



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Dania Shriki

Relatórios de Estágio sob orientação do Doutor Paulo Jorge da Silva Monteiro e da Doutora Maria Alexandra de Castro Albuquerque Rocha Gonçalves, e Monografia intitulada “Inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) como potenciais agentes na prevenção e tratamento de cancro de pulmão”, sob a orientação da Professora Doutora Fernanda Maria Fernandes Roleira, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Dania Shriki

Relatórios de Estágio sob orientação do Doutor Paulo Jorge da Silva Monteiro e da Doutora Maria Alexandra de Castro Albuquerque Rocha Gonçalves, e Monografia intitulada “Inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) como potenciais agentes na prevenção e tratamento de cancro de pulmão”, sob a orientação da Professora Doutora Fernanda Maria Fernandes Roleira, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2022

Declaração de Autoria

Eu, Dania Shriki, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015277207, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) como potenciais agentes na prevenção e tratamento de cancro de pulmão” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 05 de setembro de 2022.



(Dania Shriki)

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todos os professores, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo deste percurso.

À Professora Doutora Fernanda Roleira, minha orientadora durante a execução do trabalho laboratorial que deu origem ao tema abordado. Quero agradecer toda a sua disponibilidade, pela paciência, persistência e tempo que dispôs em guiar esta tese. Gostaria de agradecer também o apoio dado pelo Professor Doutor Elisiário Tavares da Silva, pela Professora Doutora Carla Varela, e pelo João Janela que tiveram um papel essencial na realização de componente experimental da monografia.

A toda a equipa da Farmácia São José, em particular ao Dr. Paulo Jorge da Silva Monteiro, o meu mais sincero agradecimento por toda a amizade e carinho, todos os ensinamentos prestados, ajuda e disponibilidade. Quero também expressar a minha gratidão aos meus colegas estagiários, especialmente a Márcia, pela sua companhia, assistência e, o mais importante, amizade.

À Bluepharma, especificamente ao departamento de desenvolvimento analítico, pela oportunidade de estágio, pelo exemplo e referência de competência e profissionalismo, pelos ensinamentos. Quero expressar a minha gratidão à Dra. Maria Alexandra, Maria, Joel, Joana, e Sofia pela simpatia, disponibilidade e acolhimento.

À minha família, que sempre tiveram total disponibilidade para mim. Sempre demonstraram um apoio incondicional e sempre foram os meus maiores conselheiros.

Aos meus amigos de Coimbra, por todos os bons momentos que partilhámos e pelos que ainda temos pela frente.

A Coimbra, por ter sido a minha casa, e por tudo o que vivi e aprendi ao longo destes 5 anos que ficarão para sempre guardados no meu coração.

Índice

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Siglas e Acrónimos	8
1. Introdução	9
2. Análise SWOT	9
2.1. Pontos Fortes	10
2.1.1. Localização da Farmácia e Heterogeneidade dos Utentes	10
2.1.2. Acolhimento e Forte Integração na Equipa	10
2.1.3. Serviços Prestados pela Farmácia	11
2.1.4. Sistema Informático	12
2.2. Pontos Fracos	13
2.2.1. Dificuldade de Associação dos Nomes Comerciais às DCI	13
2.2.2. Dificuldade no Aconselhamento Farmacêutico	13
2.2.3. Insegurança no Contacto com o Público	14
2.3. Oportunidade	15
2.3.1. Participação em Formação	15
2.3.2. Dispensa de Medicação Hospitalar em Farmácia Comunitária	15
2.3.3. Execução de Manipulados	16
2.4. Ameaças	17
2.4.1. Casos de Medicamentos Esgotados	17
2.4.2. Desconfiança do Utente no Estagiário	17
3. Casos Práticos	18
4. Considerações Finais	18
5. Bibliografia	19
Anexo – Casos Práticos	21

PARTE II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Siglas e Acrónimos	25
1. Introdução	26
2. Análise SWOT	27
2.1. Pontos Fortes	27
2.1.1. Receção e Cedência de Equipamentos de Trabalho	27
2.1.2. Integração na Equipa	28
2.1.3. Plano de Estágio Bem Estruturado	28
2.1.4. Projeto	29
2.1.5. Subsídio de Alimentação	30
2.2. Pontos Fracos	30
2.2.1. Familiaridade Insuficiente com o Software Waters EmpowerTM	30
2.3. Oportunidade	30
2.3.1. Seleção dos Estagiários por Entrevista	30
2.3.2. Filosofia <i>Kaizen</i>	31
2.3.3. Plano de Formação	31
2.3.4. Componente Laboratorial Forte e Contacto com Diversos Equipamentos	32
2.4. Ameaças	32
2.4.1. Conhecimento Limitado da Realidade da Indústria Farmacêutica	32
3. Considerações Finais	33
4. Bibliografia	34

PARTE III – Monografia

Resumo	36
Palavras Chaves	36
Abstract	37
Keywords	37
Abreviaturas	38

1. Introdução.....	39
1.1. Cancro de Pulmão.....	39
1.2. O Papel da Inflamação na Carcinogénese.....	39
1.3. Mecanismos e Biologia da COX-2.....	40
2. Fármacos Inibidores da COX-2.....	42
3. Celecoxib na Prevenção e Tratamento do Cancro do Pulmão.....	43
4. Síntese e Caracterização de Novas Amidas de Ácido Cinâmico Fenólico como Inibidores Seletivos da COX-2.....	44
4.1. Derivados de Ácidos Cinâmicos como Moléculas com Atividade Farmacológica.....	44
4.2. Design dos Compostos a Sintetizar.....	45
4.3. Síntese das Novas Amidas do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico.....	46
4.4. Materiais, Equipamentos e Reagentes.....	48
4.5. Procedimento Geral para a Síntese, Purificação e Caracterização das Amidas 2, 4, 6, 8 e 10.....	48
4.5.1. Terc-Butilamida do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico (2).....	49
4.5.2. Benzilamida do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico (4).....	49
4.5.3. 4-Terc-Butilanilina do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico (6).....	50
4.5.4. Dibutilamida do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico (8).....	50
4.5.5. Dipropilamida do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico (10).....	51
5. Estudo da Atividade Inibitória dos Compostos Sintetizados Sobre as COXs.....	52
5.1. Método de Avaliação.....	52
5.2. Resultados e Discussão.....	52
6. Estudo da Atividade Anti-Tumoral dos Compostos Sintetizados Sobre as Linhas Celulares de Cancro de Pulmão In Vitro.....	54
6.1. Método de Avaliação.....	54
6.2. Resultados e Discussão.....	55
7. Conclusão.....	56
8. Bibliografia.....	57
Anexo I	
Abstract.....	63
Keywords.....	64
Abbreviations.....	65
1. Introduction.....	66
2. Mechanisms and Biology of COX-2 in Cancer.....	66
3. COX-2 Inhibitor Drugs.....	67
4. Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Phenolic Cinnamic Acid Amides as Selective COX-2 Inhibitors.....	68
4.1. Material and methods.....	71
4.2. General procedure to obtain the Cinnamic Acid Amides 2, 4, 6, 8, and 10:.....	71
4.2.1. N-Tert-Butyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (2).....	71
4.2.2. N-Benzyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (4).....	72
4.2.3. N-(4-(Tert-Butylphenyl)-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (6).....	72
4.2.4. N,N-Dibutyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (8).....	72
4.2.5. N,N-Dipropyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (10).....	73
5. Inhibitory activity evaluation of the synthesised compounds against Cyclooxygenases.....	74
5.1. Method Summary.....	74
5.2. Results and Discussion.....	75
6. Antitumor Activity of The Synthesised Compounds in LUNG CANCER Cell Lines.....	77
6.1. Method Summary.....	77
6.2. Results and Discussion.....	77
7. Conclusion.....	79
8. References.....	80

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia São José

Lista de Siglas e Acrónimos

CEDIME – Centro de Informação do Medicamento e Intervenções em Saúde

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FC – Farmácia Comunitária

FSJ – Farmácia São José

Glintt – Global Intelligent Technology

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SNS – Serviço Nacional de Saúde

1. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é composto por um plano de estudo segundo o qual, a realização de um estágio curricular em Farmácia Comunitária (FC) é obrigatória no último ano de curso para a obtenção do título de formação de farmacêutico. Posto isto, o estágio curricular é considerado como uma parte crucial do processo de formação académica, em que o estudante aplica os vários conhecimentos que foram adquiridos ao longo da formação universitária, possibilitando a consolidação dos mesmos e, ao mesmo tempo, o desenvolvimento de novas competências. Nesta fase final do meu percurso académico, tive a oportunidade de realizar o meu estágio em FC na Farmácia São José (FSJ) em Coimbra, sob a orientação do proprietário e diretor técnico, Dr. Paulo Monteiro, que durou cerca de 4 meses, entre o dia 10 de janeiro e 30 de abril de 2022. O principal objetivo do presente relatório é abordar as atividades e experiências adquiridas, bem como descrever o modo geral de funcionamento da farmácia.

2. Análise SWOT

Neste sentido foi elaborado o presente relatório, que consiste numa análise SWOT, sigla de *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* (em português, pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças) do estágio curricular realizado na Farmácia São José (**Figura 1**).

Pontos Fortes

Localização da Farmácia e Heterogeneidade dos Utentes
Acolhimento e Forte Integração na Equipa
Serviços Prestados pela Farmácia
Sistema Informático

Pontos Fracos

Dificuldade de Associação dos Nomes Comerciais às DCI
Dificuldade no Aconselhamento Farmacêutico
Insegurança no Contacto com o Público

Oportunidades

Participação em Formação
Dispensa de Medicação Hospitalar em Farmácia Comunitária
Execução de Manipulados

Ameaças

Casos de Medicamentos Esgotados.
Desconfiança do Utente no Estagiário

Figura I – Análise SWOT do Estágio em FC.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Localização da Farmácia e Heterogeneidade dos Utentes

A localização de uma farmácia é fundamental para o seu sucesso. A FSJ encontra-se numa localização privilegiada e, por conseguinte, atrai um leque diversificado de utentes, tanto pela faixa etária abrangente como pelas necessidades de saúde. Isto deve-se à sua proximidade a várias unidades de saúde, incluindo centros de saúde, consultórios médicos privados e o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Posto isto, a FSJ abrange tanto utentes habituais, que estão normalmente em medicação crónica, como utentes polimedicados que vêm de unidades de saúde circundantes, bem como utentes esporádicos que vêm à farmácia para resolver uma preocupação de saúde. Face a um público tão diverso, tive a vantagem de poder interagir com um vasto leque de pessoas e situações, ajudando assim a minha capacidade de adaptabilidade, tão essencial à área da saúde.

2.1.2. Acolhimento e Forte Integração na Equipa

O acolhimento do estagiário e a sua integração na equipa têm um impacto em toda a sua experiência de estágio. A equipa da FSJ esteve sempre disponível para os estagiários desde o primeiro até ao último dia do estágio. A equipa explicou inicialmente o método de

funcionamento das várias tarefas que poderíamos realizar de forma clara e objetiva. A minha integração na equipa FSJ foi fundamental, pois teve um impacto benéfico significativo não só na minha motivação durante o estágio, mas também no meu processo de adaptação e aprendizagem. A simpatia dos membros da equipa, a sua confiança no meu trabalho, bem como a disponibilidade e atitude de cooperação na resolução de desafios, provaram ser um ponto forte no meu estágio.

2.1.3. Serviços Prestados pela Farmácia

A FC oferece uma gama de serviços para promover a saúde e o bem-estar dos clientes, indo além de ser simplesmente um local onde os medicamentos são dispensados.

Um dos serviços prestados pela FSJ é a medição de parâmetros bioquímicos e medição da pressão arterial. A medição é feita num gabinete privado equipado dentro da farmácia, desta forma, é possível fazer a monitorização destes parâmetros. No caso dos utentes regulares da farmácia, perante o seu perfil, é possível realizar um aconselhamento e, se necessário, encaminhar o utente para uma consulta médica.

Outro serviço oferecido na FSJ são consultas de nutrição, feitas semanalmente, inseridas no programa EasySlim[®]. Nestas consultas os utentes têm a oportunidade de ser acompanhados por uma nutricionista. Para complementar este serviço, a FSJ tem ao seu dispor suplementos alimentares da EasySlim[®] disponíveis, o que facilita aos utentes a criação do seu plano dietéticos.

As farmácias comunitárias têm desempenhado e continuam a desempenhar um papel crucial na luta contra a epidemia da Covid-19, oferecendo uma variedade de serviços que ajudam na causa. A fim de reduzir e minimizar o risco de exposição ao vírus, a FSJ fornece serviços de entrega de medicamentos e produtos de saúde ao domicílio. Além disso, a FSJ é uma das farmácias onde são realizados testes antigénio de Covid-19, os testes são executados numa área privativa de acordo com as normas, protocolos e condições estabelecidas pelo Serviço Nacional de Saúde (SNS), bem como as boas práticas farmacêuticas. Posteriormente, a farmácia comunica os resultados dos testes, tanto positivos como negativo, às autoridades de saúde, SNS, pois esta comunicação é importante para monitorizar a atividade nacional de testagem. Adicionalmente, uma declaração com os resultados de teste, assinado pelo farmacêutico é fornecida ao utente por meio físico ou digital.

Um serviço que não posso deixar de mencionar é o Programa OsteoReminder, é um programa de intervenção farmacêutica de apoio à pessoa em tratamento com denosumab, foca na melhoria da adesão destes utentes a este tipo de terapia. O denosumab é um anticorpo (IgG₂)

monoclonal humano, produzido numa linha celular de mamíferos por tecnologia de DNA recombinante. Está indicado no tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa e em homens com um risco aumentado de fraturas. A dose recomendada é de 60 mg de denosumab administrados na forma de uma injeção subcutânea única, uma vez de 6 em 6 meses na coxa, no abdómen ou na parte superior do braço.

A intervenção farmacêutica pode ser resumida em três etapas, a fase inicial é momento de dispensa de denosumab, onde o farmacêutico informa o utente do programa e os seus benefícios, além de fornecer material educativo sobre a doença, a terapêutica e da reação adversa do tratamento. Por fim, se o utente o desejar, é-lhe administrado o medicamento na farmácia. Na segunda etapa, o utente recebe um contacto de *follow-up* telefónico, ao fim de 2-7 dias após a administração do medicamento na farmácia, para identificar necessidades do utente e esclarecer questões. Cinco meses após a administração do medicamento, o utente é encaminhado para realizar uma consulta pelo serviço de consultas do CEDIME (Centro de Informação do Medicamento e Intervenções em Saúde, Associação Nacional das Farmácias). E por último a farmácia contacta o utente lembrá-lo da data prevista de renovação da terapêutica e identificar necessidades do utente.¹

Ter este tipo de serviços na farmácia é um ponto forte do meu estágio, pois é uma prova que o farmacêutico para além de ser um agente do medicamento, tem um papel fundamental na promoção de um estilo de vida saudável.

2.1.4. Sistema Informático

O sistema informático da FSJ é o Sifarma[®], é um *software* desenvolvido e comercializado pela Glintt (Global Intelligent Technology). É estimado que 90% das farmácias em Portugal utilizam esta ferramenta, pois é muito benéfica para a farmácia, permitindo a poupança de tempo e recursos, bem como a otimização das diversas atividades, tais como: atendimento; gestão e receção de encomendas; controlo de *stocks* e prazos de validade; dispensa de medicamentos e produtos de saúde; consulta de compras e vendas dos produtos; faturação; entre muitas outras funções. O *software* apresenta também uma base de dados que permite aceder para saber mais informações sobre os medicamentos, tais como: indicações terapêuticas, efeitos secundários, interações medicamentosas, posologia e contraindicações, facilitando assim o processo de atendimento e tornando-o mais seguro.

Durante o meu estágio, tive a possibilidade de trabalhar com duas versões do Sifarma[®]: o Sifarma 2000[®] e o Sifarma Novo Módulo de Atendimento[®]. Para executar a tarefa de atendimento, trabalhei maioritariamente com recurso ao Novo Módulo de Atendimento do

Sifarma[®], pois é um sistema mais intuitivo e apelativo em termos estéticos o que me facilitou esta tarefa e, portanto, permitiu-me dar a minha atenção ao utente e ao aconselhamento farmacêutico. No entanto, o Novo Módulo ainda apresenta um défice de várias funções face ao Sifarma 2000[®] pelo que tive a oportunidade de utilizar esta versão na receção e gestão de produtos e encomendas.

O facto de ter realizado diferentes tarefas nos dois sistemas, permitiu uma familiarização e exploração de ambos e constitui um ponto forte no meu estágio, e uma vantagem para o meu futuro profissional.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Dificuldade de Associação dos Nomes Comerciais às DCI (Denominação Comum Internacional)

Ao longo do MICF, o nosso contacto com os medicamentos nas várias unidades curriculares foi muito centrado nos nomes das substâncias ativas, ou seja, DCI dos medicamentos, com o mínimo de ênfase nas marcas existentes no mercado. Na realidade, quando começamos o estágio na farmácia, apercebemo-nos de que a maioria dos utentes conhece os medicamentos pela sua denominação comercial. Embora já estivesse familiarizada com vários nomes comerciais de medicamentos, ocasionalmente tive alguma dificuldade em associar os nomes dos princípios ativos aos nomes de marca. Isto fez com que demorasse mais tempo durante alguns atendimentos, tornando mais difícil responder várias questões levantadas durante o atendimento e diminuiu a minha confiança ao aconselhar os utentes. Eventualmente este obstáculo acabou por ser ultrapassado através do contacto frequente com os nomes de marca dos medicamentos, tanto quando foram recebidos nas encomendas como quando foram dispensadas.

2.2.2. Dificuldade no Aconselhamento Farmacêutico

Muitos dos utentes optam por escolher a farmácia como uma fonte primária de informação para receber aconselhamentos relacionados com problemas de saúde ligeiros ou moderados. Assim sendo, o aconselhamento farmacêutico é um elemento significativo das responsabilidades quotidianas de um farmacêutico. O MICF fornece um plano de estudo abrangente que permite aos estudantes começar a trabalhar numa variedade de campos. Contudo, durante o estágio na FSJ, apercebi-me que o conhecimento adquirido durante o percurso académico em algumas áreas era insuficiente para proporcionar um aconselhamento

adequado. As áreas em que senti mais dificuldades no aconselhamento ao utente foram os produtos cosméticos e os de uso veterinário.

A FSJ contém uma vasta gama de produtos de dermofarmácia e cosmética. Esta área é bastante diversificada e complexa. Embora esteja familiarizada com vários produtos e marcas, os meus conhecimentos são insuficientes para fornecer conselhos eficazes nesta área. O desafio que tinha não era compreender o que utente necessitava, mas em decidir quais os produtos mais adequados a escolher entre as numerosas marcas, visto a diversidade dos produtos. Para além das numerosas marcas disponíveis, são introduzidos regularmente novos produtos e são reformulados muitos produtos já existentes. Assim, é fundamental a aquisição de conhecimentos nesta área, bem como manter este conhecimento atualizado.

Adicionalmente, na FSJ existe uma grande procura de produtos de uso veterinário para as diferentes espécies animais, especialmente para animais de companhia, cães e gatos. No início, senti dificuldade não só na escolha do produto mais adequado, mas também na forma de utilização destes produtos.

Na minha opinião, considero que seria vantajoso reestruturar o programa de algumas unidades curriculares para que os conhecimentos que os estudantes aprendem possam ser mais eficazmente aplicados ao trabalho quotidiano na FC. Considero esta lacuna de conhecimento um ponto fraco, no entanto, durante o meu estágio, consegui desenvolver algum conhecimento nesta vertente com a experiência do dia a dia e da formação contínua que a equipa da farmácia me proporcionou.

2.2.3. Insegurança no Contacto com o Público

Apesar de ter realizado um estágio de verão numa FC, este era mais focado no *BackOffice* e pouco direcionado no atendimento de público. Dito isso, admito que senti alguma insegurança quando comecei o contacto com o público na FSJ. Uma grande parte desta insegurança estava associada à preocupação de transmitir informações incorretas, de ter um discurso pouco fluído e esclarecedor ou de não realizar corretamente os procedimentos informáticos. Nestas situações, procurava a assistência de um membro da equipa. No entanto, à medida que o tempo foi passando, consegui ultrapassar este obstáculo graças ao apoio, autonomia, constantes encorajamentos, e confiança que a equipa do FSJ tinha em mim. Aprendi como fornecer aos utentes um aconselhamento de qualidade e adquirir a confiança necessária para dar resposta às questões dos utentes. Mesmo tendo identificado este tópico como um ponto fraco, acredito que todos os primeiros atendimentos serviram como um desafio que acelerou o meu desenvolvimento.

2.3. Oportunidade

2.3.1. Participação em Formação

A excelência do exercício profissional farmacêutico está associada ao acompanhamento permanente dos desenvolvimentos na prática e ciência farmacêutica, da legislação e normativos profissionais, e dos avanços tecnológicos relacionados com o uso do medicamento. Portanto, é da responsabilidade de todos os farmacêuticos praticar o desenvolvimento profissional contínuo, isto é, praticar a atualização permanente e o desenvolvimento sistemático de conhecimentos, competências e aptidões ao longo da sua vida.²

Dada a importância de desenvolvimento contínuo, tive a oportunidade de participar numa série de formações durante o meu estágio na FSJ. Algumas destas formações foram realizadas em regime presencial por parte de delegados de informação médica. No início do estágio o número deste tipo de formações foi bastante reduzido devido à grande carga de trabalho diário da equipa da farmácia, realizando vários testes antigénio de Covid-19. Além de assistir às formações presenciais tive a oportunidade de participar de uma vasta quantidade de formações e *Webinars online*. De entre as formações que assisti, destaco as formações dermocosmética de La Roche Posay®, Vichy®, CeraVe® que incidiram sobre vários produtos das suas gamas, explicando os constituintes e como aconselhar cada produto. Ainda assisti à formação de Pharma Nord® no que concerne a suplementos da BioActivo®, Lactacyd® no que concerne aos produtos de higiene íntima feminina. Dos *Webinars* destacam-se “Noções básicas de Saúde Animal para um Bom Aconselhamento na Farmácia” e “Novo Regulamento do Medicamento Veterinário”.

De igual importância foram todos os conhecimentos transmitidos pela equipa onde foi uma prática recorrente na farmácia a resolução de casos práticos hipotéticos, de forma a simular situações reais de aconselhamento e consequente resposta.

Enquanto estagiária, o acesso a formação contínua constitui uma oportunidade para adquirir novos conhecimentos nas mais diversas áreas, e ajudou-me a ganhar mais confiança no atendimento e aconselhamento dos produtos farmacêuticos.

2.3.2. Dispensa de Medicação Hospitalar em Farmácia Comunitária

Na sequência da pandemia associada à Covid-19 o ministério da saúde publicou o Despacho n.º 4270-C/2020, de 7 de abril,³ que autoriza excecionalmente e temporariamente o fornecimento de medicamentos dispensados pelas farmácias hospitalares aos doentes em

regime de ambulatório, através das farmácias comunitárias e da entrega ao domicílio, a pedido de utente. Esta alteração visa reduzir as deslocações dos utentes desnecessariamente aos hospitais garantido à pessoa com doença o acesso fácil aos medicamentos, mantendo a segurança e monitorização farmacêutica do tratamento bem como a rastreabilidade do processo de dispensa.⁴

O processo de dispensa desta medicação nas FCs, só pode ser realizada por um farmacêutico, que deve avaliar se o doente relata novos sinais ou sintomas sugestivos de agravamento da doença, interações medicamentosas ou efeitos indesejáveis relacionados com o uso do medicamento, reportando essas informações de imediato aos serviços farmacêuticos hospitalares.

O registo deste processo pode ser feito no Sifarma clínico[®], que é uma ferramenta que faz parte do Sifarma[®]. Por conseguinte, durante o meu estágio tive a oportunidade de acompanhar todo o procedimento inerente a este processo desde a entrega da medicação hospitalar à farmácia até a sua dispensa aos utentes. Acompanhar este processo constituiu uma oportunidade uma vez que me permitiu adquirir uma melhor compreensão desta área e potenciou a minha interação com a realidade dos profissionais farmacêuticos hospitalares, permitindo-me expandir os meus conhecimentos nesta área.

2.3.3. Execução de Manipulados

A preparação de medicamentos manipulados em farmácias comunitárias é uma prática antiga que ainda é praticada de forma regular, pois permite obter medicamentos em dosagens e formas farmacêuticas não estão fornecidos pela indústria farmacêutica, particularmente, nas formulações de uso veterinário ou de uso pediátrico. Durante o estágio tive a oportunidade de aperfeiçoar a minha capacidade de preparação de manipulados farmacêuticos. Na FSJ o *software* SoftGaleno[®] é utilizado na gestão de processo de preparação dos manipulados é, particularmente, utilizado para gestão dos inventários de matérias-primas, gestão de clientes e fornecedores, rastreio de manipulados preparados, e cálculo de preços de produtos farmacêuticos preparados, entre outras coisas. No decorrer do meu estágio, além de ter tido a oportunidade de observar a preparação de alguns manipulados acompanhando os farmacêuticos da equipa, estive a oportunidade de preparar uma pomada de propionato de de clobetasol com ácido salicílico e preparar cápsulas de minoxidil sob a supervisão da farmacêutica responsável.

Enquanto estagiária, a oportunidade de trabalhar ocasionalmente em tarefas desta natureza foi vantajosa em termos da própria execução, bem como da perceção do planeamento necessário

em termos de matérias-primas e do método de cálculo para determinar o preço final, entre outras questões relacionadas com este processo.

2.4. Ameaças

2.4.1. Casos de Medicamentos Esgotados

Várias vezes ao longo do meu estágio, deparei-me com a falta de medicamentos que se encontravam esgotados, sem qualquer indicação de quando voltariam a estar em *stock*. O esgotamento de medicamentos observou-se nos medicamentos utilizados no tratamento tanto das doenças agudas como das doenças crónicas, o que constitui um dos principais problemas que todas as farmácias enfrentam e que frequentemente levanta preocupações à população. Em alguns casos, foi possível contornar o problema substituindo o medicamento pedido por um equivalente de outro laboratório que já se encontrava no mercado, no entanto, a preocupação é maior quando não existem alternativas.

Enquanto estagiária, considero que isto constituiu uma ameaça, pois nestas situações fui incapaz de fornecer os cuidados de saúde necessários ao utente, colocando-me numa situação desconfortável, especialmente quando os utentes atribuíam responsabilidade aos estagiários/profissionais pela não dispensa/entrega dos medicamentos.

2.4.2. Desconfiança do Utente no Estagiário

Durante o meu estágio, houve alguns casos em que os utentes, ao serem atendidos por um estagiário, expressaram pouca confiança nos seus conselhos. Em outros casos, alguns dos utentes recusaram-se a ser atendidos por alguém que não fosse o farmacêutico que queriam, pois, preferiam ser atendidos por caras conhecidas, ou farmacêuticos com mais experiência, em vez de um estagiário.

Na minha opinião, as causas destas situações podem ser porque o estagiário naturalmente, por falta da experiência, não responde a determinadas situações com a mesma prontidão e celeridade. Considero estas situações constituem uma ameaça ao meu estágio, pois esta falta de cooperação e compreensão causava sempre constrangimentos a nível de atendimento, tanto a nós estagiários e farmacêuticos, como aos restantes utentes em fila de espera, além disso, tiveram um impacto negativo no meu desenvolvimento de competências, uma vez que o meu estatuto de estagiário me impossibilitou de lidar com casos de mais complexa resolução.

3. Casos Práticos

No decorrer do meu estágio na FSJ, tive a oportunidade de aplicar em contexto real diversos conceitos teóricos estudados ao longo dos cinco anos do MICF. No **Anexo**, encontram-se cinco casos práticos com que me defrontei durante o estágio e consequente aconselhamento farmacêutico.

4. Considerações Finais

Após refletir acerca do estágio posso dizer que foi uma experiência muito enriquecedora, pois, este estágio permitiu-me ter contacto com o contexto real da prática farmacêutica na FC e possibilitou não só a consolidação e integração de conhecimentos adquiridos ao longo do MICF, mas também a aprendizagem de novos conceitos e a aquisição de várias competências essenciais, que me permitiram desenvolver quer a nível pessoal, quer a nível profissional.

Este estágio também me fez perceber melhor o impacto que o farmacêutico tem na área da saúde pública. Uma vez que o farmacêutico comunitário tem uma posição privilegiada para poder contribuir em diferentes áreas de saúde e bem-estar, promovendo estilo de vida mais saudável.

Gostaria de expressar a minha gratidão a toda equipa técnica da FSJ pelo seu apoio, paciência, simpatia e disponibilidade durante o estágio. Queria também deixar uma palavra de agradecimento aos meus colegas estagiários pela sua cooperação, companhia e amizade. Esta experiência foi uma experiência enriquecedora a todos os níveis, ajudou-me a alargar os meus horizontes e ensinou-me o que é ser um profissional de excelência.

5. Bibliografia

1. FERNANDES J., GUERREIRO I., MENDES MJ. - **Manual do Programa-OsteoRiminder**. CEDIM (Centro de Informação do Medicamento e Intervenções em Saúde, Associação Nacional das Farmácias). Portugal:2022.
2. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Desenvolvimento Profissional Contínuo**. [Acedido a 18 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/formacao-continua/desenvolvimento-profissional-continuo/>
3. DIÁRIO DA REPÚBLICA ELETRÓNICO - **Despacho n.º 4270-C/2020, 7 de abril de 2020**. DRE 2.ª série [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet <https://files.dre.pt/2s/2020/04/069000003/0000200003.pdf>
4. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Saúde regula dispensa de medicamentos hospitalares nas farmácias comunitárias**. [Acedido a 18 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/saude-regula-dispensa-de-medicamentos-hospitalares-nas-farmacias-comunitarias/>
5. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Bifonazol Farmoz 10 mg/g creme**. [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <http://www.infarmed.pt/infomed/>
6. SIMÓN A. - **Pé de atleta**. CIM (Centro de Informação do Medicamento), 25-02-2022. [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/e_publicacao_pe_de_atletafim_rev_9_1082289253621cb9e43cabf.pdf
7. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Strepfen 8,75 mg pastilhas**. [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <http://www.infarmed.pt/infomed/>
8. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Basiflux 0,8 mg/ml xarope**. [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <http://www.infarmed.pt/infomed/>
9. SIMÓN A. - **Ficha Técnica do CIM / A Tosse**. CIM (Centro de Informação do Medicamento), março - 2013. [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/ft106_a_tossepdf_5266326445b042ec1499be.pdf

10. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento YODAFAR 200 microgramas comprimidos.** [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <http://www.infarmed.pt/infomed/>
11. American Academy of Dermatology Association – **How to treat dandruff.** 2022. [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.aad.org/public/everyday-care/hair-scalp-care/scalp/treat-dandruff>
12. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Imodium Rapid 2 mg comprimido orodispersível.** [Acedido a 20 de agosto de 2022]. Disponível na Internet em: <http://www.infarmed.pt/infomed/>

Anexo – Casos Práticos

Caso I

Utente do sexo feminino com cerca de 30 anos dirige-se à farmácia, queixando-se de imensa comichão e ardor nos dedos e nos pés. Pedi-lhe para me mostrar os pés, verifiquei que a senhora tinha fissuras entre os dedos dos pés com pele muito seca e descamada. No decurso da conversa com a senhora, percebi que ela usa o calçado várias horas por dia, transpirando excessivamente nos pés. Além disso, ela pratica natação e anda sem proteção nos pés ao redor da piscina. Estas evidências indicam que o "pé de atleta" (tínea pedis) é muito provavelmente a causa do problema. Expliquei ao utente que é importante tratar o pé de atleta para prevenir possíveis complicações, como, por exemplo, infeções da pele provocadas por bactérias que penetram através das fissuras entre os dedos. Aconselhei-lhe o uso de um creme de bifonazol (10 mg/g),⁵ um antifúngico tópico, uma vez por dia, de preferência à noite (antes de deitar), durante pelo menos 3 semanas. Salientei ainda que é essencial a aplicação do creme durante todo o tempo de tratamento recomendado, mesmo que os sintomas diminuam. Para evitar a hiperidrose aconselhei a aplicação de um pó antifúngico nos pés e meias antes e depois de usar calçado o que desodoriza e absorve a transpiração dos pés e, portanto, dá mais proteção. No fim, acabei o atendimento com alguns conselhos que podem diminuir o risco de reinfecção, tais como, trocar de sapatos e meias diariamente e arejar o calçado para evitar a humidade, secar cuidadosamente os pés após tomar banho ou nadar, evitar a partilha de objetos de higiene pessoal com outras pessoas e usar calçados de proteção quando sair da piscina.⁶

Caso II

Utente do sexo masculino com cerca de 45 anos dirige-se à farmácia, queixando-se de tosse e dor de garganta há 2 dias. Inicialmente, para avaliar melhor a situação, comecei por lhe fazer algumas perguntas, tais como, se tomava alguma medicação, se tinha febre, dificuldade respiratória ou dor torácica e se tinha alguma doença que pudesse estar associada, ao que me respondeu que não. Na conversa o senhor também mencionou que fez um teste Covid-19 e deu negativo. Para perceber a necessidade de aconselhar um anti-inflamatório, questionei-lhe se sentia dor ao engolir, o que me respondeu que sim. Por isso, aconselhei a toma de Strepfen® (flurbiprofeno – anti-inflamatório)⁷ para aliviar a dor de garganta, explicando que deve dissolver lentamente uma pastilha na boca a cada 3 a 6 horas, no máximo 5 pastilhas por dia. Pedi também à utente que caracterizasse a tosse, que referiu ser produtiva, assim sendo, aconselhei a toma de um xarope que contém bromexina (0,8 mg)⁸, um mucolítico, para facilitar

a eliminação do muco e desta forma aliviar a tosse. Além disso, recomendei a boa hidratação explicando que assim formar-se-ão secreções menos viscosas e fáceis de expulsar e inalação de ar quente e húmido para liquefazer as secreções e ter efeito demulcente, aliviando a tosse.⁹

Caso III

Utente do sexo masculino com cerca de 70 anos dirige-se à farmácia, pedindo comprimidos de iodo, pois acredita que ao tomá-los poderão proteger das radiações, em caso de acontecer um acidente nuclear resultante dos conflitos na Ucrânia. Como farmacêutica tenho a obrigação de estar sempre bem informada para conseguir dar respostas adequadas e combater os mitos na sociedade. Posto isto, eu recusei a dispensa de medicamento, justificando de forma clara e simples a razão da minha decisão. Brevemente, expliquei que os medicamentos comercializados em Portugal que contêm iodeto de potássio (0,2 e 0,3 mg) têm como indicação a suplementação de iodo em pessoas com défice desta substância na alimentação e os suplementos alimentares disponíveis têm ainda umas dosagens inferiores aos medicamentos.¹⁰ Em ambos os casos, as dosagens são muito inferiores às necessárias para a proteção contra as radiações resultantes de acidentes nucleares (65 mg) e não se encontram disponíveis nas farmácias. Adicionalmente, alertei aos efeitos secundários de toma de uma dose elevada ou durante longos períodos de tempo de iodo.

Caso IV

Jovem do sexo masculino com cerca de 20 anos dirige-se à farmácia, queixando-se de ter caspa. Pedi-lhe que caracterizasse a caspa, numa tentativa de saber o seu tipo, pelo qual ele respondeu que eram películas finas, esbranquiçadas, de intensidade moderada, não aderem ao couro cabeludo e caem sobre os ombros. Perguntei-lhe se tinha comichão, o que ele confirmou. No decurso da conversa, percebi que ele andava mais stressado por causa dos exames na faculdade, e expliquei-lhe embora o stress não seja uma causa direta da caspa, ele pode potencializar certos fatores desencadeantes que resulta em coceira no couro cabeludo e descamação, piorando a situação. Aconselhei-lhe um champô anticaspa, para cabelo seco (tinha cabelo seco), ele optou por escolher um da marca DERCOS® (Champô dermatológico Anticaspa DS - Caspa e Prurido - Cabelo Seco). Recomendei o uso deste champô, 2 a 3 vezes por semana, depois, para prevenir recidiva, indiquei o seu uso 1 vez por semana, alternando sempre com um champô suave. Adicionalmente, salientei que deveria aplicar o champô anticaspa no couro cabeludo, deve massagear bem, deixar agir por alguns minutos, entre 3 e 5 minutos, e, no fim, enxaguar bem com água.¹¹

Caso V

Utente do sexo feminino com cerca de 40 dirige-se à farmácia, à tarde, solicitando algo para a diarreia, pois tinha uma viagem de várias horas. Perguntei-lhe há quanto tempo apresentava estes sintomas, se ele tinha dor abdominal ou febre, se as fezes contêm sangue ou pus, se tomava alguma medicação e se tinha alguma doença como a doença inflamatória do intestino. Uma vez que a diarreia começou de manhã naquele dia e a utente respondeu negativamente a todas as perguntas, expliquei-lhe que, normalmente, a diarreia é autolimitada e provavelmente é de origem viral, sendo que na maioria das pessoas resolve a infeção num curto espaço de tempo, sem complicações graves. Dada a situação da utente, aconselhei a utilização de Imodium Rapid® (loperamida, 2mg)¹², o qual iria reduzir o volume das fezes e aumentar a sua consistência. Além disso, oferece um alívio rápido e eficaz e tem a vantagem de se dissolver rapidamente na língua sem a necessidade de água. Referi que ela pode começar com a toma de 2 comprimidos, e de seguida pode tomar 1 comprimido após cada dejeção de diarreia. Chamei-lhe a atenção à importância da hidratação, referindo que para evitar a desidratação ela pode recorrer a soluções com eletrólitos ou simplesmente beber água, sumos de fruta, ou bebidas desportivas para corrigir défices iónicos eventuais. Recomendei também evitar alguns alimentos como o leite, gorduras e fibras em excesso. Por fim, alertei o utente que deveria interromper a terapia e consultar um médico se não notasse uma melhoria no prazo de 48 horas.

PARTE II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

BLUEPHARMA

Lista de Siglas e Acrónimos

CV – *Curriculum Vitae*

EPIs – Equipamentos de Proteção Individual

DAG – Desenvolvimento Analítico e Galénico

FC – Farmácia Comunitária

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

RH – Recursos Humanos

SOPs – do inglês *Standard Operating Procedures*

SWOT – do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O conteúdo programático do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é abrangente e engloba várias áreas diferentes, oferecendo um vasto leque de saídas profissionais. No âmbito da unidade curricular “Estágio Curricular” o estudante tem a possibilidade de realizar um estágio adicional numa área diferente da Farmácia Comunitária (FC). Assim, decidi aproveitar a oportunidade de ingressar num estágio na Indústria Farmacêutica, nomeadamente a Bluepharma, visto que desta maneira poderia abrir novos horizontes e aplicar uma vasta gama de conhecimentos obtidos durante o curso.

O Grupo Bluepharma, sediado em São Martinho do Bispo, na cidade de Coimbra, criado em 2001. Desenvolve-se hoje em três áreas, como a produção de medicamentos próprios e para terceiros, a investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos e a comercialização de genéricos.¹

Durante o período estágio na Bluepharma foi-me concedida a oportunidade de estar inserida no Departamento de Desenvolvimento Analítico e Galénico (DAG), mais especificamente no setor de desenvolvimento analítica, durante três meses, compreendidos entre 2 de maio e 29 de julho de 2022, sob a orientação da Doutora Maria Alexandra de Castro Albuquerque Rocha Gonçalves. O departamento de DAG pertence ao I&D e, subdivide-se em três ramos essenciais, mais concretamente o Desenvolvimento Analítico, o Desenvolvimento Galénico e as Estabilidades.

Os principais objetivos deste departamento, que assumem um papel importante nas fases iniciais da cadeia de valor dos medicamentos, são a criação e validação de métodos analíticos, o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, estudos de estabilidade e a produção e embalagem de produtos de investigação.²

O meu estágio incidiu principalmente sobre o desenvolvimento de métodos analíticos das formas sólidas orais. Para além de acompanhar o desenvolvimento de vários métodos analíticos, o meu plano de estágio tem um tema central que foi sobre o estudo da degradação forçada.

2. Análise SWOT

Neste sentido foi elaborado o presente relatório, que consiste numa análise SWOT, sigla de *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats* (em português, pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças) estando encontram-se retratados os pontos relativos ao trabalho desenvolvido e conhecimentos assimilados durante o meu estágio na Bluepharma (**Figura I**).

Pontos Fortes

- Receção e Cedência de Equipamentos de Trabalho
- Integração na Equipa
- Plano de Estágio
- Projeto
- Subsídio de Alimentação

Pontos Fracos

- Familiaridade Insuficiente com o *Software Waters Empower*TM

Oportunidades

- Seleção dos estagiários por entrevista
- Plano de Formação
- Componente Laboratorial Forte e Contacto com Diversos Equipamentos
- Contacto com a Indústria Farmacêutica

Ameaças

- Conhecimento limitado da Realidade da Indústria Farmacêutica

Figura I – Análise SWOT do Estágio em Indústria Farmacêutica.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Receção e Cedência de Equipamentos de Trabalho

Desde o primeiro dia a forma como os estagiários foram recebidos pela Bluepharma foi admirável. O departamento de Recursos Humanos (RH) proporcionou a todos os estagiários a oportunidade de participar numa sessão de boas-vindas. Nesta sessão, foi possível obter um conhecimento mais profundo da dinâmica da empresa, informações gerais sobre o funcionamento das instalações e cada um de nós teve a oportunidade de se apresentar a si próprio e ao departamento ao qual se iria juntar.

Ainda no primeiro dia, cada estagiário recebeu todo o material e os equipamentos que foram precisos ao longo do estágio. Logo, a empresa cedeu-me os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) onde se inclui a bata de laboratório, óculos de proteção, calçado de segurança

e semi-máscara respiratória. Adicionalmente, foi-me atribuído um computador portátil com acesso à internet, o qual conservei até ao final do estágio. Usei-o sobretudo para o acesso a procedimentos analíticos ou documentos oficiais e assistir a formações *online*. Cada estagiário teve acesso a uma conta de e-mail profissional e conta de Microsoft Teams® para facilitar a comunicação entre colaboradores.

A meu ver, este contacto inicial com toda a empresa foi muito importante e teve um impacto positivo no meu estágio, pois acelerou a minha integração na cultura da Bluepharma e deu-me mais confiança no desempenho das minhas funções.

2.1.2. Integração na Equipa

Inicialmente, no departamento DAG, foram-me atribuídos dois tutores do estágio, Joel Esteves e Maria Neves, que me acompanharam ao longo de todo o meu percurso na Bluepharma. Na minha opinião, o bom acolhimento promoveu a minha integração e fez-me sentir como uma colaboradora da equipa e nunca como uma estagiária.

Acredito que fazer parte de uma equipa motivada, que conhece os objetivos da empresa, permitiu-me desenvolver novas competências a vários níveis. Além disso, ter uma relação próxima com a equipa permitiu-me desenvolver profissionalmente e sentir-me confortável a tirar qualquer dúvida que pudesse ter surgido.

2.1.3. Plano de Estágio Bem Estruturado

Um dos aspetos mais relevantes da minha experiência de estágio na Bluepharma foi indubitavelmente o plano de estágio. Numa fase inicial do estágio, uma vez que antes de qualquer colaborador da empresa desempenhar uma determinada tarefa necessita de ler e/ou ter formação nos procedimentos operacionais normalizados (SOPs), dediquei-me a ler conjunto de SOPs gerais da Bluepharma e outros procedimentos específicos do departamento DAG.

Além disso, na primeira semana do estágio, foi-me apresentado um plano de formações complementares ao meu trabalho, o que me ajudou a entender mais profundamente vários conceitos para que pudesse usá-los mais tarde em situações práticas. Logo, pude participar em muitas das formações *online*, para além de certas sessões presenciais que tiveram lugar numa sala ou mesmo num laboratório.

Quanto ao trabalho laboratorial propriamente dito, tive a oportunidade de acompanhar os meus tutores em várias etapas de desenvolvimento de alguns métodos analíticos, tais como,

métodos de dissolução, métodos de determinação de conteúdo (Assay) e métodos de determinação e quantificação das impurezas (Related Substances Method).

Na terceira semana foi-me apresentado o trabalho principal do meu estágio. Este projeto será discutido pormenorizadamente no ponto seguinte.

Enquanto estagiária, considero que ter um plano de estágio bem estruturado é um ponto forte, se não o mais importante, porque me permite focar e seguir um caminho claro ao longo do estágio.

2.1.4. Projeto

Na terceira semana do meu estágio foi-me atribuído um projeto sobre o estudo de degradação forçada de comprimidos revestidos por película.

Sumariamente, o estudo da degradação forçada é considerado um especto analítico vital do programa de desenvolvimento de medicamentos. É realizada para demonstrar como um método analítico, neste caso o método de conteúdo e o método de impureza desenvolvidos anteriormente pela equipa de desenvolvimento analítico, são indicadores da estabilidade, utilizando o HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). De acordo com as orientações da FDA, um método analítico quantitativo é considerado indicador de estabilidade quando permite detetar as alterações na qualidade da substância ativa e do produto farmacêutico, ou seja, quando permite quantificar com precisão as substâncias ativas de forma farmacêutica sem interferência de produtos de degradação, impurezas, excipientes, ou outras impurezas potenciais.³

No estudo que foi desempenhado no laboratório de DAG, sujeitamos os comprimidos a várias condições extremas de degradação durante um certo período de tempo incluindo: hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, altas temperaturas, humidade e foto degradação. Após obter a percentagem de degradação desejada, conseguimos provar o balanço de massa, isto é, provamos a estabilidade dos métodos em estudo recuperando a massa degradada de substância ativa na forma de impurezas. No final, elaborei um relatório acerca do estudo realizado.

Considero este projeto um grande ponto forte do meu estágio, pois contribuiu para desenvolver o meu pensamento crítico e a capacidade de resolver e encontrar as soluções de problemas que posso enfrentar, para além de me permitir contribuir com o meu trabalho para a empresa e crescer profissionalmente.

2.1.5. Subsídio de Alimentação

Por último, tal como os outros colaboradores da Bluepharma, todos os estagiários recebem um cartão de subsídio de alimentação de valor fixo mensal. Uma vez que o meu estágio decorreu presencialmente, tive a oportunidade de almoçar ou jantar, dependendo do turno, na cantina da Bluepharma utilizando o valor de subsídio. O facto de ter recebido este subsídio é um ponto positivo não só pelos benefícios financeiros, mas também em termos das oportunidades de interação social que as refeições em equipa na cantina proporcionaram, o que me ajudou a conhecer melhor os colaboradores da Bluepharma.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Familiaridade Insuficiente com o *Software Waters Empower*TM

Um ponto fraco que identifiquei durante o período de estágio foi a falta do conhecimento sobre o *software Waters Empower*TM.

*Waters Empower*TM é um *software* utilizado para adquirir, gerir, e processar resultados cromatográficos. Como já tinha referido, a técnica mais frequentemente utilizada no departamento onde fui inserida, durante o estágio, é a HPLC. O processamento diário dos resultados da HPLC requer a sua utilização. Apesar de ter tido a oportunidade de observar regularmente os analistas do DAG a processar resultados com o *software*, ainda foi um desafio utilizar esta ferramenta sem formação para tal. Todavia esta dificuldade foi ultrapassada ao longo do período de estágio graças aos conhecimentos partilhados pelos analistas do departamento DAG.

2.3. Oportunidade

2.3.1. Seleção dos Estagiários por Entrevista

A Bluepharma é provavelmente uma das poucas empresas que tem um processo de seleção de estagiários. Os estudantes devem passar por uma entrevista depois de serem selecionados com base no seu *Curriculum Vitae* (CV). Durante a entrevista, os estudantes são questionados e avaliados com base em diversos aspetos relacionados quer com o percurso académico quer com a formação pessoal. Uma vez que esta foi a minha primeira entrevista profissional, tive a oportunidade de aprender com a experiência e determinar o que deveria ter feito melhor no futuro.

2.3.2. Filosofia Kaizen

A filosofia japonesa do *Kaizen*, uma metodologia utilizada para a melhoria contínua, visa maior eficiência em toda a estrutura organizacional de uma empresa, incluindo projetos, processos e recursos humanos. Esta ferramenta pode ser aplicada em todas as áreas, de forma contínua e rotineira.⁴

Desta forma, a Bluepharma adotou e implementou esta filosofia no seu dia-a-dia de trabalho em todos os setores desde a produção em fábrica até às unidades de gestão em gabinetes.

Como nos outros departamentos esta filosofia é aplicada no departamento DAG, onde as reuniões diárias de *Kaizen* são realizadas de forma *online* utilizando a plataforma Microsoft Teams®. O objetivo é comunicar à equipa todo o trabalho concluído ao longo do dia e organizar todas as tarefas que devem ser realizadas a curto prazo. As durações das reuniões são limitadas (cerca de 15 minutos), no entanto, poderiam ser prolongadas por mais tempo, a fim de discutir ou resolver um problema.

Enquanto estagiária, a implementação da Metodologia *Kaizen* constituiu uma oportunidade no meu estágio, pelo que as realizações destas reuniões permitiram uma melhor e mais rápida integração na rotina da equipa e do departamento, bem como propiciou uma maior noção do valor do trabalho em equipa e da capacidade de comunicação.

2.3.3. Plano de Formação

Todos os novos colaboradores, estagiários ou não, são sujeitos a um programa de formação contínua da Bluepharma que, na minha opinião, foi um dos seus pontos mais positivos e uma grande oportunidade para o meu desenvolvimento, pois permitiu uma melhor e mais rápida adaptação ao sistema operativo da empresa e, por outro lado, a aquisição de conhecimentos que seriam úteis tanto durante o meu estágio como, a longo prazo, na minha carreira profissional.

As formações começam por ser de carácter geral, concentrando-se na forma como a empresa funciona e nas ferramentas complementares. Como resultado, tive a possibilidade de participar em sessões de formação de “Enquadramento, evolução histórica da Bluepharma e Política de Recursos Humanos”, “Veeva Vault”, “Avaliação de desempenho”, “SISQUAL - Gestão de Tempos”, “Segurança Informática”, “Sistema Informática”, “Segurança e Saúde no Trabalho”, “Ambiente e Gestão de Resíduos”, “Noções de Farmacovigilância: Reações Adversas Medicamentosas”, “Melhoria Contínua”, “Introdução aos Assuntos Regulamentares” e “Qualidade e GMP”.

Adicionalmente, foram ministradas formações, ao longo do meu estágio, mais específicas relativamente àquele que era o meu trabalho diário no departamento DAG. Dentro do leque dessas formações, destaca-se nomeadamente a de “Desenvolvimento de Métodos de Dissolução”, “Transferência formal de Métodos Analíticos”, “Validação de Métodos Analíticos”, “Boas Práticas de Pesagem”, “Ensaios de Dissolução”, “Estudos de Estabilidade”, “Controlo de Impureza”, “Segurança nos laboratórios”, “Sistema de Contenção”, “HPLC - Equipamentos”, “HPLC-*Troubleshooting*”, entre muitos outros temas relacionados.

Após cada formação, fiz testes de avaliação o que me permitiu rever conceitos e prestar mais atenção aos detalhes que me poderiam ter escapado e/ou que se revelaram fragilidades.

Dito isto, ter acesso a um programa de formação tão abrangente e relevante, constitui uma oportunidade no um estágio.

2.3.4. Componente Laboratorial Forte e Contacto com Diversos Equipamentos

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de aplicar as competências práticas-laboratoriais que tinha desenvolvido ao longo do percurso académico. As competências adquiridas nas aulas práticas permitiram-me transmitir confiança às pessoas que acompanhava e permitir-me desempenhar algumas tarefas de forma autónoma.

No que respeita os equipamentos, foi-me dada a possibilidade de ter contacto, em contexto prático, com vários equipamentos e com os respetivos *softwares*. Nestes equipamentos estão incluídos, os equipamentos de HPLC utilizados no desenvolvimento das metodologias analíticas que utilizei ao longo do meu estágio. Foram-me apresentadas as várias marcas HPLC (Shimadzu e Waters) que estão disponíveis na empresa, bem como as principais variações no design e método de funcionamento. Adicionalmente, tive contacto com o Waters Empower™, um *software* utilizado no processamento e integração de cromatogramas gerados pela análise por HPLC.

Tive também oportunidade de contactar com outros equipamentos, nomeadamente balanças, microbalanças, cabine de contenção, medidor de pH, centrífugas, câmara de foto degradação, e espectrofotómetro UV/Vis, entre muitos outros.

2.4. Ameaças

2.4.1. Conhecimento Limitado da Realidade da Indústria Farmacêutica

Apesar do facto de o currículo do MICF incluir várias unidades curriculares que estão especificamente relacionadas com a indústria farmacêutica, durante o percurso académico, a

maioria dos estudantes não faziam ideia de como é realmente trabalhar numa indústria farmacêutica. Isto porque só se pode ter a correta ideia de como é trabalhar numa determinada área se tiver a oportunidade de experimentar.

Na minha opinião, é importante referir que, durante o estado de emergência provocado pela pandemia de Covid-19, foram suspensos ou cancelados vários estágios de verão e, portanto, os estudantes perderam a oportunidade de fazer mais um estágio com o objetivo de ter uma experiência numa área diferente.

Adicionalmente, ao contrário do que costumava ser feito nos anos anteriores (antes de pandemia), durante o curso não tivemos a oportunidade de realizar visitas de estudo nem às instalações de uma indústria farmacêutica nem às instalações de distribuidor por grosso, devido à situação pandémica. Uma vez que não tínhamos uma perspetiva geral das diferentes áreas e procedimentos efetuados em cada setor, nem tínhamos oportunidade de realizar mais estágios em áreas diferentes de indústria, foi difícil escolher a área em que ia fazer o estágio quando efetuei a minha candidatura na Bluepharma.

3. Considerações Finais

A partir da análise SWOT descrita na parte anterior, é evidente que a balança favorece claramente os pontos fortes e as oportunidades, com apenas alguns pontos fracos e ameaças, é-me possível dizer com confiança e certeza que este estágio foi um sucesso, dando um contributo fundamental àquilo que almejo me tornar como profissional no futuro.

Após três meses de estágio na Bluepharma, foi-me possível aprofundar os meus conhecimentos ao mesmo tempo que adquiri novos conceitos. posso dizer também que este período foi cheio de momentos de aprendizagem constante, novas experiências e aquisição de informação que certamente serão valiosos para a minha entrada no mercado de trabalho.

Para finalizar, gostaria de expressar o meu sincero agradecimento à FFUC ao permitir este tipo de estágios curriculares e a toda a equipa Bluepharma, em particular à equipa do DAG, visto ter tido a sorte de ter estado rodeado de profissionais competentes que sempre me apoiaram e estiveram presentes em todo o período do estágio.

4. Bibliografia

1. BLUEPHARMA - **Grupo Bluepharma | Bluepharma**. Bluepharma [Acedido a 08 de agosto de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharmagroup.com/pt/sobre-nos/empresa>
2. BLUEPHARMA - **Desenvolvimento Analítico e Galénico | Bluepharma**. Bluepharma [Acedido a 09 de agosto de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/innovation/development.php>
3. Harma MK, Murugesan M. **Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method**. *J Chromatogr Sep Tech*. 2017;08(01):1-4. doi:10.4172/2157-7064.1000349
4. Bwemelo, Gordian. **KAIZEN as a Strategy for Improving SSMEs' Performance: Assessing its Acceptability and Feasibility in Tanzania**. *Eur J Bus Manag*. 2014;6(35):2222-2839.

PARTE III – Monografia

**"Inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) como potenciais agentes
na prevenção e tratamento de cancro de pulmão"**

Resumo

A ciclo-oxigenase (COX) é uma enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs). As PGs, especificamente a prostaglandina E2 (PGE2), aumentam a sensibilidade dos nociceptores aos estímulos e são importantes mediadores da dor na articulação osteoartrítica. A ciclo-oxigenase-2 (COX-2), é uma isoforma da enzima COX, expressa de forma induzida em sítios de lesão/inflamação. Nos últimos anos, tem sido sugerido que a COX-2 tem um papel importante em vários processos fisiopatológicos. A sua sobreexpressão foi observada em diferentes tipos de câncros humanos, incluindo o cancro do pulmão, e parece que o aumento dos seus níveis controla muitos processos celulares. Devido ao papel da COX-2 na carcinogénese, apoptose e angiogénese, é possível que seja um excelente alvo para a prevenção e/ou tratamento de câncros humanos.

O desenvolvimento de inibidores seletivos da COX-2 foi documentado com sucesso e mostrou menos toxicidade para o trato gastrointestinal (GI) em comparação com os anti-inflamatórios não esteroides convencionais (AINEs). Contudo, a utilização de inibidores seletivos da COX-2 a longo prazo mostrou toxicidade cardiovascular, pelo que a sua utilização para a prevenção e terapia do cancro é atualmente questionável, sugerindo que é necessário um maior desenvolvimento de novos agentes seletivos da COX-2.

A presente monografia baseia-se na recente descoberta de atividade inibitória seletiva das amidas do ácido cinâmico na enzima COX-2, e a partir das relações estrutura-atividade (SAR) estabelecidas, foi possível concluir que o padrão de substituição aromático 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil está fortemente relacionado com a inibição seletiva da COX-2. Utilizando esta informação como base, sintetizamos cinco novas amidas derivadas de ácido cinâmico com padrão de substituição de 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil e avaliámos a sua capacidade de inibir a COX-1 e COX-2 no sangue humano, bem como a sua atividade citostática nas linhas celulares de cancro de pulmão.

Palavras Chaves:

Ciclo-oxigenases, Inibidores de Ciclo-oxigenases, Derivados de Ácido Cinâmico, Anti-Inflamatórios não Esteroides, Cancro de Pulmão.

Abstract

Cyclooxygenase (COX) is an enzyme responsible for converting arachidonic acid into prostaglandins (PGs). Prostaglandin E2 makes nociceptors more sensitive to stimuli and it is a key mediator of pain in osteoarthritic joints. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an isoform of COX, it is referred to as an 'inducible isoform', which is believed to be undetectable in most normal tissues, but can be up-regulated during various conditions, many of them pathological. In the recent years, many studies demonstrate that COX-2 can be overexpressed in many different types of human cancers, including lung cancer. It appears that increased levels of COX-2 can control many cellular processes. Due to COX-2's role in carcinogenesis, apoptosis, and angiogenesis, it might be an excellent target for the prevention and/or treatment of human cancers.

The development of COX-2 selective inhibitors has been successfully documented; these compounds has shown less toxicity to the gastrointestinal (GI) tract compared to conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Nevertheless, the long-term use of COX-2 selective inhibitors has shown cardiovascular toxicity, whereby their effectiveness in treating and preventing cancer is currently debatable, suggesting that more research into novel COX-2 selective drugs is required.

The present monograph is based on the recent discovery of selective inhibitory activity of cinnamic acid amides on the COX-2 enzyme, and from the established structure-activity relationships (SAR), it was possible to conclude that the 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenil aromatic structural feature is strongly related to selective COX-2 inhibition. Using this information as a basis, five amides derivative of this cinnamic acid were synthesized with a substitution pattern of 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl. Then, their ability to inhibit COX-1 and COX-2 in human blood and their cytostatic activity in lung cancer cell lines were evaluated.

Keywords:

Cyclooxygenases, Cyclooxygenase Inhibitors, Cinnamic Acid Derivatives, Nonsteroidal Anti-inflammatories, Lung Cancer.

Abreviaturas

AINEs – Anti-Inflamatórios Não Esteróides
AKT – Proteína Cinase B
COX – Ciclo-oxigenases
COX 1 – Ciclo-oxigenases 1
COX 2 – Ciclo-oxigenases 2
COX 3 – Ciclo-oxigenases 3
CPCNP– Cancro Do Pulmão De Células Não Pequenas
CPCP – Cancro Do Pulmão De Células Pequenas
d – Dupleteo
DMF – Dimetilformamida
DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido-d₆
dt – Duplo Tripleto
EGFR – Fator de Crescimento Epidérmico
GI – gastrointestinal
IL-6 – Interleucina-6
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
J – Constante de Acoplamento
LPS – Lipopolissacarídeo
m – Multipleto
MMP – Metaloproteinase
NF-kB – Factor Nuclear kB
PFs – Pontos de Fusão
PGE2 – Prostaglandina E2
PGI₂ – Prostaciclina I₂
PI3K – Fosfoinositídeo 3-Cinase
ppm – Partes por Milhão
PyBOP – (Benzotriazol-1-Yloxy) Tri(Pyrrolidino)Phosphonium Hexafluorophosphate
q – Quarteto
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
s – Singuleto
STAT3 – do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription 3
t – Tripleto
TEA – Trietilamina
TLC – Cromatografia em Camada Fina
TXA2 – Tromboxano A2
TXBSI – Inibidor da Tromboxano Sintetase
VEGF – Fator De Crescimento Endotelial Vascular

I. Introdução

I.1. Cancro de Pulmão

O cancro do pulmão é um problema de saúde muito sério. Esta doença é a principal causa de morte por cancro nos homens e a segunda principal causa de morte por cancro nas mulheres (depois do cancro da mama). É responsável por 13% de todos os novos casos de cancro e por 19% de todas as mortes relacionadas com o cancro, mais de metade dos doentes com cancro do pulmão morrem no prazo de um ano após o diagnóstico.¹ Existem vários tipos de cancro do pulmão, que podem ser divididos em dois grupos principais, com base no aspeto microscópico das células cancerosas, que se comportam de uma forma diferente em termos do seu desenvolvimento e metástases: o cancro do pulmão de células pequenas (CPCP) e o cancro do pulmão de células não pequenas (CPCNP). O CPCNP é o subtipo mais comum, representando cerca de ~80% –85% de todos os casos de cancro do pulmão². Devido à ausência de sintomas específicos nas fases iniciais da doença, mais de 50% dos doentes recém-diagnosticados com CPCNP têm a doença já na fase avançada (IIIB ou IV), e perdem a oportunidade de tratamento cirúrgico precoce.³ Geralmente, as fases avançadas do CPCNP oferecem maiores desafios terapêuticos, sendo muitas vezes necessário terapêuticas multimodais que podem incluir radioterapia, quimioterapia e cuidados paliativos.⁴ A quimioterapia é a abordagem terapêutica mais recomendada em todas as fases da doença e apesar dos seus grandes avanços, o CPCNP avançado continua incurável, e os resultados clínicos não são satisfatórios, sendo que a resistência tumoral ao tratamento continua a ser um problema clínico.

Deste modo, novas abordagens para o tratamento do cancro do pulmão têm sido estudadas ao longo dos últimos anos e, atualmente, novas estratégias de tratamento têm vindo a evoluir para ultrapassar a limitação dos tratamentos atuais e melhorar o benefício clínico do CPCNP avançado.⁵

I.2. O Papel da Inflamação na Carcinogénese

O cancro pode ter origem em vários fatores etiológicos. Apenas 5-10% estão associados a instabilidade genómica e alterações epigenéticas, enquanto 90-95% dos casos estão associados a stress ambiental e ao estilo de vida.⁶ Os principais fatores de risco para a carcinogénese, tais como, infeções crónicas, obesidade, dieta, poluentes e radiações ambientais, têm o processo de inflamação em comum.⁷

A inflamação é uma resposta biológica que ocorre quando o sistema imunológico responde a uma infecção ou doença. Pode ser aguda, persistindo durante um curto período de tempo, ou ser crônica, tendo, neste caso, uma duração prolongada e está associado a várias patologias, incluindo o cancro.

Deste modo, vários estudos epidemiológicos e clínicos sugeriram que existe uma ligação entre a inflamação crônica e o cancro, uma vez que, as biópsias tumorais contêm frequentemente células inflamatórias, e os tumores desenvolvem-se frequentemente em locais de inflamação crônica. Adicionalmente, verificou-se a presença de mediadores inflamatórios, angiogénese e alterações na homeostase tecidual nos tecidos tumorais, semelhante aos observados nas respostas inflamatórias crônicas.⁸

Identificou-se vários mecanismos pelos quais a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento do cancro, incluindo a indução da instabilidade genómica e alterações na regulação epigenética que levam a uma acumulação de mutações nas células epiteliais e danos persistentes nos tecidos e DNA, indução do angiogénese, resistência à apoptose e aumento da proliferação celular.⁹ Atualmente, um dos alvos a ser avaliado para inibir a inflamação relacionada com o cancro do pulmão é a enzima ciclo-oxigenase (COX), mais particularmente a ciclo-oxigenase-2 (COX-2).

1.3. Mecanismos e Biologia da COX-2 nas carcinogénese

A COX é uma enzima que catalisa etapas sequenciais de síntese dos prostanóides, que incluem prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂), a partir do ácido araquidónico libertado de fosfolípidos de membranas celulares lesadas por ação catalítica da fosfolipase A₂.¹⁰ Ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e COX-2 são duas isoformas principais da enzima COX. Adicionalmente, foi identificada uma terceira isoforma, a ciclo-oxigenase-3 (COX-3).¹¹ Tanto a COX-1 como a COX-2 são capazes de catalisar a produção dos prostanóides, e ambas têm uma estrutura tridimensional semelhante, partilhando 60% da sua sequência de aminoácidos, embora sejam codificados por cromossomas diferentes (cromossomas 9 e 1, respetivamente).¹² Todavia, COX-1 e COX-2 têm funções biológicas distintas devido às diferenças na regulação da sua expressão, distribuição nos tecidos e tipo de prostanóides expressas.⁹

A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos (por exemplo, plaquetas, pulmão, próstata, cérebro, trato gastrointestinal, rim, fígado e baço). Os prostanóides derivados da COX-1, em geral, têm um papel importante em manter a homeostase nos tecidos em que atuam. Ao contrário da COX-1, a COX-2 é geralmente expressa de forma induzida,

exceto no cérebro, rim e ossos onde é expressa constitutivamente, é responsável pelo aumento da produção de prostanóides e fatores de crescimento em resposta a estímulos inflamatórios e em várias condições patológicas, incluindo a inflamação e o cancro.¹³ Dada a importância da COX-2, e dos produtos de PGs, particularmente PGE₂, no processo inflamatório relacionada com o cancro,^{9,14} a COX-2 tem sido extensivamente investigada em muitas doenças neoplásicas, incluindo cancro esofágico¹⁵, gastrointestinal¹⁶ e pancreático¹⁷, cancro da mama¹⁸ e do colo do útero¹⁹, cancro renal²⁰, da próstata²¹, e da bexiga²², cancro da pele²³ e da cabeça e do pescoço²⁴, tumores hematológicos²⁵, mesotelioma²⁶ e cancro do pulmão.^{27,28}

Em condições fisiológicas normais, o nível de expressão da COX-2 é baixo, no entanto, no caso de cancro, uma variedade de fatores de crescimento e oncogenes, tais como, o fator nuclear kB (NF-kB) e Interleucina-6 (IL-6), ligam-se às regiões promotoras da COX-2 e estimulam a sua transcrição, além disso, a mutação da p53 resulta na estimulação da expressão da COX-2 e, conseqüentemente, a COX-2 é positivamente regulada numa variedade de cancros, sendo associada a um comportamento tumoral biológico mais agressivo e um pior prognóstico.²⁹ Em que diz respeito ao cancro de pulmão, sabe-se que a expressão aumentada da COX-2 foi relatada em cerca de 70% dos adenocarcinomas de CPCNP.³⁰

Desta forma, a sobreexpressão da COX-2 está associada a vários eventos que podem contribuir para a gravidade da carcinogénese, incluindo: 1) O aumento da angiogénese através do aumento dos níveis de PGs que, por sua vez, aumentam a expressão de mediadores pró-angiogénicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de genes anti-apoptóticos (bcl-2 e Akt), promovendo a neovascularização e a proliferação tumoral. 2) A diminuição da apoptose e o aumento de proliferação celular através de diminuição dos níveis de ácido araquidónico biodisponível e elevação dos níveis de PGs que contribuem para a indução dos genes pró e anti-apoptóticos como o NF-KB. 3) A imunossupressão através de modulação dos mediadores de inflamação, nomeadamente o aumento da atividade de Interleucina-10 (IL-10) (imunossupressora) e a diminuição da atividade de Interleucina-12 (IL-12) (imunoestimuladora), e modulação dos genes de mediadores tumorais (bcl-2 e p53), além disso, através de inibição do crescimento de linfócitos B e T, particularmente das células “*natural killer*”, limitando a eficácia antineoplásica. 4) O aumento da invasão celular através do aumento de expressão de metaloproteinasas (MMP-2 e MMP-9) que, por sua vez, aumenta a invasão e adesão tumoral às proteínas da matriz extracelular. 5) A promoção de formação de espécies reativas de oxigénio cancerígenas e a conversão de pré-carcinogénicos em carcinogénicos.^{31,32} Posto isto, a COX-2 e os seus produtos têm sido alvos atrativos para

tratamentos terapêuticos e quimioprotetores numa série de cânceres humanos, desde que se descobriu que os inibidores da COX-2 interferem com a carcinogênese e a apoptose.^{33, 17}

2. Fármacos Inibidores da COX-2

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são um grupo heterogêneo de compostos não relacionados quimicamente, mas com efeitos terapêuticos semelhantes, que têm sido amplamente utilizados para reduzir a dor e a inflamação, fornecendo um alívio sintomático através da inibição direta das enzimas da COX, com uma subsequente redução das PGs.³⁴

Os inibidores da COX sintéticos, existem há décadas, têm sido eficazes no bloqueio da via COX-2 na inflamação de forma seletiva ou não seletiva. A primeira geração de AINEs são inibidores não seletivos da COX, como a aspirina, que possuem afinidade semelhante para COX-1 e COX-2, bloqueando irreversivelmente a enzima alvo.³⁵ Outros AINEs não seletivos atuam como inibidores competitivos da COX, bloqueando-a de forma reversível, incluem diclofenac, indometacina, cetoprofeno, naproxeno, ibuprofeno, fenilbutazona e meclofenamato.³⁶ O uso a médio e a longo prazo dos AINEs não seletivos pode ter vários efeitos colaterais, nomeadamente efeitos gastrointestinais (GIs) negativos, como úlceras e degradação do muco da membrana, hipertensão arterial e insuficiência renal.³⁶ Para limitar os efeitos colaterais houve a necessidade de procurar inibidores seletivos da COX-2 que bloqueiam a produção de prostaciclina inflamatória, PGI₂, enquanto ainda permitem a produção de PGs protetoras GI, reduzindo assim a incidência dos efeitos secundários GI. No entanto, os inibidores seletivos da COX-2 estão associados a complicações cardiovasculares, tais como, ataque cardíaco, trombose e AVC.³⁷ Então, existe uma necessidade de encontrar medicamentos mais seletivos para a COX-2, evitando ao mesmo tempo efeitos secundários prejudiciais no tratamento de doenças inflamatórias.

Em 1998, o primeiro inibidor seletivo da COX-2, o celecoxib, foi aprovado pela FDA, que, hoje em dia, é o único inibidor seletivo da COX-2 disponível nos Estados Unidos e um dos poucos disponíveis na Europa.³⁸ Vários meses depois, o rofecoxib e o valdecoxib também foram aprovados, porém em 2004 e 2005, respetivamente, houve uma retirada global dos dois medicamentos, pois os estudos indicaram que havia uma duplicação do risco de eventos tromboembólicos graves, incluindo infarto do miocárdio, que poderiam ocorrer 18 meses após o seu uso.^{31,39}

Os inibidores seletivos da COX-2 provaram ter efeitos potentes anti-tumorais ou quimiopreventivos *in vitro* e *in vivo*. Embora o mecanismo molecular de inibição da tumorigenese não tenha sido completamente delineado, estudos sugerem que estes

medicamentos podem atuar em múltiplos alvos de progressão tumoral através de uma combinação de vias dependentes e independentes da COX-2.^{17,40} De acordo com dados epidemiológicos, indivíduos com cancro colorretal e do pulmão que utilizaram AINEs tiveram uma incidência e uma taxa de mortalidade mais baixa do que aqueles que não os utilizaram, tornando-os candidatos promissores à terapia e prevenção do cancro.⁴¹

3. Celecoxib na Prevenção e Tratamento do Cancro do Pulmão

O celecoxib, é um inibidor seletivo da COX-2, aprovado pela FDA e pela EMA para o alívio sintomático na osteoartrite e artrite reumatoide.⁴² Nos últimos anos, vários estudos revelaram que o celecoxib tem também um efeito anti-tumoral. Como está descrito na secção 1.3, a COX-2 tem um papel importante no desenvolvimento de cancro. Posto isto, pensa-se que o celecoxib, como inibidor seletivo da COX-2, desempenha o seu mecanismo anti-tumoral através da inibição da proliferação celular, indução da apoptose, imunomodulação, regulação do microambiente tumoral, efeito anti-angiogénico e resensibilização de outros medicamentos anti-tumorais. Entretanto, as vias independentes da COX-2 também contribuem para o efeito anti-tumoral do celecoxib.¹⁷

O celecoxib tem sido testado em ensaios clínicos contra uma grande variedade de cancros, incluindo o cancro do pulmão, como um único agente ou em combinação com outros agentes terapêuticos,^{43,44} o que surgiu que o celecoxib pode fazer parte de um regime viável e clinicamente ativo na prevenção e tratamento de doentes com cancro do pulmão, induzindo a apoptose das células CPCNP e aumentando a atividade anti-tumoral de medicamentos quimioterápicos padrão.⁴⁵ Para além disso, reduz as reações adversas causadas pela radioterapia, como pneumonia radioativa.⁴⁶ Um estudo conduzido por Shi *et al.*⁴⁷, onde utilizaram um nanosistema à base de albumina com celecoxib e doxorubicina, mostrou efeitos de inibição sinérgica no CPCNP, tanto nas experiências *in vitro* como *in vivo*.⁴⁷ Outro estudo liderado por Sun *et al.*⁴⁸, mostrou que a combinação de erlotinibe com celecoxib bloqueou as vias relacionadas com a via de sinalização do recetor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) e COX-2 após a radioterapia, e aumentou a radiosensibilidade. Os mecanismos subjacentes poderiam incluir o aumento da apoptose das células tumorais e a paragem do ciclo celular G0/G1 através da inibição da via de sinalização fosfoinositídeo 3-cinase/proteína cinase B (PI3K/AKT).⁴⁸ Outro estudo recente de Li *et al.*⁴⁹, avaliou o efeito combinado de gefitinibe e celecoxib nas linhas de CPCNP, mostrou que a terapia combinada induziu a apoptose destas linhas celulares.⁴⁹ Em dois meta análise, uma conduzida por Yi L *et al.*⁴⁴ e outra por Yu-Qiong *et al.*⁵⁰, foi avaliado o benefício do celecoxib no tratamento do CPCNP avançado e

demonstrou-se que o celecoxib apresentou atividade anti-tumoral moderada para CPCNP, sem aumentar o risco de eventos cardiovasculares nas dosagens usadas. Como conclusão das duas análises, o celecoxib combinado com terapia da primeira linha de tratamento do CPCNP pode melhorar a taxa de resposta total e a taxa de sobrevivência de 1º ano dos doentes. Em relação à toxicidade, o celecoxib mais a quimioterapia resultou numa maior incidência de toxicidade hematológica. Em conclusão, ainda não existe consenso se a combinação de um inibidor da COX-2 com a quimioterapia e imunoterapia tem uma relação risco benefício positiva.^{44,50}

4. Síntese e Caracterização de Novas Amidas de Ácido Cinâmico Fenólico como Inibidores Seletivos da COX-2

Neste ponto será apresentada a componente experimental da monografia realizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, com a colaboração do Grupo da Professora Eduarda Fernandes, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e do Grupo da Professora Filomena Botelho, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. O projeto de investigação baseou-se na recente descoberta da atividade inibitória seletiva da COX-2, demonstrada pelas amidas do ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico. Desta forma, foram sintetizadas novas amidas do referido ácido, testada a sua atividade inibidora da COX-2 e avaliados os seus efeitos anti-tumorais em duas linhas celulares de cancro de pulmão.

4.1. Derivados de Ácidos Cinâmicos como Moléculas com Atividade Farmacológica

O ácido cinâmico é um ácido carboxílico aromático natural, encontrado em algumas plantas como *Cinnamomum cassia* (canela chinesa), *Panax ginseng*, frutas, grãos integrais, vegetais e mel.⁵¹ É composto por um anel benzénico e um grupo ácido acrílico, sendo possível fazer modificações químicas no ácido cinâmico e nos derivados que ocorrem naturalmente nas plantas, para obter derivados sintéticos de ácido cinâmico.⁵² As diferentes atividades biológicas dos derivados do ácido cinâmico têm sido atribuídas à natureza e posição dos grupos substituintes do anel aromático. Vários estudos relataram que o ácido cinâmico e os seus derivados apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas,⁵³ neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antidiabéticas⁵⁴ e anticancerígenas,⁵⁴ sugerindo a existência de uma atividade anti-tumoral de vários ácidos hidroxicinâmicos contra uma vasta gama de cancros, tais como, cancro de mama, cólon e pulmão.⁵⁵

4.2. Design dos Compostos a Sintetizar

O presente trabalho teve como base o trabalho de (Ribeiro *et al.*, 2019)⁵⁶, do grupo de investigação onde realizei a parte experimental da monografia, em que se investigaram uma série de novos compostos, derivados de ácido hidroxicinâmico, que demonstraram ser bons inibidores seletivos da COX-2.⁵⁶ Nesse trabalho, foi estabelecida uma relação estrutura-atividade avaliando a aptidão dos compostos sintetizados para suprimir a produção das PGs através da determinação da atividade inibitória das enzimas COX-1 e COX-2. De acordo com os resultados obtidos, o padrão de substituição aromática do ácido cinâmico tem um impacto significativo na inibição da COX-2, sendo que o 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxifenil foi o mais eficaz para a inibição da COX-2. Para além disso, foi referido no mesmo estudo que a maior atividade das amidas de ácido cinâmico se devia à sua maior lipofilia, quando comparada com a dos respetivos ácidos, e que as amidas do ácido cinâmico terciárias possuem uma atividade inibitória da COX-2 superior às secundárias. Estes resultados podem ser correlacionados com o local ativo da COX-1 e da COX-2. A presença de um resíduo de isoleucina na posição 523 da COX-1, em vez de um resíduo de valina presente na COX-2, é considerada a variação mais significativa entre as duas isoenzimas, e o tamanho reduzido do resíduo de valina permite que moléculas com grupos hidrofóbicos se envolvam mais eficazmente com o local ativo da COX-2.⁵⁷ Isto poderia explicar a elevada atividade inibitória da COX-2 pelas amidas de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxi cinâmico que, para além de possuírem dois grupos hidrofóbicos *terc*-butílicos no anel aromático, também possuem um grupo amida hidrofóbico volumoso, principalmente as amidas terciárias.⁵⁶

Segundo o mesmo estudo, os derivados de ácido cinâmico sintetizados com o padrão de substituição aromática 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxilo, para além de serem compostos muito eficazes na inibição da COX-2, eles têm elevada afinidade para esta enzima, pois os dois grupos *terc*-butilo volumosos são capazes de induzir restrições estéricas, resultando em inibidores da COX-2 altamente eficazes e seletivos.⁵⁶

Dados os resultados do estudo anterior, neste trabalho de investigação para a monografia, optámos por explorar a síntese de cinco novas amidas do ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxilo cinâmico (**Figura 1**), duas delas terciárias, a partir da reação de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico (**Figura 3 (a)**) com diferentes aminas nomeadamente, *terc*-butilamina, benzilamina, 4-*terc*-butilanilina, dibutilamina e dipropilamina.

4.3. Síntese das Novas Amidas do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico

A síntese das amidas **2**, **4**, **6**, **8** e **10** foi realizada utilizando uma reação de passo único a partir do ácido 3,5-di-terc-butil-4-hidroxicinâmico e as respectivas aminas **1**, **3**, **5**, **7** e **9** em dimetilformamida (DMF) e trietilamina (TEA), na presença do agente de acoplamento (benzotriazol-1-yloxy) tri(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) em diclorometano (CH_2Cl_2), à temperatura ambiente. Este procedimento revelou-se adequado para permitir a amidação direta do ácido, produzindo as amidas desejadas em rendimentos apropriados entre 29 e 70%, aproximadamente (**Figura 2, Tabela 1**). De seguida, as amidas sintetizadas foram testadas quanto à sua capacidade para inibir a produção das PGs através da inibição da atividade das enzimas COX-1 e COX-2 (**Tabela 2**) e as atividades resultantes foram correlacionadas com a estrutura dos compostos. Os compostos preparados também foram testados em linhas de células cancerígenas, avaliando os seus efeitos citotóxicos em dois tipos diferentes de linhas de células cancerígenas do pulmão (**Figura 4, Tabela 3**), para nos dar uma ideia sobre a atividade anti-tumoral das amidas sintetizadas.

CARACTERÍSTICA ESTRUTURAL AROMÁTICA IMPORTANTE
PARA A INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2

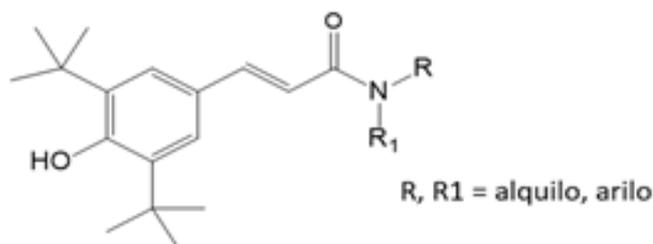


Figura 2 – Estrutura geral dos novos compostos sintetizados.

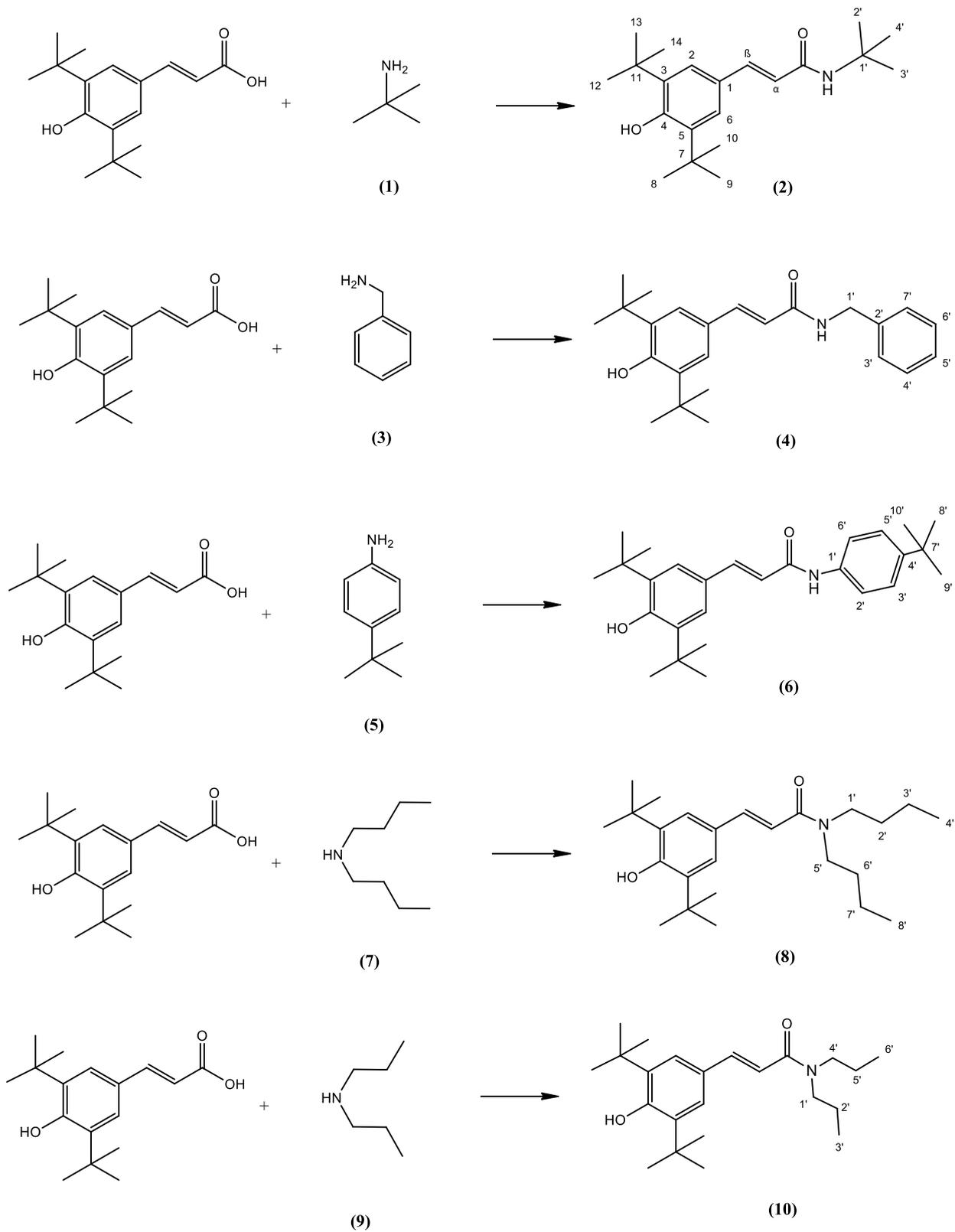


Figura 2 – As reações da síntese de amidas de ácido cinâmico.

Tabela I – Tempo de reação (h) e rendimento (%) dos compostos sintetizados.

Compostos	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
2	6	28,90
4	3 h 30 min	43,11
6	7 h 15 min	63,04
8	7 h e 30 min	70,37
10	5 h e 30 min	43,50

4.4. Materiais, Equipamentos e Reagentes

A cromatografia em camada fina (TLC) foi utilizada para monitorizar as reações, sendo realizada em placas de sílica gel 60 HF254, que foram reveladas primeiro com luz ultravioleta e posteriormente com vapor de iodo. Na cromatografia em coluna, utilizou-se sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária e uma mistura de éter de petróleo / acetato de etilo 90:10 como fase móvel. Os pontos de fusão (Pfs) foram determinados num dispositivo Büchi Melting Point B-540. Os espectros de ressonância magnética nuclear ^1H RNM e ^{13}C RNM foram registados nas frequências de 400 MHz e 100 MHz, respetivamente, num Varian Unity 400 utilizando dimetilsulfóxido- d_6 (DMSO- d_6) nos compostos **2**, **4** e **6** e clorofórmio deuterado (CDCl_3) nos compostos **8** e **10**, como solventes. Os desvios químicos foram registados em valores δ em partes por milhão (ppm), o solvente residual não deuterado foi utilizado como padrão interno para determinar as posições dos picos; os valores das constantes de acoplamento (J) foram expressos em hertz; a multiplicidade é indicada como: s, singuleto; d, duplete; t, tripleto; dt, duplo tripleto; q, quarteto; m, multiplete.

4.5. Procedimento Geral para a Síntese, Purificação e Caracterização das Amidas **2**, **4**, **6**, **8** e **10**

Como foi referido, a síntese das amidas **2**, **4**, **6**, **8**, e **10** foi realizada a partir da reação das aminas **1**, **3**, **5**, **7** e **9**, respetivamente, com ácido 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxicinâmico, que foi inicialmente dissolvido em DMF e TEA. A solução obtida foi arrefecida num banho de água com gelo e procedeu-se à adição sequencial da amina e de uma solução de PyBOP em CH_2Cl_2 . O sistema foi colocado em agitação à temperatura de 0°C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante um período de tempo específico para cada reação, com agitação constante.

Posteriormente, nos compostos **2**, **4**, e **6**, o CH_2Cl_2 foi removido a pressão reduzida e a mistura resultante foi diluída com 100 mL de água destilada. Foi efetuada uma extração com

2 porções de 100 mL de acetato de etilo, que foram reunidas e lavadas com 2 porções de 100 mL de HCl 1 N, 100 mL de água destilada, 3 porções de 100 mL de solução de NaHCO₃ a 5% e, por fim, mais 100 mL de água destilada. O sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi utilizado para secar a fase orgânica, que foi subsequentemente filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Foi obtido um *crude* que foi purificado por recristalização e/ou por cromatografia em coluna, resultando nas amidas correspondentes **2**, **4** e **6**.

Por outro lado, na preparação dos compostos **8** e **10**, depois de terminar a reação, esta foi deixada no frigorífico durante um período de tempo e, posteriormente, a suspensão resultante foi filtrada a vácuo. Os resíduos obtidos foram purificados por cristalização, resultando nas amidas **8** e **10**.

4.5.1. Terc-Butilamida do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico (**2**)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,4 (2,7 mmol) mg de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico; 4,2 mL de DMF; 0,25 mL de TEA; 0,19 mL (1,81 mmol) de *terc*-butilamina (**1**); 0,94 g (1,81 mmol) de PyBOP; e 4,2 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0°C, durante 30 min, e depois à temperatura ambiente durante 6h. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando éter de petróleo e acetato de etilo 8:2 como fase móvel, e uma solução de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico em acetato de etilo como controle. O *crude* obtido após *work-up*, descrito em **4.5**, foi purificado por recristalização em metanol. No entanto, uma nova análise por TLC revelou que o produto obtido ainda continha impurezas, pelo que uma cromatografia em coluna foi realizada com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), usando uma mistura de éter de petróleo / acetato de etilo 90:10 como fase móvel. Foram recuperadas um total de 162 mg de composto **2**, correspondente a um rendimento de 28,9%. Pf (metanol) 182,1–194,8°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,31 (9H, s, 3(CH₃) (N-*terc*-butilo)), 1,39 (18H, s, 3(CH₃) (C-*terc*-butilo)), 6,50 (1H, d, *J* = 15,6, CH(α))* , 7,25 (1H, d, *J* = 15,6, CH(β))* , 7,27 (3H, s, CH (C-2 e C-6), e OH), 7,57(1H, s, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 28,6 (C-2', C-3', C-4'), 30,2 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 e C-14), 34,5 (C-7 e C-11), 50,0 (C-1'), 120,4 (C-α), 124,1 (C-2 e C-6), 126,5 (C-1), 138,7 (C-3 e C-5), 139,1 (C-β), 155,3 (C-OH), 164,8 (C-O).

4.5.2. Benzilamida do Ácido 3,5-Di-Terc-Butil-4-Hidroxicinâmico (**4**)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,2 mg (2,7 mmol) de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico; 4,2 mL de DMF; 0,25 mL de TEA; 0,197 mL (1,81 mmol) de benzilamina (**3**);

0,94 g (1,81 mmol) de PyBOP; e 4,2 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0°C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante 3h30min. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando éter de petróleo e acetato de etilo 8:2 como fase móvel, e uma solução de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico em acetato de etilo como controle. O *crude* obtido após *work-up*, descrito em 4.5, foi purificado por recristalização em metanol, resultando em 285 mg de composto 4, o que corresponde a um rendimento de 43,11%. Pf (metanol) 166,6–167,6°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,40 (18H, s, 3(CH₃) (C-*terc*-butilo)), (4,38 (2H, d, *J* = 5,87, CH₂ (C-1')), 6,50 (1H, d, *J* = 15,6, CH(α))*), 7,28 (7H, m, CH (anéis aromáticos)), 7,38 (1H, d, *J* = 15,6, CH(β))*), 8,44 (1H, t, *J* = 5,9, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d₆) δ: 30,2 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 e C-14), 34,5 (C-7 e C-11), 42,3 (C-1'), 118,7 (C-α), 124,3 (C-2 e C-6), 126,2 (C-2'), 126,8 (C-5'), 127,4 (C4'-C6'), 128,3 (C-3', C-7'), 139,2 (C-3 e C-5), 139,5 (C-1), 139,9 (C-β), 155,6 (C-OH), 165,4 (C-O).

4.5.3. 4-*Terc*-Butilanilina do Ácido 3,5-Di-*Terc*-Butil-4-Hidroxicinâmico (6)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,4 mg (2,7 mmol) de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico; 4,2 mL de DMF; 0,25 mL de TEA; 0,288 mL (1.81 mmol) de 4-*terc*-butilanilina (5); 0,94 g (1,81 mmol) de PyBOP; e 4,2 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0°C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante 7h15 min. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando éter de petróleo e acetato de etilo 8:2 como fase móvel, e uma solução de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico em acetato de etilo como controle. O *crude* obtido após *work-up*, descrito em 4.5, foi purificado por recristalização em metanol, resultando em 465 mg de composto 6, o que corresponde a um rendimento de 63,04%. Pf (metanol) 233,6–235,5°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1,27 (9H, s, 3(CH₃) (C-*terc*-butilo)), 1,41 (18H, s, 3(CH₃) (C-*terc*-butilo)), 6,66 (1H, d, *J* = 15,6, CH(α))*), 7,33 (2H, d, *J* = 8,6, CH (C-3' e C-5')), 7,38 (2H, s, CH (C-2 e C-6)), 7,49 (1H, d, *J* = 15,6, CH(β))*), 7,60 (2H, d, *J* = 8,6, CH (C-2' e C-6')), 9,99 (1H, s, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 30,2 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 e C-14), 31,2 (C-8', C-9' e C-10'), 34,0 (C-7'), 34,5 (C-7 e C-11), 118,8 (C-α), 118,9 (C-3' e C-5'), 124,5 (C-2 e C-6), 125,4 (C-2' e C-6'), 126,0 (C-1), 136,9 (C-3 e C-5), 139,2 (C-4'), 141,1 (C-β), 145,3 (C-1'), 155,6 (C-OH), 163,8 (C-O).

4.5.4. Dibutilamida do Ácido 3,5-Di-*Terc*-Butil-4-Hidroxicinâmico (8)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,1 mg (2,7 mmol) de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico; 4,2 mL de DMF; 0,25 mL de TEA; 0.304 mL (1.81 mmol) de dibutilamina (7);

0,94 g (1,81 mmol) de PyBOP; e 4,2 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0°C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante 7h30min. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando éter de petróleo e acetato de etilo 8:2 como fase móvel, e uma solução de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico em acetato de etilo como controle. Posteriormente, procedeu-se a uma filtração a vácuo e purificação por recristalização em metanol resultando em 494 mg de composto **8**, o que corresponde a um rendimento de 70,37% . Pf (metanol) 195,2–197,6°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,96 (6H, dt, *J* = 7,5; 2(CH₃) (C-4' e C-8')), 1,38 (4H, m, 2(CH₂) (C-3' e C-7')), 1,45 (18H, s, 3(CH₃) (C-*terc*-butilo)), 1,61 (4H, m, 2(CH₂) (C-2' e C-6')), 3,41 (4H, dt, *J* = 7,5; 2(CH₂) (C-1' e C-5')), 5,43 (OH), 6,67 (1H, d, *J* = 15,3, CH(α))* , 7,35 (2H, s, CH (C-2 e C-6)), 7,56 (1H, d, *J* = 15,3, CH(β))* . ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 13,9 e 14,1 (C-4' e C-8'), 20,2 e 20,5 (C-3' e C-7'), 30,3 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 e C-14), 32,1 (C-2' e C-6'), 34,5 (C-7 e C-11), 46,81 e 48,04 (C-1' e C-5'), 114,9 (C-α), 125,1 (C-2 e C-6), 127,1 (C-1), 136,4 (C-3 e C-5), 143,3 (C-β), 166,6 (C-O), 155,5 (C-OH).

4.5.5. Dipropilamida do Ácido 3,5-Di-*Terc*-Butil-4-Hidroxicinâmico (10)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,1 mg (2,7 mmol) de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico; 4,2 mL de DMF; 0,25 mL de TEA; 0,248 mL (1,81 mmol) de dipropilamina (**9**); 0,94 g (1,81 mmol) de PyBOP; e 4,2 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0°C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante 5h30min. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando éter de petróleo e acetato de etilo 8:2 como fase móvel, e uma solução de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico em acetato de etilo como controle. Posteriormente, procedeu-se uma filtração a vácuo e o resíduo foi purificado por recristalização em metanol, resultando em 283 mg de composto **10**, o que corresponde a um rendimento de 43,5%. Pf (metanol) 202–203,2°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,94 (6H, m 2(CH₃) (C-3' e C-6')), 1,45 (18H, s, 3(CH₃) (C-*terc*-butilo)), 1,64 (4H, m, (CH₂)₂ (C-2' e C-5')), 3,38 (4H, m, (CH₂)₂ (C-1' e C-4')), 5,43 (OH), 6,66 (1H, d, *J* = 15,3, CH(α))* , 7,34 (2H, s, CH (C-2 e C-6)), 7,65 (1H, d, *J* = 15,3, CH(β))* , ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 11,6 (C-3' e C-6'), 21,4 (C-5'), 23,3 (C-2'), 30,3 (C-8 to 10 e C-12 to 14), 34,5 (C-7 e C-11), 48,7 (C-4'), 50,1 (C-1'), 114,8 (C-α), 125,1 (C-2 e C-6), 127,1 (C-1), 136,4 (C-3 e C-5), 143,3 (C-β), 155,5 (C-OH), 166,8 (C-O).

* Os dois sinais são interconvertíveis.

5. Estudo da Atividade Inibitória dos Compostos Sintetizados Sobre as COXs

5.1. Método de Avaliação

Para avaliar a atividade inibitória das amidas de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxi cinâmico sintetizadas sobre as enzimas COX-1 e COX-2 efetuou-se um ensaio *in vitro* em sangue venoso total descrito na literatura.^{57, 58}

Foram testadas várias concentrações dos compostos em análise com o objetivo de determinar o IC₅₀ (μM) ou a percentagem de inibição de cada composto (**Tabela 2**). Estes testes foram realizados em colaboração com o grupo da Professora Eduarda Fernandes da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. A partir de todo o estudo, foram estabelecidas novas relações estrutura atividade.

5.2. Resultados e Discussão

A partir da **Tabela 2**, podemos observar que o composto **2** mostrou uma capacidade moderada de inibição da enzima COX-2, sendo que obteve uma percentagem de inibição de $49 \pm 6\%$, na concentração que foi testada (100 μM). Comparando com o celecoxib (controlo) o composto **2** tem uma capacidade menor na inibição da COX-2. Relativamente à inibição da enzima COX-1, o composto **2** obteve um valor de IC₅₀ de $42 \pm 7 \mu\text{M}$, podendo-se concluir que tem mais afinidade para a COX-1 do que para a COX-2. Ao contrário das amidas do ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico previamente sintetizadas, a amida **2** teve menor atividade inibitória da COX-2 do que o ácido correspondente (IC₅₀ = $3,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$) (**Figura 3 (a)**) que mostrou uma percentagem de inibição de $93 \pm 7\%$ ⁵⁶, utilizando a mesma concentração. No entanto, o composto **2** revelou uma maior atividade na inibição da COX-1 do que o respetivo ácido, este último obteve um valor de IC₅₀ > 100 μM⁵⁶, o que indica que o composto **2** tem uma afinidade inferior para a COX-2, e superior para a COX-1, comparando com o respetivo ácido. As amidas do ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico previamente sintetizadas, hexilamida do ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico (IC₅₀ = $2,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$) (**Figura 3 (b)**) e dietilamida do ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico (IC₅₀ = $1,09 \pm 0,09 \mu\text{M}$) (**Figura 3 (c)**), mostraram ter uma atividade inibitória maior tanto na COX-1 como na COX-2.⁵⁶ Observando as estruturas das três amidas, e sabendo que as únicas diferenças estruturais entre estes compostos residem nos grupos amidas, podemos deduzir que a amida terciária (**Figura 3 (c)**) tem maior atividade inibitória da COX comparando com as amidas secundárias; deduzimos também que a amida secundária linear (**Figura 3 (b)**) tem atividade de inibição da COX-2 maior do que a amida secundária ramificada (composto **2**).

Por sua vez, o composto **4** apresentou pouca atividade inibitória da COX-1 ($16 \pm 8\%$), mas, por outro lado, mostrou uma atividade significativa na inibição da COX-2 ($IC_{50} = 6,2 \pm 2\mu M$), menor do que a do ácido correspondente ($IC_{50} = 3,0 \pm 0,3 \mu M$). O composto **4** mostrou ainda uma menor atividade do que a amida da Figura 3 (b) ($IC_{50} = 2,4 \pm 0,6 \mu M$)⁵⁶, o que permite concluir que o anel aromático na amida não aumentou a sua atividade na inibição da enzima COX-2 relativamente a amida secundária linear (**Figura 3 (b)**). Ao comparar a atividade de composto **4** com a amida da Figura 3 (c) ($IC_{50} = 1,09 \pm 0,09 \mu M$)⁵⁶, concluímos que as amidas terciárias ainda têm maior atividade do que as amidas secundárias com anel aromático (composto **4**). Tendo em conta os resultados de inibição das COX de composto **4** conclui-se que tem mais afinidade para a COX-2 do que para a COX-1.

Em relação do composto **6**, observamos uma inibição da COX-2 ligeiramente maior comparando com o composto **2** ($55 \pm 4\%$ - composto **6** e $49 \pm 6\%$ - composto **2**). Mesmo assim, o ácido correspondente e as amidas previamente sintetizadas (**Figura 3**) têm atividade superior.

Tendo em consideração que a quantificação da atividade inibitória dos compostos foi realizada por um ensaio em sangue total, pode-se concluir que as três amidas sintetizadas (**2**, **4** e **6**) foram capazes de atravessar a membrana das células sanguíneas com maior facilidade e atingir o seu alvo (COX). Deste modo, as diferenças observadas na atividade só podem ter sido causadas pela capacidade dos compostos em inibir cada uma das isoformas das COX.

Comparando a atividade inibitória da COX-1 dos compostos **2** e **4**, o composto **2** possui uma atividade superior ao composto **4**.

Comparando a atividade inibitória da COX-2 dos compostos **2**, **4** e **6**, é possível verificar que entre os três compostos o composto **4** exibe a maior atividade, seguido pelos compostos **6** e **2**, respetivamente. Poder-se-á assim prever que a presença de um grupo volumoso como a anel aromático (compostos **4** e **6**) confere uma atividade superior, comparando com amida secundária ramificada (composto **2**), provavelmente por permitir o estabelecimento de ligações de hidrogénio adicionais com o centro ativo da COX-2. No entanto, a presença de um grupo de *terc* butilo ligado ao anel aromático (composto **6**) diminui esta atividade.

Os compostos **8** e **10**, revelaram ausência de atividade inibidora da COX-2 nas concentrações testadas. Por serem compostos muito lipofílicos não se conseguiu dissolver mais do $25 \mu M$ e $12,5 \mu M$, respetivamente; nestas concentrações os compostos não foram ativos para a COX-2.

Tabela 2 – Resultados da quantificação da atividade para as amidas de ácido 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxicinâmico sobre as COX.

Composto	COX-1		COX-2	
	% de inibição ¹⁾	IC ₅₀ (μM)	% de inibição ¹⁾	IC ₅₀ (μM)
2	-	42 ± 7	49 ± 6	-
4	16 ± 8	-	-	6,2 ± 2
6	Em análise	-	55 ± 4	-
8	Em análise	-	Não ativo a 25 μM ²⁾	-
10	Em análise	-	Não ativo a 12,5 μM ²⁾	-
Indometacina	91 ± 4	-	-	-
Celecoxib	-	-	71 ± 1	-

- Os valores representam a percentagem de inibição ± desvio padrão para a maior concentração testada (100 μM), exceto para indometacina e celecoxib que foi 1 μM.
- As amidas 8 e 10 não se conseguiu dissolver mais do que a concentração apresentada e, nessas concentrações, não foram ativas para a COX-2.

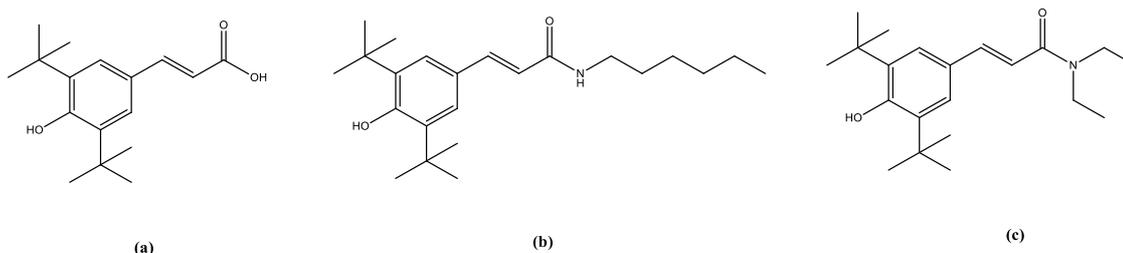


Figura 3 – (a) Ácido 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxicinâmico, (b) Hexilamida do ácido 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxicinâmico, e (c) Dietilamida do ácido 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxicinâmico.

6. Estudo da Atividade Anti-Tumoral dos Compostos Sintetizados Sobre as Linhas Celulares de Cancro de Pulmão *In Vitro*

6.1. Método de Avaliação

Os efeitos citotóxicos dos compostos sintetizados na proliferação de células cancerígenas foram avaliados utilizando o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) em duas linhas celulares diferentes de células cancerosas do pulmão H1299 e A549, em colaboração com o grupo da Professora Filomena Botelho da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (**Tabela 3**).

6.2. Resultados e Discussão

Observando a **Tabela 3** podemos concluir que nenhum dos compostos apresentou uma atividade significativa nas linhas celulares HI299 nas concentrações testadas ($> 75 \mu\text{M}$). O mesmo pode-se concluir para as linhas celulares A549, exceto no caso do composto **2**, que apresentou um valor de IC_{50} de 10,84 (1,8 vezes menor do que o valor de IC_{50} da Cisplatina, e 4,3 vezes menor do que o valor de IC_{50} do Etoposido), mostrando uma atividade antiproliferativa promissora. Comparando os valores de IC_{50} de composto **2** com os citostáticos de referência, deduzimos que o primeiro tem maior atividade citostática nas linhas celulares A549. A diferença entre a atividade de composto **2** nas duas linhas celulares pode ser devido às características diferentes destas linhas, sendo que as células A549 têm mais características epiteliais e expressam mais COX-2 do que as células HI299, enquanto as células HI299 têm mais características mesenquimais e menos expressão de marcador epitelial eficaz.⁵⁹

A **Figura 4** mostra que na linha celular A549 a proliferação celular foi reduzindo à medida que aumentou a concentração utilizada de composto **2**, podendo concluir-se que a atividade antiproliferativa do composto é dose-dependente. Cruzando os resultados obtidos no ensaio *in vitro* em sangue venoso total, para a determinação da inibição da COX-2, com este ensaio, não podemos afirmar que a atividade antiproliferativa demonstrada é totalmente dependente da via da inibição da atividade da COX-2, pois no ensaio *in vitro* em sangue venoso total utilizando uma concentração de $100 \mu\text{M}$ só houve uma inibição de $49 \pm 6\%$ da COX-2 e neste ensaio, utilizando uma concentração de $2 \mu\text{M}$ de composto **2**, a proliferação celular decresceu cerca de 80%. Isto pode ser devido ao efeito citotóxico COX-independente.

Tabela 3 – Resultados da quantificação da atividade citostática, nas linhas celulares A549 e HI299, expressa em IC_{50} das amidas de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico sobre as linhas celulares de cancro de pulmão.

Compostos	A549			HI299	
	IC_{50} (μM)	R2	95% IC ²⁾	IC_{50} (μM)	R2
2	10,84	0,82	[0,93;24,37]	$> 75 \mu\text{M}$	-
4	$> 75 \mu\text{M}$	-	-	$> 75 \mu\text{M}$	-
6	$> 75 \mu\text{M}$	-	-	$> 75 \mu\text{M}$	-
8	$> 75 \mu\text{M}$	-	-	$> 75 \mu\text{M}$	-
10	$> 75 \mu\text{M}$	-	-	$> 75 \mu\text{M}$	-
Cisplatina¹⁾	19,4	-	-	14,5	-
Carboplatina¹⁾	$>500 \mu\text{M}$	-	-	$>500 \mu\text{M}$	-
Etoposido¹⁾	46,5	-	-	229,3	-

1) Os valores de IC_{50} foram obtidos de ensaio Alamar Blue.

2) IC: Intervalo de Confiança.

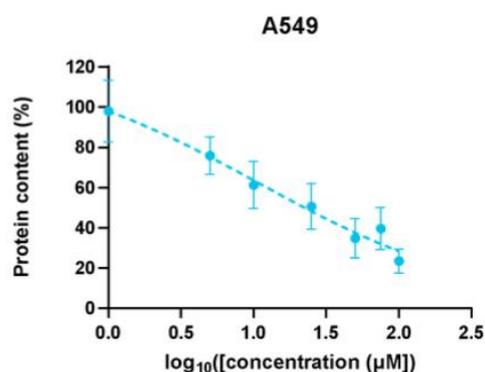


Figura 4 – Efeito do composto 2 sobre a proliferação celular de cancro do pulmão (A549) avaliada como uma medida da atividade metabólica, por ensaio colorimétrico MTT.

7. Conclusão

A fim de explorar melhor as propriedades inibidoras da enzima COX-2 de amidas de ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico, foi desenvolvido o trabalho laboratorial descrito nesta monografia, onde foram sintetizados cinco novos compostos a partir da reação do ácido 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxicinâmico com cinco diferentes aminas, utilizando uma reação simples de uma etapa, monitorizado por TLC.

Os compostos sintetizados mostraram um grau de pureza elevada depois de serem sujeitos a técnicas de purificação convencionais. Estes compostos foram caracterizados pelos espectros de RMN, e os pontos de fusão foram determinados. Os rendimentos das reações estiveram de acordo com os verificados anteriormente para o mesmo tipo de compostos. Em resumo, foi estudado a atividade inibitória, dos compostos, nas COXs. Observamos que todos os compostos tiveram uma atividade menor na inibição da COX-2, comparando com o ácido correspondente, sendo que o composto **4** revelou ser bastante eficaz na inibição da COX-2. O composto **2** demonstrou atividade citostática nas linhas celulares A549, sendo mesmo superior à da cisplatina e do etoposido, dois compostos de referência usados na quimioterapia de cancro de pulmão. Os resultados obtidos não permitiram descartar que os mecanismos COX-independente desempenham um papel significativo na inibição do crescimento das células cancerígenas, o que justifica uma investigação mais aprofundada. O presente trabalho encontra-se numa fase inicial, alguns dos resultados foram divulgados numa comunicação oral no Iberphenol International Conference e no EFMC-ISMC 2022. Mais compostos estão a ser sintetizados e mais dados vão ser reunidos com o objetivo de serem divulgados numa publicação científica. O artigo em preparação encontra-se no **Anexo I**.

8. Bibliografia

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492.
2. Araujo LH, Horn L, Merritt RE, Shilo K, Xu-Welliver M, Carbone DP. **Cancer of the Lung: Non-Small Cell Lung Cancer and Small Cell Lung Cancer.** Sixth Edit. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-323-47674-4.00069-4.
3. Prasetya RA, Metselaar-Albers M, Engels F. **Concomitant use of analgesics and immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: A pharmacodynamics perspective.** *Eur J Pharmacol.* 2021;906:174284. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174284.
4. Liu R, Xu KP, Tan GS. **Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed.** *Eur J Pharmacol.* 2015;769:127-133. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.007.
5. Lee R, Choi YJ, Jeong MS, et al. **Hyaluronic Acid-Decorated Glycol Chitosan Nanoparticles for pH-Sensitive Controlled Release of Doxorubicin and Celecoxib in Nonsmall Cell Lung Cancer.** *Bioconjug Chem.* 2020;31(3):923-932. doi:10.1021/acs.bioconjchem.0c00048.
6. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, et al. **Expert Review Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes.** 2020;25(9). doi:10.1007/s11095-008-9661-9.
7. Zappavigna S, Cossu AM, Grimaldi A, et al. **Anti-inflammatory drugs as anticancer agents.** *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):1-29. doi:10.3390/ijms21072605.
8. Guo Y, Nie Q, MacLean AL, Li Y, Lei J, Li S. **Multiscale modeling of inflammation-induced tumorigenesis reveals competing oncogenic and oncoprotective roles for inflammation.** *Cancer Res.* 2017;77(22):6429-6441. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1662.
9. Pannunzio A, Coluccia M. **Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: A review of oncology and medicinal chemistry literature.** *Pharmaceuticals.* 2018;11(4):1-20. doi:10.3390/ph11040101.
10. Hirata T, Narumiya S. **Prostanoid receptors.** *Chem Rev.* 2011;111(10):6209-6230. doi:10.1021/cr200010h.

11. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. **Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis.** *FEBS Lett.* 1995;372(1):83-87. doi:10.1016/0014-5793(95)00956-a.
12. Jara-Gutiérrez Á, Baladrón V. **The role of prostaglandins in different types of cancer.** *Cells.* 2021;10(6). doi:10.3390/cells10061487.
13. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. **Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.** *Annu Rev Biochem.* 2000;69:145-182. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145.
14. Ricciotti E, FitzGerald GA. **Prostaglandins and inflammation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):986-1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449.
15. Zhang M, Zhou S, Zhang L, Ye W, Wen Q, Wang J. **Role of cancer-related inflammation in esophageal cancer.** *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2013;23(1):27-35. doi:10.1615/critreveukargeneexpr.2013006033.
16. Cathcart M-C, O'Byrne KJ, Reynolds J V, O'Sullivan J, Pidgeon GP. **COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: novel targets for prevention and intervention.** *Biochim Biophys Acta.* 2012;1825(1):49-63. doi:10.1016/j.bbcan.2011.09.004.
17. Li J, Hao Q, Cao W, Vadgama J V., Wu Y. **Celecoxib in breast cancer prevention and therapy.** *Cancer Manag Res.* 2018;10:4653-4667. doi:10.2147/CMAR.S178567.
18. Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM, Murray LJ. **A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer.** *Br J Cancer.* 2011;105(1):13-17. doi:10.1038/bjc.2011.204.
19. Parida S, Mandal M. **Inflammation induced by human papillomavirus in cervical cancer and its implication in prevention.** *Eur J cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ.* 2014;23(5):432-448. doi:10.1097/CEJ.000000000000023.
20. Kaminska K, Szczylik C, Lian F, Czarnecka AM. **The role of prostaglandin E2 in renal cell cancer development: future implications for prognosis and therapy.** *Future Oncol.* 2014;10(14):2177-2187. doi:10.2217/fon.14.152.
21. Shao N, Feng N, Wang Y, Mi Y, Li T, Hua L. **Systematic review and meta-analysis of COX-2 expression and polymorphisms in prostate cancer.** *Mol Biol Rep.*

- 2012;39(12):10997-11004. doi:10.1007/s11033-012-2001-5.
22. Gakis G. **The role of inflammation in bladder cancer.** *Adv Exp Med Biol.* 2014;816:183-196. doi:10.1007/978-3-0348-0837-8_8.
 23. Elmets CA, Ledet JJ, Athar M. **Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention.** *J Invest Dermatol.* 2014;134(10):2497-2502. doi:10.1038/jid.2014.192.
 24. Mendes RA, Carvalho JFC, Waal I van der. **An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck.** *Oral Oncol.* 2009;45(10):e124-8. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.03.016.
 25. Ramon S, Woeller CF, Phipps RP. **The influence of Cox-2 and bioactive lipids on hematological cancers.** *Curr Angiogenes.* 2013;2(2):135-142. doi:10.2174/2211552802999140131105947.
 26. Nuvoli B, Galati R. **Cyclooxygenase-2, epidermal growth factor receptor, and aromatase signaling in inflammation and mesothelioma.** *Mol Cancer Ther.* 2013;12(6):844-852. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1103.
 27. Ramalingam S, Belani CP. **Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer.** *Clin Lung Cancer.* 2004;5(4):245-253. doi:10.3816/CLC.2004.n.006.
 28. Sandler AB, Dubinett SM. **COX-2 inhibition and lung cancer.** *Semin Oncol.* 2004;31(SUPPL. 7):45-52. doi:10.1053/j.seminoncol.2004.03.045.
 29. Xiao Y, Wang J, Qin Y, et al. **Ku80 cooperates with CBP to promote COX-2 expression and tumor growth.** *Oncotarget.* 2015;6(10):8046-8061. doi:10.18632/oncotarget.3508.
 30. Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, et al. **Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas.** *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999;5(5):1001-1005.
 31. Desai SJ, Prickril B, Rasooly A. **Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer.** *Nutr Cancer.* 2018;70(3):350-375. doi:10.1080/01635581.2018.1446091.
 32. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. **Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors.** *BMC Cancer.* 2006;6(1):27. doi:10.1186/1471-2407-6-27.

33. Pu D, Yin L, Huang L, et al. **Cyclooxygenase-2 Inhibitor: A Potential Combination Strategy With Immunotherapy in Cancer.** *Front Oncol.* 2021;11(February):1-7. doi:10.3389/fonc.2021.637504.
34. Saxena P, Sharma PK, Purohit P. **A journey of celecoxib from pain to cancer.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2020;147:106379. doi:10.1016/j.prostaglandins.2019.106379.
35. Simmons DL, Botting RM, Hla T. **Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.** *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387-437. doi:10.1124/pr.56.3.3.
36. Maroon JC, Bost JW, Borden MK, Lorenz KM, Ross NA. **Natural antiinflammatory agents for pain relief in athletes.** *Neurosurg Focus.* 2006;21(4):E11. doi:10.3171/foc.2006.21.4.12.
37. Walker C. Are All Oral COX-2 Selective Inhibitors the Same? A Consideration of Celecoxib, Etoricoxib, and Diclofenac. *Int J Rheumatol.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/1302835.
38. Maroon JC, Bost JW, Maroon A. **Natural anti-inflammatory agents for pain relief.** *Surg Neurol Int.* 2010;1:80. doi:10.4103/2152-7806.73804.
39. Ehrich EW, Dallob A, De Lepeleire I, et al. **Characterization of rofecoxib as a cyclooxygenase-2 isoform inhibitor and demonstration of analgesia in the dental pain model.** *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65(3):336-347. doi:10.1016/S0009-9236(99)70113-X.
40. de Groot DJA, de Vries EGE, Groen HJM, de Jong S. **Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic.** *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;61(1):52-69. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.07.001.
41. Smalley WE, DuBois RN. **Colorectal Cancer and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs.** In: August JT, Anders MW, Murad F, Coyle J, eds. Vol 39. *Advances in Pharmacology.* Academic Press; 1997:1-20. doi:https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60067-8.
42. Mishan MA, Khazeei Tabari MA, Zargari M, Bagheri A. **MicroRNAs in the anticancer effects of celecoxib: A systematic review.** *Eur J Pharmacol.* 2020;882:173325. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173325.
43. Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. **Cyclooxygenase-2 (COX-2)-**

- Independent Anticarcinogenic Effects of Selective COX-2 Inhibitors.** *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2006;98(11):736-747. doi:10.1093/jnci/djj206.
44. Yi L, Zhang W, Zhang H, et al. **Systematic review and meta-analysis of the benefit of celecoxib in treating advanced non-small-cell lung cancer.** *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:2455-2466. doi:10.2147/DDDT.S169627.
 45. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. **Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors.** *Cancer Res.* 2000;60(5):1306-1311.
 46. De Ruysscher D, Bussink J, Rodrigus P, et al. **Concurrent celecoxib versus placebo in patients with stage II-III non-small cell lung cancer: a randomised phase II trial.** *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2007;84(1):23-25. doi:10.1016/j.radonc.2007.05.008.
 47. Shi L, Xu L, Wu C, et al. **Celecoxib-Induced Self-Assembly of Smart Albumin-Doxorubicin Conjugate for Enhanced Cancer Therapy.** *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(10):8555-8565. doi:10.1021/acsami.8b00875.
 48. Sun J, Liu N-B, Zhuang H-Q, Zhao L-J, Yuan Z-Y, Wang P. **Celecoxib-erlotinib combination treatment enhances radiosensitivity in A549 human lung cancer cell.** *Cancer Biomark.* 2017;19(1):45-50. doi:10.3233/CBM-160323.
 49. Li N, Li H, Su F, Li J, Ma X, Gong P. **Relationship between epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and serum cyclooxygenase-2 Level, and the synergistic effect of celecoxib and gefitinib on EGFR expression in non-small cell lung cancer cells.** *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):9010-9020.
 50. Yu-Qiong Xu, Xiang Long, Ming Han, Ming-Qiang Huang, Jia-Fa Lu, Xue-Dong Sun WH, ORCID. **Clinical cases. Clin benefit COX-2 Inhib Adjuv Chemother Adv non-small cell lung cancer A Syst Rev meta- Anal.** 2021;8960(3):516-518. doi:10.3280/PU2021-003009.
 51. Chandra S, Roy A, Jana M, Pahan K. **Cinnamic acid activates PPAR α to stimulate Lysosomal biogenesis and lower Amyloid plaque pathology in an Alzheimer's disease mouse model.** *Neurobiol Dis.* 2019;124:379-395. doi:10.1016/j.nbd.2018.12.007.
 52. Ruwizhi N, Aderibigbe BA. **Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy.** *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):1-36. doi:10.3390/ijms21165712.
 53. Abd El-Raouf OM, El-Sayed E-SM, Manie MF. **Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde**

- Ameliorate Cisplatin-Induced Splenotoxicity in Rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2015;29(9):426-431. doi:10.1002/jbt.21715.**
54. Guo S, Zhen Y, Zhu Z, Zhou G, Zheng X. **Cinnamic acid rescues behavioral deficits in a mouse model of traumatic brain injury by targeting miR-455-3p/HDAC2. *Life Sci.* 2019;235:116819. doi:10.1016/j.lfs.2019.116819.**
55. Ge Y-X, Wang Y-H, Zhang J, et al. **New cinnamic acid-pregnenolone hybrids as potential antiproliferative agents: Design, synthesis and biological evaluation. *Steroids.* 2019;152:108499. doi:10.1016/j.steroids.2019.108499.**
56. Ribeiro D, Poença C, Varela C, et al. **New phenolic cinnamic acid derivatives as selective COX-2 inhibitors. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationships. *Bioorg Chem.* 2019;91(August):103179. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103179.**
57. Blain H, Boileau C, Lapicque F, et al. **Limitation of the in vitro whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;53(3):255-265. doi:10.1046/j.0306-5251.2001.01533.x.**
58. Knights KM, Mangoni AA, Miners JO. **Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: Implications for understanding toxicity. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2010; 3(6):769-776. doi:10.1586/ecp.10.120.**
59. Huang H, Chetyrkina M, Wong C, et al. **Identification of potential descriptors of water-soluble fullerene derivatives responsible for antitumor effects on lung cancer cells via QSAR analysis. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021. doi:10.1016/j.csbj.2021.01.012.**

Anexo I

Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors as Potential Agents in The Prevention and Treatment of Lung Cancer: Design, Synthesis and Biological evaluation

Mariana Lucas (1), Daniela Ribeiro (1,2), Dania Shriki (3), João Janela (3), Carla Varela (4,5,6), Ana R. Gomes (7,8), Ana M. Abrantes (4,5,8), Maria F. Botelho (4,5,8), Ana S. Pires (4,5,8), Elisiário Tavares-da-Silva (7), Eduarda Fernandes (1), Fernanda Roleira (7)

1) LAQV, REQUIMTE, Laboratory of Applied Chemistry, Department of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, Portugal

2) Faculty of Agrarian Sciences and Environment, University of the Azores, 9700-042 Angra do Heroísmo, Açores, Portugal

3) Univ Coimbra, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Azinhaga de Santa Comba, Pólo III - Pólo das Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra, Portugal

4) Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), Praceta Professor Mota Pinto, 3004-561 Coimbra, Portugal

5) Univ Coimbra, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), Coimbra, Portugal

6) Univ Coimbra, CIEPQPF, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine, Azinhaga de Santa Comba, Pólo III - Pólo das Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra, Portugal

7) Univ Coimbra, CIEPQPF, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Azinhaga de Santa Comba, Pólo III - Pólo das Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra, Portugal

8) Univ Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, Azinhaga de Santa Comba, Pólo III - Pólo das Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra, Portugal

Abstract

Cyclooxygenase (COX) is an enzyme responsible for converting arachidonic acid into prostaglandins (PGs). Prostaglandin E2 makes nociceptors more sensitive to stimuli and it is a key mediator of pain in osteoarthritic joints. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an isoform of COX, it is referred to as an 'inducible isoform', which is believed to be undetectable in most normal tissues, but can be up-regulated during various conditions, many of them pathological. In the recent years, many studies demonstrate that COX-2 can be overexpressed in many different types of human cancers, including lung cancer. It appears that increased levels of COX-2 can control many cellular processes. Due to COX-2's role in carcinogenesis, apoptosis, and angiogenesis, it might be an excellent target for the prevention and/or treatment of human cancers.

The development of COX-2 selective inhibitors has been successfully documented; these compounds has shown less toxicity to the gastrointestinal tract compared to conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Nevertheless, the long-term use of COX-2 selective inhibitors has shown cardiovascular toxicity, whereby their effectiveness in treating and preventing cancer is currently debatable, suggesting that more research into novel COX-2 selective drugs is required.

The present monograph is based on the recent discovery of selective inhibitory activity of cinnamic acid amides on the COX-2 enzyme, and from the established structure-activity

relationships (SAR), it was possible to conclude that the 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl aromatic structural feature is strongly related to selective COX-2 inhibition. Using this information as a basis, five amides derivative of this cinnamic acid were synthesized with a substitution pattern of 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl. Then, their ability to inhibit COX-1 and COX-2 in human blood and their cytostatic activity in lung cancer cell lines were evaluated.

Keywords:

Cyclooxygenases, Cyclooxygenase Inhibitors, Cinnamic Acid Derivatives, Nonsteroidal Anti-inflammatories, Lung Cancer.

Abbreviations

COX – Cyclooxygenase
COX-1 – Cyclooxygenase-1
COX-2 – Cyclooxygenase-2
COX-3 – Cyclooxygenase-3
C2SI – COX-2 selective inhibitors
DMF – Dimethylformamide
GI – Gastrointestinal
J – Coupling Constant
IL-6 – Interleukin-6
IL-10 – Interleukin-10
IL-12 – Interleukin-12
MMP-2 – Metalloproteinase-2
MMP-9 – Cyclooxygenase-9
MP – Melting Point
NK – Natural Killer
NSAIDs – Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
NSCLC – Non-Small Cell Lung Cancer
NF- κ B – Nuclear Factor κ B
PGE₂ – Prostaglandin E₂
PGI₂ – Prostacyclin
PGs – Prostaglandins
PPB – Plasma Protein Binding
ppm – Parts Per Million
PyBOP – (Benzotriazol-1-yloxy) tri(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
ROS – Reactive Oxygen Species
SCLC – Small Cell Lung Cancer
SAR – Structure-Activity Relationship
TEA – Triethylamine
TLC – Thin Layer Chromatography
TXA₂ – Thromboxane A₂
TXBSI – Thromboxane Synthase Inhibitor
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

I. Introduction

Lung cancer is one of the mostly diagnosed cancers worldwide. It is the leading cause of cancer mortality in men and the second-leading cause of cancer mortality in women (behind breast cancer).¹ There are two main types of lung cancer: small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). A third less common type of lung cancer is called carcinoid. NSCLC is the most common subtype, accounting for ~ 80% - 85% of all lung cancer cases.² More than 50% of recent diagnosed NSCLC patients have advanced stage (IIIB or IV) disease and have, thus, lost the opportunity for early surgical intervention.³ Treatment options for NSCLC vary, including surgery, radiotherapy, platinum-based chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy, depending on cancer stages, histologic classification, and genetic alteration.³ Chemotherapy is the most recommended therapeutic approach in all stages of the disease, however, despite the great advances in chemotherapy, advanced lung cancer remains incurable.⁴ Hence, a novel strategy is needed to overcome the limitation of current treatments and improve the clinical benefit of advanced NSCLC.

Accumulating evidence has established a relationship between cancer and inflammation and has shown that inflammation in the tumor microenvironment promotes the growth of tumors. Epidemiological studies revealed that tumor biopsies frequently contain inflammatory cells, and tumors frequently develop at chronic inflammation sites. Furthermore, as seen in chronic inflammatory responses, tumor tissues exhibit the presence of inflammatory mediators, angiogenesis, and changes in tissue homeostasis.⁵ One of the targets currently being evaluated for inhibiting lung cancer-related inflammation is cyclooxygenase (COX) class of enzymes, more particularly cyclooxygenase-2 (COX-2).

2. Mechanisms and Biology of COX-2 in Cancer

COX is an enzyme that converts arachidonic acid into prostanoids, such as prostaglandins (PGs), prostacyclin (PGI₂), and thromboxane A₂ (TXA₂).⁶ Cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) are the two primary isoforms of the COX enzyme; a third isoform, cyclooxygenase-3 (COX-3) was recently discovered.⁷ COX-1 and COX-2 display many similarities in structure and catalytic properties, also, they share 60% of their amino acid sequence, even though, they are encoded by distinct chromosomes (chromosomes 9 and 1, respectively).⁸ Thus, the two isoform have distinct biological functions due to differences in their regulation of expression, tissue distribution, and associated synthases.⁹

In most tissue, COX-1 is constitutively expressed (e.g., platelets, lung, prostate, brain, GI tract, kidney, liver, and spleen). In general, COX-1-derived prostanoids play an important role in

maintaining homeostasis. Unlike COX-1, COX-2 is, generally, an inducible isoform, except in the brain, kidney, and bone where it is expressed constitutively. It is responsible for increased prostanoids synthesis and growth factors in response to inflammatory stimuli during inflammation and various pathological conditions, including cancer.^{9, 10, 11}

Under normal physiological conditions, COX-2 has low expression level, however, this is not the case for many types of cancer, where it can be up-regulated, this can be due to the capacity of variety of growth factors and oncogenes, such as nuclear factor kB (NF-kB), interleukin 6 (IL-6), to bind to the promoter regions of COX-2 and stimulate its transcription, furthermore, mutation of p53 can also stimulate COX-2 expression. The overexpression of this enzyme showed to be associated with more aggressive tumor behavior, and a worse prognosis.²⁹ Regarding lung cancer, it is known that COX-2 up-regulation has been reported in about 70% of NSCLC adenocarcinomas.¹³

COX-2 overexpression is associated with several events that may contribute to the severity of carcinogenesis, including: 1) Increasing angiogenesis, as a result of increasing the expression of pro-angiogenic mediators, such as, vascular endothelial growth factor (VEGF), PGs that induce neovascularization, and anti-apoptotic genes (bcl-2 and Akt) that promote neovascularization and tumor proliferation. 2) decreasing apoptosis and increasing cell proliferation by lowering bioavailable arachidonic acid levels and elevating PG levels, which lead to increase transcriptional activity of anti-apoptotic mediator NF-kB. 3) Immunosuppression by negatively influencing the activity of T/B lymphocytes, Natural Killer T (NK) cells, and dendritic cells, reducing the activity of immunostimulatory interleukin 12 (IL-12), and increasing the activity of immunosuppressive interleukin 10 (IL-10). 4) Increasing cell invasion by increasing transcriptional activity of metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) which increases tumor invasion and adhesion to extracellular matrix. 5) increasing in the reactive oxygen species (ROS) production and converting of pre-carcinogens to carcinogens.^{14, 15}

Given the importance of COX-2, and PGs products, particularly PGE₂, in the cancer-related inflammatory process,^{9,10} COX-2 has been attractive targets for therapeutic and chemoprotective treatments in many neoplastic diseases.

3. COX-2 Inhibitor Drugs

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a heterogeneous group of chemically unrelated compounds with similar therapeutic effects, they are commonly used to manage the pain and inflammation associated with some types of arthritis (such as rheumatoid arthritis) and other musculoskeletal disorders.¹⁶ NSAIDs provide symptomatic relief by inhibiting cyclooxygenase isoenzymes (COX-1 and COX-2), with a subsequent reduction in the

prostaglandin mediators of pain. NSAIDs first generation were nonselective COX inhibitors, such as aspirin, which demonstrate similar affinity for COX-1 and COX-2 by irreversibly blocking the target enzyme. Other nonselective NSAIDs act as competitive COX inhibitors, reversibly blocking it, such as, diclofenac, indomethacin, ketoprofen, naproxen and ibuprofen.¹⁷ NSAIDs with no selectivity towards COX-2 exhibit many side effects, especially on the GI level. Because of this, there is an intense search for COX-2 selective inhibitors (C2SI). However, while the incidence of GI side effects has been reduced by C2SI drugs, they have now been associated with cardiovascular complications such as heart attack, thrombosis, and stroke.¹⁸

Celecoxib, is the first selective COX-2 inhibitor, it was approved by the FDA in 1998, and is now the only C2SI available in the United States and one of only a few available in Europe.¹⁹ Rofecoxib and Valdecoxib are C2SI; nevertheless, both medications were withdrawn globally, when studies revealed that their use doubled the risk of major thromboembolic events, including myocardial infarction.^{20,21} There are no safe C2SIs available for use as an appropriate therapeutic with minimal GI and cardiovascular effects. As a result, there is an unfulfilled need to find drugs that are more selective for COX-2, while avoiding detrimental side effects in the treatment of chronic inflammatory illnesses, such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Furthermore, targeted COX-2 inhibition has proven potent anti-tumoral or chemopreventive effects *in vitro*, *in vivo* and in patients. Although the molecular mechanism of tumorigenesis inhibition by NSAIDs, particularly C2SI, has not been fully delineated, studies suggest that they may act on multiple targets of tumor progression involving a combination of COX-2-dependent and COX-independent pathways.^{15,22} According to epidemiological data, individuals with colorectal and lung cancer who used NSAIDs had a lower incidence and mortality rate than those who did not, making them promising candidates for cancer therapy and prevention²³

4. Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Phenolic Cinnamic Acid Amides as Selective COX-2 Inhibitors

Based on the recent discovery of (Ribeiro *et al.*, 2019)²⁴, some cinnamic acid amides are potent selective COX-2 inhibitors. From the established structure-activity relationships (SAR), it was possible to conclude that the 4-hydroxy-3,5-di-tert-butyl aromatic structural feature is strongly related to selective COX-2 inhibition. This work focuses on the design, synthesis, and evaluation a set of new phenolic cinnamic acid amides with the 4-hydroxy-3,5-di-tert-butyl aromatic substitution pattern (**Figure 1**) as COX-1 and COX-2 inhibitors in human blood. Since several studies have reported that various hydroxycinnamic acids may have anti-tumor

activity against a wide range of cancers such as breast, colon, lung, and others,²⁵ the anti-cytostatic activity of the prepared compounds was investigated in lung cancer cell lines. The synthesis of the amides **2**, **4**, **6**, **8**, and **10** (**Figure 2**) was performed using a single-step reaction starting from, 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid and the respective amine **1**, **3**, **5**, **7**, and **9** in dimethylformamide (DMF) and triethylamine (TEA), in the presence of the coupling agent (Benzotriazol-1-yloxy)tri(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) in dichloromethane (CH₂Cl₂), at room temperature. This procedure revealed to be adequate to afford the direct amidation of the acid, producing the desired amides in appropriate yields (28.90–70.37%) (**Table I**). Then, the synthesized amides were tested for their capacity to inhibit PGs production via COX-1 and COX-2 enzymes (**Table 2**), and the resulting activities were correlated with the structure of the compounds. We also have proceeded to test the referred compound in cancer cell lines by evaluating its cytotoxic effects in two different types of lung cancer cell lines (**Table 3, Figure 4**) to give us some insight on the synthesized amides antitumor activity.

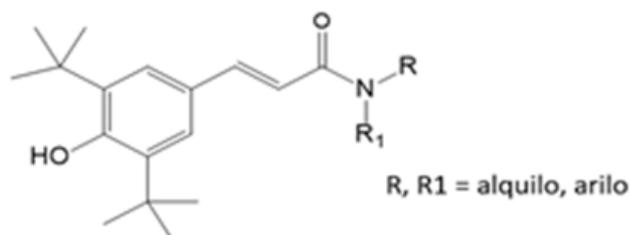


Figure I – General structure of the synthesized compounds.

Table I – Reaction time (h) and yield (%) for the synthesised compounds.

Compondes	Reaction time (h)	Yield (%)
2	6	28.90
4	3 h 30 min	43.11
6	7 h 15 min	63.04
8	7 h e 30 min	70.37
10	5 h e 30 min	43.50

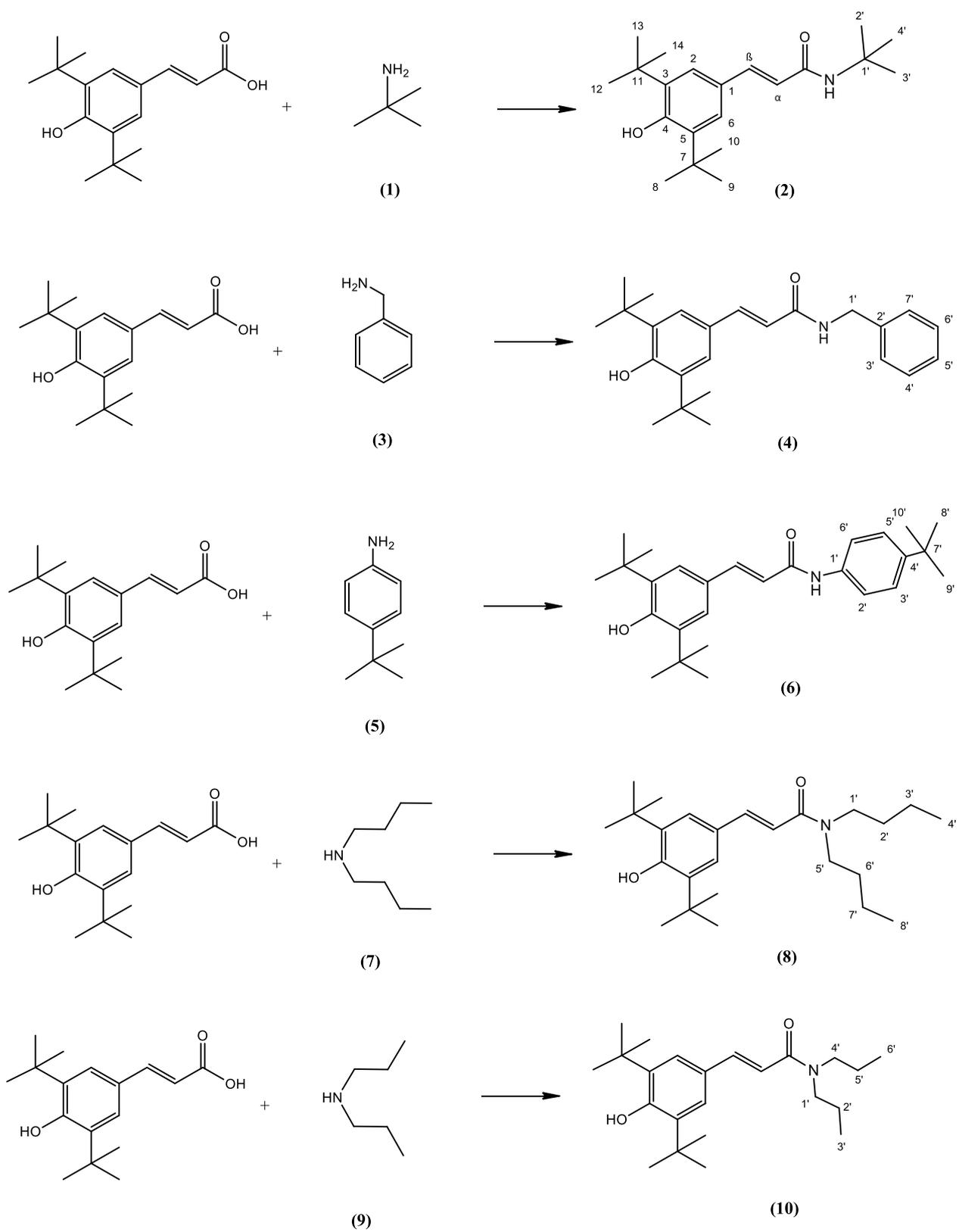


Figure 2 – Synthesis of the prepared cinnamic acid amides.

4.1. Material and Methods

Reactions were controlled by thin layer chromatography (TLC) using silica gel 60 HF254 plates. Column chromatography was performed using silica gel 60 (0.063–0.200 mm). Melting points (Mps) were measured in a Büchi Melting Point (MP) B-540 apparatus. Values for MP weren't corrected. The ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively, on a Varian Unity 400, using Dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) as solvent for compounds **2**, **4** and **6**. While, deuterated chloroform (CDCl_3) was used as a solvent for compounds **8** and **10**. Peaks positions are given in parts per million (ppm) using the residual non-deuterated solvent as the internal standard. Data are reported as follows: chemical shift (ppm), integrated intensity, multiplicity (indicated as: s, singlet; d, doublet; t, triplet; dt, double triplet; q, quartet, and m, multiplet), coupling constants (J) values in Hertz (Hz) and corresponding nucleus.

4.2. General Procedure to Obtain the Cinnamic Acid Amides **2**, **4**, **6**, **8**, and **10**:

3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid was dissolved in DMF and TEA. The solution was then cooled in an ice-water bath and different amines **1**, **3**, **5**, **7**, and **9** were added, followed by a solution of PyBOP in dichloromethane. The mixture was stirred at 0°C for 30 min and then at room temperature for specific periods of time.

Subsequently, in the preparation of compounds **2**, **4**, and **6**, Dichloromethane was removed under reduced pressure and the remaining solution was diluted with distilled water (100 mL). The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2x 100 mL) and the organic phases were washed with 1 N HCl (2x 100 mL), water (2x 100 mL), NaHCO_3 5% (3x 100 mL) and water (2x 100 mL), dried over anhydrous NaSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The obtained residues were purified by silica gel column chromatography or crystallisation yielding the corresponding amides **2**, **4**, and **6**. On the other hand, in the preparation of compounds **8** and **10** the products of the reaction were left in the refrigerator for a period of time and then were vacuum filtered. The residue obtained was purified by crystallisation, resulting in amides **8** and **10**.

4.2.1. *N-Tert-Butyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (2)*

3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid (500.4 mg, 1.81 mmol); DMF (20 mL); TEA (0.25mL); *tert*-butylamine (0.19 mL, 1.81 mmol) PyBOP (0.9419 g, 1.81 mmol); CH_2Cl_2 (4.2 mL); reaction time: 6h; silica gel column chromatography (petroleum ether / ethyl

acetate:90/10). 28.9% yield. Mp 182.1–194.8 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.31 (9H, s, 3(CH₃) (N-*tert*butyl)), 1.39 (18H, s, 3(CH₃) (C-*tert*butyl)), 6.50 (1H, d, *J* = 15.6, CH(α))* , 7.25 (1H, d, *J* = 15.6, CH(β))* , 7.27 (3H, s, CH (C-2 and C-6) and OH), 7.57 (1H, s, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 28.6 (C-2', C-3', C-4'), 30.2 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 and C-14), 34.5 (C-7 and C-11), 50.0 (C-1'), 120.4 (C-α), 124.1 (C-2 and C-6), 126.5 (C-1), 138.7 (C-3 and C-5), 139.1 (C-β), 155.3 (C-OH), 164.8 (C-O).

4.2.2. N-Benzyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (4)

3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid (500.2 mg, 1.81 mmol); DMF (20 mL); TEA (0.25 mL); benzylamine (0.197 mL, 1.81 mmol); PyBOP (0.9419 g, 1.81 mmol); CH₂Cl₂ (4.2 mL); reaction time: 3h and 30min; crystallization from methanol/water; 43.11% yield. Mp 166.6–167.6 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.40 (18H, s, 3(CH₃) (C-*tert*butyl)); (4.38 (2H, d, *J* = 5.87, CH₂ (C-1')), 6.50 (1H, d, *J* = 15.6, CH(α))* , 7.28 (7H, m, CH (aromatic rings), 7.38 (1H, d, *J* = 15.6, CH(β))* , 8.44 (1H, t, *J* = 5.9, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 30.2 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 and C-14), 34.5 (C-7 and C-11), 42.3 (C-1'), 118.7 (C-α), 124.3 (C-2 and C-6), 126.2 (C-2'), 126.8 (C-5'), 127.4 (C4'-C6'), 128.3 (C-3', C-7'), 139.2 (C-3 and C-5), 139.5 (C-1), 139.9 (C-β), 155.6 (C-OH), 165.4 (C-O).

4.2.3. N-(4-(Tert-Butylphenyl)-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (6)

3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid (500.4 mg, 1.81 mmol); DMF (20 mL); TEA (0.25 mL); 4-*tert*-butyl aniline (0.288 mL, 1.81 mmol); PyBOP (0.9419 g, 1.81 mmol); CH₂Cl₂ (4.2 mL); reaction time: 7h and 15min; crystallization from methanol/water; 63.04% yield. Mp 233.6–235.5 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.27 (9H, s, 3(CH₃) (C-*tert*butyl)), 1.41 (18H, s, 3(CH₃) (C-*tert*butyl)), 6.66 (1H, d, *J* = 15.6, CH(α))* , 7.33 (2H, d, *J* = 8.6, CH (C-3' and C-5')), 7.38 (2H, s, CH (C-2 and C-6)), 7.49 (1H, d, *J* = 15.6, CH(β))* , 7.60 (2H, d, *J* = 8.6, CH (C-2' and C-6')), 9.99 (1H, s, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 30.2 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 and C-14), 31.2 (C-8' to C-10'), 34.0 (C-7'), 34.5 (C-7 and C-11), 118.8 (C-α), 118.9 (C-3' and C-5'), 124.5 (C-2 and C-6), 125.4 (C-2' and C-6'), 126.0 (C-1), 136.9 (C-3 and C-5), 139.2 (C-4'), 141.1 (C-β), 145.3 (C-1'), 155.6 (C-OH'), 163.8 (C-O).

4.2.4. N,N-Dibutyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (8)

3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid (500.1 mg, 1.81 mmol); DMF (20 mL); TEA (0.25 mL); dibutylamine (0.304 mL, 1.81 mmol); PyBOP (0.9419 g, 1.81 mmol); CH₂Cl₂ (4.2

mL); reaction time: 7h and 30min; crystallization from methanol/water; 70.37% yield. Mp 195.2–197.6°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.96 (6H, dt, *J* = 7.5, 2(CH₃) (C-4' and C-8')), 1.38 (4H, m, 2(CH₂) (C-3' and C-7')), 1.45 (18H, s, 3(CH₃) (C-*tert*butyl)), 1.61 (4H, m, 2(CH₂) (C-2' and C-6')), 3.41 (4H, dt, *J* = 7.5, 2(CH₂) (C-1' and C-5')), 5.43 (OH), 6.67 (1H, d, *J* = 15.3, CH(α))* , 7.35 (2H, s, CH (C-2 and C-6)), 7.56 (1H, d, *J* = 15.3, CH(β))* . ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 13.9 and 14.1 (C-4' and C-8'), 20.2 and 20.5 (C-3' and C-7'), 30.3 (C-8, C-9, C-10, C-12, C-13 e C-14) , 32.1 (C-2' and C-6'), 34.5 (C-7 and C-11), 46.81 and 48.04 (C-1' and C-5'), 114.9 (C-α), 125.1 (C-2 and C-6) , 127.1 (C-1), 136.4 (C-3 and C-5), 143.3 (C-β), 166.6 (C-O), 155.5 (C-OH).

4.2.5. N,N-Dipropyl-3-(3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxyphenyl) Acrylamide (10)

3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid (500.8mg, 1.81 mmol); DMF (20 mL); TEA (0.25mL); dipropylamine (0.248 mL, 1.81 mmol); PyBOP (0.9419 g, 1.81 mmol); CH₂Cl₂ (4.2 mL); reaction time: 5h and 30min; crystallization from methanol/water; 43.5% yield. Mp 202–203.2°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.94 (6H, m, 2(CH₃) (C-3' and C-6')), 1.45 (18H, s, 3(CH₃) (C-*tert*butyl)), 1.64 (4H, m, (CH₂)₂ (C-2' and C-5')), 3.38 (4H, m, (CH₂)₂ (C-1' and C-4')), 5.43 (OH), 6.66 (1H, d, *J* = 15.3, CH(α))* , 7.34 (2H, s, CH (C-2 and C-6)), 7.65 (1H, d, *J* = 15.3, CH(β))* . ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 11.6 (C-3' and C-6'), 21.4 (C-5'), 23.3 (C-2'), 30.3 (C-8 to 10 and C-12 to 14), 34.5 (C-7 and C-11), 48.7 (C-4'), 50.1 (C-1'), 114.8 (C-α), 125.1 (C-2 and C-6), 127.1 (C-1), 136.4 (C-3 and C-5), 143.3 (C-β), 155.5 (C-OH), 166.8 (C-O).

5. Inhibitory activity evaluation of the synthesised compounds against Cyclooxygenases

5.1. Method Summary

A human whole blood assay was carried out in order to assess the ability of the new synthesized (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-propenamides to inhibit PGE₂ production - via COX-1 and -2 as previously reported.^{26, 27} For this assay a healthy human volunteers' venous blood was collected by antecubital venipuncture into heparin-Li⁺ vacuum tubes after they gave their informed consent.

*These signals are interchangeable.

To evaluate COX-1 inhibition, the collected blood was placed into microtubes and incubated in a water bath at 37°C with TXBSI (thromboxane synthase inhibitor) and the tested compounds, for 15 min. After that, calcium ionophore was added, triggering the activity of COX-1 enzyme, and the mixture was incubated for an additional 15 min. To stop the reaction, the samples were then kept on ice for 5 min. Then, the samples were centrifuged for 20 min at 4°C to separate the blood cells from the supernatant. The supernatant was then collected and stored at -20°C until use.

Regarding COX-2 assay, after collecting the whole blood samples, they were placed in a six-well plate and incubated in a humidified incubator at 37°C for 15 min with TXBSI (1 µM), acetylsalicylic acid (10 µg/mL) and the synthesized compounds. Subsequently, to induce COX-2 expression Lipopolysaccharide (LPS) was added, incubating the mixture for 5 hours. After this period, DPBS-gentamicin buffer (1 mL) was added to the samples and they were then placed on ice for 10 min, stopping the reaction. As in the COX-1 assay, the samples were centrifuged for 15 min at 4 °C. The supernatant was then collected and stored at -20°C until use. In both assays the amount of solvent used had no inhibitory effects and had no effect on cell viability. Following the manufacturer's instructions COX inhibitors, indomethacin (1 µM) and celecoxib (1 µM), were used as positive controls to indicate COX-1 and -2 activities. Results of the assay are expressed as the percent inhibition of control PGE₂ production. Each study corresponds to at least three independent experiments.

Several concentrations of the compounds were tested in order to determine the IC₅₀ (µM) or the percentage of inhibition of each compound (**Table 2**). These tests were performed in collaboration with the group of Professor Eduarda Fernandes from the Faculty of Pharmacy, University of Porto. From the whole study, new structure activity relationships were established.

5.2. Results and Discussion

Looking at **Table 2**, it can be observed that compound **2** showed a moderate ability to inhibit COX-2 enzyme, with a percentage of inhibition of 49 ± 6 at tested concentration (100 µM). Compared to Celecoxib (control), compound **2** has a lower capacity to inhibit COX-2. Regarding the inhibition of COX-1 enzyme, compound **2** obtained IC₅₀ value of 42 ± 7 µM, it can be concluded that compound **2** has a higher affinity for COX-1 than for COX-2. Unlike the amides of 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)acrylic acid previously synthesized, compound **2** had a lower COX-2 inhibitory activity than the corresponding acid, i.e., 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)acrylic acid (**Figure 3 (a)**), which showed a percentage

inhibition of $93 \pm 7\%$ when using the same concentration.²⁴ However, compound **2** showed greater activity in COX-I inhibition, as the acid showed an IC_{50} value higher than $100 \mu\text{M}$. The amides of the same acid previously synthesized which are N-hexyl-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-propenamide (**Figure 3 (b)**), and N,N-diethyl-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-propenamide (**Figure 3 (c)**) were shown to have a higher inhibitory activity against both COX-I and COX-2.²⁴ Comparing the structures of the three amides, and knowing the only structural differences between these compounds lie in the amide groups, it can be deduced that the tertiary amide (**Figure 3 (c)**) has higher COX inhibitory activity compared to the secondary amides, we also deduce that the linear secondary amide (**Figure 3 (b)**) has higher COX-2 inhibition activity than the branched secondary amide (compound **2**).

Concerning compound **4**, it showed a very low COX-I inhibitory activity ($16 \pm 8\%$). Nevertheless, it showed significant activity in COX-2 inhibition ($IC_{50} = 6.2 \pm 2\mu\text{M}$), however, it was lower than the corresponding acid ($IC_{50} = 3.0 \pm 0.3\mu\text{M}$). Compound **4** also showed lower activity than the amid (**b**) in **Figure 3** ($IC_{50} = 2.4 \pm 0.6$),²⁴ from which it can be deduced that the aromatic ring in the amide did not increase its activity to inhibit COX-2 enzyme. By comparing the activity of compound **4** with the amid (**c**) in **Figure 3** ($IC_{50} = 1.09 \pm 0.09$),²⁴ it can be concluded that secondary amides without an aromatic ring have higher activity than secondary amides with the ring (compound **4**). The results of compound **4**'s COX inhibition led to the conclusion that it has a stronger affinity for COX-2 than COX-I.

Regarding compound **6**, it is evident that it is even more effective at inhibiting COX-2 than compound **2** ($55 \pm 4\%$ - compound **6**, and $49 \pm 6\%$ - compound **2**). Even so, the corresponding acid and the previously synthesized amides (**Figure 3**) have higher activity. Taking into consideration that the quantification of the inhibitory activity of the compounds was performed by an assay in whole blood, it can be concluded that the three synthesized amides (**2**, **4**, and **6**) were able to cross the blood cell membrane easily and reach their target (COX). Thus, the observed differences in activity can only have been caused by the ability of the compounds to inhibit each of the COX isoforms.

Comparing COX-I inhibition of compounds **2** and **4**, compound **2** has a higher activity than compound **4**.

When compounds **2**, **4** and **6** are compared for COX-2 inhibition, it is clear that compound **4** has the highest activity, followed by compounds **6** and **2**, respectively. Thus, it would stand to reason that the presence of a bulky group, such as an aromatic ring (compounds **4** and **6**), would confer a higher activity compared to a secondary branched amide (compound **2**), likely because it would permit the formation of more hydrogen bonds with the active center of

COX-2. However, the presence of a *tert*-butyl group attached to the aromatic ring (compound **6**) decreases this activity.

Regarding compounds **8** and **10**, both of them showed no COX-2 inhibitory activity at tested concentrations. Giving their high lipophilicity it was only possible to dissolve not more than 25 μM and 12.5 μM , respectively, and at these concentrations the compounds were not active for COX-2.

Table 2 – Inhibition (%) of PGE₂ production, via COX-1 and COX-2, IC₅₀, for the studied compounds.

Compound	COX-1		COX-2	
	Inhibition (%) ¹⁾	IC ₅₀ (μM)	Inhibition (%) ¹⁾	IC ₅₀ (μM)
2	-	42 \pm 7	49 \pm 6	-
4	16 \pm 8	-	-	6.2 \pm 2
6	Em análise	-	55 \pm 4	-
8	Em análise	-	Não ativo a 25 μM ²⁾	-
10	Em análise	-	Não ativo a 12.5 μM ²⁾	-
Indomethacin	91 \pm 4	-	-	-
Celecoxib	-	-	71 \pm 1	-

- 1) The values represent the percentage of inhibition \pm standard error of the mean for the highest tested concentration (100 μM), except for indomethacin and celecoxib which was 1 μM .
- 2) Compounds **8** and **10** could not be dissolved more than the concentration shown and at these concentrations were not active for COX-2.

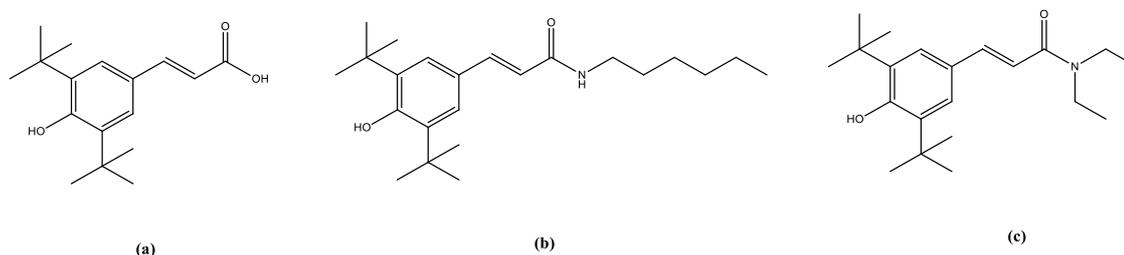


Figure 3 – (a) 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid (b) N-Hexyl-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) -2-propenamide, (c) N-Hexyl-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) -2-propenamide

6. Antitumor Activity of The Synthesised Compounds in LUNG CANCER Cell Lines

6.1. Method Summary

The cytotoxic effects of the synthesized compounds on lung cancer cells proliferation were evaluated using the colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2) 2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. This assay was performed on two different lung cancer cell lines H1299 and A549. It is a colorimetric assay based on the reduction of MTT by the effect of cellular metabolic activity forming blue or purple insoluble formazan crystals. The quantification of formazan crystals converted by metabolically active cells allows to measure cell proliferation.²⁸ In each experiment, cancer cells were deposited in 48-well plates and incubated with increasing concentrations of the tested compounds. Following this, cell proliferation was assessed and analyzed using the Mamede *et al*²⁹ technique. Sigmoid fitting was used to determine the IC₅₀ values, and results are expressed as percentage of cell proliferation correlated with control experiments.

The cytotoxic effects of the reference cytostatic used in conventional chemotherapy regimens were obtained with Alamar Blue assay (**Table 3**)

6.2. Results and Discussion

Observing **Table 3** we can conclude that none of the compounds showed a significant activity on H1299 cell lines at the tested concentrations (> 75 µM). The same can be concluded for compounds activity on A549 cell lines, except for compound **2** which showed an IC₅₀ value of 10.84 (1.8 times lower IC₅₀ value than Cisplatin, and 4.3 times lower IC₅₀ value than Etoposide), showing promising antiproliferative activity. By comparing IC₅₀ values of compound **2** with the reference conventional chemotherapy cytostatic, we inferred that the new compound has higher anti proliferation activity in A549 cell lines.

The difference between compound **2** activity in the two cell lines can probably be due to the different characteristics of these lines, with A549 cells having more epithelial characteristics, and express more COX-2 than H1299 cells, while H1299 cells have more mesenchymal characteristics and less effective epithelial marker expression.³⁰

Figure 4 shows that in A549 cell lines as the concentration of compound **2** rose, cell proliferation decreased, which we can conclude that the antiproliferative activity of compound is dose dependent. Looking at the outcomes of the *in vitro* assay in human whole blood to assess COX-2 inhibition and this assay, it can be state that the cytostatic activity may not be totally dependent on the inhibition of COX-2 activity, since *in vitro* assay in human whole blood

a concentration of 100 μM was used, and only $49 \pm 6\%$ inhibition of COX-2 was observed. Nevertheless, for this test the maximum concentration that was used of compound **2** was 2 μM , at this concentration cell proliferation decreased about 80%. This could be possibly as a result of the COX-independent pathway of the anti-proliferative effect.

Table 3 – IC₅₀ values obtained for cell lines after exposure to the studied compounds. Cell proliferation was determined by MTT assay.

Compounds	A549			H1299	
	IC ₅₀ (μM)	R2	95% CI	IC ₅₀ (μM)	R2
2	10.84	0.82	[0.93;24.37]	> 75 μM	-
4	> 75 μM	-	-	> 75 μM	-
6	> 75 μM	-	-	> 75 μM	-
8	> 75 μM	-	-	> 75 μM	-
10	> 75 μM	-	-	> 75 μM	-
Cisplatin ¹⁾	19.4	-	-	14.5	-
Carboplatin ¹⁾	>500 μM	-	-	>500 μM	-
Etoposide ¹⁾	46.5	-	-	229.3	-

1) IC₅₀ values obtained with Alamar Blue assay.

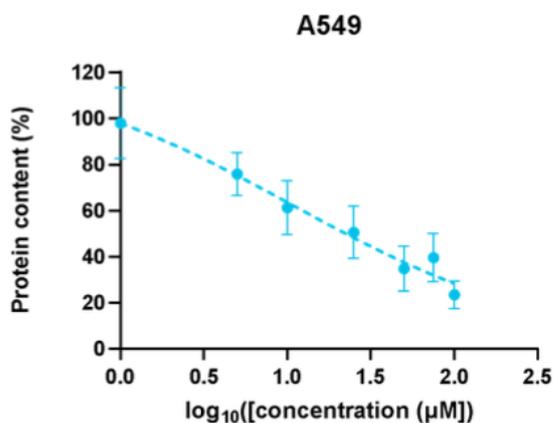


Figure 4 – Effect of compound **2** on lung cancer (A549), Cell proliferation was evaluated as a measure of metabolic activity, by colorimetric MTT assay.

7. Conclusion

To further explore the COX-2 enzyme inhibitory properties of 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid amides, five new compounds were synthesized from reacting 3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) acrylic acid with five different amines using a simple one-step reaction, monitored by TLC.

The synthesized compounds showed a high degree of purity after being subjected to conventional purification techniques. These compounds were characterized by NMR spectrum, and melting points were determined. The yields of the reactions were similar to those verified previously for the same type of compounds.

In summary, the inhibitory activity, of the compounds against COXs was studied. It was observed that all compounds had a lower activity in COX-2 inhibition, compared to the corresponding acid, and compound **4** was found to be the most effective in COX-2 inhibition. Compound **2** showed cytostatic activity in A549 cell lines and was even higher than that of cisplatin and etoposide, two reference compounds used in lung cancer chemotherapy. The results obtained did not allow us to rule out that COX-independent mechanisms play a significant role in the inhibition of cancer cell growth, which warrants further investigation.

8. References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492.
2. Araujo LH, Horn L, Merritt RE, Shilo K, Xu-Welliver M, Carbone DP. **Cancer of the Lung: Non-Small Cell Lung Cancer and Small Cell Lung Cancer.** Sixth Edit. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-323-47674-4.00069-4.
3. Prasetya RA, Metselaar-Albers M, Engels F. **Concomitant use of analgesics and immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: A pharmacodynamics perspective.** *Eur J Pharmacol.* 2021;906:174284. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174284.
4. Liu R, Xu KP, Tan GS. **Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed.** *Eur J Pharmacol.* 2015;769:127-133. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.007.
5. Guo Y, Nie Q, MacLean AL, Li Y, Lei J, Li S. **Multiscale modeling of inflammation-induced tumorigenesis reveals competing oncogenic and oncoprotective roles for inflammation.** *Cancer Res.* 2017;77(22):6429-6441. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1662.
6. Hirata T, Narumiya S. Prostanoid receptors. *Chem Rev.* 2011;111(10):6209-6230. doi:10.1021/cr200010h.
7. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. **Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis.** *FEBS Lett.* 1995;372(1):83-87. doi:10.1016/0014-5793(95)00956-a.
8. Jara-Gutiérrez Á, Baladrón V. **The role of prostaglandins in different types of cancer.** *Cells.* 2021;10(6). doi:10.3390/cells10061487.
9. Pannunzio A, Coluccia M. **Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: A review of oncology and medicinal chemistry literature.** *Pharmaceuticals.* 2018;11(4):1-20. doi:10.3390/ph11040101.
10. Ricciotti E, FitzGerald GA. **Prostaglandins and inflammation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):986-1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449.
11. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. **Cyclooxygenases: structural, cellular, and**

- molecular biology.** *Annu Rev Biochem.* 2000;69:145-182. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145.
12. Xiao Y, Wang J, Qin Y, et al. **Ku80 cooperates with CBP to promote COX-2 expression and tumor growth.** *Oncotarget.* 2015;6(10):8046-8061. doi:10.18632/oncotarget.3508.
 13. Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, et al. **Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas.** *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999;5(5):1001-1005.
 14. Pu D, Yin L, Huang L, et al. **Cyclooxygenase-2 Inhibitor: A Potential Combination Strategy With Immunotherapy in Cancer.** *Front Oncol.* 2021;11(February):1-7. doi:10.3389/fonc.2021.637504.
 15. Li J, Hao Q, Cao W, Vadgama J V., Wu Y. **Celecoxib in breast cancer prevention and therapy.** *Cancer Manag Res.* 2018;10:4653-4667. doi:10.2147/CMAR.S178567.
 16. Saxena P, Sharma PK, Purohit P. **A journey of celecoxib from pain to cancer.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2020;147:106379. doi:10.1016/j.prostaglandins.2019.106379.
 17. Simmons DL, Botting RM, Hla T. **Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.** *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387-437. doi:10.1124/pr.56.3.3.
 18. Walker C. **Are All Oral COX-2 Selective Inhibitors the Same? A Consideration of Celecoxib, Etoricoxib, and Diclofenac.** *Int J Rheumatol.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/1302835.
 19. Maroon JC, Bost JW, Maroon A. **Natural anti-inflammatory agents for pain relief.** *Surg Neurol Int.* 2010;1:80. doi:10.4103/2152-7806.73804.
 20. Desai SJ, Prickril B, Rasooly A. **Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer.** *Nutr Cancer.* 2018;70(3):350-375. doi:10.1080/01635581.2018.1446091.
 21. Ehrlich EW, Dallob A, De Lepeleire I, et al. **Characterization of rofecoxib as a cyclooxygenase-2 isoform inhibitor and demonstration of analgesia in the dental pain model.** *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65(3):336-347. doi:10.1016/S0009-9236(99)70113-X.
 22. de Groot DJA, de Vries EGE, Groen HJM, de Jong S. **Non-steroidal anti-**

- inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic.** *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;61(1):52-69. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.07.001.
23. Smalley WE, DuBois RN. **Colorectal Cancer and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs.** In: August JT, Anders MW, Murad F, Coyle J, eds. Vol 39. **Advances in Pharmacology.** Academic Press; 1997:1-20. doi:https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60067-8.
 24. Ribeiro D, Poença C, Varela C, et al. **New phenolic cinnamic acid derivatives as selective COX-2 inhibitors. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationships.** *Bioorg Chem.* 2019;91(August):103179. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103179.
 25. Ge Y-X, Wang Y-H, Zhang J, et al. **New cinnamic acid-pregnenolone hybrids as potential antiproliferative agents: Design, synthesis and biological evaluation.** *Steroids.* 2019;152:108499. doi:10.1016/j.steroids.2019.108499.
 26. Blain H, Boileau C, Lapicque F, et al. **Limitation of the in vitro whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use.** *Br J Clin Pharmacol.* 2002;53(3):255-265. doi:10.1046/j.0306-5251.2001.01533.x.
 27. Knights KM, Mangoni AA, Miners JO. **Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: Implications for understanding toxicity.** *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2010;3(6):769-776. doi:10.1586/ecp.10.120.
 28. Pires AS, Varela CL, Marques IA, et al. **Oxymestane, a cytostatic steroid derivative of exemestane with greater antitumor activity in non-estrogen-dependent cell lines.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2021;212(March). doi:10.1016/j.jsbmb.2021.105950.
 29. Mamede AC, Guerra S, Laranjo M, et al. **Selective cytotoxicity and cell death induced by human amniotic membrane in hepatocellular carcinoma.** *Med Oncol.* 2015;32(12). doi:10.1007/s12032-015-0702-z.
 30. Huang H, Chetyrkina M, Wong C, et al. **Identification of potential descriptors of water-soluble fullerene derivatives responsible for antitumor effects on lung cancer cells via QSAR analysis.** *Comput Struct Biotechnol J.* 2021. doi:10.1016/j.csbj.2021.01.012.