

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVO CANDIDATO A FÁRMACO
ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS

AYLIME CASTANHO BOLOGNESI MELCHIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVO CANDIDATO A FÁRMACO
ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS**

AYLIME CASTANHO BOLOGNESI MELCHIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

ARARAQUARA - SP

2013

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais Jefferson e Evanir,
por serem meu ponto de apoio por toda a vida.*

*Por todas as palavras, todos os conselhos,
e amor incondicional ao longo desses anos.*

*Agradeço por todo o esforço e por tudo que abriram
mão para que eu pudesse chegar até aqui.*

Ao meu querido Fernando, amor da minha vida.

*Por todo companheirismo, compreensão e paciência ao
longo desses anos, não permitindo que eu desistisse.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho em muito se deve à colaboração e apoio de diversas pessoas, as quais transmito os mais sinceros agradecimentos:

À Deus e Nossa Senhora, em primeiro lugar, por terem me dado força, ânimo, sabedoria, discernimento e pela proteção por todos esses anos.

Aos meus pais, Jefferson e Evanir, pelo amor incondicional, compreensão, força, estímulo e participação em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

Ao meu amado Fernando, que esteve presente em todos os momentos, por todo amor, carinho, dedicação, ajuda, cuidado e paciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos pela atenção, paciência e ensinamentos durante todos os momentos da realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Paulo Renato Yamasaki, Thaís Melo, Priscila Longhin, Marcella Gabrielle, Luíz Dutra, Juliana Reis, Daniela Hartman, Rafael Chelucci, Diego Chiba, Carla Ferreira e Arthur Svendsen.

Ao técnico Mateus, agradeço a atenção, disponibilidade e toda a ajuda prestada sempre que necessário.

À seção de Graduação, especialmente ao Alexandre, pela ajuda, paciência e orientações.

Ao CNPq pela credibilidade no projeto, bolsa concedida e apoio financeiro.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Câncer.....	7
1.2 Desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos.....	11
1.3 Modificações moleculares.....	20
1.4 Planejamento estrutural.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5. CONCLUSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Resumo

As neoplasias são a segunda maior causa de mortes no mundo, ficando atrás apenas de doenças cardiovasculares. Os tumores sólidos representam uma das maiores dificuldades na terapia oncológica. Devido ao desequilíbrio que ocorre entre o consumo e o fornecimento de oxigênio para esses tecidos, desenvolve-se uma condição de hipóxia capaz de conferir resistência ao tumor contra terapias radioativa e químicas. Além disso, a hipóxia gerada nesses tecidos é capaz de induzir a transcrição de diferentes genes promovendo a formação de novos vasos para suprir a deficiência de oxigênio e nutrientes nestes tecidos. Nesse contexto, desenvolvemos no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (*Lapdesf*), uma molécula híbrida útil ao tratamento de tumores sólidos com mecanismo duplo de ação, a saber: a) citotoxicidade apenas em ambiente com baixa tensão de oxigênio (anaeróbio); b) inibição da angiogênese. As buscas de novos fármacos que apresentem mecanismo duplo de ação podem contribuir de maneira significativa no tratamento da doença, diminuindo a resistência das células tumorais ao tratamento. A nova molécula, sintetizada com rendimentos de 60%, foi purificada e caracterizada por infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Ensaios *in vitro* para caracterização da atividade biológica estão em andamento. Essa nova molécula apresenta, possivelmente, um novo mecanismo de ação e representa uma nova abordagem ao tratamento de tumores sólidos.

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados notificados em 2011 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 16% dos óbitos de causa conhecida (BRASIL, 2013). O relatório recentemente publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no ano de 2030 ocorrerão 27 milhões de casos de câncer e 17 milhões de mortes em decorrência da doença (BRASIL, 2011).

Nos países mais desenvolvidos, os tipos predominantes de câncer são de pulmão, mama, próstata e cólon, diferente de países em desenvolvimento, onde as neoplasias predominantes são de estômago, fígado, cavidade oral e colo de útero. Entretanto, ao longo dos anos tem se tornado cada vez mais difícil traçar padrões de tipos de neoplasias incidentes em países ricos e pobres, pois vem se observando uma diminuição dessa homogeneidade dentro desses grupos de países com aumento progressivo nos casos de câncer, que historicamente, não eram expressivos (BRASIL, 2011).

Como observado no mundo todo, o Brasil também tem passado por processo de transição em que podemos observar uma mudança no perfil de enfermidades populacional. As doenças infecciosas e parasitárias, desde os anos 1960, deixaram de ser a principal causa de morte dando lugar às doenças do sistema circulatório e neoplasias. Esse quadro é reflexo do envelhecimento da população, consequência de um intenso processo de urbanização, e das ações de promoção e recuperação da saúde (BRASIL, 2011).

Os tumores sólidos têm ganhado destaque entre as neoplasias por representarem um grande desafio para a medicina devido à sua resistência às terapias radioativas e químicas (HARRIS, 2001; AKAKURA et al., 2001; HOCKEL & VAUPEL, 2001; KRISHNAMACHARY et al., 2003; TSURUO et al., 2003). Tais tumores são formados por

células neoplásicas, vasos sanguíneos e interstício, uma matriz rica em colágeno que age como barreira entre as células neoplásicas e os vasos (JAIN, 1994). Inicialmente a vascularização tumoral ocorre de forma normal, suprindo as necessidades do tumor, entretanto, com o desenvolvimento tumoral os vasos não são capazes de fornecer oxigênio e nutrientes para todo o tecido, desenvolvendo regiões hipóxicas (MIYOSHI et al., 2006).

O desenvolvimento de tais regiões é responsável pelas características biológicas apresentadas pelo tumor (MIYOSHI et al., 2006). Sob baixa pressão de oxigênio ocorre ativação de vários fatores pró-angiogênicos como o fator induzido por hipóxia (HIF-1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (CONTI, 2013), capazes de induzir a formação de novos vasos e permitir o crescimento e proliferação tumoral.

À partir das características biológicas dos tumores sólidos, novos fármacos têm sido planejados na tentativa de se melhorar a atividade e seletividade, já que a hipóxia é condição apenas dos tecidos neoplásicos (KNOCKE, 1999; VAUPEL et al., 2003). Partindo-se disso, planejamos uma nova molécula híbrida formada por um derivado quinoxalínico, na tentativa de conferir à molécula citotoxicidade seletiva apenas às condições de hipóxia, e um núcleo ftalimídico na tentativa de conter a angiogênese tumoral.

1.1. Câncer

O câncer pode ser definido como uma doença onde células anormais, que passaram por várias mutações, se dividem de forma descontrolada (ZHAO, et al., 2011) desenvolvendo resistência contra apoptose, além de apresentarem habilidade de auto-renovação, característica normal às células tronco (MAROTTA & POLYAK, 2009). Além dessas características, a capacidade de invasão tecidual dos tumores é uma grande preocupação, pois através do

sangue e do sistema linfático o tumor consegue se espalhar pelo corpo desenvolvendo o estágio mais devastador e causador de morte no câncer: a metástase (ZHAO, et al., 2011).

Tumores em crescimento atingem um estágio em que o suprimento sanguíneo existente passa a ser insuficiente para suprir as necessidades metabólicas do tumor, ficando algumas áreas em condições de hipóxia, considerada quando a pressão de oxigênio em um tecido é menor que 5–10mmHg (HARRIS, 2001), condição esta bastante comum em tumores sólidos (LU & KANG, 2010).

Estudos *in vivo* demonstram que tumores sólidos humanos contêm regiões com tensão de oxigênio bastante diminuídas em relação aos níveis encontrados em tecidos saudáveis (KNOCKE, 1999; VAUPEL et al., 2003) e isso ocorre devido ao desequilíbrio entre o consumo e suprimento de oxigênio. Embora a condição de hipóxia seja tóxica tanto a células cancerígenas quanto a células saudáveis, as células cancerígenas são capazes de promover alterações genéticas e adaptativas que permitem sua sobrevivência, e até mesmo proliferação, nessa condição (HARRIS, 2001). Tal processo contribui para o caráter agressivo e malignidade do tumor. Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que a hipóxia tumoral induz, a angiogênese através do fator induzido por hipóxia (HIF 1), promovendo, entre outras ações, resistência contra quimioterapia e radioterapia, e evasão de processos apoptóticos. Esse conjunto de fatores favorece o caráter invasivo, conforme apresentado na Figura 1, e facilita a ocorrência de metástases (HARRIS, 2001; AKAKURA et al., 2001; HOCKEL & VAUPEL, 2001; KRISHNAMACHARY et al., 2003; TSURUO et al., 2003; LU, X., KANG, 2010).

A fisiologia de células tumorais em hipóxia está intimamente relacionada a alteração da expressão gênica sob condições deficientes de oxigênio. O fator induzido por hipóxia (HIF) é um fator de transcrição que desempenha um importante papel na expressão de vários genes em hipóxia (SEMENZA, 2000; ZHONG et al., 1999). A HIF-1 é uma proteína heterodimérica formada pelas subunidades α e β . Apesar da HIF-1 α e HIF-1 β serem

constitutivamente expressas, em condições de tensão normal de oxigênio, HIF-1 α é degradada rapidamente por prolil hidroxilases que utilizam o oxigênio como substrato para hidroxilar a proteína (LU & KANG, 2010). A HIF-1 α hidroxilada se liga ao complexo von Hippel-Lindau (VHL)-ubiquitina ligase que adiciona ubiquitina à ela, levando à sua degradação pela ação de proteossomos. Por outro lado, sob condições de hipóxia, a HIF-1 α encontra-se estável devido a falta de oxigênio (LU & KANG, 2010), e ocorre acúmulo de HIF-1 α , disponível para formar dímeros com a subunidade β . Esses dímeros são transportados até o núcleo, onde irão iniciar a transcrição gênica (MIYOSHI et al., 2006).

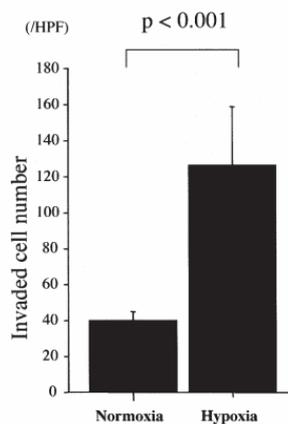


Figura 1. Avaliação da capacidade de invasão de células HepG2 sob condições normais de oxigênio e hipóxia (retirado de MIYOSHI et al., 2006)

A proteína HIF-1 regula a expressão gênica através da ligação ao elemento responsivo a hipóxia (HRE) de genes alvo e é capaz de induzir mais de 40 genes sob condições de hipóxia (SEMENZA, 2002), como o das enzimas glicolíticas aldolases A e C, de transportadores de glicose como GLUT-1 e GLUT-3 e de moléculas promotoras de angiogênese como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (SEMENZA, 2003). HIF-1 α também aumenta a secreção de enzimas e proteínas relacionadas à invasão e metástase tumoral. Inúmeros estudos têm demonstrado que a superexpressão de HIF-1 α está relacionada ao mal prognóstico de vários tipos de câncer (SEMENZA, 2003). Além disso, a

HIF-1 α é conhecida como molécula chave para a progressão tumoral em condições de hipóxia (MIYOSHI et al., 2006), sendo capaz de regular a adaptação metabólica em situações de privação de oxigênio e ativar a transcrição de genes envolvidos na angiogênese tumoral (CARMELIET, 1998).

O VEGF, importante fator ativado pelo HIF-1, desempenha um papel central na angiogênese tumoral (JENSEN et al., 2006; PLATE et al., 1992) através da interação com as angiopoetinas (Figura 2). As angiopoetinas, Ang-1 e Ang-2, interagem com o VEGF através de seus receptores de tirosina quinases, Tie-1 e Tie-2, e na presença do VEGF Ang-2 promove um aumento nos vasos sanguíneos (REISS et al., 2005).

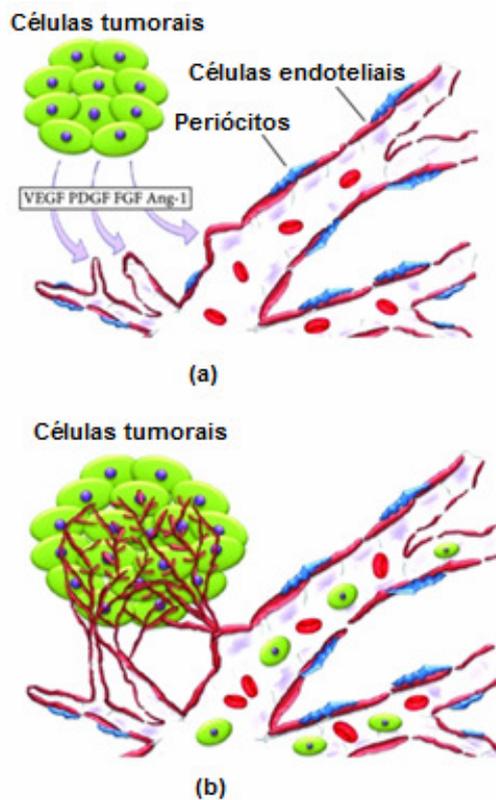


Figura 2. (a) Fatores pró-angiogênicos; (b) angiogênese tumoral e metástase. Ang-1, angiopoetina 1; FGF, fator de crescimento fibroblástico; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial (Adaptado de: CONTI et al., 2013).

Tais características fisiológicas dos tumores sólidos são diferenciadas entre as células sadias e as células tumorais e podem ser utilizadas como possíveis alvos terapêuticos no desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento de tumores sólidos.

1.2. Desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos

1.2.1 Fármacos seletivos à condições de hipóxia

Recentemente, pesquisadores perceberam que a hipóxia é característica comum e específica em tumores humanos. Baseado nessas diferenças fisiológicas tem se tentado desenvolver terapias que possuam como alvo a hipóxia tumoral (JAIN et al., 2006; CALABRESE et al., 2007), onde os compostos apresentem citotoxicidade apenas quando em ausência de oxigênio (LU & KANG, 2010). Apesar de todos os efeitos deletérios da hipóxia nas células, ela pode ser usada como uma ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos: sendo a hipóxia condição apenas das células tumorais, fármacos que apresentem citotoxicidade apenas nessas regiões podem ser capazes de matar as células tumorais deixando as células sadias intactas (AHN & BROWN, 2007).

Abaixo estão relacionados alguns exemplos de moléculas seletivas a condições de hipóxia.

1.2.1.1 Radiossensibilizadores

Sabe-se que os tecidos em hipóxia são mais resistentes à radiação ionizante que os tecidos normais. Isso se deve ao fato de que o oxigênio presente no meio reage com radicais livres liberados pela radiação formando espécies reativas capazes de promover a morte celular

(OLIVEIRA & ALVES, 2002). Sendo assim, no caso de tumores sólidos há uma diminuição do suprimento de oxigênio com conseqüente redução na eficácia da terapia radioativa (Figura 3).

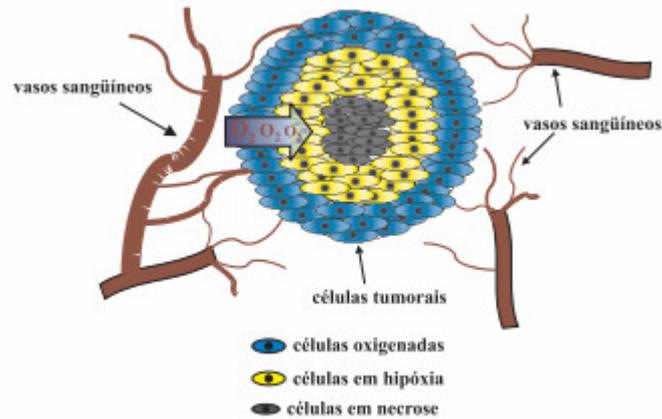


Figura 3. Ilustração da variação na concentração de oxigênio em tumores sólidos (Retirado de OLIVEIRA & ALVES, 2002)

Partindo-se disso, grupos de fármacos que mimetizem a ação danosa do oxigênio vêm sendo propostos com o intuito de aumentar a eficácia da terapia radioativa em tumores sólidos. As principais classes desses agentes são:

- Nitroimidazóis: Foram inicialmente usados como radiosensibilizadores mas posteriormente foi observado sua capacidade de causar morte celular independente da exposição à radiação. Um dos representantes dessa série é o metronidazol (Figura 4). Sabe-se que nitro aromáticos em ambientes anaeróbios são metabolizados em espécies reativas de nitrogênio aumentando o estresse oxidativo no meio levando a morte celular (TAYLOR & RAUTH, 1978).

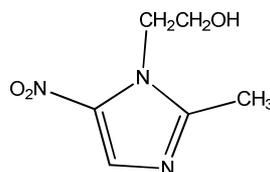


Figura 4. Estrutura química do metronidazol

- Derivados da platina: Representados pela cisplatina (Figura 5), agem no DNA e RNA através de ligações covalentes na estrutura tridimensional do material genético, impedindo sua duplicação (KATZ et al., 2009).

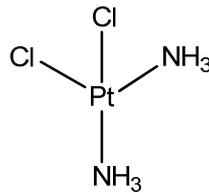


Figura 5. Estrutura química da cisplatina

1.2.1.2 Agentes antineoplásicos biorredutíveis

Em trabalho realizado por Sartorelli e colaboradores, foi proposto que células em hipóxia apresentariam maior capacidade redutora do que células normóxicas (LIN et al., 1972). Sendo assim, uma nova abordagem terapêutica poderia ser explorada com o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos que só se tornariam citotóxicos quando ativados por nitrorredutases celulares (LIN et al., 1972). Essas moléculas são portanto pró-fármacos, que *in vivo* são ativadas através do metabolismo celular tornando-se tóxicas (OLIVEIRA & ALVES, 2002). As principais classes de agentes biorredutíveis são:

- antibióticos contendo uma função quinona, tendo a mitomicina C (Figura 6) como principal representante (ROCKWELL et al., 1982);

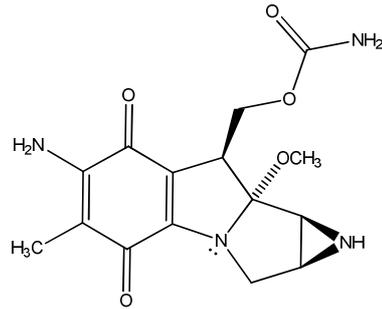


Figura 6. Estrutura química da mitomicina C

- nitroimidazóis sendo os mais expressivos da classe o metronidazol (Figura 4) e o misonidazol (Figura 7) (OLIVEIRA & ALVES, 2002);

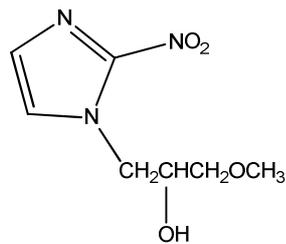


Figura 7. Estrutura química do misonidazol

- di-*N*-óxidos de benzotriazina representada pela tirapazamina (Figura 8) (ZEMAN et al., 1986).

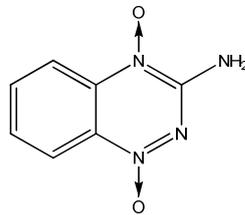


Figura 8. Estrutura química da tirapazamina.

1.2.1.3 Derivados quinoxalínicos

Os derivados quinoxalínicos apresentam várias propriedades biológicas de interesse na química medicinal, podendo ser destacadas as atividades antibacteriana, antiviral, anticâncer, antifúngica, anti-helmíntica e inseticida (CARTA et al., 2005).

Vários estudos demonstram o efeito antibacteriano das quinoxalinas 1,4-dióxidos (QdNO) e buscam explicar o seu mecanismo de ação. Até então acreditava-se que as QdNO agiam como inibidores da síntese de DNA, levando à morte bacteriana (SUTER et al., 1978; ENGLISH; DUNEGAN, 1970). De acordo com Suter e colaboradores, a enzima bacteriana QdNO redutase é necessária para a ativação de tais compostos (SUTER et al., 1978). Os pesquisadores utilizaram cepas de *Escherichia colimutants*, deficiente na função dessa enzima, que apresentou resistência às QdNO 30 vezes maior que a cepa selvagem. Além disso, relataram que a atividade bactericida das QdNO é muito maior em condições anaeróbicas, quando comparadas a condições aeróbicas. Em condições anaeróbicas a moléculas foi capaz de impedir completamente a síntese de DNA bacteriano(SUTER et al., 1978).

Em 1948, Iland segeriu que algumas quinoxalinas-1,4-dióxido poderiam ser usadas também para o tratamento da tuberculose (ILAND, 1948). Partindo do mesmo princípio, em 1999, Sainz e colaboradores sintetizaram uma nova série de derivados quinoxalínicos 1,4-dióxido substituídos e comprovou sua eficácia *in vitro*. Os resultados apresentados por Sainz mostram que alguns substituintes, como o cloro, nas posições 2, 3, 6 e 7 (Figura 9) podem aumentar a atividade tuberculostática dos compostos contra o *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, sendo que na concentração de 12,5 mg/mL a % de inibição de crescimento foi entre 72 e 100% (SAINZ et al., 1999).

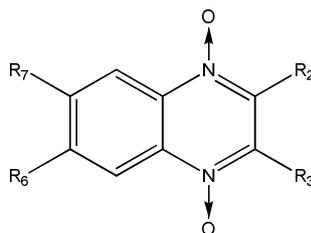


Figura 9. Estrutura química das quinoxalinas

Recentemente foi descoberta a ação das quinoxalinas-1,4-dióxido e de seus derivados reduzidos contra o *T. cruzi* (AGUIRRE et al., 2004). O nifurtimox e o benznidazol são os únicos fármacos atualmente disponíveis no mercado para tratamento da doença de Chagas, entretanto eles não são eficazes contra todas as cepas do *T. cruzi*. Os resultados encontrados foram bastante promissores: 33 QdNOs e seus compostos relacionados apresentaram atividade contra as formas epimastigota de duas cepas do parasita (cepas Brener e Tulahuen) (CARTA et al., 2005).

Apesar das várias atividades biológicas descritas, a atividade antitumoral é a mais promissora para uso das quinoxalinas. Especificamente para tumores em condições de hipóxia. Já é sabido, há mais de 50 anos, que baixos níveis de oxigenação, ou hipóxia, protegem as células contra a morte por Raios-X (HALEY et al., 1957; HALEY et al., 1959). A condição de hipóxia em tumores sólidos não é um problema apenas para a terapia radioativa mas também confere resistência à maioria das drogas anticâncer e, além disso, parece aumentar a metástase e acelerar a progressão tumoral (CARTA et al., 2005).

Suter et al., em 1978 sugeriu que a atividade seletiva em hipóxia das quinoxalinas 1,4-dióxido envolve a redução enzimática do composto (1) a intermediário instável (2) promovendo a liberação de espécies reativas de oxigênio (3) (Figura 10).

O radical (2) pode retirar diretamente átomos de hidrogênio da cadeia de DNA para formação do metabólito (3), liberando água, ou pode se fragmentar liberando radical hidroxila (agente de clivagem do DNA) e seu metabólito (3) (CARTA et al., 2005).

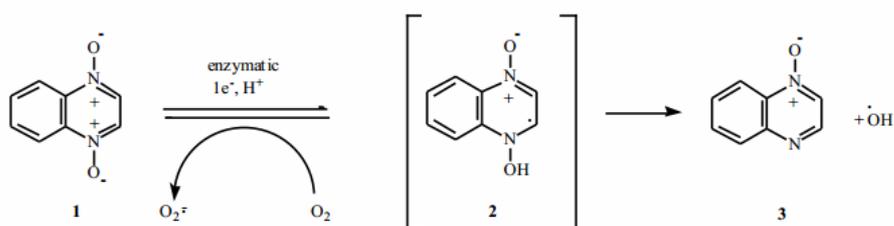


Figura 10. Redução enzimática das QdNO (retirada de CARTA et al., 2005).

Os autores sugerem que mesmo as QdNO substituídas, como as 3-aminoquinoxalina-2-carbonitrila 1,4-dióxido, exibem atividade seletiva contra células em hipóxia, podendo atuar como agentes causadores de danos ao DNA, ativados por redução sob condições fisiológicas adequadas (MONGE et al., 1995a; MONGE et al., 1995; ORTEGA et al., 2000).

Baseados no mecanismo de ação das QdNO descrito por Suter (SUTER et al., 1978) e na semelhança estrutural entre o núcleo da tirapazamima (TPZ) (Figura 7), já conhecida pela sua atividade contra tumores sólidos, e das quinoxalinas 1,4-dióxidos, Monge et al., em 1995 sintetizou e avaliou a toxicidade da série 3-aminoquinoxalina-2-carbonitrila-1,4-dióxido substituída nas posições 6 e 7 em células em hipóxia, sendo a mais seletiva a 6-cloro-3-aminoquinoxalina-2-carbonitrila-1,4-dióxido (Figura 11). Esse composto foi capaz de matar 60% das células tumorais sem afetar nenhuma célula sadia (MONGE et al., 1995).

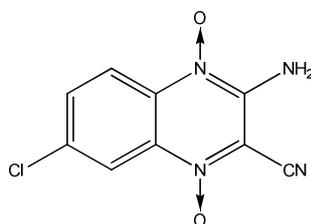


Figura 11. Estrutura química da 6-cloro-3-aminoquinoxalina-2-carbonitrila-1,4-dioxiido.

Ensaio de sobrevivência clonogênica, Matrigel, e radiosensibilização foram realizados *in vitro* e *in vivo*, utilizando células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) e de adenocarcinoma mamário EMT-6. Além da citotoxicidade seletiva em hipóxia apresentada

pelas quinoxalinas, o tratamento das células com compostos derivados de quinoxalina-1,4-dióxido mostrou que tais compostos são capazes também de inibir a secreção do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (GALIMUHTASIB et al., 2004).

Haug et al. (2005) demonstraram que a expressão de HIF-1 α está intimamente relacionada a expressão de VEGF, densidade de microvasos e o prognóstico de pacientes (HUANG et al., 2005): quanto maior a densidade de vasos, menor a sobrevida (LEON et al., 1996).

1.2.2 Fármacos inibidores da angiogênese

Além de se utilizar da situação de hipóxia propriamente dita como um possível alvo terapêutico, vários estudos mostram que um significativo avanço terapêutico no tratamento do câncer pode ser alcançado também através do uso de inibidores da angiogênese induzida pela privação de oxigênio nos tecidos (ESCUDIER et al., 2007; FAIVRE et al., 2007; HURWITZ et al., 2004; SANDLER et al., 2006).

As discussões sobre qual o mecanismo de ação exato dos fármacos anti-angiogênicos e se eles tem um efeito antitumoral direto continuam (GERSTNER & BATCHELOR, 2012). Inicialmente, a hipótese era de que os agentes antiangiogênicos agiam prevenindo a formação de novos vasos sanguíneos e destruindo os vasos tumorais já existentes, deixando o tumor em privação de oxigênio e nutrientes (FOLKMAN, 2007). Recentemente, outras evidências têm demonstrado uma importante ligação entre a angiogênese e células produzidas pela medula óssea. Monócitos e macrófagos são capazes de expressar VEGF sendo recrutados para os tumores, aumentando a expressão de VEGF e contribuindo para a angiogênese e crescimento tumoral (BARLEON et al., 1996; KERBER et al., 2008). Portanto, a supressão da síntese de

VEGF nas células medulares pode contribuir também para a desaceleração do crescimento tumoral (KERBER et al., 2008). Alguns representantes dessa classe de fármacos são sorafenibe (Figura 12), sunitinibe (Figura 13) e bevacizumabe, um anticorpo monoclonal (ESCUDIER et al., 2007; FAIVRE et al., 2007; HURWITZ et al., 2004; SANDLER et al., 2006).

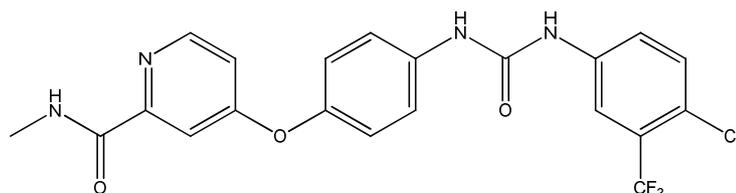


Figura 12. Estrutura química do sorafenibe

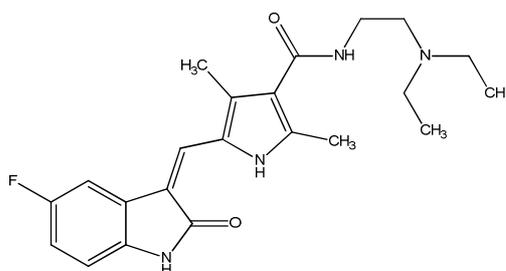


Figura 13. Estrutura química do sunitinibe

1.2.2.1 *Derivados ftalimídicos*

Outro fármaco conhecido por sua atividade antiangiogênica é a talidomida. Derivada do ácido glutâmico, a talidomida foi inicialmente desenvolvida como sedativo, sendo posteriormente descoberta sua atividade imunomodulatória, devido a sua capacidade em inibir TNF- α , e propriedade antiangiogênica (KUMAR & CHHIBBER, 2011) através da diminuição da ativação de receptores de VEGF e de FGF (SHORTT et al., 2013).

Os análogos da talidomida são fármacos imunomoduladores (IMiD) com um amplo espectro de aplicações e alvos moleculares. A própria talidomida apresenta eficácia clínica como anti-inflamatório e antineoplásico, sendo usada no tratamento de mielodisplasias e

mieloma múltiplo, em que apresentou resposta em mais de 30% de pacientes refratários. Entretanto, apesar de sua utilização já ser conhecida há várias décadas, o seu mecanismo exato ainda permanece indefinido (MOEHLER, 2012).

As diversas propriedades biológicas dos análogos da talidomida indicam que eles podem apresentar mecanismos de ação diferentes nas diferentes doenças e não podem ser utilizados de forma indiscriminada. O uso da talidomida é específico para determinadas neoplasias, o que sugere que seu alvo e mecanismo de ação variam e estão diretamente ligados à biologia de tais tumores susceptíveis ao fármaco (MOEHLER, 2012).

A talidomida e seus análogos têm demonstrado grande eficácia contra reguladores da angiogênese (MOEHLER, 2012). *In vivo*, a inibição de vários fatores pró-angiogênese como IL-6, TNF- α e VEGF, é evidência para comprovação da ação indireta da talidomida na supressão da angiogênese (CORRAL et al., 1999; FERGUSON et al., 2007; LU et al., 2009). Experimentos realizados com o objetivo de descobrir os mecanismos por trás da teratogenicidade da molécula apresentaram resultados indicando as propriedades antiangiogênicas do fármaco (D'AMATO et al., 1994).

1.3. Modificações moleculares

Entre os métodos de descoberta de novos fármacos a modificação molecular se mostra como uma das mais promissoras (WERMUTH, 2004). Entre os processos de modificação molecular destacam-se: hibridação, latenciação, bioisosterismo entre outros (SANTOS, 2009).

A hibridação é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em uma única molécula. Essa estratégia tem sido empregada para obtenção de diversos fármacos

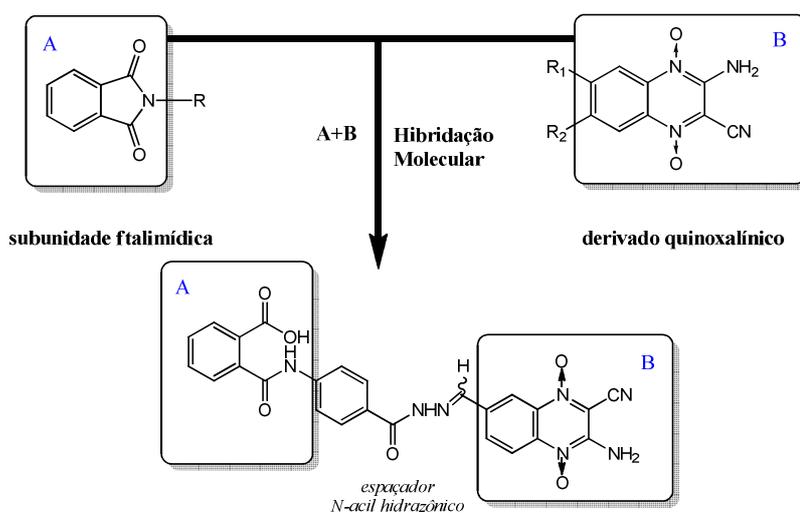
disponíveis no mercado e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos (STRUPEZEWSKI, 1991).

Alguns processos fisiopatológicos envolvidos na gênese de doenças podem, por suas características, sugerir a necessidade de se desenharem bioligantes ou protótipos onde sejam incluídas, na mesma molécula, propriedades farmacodinâmicas duplas ou triplas, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Neste caso, o desenho estrutural, baseado no mecanismo de ação, deve considerar fatores estruturais mais complexos, de maneira a assegurar à mesma molécula planejada o reconhecimento molecular por dois ou mais alvos terapêuticos, simultaneamente, aumentando a eficiência terapêutica.

1.4. Planejamento estrutural

Utilizando a estratégia de hibridação molecular foi planejada uma nova estrutura química contendo as subunidades farmacofóricas: a) do protótipo talidomida, representada pela inserção do núcleo ftalimídico (A); b) do derivado quinoxalínico (B) (Esquema 1).



Esquema 1. Planejamento estrutural do novo composto híbrido contendo a subunidade espaçadora *N*-acil hidrazona.

A subunidade ftalimídica (A), grupo farmacofórico principal para a ação moduladora direta sobre biossíntese de TNF- α (fator pró-angiogênese) da talidomida, foi mantida nos derivados planejados. A presença de R vizinho à subunidade ftalimídica nos compostos planejados (Esquema 1) permite explorar substituições mais adequadas para modulação da citocina TNF- α conforme dados de relação estrutura-atividade descritos na literatura (LIMA et al 2001). Além disso, com a subunidade ftalimídica, buscamos uma inibição do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) com consequente diminuição da vascularização e progressão tumoral.

A subunidade *N*-acil hidrazona presente nos derivados planejados foi utilizada como agente espaçador. Diversos relatos na literatura demonstram a importância dessa subunidade em compostos com atividade analgésica e anti-inflamatória. Dessa forma, esse espaçador poderia contribuir e agregar às atividades farmacológicas dos novos compostos híbridos (SILVA et al 2010; LIMA et al 2008; SILVA et al 2004; BARREIRO et al 2002; BARREIRO; FRAGA, 1999).

A subunidade quinoxalínica foi adicionada a nova molécula híbrida devido a sua capacidade em agir como causadora de danos ao DNA, ativados por redução apenas sob condições de hipóxia, sendo portanto seletiva. A molécula é capaz de retirar diretamente átomos de hidrogênio da cadeia de DNA e liberar espécies reativas de oxigênio apenas quando em situação de hipóxia, deixando as células saudáveis intactas (CARTA et al., 2005).

A identificação do protótipo é a etapa-chave para a descoberta da arquitetura molecular adequada para ação dos candidatos a fármacos. A fim de assegurar o perfil farmacodinâmico, e principalmente farmacocinético os substituintes devem ser racionalmente selecionados. Assim, neste trabalho pretende-se sintetizar um novo compostos híbridos mais potente e seguro no tratamento de tumores sólidos.

2 OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Este trabalho visa o planejamento e síntese de novo derivado quinoxalínico, desenhado usando a estratégia de hibridação molecular, úteis para o tratamento de tumores sólidos.

2.2. *Objetivos específicos*

- Síntese, purificação e caracterização estrutural dos intermediários sintéticos (I), (II) e (III).
- Síntese do composto híbrido 2-amina-6-((2-(4-(2-carboxibenzamida)benzoil)hidrazona)metil)-3-cianoquinoxalina 1,4-dioxido (IV).
- Purificação e caracterização estrutural do composto híbrido 2-amina-6-((2-(4-(2-carboxibenzamida)benzoil)hidrazona)metil)-3-cianoquinoxalina 1,4-dioxido (IV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Materiais (reagentes e solventes)*

- 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (Sigma Aldrich), acetato de etila (Quemis), ácido acético glacial (Synth), ácido clorídrico (Synth), anidrido ftálico (Sigma Aldrich), azida de sódio (Merck), diclorometano (Quemis), dimetilformamida (Quemis), dimetilsulfóxido (Vetec), EDC (Sigma Aldrich), etanol (Synth), éter etílico (Quemis), éter de petróleo (Synth), hexano (Synth), malononitrila (Sigma Aldrich), sílica gel para cromatografia em coluna 0,06-0,2 mm (Sigma Aldrich), sulfato de sódio anidro (Synth), tolueno (Synth) e trietilamina (Synth).

3.2. *Métodos Analíticos*

3.2.1. *Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.)*

Para acompanhamento das reações foi utilizada cromatografia em camada delgada (cromatofolhas de alumínio 20x20 cm Sílica gel 60 F254 0,2 mm de espessura - Merck)

3.2.2. *Espectrometria de RMN ¹H e ¹³C*

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), utilizando-se espectrômetro, Brüker, modelo Advance DPX300 operando a 300 MHz para ¹H e a 75 MHz para ¹³C.

3.2.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

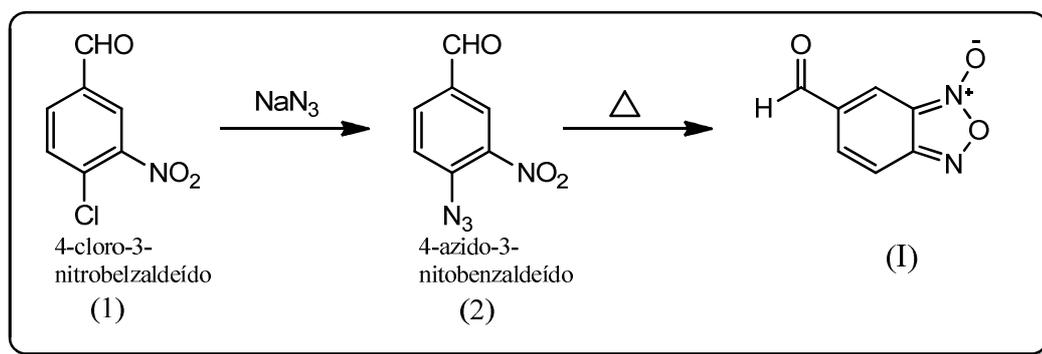
Os espectros de absorção no IV, na região de 4.000 a 400 cm^{-1} , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro Shimadzu, disponível no Laboratório de Química Farmacêutica da FCFAR-UNESP, Araraquara.

3.2.4. Ponto de Fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas, sem correção, em aparelho de Ponto de fusão capilar “Electrothermal”, disponível no Laboratório de Química Farmacêutica da FCFAR-UNESP, Araraquara.

3.3. Procedimentos de síntese

3.3.1. Síntese do derivado benzofuroxânico 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (I)



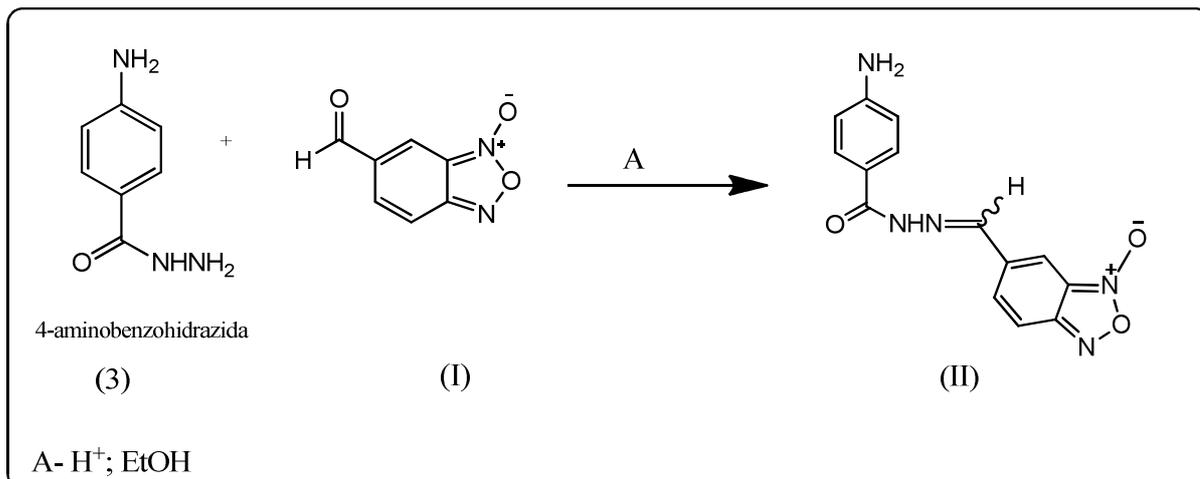
Uma solução em balão de 125 mL contendo 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (1) (10g; 0,054 mol) e 30 mL de dimetilsulfóxido foi aquecida a 75° C em banho de óleo. Atingida essa temperatura, foi retirado o banho e adicionada azida de sódio (3,53 g; 0,054 mol) em

pequenas porções para que a temperatura não ultrapassasse 80° C. Após adição completa da azida de sódio, a mistura reacional foi aquecida a 75° C durante 60 minutos. Posteriormente, adicionou-se gelo à mistura reacional e a fase aquosa foi extraída com porções de éter. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O produto 4-azido-3-nitrobenzaldeído (2) foi obtido e apresentou-se como um sólido amarelo acastanhado.

Posteriormente o produto foi dissolvido em 50 mL de tolueno e mantido sob aquecimento em sistema de refluxo 90 minutos. Em seguida, o solvente foi evaporado e o produto ressuspendido em 40 mL de acetato de etila, onde adicionou-se carvão ativado e filtrou-se a mistura. À solução resultante foi adicionado éter de petróleo para precipitação. O volume da solução foi reduzido em rotaevaporador e, posteriormente, adicionou-se novamente éter de petróleo e o produto foi deixado em meio refrigerado para que ocorresse sua precipitação. O isolamento do sólido formado (I) foi feito por filtração à pressão reduzida e deixado secar à temperatura ambiente.

O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando sílica como fase estacionária e diclorometano como fase móvel. As placas cromatográficas foram reveladas com o Revelador de Brad (2,4-dinitrofenilhidrazida) que cora em amarelo os grupos com a função aldeído.

3.3.2. Síntese do intermediário 4-amino-N'-((benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-il)metileno)benzo hidrazida(II)

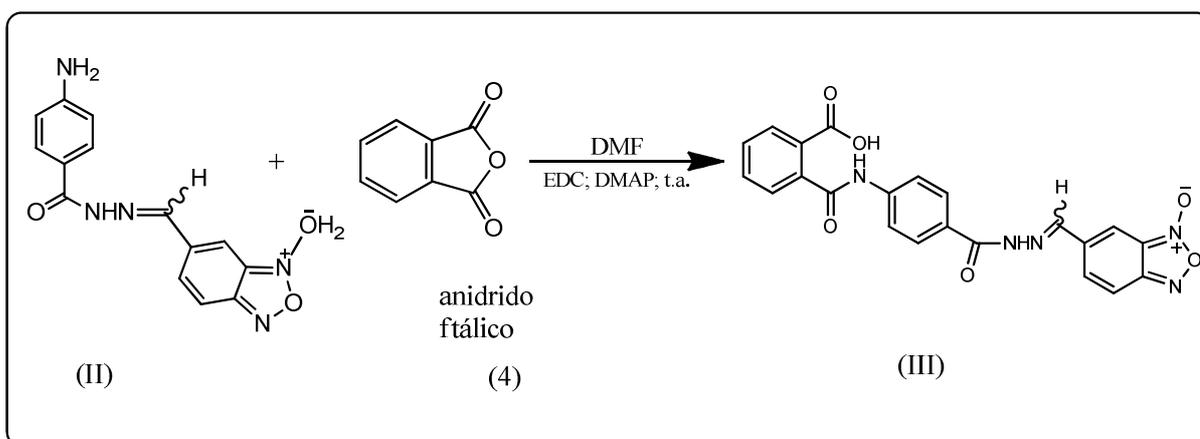


A reação de formação da hidrazona (II) acima foi realizada em meio etanólico, catalisado por ácido. Para tanto, foram adicionados quantidades equimolares de 6-formilbenzo[c]-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (I) (0,300 g; 0,0018 mol) e de 4-aminobenzohidrazida (3) (0,276 g; 0,0018 mol) em 15,0 mL de etanol, onde foram solubilizadas em um balão de fundo redondo de 150 mL, com posterior adição de (0,52 mL; 0,0036 mol) de ácido acético glacial, de modo que o pH da reação estivesse ajustado entre 4-5. Posteriormente, a mistura reacional foi colocada sob agitação constante à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 8 horas. Ao término da reação, realizou-se filtração sob pressão reduzida e lavagem do produto retido com água e pequena quantidade de etanol gelado, para a remoção de resquícios dos reagentes. O sólido obtido foi deixado secar a temperatura ambiente.

O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel 50% hexano e 50% acetato de etila, e sílica como fase estacionária. As placas cromatográficas foram reveladas utilizando-se como reagente revelador Iodo, portanto, tanto os compostos contendo a função hidrazida quanto o composto híbrido (II) obtido irão corar-se de amarelo, revelando seus diferentes fatores de retenção.

As placas cromatográficas também foram reveladas com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazida (Revelador de Brad) que cora em amarelo os grupos com a função aldeído.

3.3.3. Síntese do composto intermediário ácido 2-(4-((benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-il)metilenoaminocarbamoi) fenilcarbamoi) benzóico (III)



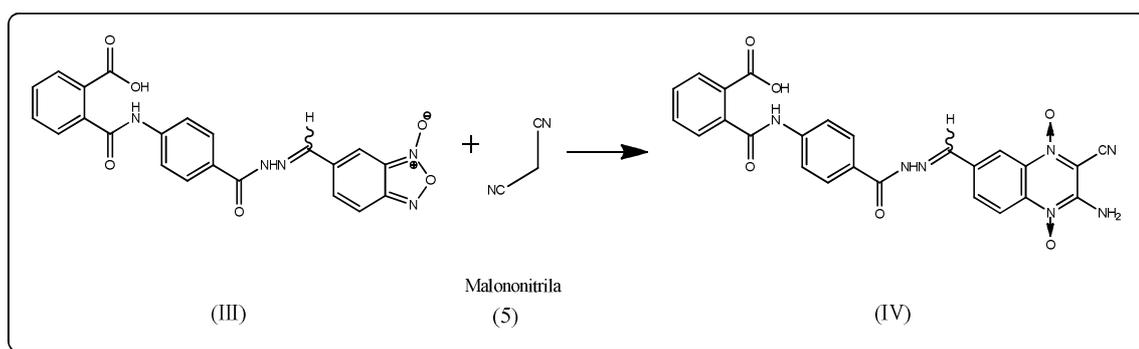
A reação de formação do composto híbrido (III) foi realizada em um balão de 125 mL, onde foram adicionados 0,300 g (0,001 mol) de 4-amino-*N'*-((benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-il)metileno)benzo hidrazida (II) em 10,0 mL de dimetilformamida anidro, seguido de (0,230 g; 0,0012 mol) de EDC (agente acoplante). À mistura reacional foram adicionados DMAP, como agente catalisador, e anidrido ftálico (4) (0,149 g; 0,001 mol). O sistema foi mantido sob agitação constante e à temperatura ambiente por 24 horas.

Ao término da reação, foi adicionado ao meio cerca de 20 mL de água destilada e 10 mL de HCl 0,5 M para favorecer a precipitação do produto.

O isolamento da mistura reacional foi feito por filtração simples, lavando-se o precipitado com água e etanol gelados, seguido de pequenas quantidades de acetato de etila e diclorometano, e deixado secar a temperatura ambiente.

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel 50% hexano e 50% acetato de etila e sílica como fase estacionária. As placas cromatográficas foram reveladas utilizando-se como reagente revelador Iodo. Portanto, tanto o composto intermediário (II) contendo a função hidrazona quanto o composto intermediário (III) obtidos, irão corar-se de amarelo revelando seus diferentes fatores de retenção.

3.3.4. Síntese do composto final 2-amina-6-((2-(4-(2-carboxibenzamida)benzoi)hidrazona)metil)-3-cianoquinoxalina 1,4-dioxido (IV).



A reação de formação do composto (IV) foi realizada em um balão de 125 mL, onde foram adicionados 6,68 g (15 mmol) de 2-(4-((benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-il)metilenoaminocarbamoil)fenilcarbamoil) benzóico (III) em 10,0 mL de dimetilformamida, e em seguida foram adicionados 1,19 g (18 mmol) de malononitrila (5). O sistema foi mantido em banho de gelo até que a mistura reacional atingisse 0°C, onde, gota a gota, foram adicionados 1,5 mL de trietilamina. Após completa adição, o sistema foi mantido sob agitação constante, protegido da luz, em atmosfera de nitrogênio e à temperatura ambiente por 24 horas. O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se sílica como fase estacionária e acetato de etila como fase móvel.

Ao término da reação, foi adicionado ao meio cerca de 20 mL de água destilada e 10 mL de HCl 0,5 M para provocar a precipitação do produto, que foi separado por filtração simples. O precipitado foi lavado com éter etílico e deixado secar a temperatura ambiente.

Após secagem, o produto foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como fase móvel acetato de etila, e apresentou-se como um pó vermelho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interpretação dos espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) dos compostos obtidos foi realizada baseando-se na referência de SILVERSTEIN et al., (2000) e a interpretação dos deslocamentos químicos por RMN dos derivados que apresentam o núcleo benzofuroxânico foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural dessas moléculas (CERECETTO et al., 1999; MONGE et al., 1993).

4.1. Composto I: 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol.

A síntese do anel benzofuroxano inicia-se na primeira etapa com uma reação de substituição nucleofílica aromática entre os reagentes 4-cloro-3-nitrobenzaldeído e o sal azida de sódio. A segunda etapa envolve o mecanismo de reação de eliminação com a saída do grupo abandonador para a obtenção do aldeído 4-azida-3-nitrobenzaldeído que por sua vez passará por uma etapa de aquecimento que promoverá um rearranjo molecular (ciclocondensação) com liberação de nitrogênio gasoso, obtendo-se assim o aldeído desejado. A figura 14 demonstra o mecanismo de obtenção do derivado benzofuroxânico.

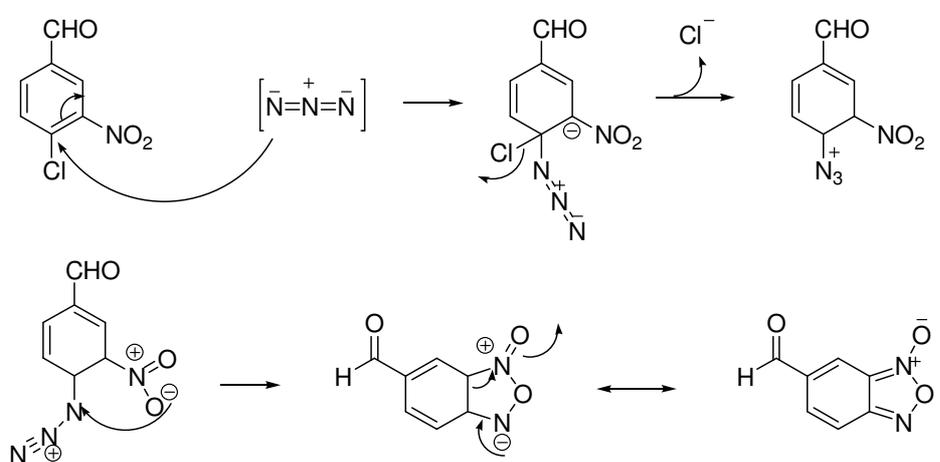
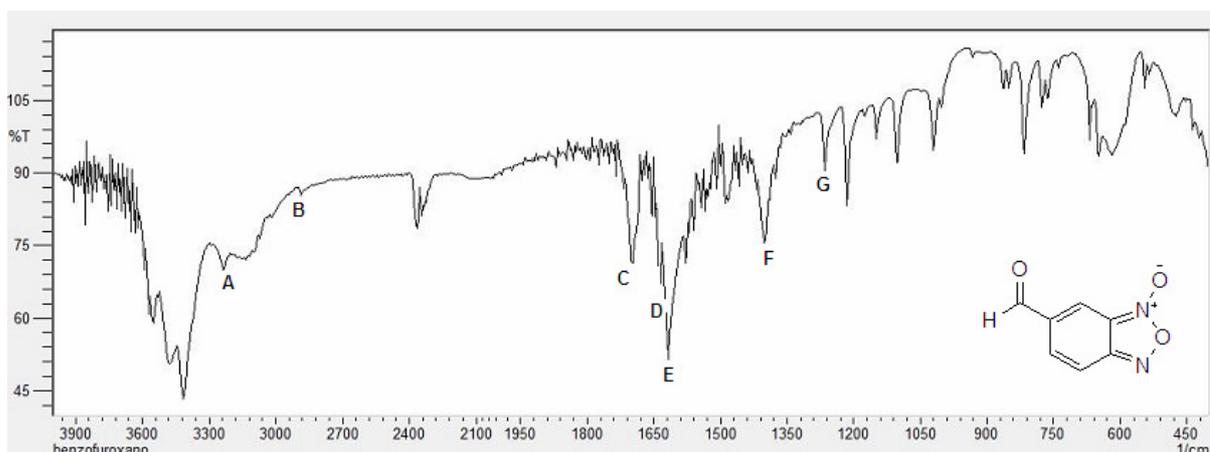


Figura 14. Mecanismo de formação do 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (I).

O produto obtido caracteriza-se por um sólido amarelo ouro, que foi identificado por C.C.D., apresentando fator de retenção ($R_f = 0,75$), $PM = 164,12 \text{ g/mol}$ ($C_7H_4N_2O_3$), faixa de fusão entre $66-68^\circ \text{ C}$ e rendimento de 78% .

4.1.1 Caracterização estrutural por Infravermelho

O espectro na região de infravermelho (Espectro 1) mostra os estiramentos axiais de C-H aromático em $3093,82 \text{ cm}^{-1}$ e de C-H do aldeído do derivado furoxânico em $2885,51 \text{ cm}^{-1}$. A banda de deformação axial da ligação C=O da carbonila do aldeído foi obtida em $1695,43 \text{ cm}^{-1}$, e o estiramento axial provocado pela ligação C=N da molécula é evidenciado em $1618,28 \text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN, 2006). Em $1400,32 \text{ cm}^{-1}$, observa-se o estiramento angular referente à ligação NO_2 , assim como a banda de deformação axial da ligação N-O em $1265,30 \text{ cm}^{-1}$.



Espectro 1. Infravermelho do 6-formilbenzo[c]-N-óxido-1,2,5-oxadiazol em pastilha de KBr.

Tabela 1. Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao composto (I) (KBr).

Marcador	V (cm ¹)	Grupo Funcional	Tipo de Deformação
A	3093,82	C-H (aromático)	Axial
B	2885,51	C-H (aldeído)	Axial
C	1695,43	C=O (aldeído)	Axial
D	1618,28	C=N	Axial
E	1400,32	NO ₂	Angular
F	1265,30	N-O	Axial

4.1.2 Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C)

O composto (I) possui seus sinais correspondentes bem representados nos espectros 2 e 3. O solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) foi utilizado para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H). A presença deste solvente pode ser observada, no espectro 2, obtido em δ 2,50 ppm e a água pertencente ao solvente em δ 3,32 ppm.

No espectro 3, observa-se o deslocamento referente ao hidrogênio da carbonila do aldeído apresentando-se como um singlete em δ 10,84 ppm. O hidrogênio 2 apresenta deslocamento químico em δ 8,45 e aparece como um dubleto, e os deslocamentos químicos em δ 7,77 e 7,89 ppm referem-se aos hidrogênios 5 e 4, respectivamente, aparecendo como um duplo-dubleto, no caso do hidrogênio 4, e como um singlete, no caso do hidrogênio 5, com constantes de acoplamento em J_{orto}=8,64 Hz e J_{meta} = 1,32 Hz.

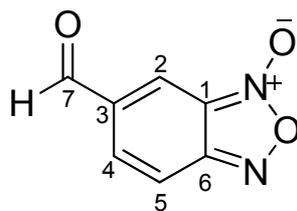
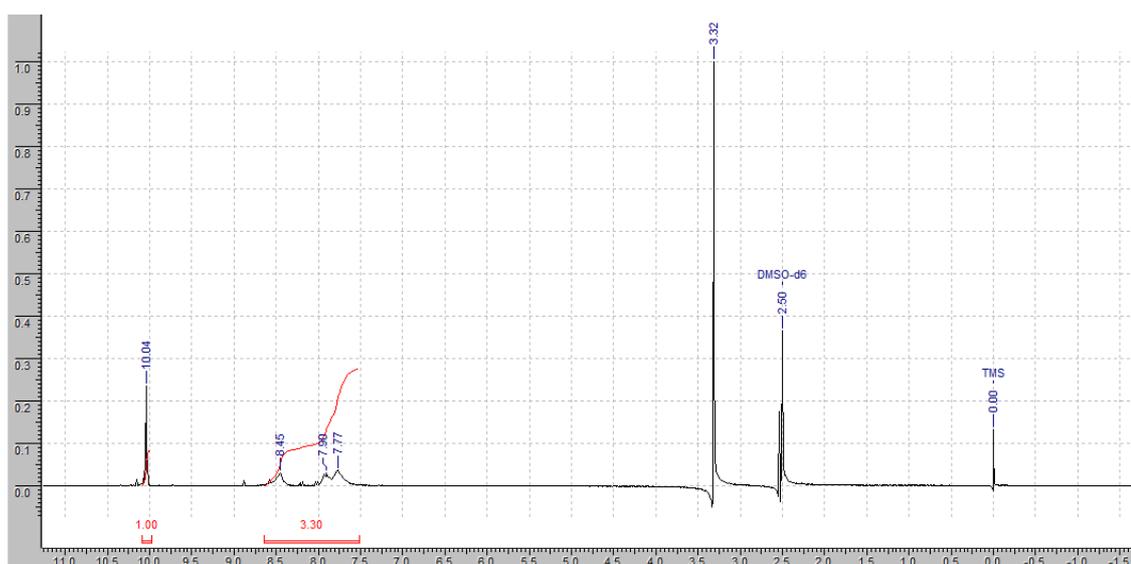
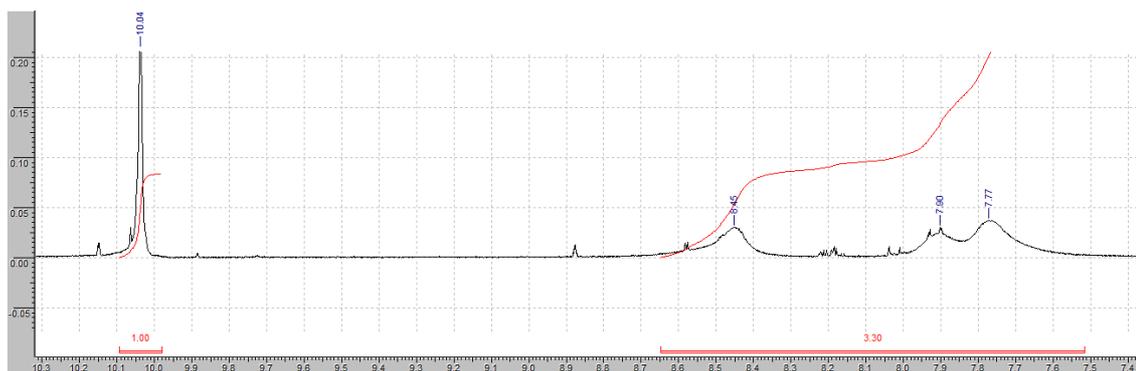


Tabela 2. Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H e constantes de acoplamento do composto (I).

RMN ^1H	δ (ppm)
H aldeído	10,84
H2	8,45
H4	7,89
H5	7,77



Espectro 2. Espectro de RMN ^1H do composto (I) (300 MHz; DMSOd6).

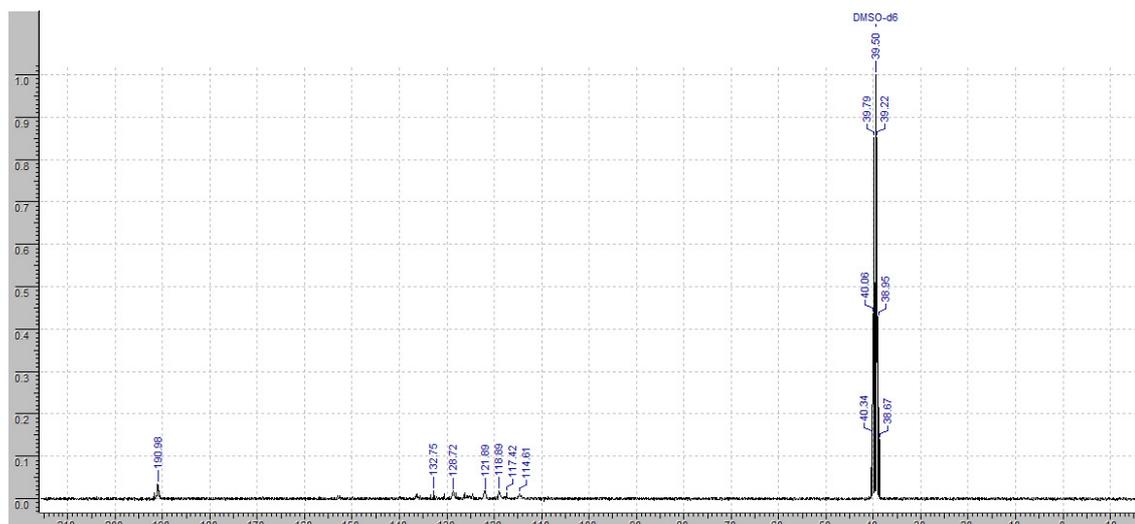


Espectro 3. Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto (I) (300 MHz; DMSO d_6).

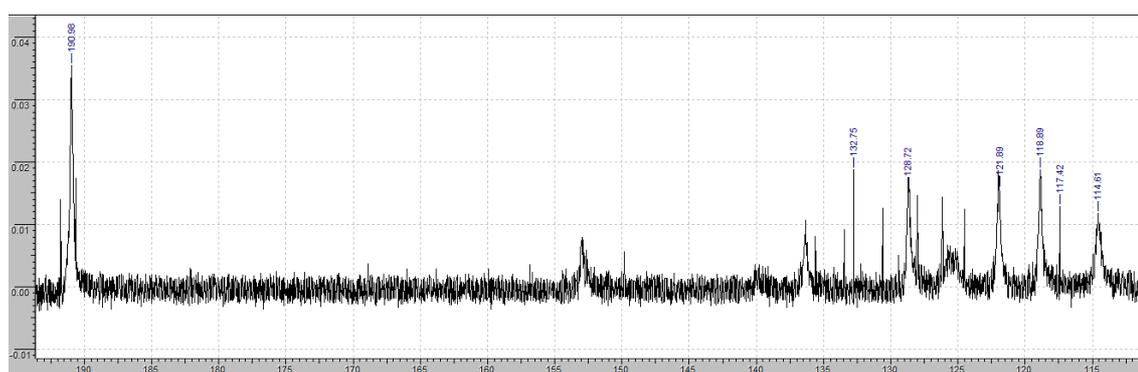
Os espectros 4 e 5 permitem-nos observar os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C . É possível visualizar o deslocamento químico do carbono 7, referente à carbonila do aldeído, em δ 190,98 ppm. O carbono C3 do anel aromático pode ser visualizado em 132,75 ppm, o carbono C2 em 128,72 ppm e os carbonos C4 e C5 em 118,89 e 121,89, respectivamente. É importante destacar os deslocamentos químicos em δ 117,42 e 114,61 atribuídos aos carbonos 6 e 1, respectivamente, referentes ao anel furoxânico.

Tabela 3. Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C do composto (I).

RMN C13 N°	δ (ppm)
C7	190,98
C3	132,75
C4	118,89
C5	121,89
C6	117,42
C1	114,61
C2	128,72



Espectro 4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto (I). (75 MHz; DMSO_d6).



Espectro 5. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do composto (I) (75 MHz; DMSO_{d6}).

4.2 Composto II: 4-amino-*N*'-((benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-il)metileno)benzohidrazida

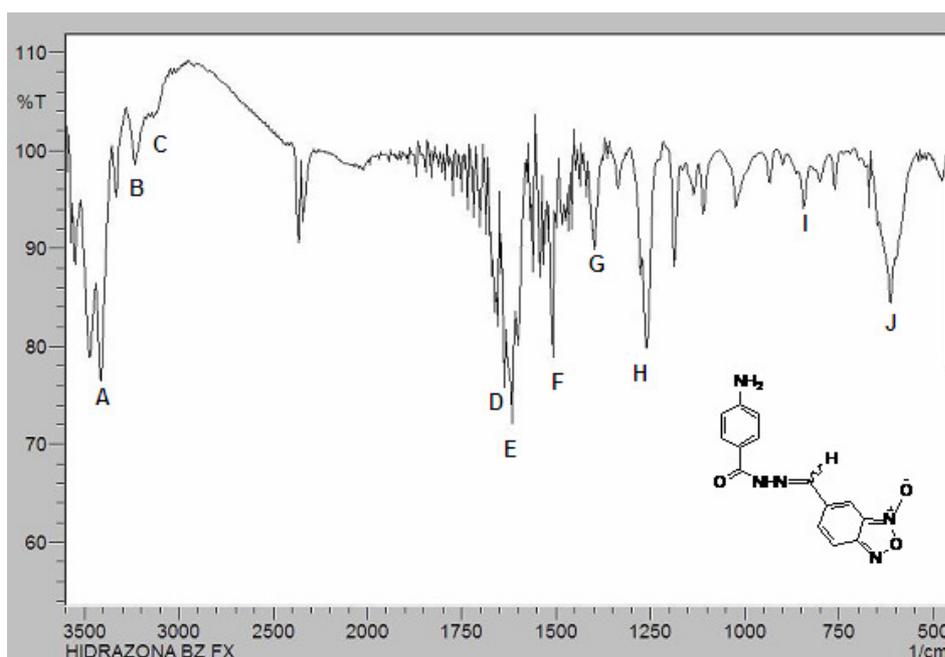
Os resultados das placas, quando coradas com o reagente de Brad (2,4-dinitrofenilhidrazida), mostraram que a função aldeído não estava presente no produto desejado, sugerindo a formação deste composto.

A molécula 4-amino-*N'*-((benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-il)metileno)benzo hidrazida (II), caracteriza-se por um sólido amarelo ouro, de PM = 297,27 g/mol (C₁₄H₁₁N₅O₃), faixa de fusão entre 227,2 - 227,8° C, fator de retenção (R_f = 0,30) e rendimento de 96 %.

4.2.1 Caracterização estrutural por Infravermelho

No espectro do infravermelho (Espectro 6) relativo ao composto da hidrazona (II), podem ser observados os estiramentos axiais da ligação N-H da amina *para* aromática em 3412,08 cm⁻¹. As bandas de deformações angulares em 669,30 e 763,81 cm⁻¹ representam a dissubstituição no anel aromático referente às posições 1 e 4 (orientação *para*).

O estiramento axial referente à carbonila C=O da amida apresenta-se em 1635,64 cm⁻¹ para o composto (II), assim como a banda de deformação axial em 1618,28 cm⁻¹ aponta a presença da ligação C=N do anel furoxânico, sugerindo que ocorreu a reação de formação deste composto. Observa-se ainda a banda de deformação axial referente à ligação N-O do derivado furoxânico em 1261,45 cm⁻¹.



Espectro 6. Infravermelho do composto 4-amino-*N'*-((benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-5-il)metileno)benzo hidrazida em pastilha de KBr.

Tabela 4. Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao Composto (II) (KBr).

Marcador	V (cm¹)	Grupo funcional	Tipo de Deformação
A	3412,08	N-H	Axial
B	3230,77	N-H (amida)	Axial
C	2922,16	C-H (aromático)	Axial
D	1654,92	C=O (amida)	Axial
E	1618,28	C=N	Axial
F	1508,33	NO ₂	Axial
G	1398,39	C-N	Axial
H	1261,45	N-O	Axial
I	763,81	Dissubstituição em anel aromático, posições 1,4	Angular
J	669,30	Dissubstituição em anel aromático, posições 1,4	Angular

4.2.2 Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H)

A hidrazona (II) possui seus sinais correspondentes bem representados no espectro 7. O solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) foi utilizado para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H).

Os deslocamentos químicos em δ 7,69 e 6,60 foram atribuídos aos hidrogênios 11 e 15, e aos hidrogênios 12 e 14, respectivamente, aparecendo como um duplo dubleto integrando para dois hidrogênios. O deslocamento em δ 7,69 corresponde aos hidrogênios em posição *orto* em relação ao grupamento amida (hidrogênios 11 e 15) e o deslocamento em δ 6,60 corresponde aos hidrogênios em posição *orto* em relação a amina livre (hidrogênios 12 e 14), indicando a presença de uma estrutura aromática 1,4 dissustituída. Esses hidrogênios estão simetricamente dispostos, ou seja, as distâncias e ângulos de ligação de cada hidrogênio em relação ao grupamento amida e em relação à amina livre são idênticos, possuindo assim mesma constante de acoplamento em $J_{orto}=8,0$ e $J_{meta}=2,0$.

No espectro ampliado (espectro 8), o deslocamento em δ 11,83 foi atribuído ao hidrogênio 8 e em δ 8,45 podemos visualizar o hidrogênio 7 da ligação imina da hidrazona (II), ambos aparecendo como singletos. Já em δ 5,87, podem ser visualizados os hidrogênios da amina livre aparecendo como singlete integrando para dois hidrogênios. Por fim, os hidrogênios 2, 5 e 4 do derivado benzofuroxânico aparecem como um multiplete com deslocamento químico em δ 7,9, integrando para três hidrogênios.

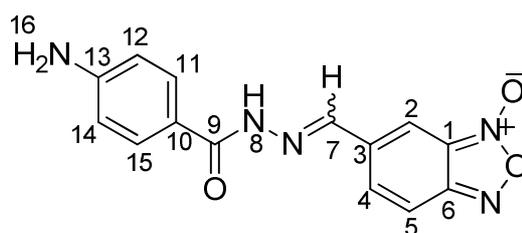
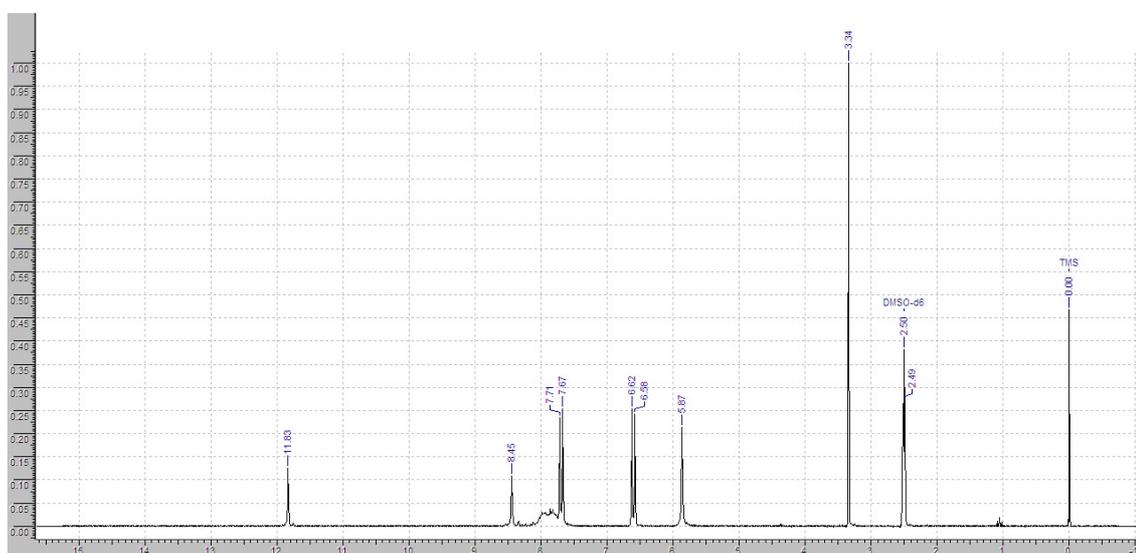


Tabela 5. Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H e constantes de acoplamento do composto (II).

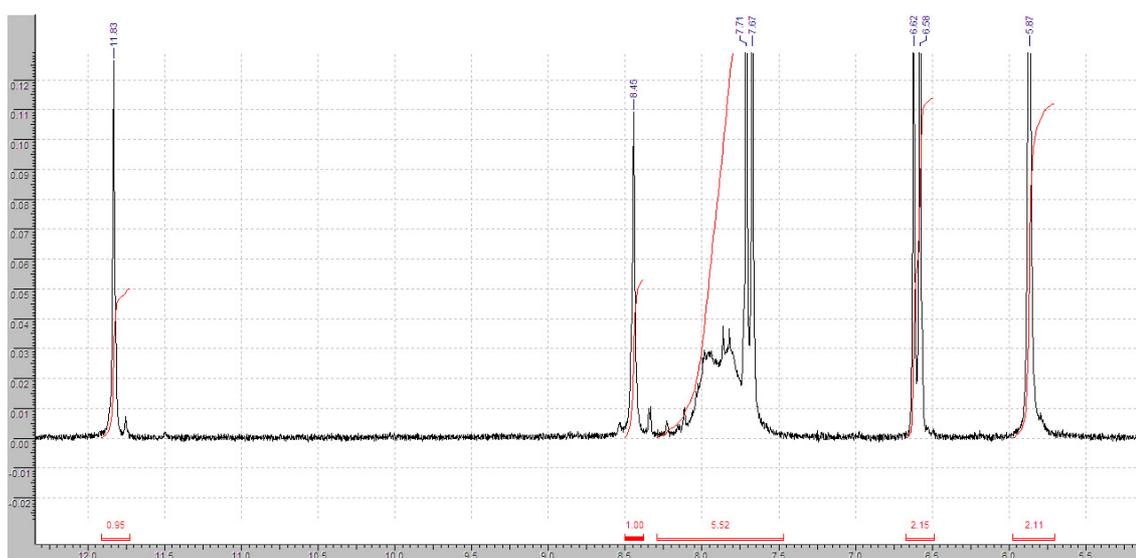
RMN H1	δ (ppm)
H2, H4 e H5	7,9 - 7,7
H7	8,45
H8	11,83

Continuação da Tabela 5.

H11 e H15	7,69
H12 e H14	6,60
H16	5,87



Espectro 7. Espectro de RMN de ^1H do composto (II), utilizando como solvente $\text{DMSO}d_6$.



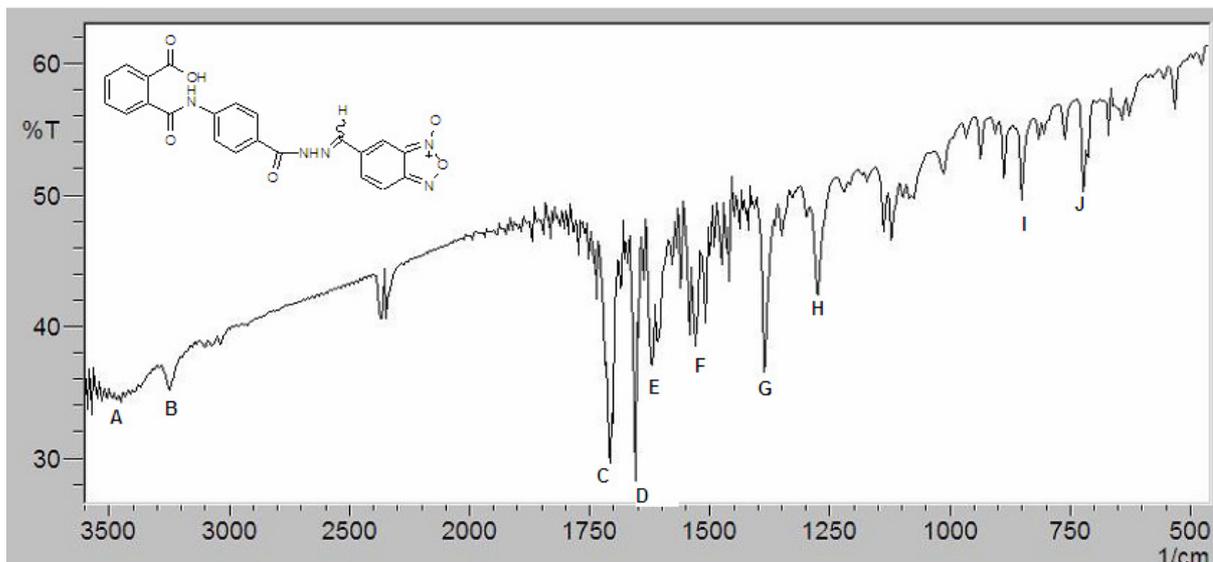
Espectro 8. Espectro de RMN ^1H ampliado entre as regiões δ 5,5 ppm e δ 12,0 ppm.

4.3 Composto III: ácido 2-(4-((benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-il)metilenoaminocarbamoil)fenilcarbamoil) benzóico

O composto híbrido obtido (III), o ácido 2-(4-((benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-il)metilenoaminocarbamoil)fenilcarbamoil) benzóico, é caracterizado por um pó amarelo claro cintilante, com faixa de fusão entre 283,2 - 283,8°C, PM = 445,38 g/mol (C₂₂H₁₅N₅O₆), não apresentou R_f (ficou retido) e rendimento de, aproximadamente, 50 %.

4.3.1 Caracterização estrutural por Infravermelho

No espectro do infravermelho (Espectro 9) relativo ao composto da hidrazona (III), pode ser observado o estiramento axial da ligação O-H do ácido carboxílico em 3446,79 cm⁻¹. O estiramento axial referente à carbonila C=O do ácido carboxílico também apresenta-se em 1707,00 cm⁻¹, assim como as bandas de deformação axial em 1654,92/1620,21 cm⁻¹ que apontam a presença da ligação C=O da amidas dessa hidrazona, sugerindo que ocorreu a reação de formação deste composto. Observa-se ainda a banda de deformação axial C=N da ligação imina do derivado furoxânico em 1618,28 cm⁻¹ no composto, assim como o estiramento axial referente à ligação N-O em 1386,82 cm⁻¹. Não foi possível visualizar neste espectro a banda de deformação referente ao anidrido ftálico que aparece entre 1865 - 1782 cm⁻¹.



Espectro 9. Infravermelho do ácido 2-(4-((benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-il)metilenoaminocarbamoil) fenilcarbamoil) benzóico em pastilha de KBr.

Tabela 6. Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao composto (III) (KBr).

Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de Deformação
A	3446,79	O-H	Axial
B	3248,13	N-H (amida)	Axial
C	1707,00	C=O (ácido carboxílico)	Axial
D	1654,92/1620,21	C=O (amida)	Axial
E	1618,28	C=N	Axial
F	1527,62	NO ₂	Axial
G	1386,82	C-N	Axial
H	1274,95	N-O	Axial
I	850,61	Dissubstituição em anel aromático, posições 1,4	Angular
J	721,38	Dissubstituição em anel aromático, posições 1,4	Angular

4.3.2 Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H)

A hidrazona (III) possui seus sinais correspondentes representados no espectro 10. O solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) foi utilizado para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H).

De acordo com o espectro 10, observa-se os deslocamentos químicos em δ 7,65 e 8,06 ppm referentes aos hidrogênios do anel aromático 1,4 dissustituído, apresentando-se como dois dubletos que integram para dois hidrogênios cada. Na região de δ 7,90 a 8,05 ppm podemos visualizar os hidrogênios do anel aromático contendo o grupo ácido e os hidrogênios do derivado furoxânico, aparecendo como dois multipletos. No espectro ampliado 11, pode ser observada com maior clareza a multiplicidade da região aromática, sendo pouco preciso definir os picos correspondentes a cada hidrogênio. No entanto, a integração dessa região mostra a presença de cerca de 7 átomos de hidrogênio, o que corresponde ao número de H dessa região aromática.

Ainda no espectro ampliado 11, em δ 12,30 ppm podemos visualizar o hidrogênio 16 e em δ 8,52 ppm podemos visualizar o hidrogênio 7 da ligação imina, ambos aparecendo como singletos. Vale ressaltar que neste mesmo espectro não foram observados, na região de δ 5,87 ppm, os hidrogênios da amina livre em singlete, sugerindo a formação do composto desejado. Por fim, os hidrogênios 2, 4 e 5 do derivado benzofuroxânico aparecem como um multiplete em 7,9, integrando para três hidrogênios.

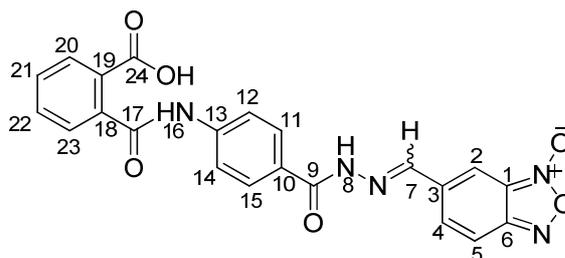
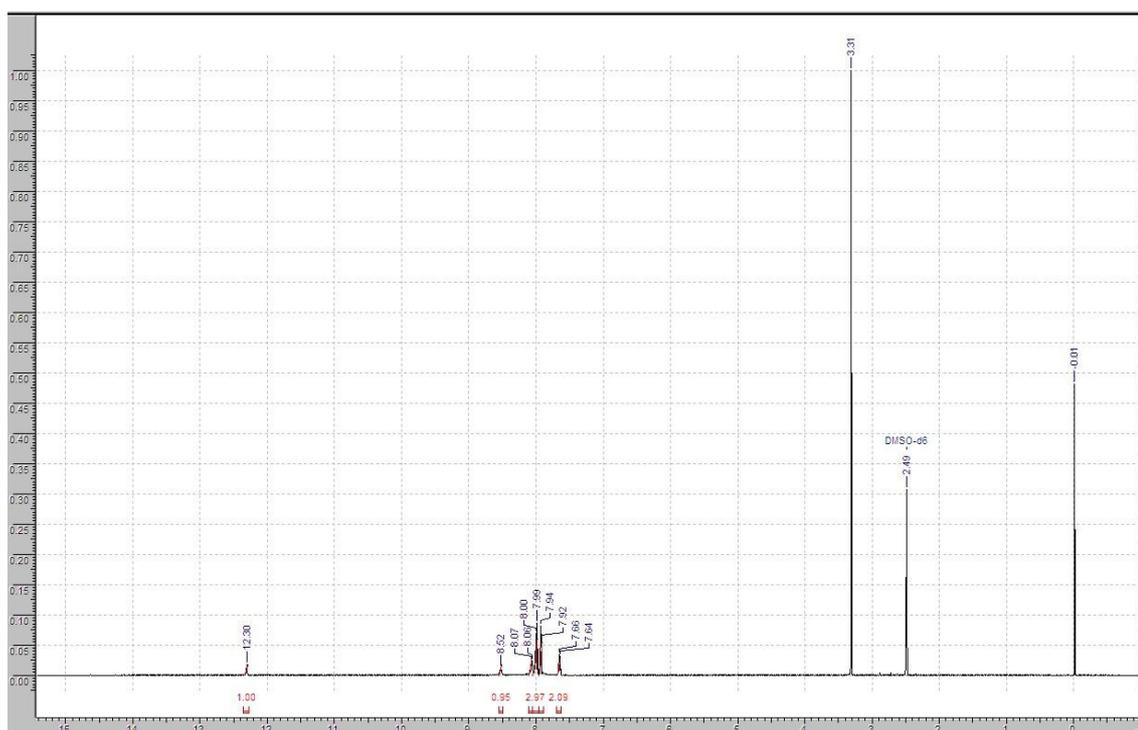
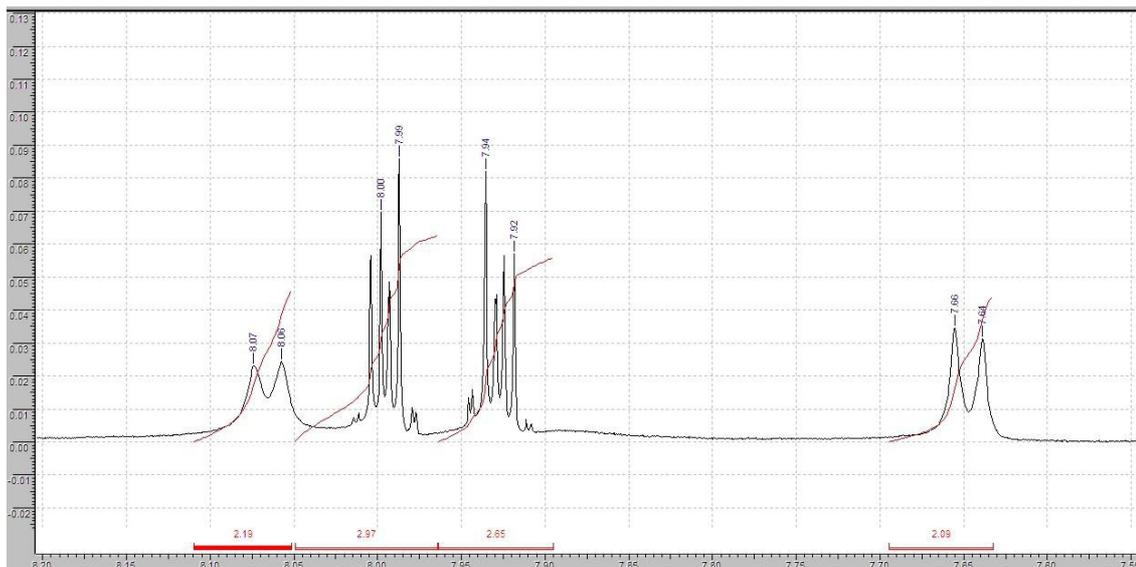


Tabela 7. Deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H e constantes de acoplamento do composto (III).

RMN H1	δ (ppm)
H2, H4, H5, H20, H21, H22 e H23	7,9 a 8,0
H12 e H14	7,65
H11 e H15	8,06
H16 e H8	12,30
H7	8,52



Espectro 10. Espectro de RMN de ^1H do composto (III), utilizando como solvente DMSO d_6 .

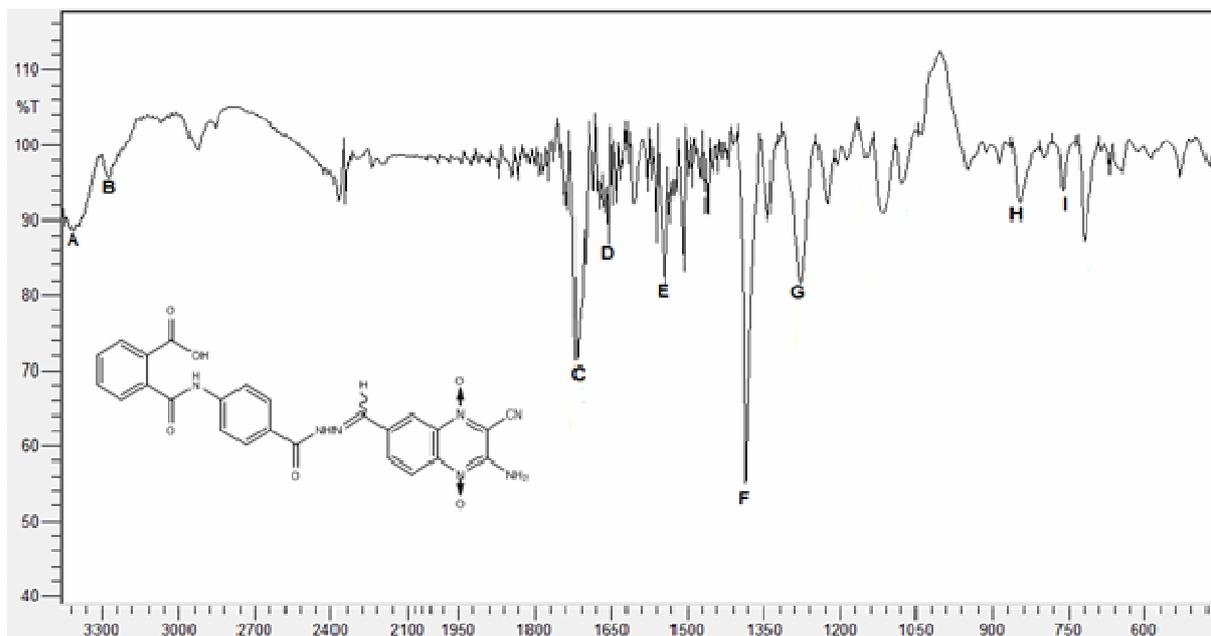


Espectro 11. Espectro de RMN ^1H ampliado entre as regiões δ 7,55 - δ 8,20 ppm.

4.4 CompostoIV: 2-amina-6-((2-(4-(2-carboxibenzamida)benzoi)hidrazona)metil)-3-cianoquinaxalina 1,4-dioxido

4.4.1 Caracterização estrutural por Infravermelho

No espectro do infravermelho (Espectro 12) relativo ao composto híbrido (IV), pode ser observado o estiramento axial da ligação O-H do ácido carboxílico em $3427,51\text{ cm}^{-1}$. O estiramento axial referente à carbonila C=O do ácido carboxílico também apresenta-se em $1718,58\text{ cm}^{-1}$, assim como a banda de deformação axial em $1653,00\text{ cm}^{-1}$ que apontam a presença da ligação C=O da amida desse composto. Observa-se ainda a banda de deformação axial C=N do derivado furoxânico em $1541,12\text{ cm}^{-1}$ no composto, assim como o estiramento axial referente à ligação C-N (aromático) em $1384,89\text{ cm}^{-1}$ e à ligação C-N (alifático) em $1276,88\text{ cm}^{-1}$.



Espectro 12. Infravermelho do 2-amino-6-((2-(4-(2-carboxibenzamida)benzoi)hidrazona)metil)-3-cianoquinaxalina 1,4-dioxido em pastilha de KBr.

Tabela 8. Bandas de absorção do espectro no infravermelho relativos ao composto (IV) (KBr).

Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Tipo de Deformação
A	3427,51	O-H	Axial
B	3275,13	N-H (amida)	Axial
C	1718,58	C=O (ácido carboxílico)	Axial
D	1653,00	C=O (amida)	Axial
E	1541,12	C=N	Axial
F	1384,89	C-N (aromático)	Axial
G	1276,88	C-N (alifático)	Axial
H	846,75	Dissubstituição em anel aromático, posições 1,4	Angular

Continuação da Tabela 8.

I	761,88	Dissubstituição em anel aromático, posições 1,2	Angular
----------	--------	---	---------

4.4.2 *Caracterização estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H)*

O derivdo quinoxalínico (IV) possui seus sinais correspondentes representados nos espectros 13 e 14. O solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) foi utilizado para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H).

De acordo com o espectro ampliado 14, observa-se os deslocamentos químicos em δ 7,65 e 7,48 ppm referentes aos hidrogênios do anel aromático 1,4 dissubstituído e em δ 7,93 e 8,0 referentes aos hidrogênios do anel aromático contendo o grupo ácido, aparecendo como duplos dupletos.

Ainda no espectro ampliado (espectro 14), em δ 8,31 ppm podemos visualizar o hidrogênio 7 da ligação imina, aparecendo como singlete e os hidrogênios 2 e 5 do derivado benzofuroxânico aparecem em δ 8,64 e 8,5, respectivamente, integrando para dois hidrogênios. Por fim, em δ 8,08 podemos visualizar o deslocamento químico referente à amina primária do anel quinoxalínico, sugerindo a formação do composto desejado.

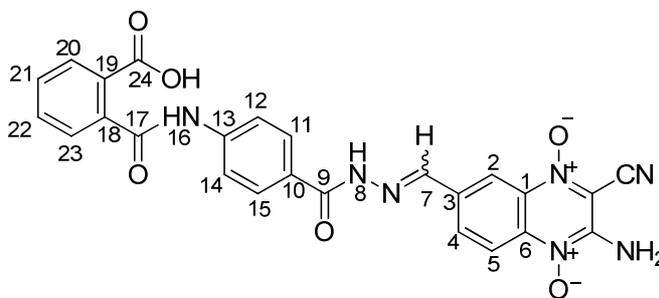
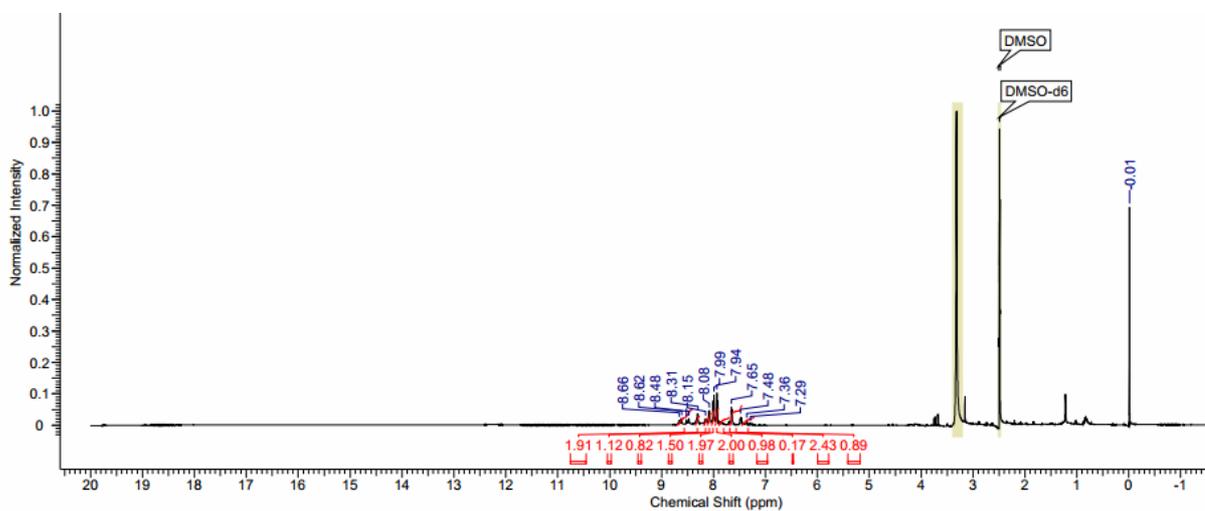
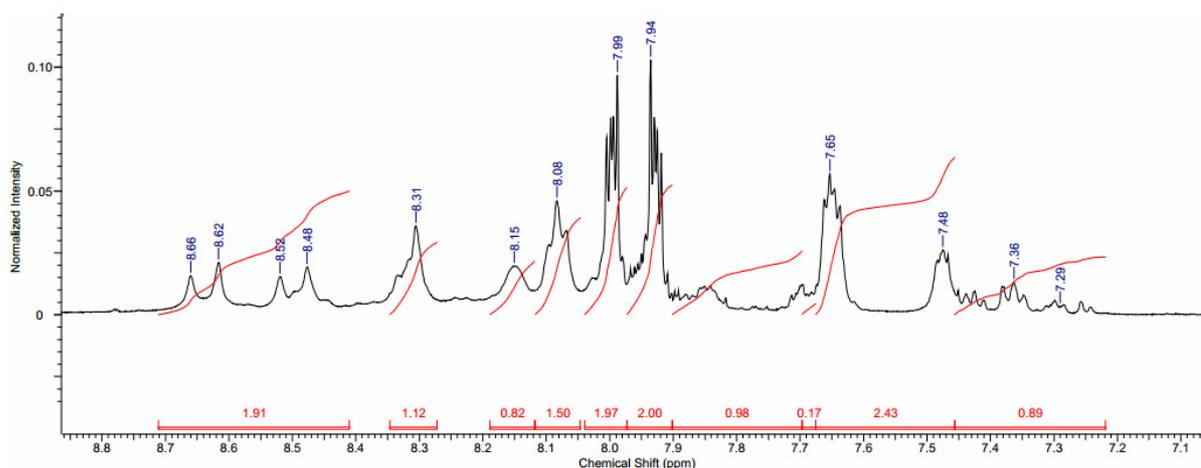


Tabela 9. Deslocamentos químicos no espectro de RMN H1 e constantes de acoplamento do composto (IV).

RMN H1	δ (ppm)
H hidroxila	8,15
H _{amina primária}	8,08
H2	8,64
H5	8,5
H7	8,31
H11 e H15	7,48
H12 e H14	7,65
H20 e H22	7,93
H21 e H23	8,0



Espectro 13. Espectro de RMN de ¹H do composto (IV), utilizando como solvente DMSOd6.



Espectro 14. Espectro de RMN ^1H ampliado entre as regiões δ 6,5 - δ 9,5 ppm.

A Tabela 10 compara os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^1H .

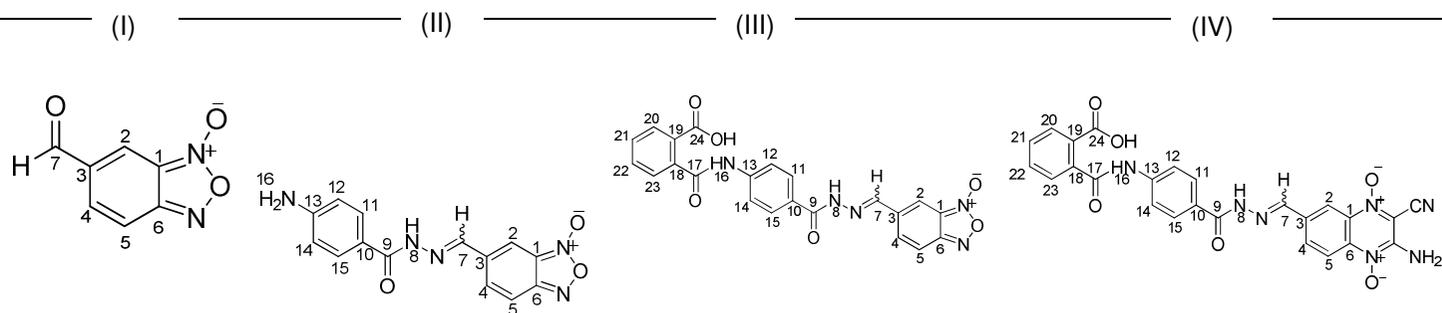
Diante dos deslocamentos químicos visualizados nos espectros, é importante destacar a diferença de deslocamento do hidrogênio do aldeído do produto de partida em relação aos compostos obtidos. Essa diferença é atribuída à presença do hidrogênio da imina, formada a partir da reação de um aldeído com uma amina primária previamente selecionada. Observamos o desaparecimento do hidrogênio do aldeído em δ 10,84 e a presença dos deslocamentos em δ 8,45, δ 8,52 e δ 8,31 referentes aos hidrogênios da imina dos compostos II, III e IV respectivamente, sugerindo a formação dos produtos desejados.

Vale ressaltar que não foi possível observar os hidrogênios da amina livre do composto II na região de δ 5,87 ppm. Além disso, é importante destacar o deslocamento químico dos hidrogênios 12 e 14, que no composto II apresentaram um sinal em δ 6,6 e nos compostos III e IV o mesmo sinal apresentou um deslocamento químico em δ 7,65. Essa diferença de deslocamento é atribuída à reação do composto II com anidrido ftálico o que levou a formação de uma amina secundária em ambos os compostos (III e IV). Com relação ao composto IV, observa-se um deslocamento químico em δ 8,08 referente ao hidrogênio da amina primária do anel quinoxalínico. Monge e colaboradores (1993) sintetizaram e

caracterizaram derivados quinoxalínicos por RMN de ^1H , obtendo deslocamento químico em δ 8,06, atribuído a amina primária deste núcleo. Dessa forma, diante dos deslocamentos obtidos podemos sugerir a obtenção do composto IV.

O composto IV será analisado por outras técnicas espectrométricas para a confirmação da estrutura proposta.

Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN ¹H dos compostos I, II, III e IV.



Posição	δ ¹ H	δ ¹ H	δ ¹ H	δ ¹ H
H _{aldeído}	10,84 (s; 1H)			
H _{hidroxila}				8,15 (s)
H _{amina primária}				8,08
2	8,45 (s)	7,7 a 7,9 (m)	7,9 a 8,0 (m)	8,64 (d)
4	7,89 (dd; J _{orto} =8,64 Hz; J _{meta} = 1,32 Hz)	7,7 a 7,9 (m)	7,9 a 8,0 (m)	
5	7,77 (dd; J _{orto} =8,64 Hz; J _{meta} = 1,32 Hz)	7,7 a 7,9 (m)	7,9 a 8,0 (m)	8,5 (d)
7		8,45 (s)	8,52 (s)	8,31 (s)

8		11,83 (s)	12,30 (s)	
11		7,69 (dd; $J_{orto}=8,0\text{Hz}$; $J_{meta} = 2,0\text{ Hz}$)	8,06 (d)	7,48 (t; $J_{orto}= 8,07\text{ Hz}$)
12		6,60 (dd; $J_{orto}=8,0\text{ Hz}$; $J_{meta} = 2,0\text{ Hz}$)	7,65 (d)	7,65 (d; $J_{orto}= 8,07\text{ Hz}$)
14		6,60 (dd; $J_{orto}=8,0\text{ Hz}$; $J_{meta} = 2,0\text{ Hz}$)	7,65 (d)	7,65 (d; $J_{orto}= 8,07\text{ Hz}$)
15		7,69	8,06 (d)	7,48 (t; $J_{orto}= 8,07\text{ Hz}$)
16		5,87 (s)	12,30 (s)	
20			7,9 a 8,0 (m)	7,93 (dd; $J_{meta} = 2,2\text{ Hz}$; $J_{orto} = 8,44\text{ Hz}$)
21			7,9 a 8,0 (m)	8,0 (dd; $J_{meta} = 2,2\text{ Hz}$; $J_{orto} = 8,44\text{ Hz}$)
22			7,9 a 8,0 (m)	7,93 (dd; $J_{meta} = 2,2\text{ Hz}$; $J_{orto} = 8,44\text{ Hz}$)
23			7,9 a 8,0 (m)	8,0 (dd; $J_{meta} = 2,2\text{ Hz}$; $J_{orto} = 8,44\text{ Hz}$)

5. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu sintetizar e caracterizar por espectrofotometria na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono uma série de intermediários contendo o núcleo benzofuroxano com rendimentos de 78%, 96%, 50% e 60%, para os compostos I, II, III, IV, respectivamente. Também foi sintetizado um novo composto, planejado segundo a estratégia de hibridação molecular, contendo a subunidade quinoxalínica e ftalimídica. Esse composto foi também caracterizado por métodos analíticos como espectrofotometria na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A nova molécula obtida será posteriormente avaliada em modelos *in vitro* para caracterizar seu potencial efeito antitumoral. Essa nova molécula apresenta, provavelmente, um novo mecanismo de ação e representa uma nova abordagem ao tratamento do tumores sólidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., ALFARO, M. E., JASO, A., ZARRANZ, B., ORTEGA, M. A., ALDANA, I., MONGE-VEGA, A. Quinoxaline N,N'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure–activity relationships. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 3835-3839, 2004.

AHN, G. O. BROWN, M. Targeting tumors with hypoxia-activated cytotoxins. **Front Biosci.**, v. 12, p. 3483–3501, 2007.

AKAKURA, N., KOBAYASHI, M., HORIUCHI, I., SUZUKU, A., WANG, J., CHEN, J., NIIZEKI, H., KAWAMURA, K., HOSOKAWA, M., ASAKA, M. Constitutive expression of hypoxia inducible factor-1 renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. **Cancer Res**, v. 61, p. 6548-6554, 2001.

BARLEON, B. SOZZANI, S., ZHOU, D., WEICH, H. A., MANTOVANI, A., MARMÉ, D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood.**, v. 87, p. 3336–3343, 1996.

BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2001.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., MIRANDA, A. L. P., RODRIGUES, C. R. A Química Medicinal de *N*-Acil hidrazonas: Novos Compostos-Protótipos e Fármacos Analgésicos, Antiinflamatórios e Anti-Trombóticos **Quim. Nova.**, v 25, p. 129-148, 2002.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. A Utilização do Safrol, Principal Componente Químico do Óleo de Sassafráz, na Síntese de Substâncias Bioativas na Cascata do Ácido Araquidônico: Antiinflamatórios, Analgésicos e Anti-trombóticos. **Quím. Nova.**, v. 22, p. 744-759, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Sistemas de Informação sobre Mortalidade. Consolidação da base de dados de 2011. Brasília (DF), 2013.

CALABRESE, C., POPPLETON, H., KOCAK, M., HOGG, T. L., FULLER, C., HAMNER, B., OH, E. Y., GABER, M. W., FINKLESTEIN, D., ALLEN, M., FRANK, A., BAYAZITOV, I. T., ZAKHARENKO, S. S., GAJJAR, A., DAVIDOFF, A., GILBERTSON, R. J. A perivascular niche for brain tumor stem cells. **Cancer Cell.**, v. 11, p. 69–82, 2007.

CARMELIET, P., DOR, Y., HERBERT, J. M., FUKUMURA, D., BRUSSELMANS, K., DEWERCHIN, M., NEEMAN, M., BONO, F., ABRAMOVITCH, R., MAXWELL, P., KOCH, C. J., RATCLIFFE, P., MOONS, L., JAIN, R. K., COLLEN, D., KESHERT, E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature.**, v. 394, p. 485-490, 1998.

CARTA, A., CORONA, P., LORIGA, M. Quinoxaline 1,4-Dioxide: A Versatile Scaffold Endowed With Manifold Activities. **Curr Med. Chem.**, v. 12, p. 2259-2272, 2005.

CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., RISSO, M., SAENZ, P., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole *N*-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure-Activity Relationships. **J. Med. Chem.** v 42. p. 1941-1950, 1999.

CONTI, A., SANTONI, M., AMANTINI, C., BURATTINI, L., BERARDI, R., SANTONI, G., CASCINU, S., MUZZONIGRO, G. Progress of Molecular Targeted Therapies for Advanced Renal Cell Carcinoma. **BioMed Research International**, vol. 2013, Article ID 419176, 9 pages, 2013. doi:10.1155/2013/419176.

CORRAL, L. G. HASLETT, P. A., MULLER, G. W., CHEN, R., WONG, L. M., OCAMPO, C. J., PATTERSON, R. T., STIRLING, D. I., KAPLAN, G. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF- α . **J Immunol.**, v. 163, p. 380–386, 1999.

D'AMATO, R. J., LOUGHNAN, M. S., FLYNN, E., FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 91, p. 4082–4085, 1994.

ENGLISH, A. R., DUNEGAN, C. M. Quinoxaline-1, 4-di-N oxides. I. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by 2,3-dihydroxymethyl-quinoxaline-1, 4-di-N-oxide. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 133, p. 398-400, 1970.

ESCUDIER, B., EISEN, T., STADLER, W. M., SZCZYLIK, C., OUDARD, S., SIEBELS, M., NEGRIER, S., CHEVREAU, C., SOLSKA, E., DESAI, A. A., ROLLAND, F., DEMKOW, T., HUTSON, T. E., GORE, M., FREEMAN, S., SCHWARTZ, B., SHAN, M., SIMANTOV, R., BUKOWSKI, R. M., TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. **N Engl J Med.**, v. 357, p. 125-134, 2007.

FAIVRE, S., DEMETRI, G., SARGENT, W., RAYMOND, E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 6, p. 734-745, 2007.

FERGUSON, G. D., JENSEN-PERGAKES, K., WILKEY, C., JHAVERI, U., RICHARD, N., VERHELLE, D., DE PARSEVAL, L. M., CORRAL, L. G., XIE, W., MORRIS, C. L., BRADY, H., CHAN, K. Immunomodulatory drug CC-4047 is a cell-type and stimulus-selective transcriptional inhibitor of cyclooxygenase 2. **J Clin Immunol.**, v. 27, p. 210–220, 2007.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov.**, v. 6, p. 273–286, 2007.

GALI-MUHTASIB, H., SIDANI, M., GEARA, F., MONA, A. D., AL-HMAIRA, J., HADDADIN, M. J., ZAATARI, G. Quinoxaline 1,4-dioxides are novel angiogenesis inhibitors that potentiate antitumor effects of ionizing radiation. **Int. J. Oncol.**, v. 24, p. 1121-1131, 2004.

GERSTNER, E. R., BATCHELOR, T. T. Antiangiogenic therapy for glioblastoma. **Cancer J.**, v. 18, p. 45–50, 2012.

HALEY, T. J., FLESHER, A. M., VEOMETT, R., VINCENT J. Beneficial effect of quinoxaline 1,4-di-N-oxide in radiation injury in mice. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 96, p. 579-582, 1957.

HALEY, T. J., FLESHER, A. M., KOMESU, N. Prophylactic Effects of Amine Oxides in Radiation Injury in Mice. **Nature.**, v. 184, p. 198, 1959.

HARRIS, A. L. Hypoxia - A key regulatory factor in tumor growth. **Nat Review.**, v. 2, p. 38-47, 2001.

HOCKEL, M., VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **J Natl Cancer Inst.**, v. 93, p. 266-276, 2001.

HUANG, G. W., YANG, L. Y. LU, W. Q. Expression of hypoxia-inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: impact on neovascularization and survival. **World J Gastroenterol.**, v. 11, p. 1705-1708, 2005.

HURWITZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., CARTWRIGHT, T., HAINSWORTH, J., HEIM, W., BERLIN, J., BARON, A., GRIFFING, S., HOLMGREN, E., FERRARA, N., FYFE, G., ROGERS, B., ROSS, R., KABBINAVAR, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med.**, v. 350, p. 2335-2342, 2004.

ILAND, C. N. Effect of Antibacterial Analogues of Vitamin K on *M. tuberculosis*. **Nature.**, v. 161, p. 1010, 1948.

JAIN, R. K. Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors. **Scientific Amer**, v. 271 p. 58-65, 1994.

JAIN, R. K., DUDA, D. G., CLARK, J. W., LOEFFLER, J. S. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. **Nat Clin Pract Oncol.**, v. 3, p. 24–40, 2006

JENSEN, R. L., RAGEL, B. T., WHANG, K., GILLESPIE, D. Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. **J Neurooncol.**, v. 78, p. 233–247, 2006

KATZ, D., ITO, E., LIU, F. On the Path to Seeking Novel Radiosensitizers. **Int. J. Radiat. Oncol., Biol. Phys.**, v. 73, p. 988-996, 2009.

KERBER, M., REISS, Y., WICKERSHEIM, A., JUGOLD, M., KIESSLING, F., HEIL, M., TCHAIKOVSKI, V., WALTENBERGER, J., SHIBUYA, M., PLATE, K. H., MACHEIN, M. R. Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. **Cancer Res.**, v. 68, p.7342–7351, 2008.

KNOCKE, T. H., PINTILIE, M., WOO, J., MORRISON, A., BIRLE, D., FYLES, A., MILOSEVIC, M., HILL, R. Intratumoral pO₂ measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. **Radiother Oncol**, v. 9, p. 99-104, 1999.

KRISHNAMACHARY, B., BERG-DIXON, S., KELLY, B., AGANI, F., FELDSER, D., FERREIRA, G., IYER, N., LARUSCH, J., PAK, B., TAGHAVI, P., SEMENZA, G. L. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor1. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1138-1143, 2003.

KUMAR, V., CHHIBBER, S. Thalidomide: an old drug with new action. **J. Chemother.**, v. 23, p. 326–334, 2011.

LEON, S. P, FOLKERT, R. D., BLACK, P. M. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. **Cancer**, v. 77, p. 362–372, 1996.

LIMA, L. M., FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J. O Renascimento de um Fármaco: Talidomida. **Quím. Nova**, v. 24, p. 683-688, 2001.

LIMA, L. M., FRATTANI, F. S., SANTOS, J. L., CASTRO, H. C., FRAGA, C. A., ZINGALI, R. B., BARREIRO, E. J. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate--acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, p. 348-356, 2008.

LIN, A. J., COSBY, L. A., SHANSKY, C. W., SARTORELLI, A. C. Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives. **J. Med. Chem.**, v. 15, p. 1247-1252, 1972.

LU, L., PAYVANDI, F., WU, L., ZHANG, L. H., HARIRI, R. J., MAN, H. W., CHEN, R. S., MULLER, G. W., HUGHES, C. C., STIRLING, D. I., SCHAFER, P. H., BARTLETT, J. B. The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. **Microvasc Res.**, v. 77, p. 78-86, 2009.

LU, X., KANG, Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors (HIFs): master regulators of metastasis. **Clin Cancer Res.**, v. 16, p. 5928-5935, 2010.

MAROTTA, L. L., POLYAK, K. Cancer stem cells: a model in the making. **Curr Opin Genet Dev**, v. 19, p. 44-50, 2009.

MIYOSHI, A., KITAJIMA, Y., IDE, T., OHTAKA, K., NAGASAWA, H., UTO, Y., HORI, H., MIYAZAKI, K. Hypoxia accelerates cancer invasion of hepatoma cells by upregulating MMP expression in an HIF-1 α -independent manner. **Int J Oncol**, v. 29, p. 1533-1539, 2006.

MOEHLER, T. Clinical experience with thalidomide and lenalidomide in multiple myeloma. **Curr. Cancer Drug Targets.**, v. 12, p. 372-390, 2012.

MONGE, A., PALOP, J. A., LÓPEZ DE CERÁIN, A., SENADOR, V., MARTÍNEZ-CRESPO, F. J., SAINZ, Y., NARRO, S., GARCÍA, E., MIGUEL, C., GONZÁLEZ, M. Hypoxia-selective agents derived from quinoxaline 1,4-di-N-oxides. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 1786- 1792, 1995(a)

MONGE, A., MARTÍNEZ-CRESPO, F. J., LÓPEZ DE CERÁIN, A., PALOP, J. A., NARRO, S., SENADOR, V., MARÍN, A., SAINZ, Y., GONZÁLEZ, M., HAMILTON, E. Hypoxia-selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 4488-4494, 1995.

MONGE, A., PALOP, J. A., DEL CASTILLO, J. C., CALDERÓ, J. M., ROCA, J., ROMERO, G., DEL RIO, J., LASHERAS, B. Novel Antagonists of 5-HT₃ Receptors. Synthesis and Biological Evaluation of Piperazinylquinoxaline Derivatives. **J. Med. Chem.**, v. 36, p. 2745-2750, 1993.

OLIVEIRA, R. B., ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**, v. 25, p. 976-984, 2002.

ORTEGA, M. A., MORANCHO, M. J., MARTÍNEZ-CRESPO, F. J., SAINZ, Y., MONTOYA, M. E., LÓPEZ DE CERÁIN, A., MONGE, A. New quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives as hypoxic-cytotoxic agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 35, p. 21-30, 2000.

PLATE, K. H., BREIER, G., WEICH, H. A., RISAU, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. **Nature**, v. 359, p.845–848, 1992

REISS, Y., MACHEIN, M. R., PLATE, K. H. The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas. **Brain Pathol.**, v. 15, p. 311–317, 2005.

ROCKWELL, S., KENNEDY, K. A., SARTORELLI, A. C. Mitomycin-C as a prototype bioreductive alkylating agent: In vitro studies of metabolism and cytotoxicity. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 8, p. 753-755, 1982.

SAINZ, Y., MONTOYA, M. E., MARTÍNEZ-CRESPO, F. J., ORTEGA, M. A., LÓPEZ DE CERÁIN, A., MONGE, A. New quinoxaline 1,4-di-N-oxides for treatment of tuberculosis. **Arzeim –Forsch. Drug Res.**, v. 49, p. 55-59, 1999.

SANDLER, A., GRAY, R., PERRY, M. C., BRAHMER, J., SCHILLER, J. H., DOWLATI, A., LILENBAUM, R., JOHNSON, D. H. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med.**, v. 355, p. 2542-2550, 2006.

SANTOS, J. L. **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.** 2009. 129 p. Tese (Doutorado em Farmácia-Bioquímica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **J Appl Physiol**, v. 88, p. 1474-1480, 2000.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. **Trends Mol Biol**, v. 8, p. 62-67, 2002.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Rev**, v. 3, p. 721-732, 2003.

SHORTT, J., HSU, A. K., JOHNSTONE, R. W. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. **Oncogene**, v. 32, p. 4191-4202, 2013.

SILVA, G. A., COSTA, L. M., BRITO, F. C., MIRANDA, A. L., BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H-phenothiazine-1-acylhydrazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 3149-3158, 2004.

SILVA, Y. K., AUGUSTO, C. V., DE CASTRO BARBOSA, M. L., DE ALBUQUERQUE MELO, G. M., DE QUEIROZ, A. C., DE LIMA MATOS FREIRE DIAS, T., JÚNIOR, W. B., BARREIRO, E. J., LIMA, L. M., ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, p. 5007-5015, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SUTER, W., ROSSELET, A., KNÜSEL F. Mode of Action of Quinoxin and Substituted Quinoxaline-di-N-Oxides on Escherichia coli. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 13, p. 770-783, 1978.

TAYLOR, Y. C., RAUTH, A. M. Differences in the Toxicity and Metabolism of the 2-Nitroimidazole Misonidazole (Ro-07-0582) in HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. **Cancer Res.**, v. 38, p. 2745-2752, 1978.

TSURUO, T., NAITO, M., TOMIDA, A., FUJITA, N., MASHIMA, T., SAKAMOTO, H., HAGA, N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. **Cancer Sci**, v. 94, p. 15-21, 2003.

VAUPEL, P., THEWS, O., KELLEHER, D. K., KONERDING, M. A. O(2) extraction is a key parameter determining the oxygenation status of malignant tumors and normal tissues. **Int J Oncol**, v. 22, p. 795-798, 2003.

ZEMAN, E. M., BROWN, J. M., LEMMON, M. J., HIRST, V. K., LEE, W. W. SR-4233: A new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 12, p. 1239-1242, 1986.

ZHAO, Y., BAO, Q., RENNER, A., CAMAJ, P., EICHHORN, M., ISCHENKO, I., ANGELE, M., KLEESPIES, A., JAUCH, K. W., BRUNS, C. Cancer stem cells and angiogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 55, p. 477-482, 2011.

ZHONG, H., KIZAKA-KONDOH, S., HIROTA, K., HIRAOKA, M., YONEDA, T. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 in common human cancers and their metastases. **Cancer Res**, v. 67, p. 5830-5835, 1999.

WERMUTH, C. G. Selective Optimization of Side Activities: □ Another Way for Drug Discovery. **J Med Chem.**, v. 47, p. 1303-1314. 2004.

Araraquara,

De acordo,

Aylime Castanho Bolognesi Melchior

Jean Leandro dos Santos