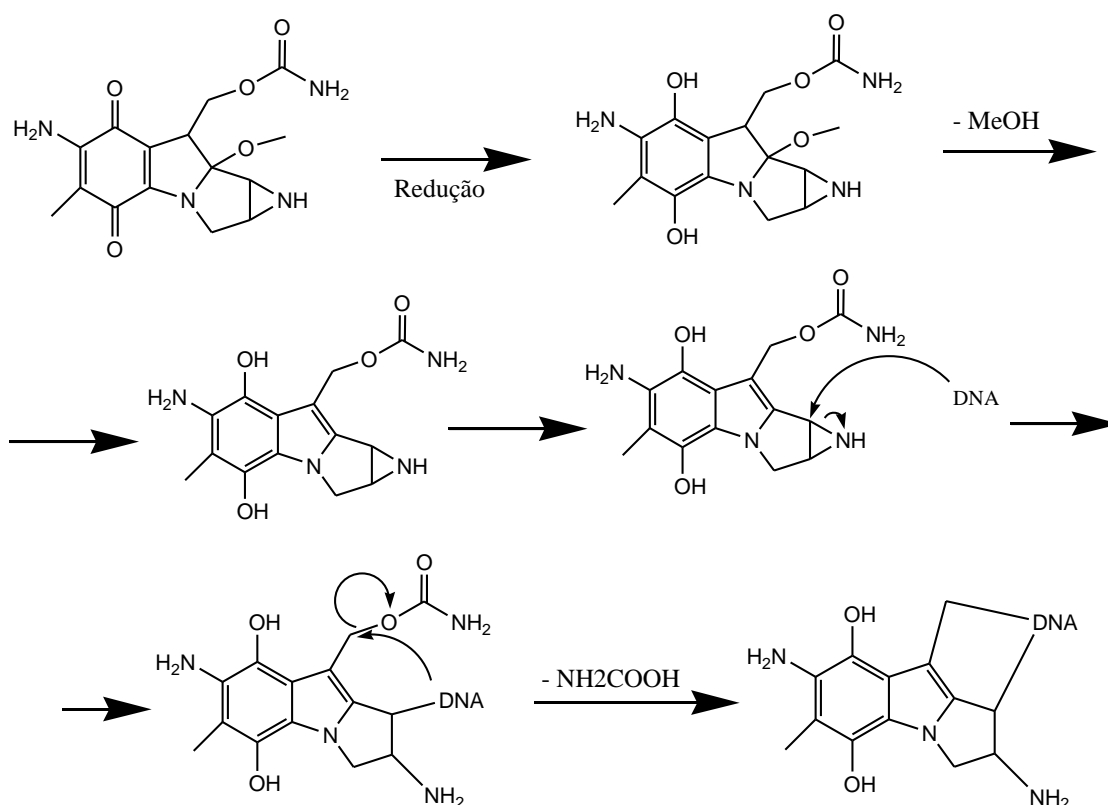


Estrutura II-2 - Estrutura molécula da mitomicina C.

A necessidade de redução do anel quinona para que a mitomicina C se torne ativa, constitui um mecanismo de seletividade por parte deste fármaco, visando apenas tumores sólidos. Este fenómeno está relacionado com o ambiente de hipoxia que a molécula encontra no interior deste tipo de tumores, que contrasta com o ambiente existente noutros tipos de neoplasias em que a maior concentração de Oxigénio molecular, inibe a redução da mitomicina C à sua forma ativa. Esta seletividade própria da mitomicina C é bastante importante já que, normalmente, os tumores sólidos apresentam uma elevada resistência a tratamentos que impliquem a utilização de oxigénio molecular ou radiação, dificultando assim a terapêutica. (Tomasz & Palom, 1997)

Em termos de interações moleculares, a mitomicina C estabelece ligações covalentes apenas com as desoxiguanosinas presentes no DNA podendo estas constituir monoalquilações ou *cross-links*, como já tinha sido referido. O estabelecimento de ligações intermoleculares é assistido por um sistema conjugado, na medida em que os ataques nucleofílicos pelos grupos amina da desoxiguanosina, se dão em carbonos alílicos da molécula de mitomicina C. Esta reação de adição, maioritariamente feita à posição N2 da desoxiguanosina, é assim facilitada pelo sistema conjugado, o que vai de encontro à importância da redução do anel de quinona, para a atividade alquilante da mitomicina C. (Yang & Wang, 1999)

O mecanismo de alquilação do DNA celular por parte da mitomicina C é apresentado no Mecanismo II-9.



Mecanismo II-9- Mecanismo de alquilação de DNA por parte da mitomicina C.

A formação de *cross-links* e de monoadductos com o DNA por parte da mitomicina C apresenta seletividade para sequências do tipo CpG, apesar de ser possível a ocorrência de monoadductos fora deste tipo de sequência, mas numa quantidade muito menor. A rigidez da molécula de mitomicina C, a distância entre as duas funções alílicas alquilantes, e as interações não-covalentes estabelecidas pela mitomicina C com determinadas bases azotadas do DNA quando este citotóxico se encontra entre as duas cadeias da dupla hélice, ajudam a compreender esta seletividade por parte do fármaco para as sequências 5'-CpG-3', em que p representa a ponte fosfato entre a desoxiguanosina e a desoxicitidina, com esta última na extremidade 5'.

A seletividade da mitomicina C é explicada por a sua primeira alquilação requerer, em circunstâncias normais, não só uma desoxiguanosina na cadeia onde se vai ligar primariamente, mas também uma desoxicitidina ligada à extremidade 5' desta desoxiguanosina. Esta sequência implica que na cadeia oposta exista uma desoxiguanosina complementar à desoxicitidina, nucleosídeo este que apresenta uma grande importância no posicionamento, e conseqüentemente na ação, da mitomicina C em relação à dupla cadeia de DNA. Esta desoxiguanosina estabelece uma ponte de hidrogénio através do seu grupo amina na posição N2, com o grupo carbamato do

fármaco, ficando este grupo funcional direcionado para o terminal 5' da cadeia em que se dá a primeira alquilação (Figura II-1). Esta interação não-covalente intermolecular leva a uma orientação da molécula de mitomicina C que faz com que esta se aproxima da desoxiguanosina onde se vai dar a primeira alquilação, facilitando este primeiro passo da alquilação bifuncional. A formação do *cross-link* é consumada quando o grupo amina N2, na cadeia complementar à cadeia onde se deu a primeira alquilação, devido à proximidade do grupo carbamato por via da ponte de hidrogénio anteriormente estabelecida, ataca o carbono electrofílico que se encontra ligado ao carbamato, e que também se encontra numa posição alílica. Assim se estabelece a segunda alquilação do *cross-link* entre as duas cadeias complementares de DNA. (Yang & Wang, 1999) (Tomasz, 1995)

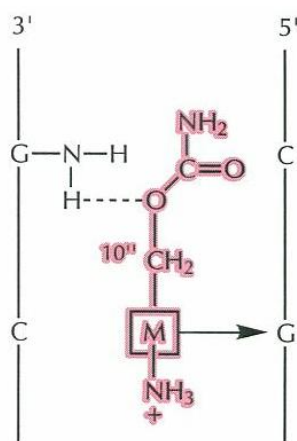


Figura II-1 - Orientação da mitomicina C no seio da dupla hélice de DNA. A seta aponta a desoxiguanosina onde se dá a primeira alquilação. (Adaptado de referência Tomasz, 1995)

Esta seletividade é entendida como uma potente arma desenvolvida pelos microorganismos produtores de mitomicina C contra outros microorganismos seus competidores, já que estas interações não-covalentes garantem que se formem preferencialmente *cross-links*, que são mais tóxicos que os monoadductos.

No entanto, devido ao tamanho e rigidez da molécula do fármaco, a sua ação de agente alquilante bifuncional fica confinada a esta sequência específica. Isto constitui uma desvantagem para a ação citotóxica da molécula no tratamento de neoplasias, pois a sequência 5'-CpG-3' é relativamente pouco abundante no genoma humano. De facto, apenas 5% das desoxiguanosinas presentes no genoma das células dos mamíferos se encontra nestas sequências, ao contrário do que acontece nos microorganismos bacterianos onde esta percentagem pode chegar aos 70%. (Tomasz, 1995)

Este “calcanhar de Aquiles” da mitomicina C deixa, no entanto, algumas portas abertas no que diz respeito à modulação e desenvolvimento de moléculas análogas mais potentes e eficientes que a mitomicina C.

II.4. Tamoxifeno

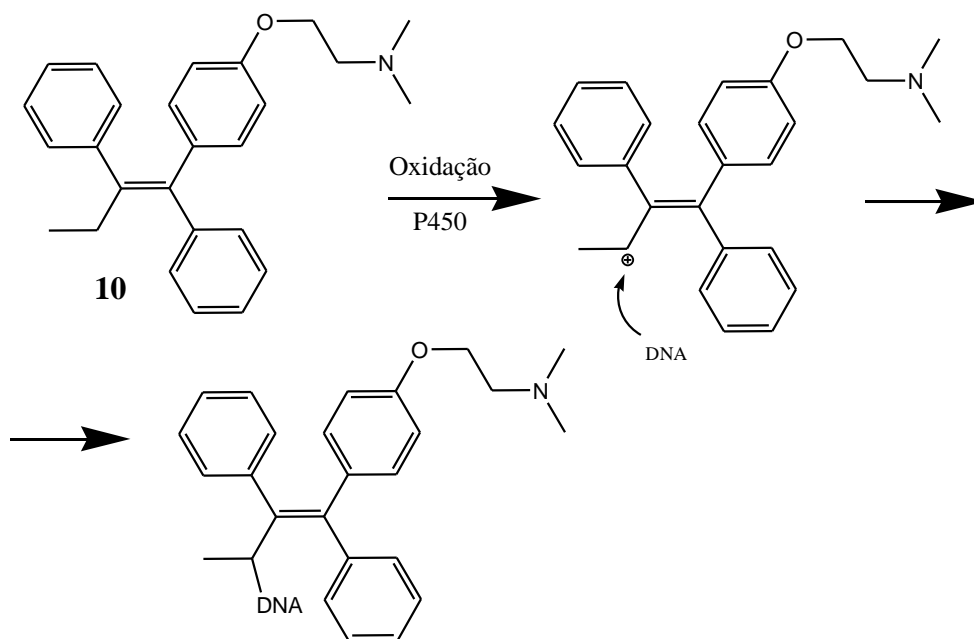
O tamoxifeno **10**, um trifeniletileno, é um composto com atividade antiestrogénica, sendo amplamente utilizado como adjuvante em quimioterapia da neoplasia da mama, assim como na profilaxia desta doença em mulheres que apresentem um alto risco de a vir a desenvolver. (Kuramochi, 1996) (Surh, 1998)

Apesar de ser benéfico no tratamento e profilaxia do cancro da mama, o tratamento com tamoxifeno aumenta o risco de cancro do endométrio, assim como o risco de desenvolvimento de eventos tromboembólicos em mulheres. O mecanismo de indução de cancro do endométrio ainda não está completamente compreendido, pensando-se que estarão envolvidos fatores hormonais, assim como fatores relacionados com genotoxicidade. (Gamboa da Costa & Pereira, 2007)

Esta mesma genotoxicidade já foi verificada também em roedores tratados com tamoxifeno, sendo que este fármaco exibe uma ação hepatocarcinogénica, tendo sido detetados aducto de tamoxifeno com o material genético dos hepatócitos. Este facto sugere que seja este o mecanismo inerente à genotoxicidade e carcinogénese associada à utilização de tamoxifeno, tanto em roedores como em humanos.

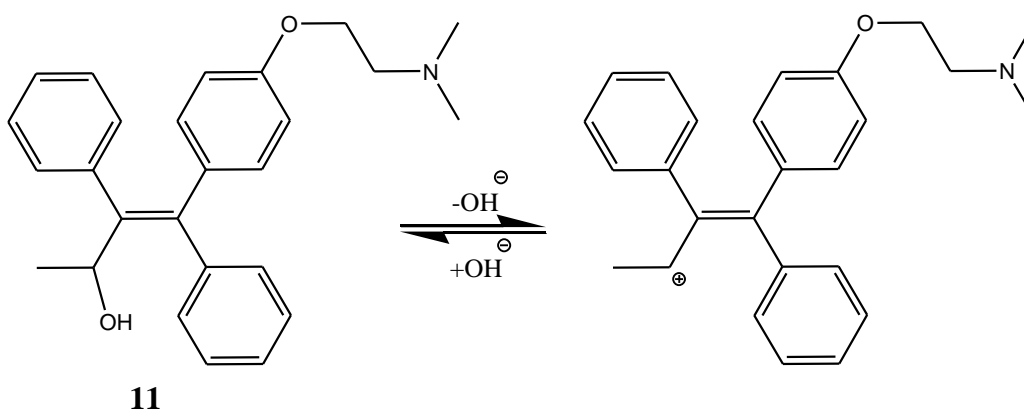
O tamoxifeno forma aducto com o DNA, após ser metabolicamente ativado por enzimas do citocromo P450, nomeadamente o CYP2E1 e o CYP3A1. Esta ativação metabólica torna o tamoxifeno num agente electrofílico com grande capacidade alquilante, devido a uma oxidação da posição α do grupo etil, pela remoção de um hidreto, levando assim à formação de um intermediário que possui um carbocatião alílico na posição onde se deu a oxidação. Este carbocatião apresenta uma reatividade elevada, reagindo com nucleófilos existentes no DNA, e estabelecendo ligações covalentes, permitindo assim a formação de diversos aducto (Mecanismo II-10). (Okubo, Nagai, & Ushiyama, 1998)

As ligações covalentes entre o tamoxifeno e o DNA estabelecem-se preferencialmente com o grupo amina exocíclico da base azotada guanina, ou seja, o azoto na posição 7, do nucleósido desoxiguanosina.



Mecanismo II-10 - Mecanismo de formação de aducto do tamoxifeno com o DNA.

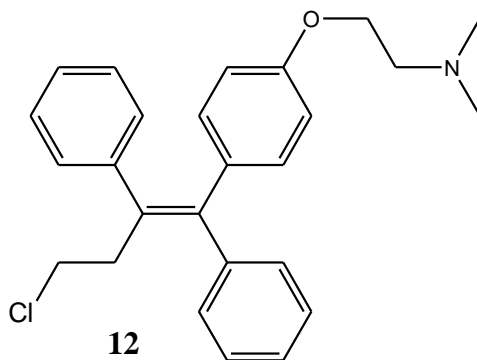
Sabe-se que o α -hidroxitamoxifeno **11**, um metabolito do tamoxifeno, também apresenta capacidade de estabelecer aducto com o DNA, pois, devido à sua estrutura apresenta a capacidade de se converter no intermediário da metabolização do tamoxifeno, que possui o carbocátion alílico (Mecanismo II-11). Assim, a α -hidroxilação do tamoxifeno também pode ser entendida como uma ativação metabólica. (Okubo, Nagai, & Ushiyama, 1998)



Mecanismo II-11 – Conversão do α -hidroxitamoxifeno.

Por outro lado, alguns análogos do tamoxifeno, como o toremifeno **12** (Estrutura II-3), apresentam uma toxicidade muito inferior à do tamoxifeno. Isto explica-se devido aos substituintes eletrotractores que destabilizam a formação do carbocátion. (Kuramochi,

1996) Este facto pode ser a chave no desenvolvimento de análogos do tamoxifeno, que apresentem uma menor toxicidade.

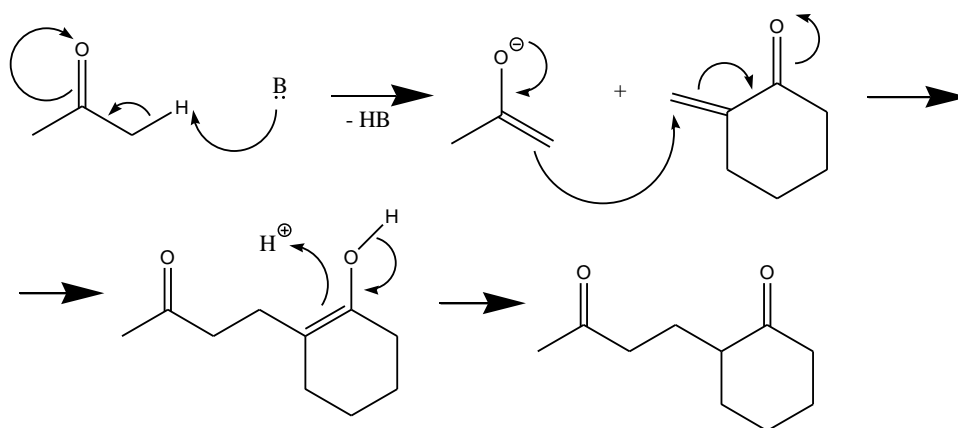


Estrutura II-3 - Estrutura molecular do toremifeno.

III. Adição tipo-Michael

Antes de definir uma adição tipo-Michael, é importante compreender o conceito inerente à reação de Michael.

Uma reação de Michael, assim chamada devido a Arthur Michael, químico orgânico norte-americano que a descobriu e estudou, consiste num ataque nucleofílico por parte de um ião enolato, um dador de Michael cuja formação se dá por catálise básica, a um aceitador de Michael, que pode ser um carbonilo α,β -insaturado, como uma cetona ou um aldeído, ou um nitrilo. (March & Smith, 2007) Na reação de Michael, o nucleófilo também pode ser um anião derivado de um dicarbonilo β ou um qualquer derivado de um destes compostos. A adição de Michael aparenta ser uma adição conjugada 1,2, devido à manutenção do grupo carbonilo no produto final, no entanto esta é uma adição conjugada 1,4, em que o grupo carbonilo se mantém devido à tautomerização do produto final, um enol, para a sua forma ceto (Mecanismo III-1). (Vollhardt & Schore, 2002)



Mecanismo III-1 – Adição de Michael.

Apesar de uma adição 1,2 ser cineticamente favorável, ocorrendo mais rapidamente devido à maior deficiência eletrónica do carbono do grupo carbonilo por estar diretamente ligado a um átomo de Oxigénio, o produto da adição 1,4 é predominante na reação de Michael. O efeito da deslocalização da densidade eletrónica também vai diminuir a eletrofilicidade do carbono do grupo carbonilo participando, de certo modo, na preferência com que se verifica uma adição 1,4, em detrimento de uma 1,2. (Cai & Bhatnagar, 2009)

O produto da adição conjugada 1,4 é termodinamicamente mais estável, devido à manutenção do grupo carbonilo, que é constituído por uma ligação dupla mais forte, sendo assim mais estável que os produtos formados na reação conjugada de adição 1,2, como são o caso dos hidratos e hemiacetais. Além disso, a adição 1,4 produz um anião enolato, que é estabilizado por ressonância. (Carey & Sundberg, 2007)

No entanto, é de referir que existem nucleófilos que reagem preferencialmente por uma adição conjugada 1,2 como é o caso da hidroxilaminas, semicarbazidas e hidrazinas. Apesar do produto apresentar uma energia fundamental mais alta do que numa adição 1,4, este tipo de reação leva à formação de uma imina cuja precipitação irá, eventualmente, levar ao estabelecimento de um equilíbrio de reação direcionado para a formação destes produtos. (Vollhardt & Schore, 2002)

Olhando para o mecanismo geral de uma reação de Michael, vemos que a reação ocorre devido à ação nucleofílica do carbono α do enolato que vai atacar o carbono β do composto carbonilo α,β - insaturado. O carácter eletrotrator do grupo carbonilo vai roubar densidade eletrónica, tornando assim o carbono β do carbonilo α,β - insaturado mais suscetível a um ataque nucleofílico, como se poder observar pela densidade eletrónica da molécula de 3-butenona, na Figura III-1.

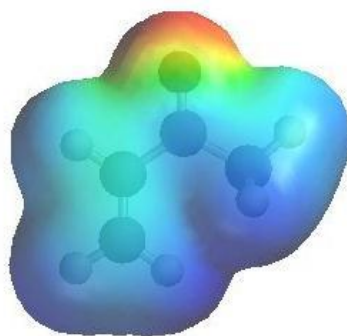
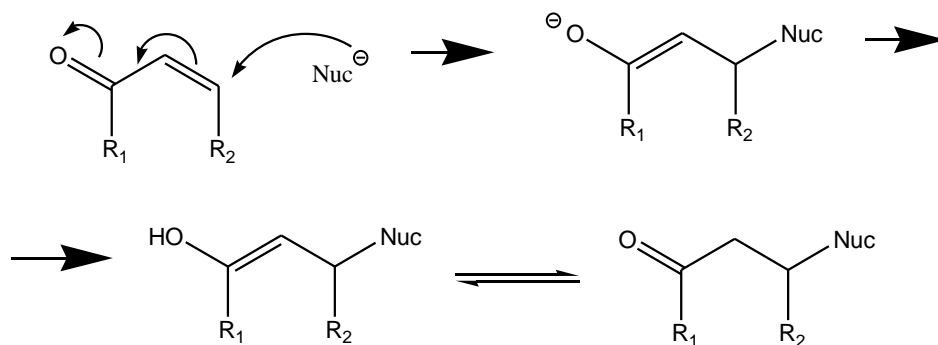


Figura III-1 - Densidade eletrónica da 3-butenona.

Em jeito de sumário, uma reação de adição de Michael resume-se a uma adição conjugada de um enolato, para formar um composto com dois grupos carbonilo.

Pode entender-se uma reação tipo-Michael como uma derivação da reação de adição de Michael, ocorrendo por um mecanismo em tudo semelhante a esta, excetuando o facto de a adição a um aceitador de Michael, um carbonilo α,β - insaturado, ocorrer através do estabelecimento de uma ligação covalente por parte de um outro nucleófilo que não um

enolato, ou outra molécula análoga, dispensando-se assim, a catálise básica Mecanismo III-2.



Mecanismo III-2 – Reação tipo-Michael.

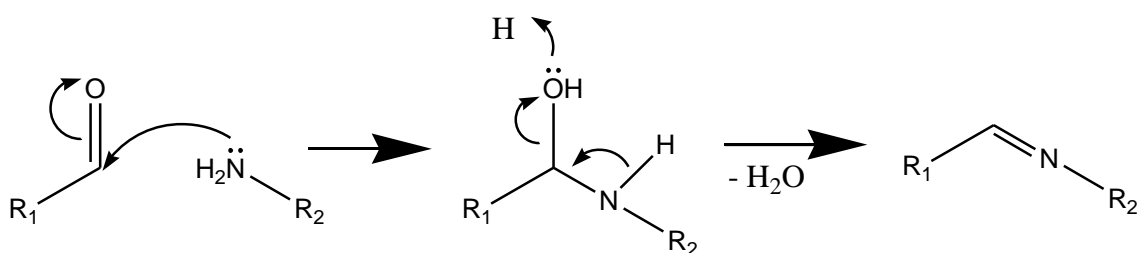
Em determinados casos em que o sistema π conjugado do aceitador de Michael apresente mais que duas ligações duplas conjugadas, a ligação pode dar-se na posição 1 e noutra posição do sistema conjugado, que não a posição 4, desde que esta mesma posição seja par.

Os grupos nucleofílicos mais importantes que atuam na reação tipo-Michael, a nível fisiológico, são os grupos amina e os grupos tiol. Este facto apresenta uma grande relevância pois muitos fármacos apresentam um aceitador de Michael no seu farmacóforo, existindo ainda outras moléculas que exercem a sua atividade no organismo, também por possuírem um carbonilo α,β - insaturado na sua estrutura molecular. Ao contrário do que acontece em laboratório onde este tipo de reações é facilmente reversível através de aquecimento, uma vez no organismo humano os aceitadores de Michael formam aducto estáveis com diversas moléculas endógenas. Assim estas reações em meio orgânico representam um foco de elevada importância tanto a nível farmacológico, podendo muitas delas apresentar uma atividade citotóxica, citostática, antibacteriana ou atuarem na modulação da resposta inflamatória, devido à capacidade de estabelecerem ligações com proteínas, enzimas ou com o material genético das células. (Gersch & Kreuzer, 2012)

Grande parte dos efeitos nocivos associados a compostos alílicos devem-se à sua ativação metabólica a um carbonilo α,β - insaturado. Composto alílicos com bons grupos abandonantes são hidrolisados a álcoois alílicos, que são posteriormente metabolizados pelo álcool desidrogenase a um carbonilo α,β - insaturado, que, como já se viu, poderá

atuar como um aceitador de Michael. (Toennes, Schmidt, & Fandiffo, 2002) (Eder, Dornbusch, & Fischer, 1987)

Devido a os compostos carbonilo α,β - insaturado manterem o grupo carbonilo após a adição tipo-Michael, ainda podem ser alvos de um outro ataque nucleofílico. Em meio orgânico, este ataque é normalmente feito por um grupo amina, estabelecendo-se uma base de Schiff (Mecanismo III-3) Este mecanismo ocorre no estabelecimento de *cross-links* entre este tipo de compostos e bases azotadas ou aminoácidos.



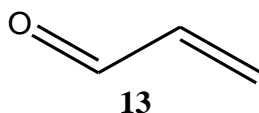
Mecanismo III-3 – Formação de uma base de Schiff.

Apesar de ser possível o estabelecimento da base de Schiff antes da adição tipo-Michael, esta reação normalmente ocorre numa muito menor extensão, já que de certo modo o carbono do grupo carbonilo se encontra reacionalmente desativado relativamente ao carbono β , pois a deslocalização de densidade eletrónica do sistema conjugado confere-lhe uma menor eletrofilicidade devido à eletronegatividade do grupo funcional do qual faz parte. Após a adição de tipo-Michael a ligação dupla entre os dois carbonos é perdida, mas o grupo carbonilo mantém-se intacto. Assim a perda de contributo eletrónico por parte da ponte dupla, aumenta a reatividade do grupo carbonilo, reagindo este com grupos amina existentes na vizinhança, formando-se assim a base de Schiff. (Cai & Bhatnagar, 2009)

As reações tipo-Michael também apresentam um papel importante no desenvolvimento de algumas patologias, nomeadamente na carcinogénese e aterosclerose, já que alguns aducto formados podem causar mutações, que levem ao descontrolo do ciclo celular, mas que não causem a apoptose celular.

III.1. Acroleína

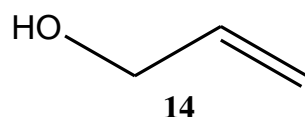
A acroleína **13**, ou propen-2-enal, é o aldeído α,β - insaturado de estrutura mais simples, constituindo a estrutura básica de todos os carbonilos α,β - insaturados (Estrutura III-1). Este composto é formado a nível endógeno, como um produto secundário da degradação lipídica por peroxidação e pela oxidação de outras moléculas como aminoácidos ou poliaminas. No entanto a acroleína constitui também um poluente ambiental, podendo ser produzida por fontes exógenas, nomeadamente em diversas combustões, como de madeira, combustíveis fósseis e outros compostos orgânicos. A acroleína é ainda encontrada em grande concentração no fumo do tabaco. Este composto constitui também uma importante molécula a nível da indústria química. (Thompson & Burcham, 2008)



Estrutura III-1 - Estrutura molecular da acroleína.

A acroleína é uma das molécula que apresenta o maior carácter electrofílico de toda a série de aldeídos α,β - insaturados, podendo reagir com diversos nucleófilos, por uma reação tipo-Michael ou ainda pelo estabelecimento de uma base de Schiff. As propriedades tóxicas deste composto devem-se assim à sua capacidade de reagir com várias moléculas endógenas, causando depleção de glutathione, formando aducto com proteínas, DNA, RNA e ainda *cross-links* inter- ou intra-moleculares. (Cai & Bhatnagar, 2009) Estas reações podem levar a mutações, locais abásicos no DNA e quebras de cadeia deste, perdas de função de proteínas, e, dependendo da extensão dos danos causados, morte celular, sendo que estes factos vão ao encontro dos efeitos provocados por uma exposição aguda à acroleína que compreendem uma desregulação de diversos mecanismos celulares envolvidos na apoptose, regulação do ciclo celular, transcrição e biossíntese de proteínas. (Thompson & Burcham, 2008) (Wang, Prorok, & Vaughan, 1993)

A toxicidade do 2-propen-1-ol **14** (Estrutura III-2), um álcool alílico utilizado como herbicida e intermediário em algumas sínteses industriais, deve-se à sua ativação metabólica a acroleína. (Eder, Dornbusch, & Fischer, 1987) (Toennes, Schmidt, & Fandiffo, 2002)

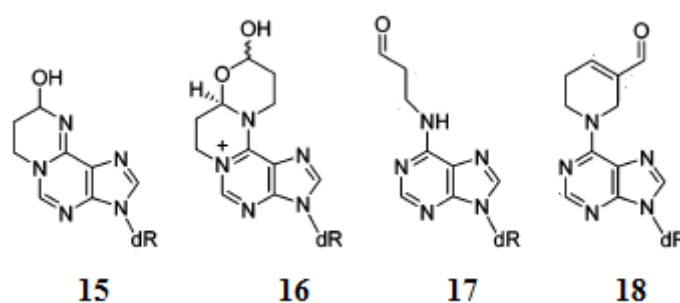


Estrutura III-2 – Estrutura molecular do 2-propen-1-ol.

Constituindo a estrutura reacional base de todos os restantes α,β -aldeído insaturados que constituem produtos secundários da peroxidação lipídica, os mecanismos de ação da acroleína, podem de certa forma ser extrapolados para os restantes produtos secundários da oxidação lipídica.

Em termos de interações com o material genético, a acroleína apresenta a capacidade de estabelecer aducto com todos os nucleósidos que fazem parte das cadeias de DNA ou RNA. Apesar de se conhecer a estrutura de alguns dos aducto formados, existe a noção que devido às características estruturais e reacionais da acroleína, ainda existem muitos outros tipos de aducto cuja estrutura ainda se encontra por elucidar. (Pawłowicz & Munter, 2006)

Em ratinhos expostos a acroleína foi encontrada uma acumulação de aducto de acroleína com desoxiadenosina, no núcleo os seus hepatócitos. Em reação *in vitro* entre a acroleína e o DNA de células do timo de vitelo verificou-se que uma mesma desoxiadenosina pode estabelecer aducto com mais que uma molécula de acroleína. Destas reações obtiveram-se quatro principais monoadductos de acroleína com desoxiadenosina (Estrutura III-3).

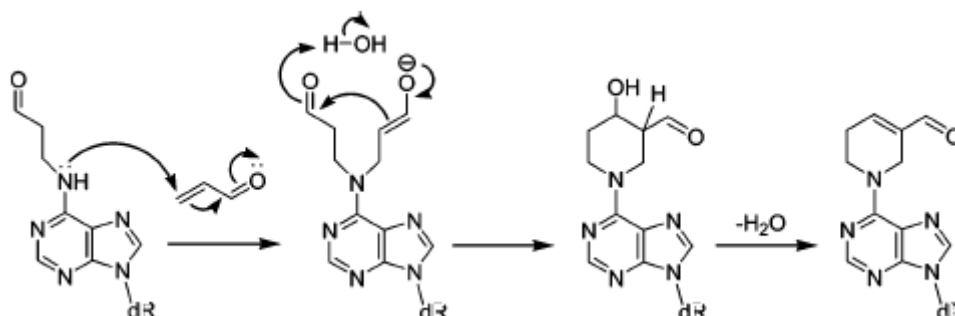


Estrutura III-3 – Aducto formados *in vitro* entre a acroleína e desoxiadenosina.

Os aducto exocíclicos **15** e **16** são os que se formam em maior quantidade. O aducto **15** é formado por uma reação tipo-Michael entre a acroleína e o azoto N6 do nucleótido. Após esta adição dá-se uma reação de substituição intramolecular que tem como produto o aducto **15**. Quanto ao aducto **16**, é formado por uma reação entre o aducto **15**

e uma outra molécula de acroleína por uma reação tipo-Michael e uma adição nucleofílica intramolecular.

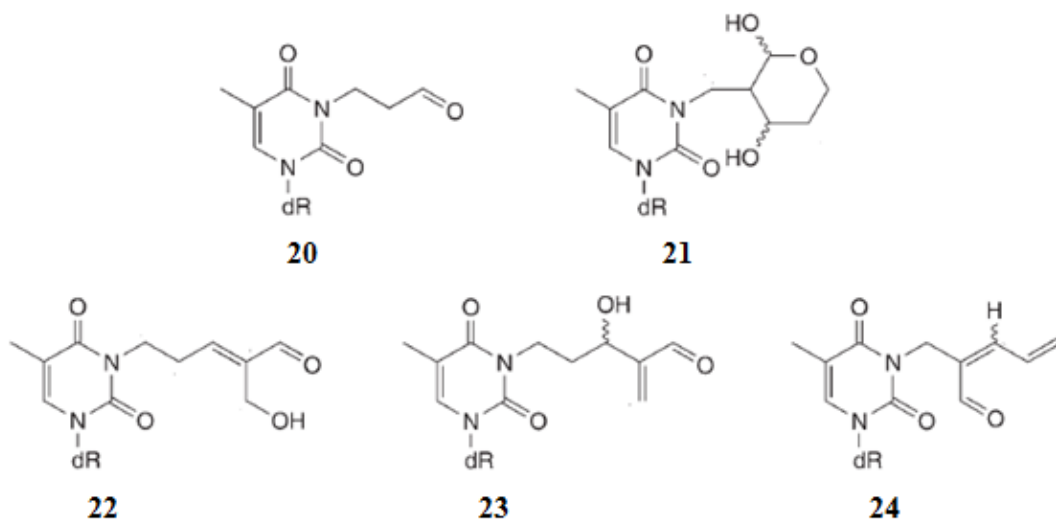
Em relação aos aducto formados em menor extensão, o aducto **17** forma-se por um rearranjo de Dimroth do aducto **15** e uma subsequente abertura do anel propano. Por sua vez, o aducto **18** é produto de uma reação de adição tipo-Michael do aducto **17** com outra molécula de acroleína e uma posterior ciclização (Mecanismo III-4).



Mecanismo III-4 – Mecanismo de formação do aducto **18** da Estrutura (Adaptado de Pawłowicz & Munter, 2006)

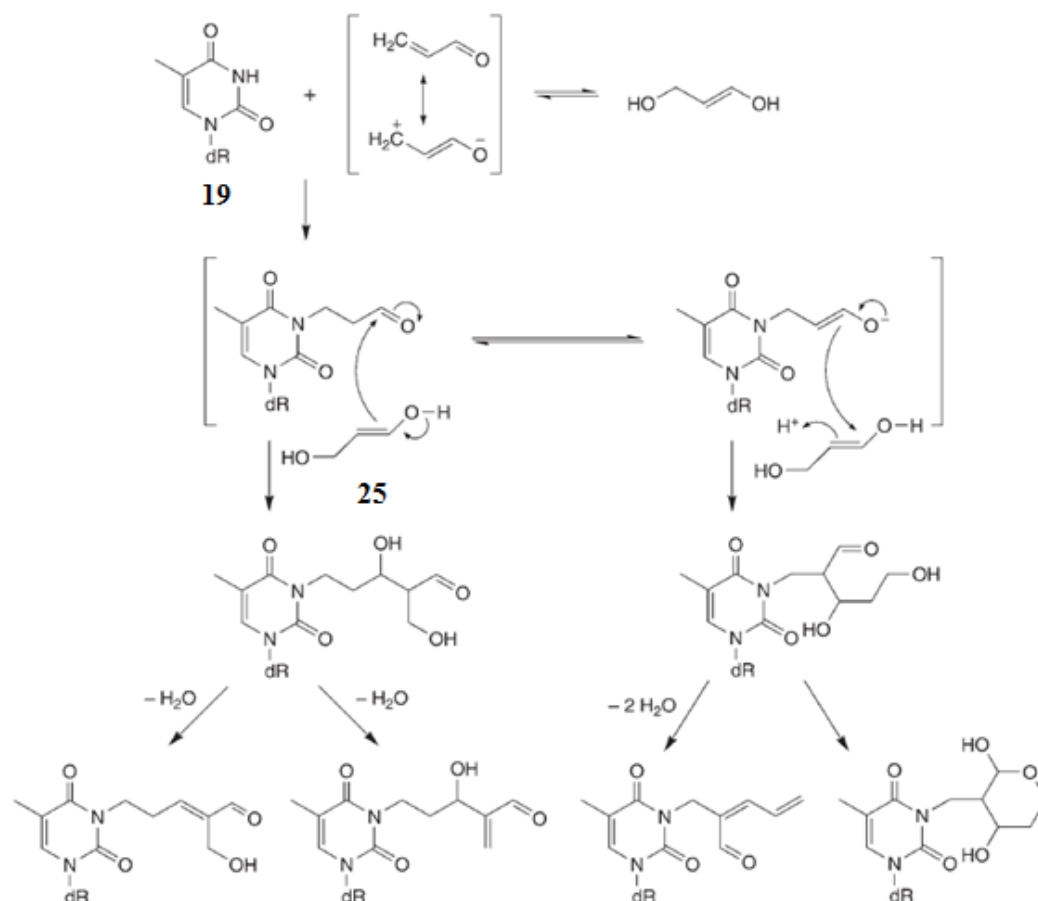
Seria de esperar que se apresentasse como pouco provável a reação de duas moléculas de acroleína com a mesma molécula de desoxiadenosina no DNA, no entanto uma desoxiguanosina após uma primeira reação tipo-Michael apresenta-se como mais reativa perante uma acroleína, reagindo três vezes mais rápido, do que uma desoxiadenosina não alquilada. Esta superior reatividade explica não só a formação de aducto com duas acroleínas mas também que o aducto mais abundante seja o aducto **16**. (Pawłowicz & Munter, 2006)

A acroleína também reage com a desoxitimidina **19**, formando-se aducto estáveis. Tal como no caso da desoxiadenosina, também aqui se formam aducto com mais que uma molécula de acroleína, o que permite uma panóplia imensa de aducto possíveis. Existem, no entanto, cinco aducto maioritários (Estrutura III-4). (Pawłowicz & Kronberg, 2008)



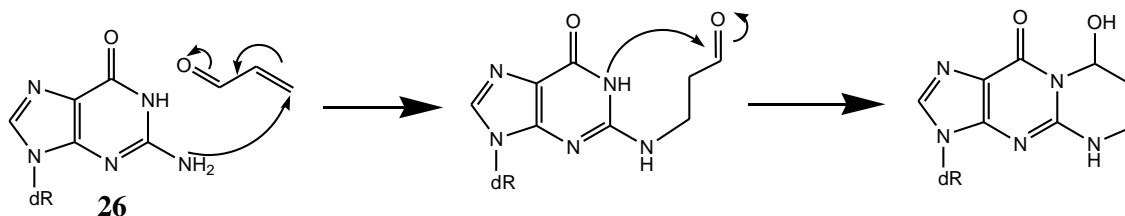
Estrutura III-4 – Estrutura dos aducto maioritários da reação da acroleína com a desoxitimidina.

A formação do aducto **19** dá-se através de uma reação tipo-Michael entre o azoto N3 da base azotada e a acroleína. Todos os restantes aducto têm o aducto **19** como precursor, sendo que este reage posteriormente com outra molécula de acroleína, na sua forma enol **25**, seguido de uma reação de desidratação, no caso dos aducto **21**, **22** e **23**, ou de uma reação de adição nucleofílica intramolecular no caso do aducto **20** (Mecanismo III-5). (Pawłowicz & Kronberg, 2008)



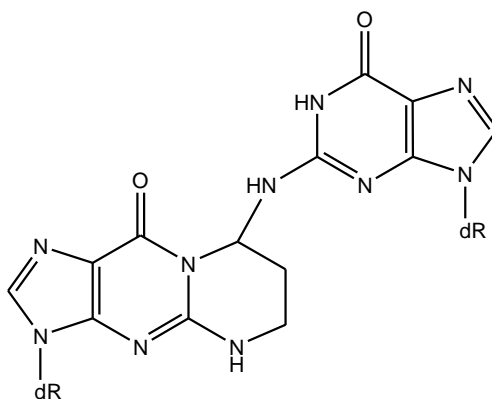
Mecanismo III-5 - Mecanismo de formação dos aducto maioritários entre a acroleína e a desoxitimidina (Adaptado de Pawłowicz & Kronberg, 2008)

Os aducto formados entre a acroleína e a desoxiguanosina **26** serão talvez os mais estudados, ocorrendo por uma adição nucleofílica tipo-Michael entre o azoto na posição N2 do nucleósido, e a acroleína, que funciona como aceitador de Michael. Após esta reação ocorre uma ciclização devido a um ataque nucleofílico intramolecular por parte do azoto N1 ao carbono electrófilico do grupo aldeído, resultante da adição tipo-Michael (Mecanismo III-6). (Kozekov, Turesky, & Alas, 2010)



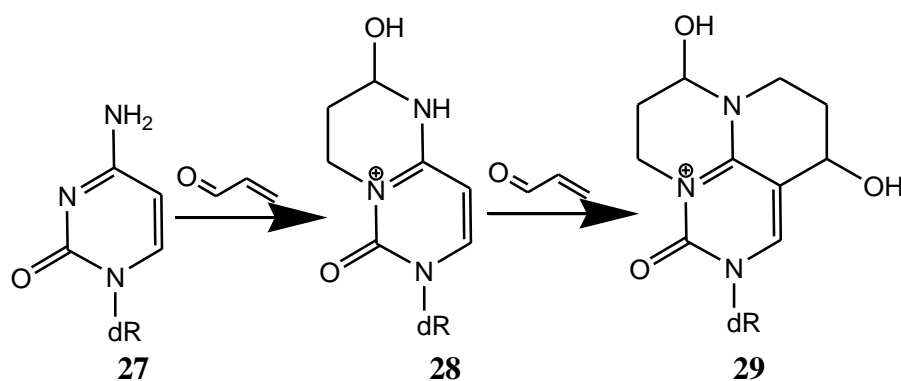
Mecanismo III-6 – Formação do aducto exocíclico entre a acroleína e a desoxiguanosina.

Esta reação entre a acroleína e a desoxiguanosina, à imagem do que acontece também com o 4-hidroxi-2-nonenal **32** (III.2.1.), é mutagênica, dando lugar a transversões G→T. Para além destas mutações pontuais a acroleína tem a capacidade de formar *cross-links* entre duas desoxiguanosinas, em sequências 5'-CpG-3'. A mitomicina C **9** (Estrutura II-2) também apresenta seletividade para esta sequência formando também aducto entre duas desoxiguanosinas, sabendo-se que a razão se prende com interações intermoleculares, e sendo a sua ação farmacológica dependente destes *cross-links*. Neste caso específico, a formação destes bis-adutos ocorre por um mecanismo diferente do que normalmente acontece com os α,β -aldeídos insaturado, já que devido à reação intramolecular que ocorre aquando da formação do aducto exocíclico, não há manutenção do grupo carbonilo, necessário à formação de uma base de Schiff. Assim a formação destes *cross-links* ocorre pelo encadeamento de, primeiro, a reação que tem como produto o aducto exocíclico entre uma desoxiguanosina e uma molécula de acroleína e um subsequente ataque nucleofílico simples ao carbono do aducto exocíclico ligado ao hidroxilo, por parte do azoto N2 de uma outra desoxiguanosina emparelhada com a desoxicitidina **27** ligada à extremidade 5' da desoxiguanosina onde se deu a primeira alquilação, estabelecendo-se assim uma ligação covalente (Estrutura III-5). (Kozekov, Turesky, & Alas, 2010)



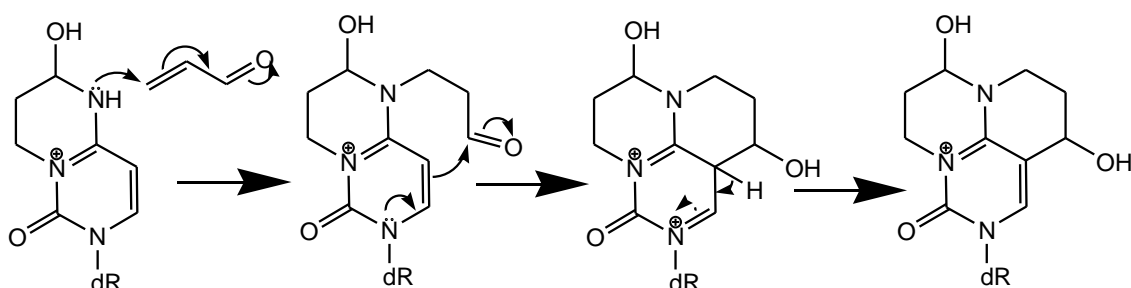
Estrutura III-5 – Cross-link formado entre a acroleína e duas desoxiguanosinas.

Por fim, na reação entre a acroleína e a desoxicitidina **27** também são formados dois tipos de aducto, um em que se forma um exociclo e outro em que se formam dois exociclos (Mecanismo III-7). (Pawłowicz & Klika, 2007)



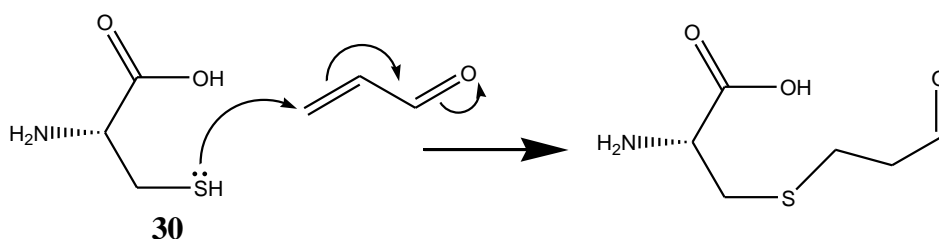
Mecanismo III-7 – Aducto formados entre a acroleína e a desoxicitidina.

O aducto que possui apenas um exociclo, aducto **28** forma-se por uma adição tipo-Michael ao azoto N3 da desoxicitidina, dando-se a ciclização posteriormente devido a um ataque nucleofílico por parte do azoto N4, do grupo amina exocíclico, ao grupo carbonilo. Por sua vez, a formação do aducto que contém dois exociclos, aducto **29**, dá-se por uma nova adição tipo-Michael ao aducto **28**, mais propriamente ao azoto N4. A segunda ciclização deste aducto dá-se então por um ataque nucleofílico por parte de uma ligação dupla do anel aromático, assistida pelo átomo de azoto endocíclico onde se encontra ligada a desoxirribose. A aromaticidade do anel é restabelecida por uma desprotonação (Mecanismo III-8). (Pawłowicz & Klika, 2007)



Mecanismo III-8 – Formação de aducto entre acroleína e desoxicitidina contendo dois exociclos.

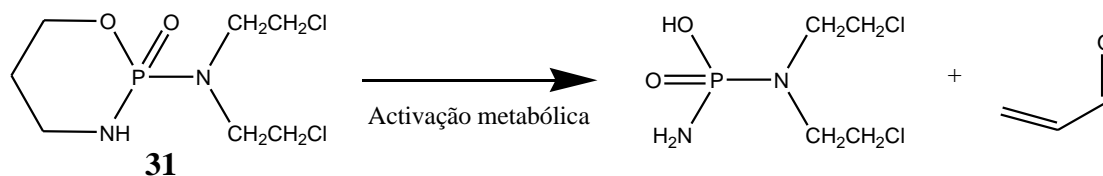
Para além da ação que exerce a nível do material genético, a acroleína também apresenta efeitos tóxicos por reagir com proteínas. Reagindo de uma forma similar ao que acontece com as bases azotadas do DNA, a acroleína estabelece aducto e *cross-links* com resíduos de lisina, histidina e cisteína **30** existentes em diversas proteínas. Esta alteração covalente das proteínas leva a uma diminuição ou mesmo perda de função por parte do péptido. Sendo o grupo tiol da cisteína, o grupo nucleofílico mais reativo existente em proteínas, torna-se o alvo preferencial da alquilação pela acroleína, no que à sua ação sobre proteínas diz respeito (Mecanismo III-9).



Mecanismo III-9 – Formação de aducto entre a acroleína e cisteína.

Apesar de haver uma perfeita percepção dos efeitos nocivos que a alquilação de proteínas por parte da acroleína pode ter a nível fisiopatológico, na prática ainda poucos fenómenos estão efetivamente relacionados com esta questão toxicológica. Foi verificado em ratos que uma administração endovenosa de acroleína causava danos a nível do tecido do miocárdio, provocando disfunção contráctil. Verificou-se que a acroleína danificou proteínas do citoesqueleto, para além de várias proteínas envolvidas no metabolismo energético. (Cai & Bhatnagar, 2009) (Thompson & Burcham, 2008)

A acroleína apresenta ainda outra particularidade. Esta é um produto da ativação metabólica da ciclofosfamida **31**. A ciclofosfamida é um antineoplásico usado contra uma grande variedade de tumores. Este fármaco no entanto só se torna ativo após metabolização, formando-se fosforamida, uma mostarda nitrogenada que funciona como agente alquilante bifuncional, e formando-se também acroleína neste processo (Mecanismo III-10). Tem vindo a ser proposto que a ação da acroleína sobre a dupla cadeia de DNA também pode desempenhar um papel na citotoxicidade da ciclofosfamida. (Lawley & Phillips, 1996) (Esterbauer, 1993) No entanto, a acroleína também parece envolvida na toxicidade da ciclofosfamida a nível da bexiga. (Pawłowicz & Munter, 2006)



Mecanismo III-10 – Ativação metabólica da ciclofosfamida a fosforamida e acroleína.

Dada a grande reatividade da acroleína perante proteínas e ácidos nucleicos, e todos os processos biológicos que pode desencadear, uma completa compreensão dos mecanismos de ação deste aldeído α,β -insaturado pode, não só constituir um avanço significativo na elucidação e combate de várias patologias e mecanismos de toxicidade

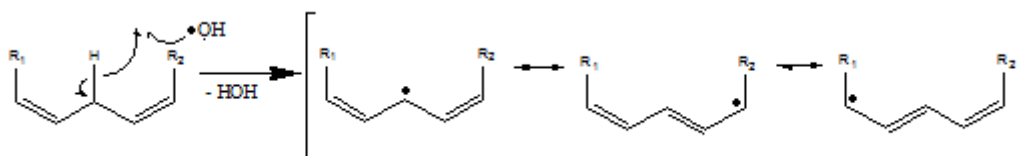
associados a este composto, mas também servir como modelo de *design* de novas moléculas com atividade farmacológica.

III.2. Derivados da peroxidação de ácidos gordos insaturados

A peroxidação lipídica é um processo de degradação de ácidos gordos insaturados que pode ocorrer por auto-oxidação de lípidos insaturados existentes em óleos e gorduras, conhecida como rancidez, ou pode ocorrer endogenamente a nível dos ácidos gordos insaturados existentes nos lípidos membranares, como os ésteres de colesterol e fosfolípidos, e noutros lípidos existentes no organismo, como os triglicéridos, quando as células estão sujeitas a stress oxidativo. (Esterbauer, 1993) (Zhu & Lee, 2006) (Uchida, 2003)

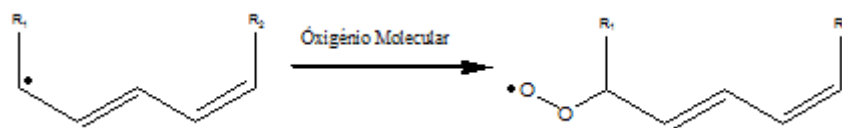
Esta reação de oxidação pode propagar-se por via de uma reação de propagação por radicais livres desencadeando a peroxidação de um grande número de moléculas lipídicas, através de um só radical iniciador. Esta cascata reacional em termos fisiológicos, adquire uma especial importância ao nível das membranas celulares já que pode afetar grande parte dos lípidos constituintes desta. (Shimozu & Shibata, 2009)

Esta reação de propagação evolui por três passos, tendo início num radical hidroxí, que tem a capacidade de abstrair hidrogénios em posição alílica, na estrutura lipídica. Por se encontrar numa posição alílica, este radical é estabilizado por ressonância. Este é o passo de iniciação do processo de peroxidação de ácidos gordos insaturados (Mecanismo III-11). (Vollhardt & Schore, 2002)



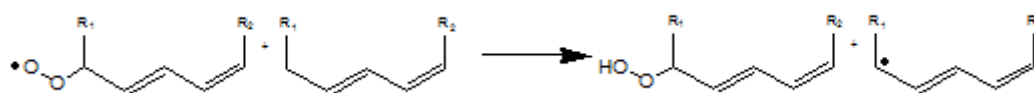
Mecanismo III-11 – Passo de iniciação da peroxidação lipídica.

No primeiro passo de propagação, o radical alílico formado no passo de iniciação reage com oxigénio molecular, dando origem a um radical peroxi (Mecanismo III-12). (Vollhardt & Schore, 2002)



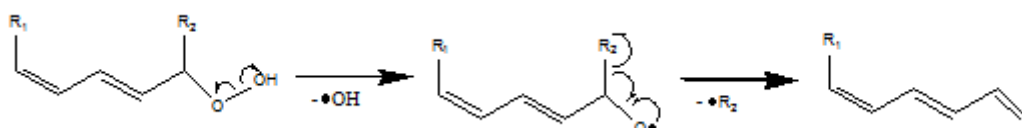
Mecanismo III-12 – Primeiro passo de propagação da peroxidação lipídica.

No segundo passo de propagação, que é também o terceiro e último passo da reação de peroxidação lipídica, o radical peroxi reage com um ácido gordo poli-insaturado, formando-se hidroperóxido lipídico e um novo radical alílico, que pode dar início a um novo primeiro passo de propagação da peroxidação lipídica (Mecanismo III-13). (Vollhardt & Schore, 2002)



Mecanismo III-13 – Segundo passo de propagação da peroxidação lipídica.

No entanto os hidroperóxidos não gozam de grande estabilidade devido ao grupo -OOH, podendo uma clivagem homolítica da ligação O-O desencadear uma reação radicalar intramolecular, que vai ter como resultado a formação de um α,β -aldeído insaturado (Mecanismo III-14) (Vollhardt & Schore, 2002) (Sigolo & Di Mascio, 2007)



Mecanismo III-14 – Formação de um α,β -aldeído insaturado a partir de um hidroperóxido lipídico.

Assim como os hidroperóxidos apresentam atividade citotóxica (IV.3.), estes seus produtos secundários também estabelecem diversas interações a nível celular, sendo biologicamente ativos. (Annangudi, Deng, & Gu, 2008) Devido á sua estrutura estes compostos atuam como eletrófilos bifuncionais, podendo estabelecer uma grande variedade de aducto inter ou intra-moleculares com diversas moléculas endógenas, como proteínas, RNA e o próprio DNA, seja por via de reações tipo-Michael, reação que se dá de forma preferencial, por formação de bases de Schiff, ou por ambas, como acontece no caso de formação de muitos dos *cross-links* entre dois aminoácidos e nalguns *cross-links* a nível do DNA. Estes bis-adutos constituem 1-5% dos aducto formados entre este tipo de compostos e o DNA. Devido a esta reatividade, estas

moléculas podem assim desencadear diversos processos carcinogénicos ou de citotoxicidade, dependendo das concentrações (Esterbauer, 1993). Estas moléculas estão implicadas na regulação de alguns genes pró-apoptóticos como o p53, um gene indispensável ao controlo do ciclo celular. A sua atividade citotóxica envolve a ativação de caspases, fragmentação e inibição da replicação de DNA. (Sigolo & Di Mascio, 2007) (Shimozu & Shibata, 2009)

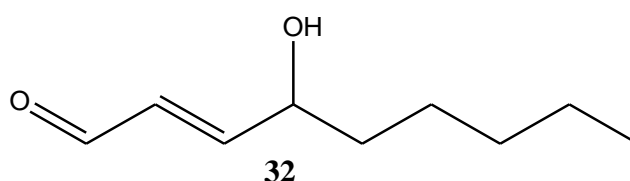
Ao contrário do que acontece com os radicais, estes aldeídos são suficientemente estáveis para difundir no interior das células, ou mesmo passar a membrana celular, podendo reagir com outras moléculas em locais do organismo longe de onde se deu a peroxidação lipídica. (Uchida, 2003)

Estes α,β – aldeídos estão associados ao desenvolvimento de diversos processos biológicos, relacionando-se com diversas outras patologias para além da carcinogénese, como a aterosclerose, doença de Alzheimer, artrite reumatoide, e no envelhecimento. (Shimozu & Shibata, 2009) (Sigolo & Di Mascio, 2007)

Em termos de metabolização endógena, o organismo possui as suas “armas” contra a ação deste tipo de moléculas já que estas podem ser metabolizadas por glutathione- S-transferases, via adição tipo Michael que previne assim as adições deste composto a outros nucleófilos orgânicos, e pela aldeído desidrogenase e álcool desidrogenase, que originam metabolitos inócuos. (Uchida, 2003)

III.2.1. 4-hidroxi-2-nonenal

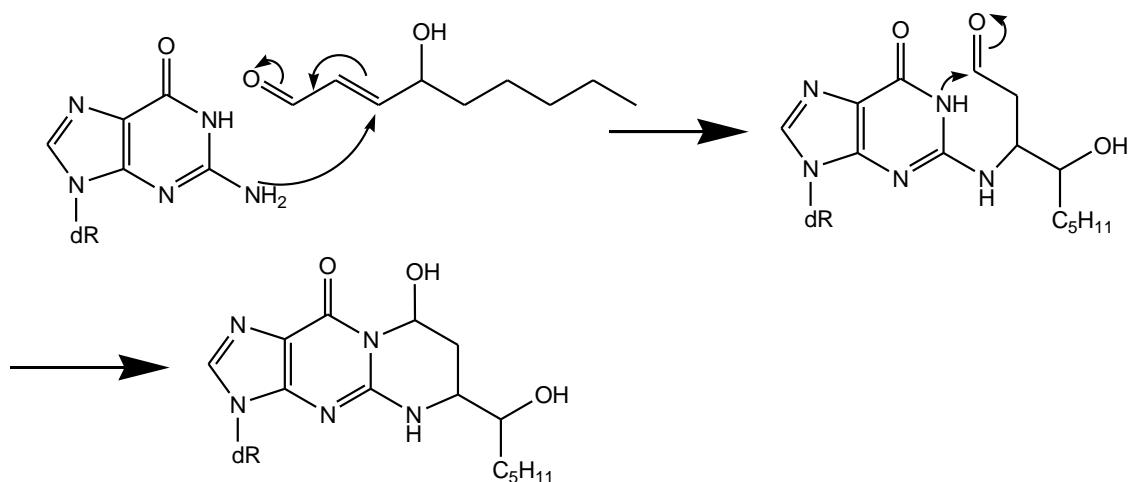
O 4-hidroxi-2-nonenal **32** (Estrutura III-6) é o α,β -aldeído insaturado proveniente da peroxidação lipídica mais estudado, acreditando-se ser o grande responsável pelos efeitos tóxicos e citopatológicos observados e causados pelo stress oxidativo a nível celular. Foi a partir dos estudos sobre este composto que se chegou a diversas conclusões sobre os efeitos nocivos desta classe de compostos. (Uchida, 2003)



Estrutura III-6 – Estrutura molecular do 4-hidroxi-2-nonenal.

Na categoria de α,β -aldeído insaturado, o 4-hidroxi-nonenal pode estabelecer aducto com os mais diversos nucleófilos endógenos por reações de adição conjugadas tipo-Michael, já que a sua estrutura lhe permite funcionar como um aceitador de Michael. Devido à sua natureza eletrofílica bifuncional, este composto pode estabelecer aducto exocíclicos com as bases azotadas do DNA e formar *cross-links* no DNA ou entre aminoácidos. (Pawłowicz & Munter, 2006) (Uchida, 2003) Devido ao grupo hidroxilo, o 4-hidroxi-2-nonenal apresenta um carbono β com um carácter ainda mais electrofílico que um α,β -aldeído normal, apresentando assim uma reatividade mais acentuada.

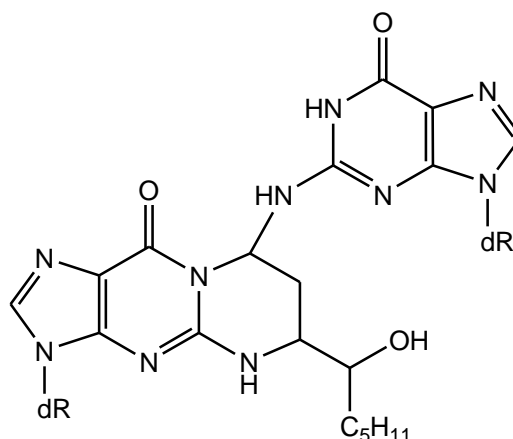
A reação de adição tipo-Michael entre o 4-hidroxi-2-nonenal e o DNA é responsável pelos efeitos genotóxicos deste composto. Apesar de outros compostos análogos deste, como o 4-oxo-2-enal **35** (III.2.2.) reagirem com grande parte dos nucleósidos existentes no DNA, o 4-hidroxi-nonenal, tal como a acroleína **13** (III.1.) reage preferencialmente com as desoxiguanosinas, formando um aducto exocíclico. O mecanismo de formação deste aducto desenrola-se primeiro por uma adição tipo-Michael do 4-hidroxi-2-nonenal ao átomo de azoto na posição N2 da desoxiguanosina. Após esta adição o aducto exocíclico estabelece-se por uma reação de substituição nucleofílica intramolecular ao grupo aldeído, tendo o azoto N1 como agente nucleofílico (Mecanismo III-15). (Pawłowicz & Munter, 2006)



Mecanismo III-15 – Formação de aducto entre o 4-hidroxi-2-nonenal e a desoxiguanosina.

Esta reação entre o 4-hidroxi-2-nonenal e a desoxiguanosina é mutagénica, dando lugar a transversões G→T. Para além destas mutações pontuais o 4-hidroxi-2-nonenal tem a capacidade de formar *cross-links* entre duas desoxiguanosinas, em sequências 5'-CpG-3', tudo à imagem do que acontece também com a acroleína. Refira-se que também o

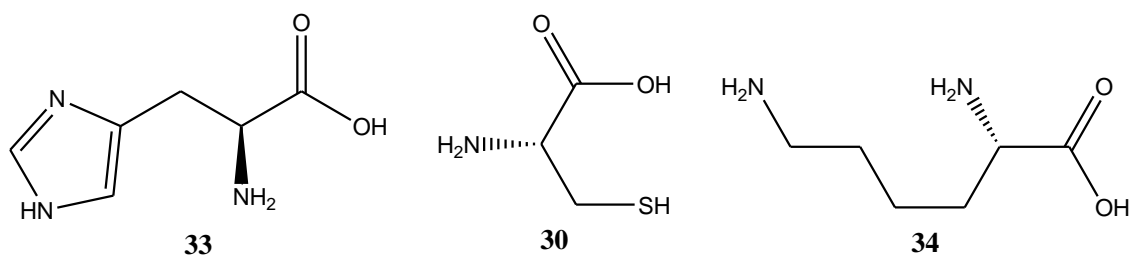
mecanismo de formação de aducto exocíclicos pelo 4-hidroxi-2-nonenal é análogo ao que ocorre com a acroleína, apresentando aducto bastante semelhantes, salvo as devidas diferenças estruturais entre os dois aldeídos α,β - insaturados (Estrutura III-7). Devido a estes bis-adutos formados pelo 4-hidroxi-2-nonenal, este composto vai interferir com diversos processos celulares que podem levar a mutações, ou mesmo a uma desregulação do ciclo celular, ou se se der numa escala relativamente maior, à morte celular. (Kozekov, Turesky, & Alas, 2010) (Esterbauer, 1993)



Estrutura III-7 – Cross-link formado pelo 4-hidroxi-2-nonenal e duas desoxiguanosinas.

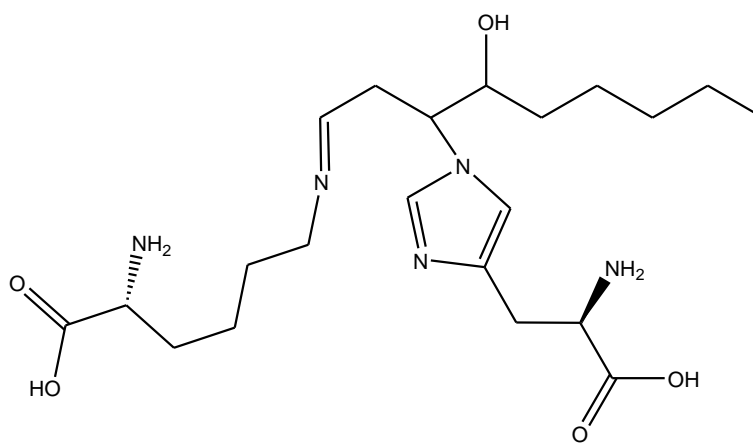
Apesar de poder reagir com DNA, e RNA, as proteínas são o alvo preferencial do 4-hidroxi-2-nonenal (Sigolo & Di Mascio, 2007). Este composto apresenta uma grande facilidade em reagir com aminoácidos, sendo a reação por adição tipo-Michael o mecanismo principal de formação de aducto. No entanto, este composto apresenta também a capacidade de alterar covalentemente aminoácidos através do estabelecimento de bases de Schiff. A formação destes aducto constitui a base de grande parte dos efeitos que este composto exerce a nível orgânico.

No entanto, em ambiente fisiológico o 4-hidroxi-2-nonenal apenas estabelece aducto de Michael com três tipos de aminoácidos, sendo eles a histidina **33**, a lisina **34** e a cisteína **30** (Estrutura III-8). (Uchida, 2003)



Estrutura III-8 – Histidina **33**, cisteína **30** e lisina **34**.

Em relação aos *cross-links* estabelecidos, estes também só se formam entre os três aminoácidos atrás referidos (Estrutura III-9).



Estrutura III-9 –Estrutura do cross-link formado entre o 4-hidroxi-2-nonenal, uma lisina e uma histidina.

Esta capacidade de alterar covalentemente proteínas relaciona o 4-hidroxi-2-nonenal com diversas patologias pois pode alterar a estrutura e funcionalidade da proteína, para além de, como seria de esperar, poder desencadear respostas imunológicas. (Aldini & Granata, 2007) (Shimozu & Shibata, 2009)

Uma das proteínas que pode ser covalentemente modificada pelo 4-hidroxi-2-nonenal é a insulina. Esta proteína constitui o principal regulador do metabolismo de hidratos de carbono, sendo que a diminuição da ação da insulina nos seus alvos de ação causa um aumento de resistência à ação desta. Este facto está na base do desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2. O 4-hidroxi-2-nonenal altera covalentemente resíduos de histidina na estrutura da insulina, por via de uma reação tipo-Michael. Esta alteração covalente da estrutura da insulina provoca uma diminuição do seu efeito hipoglicemiante e de estimulação de *uptake* de glucose pelas células musculares e adipócitos. (Pillon, Vella, & Soulere, 2011)

Este composto é também formado na pele pela exposição a radiação UV-B, estando relacionado com o desenvolvimento de melanoma da pele. O 4-hidroxi-2-nonenal reage com proteínas do estrato córneo induzindo citotoxicidade e dermatite atópica com perda de hidratação, diminuindo a capacidade da pele em estabelecer uma barreira eficiente. A reação deste aldeído com aminoácidos de proteínas nucleares das células da pele pode desencadear processos de carcinogênese. (Aldini & Granata, 2007)

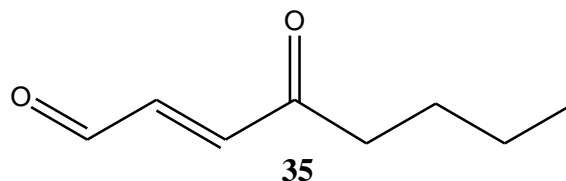
Outra patologia em que o 4-hidroxi-2-nonenal se encontra envolvido é a aterosclerose. As LDL, proteínas responsáveis pelas lesões existentes na aterosclerose, apresentam na sua composição uma proteína de grande massa molecular rica em lisina, a apoB-100. Esta proteína é importante para a ligação aos recetores de LDL no fígado. Sendo rica em lisina, esta proteína é alvo de alterações covalentes por reações tipo-Michael com o 4-hidroxi-2-nonenal, alterando a interação das lipoproteínas de baixa densidade com o seu recetor, o que leva ao aumento de LDL em circulação. Este problema associado à alteração covalente da apoB-100, pode ser entendido como mais grave ainda, se se tiver em conta que esta proteína é uma proteína hidrofóbica que estabelece interações com os lípidos existentes nas LDL, lípidos estes que também são alvos de processos de oxidação. (Uchida, 2003) (Annangudi, Deng, & Gu, 2008)

O 4-hidroxi-2-nonenal também se relaciona com a doença de Alzheimer. Apesar do mecanismo de desenvolvimento desta patologia ainda continuar muito pouco claro, sabe-se que os processos oxidativos têm um papel importante no desenvolvimento da doença. Em doentes que sofrem de Alzheimer existe um nível aumentado de aducto de Michael de 4-hidroxi-2-nonenal com histidina, no hipocampo. Para além disso também se verificou a existência de aducto de Michael de 4-hidroxi-2-nonenal com histidinas existentes nas cadeias laterais da amiloide- β , o que provoca uma maior agregação deste péptido. Tendo em conta que é este péptido que forma as placas senis características da doença de Alzheimer e é, também, responsável por desencadear processos oxidativos, o 4-hidroxi-2-nonenal perfila-se como uma peça-chave na compreensão deste tipo de demência. (Uchida, 2003) (Butterfield & Lange, 2010)

III.2.2. 4-oxo-2-enal

O 4-oxo-2-enal **35** é um análogo oxidado do 4-hidroxi-nonenal (III.2.1.) na posição 4 (Estrutura III-10). No entanto, apesar das semelhanças estruturais e de ter o mesmo

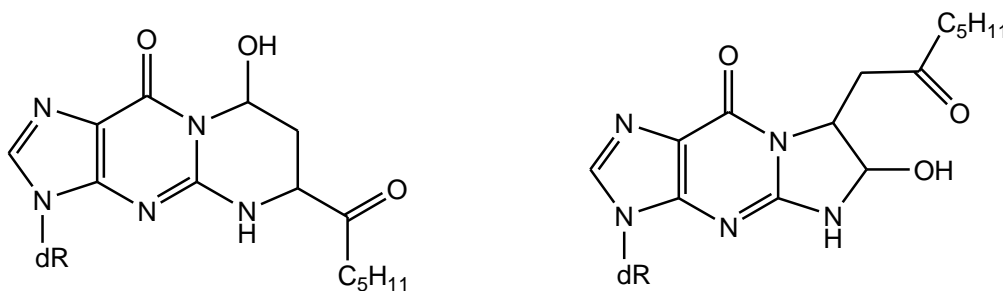
percursor proveniente da peroxidação lipídica, o 4-oxo-2-enal é formado de forma independente do 4-hidroxi-nonenal. (Zhu & Lee, 2006) (Zhu & Sayre, 2007)



Estrutura III-10 – Estrutura molecular do 4-oxo-2-enal.

Esta molécula funciona como um aceitador de Michael, tal como o 4-hidroxi-nonenal, reagindo em ambiente intercelular da mesma forma e com os mesmo nucleófilos que este último. Estabelece assim aducto cíclicos com as bases azotadas do material genético, monoaductos e *cross-links* com determinados aminoácidos como a lisina, histidina e cisteína. No entanto, o 4-oxo-2-enal possui um carbono em posição β , em relação a cada um dos grupos carbonilo, apresentando assim dois centros eletrofílicos que podem ser alvo de um ataque nucleofílico, numa reação tipo-Michael. Esta particularidade estrutural apresenta-se como mais relevante na reação entre o 4-oxo-2-enal e aminoácidos. (Shimozu & Shibata, 2009) (Zhu & Sayre, 2007)

Apesar de todas as semelhanças entre o 4-oxo-2-enal e o 4-hidroxi-nonenal, estes apresentam algumas diferenças a nível reacional, sendo que o 4-oxo-2-enal apresenta uma maior seletividade para reagir com nucleósidos, tanto do DNA como do RNA, que o 4-hidroxi-nonenal. Esta característica torna a ação do 4-oxo-2-enal mais importante a nível da mutagenese, e ao nível da manutenção de uma normal função do mRNA. Devido à pequena diferença estrutural, a estrutura dos aducto formados pelo 4-oxo-2-enal com as bases azotadas do material genético, também apresenta diferenças em relação aos formados pelo 4-hidroxi-nonenal (Estrutura III-11).



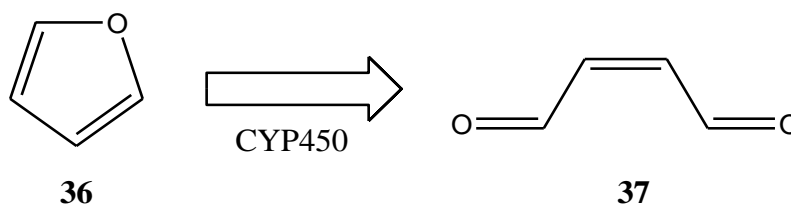
Estrutura III-11 – Estrutura dos aducto exocíclicos formados pelo 4-oxo-2-enal e a desoxiguanosina.

No geral, o 4-oxo-2-enal reage com nucleófilos numa proporção superior aos restantes aldeídos provenientes da peroxidação lipídica. Esta maior reatividade por parte do 4-oxo-2-enal, foi apresentada como a explicação para a sua maior neurotoxicidade, em relação ao 4-hidroxi-2-nonenal. (Sigolo & Di Mascio, 2007) (Shimozu & Shibata, 2009)

III.3. *cis*-2-butene-1,4-dial

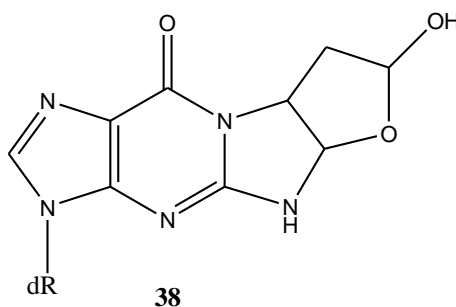
O furano **36** é um importante composto utilizado a nível industrial, tanto como solvente, como intermediário em diversas sínteses. Este composto é, relativamente, abundante no ambiente, sendo proveniente de diversos tipos de combustões. O furano pode ser também encontrado em alguns alimentos. Após diversos estudos ficou provado que o furano é responsável pelo surgimento de carcinomas hepatocelulares, assim como outros danos hepáticos, em roedores, tendo sido, assim, considerado como potencial carcinogénico para os humanos, pela Internacional Agency for Cancer Research e pelo National Toxicology Program. O mecanismo preciso pelo qual o furano exerce a sua toxicidade ainda não está completamente esclarecido sabendo-se, no entanto, que este está dependente de vários fatores. Por um lado o furano interfere na proliferação celular no fígado, aumentando-a, e por outro, sabe-se que a toxicidade está dependente da bioativação do furano pelo citocromo P450, mais propriamente pelo CYP2E1. Este facto é sustentado pelo facto de a hepatotoxicidade associada ao furano aumentar quando os hepatócitos são pré-tratados com acetona, um indutor do citocromo P450, e diminuir quando são utilizados inibidores do P450, como é o caso do imidazol, um alcaloide. (Lu, Sullivan, & Phillips, 2009) (Byrns, Vu, & Neidigh, 2006)

Existem evidências experimentais que indicam o *cis*-2-butene-1,4-dial **37**, um α,β -aldeído insaturado proveniente da oxidação do furano pelo citocromo P450, como o responsável pela toxicidade associada ao furano (Mecanismo III-16).



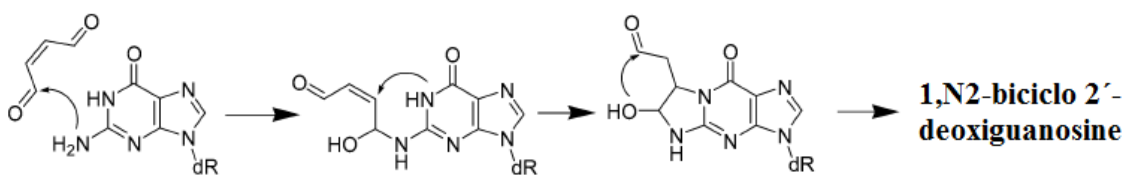
Mecanismo III-16 - Oxidação do furano a *cis*-2-Butene-1,4-dial.

Esta molécula possui uma estrutura que permite uma reação de adição nucleofílica de Michael, tendo a possibilidade de reagir com diversas moléculas, com grupos funcionais de carácter nucleofílico. A reação do *cis*-2-butene-1,4-dial com ácidos nucleicos assume uma grande importância na toxicidade associada ao composto. Este, ao reagir com as bases azotadas do material genético, forma aducto, que podem ser cíclicos ou não, e *cross-links*. Estes produtos, por sua vez, podem levar a ruturas de cadeia e erros de replicação no DNA das células, pois prejudicam a ação da DNA polimerase, podendo levar a uma evolução carcinogénica das células. De um ponto de vista mais minucioso, temos que o *cis*-2-butene-1,4-dial reage com os resíduos de Timina, Citosina e Guanina, dos nucleósidos. Apesar de reagir com três tipos das quatro bases azotadas presentes no DNA, os aducto do *cis*-2-butene-1,4-dial, formam-se maioritariamente com a base azotada Guanina do nucleósido desoxiguanosina. (Vu & Peterson, 2005) O aducto mais estável, formado por esta reação, é o 1,N2-biciclo 2'-deoxiguanosina **38** (Estrutura III-12)



Estrutura III-12 – 1,N2-biciclo 2'-deoxiguanosina.

O mecanismo de formação preferencial do aducto é apresentado no Mecanismo, em que a ligação do *cis*-2-butene-1,4-dial se dá com o átomo de azoto N2, da base azotada, reagindo por um mecanismo semelhante ao pelo qual reage a acroleína (Mecanismo III-17).



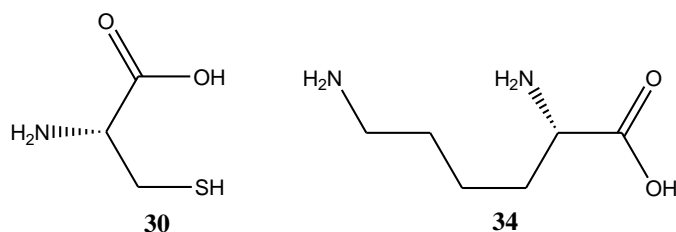
Mecanismo III-17 – Mecanismo de formação do 1,N2-biciclo 2'-deoxiguanosine (Adaptado de Vu & Peterson, 2005)

Para além de reagir com o DNA, este composto também reage com proteínas ou péptidos, assim como com aminoácidos livres, devido a grupos amina ou grupos tiol existentes nos aminoácidos, que por sua vez constituem as subunidades proteicas. No caso da reação com péptidos e proteínas, a mais importante, é a reação com a glutathione, já que esta constitui um péptido bastante abundante no fígado, atuando na destoxificação de alguns xenobióticos. A reação da molécula de *cis*-2-butene-1,4-dial com este péptido dá-se mais rapidamente do que com um qualquer aminoácido. A glutathione apresenta uma relativa versatilidade no que à ligação ao *cis*-2-butene-1,4-dial diz respeito, já que pode estabelecer uma ligação apenas, através do seu grupo tiol, ou pode estabelecer duas ligações, sendo que a segunda ligação covalente se dá por via de uma reação intramolecular através do grupo amina de um glutamato existente na molécula de glutathione, que ataca um grupo aldeído do resíduo de *cis*-2-butene-1,4-dial. Esta reação é tida como um mecanismo de neutralização da atividade do metabolito ativo, mas no entanto esta adição intramolecular não ocorre a uma velocidade suficientemente elevada, que permita o impedimento de qualquer outra alquilação por parte de outros nucleófilos celulares. (Lu, Sullivan, & Phillips, 2009)

Tendo em conta o exemplo da glutathione, será, de prever que uma reação de alquilação precedida por outra alquilação intramolecular, possa acontecer com outros péptidos ou proteínas, desde que estes tenham aminoácidos na sua estrutura que assim o permitam. No entanto, quando a glutathione estabelece apenas uma ligação com o *cis*-2-butene-1,4-dial, existe a possibilidade de outra proteína, um aminoácido livre ou mesmo outra molécula de glutathione, se vir a ligar também à molécula de *cis*-2-butene-1,4-dial, formando-se um *cross-link*, sendo que no ultimo caso a ligação pode ser estabelecida tanto pelo grupo tiol como pelo grupo amina do glutamato, da glutathione. No entanto, é de referir que ainda não foram observados estes *cross-links* de duas moléculas de glutathione, como metabolitos hepáticos, o que pode ser explicado pela elevada competição, por parte de outras moléculas, com a glutathione, em condições intracelulares.

Nos casos de reação de adição de Michael, entre a molécula de *cis*-2-butene-1,4-dial e aminoácidos livres, as mais usuais são as adições do *cis*-2-butene-1,4-dial a aminoácidos de lisina **34** ou cisteína **30** (Estrutura III-13). No caso da lisina o ataque nucleofílico é feito por um grupo amina, enquanto na cisteína é feita por um grupo tiol. No caso destas reações com aminoácidos, também se pode encontrar uma variedade de

cross-links, podendo estes estabelecerem-se entre aminoácidos iguais, diferentes ou entre aminoácidos e proteínas, como já tinha sido referido. Estas reações atrás apresentadas, vão de encontro ao facto de serem, usualmente, encontrados estes aducto na urina de ratos tratados com furano. (Lu, Sullivan, & Phillips, 2009)



Estrutura III-13 – Cisteína **30** e Lisina **34**.

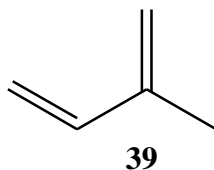
Os aducto provenientes destas reações entre aminoácidos, e proteínas, com o *cis*-2-butene-1,4-dial, podem levar a reações imunológicas por parte do sistema imunitário, que reconhece os aducto como corpos estranhos ao organismo, desencadeando assim uma resposta imunológica.

III.4. Terpenóides

Os terpenóides são a maior e mais estudada classe de metabolitos secundários existente em plantas e invertebrados inferiores, sendo moléculas influentes nos mecanismos de defesa e sinalização por parte destes organismos. De facto não há grupo que ilustre melhor a potencialidade biossintética dos organismos vivos do que este grupo, dada a sua variedade e múltiplas funcionalidades. (de las Heras & Rodriguez, 2003) (Cheng, Lou, & Mao, 2007)

Os terpenóides são formados a partir da reação entre várias moléculas de um precursor comum, o isopreno **39** (Estrutura III-14). Este composto conjugado possui cinco carbonos e assim os terpenóides apresentam sempre uma estrutura base constituída por um número de carbonos múltiplo de cinco. O isopreno é também abordado tendo em conta as suas potencialidades carcinogénicas em II.2. Os compostos do grupo dos terpenóides são então caracterizados tendo em conta o número de unidades de isopreno que deram origem ao seu esqueleto. Assim os terpenóides são classificados por hemi, mono, sesqui, di, sester, tri e tetraterpenóides, consoante, são constituídos por um, dois,

três, quatro, cinco, seis, sete ou oito resíduos de isopreno, respetivamente. (de las Heras & Rodriguez, 2003) (Cheng, Lou, & Mao, 2007)



Estrutura III-14 – Estrutura molecular do isopreno.

A junção da polimerização do isopreno com as ciclizações e rearranjos de que os esqueletos dos compostos são alvo, são a causa para a tamanha variedade estrutural que se verifica no seio do grupo dos terpenóides. (de las Heras & Rodriguez, 2003)

Em termos farmacológicos, os terpenóides apresentam também uma grande amplitude de efeitos possuindo desde propriedades anti-inflamatórias a propriedades anticancerígenas, passando pelas suas potencialidades a nível do combate a diversos microorganismos. Esta ação farmacológica tem sido utilizada desde há bastantes séculos para cá, já que muitos dos preparados farmacêuticos de plantas utilizados em diversas patologias, devem as suas propriedades farmacológicas ao seu conteúdo em determinados terpenóides. O uso destas fórmulas farmacêuticas ao longo dos tempos e sem grandes efeitos secundários, indica uma baixa toxicidade destas moléculas a nível do organismo humano. (de las Heras & Rodriguez, 2003) (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010)

Apesar de tudo, ainda existem bastantes indefinições em volta destes compostos já que o seu estudo só explodiu verdadeiramente nos anos 90, sendo assim relativamente recente. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010)

As capacidades terapêuticas destes compostos associadas à sua baixa toxicidade para o organismo humano, tornam-nos num dos grupos atualmente mais estudados tendo em vista a sua grande potencialidade farmacológica, como demonstra o elevado número de terpenóides em avançados estudos clínicos.

III.4.1. Lactonas diterpénicas

Os diterpenos constituem uma família numerosa dentro do grupo dos terpenóides, sendo que a maior parte dos diterpenos conhecidos têm vindo a ser isolados das plantas da

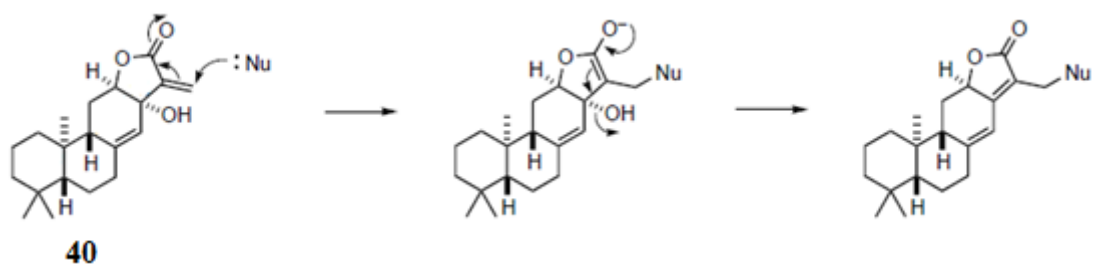
família *Asteraceae* ou da família *Lamiaceae*. As lactonas diterpénicas são os diterpenóides mais relevantes a nível de farmacologia.

Com um esqueleto de vinte carbonos formado a partir de quatro unidades de isopreno, as lactonas diterpénicas apresentam uma variedade de ações biológicas como ação anti-inflamatória, anti-fúngica, anti-bacteriana e anti-cancerígena, apresentando ainda ação contra a leishmaniose. Isto deve-se ao seu grupo carbonilo insaturado que permite a estas moléculas funcionar como um agente alquilante, por um mecanismo tipo-Michael. (de las Heras & Rodriguez, 2003)

III.4.1.1. Jolkinolido D

O jolkinolido D **40** é um diterpenóide isolado da planta *Euphorbia jolkini*. Este composto induz a apoptose de células tumorais e inibe a invasão da membrana basal por células cancerígenas. (Sakakura, Takayanagi, & Kigoshi, 2002)

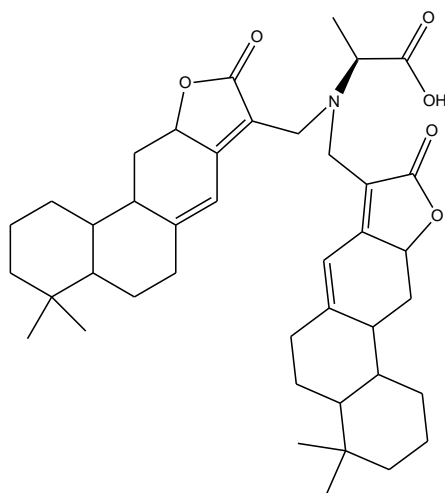
O mecanismo de Ação do jolkinolido D baseia-se na alquilação de nucleófilos endógenos, como os restantes citotóxicos terpenóides apresentados. No entanto, apesar de atuar também como um aceitador de Michael, o seu mecanismo de alquilação ocorre por um mecanismo ligeiramente diferente, mas mais eficiente, do que o que ocorre com os restantes terpenóides que possuem uma α -metileno- γ -lactona, uma 2-ciclopentenona ou um butenolido como farmacóforo. No caso do jolkinolido D, o seu farmacóforo é uma β -hidroxi- α -metileno lactona γ,δ -insaturada. Devido a esta estrutura insaturada eletrofílica que funciona como um aceitador de Michael, o mecanismo de alquilação dá-se por uma reação tipo-Michael onde, aquando da tautomerização, o grupo hidroxilo atua como grupo abandonante, havendo uma migração da insaturação do enolato em vez de uma protonação desta. Forma-se assim um sistema conjugado de duas ligações duplas, que confere uma grande estabilidade ao aducto (Mecanismo III-18).



Mecanismo III-18 – Mecanismo de alquilação do jolkinolido D (Adaptado de Sakakura, Takayanagi, & Kigoshi, 2002)

A nível dos ácidos nucleicos e em ambiente fisiológico, o jolkinolido D só estabelece ligações covalentes com o nucleósido desoxiguanosina. A alquilação dá-se no azoto N1 da base azotada do nucleósido.

No entanto as moléculas endógenas com que o jolkinolido D reage preferencialmente, tal como os restantes terpenos com atividade citotóxica, são os resíduos de cisteína das proteínas. Esta alquilação dá-se de forma bastante rápida, sendo estes adutos os mais comuns. Apesar disto, o jolkinolido D apresenta uma particularidade que o diferencia em relação aos outros terpenos com atividade análoga. Devido à sua maior reatividade, dada a estrutura do seu farmacóforo, este apresenta uma maior apetência para reagir com grupos amina de aminoácidos, reagindo com estes com relativa facilidade em relação ao que acontece com outros terpenos que atuam como aceitadores de Michael. Esta particularidade permite-lhe ser dos poucos alquilantes por mecanismo tipo-Michael com capacidade de reagir com a alanina, podendo o grupo amina da alanina ser alquilado até duas vezes (Estrutura III-15). (Sakakura, Takayanagi, & Kigoshi, 2002)



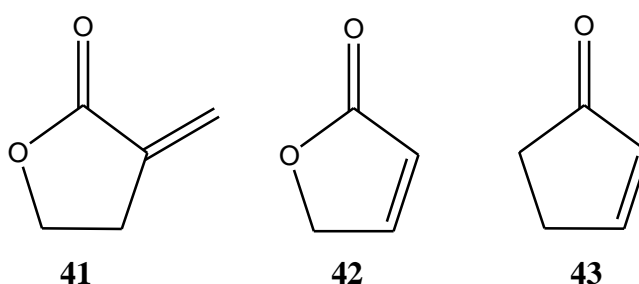
Estrutura III-15 – Estrutura do aducto duplo formado por duas moléculas de jolkinolido D e uma alanina.

III.4.2. Lactonas Sesquiterpénicas

Os sesquiterpenos são os membros do grupo dos terpenos cujo esqueleto estrutural é composto pela reação entre três unidades de isopreno, tendo assim quinze átomos de carbono. Constituindo a maior, e mais estudada fatia entre o grupo dos terpenóides, são característicos da família *Asteraceae*, podendo no entanto ocorrer de forma esporádica noutras famílias. Os sesquiterpenos, a par dos monoterpénos, constituem os principais compostos voláteis libertados pelas plantas após sofrerem algum tipo de dano. (Vasas & Hohmann, 2011)

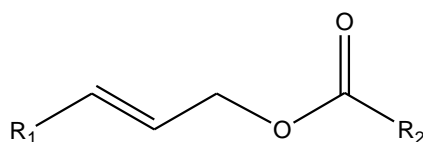
Um número considerável de sesquiterpenos encontra-se sob a sua forma lactonizada, apresentando-se como os princípios ativos de muitas plantas medicinais, conferindo propriedades anti-infecciosas e anti-inflamatórias. Hoje sabe-se que algumas destas lactonas sesquiterpénicas apresentam também atividade anticancerígena.

Vários estudos apontam para que atividade farmacológica destes compostos se deva maioritariamente à capacidade destas moléculas funcionarem como um agente alquilante, por um mecanismo tipo-Michael. As lactonas sesquiterpénicas podem possuir três farmacóforos diferentes, sendo eles uma α -metileno- γ -lactona **41**, um butenolido **42** ou uma ciclopentenona **43**, que funcionam como aceitador de Michael (Estrutura III-16). (Janecki, Błaszczuk, & Studzian, 2005) (Scotti, Fernandes, & Ferreira, 2007)



Estrutura III-16 – Estruturas moleculares de α -metileno- γ -lactona **41**, butenolido **42**, ciclopentenona **43**.

Algumas lactonas sesquiterpénicas apresentam ainda outro centro alquilante constituído por um grupo éster conjugado, ou alílico, que reage por uma reação de substituição nucleofílica assistida pela ligação dupla (Estrutura III-17).



Estrutura III-17 – Éster conjugado, ou alílico.

A atividade farmacológica das lactonas sesquiterpénicas é tanto maior quando maior o número de centros reativos com capacidade alquilante, a estrutura da molécula tiver. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010) No entanto existem vários estudos visando a estrutura e conformação destas moléculas já que se pensa que estas possam também desempenhar um papel importante na reatividade destas moléculas, já que influenciam a acessibilidade ao centro electrofílico, o farmacóforo da molécula. (de las Heras & Rodriguez, 2003)

Os grupos tiol, como os da cisteína, são os alvos primários da Ação deste grupo de terpenóides. Ao alquilarem estes resíduos, as lactonas sesquiterpénicas bloqueiam uma série de mecanismos celulares, levando a célula a entrar em apoptose. (de las Heras & Rodriguez, 2003) (Janecki, Błaszczuk, & Studzian, 2005)

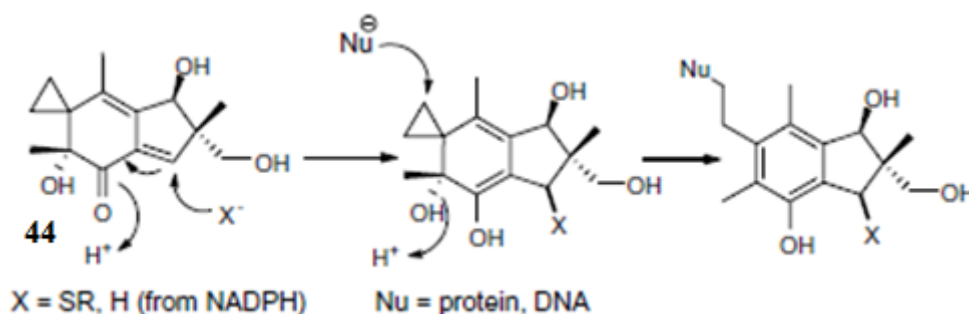
Sabe-se, no entanto, que estas moléculas apresentam alguns aspetos negativos como a sua baixa biodisponibilidade que se deve à sua extensa ligação com proteínas plasmáticas ricas em grupos tiol. Outro aspeto negativo é o facto de, também devido à sua capacidade de alquilar proteínas, provocar uma resposta imunológica por parte do organismo. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010)

Apesar de serem vários os estudos a decorrer sobre as lactonas sesquiterpénicas, apenas existem algumas ideias e propostas para os mecanismos de Ação pelo qual estas moléculas atuam farmacologicamente. São assim necessários novos desenvolvimentos visando esta classe de compostos.

III.4.2.1. Iludina S e Irofulveno

A iludina S **44** é um sesquiterpeno obtido a partir do cogumelo tóxico *Omphalotus illudens*. Este composto apresenta propriedades antitumorais e uma grande atividade contra *Staphylococcus aureus*. No entanto o uso deste fármaco foi abandonado devido à sua pequena janela terapêutica, apresentando este um perfil tóxico muito desfavorável. (McMorris, 1999) (McMorris & Chimmani, 2007)

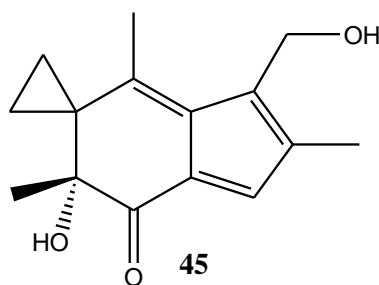
A atividade da iludina S depende de uma adição tipo-Michael mas, ao contrário de grande parte dos restantes sesquiterpenos com propriedades anti-tumorais e antibióticas, o seu farmacóforo não é o recetor de Michael presente na sua estrutura. Assim o mecanismo de Ação da iludina S baseia-se numa ativação intracelular por uma adição do tipo-Michael de um tiol ou de um hidreto, vindo do NADPH, à cetona α,β -insaturada, obtendo-se um anel ciclohexadieno. Este anel é indispensável à atividade do fármaco. O ciclohexadieno vai atuar sobre a capacidade alquilante do composto, pois contribui para despoletar a abertura do anel de ciclopropano. Quando esta abertura se dá pelo ataque de outro nucleófilo, que pode ser uma molécula constituinte do DNA ou uma proteína, o ciclohexadieno perde um grupo hidroxilo de forma coordenada com o ataque nucleofílico ao ciclopropano, formando-se assim um anel aromático (Mecanismo III-19). (McMorris & Chimmani, 2007) (McMorris, 1999) Este processo vai favorecer a ocorrência da reação de alquilação do DNA, ou de proteínas, porque origina um anel aromático a partir do ciclohexadieno, que é bastante mais estável. A formação do anel aromático, associada ao alívio da tensão inerente ao ciclopropano através da sua abertura, torna o mecanismo de Ação da iludina S, um processo energeticamente favorável.



Mecanismo III-19 – Mecanismo de Ação da iludina S (Adaptado de McMorris & Chimmani, 2007)

Por sua vez o irofulveno **45** (Estrutura III-18), ou hidroximetilacilfulveno, é um análogo da iludina S, apresentando um mecanismo de Ação semelhante ao desta, sendo, no entanto, um perfil tóxico e uma janela terapêutica mais favorável. Este composto apresenta atividade contra o carcinoma do pâncreas, carcinoma este que é resistente à maior parte dos citotóxicos. Apresenta ainda atividade contra outros tipos de neoplasia como carcinoma do pulmão, da mama, do colón, da próstata e ainda contra neoplasias dos ovários e do estômago. (McMorris, 1999) (McMorris, Yu, & Lira, 2001)

Esta melhoria terapêutica em relação à iludina S, está relacionada com o grupo hidroxilo alílico, que confere uma maior hidrofiliabilidade ao fármaco (McMorris & Chimmani, 2007), sendo ainda possível que este grupo estabeleça um qualquer tipo de interação com um recetor, que contribua para a melhoria da Ação terapêutica da molécula. (McMorris, Yu, & Lira, 2001)



Estrutura III-18 – Estrutura molecular do irofulveno.

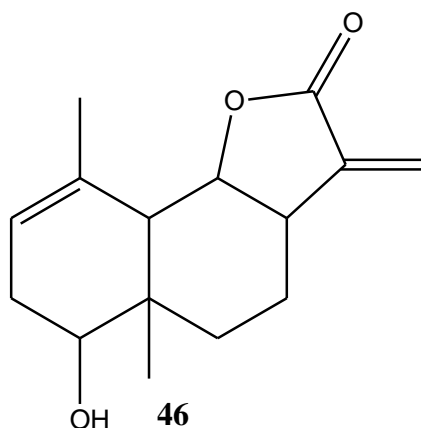
O irofulveno entra rapidamente nas células concentrando-se de forma predominante no núcleo da célula, mas podendo ser encontrado também no citosol e membranas. 60% do fármaco liga-se a proteínas sendo que 27% liga-se ao DNA e 11% ao RNA. (McMorris, Yu, & Lira, 2001)

Este citotóxico exerce a sua toxicidade através do estabelecimento de monoadductos, por um mecanismo similar ao da iludina S, e quebras de cadeias de DNA, provocando uma inibição da síntese de DNA e a apoptose celular. É de referir que não existe qualquer evidência que esta molécula estabeleça qualquer tipo de *cross-links*. (McMorris, 1999)

III.4.2.2. Santamarina

A santamarina **46** (Estrutura III-19) é uma lactona sesquiterpénica extraída da *Cyathocline purpúrea*, uma planta usada na medicina chinesa tradicional, em preparações farmacêuticas em casos de tuberculose, malária, reumatismo e outras doenças inflamatórias.

Esta molécula cujo farmacóforo é uma α -metileno- γ -lactona, apresenta atividade contra algumas linhas de células tumorais de leucemia, cancro da nasofaringe, do pulmão e coloretal. (Ma, Chong, & Li, 2009)

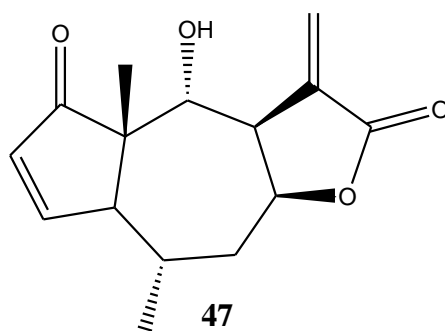


Estrutura III-19 – Estrutura molecular da santamarina.

Pensa-se que a sua atividade farmacológica esteja relacionada com a alteração covalente de grupos tiol no centro ativo de enzimas envolvidas no processo de síntese de ácidos nucleicos e proteínas. (Ma, Chong, & Li, 2009)

III.4.2.3. Helenalina

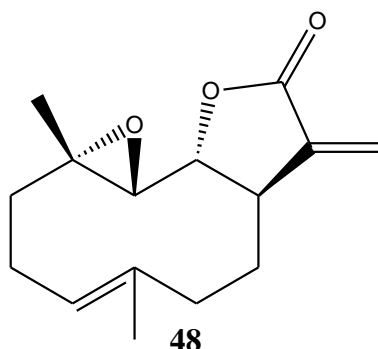
A helenalina **47** é uma lactona sesquiterpénica, apresentando, nesta condição, as mesmas propriedades farmacológicas do grupo de moléculas no qual se insere. No entanto esta molécula é uma das lactonas sesquiterpénicas que apresenta maior atividade. Este facto é justificado por apresentar na sua estrutura molecular dois grupos eletrofílicos com capacidade para atuarem como aceitadores de Michael. São eles uma ciclopentenona e uma α -metileno- γ -lactona., o que garante que a helenalina possa funcionar como um agente alquilante bifuncional (Estrutura III-20) Esta maior atividade da helenalina em relação a outras lactonas sesquiterpénicas apenas com um farmacóforo, vai de encontro á proporcionalidade direta verificada em relação à quantidade de centros alquilantes existentes na estrutura da molécula e a atividade farmacológica da mesma. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010) (Pati, Das, & Sharma, 2007)



Estrutura III-20 – Estrutura molecular da helenalina.

III.4.2.4. Partenolido

O partenolido **48** (Estrutura III-21) é uma das lactonas sesquiterpénicas mais estudadas encontrando-se diversos derivados seus em ensaios clínicos, atualmente. Extraído das folhas da *Tamacenum parthenium*, o partenolido é o princípio ativo responsável pelas propriedades anti-inflamatória assim como pela Ação no alívio da enxaqueca, por parte desta planta. (Koprowska & Czyż, 2010)



Estrutura III-21 – Estrutura molecular do partenolido.

Estudos recentes mostraram o partenolido como inibidor de alguns mecanismos epigenéticos, ou seja, mecanismos moleculares envolvidos no controlo da expressão de genes. (Hartl & Jones, 2006) Esta atividade deve-se à capacidade que o grupo α -metileno- γ -lactona, o farmacóforo do partenolido, tem em alquilar, por uma reação de adição tipo-Michael, o tiol da cisteína na posição 1226 do centro ativo de uma das enzimas responsáveis pela metilação do DNA, a DNA metiltransferase. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010)

A inibição destes mecanismos epigenéticos torna o partenolido, e os seus derivados, numa das mais promissoras moléculas com vista o combate ao cancro. Isto prende-se com o facto de as células cancerígenas apresentarem uma elevada expressão de DNA

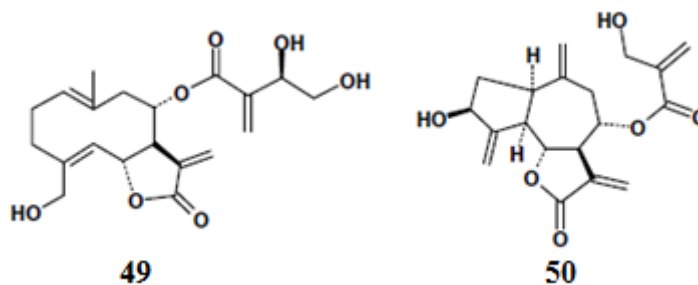
metiltransferase, cuja atividade silencia vários genes entre eles genes supressores de tumores ou envolvidos na apoptose celular. Em estudos recentes, o partenolido mostrou-se capaz de, *in vitro*, reativar o gene HIN-1, um gene supressor de tumores, por hipometilação deste mesmo gene. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010)

Além desta atividade contra alguns mecanismos epigenéticos das células cancerígenas, o partenolido apresenta uma propriedade muito particular. Este fármaco apresenta uma seletividade relativamente elevada para induzir a apoptose apenas em células cancerígenas, ao mesmo tempo que protege as células saudáveis do stress oxidativo e das radiações UV-B. Para além disto, este fármaco apresenta-se ainda como um depletor de glutatona nas células cancerígenas e parece apresentar potencial anti-cancerígeno ao nível do desenvolvimento de neoplasias em células estaminais. (Koprowska & Czyż, 2010)

III.4.2.5. Cnicina e Cinaropicrina

A cnicina **49** e cinapicrina **50** (Estrutura III-22) são lactonas sesquiterpénicas, com propriedades antibióticas. Estas exercem a sua Ação farmacológica através de uma potente e irreversível inibição da enzima MurA. Esta enzima bacteriana reveste-se de grande importância pois é responsável pelo primeiro passo da biossíntese de moléculas precursoras da formação de peptidoglicanos, sendo assim escolhida como alvo de diversos agentes terapêuticos. (Gersch & Kreuzer, 2012) (Bachelier, Mayer, & Klein, 2006)

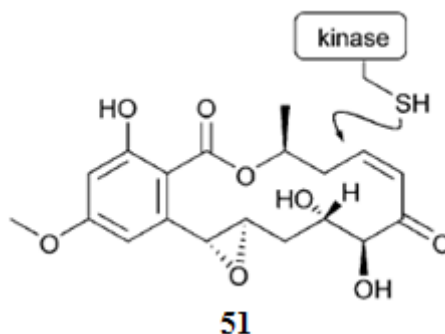
Esta proteína contém na sua estrutura uma cisteína, na posição 115, que constitui um elemento essencial na catálise enzimática. Por sua vez, tanto a cnicina como a cinaropicrina, possuem dois farmacóforos constituídos por uma cadeia éster insaturada, que funciona com um aceitador de Michael. Assim, por via de uma reação tipo-Michael, uma das cadeias éster insaturadas vai ser alvo de um ataque nucleofílico por parte do grupo tiol da cisteína, estabelecendo-se assim uma ligação covalente. O ataque dar-se-á, preferencialmente no éster acíclico devido ao menor impedimento estérico. Esta ligação leva à inibição da enzima não só por alquilar um aminoácido importante na catálise da reação enzimática, como também por impedir a alteração da conformação da enzima, devido à dimensão da lactona sesquiterpénica. (Bachelier, Mayer, & Klein, 2006)



Estrutura III-22 – Cnicina **49** e Cinaropicrina **50**.

III.5. Hipotemicina

A hipotemicina **51** é uma lactona derivada do ácido resorcílico. Esta molécula apresenta a capacidade de inibir covalentemente algumas cinases. Esta inibição deve-se à existência de um aceitador de Michael na estrutura da hipotemicina, que vai reagir com uma cisteína adjacente ao centro ativo da enzima, por um mecanismo tipo-Michael. (Mecanismo III-20) (Barluenga & Jogireddy, 2010)



Mecanismo III-20 – Mecanismo de inibição das cinases pela hipotemicina. (Adaptado de Barluenga & Jogireddy, 2010)

As cinases mais inibidas pela Ação deste xenobiótico são recetores de fatores de crescimento pro-angiogénicos, nomeadamente recetores dos Fatores de Crescimento Endotelial e os recetores dos Fatores de Crescimento Derivados das Plaquetas. São encontrados elevados níveis de expressão destes fatores de crescimento pró-angiogénico em casos de carcinoma das células renais, sendo que já existem outros tipos de inibidores dos seus recetores com atividade antitumoral demonstrada, contra este tipo de neoplasia.

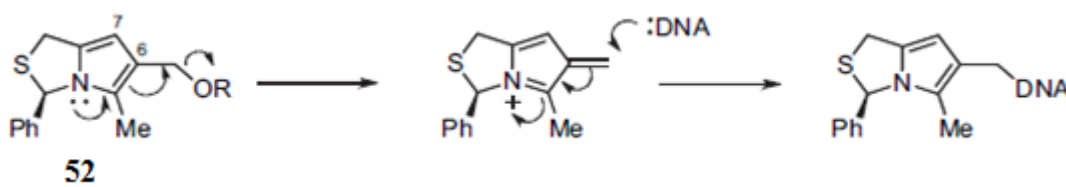
Levando em conta que aproximadamente metades das cinases codificadas no genoma humano apresentam uma cisteína na vizinhança da bolsa onde se ligam os nucleótidos,

o desenvolvimento deste tipo de lactonas derivadas do ácido resorcílico, apresenta-se como um caminho promissor em termos de oncologia. (Barluenga & Jogireddy, 2010)

III.6. 6-hidroximetil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol

O 6-hidroximetil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol **52** é uma molécula com propriedades anticancerígenas, tendo sido desenvolvida recentemente, apresentando atividade *in vitro* contra linhas de células tumorais humanas de adenocarcinoma coloretal e mamário. (Soares, Brito, & Laranjo, 2010)

Esta molécula funciona por mono-alquilação do DNA por uma reação tipo-Michael, em que o aceitador de Michael é uma imina, formada após uma primeira reação de eliminação. O mecanismo de adição do 6-hidroximetil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol é apresentado no Mecanismo III-21.



Mecanismo III-21 – Mecanismo de adição do 6-hidroximetil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol ao DNA
(Adaptado de Soares, Brito, & Laranjo, 2010)

IV. Outros fármacos com sistemas conjugados

Apesar de os sistemas conjugados serem responsáveis pela atividade biológica de diversas moléculas, conferindo-lhe uma capacidade alquilante capaz de alterar covalentemente diversas moléculas endógenas, existem outras moléculas que atuam por outros mecanismos distintos mas que continuam dependentes de um sistema conjugado.

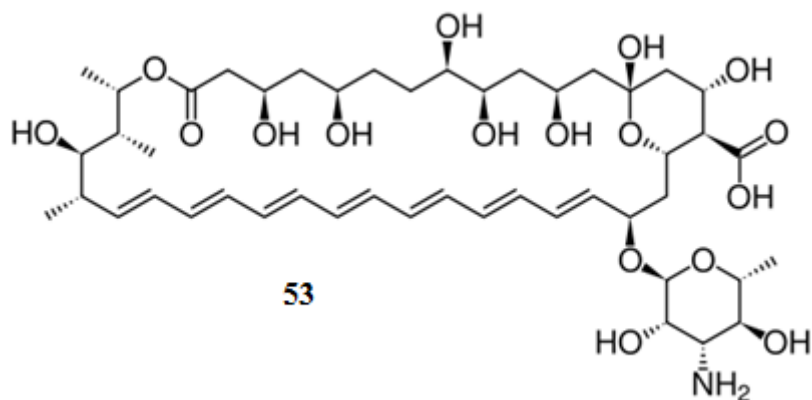
Assim as moléculas com sistemas conjugados não se limitam a agentes alquilantes, não se devendo menosprezar a utilidade de outros fármacos, ou moléculas endogenamente ativas, assim como o seu mecanismo de Ação, em que um sistema conjugado desempenha um papel fulcral.

IV.1. Anfotericina B

A anfotericina B **53** é um polieno com propriedades antifúngicas, utilizado há mais de 50 anos no tratamento de várias infeções fúngicas sistémicas. Apesar da sua utilidade terapêutica, não é de desprezar a sua toxicidade, principalmente a nível renal. (Balkis & Leidich, 2002)

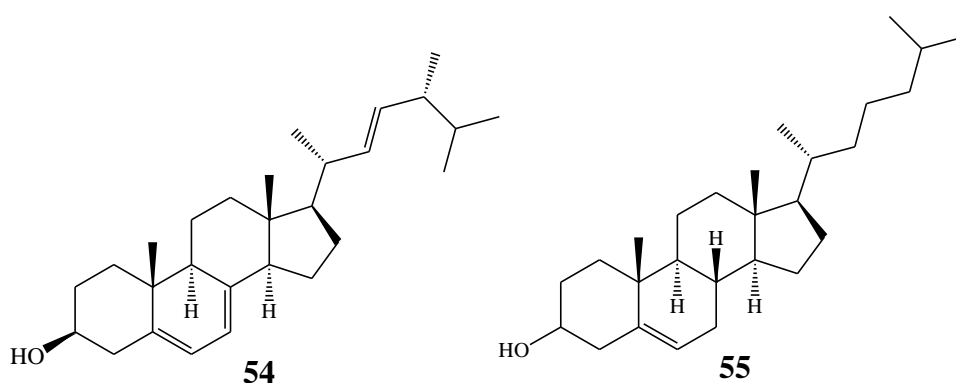
Esta molécula exerce a sua atividade através de processos oxidativos e por alterar a estrutura da membrana celular.

A anfotericina B apresenta uma estrutura anfotérica que é determinante para a sua Ação farmacológica (Estrutura IV-1). Devido à estrutura rígida das suas sete ligações duplas conjugadas a anfotericina B tem a capacidade de se ligar aos esteróis, esteroides com 27 a 29 átomos de carbono, existentes nas membranas celulares, através de forças de van der Waals, enquanto o carácter hidrofílico da margem da molécula paralela à cadeia conjugada, permite a formação de poros em zonas onde exista um pequeno agregado de moléculas de anfotericina B incorporados na estrutura da membrana celular. Estes poros vão provocar uma despolarização membranar e um aumento da permeabilidade da membrana a protões e outros catiões monovalentes, contribuindo assim para a lise da célula. (Brajtburg & Powderly, 1990)



Estrutura IV-1 – Estrutura molecular da anfotericina B.

No entanto a anfotericina B apresenta uma maior afeição para membranas contendo ergosterol como esteroide estrutural, como é o caso dos fungos, do que para membranas contendo colesterol, como acontece nas células dos mamíferos. É neste facto que se baseia a utilidade clínica da anfotericina como antifúngico. Esta seletividade pode ser explicada a nível estrutural já que o ergosterol **54**, ao contrário do colesterol **55**, apresenta uma ligação dupla no carbono 22 da sua estrutura (Estrutura IV-2). Esta ligação dupla vai diminuir a liberdade conformacional da molécula, fazendo com que o ergosterol apresente uma estrutura mais planar que o colesterol, estrutura esta que facilita e maximiza o estabelecimento de ligações de van der Waals entre a cadeia conjugada do polieno e o esteroide. (Brajtburg & Powderly, 1990)



Estrutura IV-2 – Estrutura molecular do ergosterol **54** e do colesterol **55**.

Apesar da seletividade para o ergosterol comparado com outros esteróides ser bastante superior, a toxicidade verificada aquando do uso de anfotericina B, é resultado da sua interação com o colesterol das células do organismo.

Não obstante ser utilizada em terapêutica desde a década de 50, as resistências desenvolvidas a este polieno não são comuns, confinando-se praticamente apenas a espécies de fungos raras. (Balkis & Leidich, 2002)

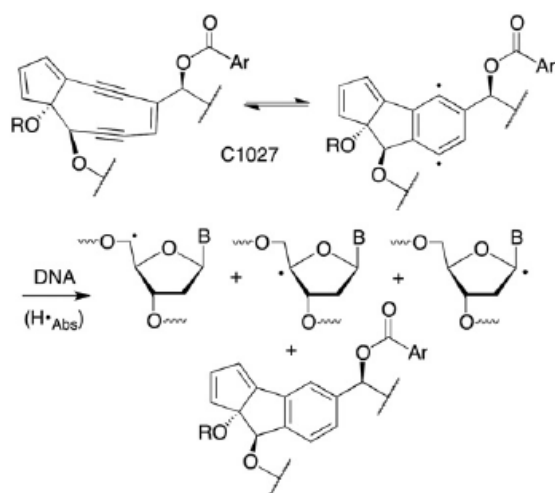
IV.2. Enediínas

Enediínas são moléculas naturais com propriedades antitumorais e antibióticas que podem ser obtidas a partir de algumas estirpes de bactérias ou mesmo de algumas espécies marinhas. Existem atualmente 20 Enediínas descritas. Estas moléculas com atividade farmacológica apresentam uma arquitetura estrutural muito própria, caracterizada pela presença de um hexa-3-en-1,5-diino, um sistema conjugado, na sua estrutura molecular. (Dai, 2003) (Fouad, Wright, & Plourde II, 2005)

Estas moléculas são uns dos agentes com maior capacidade citotóxica conhecidos até hoje, apresentando uma potência milhares de vezes superiores, por exemplo, à mitomicina C.

No entanto as enediínas apresentam o problema de serem bastante tóxicas e pouco seletivas, dificultando assim o seu uso clínico. (San Pedro, Beerman, & Greenberg, 2012)

Estes fármacos não são ativos por si só, sendo ativados em condições fisiológicas através de uma cicloaromatização de Bergman, formando-se uma molécula com um farmacóforo constituído por um bi-radical 1,4-benzoide. Este bi-radical apresenta-se como o responsável pelos danos causados pelas enediínas no material genético (Mecanismo IV-1).



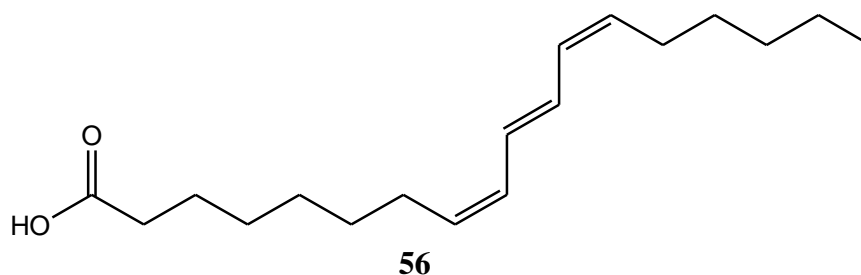
Mecanismo IV-1 - Mecanismo de ação da C1027, uma enediína (Adaptado San Pedro, Beerman, & Greenberg, 2012)

O mecanismo de ação das enediínas tem a particularidade de não atuar sobre as bases azotadas dos nucleótidos, como grande parte dos antineoplásicos alquilantes, mas sim sobre os resíduos de açúcar de uma, ou de ambas as cadeias do DNA. Pela ação do bi-radical existente na enediína ativada, esta vai abstrair átomos de hidrogénio, em diferentes posições do esqueleto molecular das desoxirriboses, causando danos severos no DNA. Nestes danos ao material genético incluem-se quebras de cadeia dupla ou de apenas uma das cadeias, *cross-links*, monoadductos e lesões abásicas. Estes fenómenos levam a uma clivagem da dupla-cadeia de DNA impossível de ser reparada. (San Pedro, Beerman, & Greenberg, 2012) É de referir que as enediínas apresenta seletividade para determinadas sequências nucleotídicas no DNA, sendo que as seletividades podem divergir entre as enediínas. (Xu, Xi, & Zen, 1997)

Recentemente descobriu-se que a atividade farmacológica da enediína pode não resumir-se à sua ação sobre o DNA, apresentando-se a hipótese de estas atuarem também sobre RNA e proteínas, desencadeando diversos mecanismos de apoptose celular. (Fouad, Wright, & Plourde II, 2005)

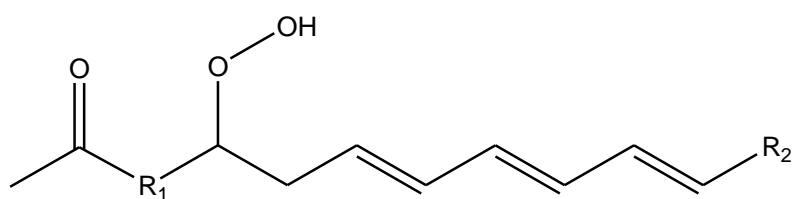
IV.3. Ácidos gordos triénicos conjugados

Os compostos desta classe são isómeros do ácido α -linoleico, contendo um trieno conjugado na sua estrutura. O ácido jacárico **56** (Estrutura IV-3) é exemplo de um destes compostos. (Shinohara, Tsuduki, & Ito, 2012) Estes lípidos podem ser encontrados na alimentação, nomeadamente em carnes de ruminantes e lacticínios.



Estrutura IV-3 – Estrutura molecular do ácido jacárico.

Estes ácidos gordos apresentam atividade anti-obesidade, citostática e citotóxica, atuando principalmente a nível da prevenção de cancro da mama, pulmão e do colón. Sabe-se hoje que a sua atividade citotóxica é dependente da sua estrutura triénica conjugada, já que esta conjugação de três ligações duplas vai dar origem à formação de peróxidos no organismo (Estrutura IV-4) (Igarash & Miyazawa, 2000). Apesar de estes peróxidos de ácidos gordos poderem dar origem a outros compostos também com propriedades citotóxicas, como aldeídos insaturados (III.2.) (Uchida, 2003) (Vollhardt & Schore, 2002), no caso particular dos ácidos triénicos conjugados, são os próprios peróxidos que são responsáveis pela sua atividade anticancerígena, atuando como agentes oxidantes ao nível da membrana celular (Esterbauer, 1993). Esta ação promove a peroxidação de outros ácidos gordos insaturados constituintes da membrana, alterando assim a estrutura membranar e provocando a apoptose da célula. (Shinohara, Tsuduki, & Ito, 2012)



Estrutura IV-4 – Estrutura geral de um hidroperóxido de um ácido triénico conjugado.

Apesar de apresentarem um mecanismo de ação comum, os diferentes isómeros do ácido α -linoleico apresentam diferentes níveis de atividade antitumoral, dependente do diferente *uptake* celular de que são alvo. (Shinohara, Tsuduki, & Ito, 2012)

A ação desta classe de compostos vem assim reforçar sobremaneira a importância da alimentação na prevenção do cancro.

V. Discussão/Potenciação e desenvolvimento de fármacos

Os sistemas conjugados apresentam-se como grupos funcionais de elevada importância a nível da farmacologia. Estes sistemas, como os aceitadores de Michael ou sistemas alílicos, constituem o farmacóforo de diversos antibióticos e antineoplásicos, devido à sua capacidade de inibir irreversivelmente enzimas e alterar covalentemente material genético, impedindo que diversos processos celulares se desenvolvam normalmente.

O conhecimento dos mecanismos de toxicidade tanto de alguns fármacos como de diversos outros xenobióticos, por si só, constitui um suporte importante no desenvolvimento de novas moléculas com atividade farmacológica melhorada, seja por um desenvolvimento de um fármaco completamente novo ou pela alteração de um já existente.

A adição, ou potenciação, de sistemas conjugados que sejam responsáveis pela atividade farmacológica de determinados fármacos, pode não só alterar a atividade farmacodinâmica da molécula, mas também o perfil farmacocinético, devido à lipofilicidade inerente aos alcenos conjugados. Uma maior lipofilicidade de um fármaco está co-relacionada com uma maior biodisponibilidade deste, sendo importante para a produção de medicamentos suscetíveis de serem tomados por via oral, o que representa um grande acréscimo em termos de comodidade para o doente. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010)

Sendo que a atividade de diversos citotóxicos se deve à sua capacidade alquilante, é fácil de compreender que um aumento da atividade farmacológica destes se pode prender com dois fatores, ou o aumento da reatividade do farmacóforo já existente, ou adição de novos farmacóforos também com capacidade alquilante. É neste aumento de atividade que os sistemas conjugados podem desempenhar um papel fulcral no avanço da terapêutica, devido à elevada capacidade alquilante dos aceitadores de Michael e sistemas alílicos, que têm a capacidade de estabelecer adutos bastante estáveis com diversas moléculas endógenas.

Com os avanços em proteômica que têm permitido conhecer a estrutura de diversas proteínas e enzimas, assim como as ferramentas informáticas que permitem estudos de *docking*, é hoje possível ao desenvolvimento de novos fármacos com alvos bem definidos. Apesar de poder vir a ser este o caminho mais promissor a nível da Química Orgânica Farmacêutica, existem muitos outros parâmetros e caminhos que não podem ser menosprezados.

A seletividade é uma das grandes preocupações aquando do desenvolvimento e uso de um fármaco. Se no caso dos antibióticos, os microrganismos apresentam características estruturais e funcionais que os distinguem das células dos mamíferos, no caso das células tumorais é bastante mais complicado arranjar um ponto de discrepância que possa ser explorado em termos de seletividade para estas células, em detrimento das células saudáveis.

No entanto, apesar de se revelar difícil conferir seletividade aos citotóxicos, existem diferenças entre as células tumorais e as saudáveis, que merecem ser exploradas. Todos os tumores apresentam um perfil metabólico diferente do que ocorre noutros tecidos saudáveis. Isto deve-se a maior taxa de replicação celular, que requer muitos mais nutrientes. (Hartl & Jones, 2006) Este consumo aumentado nas células tumorais, faz com que haja um aporte celular muito maior também de fármaco, constituindo um método de seletividade, principalmente em tumores superficiais e largamente irrigados. No entanto, existem células que mesmo saudáveis apresentam uma grande taxa de replicação, sendo assim alvo de efeitos nefastos por parte dos citotóxicos, como é o caso das células do epitélio gastrointestinal, células hematopoiéticas e células dos folículos pilosos. Esta ação sobre estes tecidos é responsável pelos efeitos secundários dos mais comuns dos citotóxicos, como a alopecia, vômitos, diarreia, perda de peso e supressão da medula óssea. (Sahin, Sahin, & Kucuk, 2010) (Jordan & Kasper, 2005) (Vander Heiden, 2011)

No entanto, dentro das neoplasias há uma atenção especial em relação aos tumores sólidos já que estes apresentam uma grande resistência à terapia. Apesar desta contrariedade, estes também apresentam características próprias que permitem uma otimização dos fármacos que visam atuar sobre este tipo de neoplasias, principalmente a nível do desenvolvimento de pró-fármacos que sejam ativados seletivamente no ambiente extracelular do tumor. (Denny, 2001)

A principal particularidade deste tipo de neoplasias está relacionada com uma angiogénese pouco funcional no seio destas massas tumorais, o que vai provocar um aporte de sangue deficiente. Este facto vai fazer com que uma determinada porção interior do tumor se encontre em hipoxia. Esta característica é única e bastante comum nos tumores sólidos.

Independentemente de esta hipoxia poder ser crónica ou transitória, vai fazer com que haja um ambiente redutor no seio do tumor, aumentado pela ausência de oxigénio, ausência esta que impede a oxidação dos produtos da ação de redutases endógenas. Além disto, o pH no espaço intercelular é mais baixo em cerca de uma unidade de pH, em relação ao que acontece em ambiente fisiológico. Isto ocorre devido à reduzida *clearance*, e consequente acumulação, de metabolitos celulares, resultantes maioritariamente da respiração anaeróbia das células em hipoxia, que por sua vez é fruto do reduzido aporte sanguíneo a estas células. (Denny, 2001)

O potencial redutor já é de certa forma explorado pela mitomicina C, sendo a redução do seu anel de hidroquinona uma peça indispensável à seletividade e atividade do fármaco. Mas por outro lado, o aproveitamento das diferenças de pH entre as células saudáveis e as células tumorais ainda é um pouco posto de lado.

Em termos de desenvolvimento de fármacos mais eficientes, ainda para mais tendo em conta a dimensão nefasta que o cancro assume atualmente, nada deve ser menosprezado. Deve ser tido em conta cada pormenor que possa beneficiar em termos de seletividade ou em termos de ação do fármaco. É assim importante, não só, conhecer os aspetos celulares inerentes às neoplasias, por exemplo, mas também conhecer todos os aspetos relacionados com a ação de cada citotóxico, desde o seu farmacóforo à sua estrutura molecular. Será desta forma possível aproveitar as potencialidades particulares de cada fármaco, e utiliza-las no desenvolvimento de uma terapia farmacológica mais eficaz e poderosa no combate tanto do cancro, como de diversas outras patologias.

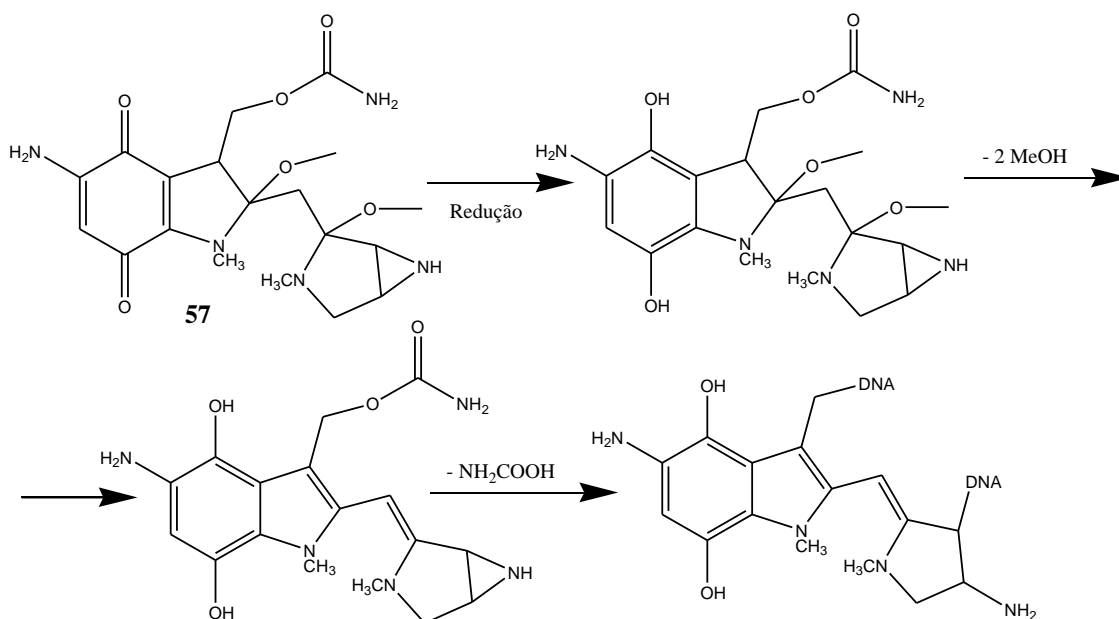
Seguindo a linha pelo qual se rege este trabalho, baseada na alteração e potenciação de fármacos com base nalguns conhecimentos do mecanismo de ação de outras moléculas assim como de vários mecanismos endógenos, serão então apresentadas algumas alterações passíveis de serem efetuadas ao nível de *design* de alguns fármacos que, teoricamente, podem contribuir para o aumento da sua atividade.

Em boa verdade, é no conhecimento e nas novas ideias que este permite, que se encontram as ferramentas que conferem à Ciência a possibilidade de esta avançar, em prol de todos nós.

V.1. Mitomicina C

A mitomicina C **9** (II.3.) apresenta propriedades antibióticas e antitumorais, devido à sua capacidade alquilante, que lhe permite estabelecer adutos com o DNA, mais propriamente, *cross-links*. No entanto, na condição de antineoplásico este fármaco apresenta como desvantagem a sua seletividade para sequências 5'-CpG-3', sequência esta que é pouco abundante no genoma humano, ao contrário do que acontece nos microorganismos. Esta seletividade resulta da dimensão e restrições conformacionais associadas à molécula do fármaco. Assim será de prever que uma diminuição das restrições conformacionais e um aumento da dimensão da molécula por um aumento do espaçamento entre os dois centros alquilantes da molécula iriam levar a um aumento da utilidade da mitomicina C em quimioterapia, já que se iria superar o inconveniente associado à seletividade do fármaco. De facto as dimensões do espaçamento poderiam ser a peça-chave para a atividade destas moléculas. No entanto, numa modelação da molécula de mitomicina C, há que ter em atenção em manter alguns dos seus aspetos estruturais indispensáveis à sua ação. São eles o grupo carbamato, que atua na orientação e ação do fármaco no seio da dupla hélice de DNA, as posições alílicas dos nucleofugos que contribuem para a eficiência da alquilação mantendo a capacidade bi-alquilante da molécula, e o anel de hidroquinona, cuja redução é indispensável à ação da mitomicina C por integrar o sistema conjugado que assiste as substituições nucleofílicas e confere seletividade ao fármaco para atuar em tumores sólidos, com o interior em hipoxia.

Um derivado da mitomicina C **57** representativo desta ideia de potenciação, assim como o seu possível mecanismo de ação é apresentado no Mecanismo V-1.



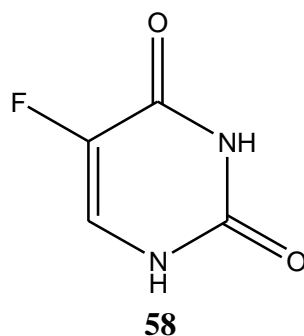
Mecanismo V-1 - Mecanismo de ação de uma molécula derivada da mitomicina C.

O facto de a mitomicina C apresentar seletividade para tumores sólidos torna-a um fármaco bastante importante, devido à elevada resistência destes tipos de neoplasias a grande parte das terapias anti-tumorais disponíveis. Assim um melhoramento da atividade antitumoral da mitomicina C, pode representar um avanço considerável em quimioterapia.

V.2. Bases azotadas

As bases azotadas são subunidades dos nucleótidos, sendo assim também subunidades do DNA.

Estas moléculas estão envolvidas nos processos de replicação do DNA, contactando diretamente com o centro ativo de várias enzimas envolvidas em processos celulares. Assim utilizar as bases azotadas como modelo para o design de novos fármacos, anticancerígenos, constitui uma estratégia com potencial a nível farmacológico. O 5-fluoruracilo **58** é um exemplo do sucesso que esta estratégia pode representar (Estrutura V-1).

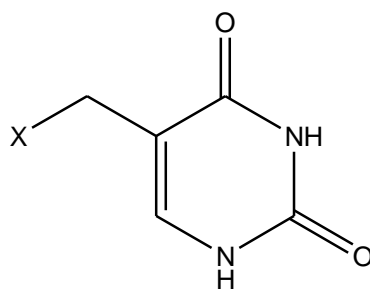


Estrutura V-1 – Estrutura molecular do 5-fluoruracilo.

Uma alteração pouco relevante da estrutura das bases azotadas para além de garantir que não existem grandes alterações na interação das moléculas com os centros ativos das enzimas, é ainda importante a nível da seletividade do fármaco para as células tumorais em relação à maior parte das células saudáveis. Esta seletividade é resultado de mais extenso metabolismo e síntese de DNA, dada a maior taxa de replicação celular por parte das células tumorais, necessitando estas células de um maior aporte de nutrientes e nucleótidos, dos quais fazem parte as base azotadas. No entanto, continuará a afetar células saudáveis que apresentam uma grande taxa de replicação, como as células hematopoiéticas e do epitélio intestinal.

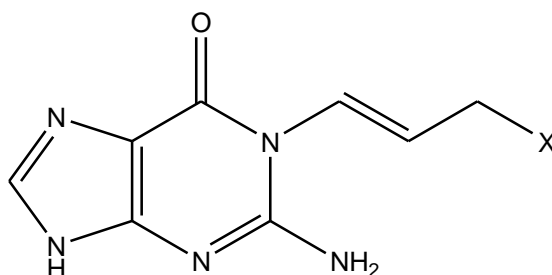
Uma estratégia que pode ser interessante do ponto de vista terapêutico é conferir capacidade alquilante a moléculas análogas das purinas ou pirimidinas. Dependendo da alteração que conferisse esta propriedade alquilante, poderia dar-se uma inibição irreversível do centro ativo de enzimas com resíduos nucleofílicos, ou mesmo o estabelecimento de cross-links entra a dupla cadeia do DNA. Uma das enzimas que tanto pela sua função, como pela estrutura do seu centro ativo, se apresentaria como um bom alvo terapêutico seria a DNA polimerase. Esta enzima indispensável à replicação e reparação do DNA, possui no seu centro ativo uma cisteína. Sabe-se que os resíduos tiol são os nucleófilos mais reativos em ambiente fisiológico.

Uma das estratégias de modificação das bases azotadas que lhe iria conferir capacidade alquilante, seria um simples acrescento de um nucleofugo em posição alílica, situação possível na timina devido à sua insaturação entre o carbono 5 e 6 e ao grupo metilo ligado ao carbono 6 (Estrutura V-2). Esta modelação apenas iria acrescentar um átomo á estrutura molecular da timina.



Estrutura V-2 – Análogo da alquilante da timina com nucleofugo em posição alílica.

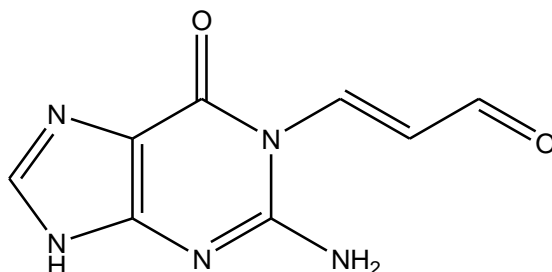
Outra hipótese seria a adição de um sistema conjugado completo com o nucleofugo na posição alílica. Esta alteração, apesar de poder ser feita em todas as bases azotadas, já iria provocar uma alteração mais relevante na estrutura, que se poderia traduzir numa diminuição bastante acentuada das interações com o centro ativo enzimático. Por outro lado, o grupo funcional alquilante adicionado iria permitir o estabelecimento de um *cross-link* entre as duas cadeias complementares. Esta capacidade iria estar dependente da dimensão do grupo funcional adicionado, dimensão esta que quanto maior for, mais interfere ao nível da interação do substrato com os centros ativos das enzimas. Assim, teoricamente, a ligação destes análogos de bases azotadas a centros ativos enzimáticos e a sua capacidade de estabelecer *cross-links* estaria maximizada se a adição deste grupo funcional fosse feita na margem da molécula que estabelece as pontes de hidrogénio, com o seu devido nucleótido da cadeia complementar. Ficaria assim o novo grupo funcional no interior da dupla hélice, o que requereria um grupo alquilante de menores dimensões, havendo assim uma alteração estrutural menos denunciada mas que manteria a capacidade da molécula em estabelecer uma ligação covalente com a cadeia de DNA complementar (Estrutura V-3).



Estrutura V-3 - Análogo alquilante da guanina com nucleofugo em posição alílica.

Existe ainda a possibilidade de tornar os análogos das bases azotadas em compostos alquilantes por um mecanismo tipo-Michael, através da adição de um grupo funcional que atue como um aceitador de Michael, grupo funcional este que se sabe ter como alvo

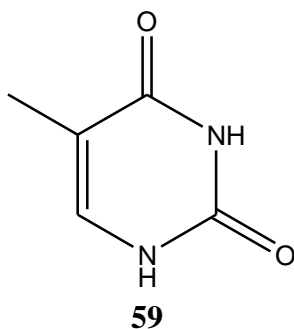
preferencial de alquilação os grupos tiol. Esta preferência adquire uma especial importância no caso do DNA polimerase devido à estrutura do seu centro ativo, atrás referida. O grupo aceitador de Michael poderia apresentar-se numa localização exocíclica (Estrutura V-4) ou em posição endocíclica, no caso específico da timina.



Estrutura V-4 - Análogo alquilante da guanina com um grupo aceitador de Michael exocíclico.

Dada a existência do grupo carbonilo exocíclico na estrutura destes análogos das bases azotadas, não seria de desprezar a hipótese de se estabelecerem bases de Schiff pela reação com grupos aminas de outras bases azotadas. Esta reação permitira também a formação de *cross-links*.

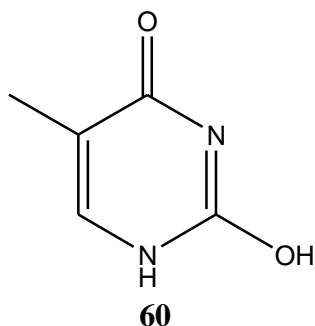
A timina **59**, por sua vez, apresenta características estruturais que permitem uma modulação particular da molécula em relação às restantes bases azotadas do DNA, devido aos seus dois grupos carbonilo (Estrutura V-5).



Estrutura V-5 – Estrutura molecular da timina.

A particularidade estrutural da timina permite a criação de um grupo aceitador de Michael endocíclico **60** (Estrutura V-6). A molécula apresentada na Estrutura V-6, apresenta uma estrutura muito similar à timina. As alterações são sublimes, não alterando sequer as dimensões da molécula. Uma insaturação entre o azoto na posição 1 e o carbono na posição 2, vai dar lugar a um carbonilo α,β -insaturado na estrutura da molécula. Na posição 2 do anel, também o grupo carbonilo foi reduzido a um grupo

hidroxilo. Esta alteração, devido à eletronegatividade do grupo hidroxilo, vai tornar o carbono β do agora grupo aceitador de Michael, ainda mais electrofilico, e mais reativo tendo em vista uma reação de alquilação. Além do mais, o grupo hidroxilo possui as mesmas funcionalidade que o carbonilo a nível de interações intermoleculares não covalentes.



Estrutura V-6 – Molécula análoga da timina com função alquilante.

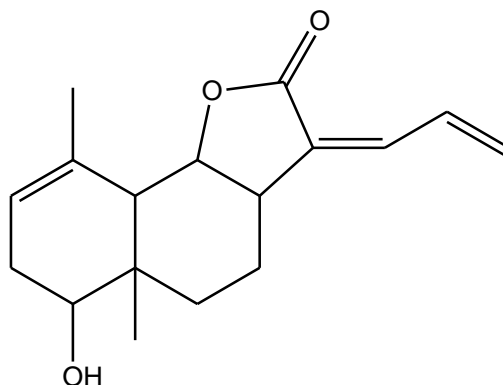
A modificação molecular, a par de estudos de *docking* deste tipo de moléculas endógenas pode constituir uma boa base para o desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos.

V.3. Lactonas sesquiterpénicas

As lactonas sesquiterpénicas funcionam como agentes alquilantes de moléculas endógenas, como enzimas, através de um mecanismo de adição tipo-Michael. Este mecanismo de ação deste tipo de moléculas deve-se ao seu farmacóforo, que funciona como um aceitador de Michael, podendo ser uma α -metileno- γ -lactona, um butenolido ou uma ciclopentenona. (Janecki, Błaszczuk, & Studzian, 2005) (Scotti, Fernandes, & Ferreira, 2007)

No entanto, e sendo a sua atividade dependente de um ataque nucleofílico ao seu farmacóforo, a atividade das lactonas sesquiterpénicas é muitas vezes diminuída devido ao impedimento estéreo existente em algumas estruturas moleculares desta classe de compostos, que dificulta esse ataque nucleofílico. Levando em conta o mecanismo pelo qual se dá uma adição tipo-Michael e o fenómeno de deslocalização de ligações, ao longo de um sistema conjugado, pode aumentar-se o sistema conjugado que constitui o farmacóforo da molécula, sendo que esta cadeia deve ser aumentada de forma exocíclica, de modo a possuir uma maior liberdade conformacional e menos

impedimento estéreo, já que o átomo electrofílico se vai situar mais afastado do esqueleto central da molécula (Estrutura V-7). Desta forma, será facilitado o ataque nucleofílico, na medida em que se diminui o impedimento estéreo, sem alterar o mecanismo de alteração.



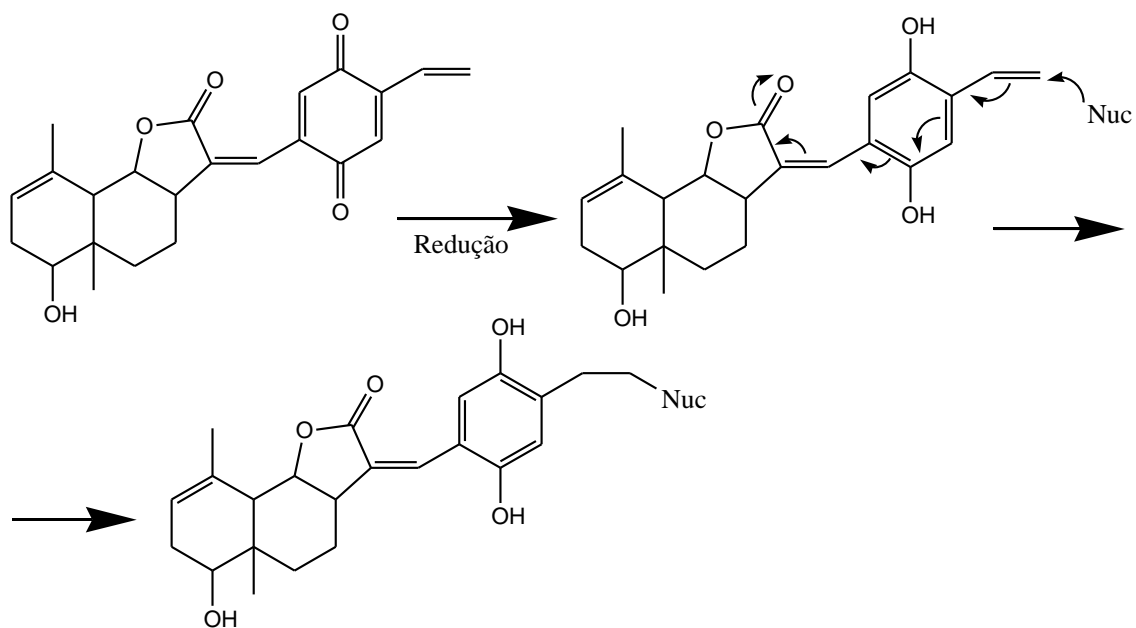
Estrutura V-7 – Alteração do farmacóforo da santamarina 46, uma lactona sesquiterpénica, por aumento das dimensões do sistema conjugado.

A alteração do farmacóforo das lactonas sesquiterpénicas pode ser explorada de uma forma ainda mais profunda, aproveitando a conjugação existente para conferir seletividade a este fármaco para tumores sólidos. Isto é possível através do aumento das dimensões do sistema conjugado do farmacóforo e da incorporação de um anel de hidroquinona na estrutura deste.

O anel de hidroquinona que faz parte da estrutura da mitomicina C, é responsável pela seletividade deste fármaco para tumores sólidos, já que a bioativação da mitomicina C está dependente da redução do anel de hidroquinona.

Um pouco à imagem do que acontece com a mitomicina C, a ativação do farmacóforo estará dependente da redução do anel de hidroquinona, cujo produto irá encontrar-se conjugado com o farmacóforo da lactona sesquiterpénica, sendo indispensável a uma adição tipo-Michael. Esta bioativação será a base da seletividade já que ocorrerá nas células em hipoxia no interior dos tumores sólidos onde existe um ambiente redutor.

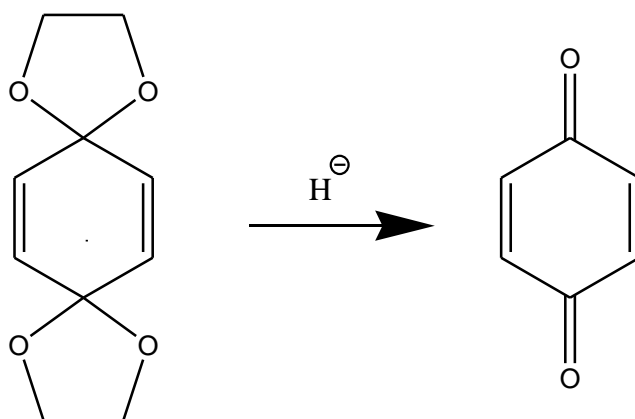
Os princípios mecanísticos da ação desta lactona sesquiterpénica modificada, iriam manter-se os mesmos, ou seja continuariam a funcionar por um ataque nucleofílico e uma deslocalização das ligações π do sistema, permitindo uma adição tipo-Michael, desde que os novos substituintes do anel se encontrem em posição *para* um em relação ao outro (Mecanismo V-2).



Mecanismo V-2 – Mecanismo de ação potencial de uma lactona sesquiterpénica, baseada na estrutura da santamarina **46**, dependente da redução de um anel de hidroquinona.

Para além das propriedades farmacodinâmicas, esta alteração iria conferir ainda uma maior lipofilicidade ao fármaco, devido á dimensão considerável do grupo funcional.

Falando mais especificamente em relação ao anel de hidroquinona, a seletividade conferida por este grupo pode ainda ser melhorada tendo em conta outras características do ambiente extracelular dos tumores em hipoxia. Os grupos carbonilo do anel podem ser protegidos utilizando um diol, etano-1,2-diol mais propriamente, através de um processo relativamente comum em química orgânica. Esta proteção é removida por um mecanismo catalisado por um ambiente ácido (Mecanismo V-3), ambiente este que é verificado no seio dos tumores sólidos.



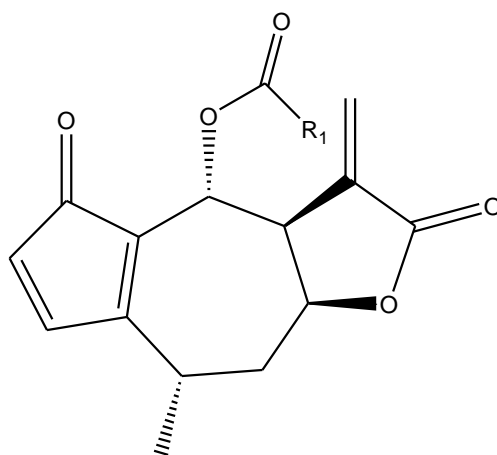
Mecanismo V-3 – Remoção dos diois protetores dos grupos carbonilo do anel de hidroquinona.

Este mecanismo iria cimentar a seletividade de fármacos dependentes da redução deste anel, já que a bioativação do fármaco iria requerer um ambiente redutor e ácido, o que iria cingir ainda mais a ação destes fármacos aos tumores sólidos, onde ambos estes dois fatores co-existem. Por outro lado, esta proteção dos grupos carbonilo iria precaver qualquer reação do anel hidroquinônico por um mecanismo tipo-Michael, já que os grupos carbonilo dos carbonilos α,β - insaturados do anel iriam estar desativados.

V.3.1. Helenalina

A helenalina **47** é uma lactona sesquiterpénica que atua por alquilação de moléculas endógenas, por uma reação tipo-Michael. Devido à sua estrutura, para além das alterações já apresentadas de que o seu farmacóforo pode ser alvo, esta molécula, de forma particular e dada a sua estrutura, pode ainda ser modificada de modo a apresentar mais grupos funcionais com capacidade alquilante, o que vai aumentar a sua atividade farmacológica. (Ghantous & Gali-Muhtasib, 2010) (Pati, Das, & Sharma, 2007)

No caso da helenalina, a remoção do grupo metilo e uma insaturação no anel da ciclopentenona na face oposta à ligação dupla entre carbonos já existente iria dar origem a uma ciclopenta-2,4-dienona (Estrutura V-8). Este grupo funcional associado a uma substituição do grupo hidroxilo por um grupo éster, iria conferir uma nova função alquilante à molécula, já que esta iria passar a possuir um éster em posição alílica, que iria constituir um bom nucleofugo. Este éster, se apresentar uma cadeia alifática, confere também uma maior lipofilicidade ao composto, aumentando a sua penetração celular e, conseqüentemente, melhorando a sua atividade. Para além disto, a ciclopenta-2,4-dienona iria ainda permitir à reagir por um mecanismo tipo-Michael por duas vezes.



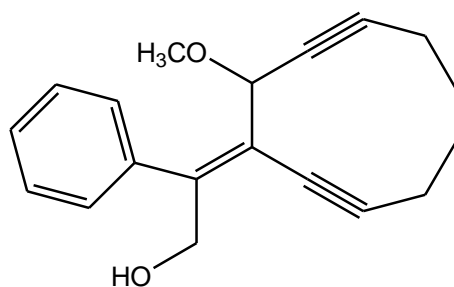
Estrutura V-8 – Derivado da helenalina.

V.4. Pró-fármaco de enediínas

As enediínas (IV.2.) são o conjunto de fármacos que partilham um núcleo estrutural composto por um hexa-3-en-1,5-diino, um sistema conjugado. Estas moléculas apresentam uma grande potência citotóxica, atuando por um mecanismo radicalar fruto de uma cicloaromatização de Bergman que transforma o grupo hexa-3-en-1,5-diino, num bi-radical 1,4-benzenoide, que vai danificar o DNA celular.

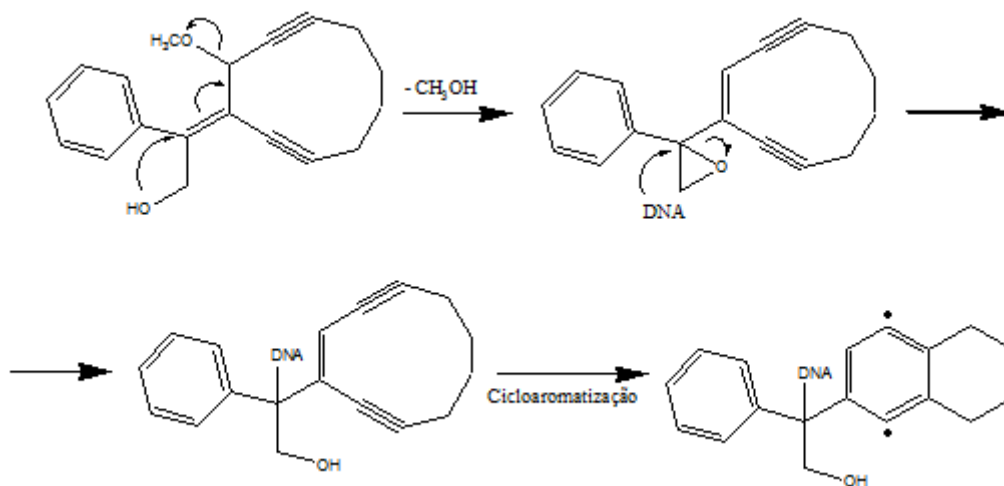
No entanto estas moléculas apresentam a sua elevada toxicidade como inconveniente. Assim, formular pró-fármacos destas moléculas que garantam que estas só são ativadas no sítio onde se pretende que estas atuem, iria levar a uma maior seletividade e potenciação da sua ação.

A molécula apresentada na Estrutura V-9 representa um potencial pró-fármaco de uma enediína. Esta molécula apresenta uma seletividade teórica para grandes tumores com o interior em hipoxia, dado que o ambiente extracelular no núcleo destas neoplasias tem um pH mais baixo que o fisiológico, e apresenta ainda um novo centro reativo com capacidade alquilante.



Estrutura V-9 – Estrutura molecular de um pró-fármaco de uma enediína.

A conversão deste pró-fármaco a uma enediína será despoletada por uma reação de adição nucleofílica intramolecular. Esta reação dá-se por um ataque nucleofílico do grupo hidroxilo à ligação dupla que coloca o grupo metoxi em posição alílica. Uma deslocalização da ligação dupla vai levar à saída do grupo metoxi, a formação de um grupo hexa-3-en-1,5-diino, indispensável à ação terapêutica das enediínas, e ainda à formação de um epóxido com o átomo de carbono interno em posição alílica. Este átomo do anel oxirano, e dada a posição alílica em que se encontra, vai possuir uma elevada reatividade, podendo funcionar como um alquilante do DNA (Mecanismo V-4). Esta alquilação vai ainda garantir que a enediína fique ligada ao seu alvo terapêutico, estando a sua ação apenas dependente da cicloaromatização de Bergman que forma a espécie radicalar. (Tachi, Dai, & Tanabe, 2006)



Mecanismo V-4 – Mecanismo de ação do pró-fármaco de enediína.

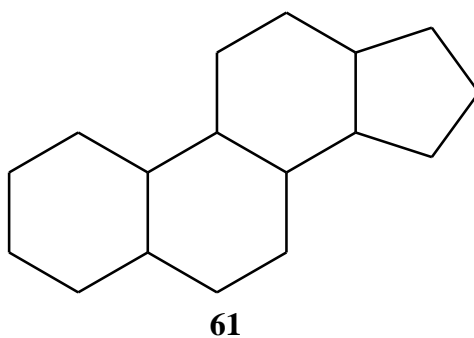
A seletividade deste pró-fármaco por tumores em hipoxia, por sua vez, prende-se com o menor pH existente no ambiente extracelular no centro das grandes neoplasias em relação ao pH que ocorre em ambiente fisiológico. Esta diferença de acidez vai fazer com que haja uma maior ativação do pró-fármaco neste tipo de neoplasias, já que o

menor pH vai fazer com que se dê uma maior taxa de protonação do grupo metoxi, o que aumenta a sua nucleofugacidade, e leva assim a uma maior taxa de conversão do pró-fármaco, em relação ao que aconteceria em ambiente fisiológico. Para além disto, um ambiente mais ácido também vai facilitar a abertura do anel oxirano.

Esta alteração contornaria alguns dos aspetos negativos associados à utilização das enedíinas, acrescentar-lhe-ia ainda uma função alquilante, e com a benesse de não alterar de forma alguma o grupo funcional responsável pela ação destes citotóxicos.

V.5. Esteroides

Os esteroides têm vindo a ser utilizados como transportadores de diversos agentes quimioterapêuticos, principalmente agentes alquilantes, com destino a células carcinogénicas. Esta utilidade dos esteroides, encontra-se relacionada com as maiores necessidades das células tumorais, que requerem uma maior quantidade de diversas moléculas endógenas e nutricionais, em relação às células saudáveis. Entre estas moléculas encontram-se os esteroides, moléculas com uma estrutura básica constituída por um ciclo-pentano-peridro-fenantreno **61** (Estrutura V-10), uma estrutura multicíclica constituída por 17 carbonos. (Koutsourea, Fousteris, & Arsenou, 2008)

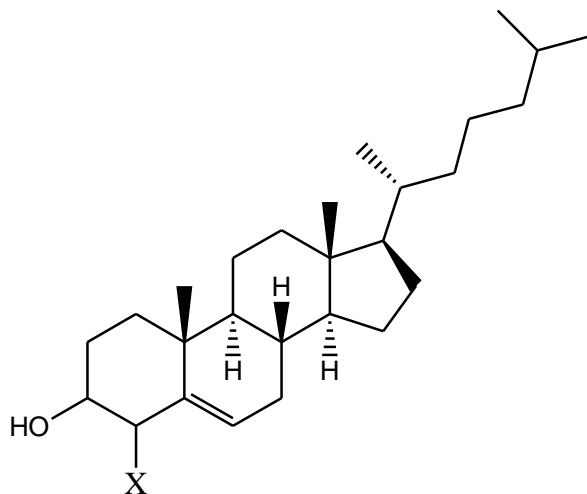


Estrutura V-10 – Estrutura do ciclo-pentano-peridro-fenantreno.

Dada a importância dos esteroides para diversos processos celulares e ao maior aporte destes às células tumorais, estes podem, por si só, representar um bom alvo de modulação molecular com o objetivo de desenvolver novos fármacos citotóxicos.

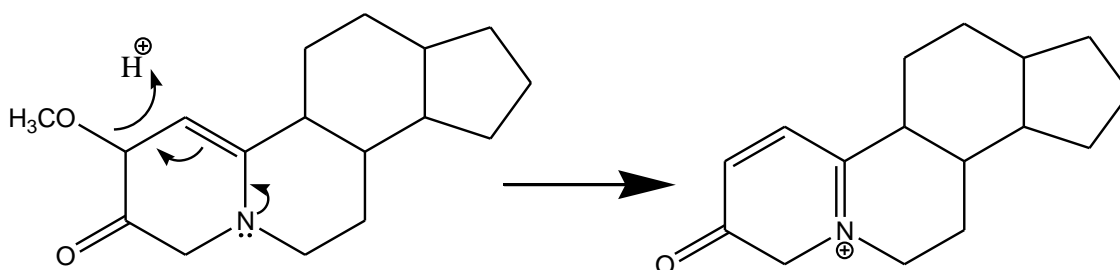
Uma possível estratégia é desenvolver análogos de esteroides com capacidade alquilante. Isto pode ser conseguido apenas através da adição de um nucleofugo conjugado com uma ponte dupla já existente na estrutura de um determinado esteroide, obtendo-se assim um sistema alílico. O colesterol **55**, um dos esteroides mais

abundantes, pode servir de exemplo a esta pequena alteração, pois possui uma ligação dupla que permite conjugação (Estrutura V-11).



Estrutura V-11 – Estrutura de um derivado de um esteroide, o colesterol, com capacidade alquilante.

No entanto também se pode proceder a alterações no esqueleto molecular básico dos esteroides de modo a obter-se um fármaco mais elaborado e mais seletivo. Uma das estratégias seria o desenvolvimento de um análogo de um esteroide, com um grupo funcional passível de ser ativado a um grupo alquilante, mais propriamente um aceitador de Michael, preferencialmente em ambiente ácido, o que lhe ia conferir alguma seletividade para tumores sólidos, por razões já anteriormente apresentadas. Uma molécula que, teoricamente, apresenta esta seletividade, assim como o seu mecanismo de ativação, é apresentada no Mecanismo V-5.



Mecanismo V-5 – Mecanismo de ativação de um análogo esteroide a um composto com capacidade alquilante por um mecanismo tipo-Michael.

Ao apresentar um grupo metoxi numa posição alílica o aceitador de Michael é facilmente formado, após uma protonação do nucleofugo, devido à conjugação existente na molécula. Apesar deste possível mecanismo de ativação, pela formação de um aceitador de Michael, a capacidade do carbono alílico ligada ao grupo metoxi também

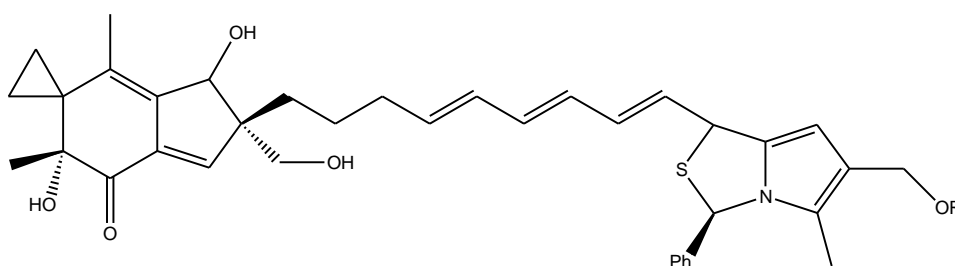
não é de desprezar, o que faz com que este tipo de moléculas apresente dois mecanismos de alquilação diferentes, mas ambas dependentes de um sistema conjugado.

V.6. Espaçadores multiconjugados

Os espaçadores, ou *linkers*, como o nome indica, podem ser entendidos como moléculas que atuam como uma “ponte”, ou seja, estabelecem a ligação intermédia entre duas outras moléculas. Este conceito tem sido explorado em Química Orgânica Farmacêutica de modo a desenvolver moléculas híbridas que contém na sua estrutura dois fármacos diferentes ligados por um espaçador, apresentando esta molécula combinada a atividade farmacológica de ambos os fármacos. (Pokrovskaya, 2009)

Olhando para este conceito de *linker*, e conhecendo os mecanismos reacionais pelos quais os dienos e trienos conjugados atuam no organismo humano, estes podem ser utilizados como espaçadores, não funcionando apenas em termos estruturais na molécula mas apresentando também uma atividade biológica própria, assim como aumentando a lipofilicidade das moléculas no qual são incorporados.

Relacionando os mecanismos pelos quais diversos fármacos exercem a sua citotóxicidade com as valências que um *linker* pode conferir a uma molécula em termos estruturais, os trienos e dienos conjugados podem assumir uma especial relevância positiva se funcionarem como *linker* entre duas moléculas de agentes alquilantes do DNA, podendo estas duas moléculas ser, ou não, do mesmo fármaco (Estrutura V-12).



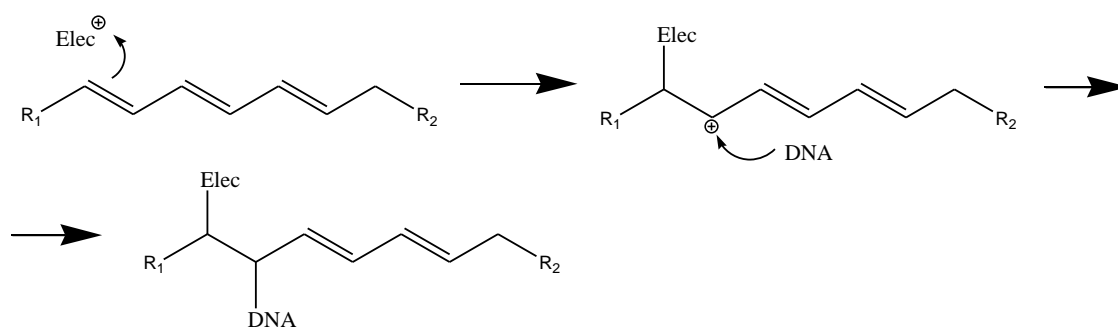
Estrutura V-12 – Estrutura de um potencial fármaco híbrido de dois alquilantes de DNA unidos por um espaçador multiconjugado.

Uma molécula híbrida deste tipo poderia formar um *cross-link* proporcionado pela “ponte” entre os dois agentes alquilantes. Por questões estruturais e espaciais, este *linker* iria constituir, por si só, um obstáculo à ação das enzimas envolvidas na replicação do DNA. Uma molécula com esta estrutura, dependendo dos agentes alquilantes incorporados nela apresentarem um mecanismo de alquilação mono ou

bifuncional, poderia formar até três *cross-links*, que como se sabem constituem os adutos mais tóxicos para as células.

Apesar da potencial utilidade deste último potencial mecanismo de ação, este constitui a visão mais simplista de como um *linker* constituído por um dieno, ou trieno conjugado, poderia desempenhar uma função importante em termos de toxicidade. Se levarmos em conta a reatividade dos sistemas conjugados, as potencialidades de um espaçador deste tipo desdobram-se numa maior panóplia de mecanismos de citotoxicidade possíveis.

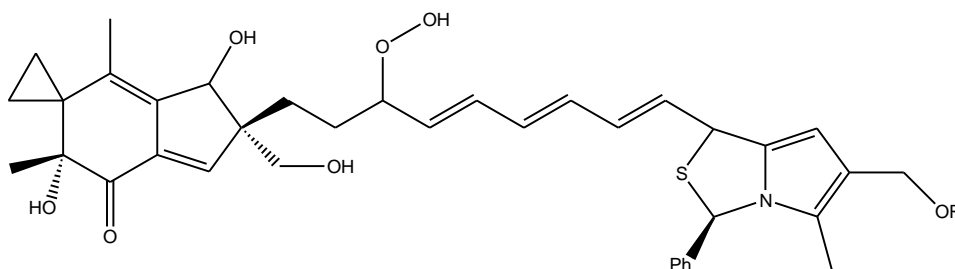
Como se sabe, um sistema multiconjugado apresenta uma reatividade elevada, principalmente na presença de eletrófilos. Assim um espaçador constituído por um sistema multiconjugado, como um dieno conjugado, em ambiente intracelular, poderia reagir com um eletrófilo endógeno de modo a formar um carbocátion, o que iria conferir ao espaçador uma atividade alquilante própria, por um mecanismo S_N1 (Mecanismo V-6).



Mecanismo V-6 – Alquilação do DNA por um espaçador multiconjugado, através de um mecanismo S_N1 . Este potencial alquilante pode representar uma mais-valia ao nível da inibição enzimática, assim como ao nível da alquilação do DNA, na medida em que aumenta o número de potências alquilações de um híbrido constituído por dois agentes alquilantes de DNA separados por um *linker*, constituído por um sistema multiconjugado.

Levando em conta a possibilidade de um trieno conjugado ser alvo de peroxidação no interior do organismo, não é de menosprezar que este tipo de espaçadores propostos, após peroxidação (Estrutura V-13), apresente atividade citotóxica por perturbarem a estrutura celular à imagem do que acontece no caso dos ácidos triénicos conjugados (IV.3.). Por outro lado, existe ainda outra possibilidade de ação destes compostos, relacionada com a peroxidação dos *linkers*. No caso de os agentes alquilantes ligados ao

espaçador estabelecerem adutos com DNA, o grupo hidroperóxido derivado da peroxidação do sistema conjugado, vai encontrar-se, obrigatoriamente, na proximidade do material genético. Como se sabe este grupo funcional não apresenta grande estabilidade podendo reagir por uma clivagem homolítica, dando lugar a um radical (Mecanismo III-14). Este radical pode então, por sua vez, devido à sua proximidade com a dupla cadeia de DNA, desencadear um processo de degradação do material genético por um mecanismo oxidativo.

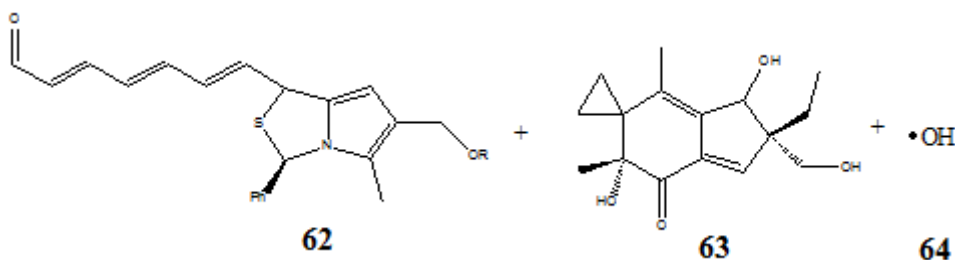


Estrutura V-13 - Estrutura de um hidroperóxido de um potencial fármaco híbrido de dois alquilantes de DNA unidos por um espaçador multiconjugado.

No entanto, o mecanismo de alteração de um *linker* multiconjugado por peroxidação lipídica não acaba na formação de um radical pela clivagem do grupo hidroperóxido, o que contribui para que potencialidade de um linker multiconjugado não se esgote também no último mecanismo de ação potencial apresentado.

De facto, o passo final da degradação de lípidos por peroxidação consiste na clivagem do lípido num aldeído α,β -insaturado **62**, uma outra cadeia contendo um radical **63** e ainda um radical hidroxil **64** (Mecanismo III-14). Fazendo o paralelo com a degradação do *linker* multiconjugado iriam obter-se uma separação entre os dois agentes alquilantes já que iria haver uma clivagem do espaçador. Apesar disto, esta clivagem poderia apresentar-se como benéfica já que, para além de se manterem as capacidades alquilantes dos dois agentes que faziam parte da estrutura inicial pois o esqueleto destes não seria minimamente afetado, se iria formar um aldeído α,β -insaturado que se encontraria ligado a um dos agentes alquilantes, conferindo-lhe assim uma nova possibilidade de ligação ao DNA o que, presumivelmente, aumentaria a toxicidade deste agente alquilante. Para além desta nova molécula, a outra fração proveniente da cisão da molécula inicial por peroxidação do *linker*, iria ser constituída por o outro agente alquilante, que também manteria o seu potencial de ação, acrescentado da valência de possuir um radical na sua estrutura, com todo o potencial de toxicidade celular a esta espécie associado, dada a

sua elevada reatividade. A formação de um radical hidroxí nesta reação de peroxidação, também poderia apresentar vantagens já que esta espécie, tal como o outro radical formado, também apresenta um carácter tóxico, por reagir facilmente com diversas moléculas endógenas. Os produtos resultantes da cisão do hidroperóxido são apresentados na Estrutura V-14.



Estrutura V-14 – Produtos da peroxidação de Estrutura V-13.

Apesar de estas moléculas poderem representar um acrescento importante em quimioterapia dadas as suas diversas potencialidades de ação, a sua utilidade em tumores sólidos seria de certa forma questionável, já que, devido à escassez de oxigénio, a peroxidação necessária para que estes fármacos apresentassem todos os seus mecanismos de toxicidade estaria comprometida.

VI. Conclusão

Os sistemas conjugados apresentam um grande leque de interações a nível orgânico, constituindo o principal grupo funcional de diversas moléculas com atividade biológica endógena marcada. Estes sistemas, cujas ligações se encontram deslocalizadas, são uma peça-chave nos mecanismos moleculares pelos quais se desenvolvem certas patologias, assim como nos mecanismos pelos quais determinados fármacos atuam.

Se o conhecimento da reatividade endógena dos sistemas conjugados de certas moléculas pode explicar a sua toxicidade, num puro sentido farmacológico, a modificação ou adição, de um sistema conjugado a um fármaco pode conferir-lhe novas valências farmacológicas e farmacocinéticas, ou potenciar os efeitos apresentados pela molécula não modificada.

Assim, na interceção entre os conhecimentos em Química Orgânica Farmacêutica sobre os sistemas conjugados, com as novas ferramentas, tanto em termos de equipamentos como de conhecimento, disponíveis a nível de Biologia Molecular, estudos de *docking* de moléculas e proteómica, as potencialidades dos sistemas conjugados podem constituir um elemento preponderante na modulação e desenvolvimento de fármacos.

VII. Bibliografia

- Aldini, G., & Granata, P. (2007). Effects of UVB Radiation on 4-Hydroxy-2-trans-nonenal Metabolism and Toxicity in Human Keratinocytes. *Chem. Res. Toxicol.* , 416-423.
- Annangudi, S., Deng, Y., & Gu, X. (2008). Low-Density Lipoprotein Has an Enormous Capacity To Bind (E)-4-Hydroxynon-2-enal (HNE): Detection and Characterization of Lysyl and Histidyl Adducts Containing Multiple Molecules of HNE. *Chem. Res. Toxicol.* , 1384–1395.
- Bachelier, A., Mayer, R., & Klein, C. D. (2006). Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , 5605–5609.
- Balkis, M., & Leidich, S. (2002). Mechanisms of Fungal Resistance. *Drugs* , 1025-1040.
- Barluenga, S., & Jogireddy, R. (2010). In Vivo Efficacy of Natural Product-Inspired Irreversible Kinase Inhibitors. *ChemBioChem* , 1692 – 1699.
- Begeman, P., Boysen, G., & Georgieva, N. (2011). Identification and Characterization of 2'-Deoxyadenosine Adducts Formed by Isoprene Monoepoxides in vitro. *Chemical Research in Toxicology* , 1048-1061.
- Brajtburg, J., & Powderly, W. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 183-188.
- Butterfield, D., & Lange, M. (2010). Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* , 924–929.
- Byrns, M. C., Vu, C. C., & Neidigh, J. W. (2006). Detection of DNA Adducts Derived from the Reactive Metabolite of Furan, cis-2-Butene-1,4-dial. *Chem. Res. Toxicol.* , 414-420.
- Cai, J., & Bhatnagar, A. (2009). Protein Modification by Acrolein: Formation and Stability of Cysteine Adducts. *Chem. Res. Toxicol.* , 708–716.
- Carey, F., & Sundberg, R. (2007). *Advanced Organic Chemistry PART A: Structure and Mechanisms*. Charlottesville, Virginia: Springer Science+Business Media, LLC.
- Cheng, A.-X., Lou, Y.-G., & Mao, Y.-B. (2007). Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology* , 179–186.
- Dai, W.-M. (2003). Natural Product Inspired Design of Eneidyne Prodrugs via Rearrangement of an Allylic Double Bond. *Current Medicinal Chemistry* , 2265-2283.
- de las Heras, B., & Rodriguez, B. (2003). Terpenoids: Sources, Structure Elucidation and Therapeutic Potential in. *Current Topics in Medicinal Chemistry* , 171-185.
- Delgado, E. (2005). Surgical replacement of the third eyelid gland in dogs. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* , 89-94.
- Denny, W. A. (2001). Prodrug strategies in cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* , 577–595.
- Eder, E., Dornbusch, K., & Fischer, G. (1987). The role of biotransformation in the genotoxicity of allylic compounds. *Archives of Toxicology* , 182-186.
- Eder, E., Kutt, W., & Deininger, C. (2001). On the role of alkylating mechanisms, O-alkylation and DNA-repair in genotoxicity of alkylating methanesulfonates of widely varying structures in bacterial systems. *Chemico-Biological Interactions* , 89-99.
- Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* , 779S-86S.

- Fouad, F., Wright, J., & Plourde II, G. (2005). Synthesis and Protein Degradation Capacity of Photoactivated Ene-diyne. *J. Org. Chem.* , 9789-9797.
- Gamboa da Costa, G., & Pereira, P. (2007). DNA Adduct Formation in the Livers of Female Sprague-Dawley Rats Treated with Toremifene or r-Hydroxytoremifene. *Chem. Res. Toxicol.* , 300-310.
- Gersch, M., & Kreuzer, J. (2012). Electrophilic natural products and their biological targets. *Nat. Prod. Rep.* , 659-682.
- Ghantous, A., & Gali-Muhtasib, H. (2010). What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today* .
- Hartl, D., & Jones, E. (2006). *Essential Genetics: A Genomics Perspective*. Jones and Bartlett Publishers.
- Hemminki, K. (1983). Nucleic Acid Adducts of Chemical Carcinogens and Mutagens. *Archives of Toxicology* , 249-285.
- Igarash, M., & Miyazawa, T. (2000). Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Letters* , 173-179.
- Janecki, T., Błaszczyk, E., & Studzian, K. (2005). Novel Synthesis, Cytotoxic Evaluation, and Structure-Activity Relationship Studies of a Series of r-Alkylidene- γ -lactones and Lactams. *J. Med. Chem.* , 3516-3521.
- Jordan, K., & Kasper, C. (2005). Chemotherapy-induced nausea and vomiting: current and new standards in the antiemetic prophylaxis and treatment. *European Journal of Cancer* , 199–205.
- Koprowska, K., & Czyż, M. (2010). Molecular mechanisms of parthenolide's action: Old drug with a new face. *Postepy Hig Med Dosw* , 100-114.
- Koutsourea, A., Fouteris, M., & Arsenou, E. (2008). Rational design, synthesis, and in vivo evaluation of the antileukemic activity of six new alkylating steroidal esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , 5207–5215.
- Kozekov, I., Turesky, R., & Alas, G. (2010). Formation of Deoxyguanosine Cross-Links from Calf Thymus DNA Treated with Acrolein and 4-Hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* , 1701-1713.
- Kuramochi, H. (1996). Conformational Studies and Electronic Structures of Tamoxifen and Toremifene and Their Allylic Carbocations Proposed as Reactive Intermediates Leading to DNA Adduct Formation. *J. Med. Chem.* , 2877-2886.
- Lawley, P., & Phillips, D. H. (1996). DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutation Research* 355 , 13-40.
- Lown, J. W. (1983). The mechanism of action of quinone antibiotics. *Molecular and Cellular Biochemistry* , 17 40.
- Lu, D., Sullivan, M. M., & Phillips, M. (2009). Degraded Protein Adducts of cis-2-Butene-1,4-dial Are Urinary and Hepatocyte Metabolites of Furan. *Chem. Res. Toxicol.* , 997–1007.
- Ma, G., Chong, L., & Li, Z. (2009). Anticancer activities of sesquiterpene lactones from *Cyathocline purpurea* in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* , 143–152.
- Malte Gersch, J., & Sieber, S. A. (2012). Electrophilic natural products and their biological targets. *The Royal Society of Chemistry* , 659-682.
- March, J., & Smith, M. B. (2007). *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms,*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- McMorris, T. (1999). Discovery and Development of Sesquiterpenoid Derived Hydroxymethylacylfulvene: A New Anticancer Drug. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , 881±886.

- McMorris, T., & Chimmani, R. (2007). Synthesis and antitumor activity of amine analogs of irifolven. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , 6770–6772.
- McMorris, T., Yu, J., & Lira, R. (2001). Structure-Activity Studies of Antitumor Agent Irofulven (Hydroxymethylacylfulvene) and Analogues. *J. Org. Chem.* , 6158-6163.
- Ochran, R., & Uggerud, E. (2007). Sn2 reactions with allylic substrates - Trends in reactivity. *International Journal of Mass Spectrometry* , 169-175.
- Okubo, T., Nagai, F., & Ushiyama, K. (1998). DNA cleavage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation caused by tamoxifen derivatives in vitro. *Cancer Letters* , 9–15.
- Pati, H., Das, U., & Sharma, R. (2007). Cytotoxic Thiol Alkylators. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* , 131-139.
- Pawłowicz, A., & Klika, K. (2007). The Structural Identification and Conformational Analysis of the Products from the Reaction of Acrolein with 2-Deoxycytidine, 1-Methylcytosine and Calf Thymus DNA. *Eur. J. Org. Chem.* , 1429–1437.
- Pawłowicz, A., & Kronberg, L. (2008). Characterization of Adducts Formed in Reactions of Acrolein with Thymidine and Calf Thymus DNA. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* , 177-188.
- Pawłowicz, A., & Kronberg, L. (2008). Characterization of Adducts Formed in Reactions of Acrolein with Thymidine and Calf Thymus DNA. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* , 177-188.
- Pawłowicz, A., & Munter, T. (2006). Formation of Acrolein Adducts with 2 ϵ -Deoxyadenosine in Calf Thymus DNA. *Chem. Res. Toxicol* , 571-576.
- Pillon, N., Vella, R., & Soulere, L. (2011). Structural and Functional Changes in Human Insulin Induced by the Lipid Peroxidation Byproducts 4-Hydroxy-2-nonenal and 4-Hydroxy-2-hexenal. *Chemical Research in Toxicology* , 752–762.
- Pokrovskaya, V. (2009). Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Fluoroquinolone-Aminoglycoside Hybrid Antibiotics. *J. Med. Chem.* , 2243–2254.
- Sahin, K., Sahin, N., & Kucuk, O. (2010). Lycopene and Chemotherapy Toxicity. *Nutrition and Cancer* , 988–995.
- Sakakura, A., Takayanagi, Y., & Kigoshi, H. (2002). Jolkinolide D pharmacophore: synthesis and reaction with amino acids, nucleosides, and DNA. *Tetrahedron Letters* , 6055–6058.
- San Pedro, J. M., Beerman, T., & Greenberg, M. (2012). DNA damage by C1027 involves hydrogen atom abstraction and addition to nucleobases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , 4744–4750.
- Scotti, M., Fernandes, M., & Ferreira, M. (2007). Quantitative structure–activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , 2927–2934.
- Shimozu, Y., & Shibata, T. (2009). Identification of Advanced Reaction Products Originating from the Initial 4-Oxo-2-nonenal-cysteine Michael Adducts. *Chem. Res. Toxicol* , 957–964.
- Shinohara, N., Tsuduki, T., & Ito, J. (2012). Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* , 980–988.
- Sigolo, C., & Di Mascio, P. (2007). Covalent Modification of Cytochrome c Exposed to trans,trans-2,4-Decadienal. *Chem. Res. Toxicol* , 1099–1110.
- Soares, M., Brito, A. F., & Laranjo, M. (2010). Chiral 6-hydroxymethyl-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles: Novel antitumor DNA monoalkylating agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 4676-4681.
- Streitwieser, A., Jayasree, E., Leung, S. S., & Choy, G. (2005). A Theoretical Study of Substituent Effects on Allylic Ion and Ion Pair Sn2 Reactions. *J. Org. Chem* , 8486-8491.

- Surh, Y.-J. (1998). Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfo-conjugation. *Chemico-Biological Interactions* , 221-235.
- Tachi, U. i., Dai, W.-M., & Tanabe, K. (2006). Synthesis and DNA cleavage reaction characteristics of enediyne prodrugs activated via an allylic rearrangement by base or UV irradiation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , 3199-3209.
- Tachi, Y., & Dai, W.-M. (2006). Synthesis and DNA cleavage reaction characteristics of enediyne prodrugs activated via an allylic rearrangement by base or UV irradiation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , 3199-3209.
- Thompson, C., & Burcham, P. (2008). Genome Wide Transcriptional Responses to Acrolein. *Chem. Res. Toxicol.* , 2245-2256.
- Toennes, S., Schmidt, K., & Fandiffo, A. (2002). A Fatal Human Intoxication with the Herbicide Allyl Alcohol (2-Propen-1-ol). *Journal of Analytical Toxicology* , 55-57.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & Biology* , 575-579.
- Tomasz, M., & Palom, Y. (1997). The Mitomycin Bioreductive Antitumor. *Pharmacol. Ther.* , 73-87.
- Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* , 318-343.
- Vander Heiden, M. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *DRUG DISCOVERY* , 671-684.
- Vasas, A., & Hohmann, J. (2011). Xanthane sesquiterpenoids: structure, synthesis and biological activity. *Nat. Prod. Rep.* , 824-842.
- Vollhardt, K. P., & Schore, N. (2002). *Organic Chemistry: Structure and Function*. Freeman.
- Vu, C. C., & Peterson, L. A. (2005). Synthesis of a 2 ϕ -Deoxyguanosine Adduct of cis-2-Butene-1,4-dial, a Reactive Metabolite of Furan. *Chem. Res. Toxicol.* , 1012-1017.
- Wang, J.-Y., Prorok, G., & Vaughan, W. (1993). Cytotoxicity, DNA cross-linking, and DNA single-strand breaks induced by cyclophosphamide in a rat leukemia in vivo. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* , 381-386.
- Xu, Y.-j., Xi, Z., & Zen, Y.-s. (1997). Mechanism of Formation of Novel Covalent Drug-DNA Interstrand Cross-Links and Monoadducts by Enediyne Antitumor Antibiotics. *Biochemistry* , 14975-14984.
- Yang, X.-L., & Wang, A. (1999). Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacology & Therapeutics* , 181-215.
- Zhu, P., & Lee, S. H. (2006). Characterization of a Lipid Hydroperoxide-Derived RNA Adducts in Rat Intestinal Epithelial Cells. *Chem. Res. Toxicol.* , 809-817.
- Zhu, X., & Sayre, L. (2007). Long-Lived 4-Oxo-2-enal-Derived Apparent Lysine Michael Adducts Are Actually the Isomeric 4-Ketoamides. *Chem. Res. Toxicol.* , 165-170.