



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LUCAS CORAL FERREIRA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS INIBIDORES DE GLUTAMINASE
DERIVADOS DE 3-TIO-1,2,4-TRIAZOIS.**

**Campinas
2023**

LUCAS CORAL FERREIRA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS INIBIDORES DE GLUTAMINASE
DERIVADOS DE 3-TIO-1,2,4-TRIAZOIS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cezar Pastre

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Lucas Coral Ferreira e orientada pelo Prof. Dr. Julio Cezar Pastre.

**Campinas
2023**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

F413p Ferreira, Lucas Coral, 1995-
Planejamento e síntese de novos inibidores de glutaminase derivados de
3-tio-1,2,4-triazóis / Lucas Coral Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Julio Cezar Pastre.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Glutaminase. 2. Inibidores químicos. 3. Câncer. I. Pastre, Julio Cezar,
1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Design and synthesis of new 3-thio-1,2,4-triazole derivatives as
glutaminase inhibitors

Palavras-chave em inglês:

Glutaminase

Chemical inhibitors

Cancer

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Julio Cezar Pastre [Orientador]

Carlos Roque Duarte Correia

Jeanine Giarolla Vargas

Data de defesa: 01-03-2023

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0007-0858-2585>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/8981901977348301>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Julio Cezar Pastre (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia (Universidade Estadual de Campinas)

Profa. Dra. Jeanine Giarolla Vargas (Universidade Estadual de São Paulo)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **LUCAS CORAL FERREIRA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 1 de março de 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Prof. Dr. Julio Cezar Pastre por ter acreditado em mim desde o início. Obrigado Julio pela oportunidade, mesmo quando eu estava sem bolsa e trabalhando o senhor ter continuado a me apoiar, foi de grande valia para que eu continuasse minha trajetória no mestrado.

Agradecer a minha mãe Inês Ap. Coral, por ter ficado ao meu lado durante esse período e ter sido meu suporte para que esse sonho se realizasse.

Ao Caio S. Gadanha, por todo apoio, desde conversas de desabafo até puxões de orelha, você é um grande irmão pra mim.

Ao Lucas Cunha e Guilherme Cariello, vocês foram muito importantes ainda mais na etapa final e tenho muito orgulho de carregar essas amizades comigo.

Aos amigos de longa data, Gustavo Oliveira, Pedro Cosmo e Gabriel Rios que desde a graduação me acompanham.

Ao atual Pastre's group, Rodini e Camila, mas sem esquecer daqueles que já finalizaram sua jornada no grupo como Guilherme, Gustavo e Henrique. Obrigado pelos almoços, as brincadeiras, companhia e principalmente pelo tanto que me ensinaram na bancada, foi de extrema importância.

Aos técnicos do IQ, mas em especial ao Anderson e Carol do RMN, vocês sempre me ouviram, aconselharam e ajudaram como podiam. O valor de vocês é muito maior do que apenas os técnicos do RMN.

À pesquisadora Dra. Sandra Dias e a doutoranda Bianca do LNBio – CNPEM pelos resultados de inibição frente à enzima glutaminase isolada.

Ao Prof. Dr. Daniel Kawano da FCF pelos cálculos de docagem molecular.

À pesquisadora Dra. Daniela B. B. Trivella do LNBio – CNPEM pelos resultados de inibição frente à linhagens celulares.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concebida durante o mestrado (Processo: 160907/2021-7).

À Fapesp pela infraestrutura disponível no IQ-UNICAMP e o apoio financeiro para o BMOS 2022.

Ao Victor Stork, Pedro Marques e Kelita pelas conversas e momentos de descontração e aos demais colegas do grupo do Prof. Emilio e Prof. Rodrigo.

RESUMO

A química de triazóis tem sido investigada intensivamente e amplamente pelos químicos, em especial da área medicinal na tentativa de realizar a aplicação desses mesmos núcleos em medicamentos, pois essas estruturas têm se demonstrado com valores relevantes em testes biológicos como grupos farmacofóricos e por aumentarem propriedades como polaridade e estabilidade da estrutura. Deste modo, a inserção dos núcleos, utilizando-se procedimentos experimentais robustos como a síntese de 1,2,4-triazóis a partir da ciclização em meio básico de tiossemicarbazidas e do núcleo 1,2,3-triazol pela cicloadição catalisada por cobre entre uma azida e um alcino (CuAAC), podem ser utilizadas para a síntese de compostos bioativos, úteis para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. Assim, com estudos apresentados por Otto, pioneiro em metabolismo do câncer, algumas enzimas foram relacionadas como alvos terapêuticos para a doença e, dentre elas, temos a glutaminase. A glutaminase é relacionada na via da glutaminólise onde há a conversão de glutamina para glutamato e, assim, se inserir no ciclo TCA e sintetizar vários intermediários glicolíticos de alto valor para a proliferação e manutenção celular. Ela pode ser encontrada como dímero ou tetrâmero, sendo o tetrâmero o único com atividade catalítica e é subdividida em 2 classes sendo elas a Glutaminase 1 (GLS1) e Glutaminase 2 (GLS2). Em diversas linhagens de células tumorais há superexpressão apenas da GLS1, deste modo, ela foi definida como um alvo terapêutico promissor para o tratamento de câncer. Newcomb *et al.* sintetizou uma molécula simétrica contendo o núcleo 1,2,4-tiadiazol como base da estrutura (denominada pelo acrônimo BPTES), a qual apresentou ótimo valor de inibição frente a enzima glutaminase e por interagir com o sítio alostérico da enzima, não apresentou efeitos off-target, se demonstrando seletiva. Neste contexto, o objetivo desse projeto é sintetizar novos inibidores de glutaminase derivados do 3-tio-1,2,3-triazol como núcleo principal e avaliar a atividade biológica frente à enzima glutaminase isolada. O presente trabalho realizou a síntese de novos derivados contendo o núcleo 1,2,4-triazol, obtendo como destaque a *N-benzyl-1-3-((4-ciclopropil-5-fenil-4H-1,2,4-triazol-3-il)tio)propil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida*, que apresentou valor de inibição relevante frente a enzima ($IC_{50} = 32,0 \mu M$), e a *N.N'-((propano-1,3-bis(sulfanildil))bis(1,3,4-tiadiazol-5,2-dil))bis(2-fenilacetamida)* com valor de inibição ($IC_{50} = 1,0 \mu M$) e redocking superior ao BPTES.

ABSTRACT

The chemistry of triazoles has been intensively and widely investigated by chemists, especially in the medicinal field, in an attempt to apply these same nuclei in medicines, as these structures have been shown to have relevant values in biological tests as pharmacophoric groups and for increasing properties such as polarity and stability of the structure. In this way, the insertion of the nuclei, using robust experimental procedures such as the synthesis of 1,2,4-triazoles from the cyclization in basic medium of thiosemicarbazides and the 1,2,3-triazole nucleus by the cycloaddition catalyzed by copper between an azide and an alkyne (CuAAC), can be used for the synthesis of bioactive compounds, useful for the treatment of several diseases, including cancer. Thus, with studies presented by Otto, a pioneer in cancer metabolism, some enzymes were listed as therapeutic targets for the disease and, among them, we have glutaminase. Glutaminase is related to the glutaminolysis pathway where there is the conversion of glutamine to glutamate and, thus, inserting itself in the TCA cycle and synthesizing several glycolytic intermediates of high value for cell proliferation and maintenance. It can be found as a dimer or tetramer, the tetramer being the only one with catalytic activity and is subdivided into 2 classes, namely Glutaminase 1 (GLS1) and Glutaminase 2 (GLS2). In several tumor cell lines there is only overexpression of GLS1, thus, it was defined as a promising therapeutic target for the treatment of cancer. Newcomb et al. synthesized a symmetric molecule containing the 1,2,4-thiadiazole core as the base of the structure (denominated by the acronym BPTES), which showed excellent inhibition value against the enzyme glutaminase and, due to its interaction with the allosteric site of the enzyme, did not show off effects -target, proving selective. In this context, the objective of this project is to synthesize new glutaminase inhibitors derived from 3-thio-1,2,3-triazole as the main nucleus and to evaluate the biological activity against the isolated glutaminase enzyme. The present work carried out the synthesis of new derivatives containing the nucleus 1,2,4-triazole, obtaining as highlight the *N-benzyl-1-3-((4-cyclopropyl-5-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)propyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide*, which showed a relevant inhibition value against the enzyme ($IC_{50} = 32,0 \mu M$), and *N.N'-((propane-1,3-bis(sulfanildyl))bis(1,3,4-thiadiazol-5,2-dyl))bis(2-phenylacetamide)* with inhibition value ($IC_{50} = 1.0 \mu M$) and redocking higher than BPTES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Medicamentos mais consumidos com <i>N</i> -heterociclos em sua estrutura.	15
Figura 2. Apresenta a estrutura dos compostos e alguns exemplos de núcleos inseridos como substituinte da amida destacados pelo quadro em vermelho.....	16
Figura 3. Exemplos de metodologias utilizadas para a construção de anéis <i>N</i> -heterociclos.....	17
Figura 4. Exemplos de reações que estão contidas nas condições <i>click</i>	18
Figura 5. Metodologias empregadas para a síntese de 1,2,3-triazol a partir de alcino e azida orgânica.	19
Figura 6. Representação de 3 estruturas apresentadas na literatura que são intermediários importantes para elucidação do mecanismo envolvido na CuAAC. Os átomos de carbono são representados em cinza, de hidrogênio em branco, enxofre em amarelo, nitrogênio em azul e cobre em laranja. Adaptado de Meldal <i>et al.</i> ²¹	23
Figura 7. Comparação entre as células não proliferativas (saudáveis) e o tecido proliferativo ou tumor com o saldo obtido em função de mol de ATP/ mol de glucose, adaptado de Heiden <i>et al.</i> ⁴⁶	24
Figura 8. Demonstração da interligação entre a reação de síntese do piruvato à lactato e a possível participação na síntese do 1,3-bisfosfoglicerato, intermediário importante para a via glicolítica.	24
Figura 9. Etapas da síntese do α -cetoglutarato partindo da glutamina.	25
Figura 10. Intermediários do Ciclo TCA sintetizados a partir da glutaminólise. Adaptado de Yang <i>et al.</i> ⁵⁷	26
Figura 11. Demonstração da interação da molécula de glutamato com o sítio ativo da enzima glutaminase, apresentando as interações com os resíduos de aminoácidos. Adaptado de DeLabarre <i>et al.</i> ⁶⁴ . Os átomos, contidos na estrutura da glutamina, de carbono são apresentados na coloração laranja, os de oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul. Em amarelo, os resíduos de aminoácidos de um dímero e em azul do outro dímero que compõe essa interface catalítica.....	27
Figura 12. (A) GLS1 apresentada como tetrâmero com o sítio ativo preenchido pelo substrato (glutamina) em roxo e (B) o BPTES no bolso alostérico sendo ampliado no retângulo azul. Adaptado de Zimmerman <i>et al.</i> ⁵⁸ e em (C) a estrutura química do BPTES, átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo.	28
Figura 13. Estrutura química dos compostos 27 e 28.....	29
Figura 14. Molécula de BPTES dividida em três regiões. ⁷¹	30
Figura 15. Estrutura molecular e atividade de inibição frente à glutaminase (GLS1) dos derivados sintetizados pelo grupo do pesquisador Tsukamoto.....	30
Figura 16. Estrutura química do CB-839.....	31
Figura 17. Otimização estrutural do derivado contendo 1,2,3-triazol como núcleo e estrutura molecular do IPN60090.	31
Figura 18. Otimização proposta por McDermott e o derivado com maior destaque no trabalho publicado. Ilustração adaptada de McDermott <i>et al.</i> ⁸⁰	32
Figura 19. Imagem cristalográfica do CB-839 frente à glutaminase e estrutura molecular do macrociclo sintetizado. Adaptado de Xu <i>et al.</i> ⁸²	33
Figura 20. Compostos sintetizados e seus efeitos frente à enzima glutaminase.....	33

Figura 21. Compostos inicialmente planejados para o presente estudo.	34
Figura 22. Estrutura química dos análogos avaliados nos ensaios citotoxicidade.	58
Figura 23. Comparação entre a pose cristalográfica do inibidor da enzima glutaminase humana BPTES (A) com os modos de ligação (poses de docagem) preditos para os compostos sintetizados. B) Pose predita para 74 ; C) Pose predita para 76 ; D) Pose predita para 61.1 ; E) Pose predita para 60.2 ; F) Pose predita para 63.1 ; G) Pose predita para 63.2 ; H) Pose predita para 61.2 . (adicionar a relação das cores de átomos com os átomos utilizados).	62
Figura 24. Diagramas bidimensionais das interações proteína-ligantes gerados a partir dos modelos 3-D. A) BPTES; B) 74 ; C) 76 ; D) 61.1 ; E) 60.2 ; F) 63.1 ; G) 63.2 ; H) 61.2 . As linhas tracejadas pretas correspondem a ligações de hidrogênio, linhas tracejadas em verde a interações π - π , enquanto as linhas sólidas verdes destacam as interações hidrofóbicas.	66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação dos diagramas de energia para orbitais moleculares da azida, dipolarófilo e a influência no orbital em cada tipo de reação. Adaptado de Chen <i>et al.</i> ²⁹	20
Esquema 2. Representação dos orbitais de fronteira para a reação entre azida e alcino favorecendo o regioisômero 1,5 (a) ou 1,4 (b).	20
Esquema 3 Mecanismos de Glaser e Sonogashira, com destaque pelo retângulo em azul do acetileno de cobre.	21
Esquema 4. Ciclo catalítico proposta para a síntese do triazol 1,4-disubstituído.	22
Esquema 5. Esquema geral para a síntese dos núcleos 1,2,4-triazóis.	36
Esquema 6. Condições experimentais para a síntese das tiossemicarbazidas intermediárias.	36
Esquema 7. Demonstração da estrutura de ressonância entre LUMO carbonil e HOMO par de elétrons não ligante do nitrogênio.	37
Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação de condensação entre a hidrazida e o tiocianato.	37
Esquema 9. Síntese dos núcleos 1,2,4-triazóis.	38
Esquema 10. Mecanismo proposto para a síntese dos 5-aryl-1,2,4-triazol-3-ona. (Remover a base da conversão de 47 para 50)	39
Esquema 11. Rota proposta para a síntese do 5-fenil-3-tio-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol (57).	39
Esquema 12. Síntese da tiossemicarbazida intermediária (56).	40
Esquema 13. Mecanismo proposto para a síntese da tiossemicarbazida 56	40
Esquema 14. Síntese do núcleo 5-fenil-3-tio-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol (57).	41
Esquema 15. Rota geral para a síntese dos dímeros.	41
Esquema 16. Síntese dos dímeros 1,3-bis((1,2,4-triazol)tio)propano.	41
Esquema 17. Rota proposta para a síntese do dímeros assimétricos contendo 1,2,3-triazol.	42
Esquema 18. Reação de alquilação com brometo de propargila.	42
Esquema 19. Mecanismo proposto por Fizer <i>et al.</i> para a alquilação seletiva no enxofre. B representa a base presente no meio.	43
Esquema 20. Síntese do dímero 61 via <i>click chemistry</i>	43
Esquema 21. Análise retrosintética para síntese do dímero não simétrico com azida orgânica como intermediário.	44
Esquema 22. Síntese do 3-azido-1-bromopropano (65).	44
Esquema 23. Síntese da azida intermediária contendo os núcleos 4-ciclopropil-5-fenil-1,2,4-triazol (64.1) e 4- <i>H</i> -5-fenil-1,2,4-triazol (64.2).	45
Esquema 24. Síntese do alcino intermediário 66 a partir do ácido propargílico e benzilamina.	45
Esquema 25. Síntese dos dímeros via azida intermediária utilizada na <i>click chemistry</i>	46
Esquema 26. Análise retrosintética proposta para a síntese do composto 67	46
Esquema 27. Condições experimentais testadas a partir de desproteção para a síntese do 67	47

Esquema 28. Condições experimentais testadas a partir de base e agente alquilante para a síntese 67.....	48
Esquema 29. Análise retróssintética para a síntese do 67 com N4 protegido. ..	49
Esquema 30. Alquilação do grupo tiol contido no núcleo 5-fenil-3-tio-1,2,4-triazol.....	49
Esquema 31. Rota proposta para a proteção do N4.....	50
Esquema 32. Tentativa de desproteção através de hidrogenação catalítica.	50
Esquema 33. Análise retróssintética para a síntese do dímero simétrico contendo 1,2,4-tiadiazol.....	51
Esquema 34. Síntese do dímero 5,5'-(propano-1,3-dibis(sulfanil))bis(1,3,4-tiadiazol-2-amina).....	51
Esquema 35. Síntese do <i>N,N'</i> -((propano-1,3,-dibis(sulfanil))bis(1,3,4-tiadiazol-5,2-il))bis(2-fenilacetamida).....	52
Esquema 36. Análise retróssintética para a síntese do dímero assimétrico contendo o núcleo 1,2,3-triazol.	53
Esquema 37. Síntese do 5-(prop-2-in-iltio)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (78).....	53
Esquema 38. Condições experimentais para a síntese do núcleo acilado (77)..	54
Esquema 39. Síntese do <i>N</i> -(5-(((1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-2-fenilacetamida (76).....	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Comparação dos dados de RMN de ^1H do composto 69 obtido com o da literatura.	48
Tabela 2. Comparação dos dados de RMN de ^1H do composto 75 obtido com o da literatura.	52
Tabela 3. Valores de IC_{50} para o CB-839 , referência na inibição de glutaminase e para os derivados preparados.	55
Tabela 4. Valores de IC_{50} e seletividade (IS) obtidos frente às linhagens HCT-116 e MDA-MB-231 para os análogos sintetizados, junto ao controle positivo (paclitaxel) e o controle negativo (HaCat).	57
Tabela 5. Escores de docagem preditos para a interação entre os compostos sintetizados e os resíduos de aminoácidos do sítio alostérico da enzima glutaminase humana.	59

LISTA DE ACRÔNIMOS

AcOEt	Acetato de etila
ATP	Adenosina trifosfato
BrBn	Brometo de benzila
DCC	<i>N,N'</i> -dicicloexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA	Disopropietilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilforamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Et₃N	Trietilamina
HATU	Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i>
Hz	Hertz
<i>i</i>-PrOH	Isopropanol
J	Constante de acoplamento de RMN
L	Litro
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
m	Mili
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHz	Mega-Hertz
NaAsc	Ascorbato de sódio
°C	Celsius
Ph	Fenil
RMN	Ressonância magnética nuclear
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 N-HETEROCICLOS NA QUÍMICA MEDICINAL	15
1.2 <i>CLICK CHEMISTRY</i>	17
1.3 EFEITO DE WARBURG	23
1.4 GLUTAMINA	25
1.4.1 Glutaminase	26
1.3. PEQUENAS MOLÉCULAS DESENVOLVIDAS	28
2. OBJETIVOS	35
2.1 GERAL	35
2.2 ESPECÍFICOS	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 SÍNTESE DOS NÚCLEOS 1,2,4-TRIAZÓIS	36
3.2 SÍNTESE DOS DÍMEROS 1,2,4-TRIAZOL	41
3.3 SÍNTESE DOS DÍMEROS COM 1,2,4-TIADIAZOL	51
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	54
3.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	57
3.6 DOCKING MOLECULAR	58
4. CONCLUSÃO	67
5. MATERIAIS E MÉTODOS	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
7. ANEXOS	93
7.1 ESPECTROS DE RMN	93
7.2 GRÁFICOS DE INIBIÇÃO FRENTE À ENZIMA ISOLADA.	148
7.3 GRÁFICOS DOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.	149

1. INTRODUÇÃO

1.1 N-HETEROCICLOS NA QUÍMICA MEDICINAL

Os heterociclos nitrogenados são amplamente estudados e apresentam alto valor agregado¹ pelo fato de possuírem diversas aplicações em segmentos que impactam na economia, como o agronegócio² e farmacológico³. Algumas dessas moléculas já eram conhecidas há tempos e ainda se apresentam com características únicas e essenciais para o mundo atual, como é o exemplo clássico de produto natural morfina⁴ (**1**) que é utilizada como analgésico, extraída da *Papaver Somniferum*. Esses núcleos também estão presentes nos fármacos sintéticos mais procurados no território brasileiro, como é apresentado no levantamento da Secretaria-Executiva da Câmara de Regulamentação do Mercado de Medicamentos (SCMED). Dentre o ranking das 20 substâncias mais utilizadas, tem-se exemplos com N-heterociclos nas estruturas da Losartana⁵ (**2**), Dipirona monossódica (**3**) e Cloridrato de Nafazolina (**4**) que são apresentadas na **figura 1**, em que somente no ano de 2019 geraram um faturamento de 85,9 bilhões de reais.⁶

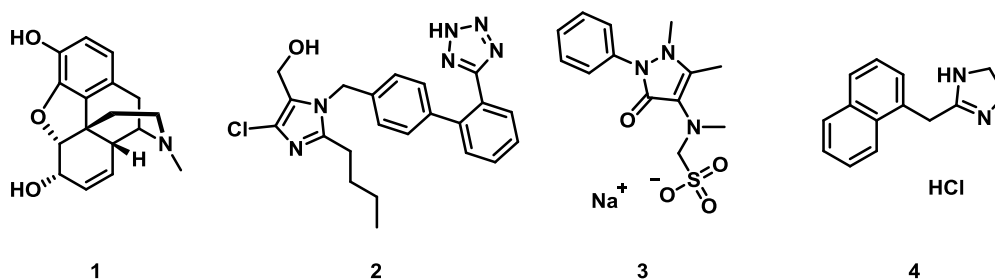


Figura 1. Medicamentos mais consumidos com N-heterociclos em sua estrutura.

Esse alto valor econômico se dá pelo fato de que a incorporação desses núcleos nitrogenados em possíveis candidatos a fármacos pode promover modificações positivas nas propriedades físicas, como aumentar a estabilidade, além de melhorar aspectos relacionados à polaridade, capacidade de realizar ligações de hidrogênio, solubilidade. Esse efeito se dá, pelo fato de apresentarem características similares e substituir algumas funções orgânicas mais simples como as amidas (*i.e.* bioisosterismo).^{7,8} Um exemplo de modificação molecular empregando o bioisosterismo foi reportado pelos pesquisadores Lindsley e Niswender, no qual realizaram uma primeira otimização estrutural tomando como base o composto (**5**)⁹ que, apesar de apresentar boa atividade de inibição frente ao alvo, teve baixa estabilidade por conta da amida presente na

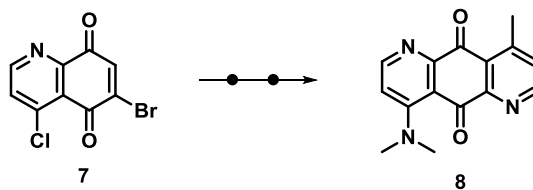
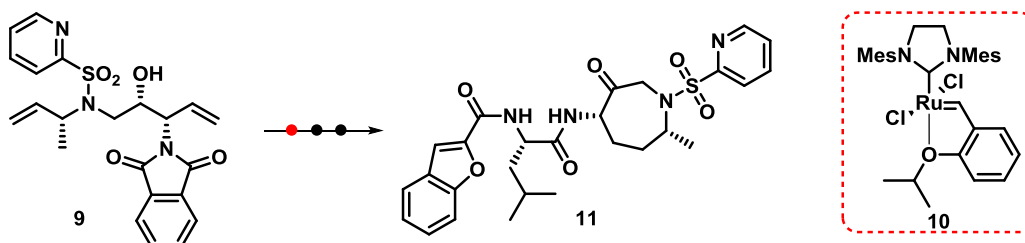
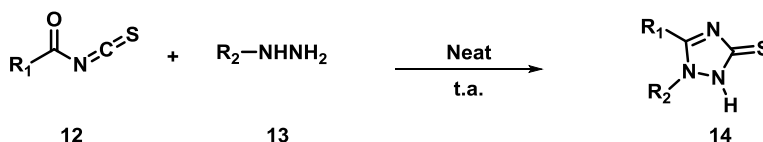
Fuentes *et al.*Wang *et al.*Yavari *et al.*

Figura 3. Exemplos de metodologias utilizadas para a construção de anéis *N*-heterociclos.

Assim como as metodologias apresentadas anteriormente, as reações *click* são amplamente aplicadas para a incorporação de *N*-heterociclos em diversas estruturas que apresentaram atividade biológica relevante.^{18,19}

1.2 CLICK CHEMISTRY

Em meados de 2001, foi introduzido por Sharpless *et al.* o conceito de click chemistry, o qual se baseia em reações capazes de unir duas funções terminais contidas em estruturas complexas sem formação de subprodutos, com alta eficiência, sendo aplicada à síntese de potenciais fármacos.²⁰ Para que a reação seja considerada *click chemistry*, deve cumprir todos os requisitos que são apresentados abaixo:²¹

- Ser modular e ter escopo amplo;
- Fornecer rendimentos altos;
- Os subprodutos devem ser inofensivos;
- Ser estereoespecífica, mas não necessariamente enantiosseletiva;
- Favorecidas termodinamicamente;
- Não apresentar sensibilidade a oxigênio ou água;
- Condições *neat* ou empregar solventes benignos e temperatura ambiente;

- Materias de partida disponíveis;
- Purificação sem necessidade de cromatografia.

Posteriormente, a pesquisadora Carolyn R. Bertozzi avançou com a ideia da *click chemistry* aplicando as reações em sistemas vivos entre ciclooctinos e azidas orgânicas, demonstrando a possibilidade da reação sem qualquer interferência nos processos bioquímicos presentes.²² As contribuições de Karl B. Sharpless, as reações realizadas em paralelo e simultaneamente pelo pesquisador Morten P. Meldal em reações de conjugação entre peptídeos e açúcares²³ junto às aplicações de Bertozzi em organismos vivos conceberam a eles o prêmio Nobel em Química de 2022.²⁴

Tem-se diversos exemplos de reações *click*, isso por que ela é, na verdade, um grupo de reações que se enquadram nos requisitos citados acima como a hidrotiolação de olefinas via *tiol-ene* (17), síntese de 1,2,3-triazóis a partir de alcino e azida orgânica promovidas por tensão de anel (SPAAC) (20)²⁵ ou a reação de cicloadição de alcino e azida orgânica catalisada por cobre (CuAAC) (22)²⁶ apresentados na **figura 4**.

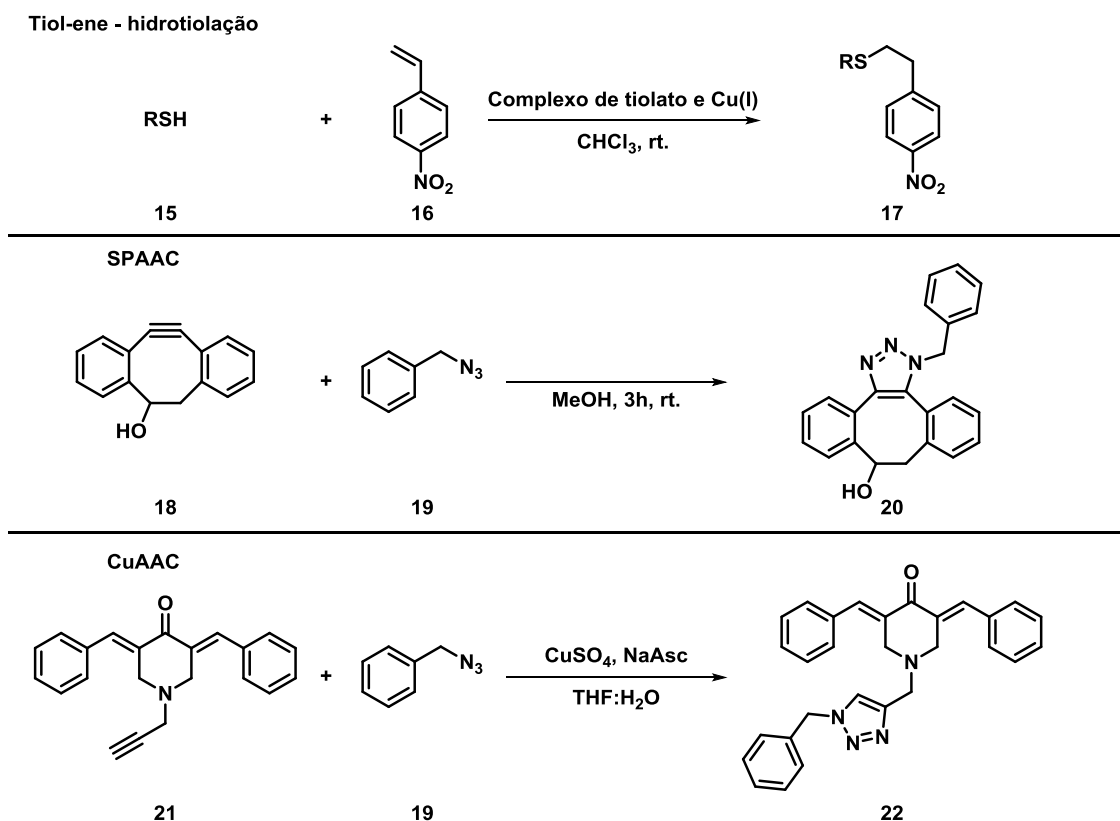


Figura 4. Exemplos de reações que estão contidas nas condições *click*.

A CuAAC, que se baseia na síntese de 1,2,3-triazol desenvolvida por Sharpless com catálise por cobre (I), apresenta uma regioseletividade implícita que não era

visualizada na reação, sem a presença de metais de transição e em condições térmicas, apresentada por Rolf Huisgen em 1964,²⁷ pioneiro na discussão sobre reações de cicloadição 1,3-dipolar. Sendo assim, a metodologia de Huisgen forma uma mistura de isômeros, sendo os 1,2,3-triazóis 1,4 e 1,5 dissustituídos. Já para a reação de Sharpless, o único produto formado é o 1,2,3-triazol 1,4 dissustituído, **figura 5**.

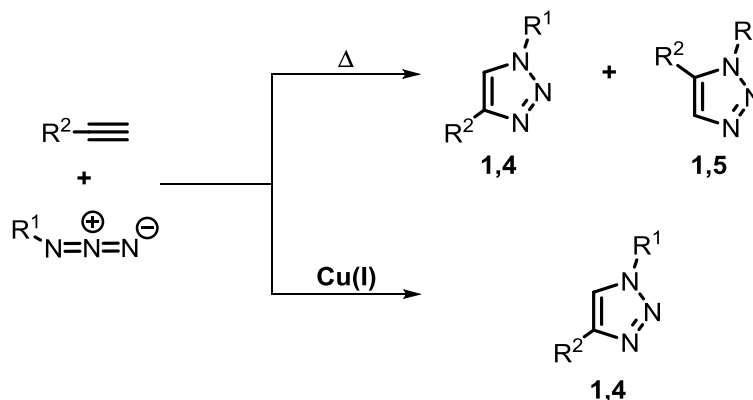
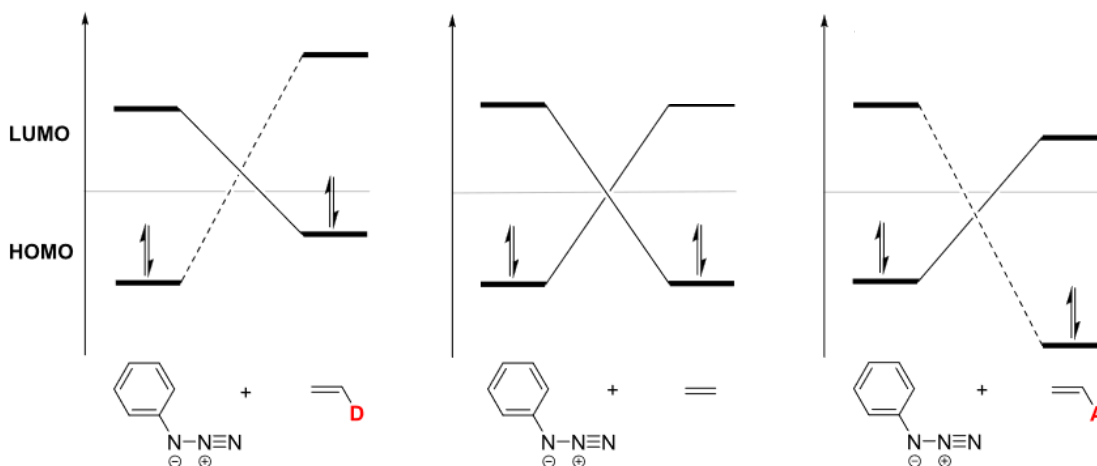


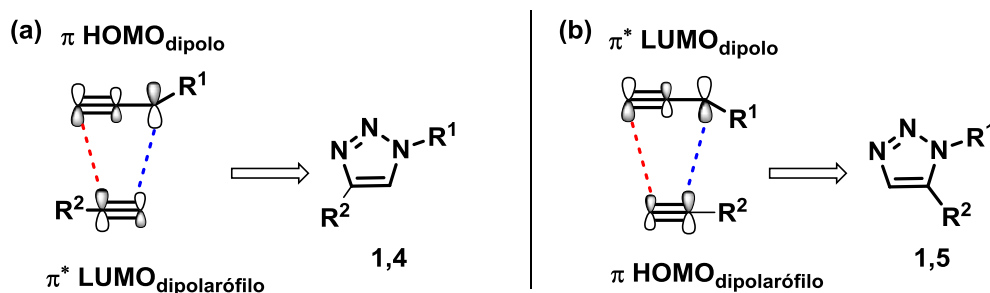
Figura 5. Metodologias empregadas para a síntese de 1,2,3-triazol a partir de alcino e azida orgânica.

Essa diferença entre a regioselectividade pode ser visualizada através dos mecanismos envolvidos em cada reação, pois considera-se que ambas são reações de cicloadição 1,3-dipolar (1,3 DPCA). Sendo assim, avaliando primeiramente o mecanismo envolvido na reação de Huisgen, necessariamente temos a participação da aril azida como 1,3-dipolo, sendo a espécie mais rica em elétrons, e o alcino como dipolarófilo, que é a espécie mais deficiente em elétrons. Sustmann *et al.* realizou uma avaliação das reações de fenil azidas e alcenos e, através da teoria de orbitais de fronteira e, demonstrou que azidas poderiam apresentar características ambifílicas (ou seja, agir como nucleófilo ou eletrófilo na reação.) apresentada por 3 tipos genéricos.²⁸ Para o **tipo I**, temos a inserção de um grupo doador de elétrons, aumento dos níveis de energia dos orbitais do dipolarófilo, favorecendo uma interação entre o LUMO_{azida}→HOMO_{dipolarófilo}, para o **tipo II**, há ausência de grupos no etileno, deste modo não haveria um possível favorecimento entre as interações HOMO e LUMO de ambas as espécies, para o **tipo III**, há a inserção de um grupo retirador de elétrons, diminuindo os orbitais de energia e deste modo, favorecendo uma interação HOMO_{azida}→LUMO_{dipolarófilo} (**esquema 1**).²⁹



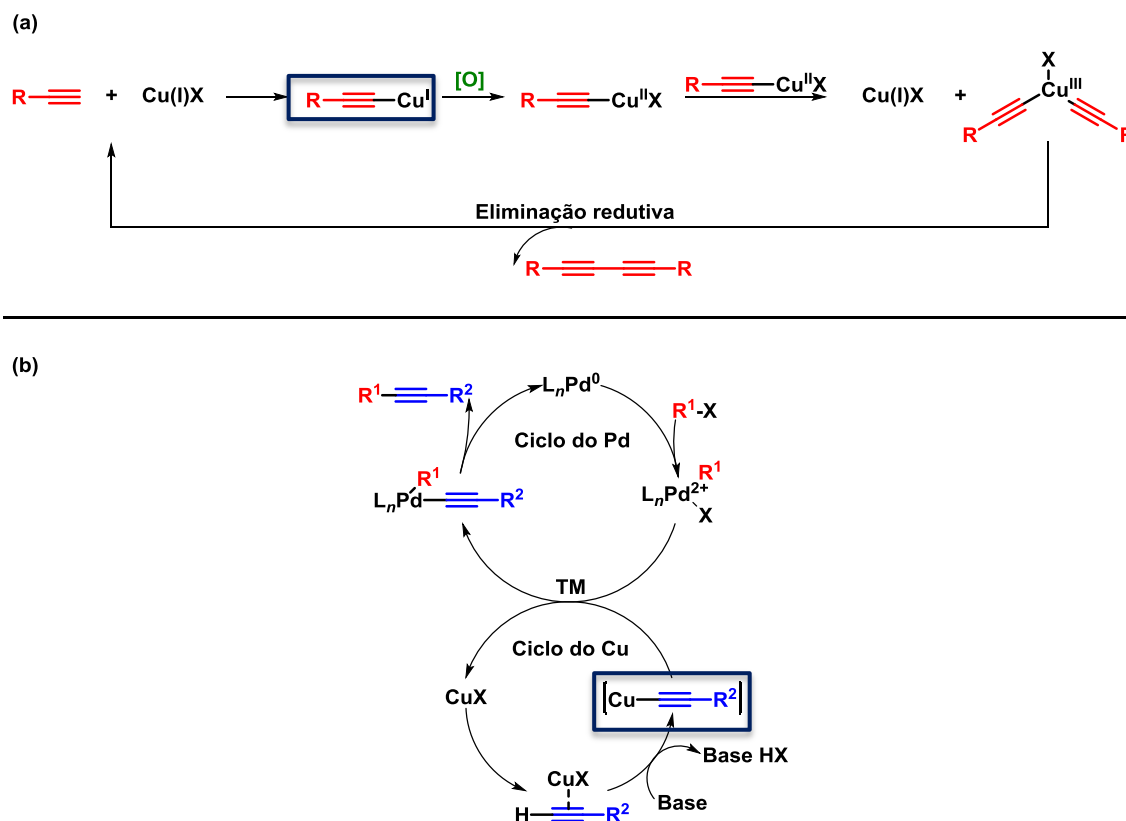
Esquema 1. Representação dos diagramas de energia para orbitais moleculares da azida, dipolarófilo e a influência no orbital em cada tipo de reação. Adaptado de Chen *et al.*²⁹

Sendo assim, quando os substituintes presente no dieno e no dienófilo forem de mesma natureza, os orbitais HOMO e LUMO das espécies envolvidas possuiriam uma pequena variação, e sabendo que a aproximação do dienófilo é suprafacial,³⁰ teríamos 2 possibilidades: o primeiro momento seria considerando o $\text{LUMO}_{\text{dipolarófilo}} \rightarrow \text{HOMO}_{\text{azida}}$, e favorecendo a formação do produto 1,4 (a), e o segundo considerando os orbitais $\text{HOMO}_{\text{dipolarófilo}} \rightarrow \text{LUMO}_{\text{azida}}$, favorecendo a formação do produto 1,5 (b), representados no **esquema 2**.³¹ Assim, o produto resultante da reação, na realidade, seria uma mistura composta pelos isômeros 1,4 e 1,5.



Esquema 2. Representação dos orbitais de fronteira para a reação entre azida e alcino favorecendo o regioisômero 1,5 (a) ou 1,4 (b).

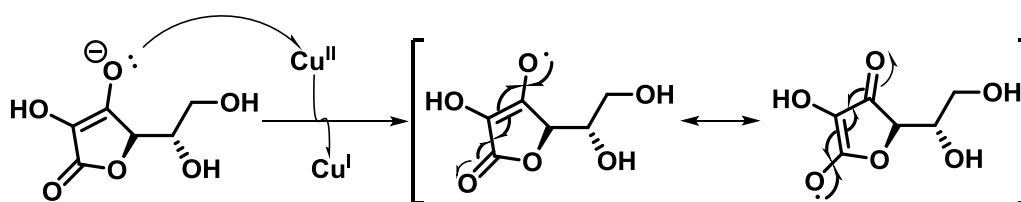
Já na reação desenvolvida por Sharpless, temos a utilização da espécie de cobre (I) como catalisador. De início, na literatura indica alguns mecanismos propostos que tomaram como base a formação de acetiletos cupratos (*i.e.* espécie formada onde há a substituição do hidrogênio terminal no alcino por metal) entre alcino e o cobre (I). Essa espécie está presente na proposta de mecanismo para outras reações de acoplamento como a de Glaser (a), e na reação de Sonogashira (b), destacados na **esquema 3**.^{32–34}



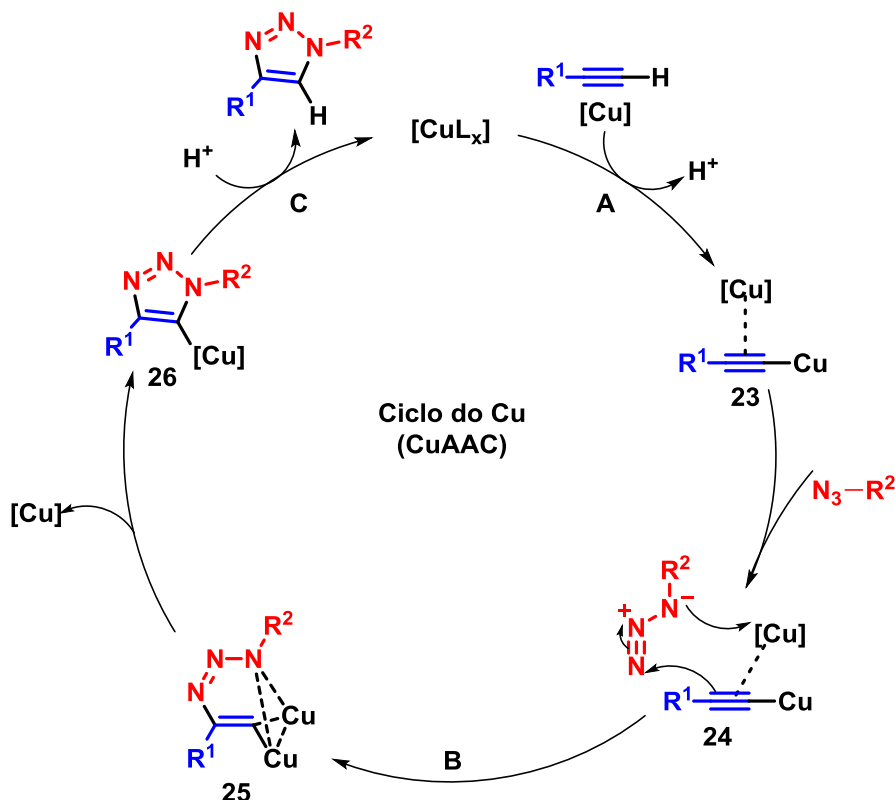
Esquema 3 Mecanismos de Glaser e Sonogashira, com destaque pelo retângulo em azul do acetileto de cobre.

A partir da formação do intermediário acetileto, Finn e Fokin foram os primeiros a propor um mecanismo geral para a CuAAC utilizando cálculos teóricos de DFT, **esquema 4**, e destacaram a importância da coordenação da azida e do alcino nos átomos de cobre. No início do ciclo, temos a **etapa I** onde há a redução do cobre (II) para (I) em solução na presença do íon ascorbato,³⁵ em seguida, temos o início do ciclo catalítico (**etapa II**) através da coordenação do átomo de cobre no orbital π da ligação tripla, interação que reduz o pKa do hidrogênio no alcino terminal próximo a 10 unidades, possibilitando a abstração por bases mais fracas normalmente empregadas nessa metodologia.³⁶ Em sequência, a inserção de outro átomo de cobre no orbital σ , resulta no acetileto de cobre (**23**), que coordenado ao outro cobre, forma um complexo intermediário dinuclear, finalizando a **etapa A**.³⁷ A azida orgânica é ativada pela coordenação com o cobre, passando pelo mecanismo concertado no intermediário **24**,³⁸ que resulta na espécie **25**, (**etapa B**). Em seguida, há uma descoordenação do átomo de cobre para o meio formando o anel triazólico com a regioselectividade 1,4 (**26**) e, ao final da **etapa C**, o cobre é reoxidado para iniciar o ciclo catalítico novamente.³⁶

I) Redução do cobre em solução:



II) Ciclo catalítico do cobre:



Esquema 4. Ciclo catalítico proposta para a síntese do triazol 1,4-dissubstituído.

Posteriormente, intermediários que são considerados chaves para a reação se apresentaram estáveis ao ponto de serem isolados como é o caso do acetileto metálico coordenado a outro átomo de cobre (**Figura 6a**), ou a partir de um catalisador de cobre dinuclear ligado a um *para*-toluilaquinil (**Figura 6b**) e a reação com fenilazida para a formação do produto triazólico (**Figura 6c**).^{39,40}

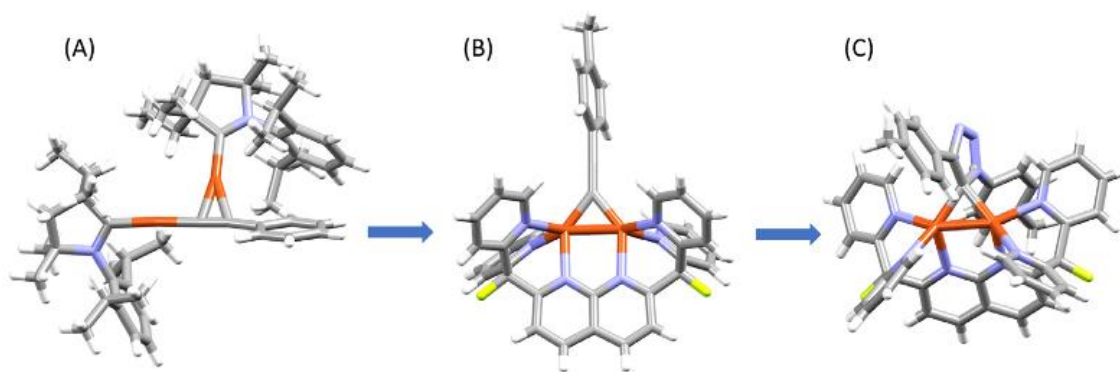


Figura 6. Representação de 3 estruturas apresentadas na literatura que são intermediários importantes para elucidação do mecanismo envolvido na CuAAC. Os átomos de carbono são representados em cinza, de hidrogênio em branco, enxofre em amarelo, nitrogênio em azul e cobre em laranja. Adaptado de Meldal *et al.*²¹

Deste modo, a inserção de núcleos 1,2,3-triazol dissustituídos em possíveis fármacos foi facilitada e bem vista por apresentar alta estabilidade à temperatura e oxidação, caráter aromático e a habilidade de aceitar ligações de hidrogênio. Dentre as atividades biológicas apresentadas por esse núcleo, a presença em inibidores para alvos terapêuticos relacionados ao câncer é bastante atraente.⁴¹

1.3 EFEITO DE WARBURG

O câncer é uma das doenças mais agressivas e letais conhecidas no mundo e a área de pesquisa visando compreender sobre seu metabolismo tem sido cada vez mais investigada.⁴² Otto Warburg foi pesquisador pioneiro no metabolismo do câncer e, em meados de 1924, destacou que apenas as células afetadas pela doença apresentavam alta captura de glucose, excreção de lactato, proliferação celular e assimilando (envolvendo) a uma lesão mitocondrial que causaria essa disfunção.^{43,44} Esse fenômeno, se daria pelo fato da célula tumoral preferir a via fermentativa ao invés da via aeróbica, mesmo em condições suficientes de oxigênio, denominado por Efeito de Warburg, sendo então definida como marca registrada da doença, **figura 7**.⁴⁵

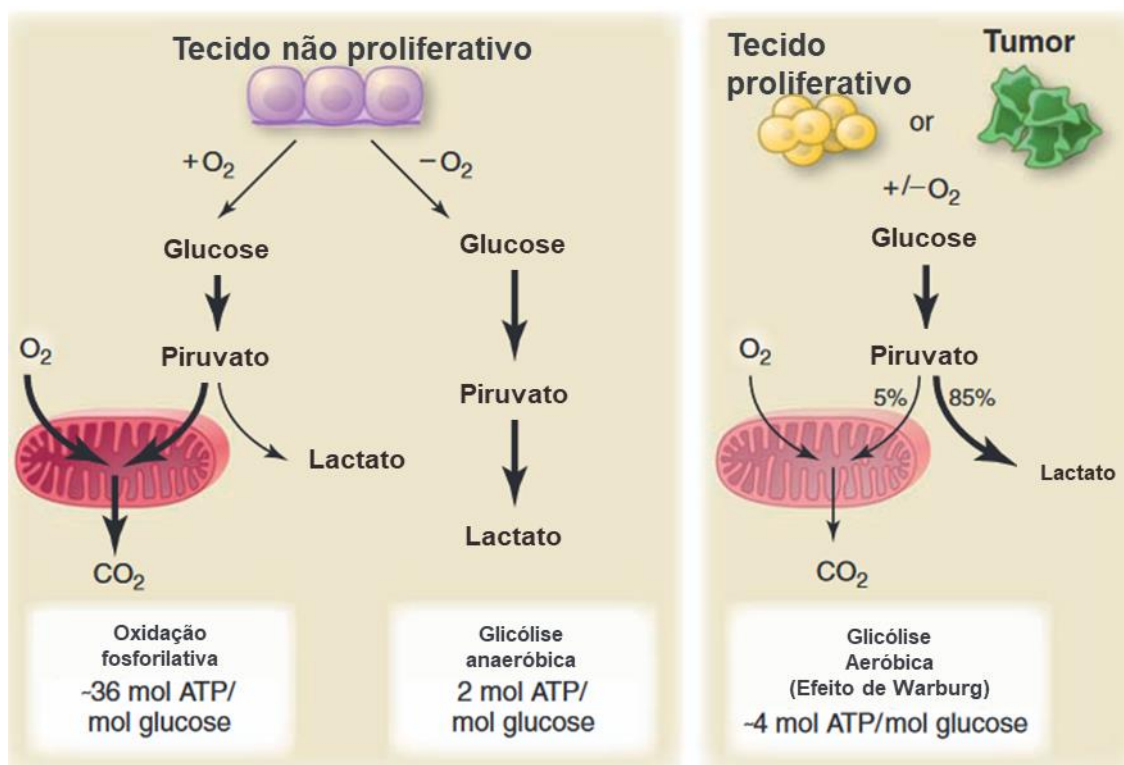


Figura 7. Comparação entre as células não proliferativas (saudáveis) e o tecido proliferativo ou tumor com o saldo obtido em função de mol de ATP/ mol de glucose, adaptado de Heiden *et al.*⁴⁶

Posteriormente, verificou-se que a mitocôndria da célula comprometida com o tumor estaria saudável e essa preferência estaria relacionada com as características do microambiente do tumor ser sólido, heterogêneo, com pH intracelular alcalino, irrigação sanguínea variável e dificuldade de difusão de oxigênio.⁴⁷⁻⁴⁹ A relação do efeito de Warburg com o câncer ainda não foi completamente elucidada, entretanto, o fato da célula selecionar uma via menos rentável em relação a ATP é interessante. A partir da literatura, acredita-se que a via fermentativa seria um suporte, em que, a partir dos produtos obtidos, lactato e a oxidação da espécie para NAD⁺, poderia ser utilizado na conversão do gliceraldeído para 1,3-bisfosfoglicerato, etapa intermediária da via glicolítica, a qual necessita de NAD⁺, (**figura 8**).^{42,50}

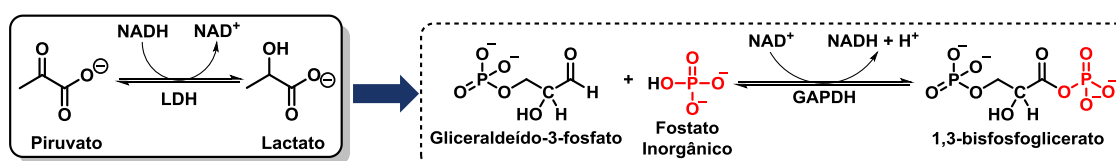


Figura 8. Demonstração da interligação entre a reação de síntese do piruvato à lactato e a possível participação na síntese do 1,3-bisfosfoglicerato, intermediário importante para a via glicolítica.

Em contrapartida, o efeito de Warburg é diretamente vinculado ao acúmulo de intermediários glicolíticos, que aumentam a taxa de crescimento e desenvolvimento de

tumores.⁵¹ Esses intermediários, podem ser obtidos a partir de intermediários do ciclo TCA, que tem como substrato a glucose. Sendo assim, considerando um alto fluxo glicolítico, poderia ocorrer escassez, e neste contexto, a glutamina apresenta características similares e pode fornecer os mesmos intermediários essenciais para diferentes rotas quando a glucose se torna escassa no meio.⁵²

1.4 GLUTAMINA

A glutamina é o aminoácido mais abundante por todo o corpo e, anteriormente, era considerada como um aminoácido não essencial.⁴⁹ Entretanto, em situações extremas, foi avaliado que ocorre alta demanda de glutamina e, deste modo, é considerada como um aminoácido essencial condicional⁵³ e assim como a glucose, consegue doar átomos de carbono, nitrogênio, promover a sinalização para a síntese de macromoléculas e o controle redox via glutamato.⁵⁴ O glutamato pode ser produzido via glutaminólise, que é responsável por alto fluxo de consumo da glutamina, associado ao câncer de mama (MA-MDB-231) e diferentes tumores, sendo considerada como atual marca registrada da doença, **figura 9**.^{55,56}

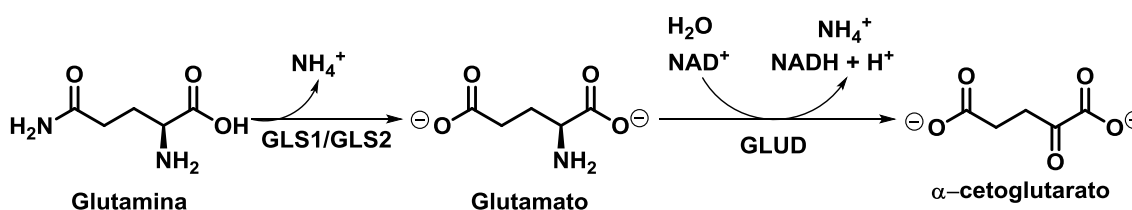


Figura 9. Etapas da síntese do α -cetoglutarato partindo da glutamina.

Na **figura 10**, temos o início do ciclo a partir do transporte da glutamina para dentro da célula pela ação de uma proteína carreadora de aminoácidos, ASCT2 (*i.e.*, SLC15), que, logo em seguida, reage diretamente com as enzimas de glutaminase 1 ou 2, sendo GLS1 ou GLS2, respectivamente, formando o glutamato. O glutamato via a enzima glutamato desidrogenase (GLUD) sintetiza o α -cetoglutarato (α -KG), intermediário do ciclo TCA, que é inserido no ciclo sem a necessidade de glucose. Ele também pode ser formado através de outras vias mediadas por transaminases como a glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT), glutamato-piruvato transaminase (GPT) e a fosforina transaminase (PSAT).⁵⁷

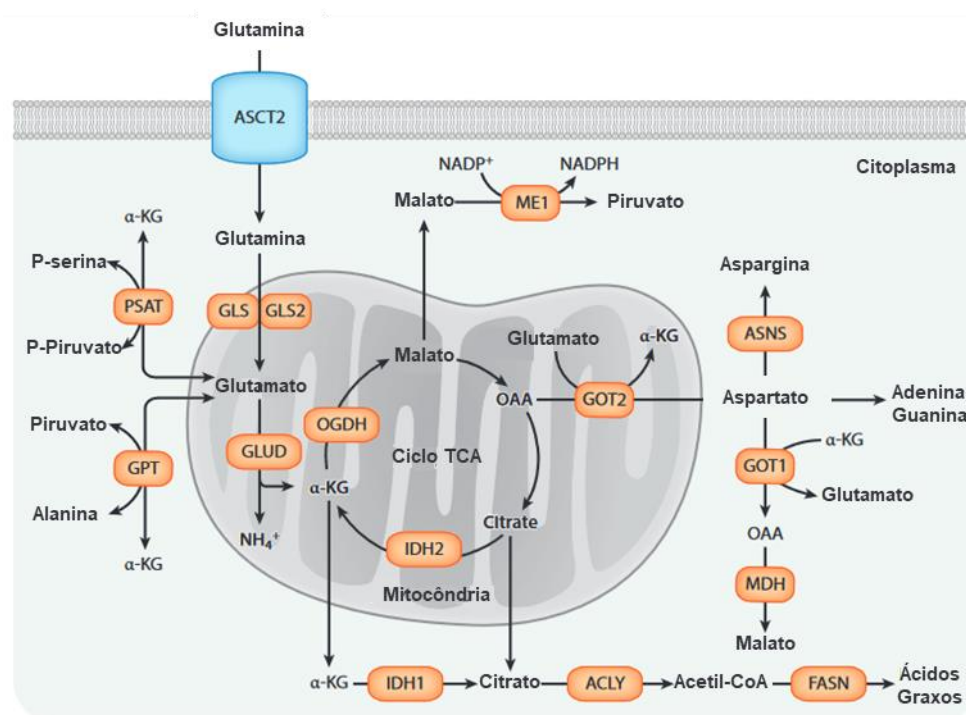


Figura 10. Intermediários do Ciclo TCA sintetizados a partir da glutaminólise. Adaptado de Yang *et al.*⁵⁷

1.4.1 Glutaminase

No corpo humano temos dois genes que podem codificar a glutaminase, o gene da glutaminase 1 e da glutaminase 2. Contido neles, há 4 isoformas, a enzima glutaminase (GAC) e a kidney-type glutaminase (KGA) que estão contidas na glutaminase 1 (GLS1) e a glutaminase B (GAB) e liver-type glutaminase (LGA) que estão contidas na glutaminase 2 (GLS2).⁵⁸ Sabe-se que a inibição atividade da GLS1 está relacionada com a supressão do desenvolvimento de tumores^{56,59-61}, por outro lado, a GLS2 possui diferentes ações, em casos distintos, agindo como supressor ou não para a doença.⁶²

A glutaminase se apresenta em 2 formas distintas, como dímero ou tetrâmero, entretanto, apenas a forma de tetrâmero apresenta atividade catalítica.⁶³ A diferença entre a GAC e a KGA é apenas no carbono terminal, conservando a mesma sequência até o resíduo 551. O sítio catalítico (**figura 11**) da enzima se encontra entre os resíduos de aminoácidos de Tirosina 249, Glutamina 285, Serina 286, Aspargina 335, Ácido Glutâmico 381, Aspargina 388, Tirosina 414, Tirosina 466 e Valina 484.^{63,64}

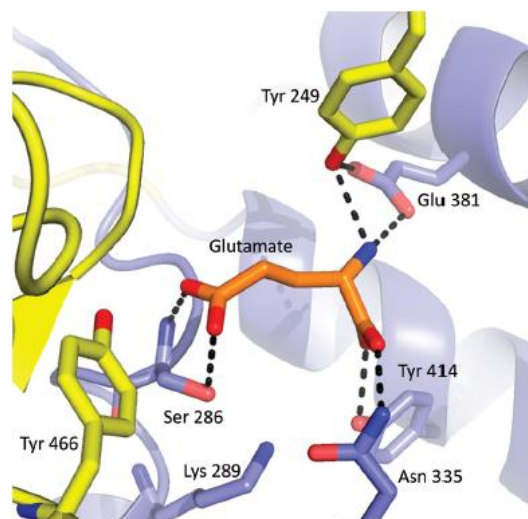


Figura 11. Demonstração da interação da molécula de glutamato com o sítio ativo da enzima glutaminase, apresentando as interações com os resíduos de aminoácidos. Adaptado de DeLabarre *et al.*⁶⁴. Os átomos, contidos na estrutura da glutamina, de carbono são apresentados na coloração laranja, os de oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul. Em amarelo, os resíduos de aminoácidos de um dímero e em azul do outro dímero que compõe essa interface catalítica.

O sítio alostérico, contendo os resíduos de fenilalanina 318, leucina 321, fenilalanina 322, leucina 323, asparagina 324, ácido glutâmico 325 e tirosina 394 de cada monômero se encontra a 18 Å do aminoácido residual de Serina 286. Deste modo, co-cristais de glutaminase com o substrato e com o BPTES (**27**), molécula de referência sobre o assunto, foram obtidos e apresentados na **figura 12**.^{58,65}

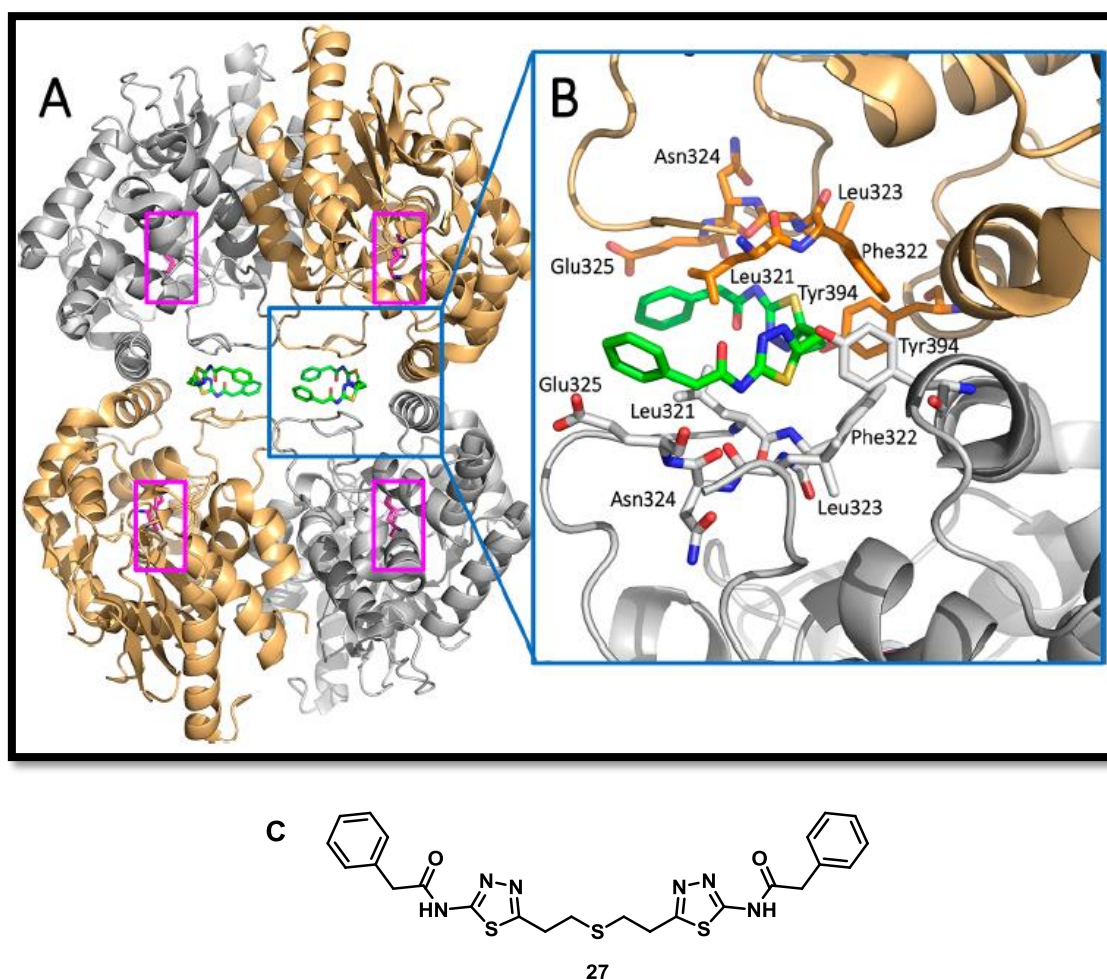


Figura 12. (A) GLS1 apresentada como tetrâmero com o sítio ativo preenchido pelo substrato (glutamina) em roxo e (B) o BPTES no bolso alostérico sendo ampliado no retângulo azul. Adaptado de Zimmerman *et al.*⁵⁸ e em (C) a estrutura química do BPTES, átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo.

Conclui-se que o bolso alostérico em que o BPTES interage com as duas interfaces dos monômeros é um canal estreito, onde a molécula assume uma conformação em formato de “U” e na região entre os resíduos 320-327 e a interface α -hélice com os resíduos 386-399. Entre os resíduos de fenilalanina 322, a amida e os nitrogênios do anel tiadiazol contidos no BPTES interagem através de ligações de hidrogênio. Já com a leucina 323 ocorre interação entre o oxigênio carbonílico com o hidrogênio contido nas amidas contidas no BPTES.⁶⁴ Essas interações fazem com que haja uma mudança conformacional do tetrâmero que resulta na inatividade catalítica.⁶³

1.3. PEQUENAS MOLÉCULAS DESENVOLVIDAS

Diversos estudos foram realizados para desenvolver e sintetizar pequenas moléculas capazes de inibir a glutaminase e propiciar um novo tratamento terapêutico ao câncer. Temos duas classes de compostos que foram desenvolvidas em ordem

cronológica. A primeira classe tinha como principal objetivo interagir com o sítio ativo da enzima e, por consequência, competir com o substrato. A segunda classe, por sua vez, teria como maior objetivo inibir a glutaminase através da interação em seu sítio alostérico, resultando nas características discutidas anteriormente.⁶⁶

Historicamente, em 1966, o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, **28** (DON)⁶⁷, extraído da bactéria *Streptomyces* (**Figura 13**), foi o primeiro composto que apresentou maior atividade de inibição para a GAC e se baseava na interação com o sítio ativo da enzima resultando na formação de um complexo inibidor-enzima estável.⁶⁸ Porém, ele possuía baixa seletividade interagindo em outras vias nas quais a glutamina também era substrato, resultando em efeitos *off-target*.⁶⁹

Por outro lado, em meados de 2002, Newcomb *et al.* dá início à uma nova classe de moléculas inibidoras diméricas e simétricas que apresentava alta seletividade e inibição ($IC_{50} = 3,0 \mu M$), sendo o bis-2-[5-(fenilacetamido)-1,3,4-tiadiazol-2-il]etil sulfito (BPTES) **27** (**Figura 13**), o composto mais representativo da série.⁶⁵ Contudo, este composto apresenta baixa solubilidade, limitando seu uso como um *lead*. (*i.e.*, molécula bioativa com capacidade de se tornar um fármaco, após ser aceito pelos ensaios biológicos), abrindo espaço para uma subcategoria na classe de inibidores, os derivados do BPTES.⁷⁰

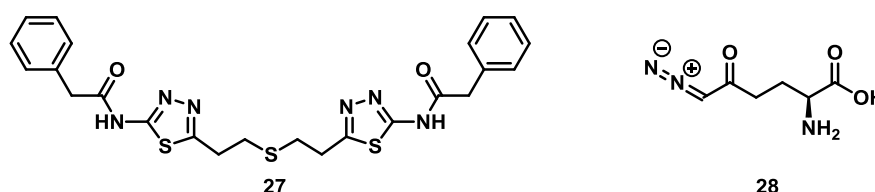


Figura 13. Estrutura química dos compostos 27 e 28.

Após o depósito da patente de Newcomb *et al.*, o BPTES foi analisado e sua estrutura química dividida em três regiões (**figura 14**), permitindo assim, propor alterações a fim de aumentar a capacidade de inibição e solubilidade do composto. Dessa forma, vários grupos de pesquisa se dedicaram a estudar e investigar a relação estrutura-atividade do BPTES, por conseguinte, surge uma nova subclasse composta por seus derivados.⁷¹

Na região A - Inserção de um espaçador de 5 átomos, sendo composto por 4 átomos de carbono e 1 átomo de enxofre;

Na região B – O núcleo base em ambos os lados composto por tiadiazol (corrigir sobre o núcleo);

Na região C - Ao lado do núcleo tiadiazol temos os grupos fenilacetamido.

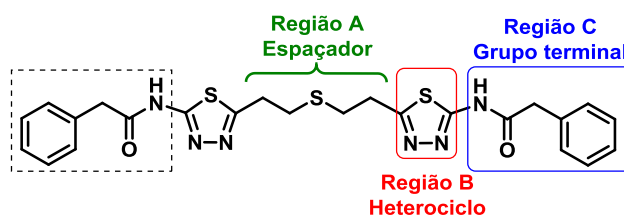


Figura 14. Molécula de BPTES dividida em três regiões.⁷¹

Em primeiro momento, o grupo de pesquisa de T. Tsukamoto deu início ao primeiro estudo a fim de entender a relação entre a estrutura e a atividade frente à enzima por meio de análogos truncados. Para a região A, a remoção do enxofre central, porém preservando os carbonos, aumentou significativamente o valor de inibição (**29**), entretanto a diminuição do espaçador para 3 carbonos diminuiu o valor de inibição próximo a 10x (**30**). Na região C, a remoção de um dos grupos acil (**31**) ou adição de grupos na posição *para* de ambas naturezas foram bem toleradas (**32**), entretanto a total remoção dos grupos contidos na região C afetou bruscamente o valor de inibição (**33**). Para a região B, a substituição do núcleo 1,2,4-tiadiazol por um 1,3-tiazol (**34**) resultou em uma perda significativa da atividade, demonstrando que o N₄ tem papel relevante na atividade inibitória (**figura 15**).^{72,73}

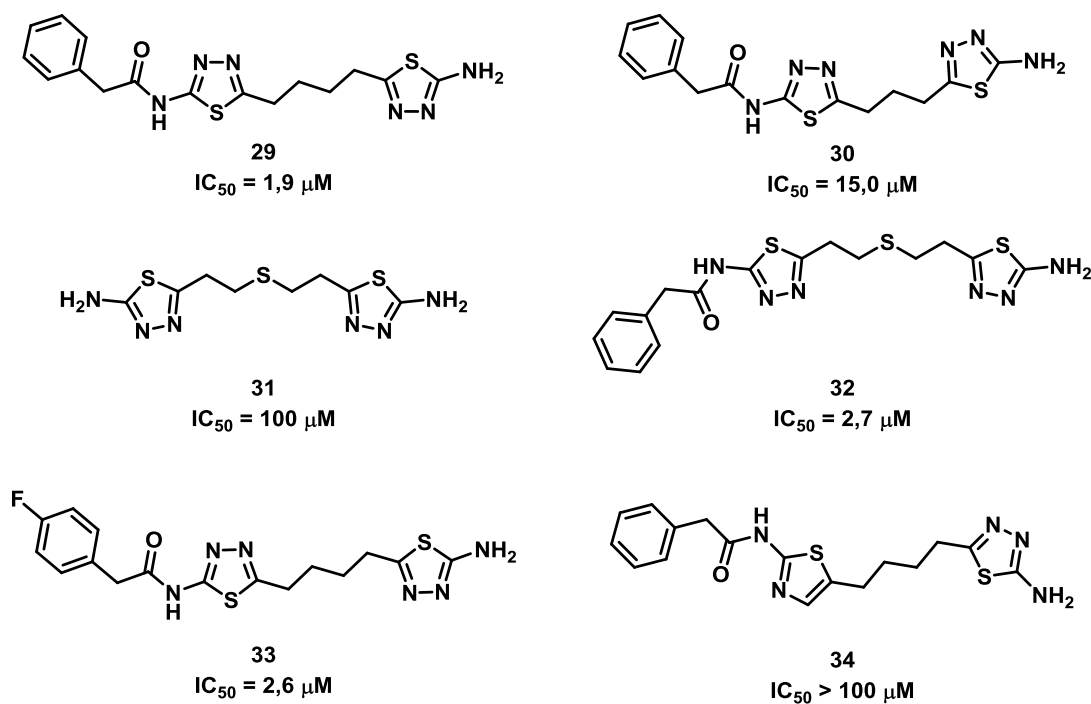


Figura 15. Estrutura molecular e atividade de inibição frente à glutaminase (GLS1) dos derivados sintetizados pelo grupo do pesquisador Tsukamoto.

Deste modo, a mudança do espaçador para somente 4 átomos de carbono foi preservada para novas explorações nas regiões B e C. A partir disso, Li *et al.* publicam diversos derivados, no qual aumentam o poder de inibição da glutaminase para a escala nano molar com alterações na região B, utilizando um núcleo piridazina, com a troca de um grupo fenila por 2-piridina e ainda adição em *meta* de trifluorometoxil. O composto mais representativo desta série é, atualmente conhecido por CB-839 (**36**) apresentado na **figura 16**.^{74,75} A não simetria da molécula, junto a adição do grupo trifluormetoxil foi associada a melhor solubilidade em água e, assim, foi o primeiro derivado do BPTES a seguir para os testes de fase clínica.^{63,76}

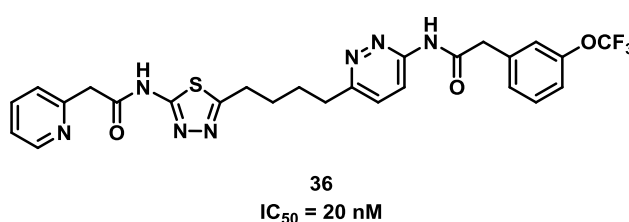


Figura 16. Estrutura química do CB-839.

Em 2016, Di Francesco *et al.* cobre grande parte das alterações possíveis para os derivados e apresenta a capacidade de substituição do núcleo 1,2,3-triazol, na região B, com índice de inibição moderado (**37**), o que posteriormente junto a Soth *et al.* foi utilizada para uma nova otimização resultando em um inibidor com atividade inibitória da glutaminase em concentração baixo nano molar, denominado por IPN60090 (**38**), **figura 17**.^{77,78} Este derivado também se encontra em fase clínica atualmente.⁷⁹

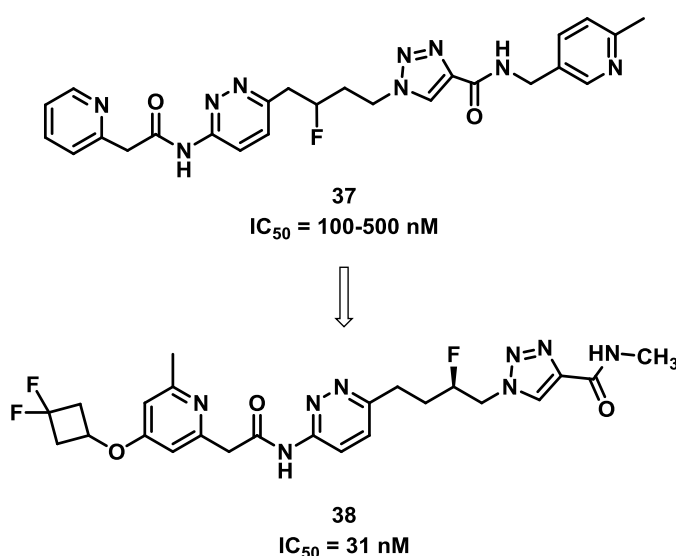


Figura 17. Otimização estrutural do derivado contendo 1,2,3-triazol como núcleo e estrutura molecular do IPN60090.

Outros derivados foram propostos através da análise conformacional do BPTES quando ligado à glutaminase, ambos apresentaram valor de inibição em nano molar. O primeiro foi apresentado por McDermott *et al.*, pela análise da imagem de cristalografia de Raios X (PDB: 3UO9)⁶⁴, na qual ele sugere a alteração na região A por um heteroátomo junto a um heterociclo nitrogenado com a quantidade de átomos apropriado, no intuito de aumentar a inibição e lipofilicidade do composto, gerando o UPGL00004 (**39**), **figura 18**.⁸⁰ Esse composto, posteriormente, apresentou em ensaios biológicos uma potência comparável ao CB-839, superando o BPTES.⁸¹

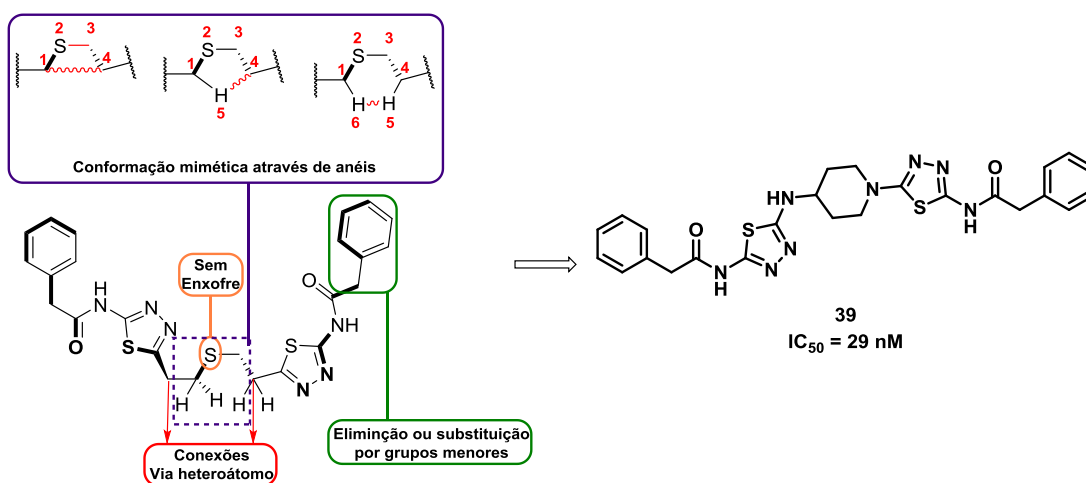


Figura 18. Otimização proposta por McDermott e o derivado com maior destaque no trabalho publicado. Ilustração adaptada de McDermott *et al.*⁸⁰

Da mesma forma, até macrociclizações tomando como base a imagem cristalográfica (PDB: 5HL1) do CB-839, foram experimentadas para aumentar a restrição conformacional da molécula no sítio alostérico da glutaminase, **40**, como demonstrado na **figura 19**.⁸²

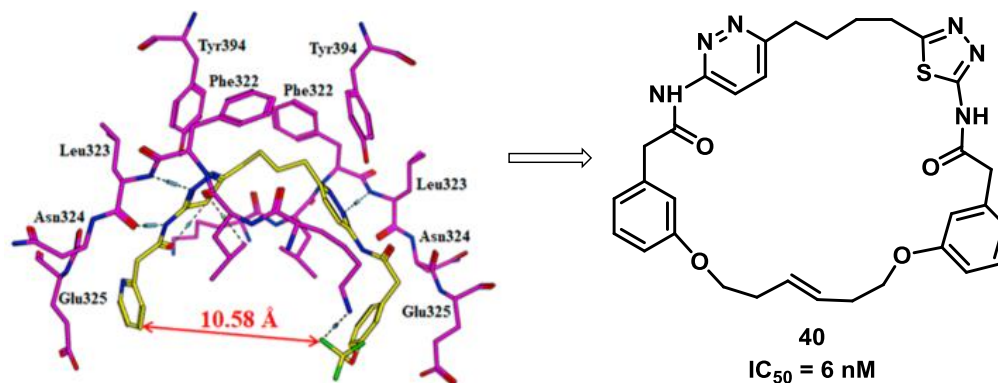


Figura 19. Imagem cristalográfica do CB-839 frente à glutaminase e estrutura molecular do macrociclo sintetizado. Adaptado de Xu *et al.*⁸²

Frente a isso, o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Julio C. Pastre iniciou uma pesquisa para síntese de novos inibidores de glutaminase a partir de 3-tio-1,2,4-triazóis⁷¹ obtendo compostos com valores de inibição e seletividade significativos. Alguns dos compostos sintetizados com seus respectivos valores de inibição são apresentados abaixo na **figura 20**.

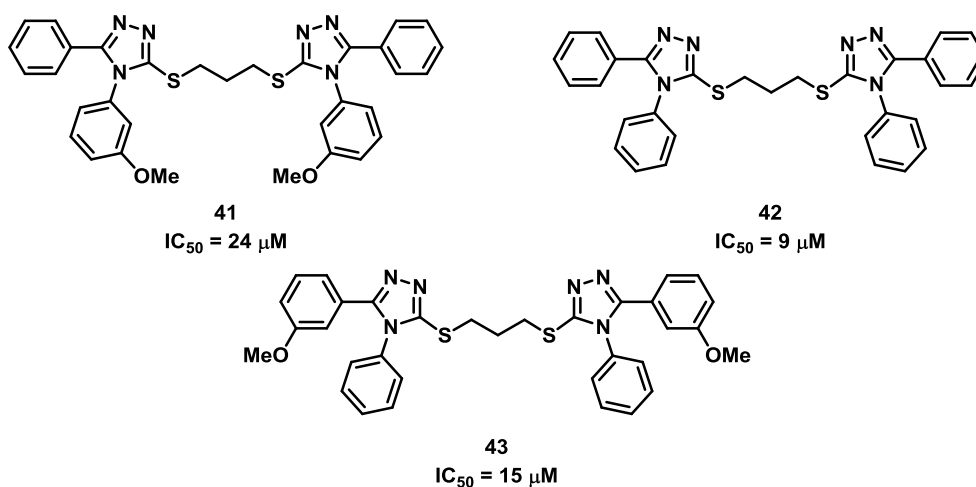


Figura 20. Compostos sintetizados e seus efeitos frente à enzima glutaminase.

Deste modo, levando em consideração os valores de inibição da ordem de baixo micro molar, pode-se concluir que o núcleo de triazol seria um substituto válido em relação ao tiadiazol, presente na molécula de BPTES. Os resultados, elaborados em colaboração com o Prof. Dr. Daniel F. Kawano, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-UNICAMP), indicou que o núcleo 3-tio-1,2,4-triazol poderia ser substituto do 1,2,4-tiadiazol que está contido na molécula do BPTES, entretanto, seria necessário investigar outros possíveis substituintes no N₄ na intenção de garantir uma melhor acomodação da molécula no bolso alostérico da enzima.⁷¹

Sendo assim, o presente projeto propõe o planejamento e síntese de novos compostos em busca de melhor solubilidade, através da não simetria da molécula, e potencial de inibição para os novos derivados a partir de núcleos de 1,2,4-triazol e 1,2,4-tiadiazol, como é demonstrado na **figura 21**. As principais alterações serão realizadas nesses núcleos, apresentando dímeros simétricos ou não simétricos e ainda a adição do núcleo 1,2,3-triazol.

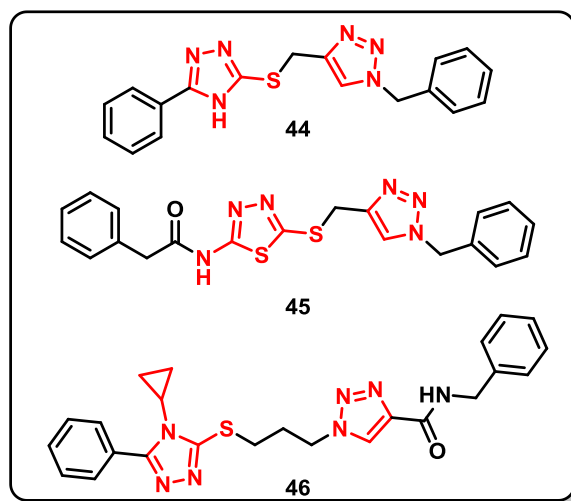


Figura 21. Compostos inicialmente planejados para o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Sintetizar novos compostos derivados do análogo de referência BPTES contendo os núcleos 1,2,4-triazóis e 1,2,3-triazóis substituídos visando o desenvolvimento de novos inibidores de glutaminase (GAC);

Planejar e caracterizar os novos derivados a partir de núcleos 1,2,4-triazóis, tiadiazóis e 1,2,3-triazóis.

2.2 ESPECÍFICOS

Sintetizar análogos derivados do BPTES não simétricos contendo os núcleos 1,2,3- e 1,2,4-triazóis;

Sintetizar análogos derivados do BPTES não simétricos contendo os núcleos 1,2,4-tiadiazol junto a núcleos 1,2,4- ou 1,2,3-triazóis;

Sintetizar análogos derivados do BPTES simétricos contendo o núcleo 5-amino-3-mercapto-1,2,4-tiadiazol;

Avaliar a capacidade e seletividade de inibição dos derivados desenvolvidos frente à enzima glutaminase em colaboração com a Dra. Sandra Dias do LNBio-CNPq;

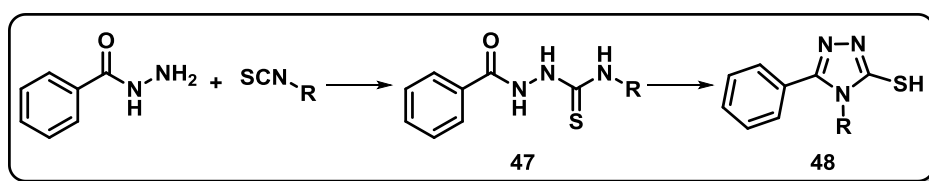
Avaliar a capacidade e seletividade de inibição dos derivados desenvolvidos frente à duas linhas celulares HCT-116 e MA-MDB-231 em colaboração com a Dra. Daniela B. B. Trivela do LNBio-CNPq;

Explorar os modos de interação entre a glutaminase e os análogos sintetizados em colaboração com o Prof. Dr. Daniel F. Kawano da FCF – UNICAMP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

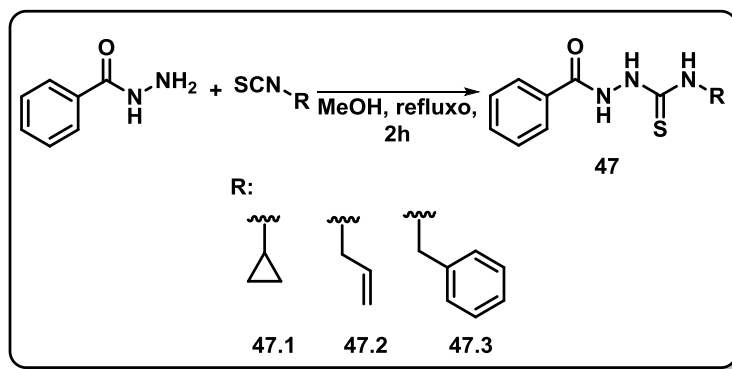
3.1 SÍNTESE DOS NÚCLEOS 1,2,4-TRIAZÓIS

Para a síntese dos núcleos utilizados nas moléculas derivadas do BPTES no presente trabalho, foi realizada uma reação de condensação entre a benzoidrazida e diferentes isotiocianatos orgânicos, que em sequência são submetidos a uma reação de ciclização em meio básico para a formação do anel 3-tio-1,2,4-triazol em concordância com a metodologia já consolidada pelo grupo de pesquisa,⁷¹ apresentada no **esquema 5**.



Esquema 5. Esquema geral para a síntese dos núcleos 1,2,4-triazóis.

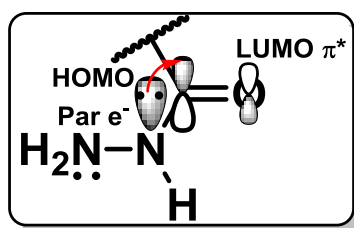
Nessa primeira etapa, utilizou-se o isotiocianato orgânico com substituinte ciclo propila pelo fato de ser um grupo de menor volume quando comparado à anéis benzênicos e, assim, apresentaria baixa repulsão estérea quando inserido nos derivados visto que o canal alostérico é estreito. Os com grupos benzila e alila, foram utilizados tendo em mente as reações de remoção dos mesmos para a síntese de um análogo de interesse. Para a formação da tiossemicarbazida, as hidrazidas e os isotiocianatos foram solubilizados em metanol em quantidades equimolares e mantidos sob refluxo por 2 horas. Em alguns casos, ao decorrer da reação há a formação de precipitado branco, indicando o término da reação, **esquema 6**.



Esquema 6. Condições experimentais para a síntese das tiossemicarbazidas intermediárias.

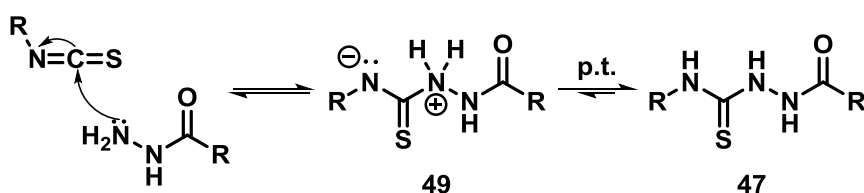
Nota-se que não há necessidade de base para que a reação ocorra, com pH próximo ao neutro e a aril hidrazida se condensa ao isotiocianato através do grupo NH₂

presente na estrutura. Como o grupo NH é vizinho a um grupo carbonílico, similar a estrutura de uma amida, a hibridização deste nitrogênio é sp^2 , havendo assim a geometria necessária para que o par de elétrons se mantenha em um orbital p puro, paralelo ao orbital LUMO π^* do grupo carbonil, interação orbitalar representada no **esquema 7**. Entretanto, o nitrogênio do grupo NH_2 apresenta uma hibridização sp^3 , assim seu par de elétrons se encontra mais disponível para o ataque nucleofílico.



Esquema 7. Demonstração da estrutura de ressonância entre LUMO carbonil e HOMO par de elétrons não ligante do nitrogênio.

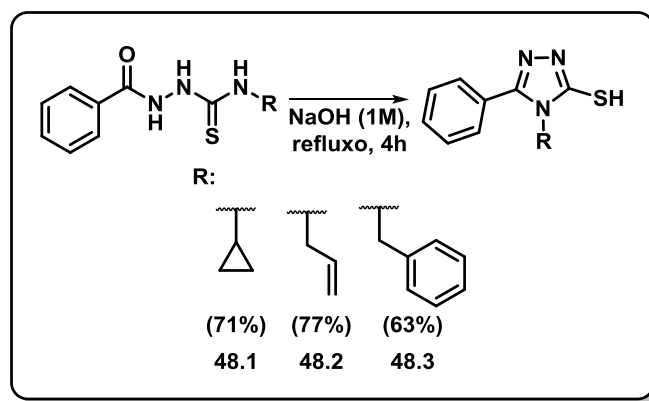
Deste modo, ocorre o ataque do grupo NH_2 , nitrogênio mais nucleofílico da fenil hidrazida,⁸³ formando a espécie carregada **49**, que abstrai um próton (p.t.) do meio e resulta na aril tiossemicarbazida de interesse **47**, como apresentado pelo **esquema 8**.



Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação de condensação entre a hidrazida e o tiocianato.

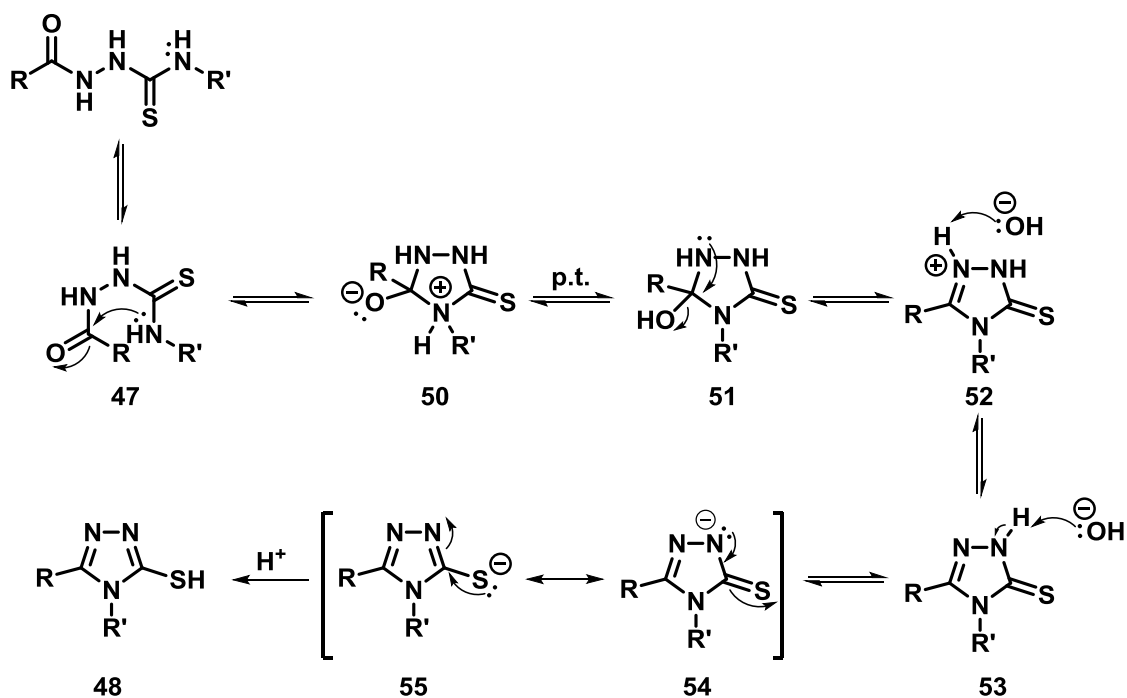
O meio reacional foi concentrado sob pressão reduzida e o sólido obtido foi submetido a próxima etapa sem demais procedimentos de purificação uma vez que apresentava pureza elevada com base na análise do bruto reacional por RMN de 1H .

Para a segunda etapa, a tiossemicarbazida respectiva em meio básico é ciclizada resultando nos núcleos intermediários 4-ciclopropil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (**48.1**), 4-alil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (**48.2**) e 4-benzil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (**48.3**), respectivamente, em rendimentos de 63-77% para duas etapas (**esquema 9**).



Esquema 9. Síntese dos núcleos 1,2,4-triazóis.

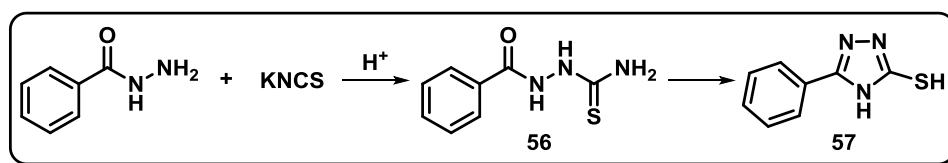
O meio reacional, inicialmente, apresenta-se verde claro com a tiossemicarbazida totalmente solúvel. Ao passo que a reação se procede, esta cor diminui de intensidade até o sistema tornar-se incolor, indicando total consumo do material de partida. O tratamento ácido do meio reacional leva à obtenção do produto puro, sem necessidade de purificação por cromatografia em coluna, e o rendimento é descrito para as duas etapas. O mecanismo proposto se inicia pelo ataque intramolecular do nitrogênio vizinho à tiona no carbono carbonílico gerando o alcóxido correspondente (50). Assim, haveria uma transferência de próton intermolecular, com o nitrogênio 1 realizando uma eliminação de íon hidróxido para o meio (51) o deixando carregado positivamente, facilitando a abstração do próton pela base (52). Assim, segundo a literatura, o 53 tem seu próton abstraído com facilidade em meio básico, gerando a tiona correspondente (54), que se encontra em ressonância com o tiolato (55). Deste modo, com a acidificação do meio, o tiolato é neutralizado para tiol, sendo obtido o produto desejado (48), apresentado no **esquema 10**.



Esquema 10. Mecanismo proposto para a síntese dos 5-aryl-1,2,4-triazol-3-iona. (Remover a base da conversão de 47 para 50)

O interessante em relação aos núcleos 1,2,4-triazol sintetizados é que a partir de diferentes hidrazidas orgânicas, é possível realizar a síntese de compostos com diferentes substituintes ligados diretamente ao anel com rendimentos bons.

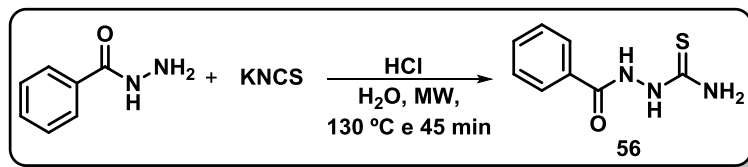
Em relação à síntese do 5-fenil-3-tiol-4*H*-1,2,4-triazol (**57**), a fenil hidrazida orgânica utilizada foi a mesma que na síntese dos núcleos apresentados anteriormente. Entretanto, para que o nitrogênio 4 (N₄) não tivesse nenhum substituinte arila ou alquila, diminuindo ainda mais o impedimento estérico que poderia realizar frente ao canal do BPTES, fez-se necessária a utilização de uma fonte inorgânica de isotiocianato. Assim, foi empregado a utilização do sal tiocianato de potássio em meio ácido como apresentado no **esquema 11**.



Esquema 11. Rota proposta para a síntese do 5-fenil-3-tio-4*H*-1,2,4-triazol (**57**).

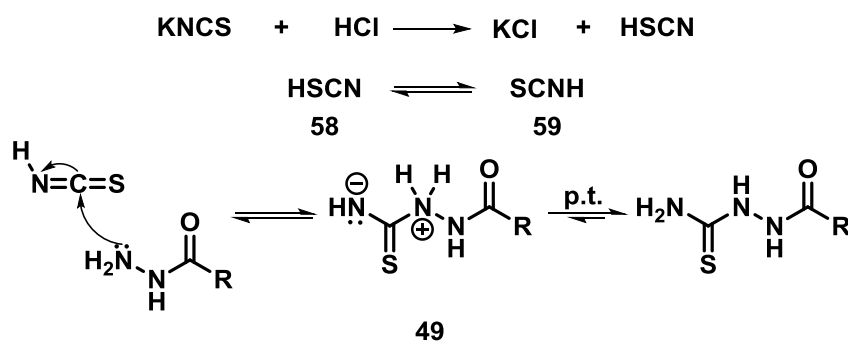
Deste modo, a síntese da benzotiossemicarbazida (**56**) foi realizada empregando uma condição descrita na literatura, sendo adaptada para o uso de um reator de microondas (MO), **esquema 12**.⁸⁴ Como a tiossemicarbazida formada possui baixa

solubilidade em água, o produto pôde ser obtido através de filtração simples após submeter o bruto reacional a baixas temperaturas.



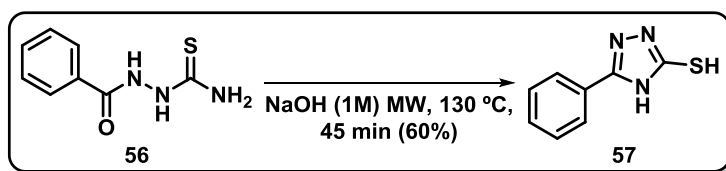
Esquema 12. Síntese da tiossemicarbazida intermediária (56).

Diferente das aril tiossemicarbazidas apresentadas anteriormente, essa necessitaria de meio ácido pois antes de ocorrer a reação de condensação para a formação da tiossemicarbazida, via ataque do nitrogênio mais nucleofílico contido na fenil hidrazida, haveria uma reação de dupla troca entre o KNCS e o ácido clorídrico. Há a formação de ácido tiociânico (58), que está em equilíbrio com seu tautômero, ácido isotiociânico (59), o que formaria o mesmo intermediário (49) apresentado anteriormente que após abstração de próton (p.t.) do meio, formaria a tiossemicarbazida de interesse **esquema 13**.



Esquema 13. Mecanismo proposto para a síntese da tiossemicarbazida 56.

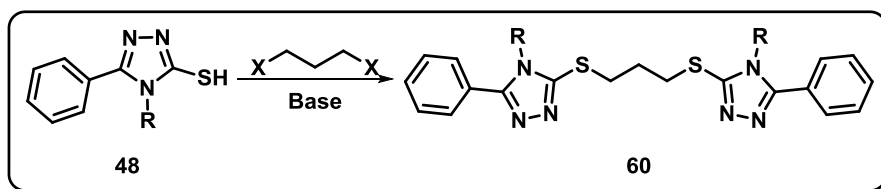
Em sequência, a tiossemicarbazida obtida é solubilizada em meio aquoso básico e submetida a 130 °C por 45 minutos em um reator de microondas (**Esquema 14**).⁸⁴ Através da acidificação do meio, pode-se obter o composto 57 sem nenhuma etapa adicional de purificação pelo processo de filtração a vácuo com funil de Büchner o rendimento foi calculado para as duas etapas. O mesmo mecanismo de reação para o 57 segue o mesmo modelo que apresentado anteriormente pelo **esquema 10**.



Esquema 14. Síntese do núcleo 5-fenil-3-tio-4H-1,2,4-triazol (57).

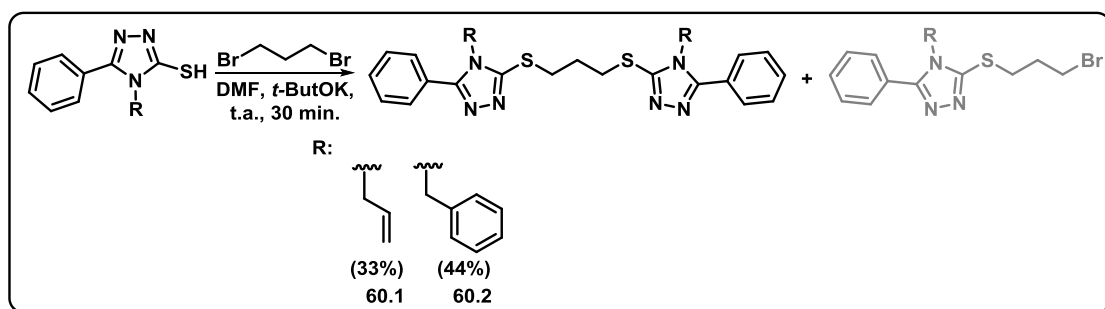
3.2 SÍNTESE DOS DÍMEROS 1,2,4-TRIAZOL

A síntese dos dímeros simétricos, seria realizada a partir da reação entre 2 núcleos 1,2,4-triazóis e um 1,3-di-haleto de alquila como agente alquilante na presença de base (**esquema 15**), empregando as condições experimentais utilizadas previamente pelo grupo de pesquisa.⁷¹



Esquema 15. Rota geral para a síntese dos dímeros.

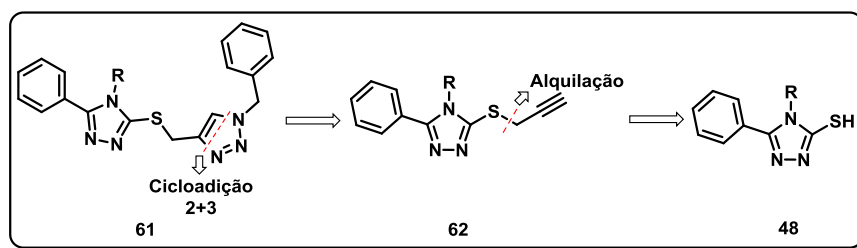
Estas foram realizadas em DMF, com o núcleo 5-alil- (48.2) e 5-benzil-1,2,4-triazol-3-tiol (48.3) e a base utilizada em quantidades equimolares e meio equivalente do 1,3-di-haleto de alquila, diminuindo a formação do produto proveniente da reação de eliminação. Com a progressão da reação, há a formação de precipitado branco (produto) no meio reacional e os rendimentos inferiores a 50%, se dão pela formação do produto monoalquilado, que não foi quantificado (**Esquema 16**).



Esquema 16. Síntese dos dímeros 1,3-bis((1,2,4-triazol)tio)propano.

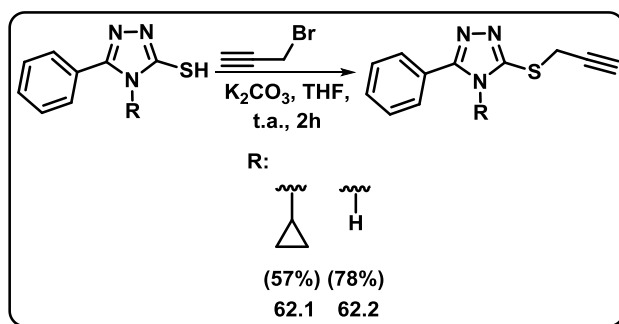
Assim como os compostos anteriores, estes compostos, apresentariam uma porção da molécula possuindo o núcleo 5-ciclopropil-3-tiol-1,2,4-triazol e para a outra porção o 1,2,3-triazol, não simétricos, semelhante aos propostos por Di Francesco *et al.*, entretanto, com um espaçador de 2 átomos, que pode ser analisada através de uma

retrossíntese para realizar a síntese do produto desejado, como é apresentado no **esquema 17**. Assim, **61** poderia ter o núcleo 1,2,3-triazol incorporado via *click chemistry* através da reação de cicloadição [3+2] dipolar catalisada por cobre entre um alcino e uma azida (CuAAC). O alcino intermediário **62** poderia ser preparado através de uma alquilação do núcleo 3-tio-1,2,4-triazol correspondente (**48**) com um haleto de propargila.



Esquema 17. Rota proposta para a síntese do dímeros assimétricos contendo 1,2,3-triazol.

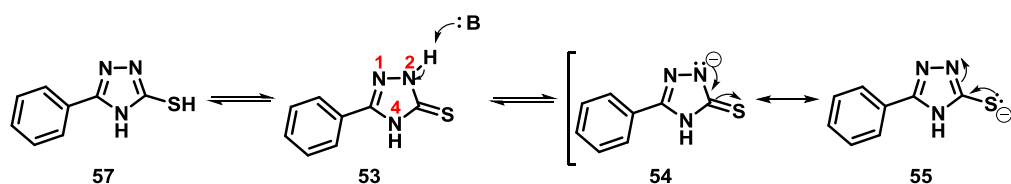
Deste modo, em um primeiro momento, foi realizada a reação de alquilação empregando brometo de propargila para 2 núcleos diferentes, o 4-ciclopropil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (**62.1**) e o 5-fenil-4*H*-1,2,4-triazol-3-tiol (**62.2**) como é apresentado no **esquema 18**.



Esquema 18. Reação de alquilação com brometo de propargila.

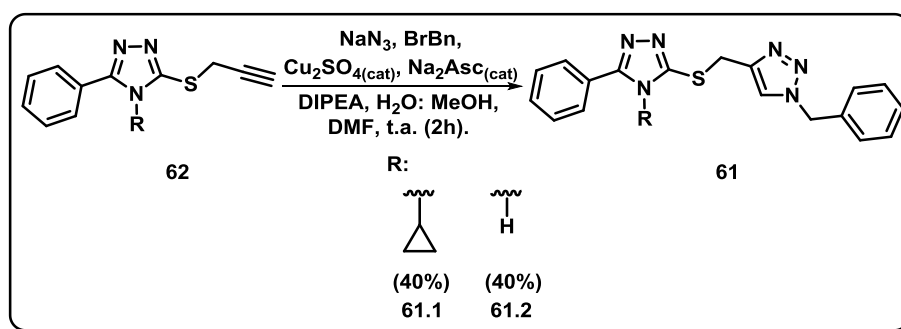
Para o produto proveniente da reação do núcleo 3-fenil-5-(prop-2-ino-1-iltio)-4*H*-1,2,4-triazol (**62.2**) não foi identificado produto de dialquilação (*i.e.* ocorrer a reação de alquilação no átomo de enxofre e no nitrogênio da mesma molécula), visto que o brometo de propargila é bem reativo. Este resultado corrobora com os dados publicados em 2021 pelo pesquisador Fizer e colaboradores,⁸⁵ nos quais descrevem o estudo da influência do pH do meio reacional no controle regioseletivo para a alquilação em diferentes 1,2,4-triazol-3-iona, sendo observável alquilações no nitrogênio 1, 2 e no tiol vicinal ao heterociclo. Assim, quando o meio é básico, há um equilíbrio entre os tautômeros, as espécies tiol (**57**) e tiona (**53**) e, desta forma, a base remove o hidrogênio

do nitrogênio 2 na espécie **53**, favorecendo o **54** que por ressonância ocorre a formação do íon tiolato correspondente (**55**) que age como a espécie nucleofílica no meio reacional, apresentado na **esquema 19**.



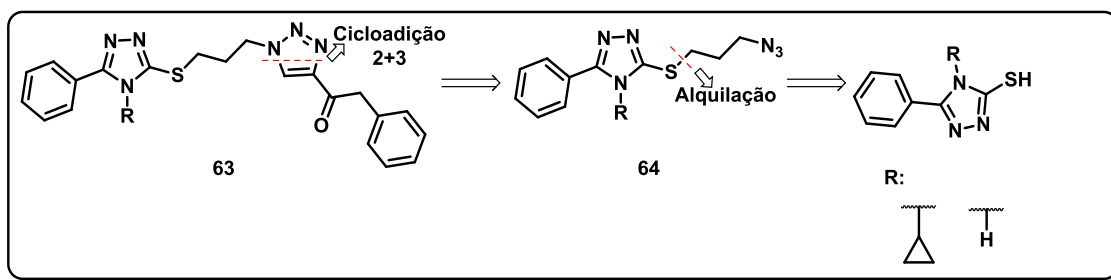
Esquema 19. Mecanismo proposto por Fizer *et al.* para a alquilação seletiva no enxofre. B representa a base presente no meio.

Com o produto propargilado devidamente caracterizado, a continuação da rota proposta, seria a etapa de incorporação do 1-benzil-1,2,3-triazol à molécula via condição de reação *click* (CuAAC). A mesma foi realizada na condição experimental apresentada no **esquema 19**.



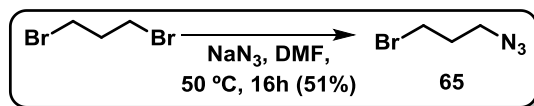
Esquema 20. Síntese do dímero **61** via *click chemistry*.

Os compostos contendo os núcleos 3-tio-1,2,4-triazol em uma porção da molécula e o 1-benzil-1,2,3-triazol na outra (**63**) foram inspirados a partir dos compostos de Di Francesco *et al.*⁷⁷ alterando o núcleo 1,2,4-tiadiazol por 1,2,4-triazol. Foi efetuada uma análise retrossintética que é apresentada no **esquema 21**. Sendo assim, uma reação de cicloadição [3+2] dipolar entre o alcino e a azida orgânica correspondente seria realizada. Esta azida (**64**) seria sintetizada através da reação de alquilação do grupo tiol presente no núcleo 3-tiol-1,2,4-triazol utilizado com um haleto de alquila contendo um grupo azida na sua estrutura. A preparação do núcleo já foi apresentada na seção 3.1.⁷¹



Esquema 21. Análise retrossintética para síntese do dímero não simétrico com azida orgânica como intermediário.

Antes de dar início a síntese dos dímeros relatados anteriormente, foi realizado a síntese do 3-azido-1-bromopropano (**65**) nas condições apresentadas no **esquema 22** e empregando metodologia descrita na literatura.⁸⁶

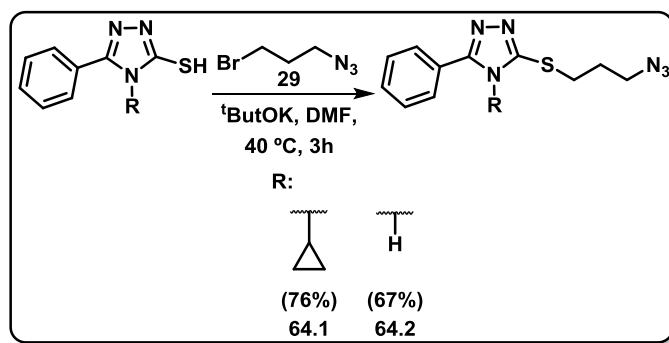


Esquema 22. Síntese do 3-azido-1-bromopropano (**65**).

O produto se apresentou muito volátil não sendo possível deixá-lo sob pressão reduzida em bomba de alto vácuo para remoção total do resíduo de solvente proveniente do processo de purificação. Deste modo, o rendimento aproximado foi calculado através do espectro de RMN, com adição de trimetóxi-benzeno como padrão interno, utilizando as proporções fornecidas pelas integrais. Vale salientar que azidas orgânicas são altamente perigosas e devem ser manuseadas com cautela e utilizando todos os EPI's necessários.

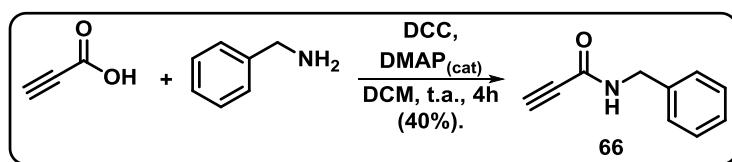
Outro fato relevante é que a reação de formação da azida não poderia ser acompanhada por CCD, pois mesmo utilizando diferentes reveladores químicos, não foi possível visualizar a formação do produto.

Com o 3-azido-1-bromopropano (**65**) devidamente purificado e caracterizado, as reações de alquilação dos núcleos 5-fenil-3-tio-4-ciclopropil-1,2,4-triazol e 5-fenil-3-tio-4-*H*-1,2,4-triazol foram efetuadas para formar as azidas orgânicas respectivas (**64.1**) e (**64.2**), **esquema 23**, e dar continuidade à síntese dos produtos desejados. As azidas orgânicas obtidas se apresentaram como sólido e, deste modo, facilitou o armazenamento do intermediário.



Esquema 23. Síntese da azida intermediária contendo os núcleos 4-ciclopropil-5-fenil-1,2,4-triazol (64.1) e 4-H-5-fenil-1,2,4-triazol (64.2).

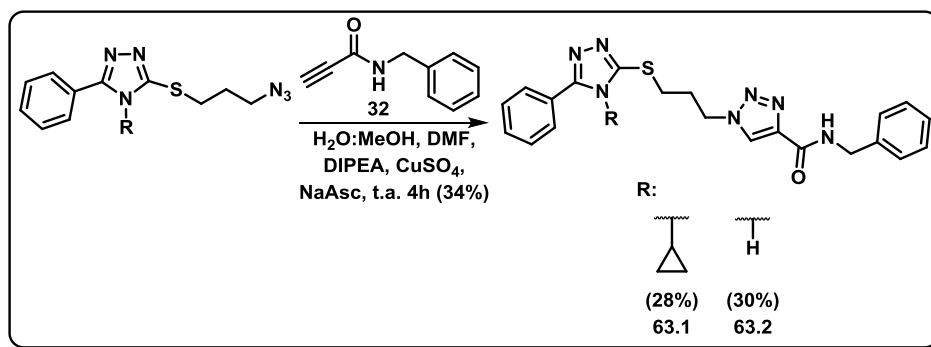
Com as sínteses das azidas orgânicas intermediárias realizadas, restaria como último passo para obter os produtos de interesse, a reação de cicloadição [3+2] dipolar entre uma azida orgânica e um alcino catalisada por cobre (CuAAC). Neste ponto, o alcino de interesse necessitaria ser sintetizado, visto que a rota é convergente. Como era de interesse em manter o grupo carbonílico próximo ao heterociclo, o alcino foi obtido pela reação de condensação entre o ácido propargílico e a benzilamina. A síntese do alcino (**66**) foi realizada, utilizando as condições de amidação *via* Steglich.⁸⁷ As condições experimentais e os reagentes são apresentadas no **esquema 24**.



Esquema 24. Síntese do alcino intermediário **66** a partir do ácido propargílico e benzilamina.

Foram realizados diferentes métodos de adição para a síntese do **66**, dos quais, o produto foi obtido com baixo rendimento, através da adição da base no meio reacional, em seguida resfriamento até 0 °C e adição gota a gota do ácido. Mesmo assim, era visível a formação de subprodutos que não foram isoláveis através do acompanhamento da reação por CCD.

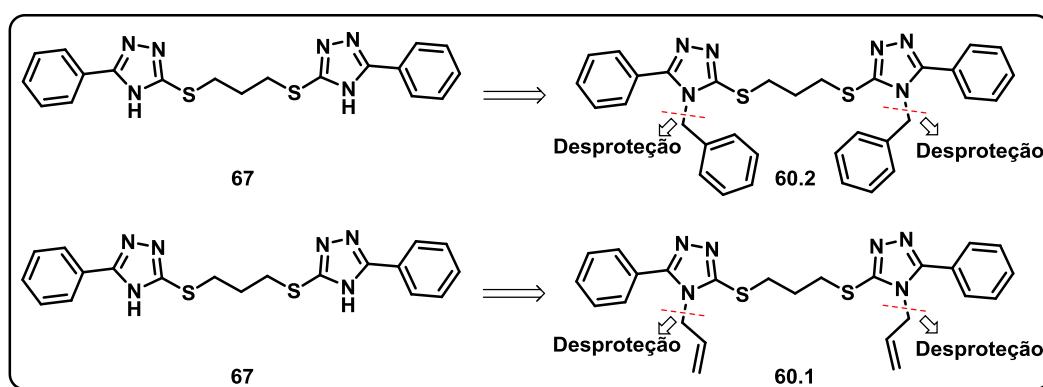
Com as azidas intermediárias (**64.1** e **64.2**) e o alcino intermediário (**66**), seria possível realizar a cicloadição azida-alcino catalisada por cobre, resultando no produto de interesse, representados no **esquema 25**.



Esquema 25. Síntese dos dímeros via azida intermediária utilizada na click chemistry.

Os rendimentos apresentados serem baixos pode estar relacionado ao fato de que as azidas orgânicas se apresentaram pouco solúveis na mistura reacional água:metanol, formando uma suspensão do material. No decorrer da reação há a formação de um sólido branco fino

Finalmente, a síntese do composto **67**, contendo o núcleo 1,2,4-triazol com o N₄ não substituído foi racionalizada através da remoção dos grupos alquil presente nos dois dímeros que foram apresentados anteriormente, primeiro através da remoção dos grupos benzila contidos no **60.2**⁸⁸ e outro pela remoção dos grupos alila contidos no **60.1**⁸⁹, ambos apresentados no **esquema 26**. O produto formado então, teria os nitrogênios (N₄) livres, o que poderia facilitar a acomodação da molécula no bolso alostérico da glutaminase, visto que é um bolso mais estreito, além de permitir que novas interações moleculares fossem realizadas pela presença de um doador de ligação de hidrogênio na molécula.

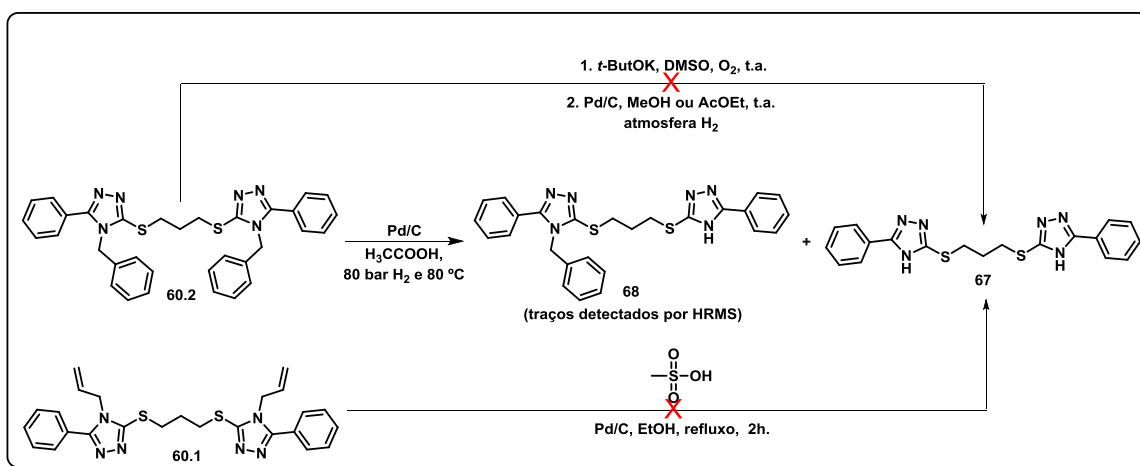


Esquema 26. Análise retrosintética proposta para a síntese do composto 67.

Deste modo, foram realizadas tentativas de desproteção utilizando-se diferentes metodologias como metanol ou acetato de etila em atmosfera de hidrogênio (1, 5 e 10 bar), na presença de paládio sob carvão (Pd/C) com concentrações de 5% e 10% (w/t),

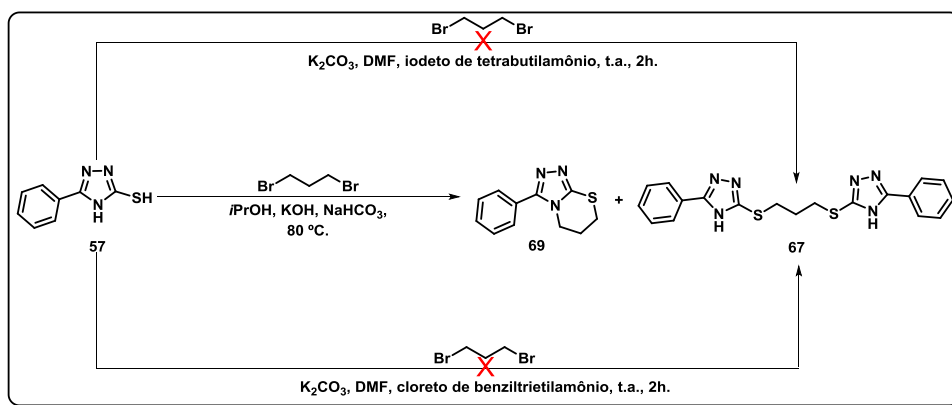
ácido metassulfônico e paládio sob carvão (Pd/C) em etanol sob refluxo. Todas as reações foram acompanhadas por CCD, entretanto não se observou nem mesmo a formação de traços do produto desejado e o material de partida foi essencialmente recuperado.

Em paralelo foi realizada em parceria com a pesquisadora Dra. Marjorie Bruder do Laboratório Nacional de Biociências – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNBio – CNPEM), a tentativa da reação de desproteção em regime de fluxo contínuo utilizando o hidrogenador em fluxo contínuo *H-cube pro* da ThalesNano, nas condições experimentais 80 °C em ácido acético e 80 bar de hidrogênio. Neste ensaio, baixíssima conversão no subproduto monodebenzilado (**68**) foi observada, **esquema 27**, sendo detectado por análise de massas de alta resolução (teórico 485.1575, encontrado 485.1582).



Esquema 27. Condições experimentais testadas a partir de desproteção para a síntese do **67**.

Como não houve a formação do produto de interesse por meio da desproteção, outra rota foi racionalizada pelo uso de uma base e um di-haleto de alquila como agente alquilante para realizar a síntese do dímero utilizando o núcleo 5-fenil-3-tio-4*H*-1,2,4-triazol nas condições experimentais apresentadas por Lazrak e colaboradores.⁹⁰ A reação também foi avaliada nas condições de Finkelstein (**Esquema 28**). Porém, após a alquilação do átomo de enxofre poderia ocorrer ainda uma alquilação intramolecular do átomo de nitrogênio, para formar um anel de 6 membros em detrimento da formação do dímero desejado. De fato, esse caminho reacional foi descrito por Yang e colaboradores.⁹¹



Esquema 28. Condições experimentais testadas a partir de base e agente alquilante para a síntese **67**.

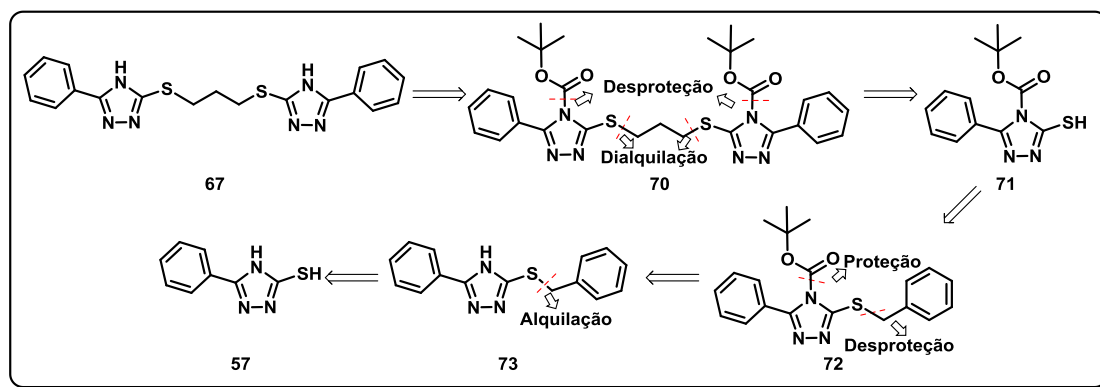
Assim, a reação foi avaliada nas condições mencionadas anteriormente e apenas a síntese do bicyclo foi observada. A caracterização do bicyclo (**69**) por RMN de ^1H foi realizada e condiz com os valores de deslocamento químico (δ) relatados na literatura,⁹¹ apresentados na **tabela 1**. Outras condições como, menor temperatura e uso de outras bases foram utilizadas na tentativa de favorecer a formação do dímero, porém o bicyclo se formou majoritariamente em todos os testes realizados.

Tabela 1. Comparação dos dados de RMN de ^1H do composto **69** obtido com o da literatura.

Dados observados (CDCl ₃ , 250 MHz)	Dados da literatura ⁹¹ (CDCl ₃ , 400 MHz)
8,02-8,05 (m, 2H) CH	8,04 (d, $J^3 = 7,6$ Hz, 2H) CH
7,57 (t, $J^3 = 7,0$ Hz, 1H) CH₂	7,58 (t, $J^3 = 7,2$ Hz, 2H) CH₂
7,44 (q, $J^3 = 7,5$ Hz, 2H) CH₂	7,45 (t, $J^3 = 7,6$ Hz, 2H) CH₂
4,47 (t, $J^3 = 6,0$ Hz, 2H) CH₂	4,48 (t, $J^3 = 6,0$ Hz, 2H) CH₂
3,55 (t, $J^3 = 6,5$ Hz, 2H) CH₂	3,56 (t, $J^3 = 6,4$ Hz, 2H) CH₂
2,32 (q, $J^3 = 6,2$ Hz, 2H) CH₂	2,36-2,30 (m, 2H) CH₂

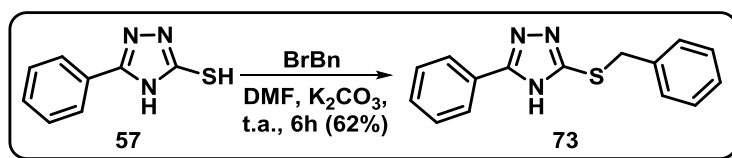
Visto que o nitrogênio 4 (N₄), contido no anel, se apresentou nucleofílico, foi racionalizado uma nova rota sintética para o composto **67**, através da análise retrossintética do produto apresentada no **esquema 29**. O composto **67** poderia ser obtido através da remoção do grupo de proteção Boc dos N₄ (**70**), que seria sintetizado a partir da reação do **71** com um dihaleto de alquila. Por sua vez, o composto **71** seria

preparado pela remoção do grupo de proteção benzila no enxofre, ao passo que o intermediário **72** seria realizado a partir da inserção do de proteção Boc no composto (**73**), e este por fim seria obtido pela alquilação do núcleo 5-fenil-4*H*-3-tio-1,2,4-triazol (**57**). Deste modo, a síntese do (**67**) seria realizada sem ter a interferência do N₄ para a formação do biciclo, **69**.



Esquema 29. Análise retróssintética para a síntese do **67** com N₄ protegido.

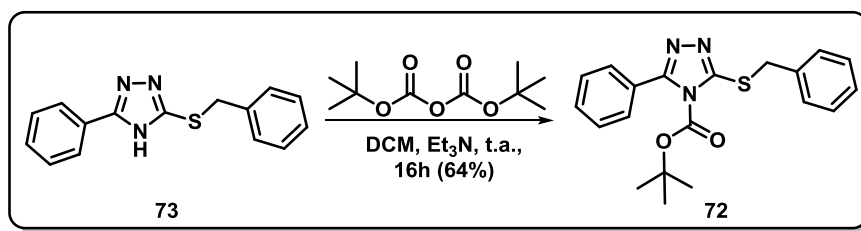
Com base nessa análise retróssintética, obtivemos então a síntese do núcleo 5-fenil-3-tio-1,2,4-triazol (**57**), nas mesmas condições como apresentado anteriormente. Em sequência, foi realizado a síntese do composto **73**, com base nas condições experimentais descritas na literatura⁹² e apresentadas no **esquema 30**.



Esquema 30. Alquilação do grupo tiol contido no núcleo 5-fenil-3-tio-1,2,4-triazol.

Corroborando com os dados de RMN obtidos, quando analisado o espectro de RMN de hidrogênio, há a ausência do singlete com deslocamento acima de 13,0 ppm, o valor duplicado de integração na região dos aromáticos, entre 7,0-8,0 ppm, e o aparecimento de um singlete de alta intensidade em 4,42 ppm, que está contido no intervalo de deslocamento apropriado para CH₂ de grupos benzila.

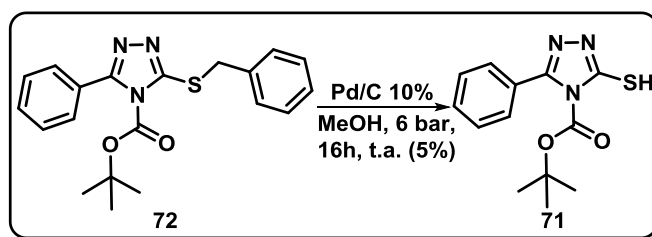
Em sequência, o produto aquilado (**73**), foi submetido a proteção do N₄ para a formação do núcleo *tert*-butil-3-(benziltio)-5-fenil-4*H*-1,2,4-triazol-4-carboxilato (**72**) que agora possui os dois sítios reativos de interesse protegidos,⁹² (**Esquema 31**).



Esquema 31. Rota proposta para a proteção do N4.

Por análise do espectro de RMN obtido, no espectro de hidrogênio, há a conservação do singlete anteriormente destacado com uma pequena variação do deslocamento químico de 4,42 para 4,60 ppm e o aparecimento de um singlete de maior intensidade na região de 1,70 ppm, referente ao grupo *tert*-butila que integra para 9 hidrogênios.

Deste modo, o composto **72**, derivado de duas etapas de proteção, seria utilizado para realizar a desproteção seletiva do grupo tiol (**71**) através de um processo de hidrogenação catalítica, utilizando paládio sob carvão 10% (w/t), atmosfera de hidrogênio em metanol, **esquema 32**. Em uma primeira tentativa, as condições experimentais utilizadas foram com base na literatura, inclusive a pressão de hidrogênio.⁹² Entretanto a conversão do material de partida e o rendimento foram baixíssimos.



Esquema 32. Tentativa de desproteção através de hidrogenação catalítica.

Esse resultado, corrobora com o espectro de RMN de hidrogênio obtido para o composto isolado neste ensaio, onde há a ausência do singlete entre 4,00-5,00 ppm do CH₂, a conservação do singlete em 1,70 ppm com integração para 9 hidrogênios e o aparecimento de um singlete em 8,70 ppm, proveniente da regeneração do grupo tiol.

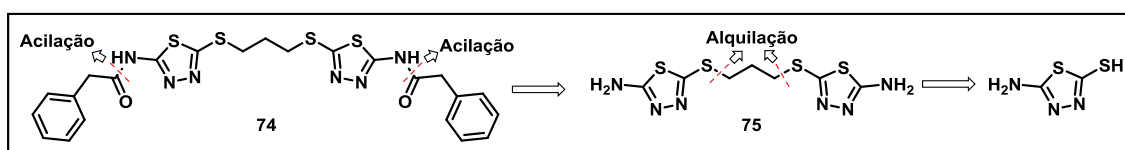
Novas tentativas de remoção do grupo benzila do átomo de enxofre foram realizadas, variando-se a proporção de catalisador para 15 ou 20 mol%, depois 0,5 equivalente. Os valores de pressão foram variados de 6 bar e depois 10 bar e o tempo reacional (4, 16, 24, 48 horas) e todos os testes foram realizados a temperatura

ambiente. Todos os testes foram acompanhados por CCD, entretanto a conversão foi novamente baixa e o produto formado em quantidades traço.

Considerando que a síntese do dímero (**70**), necessita de uma quantidade em massa considerável, seria necessário reavaliar a etapa de desproteção, na tentativa de otimizar as condições experimentais.

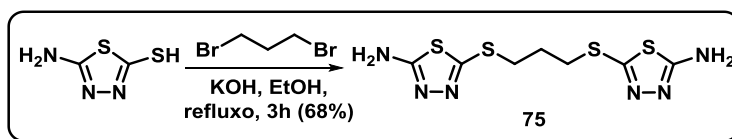
3.3 SÍNTESE DOS DÍMEROS COM 1,2,4-TIADIAZOL

O primeiro composto proposto para a síntese utilizando o 1,2,4-tiadiazol, que é um núcleo que pode ser obtido comercialmente, foi planejado por apresentar uma pequena diferença em relação ao composto de referência, contendo dois átomos de enxofre próximos ao heterociclo, ao invés de um átomo de enxofre centralizado na cadeia alquílica. A rota foi planejada através de uma análise retrossintética que é apresentada no **esquema 33**. Sendo assim, o produto (**74**) poderia ser obtido a partir da reação de acilação dos grupos aminas presentes no **75**, que por sua vez, poderia ser sintetizado a partir da reação de bisalquilação entre o núcleo 5-amino-3-mercapto-1,2,4-tiadiazol e um di-haleta de alquila com o número de carbonos de interesse.



Esquema 33. Análise retrossintética para a síntese do dímero simétrico contendo 1,2,4-tiadiazol.

Deste modo, a síntese do dímero **75** foi realizada de acordo com as condições experimentais apresentadas por Tomi *et al.*⁹³. Há a formação de precipitado amarelado no meio reacional, representando a formação do produto desejado, que é filtrado e lavado com água gelada, sem necessitar de etapas extras de purificação (**Esquema 34**). O produto bisalquilado **75** apresentou baixa solubilidade em diversos solventes orgânicos polares.



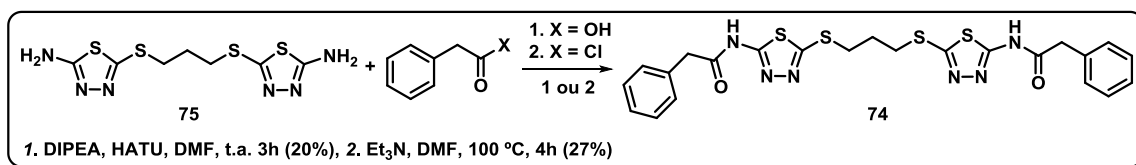
Esquema 34. Síntese do dímero 5,5'-(propano-1,3-dibis(sulfanil))bis(1,3,4-tiadiazol-2-amina).

A partir dos deslocamentos químicos (δ) do espectro de RMN de ^1H obtido, contido na **tabela 2**, comparados com os apresentados na literatura, a obtenção do produto foi confirmada.

Tabela 2. Comparação dos dados de RMN de ^1H do composto **75** obtido com o da literatura.

Dados observados (DMSO-d ₆ , 500 MHz)	Dados da literatura ⁹³ (DMSO-d ₆ , 300 MHz)
7,30 (s, 4H, NH ₂)	7,30 (s, 4H, NH ₂)
3,14 (t, $J^3 = 7,0$ Hz 4H, CH ₂)	3,14-3,16 (t, 4H, CH ₂)
1,99 (q, $J^3 = 7,0$ Hz, 2H, CH ₂)	1,99 (m, 2H, CH ₂)

Em sequência, a reação de acilação dos grupos amino foi realizada como é mostrada no **esquema 35**. A condição experimental **1** foi baseada no procedimento apresentado pelo grupo de pesquisa do Tsukamoto *et al.*⁹⁴, porém o aumento da escala se torna limitado por causa do HATU. Investigou-se outro método de obtenção do **75** que além de ser mais viável, a solubilidade em DMF a 100 °C do **74** foi razoável e optou-se por dar continuidade com a condição experimental **2**.

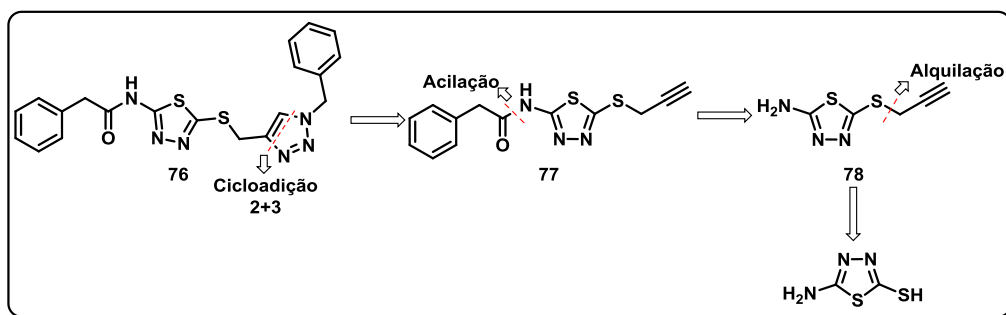


Esquema 35. Síntese do *N,N'*-((propano-1,3-dibis(sulfanil))bis(1,3,4-tiadiazol-5,2-il))bis(2-fenilacetamida).

O composto **74** obtido se apresentou com baixa solubilidade em solventes orgânicos polares, assim como o material de partida, o que resultaria em uma alta adesão do composto em sílica para cromatografia em coluna. Deste modo, foi realizada a purificação através da extração por meio de solventes reativos, onde primeiro o bruto reacional é extraído com uma solução de NaOH e, em sequência é acidificado até pH = 7,0 com uma solução de HCl, ambos em concentração (1M).

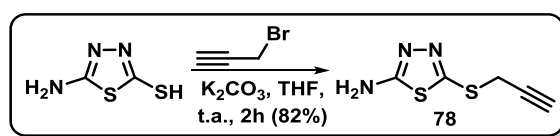
Em seguida, efetuou-se a síntese do composto **76**, um dímero não simétrico baseado nos dados de Di Francesco *et al.*⁷⁷ contendo o núcleo 1,2,3-triazol na outra

porção da molécula. A partir da análise retrossintética, apresentada no **esquema 36**, o composto **76** seria preparado pela reação de cicloadição catalisada por cobre entre uma azida orgânica e um alcino terminal **77**, que seria preparado a partir da acilação da amina presente no **76** e alquilação do enxofre (**78**). O núcleo 5-amino-3-mercaptop-1,2,4-tiadiazol foi obtido comercialmente.



Esquema 36. Análise retrossintética para a síntese do dímero assimétrico contendo o núcleo 1,2,3-triazol.

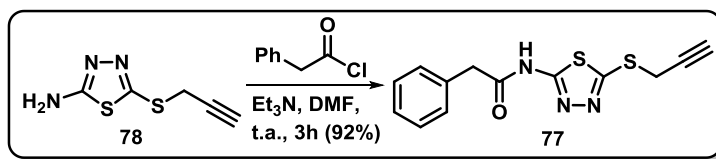
A primeira etapa, que consiste na alquilação do grupo tiol, foi realizada através da reação com o brometo de propargila nas condições experimentais apresentadas pelo **esquema 37**.



Esquema 37. Síntese do 5-(prop-2-in-iltio)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**78**).

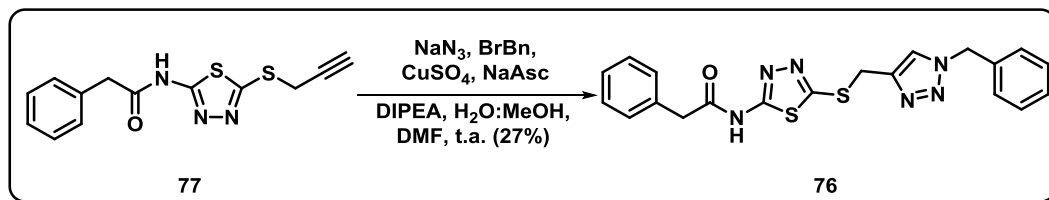
Entretanto, o uso de quantidades equimolares entre o brometo e o 5-amino-3-mercaptop-1,2,4-tiadiazol levou à formação de um subproduto, visto que o brometo de propargila é muito reativo, o qual aparenta ser o produto da reação de bisalquilação do núcleo. Ele apresentava fator de retenção (R_f) e polaridade muito semelhantes ao do produto de interesse e no espectro de RMN ^1H da mistura era observável um tripleto em 6,40 ppm ($J^3 = 6,3$ Hz), duplete em 5,26 ppm ($J^3 = 6,3$ Hz) e singleto largo em 7,38 ppm com deslocamentos bem próximos dos sinais do produto dificultando o processo de interpretação dos dados. Deste modo, se fez necessário realizar a adição de, no mínimo (repensar a forma de escrever a quantidade de equivalentes), 3 equivalentes do núcleo em relação ao brometo, para minimizar a formação do subproduto, facilitando assim a purificação do bruto reacional por cromatografia em coluna de sílica *flash*.

A partir do produto propargilado (**78**), foi realizada a reação de acilação da amina livre empregando-se o cloreto do ácido fenilacético correspondente em DMF com trietilamina como base (**Esquema 38**).⁹⁵



Esquema 38. Condições experimentais para a síntese do núcleo acilado (**77**).

Como última etapa para obter o produto proposto, foi realizada a reação via *click chemistry* da reação de cicloadição catalisada por cobre (CuAAC) entre o alcino preparado, 2-fenil-N-(5(prop-2-in-1-tio)-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida (**77**) e azida de sódio junto a brometo de benzila, **esquema 39**.



Esquema 39. Síntese do *N*-(5-(((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-2-fenilacetamida (**76**).

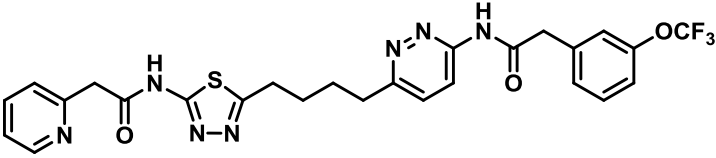
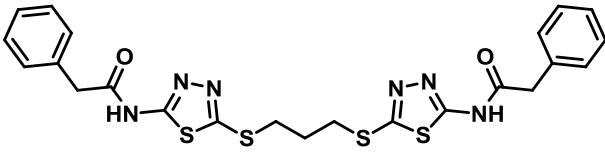
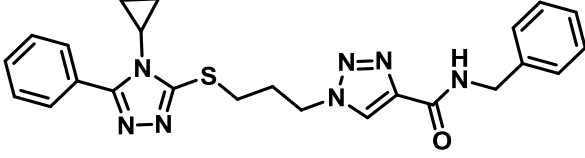
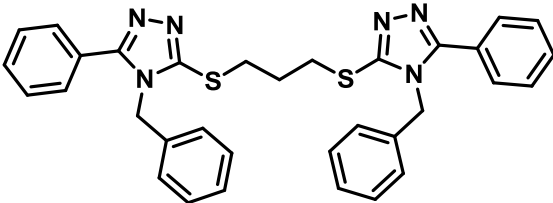
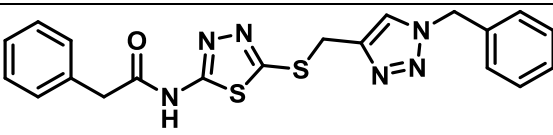
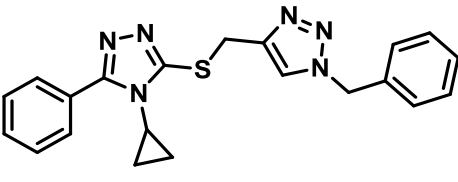
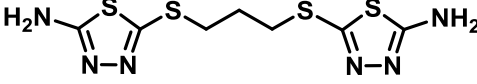
Ao início da reação, o 2-fenil-N-(5(prop-2-in-1-tio)-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida foi parcialmente solúvel no meio reacional e, desta forma, poderia justificar o baixo rendimento obtido para a reação. Apesar de conter o núcleo 1,2,4-tiadiazol no composto **76**, que confere problemas de solubilidade em alguns dos compostos sintetizados anteriormente, este apresentou boa solubilidade em alguns solventes polares como clorofórmio, acetona, tetrahidrofurano, acetato de etila e metanol. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna de sílica *flash*.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Com os resultados obtidos previamente pelo grupo de pesquisa através da avaliação de uma série de compostos contendo o núcleo 3-tio,1,2,4-triazol, este trabalho teria como proposta maior complementar os resultados agregando uma maior viabilidade estrutural para os análogos avaliados, mas ainda preservando o núcleo 1,2,4-triazol como principal. Os testes para avaliação da atividade biológica dos compostos frente à enzima glutaminase foram realizados em triplicata pela doutoranda Bianca N.

Da Silva do grupo da Dra. Sandra M. Gomes Dias do LNBio – CNPEM. Os análogos avaliados estão apresentados na **tabela 3** junto aos seus respectivos valores de inibição em ordem crescente.

Tabela 3. Valores de IC₅₀ para o CB-839, referência na inibição de glutaminase e para os derivados preparados.

Código	Estrutura molecular	IC ₅₀ (μM)
CB-839		0,035
74		1,2
63.1		34,3
60.2		32,0
76		32,6
61.1		> 100
75		> 200

Segundo a literatura, o BPTES apresenta valor de IC₅₀ = 3,0 μM⁷² e em sua estrutura molecular o espaçador composto por uma cadeia alquílica com um átomo de enxofre ao centro que apresenta interações hidrofóbicas importantes com os resíduos da glutaminase. Tsukamoto *et al.* sintetizou alguns derivados do BPTES variando a

posição do átomo de enxofre na cadeia alquílica e a quantidade de carbonos, com valores próximos a $IC_{50} = 1,00 \mu M$ e destacou que a presença de átomos de enxofre ligado ao heterociclo pode realizar interações relevantes com os resíduos de aminoácidos resultando em uma melhor estabilização da molécula.⁹⁴ O composto **74**, cuja estrutura química também é bastante similar ao BPTES, foi avaliado e apresentou valor de inibição mais promissor dentre os compostos avaliados nos ensaios biológicos. Com a presença de 2 átomos no espaçador, o efeito destacado por T. Tsukamoto poderia ser maior e esta modificação estrutural foi tolerada. Após estes resultados, novos derivados com diferentes substituintes no anel aromático foram sintetizados, porém ainda serão avaliados posteriormente.

A ausência dos grupos fenil acetila no análogo **75** impactou negativamente no valor de inibição, pois as ligações de hidrogênio realizadas pelas amidas seriam essenciais para a acomodação da molécula no sítio alostérico, corroborando com a literatura.⁷²

O composto **60.2**, apesar de ter apresentado valor de inibição significativo, pode não interagir da mesma forma como o BPTES, por possuir grupos benzila ligados ao N₄ do anel triazólico. Esses grupos mais volumosos dificultariam a inserção da molécula no canal alostérico e, desta forma, justificam o valor de IC_{50} obtido para a inibição da glutaminase.

A utilização do núcleo 1,2,4-tiadiazol-acetamido no análogo **76**, junto ao anel *N*-benzil-1,2,3-triazol apresentou valor relevante de inibição. Já a utilização de um 1,2,4-triazol com o grupo ciclopropil (**61.1**) substituído no N₄ exibiu baixa atividade indicando que o substituinte poderia interferir na acomodação da molécula ao sítio alostérico, prejudicando assim a inibição da GAC.

O composto **63.1** apresentou melhora no índice de inibição quando comparados aos compostos apresentados por Di Francesco *et al.*⁷⁷ (IC_{50} entre 100-500 μM), no qual utilizou núcleos 1,2,4-tiadiazol ou 1,2,3-triazol, desta forma, compreende-se que o núcleo 1,2,4-triazol impactou positivamente a atividade. Quando comparado ao composto **61.1**, que possui o mesmo núcleo 1,2,4-triazol e apresentou baixa atividade frente à glutaminase, pode ser relacionada com o fato de o espaçador apresentar menor número de carbonos, junto ao fato da ausência um grupo carbonila vizinho ao anel

1,2,3-triazolico, o que impacta positivamente na atividade. O composto **63.2** e **61.2**, que apresentam o hidrogênio ligado ao N₄ ainda serão avaliados frente à glutaminase.

3.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Em colaboração com o grupo da pesquisadora Dra. Daniela B. B. Trivella, LNBio – CNPEM, foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* frente à duas linhagens distintas de carcinoma humano, a HCT-116 que é referente a carcinoma de cólon humano, a MDA-MB-231, adenocarcinoma de mama humano e a linhagem controle HaCat, fornecendo dados para o índice de seletividade (IS). Os análogos avaliados junto aos valores de inibição e seletividade são apresentados na **tabela 4**. As estruturas são apresentadas na **figura 22**.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ e seletividade (**IS**) obtidos frente às linhagens HCT-116 e MDA-MB-231 para os análogos sintetizados, junto ao controle positivo (paclitaxel) e o controle (HaCat).

Código	HaCat IC ₅₀ (μM)	HCT-116 IC ₅₀ (μM)	IS	MDA-MB-231 IC ₅₀ (μM)	IS*
Paclitaxel	< 0,01	< 0,01	1,1	< 0,01	0
74	50,5	227,0	0,2	118,0	0,4
63.1	99,6	109,0	0,9	53,0	1,9
63.2	50,5	22,4	2,3	25,3	2,0
60.2	113,0	564,0	0,2	857,0	0,1
76	671,0	438,0	1,5	188,4	3,6
61.1	412,0	707,0	0,3	1910,0	0,2
61.2	206,0	284,0	0,7	97,1	2,1

*O cálculo de Índice de seletividade foi calculado através da equação:

$$IC_{50} = IC_{50}^{HaCat} / IC_{50}^{HCT - 116}$$

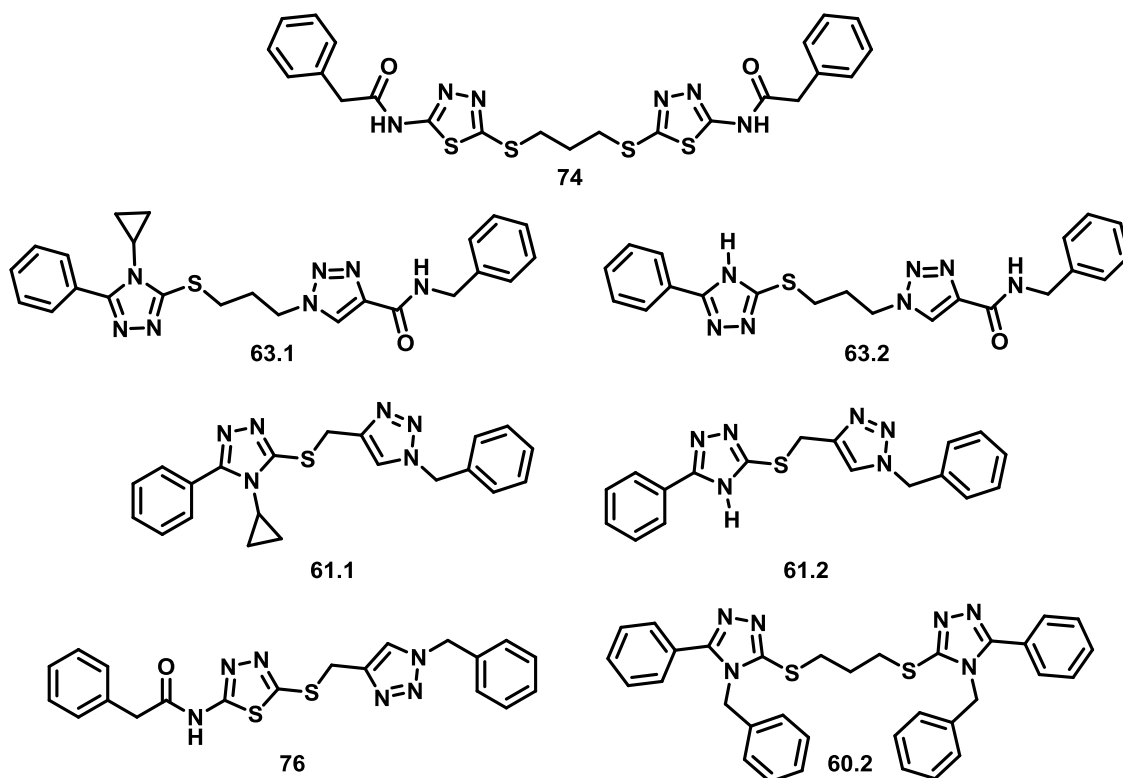


Figura 22. Estrutura química dos análogos avaliados nos ensaios de citotoxicidade.

Dentre os 7 análogos avaliados, destaca-se a distinção nos valores obtidos quando avaliados os análogos **63.1** e **63.2**, pelo fato de que, apresentam estruturas muito similares diferindo apenas na presença ou não do substituinte no nitrogênio N₄. Desta forma, a alteração para um anel não substituído é preferível por impactar positivamente na inibição celular. Os valores de seletividade obtidos para o composto **63.2**, sendo 2,3 frente à HCT-116 e 2,0 frente à MDA-MB-231, foram relevantes no ensaio.

Da mesma forma, o composto **76** que, apesar dos valores de inibição serem mais elevados, apresentou alta seletividade frente às linhagens testadas.

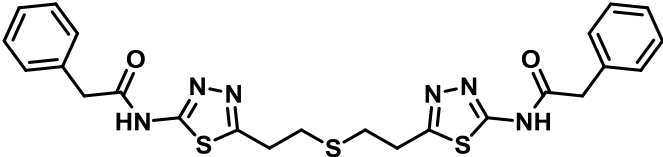
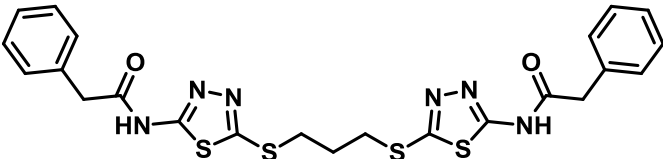
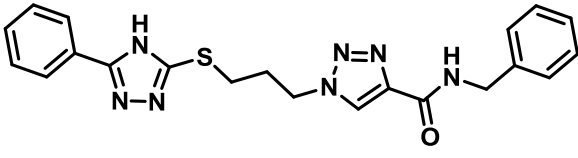
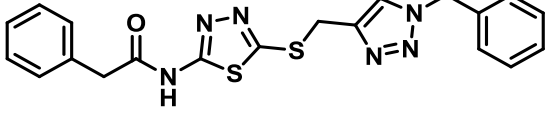
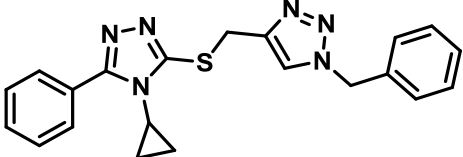
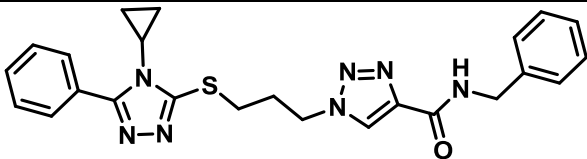
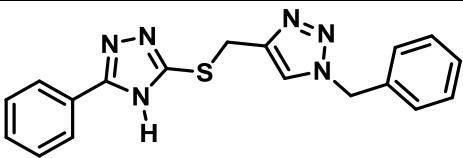
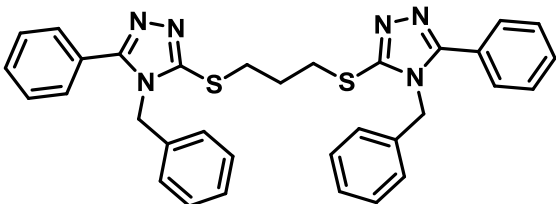
Alguns análogos apresentaram uma atividade acima de 250 micromolar pode também ser devido à baixa solubilidade no meio de avaliação, isto porque foi visualizado precipitação em ambas as placas da análise, de diluição intermediária e a de incubação final.

3.6 DOCKING MOLECULAR

A avaliação *in silico* e predição das interações mais importantes realizadas entre os compostos sintetizados em sobreposição com a pose do BPTES (**Figura 23**) junto aos escores de docagem obtidos, suas estruturas moleculares e os valores obtidos no

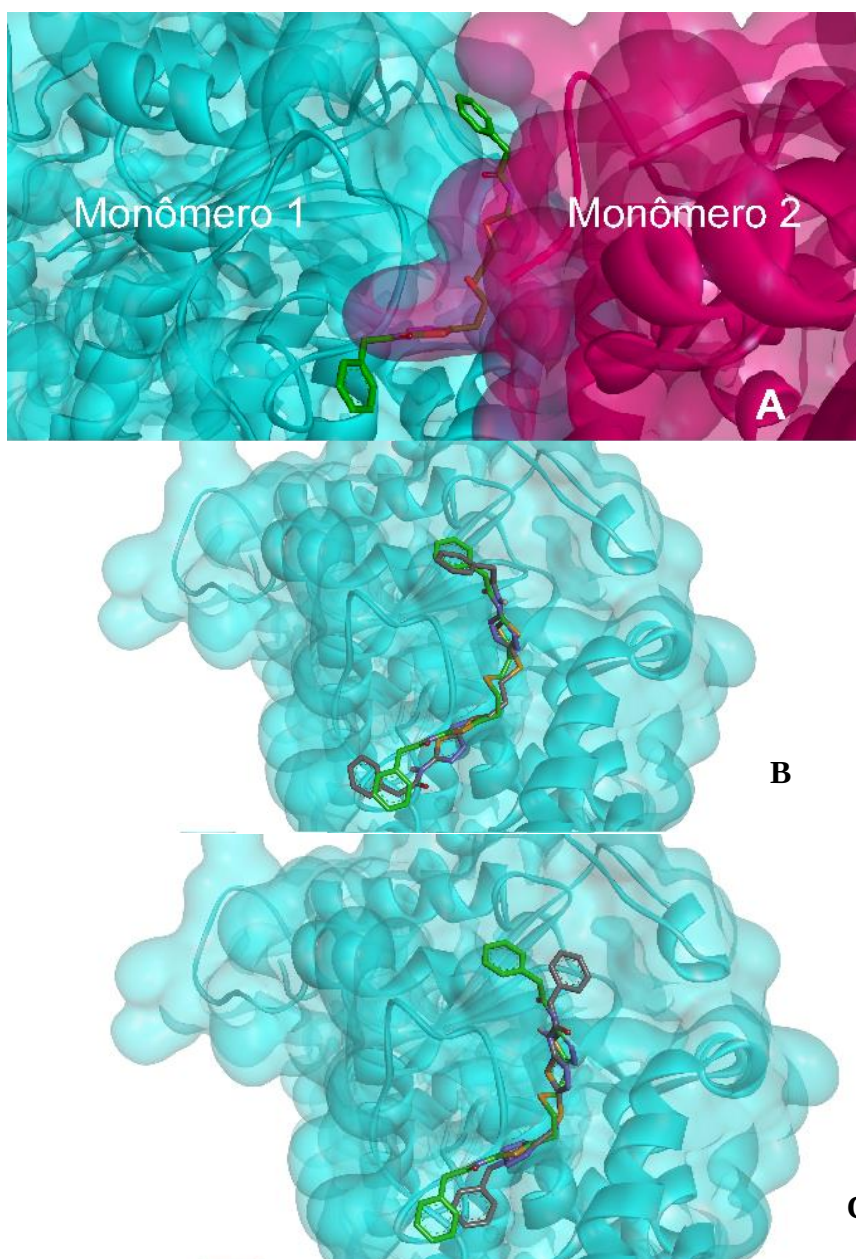
ensaio da glutaminase isolada estão apresentados na **tabela 5**. Este estudo foi realizado pelo Prof. Dr. Daniel F. Kawano da FCF – Unicamp.

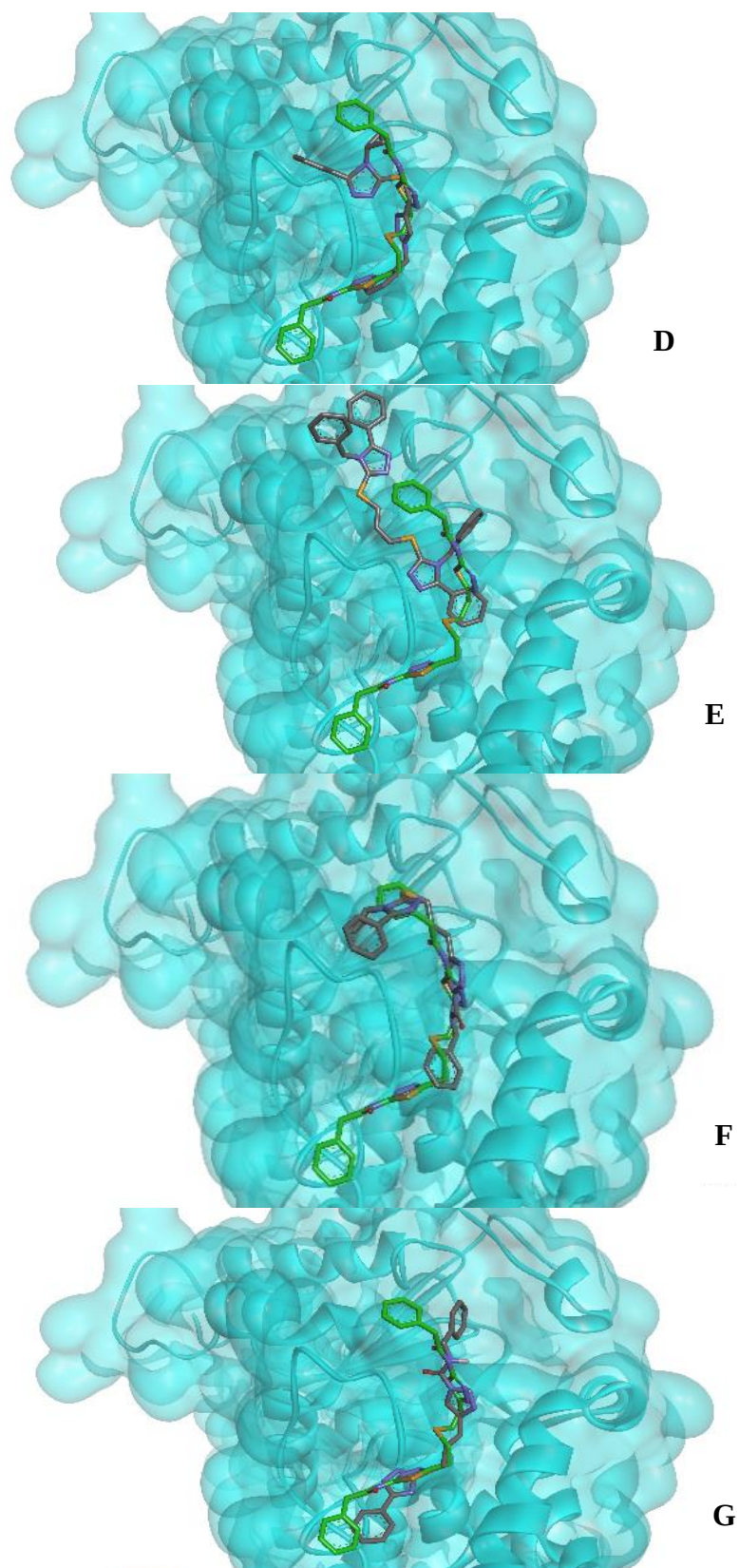
Tabela 5. Escores de docagem preditos para a interação entre os compostos sintetizados e os resíduos de aminoácidos do sítio alostérico da enzima glutaminase humana.

Código	Estrutura molecular	Escore de docagem	IC ₅₀ (μM)
BPTES		84,80	3,0
74		94,77*	1,2
63.2		85,99	-
76		80,59	32,6
61.1		77,77	> 100
63.1		76,96	34,3
61.2		76,14	-
60.2		47,09	32,0

75	<chem>Nc1nc(s1)SCCCS2=NC(=N)S=C2N</chem>	**	> 200
----	--	----	-------

*Escore de docagem calculado para a pose de *redocking* (RMSD = 1,58 Å). Os valores de escore de docagem são adimensionais e se referem às pontuações calculadas pela função de pontuação GoldScore, que considera energias de ligações de hidrogênio, de van der Waals, interações com metais e tensões de torcionais do ligante (Verdonk et al., 2003). **Nenhuma pose resultante nas simulações de docagem.





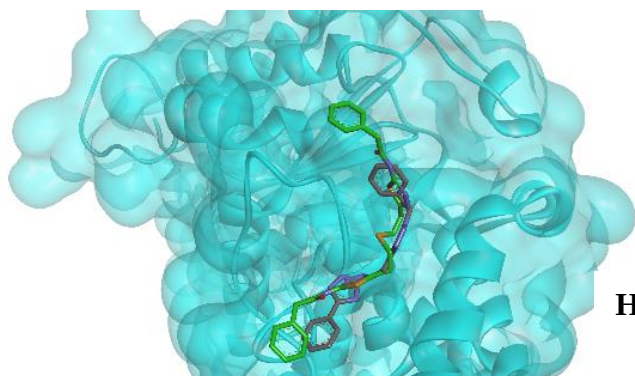


Figura 23. Comparação entre a pose cristalográfica do inibidor da enzima glutaminase humana BPTES (A) com os modos de ligação (poses de docagem) preditos para os compostos sintetizados. B) Pose predita para **74**; C) Pose predita para **76**; D) Pose predita para **61.1**; E) Pose predita para **60.2**; F) Pose predita para **63.1**; G) Pose predita para **63.2**; H) Pose predita para **61.2**. (adicionar a relação das cores de átomos com os átomos utilizados).

Dentre os compostos avaliados, apenas o composto **60.2** não conseguiu se acomodar completamente no sítio de interação como o BPTES (**Figura 23 E**), o que corrobora com a literatura, pois ele possui anéis aromáticos em sua estrutura que impõem alta restrição estérea em comparação com os substituintes correspondentes nos demais análogos avaliados. Essa observação é expressa pelo escore de docagem, **tabela 4**, e pelas interações que, em sua maioria, são fracas, sendo representadas por hidrofóbicas e empilhamento π - π (**Figura 24 E**).

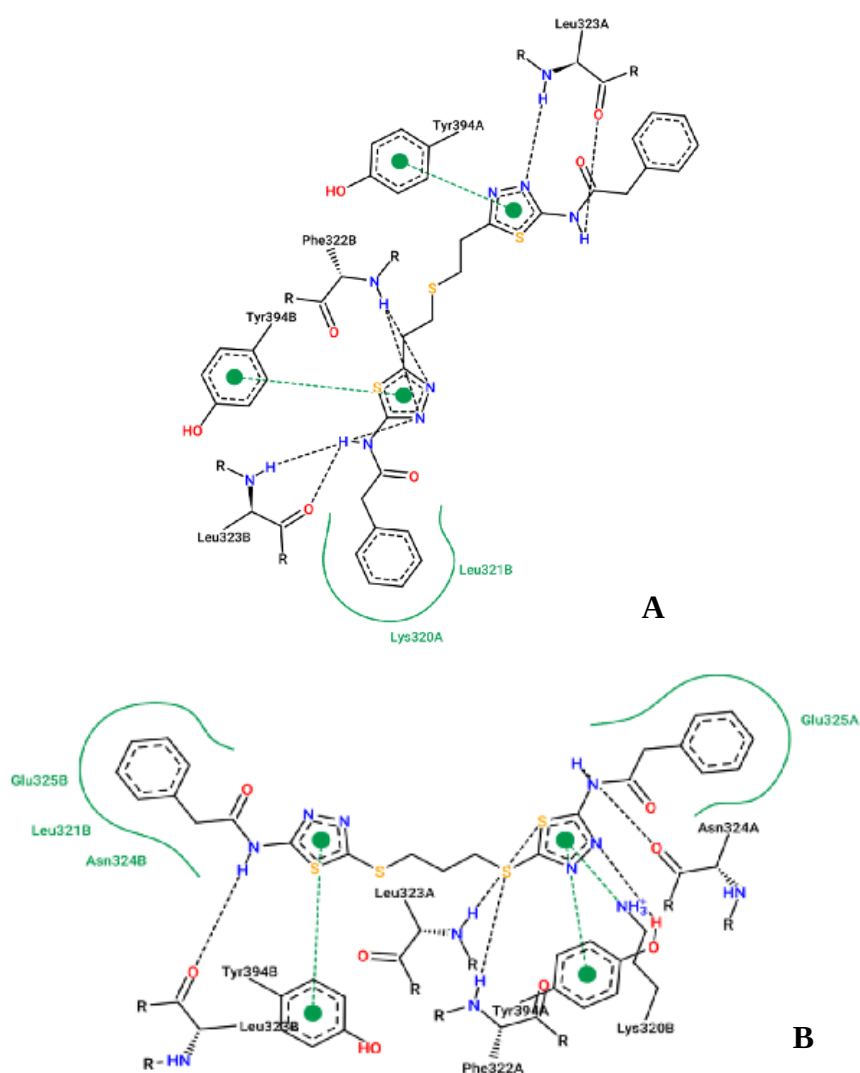
Assim como nos ensaios biológicos realizados, o análogo que apresentou resultados mais promissores nas simulações de docking foi o composto **74**, tendo apresentado uma orientação no sítio da glutaminase bastante semelhante ao BPTES (**Figura 23 B**), o que é racional, pois o análogo possui estrutura bem semelhante ao composto de referência. O deslocamento do átomo de enxofre do centro da cadeia alquílica para mais próximo do heterociclo fez com que fosse possível realizar uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio da amida na Fenilalanina 322A (**Figura 24 B**).

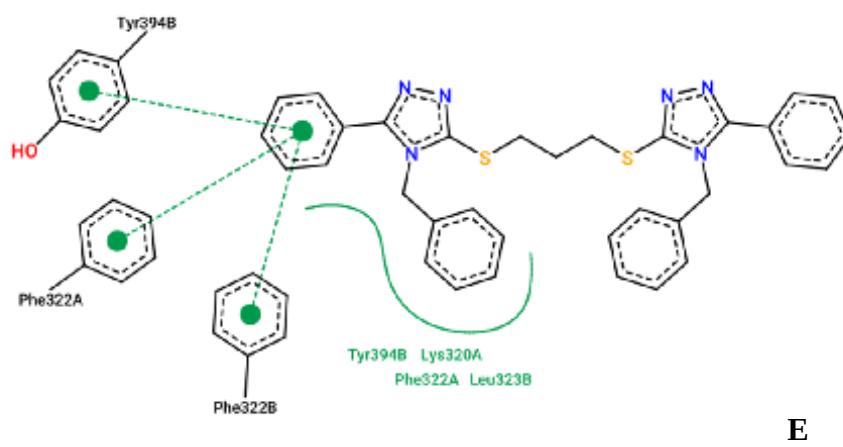
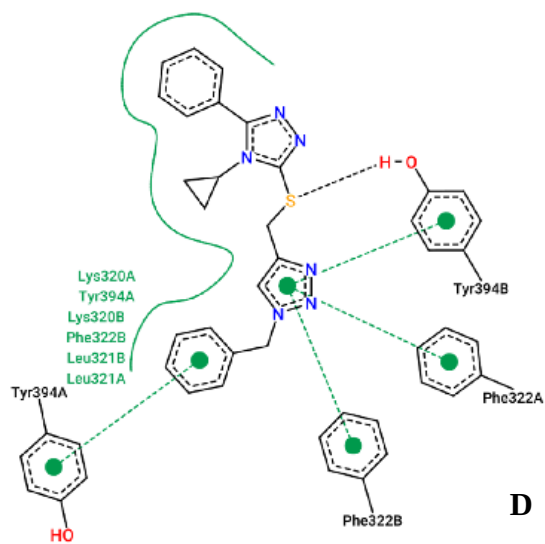
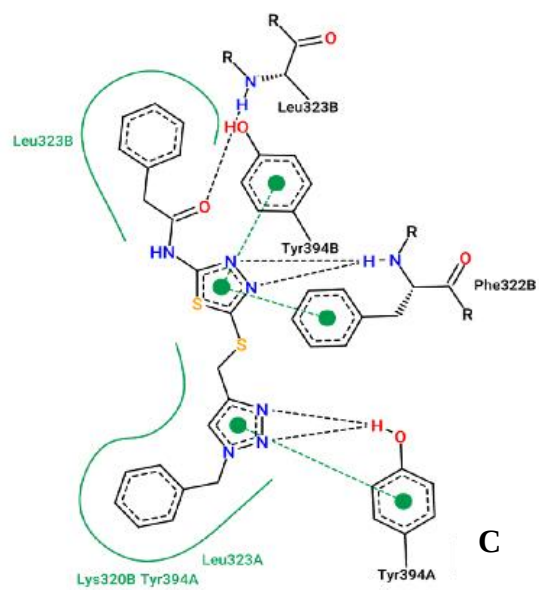
O composto **61.1** apresentou conformação distinta em relação ao BPTES, com afastamento do núcleo 1,2,4-triazol dos resíduos de aminoácidos Fenilalanina 322B e 322A e Tirosina 294A, resultando na ausência de ligações de hidrogênio entre os nitrogênios 1 e 2. Já o composto **76**, contendo o núcleo 1,2,4-tiadiazol, e o **61.2** o núcleo com o hidrogênio ligado ao N₄, apresentaram conformações mais similares ao BPTES com a presença de ligações de hidrogênio nos nitrogênios 1 e 2.

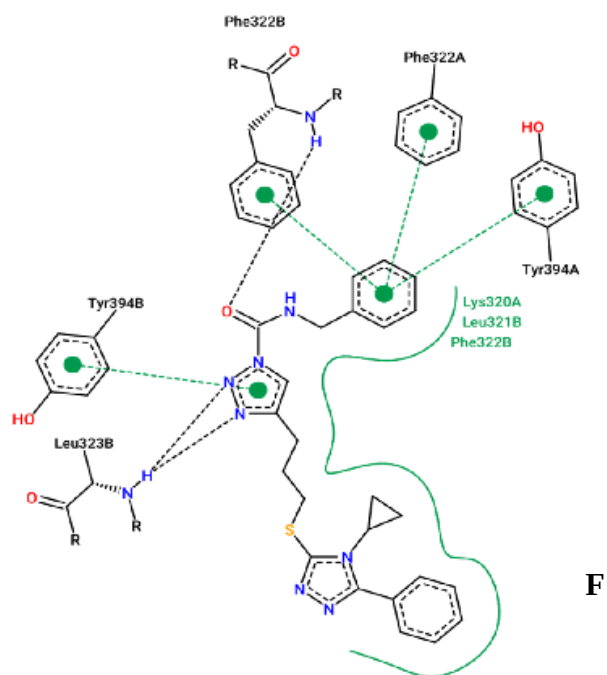
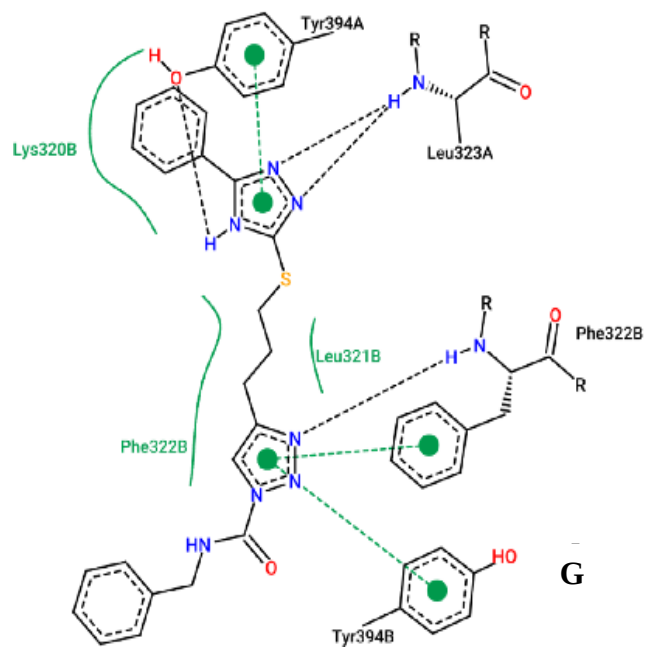
Em relação ao composto **75**, este apresentou um padrão negativo nas simulações, pois não resultou em qualquer pose de docagem frente à enzima, provavelmente em

função da omissão dos anéis benzênicos e as amidas em relação ao BPTES, que se mostram importantes para o correto posicionamento dos anéis tiadiazóis adjacentes para a realização de interações com resíduos de aminoácidos da glutaminase, corroborando com o valor obtido pelo ensaio biológico.

O composto **63.2** (**figura 24 G**), por não apresentar um substituinte em N₄ e possuir o átomo de hidrogênio ligado ao N₄ apresentou uma interação maior e distinta com o resíduo de tirosina 394A, quando comparado ao composto **63.1** que possui a ciclopropila (**figura 24 F**). Além da interação π - π realizada através do núcleo 1,2,4-triazol pelo **63.2** com o resíduo de tirosina 394A, o átomo de hidrogênio no N₄ consegue realizar uma ligação de hidrogênio com o a hidroxila presente na tirosina 394A, o que aumentaria a estabilização da molécula frente à glutaminase.





**F****G**

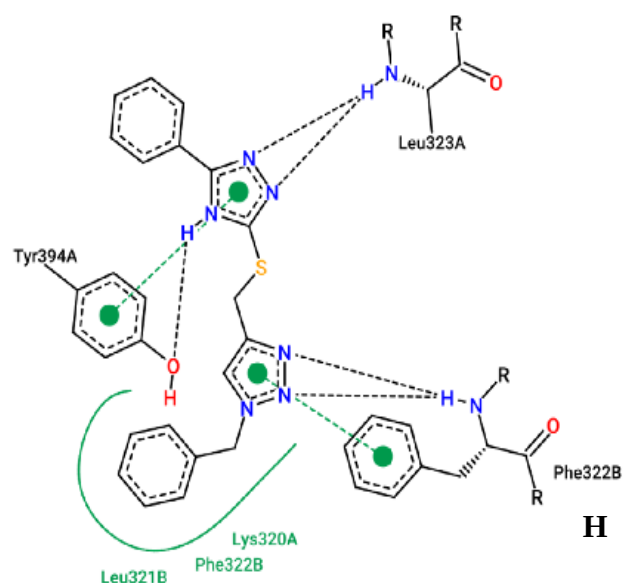


Figura 24. Diagramas bidimensionais das interações proteína-ligantes gerados a partir dos modelos 3-D. **A)** BPTES; **B)** 74; **C)** 76; **D)** 61.1; **E)** 60.2; **F)** 63.1; **G)** 63.2; **H)** 61.2. As linhas tracejadas pretas correspondem a ligações de hidrogênio, linhas tracejadas em verde a interações π - π , enquanto as linhas sólidas verdes destacam as interações hidrofóbicas.

4. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível realizar a síntese de derivados do BPTES a partir de metodologias robustas para incorporação de heterociclos nitrogenados, dos quais, 8 foram avaliados frente à glutaminase isolada em colaboração com a doutoranda Bianca Novaes e a Dr.^a Sandra Dias do CNPEM – LNBio. Valores de IC₅₀ em baixo micromolar foram obtidos e a baixa solubilidade dos análogos nas condições dos ensaios podem ter impactado nos resultados de inibição. Os compostos **63.1** e o **74** apresentaram valores de inibição relevantes frente à enzima glutaminase isolada. O composto **60.2**, por apresentar substituintes benzila, que são muito volumosos, impede que ele interaja no sítio alostérico da glutaminase como o BPTES, corroborando com os dados obtidos pela docagem molecular.

Os valores de escore de docagem molecular corroboraram com os valores de inibição da enzima isolada, como apresentado anteriormente, onde destaca-se o composto **74**, superando tanto o escore de docagem quanto o índice de inibição frente à enzima isolada para o análogo de referência (BPTES). Ressalva-se apenas os compostos **63.2** e **61.2**.

Os valores de inibição obtidos para os ensaios de citotoxicidade em 2 linhagens distintas de câncer, HCT-116 e MDA-MB-231, se encontram dentro do intervalo apresentado na literatura atual, sendo em baixo micromolar, apesar de ter ocorrido problemas de solubilidade no meio desejado da mesma forma que para os ensaios para a enzima isolada. Porém, pôde-se destacar a influência do nitrogênio N₄ ser substituído ou não, pois através dos compostos **63.1** e **63.2** frente à linhagem HCT-116 houve uma diferença de, aproximadamente, 5 vezes. Já para a linhagem MDA-MB-231 a diferença de atividade foi de 2 vezes, perceptível através dos valores obtidos.

De modo geral, foram obtidos valores de inibição relevantes para a enzima isolada que, de certo modo, corroborou com os resultados obtidos pela docagem molecular realizada junto aos resultados de citotoxicidade obtidos, assim, conclui-se que o núcleo 1,2,4-triazol pode ser utilizado para o desenvolvimento de novos inibidores de glutaminase.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados no presente projeto são todos de padrão analítico e foram obtidos comercialmente por diversas empresas como Merck, Sigma-Aldrich Ambeed e Synth e não foram purificados previamente. As reações anidras foram realizadas sob atmosfera de N₂ anidro e encanado. Os solventes para reações anidras: THF, DCM e DMF foram tratados com peneira molecular ativada de 4 Å, obtidos comercialmente da marca Synth ou Sigma-Aldrich. A nomenclatura de todos os compostos contidos no presente projeto foi dada através do software *ChemDraw*[®] da PerkinElmer.

O ultrassom utilizado foi o Banho de Ultrassom - Q335D da marca *Quimis*[®] com frequência de 40 KHz.

Reações em microondas

As reações realizadas sob radiação de microondas foram executadas em um aparelho *Initator*⁺ *Microwave System with Robot Eight* da marca *Biotage*[®], com tubo selado, com volumes máximos de 5 mL ou 20 mL.

Métodos cromatográficos

O acompanhamento das reações foi efetuado por placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 suportadas em chapas de alumínio da *Merck*.

A cromatografia em coluna *flash* foi realizada no aparelho *Isolera*TM *Systems* da *Biotage*[®], com sílica *flash* (sílica gel 60, 220-440 mesh, Sigma-Aldrich).

Análises espectroscópicas e espectrométricas

As análises de massas de alta resolução foram realizadas em espectrômetro Q Exactive – Orbitrap Thermo.

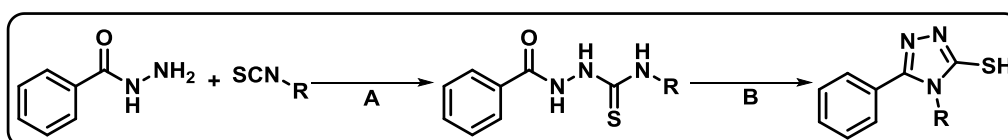
As análises de espectroscopia de infravermelho foram realizadas em espectrômetro de infravermelho Cary 630 da marca Agilent.

As análises de RMN foram realizadas nos espectrômetros Bruker DPX-250, Varian Gemini 300 e Avance III 500. Os solventes utilizados foram CDCl₃ ou DMSO-d₆. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) em relação ao solvente deuterado residual como padrão interno (CDCl₃: 7,26 ppm para RMN de ¹H e 77,16 ppm para RMN de ¹³C. DMSO-d₆: 2,50 ppm para RMN de ¹H e 39,52 ppm para RMN de C¹³. As constantes de acoplamento (*J*) são apresentadas em

hertz (Hz). Os espectros de RMN de ^1H são apresentados na seguinte ordem: multiplicidade (representados por s = singleto, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto, qu = quinteto, m = multiplete, dt = duplete de tripleto, ddt = duplete de duplete de tripleto e sl = singleto largo), constante de acoplamento (J) e número de hidrogênios. Os espectros foram processados pelo software *TopSpin* da Bruker®.

Metodologia e caracterização

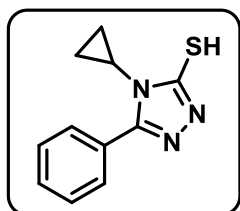
4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (47).



Procedimento A: Em um balão de 100 mL de fundo redondo foram solubilizados benzohidrazida (1,389 g, 1,0 eq., 10 mmol) e o respectivo isotiocianato de alkila (1,0 eq., 10 mmol) em 50 mL de MeOH. O meio reacional foi mantido sob agitação e em refluxo por 2 horas. Há a formação de precipitado branco durante a reação. Com o término da reação, o solvente foi removido sob pressão reduzida e submetido para o próximo procedimento sem purificação adicional.

Procedimento B: Ao resíduo obtido na etapa A, foi adicionado 30 mL de uma solução de NaOH (1M) e mantido sob agitação em sistema de refluxo por 4 horas, revelador: Lâmpada UV 254 nm ($r_f = 0,375$; 3:1 Hex:AcOEt). Com o término da reação, o meio reacional foi deixado resfriar, acidificada até pH = 1 com HCl (1M) e filtrada a vácuo com funil de Büchner, fornecendo o tiol desejado com rendimentos entre 63-77%.

4-ciclopropil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (47.1).

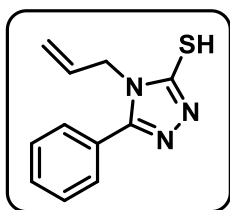


Obtido como sólido branco com rendimento de 71%

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 13,8 (s, 1H), 7,77-7,75 (m, 2H), 7,57-7,51 (m, 3H), 3,29 (m, 1H), 0,96-0,92 (m, 2H) e 0,58-0,55 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 169,0(C_0), 152,1(C_0), 130,3(C_0), 128,6(CH), 128,4(CH), 126,1(CH), 26,3(CH_2), 9,0(CH).

4-alil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (47.2).

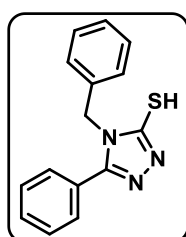


Obtido como sólido branco em 77% de rendimento.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 14,0 (s, 1H), 7,68-7,65 (m, 4H), 7,60-7,50 (m, 6H), 5,83 (ddt, $J^3 = 4,8$ Hz, 10,6 Hz e 17,5 Hz, 2H), 5,12 (dt, $J^3 = 1,1$ Hz e 10,5 Hz, 2H), 4,84 (dt, $J^3 = 1,1$ Hz e 17,3 Hz, 2H) e 4,69 (dt, $J^3 = 1,1$ Hz e 17,3 Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 167,5 (C_0), 151,3 (C_0), 131,8 (CH), 130,7 (CH), 128,9 (CH), 128,3 (CH), 126,0 (CH), 117,2 (CH_2) e 46,8 (CH_2).

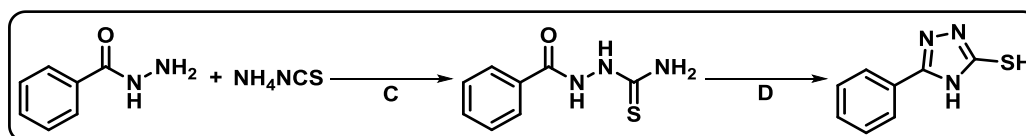
4-benzil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (47.3).



Obtido como sólido branco com 63% de rendimento.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 12,5 (s, 1H), 7,51-7,48 (m, 1H), 7,42-7,38 (m, 4H), 7,30-7,24 (m, 3H), 7,13-7,12 (m, 2H) e 5,38 (s, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 168,7 (C_0), 162,7 (C_0), 132,2 (C_0), 131,2 (C_0), 129,1 (CH), 128,9 (CH), 128,8 (CH), 128,1 (CH), 127,2 (CH), 125,8 (CH) e 48,1 (CH_2).

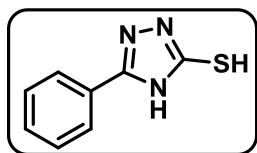


Procedimento C: Em um tubo de microondas com capacidade para 20 mL da marca biotage foram adicionados o tiocianato de amônio (2,664 g, 5 eq., 35 mmol), a benzoidrazida (973 mg, 1 eq., 7,5 mmol) e 20 mL de água. Em sequência, foi adicionado o HCl concentrado (770 μL , 1,34 eq., 9,38 mmol) e o tubo foi selado e agitado até completa homogeneização. Em seguida, foi submetido as condições de 130 $^\circ\text{C}$ por 45 minutos com 900 rpm de agitação. Ao final da reação, o bruto reacional é neutralizado até pH = 7,0 com NaOH (1M) e, em sequência, obtido através de filtração simples. O sólido marrom claro obtido foi utilizado na próxima etapa sem purificação adicional.

Procedimento D: Em um tubo de microondas com capacidade para 20 mL da marca Biotage foi adicionado o sólido anterior e solubilizado em uma solução de NaOH (1M). O tubo foi selado e agitado para completa homogeneização. Em sequência, foi submetido as condições de 130 $^\circ\text{C}$ por 45 minutos com 900 rpm de agitação. Logo após

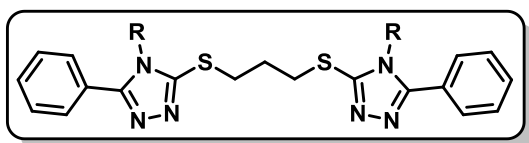
o término da reação, o meio foi deixado resfriar e acidificado com HCl (1M) até pH = 2,0. O sólido foi obtido através da filtração a vácuo em funil de Büchner. O produto se apresentou como um sólido branco (691 mg, 56%).

4-*H*-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol (57).



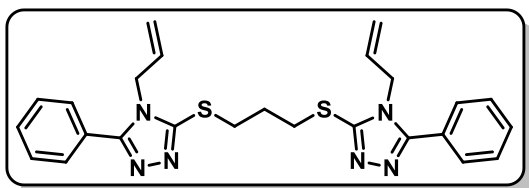
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 13,8 (s, 1H), 13,6 (s, 1H), 7,91-7,89 (m, 2H) e 7,51-7,50 (m, 3H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 167,0 (C_0), 150,2 (C_0), 130,6 (C_0), 129,0 (CH), 125,6 (CH) e 125,4 (CH).



Em um balão de fundo redondo contendo 1,0 mL de DMF anidro foram adicionados o 4-*alquil*-5-fenil-1,2,4-triazol-3-tiol desejado (1,1 eq., 0,484 mmol) e *terc*-butóxido de potássio (56 mg, 1,1 eq., 0,484 mmol). Em seguida, foi adicionado o 1,3-dibromopropano (22,6 μL , 0,5 eq., 0,22 mmol) e foram agitados a temperatura ambiente por 30 minutos, revelador: Lâmpada UV 254 nm. Ao término da reação o meio foi diluído em 15 mL de AcOEt e lavado com 3x10 mL de Água e 1x10 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotativo. O bruto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO_2 ; R_f = 0,25; 95:5 AcOEt: MeOH) com rendimentos entre 33-44%.

1,3-bis((4-*alil*-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)propano (60.1)

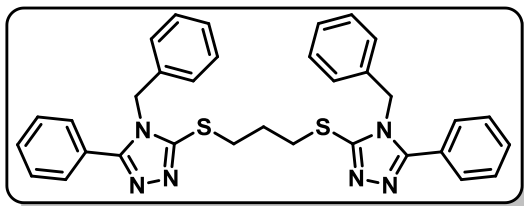


O produto se apresentou como um óleo viscoso e incolor em rendimento de 33%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,62-7,59 (m, 4H), 7,47-7,42 (m, 6H), 5,89 (ddt, J^3 = 4,82 Hz, 10,6 Hz e 17,5 Hz, 2H), 5,30 (dt, J^3 = 1,1 Hz e 10,5 Hz, 2H), 4,98 (dt, J^3 = 1,1 Hz e 17,3 Hz, 2H), 4,55 (dt, J^3 = 1,1 Hz e 17,3 Hz, 2H), 3,40 (t, J^3 = 7,05 Hz, 2H) e 2,31 (qu, J^3 = 7,05 Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 156,0 (C_0), 151,6 (C_0), 131,6 (CH), 130,3 (CH), 128,9 (CH), 128,7 (CH), 127,1 (CH), 118,3 (CH), 46,8 (CH_2), 31,8 (CH_2) e 29,4 (CH_2).

1,3-bis((4-*benzil*-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)propano (60.2)



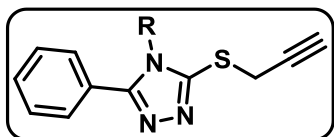
O produto se apresentou como sólido branco em rendimento de 44%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,52-7,50 (m, 4H), 7,46-7,38 (m, 6H), 7,33-7,28 (m, 6H), 6,99-6,97 (m, 4H), 5,2 (s, 4H), 3,3 (t, $J^3 = 6,98$ Hz, 2H) e 2,2 (qu, $J^3 = 6,98$ Hz, 2H).

RMN de C^{13} (100 MHz, DMSO- d_6): 156,4 (C_0), 151,8 (C_0), 135,2 (CH), 130,3 (CH), 128,3 (CH), 127,1 (CH), 126,4 (CH), 48,0 (CH_2), 31,9 (CH_2), 29,2 (CH_2).

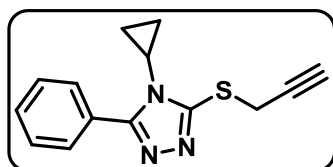
HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{S}_2\text{H}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 575,20461, encontrado 575,20496.

4-alkil-3-fenil-5-(prop-2-in-1-iltio)-1,2,4-triazol (62).



Em um balão reacional sob agitação foram solubilizados o núcleo tiol desejado, 4-ciclopropil-3-fenil-5-(prop-2-in-1-iltio)-1,2,4-triazol ou 4-*H*-3-fenil-5-(prop-2-in-1-iltio)-1,2,4-triazol (1 eq., 2 mmol) e carbonato de potássio (415 mg, 1,5 eq., 3 mmol) em 10 mL de THF anidro. Em seguida, foi adicionado o brometo de propargila (245 μL , 1,1 eq., 2,2 mmol) e foram mantidos sob temperatura ambiente por 2 horas, revelador: vanilina, mancha amarelo claro. Ao término da reação, o meio foi diluído em 10 mL de AcOEt e, em seguida, lavado com 3x10 mL de Água e 1x10 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO_2 ; $R_f = 0,3$; 2:1 (Hex:AcOEt) para o produto com ciclopropil) e SiO_2 ; $R_f = 0,3$; 2:1 (Hex:AcOEt) para o produto com NH livre), com rendimentos de 57-77%.

4-ciclopropil-3-fenil-5-(prop-2-in-1-iltio)-1,2,4-triazol (62.1).

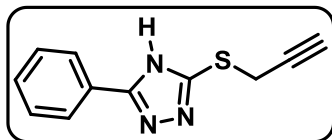


O produto se apresentou como um sólido branco em rendimento de 57%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,80-7,78 (m, 2H), 7,52-7,44 (m, 3H), 4,11 (d, $J^3 = 2,67$ Hz, 2H), 3,53 (m, 1H), 3,20 (t, $J^3 = 2,67$ Hz, 1H), 1,02-0,98 (m, 2H) e 0,62-0,58 (m, 2H).

RMN de C^{13} (100 MHz, DMSO- d_6): 155,0 (C_0), 151,5 (C_0), 129,7 (CH), 128,4 (CH), 128,3 (CH), 127,2 (CH), 79,6 (CH), 25,5 (CH_2), 20,0 (CH) e 8,66 (CH).

4-*H*-3-fenil-5-(prop-2-in-1-iltio)-1,2,4-triazol (62.2).



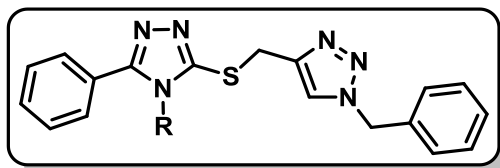
O produto se apresentou como sólido branco em rendimento de 77%.

RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 14,50 (sl, 1H), 7,99-7,96 (m, 2H), 7,53-7,50 (m, 3H), 4,01 (d, $J_3 = 2,20$ Hz, 2H) e 3,19 (t, $J_3 = 2,30$ Hz, 1H).

RMN de C^{13} (100 MHz, DMSO- d_6): O composto se demonstrou instável no solvente empregado para a análise e não foi possível obter espectro de carbono.

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $C_{11}H_9N_3SH^+$ $[M + H]^+$: 216,05899, encontrado 216,05874.

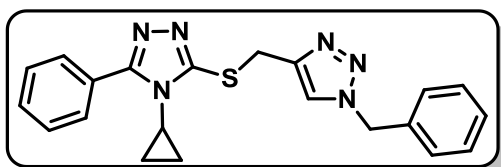
1-benzil-4-(((4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)metil)-1*H*-1,2,3-triazol (61).



Em uma suspensão de 11 mL de uma mistura Água: MeOH (2:1) foram adicionados o 4-alkil-3-fenil-5-(prop-2-in-1-iltio)-1,2,4-triazol (**62.1 e 62.2**) (1 eq., 0,975 mmol), azida

de sódio (69,8 mg, 1,1 eq., 1,07 mmol), brometo de benzila (142 μ L, 1,2 eq., 1,17 mmol) e DIPEA (214 μ L, 1,26 eq., 1,23 mmol). Em paralelo, foram solubilizados em 7 mL de DMF seco sulfato de cobre (46,7 mg, 30 mol%) e ascorbato de sódio (116 mg, 60 mol%) que foram submetidos a 1 hora de borbulhamento sob atmosfera de nitrogênio em ultrassom. Em seguida, o meio de DMF foi cuidadosamente transferido com auxílio de uma seringa para a suspensão e foi mantido sob agitação e temperatura ambiente por 4 horas, revelador: Lâmpada de UV 254 nm. Ao término da reação o meio foi diluído em 25 mL de solução saturada de NaCl e lavado com 3x20 mL de AcOEt. A fase orgânica combinada foi lavada com 3x15 mL de água e 1x20 mL de solução saturada de NaCl. Em sequência, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotativo. O bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO_2 ; $R_f = 0,3$; (AcOEt) para o produto com ciclopropil) e SiO_2 ; $R_f = 0,3$; 1:1 (Hex:AcOEt) para o produto com NH livre), com rendimentos de 40%.

1-benzil-4-(((4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)metil)-1*H*-1,2,3-triazol (61.1).



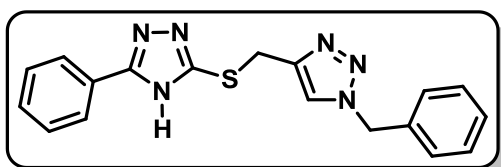
O produto obtido apresentou-se como sólido levemente amarelado com rendimento de 40%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 8,1 (s, 1H), 7,8-7,7 (m, 2H), 7,5-7,4 (m, 3H), 7,4-7,3 (m, 5H), 5,6 (s, 2H), 4,6 (s, 2H), 3,4-3,3 (m, 2H), 0,97-0,94 (m, 2H) e 0,55-0,52 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 155,8 (C_0), 152,4 (C_0), 143,1 (CH), 136,0 (CH), 129,7 (CH), 128,8 (CH), 128,5 (CH), 128,4 (CH), 128,1 (CH), 127,9 (CH), 127,2 (CH), 123,9 (CH), 52,80 (CH_2), 26,4 (CH), 25,5 (CH_2) e 8,70 (CH_2).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 389,15429, encontrado 389,15409.

1-benzil-4-(((4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)metil)-1H-1,2,3-triazol (61.2).

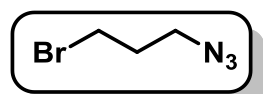


O produto obtido se apresentou como sólido branco e rendimento de 40%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 14,5 (sl, 1H), 8,0 (s, 1H), 7,97-7,96 (m, 2H), 7,51-7,23 (m, 8H), 5,5 (s, 2H) e 4,5 (s, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 135,39 (CH), 128,38 (CH), 128,08 (CH), 127,45 (CH), 127,20 (CH), 125,36 (CH), 122,90 (CH) e 52,11 (CH_2).

3-azido-1-bromopropano (65).



Em um balão de fundo redondo foi adicionado a azida de sódio (260 mg, 1 eq., 6,4 mmol) e 8 mL de DMF seco. Em seguida, foi adicionado 1,3-dibromopropano (328 μL , 2 eq., 12,8 mmol) e foi aquecido até 55 $^\circ\text{C}$ sendo mantido por 16 horas. Com o término da reação, foi adicionado 15 mL de DCM e lavado 3x10 mL de água e 1x10 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto reacional foi submetido a purificação em cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO_2 , 100% *n*-Hexano). O produto se apresentou como um líquido incolor e foi obtido em rendimento de 22% (235 mg).

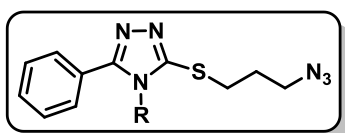
Obs.1: O composto se apresentou muito volátil não sendo possível submeter a bomba de alto vácuo para remoção completa de traços do solvente.

Obs.2: Não foi possível acompanhar a reação por CCD e nem determinar Rf pela volatilidade do produto.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): 3,49 (t, $J^3 = 6,2$ Hz, 2H), 3,48 (t, $J^3 = 6,3$ Hz, 2H) e 2,08 (q, $J^3 = 6,3$ Hz, 2H).

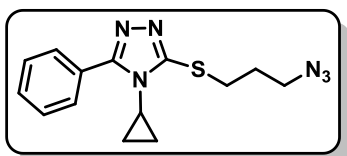
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 49,5 (CH_2), 31,8 (CH_2) e 30,0 (CH_2).

3-((3-azidopropil)tio)-4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol (64).



Em um balão de fundo redondo foi adicionado o núcleo 4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-iona desejado (**48.1** e **57**) (1 eq., 0,224 mmol) e *terc*-butóxido de potássio (25,9 mg, 1 eq., 0,224 mmol) em uma solução de 800 μL de DMF anidro e foram mantidos sob agitação em atmosfera de nitrogênio. Em paralelo, o 3-azido-1-bromopropano foi solubilizado em 200 μL de DMF anidro e adicionado lentamente com seringa ao meio reacional. Com o término da adição, o meio reacional foi aquecido até 40 $^\circ\text{C}$ e mantido por 4 horas, revelador: Vanilina, mancha amarelo claro. Após o término da reação, o meio reacional foi diluído em 15 mL de AcOEt e lavado com 3x10 mL de Água e 1x10 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto reacional foi purificado por cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO_2 ; Rf = 0,37; 1:1 Hex:AcOEt). Os produtos obtidos se apresentaram como sólido e os rendimentos foram de 67-76%.

3-((3-azidopropil)tio)-4-ciclopropil-5-fenil-1,2,4-triazol (64.1).



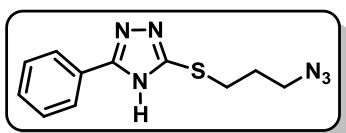
O produto obtido se apresentou como sólido amarelado em rendimento de 76%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 7,76-7,74 (m, 2H), 7,46-7,45 (m, 2H), 3,49 (t, $J^3 = 6,6$ Hz, 2H), 3,49 (t, $J^3 = 7,02$ Hz, 2H), 3,19-3,15 (m, 1H), 2,16 (qu, $J^3 = 6,80$ Hz, 2H), 1,07-1,03 (m, 2H) e 0,71-0,68 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6): 156,20 (C_0), 153,60 (C_0), 129,64 (CH), 128,35 (CH), 127,21 (CH), 49,96 (CH_2), 28,79 (CH_2), 28,62 (CH_2), 25,52 (CH), 9,11 (CH_2).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{SH}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 301,12299, encontrado 301,12274.

3-((3-azidopropil)tio)-4-H-5-fenil-1,2,4-triazol (64.2).



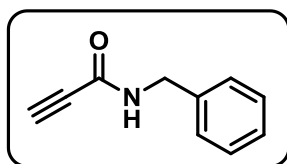
O produto obtido se apresentou como sólido branco em rendimento de 67%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 13,10 (sl, 1H), 7,94-7,21 (m, 2H), 7,42-7,35 (m, 3H), 3,41 (t, $J^3 = 6,5$ Hz, 2H), 3,22 (t, $J^3 = 7,00$ Hz, 2H) e 2,00 (qu, $J^3 = 7,00$ Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 159,32 (C_0), 157,85 (C_0), 130,44 (CH), 129,02 (CH), 128,00 (CH), 127,45 (CH), 126,64 (CH), 49,94 (CH_2), 29,84 (CH_2) e 24,08 (CH_2).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{SH}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 261,09169, encontrado 261,09179.

***N*-benzilpropiolamida (66).**

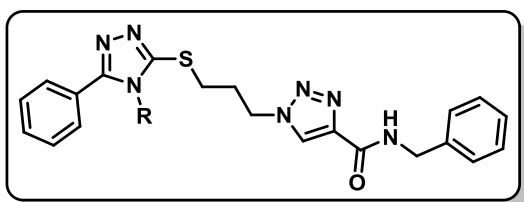


Em um balão foi solubilizado o DCC (1,461 g, 1 eq., 7,08 mmol) e o DMAP (87,4 mg, 10 mol%) e esse meio reacional foi resfriado até 0 °C. Em seguida, a benzilamina (1,016 μL , 1,3 eq., 9,2 mmol) foi adicionada lentamente. Ainda sob baixa temperatura, o ácido propargílico (445 μL , 1eq., 7,08 mmol) é adicionado à solução principal gota a gota em um intervalo de 6 minutos. Com o término da adição, o banho é removido e a reação é mantida sob agitação em temperatura ambiente durante 4 horas, revelador: Permanganato de potássio, mancha amarelo intenso. Ao final da reação, a mistura reacional foi filtrada e concentrado sob pressão reduzida. O bruto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO_2 ; $R_f = 0,5$; 7:3 Hex:AcOEt).

Obs.1: A sequência de adição do ácido e da base devem ser mantidos para que a reação ocorra satisfatoriamente;

Obs.2: Não foi possível realizar total remoção da uréia formada, deste modo, o produto foi submetido para a próxima etapa contendo traços de uréia.

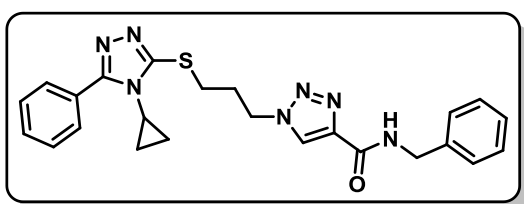
***N*-benzil-1-(3-((4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)propil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (63).**



Em uma solução de 9 mL de uma mistura Água:MeOH (2:1) foi adicionado o 3-((3-azidopropil)tio)-4-alkil-5-fenil-1,2,4-triazol

desejado (**48.1** e **57**) (345 mg, 1 eq., 1,32 mmol), a *N*-benzilpropiolamida (232 mg, 1.1 eq., 1,46 mmol) e a DIPEA (291 μ L, 1,26 eq., 1,67 mmol). Em paralelo, foi adicionado em 6 mL de DMF anidro o sulfato de cobre (63 mg, 30 mol%) e ascorbato de sódio (157 mg, 60 mol%). Em sequência, foi transferido cuidadosamente com auxílio de uma seringa a solução contendo Cobre e ascorbato para a mistura Água:MeOH. O meio reacional foi agitado em temperatura ambiente por 4 horas, revelador: Lâmpada UV 254 nm. Com o término da reação o meio foi diluído em 25 mL de solução saturada de NaCl e lavado com 3x30 mL de AcOEt. A fase orgânica obtida foi lavada com 50 mL de solução saturada de NaCl e em seguida seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto obtido foi solubilizado em 15 mL de NaOH (1M), filtrado e acidificado para pH = 1 com HCl (1M). O produto obtido se apresentou como sólido branco e os rendimentos de 28-33%.

***N*-benzil-1-(3-((4-ciclopropil-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)propil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxamida (63.1).**



O produto apresentou-se como sólido branco em rendimento de 28%.

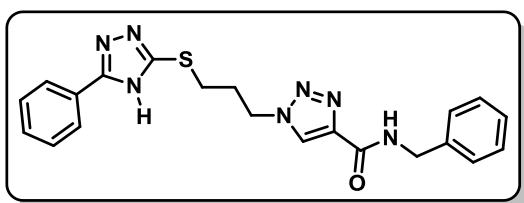
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 8,2 (s, 1H), 7,76-7,74 (m, 2H), 7,48-7,46 (m, 4H),

7,36-7,27 (m, 5H), 4,65 (t, $J^3 = 6,6$ Hz, 2H), 4,61 (t, $J^3 = 7,0$ Hz, 2H), 3,3 (t, $J^3 = 6,8$ Hz, 2H), 3,17-3,14 (m, 1H), 2,6 (qu, $J^3 = 7,0$ Hz, 2H), 1,07-1,02 (m, 2H) e 0,72-0,68 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 160,0 (C_0), 143,5 (C_0), 138,0 (C_0), 130,0 (CH), 128,8 (CH), 128,7 (CH), 128,6 (CH), 128,0 (CH), 127,2 (CH), 125,8 (CH), 49,3 (CH_2), 43,3 (CH_2), 29,9 (CH_2), 28,5 (CH_2), 25,8 (CH_2) e 9,30 (CH_2).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{OSH}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 461,19476, encontrado 461,19363.

***N*-benzil-1-(3-((4-*alquil*-5-fenil-1,2,4-triazol-3-il)tio)propil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxamida (63.2).**



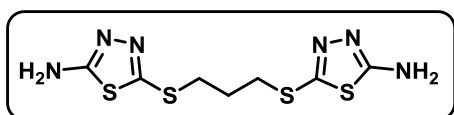
O produto se apresentou como sólido vítreo branco em rendimento de 30%.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 14,5 e 14,11 (s, 1H), 9,0 (t, $J^3 = 6,4$ Hz, 1H), 8,6 (s, 1H), 7,94-7,92 (m, 2H), 7,49-7,20 (m, 9H), 4,56 (t, $J^3 = 7,0$ Hz, 2H), 4,46 (d, $J^3 = 6,4$, 1H), 3,11 (m, 2H) e 2,30 (qu, $J^3 = 7,0$ Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 159,74 (C_0), 142,80 (C_0), 139,60 (C_0), 129,1 (CH), 128,2 (CH), 127,3 (CH), 126,7 (CH), 126,6 (CH), 126,0 (CH), 48,6 (CH_2), 41,9 (CH_2), 30,0 (CH_2).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{OSH}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 420,16011, encontrado 420,15983.

5,5'-(propano-1,3-dilbis(sulfanedil))bis(1,3,4-tiadiazol-2-amino) (75).



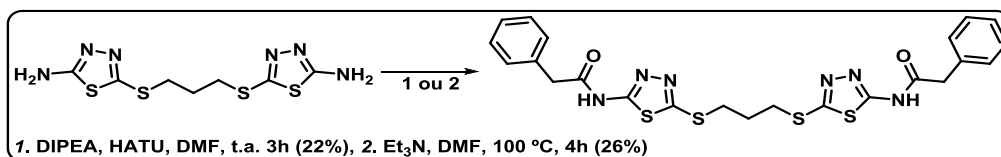
Foi adicionado em um balão de fundo redondo o 5-amino-3-mercapto-1,3,4-tiadiazol (1,0 g, 1 eq., 7,5 mmol) e 25 mL de etanol absoluto. Dissolveu-se

KOH (495 mg, 1 eq., 7,5 mmol) no volume mínimo possível de água e adicionou-se ao balão reacional. Em sequência, adicionou-se o 1,3-dibromopropano (384 μL , 0,5 eq., 3,75 mmol) e o meio reacional foi mantido sob refluxo por 4 horas em agitação, revelador: lâmpada UV 254 nm. Ao término da reação, o solvente foi removido sob pressão reduzida e adicionou-se 50 mL de HCl (1M). Logo após, a solução teve seu pH aumentado até pH = 9,0 com NaOH (1M) e o precipitado foi filtrado em funil de Büchner. O produto se apresentou como sólido branco e foi obtido em 67% (766 mg).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,30 (s, 4H); 3,14 (t, $J^3 = 7,06$ Hz, 4H) e 1,99 (qu, $J^3 = 7,06$ Hz, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 169,68 (C_0), 149,62 (C_0), 32,86 (CH_2) e 29,12 (CH_2).

N,N'-((propano-1,3-diilbis(sulfanedil))bis(1,3,4-tiadiazol-5,2-diil))bis(2-fenilacetamido) (74).



Condição 1: Em uma suspensão de 3 mL de DMF anidro foi adicionado o 5,5'-(propano-1,3-dilbis(sulfanedil))bis(1,3,4-tiadiazol-2-amino) (153 mg, 1 eq., 0,5 mmol)

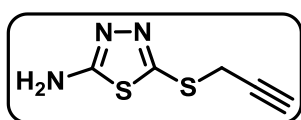
e o ácido fenil acético (151 mg, 2,2 eq., 1,1 mmol) e resfriado até 0 ° C. Paralelamente, foi preparada uma solução de 2 mL de DMF contendo DIPEA (261 µL, 3 eq., 1,5 mmol) e HATU (392 mg, 2 eq., 1,0 mmol) e foram transferidos gota a gota para o balão previamente resfriado. Ao término da reação, o meio reacional foi diluído em 15 mL de AcOEt em seguida foi lavado com 3x10 mL de H₂O destilada e 1x10 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. O bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO₂; 9:1 CHCl₃:MeOH; R_f = 0,5). O produto se apresentou como sólido branco e foi obtido em 22% (59,0 mg).

Condição 2: Em uma solução de 1,5 mL de DMF anidro, foi adicionado o 5,5'-(propano-1,3-dilbis(sulfanedil))bis(1,3,4-tiadiazol-2-amino) (153 mg, 1 eq., 0,5 mmol) e Et₃N (174 µL, 2,5 eq., 1,25 mmol). Em seguida, a suspensão foi submetida à 0 ° C e o cloreto fenil acético (165 µL, 2,5 eq., 1,25 mmol). Após o término da adição, o meio reacional foi aquecido até 100 ° C por, aproximadamente, 2 horas, revelador: UV 254. Ao término da reação, foi diluído com 15 mL de AcOEt, em seguida foi lavado com 3x10 mL de H₂O destilada e 1x10 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto foi solubilizado em NaOH (1M), acidificado até pH = 7,0 com HCl (1M), deixado descansar por 15 minutos e em seguida filtrado sob vácuo. O produto se apresentou como um sólido branco e foi obtido em 26% (70 mg).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 12,8 (s, 2H), 7,34-7,24 (m, 10H), 3,8 (s, 4H), 3,31 (t, J³ = 7,05 Hz, 4H) e 2,08 (qu, J³ = 7,05 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆): 169,70 (C₀); 158,96 (C₀); 158,07(C₀); 134,52 (CH); 129,27 (CH); 128,40 (CH); 126,89 (CH); 41,47 (CH₂); 32,16 (CH₂) e 28,85 (CH₂).

5-(prop-2-in-1-iltio)-1,3,4-tiadiazol-2-amino (78).



Em um balão de fundo redondo adicionou-se o 5-amino-3-mercapto-1,3,4-tiadiazol (799 mg, 3 eq., 6 mmol) e carbonato de potássio (829 mg, 3 eq., 6 mmol) e foram solubilizados em 15 mL de THF anidro. Em sequência, foi adicionado o brometo de propargila (223 µL, 1 eq., 2 mmol), mantidos sob agitação e temperatura ambiente por 3 horas, relevador: Vanilina com mancha amarelo intenso. Com o término da reação, o meio foi transferido

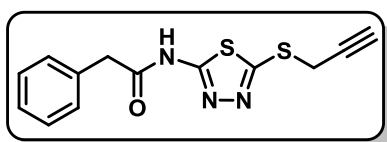
para um funil de separação e lavado com 3x10 mL de NaOH (1M). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO₂; 1:2 Hexano: AcOEt; R_f = 0,25). O produto se apresentou como sólido amarelado brilhante e foi obtido em 82% (282,3 mg).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 7,4 (s, 2H); 3,8 (d, J³ = 2,60 Hz, 2H) e 3,29 (t, J³ = 2,60 Hz, 1H).

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆): 170,50 (C₀), 148,30 (C₀), 79,66 (C₀), 75,05 (CH) e 22,82 (CH₂).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para C₅H₅N₃S₂H⁺ [M + H]⁺ : 171,99977, encontrado 171,99956.

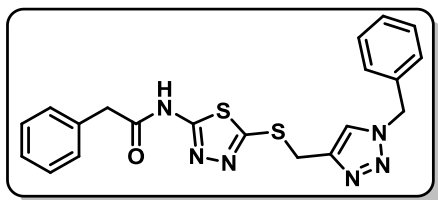
2-fenil-N-(5-(prop-2-in-1-iltio)-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamido (77).



Solubilizou-se em um balão reacional o 5-(prop-2-in-1-iltio)-1,3,4-tiadiazol-2-amino (282 mg, 1 eq., 1,65 mmol) e Et₃N (345 µL, 1,5 eq., 2,47 mmol) em 8,5 mL de THF anidro. Em seguida o meio reacional foi resfriado até 0 °C e o cloreto de fenil acético (436 µL, 2,0 eq., 3,46 mmol) foi adicionado gota a gota. Logo após o término da adição, o banho foi removido, permitindo que o meio aquecesse até temperatura ambiente e agitada por 2 horas, revelador: Permanganato de potássio. A mistura reacional foi diluída com 15 mL de AcOEt e lavada com 3x10 mL de água destilada e 1x10 mL de solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica *flash* (SiO₂; 2:1 Hexano:AcOEt; R_f = 0,3). O produto obtido se apresentou como sólido branco e foi obtido em 63% (300 mg).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para C₂₀H₁₇N₆OS₂H⁺ [M + H]⁺ : 423,10563, encontrado 423,10536.

N-(5-(((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-2-fenilacetamido (76).



Em uma solução de 11 mL de uma mistura Água: MeOH (2:1) foram adicionados 2-fenil-N-(5-(prop-2-in-1-iltio)-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamido (1 eq.,

0,975 mmol), azida de sódio (69,8 mg, 1,1 eq., 1,07 mmol), brometo de benzila (142 μ L, 1,2 eq., 1,17 mmol) e DIPEA (214 μ L, 1,26 eq., 1,23 mmol). Em paralelo, foram solubilizados em DMF seco sulfato de cobre (46,7 mg, 30 mol%) e ascorbato de sódio (116 mg, 60 mol%) que foram submetidos a 1 hora de borbulhamento sob atmosfera de nitrogênio em ultrassom. Em seguida, o meio de DMF foi cuidadosamente transferido com auxílio de uma seringa para a suspensão e foi mantido sob agitação e temperatura ambiente por 4 horas, revelador: Lâmpada de UV 254 nm. Ao término da reação, o meio reacional foi diluído em 25 mL de Brine e lavado com 3x20 mL de AcOEt. A fase orgânica combinada foi lavada com 3x15 mL de água e 1x20 mL de solução saturada de NaCl. Em sequência, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O bruto obtido foi solubilizado em NaOH (1M) e em seguida, foi acidificado com HCl (1M). O produto se apresentou como sólido branco levemente amarelado e foi obtido em 27% (113 mg).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 13,0 (s, 1H), 7,40-7,38 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 5H), 7,16-7,14 (m, 2H), 5,40 (s, 2H), 4,53 (s, 2H) e 3,95 (s, 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 169,6 (C_0), 161,0 (C_0), 159,6 (C_0), 143,8 (CH), 134,5 (CH), 133,6 (CH), 129,5 (CH), 129,2 (CH), 129,0 (CH), 128,9 (CH), 128,0 (CH), 127,7 (CH), 122,6 (CH), 54,2 (CH_2), 42,8 (CH_2) e 28,6 (CH_2).

HRMS (ESI TOF-MS) m/z calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{OS}_2\text{H}^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 423,10563, encontrado 423,10536.

Métodos para os ensaios biológicos

Glutaminase isolada

O ensaio de atividade enzimática é baseado em uma reação acoplada à reação da glutaminase, gerando um produto detectável por espectrofotometria de luz visível. Foi preparado um mix contendo 50 mM tampão tris-acetato (pH 8,6), 0,19 mM EDTA, 20 mM K_2HPO_4 , 2 mM NAD^+ , 2,5 mU/ μ L GDH, 5 nM GAC WT. Os compostos foram diluídos em serie e encubados por 1 hora a temperatura ambiente com a enzima. A glutamina a 7,5 mM foi acrescida da reação e as reações foram feitas em triplicata, em uma placa de 96 poços com volume final de 200 μ L. Para a leitura dos poços, foi usado o leitor de microplacas EnVision. Como controle positivo de inibição foi utilizado o inibidor CB-839. As porcentagens de inibição foram calculadas considerando-se a velocidade da reação na ausência dos compostos utilizando o Software de análise GraphPad Prism.

Cultura celular e ensaio de citotoxicidade

HaCat (imortalizada, mas não transformada, linha de célula epitelial) foi cultivada no meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) com alto teor de glicose, suplementada com 1% de penicilina G-estreptomicina (Invitrogen) e 10% de soro bovino fetal inativado (FBS, VitroCell) a 37 °C e 5% de CO₂. HCT-116 (linhagem celular de carcinoma de cólon humano) foi cultivado em McCoy 5A (Sigma) e suplementado com 1% de penicilina G-estreptomicina (Invitrogen) e 10% de soro bovino fetal inativado (FBS, VitroCell) a 37 °C e 5% de O₂. MDA-MB-231 (linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano) foi cultivado em Leibowitz L15 (VitroCell), suplementado com 1% de penicilina G-estreptomicina (Invitrogen) e 10% de soro bovino fetal inativado (FBS, VitroCell) a 37 °C e 100% de ar.

Os compostos foram preparados em DMSO (Solução estoque de 50 mM para os compostos **74**, **61.2**, **63.1**, **63.2**, **76** e 25 mM para **61.1** e **60.2**) e transferidos (30 µL) para a 3ª e 13ª coluna em uma placa de 384 poços (Greiner Bio-One) em 3 replicatas utilizando manipulador de líquidos Janus Varispan (PerkinElmer). Diluições em série foram preparadas utilizando o manipulador de líquidos da Versette (Thermo) em 10 pontos com um fator de diluição de 0,25 (Padrão de concentração final contidos no intervalo de 50 mM até 0,19 µM) em DMSO. A 2ª e a 23ª coluna das curvas de diluição continham apenas DMSO e foi usado para controle negativo. Paclitaxel foi utilizado como composto de referência citotóxico contido dentro do grupo de controle positivo.

As células foram adicionadas à uma placa de 384 poços (µClear Greiner Bio-One) nas densidades de 1500 (HaCat), 1000 (HCT-116) e 2000 (MDA-MB-231) utilizando 55 µL do meio cultivado por 24 horas nas condições mencionadas acima. Após 24h, os compostos (2,0 µL) foram transferidos para a placa de diluição contendo o meio adequado de acordo com a linhagem de célula (50 µL) utilizando o Dispenser de líquidos Janus MDT (PerkinElmer). Os compostos diluídos em foram transferidos para as placas que continham as células e incubados por 48 horas nas condições recomendadas para cada linhagem celular. Ao final, a concentração de DMSO nos ensaios celulares permeou 0,4%.

Hoechst 33342 (Invitrogen) foi dissolvido em água ultrapura na concentração de 10 mg/mL. A concentração de 5 µg/mL da solução de Hoechst foi preparada em meio pré-aquecido (DMEM, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina ou McCoy 5A, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina ou Leibowitz L15, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina). O meio foi removido das placas em 50 µL e uma solução

colorida foi adicionado e incubado por 40 minutos nas condições recomendadas para cada linhagem celular. O meio foi removido das placas e 3,7% de formaldeído (em PBS) foi adicionado para fixação celular. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos, em sequência, os poços foram lavados com 50 μ L de 1x PBS. A imagem celular foi realizada com *Operetta High-Content Imaging System* (PerkinElmer) multiplicado por um fator de 10x. O número de células foi quantificado através do software Columbus 2.4.0 (PerkinElmer). Os dados processados foram transferidos para o software Prism (Graph Pad, San Diego, v8). As curvas de resposta em concentração foram construídas utilizando a concentração final dos compostos nos ensaios em escala logarítmica, e nos valores máximos $\pm$ MEV com o número de células normalizadas (normalizado em relação ao grupo de controle negativo contido na placa, referido como 100% da população) em cada concentração para cada composto. Cada experimento foi realizado em 3 replicatas. As curvas foram determinadas utilizando a equação normalizada de concentração-resposta apresentada pelo Prism 8. Ao menos três experimentos independentes com diferentes células foram realizados. Os valores de IC50 reportados são $\pm$ MEV desses experimentos independentes.

Métodos de docagem molecular

As estruturas tridimensionais dos ligantes foram geradas modificando a estrutura cristalográfica do BPTES complexado à glutaminase humana (Código de identificação no *Protein Data Bank* 3UO9). As estruturas foram desenhadas no programa Discovery Studio Visualizer desenvolvido pela BIOVIA em 2016, modificando os substituintes originais no BPTES, sendo as geometrias finais dos compostos então refinadas por minimização de energia usando o *Merck Molecular Force Field*.⁹⁶

Como a estrutura da glutaminase complexada ao BPTES está disponível apenas com uma resolução de 2,30 Å,⁶⁴ o modelo cristalográfico está propenso a apresentar as cadeias laterais de alguns aminoácidos ausentes.⁹⁷ Consequentemente, utilizou-se o módulo *DockPrep* do programa *UCFS Chimera*⁹⁸ para completar essas cadeias laterais a partir da biblioteca de rotâmeros de Dunbrack,⁹⁹ bem como para atribuir as cargas adequadas aos resíduos de aminoácidos, entre algumas outras tarefas menores.

A estrutura proteica foi então carregada no software GOLD 5.6 para a realização das simulações de *docking* molecular. GOLD é um programa amplamente utilizado pela indústria farmacêutica, desenvolvido através de uma colaboração entre a Universidade

de Sheffield (Sheffield, Reino Unido), GlaxoSmithKline (Londres, Reino Unido) e *Cambridge Crystallographic Data Center*. As simulações foram realizadas dentro de uma esfera com 12 Å de raio, para a qual o centro geométrico foi determinado a partir do ligante cristalográfico. GOLD utiliza algoritmos de amostragem genética, inspirados na teoria da evolução de Darwin,¹⁰⁰ sendo que 100 ciclos de amostragem foram empregados para cada ligante, com uma eficiência de busca de 100%. A função de escore GoldScore foi definida para o ranqueamento das poses já que foi a que produziu os melhores resultados nas simulações de *redocking* do ligante cristalográfico, resultando num desvio quadrático médio de átomos pesados de 1,58 Å, o qual foi considerado como apropriado.¹⁰¹

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Cabrele, C.; Reiser, O. The Modern Face of Synthetic Heterocyclic Chemistry. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (21), 10109–10125. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02034>.
- (2) Lamberth, C. Heterocyclic Chemistry in Crop Protection. *Pest Management Science* **2013**, *69* (10), 1106–1114. <https://doi.org/10.1002/ps.3615>.
- (3) Qadir, T.; Amin, A.; Sharma, P. K.; Jeelani, I.; Abe, H. A Review on Medicinally Important Heterocyclic Compounds. *The Open Medicinal Chemistry Journal* **2022**, *16* (1). <https://doi.org/10.2174/18741045-v16-e2202280>.
- (4) Martins, R. T.; Almeida, D. B. de; Monteiro, F. M. do R.; Kowacs, P. A.; Ramina, R. Receptores opioides até o contexto atual. *Rev. dor* **2012**, *13*, 75–79. <https://doi.org/10.1590/S1806-00132012000100014>.
- (5) Larsen, R. D.; King, A. O.; Chen, C. Y.; Corley, E. G.; Foster, B. S.; Roberts, F. E.; Yang, C.; Lieberman, D. R.; Reamer, R. A.; Tschaen, D. M.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J.; Lo, Y. S.; Rossano, L. T.; Brookes, A. S.; Meloni, D.; Moore, J. R.; Arnett, J. F. Efficient Synthesis of Losartan, A Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonist. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (21), 6391–6394. <https://doi.org/10.1021/jo00100a048>.
- (6) *Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico 2020 — Português (Brasil)*. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/cmmed/anuario-estatistico-2019-versao-para-impressao.pdf/view> (accessed 2022-12-07).
- (7) Jampilek, J. Heterocycles in Medicinal Chemistry. *Molecules* **2019**, *24* (21), 3839. <https://doi.org/10.3390/molecules24213839>.
- (8) Giraudo, A.; Krall, J.; Bavo, F.; Nielsen, B.; Kongstad, K. T.; Rolando, B.; De Blasio, R.; Gloriam, D. E.; Löffler, R.; Thiesen, L.; Harpsøe, K.; Frydenvang, K.; Boschi, D.; Wellendorph, P.; Lolli, M. L.; Jensen, A. A.; Frølund, B. Five-Membered N-Heterocyclic Scaffolds as Novel Amino Bioisosteres at γ -Aminobutyric Acid (GABA) Type A Receptors and GABA Transporters. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (12), 5797–5809. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00026>.
- (9) Reed, C. W.; McGowan, K. M.; Spearing, P. K.; Stansley, B. J.; Roenfan, H. F.; Engers, D. W.; Rodriguez, A. L.; Engelberg, E. M.; Luscombe, V. B.; Loch, M. T.; Remke, D. H.; Rook, J. M.; Blobaum, A. L.; Conn, P. J.; Niswender, C. M.; Lindsley, C. W. VU6010608, a Novel MGlu7 NAM from a Series of N-(2-(1H-1,2,4-Triazol-1-yl)-5-(Trifluoromethoxy)Phenyl)Benzamides. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (12), 1326–1330. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00429>.
- (10) Reed, C. W.; Washecheck, J. P.; Quitlag, M. C.; Jenkins, M. T.; Rodriguez, A. L.; Engers, D. W.; Blobaum, A. L.; Conn, P. J.; Niswender, C. M.; Lindsley, C. W. Surveying Heterocycles as Amide Bioisosteres within a Series of MGlu7 NAMs: Discovery of VU6019278. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *29* (10), 1211–1214. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.016>.
- (11) Constantino, A. F.; Francisco, C. S.; Cubides-Roman, D. C.; Jr, V. L. Hetero-Diels-Alder Reactions in the Synthesis of Biologically Active Nitrogen Compounds: A Review. *Current Organic Synthesis* **15** (1), 84–104.
- (12) Diels, O.; Alder, K. Synthesen in Der Hydroaromatischen Reihe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1928**, *460* (1), 98–122. <https://doi.org/10.1002/jlac.19284600106>.
- (13) Manzanaro, S.; Vicent, M. J.; Martín, M. J.; Salvador-Tormo, N.; Pérez, J. M.; del Mar Blanco, M.; Avendaño, C.; Menéndez, J. C.; de la Fuente, J. Á. Synthesis and Biological Evaluation of New 1,5-Diazaanthraquinones with Cytotoxic Activity.

- Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (24), 6505–6515. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.09.021>.
- (14) Wang, H.; Goodman, S. N.; Dai, Q.; Stockdale, G. W.; Clark, W. M. Jr. Development of a Robust Ring-Closing Metathesis Reaction in the Synthesis of SB-462795, a Cathepsin K Inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12* (2), 226–234. <https://doi.org/10.1021/op700288p>.
- (15) Yu, M.; Lou, S.; Gonzalez-Bobes, F. Ring-Closing Metathesis in Pharmaceutical Development: Fundamentals, Applications, and Future Directions. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22* (8), 918–946. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00093>.
- (16) Yavari, I.; Shirgahi-Talari, F.; Hossaini, Z.; Sabbaghan, M.; Seyfi, S. Synthesis of Functionalized 1,2,4-Triazole-3-Thiones from Ammonium Isothiocyanate, Acid Chlorides, and Arylhydrazines. *Mol. Divers.* **2010**, *14* (4), 763–766. <https://doi.org/10.1007/s11030-009-9218-9>.
- (17) Li, Z.; Gu, Z.; Yin, K.; Zhang, R.; Deng, Q.; Xiang, J. Synthesis of Substituted-Phenyl-1,2,4-Triazol-3-Thione Analogues with Modified d-Glucopyranosyl Residues and Their Antiproliferative Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44* (11), 4716–4720. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.030>.
- (18) Pagliai, F.; Pirali, T.; Del Grosso, E.; Di Brisco, R.; Tron, G. C.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Rapid Synthesis of Triazole-Modified Resveratrol Analogues via Click Chemistry. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 467–470. <https://doi.org/10.1021/jm051118z>.
- (19) Alam, M. M. 1,2,3-Triazole Hybrids as Anticancer Agents: A Review. *Arch Pharm (Weinheim)* **2022**, *355* (1), e2100158. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100158>.
- (20) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (21) Meldal, M.; Diness, F. Recent Fascinating Aspects of the CuAAC Click Reaction. *Trends in Chemistry* **2020**, *2* (6), 569–584. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2020.03.007>.
- (22) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 666–676. <https://doi.org/10.1021/ar200148z>.
- (23) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (24) Bertozzi, C. A Special Virtual Issue Celebrating the 2022 Nobel Prize in Chemistry for the Development of Click Chemistry and Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent. Sci.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.2c01430>.
- (25) Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. Strain-Promoted Alkyne–Azide Cycloadditions (SPAAC) Reveal New Features of Glycoconjugate Biosynthesis. *ChemBioChem* **2011**, *12* (12), 1912–1921. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100117>.
- (26) Mandalapu, D.; Saini, K. S.; Gupta, S.; Sharma, V.; Yaseen Malik, Mohd.; Chaturvedi, S.; Bala, V.; Hamidullah; Thakur, S.; Maikhuri, J. P.; Wahajuddin, M.; Konwar, R.; Gupta, G.; Sharma, V. L. Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Triazole Hybrids of Curcumin Mimics and Their Selective Anticancer

- Activity against Breast and Prostate Cancer Cell Lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26* (17), 4223–4232. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.053>.
- (27) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2* (10), 565–598. <https://doi.org/10.1002/anie.196305651>.
- (28) Sustmann, R. A Simple Model for Substituent Effects in Cycloaddition Reactions. I. 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Tetrahedron Letters* **1971**, *12* (29), 2717–2720. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)96961-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96961-8).
- (29) Chen, P.-P.; Ma, P.; He, X.; Svatunek, D.; Liu, F.; Houk, K. N. Computational Exploration of Ambiphilic Reactivity of Azides and Sustmann's Paradigmatic Parabola. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (8), 5792–5804. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00239>.
- (30) Houk, K. N.; Sims, Joyner.; Duke, R. E.; Strozier, R. W.; George, J. K. Frontier Molecular Orbitals of 1,3 Dipoles and Dipolarophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (22), 7287–7301. <https://doi.org/10.1021/ja00803a017>.
- (31) Houk, K. N. Frontier Molecular Orbital Theory of Cycloaddition Reactions. *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8* (11), 361–369. <https://doi.org/10.1021/ar50095a001>.
- (32) Glaser, C. Beiträge Zur Kenntniss Des Acetenylbenzols. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1869**, *2* (1), 422–424. <https://doi.org/10.1002/cber.186900201183>.
- (33) Chinchilla, R.; Nájera, C. Recent Advances in Sonogashira Reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (10), 5084–5121. <https://doi.org/10.1039/C1CS15071E>.
- (34) Vilhelmsen, M. H.; Jensen, J.; Tortzen, C. G.; Nielsen, M. B. The Glaser–Hay Reaction: Optimization and Scope Based on ¹³C NMR Kinetics Experiments. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013* (4), 701–711. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201201159>.
- (35) Fornaro, A.; Coichev, N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Quím. Nova* **1998**, *21*, 642–650. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000500017>.
- (36) Finn, M. G.; Fokin, V. V. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC). In *Catalysis without Precious Metals*; John Wiley & Sons, Ltd, 2010; pp 235–260. <https://doi.org/10.1002/9783527631582.ch10>.
- (37) Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. Isolation of a Copper(I) Triazolide: A “Click” Intermediate. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (12), 2101–2103. <https://doi.org/10.1002/anie.200604444>.
- (38) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1229506>.
- (39) Ziegler, M. S.; Lakshmi, K. V.; Tilley, T. D. Dicopper Cu(I)Cu(I) and Cu(I)Cu(II) Complexes in Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (15), 5378–5386. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13261>.
- (40) Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. Isolation of Bis(Copper) Key Intermediates in Cu-Catalyzed Azide-Alkyne “Click Reaction.” *Science Advances* **2015**, *1* (5), e1500304. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500304>.
- (41) Kaur, J.; Saxena, M.; Rishi, N. An Overview of Recent Advances in Biomedical Applications of Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32* (8), 1455–1471. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00247>.

- (42) Liberti, M. V.; Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* **2016**, *41* (3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.
- (43) Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* **1927**, *8* (6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.
- (44) Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123* (3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- (45) Pavlova, N. N.; Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism* **2016**, *23* (1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- (46) Heiden, M. G. V.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, *324* (5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- (47) García-Cañaveras, J. C.; Chen, L.; Rabinowitz, J. D. The Tumor Metabolic Microenvironment: Lessons from Lactate. *Cancer Res* **2019**, *79* (13), 3155–3162. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3726>.
- (48) Nagy, J. A.; Chang, S.-H.; Dvorak, A. M.; Dvorak, H. F. Why Are Tumour Blood Vessels Abnormal and Why Is It Important to Know? *Br J Cancer* **2009**, *100* (6), 865–869. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604929>.
- (49) Crabtree, H. G. Observations on the Carbohydrate Metabolism of Tumours. *Biochem J* **1929**, *23* (3), 536–545.
- (50) Lyssiotis, C. A.; Kimmelman, A. C. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cell Biology* **2017**, *27* (11), 863–875. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.003>.
- (51) DeBerardinis, R. J.; Chandel, N. S. Fundamentals of Cancer Metabolism. *Science Advances* **2016**, *2* (5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>.
- (52) Zhang, J.; Pavlova, N. N.; Thompson, C. B. Cancer Cell Metabolism: The Essential Role of the Nonessential Amino Acid, Glutamine. *The EMBO Journal* **2017**, *36* (10), 1302–1315. <https://doi.org/10.15252/emboj.201696151>.
- (53) Hensley, C. T.; Wasti, A. T.; DeBerardinis, R. J. Glutamine and Cancer: Cell Biology, Physiology, and Clinical Opportunities. *J Clin Invest* **2013**, *123* (9), 3678–3684. <https://doi.org/10.1172/JCI69600>.
- (54) DeBerardinis, R. J.; Cheng, T. Q's next: The Diverse Functions of Glutamine in Metabolism, Cell Biology and Cancer. *Oncogene* **2010**, *29* (3), 313–324. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.358>.
- (55) Cheng, T.; Sudderth, J.; Yang, C.; Mullen, A. R.; Jin, E. S.; Matés, J. M.; DeBerardinis, R. J. Pyruvate Carboxylase Is Required for Glutamine-Independent Growth of Tumor Cells. *PNAS* **2011**, *108* (21), 8674–8679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016627108>.
- (56) Wang, J.-B.; Erickson, J. W.; Fujii, R.; Ramachandran, S.; Gao, P.; Dinavahi, R.; Wilson, K. F.; Ambrosio, A. L. B.; Dias, S. M. G.; Dang, C. V.; Cerione, R. A. Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation. *Cancer Cell* **2010**, *18* (3), 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.009>.
- (57) Yang, L.; Venneti, S.; Nagrath, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2017**, *19* (1), 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>.
- (58) Zimmermann, S. C.; Duvall, B.; Tsukamoto, T. Recent Progress in the Discovery of Allosteric Inhibitors of Kidney-Type Glutaminase. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (1), 46–59. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00327>.
- (59) Yeh, T.-K.; Kuo, C.-C.; Lee, Y.-Z.; Ke, Y.-Y.; Chu, K.-F.; Hsu, H.-Y.; Chang, H.-Y.; Liu, Y.-W.; Song, J.-S.; Yang, C.-W.; Lin, L.-M.; Sun, M.; Wu, S.-H.; Kuo, P.-

- C.; Shih, C.; Chen, C.-T.; Tsou, L. K.; Lee, S.-J. Design, Synthesis, and Evaluation of Thiazolidine-2,4-Dione Derivatives as a Novel Class of Glutaminase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5599–5612. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00282>.
- (60) Seltzer, M. J.; Bennett, B. D.; Joshi, A. D.; Gao, P.; Thomas, A. G.; Ferraris, D. V.; Tsukamoto, T.; Rojas, C. J.; Slusher, B. S.; Rabinowitz, J. D.; Dang, C. V.; Riggins, G. J. Inhibition of Glutaminase Preferentially Slows Growth of Glioma Cells with Mutant IDH1. *Cancer Res* **2010**, *70* (22), 8981–8987. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1666>.
- (61) Yu, W.; Yang, X. Y.; Zhang, Q.; Sun, L.; Yuan, S. T.; Xin, Y. J. Targeting GLS1 to Cancer Therapy through Glutamine Metabolism. *Clinical and Translational Oncology* **2021**, *23* (11), 2253–2268. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02645-2>.
- (62) Xiao, D.; Ren, P.; Su, H.; Yue, M.; Xiu, R.; Hu, Y.; Liu, H.; Qing, G. Myc Promotes Glutaminolysis in Human Neuroblastoma through Direct Activation of Glutaminase 2. *Oncotarget* **2015**, *6* (38), 40655–40666.
- (63) Xu, X.; Meng, Y.; Li, L.; Xu, P.; Wang, J.; Li, Z.; Bian, J. Overview of the Development of Glutaminase Inhibitors: Achievements and Future Directions. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (3), 1096–1115. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00961>.
- (64) DeLaBarre, B.; Gross, S.; Fang, C.; Gao, Y.; Jha, A.; Jiang, F.; Song J., J.; Wei, W.; Hurov, J. B. Full-Length Human Glutaminase in Complex with an Allosteric Inhibitor. *Biochemistry* **2011**, *50* (50), 10764–10770. <https://doi.org/10.1021/bi201613d>.
- (65) Newcomb, R. W. Selective Inhibition of Glutaminase by Bis-Thiadiazoles. US6451828B1, September 17, 2002. <https://patents.google.com/patent/US6451828B1/en> (accessed 2020-10-05).
- (66) Song, M.; Kim, S.-H.; Im, C.; Hwang, H.-J. Recent Development of Small Molecule Glutaminase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2018**, *18*. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180525100830>.
- (67) Barclay, R. K.; Phillipps, M. A. Effects of 6-Diazo-5-Oxo-l-Norleucine and Other Tumor Inhibitors on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Mice. *Cancer Res* **1966**, *26* (2 Part 1), 282–286.
- (68) Thangavelu, K.; Chong, Q. Y.; Low, B. C.; Sivaraman, J. Structural Basis for the Active Site Inhibition Mechanism of Human Kidney-Type Glutaminase (KGA). *Scientific Reports* **2014**, *4* (1), 3827. <https://doi.org/10.1038/srep03827>.
- (69) Grayzel, A. I.; Seegmiller, J. E.; Love, E. SUPPRESSION OF URIC ACID SYNTHESIS IN THE GOUTY HUMAN BY THE USE OF 6-DIAZO-5-OXO-L-NORLEUCINE*. *J Clin Invest* **1960**, *39* (3), 447–454.
- (70) Robinson, M. M.; Mcbryant, S. J.; Tsukamoto, T.; Rojas, C.; Ferraris, D. V.; Hamilton, S. K.; Hansen, J. C.; Curthoys, N. P. Novel Mechanism of Inhibition of Rat Kidney-Type Glutaminase by Bis-2-(5-Phenylacetamido-1,2,4-Thiadiazol-2-Yl)Ethyl Sulfide (BPTES). *Biochemical Journal* **2007**, *406* (3), 407–414. <https://doi.org/10.1042/BJ20070039>.
- (71) Damião, M. C. F. SÍNTESE DE 3-TIO-1,2,4-TRIAZÓIS EM REGIME DE FLUXO CONTÍNUO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA, 2020.
- (72) Shukla, K.; Ferraris, D. V.; Thomas, A. G.; Stathis, M.; Duvall, B.; Delahanty, G.; Alt, J.; Rais, R.; Rojas, C.; Gao, P.; Xiang, Y.; Dang, C. V.; Slusher, B. S.; Tsukamoto, T. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Bis-2-(5-Phenylacetamido-1,2,4-Thiadiazol-2-Yl)Ethyl Sulfide 3 (BPTES) Analogs as

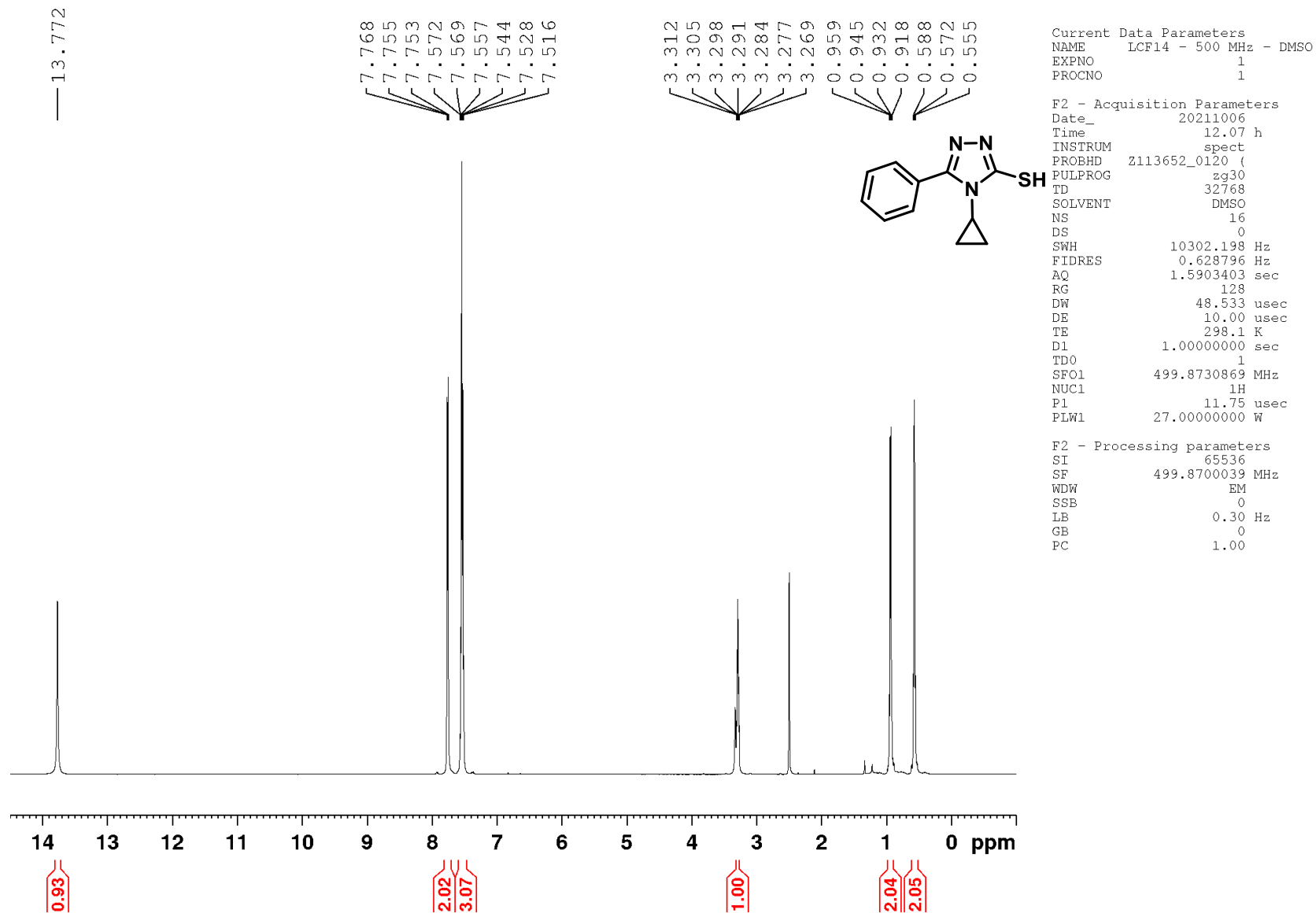
- Glutaminase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (23), 10551–10563. <https://doi.org/10.1021/jm301191p>.
- (73) Zimmermann, S. C.; Wolf, E. F.; Luu, A.; Thomas, A. G.; Stathis, M.; Poore, B.; Nguyen, C.; Le, A.; Rojas, C.; Slusher, B. S.; Tsukamoto, T. Allosteric Glutaminase Inhibitors Based on a 1,4-Di(5-Amino-1,3,4-Thiadiazol-2-Yl)Butane Scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (5), 520–524. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00060>.
- (74) Li, J.; Chen, L.; Goyal, B.; Laidig, G.; STANTON, T. F.; Sjogren, E. B. Heterocyclic Inhibitors of Glutaminase. WO2013078123A1, May 30, 2013. <https://patents.google.com/patent/WO2013078123A1/en> (accessed 2023-01-26).
- (75) Gross, M. I.; Demo, S. D.; Dennison, J. B.; Chen, L.; Chernov-Rogan, T.; Goyal, B.; Janes, J. R.; Laidig, G. J.; Lewis, E. R.; Li, J.; MacKinnon, A. L.; Parlati, F.; Rodriguez, M. L. M.; Shwonek, P. J.; Sjogren, E. B.; Stanton, T. F.; Wang, T.; Yang, J.; Zhao, F.; Bennett, M. K. Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* **2014**, *13* (4), 890–901. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0870>.
- (76) Calithera Biosciences, Inc. *A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study Comparing CB-839 in Combination With Everolimus (CBE) vs. Placebo With Everolimus (PboE) in Patients With Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC)*; Clinical trial registration NCT03163667; clinicaltrials.gov, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03163667> (accessed 2023-01-26).
- (77) Francesco, M. E. D.; Jones, P.; Heffernan, T.; Hamilton, M. M.; Kang, Z.; Soth, M. J.; Burke, J. P.; Le, K.; Carroll, C. L.; Palmer, W. S.; Lewis, R.; McAfoos, T.; Czako, B.; Liu, G.; Theroff, J.; Herrera, Z.; Yau, A. Gls1 Inhibitors for Treating Disease. US20160009704A1, January 14, 2016. <https://patents.google.com/patent/US20160009704A1/en?q=US+2016%2f0009704+A1> (accessed 2022-10-31).
- (78) Soth, M. J.; Le, K.; Di Francesco, M. E.; Hamilton, M. M.; Liu, G.; Burke, J. P.; Carroll, C. L.; Kovacs, J. J.; Bardenhagen, J. P.; Bristow, C. A.; Cardozo, M.; Czako, B.; de Stanchina, E.; Feng, N.; Garvey, J. R.; Gay, J. P.; Do, M. K. G.; Greer, J.; Han, M.; Harris, A.; Herrera, Z.; Huang, S.; Giuliani, V.; Jiang, Y.; Johnson, S. B.; Johnson, T. A.; Kang, Z.; Leonard, P. G.; Liu, Z.; McAfoos, T.; Miller, M.; Morlacchi, P.; Mullinax, R. A.; Palmer, W. S.; Pang, J.; Rogers, N.; Rudin, C. M.; Shepard, H. E.; Spencer, N. D.; Theroff, J.; Wu, Q.; Xu, A.; Yau, J. A.; Draetta, G.; Toniatti, C.; Heffernan, T. P.; Jones, P. Discovery of IPN60090, a Clinical Stage Selective Glutaminase-1 (GLS-1) Inhibitor with Excellent Pharmacokinetic and Physicochemical Properties. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (21), 12957–12977. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01398>.
- (79) Yap, T. A.; Dumbrava, E. E.; Rodon Ahnert, J.; Hong, D. S.; Pant, S.; Karp, D. D.; Piha-Paul, S. A. A.; Subbiah, V.; Tsimberidou, A. M.; Fu, S.; Janku, F.; Montez, S.; Ahmad-Taha, M. T.; Guerrero, D.; Nazarenko, N. N.; Moore, Y.; Soth, M.; Kovacs, J.; Heffernan, T. P.; Jones, P. First-in-Human Biomarker-Driven Phase I Trial of the Potent and Selective Glutaminase-1 (GLS1) Inhibitor IACS-6274 (IPN60090) in Patients (Pts) with Molecularly Selected Advanced Solid Tumors. *JCO* **2021**, *39* (15_suppl), 3001–3001. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.3001.
- (80) McDermott, L. A.; Iyer, P.; Vernetti, L.; Rimer, S.; Sun, J.; Bobby, M.; Yang, T.; Fioravanti, M.; O'Neill, J.; Wang, L.; Drakes, D.; Katt, W.; Huang, Q.; Cerione, R.

- Design and Evaluation of Novel Glutaminase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, 24 (8), 1819–1839. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.009>.
- (81) Huang, Q.; Stalneck, C.; Zhang, C.; McDermott, L. A.; Iyer, P.; O'Neill, J.; Reimer, S.; Cerione, R. A.; Katt, W. P. Characterization of the Interactions of Potent Allosteric Inhibitors with Glutaminase C, a Key Enzyme in Cancer Cell Glutamine Metabolism. *J Biol Chem* **2018**, 293 (10), 3535–3545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810101>.
- (82) Xu, X.; Wang, J.; Wang, M.; Yuan, X.; Li, L.; Zhang, C.; Huang, H.; Jing, T.; Wang, C.; Tong, C.; Zhou, L.; Meng, Y.; Xu, P.; Kou, J.; Qiu, Z.; Li, Z.; Bian, J. Structure-Enabled Discovery of Novel Macrocyclic Inhibitors Targeting Glutaminase 1 Allosteric Binding Site. *J. Med. Chem.* **2021**, 64 (8), 4588–4611. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02044>.
- (83) Nigst, T. A.; Antipova, A.; Mayr, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the α -Effect in Hydrazine Reactivities. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (18), 8142–8155. <https://doi.org/10.1021/jo301497g>.
- (84) Almandil, N. B.; Taha, M.; Farooq, R. K.; Alhibshi, A.; Ibrahim, M.; Anouar, E. H.; Gollapalli, M.; Rahim, F.; Nawaz, M.; Shah, S. A. A.; Ahmed, Q. U.; Zakaria, Z. A. Synthesis of Thymidine Phosphorylase Inhibitor Based on Quinoxaline Derivatives and Their Molecular Docking Study. *Molecules* **2019**, 24 (6), 1002. <https://doi.org/10.3390/molecules24061002>.
- (85) Fizer, M.; Slivka, M.; Korol, N.; Fizer, O. Identifying and Explaining the Regioselectivity of Alkylation of 1,2,4-Triazole-3-Thiones Using NMR, GIAO and DFT Methods. *Journal of Molecular Structure* **2021**, 1223, 128973. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128973>.
- (86) Agnew, H. D.; Rohde, R. D.; Millward, S. W.; Nag, A.; Yeo, W.-S.; Hein, J. E.; Pitram, S. M.; Tariq, A. A.; Burns, V. M.; Krom, R. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Heath, J. R. Iterative In Situ Click Chemistry Creates Antibody-like Protein-Capture Agents. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48 (27), 4944–4948. <https://doi.org/10.1002/anie.200900488>.
- (87) Lanz, J.; Riedl, R. Merging Allosteric and Active Site Binding Motifs: De Novo Generation of Target Selectivity and Potency via Natural-Product-Derived Fragments. *ChemMedChem* **2015**, 10 (3), 451–454. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402478>.
- (88) Haddach, A. A.; Kelleman, A.; Deaton-Rewolinski, M. V. An Efficient Method for the N-Debenzylation of Aromatic Heterocycles. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43 (3), 399–402. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)02192-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)02192-X).
- (89) Jaime-Figueroa, S.; Liu, Y.; Muchowski, J. M.; Putman, D. G. Allyl Amines as Ammonia Equivalents in the Preparation of Anilines and Heteroarylamines. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39 (11), 1313–1316. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10877-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10877-2).
- (90) Lazrak, F.; Essassi, E. M.; Rodi, Y. K.; Misbahi, K.; Pierrot, M. Synthèse De Nouveaux Systemes Condenses Renfermant Le 1,2,4-Triazole, La 1,3-Thiazine, La 1,3-Thiazepine Et La 1,3,5,7-Dithiadiazocine. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2004**, 179 (9), 1799–1808. <https://doi.org/10.1080/10426500490466526>.
- (91) Yuan, C.; Yan, J.; Song, C.; Yang, F.; Li, C.; Wang, C.; Su, H.; Chen, W.; Wang, L.; Wang, Z.; Qian, S.; Yang, L. Discovery of [1,2,4]Triazole Derivatives as New Metallo- β -Lactamase Inhibitors. *Molecules* **2020**, 25 (1), 56. <https://doi.org/10.3390/molecules25010056>.

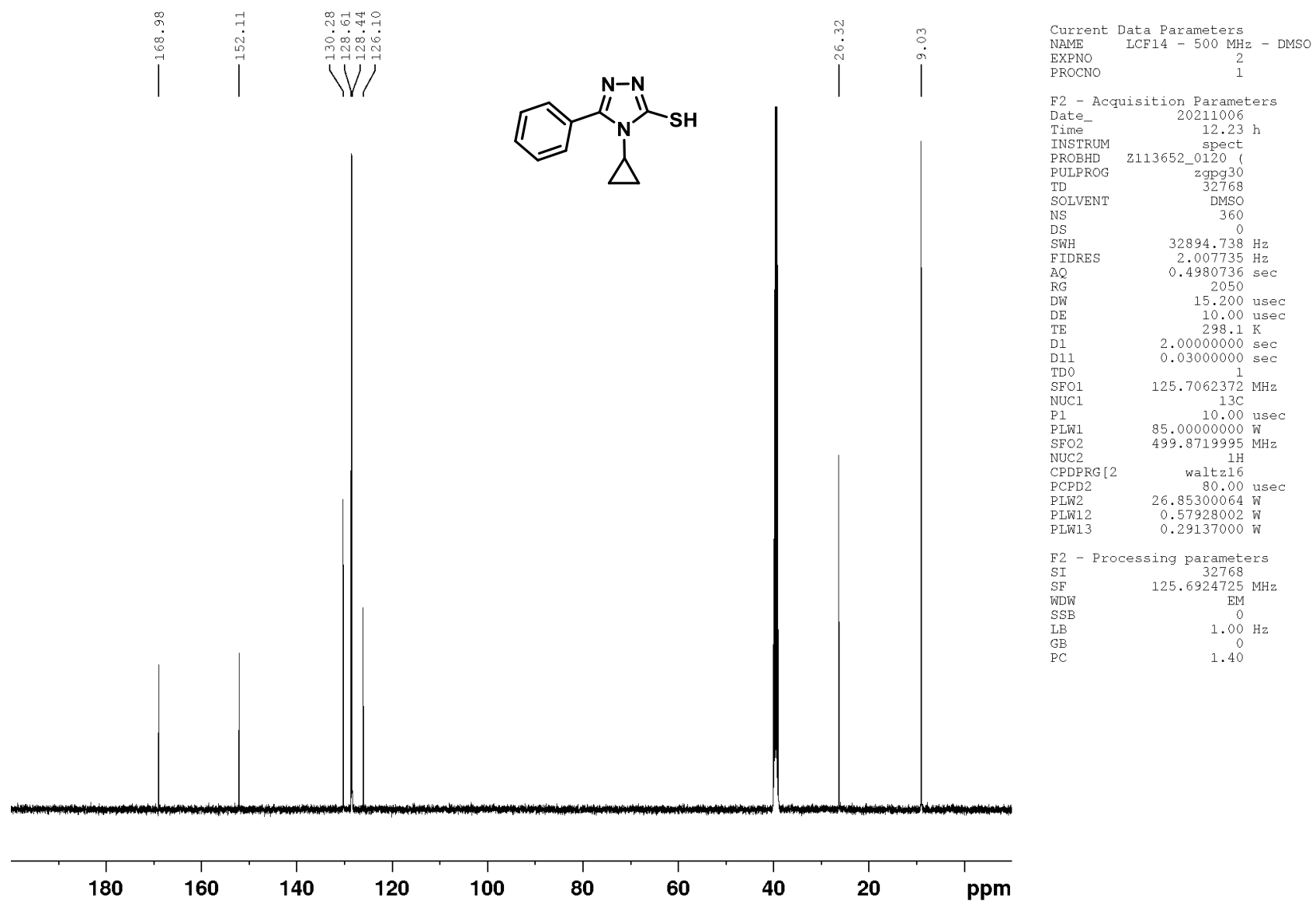
- (92) Dixit, P. P.; Dixit, P. P.; Thore, S. N. Hybrid Triazoles: Design and Synthesis as Potential Dual Inhibitor of Growth and Efflux Inhibition in Tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *107*, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.054>.
- (93) Tomi, I. H. R.; Al-Daraji, Ali. H. R.; Aziz, S. A. Synthesis, Characterization, and Study the Inhibitory Effect of Thiazole and Thiadiazole Derivatives Toward the Corrosion of Copper in Acidic Media. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* **2015**, *45* (4), 605–613. <https://doi.org/10.1080/15533174.2013.841226>.
- (94) Duvall, B.; Zimmermann, S. C.; Gao, R.-D.; Thomas, A. G.; Kalčic, F.; Veeravalli, V.; Elgogary, A.; Rais, R.; Rojas, C.; Le, A.; Slusher, B. S.; Tsukamoto, T. Allosteric Kidney-Type Glutaminase (GLS) Inhibitors with a Mercaptoethyl Linker. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2020**, *28* (20), 115698. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115698>.
- (95) Jäger, G.; Heitzer, H. Eine einfache Synthese von 5-Methyl-4+-[1,3]thiazolo[2,3-b]-1,3, 4-thiadiazolium-2-amidaten. *Synthesis* **1981**, *1981* (9), 704–706. <https://doi.org/10.1055/s-1981-35464>.
- (96) Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (5–6), 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).
- (97) Blow, D. *Outline of Crystallography for Biologists*; Oxford University Press, 2002. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198510512.001.0001>.
- (98) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25* (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- (99) Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L. A Smoothed Backbone-Dependent Rotamer Library for Proteins Derived from Adaptive Kernel Density Estimates and Regressions. *Structure* **2011**, *19* (6), 844–858. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>.
- (100) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking¹¹Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *267* (3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.
- (101) Yusuf, D.; Davis, A. M.; Kleywegt, G. J.; Schmitt, S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (7), 1411–1422. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>.

7. ANEXOS

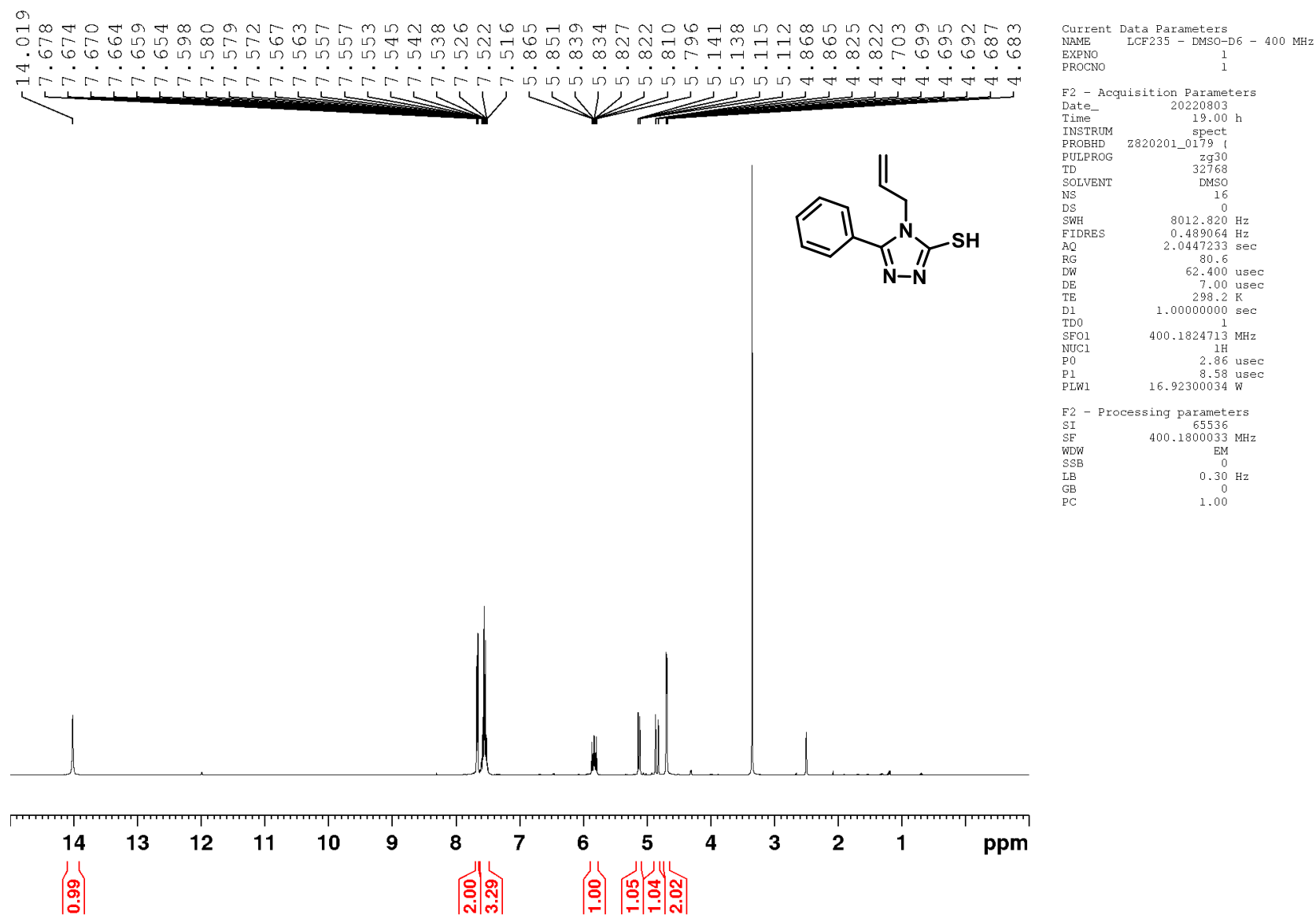
7.1 ESPECTROS DE RMN



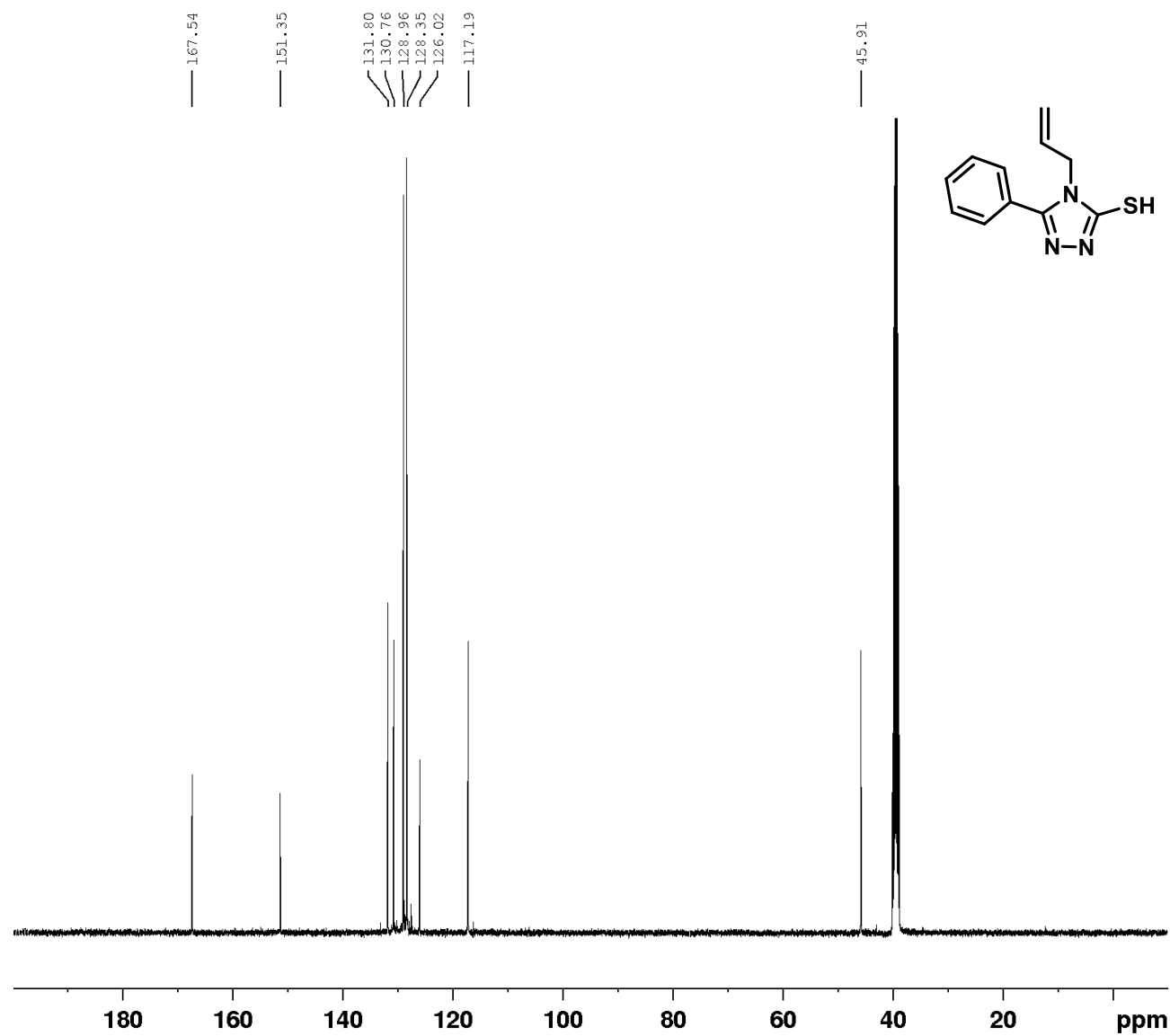
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o composto **48.1**.



Anexo 2. Espectro de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) do composto **48.1**.



Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) para o composto **48.2**.

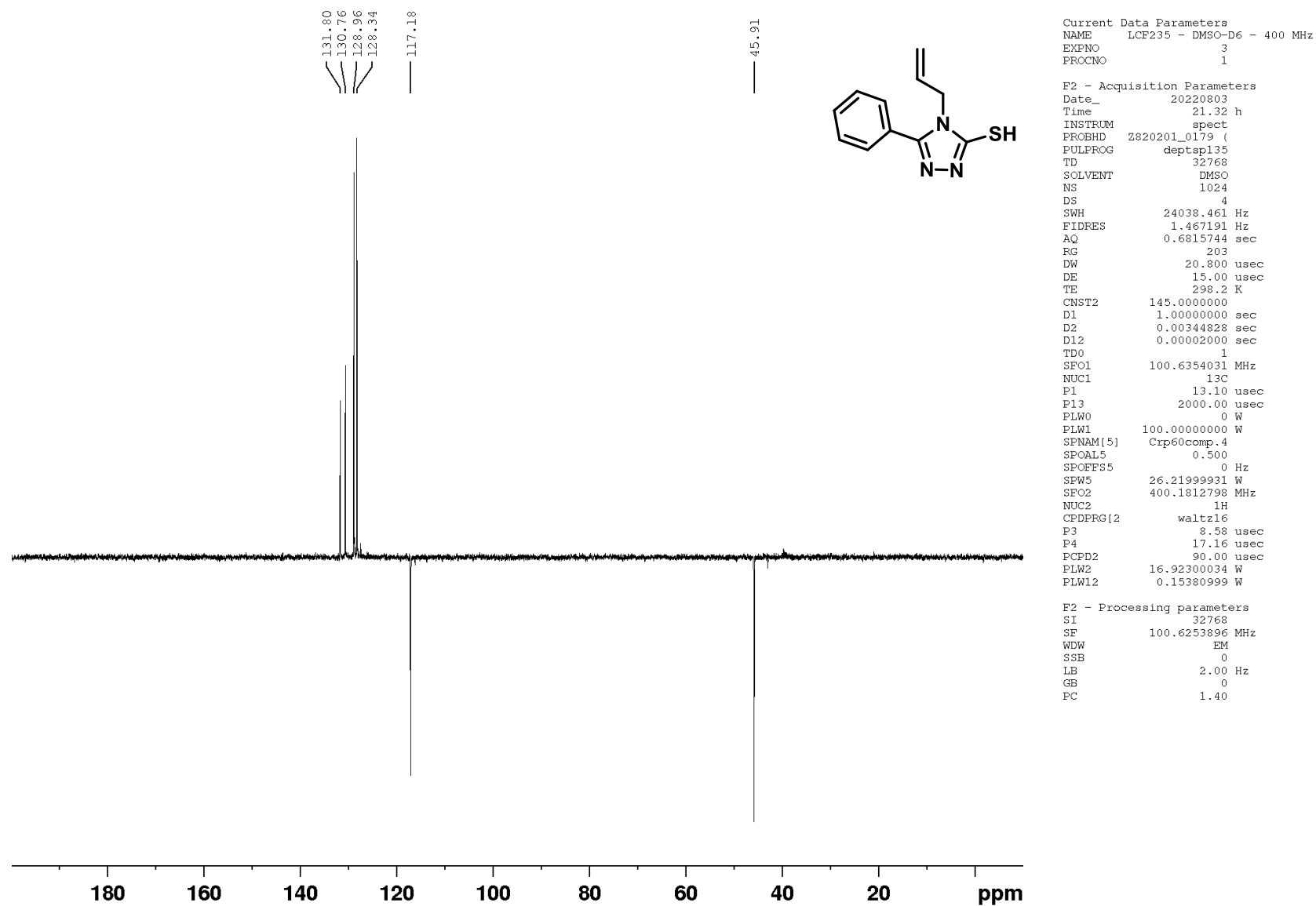


Current Data Parameters
 NAME LCF235 - DMSO-D6 - 400 MHz
 EXPNO 2
 PROCNO 1

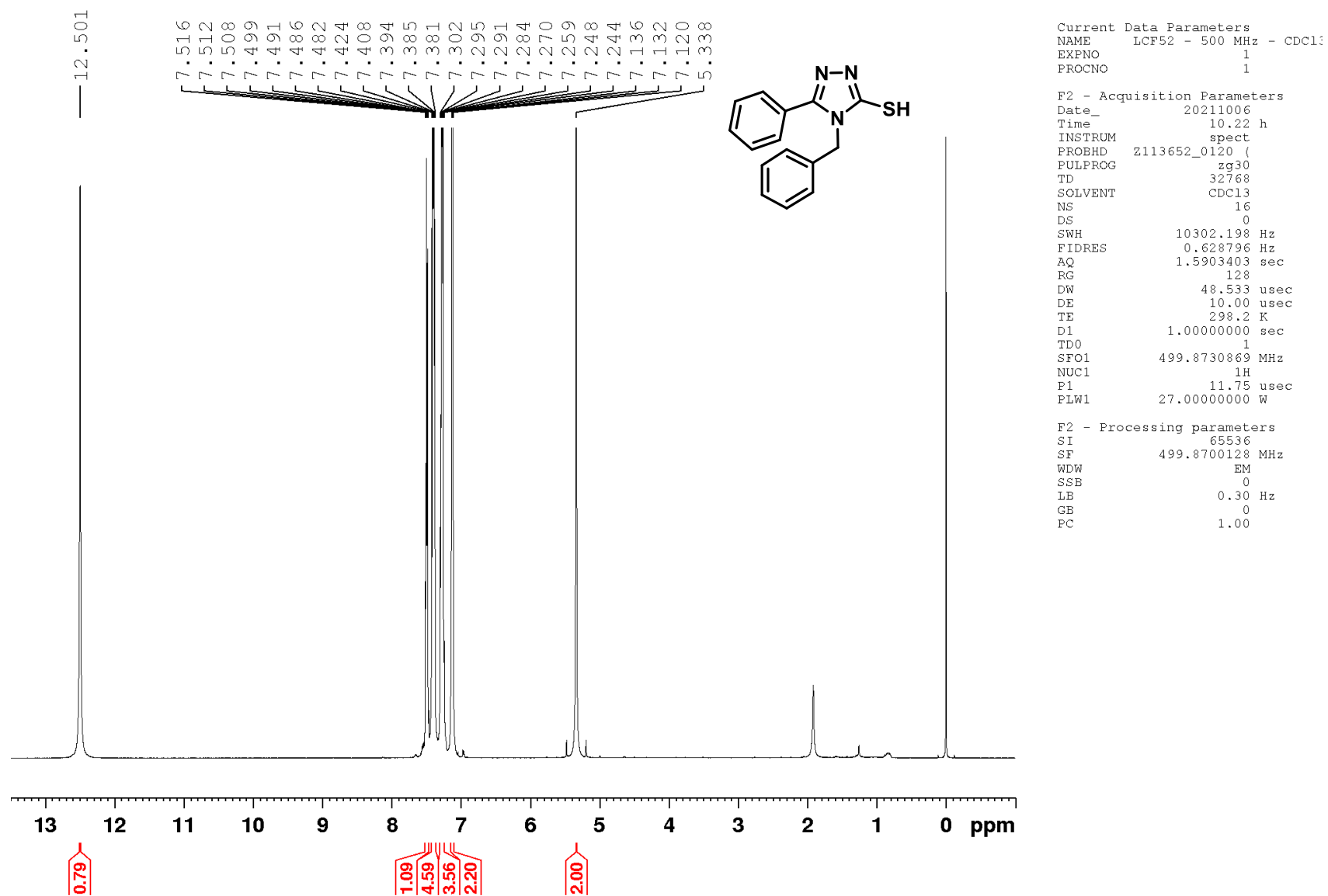
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220803
 Time 21.01 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z820201_0179 (
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 4096
 DS 4
 SWH 24038.461 Hz
 FIDRES 1.467191 Hz
 AQ 0.6815744 sec
 RG 203
 DW 20.800 usec
 DE 15.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TD0 1
 SFO1 100.6354031 MHz
 NUC1 13C
 P0 4.37 usec
 P1 13.10 usec
 PLW1 100.00000000 W
 SFO2 400.1816007 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 PCPD2 90.00 usec
 PLW2 16.92300034 W
 PLW12 0.15380999 W
 PLW13 0.07736300 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 100.6253895 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

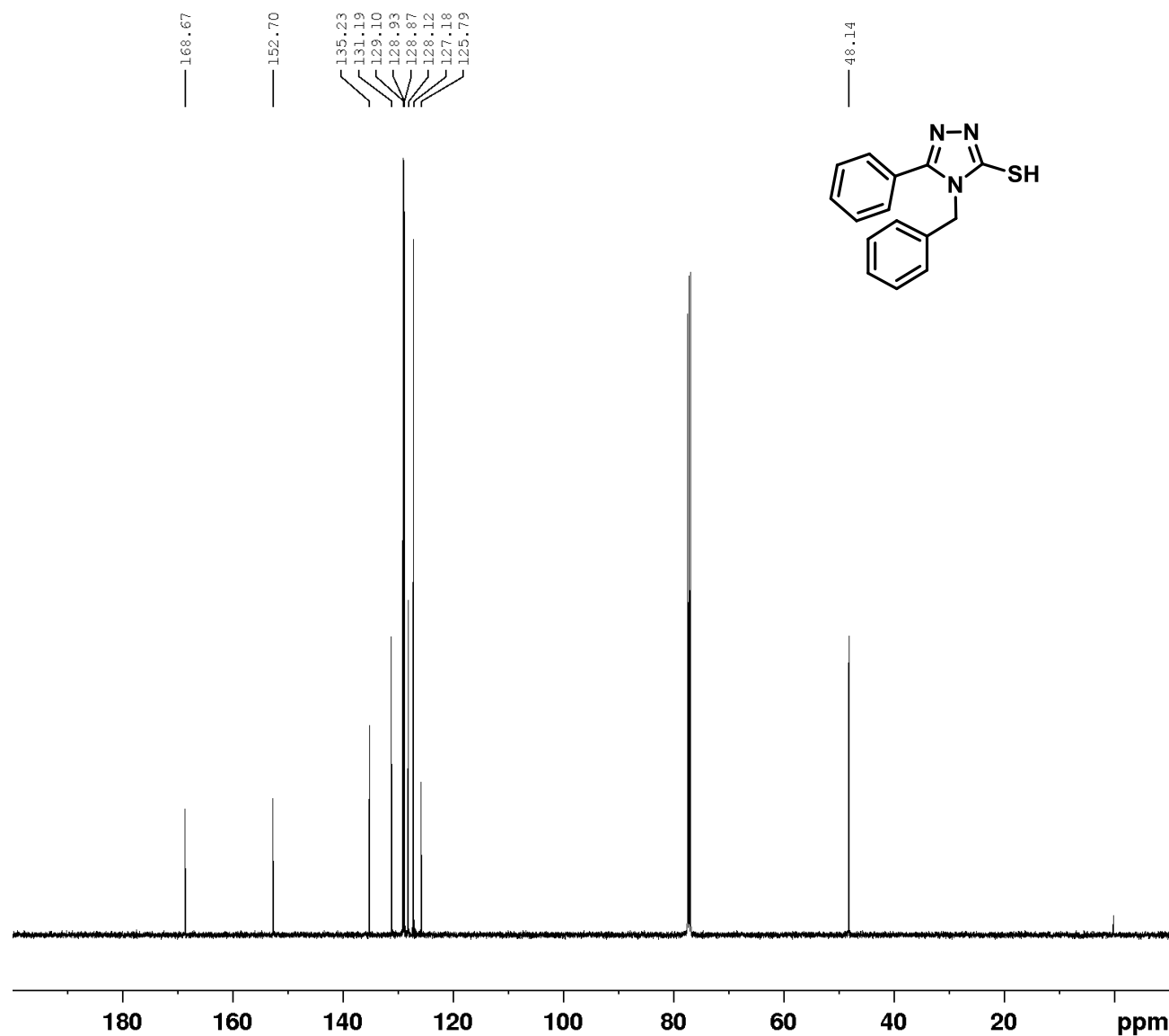
Anexo 4. Espectro de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d₆) do composto 48.2.



Anexo 5. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d₆) do composto 48.2.



Anexo 6. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) para o composto **48.3**.

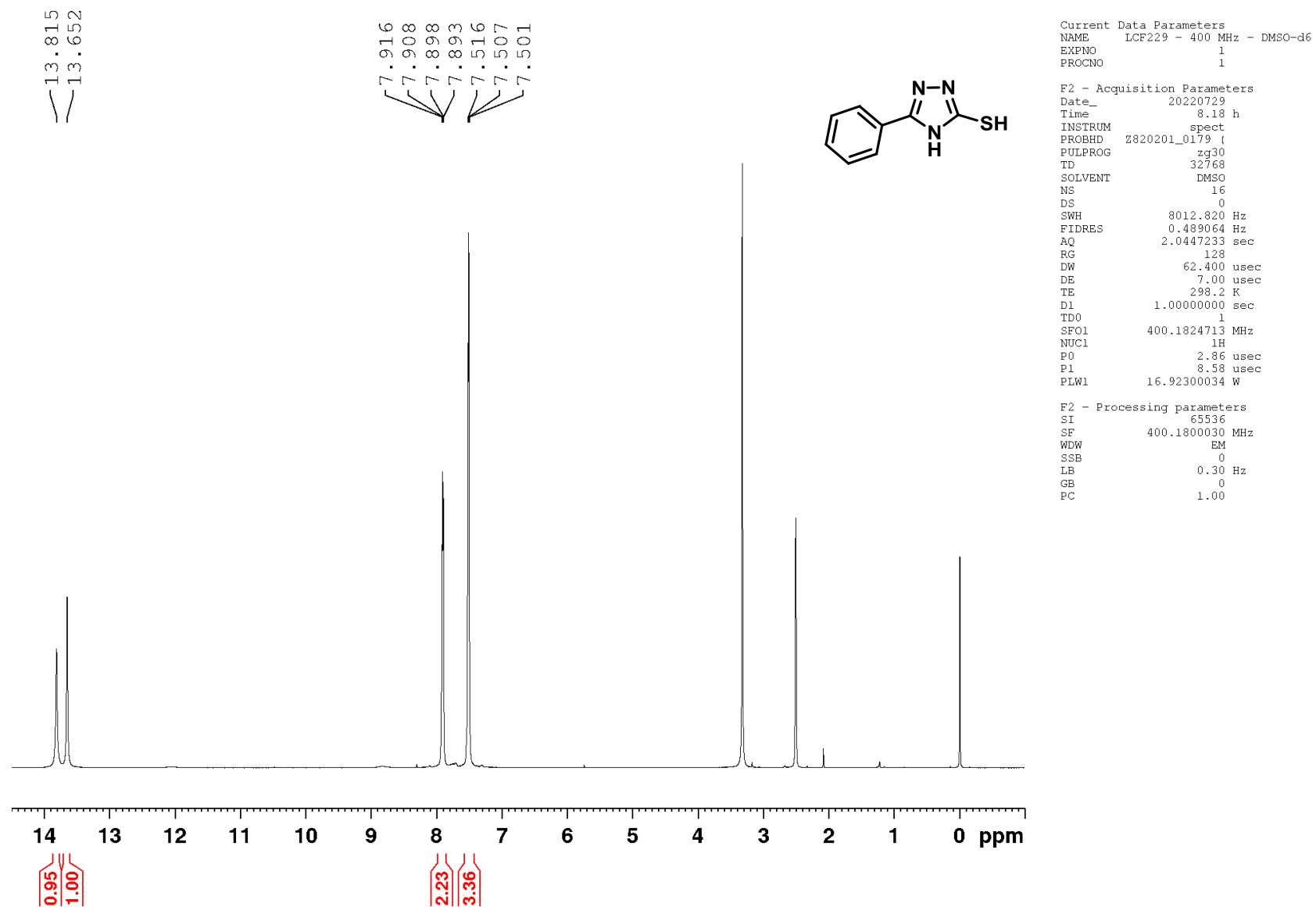


Current Data Parameters
 NAME LCF52 - 500 MHz - CDCl₃
 EXPNO 2
 PROCNO 1

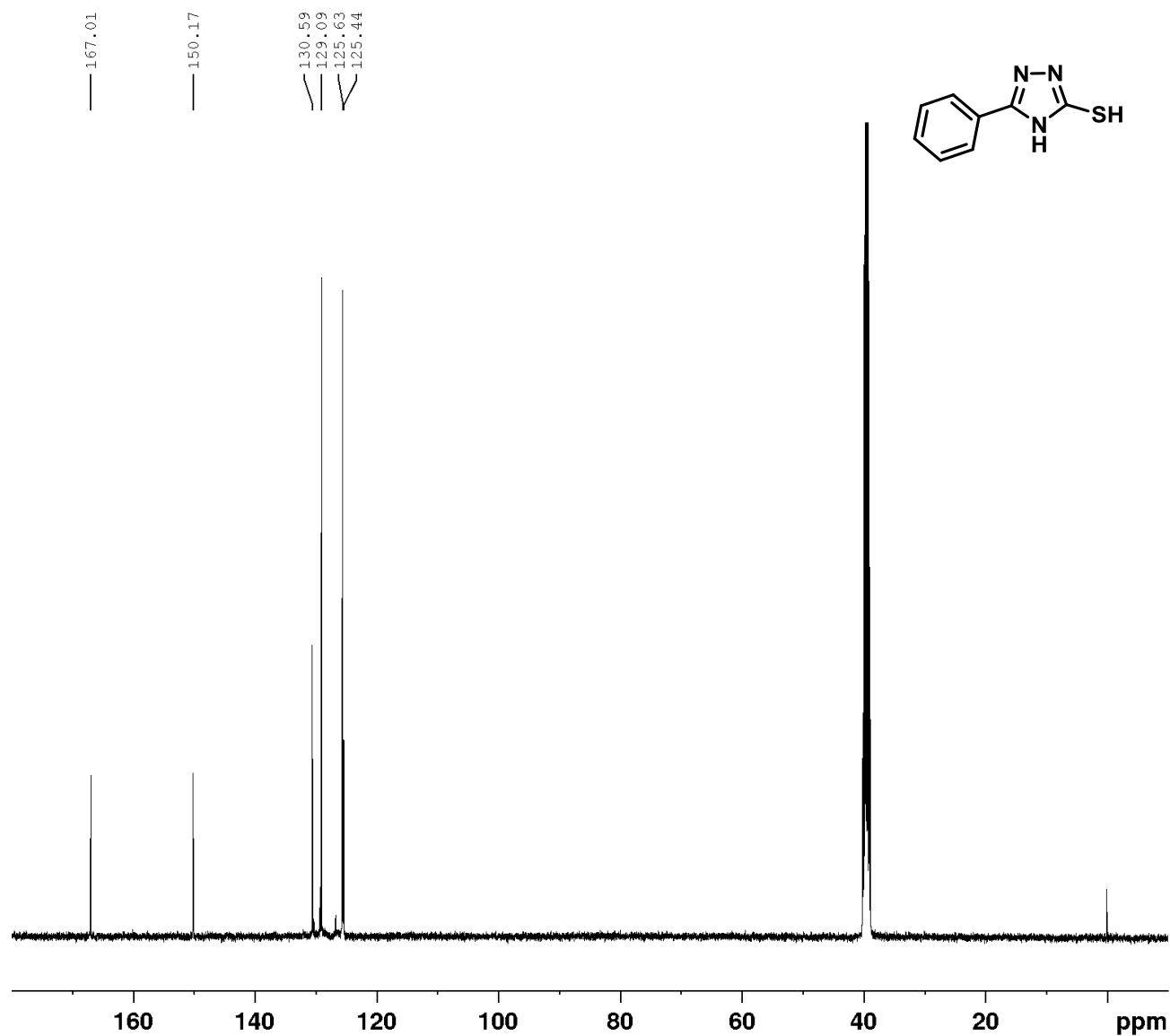
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20211006
 Time 10.53 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z113652_0120 (
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl₃
 NS 720
 DS 0
 SWH 32894.738 Hz
 FIDRES 2.007735 Hz
 AQ 0.4980736 sec
 RG 2050
 DW 15.200 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TD0 1
 SFO1 125.7062372 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 85.00000000 W
 SFO2 499.8719995 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 26.85300064 W
 PLW12 0.57928002 W
 PLW13 0.29137000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.6924007 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Anexo 7. Espectro de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto 48.3.



Anexo 8 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d6) para o composto 57.

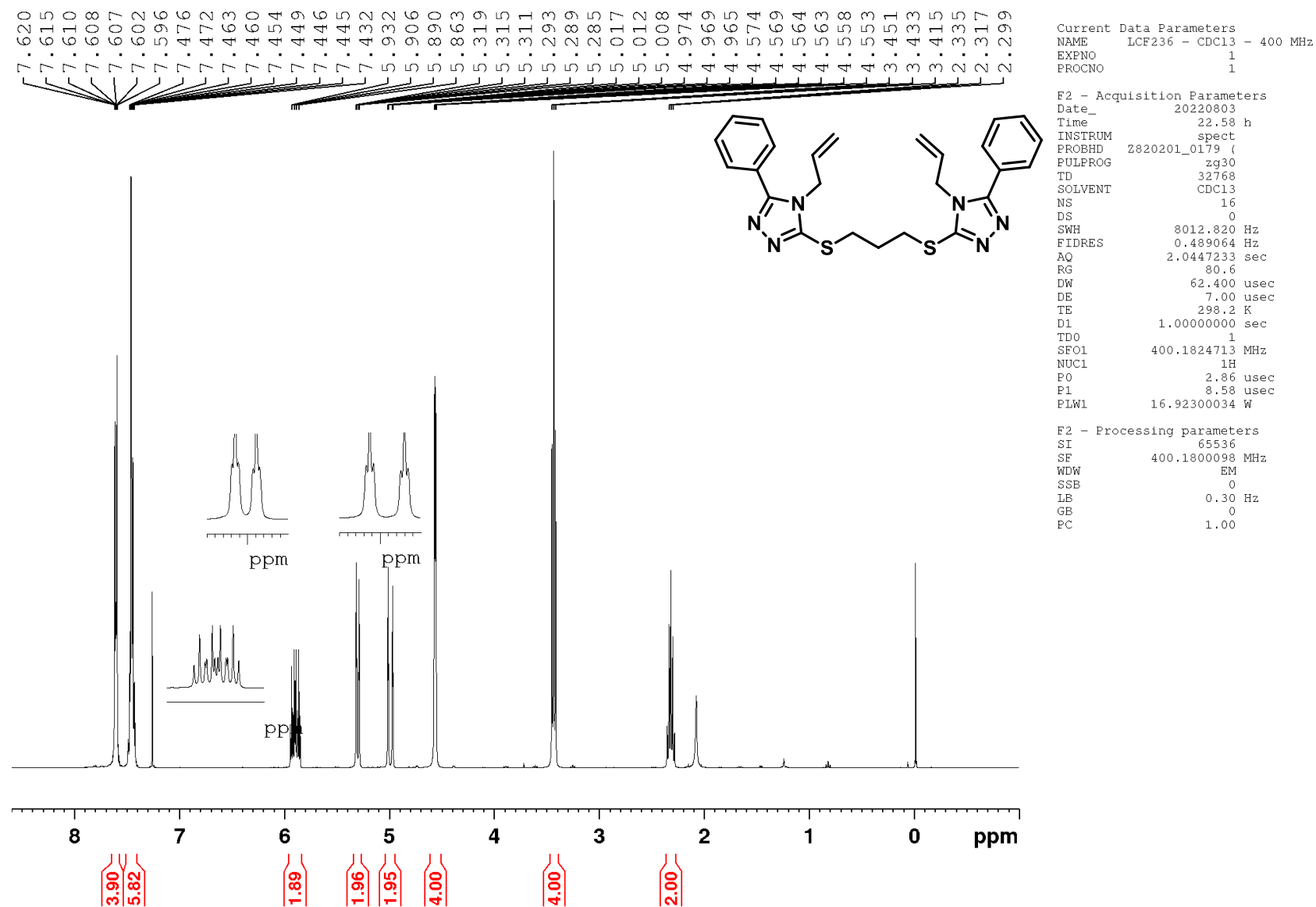


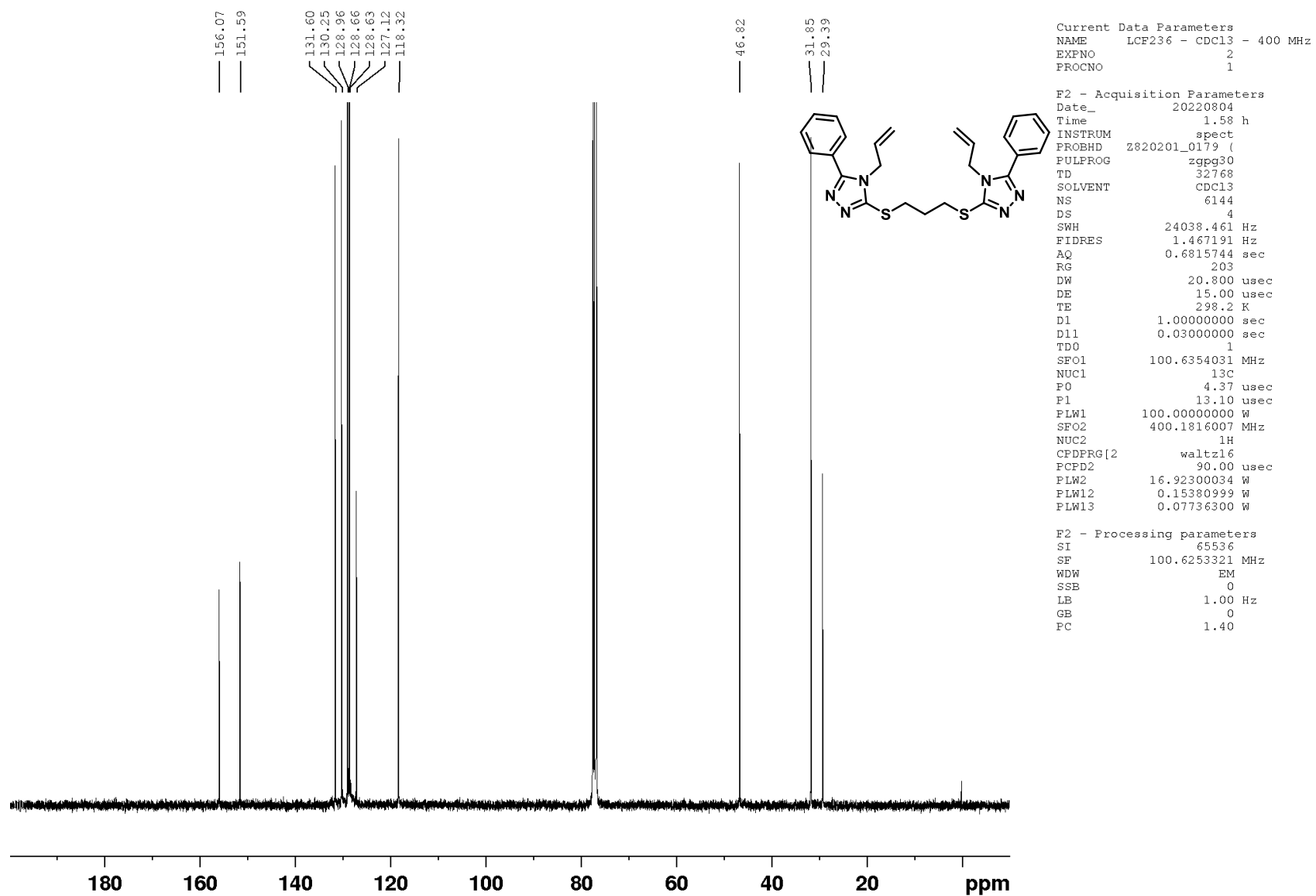
Current Data Parameters
 NAME LCF229 - 400 MHz - DMSO-d6
 EXPNO 2
 PROCNO 1

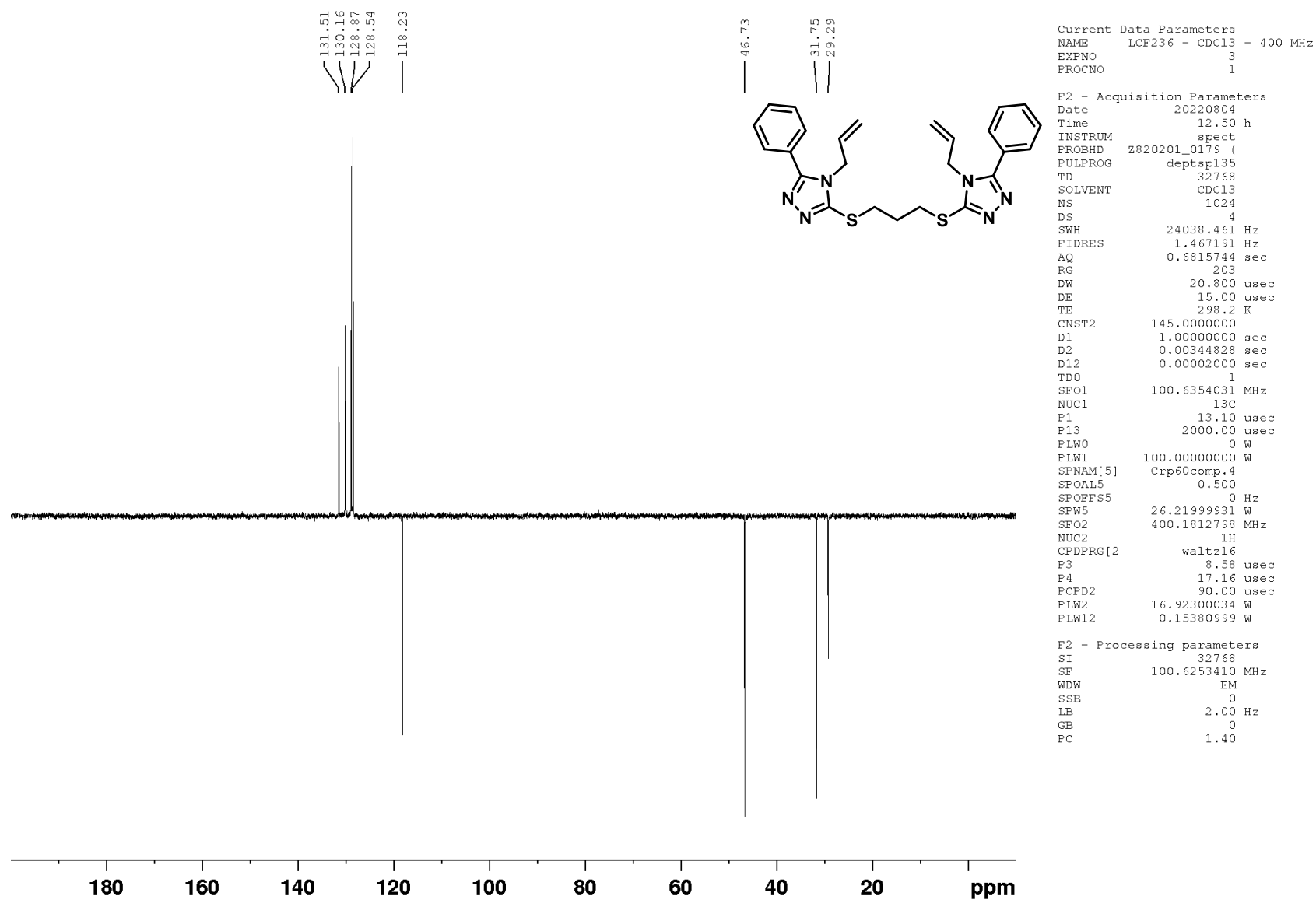
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220729
 Time 3.22 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z820201_0179 {
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 6144
 DS 4
 SWH 24038.461 Hz
 FIDRES 1.467191 Hz
 AQ 0.6815744 sec
 RG 203
 DW 20.800 usec
 DE 15.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TD0 1
 SFO1 100.6354031 MHz
 NUC1 13C
 P0 4.37 usec
 P1 13.10 usec
 PLW1 100.0000000 W
 SFO2 400.1816007 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 PCPD2 90.00 usec
 PLW2 16.92300034 W
 PLW12 0.15380999 W
 PLW13 0.07736300 W

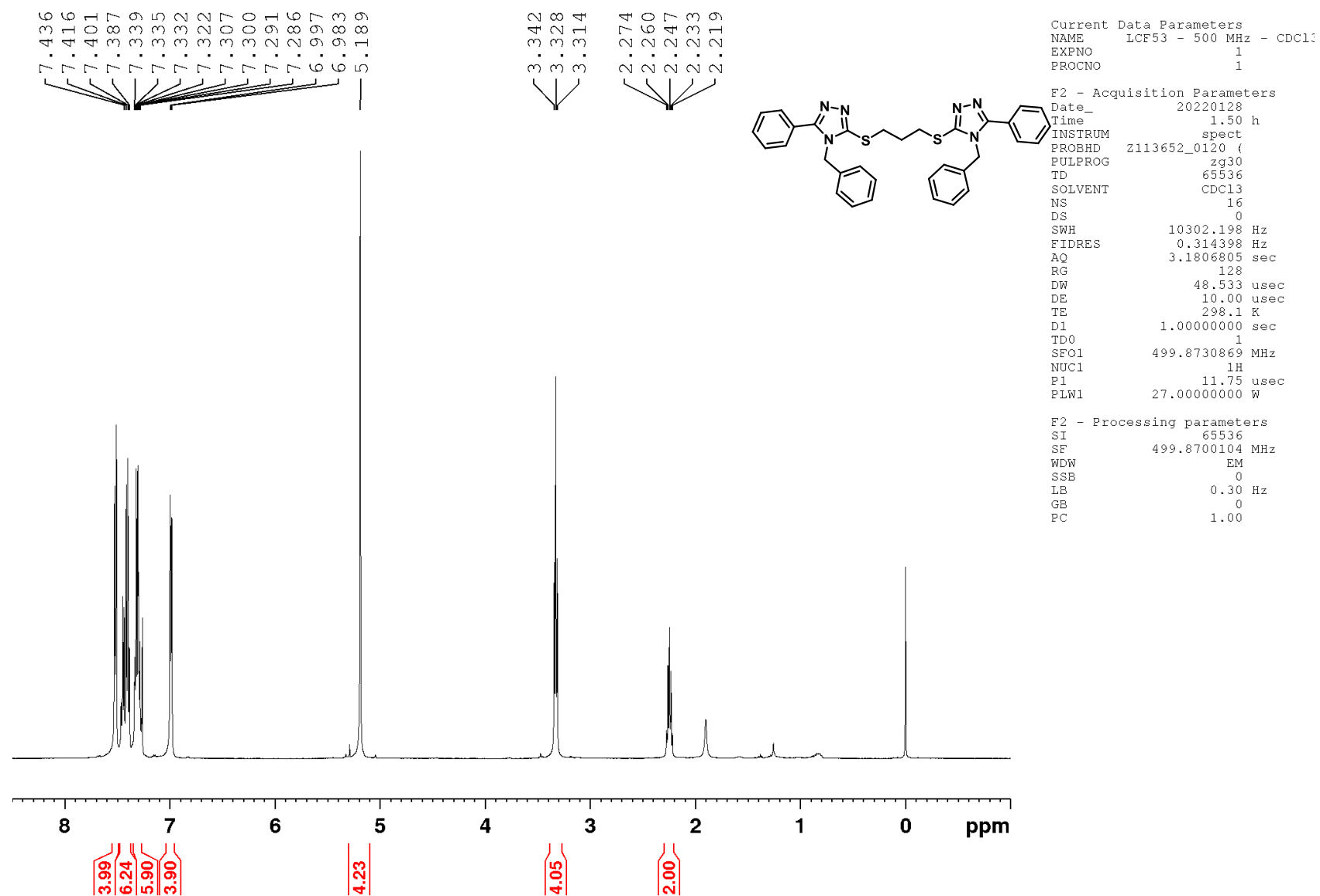
F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 100.6253897 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Anexo 9. Espectro de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d6) do composto 57.

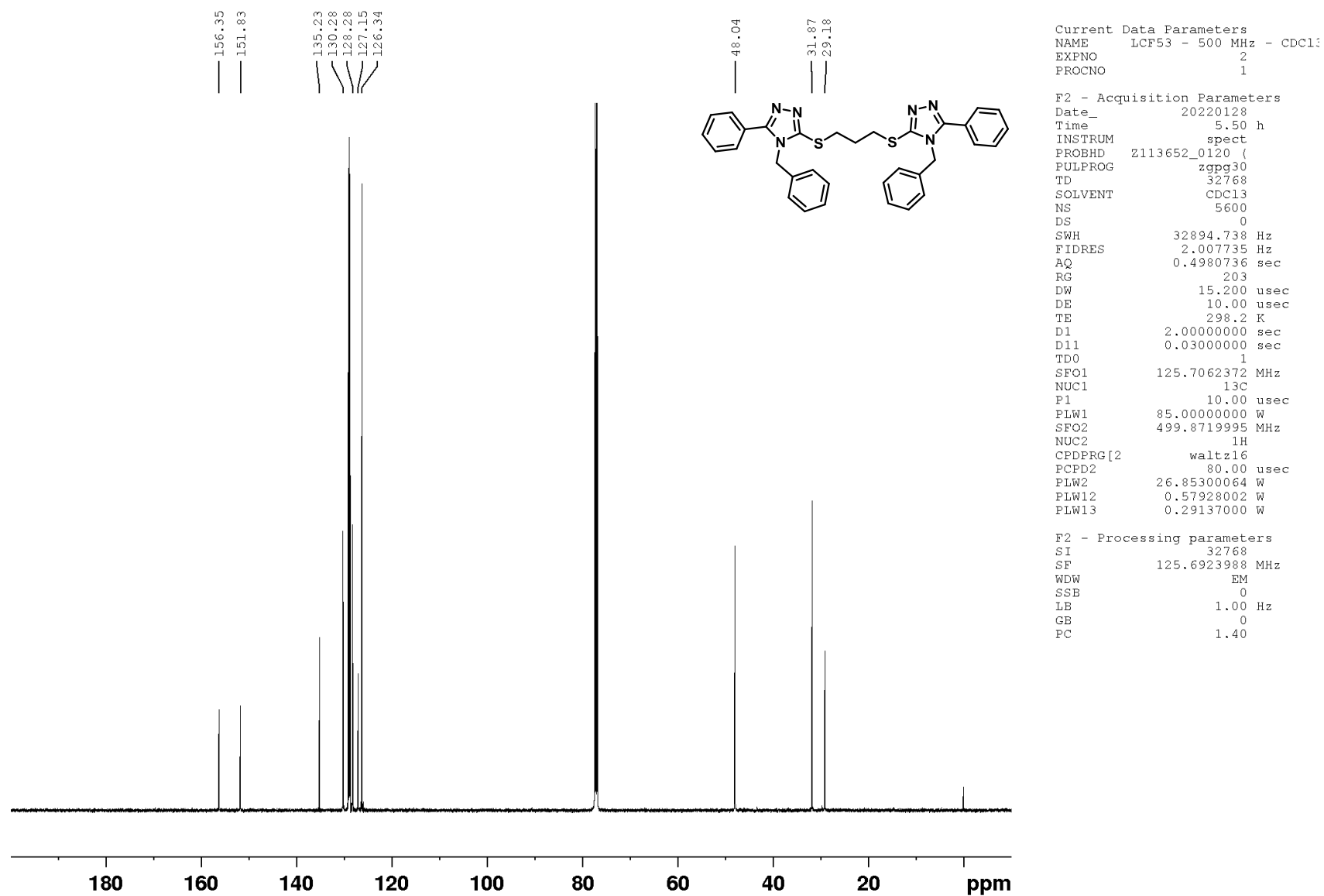
Anexo 10 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **60.1**.

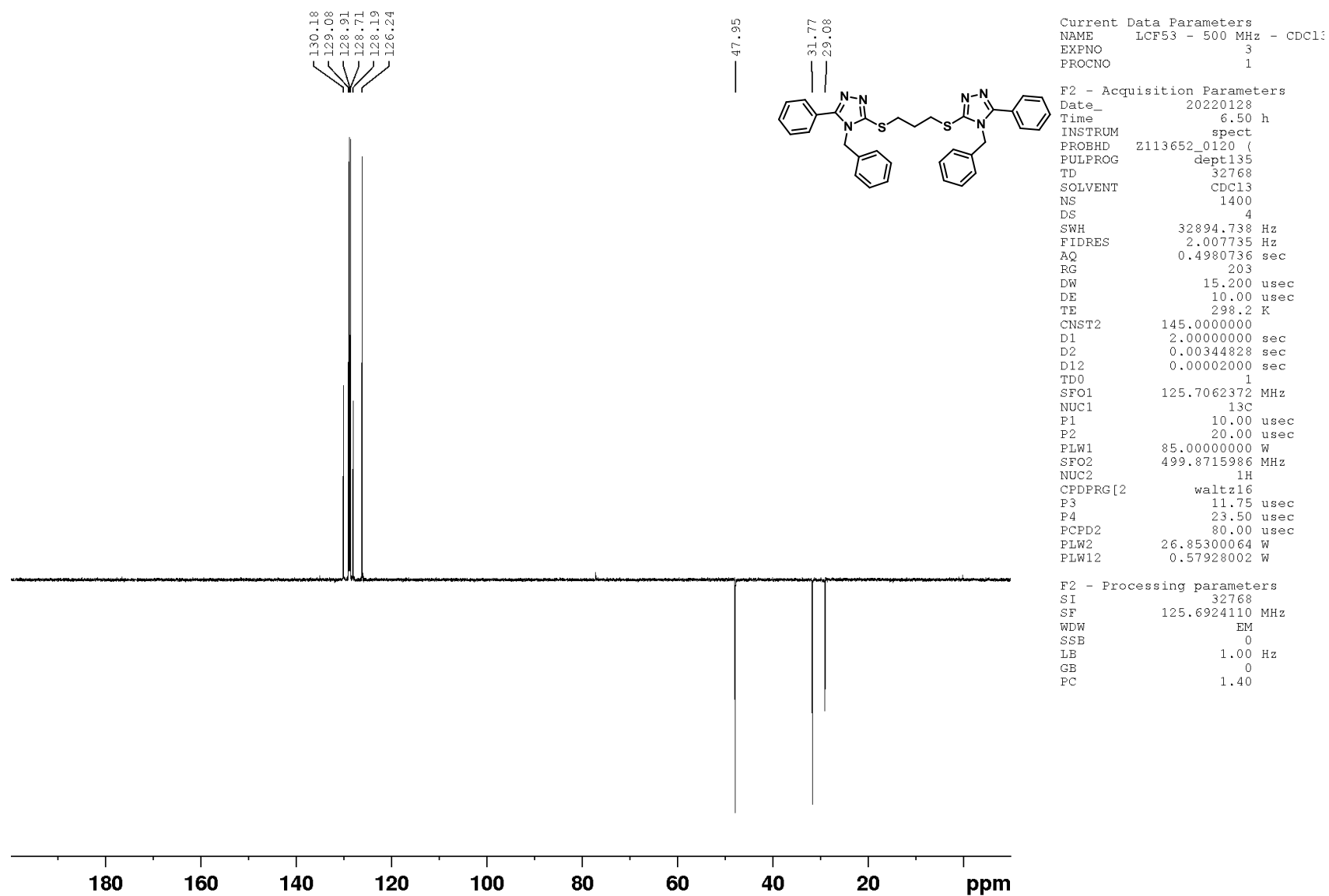
Anexo 11. Espectro de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **60.1**.

Anexo 12. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 60.1.

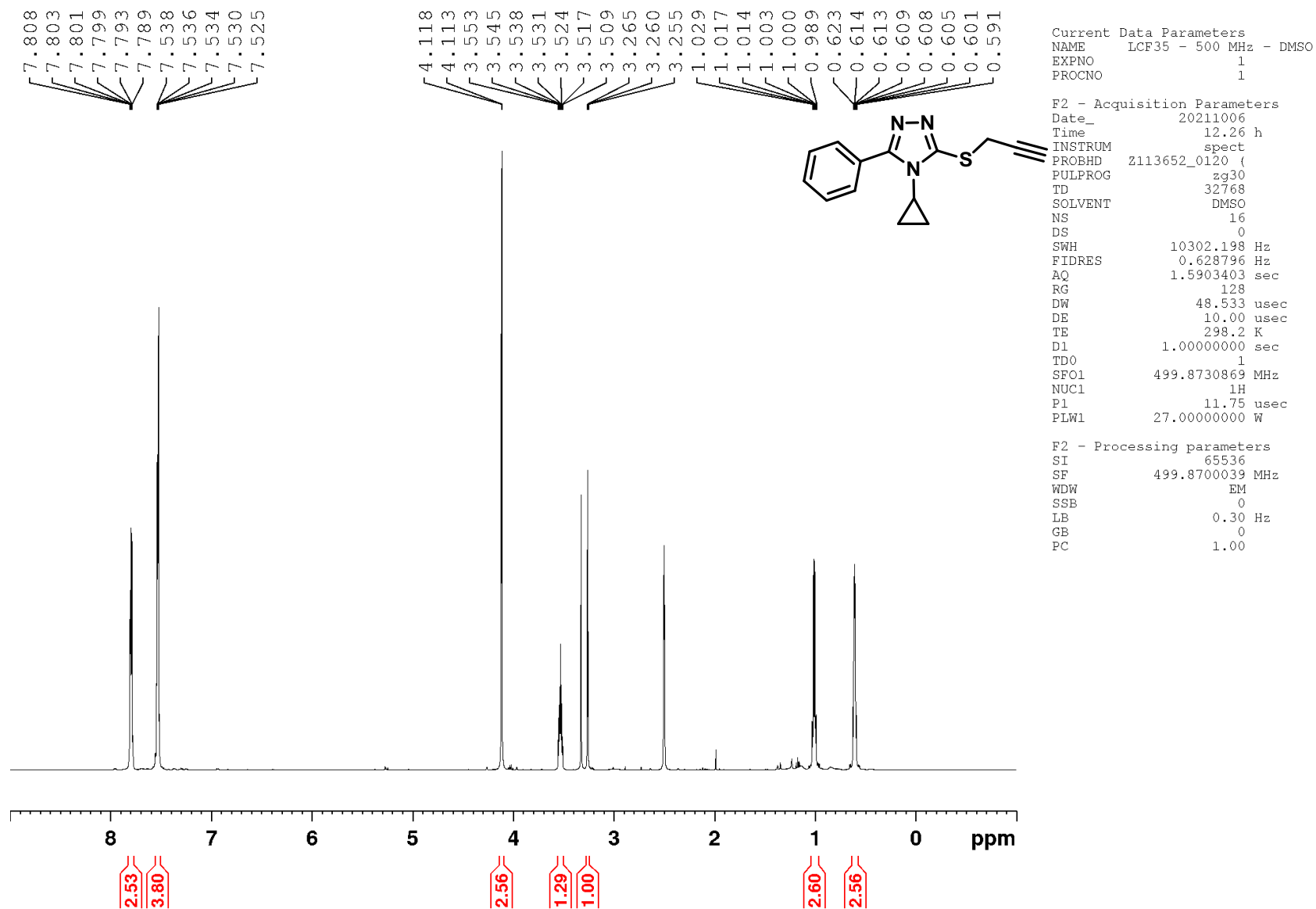


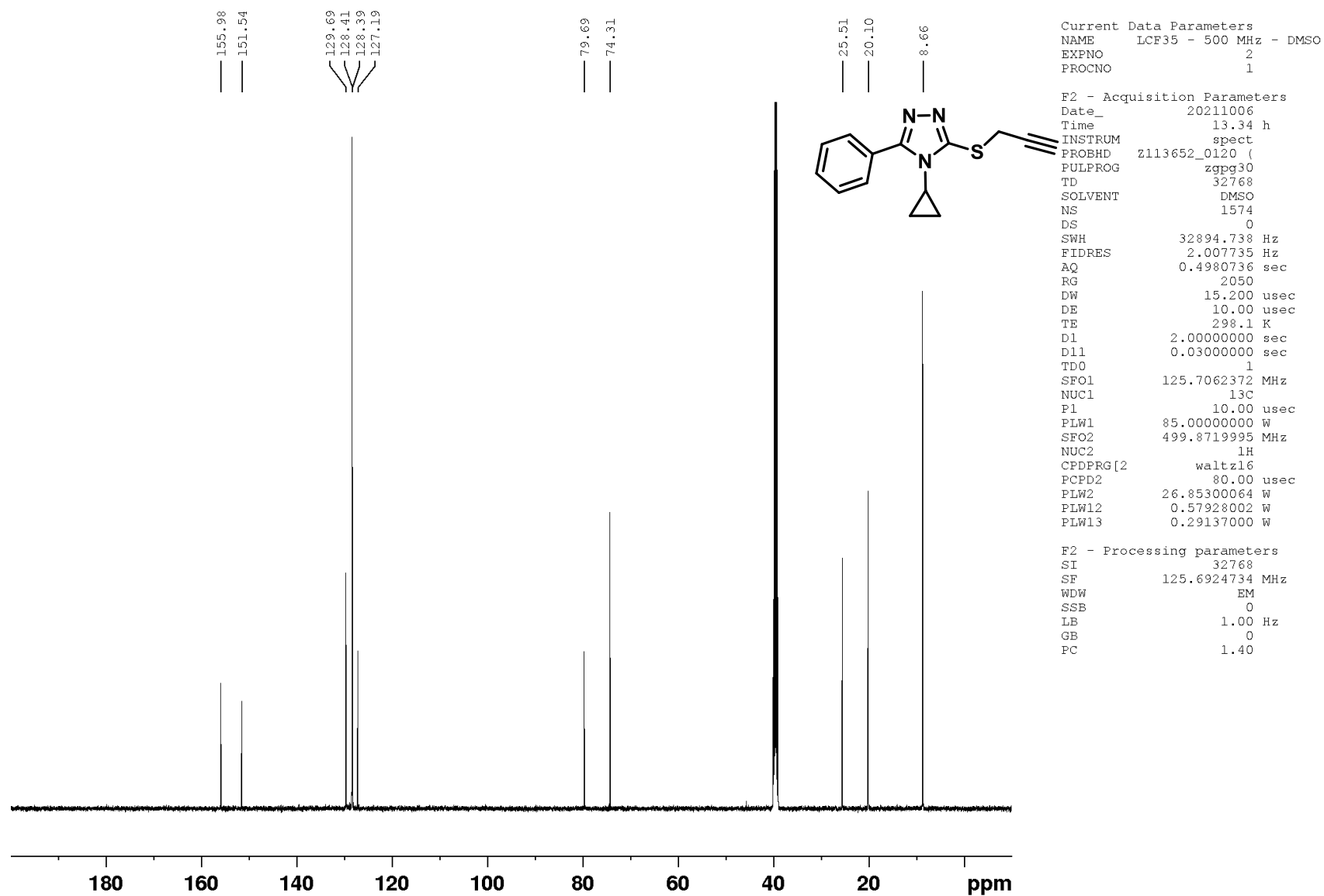
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **60.2**.

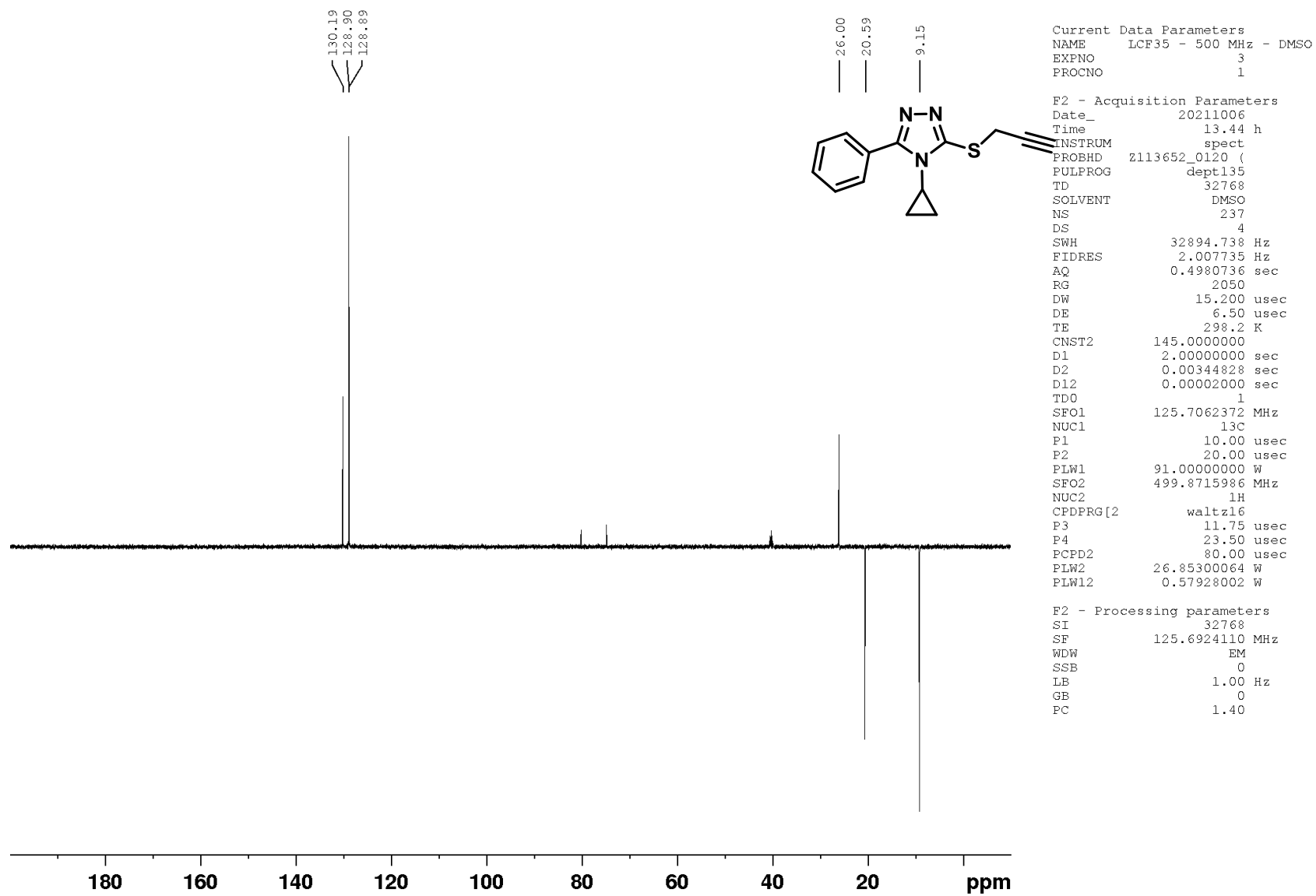
Anexo 14. Espectro de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 60.2.



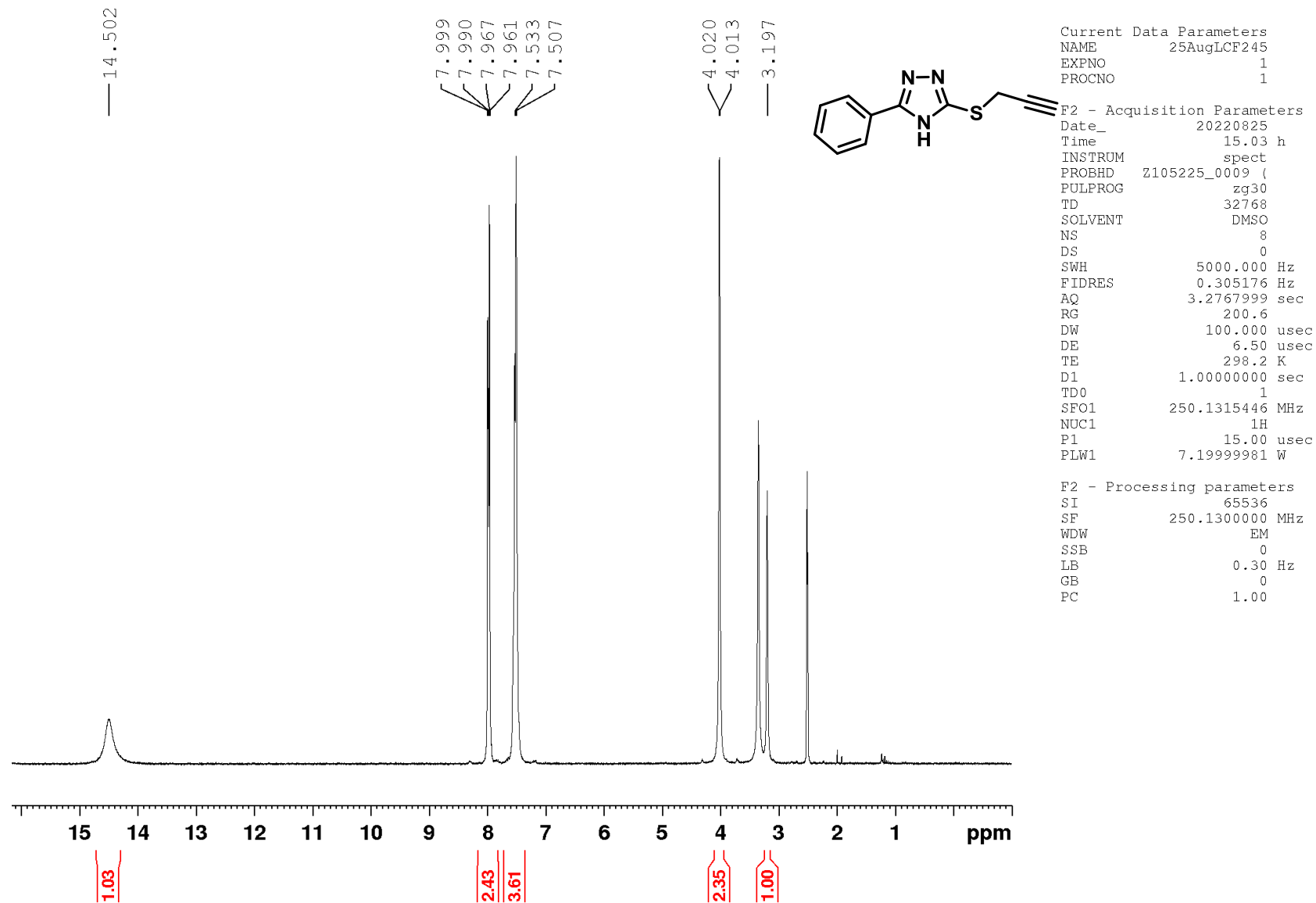
Anexo 15. Espectro de ¹³C DEPT-135 (100 MHz, CDCl₃) do composto 60.2.

Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o composto **62.1**.

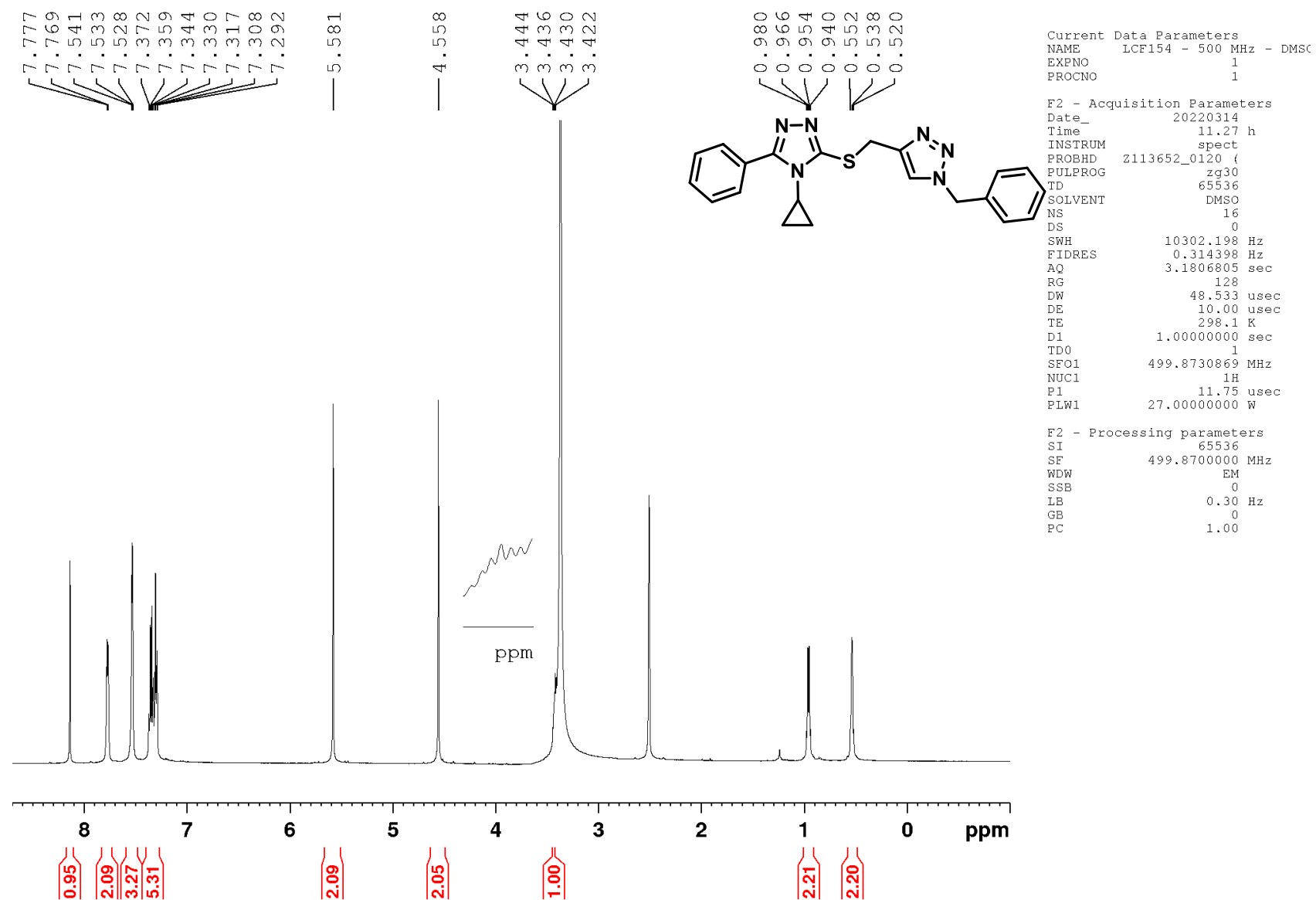
Anexo 17. Espectro de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d₆) do composto 62.1.



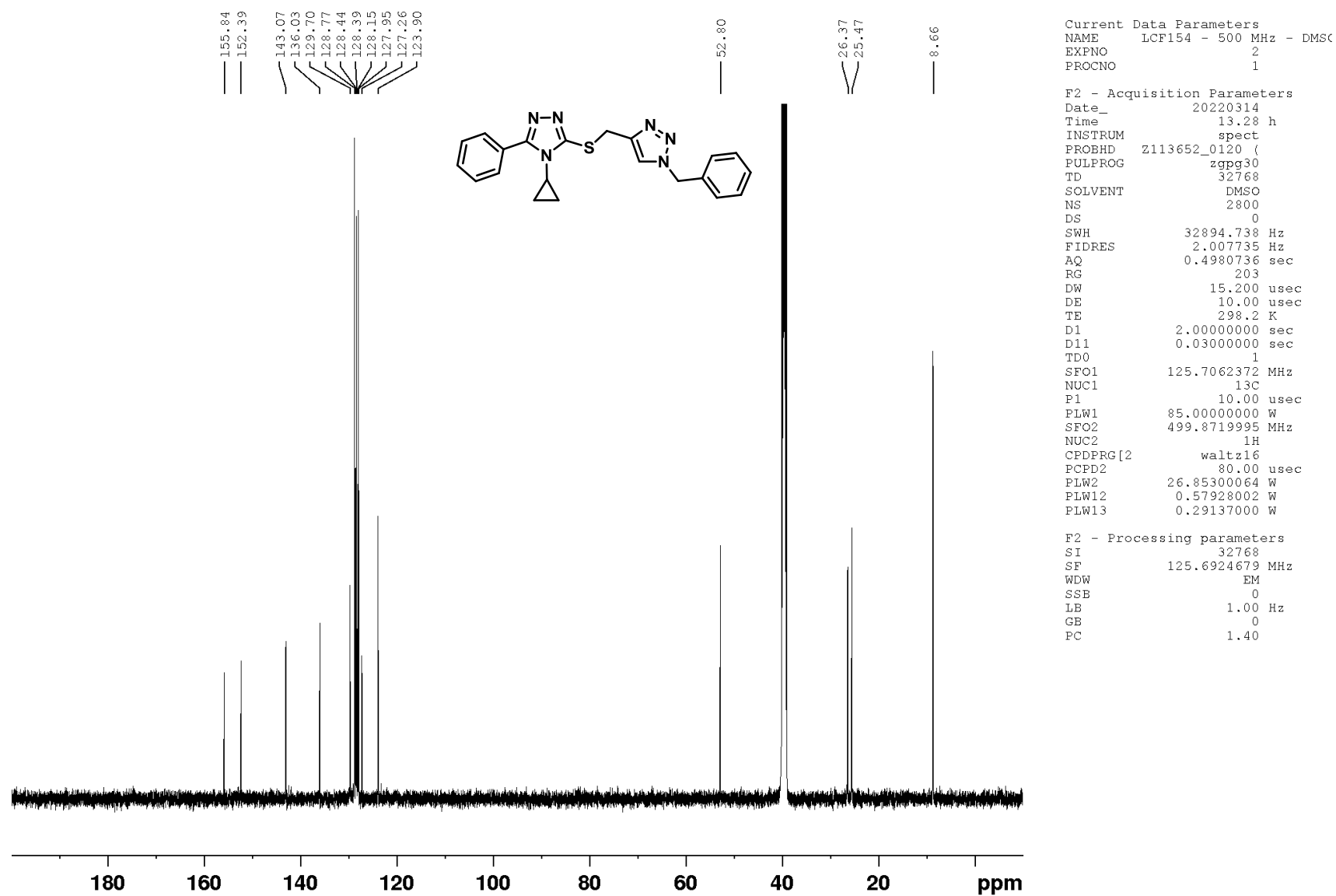
Anexo 18. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d₆) do composto **62.1**.

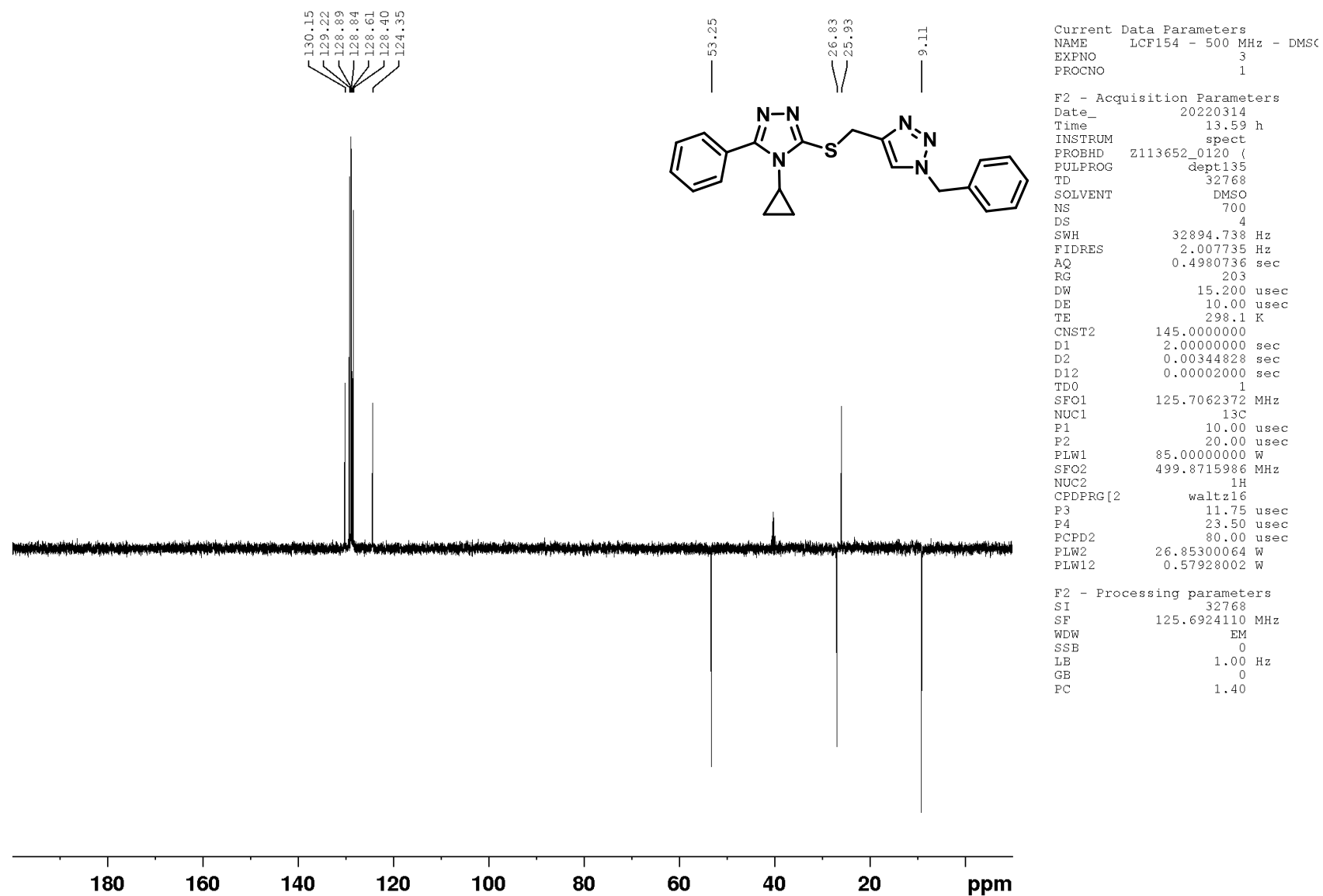


Anexo 19. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) para o composto **62.2**

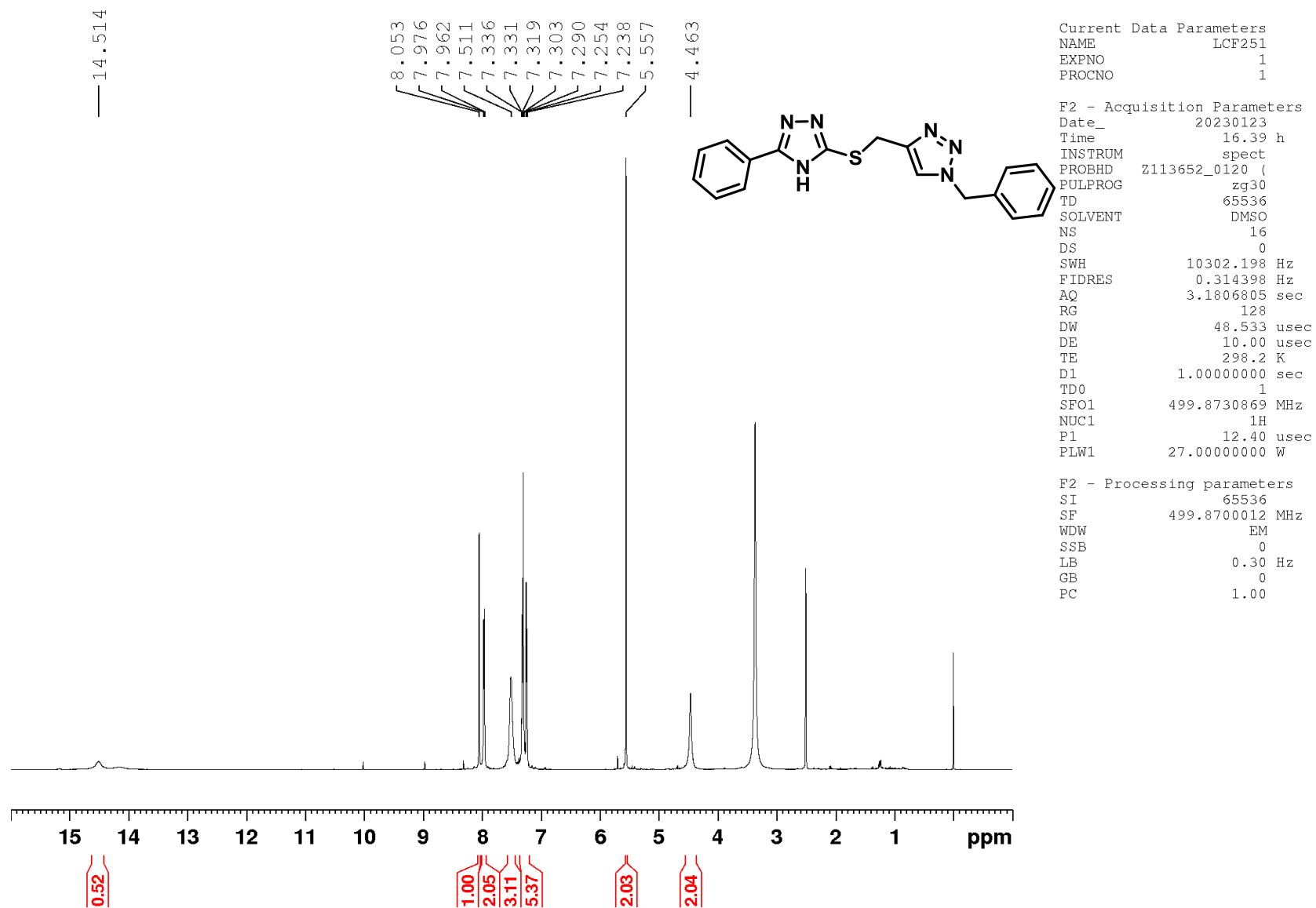


Anexo 20. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o composto **61.1**.

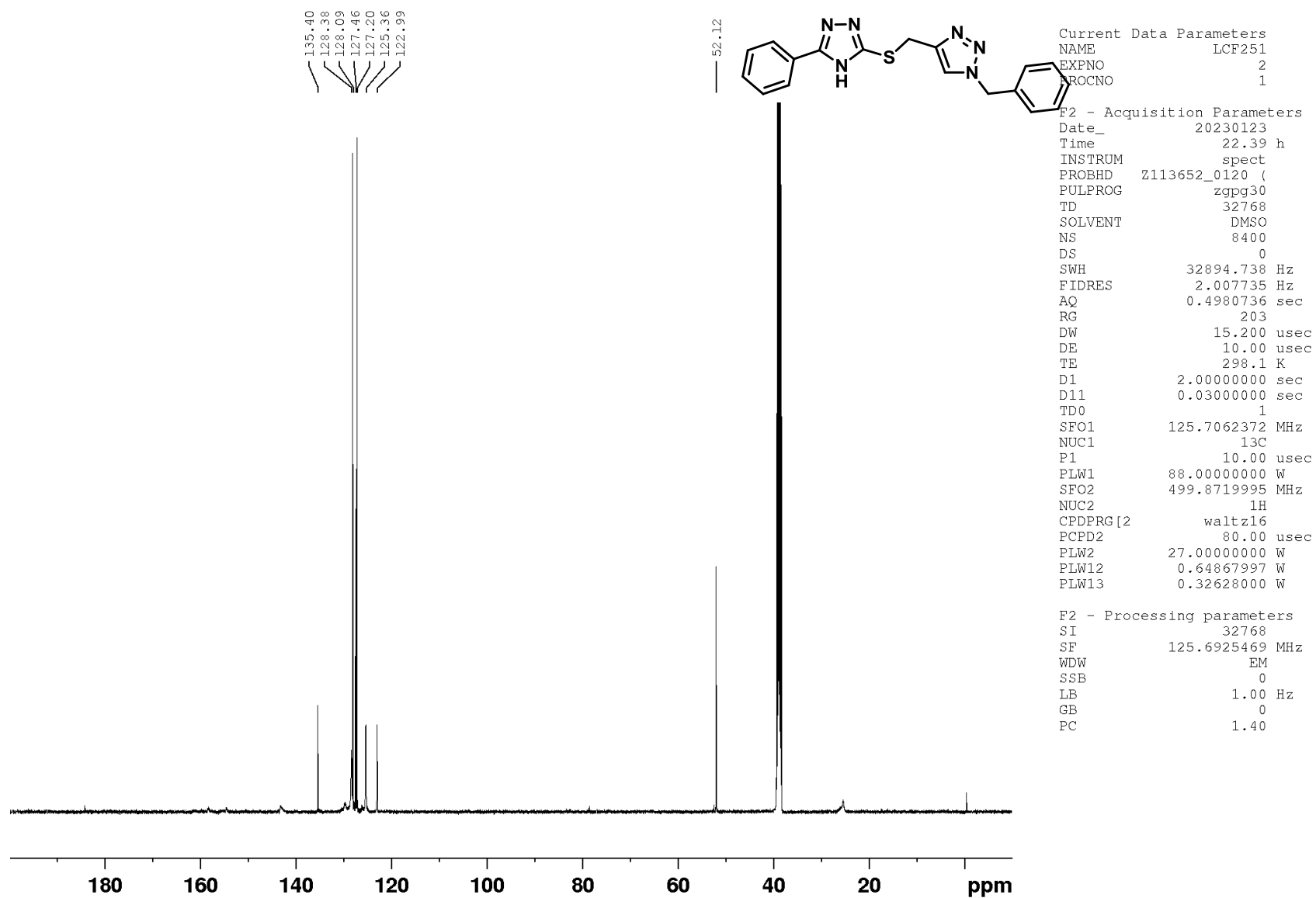
Anexo 21. Espectro de ¹³C (125 MHz, DMSO-d6) do composto 61.1.

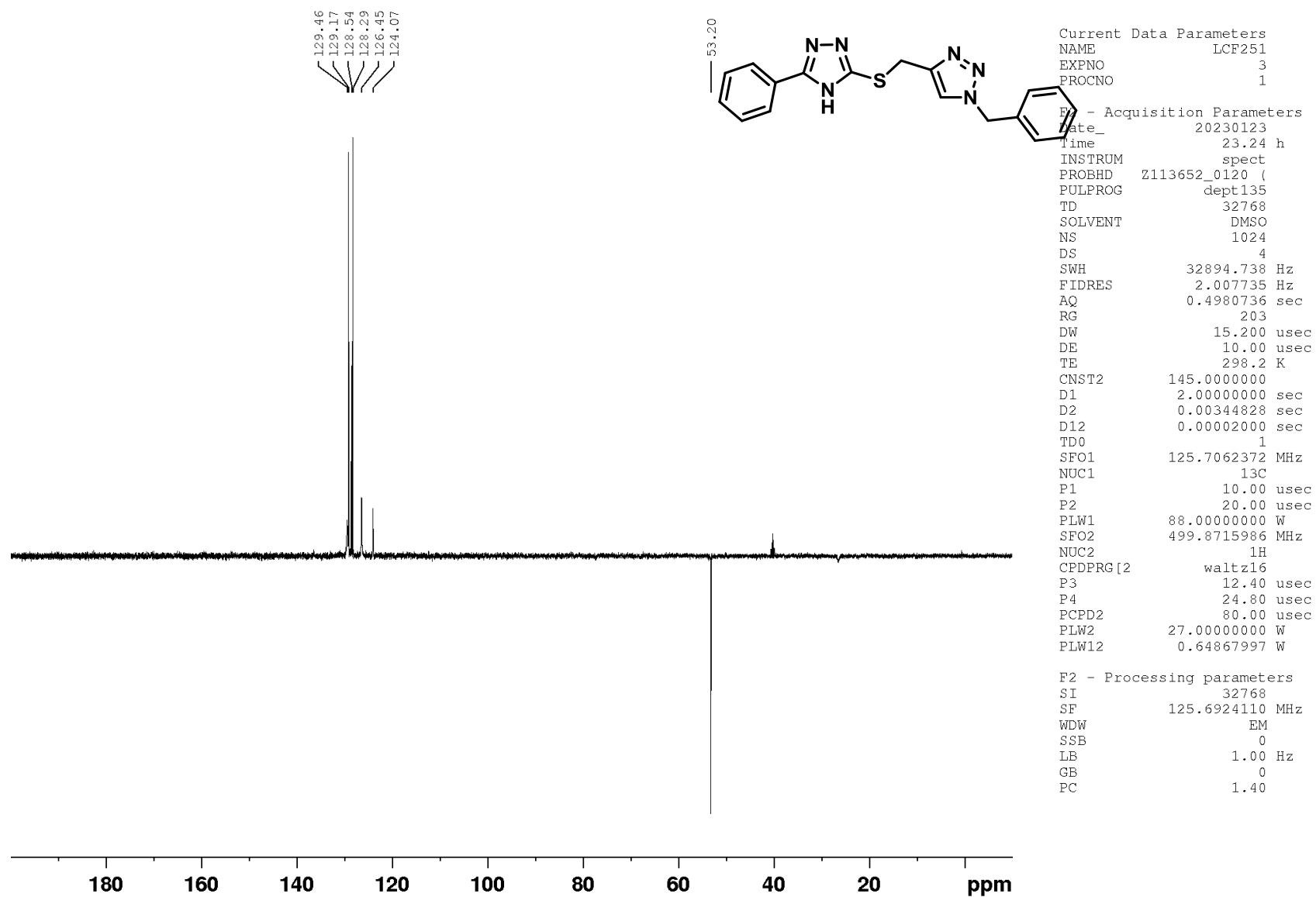


Anexo 22. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d₆) do composto **61.1**.

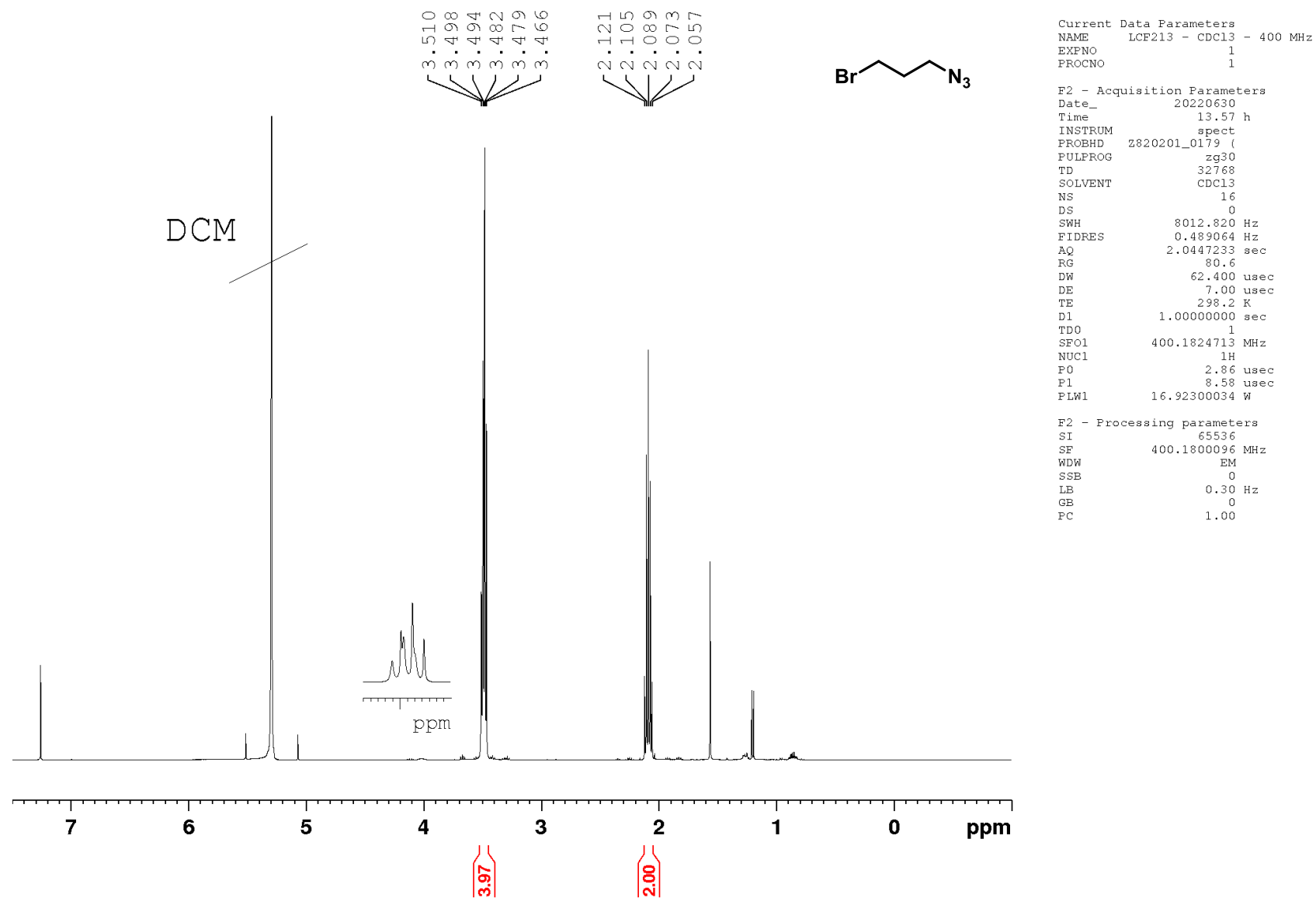


Anexo 23. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o composto **61.2**.

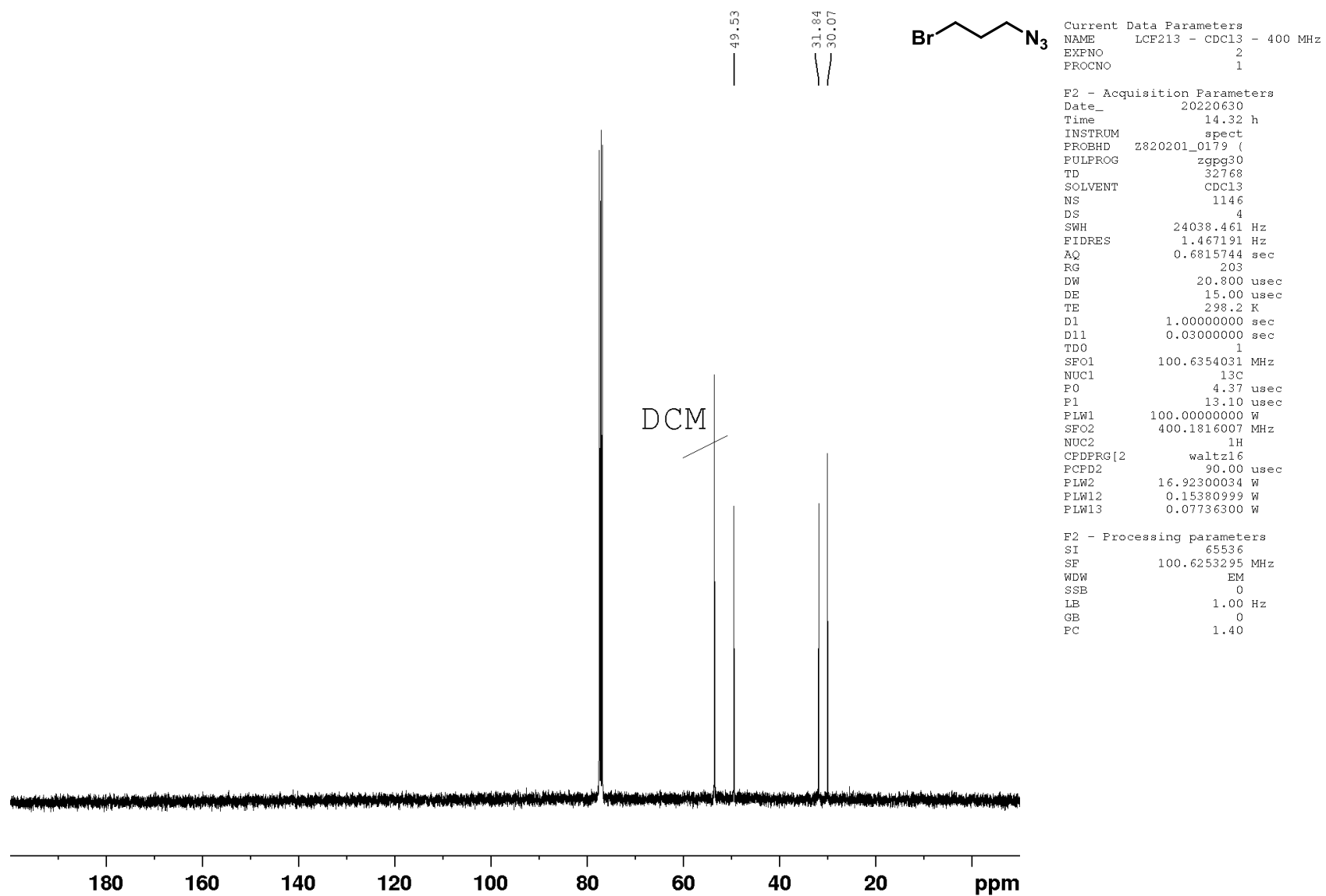
Anexo 24. Espectro de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) do composto 61.2.



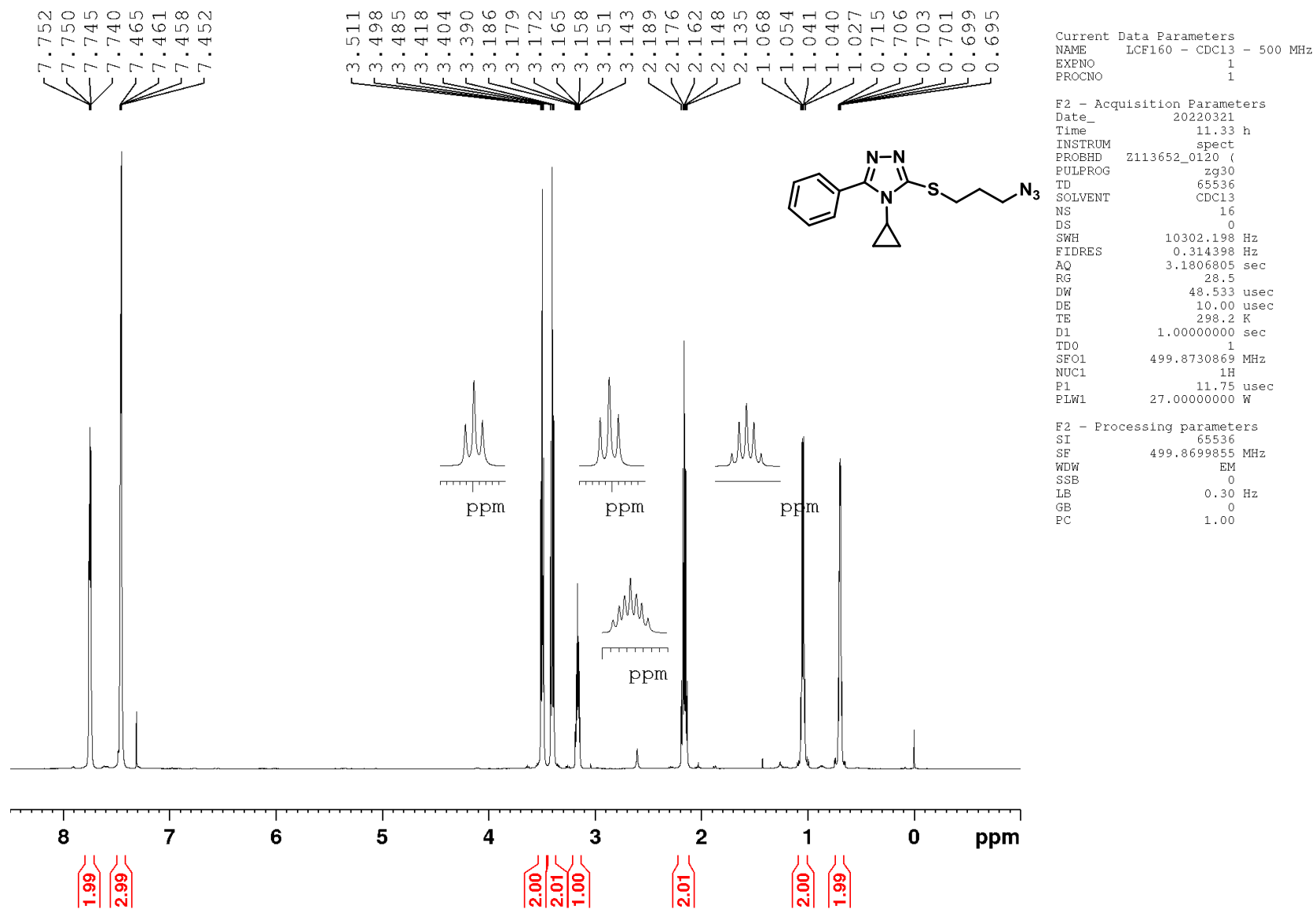
Anexo 25. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d₆) do composto **61.2**.

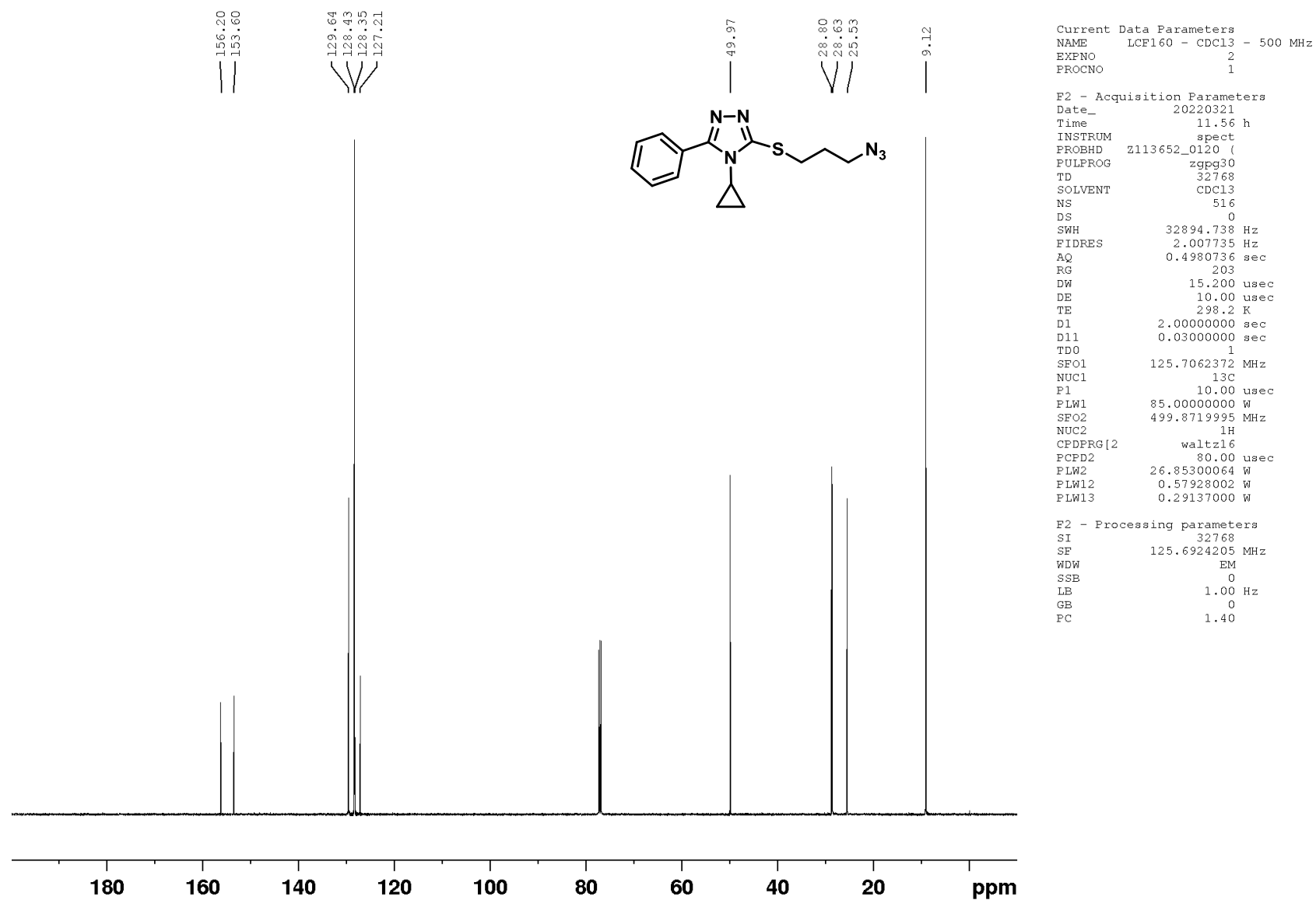


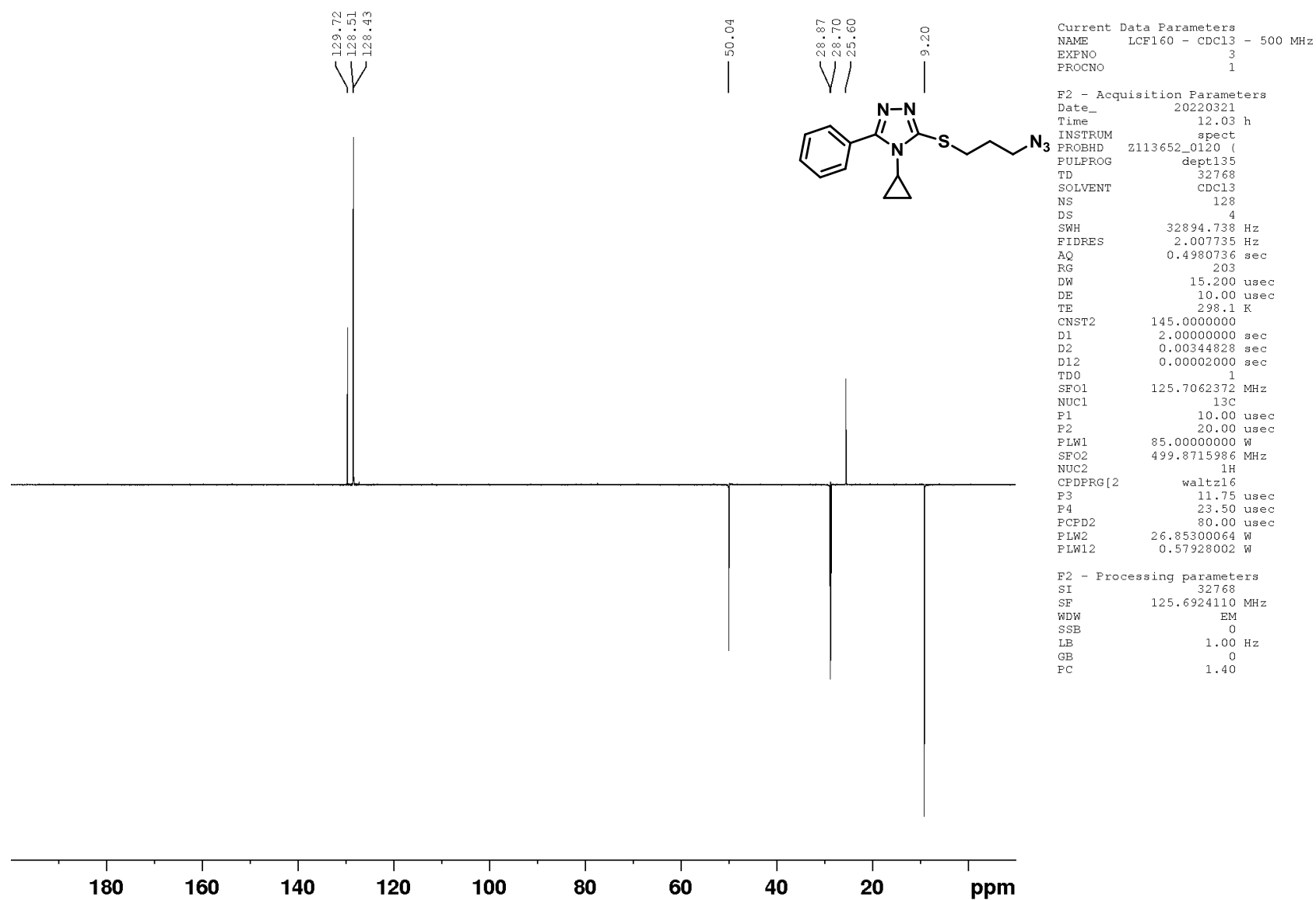
Anexo 26. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **65**.



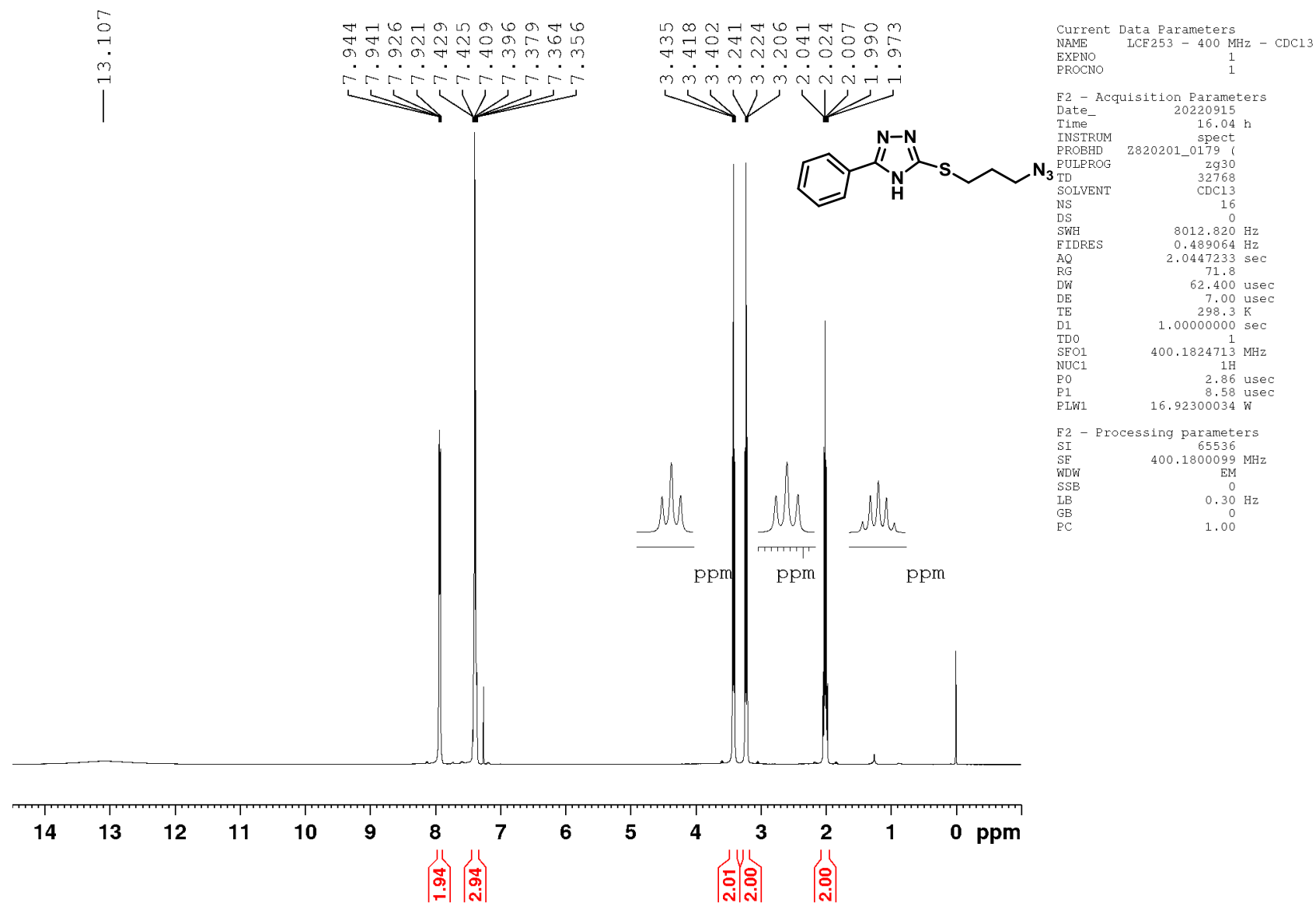
Anexo 27. Espectro de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 65.

Anexo 28. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **64.1**

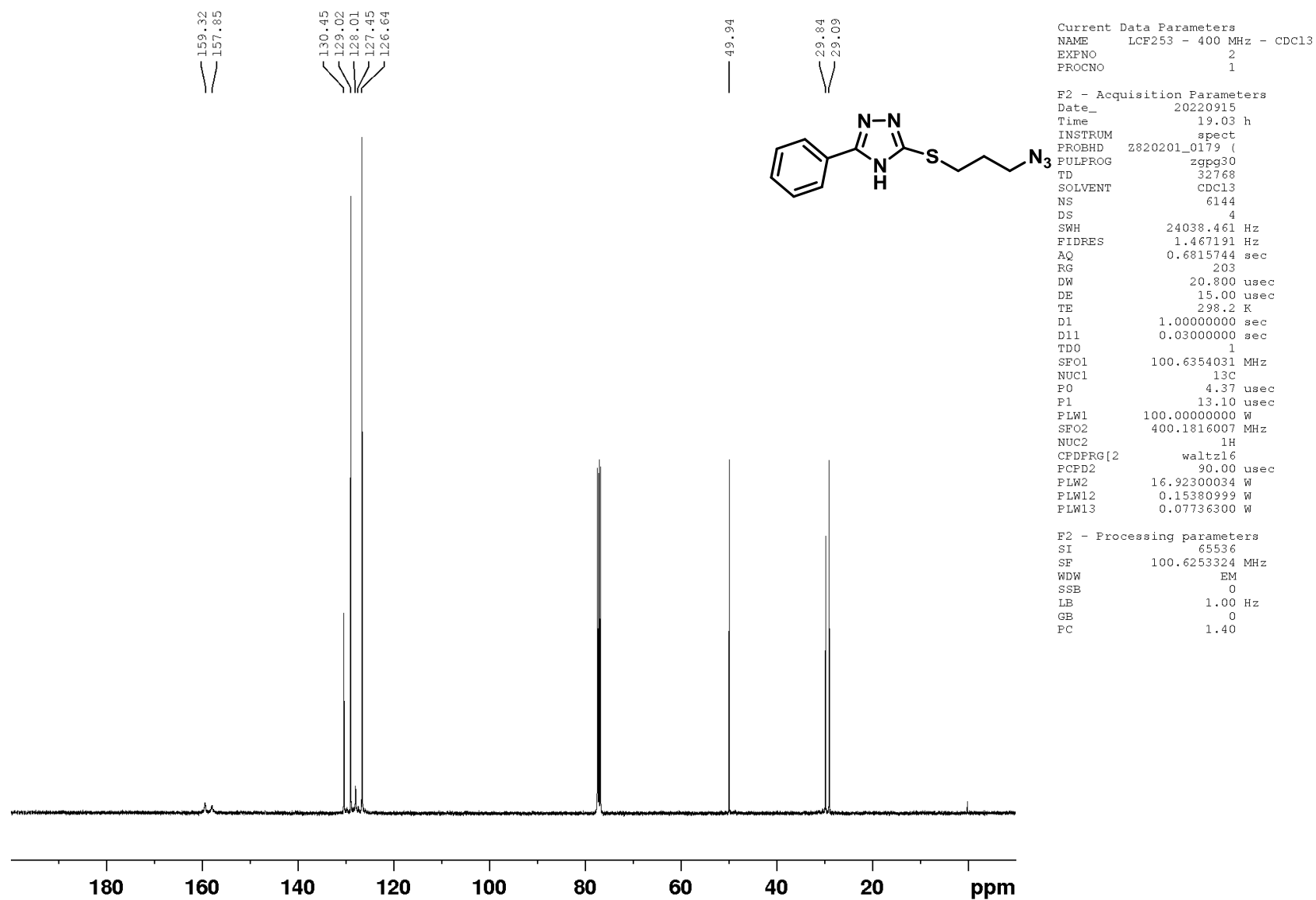
Anexo 29. Espectro de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **64.1**.

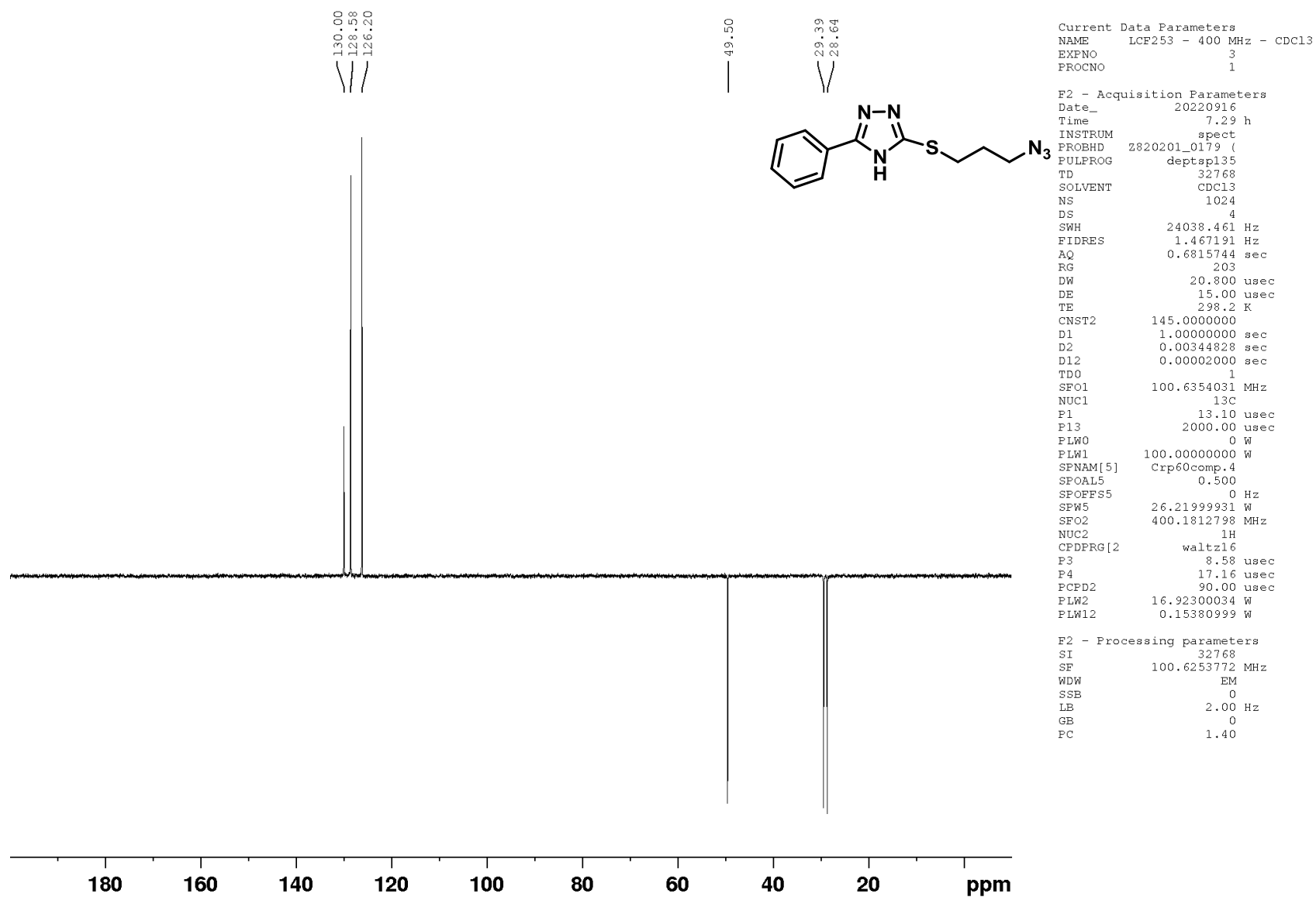


Anexo 30. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto **64.1**.

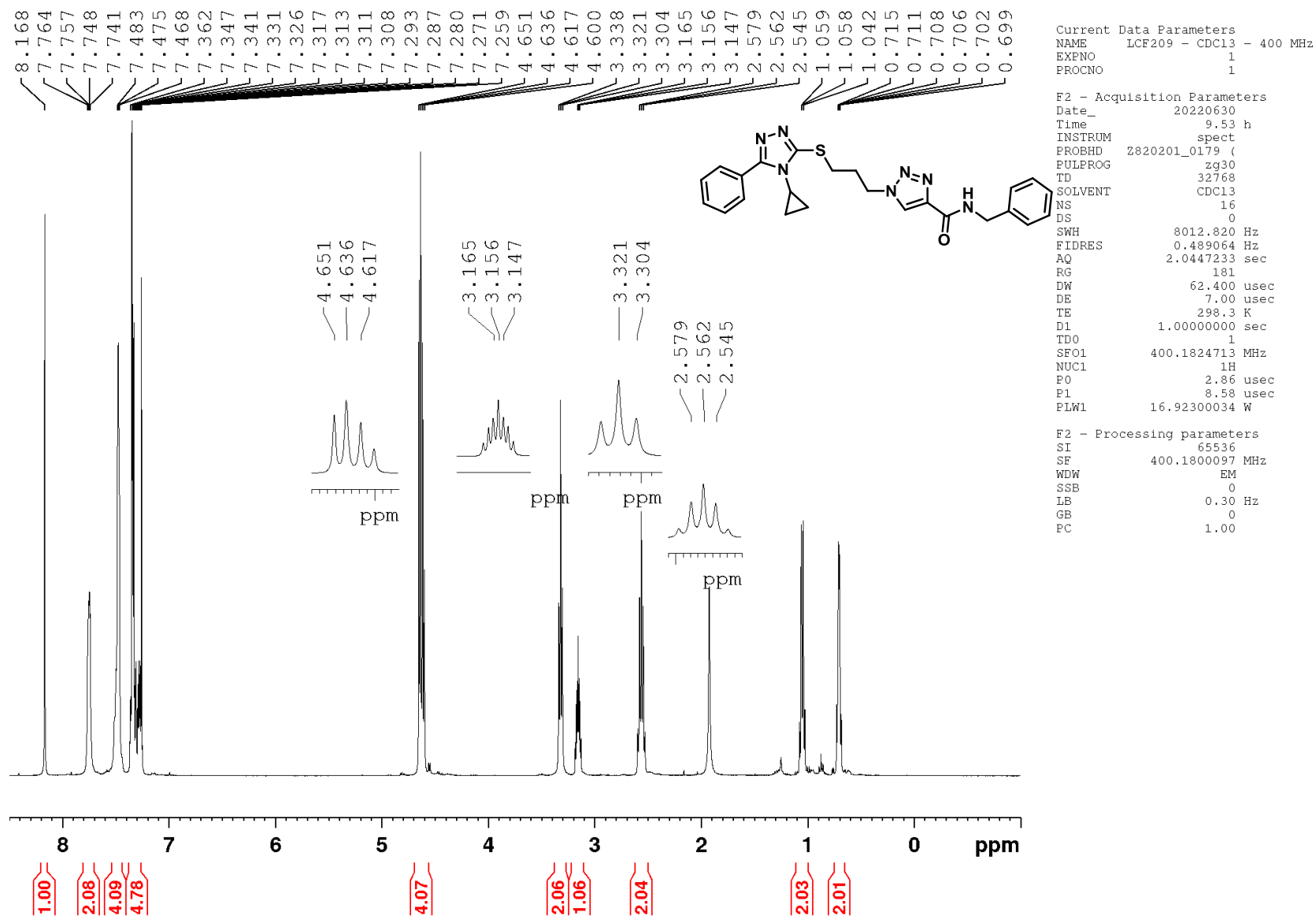


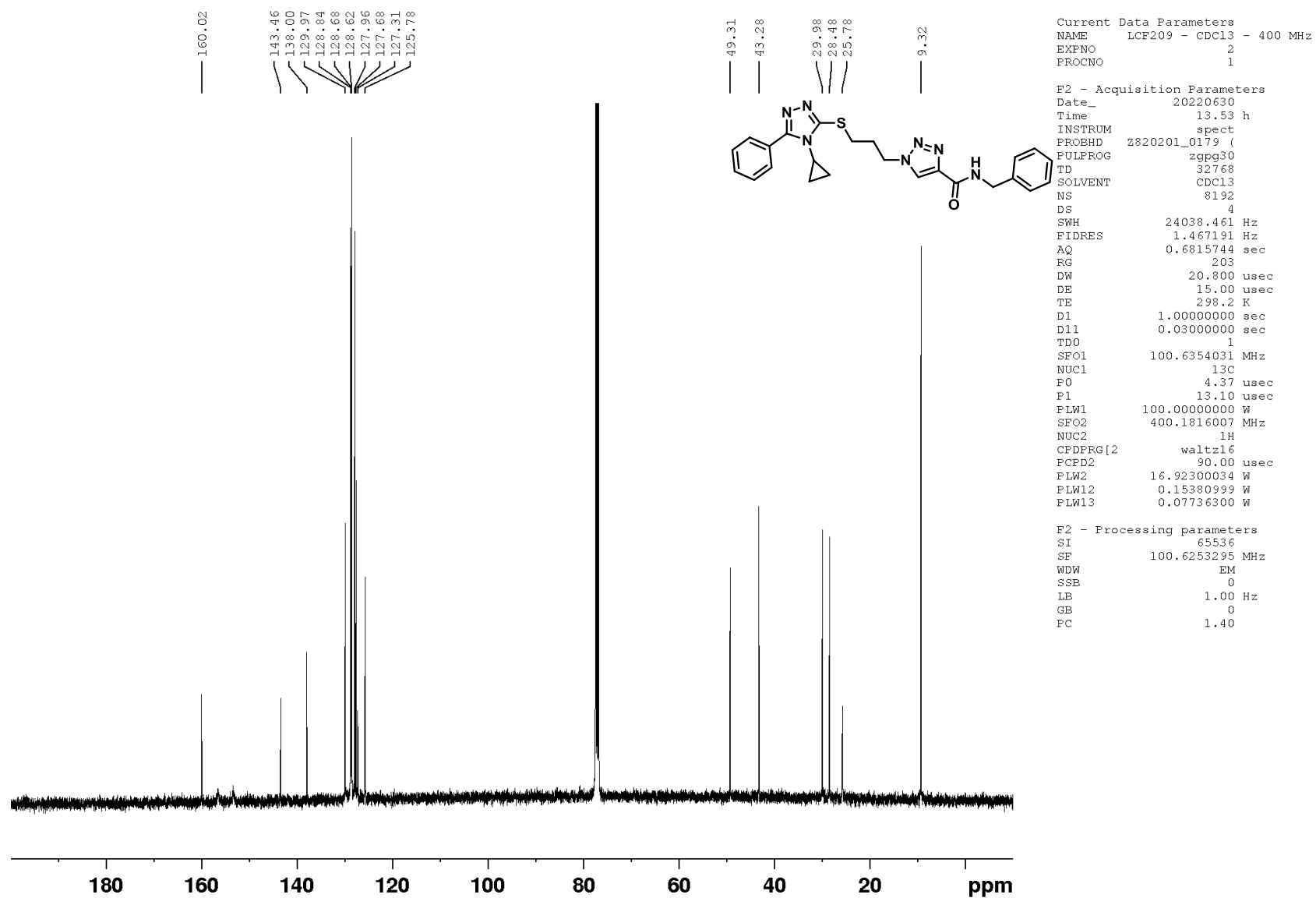
Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **64.2**.

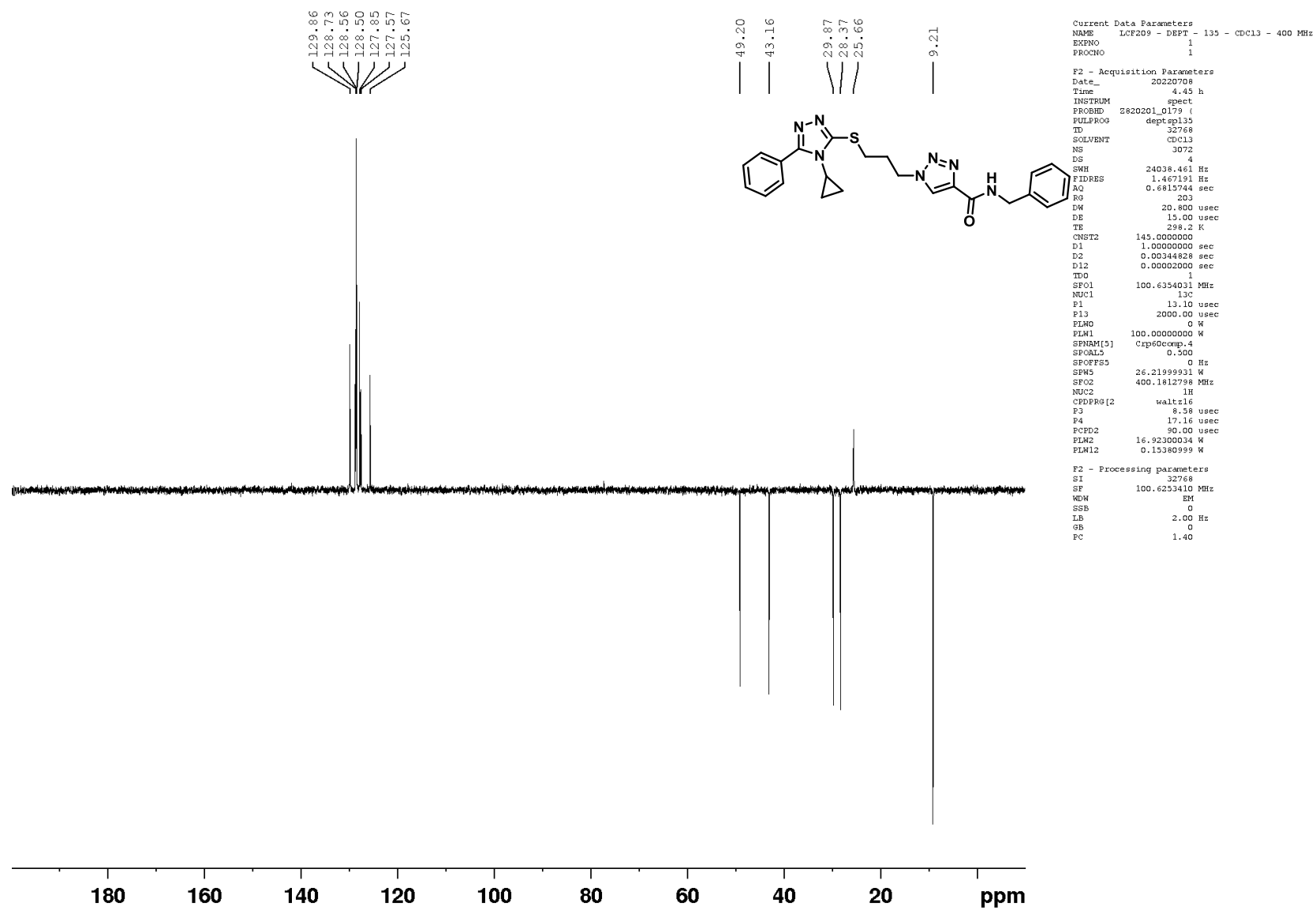
Anexo 32. Espectro de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 64.2.

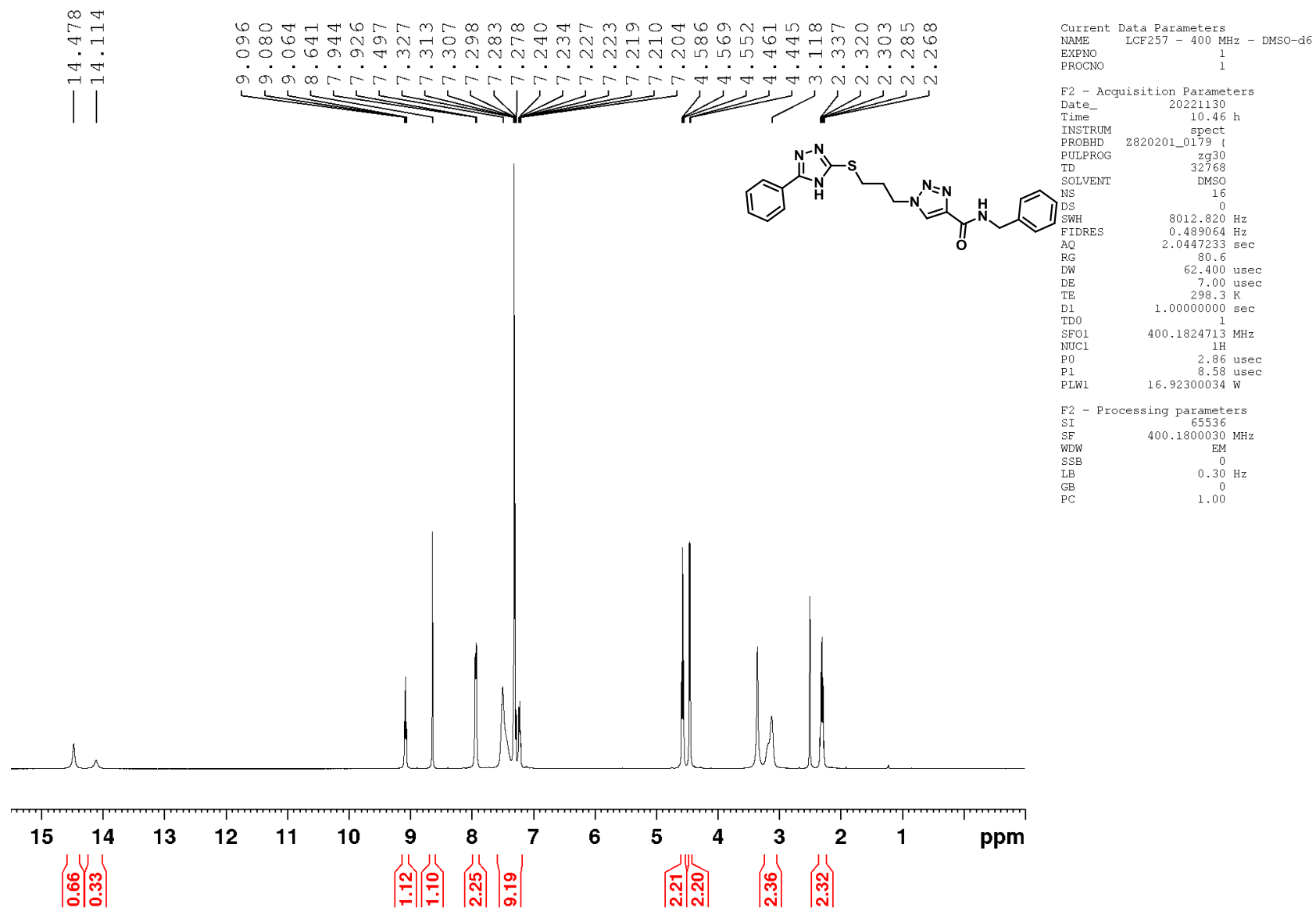


Anexo 33. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto 64.2.

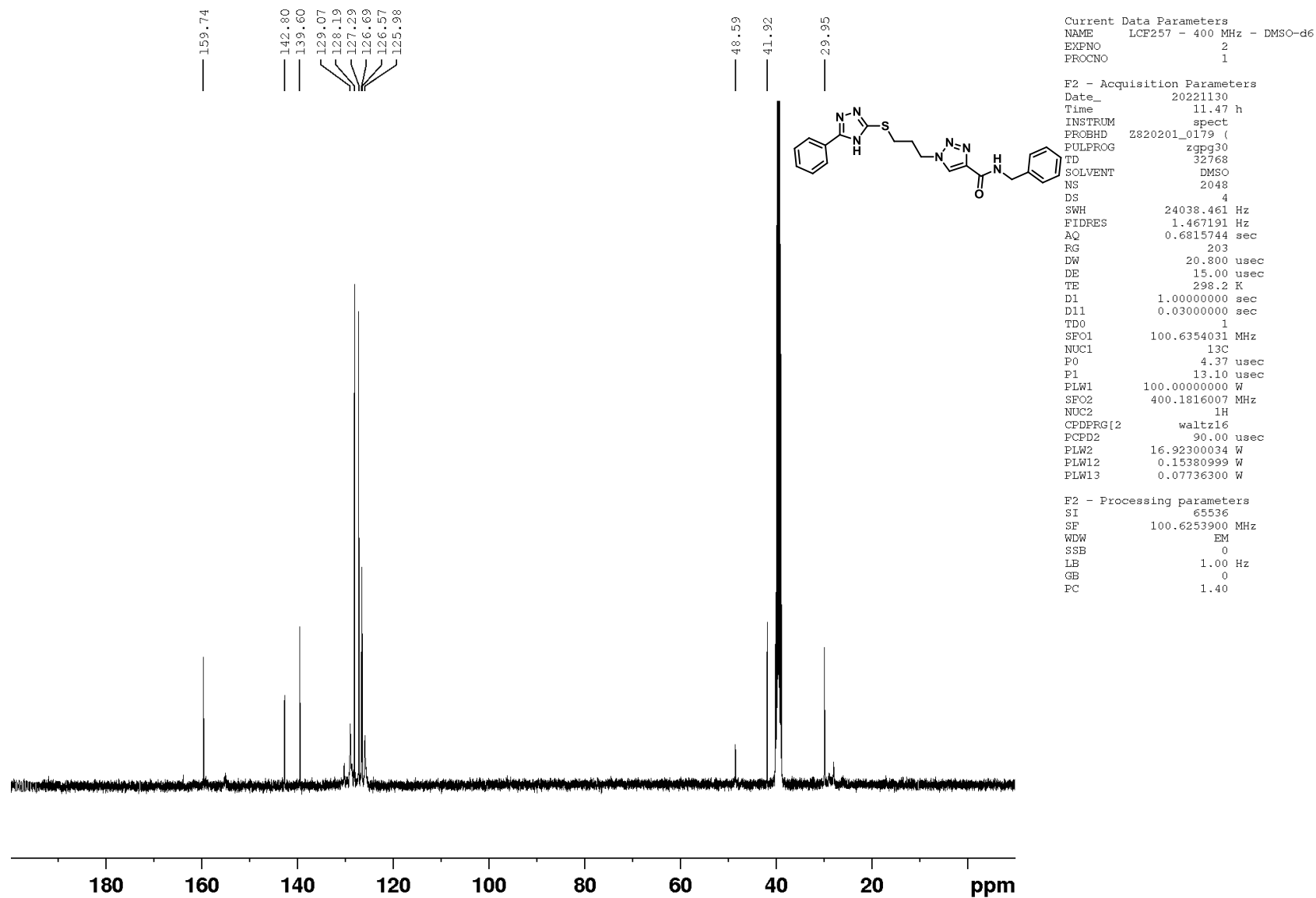
Anexo 34. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para o composto **63.1**.

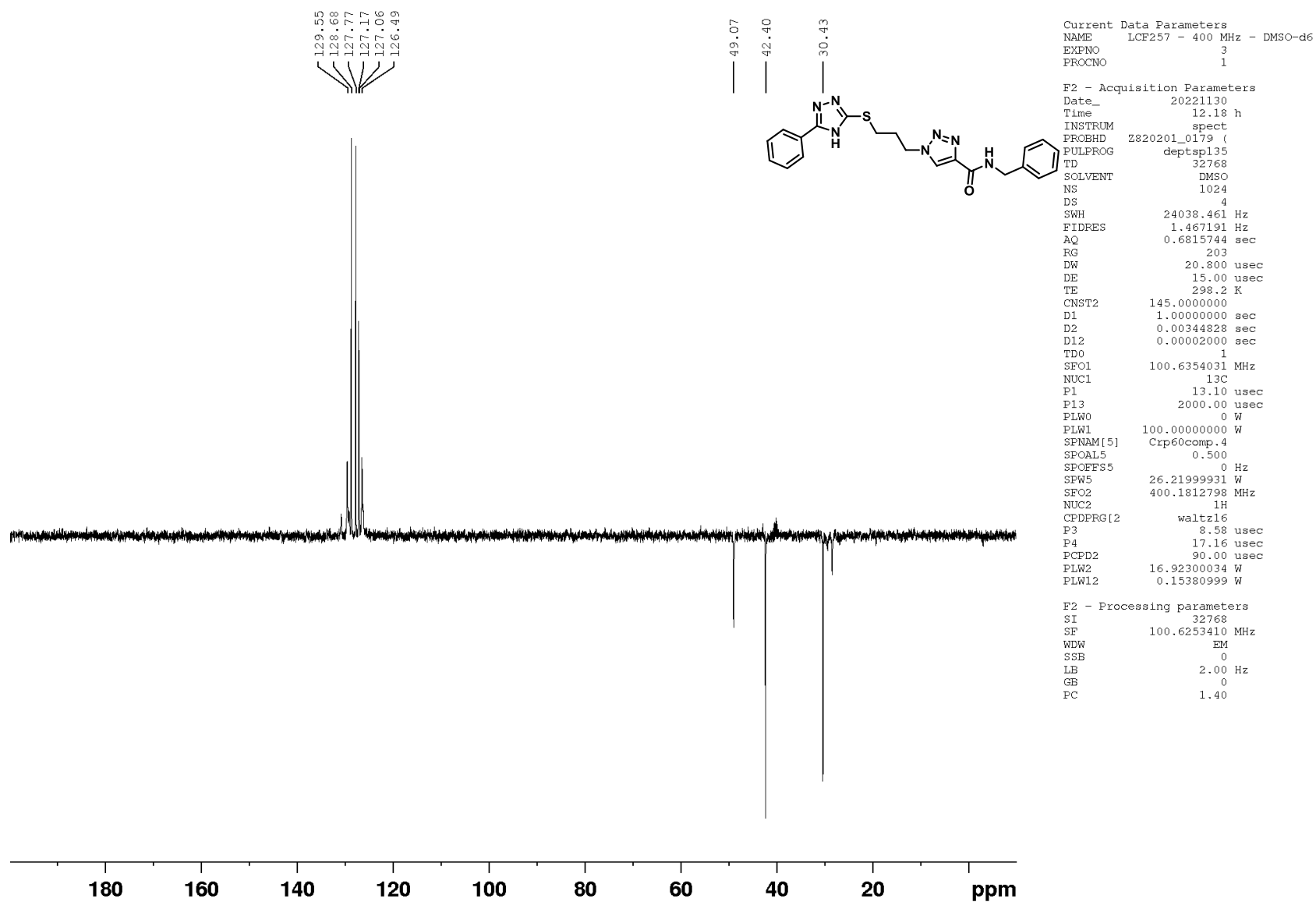
Anexo 35. Espectro de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **63.1**.

Anexo 36. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto **63.1**.

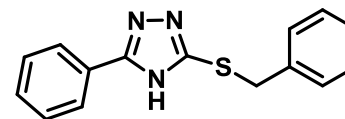
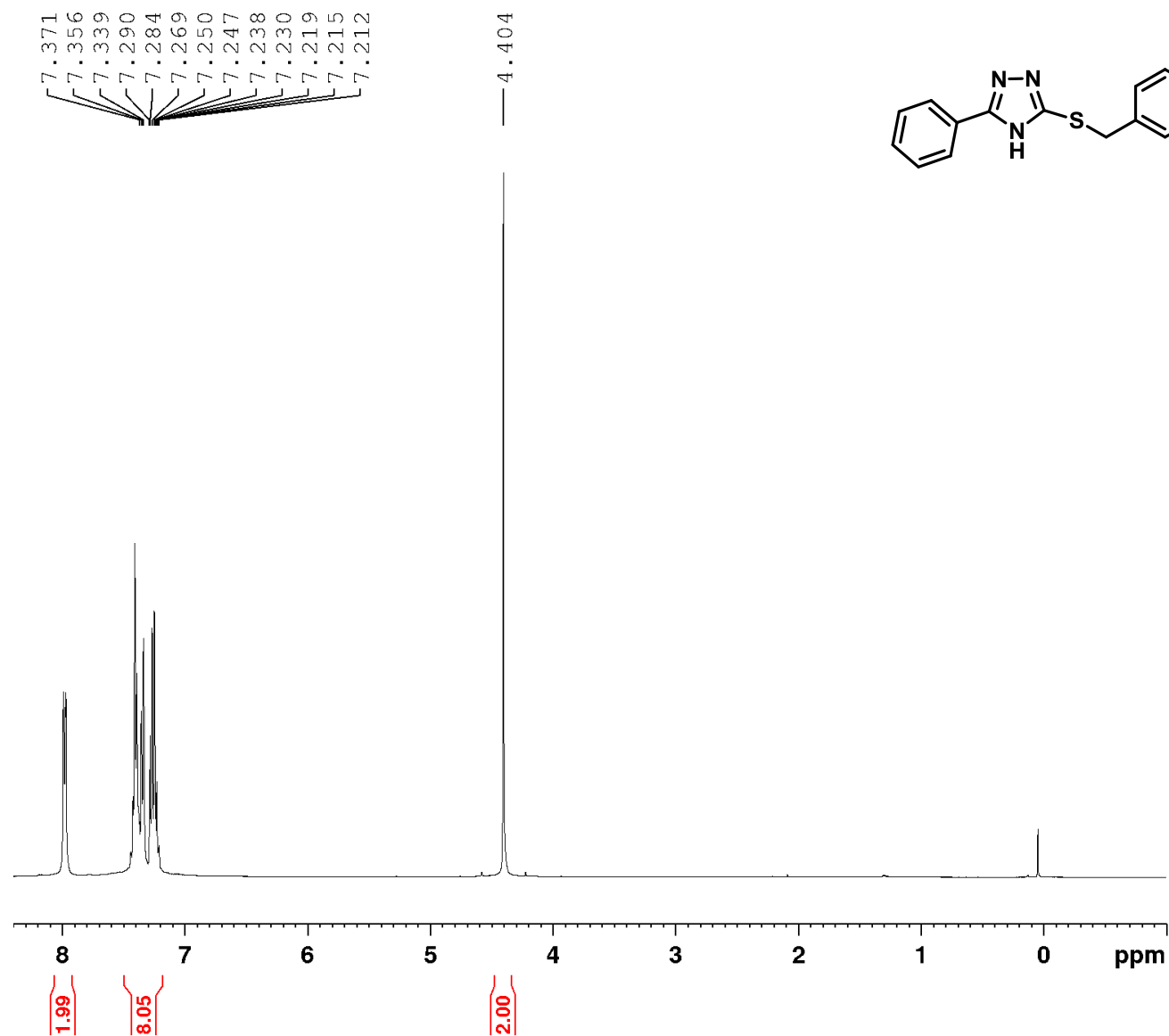


Anexo 37. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d₆) para o composto **63.2**.

Anexo 38. Espectro de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d6) do composto 63.2.



Anexo 39. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d₆) do composto **63.2**.

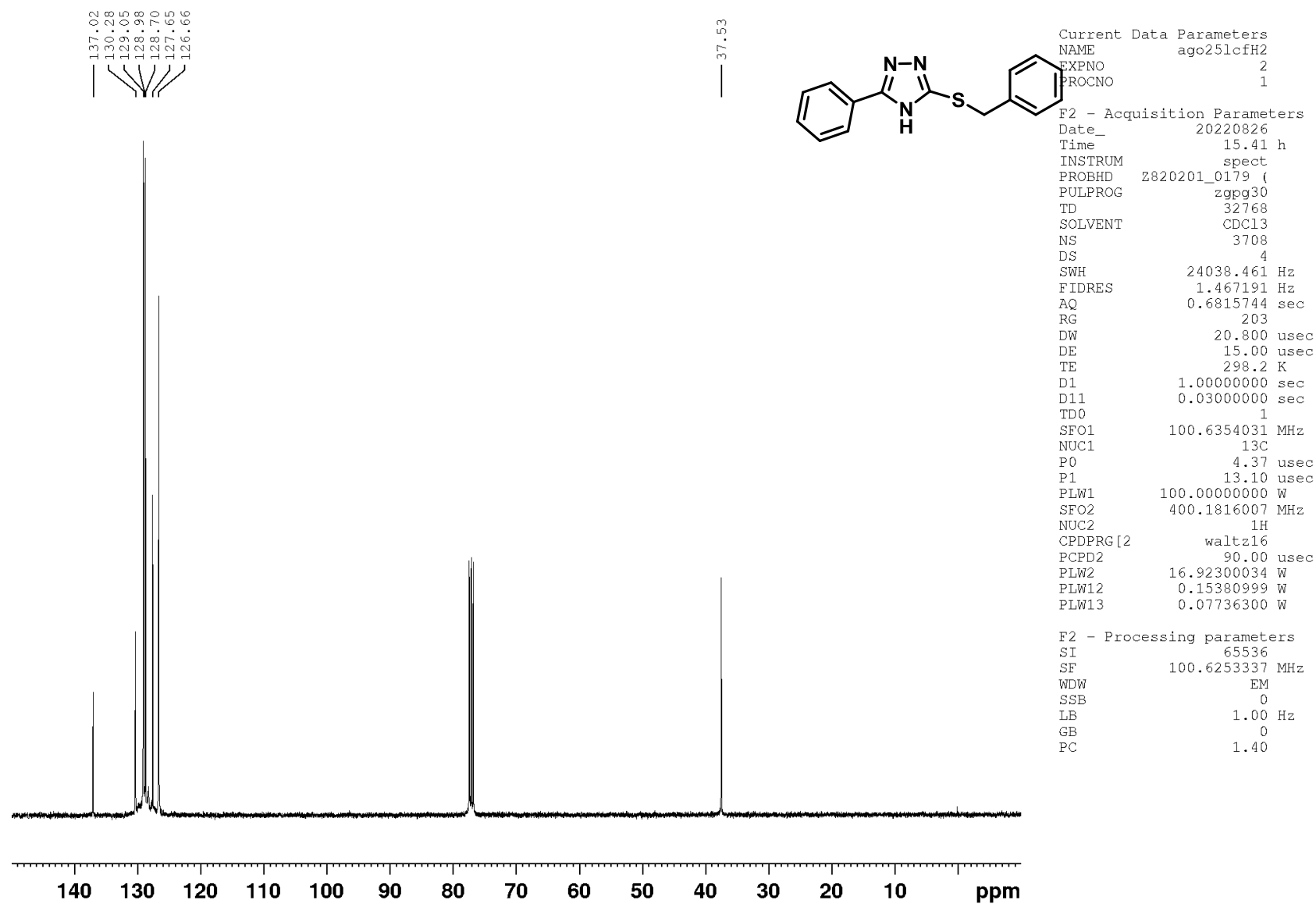


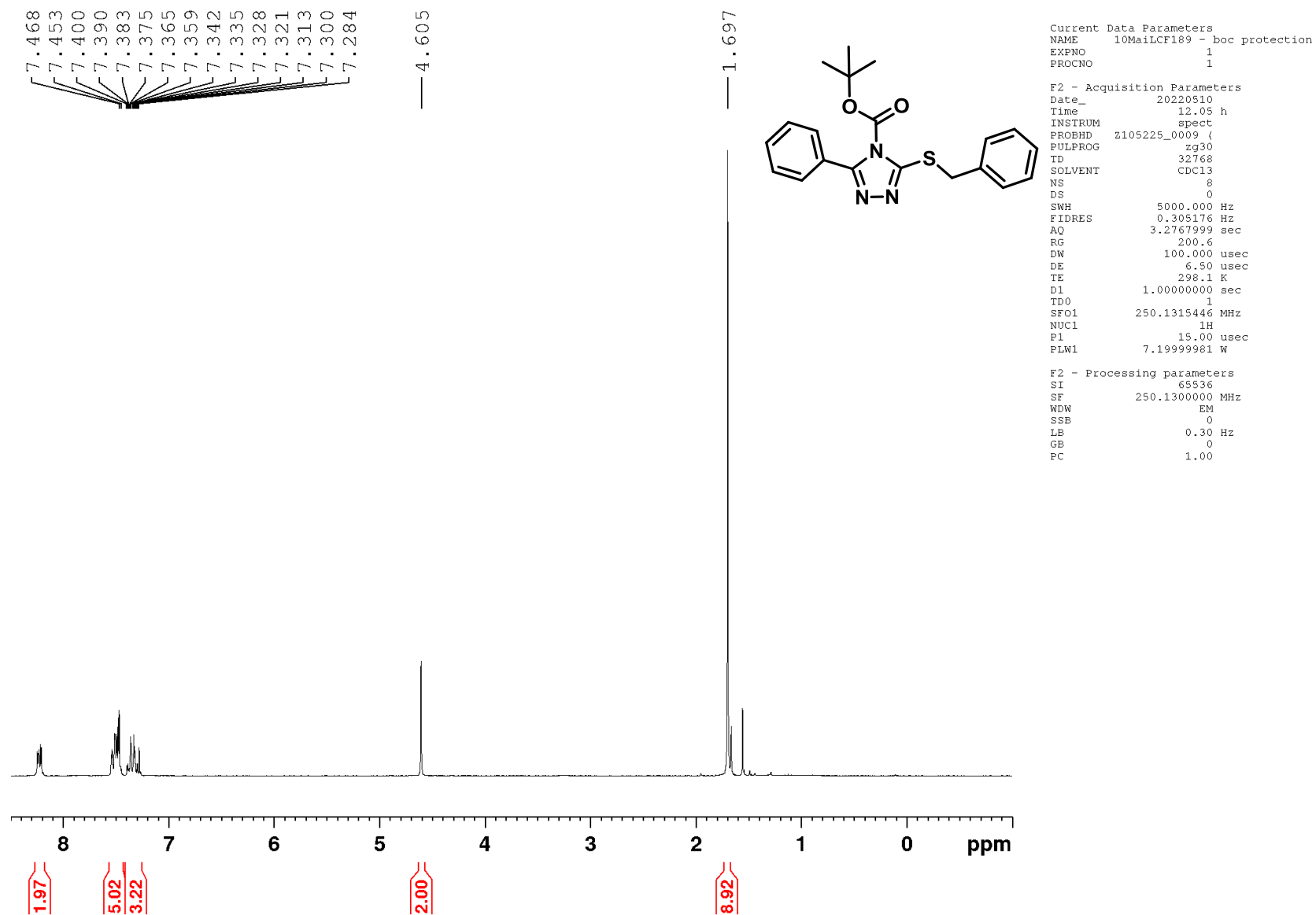
Current Data Parameters
 NAME ago25lcFH2
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220826
 Time 13.51 h
 INSTRUM spect
 PROBHD Z820201_0179 (
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.489064 Hz
 AQ 2.0447233 sec
 RG 64
 DW 62.400 usec
 DE 7.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1
 SF01 400.1824713 MHz
 NUC1 1H
 P0 2.86 usec
 P1 8.58 usec
 PLW1 16.92300034 W

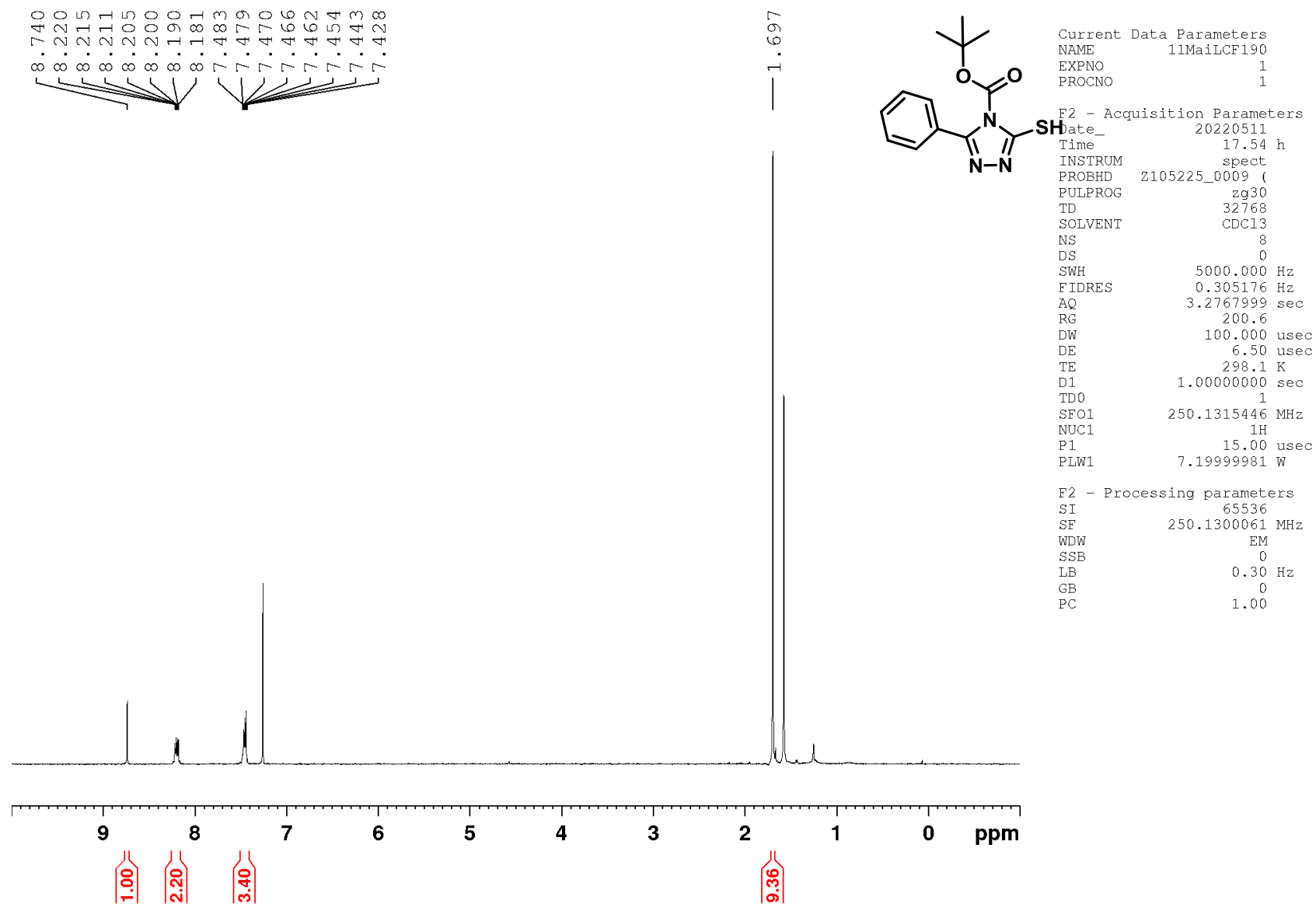
F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1800000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

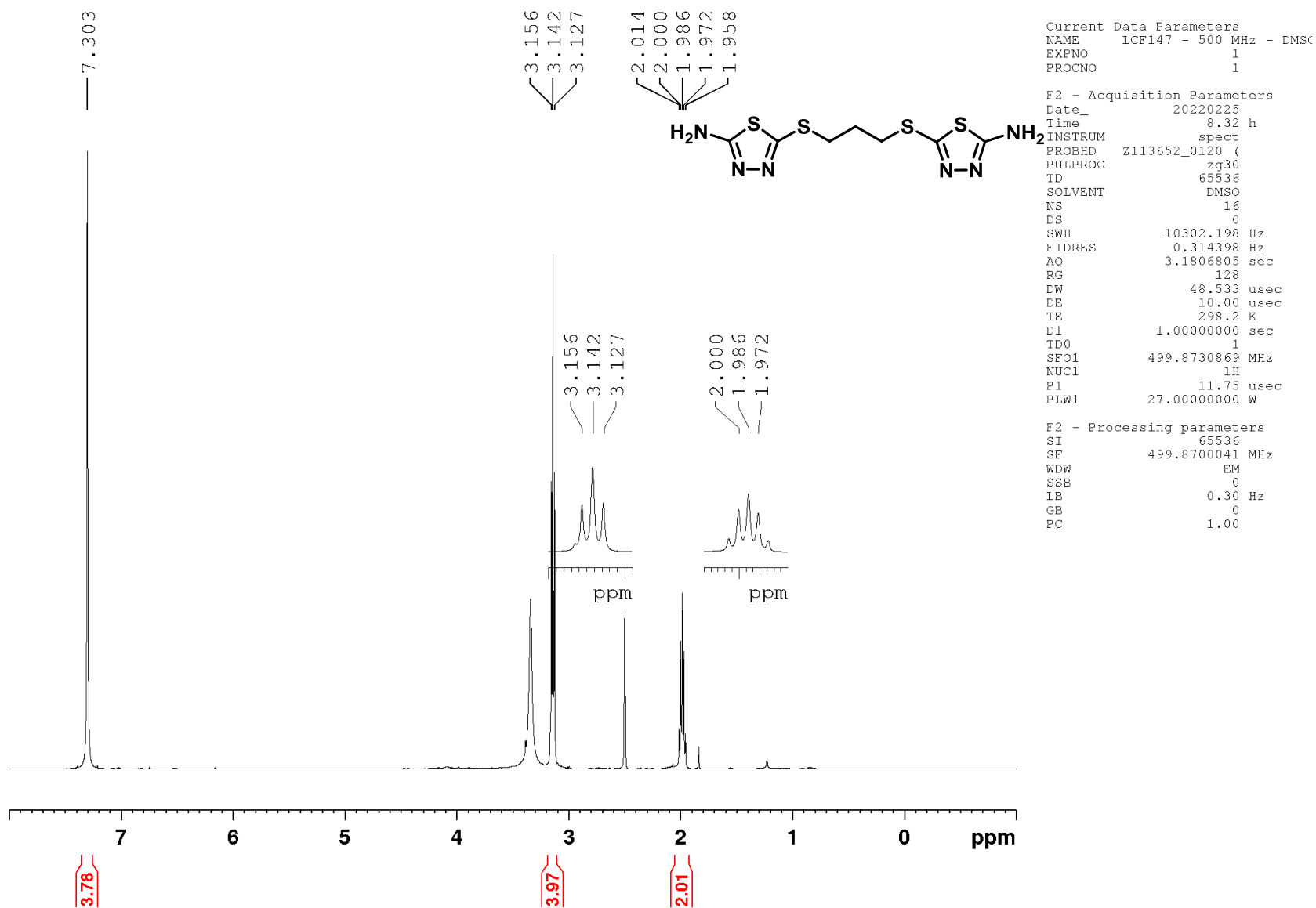
Anexo 40. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) para o composto 73.

Anexo 41. Espectro de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 73.

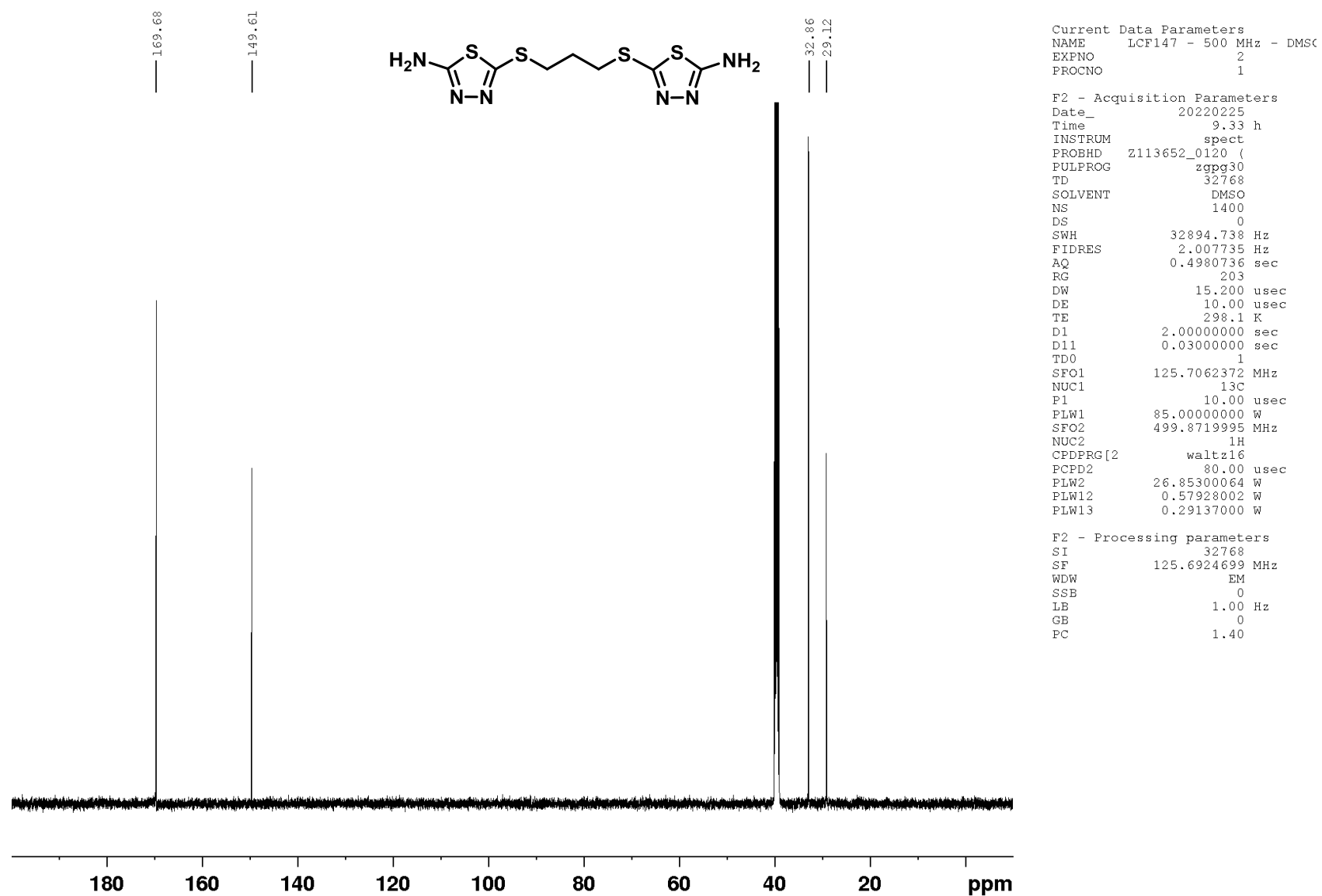


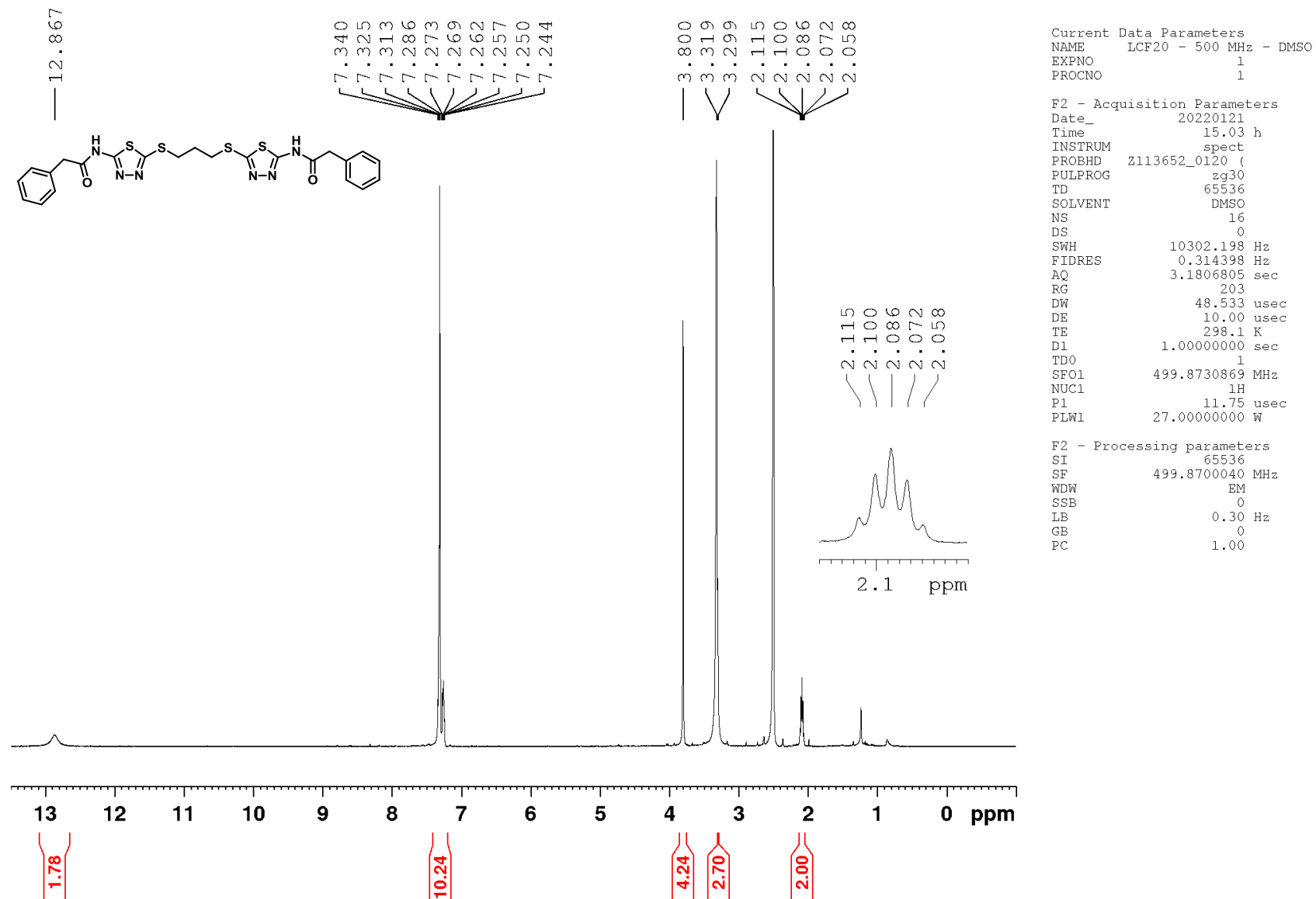
Anexo 42. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) para o composto 72.

Anexo 43. Espectro de RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) para o composto 71

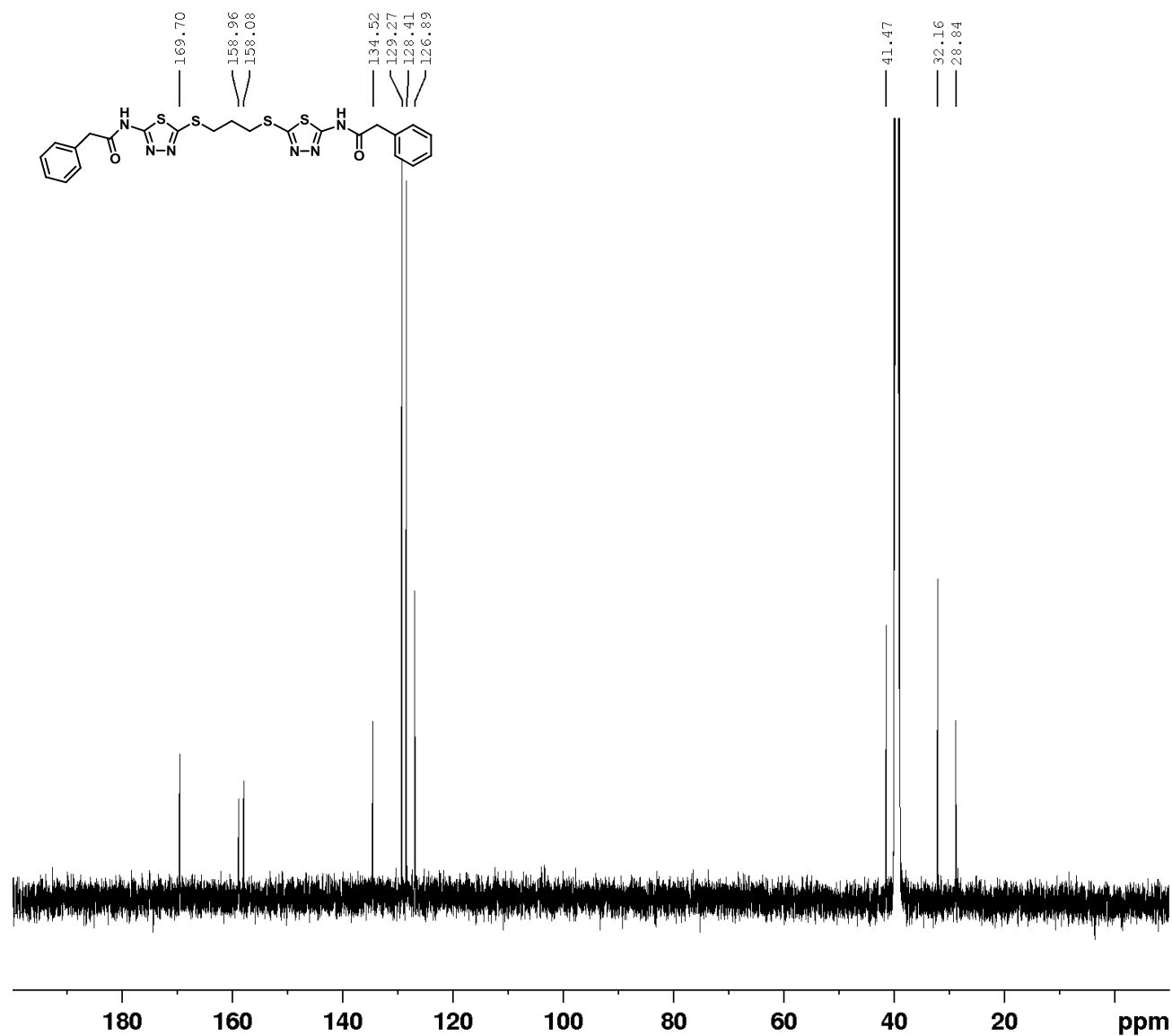


Anexo 44. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o composto 75.

Anexo 45. Espectro de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) do composto 75.



Anexo 46. . Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) para o composto 74.

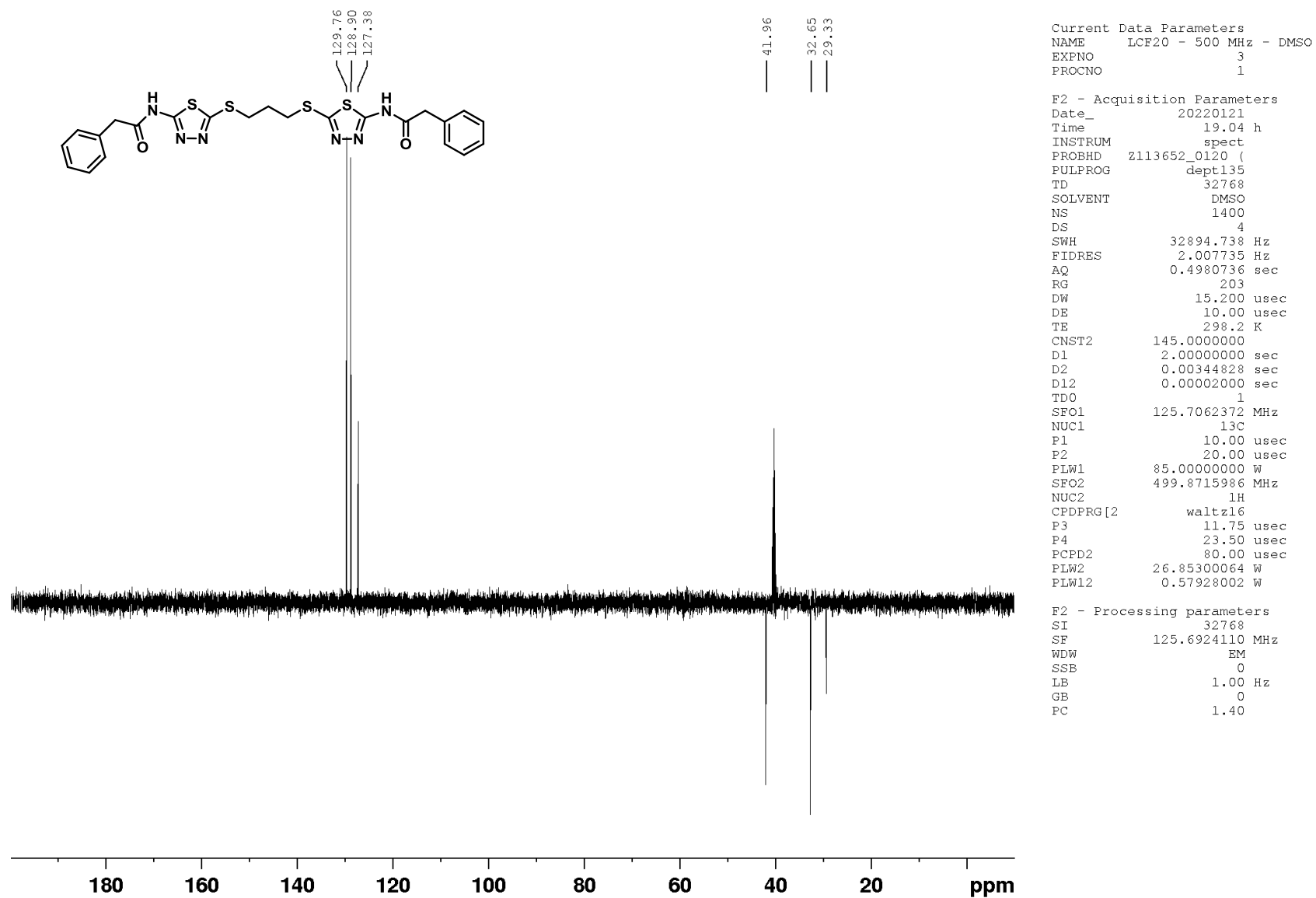


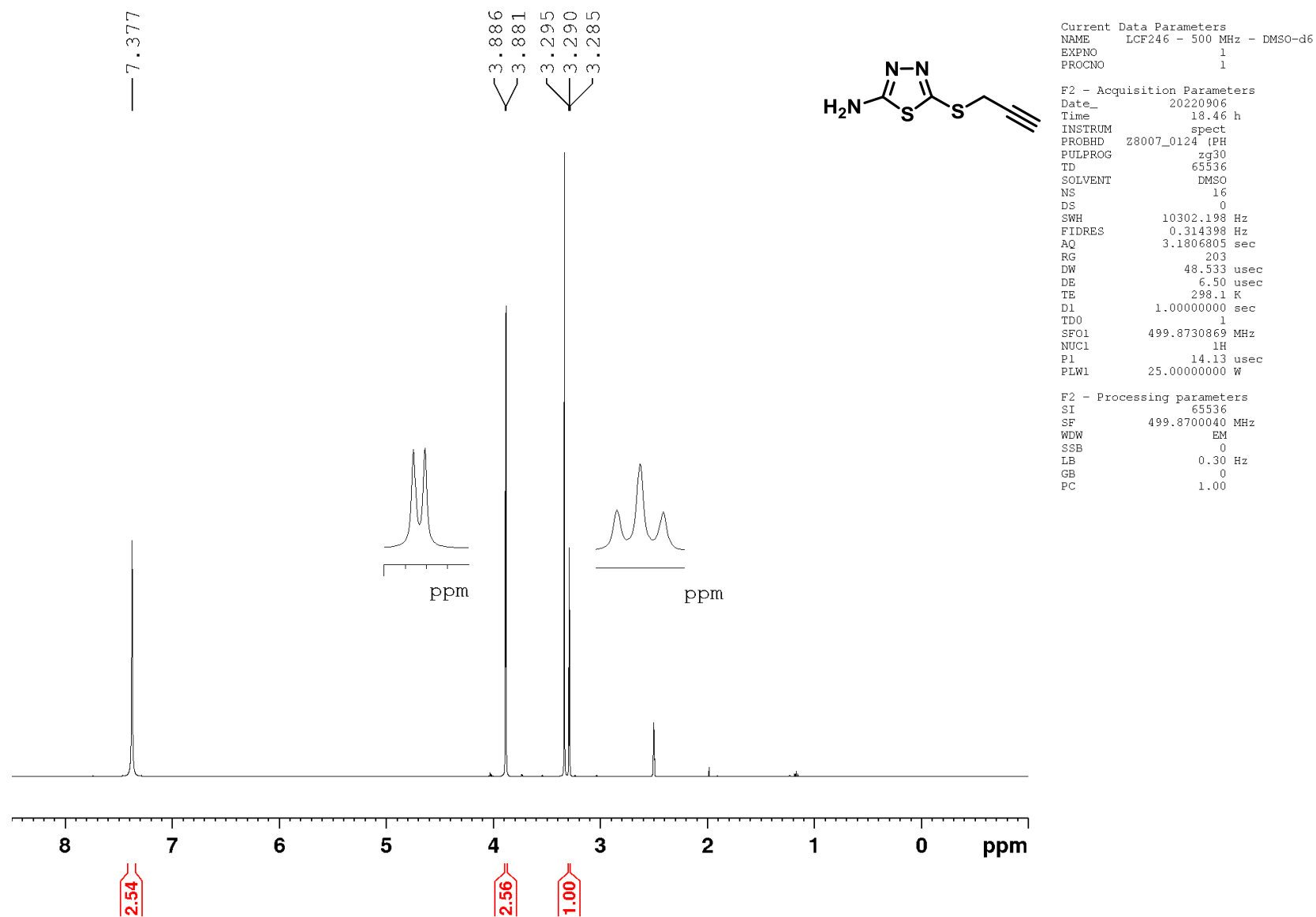
Current Data Parameters
 NAME LCF20 - 500 MHz - DMSO
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220121
 Time 18.03 h
 INSTRUM spect
 PROBHD z113652_0120 (
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 4200
 DS 0
 SWH 32894.738 Hz
 FIDRES 2.007735 Hz
 AQ 0.4980736 sec
 RG 203
 DW 15.200 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.1 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TD0 1
 SFO1 125.7062372 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 85.00000000 W
 SFO2 499.8719995 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 PCPD2 80.00 usec
 PLW2 26.85300064 W
 PLW12 0.57928002 W
 PLW13 0.29137000 W

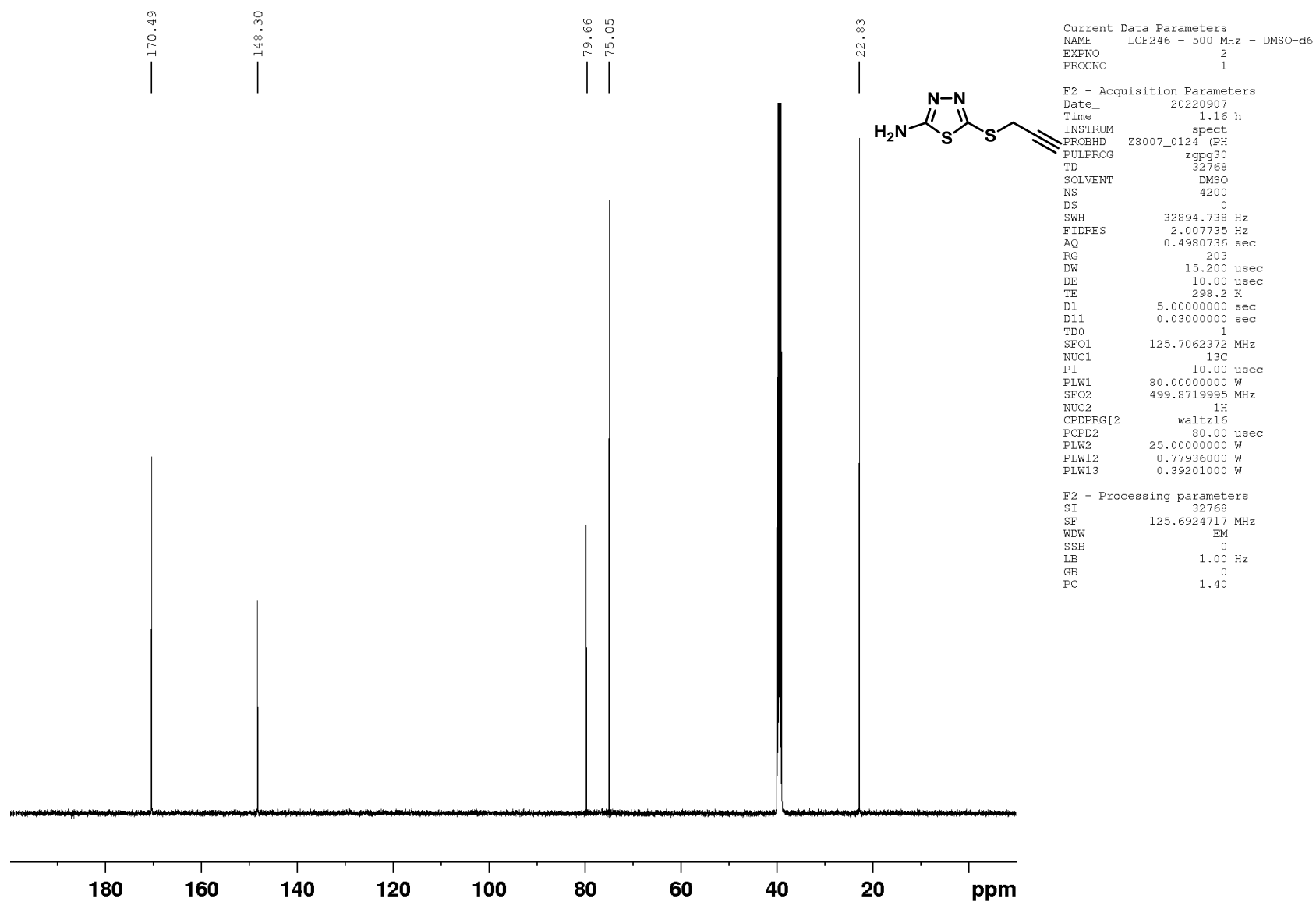
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.6924724 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Anexo 47. Espectro de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) do composto 74.

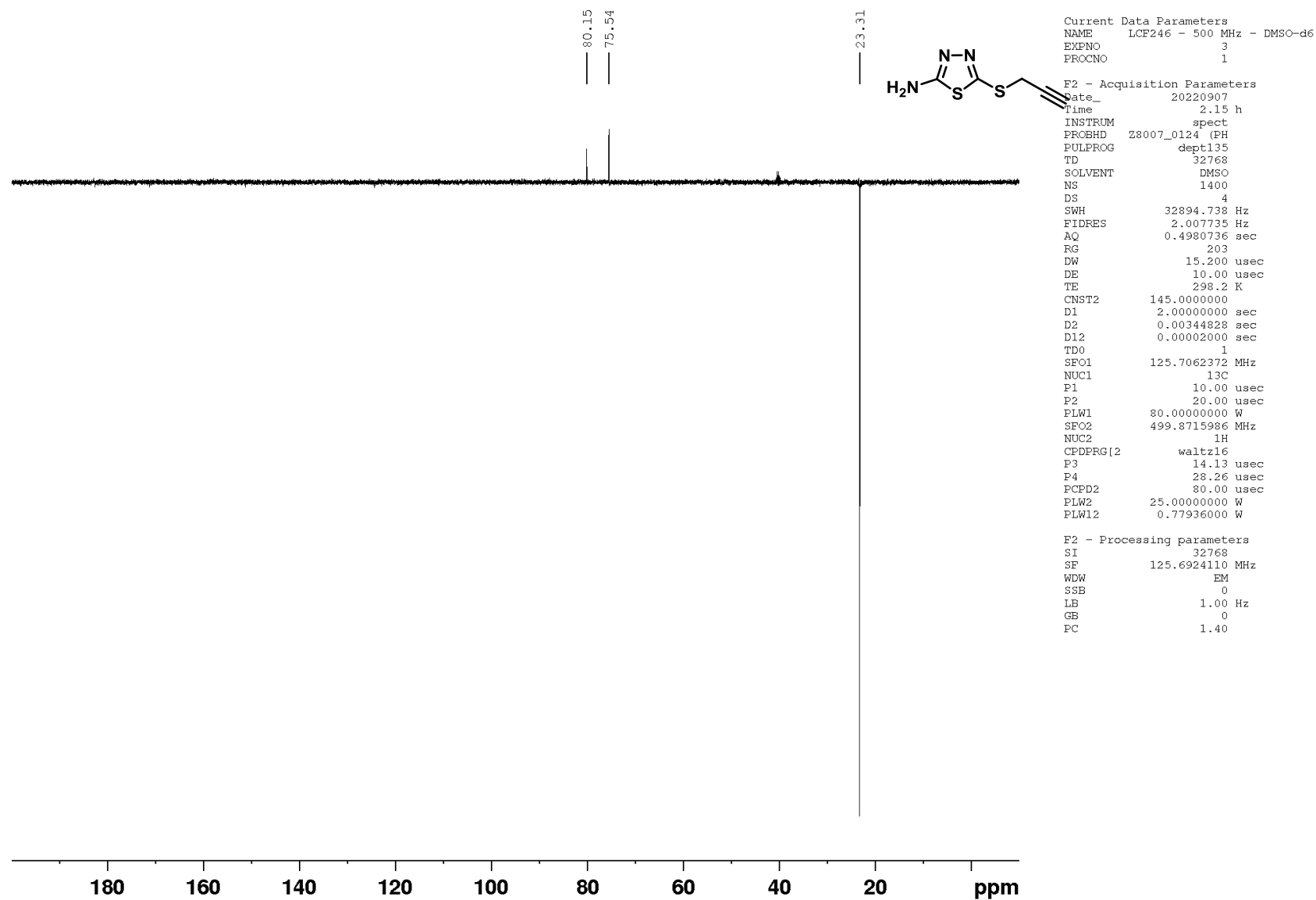
Anexo 48. Espectro de ¹³C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d₆) do composto 74.



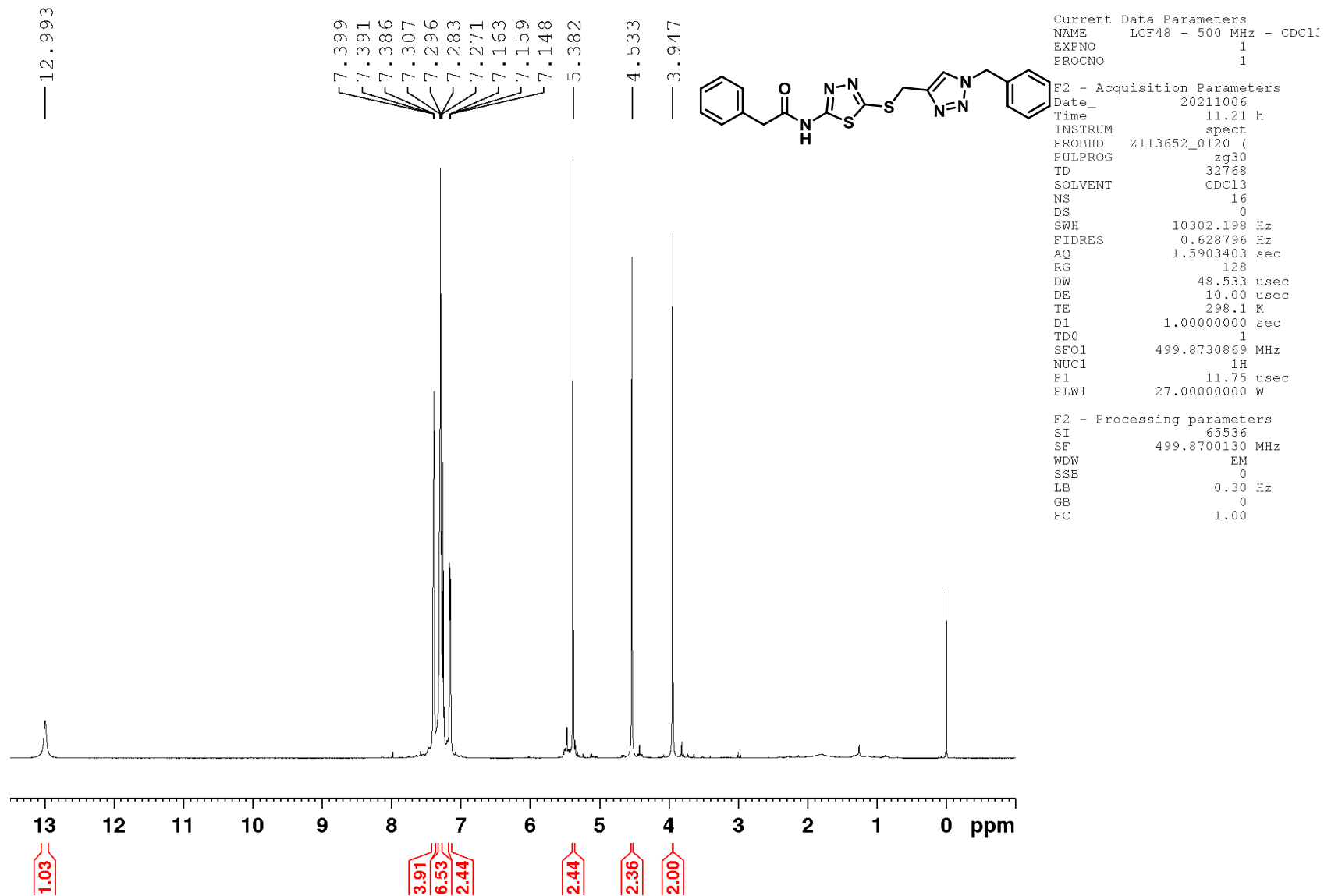
Anexo 49. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d6) para o composto **78**.



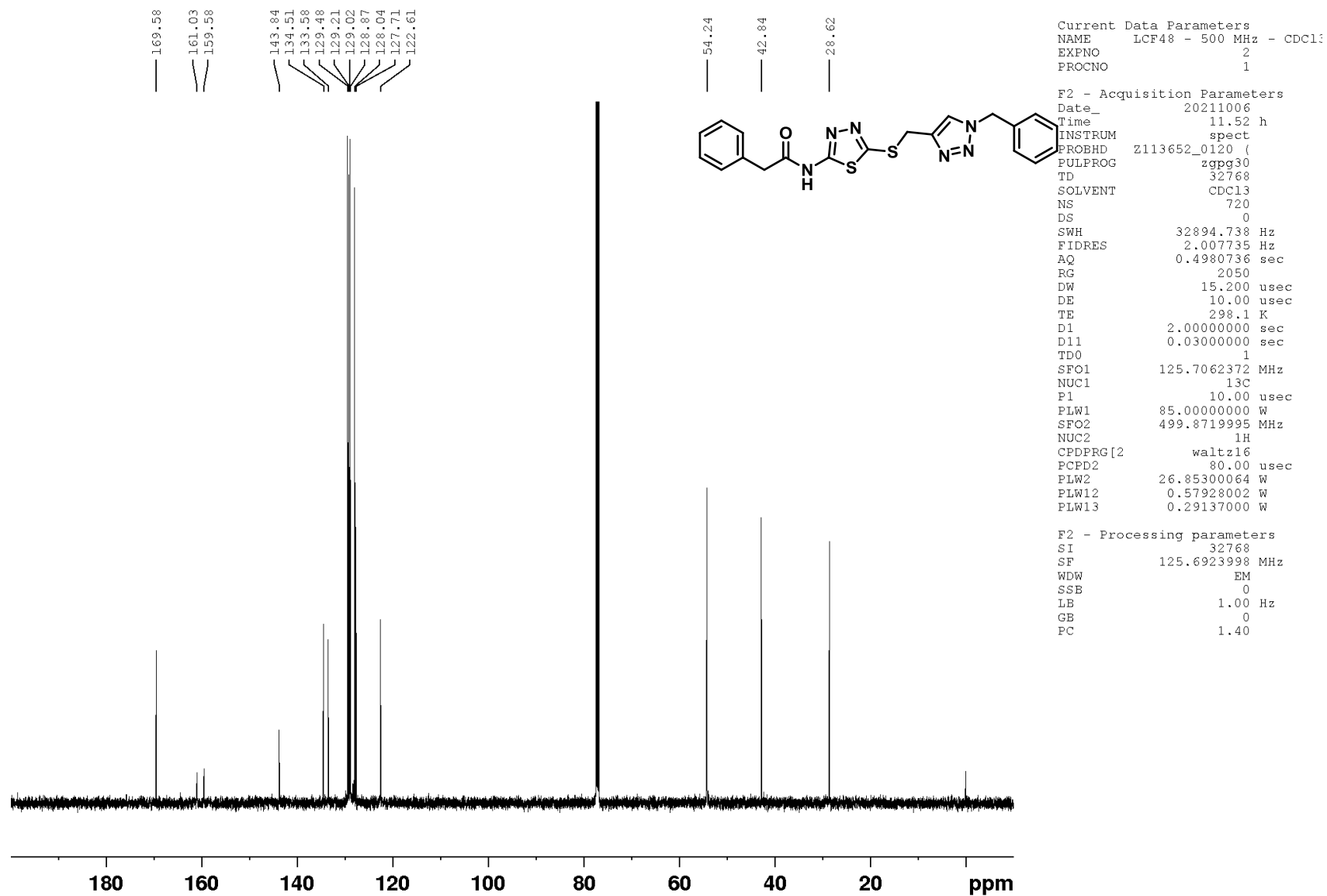
Anexo 50. Espectro de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) do composto 78.

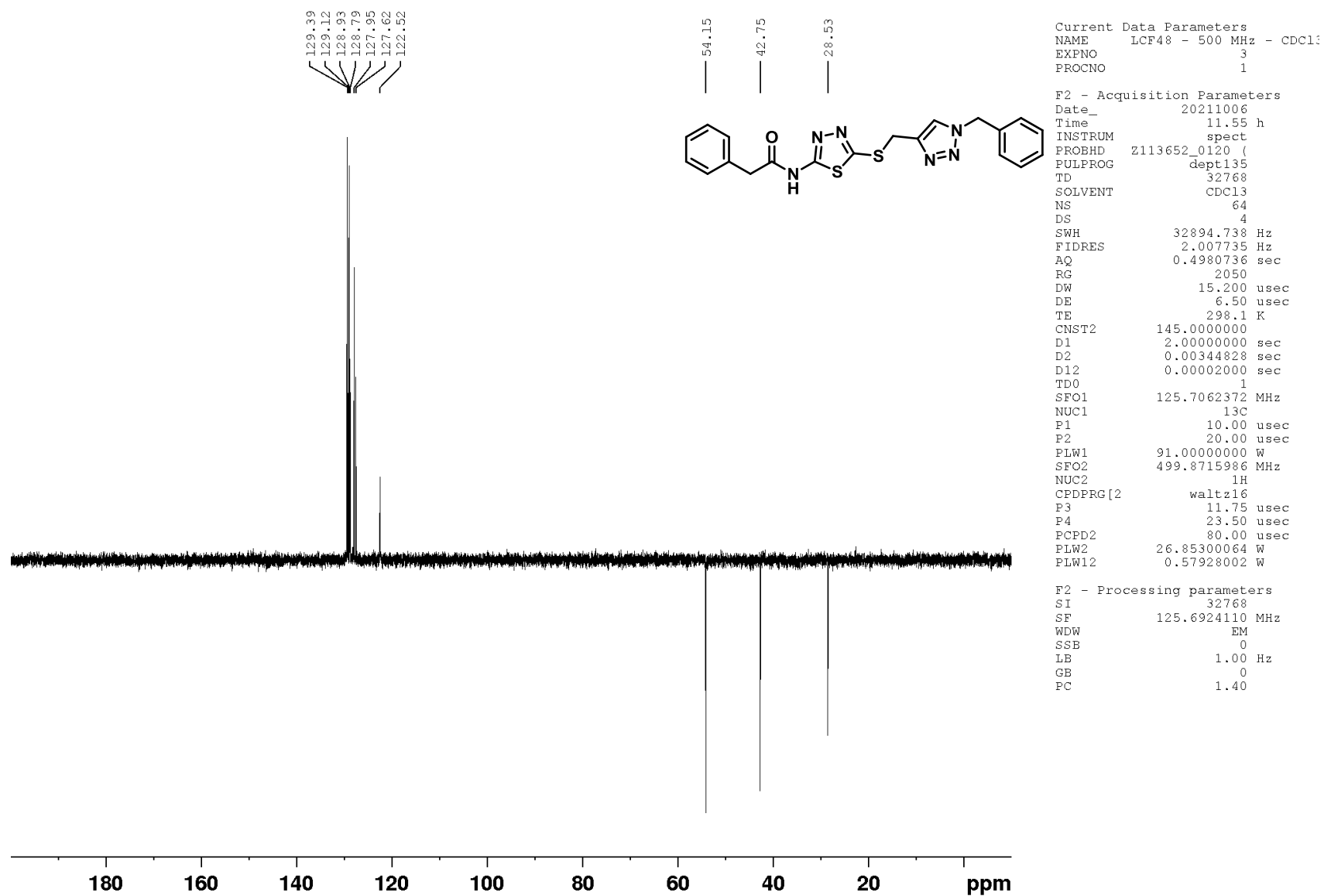


Anexo 51. Espectro de ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d6) do composto 78.



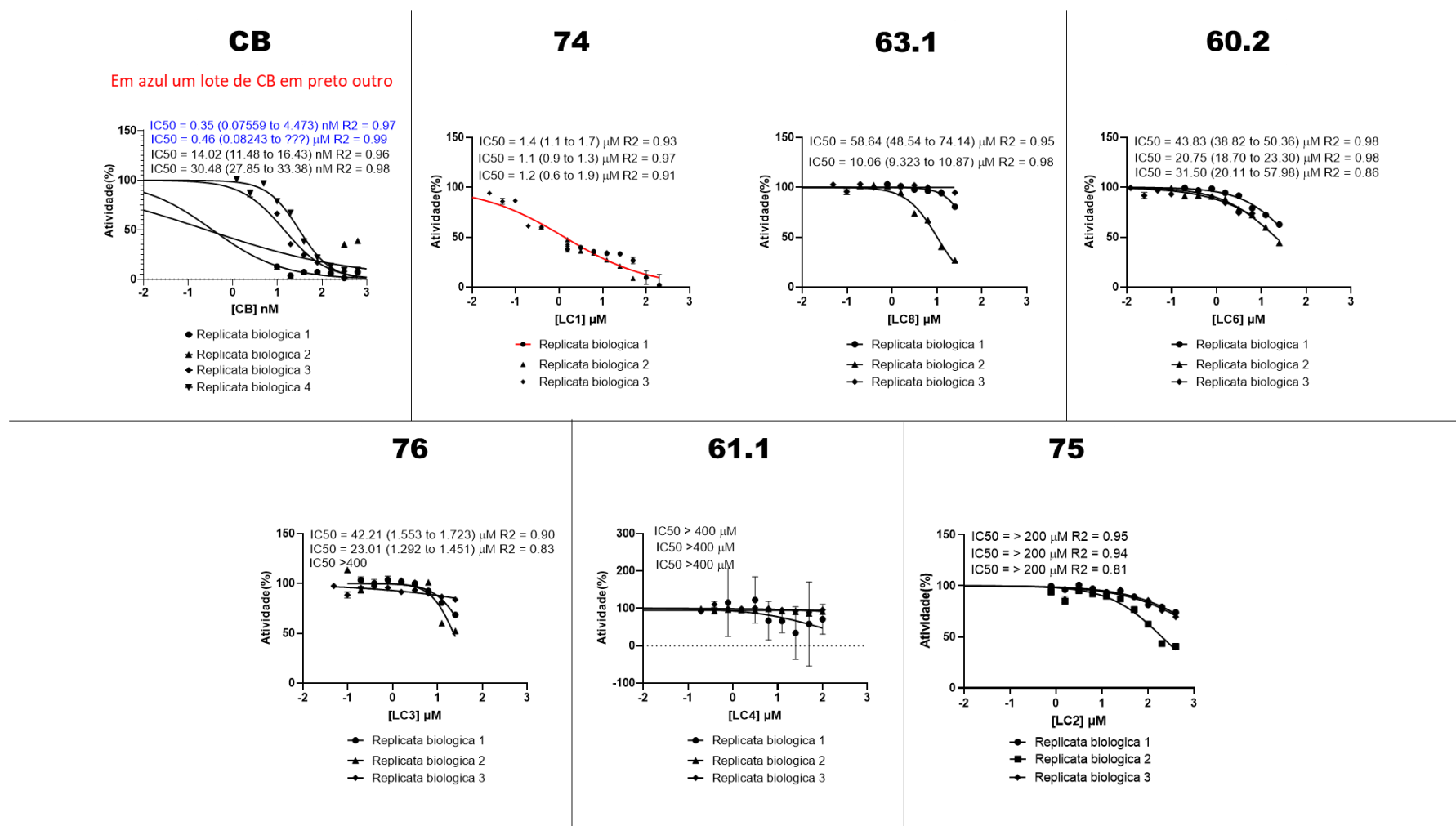
Anexo 52. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) para o composto 76.

Anexo 53. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 76.



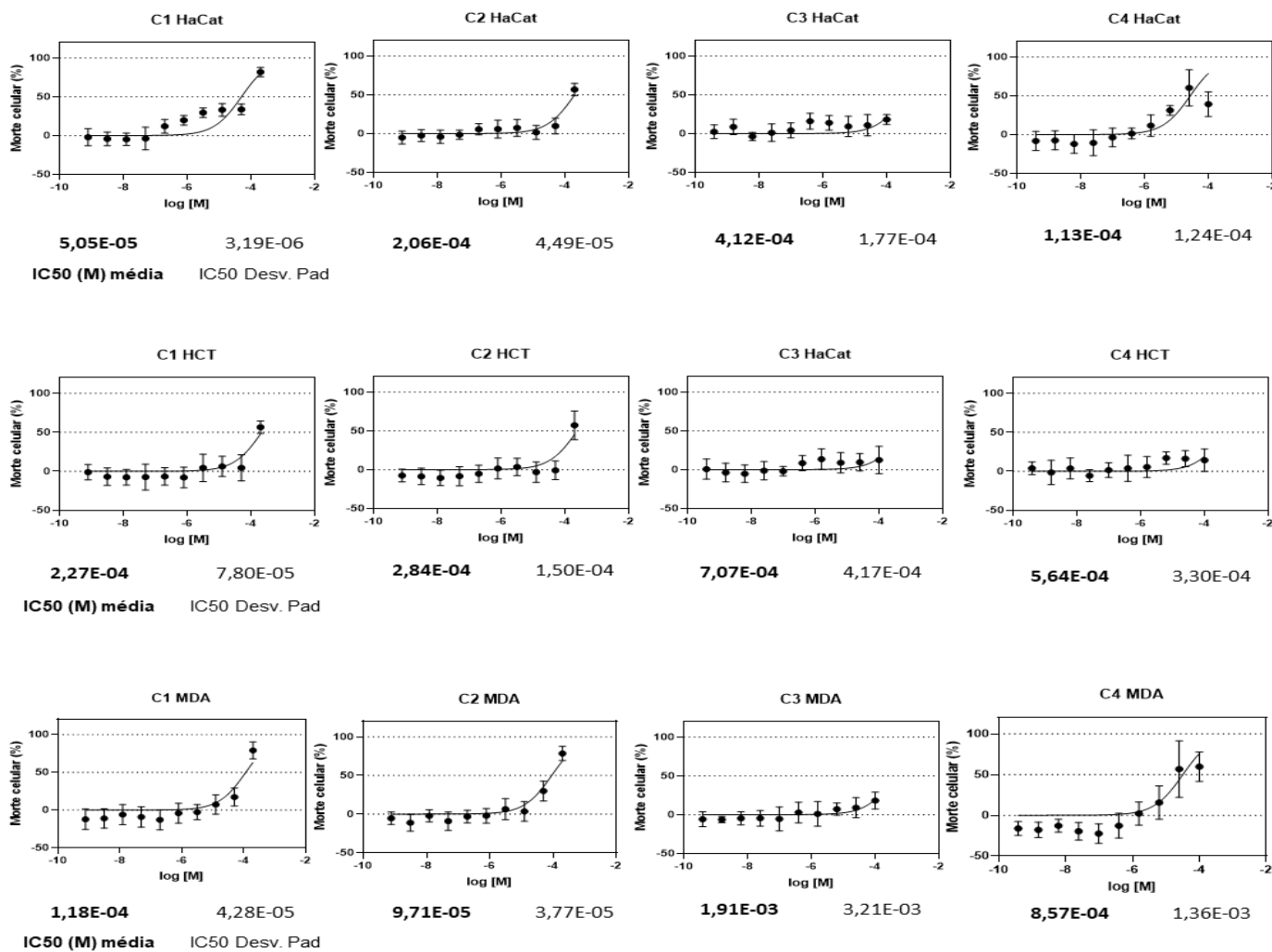
Anexo 54. Espectro de ¹³C DEPT-135 (125 MHz, CDCl₃) do composto 76.

7.2 GRÁFICOS DE INIBIÇÃO FRENTE À ENZIMA ISOLADA.

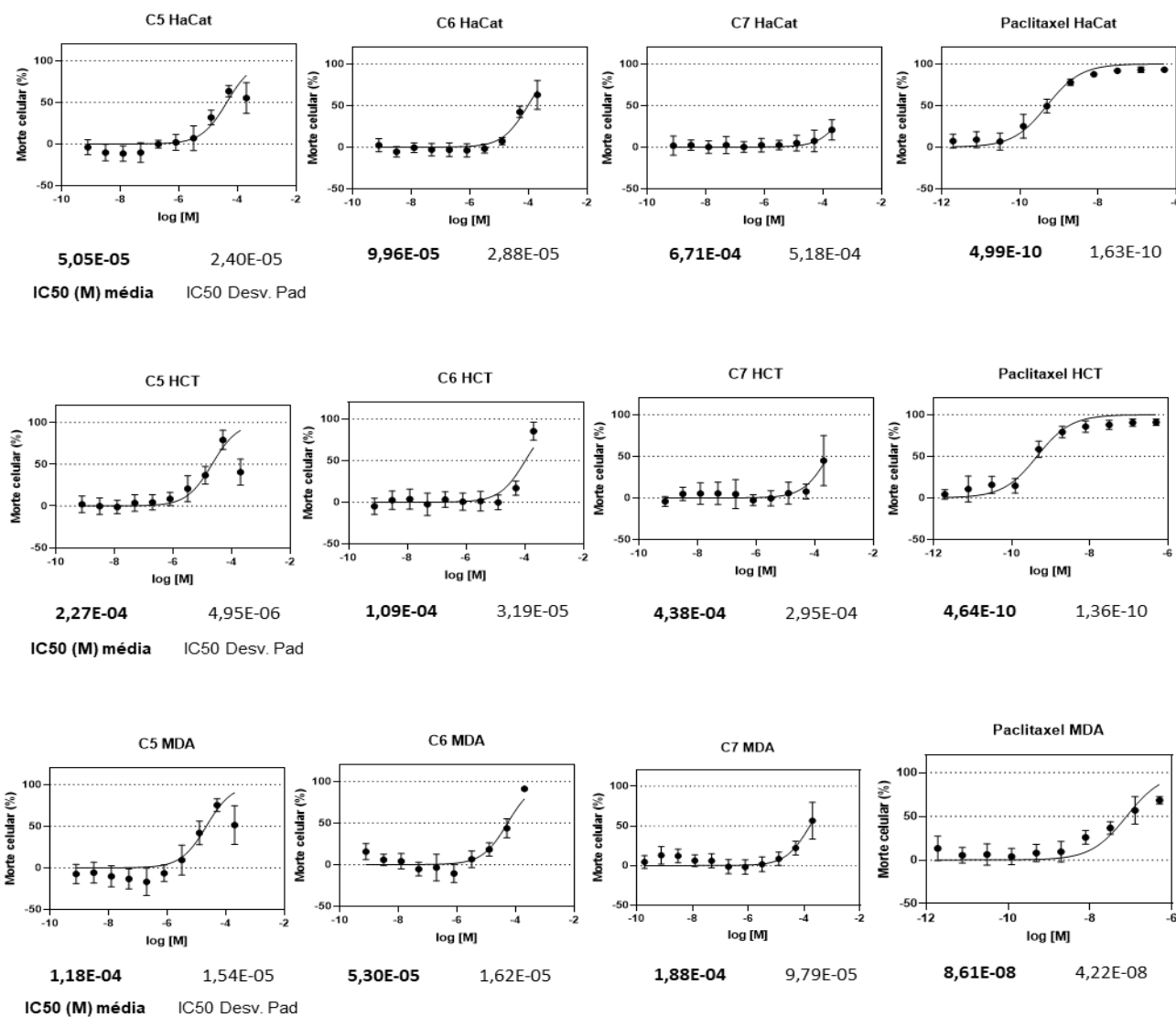


Anexo 55. Curvas de inibição para os compostos avaliados frente à glutaminase isolada, efetuadas em triplicata.

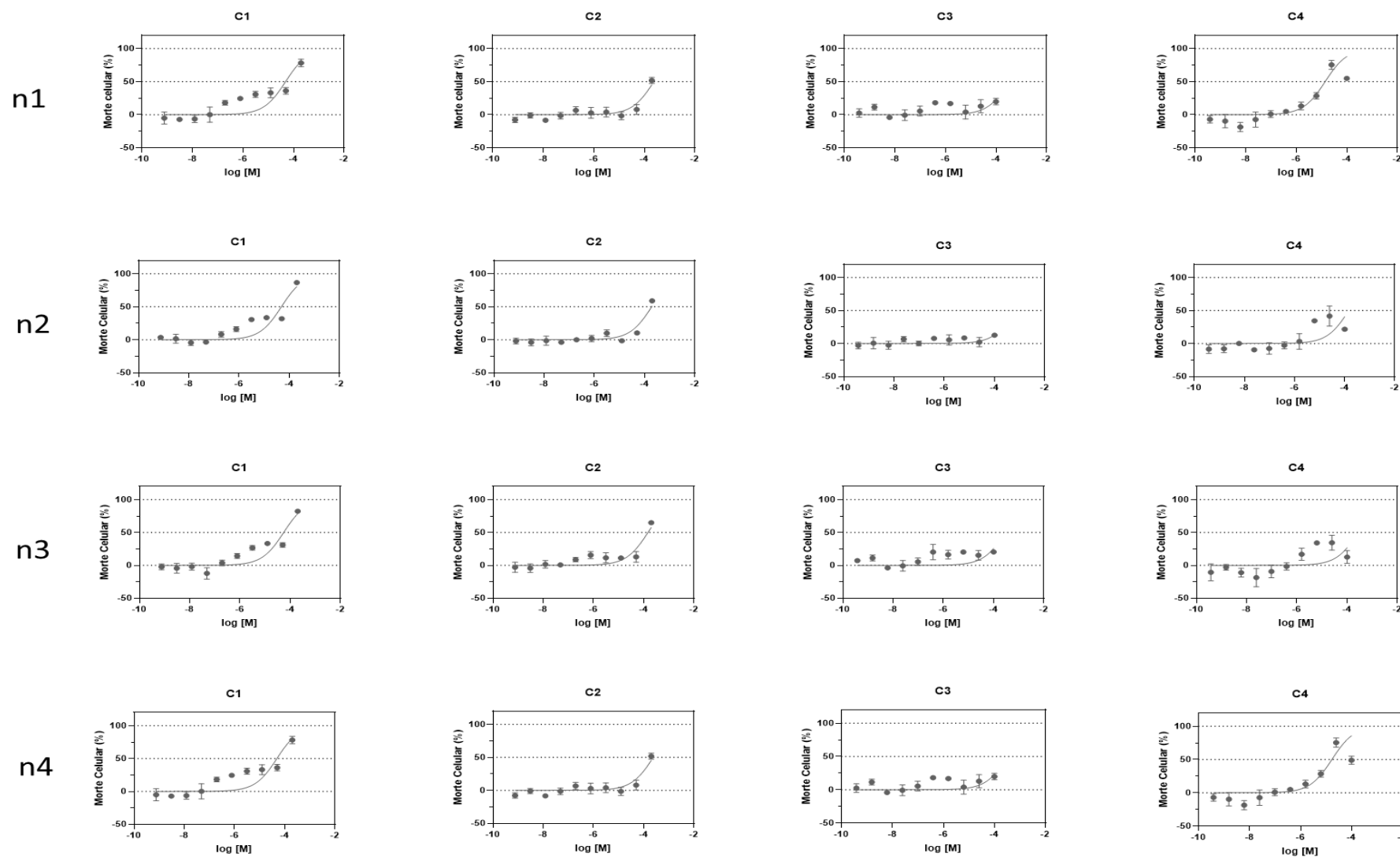
7.3 GRÁFICOS DOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.



Anexo 56. Curva da média dos valores de inibição obtidos para cada composto nas linhagens testadas.

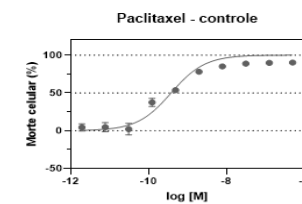
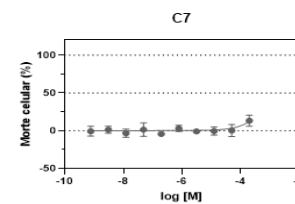
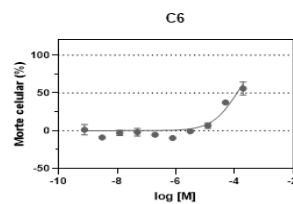
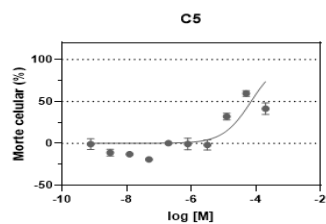


Anexo 57. Curva da média dos valores de inibição obtidos para cada composto nas linhagens testadas.

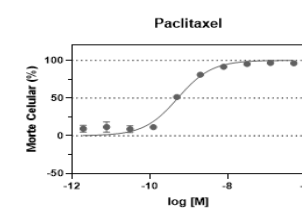
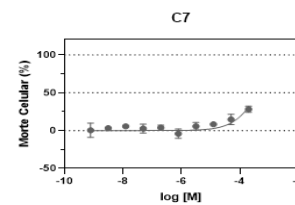
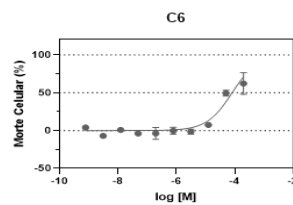
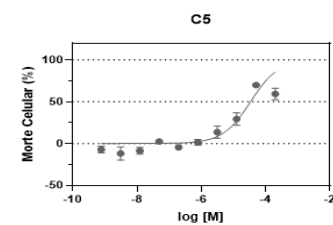


Anexo 58. Curva das replicatas com valores de inibição obtidos para cada compostos frente à HaCat.

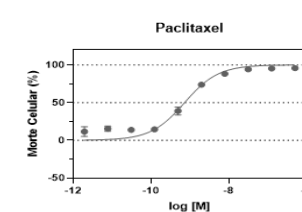
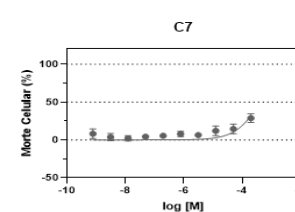
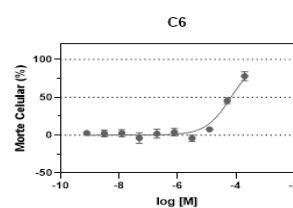
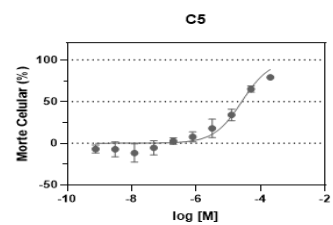
n1



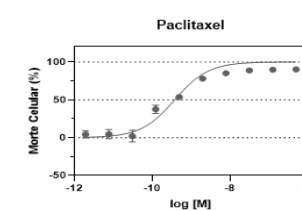
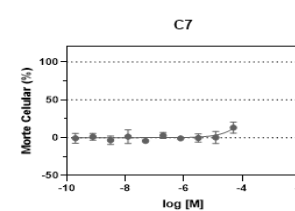
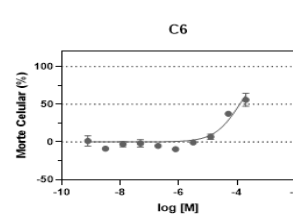
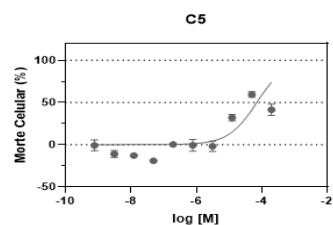
n2



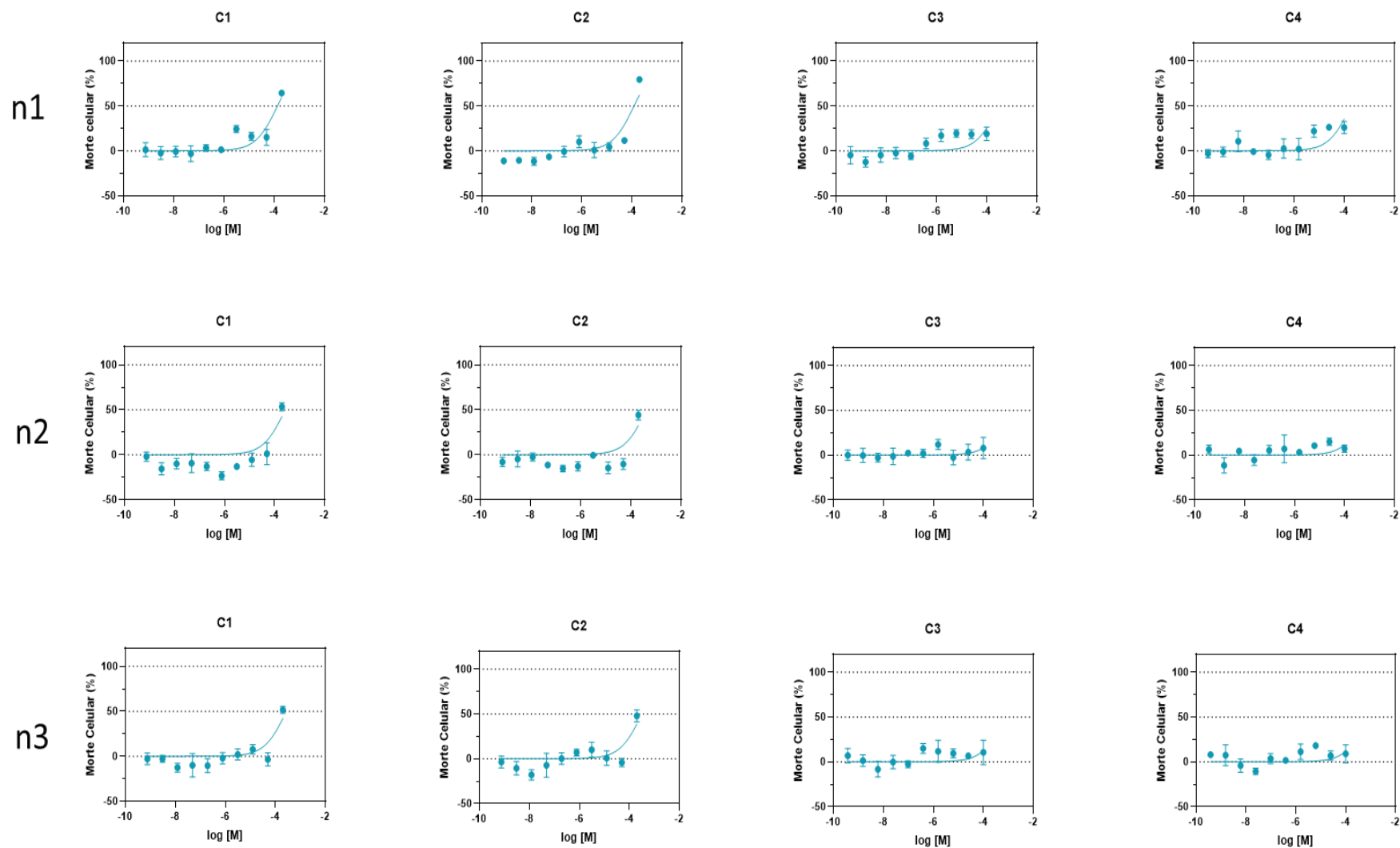
n3



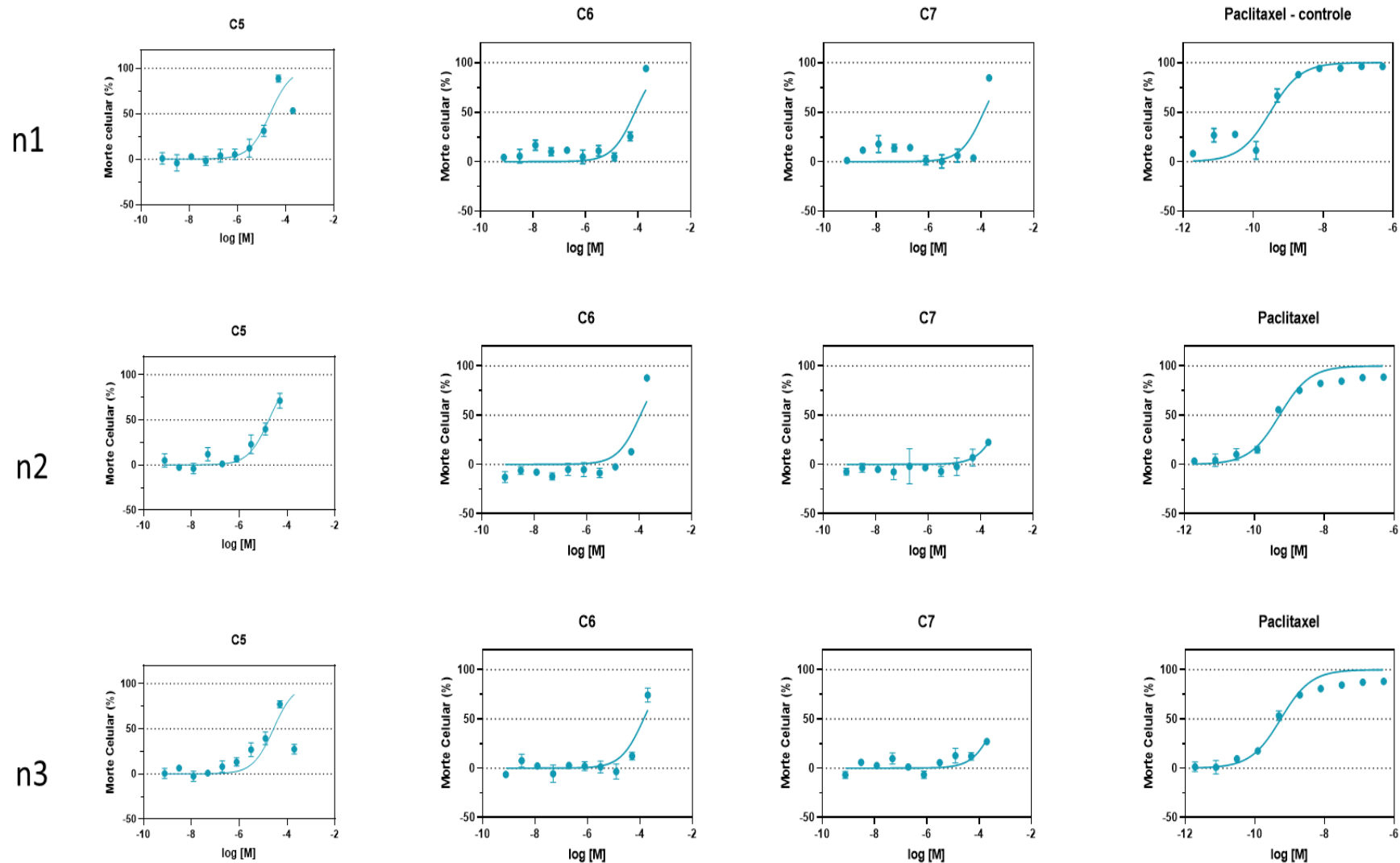
n4



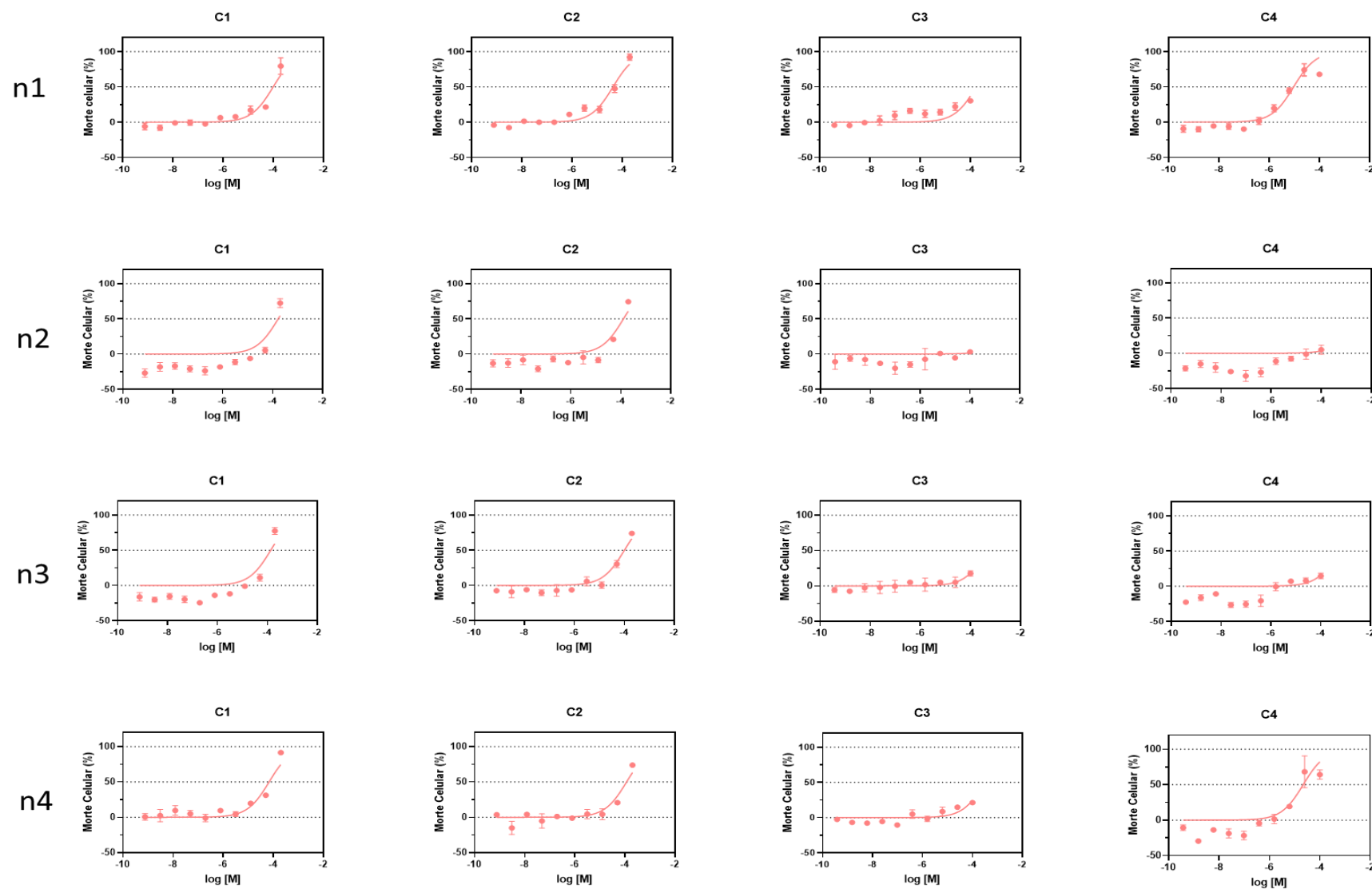
Anexo 59. Curva das replicatas com valores de inibição obtidos para cada compostos frente à HaCat.



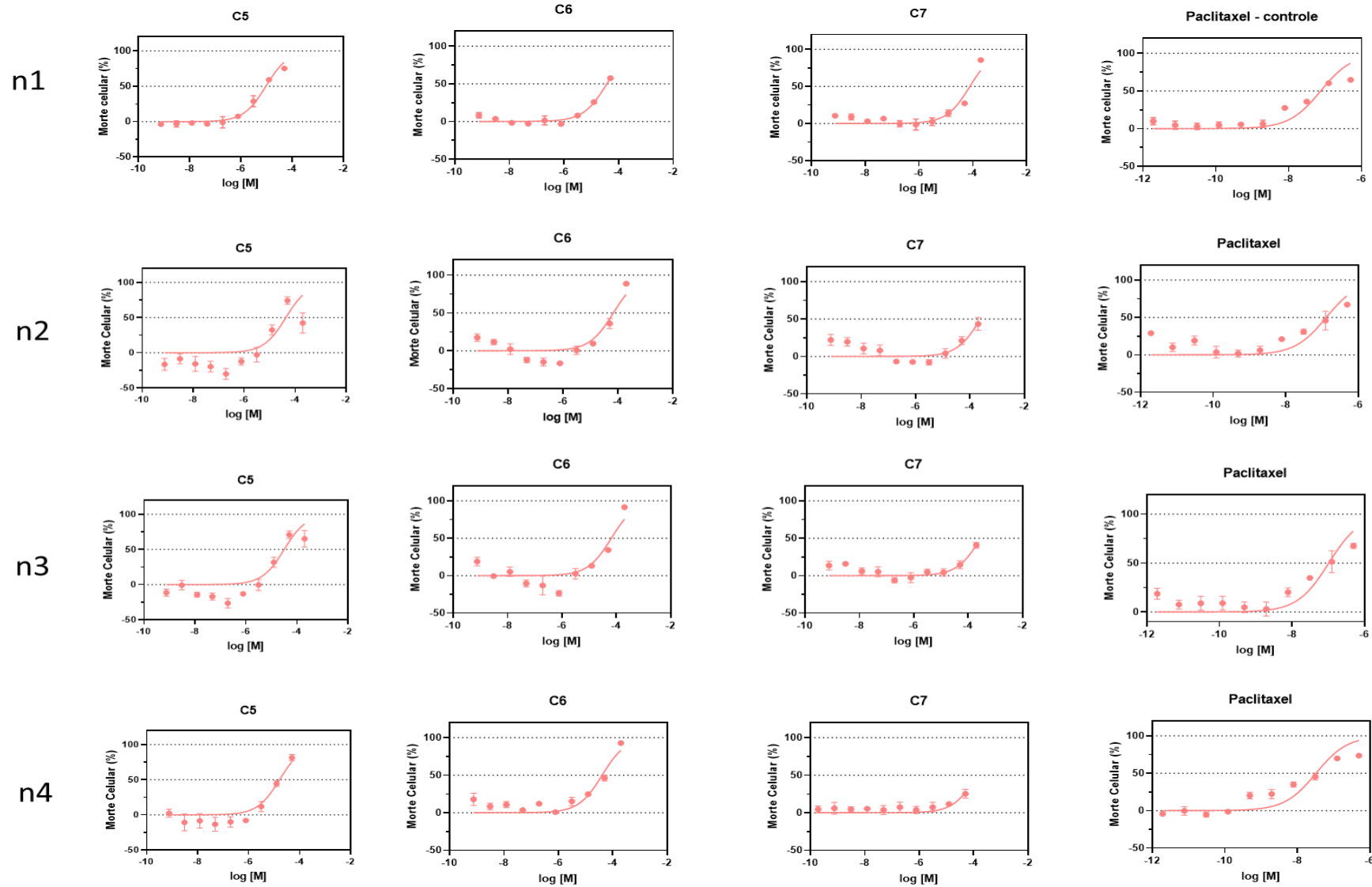
Anexo 60. Curva das replicatas com valores de inibição obtidos para cada compostos frente à HCT-116.



Anexo 61. Curva das replicatas com valores de inibição obtidos para cada compostos frente à HCT-116.



Anexo 62. Curva das replicatas com valores de inibição obtidos para cada compostos frente à MA-MDB-231.



Anexo 63. Curva das replicatas com valores de inibição obtidos para cada compostos frente à MA-MDB-231.