

GRAZIELA DOMINGUES DE ALMEIDA LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA EM CÉLULAS DE
MELANOMA *IN VITRO* DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E
DE ISOBENZOFURANONAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Campus Viçosa

T

L732a
2017
Lima, Graziela Domingues, 1981-
Avaliação da atividade antimetastática em células de melanoma in vitro de compostos derivados do ácido cinâmico e de isobenzofuranonas / Graziela Domingues Lima. - Viçosa, MG, 2017. ix, 75f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariana Machado Neves.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Melanoma cutâneo. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Ácido cinâmico. 4. Isobenzofuranonas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

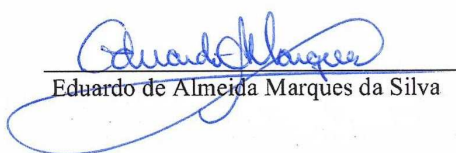
CDD 22. ed. 616.99477

GRAZIELA DOMINGUES DE ALMEIDA LIMA

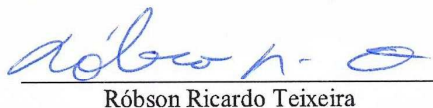
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA EM CÉLULAS DE
MELANOMA *IN VITRO* DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO
CINÂMICO E DE ISOBENZOFURANONAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

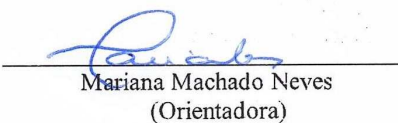
APROVADA: 16 de agosto de 2017.


Eduardo de Almeida Marques da Silva


Joana Gasperazzo Ferreira


Róbson Ricardo Teixeira


Tiago Antônio de Oliveira Mendes


Mariana Machado Neves
(Orientadora)

“Aquele que estuda a forma como as coisas se originaram e passaram a existir, quer se trate do estado ou de qualquer outra coisa, terá delas a mais bela visão.”
Aristóteles

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho aos amores da minha vida. À minha amada mãe Rosélia, minha guerreira e base forte, que nunca me deixou esquecer que a verdadeira força vem de Deus. Ao meu amado Pai Edmar, meu companheiro, meu amigo e conselheiro, que me ensinou a nunca fugir das dificuldades. Aos meus amados irmãos, Rodrigo, Aline e Ícaro, meus apoiadores e torcida fiel, e aos meus sobrinhos, Raul e Lara, alegrias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pelo privilégio de dedicá-la ao estudo e admiração de sua criação, e por me sustentar diante de todas as dificuldades e provações ao longo dessa caminhada.

Viver esta experiência de forma verdadeiramente plena não seria possível sem o companheirismo, parceria, colaboração, amizade e ensinamentos de pessoas que humildemente eu agradeço.

À Mari, minha orientadora e amiga, pelos seis anos de convivência e parceria, por sempre me apoiar e estar ao meu lado em todas as dificuldades ao longo dessa caminhada, e por confiar e acreditar no meu trabalho. Mari, obrigada pelo tempo de sua vida que você dedicou à minha formação.

Ao Professor Gustavo Bressan pela co-orientação, recursos, apoio e pela oportunidade de expandir meus conhecimentos e minha formação profissional.

Ao Professor Róbson, pela parceria no desenvolvimento desse trabalho, pelo tempo dedicado na correção e arguição desta tese, e por me lembrar como é empolgante conversar sobre ciência.

Ao Professor Eduardo, por aceitar participar da banca, pelo tempo disponibilizado na correção deste trabalho, e principalmente pela ajuda sempre incondicional ao longo desses seis anos de pós-graduação.

Ao Professor Tiago, pelas importantes contribuições neste trabalho e por aceitar participar desta banca.

À Joana, pelos primeiros ensinamentos de como trabalhar com cultura celular. Joana, aquele ensaio de migração celular foi o início de tudo. Muito obrigada!

Aos Professores, Julina L. R. Fietto, Abelardo S. Júnior e Márcia Rogéria pelos recursos disponibilizados para a realização deste trabalho.

À Professora Sirlene e ao pós-doc Matheus por aceitarem participar da banca como suplentes.

Aos Professores do Laboratório de Biologia Estrutural, em especial ao professor Sérgio, por sempre deixar sua porta aberta aos “desesperados” por um café (hihihihi), pela disponibilidade em sempre ajudar, pelos causos, pelas piadas e é claro, pelas frases inesquecíveis.

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos, em especial aos professores Eduardo e Leandro pela ajuda sempre incondicional.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, por me tratarem sempre com carinho e atenção, em especial à Bethinha, por ser uma mãezona.

Às minhas amigas geograficamente distantes (hihihi), Gilda (Gildinha), Lí (Marmota), Paola (Pao), Ednalva (Ed), Camila (Camilinha e Sasa) e Eliziária (Lisa Maria), por sempre torcerem por mim e compreenderem as minhas ausências. Saudades de vocês!

Às amigas do “café com bobagem” (hihihi), Natália (Nati fiote), Camila (Camilinha), Jerusa (Jeruuusa) e Thaís (Thaisinha). Meninas, estes cafés deixarão saudades! Obrigada pela amizade e companheirismo de vocês.

À amiga Petronilha e família, pelo carinho e torcida.

Aos padrinhos Wanda e Zoca, e aos irmãos de coração Samuel e Shara, por serem presença de Deus na minha vida.

A todos meus familiares, pelas orações e torcida, mas principalmente por estarem ao lado de meus pais nos momentos em que eu não pude estar. Amo vocês!

À Gabi, minha amiga e parceira, por toda ajuda e cumplicidade no desenvolvimento deste trabalho. Gabi, você foi fundamental nesta caminhada, muito obrigada!

Aos amigos (as) e companheiros (as) de luta :) do Laboratório de Biologia Estrutural (LAB 333), a Tatiana (Tati cabeça), Vivi (Mouro), Susana (Susa), Fernanda (Nanda), Eduardo (Dudas), Luiz (Bigode), Marli (Marlizinha), Ana Luiza (Analú), Verônica (Verusca), Beth, Talita, Juliana (Juju), Marcela (Marcelinha), Felipe (Felipão) e Janaína (Jambis). Muito obrigada pelo companheirismo e amizade em todos os momentos.

A todos (as) amigos (as) da “Galera do Fluxo” e agregados (hihihi), Gabizinha, Matheus, Adriana (Dridri), Alisson, Bianca, Fernandinha, Flávia, Janine, Leila (Leilinha), Fernanda, Tiago (Onofre), Luciana (Lu), Amanda, Victor (Vitim), Lethicia, Mateus (Gandra), Nancy, Elói, Joice, Mônica, Isadora, Raoni, Roméria, Éverton, e por fim nossa Deyse (Deysis). Foi duro disputar horários no fluxo com vocês (hihihi)! Obrigada por tudo pessoal!

Aos orientados do Prof. Róbson, Michelle, Wagner e Ana Paula, pela síntese dos compostos avaliados neste trabalho.

Aos amigos (as) do Laboratório de Ultraestrutura, em especial a Ademária (Deia), Helen e Jamile, pelas conversas e risadas.

Aos amigos (as) do Laboratório de Imunologia, em especial ao Del, Thaisinha e Patick pelo apoio.

Às estagiárias, Amanda, Gabi e Geórgia pela ajuda e colaboração.

Aos colegas do Programa Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela convivência ao longo destes seis anos de formação.

Aos funcionários do Biotério Central da UFV, Adão e Juliano, pela amizade e saudosas conversas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Minas Gerais por parte do suporte financeiro do projeto.

À UFV e ao programa de Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1 – APRESENTAÇÃO GERAL	
1. JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Melanoma cutâneo, metástase e metaloproteinases.....	2
2.2 Produtos naturais como fonte de compostos com atividade inibitória sobre as MMPs.....	5
2.2.1 Ácido cinâmico.....	7
2.2.2 Isobenzofuranonas.....	10
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	15
4 REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1	
1. Introdução.....	28
2. Resultados e discussão.....	30
3. Conclusão.....	42
4. Materiais e Métodos.....	42
5. Referências.....	55
CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2	
1. Introdução.....	61
2. Resultados e discussão.....	64
3. Conclusão.....	70
4. Referências.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

RESUMO

LIMA, Graziela Domingues de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Avaliação da atividade antimetastática em células de melanoma in vitro de compostos derivados do ácido cinâmico e de isobenzofuranonas.** Orientador: Mariana Machado Neves. Coorientador: Gustavo Costa Bressan.

O melanoma cutâneo é um problema de saúde pública mundial, por ser um tumor sólido altamente metastático. Compostos sintéticos têm sido desenvolvidos no intuito de combater atividades das células tumorais, como migração, invasão, adesão e proliferação. Dentre eles, compostos derivados do ácido cinâmico e isobenzofuranonas têm apresentado importante atividade antimetastática. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimetastática *in vitro* de dois grupos de compostos, 26 compostos derivados do ácido cinâmico e 25 isobenzofuranonas, frente ao comportamento metastático de células de melanoma cutâneo murino B16-F10. Inicialmente, determinou-se a concentração não citotóxica de derivados destes dois grupos químicos frente à linhagem B16-F10. Como a concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi aquela considerada não citotóxica, todos os ensaios subsequentes foram realizados utilizando concentrações inferiores ou iguais a esta. Posteriormente, os compostos derivados do ácido cinâmico e as isobenzofuranonas foram avaliados quanto ao efeito antimigratório sobre células B16-F10. Os compostos **9a** e **1f** foram mais efetivos nas concentrações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tanto o composto **9a**, um derivado do ácido cinâmico com porção 1,2,3-triazólica contendo um grupo fenilo, quanto o composto **1f**, uma isobenzofuranona funcionalizada na posição C3 contendo hidroxilas nas posições C-2' e C-6' do anel aromático, apresentaram atividade antimetastática e antiproliferativa significativa contra células B16-F10. No caso do composto **9a**, seu efeito biológico foi atribuído à sua interação com o sítio ativo das metaloproteinases -9 e -2 pelo estudo de *docking* molecular. Já para o composto **1f**, sugerimos que seu efeito inibidor é devido à sua interação com proteínas PKC. Os dois compostos derivados apresentam uma característica em comum, que é a presença de estruturas químicas heterocíclicas na sua composição. Em conclusão, nossos resultados mostraram que derivados do ácido cinâmico podem inibir o comportamento metastático de células B16-F10 *in vitro*, possivelmente por interferir na atividade de metaloproteinases de matriz. Adicionalmente, nossos resultados mostraram pela primeira vez que isobenzofuranonas sintéticas podem inibir a invasividade de células B16-F10 *in vitro*. Portanto, os compostos **9a** e **1f** apresentam potencial para o uso no desenvolvimento de novos candidatos para o tratamento do melanoma cutâneo.

ABSTRACT

LIMA, Graziela Domingues de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Evaluation of antimetastatic activity in melanoma cells in vitro of compounds derived from cinnamic acid and isobenzofuranones.** Adviser: Mariana Machado Neves. Co-adviser: Gustavo Costa Bressan.

Cutaneous melanoma is a worldwide public health problem because it is a highly metastatic solid tumor. Synthetic compounds have been developed in order to inhibit activities of tumor cells, such as migration, invasion, adhesion and proliferation. Among them, compounds derived from cinnamic acid and isobenzofuranones have shown important antimetastatic activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* antimetastatic activity of two groups of compounds, 26 compounds derived from the cinnamic acid and 25 isobenzofuranones, against the metastatic behavior of murine cutaneous melanoma cells B16-F10. Initially, the non-cytotoxic concentration of the derivatives was determined against the B16-F10 cells. As the concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ was non-cytotoxic, all subsequent assays were performed using concentrations below or equal to this. Subsequently, the compounds derived from cinnamic acid and isobenzofuranone were evaluated for the anti-migratory activity on B16-F10 cells. Compounds **9a** and **1f** were more effective at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ concentrations. Both compound **9a**, a 1,2,3-triazolic-cinnamic acid derivative containing a phenyl group, and compound **1f**, a isobenzofuran derivative functionalized at C-3 position, showed significant antimetastatic and antiproliferative activities against B16-F10 cells. In the case of compound **9a**, its biological effect was attributed to its interaction with the active site of metalloproteinases -9 and -2 by the molecular docking study. For compound **1f**, we suggest that its inhibitory effect is due to its interaction with PKC proteins. Both derivatives have one feature in common, which is the presence of heterocyclic chemical structures in their composition. In conclusion, our results showed that cinnamic acid derivatives can inhibit the metastatic behavior of B16-F10 cells *in vitro*, possibly by interfering with the activity of matrix metalloproteinases. In addition, our results showed for the first time that synthetic isobenzofuranone derivatives can inhibit the invasiveness of B16-F10 cells *in vitro*. Therefore, compounds **9a** and **1f** have potential structures for the development of novel candidates for the treatment of cutaneous melanoma.

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO GERAL

1. JUSTIFICATIVA

O melanoma cutâneo é um dos tipos de câncer sólido mais agressivo e metastático que existe, e nos últimos anos ele se tornou um problema de saúde pública em todo mundo. Quando diagnosticado precocemente, o melanoma pode ser tratado por meio de intervenção cirúrgica, mas uma vez em seu estágio metastático, ele é extremamente difícil de ser tratado devido à sua resistência às atuais estratégias terapêuticas. Por isso, os resultados insatisfatórios das atuais terapias utilizadas no tratamento desse tipo de câncer têm estimulado a realização de estudos experimentais na busca de compostos promissores para o tratamento do melanoma, principalmente em seu estágio avançado.

Uma atenção renovada sobre medicamentos alternativos e terapias naturais estimulou a pesquisa por drogas mais eficazes no tratamento do melanoma. Produtos naturais têm sido reconhecidos como fonte de compostos com atividade sobre diferentes tipos de câncer, e modificações estruturais destes compostos podem potencializar sua atividade biológica, sendo esta uma importante ferramenta na descoberta de novas drogas. Dentre esses compostos, estudos mostram que derivados do ácido cinâmico e compostos heterocíclicos, como as isobenzofuranonas, possuem atividade antimetástática promissora. O ácido cinâmico é um ácido aromático de ocorrência natural e que pode ser encontrado em frutas, óleos vegetais e plantas medicinais. Já as isobenzofuranonas, são compostos heterocíclicos caracterizados estruturalmente pela presença de um anel γ -lactônico fundido a um anel aromático, que podem ser isolados de plantas ou fungos. Diferentes abordagens científicas mostraram que o ácido cinâmico e derivados, e as isobenzofuranonas possuem atividade anticâncer sobre diferentes linhagens tumorais, como por exemplo carcinoma de cólon, adenocarcinoma de pulmão e melanoma. Com base no presente exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial antimetastático de compostos derivados do ácido cinâmico e de isobenzofuranonas sobre a linhagem de célula de melanoma cutâneo B16-F10.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Melanoma cutâneo, metástase e metaloproteinases

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer extremamente agressivo e metastático e sua incidência no mundo tem aumentado mais rápido do que qualquer outro tumor sólido conhecido (Eggermont et al., 2014). Quando diagnosticado precocemente, o melanoma pode ser tratado por meio de intervenção cirúrgica, mas não quando atinge seu estágio metastático. Neste caso, seu tratamento é extremamente difícil, devido à sua resistência às atuais estratégias terapêuticas. Essa resistência está relacionada principalmente às complexas e múltiplas vias de sinalização celular que controlam a proliferação e a capacidade das células malignas de escaparem de processos de morte e causarem metástase (Gray-Schopfer et al., 2007, Elias et al., 2010).

No melanoma, a via de sinalização celular Ras/Raf (MAPK) (Figura 1), está constitutivamente ativa devido a alterações genéticas e, por isso, exercem diferentes funções sobre a transformação maligna dos melanócitos, progressão e metástase no melanoma, sendo por isso uma das principais vias estudadas como alvo terapêutico contra o melanoma (Gray-Schopfer et al., 2007; Ross et al., 2012; Yajima et al., 2012; Faião-Flores et al., 2013; Nandy et al., 2014). Outra importante via para a sobrevivência e invasividade celular no melanoma é a via RAS/PI3K/AKT (AKT), que por meio dos fatores de transcrição mTOR e NF- κ B (Figura 1, Pg.3), sustentam o desenvolvimento tumoral por transcreverem genes associados ao câncer e genes associados às proteínas envolvidas na invasividade celular e metástase (Gray-Schopfer et al., 2007; Ross et al., 2012; Yajima et al., 2012; Ansari et al., 2013; Faião-Flores et al., 2013; Nandy et al., 2014).

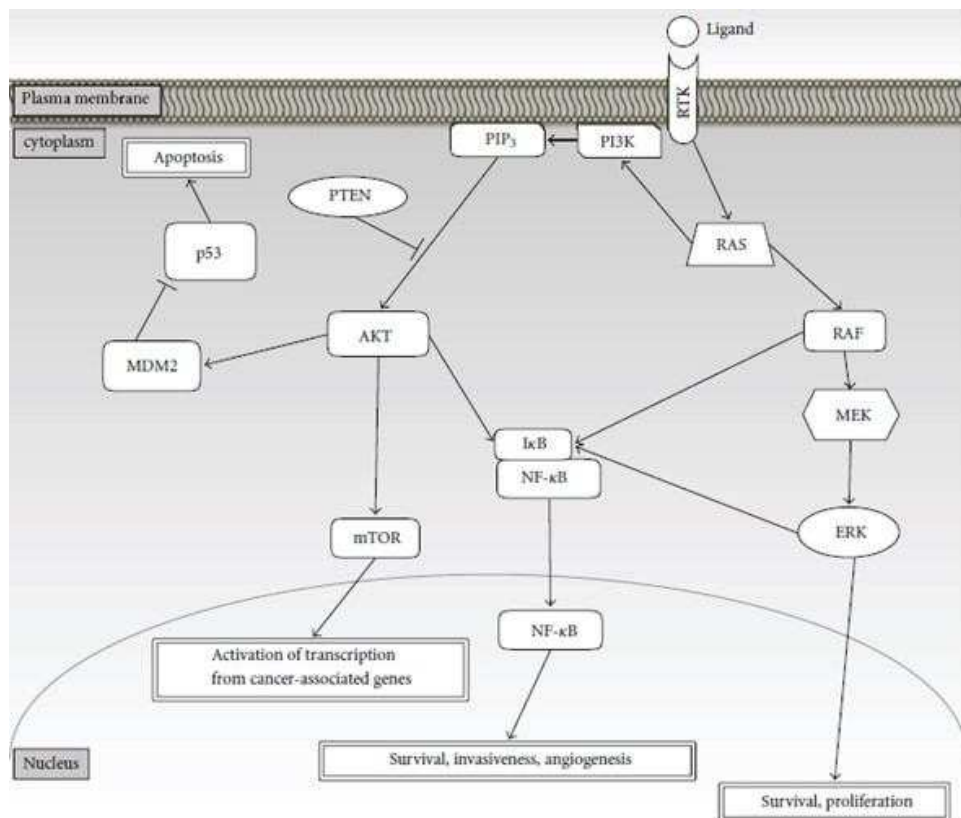


Figura 1 – Vias de sinalização celular envolvidas no desenvolvimento e progressão do melanoma. Fonte: Yajima et al., 2012.

Além das proteínas das vias MAPK e AKT, diferentes trabalhos mostram que a via das proteínas quinase C (PKCs) também são reguladoras de diferentes funções envolvidas na progressão de diferentes tipos de câncer, como leucemia, mama, pâncreas e melanoma (Michie e Nakagawa, 2006; Mochly-Rosen et al., 2012; Cooke et al., 2017; Ganapathy et al., 2017). As PKCs, são proteínas quinases que, constitutivamente desempenham diferentes papéis na sinalização celular de eventos como proliferação, diferenciação e apoptose celular. No que se refere ao câncer, as PKCs estão envolvidas na resistência a drogas, proliferação, angiogênese, invasão, intravasamento e metástase (Sledge e Gokmen-Polar, 2006; Mochly-Rosen et al., 2012).

A metástase é um evento de múltiplas etapas (Figura 2, Pg.4). Em linhas gerais, as células com potencial metastático se destacam do local do tumor primário, migram e intravasam a membrana basal de vasos sanguíneos e linfáticos, e em seguida acessam o lúmen desses vasos, disseminam-se pelo corpo e extravasam para outros tecidos e órgãos, aos quais

se aderem, colonizam e proliferam para formar um tumor secundário (Kumar & Weaver, 2009; Guan, 2015).

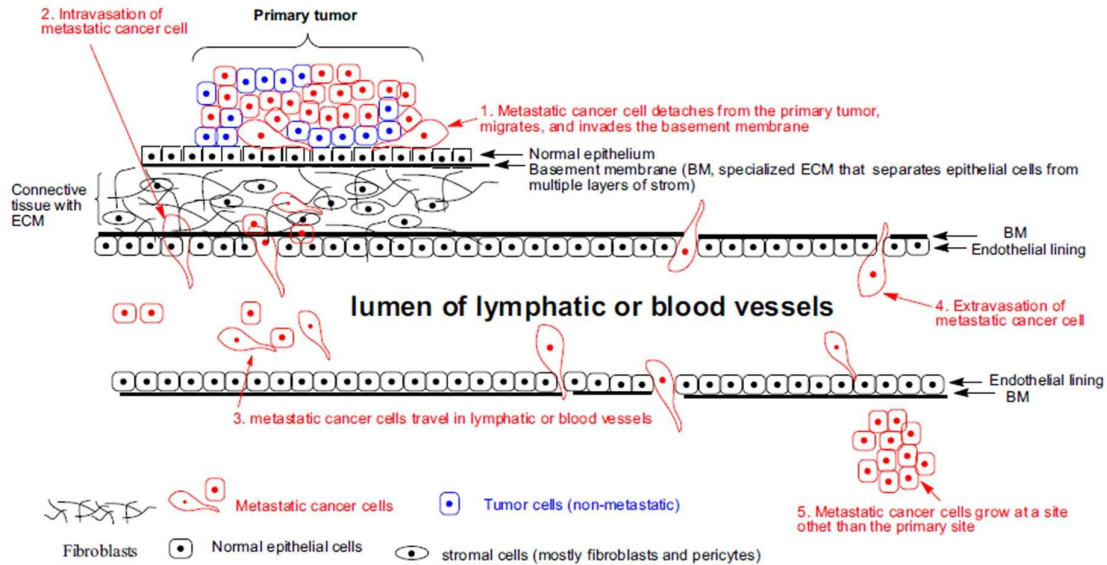


Figura 2- Esquema ilustrativo das etapas da metástase. Fonte: Guan et al., 2015.

Durante o processo de metástase, e para que suas etapas ocorram de forma efetiva, é necessário que haja o aumento da síntese e da atividade de enzimas responsáveis pela dinâmica da matriz extracelular (ME), as denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são um grupo de endopeptidases dependentes de zinco, que incluem as colagenases, estromelisinases e gelatinases, como a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) (Figura 3, Pg.5). As MMPs são responsáveis por degradar componentes da ME, como colágeno, elastina, laminina e fibronectina, alterando o microambiente da ME e modulando a atividade de moléculas biologicamente ativas, como fatores de crescimento, além de atuar sobre a atividade de proteases. Desta forma, as MMPs são essenciais à progressão da metástase, pois promovem as condições necessárias para que células metastáticas possam invadir a membrana basal de vasos sanguíneos e linfáticos e colonizarem outros tecidos e órgãos (Lambert et al., 2004; Lu et al., 2012; Ansari et al., 2013; Guan, 2015; Cui et al., 2017). Portanto, pelo presente exposto, as MMPs representam alvos terapêuticos promissores no desenvolvimento de novas drogas com atividade antimetastática (Lin et al., 2011; Ross et al., 2012; Ansari et al., 2013; Tang et al., 2014).

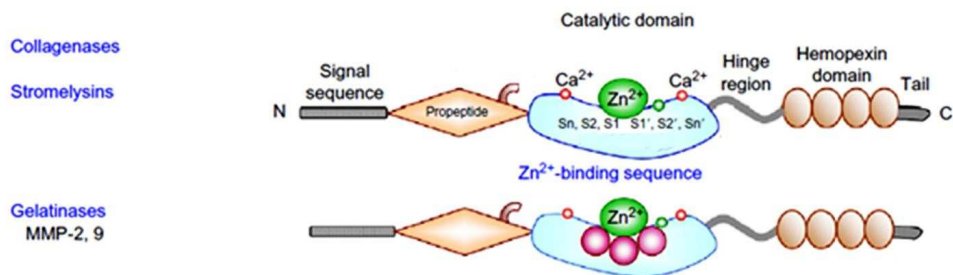


Figura 3 - Desenho esquemático da estrutura básica de metaloproteínas de matriz. Exemplos: colagenases, estromelinsinas e gelatinases. Fonte: Modificado de Cui et al., 2017.

2.2 Produtos naturais como fonte de compostos com atividade inibitória sobre as MMPs

Na busca por novas drogas com atividade antimetastática, produtos naturais têm sido reconhecidos como fontes de diferentes compostos com atividade inibitória sobre a síntese e atividade das MMPs. Nos últimos 15 anos, diferentes trabalhos evidenciaram a atividade inibitória de produtos provenientes de fontes naturais, como extratos e compostos isolados, sobre as MMPs. Em 2003, Fugita e colaboradores relataram o efeito inibitório do extrato hidrofílico da esponja marinha *Agelas nakamurai* sobre a atividade da MMP-2. Streck e colaboradores (2007) relataram que procianidina (Figura 4 A, Pg.6), obtida do marmelo japonês, inibiu significativamente as atividades das MMP-2 e -9, secretadas no meio de cultura por células de leucemia humana (HL-60). Sen e colaboradores (2010) estudaram os efeitos da epigallocatequina-3-galato (Figura 4 B, Pg.6), um polifenol isolado do chá verde, sobre a expressão e a atividade da MMP-9 em uma linhagem de câncer de mama humano (MDA-MB-231), e observaram que esta substância reduziu tanto a expressão da MMP-9, por interferir na via FAK/ERK/NFκB, quanto sua atividade enzimática. Outro exemplo de composto com atividade antimetastática é o plantamajoside (Figura 4 C, Pg.6) isolado da *Herba Plantaginis*. Este composto inibiu *in vitro* a atividade da MMP-9 e mostrou atividade antimetastática promissora *in vivo* sobre o câncer de mama (Pei et al., 2015).

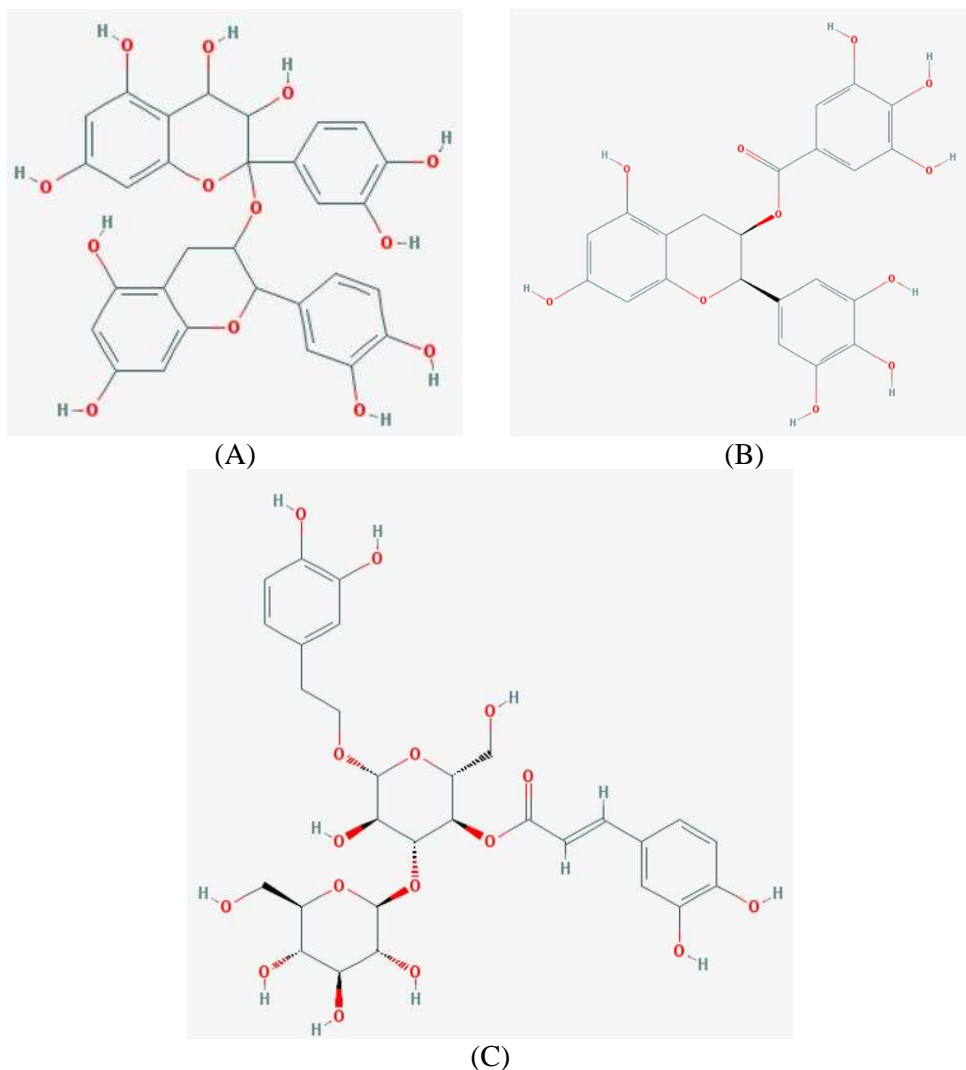


Figura 4 – Estruturas químicas de diferentes compostos naturais com atividade inibitória sobre MMPs. (A) Procianidinas (PubChem CID: 107876). (B) Epigallocatequina-3-galato (PubChem CID:65064). (C) Plantamajoside (PubChem CID:5281788).

Com relação aos compostos supracitados, é importante destacar que se tratam de compostos heterocíclicos. Estes compostos caracterizam-se por possuir em sua estrutura química ciclos contendo um ou mais átomos diferentes do carbono (sendo os mais comuns o nitrogênio, oxigênio e enxofre) (IUPAC, 2006). Além disso, os heteroátomos (átomos diferentes do C e H) presentes nestes compostos (especialmente o grupo hidroxila) podem formar ligações de hidrogênio com regiões hidrofóbicas de proteínas, como por exemplo as MMPs -2 e -9 (Zhang et al., 2006; De Melo, 2012). Com respeito aos compostos naturais, é importante salientar que eles podem ser quimicamente modificados visando à obtenção de

derivados com atividade biológica potencializada, sendo esta uma importante estratégia na descoberta de novas drogas. Dentro desta perspectiva, dois grupos de compostos de origem natural, estão recebendo atenção renovada de pesquisadores: o ácido cinâmico e seus derivados, e as isobenzofuranonas (Teixeira et al., 2013; Tsai et al., 2013).

2.2.1 Ácido cinâmico

Também denominado como ácido 3-fenil-2-propenóico, o ácido cinâmico é um composto aromático, de cor branca cristalina e odor floral. Este ácido pode ser encontrado na natureza em suas formas *trans* (Figura 5 A) e *cis* (Figura 5 B), sendo a forma *trans* a mais comum (Liu et al., 1995; Bickers et al., 2005; Letizia et al., 2005; De et al., 2011; Yen et al., 2011; Chao et al., 2013). Este composto é um aleloquímico resultante do metabolismo secundário de plantas superiores e está envolvido na lignificação e crescimento de raízes (Salvador et al., 2013; Okuda et al., 2014).

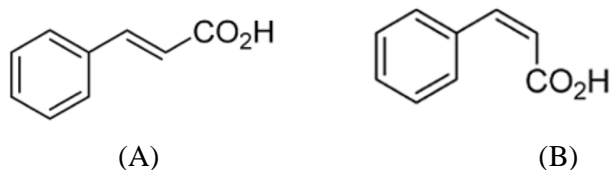


Figura 5 – Estrutura química do ácido cinâmico. (A) forma *trans*. (B) forma *cis*. Fonte: Okuda et al., 2014.

O ácido cinâmico está amplamente distribuído no reino vegetal, sendo encontrado em canela, café, frutas, óleos vegetais, legumes e plantas medicinais, e ainda encontrado no vinho (Hoskins, 1984; Akao et al., 2003; De et al., 2011; Chao et al., 2013). O ácido cinâmico é considerado por diferentes organizações mundiais, como a FDA (*Food and Drug Administration*) e a COE (*Council of Europe*), como uma substância que pode ser usada com segurança em gêneros alimentícios. Este composto e seus derivados também são utilizados como ingredientes de perfumaria, sendo encontrados em perfumes, xampus e outros produtos de higiene pessoal (Letizia et al., 2005; FDA, 2014).

Estudos que avaliaram a farmacocinética e a biodisponibilidade do ácido cinâmico em diferentes modelos animais mostraram que este composto possui boa biodisponibilidade, variando de 84% a 96% de acordo com a via e a forma de administração, seja extrato vegetal ou composto isolado. Após absorção, o ácido cinâmico é rapidamente distribuído pelo sangue

para diferentes tecidos e órgãos, como adiposo, muscular, rins e fígado, sendo este último seu principal local de biotransformação. O ácido cinâmico é biotransformado, principalmente, em ácido hipúrico (Figura 6) e em outros metabólicos por meio de reações de β -oxidação. Sua excreção ocorre por meio de fezes e urina, principalmente (Yuan et al., 1992; Sapienza et al., 1993; Bickers et al., 2005; Letizia et al., 2005; Chen et al. 2009).

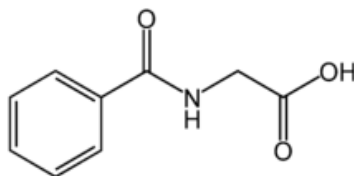


Figura 6 – Estrutura química do ácido hipúrico. Fonte: Chen et al., 2009.

Informações dos efeitos do ácido cinâmico sobre organismos vivos estão relacionadas principalmente à roedores sadios, sendo a dose letal para ratos estimada entre 4 a 5 g/kg, quando administrada em dose única por via oral, e acima de 5 g/kg para coelhos, quando administrada por via dérmica (Bickers et al., 2005; Letizia et al., 2005). Porém, são poucos os relatos sobre os efeitos tóxicos do ácido cinâmico. No que se refere à exposição humana, o ácido cinâmico se mostrou pouco alergênico, podendo ser considerado de baixa toxicidade (Bickers et al., 2005; Letizia et al., 2005; De et al., 2011).

Quimicamente, o ácido cinâmico possui três locais reativos, o anel aromático, a ligação dupla alifática e o grupo carboxila. Devido a estes aspectos químicos, este composto e seus derivados têm recebido atenção na busca de drogas alternativas ou complementares no tratamento de diferentes doenças (De et al., 2011; Hattori et al., 2011; Basu et al., 2013). Abordagens científicas distintas mostraram que o ácido cinâmico e seus derivados possuem diferentes atividades biológicas, como antioxidante, antidiabética, antimicrobiana, antifúngica e anticâncer (Yen et al., 2011; Endo et al., 2012; Kong et al., 2013; Niero et al., 2013; Sova et al., 2013; Tsai et al., 2013; Kumazaki et al., 2014). Esses compostos desempenham sua atividade anticancerígena por inibir a proliferação celular, inibir genes relacionados à hipóxia e a fatores de crescimento endotelial vascular, por diminuir a angiogênese e interferir na dinâmica de elementos do citoesqueleto, além de inibir o comportamento invasivo de células tumorais por interferir na síntese e na atividade de MMPs (Hattori et al., 2011; Luo et al., 2011; Yen et al., 2011; Endo et al., 2012; Kong et al., 2013; Niero et al., 2013; Tsai et al., 2013; Kumazaki et al., 2014).

Alguns trabalhos têm evidenciado o potencial antimetastático de derivados do ácido cinâmico (Chung et al., 2004; Belkaid et al., 2006; Jin et al., 2005; Yen et al., 2011; Tsai et al., 2013). Chung e colaboradores (2004), relataram o potencial terapêutico, *in vitro* e *in vivo*, de dois compostos derivados do ácido cinâmico (Figura 7 A e D) sobre a invasibilidade de células de hepatocarcinoma (HepG2), isso por reduzir a expressão e a atividade da MMP-9. Outro derivado do ácido cinâmico isolado da planta *Euonymus alatus*, o ácido clorogênico (Figura 7 C) mostrou ser um forte inibidor da MMP-9, também frente a uma linhagem de hepatocarcinoma (Hep3B) (Jin et al., 2005). Já Belkaid e colaboradores (2006) relataram o efeito inibitório do ácido clorogênico sobre a atividade da MMP-2. Tsai e colaboradores (2013) em seus experimentos mostraram a capacidade de derivados do ácido cinâmico, o ácido caféico (Figura 8 A), o ácido ferúlico (Figura 7 B) e o ácido clorogênico (Figura 7 C), em inibir a invasividade de células de adenocarcinoma pulmonar (Figura 8, Pg.10), por interferir tanto na expressão quanto na atividade das MMP-2 e -9.

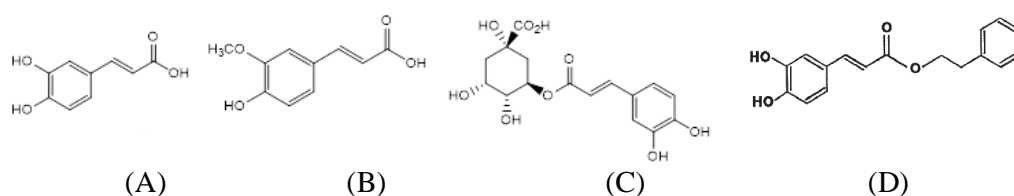


Figura 7 – Estruturas químicas de derivados do ácido cinâmico. (A) Ácido caféico (CAA). (B) Ácido ferúlico (FA). (C) Ácido clorogênico (CHA). (D) Éster fenetílico do ácido caféico. Fontes: Chung et al., 2004; Tsai et al., 2013.

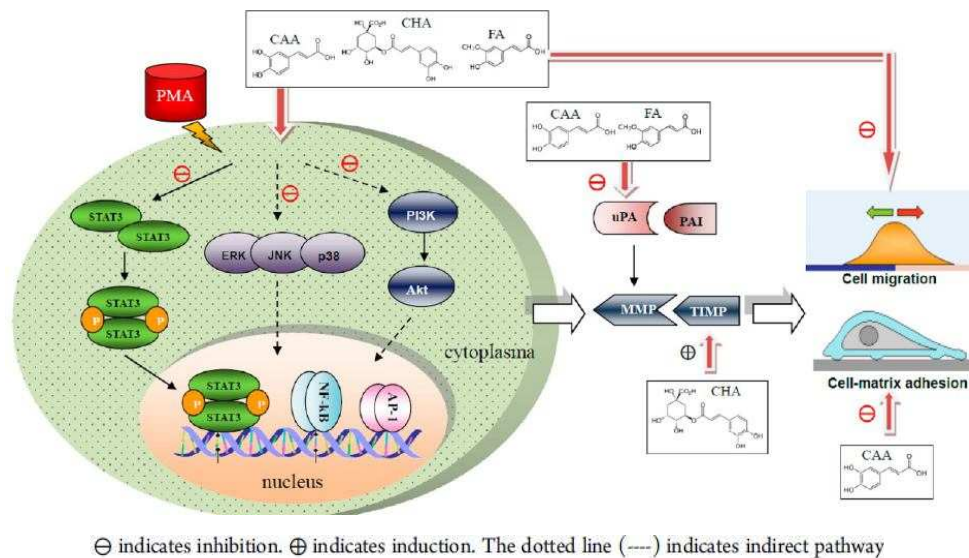


Figura 8 – Vias de sinalização envolvidas na inibição da invasibilidade de células de adenocarcinoma humano. CAA: ácido cafeico. CHA: ácido clorogênico. FA: ácido ferúlico. Fonte: Modificado de Tsai et al., 2013.

Em linhas gerais, os trabalhos que avaliaram a atividade antimetastática do ácido cinâmico e seus derivados correlacionaram seus efeitos biológicos não somente aos três locais reativos em sua estrutura, mas também à presença dos grupos hidroxila em suas estruturas químicas (Zang et al., 2006; De et al., 2011; Melo et al., 2012; Tsai et al., 2013). Este grupo químico favorece a interação dos compostos com diferentes proteínas, inclusive com proteínas relacionadas a progressão da metástase.

2.2.2 Isobenzofuranonas

Dentre os compostos naturais que possuem aplicação farmacêutica, uma grande parte é de natureza heterocíclica (Quin e Tyrell, 2010; Muhammad et al., 2017). Uma importante classe desses compostos, são as isobenzofuranonas, também denominadas de fitalidas. As fitalidas são caracterizadas estruturalmente pela presença de um anel γ -lactônico fundido a um anel aromático (Figura 9 A, Pg.11). As isobenzofuranonas podem ser de origem natural, isoladas de plantas (Figura 9 B, Pg.11) (Xin et al., 2009) ou fungos (Figura 9 C, Pg.11) (Franca, et al., 2016).

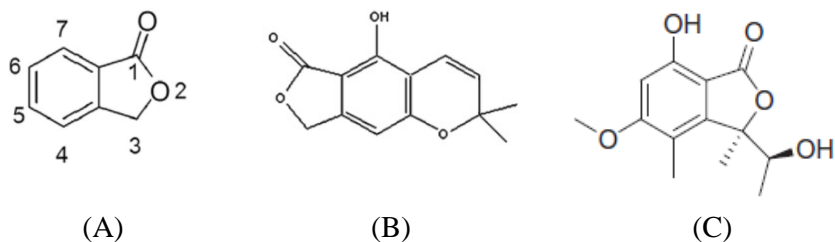


Figura 9 – Estruturas químicas de isobenzofuranonas. (A) Núcleo de isobenzofuranona. (B) Isobenzofuranona isolada de planta e (C) Isobenzofuranona isolada de fungo. Fonte: Xin et al., 2009 e Franca, et al., 2016.

Devido à importância farmacêutica, as informações sobre a farmacocinética e biodisponibilidade de isobenzofuranonas estão relacionadas principalmente a compostos que possuem aplicações médicas promissoras. A 3-Butilfitalida (NBP) (Figura 10 A) é um medicamento cardiovascular atualmente utilizado no tratamento da isquemia cerebral. Diao e colaboradores (2013), após investigarem o metabolismo, a farmacocinética e a excreção de NBP em seres humanos, relataram que o NBP é bem distribuído e absorvido pelo corpo, e que as principais vias metabólicas incluem a hidroxilação da cadeia lateral do grupo alquila, e posteriores reações de oxidação e conjugação. Após a metabolização, seus metabólitos são excretados principalmente pela urina como ácido 3-Butilfitalida-11-oico (M5-2) (Figura 10 B). Em outro estudo, Ma e colaboradores (2014) avaliaram por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) a concentração da fitalida bicuculina (Figura 10 C), um antagonista GABA, no plasma de ratos machos *Sprague-Dawley*, e os resultados mostraram que após a administração por via oral de 15 mg/kg, as recuperações médias de bicuculina no plasma estavam entre 80,5% a 91,8%.

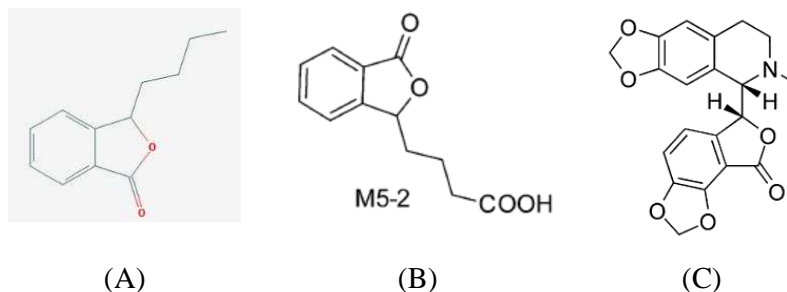


Figura 10- Estruturas químicas de fitalidas. Fonte: (A e B) Diao et al., 2013; (C): PubChem CID: 61361.

Nos últimos anos, diferentes abordagens científicas mostraram que as isobenzofuranonas possuem diferentes atividades biológicas, como leishmanicida (Pereira et al., 2015), antiplaquetária (Yang et al., 2007), antibacteriana (Hadj-esfandiari et al., 2007), antioxidante (Huang et al., 2012) e antiproliferativa (Teixeira et al., 2013). Estudos mostraram que isobenzofuranonas possuem atividade antiproliferativa sobre células de diferentes linhagens tumorais, como células leucêmicas (K563, HL60 e Nalm 6) (Teixeira et al., 2013; Maia et al., 2016), de carcinoma de faringe (HONE1) e de carcinoma de pulmão (GLC82) (Lan et al., 2014).

Já estudos *in vivo* mostraram que esta classe de compostos possui atividade antileishmanial (Figura 11) por inibir a enzima topoisomerase II do parasito. Além disso, esses compostos são promissores agentes neuroprotetores, possivelmente por ativar a via Nrf2/ARE (Mishra et al., 2014; Liu et al., 2017).

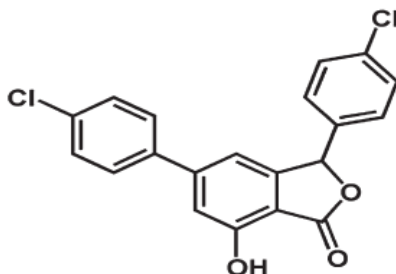


Figura 11 – Estrutura química de isobenzofuranona com atividade antileishmania *in vivo*. Fonte: Mishra et al., 2014.

Além de possuir atividade sobre a via Nrf2/ARE (Liu et al., 2017), trabalhos mostraram que isobenzofuranonas (Figura 12, Pg.13) podem ser bons ligantes de proteínas quinases C (PKCs) (Baba et al., 2004a). Em 2004a, Baba e colaboradores sintetizaram e avaliaram uma série de isobenzofuranonas (Figura 12 A, Pg.13) como ligantes da PKC α , e seus experimentos mostraram que isobenzofuranonas são boas estruturas de partida para o desenvolvimento de novos agonistas ou antagonistas de PKCs. Hirai e colaboradores (2007) avaliaram a afinidade de ligação de uma série de isobenzofuranonas à PKC α , e mostraram que dois compostos (Figura 12 B, Pg.13) são promissores agonistas desta proteína. Estes trabalhos atribuíram a interação das isobenzofuranonas com a PKC à formação de ligações de hidrogênio por meio dos grupos funcionais hidroxila ou carbonila presentes nestes derivados (Baba et al., 2004; Baba et al., 2004a; Hirai et al., 2007; Hirai et al., 2011).

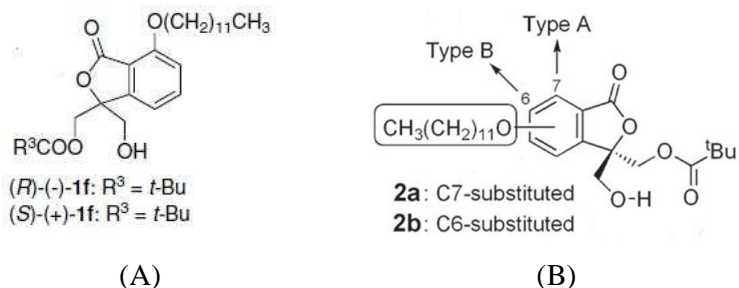


Figura 12 - Estruturas químicas de isobenzofuranonas ligantes de PKCs. (Fonte: Modificado de Baba et al., 2004a, Hirai et al., 2007, Hirai et al., 2011).

No que se refere as isobenzofuranonas, não foram encontrados no banco de dados utilizado (MEDLINE/PubMed) trabalhos que estudaram seus efeitos sobre a expressão ou atividade enzimática das MMPs, nem trabalhos a respeito de seus efeitos sobre a migração, invasão ou adesão de células tumorais. Porém, diferentes trabalhos relatam o envolvimento das proteínas PKCs sobre a invasividade de células tumorais, por regularem a expressão e a atividade de MMPs (Chakraborti et al., 2003; Al-Alem et al., 2013; Rossé et al. 2014; Noh et al., 2015). Al-Alem et al. (2013) relatam que a ativação da via PKC causa alterações significativas na expressão de MMPs envolvidas na migração de células de câncer de ovário (Ovar3). Rossé e colaboradores (2014) caracterizaram um mecanismo pelo qual a PKC α controla a invasão e o remodelamento da matriz extracelular por células de câncer de mama, por regular o tráfego da *membrane type 1-matrix metalloproteinase* (MT1-MMP).

Devido à importância da via PKC na progressão do câncer, ela é um alvo terapêutico promissor na pesquisa de inibidores. Noh e colaboradores (2015a), avaliaram o efeito do composto fisetina (Figura 13 A, Pg.14), um composto heterocíclico, sobre a atividade invasiva de células de câncer de mama (MCF-7). Os resultados mostraram que este composto heterocíclico foi efetivo em inibir o comportamento invasivo desta linhagem celular, por suprimir a ativação da MMP-9 pela regulação da via PKC/ROS/MAPK (Figura 13 B, Pg.14).

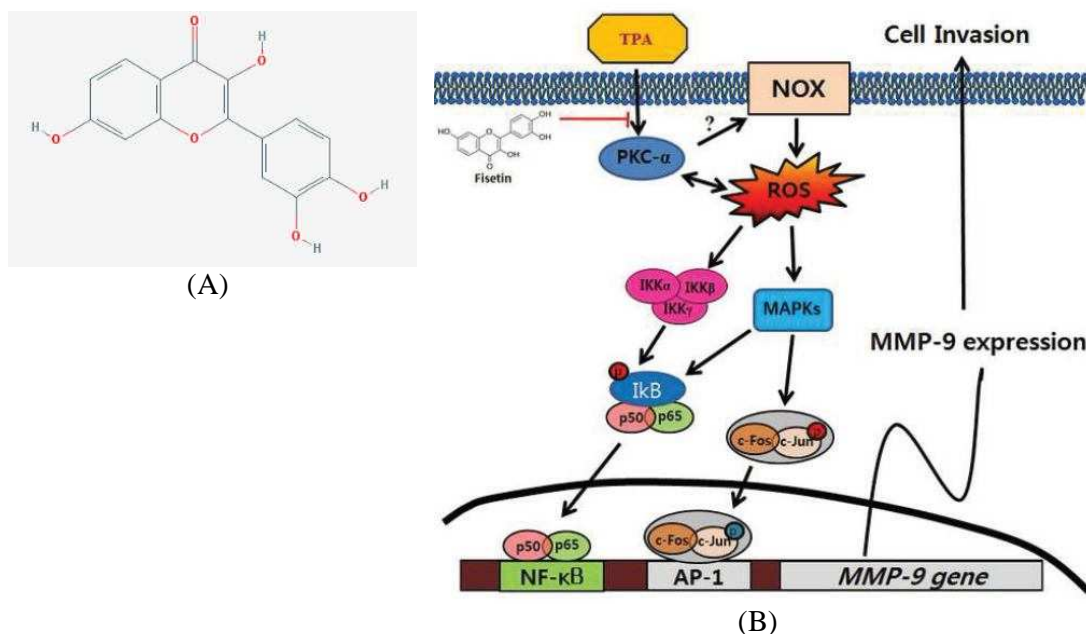


Figura 13 - (A) Estrutura química do composto fisetina (PubChem CID: 5281614). (B) Esquema ilustrativo da inibição da via PKC/ROS/MAPK pelo composto fisetina. TPA: indutor tumoral. Fonte: Noh et al., 2015.

Outro composto heterocíclico com atividade sobre a via da PKC é a galangina (Figura 14), flavonoide natural encontrado na *Alpinia officinarum*. Chien e colaboradores (2015), ao avaliarem os efeitos da galangina sobre o comportamento metastático de células de hepatocarcinoma (HepG2 tratada previamente com TPA), observaram que este composto atenuou a característica metastática destas células, tanto por reduzir a expressão das MMP-2 e -9, inibindo a via PKC/ERK, quanto por reduzir a atividade destas mesmas enzimas.

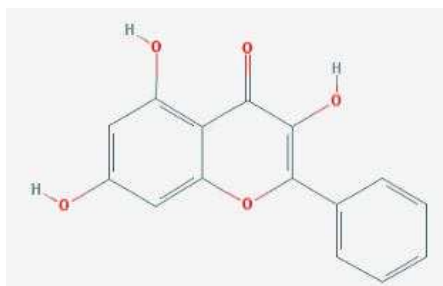


Figura 14 – Estrutura química do composto galangina (PubChem CID: 5281616).

Diante do presente exposto, consideram-se o ácido cinâmico e seus derivados e as isobenzofuranonas como substâncias atrativas para avaliação *in vitro* da atividade antimetastática.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Derivados do ácido cinâmico e isobenzofuranonas possuem atividade antimetastática *in vitro* sobre a linhagem célula de melanoma cutâneo murino B16-F10.

Para testar esta hipótese, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

Objetivo geral:

Avaliar a atividade antimetastática *in vitro* de compostos derivados do ácido cinâmico e isobenzofuranonas sobre a linhagem celular de melanoma cutâneo B16-F10.

Objetivos específicos:

Capítulo 2

- Determinar as concentrações não citotóxicas dos compostos derivados do ácido cinâmico (AC) sobre a linhagem B16-F10, por meio do ensaio de MTT;
- Selecionar os melhores compostos derivados do AC com atividade antimigratória sobre as células B16-F10, por meio do ensaio de migração celular (*wound healing assay*);
- Avaliar os efeitos dos derivados do AC selecionados, sobre o comportamento metastático *in vitro* das células B16-F10, por meio dos ensaios de invasão e adesão celular;
- Avaliar os efeitos dos derivados do AC selecionados sobre a capacidade das células B16-F10 em formar colônias, por meio do ensaio de formação de colônia;
- Avaliar os efeitos dos derivados do AC selecionados sobre a proliferação das células B16-F10, por meio do ensaio de exclusão por azul de Tripán;
- Avaliar os efeitos dos derivados do AC selecionados sobre a viabilidade de células não tumorais de fibroblasto murino (NIH3T3) e rim de macaco (Vero), por meio do ensaio de MTT;

- Avaliar os efeitos dos derivados do AC selecionados sobre a viabilidade de hemácias, por meio do ensaio de hemólise;
- Avaliar a interação físico-química dos derivados do AC selecionados com as metaloproteinases 9 e 2, por meio de *molecular docking*.

Capítulo 3

- Determinar as concentrações não tóxicas de isobenzofuranonas (IZO) sobre as linhagens B16-F10 e HepG2, por meio do ensaio de MTT;
- Selecionar as melhores IZO com atividade antimigratória sobre as células B16-F10, por meio do ensaio de migração celular (*wound healing assay*);
- Avaliar os efeitos das IZO selecionadas sobre o comportamento metastático *in vitro* das células B16-F10, por meio dos ensaios de adesão e invasão celular;
- Avaliar os efeitos das IZO selecionadas sobre a proliferação das células B16-F10, por meio do ensaio de exclusão por azul de Tripán;
- Avaliar os efeitos das IZO selecionadas sobre a viabilidade de células não tumorais de rim de macaco (Vero) e macrófago murinho (RAW.264.7), por meio do ensaio de MTT;
- Avaliar os efeitos das IZO selecionadas sobre a viabilidade de hemácias, por meio do ensaio de hemólise;

4. REFERÊNCIAS

Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y. 2003. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from própolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* 26(7): 1057-9.

Al-Alem LF, McCord LA, Southard RC, Kilgore MW, Curry TE Jr. 2013. Activation of the PKC pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and expression of MMP7 and MMP10. *Biol Reprod* 89(3): 73.

Ansari MA, Shaikh S, Muteeb G, Mohd S, Rizvi D, Shakil S, Alam A, Tripathi R, Ghazal F, Rehman A, Ali SG, Pandey AK, Ashraf GM. 2013. Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer. OMICS Group eBooks 1-19.

Baba Y, Ogoshi Y, Hirai G, Yanagisawa T, Nagamatsu K, Mayumi S, Hashimoto Y, Sodeoka M. 2004. Design, synthesis, and structure-activity relationship of new isobenzofuranone ligands of protein kinase C. *Bioorg Med Chem Lett* 14(11): 2963-7.

Baba Y, Mayumi S, Hirai G, Kawasaki H, Ogoshi Y, Yanagisawa T, Hashimoto Y, Sodeoka M. 2004a. Evaluation of series of isobenzofuranone dimers as PKC α ligands: implication for the distance between the two ligand binding sites. *Bioorg Med Chem Lett* 14(11): 2969-72.

Basu S, Jana S, Patel VB, Patel H. 2013. Effects of piperine, cinnamic acid and gallic acid on rosuvastatin pharmacokinetics in rats. *Phytother Res* 27(10): 1548-56.

Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J, Annabi B. 2006. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell Int* 6:7.

Bickers D, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, Sipes IG, Smith RL, Tagami H. 2005. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol,

cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients: The RIFM expert panel. *Food and Chemical Toxicology* 43: 799-836.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253(1-2): 269-85.

Chao HC, Najjaa H, Villareal MO, Ksouri R, Han J, Neffati M, Isoda H. 2013. *Arthrophytum scoparium* inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in B16 melanoma cells. *Exp Dermatol* 22(2): 131-6.

Chen Y, Ma Y, Ma W. 2009. Pharmacokinetics and bioavailability of cinnamic acid after oral administration of *Ramulus Cinnamomi* in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 34(1): 51-6.

Chien ST, Shi MD, Lee YC, Te CC, Shih YW. 2015. Galangin, a novel dietary flavonoid, attenuates metastatic feature via PKC/ERK signaling pathway in TPA-treated liver cancer HepG2 cells. *Cancer Cell Int.* 15:15.

Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH. 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* 18 (14): 1670-81.

Cooke M, Magimaidas A, Casado-Medrano V, Kazanietz MG. 2017. Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Mol Carcinog* 56(6): 1531-1542.

Cui N, Hu M, Khalil RA. 2017. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 147: 1-73.

Maia AFS, Siqueira RP, de Oliveira FM, Ferreira JG, da Silva SF, Caiuby CA, de Oliveira LL, de Paula SO, Souza RA, Guilardi S, Bressan GC, Teixeira RR. 2016. Synthesis, molecular properties prediction and cytotoxic screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3H)-ones. *Bioorg Med Chem Lett* 26(12): 2810-6.

de Melo EB. 2012. A QSAR Study of Matrix Metalloproteinases Type 2 (MMP-2) Inhibitors with Cinnamoyl Pyrrolidine Derivatives. *Sci Pharm* 80(2): 265-81.

De P, Koumba Yoya G, Constant P, Bedos-Belval F, Duran H, Saffon N, Daffé M, Baltas M. 2011. Design, synthesis, and biological evaluation of new cinnamic derivatives as antituberculosis agents. *J Med Chem* 54(5): 1449-61.

Diao X, Deng P, Xie C, Li X, Zhong D, Zhang Y, Chen X. 2013. Metabolism and pharmacokinetics of 3-n-butylphthalide (NBP) in humans: the role of cytochrome P450s and alcohol dehydrogenase in biotransformation. *Drug Metab Dispos* 41(2): 430-44.

Eggermont AMM, Spatz A, Robert C. 2014. Cutaneous melanoma. *Lancet* 383: 816-27.

Elias EG, Hasskamp JH, Sharma BK. Biology of human cutaneous melanoma. 2010. *Cancers (Basel)* 2 (1):165-89.

Endo S, Matsunaga T, Kanamori A, Otsuji Y, Nagai H, Sundaram K, El-Kabbani O, Toyooka N, Ohta S, Hara A. 2012. Selective inhibition of human type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. *J Nat Prod* 75(4): 716-21.

Faião-Flores, Coelho PR, Toledo Arruda-Neto JD, Maria-Engler SS, Tiago M, Capelozzi VL, Giorgi RR, Maria DA. 2013. Apoptosis through Bcl-2/Bax and cleaved caspase up-regulation in melanoma treated by boron neutron capture therapy. *PLoS One* 8(3): e59639.

FDA (Food and Drug Administration). 2014. Code of Federal Regulations, 21 CFR 172.515. Title 21-Food and Drugs, vol. 3, Chapter I- Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Part 172-Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human consumption. Subpart F-Flavoring Agents and Related Substances, 515-Synthetic Flavoring Substances and Adjuvants. Acesso em: 10 de janeiro 2015.

Franca EF, Guilardi S, Paixão DA, Teixeira RR, Pereira WL, Ellena JA. 2016. Centrosymmetric resonance-assisted intermolecular hydrogen bonding chains in the enol form of β -diketone: Crystal structure and theoretical study. *J Mol Graph Model*. 68:106-13.

Fujita M, Nakao Y, Matsunaga S, Seiki M, Itoh Y, Yamashita J, Van Soest RW, Fusetani N. 2003. Ageladine A: an antiangiogenic matrixmetalloproteinase inhibitor from the marine sponge *Agelas nakamurai*. *J Am Chem Soc* 125(51): 15700-1.

Ganapathy S Peng B, Shen L, Yu T, Lafontant J, Li P, Xiong R, Makriyannis A, Chen C. 2017. Suppression of PKC causes oncogenic stress for triggering apoptosis in cancer cells. *Oncotarget* 8(19): 30992-31002.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445: 851-857.

Guan X. 2015. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* 5(5): 402-18.

Hadj-esfandiari N, Navidpour L, Shadnia H, Amini M, Samadi N, Faramarzi MA, Shafiee A. 2007. Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure-activity relationships of new (Z)-2-(nitroimidazolymethylene)-3(2H)-benzofuranone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 17(22): 6354-63.

Hattori H, Okuda K, Murase T, Shigetsura Y, Narise K, Semenza GL, Nagasawa H. 2011. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. *Bioorg Med Chem* 19(18): 5392-401.

Hirai G, Ohkubo M, Tamura Y, Sodeoka M. 2011. Design and synthesis of protein kinase C α activators based on 'out of pocket' interactions. *Bioorg Med Chem Lett* 21(12): 3587-90.

Hirai G, Shimizu T, Watanabe T, Ogoshi Y, Ohkubo M, Sodeoka M. 2007. Importance of interaction between C1 domain and lipids in protein kinase C α activation: hydrophobic

side chain direction in isobenzofuranone ligands controls enzyme activation level. *ChemMedChem* 2(7): 1006-9.

Hoskins JA. 1984. The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds. *J Appl Toxicol* 4(6): 283-292.

Huang XZ, Zhu Y, Guan XL, Tian K, Guo JM, Wang HB, Fu GM. 2012. A novel antioxidante isobenzofuranone derivative from fungus *Cephalosporium* sp.AL031. *Molecules* 17(4): 4219-24.

IUPAC. 2006. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org>, created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.

Jin UH, Lee JY, Kang SK, Kim JK, Park WH, Kim JG, Moon SK, Kim CH. 2005. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci* 77 (22): 2760-9.

Kong CS, Jeong CH, Choi JS, Kim KJ, Jeong JW. 2013. Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells. *Phytother Res* 27(3): 317-23.

Kumar S, Weaver VM. 2009. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2): 113-27.

Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Yamada N, Ohta S, Ichihara K, Akao Y. 2014. Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. *Phytomedicine* (8-9): 1070-7.

Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49(3): 187-98.

Lan WJ, Liu W, Liang WL, Xu Z, Le X, Xu J, Lam CK, Yang DP, Li HJ, Wang LY. 2014. Pseudaboydins A and B: novel isobenzofuranone derivatives from marine fungus *Pseudallescheria boydii* associated with starfish *Acanthaster planci*. *Mar Drugs* 12(7): 4188-99.

Letizia CS, Cocchiara J, Lapczynski A, Lalko J, Api AM. 2005. Fragrance material review on cinnamic acid. *Food Chem Toxicol* 43(6): 925-43.

Lin HH, Chen JH, Chou FP, Wang CJ. 2011. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *Br J Pharmacol* 162(1): 237-54.

Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D. 1995. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *Int J Cancer* 62(3): 345-50.

Liu Z, Wang H, Shi X, Li L, Zhou M, Ding H, Yang Y, Li X, Ding K. 2017. DL-3-n-Butylphthalide (NBP) Provides Neuroprotection in the Mice Models After Traumatic Brain Injury via Nrf2-ARE Signaling Pathway. *Neurochem Res* 42(5): 1375-1386.

Lu Z, Lu N, Li C, Li F, Zhao K, Lin B, Guo Q. 2012. Oroxylin A inhibits matrix metalloproteinase-2/9 expression and activation by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and suppressing the ERK1/2 signaling pathway. *Toxicol Lett* (3): 211-20.

Luo Y, Qiu KM, Lu X, Liu K, Fu J, Zhu HL. 2011. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of cinnamic acyl sulfonamide derivatives as novel antitubulin agents. *Bioorg Med Chem* 19(16): 4730-8.

Ma J, Lin C, Wen C, Xiang Z, Yang X, Wang X. 2014. Determination of bicuculline in rat plasma by liquid chromatography mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 953-954: 143-6.

Michie AM, Nakagawa R. 2006. Elucidating the role of protein kinase C in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Oncol* 24 (3):134-8.

Mishra A, Vinayagam J, Saha S, Chowdhury S, Roychowdhury S, Jaisankar P, Majumder HK. 2014. Isobenzofuranone derivatives exhibit antileishmanial effect by inhibiting type II DNA topoisomerase and inducing host response. *Pharmacol Res Perspect* 2(6): e00070.

Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. *Nat Rev Drug Discov* 11(12): 937-57.

Muhammad ZA, Edrees MM, Faty RAM, Gomha SM, Alterary SS, Mabkhot YN. 2017. Synthesis, Antitumor Evaluation and Molecular Docking of New Morpholine Based Heterocycles. *Molecules* 22(7).

Nandy A, Dey SK, Das S, Munda RN, Dinda J, Saha KD. 2014. Gold (I) N-heterocyclic carbene complex inhibits mouse melanoma growth by p53 upregulation. *Mol Cancer* 13(57): 1-4.

Niero EL, Machado-Santelli GM. 2013. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 32:31.

Noh EM, Lee YR, Hong OY, Jung SH, Youn HJ, Kim JS. 2015. Aurora kinases are essential for PKC-induced invasion and matrix metalloproteinase-9 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep* 34(2): 803-10.

Noh EM, Park YJ, Kim JM, Kim MS, Kim HR, Song HK, Hong OY, So HS, Yang SH, Kim JS, Park SH, Youn HJ, You YO, Choi KB, Kwon KB, Lee YR. 2015a. Fisetin regulates TPA-induced breast cell invasion by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation via the PKC/ROS/MAPK pathways. *Eur J Pharmacol* 764:79-86.

Okuda K, Nishikawa K, Fukuda H, Fujii Y, Shindo M. 2014. Cis-Cinnamic acid selective suppressors distinct from auxin inhibitors. *Chem Pharm Bull* 62(6): 600-7.

Pei S, Yang X, Wang H, Zhang H, Zhou B, Zhang D, Lin D. 2015. Plantamajoside, a potential anti-tumor herbal medicine inhibits breast cancer growth and pulmonary metastasis by decreasing the activity of matrix metalloproteinase-9 and -2. *BMC Cancer*. 15: 965.

Pereira WL, Vasconcellos Rde S, Mariotini-Moura C, Gomes RS, Firmino Rde C, Silva AM, Silva Júnior A, Bressan GC, Almeida MR, Afonso LC, Teixeira RR, Fietto JL. 2015. The Antileishmanial Potential of C-3 Functionalized Isobenzofuranones against *Leishmania (Leishmania) Infantum Chagasi*. *Molecules* 20(12): 22435-44.

Quin LD, Tyrell J A. 2010. *Fundamentals of Heterocyclic Chemistry*; John Wiley & Sons: Hoboken: New Jersey.

Ross SH, Spanjaard E, Post A, Vliem MJ, Kristyanto H, Bos JL, Rooij J. 2012. Rap1 can bypass the FAK-Src-Paxillin cascade to induce cell spreading and focal adhesion formation. *PLoS One* 7(11): e50072.

Rossé C, Lodillinsky C, Fuhrmann L, Nourieh M, Monteiro P, Irondelle M, Lagoutte E, Vacher S, Waharte F, Paul-Gilloteaux P, Romao M, Sengmanivong L, Linch M, van Lint J, Raposo G, Vincent-Salomon A, Bièche I, Parker PJ, Chavrier P. 2014. Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6;111(18): E1872-9.

Salvador VH, Lima RB, dos Santos WD, Soares AR, Böhm PA, Marchiosi R, Ferrarese Mde L, Ferrarese-Filho O. 2013. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth. *PLoS One* 8(7): e69105.

Sapienza PP, Ikeda GJ, Warr PI, Plummer SL, Dailey RE, Lin CS. 1993. Tissue distribution and excretion of ¹⁴C-labelled cinnamic aldehyde following single and multiple oral administration in male Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 31(4): 253-61.

Sen T, Dutta A, Chatterjee A. 2010. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFkappaB and AP-1 in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs* 21(6): 632-44.

Sledge GW Jr, Gökmen-Polar Y. 2006. Protein kinase C-beta as a therapeutic target in breast cancer. *Semin Oncol* 3 Suppl 9: S15-8.

Sova M, Žižak Ž, Stanković JA, Prijatelj M, Turk S, Juranić ZD, Mlinarič-Raščan I, Gobec S. 2013. Cinnamic acid derivatives induce cell cycle arrest in carcinoma cell lines. *Med Chem* 9(5): 633-41.

Strek M, Gorlach S, Podsedek A, Sosnowska D, Koziolkiewicz M, Hrabec Z, Hrabec E. 2007. Procyanidin oligomers from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit activity of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases. *J Agric Food Chem* 55(16): 6447-52.

Tang YQ, Jaganath IB, Manikam R, Sekaran SD. 2014. Inhibition of APKs, Myc/Max, NFκB, and hypoxia pathways by *Phyllanthus* prevents proliferation, metastasis and angiogenesis in human melanoma (MeWo) cancer cell line. *Int J Med Sci* 11(6): 564-77.

Teixeira RR, Bressan GC, Pereira WL, Ferreira JG, de Oliveira FM, Thomaz DC. 2013. Synthesis and antiproliferative activity of C-3 functionalized isobenzofuran-1(3H)-ones. *Molecules* 18(2):1881-96.

Tsai CM, Yen GC, Sun FM, Yang SF, Weng CJ. 2013. Assessment of the anti-invasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lungadenocarcinoma cells. *Mol Pharm* 10(5): 1890-900.

Xin X, Yang Y, Zhong J, Aisa HA, Wang H. 2009. Preparative isolation and purification of isobenzofuranone derivatives and saponins from seeds of *Nigella glandulifera* Freyn by high-speed counter-current chromatography combined with gelfiltration. *J Chromatogr A* 1216(19): 4258-62.

Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Kawamoto Y, Kato M. 2012. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatology Research and Practice* 1-5.

Yang H, Hu GY, Chen J, Wang Y, Wang ZH. 2007. Synthesis, resolution, and antiplatelet activity of 3-substituted 1(3H)-isobenzofuranone. *Bioorg Med Chem Lett* 17(18): 5210-3.

Yen GC, Chen YL, Sun FM, Chiang YL, Lu SH, Weng CJ. 2011. A comparative study on the effectiveness of cis- and trans form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells. *Eur J Pharm Sci* 44(3): 281-7.

Yuan JH, Dieter MP, Bucher JR, Jameson CW. 1992. Toxicokinetics of cinnamaldehyde in F344 rats. *Food Chem Toxicol* (12): 997-1004.

Zhang L, Zhang J, Fang H, Wang Q, Xu W. 2006. Design, synthesis and preliminary evaluation of new cinnamoyl pyrrolidine derivatives as potent gelatinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 14 (24): 8286-94.

Cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions: Synthesis, molecular docking and anti-invasive activity over metastatic melanoma

ABSTRACT

It is herein described the preparation and antimetastatic evaluation of a collection of twenty-six cinnamic acid derivatives containing a 1,2,3-triazolic portion. The compounds were prepared using as the key step the Copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), also known as click reaction, among alkynylated cinnamic acid derivatives and different benzyl azides. The reactions were carried out in CH₂Cl₂/H₂O (1:1 v/v) at room temperature and triazole derivatives were obtained in yields ranging from 73%-98%. Reaction times varied from 5 to 40 minutes. The identity of each synthesized compound was confirmed by Infrared (IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (¹H and ¹³C) spectroscopy, as well as high-resolution mass spectrometry analyses. The synthesized compounds were submitted to in vitro bioassays to investigate how they act over metastatic behavior of murine melanoma. The most potent compound 3-(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (**9a**) showed significant antimetastatic and antiproliferative activity against B16-F10 cells. In addition, molecular docking revealed that residues are involved in the interaction protein-ligand complexes in metalloproteinases MPP-9 and MPP-2. Therefore, these findings suggest that cinnamic acid derivatives containing a 1,2,3-triazolic portion may have potential for development of novel candidates for controlling malignant metastatic melanoma.

Key words:

antimetastatic, melanoma, click chemistry, gelatinases, matrix metalloproteinase, virtual molecular docking

1. Introduction

Cutaneous melanoma is an extremely aggressive and metastatic cancer. And it is a potentially lethal form of skin cancer. It can be treated by surgical intervention at its early stages, but not when it reaches a metastatic stage. In this case, treatment is extremely difficult due to its resistance to current therapeutic strategies. The resistance is related to complex cell signaling pathways that modulate the proliferation and the ability of tumor cells to escape from apoptotic processes leading to metastasis, which is the main cause of death [Gray-Schopfer, et al., 2007; Siegel et al., 2015; Agaësse et al., 2017]. Metastasis is a process of tumor cells dissemination from a primary tumor mass to a different site. This process involves the detachment, migration, invasion, adhesion, and finally the colonization and growth of a secondary tumor in a new site [Kumar & Weaver, 2009; Guan, et al., 2015]. In this context, the steps involved in the metastasis process represent an important therapeutic target.

Endopeptidases play a fundamental role in melanoma development and progression, since they degrade extracellular matrix (ECM) proteins and basement membranes. Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to the family of zinc-dependent endopeptidases, including collagenases, stromelysins and gelatinases, such as MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B). MMPs are directly involved in melanoma progression and are an indicative of poor prognosis [Hofmann et al., 2000; Anrati et al., 2013; Gu et al., 2016].

Even though important studies have developed different strategies cancer therapies, the unsatisfactory results stimulate the search for new drugs to treat cutaneous melanoma, especially in metastasis. Therefore, it is essential to develop agents with effective antimetastatic activity and low cytotoxicity in anticancer research [Zhao et al., 2014; Tsai et al., 2013; Siegel et al., 2015].

Natural products have been explored as a source of compounds for drug discovery. Over the years, man has utilized secondary metabolites from plants, animals, marine organisms and microorganisms as important tools in the development of new chemotherapeutic agents for the treatment of several diseases. Considering cancer in the period between 1981 and 2002, approximately 60% of the new drugs developed for cancer treatment were derived from natural products [Gullo et al., 2006; Lam et al., 2007; Schmidt et al., 2013; Dias et al., 2012; Harvey et al., 2008]. Compounds currently used in clinical cancer chemotherapy such as paclitaxel, etoposide, teniposide, and camptothecin are examples of drugs based on the molecular structure of natural products [Ali et al., 2014].

The cinnamic acid (**Fig. 1 A**) consists of an aromatic acid found in several higher plants. Typically, this acid occurs in nature in trans-geometry and it belongs to a class of plant hormones regulating cell growth and differentiation known as auxins. Cinnamic acid and its derivatives are easily found in fruits, flowers, and vegetables and commonly consumed as phenolic compounds. These substances play an important role as intermediates in the production of different drugs [Sharma et al., 2015]. It has been demonstrated that several of these compounds displayed antifungal, antibacterial and anticancer activities [Chiriac et al., 2005]. The antimetastatic effect of cinnamic acid derivatives against tumor cell lines has been demonstrated. For instance, trans- (**Fig. 1 A**) and cis- (**Fig. 1 B**) forms of cinnamic acid exhibited antimigration activity against human lung adenocarcinoma cells [Yen et al., 2011]. An FTS-diamine/cinnamic acid hybrid (**Fig. 1 C**) showed significant anti-migratory activity against colon carcinoma cells [Ling et al., 2015]. Caffeic acid (**Fig. 1 D**), ferulic acid (**Fig. 1 E**) and chlorogenic acid (**Fig. 1 F**) were capable of inhibiting the invasive behavior of human lung adenocarcinoma cells [Tsai et al., 2013].

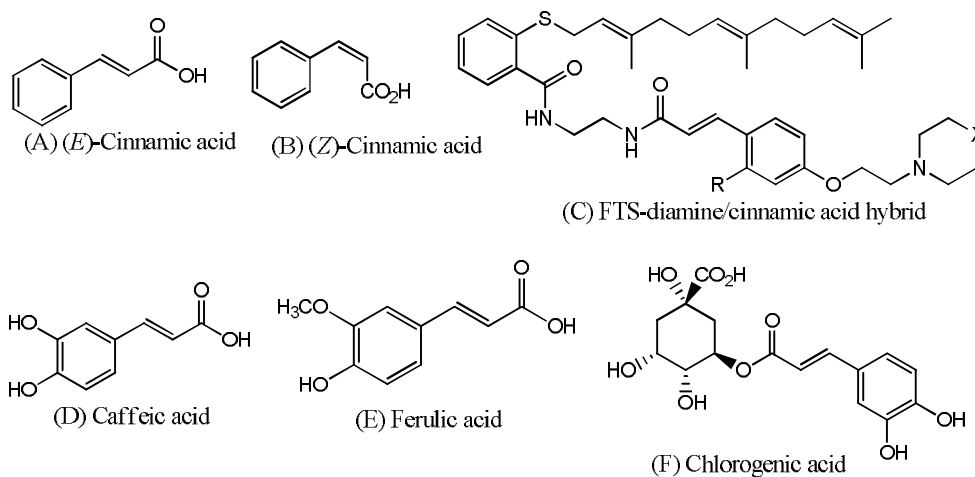


Fig. 1. Structures of cinnamic acid and some derivatives.

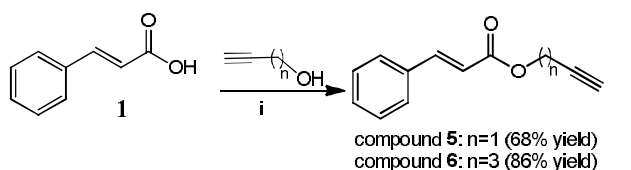
Although several chemotherapeutic agents for melanoma treatment have already been developed, there is a constant need of research efforts towards the development of novel and more efficient molecules, with minor side effects and specificity. Within this context, in this paper we describe the synthesis of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions and the evaluation of their antimetastatic activity. The click reaction, also known as CuAAC (cycloaddition reaction (C) between an alkyne (A) and an azide (A), catalyzed by copper (Cu)) between cinnamates having terminal triple bonds and different benzyl azides

corresponds to the key step of the synthetic route designed to obtain the twenty-six cinnamic acid derivatives containing triazolic portions used in our study. The antimetastatic activity of each synthesized compound was screened against the B16-F10 metastatic melanoma cell line. The most prominent compound was evaluated for its effect on tumor-colony formation and tumor cell proliferation, as well as its effect over non-tumor cell and erythrocyte viability. Finally, structural data about the interaction of some derivatives and metalloproteinases MPP-9 and MPP-2 were also assessed here.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis

The synthesis of cinnamic acid derivatives containing triazolic portions required the preparation of esters **5** and **6**, as well as a series of azides **7** (Fig. 2). Thus, the Steglich Esterification [Sova et al., 2006] between the cinnamic acid (**1**) and different alcohols afforded compounds **5** and **6** in good yields (68% and 83%, respectively) after purification by column chromatography. Azides **7** were prepared from the corresponding benzylic alcohols (Fig. 2) using a methodology previously described [Borgati et al., 2013].



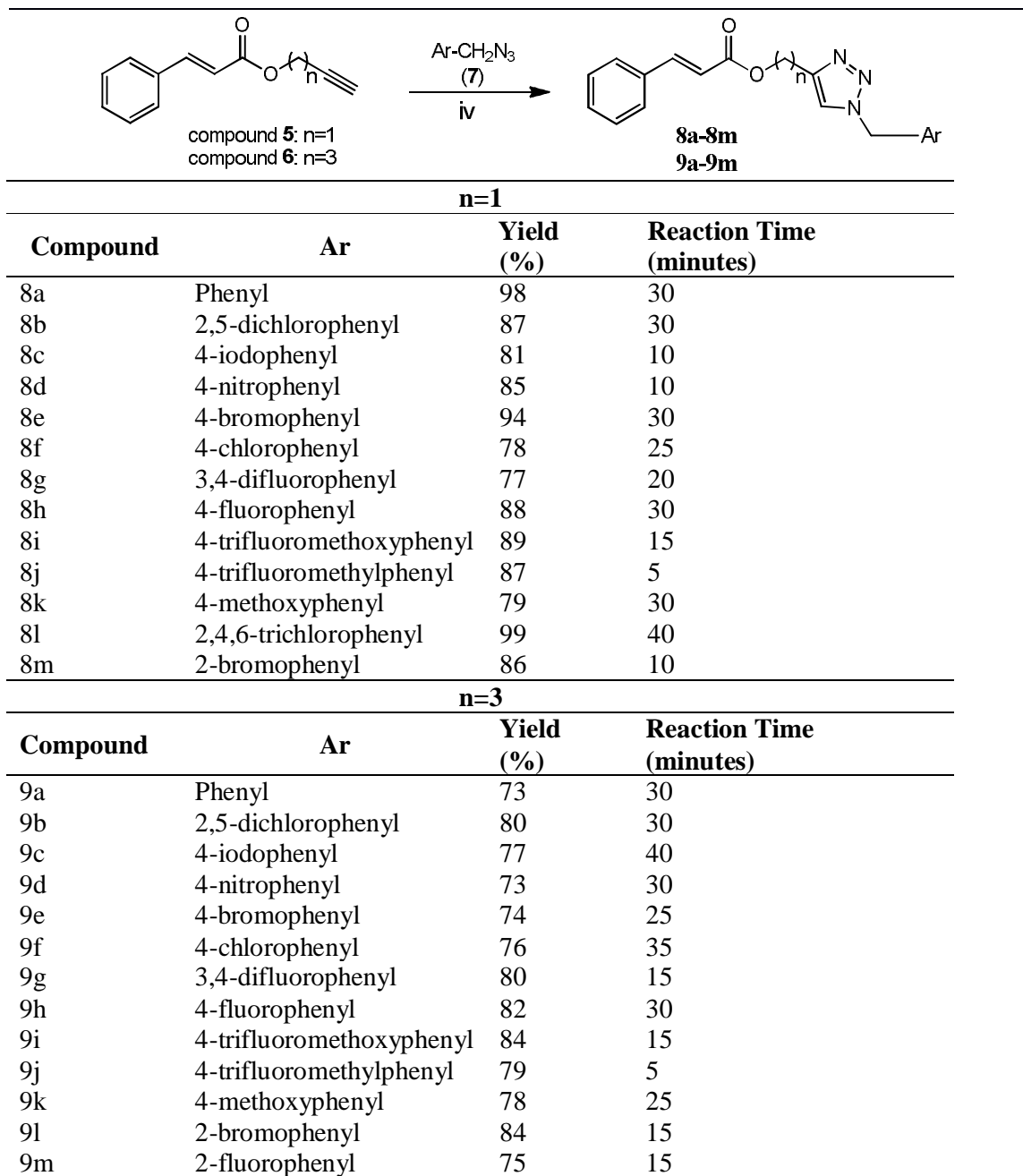
Ar = phenyl; 2,5-dichlorophenyl; 4-iodophenyl; 4-nitrophenyl; 4-bromophenyl;
 4-chlorophenyl; 3,4-difluorophenyl; 4-fluorophenyl; 4-trifluoromethoxyphenyl;
 4-trifluoromethylphenyl; 4-methoxyphenyl; 2,4,6-trichlorophenyl; 2-bromophenyl;
 2-fluorophenyl

Reagents and conditions: (i) DCC, DMAP (10 mol%), CH₂Cl₂, r.t.; (ii) Et₃N, CH₃SO₂-Cl, CH₂Cl₂, -50 °C; (iii) NaN₃, DMSO, r.t.

Fig. 2. Synthesis of esters 5 and 6 and azides 7.

The CuAAC reaction corresponded to the key step involved in the synthesis of cinnamic acid esters containing triazolic functionalities **8a-8m** and **9a-9m**. Hence, the

reactions among esters **5** and **6** and azides **7** afforded the desired cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions in yields ranging from 73% to 99% (**Fig. 3**).



Reagents and conditions: (iv) *sodium ascorbate* (40 mol%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mol%), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v), r.t.

Fig. 3. Synthesis of compounds **8a-8m** and **9a-9m**.

The identity of all synthesized compounds was confirmed by IR, NMR (^1H and ^{13}C), as well as mass spectrometry analyses. The IR spectra of compounds **8a-8m** and **9a-9m**

revealed the presence of intense absorption bands for carbonyl groups ranging from 1695 to 1719 cm^{-1} . In these compounds, the stereochemistry of the aliphatic conjugated double bond was confirmed based on the coupling constant of the signals associated with hydrogens atoms attached to carbons of those bonds (coupling constant of $J = 16$ Hz). The methylene groups attached directly to oxygen or nitrogen were observed as singlets between 4.24-5.80 ppm. The signal assigned to C-H proton of triazole ring appeared as a singlet within 7.11-8.31 ppm range. In the ^{13}C NMR spectra of the triazolic derivatives, the signals for the carbonyl groups were observed around 167.0 ppm while the carbon signals of the 1,2,3-triazole ring was observed around 121 ppm and 144 ppm.

2.2 Biological evaluation

2.2.1 Effect of compounds on B16-F10 cell viability

Initially, prior to *in vitro* evaluating the anti-metastatic efficacy of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions (**8a-8m** and **9a-9m**), we determined the non-cytotoxic or low cytotoxicity concentrations of the compounds in metastatic melanoma B16-F10 cells. Compounds were evaluated at different concentrations (0-200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of each derivative was determined. As shown in **Table 1**, after 48 h of treatment no considerable cytotoxicity was measured for twenty-three compounds ($\text{IC}_{50} \geq 200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Only compounds **9a**, **9g** and **9m** showed some cytotoxicity activity on B16-F10 cells (IC_{50} 123.30; 112.50 and 127.40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively); thus, all subsequent experiments were performed using the derivatives at concentrations lower or equal than 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Table 1. Synthesized compounds (**8a-8m** and **9a-9m**) and half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions over B16-F10 cells.

Compounds	Ar	$IC_{50}/\mu M$
8a		>200
8b		>200
8c		>200
8d		>200
8e		>200
8f		>200
8g		>200
8h		>200
8i		>200
8j		>200
8k		>200
8l		>200
8m		>200
9a		123.30
9b		>200
9c		>200
9d		>200
9e		>200
9f		>200
9g		112.50
9h		>200
9i		>200
9j		>200
9k		>200
9l		>200
9m		127.40

IC_{50} : values expressed in $\mu mol L^{-1}$; B16-F10 (mouse metastatic melanoma cell line).

2.2.2 Cinnamic acid derivatives reduce metastatic potential of B16-F10 cells

Migration is an important step in cancer metastasis and cancer cells have a strong migration behavior (Astin et al., 2010). To examine the effect of the synthesized compounds (**8a-8m** and **9a-9m**) on B16-F10 cell migration, we performed wound healing assay in the presence or absence of the compounds to evaluate cell motility. As shown in **Fig. 4 A**, among the twenty-six synthesized derivatives, nineteen of them suppressed significantly B16-F10 cells migration at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (**8a, 8b, 8f, 8h, 8i, 8j, 8l, 8m, 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9g, 9h, 9i, 9k, 9l** and **9m**) compared with vehicle-treated cells (DMSO). Compounds **8a, 8b, 8l, 8m, 9a, 9c, 9e, 9h, 9l** and **9m** were the most active ones and suppressed B16-F10 cell migration in at least 50% compared with control. Subsequently, it was evaluated the anti-migratory efficacy of these ten derivatives at 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (**Fig. 4 B**). In this case, only compound **9a** (**Fig. 4 C**) suppressed significantly the cell migration (in approximately 80%; $P \leq 0.0001$) in comparison with control (**Fig. 4 D**). Since compound **9a** showed remarkable antimigratory activity, this derivative was chosen for the experiments.

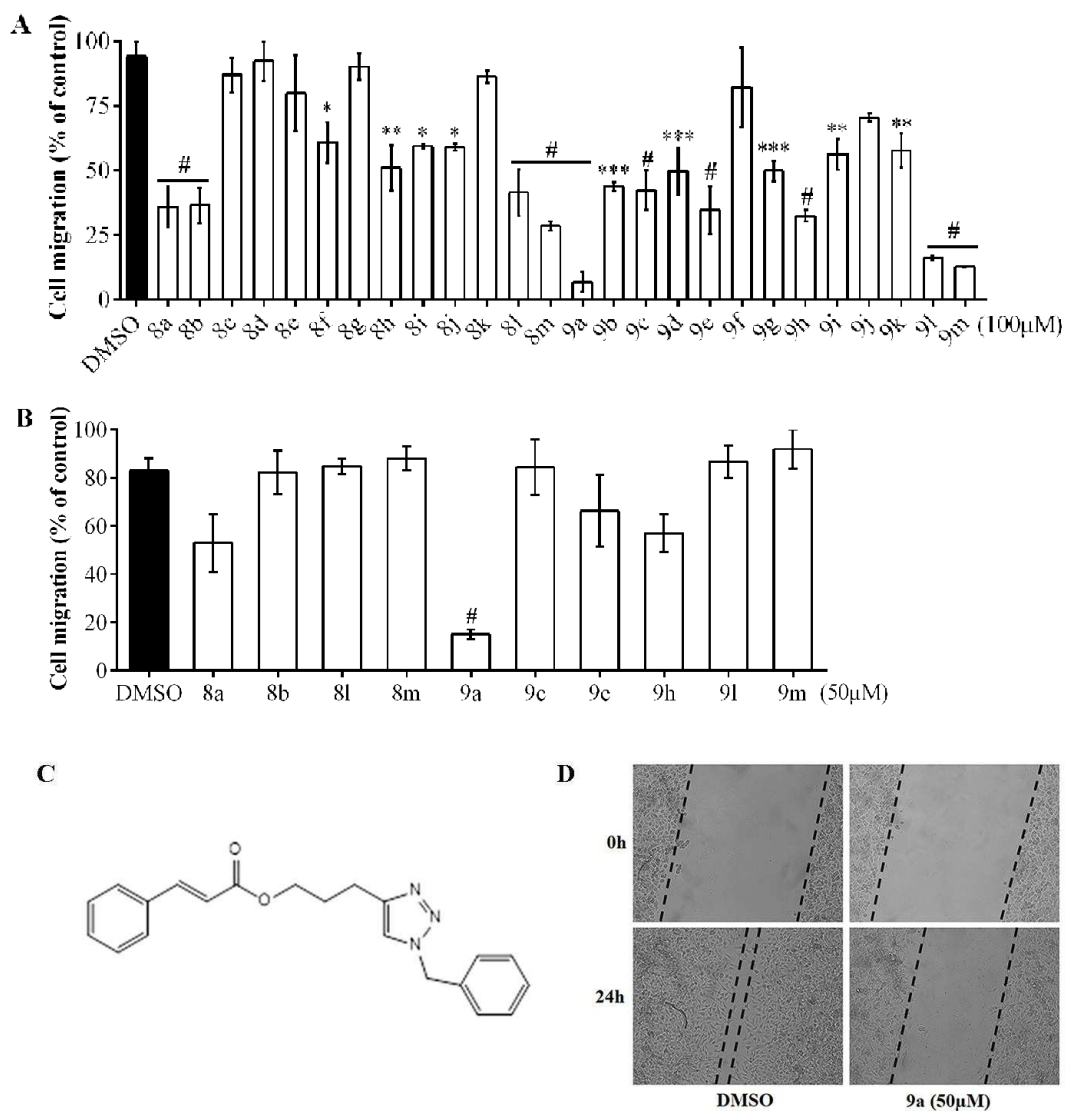


Fig. 4. Effect of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions (8a-8m and 9a-9m) on B16-F10 metastatic melanoma cells migration *in vitro*. (A) B16-F10 cells were wounded with a pipette tip and then treated with 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each synthesized compound for 24 h. (B) B16-F10 cells were wounded and then treated with 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of the most active compounds determined in (A) for 24 h. (C) Chemical structure of compound **9a**. (D) Representative microscopic image of the wound-healing assay on B16-F10 at 0 and 24 h after treatment with 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of compound **9a**. Data expressed as the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ou # $P < 0.0001$ versus control (DMSO) by Dunnett's test.

Invasion and cell adhesion are also key steps in melanoma metastasis and the development of compounds with anti-invasive and anti-adhesive properties are of potential

interest (Shtivelman et al., 2014). In this context, here in we evaluated the effect of compound **9a** in the invasion and adhesion of metastatic B16-F10 cells. Our result for cell invasion assay showed that the invasibility of B16-F10 was decreased after 24 h of treatment with compound **9a** at 12.5 (52.3%), 25 (64.2%) and 50 (76%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ compared with DMSO-treated cells (**Fig. 5 A** and **Fig. 5 B**). As shown in **Fig. 5 C**, treatment with this derivative also inhibited the cell adhesion at 25 (8.6%) and 50 (32.2%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (**Fig. 5 C**). This remarkable activity of compound **9a** over the metastatic behavior of B16-F10 cells is in agreement with other studies that previously reported antimetastatic activity for cinnamic acid derivatives [Yen et al., 2011; Ling et al., 2015; Tsai et al., 2015].

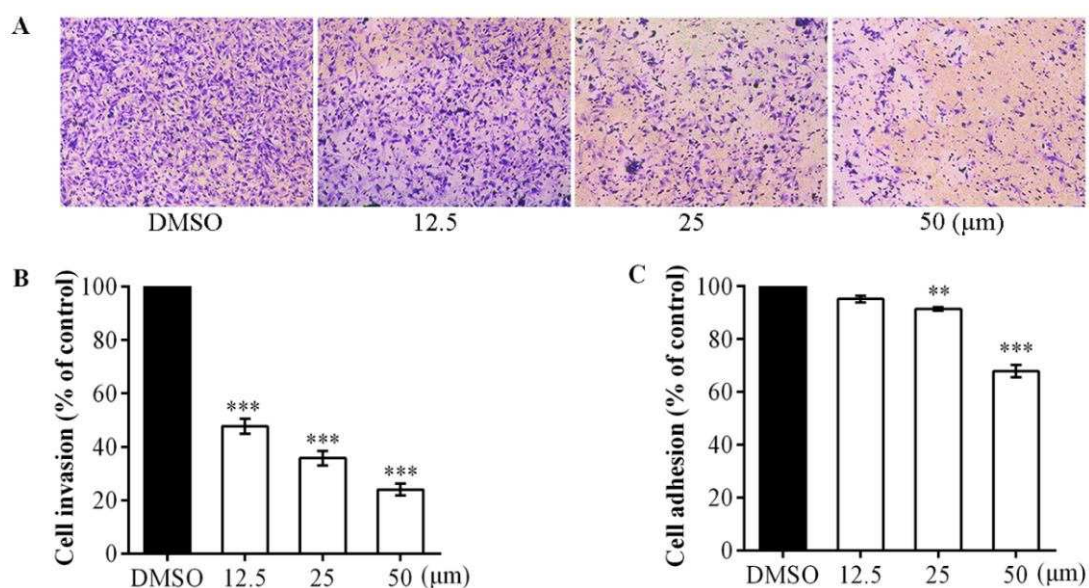


Fig. 5. Effect of compound 9a on invasion and adhesion of B16-F10 cells *in vitro*. (A) Microscopy images of the inhibitory effects of compound 9a on the invasion of B16-F10 cells to matrigel. (B) Quantification of inhibitory effects of compound 9a on the invasion of B16-F10 cells to matrigel. (C) Effect of compound 9a on B16-F10 adhesion to matrigel. Data are representative of three independent experiment and are expressed as the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ versus control (DMSO) by Dunnett's test.

2.2.3 Cinnamic acid derivative **9a** suppresses the colony-formation and proliferation of B16-F10 cells

Cancer metastasis is a process that involves the detachment, migration, invasion, adhesion and finally the colonization and growth of secondary tumor in a new site [Guan, et al., 2015]. Thus, to investigate whether cinnamic acid derivative **9a** could influence the

colony-formation of B16-F10 cells, the colony formation assay (method to determine cell reproductive death) was performed [Franken, et al., 2006]. The colony-forming activity of B16-F10 cell was suppressed after treatment with the compound **9a** at 12.5 (25.5%), 25 (20.6%) and 50 (93.1%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (**Fig. 6 A** and **Fig. 6 B**), reducing the number of colonies compared with vehicle-treated cells (DMSO). In addition, proliferation assay revealed that compound **9a** significantly impaired proliferation of B16-F10 cell at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in a time-dependent manner (**Fig. 6 C**).

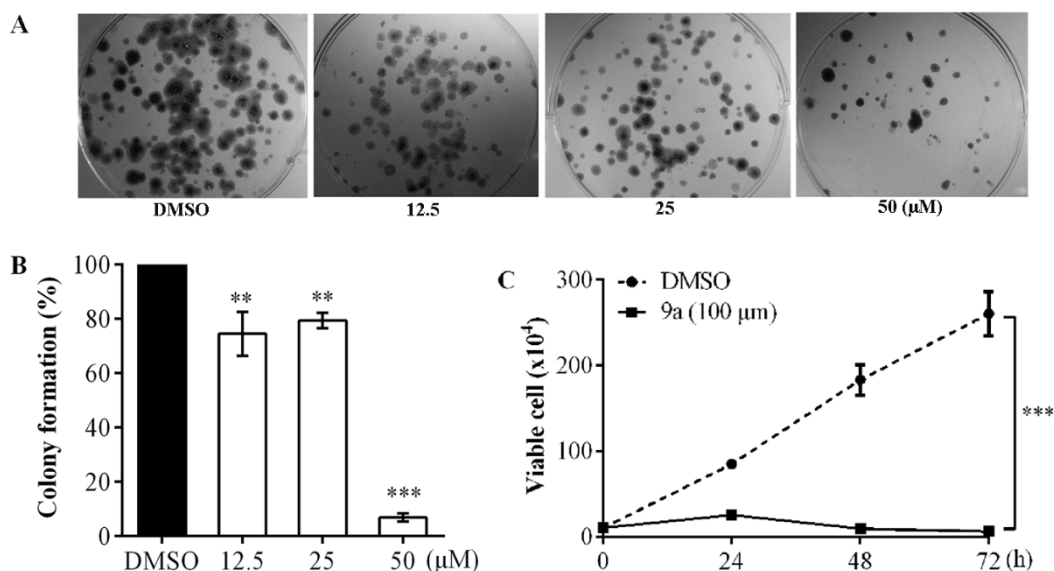


Fig. 6. Effect of compound **9a on colony formation and proliferation of B16-F10 cells.** (A) Representative images of the colony formation assay of B16-F10 cells treated with compound **9a** for 14 days. (A) Quantification of colony formation from three independent experiments. (C) Trypan blue dye exclusion assay of compound **9a** on the proliferation of B16-F10 cells. Data expressed as the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$ versus control (DMSO) by Dunnett's test.

2.2.4 Effect of compound **9a** over non-tumor cell and erythrocyte viability

As compound **9a** proved to be a promising antimetastatic agent, we next evaluated its cytotoxicity over the non-tumor cells and erythrocyte. As shown in **Fig. 8 A**, NIH3T3 fibroblasts were not sensitive to the compound **9a** at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and the Vero cells were slightly sensitive. In addition, no hemolysis indicative was observed for treatments with this derivative at different concentration ranges (12.5 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (**Fig. 8 B**). Taken together,

these data indicates that compound **9a** seems to be non-toxic agent, enabling its application in more advanced pre-clinical studies.

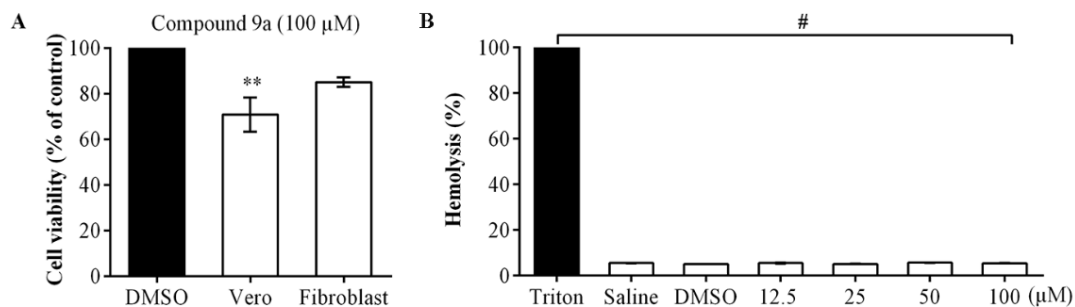


Fig. 8. Effect of compound 9a on non-tumor cell line and hemolysis. (A) Embryonic fibroblasts (NIH3T3) and Vero (African green monkey kidney cell) cell were exposed to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of compound **9a** for 48 h. (B) Graphical of hemolysis assay. Data expressed as the mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$ versus control (DMSO) and # $P < 0.0001$ versus control (Triton) by Dunnett's test.

2.2.5 Cinnamic acid derivative **9a** interacts with MMP-9 and MMP2 in a virtual molecular docking

Virtual molecular docking is an important strategy that plays a vital role in drug discovery [Chinnaraja et al., 2016]. A molecular docking analysis was performed with the twenty-six compounds (**8a-8m** and **9a-9m**) the human protein MMP-9 (PDB-ID:1L6J), which is directly involved in the melanoma progression and is indicative of a poor prognosis [Hofmann et al., 2000; Gu et al., 2016]. As shown in **Table 3**, the docking process has demonstrated that the compounds **8c**, **8j** and **9a** have a important physicochemical binding affinity with the MMP-9 (-8.3, -9.3 and -8.2 kcal/mol, respectively). Subsequently, it was evaluated the binding affinity of the compound **9a** with the human protein MMP-2 (PDB-ID:1QTB). The docking process has demonstrated that compound **9a** has a binding affinity with the MMP-2 (-8.6 kcal/mol).

Table 3. The average binding energy after docking between MMP9 (PDB-ID:1L6J) and synthesized cinnamic acid derivatives.

Compounds	Bond energy (kcal/mol)
8a	-6.9
8b	-8.0
8c	-8.3
8d	-7.8
8e	-6.7
8f	-7.8
8g	-7.9
8h	-7.5
8i	-7.2
8j	-9.3
8k	-7.0
8l	-7.1
8m	-6.8
9a	-8.2
9b	-6.9
9c	-6.8
9d	-7.1
9e	-6.4
9f	-6.2
9g	-6.1
9h	-6.6
9i	-5.9
9j	-7.4
9k	-6.7
9l	-6.9
9m	-6.3

In order to understand the antimetastatic mechanism of the cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions, and try to uncover a correlation between the biologic activity and computational parameters with MMPs, the compounds were docked with human MMP-9 structures. Thus, analysis for the twenty-six compounds (**8a-8m** and **9a-9m**) was performed using molecular docking, and the three compounds with a significant binding affinity with the MMP-9 was selected, compounds **8c**, **8j** and **9a** (**Table 3**). Analysis of the effect of these three compounds on the motility of B16-10 cells (**Fig 4 A**) showed that compound **8c** did not inhibit cell motility, and the compound **8j** possessed a poor inhibitory activity compared to compound **9a**. Although compounds **8c**, **8j** and **9a** showed important binding energy, only the compound **9a** is an antimetastatic agent, as shown *in vitro* experiments (**Fig 4**; **Fig 5**; **Fig 6**). Binding region of the compound **9a** with MMP-9 exactly matches to the active site (**Fig. 7 A**). As shown in **Fig. 7 B**, the compound **9a** interacts with

catalytic aspartate residues, Asp182 and Asp185, of MMP-9 with a distance of 3.5 Å and 3.6 Å, respectively. Subsequently, the molecular docking analysis was performed between compound **9a** and MMP-2, as shown in **Fig. 7 C**. The compound **9a** interacts with catalytic glutamate residues, Glu150, Glu184 and Glu202 of MMP-2 with a distance of 9.6 Å, 9.1 Å and 2.2 Å, respectively.

Our results showed that compound **9a** was effective in inhibiting the metastatic behavior of melanoma cells. In addition, the prediction of molecular coupling indicated that inhibition is probably due to interaction with MMP-9 and MMP-2. Different studies have shown that cinnamic acid derivatives are potent inhibitors of MMPs, highlighting the importance of heteroatoms (especially the hydroxyl group) to form hydrogen bonds, and π electrons to facilitate interactions with hydrophobic regions of the MMP-9 and MMP-2 [Zhang et al., 2006; Yen et al., 2011; Melo, 2012; Tsai et al., 2013].

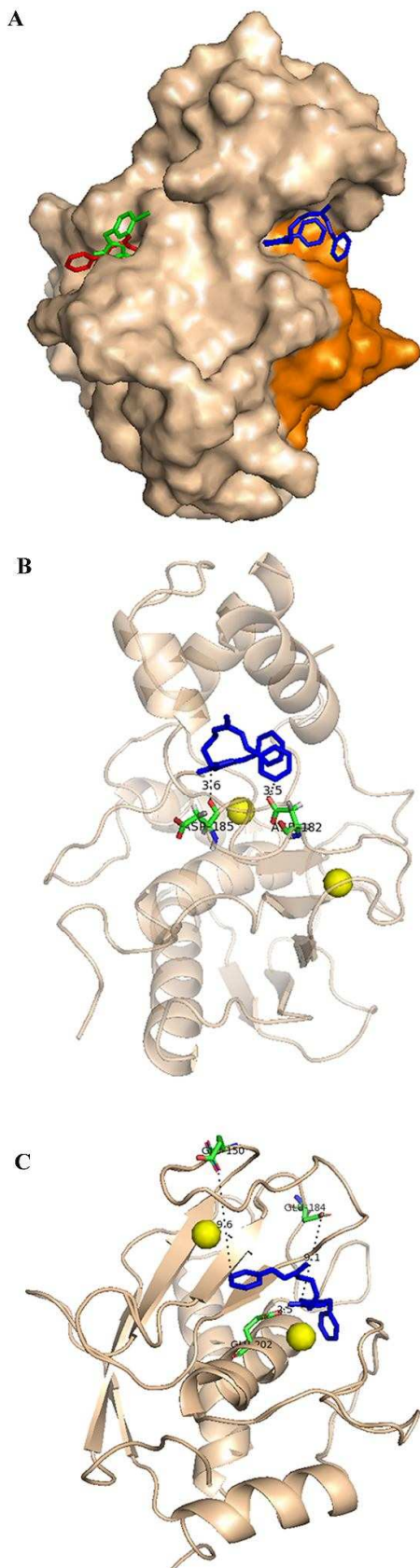


Fig. 7. Molecular interactions of the selective compounds 8c, 8j and 9a with MMP-9 and MMP-2. (A) Docking of compounds 8c (in green), 8j (in red) and 9a (in blue) with MMP-9. The active site with the orange surface. (B) Docking view showing the compound 9a bond interaction of ligands with residues in the active site of MMP-9. Important residues Asp182 and Asp185 (green) of MMP-9 interaction between compound 9a (blue). The zinc ion of the active site in yellow. (C) Docking view showing the compound 9a bond interaction of ligands with residues in the active site of MMP-2. Important residues Glu 150, Glu184 and Glu202 (green) of MMP2 interaction between compound 9a (blue). The zinc ion of the active site in yellow.

3. Conclusion

In present work, twenty-six cinnamic acid derivatives containing a 1,2,3-triazolic portion were synthesized and submitted to *in vitro* bioassays to investigate how they act over the metastatic behavior of murine melanoma. The most potent compound 9a, a 1,2,3-triazolic-cinnamic acid derivative containing a phenyl group showed significant antimetastatic and antiproliferative activity against B16-F10 cells. In order to strengthen the *in vitro* experiments, the virtual molecular docking was performed, which demonstrate that compound 9a has an important physicochemical binding affinity with the metalloproteinases 9 and 2. Hence, our investigation suggests that cinnamic acid derivatives containing a 1,2,3-triazolic portion may have potential scaffolds for the development of novel candidates for controlling malignant metastatic melanoma.

4. Material and Methods

4.1. Synthetic procedures

4.1.1 Generalities

Solvents were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Commercially available pent-4-yn-1-ol, prop-2-yn-1-ol, triethyl amine, dimethyl sulfoxide (DMSO), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-*N,N'*-dimethylaminopyridine (DMAP), sodium ascorbate, sodium azide and copper (II) sulfate were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. The ¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 instrument at 300 MHz and 75 MHz respectively, using CDCl₃ or DMSO-*d*₆ as solvents. The NMR data are presented as follows: chemical shift (δ) in ppm, multiplicity, the number of protons, *J* values in Hertz (Hz). Multiplicities are indicated by the following abbreviations: s (singlet), d (doublet), dd (double of doublets), t (triplet), m (multiplet), q (quartet), quint (quintet), td (double of triplets), d_{ap} (apparent doublet), t_{ap} (apparent triplet). Mass spectra were recorded on a SHIMADZU GCMS-QP5050A instrument using direct insertion along with the electron spray ionization method and a quadrupole analyzer. IR spectra were obtained using Varian 660-IR equipped with GladiATR scanning from 4000 to 500 cm⁻¹. Melting points were determined using a MQAPF-302 melting point

apparatus (Microquimica, Brazil) and are uncorrected. The progress of the reactions was monitored by thin layer chromatography (TLC). Flash column chromatography was performed using silica gel (60–230 mesh).

4.1.2 Synthesis of prop-2-yn-1-yl cinnamate (**5**).

0.300 g (5.35 mmol) of propargyl alcohol was added to a 50 mL round-bottom flask containing 25.0 mL of dichloromethane, 0.720 g (4.86 mmol) of cinnamic acid (**1**), 1.10 g (5.35 mmol) of DCC and 0.0594 g (0.486 mmol) of DMAP. After 25 minutes of stirring at room temperature, the reaction mixture was filtered and the resulting solution washed with 10% citric acid (2 x 20.0 mL), water (15.0 mL) and brine (30.0 mL). The resulting organic phase was reserved and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 x 20.0 mL). The organic extracts were combined, and the resulting organic phase was dried (MgSO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified by column chromatography on silica gel eluted with hexane/ethyl acetate (4:1 v/v). The described procedure afforded compound **5** in 68% yield (0.613 g, 3.30 mmol). Yellow oil, TLC: R_f = 0.41. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.51 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 4.82 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz), 6.47 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz), 7.38-7.40 (m, 3H), 7.51-7.55 (m, 2H), 7.75 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 52.0, 74.9, 77.8, 117.0, 128.2, 128.9, 130.5, 134.1, 145.9, 166.0. MS, *m/z* (%) 186 ([M]⁺, C₁₂H₁₀O₂, 14), 157 (8), 131 (100), 115 (16), 103 (82), 77 (75), 51 (66).

The other cinnamate **6** (**Fig. 2**) was prepared employing a procedure similar to that described for **5**. Structure for **6** (pent-4-yn-1-yl cinnamate) is supported by the following spectroscopic data.

Yellow oil, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (6:1 v/v), TLC: R_f = 0.53. IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3296, 3058, 2926, 2118, 1707, 1636, 1446, 1308, 1160. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.90-2.00 (m, 3H), 2.35 (td, 2H, *J*₁ = 7.0 Hz and *J*₂ = 2.6 Hz), 4.32 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 6.44 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz), 7.37-7.40 (m, 3H), 7.51-7.54 (m, 2H), 7.69 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 15.3, 27.7, 63.0, 69.0, 83.1, 117.9, 128.1, 128.9, 130.3, 134.4, 144.9, 166.9. MS, *m/z* (%): 186 ([M]⁺, C₁₂H₁₀O₂, 80), 158 (9), 147 (45), 131 (100), 103 (76), 91 (6), 77 (80), 65 (20), 51 (55), 41 (35).

4.1.3 Synthesis of compounds **8b-8m**, **9a-9m**, exemplified by the synthesis of (1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**8a**)

To a 10.0 mL round-bottom flask were added benzyl azide (0.100 g, 0.750 mmol), water (1.00 mL), dichloromethane (1.00 mL), sodium ascorbate (0.0593 g, 0.300 mmol), prop-2-yn-1-yl cinnamate (**5**) (0.140 g, 0.750 mmol) and CuSO₄·5H₂O (0.0375 g, 0.150 mmol). The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 30 minutes. Subsequently, saturated Na₂CO₃ solution (10.0 mL) was added and the resulting mixture was extracted with dichloromethane (3 x 20.0 mL). The organic extracts were combined, and the resulting organic phase was dried (MgSO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified by column chromatography on silica gel eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v). The described procedure gave compound **8a** in 98% yield (0.235 g, 0.737 mmol). White solid, m.p. 123.6-124.5 °C, TLC: R_f = 0.28 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3117, 3053, 2948, 1707, 1637, 1577, 1493, 1160. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.33 (s, 2H), 5.52 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz), 7.29-7.48 (m, 10H), 7.57 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 54.2, 57.6, 117.4, 123.7, 128.10, 128.14, 128.8, 128.9, 129.1, 130.4, 134.2, 134.4, 143.4, 145.5, 166.7.

Compounds **8b-8m** and **9a-9m** (Fig. 3) were prepared from the corresponding azides using a procedure similar to that described for compound **8a**. All the compounds were fully characterized by IR, NMR (¹H and ¹³C), and mass spectrometry. Structures for the remaining compounds are supported by the following spectroscopic data

Data for (1-(2,5-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8b) White solid, m.p. 97.9-98.4 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.58 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3113, 3073, 2974, 1713, 1634, 1493, 1304, 1146. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.36 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz), 7.17-7.51 (m, 8H), 7.67-7.73 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 51.0, 57.6, 117.4, 124.1, 128.1, 128.9, 130.2, 130.4, 130.5, 131.0, 131.6, 133.5, 133.8, 134.2, 143.5, 145.6, 166.7.

Data for (1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8c)

White solid, m.p. 200.8-201.7 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.33 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3132, 3080, 3025, 2967, 1709, 1632, 1576, 1482, 1304, 1160. ¹H

NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.25 (s, 2H), 5.55 (s, 2H), 6.59 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 7.12 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 7.39-7.41 (m, 3H), 7.62-7.69 (m, 3H), 7.73 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 8.19 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 52.8, 57.7, 94.7, 118.2, 125.3, 128.8, 129.3, 130.7, 130.9, 134.4, 136.1, 138.0, 142.8, 145.4, 166.3.

Data for (1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8d).

White solid, m.p. 194.1-195.0 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.18 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3127, 3083, 2966, 2852, 1704, 1625, 1523, 1433, 1341, 1154. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.28 (s, 2H), 5.78 (s, 2H), 6.59 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 7.39-7.41 (m, 3H), 7.55 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.63-7.68 (m, 3H), 8.21 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.28 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 52.5, 57.7, 118.2, 124.3, 125.6, 128.8, 129.3, 129.6, 130.9, 134.4, 142.9, 143.6, 145.4, 147.9, 166.3.

Data for (1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8e)

White solid, m.p. 182.0-183.2 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.30 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3136, 3082, 2922, 2852, 1706, 1632, 1577, 1486, 1305, 1162. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.24 (s, 2H), 5.58 (s, 2H), 6.63 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 7.28 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.39-7.41 (m, 3H), 7.57 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.63-7.71 (m, 3H), 8.25 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 52.5, 57.7, 118.0, 121.9, 125.5, 128.9, 129.4, 130.7, 131.0, 132.2, 134.3, 135.8, 142.7, 145.5, 166.3.

Data for (1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8f)

White solid, m.p. 171.2-172.6 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.37 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3139, 3058, 2922, 2852, 1709, 1632, 1577, 1486, 1305, 1160. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.24 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 6.63 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 7.33-7.71 (m, 10H), 8.25 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 52.5, 57.7, 118.0, 125.5, 128.9, 129.2, 129.4, 130.4, 131.0, 133.4, 134.3, 135.4, 142.7, 145.5, 166.3.

Data for (1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8g) White solid, m.p. 149.7-150.8 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.28 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3132, 3064, 2968, 1710, 1632, 1518, 1434, 1282, 1160. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.34 (s, 2H), 5.48 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 7.00-7.21 (m, 3H), 7.36-7.40 (m, 3H), 7.48-7.51 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz.). ¹³C NMR (75

MHz, CDCl₃) δ : 53.1 (d, J_{C-F} = 1.3 Hz), 57.6, 117.2-118.2 (m), 117.3, 123.7, 124.3 (dd, J_{C-F} = 3.7 Hz and J_{C-F} = 6.5 Hz), 128.1, 128.9, 130.5, 131.3 (dd, J_{C-F} = 4.0 Hz and J_{C-F} = 5.6 Hz), 134.1, 143.7, 145.6, 148.8-152.3 (m), 166.7.

Data for (1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8h)

White solid, m.p. 132.3-133.2 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.25 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3138, 3085, 2966, 1711, 1634, 1508, 1433, 1218, 1167. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.33 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, J_{trans} = 16.1 Hz), 7.06 (t_{ap}, 2H, J = 8.6 Hz), 7.25-7.51 (m, 7H), 7.57 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, J_{trans} = 16.1 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 53.5, 57.6, 116.2 (d, J_{C-F} = 21.7 Hz), 117.4, 123.6, 128.1, 128.9, 130.0 (d, J_{C-F} = 8.5 Hz), 130.2 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz), 130.5, 134.2, 143.5, 145.6, 162.9 (d, J_{C-F} = 247.0 Hz), 166.7.

Data for (1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8i)

White solid, m.p. 159.6-160.3 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.38 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3135, 3058, 2964, 1709, 1634, 1507, 1451, 1218, 1140. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.34 (s, 2H), 5.53 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 7.22 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.32 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 7.36-7.38 (m, 3H), 7.48-7.51 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 53.3, 57.6, 117.4, 120.3 (q, J = 256.2 Hz), 121.6, 123.7, 128.1, 128.9, 129.6, 130.5, 133.1, 134.1, 143.6, 145.6, 149.5, 166.7.

Data for (1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8j) White solid, m.p. 174.0-174.8 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.40 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3133, 3084, 2966, 1709, 1632, 1579, 1496, 1319, 1153, 1102. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.26 (s, 2H), 5.73 (s, 2H), 6.64 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 7.39-7.41 (m, 3H), 7.51 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.63-7.71 (m, 3H), 7.74 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 8.31 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 52.6, 57.7, 118.0, 124.5 (q, J = 270.6 Hz), 125.7, 126.2 (q, J = 3.8 Hz), 128.9, 128.9, 129.2, 129.4, 131.0, 134.3, 141.0, 142.8, 145.5, 166.4.

Data for (1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8k) White solid, m.p. 94.2-95.6 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: R_f = 0.41 (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3125, 3014, 2842, 1719, 1640, 1610, 1510, 1433, 1244, 1156. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 3.79 (s, 3H), 5.31 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, J_{trans} = 16.0 Hz), 6.89 (d, 2H, J

= 8.6 Hz), 7.24 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.36-7.50 (m, 5H), 7.53 (s, 1H), 7.68 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 53.8, 55.3, 57.7, 114.5, 117.5, 123.4, 126.3, 128.1, 128.9, 129.7, 130.4, 134.2, 143.2, 145.5, 160.0, 166.7.

Data for (1-(2,4,6-trichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8l) White solid, m.p. 122.8-124.1 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.48$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3148, 3083, 2925, 2850, 1697, 1632, 1548, 1437, 1313, 1167. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.32 (s, 2H), 5.80 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.38-7.49 (m, 7H), 7.63 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 48.5, 57.5, 117.4, 123.6, 128.1, 128.6, 128.8, 128.9, 130.4, 134.2, 136.4, 137.3, 143.0, 145.5, 166.7.

Data for (1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (8m) White solid, m.p. 76.7-78.2 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.48$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3104, 3058, 2971, 2923, 1695, 1626, 1453, 1440, 1244. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.35 (s, 2H), 5.67 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.17-7.63 (m, 9H), 7.67-7.72 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 53.8, 57.6, 117.4, 123.5, 124.0, 128.1, 128.2, 128.9, 130.4, 130.5, 133.2, 133.9, 134.2, 143.3, 145.5, 166.7.

Data for 3-(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9a) White solid, m.p. 68.1-69.5 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.26$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2935, 1705, 1634, 1552, 1450, 1309, 1163; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.48 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.24-7.53 (m, 11H), 7.66 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.3, 28.4, 54.0, 63.6, 118.0, 120.8, 128.0, 128.1, 128.6, 128.9, 129.1, 130.3, 134.3, 134.8, 144.8, 147.4, 167.0.

Data for 3-(1-(2,5-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9b) White solid, m.p. 94.3-95.3 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.48$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3116, 3067, 2940, 1703, 1632, 1577, 1461, 1320, 1166. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.12 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.87 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.26 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.58 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.11-7.54 (m, 9H), 7.67 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.3, 28.4, 50.8, 63.6, 118.0, 121.3, 128.1, 128.9, 129.9, 130.2, 130.3, 130.9, 131.4, 133.5, 134.3, 134.3, 144.8, 147.6, 167.0.

Data for 3-(1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9c)

White solid, m.p. 97.5-98.3 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.37$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3112, 3063, 2904, 2852, 1707, 1636, 1546, 1446, 1280, 1166. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.42 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 6.99 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.25 (s, 1H), 7.38-7.70 (m, 8H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.4, 63.6, 94.4, 117.9, 120.8, 128.0, 128.9, 129.7, 130.3, 134.3, 134.5, 138.2, 144.8, 147.6, 166.9.

Data for 3-(1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9d)

White solid, m.p. 63.8-65.2 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.14$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3139, 2946, 2913, 2853, 1707, 1631, 1524, 1450, 1343, 1309, 1159. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.11 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.86 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.60 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.35-7.50 (m, 8H), 7.65 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 8.20 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.0, 63.5, 117.9, 121.2, 124.3, 128.0, 128.5, 128.9, 130.4, 134.3, 141.9, 144.9, 147.9, 148.0, 166.9.

Data for 3-(1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9e) Yellow solid, m.p. 101.7-102.9 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.58$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3112, 3056, 2954, 2905, 2848, 1708, 1637, 1545, 1446, 1283, 1166. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.43 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.12 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz), 7.25 (s, 1H), 7.38-7.50 (m, 7H), 7.66 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.3, 63.6, 117.9, 120.8, 122.8, 128.0, 128.9, 129.6, 130.3, 132.2, 133.8, 134.3, 144.8, 147.6, 166.9.

Data for 3-(1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9f) Yellow solid, m.p. 58.2-59.4 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.34$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3117, 3060, 2967, 2904, 2851, 1706, 1638, 1545, 1490, 1283, 1167. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.08 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.23 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.45 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.18 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.25 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.36-7.51 (m, 5H), 7.66 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.2, 63.6, 117.9, 120.8, 128.0, 128.9, 129.3, 130.3, 133.3, 134.3, 134.7,

144.8, 147.6, 166.9.

Data for 3-(1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9g) White solid, m.p. 69.5-70.3 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.18$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3099, 3053, 2956, 2931, 2858, 1701, 1634, 1520, 1447, 1312, 1160. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.84 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.44 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 6.97-7.19 (m, 3H), 7.28 (s, 1H), 7.37-7.39 (m, 3H), 7.50-7.52 (m, 2H), 7.66 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 52.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 1.3$ Hz), 63.5, 117.0-118.1 (m), 117.9, 120.8, 124.0 (dd, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz and $J_{\text{C-F}} = 6.6$ Hz), 128.0, 128.9, 130.3, 131.8 (dd, $J_{\text{C-F}} = 4.0$ Hz and $J_{\text{C-F}} = 5.6$ Hz), 134.3, 144.9, 147.7, 148.7-152.2(????), 166.9.

Data for 3-(1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9h) White solid, m.p. 75.9-76.8 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.18$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3132, 3066, 2944, 1703, 1632, 1509, 1313, 1219, 1157. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.45 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.04 (t_{ap}, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.22-7.53 (m, 8H), 7.66 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.3, 63.6, 116.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.6$ Hz), 117.9, 120.7, 128.0, 128.9, 129.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 8.4$ Hz), 130.3, 130.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.3$ Hz), 134.3, 144.8, 147.5, 162.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 246.5$ Hz), 166.9.

Data for 3-(1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9i)

White solid, m.p. 73.8-75.0 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.37$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3126, 3068, 2993, 2949, 1706, 1634, 1508, 1449, 1160. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.84 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.49 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.20 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.27-7.51 (m, 8H), 7.67 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.1, 63.6, 117.9, 120.3 (q, $J = 256.1$ Hz), 120.8, 121.5, 128.0, 128.9, 129.4, 130.3, 133.5, 134.3, 144.9, 147.8, 149.3, 167.0.

Data for 3-(1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9j) White solid, m.p. 97.3-98.2 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.25$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR)

$\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3116, 3063, 2954, 1708, 1638, 1447, 1324, 1121. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.85 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.56 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz), 7.29-7.69 (m, 11H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.3, 63.5, 117.9, 121.0, 123.8 (q, $J = 270.6$ Hz), 126.1 (q, $J = 3.7$ Hz), 128.0, 128.1, 128.9, 130.3, 130.9 (q, $J = 32.6$ Hz), 134.3, 138.8, 144.9, 147.8, 167.0.

Data for 3-(1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9k) Yellow solid, m.p. 87.3-88.6 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.28$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3101, 3054, 3006, 2949, 2831, 1707, 1638, 1509, 1434, 1243, 1167. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.95 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.70 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.70 (s, 3H), 4.15 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 5.43 (s, 2H), 6.61 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz), 6.89 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.24 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.39-7.41 (m, 3H), 7.60-7.71 (m, 3H), 7.87 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 22.0, 28.5, 52.7, 55.5, 63.9, 114.5, 118.5, 122.3, 128.6, 128.8, 129.3, 129.9, 130.9, 134.4, 144.9, 146.7, 159.5, 166.7.

Data for 3-(1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9l) Yellow oil, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.33$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3136, 3059, 3027, 2953, 2855, 1703, 1634, 1573, 1443, 1309, 1165. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.85 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.62 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.10-7.62 (m, 10H), 7.67 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.3, 28.4, 53.7, 63.6, 118.0, 121.2, 123.3, 128.1, 128.2, 128.9, 130.2, 130.3, 130.3, 133.1, 134.3, 134.4, 144.8, 147.4, 166.9.

Data for 3-(1-(2-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9m) White solid, m.p. 45.5-46.3 °C, purified by column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.35$ (hexane/ethyl acetate/dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3125, 3061, 2948, 1710, 1636, 1490, 1313, 1166. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.54 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.07-7.53 (m, 10H), 7.66 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.3, 28.4, 47.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 4.4$ Hz), 63.7, 115.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.1$ Hz), 118.0, 120.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 1.5$ Hz), 122.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 14.7$ Hz), 124.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.7$ Hz), 128.1, 128.9, 130.3, 130.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.3$ Hz), 130.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 8.2$ Hz), 134.4, 144.8, 147.5, 160.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 246.3$ Hz), 167.0.

4.2 Biological evaluation

4.2.1 Cell culture and culture conditions

Metastatic melanoma cells (B16-F10) were kindly provided by Dr. Anésia Aparecida dos Santos (Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brazil). Embryonic fibroblasts cell line (NIH3T3) were kindly provided by Dr. Leandro Licusi de Oliveira (Department of General Biology, UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil). The African green monkey kidney cell line (Vero) were kindly provided Dr. Juliana Fietto Lopes Ragel (Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil). Cell lines were grown in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (LGC Biotecnologia), 100 mg/mL streptomycin, and 100 units/mL penicillin at pH 7.2 and 37°C under 5% CO₂ atmosphere.

4.2.2 Cell viability assay

Cell B16-F10 (1×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates. Each well contained 100 μ L of complete RPMI medium and 100 μ L of each compound solution at different concentration (0-200 μ mol L⁻¹). The compounds **8a-8m** and **9a-9m** were diluted in RPMI medium with 10% FBS and 0.4% DMSO (v/v, Sigma). After 48 h of incubation, MTT (5 mg/mL, Sigma) was added to the wells. After 4 h at 37°C, the MTT solution was removed and added 100 μ mol L⁻¹/well of DMSO to solubilize the formazan crystals. Absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices). The results were normalized considering the cultures treated with the 0.4% DMSO (control) and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated [Siqueira et al., 2015].

4.2.3 Migration assay

In order to investigate the cell migration inhibition efficiency of the cinnamic acid derivatives, the wound healing assay was performed in B16-F10 cells as described in a previous report [Liang et al., 2007; Anasamy et al., 2017] with some modifications. Briefly, cells (2×10^5 cells per well) were seeded in a 24-well plate and allowed to grow overnight at

37° C and 5% CO₂ to form a confluent monolayer. After, the monolayer were wounded by a sterile pipette tip. The cells were washed with PBS twice to remove cellular detached cells. Initially the cells were treated with the compounds **8a-8m** and **9a-9m** at the concentration of 100 µM and after evaluation, the selected compounds were treated at the concentration of 50 µM. DMSO (0.4% v/v) was used as control. Digital images were captured using an inverted microscope (EVOS fl, Life Technologies). Wound closure rates were then calculated quantitatively as the difference between wound width at 0 and 24 h. The results were expressed as percentage of cell migration.

4.2.4 Invasion assay

Cell invasion assay were performed using transwell chamber (8 µm pore diameter; Millipore) based on protocols described previously with some modifications [Chen, 2005; Hulkower and Herber, 2011]. Briefly, 60 µl of matrigel (BD Biosciences), diluted in serum free medium (1:12) was added to the upper chambers of the transwell inserts and left for 1h at 37 °C to gel formation. Thereafter, B16-F10 cells were (1×10^5) diluted with serum free medium and treated with compound **9a** in different concentrations (12.50, 25 and 50µM) for 1h, were seeded into the upper compartment, while the medium containing 10% fetal bovine serum was added in the lower compartment. After 24 h of incubation at 37°C and under 5% CO₂ atmosphere, the non-invaded cells on the upper side of the membrane were removed with a cotton swab. The invaded cells on the bottom surface were fixed with methanol and stained with 0.5% toluidine blue solution (Sigma). The invaded cells were quantified by manual counting and ten randomly chosen fields were analyzed for each group. DMSO-vehicle treatment (0.4% v/v) was used as control. The results were expressed as percentage cell migration. Three independent experiments were performed for each sample.

4.2.5 Adhesion assay

Cell adhesion assay was performed as described previously with some modifications [Anasamy et al., 2017]. In synthesis, B16-F10 cells (5×10^4) were diluted with serum free medium and treated with the compound **9a** in different concentrations (12.50, 25 and 50 µmol L⁻¹) for 30 min. After, the cells were seeded to matrigel-coated plates and then incubated

overnight at 37° C and 5% CO₂. Non-adherent cells were removed by gentle washing with PBS. Then, colorimetric MTT assay was employed to analyze the adhesion ability of cells.

4.2.6 Molecular docking

Molecular docking analysis of the synthesized compounds (**8a-8m** and **9a-9m**) was performed to determine the relative affinity with matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) enzymes using the AutoDock Vina (1.1.2) (Trott and Olson, 2010). The crystal structure of MMP-9 (PDB ID: 1L6J) and MMP-2 PDB ID: 1QIB) was extracted from Protein Data Bank. The binding site was identified by selecting the zinc ions and the amino acids within radius 12 Å were selected at the binding site. The molecular structures of all the compounds were drawn using MarvinSketch software (Chemaxon®). Binding energy estimated using Auto Docking Tools. Docked structures were visualized and edited using PyMOL software (Koca et al., 2016).

4.2.7 Clonogenic assay

The clonogenic cell assay was implemented as described previously [Franken et al., 2006; Mao et al., 2016] with some modifications. Briefly, B16-F10 cells (1x10³ cells per well) were seeded in a 6-well plate and allowed to overnight at 37°C and 5% CO₂. Posteriorly, exhausted medium was changed with fresh medium containing different concentrations (12.50, 25 and 50 µmol L⁻¹) of the compound **9a**. Treatment was carried out for 24 h following which. The cells were then cultured for 14 days with growth medium replaced every two days. On day 15, the resulting colonies were fixed with metanol and stained with 0.5% toluidine blue solution. The colonies were counted and expressed as a percentage compared to untreated control cultures.

4.2.8 Proliferation assay

Proliferation assays was performed in 6-well plates containing 10⁵ B16-F10 cells per well. The compound **9a** was added at 100 µmol L⁻¹, and as control were used DMSO (0.4% v/v). The effect of the compound on cell growth were determined by trypan blue (Invitrogen)

dye exclusion. After 24, 48, and 72 h cells were loaded on a hemocytometer to obtain the viable cell count.

4.2.9 Cytotoxicity on non-tumor cell lines

The cytotoxicity of compound **9a** was tested on three non-tumor cell lines. Cell NIH3T3 (1×10^4 cells/well) and Vero (3×10^4 cells/well) were seeded in 96-well plates and cell viability was determined by MTT assay as described above.

4.2.10 Hemolysis assay

This assay was used to determine the compatibility of red blood cells to the compound **9a**. Blood was collected from a five healthy C57BL/6J male mice and centrifuged at 700 g for 10 min and washed three times with saline, then resuspended in the same buffer to prepare 2% red blood cells suspension [Xu et al., 2017]. Subsequently, different concentrations (0 - $200 \mu\text{mol L}^{-1}$) of the compound **9a** were incubated with the suspension at 37°C . The red blood cells were also incubated with saline and triton (1% v/v) as negative control and positive control, respectively. After 1 h, the samples were centrifuged for 10 min at 700 g and then determined the release of hemoglobin by photometric analysis at 540 nm. The procedures were in accordance with the ethical principles in animal research adopted by the Animal Ethics Committees (CEUA protocol number 27/2015).

4.2.11 Statistical Analysis

All numeric data were obtained from three independent experiments and are shown as mean \pm standard error mean (S.E.M). Analyses were performed using Microsoft Excel (Microsoft Office Software) and GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Statistical analyses were done by one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

(FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The funders had no involvement in the study design, in the collection, analysis or interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the article for publication. The authors also thank CNPq, FAPEMIG and CAPES for the fellowships to students and researchers involved in this work.

References

V. Gray-Schopfer, C. Wellbrock, R. Marais, Melanoma biology and new targeted therapy, *Nature*. 445 (2007) 851-857.

R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2015, *CA Cancer J Clin*. 65 (1) (2015) 5-29.

G. Agaësse, L. Barbolat-Boutrand, M. El Kharbili, O. Berthier-Vergnes, I. Masse. p53 targets TSPAN8 to prevent invasion in melanoma cells, *Oncogenesis*. 6e309 (2017) 1-7.

S. Kumar S, V.M. Weaver, Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell, *Cancer Metastasis Rev*. 28 (1-2) (2009) 113-27.

X. Guan, Cancer metastases: challenges and opportunities, *Acta Pharm Sin B*. 5(5) (2015) 402-18.

U.B. Hofmann, J.R. Westphal, G.N. Van Muijen, D.J. Ruiter, Matrix metalloproteinases in human melanoma, *J Invest Dermatol*. 115 (3) (2000) 337-44.

M.A. Ansari, S. Shaikh, G. Muteeb, S. Mohd, D. Rizvi, S. Shakil, A. Alam, R. Tripathi, F. Ghazal, A. Rehman, S.G. Ali, A.K. Pandey, G.M. Ashraf, Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer, *OMICS Group eBooks* (2013) 1-19.

L. Gu, X. Li, Q. Ran, C. Kang, C. Lee, J. Shen, Antimetastatic activity of novel ruthenium (III) pyridine complexes, *Cancer Med*. 5 (10) (2016) 2850-2860.

K. Zhao, L. Wei, H. Hui, Q. Dai, Q.D. You, Q.L. Guo, N. Lu. Wogonin suppresses melanoma cell B16-F10 invasion and migration by inhibiting Ras-mediated pathways, *PLoS One*. 9(9) (2014) e106458.

C.M Tsai, G.C. Yen, F.M. Sun, S.F. Yang, C.J. Weng CJ, Assessment of the anti-invasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lung adenocarcinoma cells, *Mol Pharm*. 10 (5) (2013) 1890-900.

V.P. Gullo, J. Mcalpine, K.S. Lam, D. Baker, F. Petersen, Drug discovery from natural products, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33 (2006) 523-531.

K.S. Lam, New aspects of natural products in drug discovery, *TRENDS in Microbiology*, 15 (2007) 280-289.

B. Schmidt, D.M. Ribnicky, A. Poulev, S. Logendra, W.T. Cefalu, I.A. Rasskin, A natural history of botanical therapeutics, *Metabolism Clinical and Experimental*. 57 (2008) S3-S9.

D.A. Dias, S. Urban, U. Roessner, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites*. 2 (2012) 303-336.

A.L. Harvey, Natural products in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 13 (2008) 894-901.

M.A. Ali, A. Farah, F.M. Al-Hemaid, F.M. Abou-Tarboush, In vitro cytotoxicity screening of wild plant extracts from Saudi Arabia on human breast adenocarcinoma cells, *Genetics and Molecular Research*. 13 (2014) 3981-3990.

P. Sharma, Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3 (2011) 403-423.

C.I. Chiriac, F. Tanasa, M. Onciu, A Novel Approach in Cinnamic Acid synthesis: Direct Synthesis of Cinnamic Acids from Aromatic Aldehydes and Aliphatic Carboxylic Acids in the Presence of Boron Tribromide, *Molecules*. 10 (2005) 481-487.

G.C. Yen, Y.L. Chen, F.M. Sun, Y.L. Chiang, S.H. Lu, C.J. Weng, A comparative study on the effectiveness of cis- and trans-form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of humanlung adenocarcinoma cells, *Eur J Pharm Sci.* 44 (3) (2011) 281-7.

Y. Ling, X. Zhao, X. Li, X. Wang, Y. Yang, Z. Wang, X. Wang, J. Zhang, Y. Zhang, Novel FTS-iamine/cinnamic acid hybrids inhibi tumo cel proliferation and migration and promote apoptosis via blocking Ras-related signaling in vitro, *Cancer Chemother Pharmacol.* 75 (2) (2015) 381-92.

M. Sova, A. Perdih, M. Kotnik, T. L. Rizner, T. Solmajer, S. Gobec, Flavonoids and cinnamic acid esters as inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: A synthesis, QSAR and modelling study, *Bioorg Med Chem.* 14 (2006) 7404-7418.

T.F. Borgati, R.B. Alves, R.R. Teixeira, R.P. de Freitas, T.G. Perdição, S.F. da Silva, A.A. dos Santos, A.J.O. Bastidas, Synthesis and Phytotoxic Activity of 1,2,3-Triazole Derivatives, *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 24 (2013) 953-961.

J.W. Astin, J. Batson, S. Kadir, J. Charlet, R.A Persad, D. Gillatt, J.D. Oxley, C.D Nobes. Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells, *Nat Cell Biol.* 12 (12) (2010) 1194-204.

E. Shtivelman, M.Q. Davies, P. Hwu, J. Yang, M. Lotem, M. Oren, K.T. Flaherty, D.E. Fisher. Pathways and therapeutic targets in melanoma, *Oncotarget.* 5 (7) (2014) 1701-52.

N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree. Clonogenic Assay of Cells In Vitro. *Nat. Protoc.* 2006; 1(5):2315-9.

D. Chinnaraja, R. Rajalakshmi. Synthesis, spectral studies, in vitro and molecular docking studies of novel hydrazinyl carbothioamide derivatives, *Journal of Saudi Chemical Society.* 20 (2016) 443-449.

L. Zhang, J. Zhang, H. Fang, Q. Wang, W. Xu W, Design, synthesis and preliminary evaluation of new cinnamoyl pyrrolidine derivatives as potentgelatinase inhibitors, *Bioorg Med Chem.* 14 (24) (2006) 8286-94.

G.C. Yen, Y.L. Chen, F.M. Sun, Y.L. Chiang, S.H. Lu, C.J. Weng CJ, A comparative study on the effectiveness of cis- and trans-form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells, *Eur J Pharm Sci.* 44 (3) (2011) 281-7.

E.B. de Melo EB, A QSAR Study of Matrix Metalloproteinases Type 2 (MMP-2) Inhibitors with Cinnamoyl Pyrrolidine Derivatives, *Sci Pharm.* 80 (2) (2012) 265-81.

Siqueira RP. Barbosa ÉdAA. Polêto MD. Righetto GL. Seraphim TV. Salgado RL. et al. Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5- (Trifluoromethyl)Phenyl)Isonicotinamide (SRPIN340). *PLoS ONE* 10 (8) (2015) e0134882.

Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration In Vitro. *Nat. Protoc.* 2007; 2(2):329-33.

H.C. Chen, Boyden chamber assay, *Methods Mol. Biol.* 294 (2005) 15-22.

T. Anasamy, C.K. Thy, K.M. Lo, C.F. Chee, S.K. Yeap, B. Kamalidehghan, L.Y. Chung, Tribenzyltin carboxylates as anticancer drug candidates: Effect on the cytotoxicity, motility and invasiveness of breast cancer cell lines, *Eur J Med Chem.* 125 (2017) 770-783.

Hulkower, R.L. Herber, Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery, *Pharmaceutics* 3 (2011) 107-124.

Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* 2010, 31, 455.

S.W. Mao, H. Chen, L.F. Yu, F. Lv, Y.J. Xing, T. Liu, J. Xie, J. Tang, Z. Yi, F. Yang, Novel 3,4-seco bile acid diamides as selective anticancer proliferation and migration agents, *Eur J Med Chem.* 122 (2016) 574-83.

Xu T, Chi B, Gao J, Chu M, Fan W, Yi M, Xu H, Mao C. Novel electrochemical immune sensor based on Hep-PGA-PPy nanoparticles for detection of α -Fetoprotein in whole blood. *Anal Chim Acta*. 2017 Jul 18;977:36-43.

P. De, M. Baltas, F.B. Belval, Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – A Review. *Current Medicinal Chemistry*. 18 (2011) 1672-1703.

Y. Lee, H. Kuo, C. Chu, C. Wang, W. Lin, T. Tseng, Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cell, *Biochemical Pharmacology*. 66 (2003) 2281-2289.

N-H. Nam, Y-J. You, Y. Kim, D-H, Hong, H-M, Kim, B.Z. Ahn, Syntheses of certain 3-Aryl-2-propenoates and evaluation of their cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 11 (2001) 1173-1176.

Tatman D, Mo H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Lett*. 175 (2) (2002) 129-39.

Síntese de derivados de isobenzofuranona contendo porção 1,2,3-triazólica e triagem da atividade antimetastática *in vitro* de derivados de isobenzofuranonas frente a linhagem de melanoma B16-F10

RESUMO

Pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo recebem um prognóstico desfavorável, principalmente devido à alta ocorrência de metástase neste tipo de câncer. Isobenzofuranonas são compostos heterocíclicos que estudos anteriores relataram possuir efeito citotóxico contra leucemia, glioblastoma e melanoma. Assim, neste artigo descreveremos a síntese de 13 novos compostos derivados de isobenzofuranona contendo porção 1,2,3-triazólica e a triagem da atividade antimetastática *in vitro* destes 13 compostos e de mais 12 compostos derivados de isobenzofuranona funcionalizada na posição C-3. Os 25 compostos derivados de isobenzofuranona foram submetidos a bioensaios *in vitro* para investigar seus efeitos sobre o comportamento metastático de células de melanoma B16-F10. O composto mais efetivo 1f, um derivado de isobenzofuranona funcionalizada na posição C-3 contendo hidroxilas nas posições C-2' e C-6' do anel aromático, apresentou atividades antimetastática e antiproliferativa significativas contra células B16-F10. Além disso, não mostra efeito citotóxico importante frente a células não tumorais nas concentrações avaliadas. Portanto, esses resultados sugerem que os derivados de isobenzofuranonas funcionalizadas na posição C-3 avaliados neste trabalho tem potencial como agentes antimetastático contra o melanoma.

Palavras chaves: fitalidas, metastático, porção 1,2,3 triazólica, posição C-3 funcionalizada.

1. Introdução

A incidência do melanoma cutâneo aumentou nas últimas duas décadas mais rapidamente do que qualquer outro tipo de tumor sólido. Este tipo de câncer é reconhecido como um dos mais agressivos que existe, devido ao comportamento altamente metastático de suas células, que acaba resultando em elevada taxa de mortalidade entre os pacientes acometidos com essa doença (Giblin et al., 2007; Agaësse et al., 2017). Quando diagnosticado precocemente, o melanoma pode ser tratado por meio de intervenção cirúrgica. No entanto, ele é fatal em seu estágio metastático, caracterizando-se por prognósticos desfavoráveis e alta resistência às atuais estratégias terapêuticas (Aladowicz et al., 2013; Isola et al., 2016). Neste sentido, vários estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver drogas alternativas e eficazes no tratamento do melanoma, principalmente no estágio avançado.

Atualmente, produtos naturais, como extratos provenientes de plantas e fungos, têm sido reconhecidos como potenciais fontes de compostos com atividade antitumoral. Adicionalmente, esses compostos têm sido alterados na sua estrutura com o intuito de incrementar seu potencial biológico, sendo esta uma importante estratégia na descoberta de novas drogas (Silva et al., 2015; Muhammad et al., 2017). Dentre esses compostos naturais de aplicação farmacêutica, mais de 70% deles são de natureza heterocíclica (Quin & Tyrell, 2010; Lamberth & Dinges, 2012; Muhammad et al., 2017). As isobenzofuranonas, também denominadas de fitalidas, pertencem a uma classe de heterocíclicos que se caracteriza estruturalmente pela presença de um anel γ -lactônico fundido a um anel aromático (Fig. 1 A) (Franca et al., 2016), que podem ser isoladas de plantas (Fig. 1 B) (Xin et al., 2009) ou fungos (Fig. 1 C) (Franca, et al., 2016).

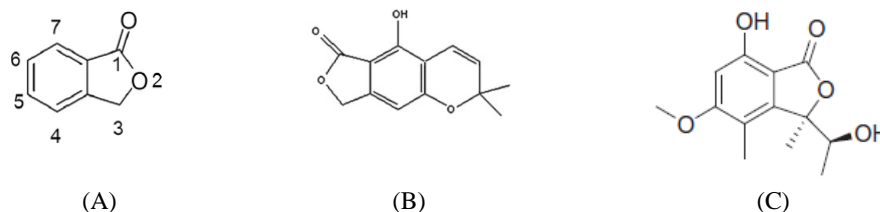


Fig. 1 - Estrutura química do núcleo de isobenzofuranona (A) e isobenzofuranona isolada de planta (B) e de fungo (C).

Recentemente, diferentes trabalhos mostraram atividade citotóxica de derivados de isobenzofuranonas frente a linhagens tumorais de leucemia (Fig. 2 A-D) (Teixeira et al.,

2013; Maia et al., 2016), glioblastoma (Fig. 2 E) e melanoma (Fig. 2 F) (Logrado et al., 2010). Estes exemplos ilustram o potencial anticâncer das isobenzofuranonas e seu valor como substância de partida para a síntese de novos compostos com aplicações antitumorais.

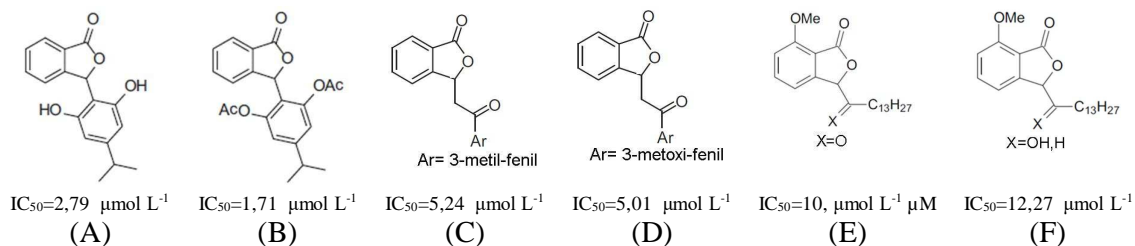
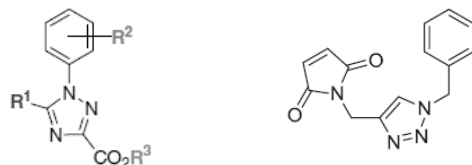


Fig. 2 - Estruturas químicas de derivados de isobenzofuranonas com atividade citotóxica sobre linhagens tumorais de leucemia, glioblastoma e melanoma. (A e B) Resultado frente a linhagem de leucemia K562; (C) Resultado frente a linhagem de leucemia Nalm6; (D) Resultado frente a linhagem de leucemia HL-60; (E) Resultado frente a linhagem de glioblastoma; (F) Resultado frente a linhagem de melanoma MDAMB-435.

Atualmente nosso grupo de trabalho está envolvido em pesquisas que visam o desenvolvimento e síntese de compostos bioativos (Siqueira et al., 2015; Silva et al., 2015; Oliveira et al., 2017; Siqueira et al., 2017), bem como na síntese e avaliação de atividades biológicas de compostos com porção 1,2,3 triazólica (Borgati et al., 2013) e de isobenzofuranonas funcionalizadas na posição C-3 (Teixeira et al., 2013; Pereira et al., 2015; Maia et al., 2016). Nossas investigações mostraram que compostos derivados de isobenzofuranonas, funcionalizadas na posição C-3, apresentaram efeitos citotóxicos contra linhagens de tumores não sólidos, como linhagens celulares de leucemia K562 (Fig. 2 A-B), Nalm6 (Fig. 2 C) e HL-60 (Fig. 2 D). No que se refere aos compostos heterocíclicos triazólicos com atividade antitumoral, outros autores mostraram a atividade citotóxica desses compostos frente a linhagens tumorais de carcinoma de pulmão (Fig.3 A) e melanoma (Fig.3 B) (Wang et al., 2011; Ali et al., 2017).



R1=3-tienil; R2=*p*CF₃; R3=Me

IC₅₀=5,74 μmol L⁻¹

(A)

IC₅₀ <25 μmol L⁻¹

(B)

Fig. 3 - Estruturas químicas de compostos heterocíclicos triazólicos com atividade citotóxica sobre linhagens celulares de carcinoma de pulmão (B; NCI-H226) e melanoma (C; SK-Mel-28).

Estes resultados em conjunto nos levaram a idealizar e sintetizar 13 novos compostos derivados de isobenzofuranona contendo porção 1,2,3-triazólica (Fig. 4) e a investigar novas atividades anticâncer de derivados de isobenzofuranonas. Assim, neste artigo descreveremos a síntese destes 13 novos compostos (Teixeira et al. em elaboração) e a triagem da atividade antimetastática *in vitro* destes 13 compostos e de mais 12 compostos derivados de isobenzofuranona funcionalizada na posição C-3 (Fig. 5), cuja síntese foi publicada em nosso trabalho anterior (Teixeira et al., 2013). Para tal triagem, foi utilizada a linhagem metastática de melanoma cutâneo murino B16-F10.

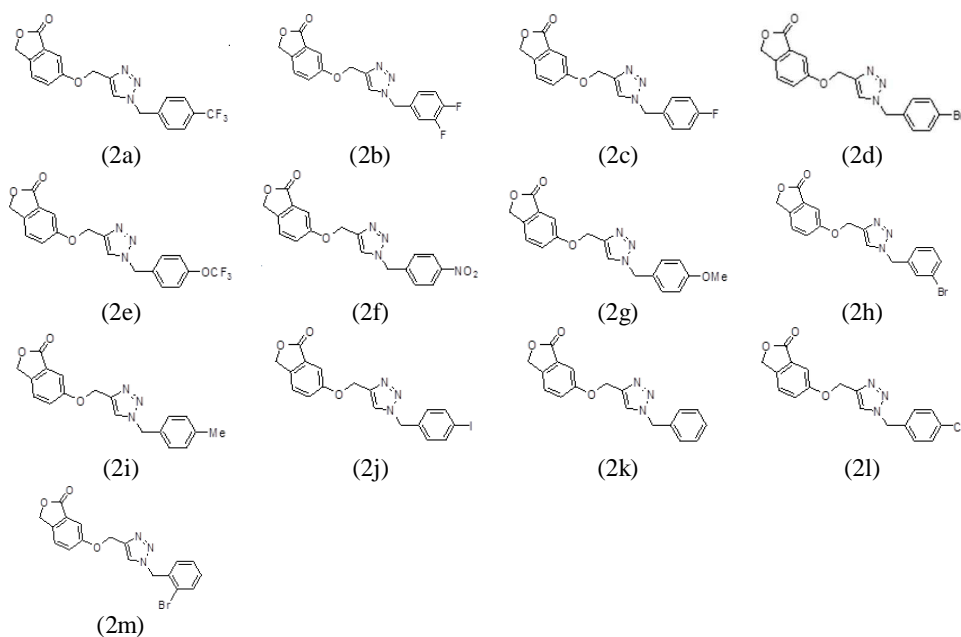


Fig. 4 - Estruturas químicas de isobenzofuranonas contendo porção 1,2,3-triazólica.

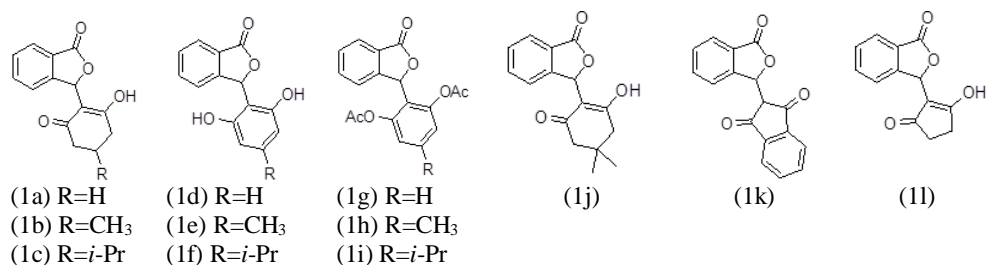


Fig. 5 - Estruturas químicas de isobenzofuranonas funcionalizadas na posição C-3. (Fonte: Teixeira et al., 2013).

2. Resultados e discussão

Inicialmente, as isobenzofuranonas contendo porção 1,2,3-triazolica (2a-2m) e as funcionalizadas na posição C-3 (**1a-1l**) foram avaliadas em relação a duas linhagens de tumores sólidos, hepatocarcinoma humano (HepG2) e melanoma metastático murino (B16-F10), isso para determinar concentrações não citotóxicas ou de baixa citotoxicidade dos compostos. A Tabela 1 mostra os resultados da atividade citotóxica dos 25 compostos sobre as linhagens HepG2 e B16-F10. Após 48 h de tratamento, 19 compostos avaliados não apresentaram citotoxicidade considerável ($IC_{50} \geq 200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os compostos 1f, 1i, 1k e 2d mostraram maior atividade citotóxica sobre a linhagem B16-F10 (IC_{50} 186,0; 195,9; 138,6; 132,5; respectivamente), e os compostos 1f, 1i, 2e e 2f sobre a linhagem HepG2 (IC_{50} 153,7; 128,6; 43,88; 160,6; respectivamente). Adicionalmente, dois compostos derivados de isobenzofuranona funcionalizada na posição C-3, 1f e 1i, apresentaram maior atividade citotóxica frente às duas linhagens celulares testadas.

Com base nestes resultados, todos os ensaios subsequentes realizados para avaliar a atividade antimetastática *in vitro* dos compostos foram conduzidos utilizando-se os compostos em concentrações inferiores ou iguais a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre a linhagem metastática B16-F10.

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹)^a obtidos quando as linhagens celulares de tumores sólidos B16-F10 e HepG2 foram tratadas com concentrações crescentes (0-200 μmol L⁻¹) de cada composto por 48 horas. (2a-2m) isobenzofuranonas contendo porção 1,2,3-triazólica. (1a-1l) isobenzofuranonas funcionalizadas na posição C-3.

Compostos	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)		Compostos	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	
	B16-F10	HepG2		B16-F10	HepG2
1a	>200	>200	2a	>200	>200
1b	>200	>200	2b	>200	>200
1c	>200	>200	2c	>200	>200
1d	>200	>200	2d	132,5	>200
1e	>200	>200	2e	>200	43,8
1f	186,0	153,7	2f	>200	160,6
1g	>200	>200	2g	>200	>200
1h	>200	>200	2h	>200	>200
1i	195,9	128,6	2i	>200	>200
1j	>200	>200	2j	>200	>200
1k	138,60	>200	2k	>200	>200
1l	>200	>200	2l	>200	>200
			2m	>200	>200

Dados normalizados frente a células tratadas com DMSO (0,4% v/v). B16-F10: melanoma metastático murino. HepG2: hepatocarcinoma humano. ^aIC₅₀: Concentração de composto necessária para inibir 50% das células viáveis, valor determinado após 48 h de tratamento contínuo. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT após três experimentos independentes.

A migração celular é um comportamento importante para a ocorrência de metástase, principalmente no melanoma (Isola et al., 2016). Inicialmente, avaliou-se o efeito dos 25 compostos (**2a-2m** e μmol L⁻¹) sobre a atividade migratória de células B16-F10. Para tal, aplicamos o ensaio de fechamento de fenda na presença e ausência dos compostos. Dentre os compostos testados, 10 deles (1e, 1f, 1h, 1i, 1j, 1k, 2a, 2c, 2e e 2f) suprimiram significativamente a migração de células B16-F10 a 100 μmol L⁻¹ após 24 h em comparação com células tratadas com DMSO (Fig. 6 A). Os compostos 1f, 1i e 2a foram os mais ativos, suprimindo a migração celular em mais de 60% (P<0,0001) quando comparados ao controle.

Posteriormente, os compostos derivados 1f, 1i e 2a foram avaliados quanto à sua eficácia utilizando o ensaio de fechamento de fenda na concentração de 50 μmol L⁻¹ (Fig. 6 B-C). Nesta concentração, os três compostos foram capazes de inibir significativamente a migração de células B16-F10, sendo os compostos 1f e 1i os mais ativos, com supressão da migração em mais de 60% (P<0,001) em comparação com o controle. Particularmente, o composto 1f (Fig. 6 B) inibiu a migração em aproximadamente 80%. Com base nestes

resultados, podemos sugerir uma relação entre o efeito antimigratório dos compostos 1f e 1i e a presença de um anel aromático diretamente ligado na posição C-3 do núcleo de isobenzofuranona (Fig. 6 D). Este anel aromático é oxigenado nas posições C-2 ' e C-6' e exibe um grupo alquila (isopropila) ligado a C-4' (Fig. 6 D). Assim, essas características estruturais parecem ser importantes em termos da atividade antimigratória desses compostos. Outros estudos encontraram efeitos citotóxicos sobre a viabilidade celular relacionados às mesmas características estruturais das isobenzofuranonas, como em *Leishmania* (Pereira et al., 2015) e na linhagem celular K562 (Teixeira et al., 2013).

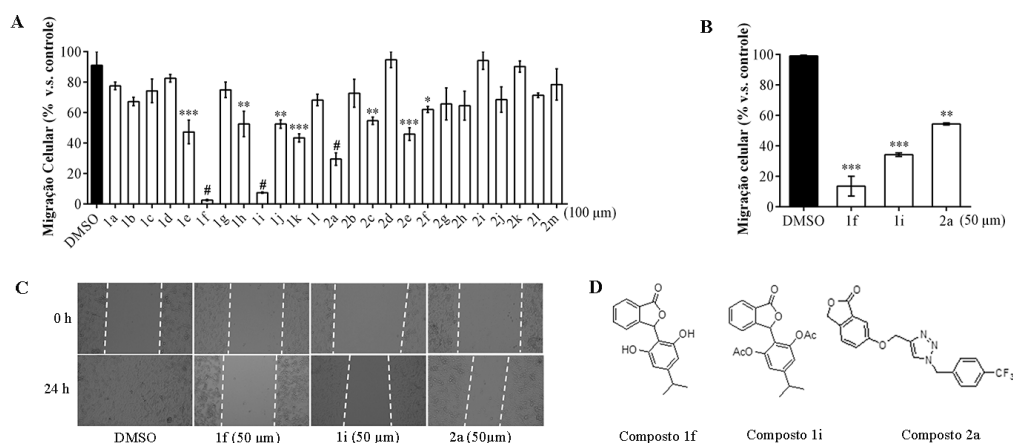


Fig. 6 - Efeito de compostos derivados de isobenzofuranonas funcionalizadas na posição C-3 (1a-1l) e isobenzofuranonas contendo porção 1,2,3-triazólica (2a-2m) sobre a migração de células B16-F10. (A e B) Após confluência, as células B16-F10 foram retiradas com auxílio de uma pipeta ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e lavadas com meio de cultura para remover células livres. Em seguida, as células foram incubadas com meio de cultura contendo os compostos na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ durante 24 h. (D) Fotomicrografia mostrando o resultado do ensaio de fechamento de fenda a 0 e 24 h após o tratamento. (C) Estruturas químicas dos compostos 1f, 1i e 2a. Dados expressos como média \pm S.E.M. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001 e #P <0,0001 versus controle (DMSO 0,4% v/v) pelo teste de Dunnett.

Além de migração, invasão e adesão celular são etapas importantes na metástase do melanoma, podendo ser alvos preferenciais para o desenvolvimento de novas drogas antimetastáticas (Shtivelman et al., 2014). Neste sentido, avaliou-se os efeitos dos compostos 1f e 1i sobre as atividades de invasão e adesão de células da linhagem B16-F10 (Fig 7). A capacidade de invasão dessas células foi significativamente reduzida após tratamento de 24 h

com o composto derivado 1f em relação às células do controle nas concentrações 12,5 (45,2%), 25 (43,8%) e 50 (56,7%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 7 A-B). Já o composto 1i reduziu significativamente a atividade de invasão celular quando nas concentrações 25 (34%) e 50 (89,2%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 7 A e Fig. 7 C). Considerando adesão celular, células da linhagem B16-F10 apresentaram redução significativa nesta atividade quando tratadas com o composto 1f nas concentrações de 25 (19,1%) e 50 (35,2%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 7 D). O composto derivado 1i não comprometeu a adesão das células B16-F10 (Fig. 7 E).

Quando analisados conjuntamente os dados de migração, invasão e adesão celular, pode-se observar que o composto 1f foi mais efetivo em inibir a migração e a invasividade de células da linhagem B16-F10 do que o composto 1i, indicando que as hidroxilas (grupo funcional -OH) presentes nas posições C-2' e C-6' do anel aromático do composto 1f (Fig. 8 A) desempenharam atividade biológica mais eficaz do que o grupo acetina (Ac) presente nas mesmas posições do composto 1i (Fig. 8 B).

No que se refere aos derivados de isobenzofuranona, trabalhos sugerem que a natureza heterocíclica de sua estrutura química favorece a interação destes compostos com proteínas PKCs, (Baba et al., 2004a; Baba et al., 2004b; Hirai et al., 2007; Hirai et al., 2011), comprometendo assim sua atividade, e como consequência alterações na expressão de metaloproteinases de matriz envolvidas nas etapas da metástase (Chien et al., 2015; Noh et al., 2015). Noh et al. (2015), avaliaram o efeito do composto fisetina, um composto heterocíclico, sobre a atividade invasiva de células de câncer de mama (MCF-7), e os resultados mostraram que este composto foi efetivo em inibir o comportamento invasivo desta linhagem celular, por suprimir a ativação da MMP-9 pela regulação da via PKC/MAPK. Outro composto heterocíclico com atividade sobre a via da PKC, é a galangina. Chien et al. (2015), ao avaliarem os efeitos da galangina sobre o comportamento metastático de células de hepatocarcinoma (HepG2), observaram que este composto atenuou a característica metastática destas células, por reduzir a expressão das MMP-2 e -9, devido a inibição da via PKC/ERK.

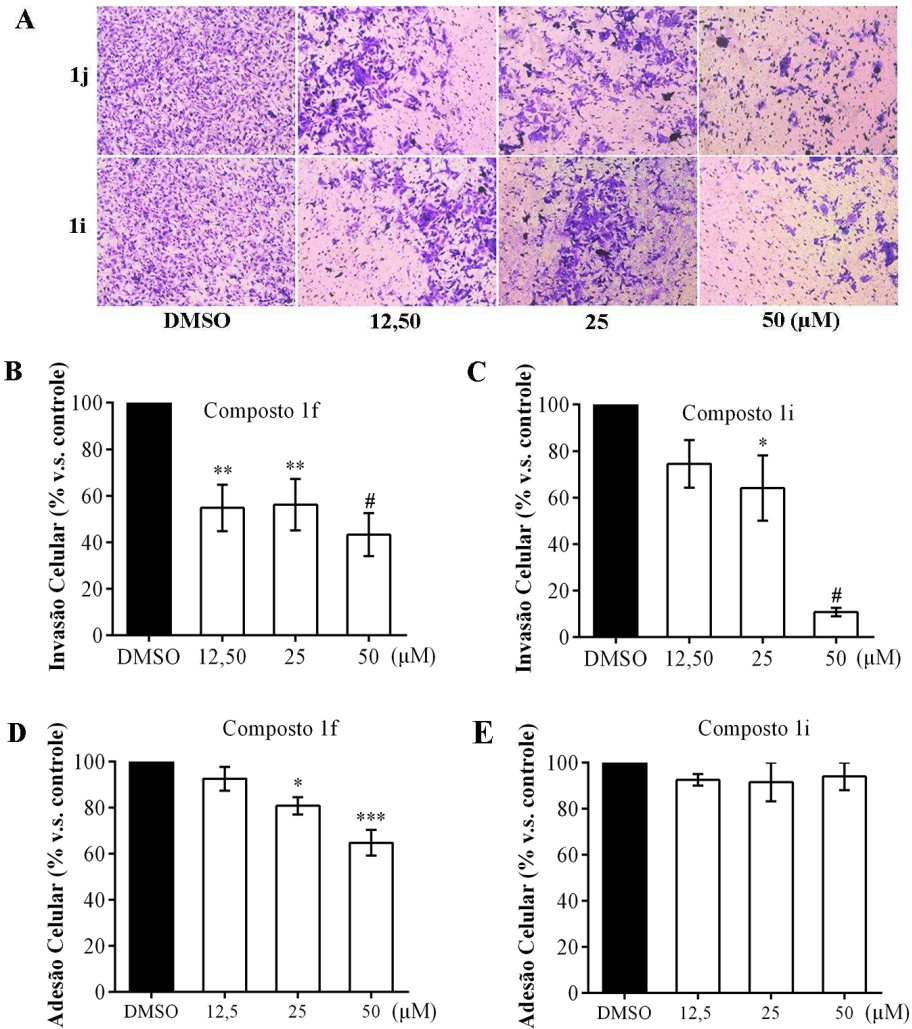


Fig. 7 - Efeito dos compostos 1f e 1i sobre a invasão e adesão de células B16-F10 *in vitro*. (A) Fotomicrografias do ensaio de invasão de células B16-F10 tratadas com os compostos 1f e 1i nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A invasão foi avaliada por meio da quantificação de células que atravessaram os insertos de Transwell revestidos com matrigel. As células invadidas foram coradas com azul de toluidina 1% e contabilizadas. (B) e (C) Gráficos representativos do ensaio de invasão celular. (D) e (E) Gráficos representativos do ensaio adesão celular. Células B16-F10 foram tratadas com os compostos 1f e 1i nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A adesão foi avaliada por método espectrofotométrico usando MTT. Dados expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e # $P < 0,0001$ versus controle (DMSO 0,4% v/v) pelo teste de Dunnett.

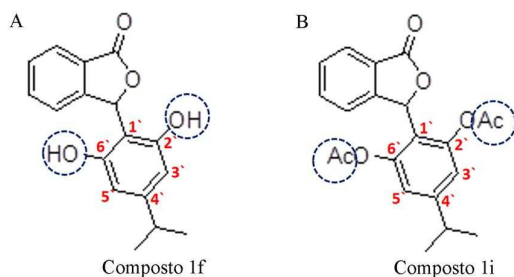


Fig. 7- Estrutura química das isobenzofuranonas **1f** e **1i** funcionalizadas na posição C-3. (A) Composto **1f** com hidroxilas (grupo -OH) presentes nas posições C-2' e C-6' do anel aromático. (B) Composto **1i** com o grupo acetina (Ac) presentes nas posições C-2' e C-6' do anel aromático.

Após as células tumorais colonizarem um novo sítio, elas precisam proliferar para que o novo tumor se estabeleça (Guan, et al., 2015). Assim, realizou-se o ensaio de proliferação por exclusão usando corante azul de tripan para investigar se o derivado de isobenzofuranona **1f** poderia comprometer a proliferação de células B16-F10. O resultado obtido indicou que o composto **1f**, na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, inibiu significativamente a proliferação de células B16-F10 de maneira tempo dependente em comparação com controle (Fig. 9).

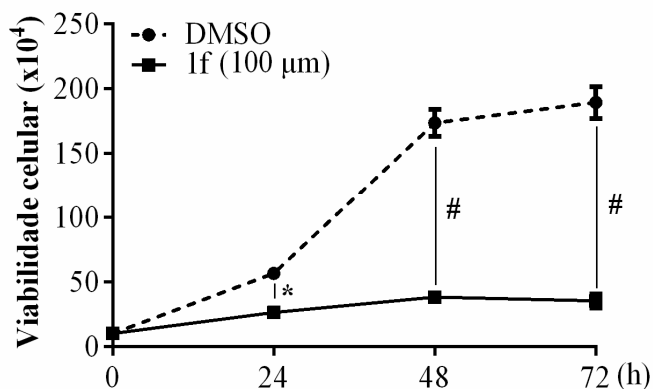


Fig. 9 – Viabilidade de células B16-F10 após tratamento com o composto derivado de isobenzofuranona **1f**. A proliferação de células B16-F10 (1×10^5 /poço) foi determinado por exclusão do azul de tripan após 24, 48 e 72 h de exposição a $100 \mu\text{M}$ do composto **1f** ou com o veículo (DMSO 0,4% v/v). Dados expressos como média \pm S.E.M. *P <0,05 e #P <0,0001 versus controle (DMSO 0,4% v/v) pelo teste de Tukey (ANOVA-Two-way).

Além de apresentar atividade biológica contra linhagens tumorais, é importante que os novos compostos possuam baixa citotoxicidade sobre células normais e sanguíneas. Por isso, avaliou-se a citotoxicidade do composto 1f sobre células não tumorais de rim de macaco (Vero), macrófago (RAW 264.7) e eritrócitos. Células Vero não foram sensíveis ao composto 1f na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 10 A), enquanto que macrófagos foram ligeiramente sensíveis ao composto nesta mesma concentração. O composto derivado 1f causou hemólise apenas quando na concentração de $100 \mu\text{M}$ (Fig. 10 B).

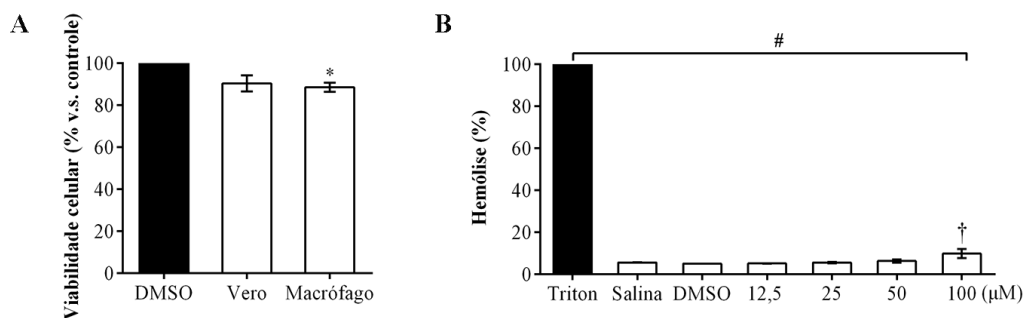


Fig. 10 – Efeito do composto derivado de isobenzofuranona 1f sobre a viabilidade de células não tumorais e eritrócitos. (A) Células Vero (célula de rim de macaco verde africano) e macrófagos (RAW 264.7) foram expostas a $100 \mu\text{M}$ do composto 1f durante 48 h. (B) Gráfico representativo do teste de hemólise. Dados expressos como média \pm S.E.M. *P <0,05 versus DMSO (0,4% v/v), #P <0,0001 versus Triton e † P <0,05 versus salina pelo teste de Dunnett.

3. Conclusão

Em conclusão, este estudo mostrou pela primeira vez que um derivado sintético de isobenzofuranona pode comprometer significativamente *in vitro* o comportamento metastático de células B16-F10, principalmente por inibir a motilidade, adesão e invasão dessas células. Adicionalmente, o composto 1f mostrou baixa toxicidade *in vitro* frente a células não tumorais. Os achados deste estudo sugerem que o derivado 1f é um composto potencial para se desenvolver como um agente antimetastático contra o melanoma, mas seu mecanismo de ação precisa ser melhor investigado.

4. Referências

Giblin AV; Thomas JM. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* **2007**; 60: 32-40.

Agaësse G; Barbolat-Boutrand L; El Kharbili M; Berthier-Vergnes O; Masse I. p53 targets TSPAN8 to prevent invasion in melanoma cells. *Oncogenesis.* **2017**; 6e309: 1-7.

Aladowicz E; Ferro L; Vitali GC; Venditti E; Fornasari L; Lanfrancione L. Molecular networks in melanoma invasion and metastasis. *Future Oncol.* **2013**; 9 (5): 713-726.

Isola AL, Eddy K, Chen S. Biology, Therapy and Implications of Tumor Exosomes in the Progression of Melanoma. *Cancers (Basel).* **2016**; 8 (110): 1-18.

da Silva, M.R.; Moreira, G.A.; da Silva, R.A.G.; Barbosa, E.A.A.; Siqueira, R.P.; Teixeira, R.R.; Almeida, M.R.; Júnior, A.S.; Fietto, J.L.R.; Bressan, G.C. Splicing Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. *BioMed Res. Int.* **2015**; 2015:1-12.

Muhammad ZA, Edrees MM, Faty RAM, Gomha SM, Alterary SS, Mabkhot YN. Synthesis, Antitumor Evaluation and Molecular Docking of New Morpholine Based Heterocycles. *Molecules.* **2017**; 22 (1211): 12-14.

Quin, L.D.; Tyrell. J.A. *Fundamentals of heterocyclic chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken: New Jersey **2010**.

Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Pharmaceuticals; Lamberth, C., Dinges, J., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim: Germany, **2012**.

Franca EF, Guilardi S, Paixão DA, Teixeira RR, Pereira WL, Ellena JA. Centrosymmetric resonance-assisted intermolecular hydrogenbonding chains in the enol form of-diketone: Crystal structure and theoretical study. *J Mol Graph Model.* **2016**; 68:106-113.

Xin X, Yang Y, Zhong J, Aisa HA, Wang H. Preparative isolation and purification of isobenzofuranone derivatives and saponins from seeds of *Nigella glandulifera* Freyn by high-speed counter-current chromatography combined with gel filtration. *J Chromatogr A*. **2009**; 1216: 4258-4262.

Teixeira RR, Bressan GC, Pereira WL, Ferreira JG, de Oliveira FM, Thomaz D. Synthesis and Antiproliferative Activity of C-3 Functionalized Isobenzofuran-1(3H)-ones *C. Molecules*. **2013**; 18: 1881-1896.

da Silva Maia AF, Siqueira RP, de Oliveira FM, Ferreira JG, da Silva SF, Caiuby CA, de Oliveira LL, de Paula SO, Souza RA, Guilardi S, Bressan GC, Teixeira RR. Synthesis, molecular properties prediction and cytotoxic screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3H)-ones. *Bioorg Med Chem Lett*. **2016**; 26 (12): 2810-6.

Logrado LP, Santos CO, Romeiro LA, Costa AM, Ferreira JR, Cavalcanti BC, Manoel de Moraes O, Costa-Lotufo LV, Pessoa C, Dos Santos ML. Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. *Eur J Med Chem*. **2010**; 45 (8): 3480-9.

Siqueira RP, Barbosa Éde A, Polêto MD, Righetto GL, Seraphim TV, Salgado RL, Ferreira JG, Barros MV, de Oliveira LL, Laranjeira AB, Almeida MR, Júnior AS, Fietto JL, Kobarg J, de Oliveira EB, Teixeira RR, Borges JC, Yunes JA, Bressan GC. Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl)Isonicotinamide (SRPIN340). *PLoS One*. **2015**; 10 (8) :e0134882.

Oliveira AF, Teixeira RR, Oliveira AS, Souza AP, Silva ML, Paula SO. Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. *Molecules*. **2017**; 22 (520): 1-20.

Siqueira RP, Barros MVA, Barbosa ÉAA, Onofre TS, Gonçalves VHS, Pereira HS, Silva Júnior A, de Oliveira LL, Almeida MR, Fietto JLR, Teixeira RR, Bressan GC. Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). *Eur J Med Chem*. **2017**; 134: 97-109.

Borgati TF, Alves RB, Teixeira RR, de Freitas RP, Perdigão TG, da Silva SF, dos Santos AP, Bastidasc AJO. Synthesis and Phytotoxic Activity of 1,2,3-Triazole Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**; 24 (6): 953-961.

Pereira WL, Vasconcellos Rde S, Mariotini-Moura C, Gomes RS, Firmino Rde C, Silva AM, Silva Júnior A, Bressan GC, Almeida MR, Afonso LC, Teixeira RR, Fietto JL. The Antileishmanial Potential of C-3 Functionalized Isobenzofuranones against *Leishmania (Leishmania) Infantum Chagasi*. *Molecules.* **2015**; 20 (12): 22435-44.

Wang LY, Tseng WC, Wu TS, Kaneko K, Takayama H, Kimura M, Yang WC, Wu JB, Juang SH, Wong FF. Synthesis and antiproliferative evaluation of 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles containing fluorenyl and trifluoromethoxyphenyl moieties. *Bioorg Med Chem Lett.* **2011**; 21 (18): 5358-62.

Ali B, Kanda Kupa LD, Heluany CS, Drewes CC, Vasconcelos SNS, Farsky SHP, Stefani HA. Cytotoxic effects of a novel maleimide derivative on epithelial and tumor cells. *Bioorg Chem.* **2017**; 72: 199-207.

Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, Flaherty KT, Fisher DE. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget.* **2014**; 5 (7): 1701-52.

Cheng M, De B, Almstead NG, Pikul S, Dowty ME, Dietsch CR, Dunaway CM, Gu F, Hsieh LC, Janusz MJ, Taiwo YO, Natchus MG, Hudlicky T, Mandel M. Design, synthesis, and biological evaluation of matrix metalloproteinase inhibitors derived from a modified proline scaffold. *J Med Chem.* **1999**; 42: 5426–5436.

Zhang L, Zhang J, Fang H, Wang Q, Xu W. Design, synthesis and preliminary evaluation of new cinnamoyl pyrrolidine derivatives as potent gelatinase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* **2006**; 14 (24): 8286-94.

De Melo EB. A QSAR Study of Matrix Metalloproteinases Type 2 (MMP-2) Inhibitors with Cinnamoyl Pyrrolidine Derivatives. *Sci Pharm.* **2012**; 80: 265–281.

Baba Y, Ogoshi Y, Hirai G, Yanagisawa T, Nagamatsu K, Mayumi S, Hashimoto Y, Sodeoka M. Design, synthesis, and structure-activity relationship of new isobenzofuranone ligands of protein kinase C. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004a**; 14 (11): 2963-7.

Baba Y, Mayumi S, Hirai G, Kawasaki H, Ogoshi Y, Yanagisawa T, Hashimoto Y, Sodeoka M. Evaluation of series of isobenzofuranone dimers as PKC α ligands: implication for the distance between the two ligand binding sites. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004b**; (11): 2969-72.

Hirai G, Shimizu T, Watanabe T, Ogoshi Y, Ohkubo M, Sodeoka M. Importance of interaction between C1 domain and lipids in protein kinase C α activation: hydrophobic side chain direction in isobenzofuranone ligands controls enzyme activation level. *ChemMedChem.* **2007**; 2 (7): 1006-9.

Hirai G, Ohkubo M, Tamura Y, Sodeoka M. Design and synthesis of protein kinase C α activators based on 'out of pocket' interactions. *Bioorg Med Chem Lett.* **2011**; 21(12):3587-90.

Chien ST, Shi MD, Lee YC, Te CC, Shih YW. Galangin, a novel dietary flavonoid, attenuates metastatic feature via PKC/ERK signaling pathway in TPA-treated liver cancer HepG2 cells. *Cancer Cell Int.* **2015**; 15:15.

Noh EM, Park YJ, Kim JM, Kim MS, Kim HR, Song HK, Hong OY, So HS, Yang SH, Kim JS, Park SH, Youn HJ, You YO, Choi KB, Kwon KB, Lee YR. Fisetin regulates TPA-induced breast cell invasion by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation via the PKC/ROS/MAPK pathways. *Eur J Pharmacol.* **2015**; 764:79-86.

Gu L, Li X, Ran Q, Kang C, Lee C, Shen J. Antimetastatic activity of novel ruthenium (III) pyridine complexes. *Cancer Med.* **2016**; 5 (10): 2850-2860.

Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B.* **2015**; 5 (5): 402-18.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi avaliado o potencial antimetastático *in vitro* de dois grupos químicos, 26 compostos derivados do ácido cinâmico e 25 compostos derivados de isobenzofuranona. Ambos os grupos de derivados apresentaram compostos com capacidade de inibir significativamente o comportamento metastático da linhagem de melanoma cutâneo B16-F10. Em particular, os resultados chamam atenção para a relação entre a natureza heterocíclica de dois derivados, 9a e 1f, e o efeito inibitório destes derivados frente a motilidade, adesão e invasão de células B16-F10, além de suas baixas atividades citotóxicas frente a células não tumorais. Juntos, esses resultados mostram o potencial destes derivados para desenvolvimento de novos candidatos para o tratamento do melanoma cutâneo.

Como perspectiva, este trabalho propõe estudos para compreender melhor os mecanismos pelos quais estes derivados desempenham sua atividade antimetastática. Isso pode ser feito por análises mais aprofundadas de sinalização celular e atividade enzimática de metaloproteinases. Propõe-se ainda a avaliação *in vivo* da atividade antimetastática dos compostos 9a e 1f, por meio do modelo experimental de indução de nódulos pulmonares.